



PRÓLOGO

La Asociación Mexicana de Microscopía A.C., (AMM) se fundó hace casi treinta años, en el mes de noviembre del año 1992. A partir de esa fecha, la AMM ha promovido y divulgado el uso de la microscopía en sus varios modos de operación, como una herramienta en diferentes campos del conocimiento, haciendo énfasis en las áreas de las Ciencias Biológicas y Médicas y la Ciencia de los Materiales. En esta ocasión, los miembros de la mesa directiva nos sentimos honrados en formar parte de la edición especial de la revista +*Ciencia* con motivo de su décimo aniversario. Esta revista de divulgación científica, desarrollada principalmente por estudiantes de la Facultad de Ingeniería, es editada por la Universidad Anáhuac México, Campus Norte. En este volumen especial de la revista +*Ciencia*, la AMM ha contribuido con artículos de divulgación relacionados con temas de actualidad de la microscopía electrónica de transmisión y de barrido y técnicas analíticas asociadas. Los temas que se han incluido como parte de esta colaboración tienen como objetivo dar a conocer los alcances de la microscopía electrónica a estudiantes, académicos y personas del sector industrial, interesadas en caracterizar muestras a nivel micrométrico y nanométrico. Los artículos forman parte de una serie de seminarios impartidos en las instalaciones de la Universidad Anáhuac México y en formato híbrido, durante el Curso Nacional “Perspectivas de la Microscopía Moderna en México”. Al mismo tiempo, aprovechamos la oportunidad para promover la serie de cursos mensuales que organiza la AMM y para la promoción de la edición XVI del Congreso del Comité Interamericano de Sociedades de Microscopía (CIASEM) a celebrarse en la Ciudad de Oaxaca del 24 al 28 de octubre de 2022 (<http://ciasem2022.com/>). Agradecemos a todos los lectores de la revista +*Ciencia* y a la hospitalidad por parte de la Universidad Anáhuac México, Campus Norte, en particular a la Dra. María Elena Sánchez Vergara y al Dr. Víctor Manuel López Sánchez por su apoyo brindado a la AMM.



18 El microscopio electrónico de transmisión y la biología celular • 23 Microscopía electrónica de transmisión *in situ* • 28 La microscopía electrónica de barrido en las ciencias agrícolas y pecuarias • 33 Importancia de la caracterización microestructural por microscopía electrónica de barrido en los materiales de construcción • 36 La técnica de espectroscopía de dispersión de energía como auxiliar para conocer mejor los materiales • 40 ¿Preparar o no a los especímenes biológicos para estudiarlos con el microscopio electrónico de barrido?





EL MICROSCOPIO ELECTRÓNICO DE TRANSMISIÓN Y LA BIOLOGÍA CELULAR

LUIS FELIPE JIMÉNEZ GARCÍA, MARÍA DE LOURDES SEGURA VALDEZ
UNAM, Facultad de Ciencias, Departamento de Biología Celular



Microscopio electrónico de transmisión. La columna central contiene lentes electromagnéticas y los electrones se producen en la parte superior del instrumento.

Resumen

Desde su invención, el microscopio electrónico ha sido utilizado en el estudio de la estructura fina de la materia viva y no viva con un detalle de dimensiones de micrómetros y nanómetros, es decir, para el estudio de la ultraestructura. Los microscopios electrónicos pueden ser de barrido o de transmisión. En este trabajo se exponen algunas aplicaciones del microscopio electrónico de transmisión en las ciencias biológicas, haciendo énfasis en su papel en estudio de las estructuras de la célula que permitió la consolidación de la biología celular.



Introducción

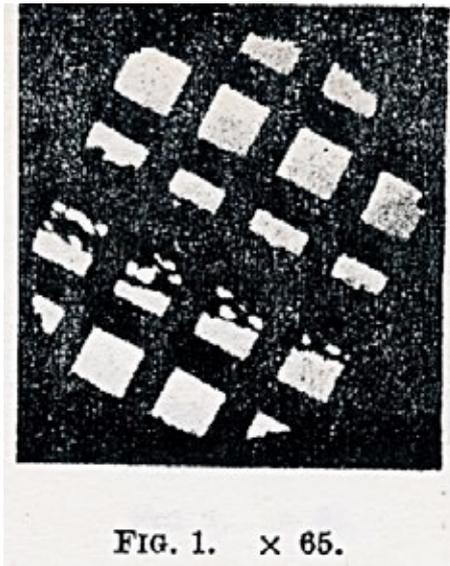
Los microscopios ópticos utilizan luz y lentes de vidrio para generar imágenes a partir de objetos con detalles de hasta $0.2 \mu\text{m}$. Si se utilizan electrones en lugar de luz y lentes electromagnéticas en lugar de las de vidrio, se pueden obtener imágenes de objetos cuyos detalles pueden ser mucho más pequeños, hasta de unos $0.005 \mu\text{m}$. Con la idea de superar la limitación que impone el uso de la luz como fuente de energía en un microscopio, se inventó el microscopio electrónico hace 90 años, en 1932. Gracias a su invento fue posible pasar de un análisis en la dimensión de micrómetros a la dimensión de fracciones de micra e incluso en el nivel de los nanómetros y angstroms. Al paso de los años, se desarrollaron los dos tipos de microscopios electrónicos que conocemos hoy en día, es decir: 1) el microscopio electrónico de transmisión (TEM, por sus siglas en inglés) y 2) el microscopio electrónico de barrido (SEM, por sus siglas en inglés). El TEM nos permite el estudio de la estructura interna de las muestras, en tanto que el SEM permite el análisis de la estructura de la superficie.

La capacidad del microscopio electrónico para obtener una resolución muy superior a la del microscopio óptico o de luz favoreció su utilización en el estudio de la estructura fina de la materia, tanto no viva como viva, en particular el estudio de la organización interna de la unidad estructural de los seres vivos, la célula.

Primeros estudios de material biológico con el TEM

Desde el siglo XVII, tanto R. Hooke como A. van Leeuwenhoek observaron células con el microscopio óptico. Durante el siglo XIX, T.

Schwann y M. Schleiden postularon la Teoría Celular proponiendo que todos los seres vivos están formados por células. En efecto, esta fue la primera teoría robusta que fue configurando a la biología como una ciencia. Ello promovió el estudio de la estructura de una gran cantidad de especies biológicas con el microscopio óptico, fortaleciendo esa teoría. Sin embargo, debido a la limitación del poder de resolución de los microscopios, no fue posible avanzar en el conocimiento de su estructura fina que ayudara a comprender su función a mayor profundidad. Además, el material tenía que ser preparado para obtener rebanadas muy delgadas, de unas cuantas micras o micrómetros de espesor, por las que pudiera ser transmitida la luz que irradia a la muestra. Debido a falta de color en las muestras biológicas, fue necesario desarrollar también técnicas de tinción que facilitaran distinguir entre unos componentes de la célula y otros. Por ello, cuando se inventa el microscopio electrónico por Max Knoll y Ernst Ruska, se abre la posibilidad de estudiar a la célula en su estructura interna fina. En efecto, poco después de su invención a principios de los años 1930, Marton en Bélgica preparó la primera muestra biológica que observó con el microscopio electrónico de transmisión. El profesor Marton utilizó una rebanada de una hoja de la plata carnívora *Drosera intermedia*. Aunque solamente observó con 65 aumentos del tamaño real, la imagen resultante mostraba una resolución o nitidez muy superior a la lograda hasta entonces con los microscopios ópticos más potentes. En la imagen se observa una rejilla o soporte de la muestra y una sección de la hoja en donde se aprecian células de la epidermis.



Primera imagen de una muestra biológica registrada con el microscopio electrónico de transmisión en 1932. Se trata del corte de una hoja de una planta colocado sobre una malla de metal.

Durante el siglo xx

La utilización del microscopio electrónico de transmisión también permitió por primera vez observar la estructura de los virus, hasta entonces solamente concebidos como entidades patógenas intangibles relacionados con la palabra veneno. Una de las primeras observaciones la realizó el profesor Thomas Anderson a principios de los años 1940, con los virus bacteriófagos T4. Las imágenes de la estructura del virus obtenidas con el TEM eran tan complejas que les sugirieron que parecían renacuajos. Desde entonces la microscopía electrónica de transmisión ha facilitado el estudio de la diversidad morfológica de los virus.

Posteriormente, siguieron estudios de la estructura de las células y de los tejidos. Muy pronto se notó que, para estudiar la estructura interna de las células con el TEM, era necesario llevar a cabo una preparación de la muestra que 1) generara cortes o rebanadas muy delgadas por las cuales los electrones pudieran ser transmitidos, que 2) eliminara restos de líquido,

debido a que las muestras se introducen en una cámara de vacío y que 3) fuera resistente al impacto de un haz de electrones acelerados. Adicionalmente, las muestras biológicas contienen mayormente átomos de número atómico bajo, por lo que son casi transparentes a los electrones, lo que hizo necesario añadirles de manera selectiva átomos de elevado número atómico, que añadieran contraste adicional a las muestras. Por lo anterior, se requirieron de varias décadas para lograr que las muestras a observar fueran cortadas en rebanadas muy finas, de unas fracciones de micrómetro de espesor —entre 30 y 90 nanómetros—, que fueran estables al impacto del haz de electrones y que se extrajera todo el líquido de ellas.

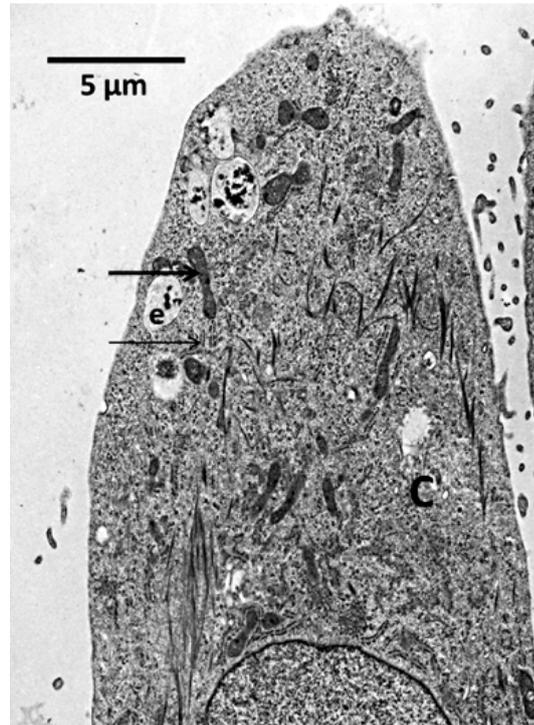
Así, surgió un procedimiento estándar para la preparación de muestras biológicas para su observación con el microscopio electrónico de transmisión. También, a lo largo del tiempo, se diseñaron variantes a ese procedimiento estándar, tanto para la observación de diferentes tipos de muestra como para el estudio de la composición y localización de moléculas específicas.

La microscopía electrónica y la biología celular

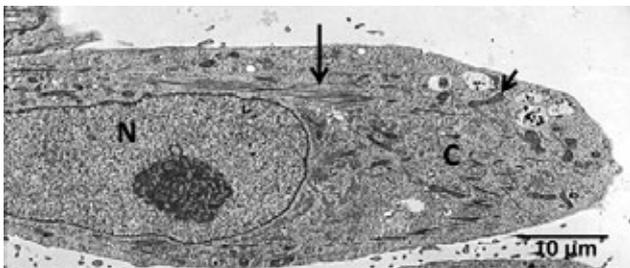
El uso de una técnica estándar para microscopía electrónica de transmisión en ciencias biológicas contribuyó definitivamente a conocer la estructura fina de la célula. Por ejemplo, se detalló la estructura de la mitocondria y se descubrió la presencia de las llamadas crestas mitocondriales, esenciales para entender la respiración celular. El retículo endoplásmico rugoso y el aparato de Golgi que, aunque fueron observados por primera vez en 1902 y 1898 respectivamente, fue hasta la década de los años 1950 que se confirmó su existencia con el uso del microscopio electrónico de transmisión. Asimismo, gracias al uso de este instrumento se confirmó la presencia de ve-



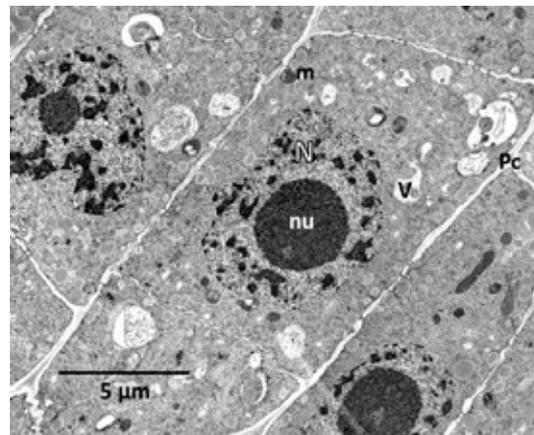
sículas y microvesículas relacionadas con el transporte de moléculas por la ruta secretora, de la que forman parte esos organelos. Del mismo modo, fue posible observar las partículas nanométricas relacionadas con diferentes eventos del metabolismo como la transcripción, la cadena respiratoria o el sustrato morfológico de la fotosíntesis, i.e, los tilacoides del cloroplasto. Asimismo, el procedimiento de observación de estructuras aisladas como la ATP sintasa, el DNA y el RNA o las proteínas. De manera notable, otros hallazgos como el descubrimiento del ribosoma por G. Palade y el retículo endoplásmico por K. Porter, realizados con el microscopio electrónico de transmisión, permitieron el surgimiento de la biología celular como una disciplina encaminada a estudiar la célula normal y la célula patológica. También se pudieron describir con este instrumento, los lisosomas, los microcuerpos o la estructura fina del nucléolo, organelo en donde se producen los ribosomas citoplásmicos en eucariontes, esenciales para la producción de proteínas en todos los seres vivos.



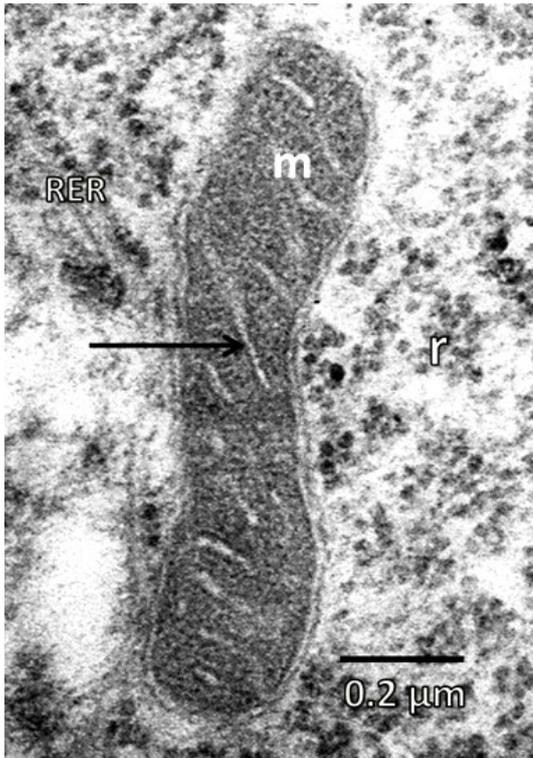
Ultraestructura a mayor aumento de citoplasma (C) de una célula humana muestra varios organelos y estructuras submicroscópicas como el retículo endoplásmico rugoso, que está señalado por la flecha delgada. También se observan mitocondrias (flecha gruesa) y endosomas. (e) El citoplasma contiene abundantes partículas que corresponden a los ribosomas.



Micrografía electrónica de una célula humana. En el núcleo (N) y en el citoplasma (C) se observan diferentes estructuras. En el citoplasma las flechas pequeñas señalan a las mitocondrias. La flecha más grande señala el citoesqueleto.



Micrografía electrónica de transmisión de una célula de la hoja de la planta teocintle (*Zea perennis*). Se observa la estructura interna que consta de núcleo (N) y nucléolo (nu), vacuola (V), mitocondria (m) y pared celular (Pc). La línea indica la escala de 5 μm que permite calcular la longitud de la célula en unas 20 μm.



Ultraestructura de una mitocondria (m). Este organelo está recubierto por dos membranas. La flecha señala una cresta mitocondrial en donde ocurre la cadena respiratoria. Fuera de este organelo hay retículo endoplásmico rugoso (RER) y ribosomas (r) en donde se lleva a cabo la síntesis de las proteínas

¿Qué contienen las estructuras submicroscópicas?

Adicionalmente al estudio de la estructura de las células y de los tejidos, la producción de mapas moleculares o químicos *in situ* ha sido un área de desarrollo. Para ello, se han producido variantes del procedimiento estándar de preparación de muestras. Combinadas con la utilización de marcadores químicos o con sondas moleculares como anticuerpos y secuencias de ácidos nucleicos, surgieron técnicas de localización de ácidos nucleicos y proteínas que han contribuido a la generación de mapas moleculares relacionados con la expresión génica. Tal es el caso de la inmuno-

microscopía electrónica y de la hibridación *in situ* ultraestructural de ácidos nucleicos. Con ello, es posible conocer la composición *in situ* de estructuras submicroscópicas celulares que contienen genes y los productos de su expresión, como las nanorribonucleoproteínas (nanoRNP).

Perspectivas

Las nuevas técnicas como la criomicroscopía electrónica ya señalan un desarrollo sobre el conocimiento de las estructuras celulares a nivel de resolución molecular dentro de la célula, tanto procarionte como eucarionte. Sin duda, los avances se encaminan al conocimiento a nivel molecular de las estructuras celulares, así como a su composición de genes y sus productos de expresión, lo que permitirá el conocimiento de las funciones específicas en la vida de las células. Hoy en día el estudio de los territorios intracelulares relacionados con la organización de los genomas y sus productos en forma de RNA y/o proteínas son motivo de análisis.

Agradecemos el apoyo técnico de la Bióloga Sarai Cruz Gómez y del Biólogo Diego García Dimas, por la preparación de la muestra de teocintle.

Referencias

- Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Morgan, D., Raff, M., Roberts, K., & Walter, P. (2015). *Molecular biology of the cell*, 6th ed. Garland Science.
- Fawcett, D. W. (1981). *The cell*, 2nd ed. Saunders.
- Marton, L. (1934). Electron microscopy of biological objects. *Nature*, 133, 911.
- Pollard, T. D., Earnshaw, W. C., Lippincott-Schwartz, J., & Johnson, G. T. (2017). *Cell Biology*, 3rd ed, Elsevier.
- Porter, K. R., & Bonneville M. A. (1973). *Fine structure of cells and tissues*, 4th ed. Lea and Febiger.



MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE TRANSMISIÓN *IN SITU*

ARTURO PONCE

University of Texas at San Antonio, Department of
Physics and Astronomy. San Antonio, Texas, 78249,
United States. E-mail: arturo.ponce@utsa.edu

La aberración corregida en microscopía electrónica de transmisión (Cs-TEM por sus siglas en inglés) ha sido por las últimas dos décadas y media la tendencia en la microscopía moderna. Las compañías que fabrican microscopios electrónicos han apostado por el camino de implementar correctores de aberraciones para conseguir resoluciones por debajo de 1 Angstrom ($<1 \text{ \AA}$). En este tiempo se han publicado artículos en revistas de alto prestigio donde la capacidad de resolver atómicamente la estructura de materiales ha contribuido de forma impactante en las ciencias básicas y aplicadas. Ejemplos como la detección de átomos aislados en capas monoatómicas de grafeno o la observación directa de la reconstrucción superficial de átomos en metales y semiconductores han revelado propiedades físicas y químicas de estos materiales funcionales. A este respecto podríamos preguntarnos: ¿Dónde está el límite de la resolución? Una respuesta asociada con las limitaciones de la detección de los electrones podría ser que estaría determinada por el radio del átomo de Bohr ($\sim 0.5 \text{ \AA}$) donde otros campos fascinantes de la física, como la mecánica cuántica, juegan un papel importante. Sin embargo, en retrospectiva, los fenómenos que ocurren en los materiales pueden ser estudiados a resoluciones de menor escala. Uno de los primeros ejemplos de observación a menor escala es el realizado por Robert Brown, un botanista inglés en el año 1827, usando un microscopio óptico. Su hallazgo consistió en registrar el movimiento de granos de polen dispersos en una solución, en donde observó que las partículas se movían dinámicamente y el cual es conocido como el movimiento Browniano en reconocimiento al Robert Brown. Inicialmente, el botanista pensó que las partículas deberían dejar de moverse en algún momento, pero eso no ocurrió. La explicación a este fenómeno no vino sino hasta 1905 cuando Albert Einstein describió de forma elegante el movimiento Browniano, teoría que contribuyó significativamente para sentar las bases de la teoría cinética en termodinámica. Este ejemplo es tan solo un caso donde la capacidad de registrar



un fenómeno dinámico en un microscopio da lugar a la formulación de una teoría científica. A la escala nanométrica hay una infinidad de fenómenos por entender, especialmente en materiales funcionales, donde la respuesta física de los materiales es su propiedad fundamental. Algunos ejemplos como la respuesta magnética en materiales o entender el mecanismo de transporte de carga en películas delgadas tienen aplicaciones en dispositivos microelectrónicos. Otros ejemplos como la transformación de fases cristalinas en metales variando la temperatura o la medición de propiedades mecánicas y eléctricas en materiales confinados a la nanoescala están directamente relacionadas con el desarrollo de nuevas tecnologías en la era moderna. Para llevar a cabo estos estudios dinámicos en el microscopio electrónico de transmisión es necesario usar portamuestras especiales que permitan estimular a los materiales de forma externa y registrar su evolución de forma dinámica en el microscopio. La realización de

experimentos en tiempo real dentro de la columna del microscopio electrónico de transmisión es conocida como *in situ* TEM. Los experimentos *in situ* TEM son un reto debido a que el ancho permitido de la pieza polar (lente objetiva) está reducido a unos pocos milímetros, especialmente los microscopios de alta resolución. Adicionalmente, las muestras objeto de estudio deben ser “electrón-transparentes” lo cual implica que las muestras deben ser adelgazadas a espesores por debajo de 100 nm para poder ser atravesadas por los electrones y coleccionar las imágenes. ¿Qué tipo de experimentos son posibles de realizar dentro del microscopio electrónico de transmisión? Básicamente podríamos categorizarlos en cinco tipos de experimentos: mecánicos, eléctricos, ópticos, magnéticos y a temperatura variable. La figura 1 muestra una ilustración del microscopio electrónico de transmisión y la región donde se insertan los portamuestras, así como el tipo de respuesta colectada en las cámaras digitales.

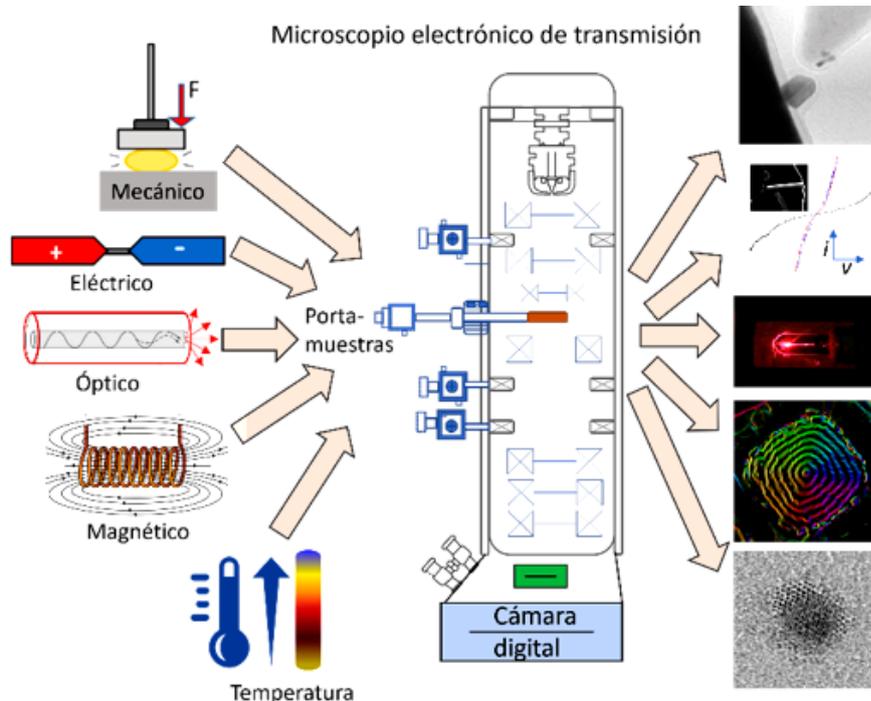


Figura 1. Diagrama esquemático de experimentos *in situ* TEM.



La alta resolución espacial que provee el microscopio electrónico de transmisión se colecta en el que se conoce como espacio real. Adicionalmente, se puede registrar el diagrama de difracción de electrones, análogo a los difractogramas que se obtienen por difracción de rayos X, conocido como el espacio recíproco. Los diagramas de difracción de electrones, a diferencia de los rayos X, se pueden colectar de regiones nanométricas de la muestra, entonces se graba no solo la imagen de la muestra sino su estructura en el espacio recíproco. Ambos espacios, real y recíproco, están directamente relacionados con la capacidad de resolución espacial del instrumento. Sin embargo, hay otro factor importante además del espacial y es el temporal. La resolución temporal depende de la rapidez con la que se registra la imagen o el difractograma. Antiguamente las imágenes eran grabadas en películas de emulsiones fotográficas en la que usaban unos pocos segundos de tiempo de exposición. Gracias al desarrollo de detectores digitales se ha podido colectar imágenes con mayor rapidez; sin embargo, sigue siendo un reto colectar imágenes a velocidades altas para monitorear por ejemplo la propagación de una grieta en un material que está siendo deformado mecánicamente. La propagación de defectos estructurales se lleva a cabo a velocidades cercanas a la velocidad del sonido (~ 300 m/s), dependiendo de cual material se estudie. Haciendo un cálculo aproximado, si uno quiere grabar los eventos que ocurren en una región de análisis de 300 nm^2 a la velocidad del sonido, la cámara debería registrar aproximadamente miles de cuadros por segundo, dicha resolución temporal es un reto. Por otro lado, las cámaras usadas para detectar electrones son convencionalmente cámaras que convierten los electrones en luz a través de un dispositivo de centelleo en contraste con las cámaras de luz que son mucho más rápidas como son las cámaras de balística. Actualmente hay cámara de detección directa de

electrones, que permite grabar imágenes en el rango de milisegundos. La resolución temporal es importante en microscopía *in situ* porque la respuesta de los materiales al ser estimulados externamente debe grabarse en tiempo real. Finalmente, el último aspecto importante a considerar en la microscopía *in situ* es el control del daño por radiación con electrones. Los electrones son acelerados a energías muy altas, del orden de 200 mil volts, lo cual puede producir un deterioro en los materiales objeto de estudio. Por otro lado, los electrones se pueden usar como una fuente de radiación para generar un efecto en las muestras y hacer microscopía *in situ* con el mismo haz de electrones. Entonces la radiación puede controlarse reduciendo la densidad de corriente (número de electrones por área), pero la iluminación es pobre y los detectores requieren también una alta sensibilidad para registrar menores eventos de choques de electrones con el detector.

Las descripciones antes dadas, resolución espacial y temporal, y límite de detectabilidad configuran un instrumento sumamente costoso y complejo. No obstante, como mencioné anteriormente, la alta resolución es un factor que para la microscopía *in situ* TEM puede ser menor. Eso alienta a los microscopistas a mirar hacia la posibilidad de adquirir portamuestras capaces de realizar experimentos en los microscopios convencionales y en la actualización de los detectores. La microscopía *in situ* TEM es un campo abierto a explorar para el estudio dinámico de materiales. En la Universidad de Texas en San Antonio hemos enfocado nuestros esfuerzos en la realización de experimentos *in situ* para estudiar propiedades mecánicas, eléctricas y magnéticas en materiales fabricados a la nanoescala. La figura 2 (izquierda) muestra un esquema del portamuestras usado para los experimentos mecánicos/eléctricos, el cual consiste en una punta de microscopía de fuerza atómica (AFM) acoplada a un circuito eléctrico, esta punta es



deflectada mecánicamente y la fuerza se registra en controlador. La sucesión de imágenes se colecta en tiempo real y cada imagen (colectadas a 300 ms) se analiza para estudiar la deformación, para finalmente construir la curva esfuerzo-deformación. En experimento que se muestra a la derecha de figura 2 se combinan las pruebas *in situ* TEM mecánicas y eléctricas realizadas en un nanowire de plata. En ese trabajo hemos identificado un cambio en el compartimento eléctrico del nanowire de plata al mismo tiempo que está siendo deformado mecánicamente, hasta alcanzar su deformación plástica [1].

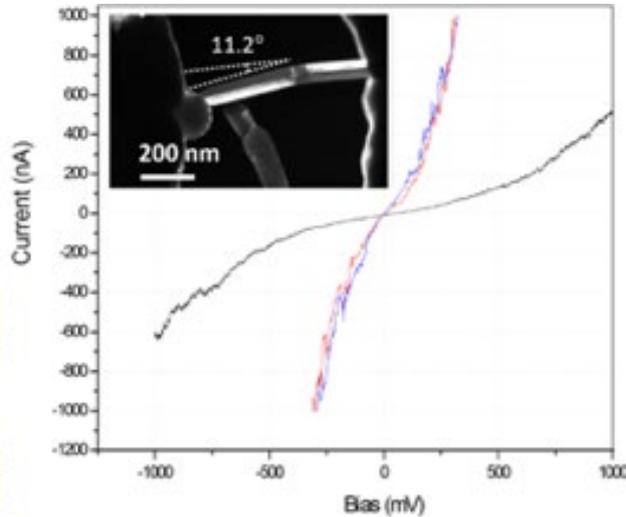
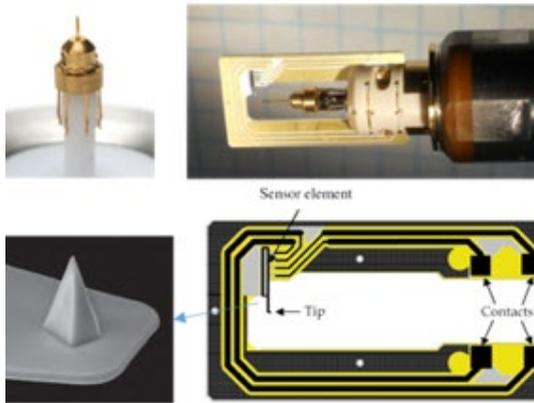


Figura 2. Experimento *in situ* TEM mecánico-eléctrico en nanowires de plata [1].

Otro campo que hemos estudiado desde hace unos años es el nanomagnetismo en materiales. Los materiales con propiedades magnéticas estudiados de forma tradicional de la tabla periódica son el hierro, el cobalto y el níquel. Pero al confinarlos a la nanoescala sus estados magnéticos dependen del tamaño y la forma de los objetos. Las aplicaciones son muy diversas, desde la fabricación de dispositivos de almacenamiento de memoria hasta el uso de nanopartículas en aplicaciones biomédicas. Describir el comportamiento magnético de dichos materiales se realiza con magnetometría *in situ* TEM. En esta técnica usamos un biprisma de electrones para obtener hologramas, las muestras son estimuladas magnéticamente con las bobinas magnéticas del lente objetivo hasta alcanzar su saturación magnética. La holografía con electrones permite registrar los potenciales magnetostáticos y electrostáticos de materiales a través de la recuperación de la fase de los electrones. Dicha fase recuperada permite visualizar los campos y dominios magnéticos a esta escala. El conjunto de imágenes de la figura 3 muestra los comportamientos magnéticos de diferentes materiales a la na-

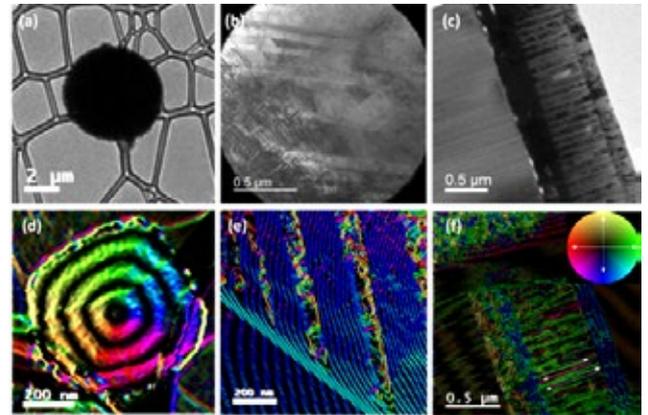


Figura 3. Micrografías de campo brillante tomadas por TEM: (a) nanoplate de permalloy (FeNi), (b) microestructura de material cerámico Ni₂MnGa, (c) arreglo bidimensional de alambres de níquel. Respectivos comportamientos magnéticos registrados por holografía con electrones después de alcanzar la saturación magnética con el lente objetivo del microscopio: (d) estado de vórtice del nanoplate de permalloy, (e) dominios magnéticos en la microestructura y (f) contorno magnético en la dirección de los alambres de plata [2, 3].



noescala [2, 3]. Por ejemplo, el estado del disco de permaloy (FeNi) es un estado de vórtice, donde el campo se encuentra encerrado en el disco y no hay líneas de campo fuera de él.

En resumen, en este artículo he pretendido mostrar el panorama de experimentos que se pueden realizar dentro de la columna de un microscopio electrónico de transmisión con la idea de despertar el interés en estudiantes interesados en materiales funcionales y sus potenciales aplicaciones tecnológicas. Los avances en esta dirección, *in situ* TEM, seguirán siendo sin duda una tendencia en la microscopía electrónica de transmisión de la presente década y seguirá teniendo relevancia a futuro al mismo tiempo que se hacen desarrollos modernos respecto a la resolución espacial

y temporal, así como en los límites de detección de electrones. Finalmente, regresando al ejemplo observado por Robert Brown, la observación en tiempo real de fenómenos a la nanoescala nos ayudará a entender y describir propiedades físicas de los materiales funcionales y tener impacto en las nanociencias y nanotecnología.

Referencias

- [1] Ochoa *et al.* (2019). *Nanopart. Res.*, 21 (1).
- [2] Ortega *et al.* (2018). *Microsc. Microanal.*, S1, 24, 952.
- [3] Ortega *et al.* (2018). *AIP Advances* 8. 056813.

A continuación, presentamos algunas fotografías del Dr. Arturo Ponce, con sus brillantes estudiantes trabajando en el microscopio electrónico de transmisión de su institución.





LA MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE BARRIDO EN LAS CIENCIAS AGRÍCOLAS Y PECUARIAS

HILDA ARACELI ZAVALETA MANCERA, AMELIA LÓPEZ HERRERA
Colegio de Postgraduados en Ciencias Agrícolas,
Km. 36.5 Carretera México-Texcoco, C.P. 56230, Texcoco, Estado de México.
arazavaleta@colpos.mx, lopez.amelia@colpos.mx

Resumen

En el presente ensayo se exploran algunas aplicaciones del Microscopio Electrónico de Barrido (MEB) en la investigación agrícola y pecuaria, dejando evidencia de la gran utilidad de esta técnica en la solución de problemas en el campo para la producción de alimentos inocuos y de calidad, de origen vegetal y animal. La aplicación de esta técnica se extiende a los estudios de poscosecha para el manejo, transporte y exportación de productos hortícolas. El potencial del MEB para el campo mexicano es enorme y prometedor.

Introducción

¿Qué es un microscopio?

Alguna vez hemos usado una lupa para observar cosas más pequeñas de lo que el ojo humano ($< 0.2 \text{ mm}$) puede percibir. Así los microscopios fotónicos usan lentes de vidrio y la luz como fuente de iluminación. En contraste, los microscopios electrónicos usan lentes electromagnéticas y electrones (\bar{e}) como fuente de iluminación, los cuales pueden observar objetos más pequeños que las bacterias ($1 \mu\text{m}$), como los virus (100 nm) y nanopartículas. Recordemos que un nanómetro es unas mil millonésimas (0.000000001 m) parte del metro (1×10^{-9}).

¿Qué es un Microscopio Electrónico de Barrido?

El Microscopio Electrónico de Barrido (MEB) ilumina o bombardea la muestra con un haz de \bar{e} que la recorre de un lado a otro, y la imagen se genera cuando los \bar{e} secundarios, emitidos de la muestra, son captados por un detector y convertidos en una imagen analógica o virtual con una gran profundidad de campo que da impresión de ser 3D sin serlo (Figura 1).

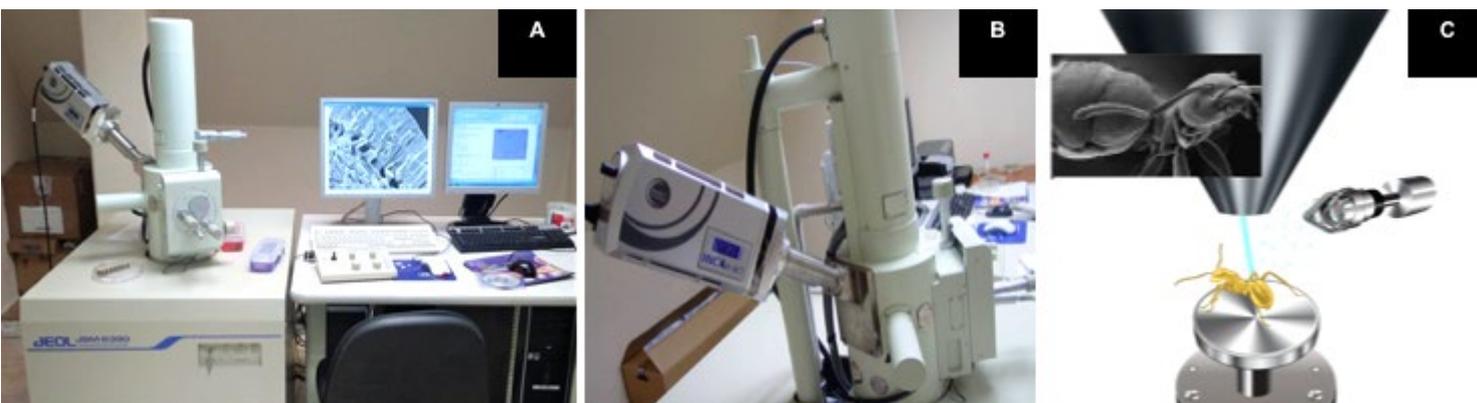


Figura 1. Microscopio Electrónico de Barrido convencional JSM 5690 (JEOL, Japón), alto vacío, con EDS (INCAx-act, Oxford Instrument) acoplado. Resolución 3 nm. A y B (MEB de la Unidad de Microscopía Electrónica, COLPOS, Montecillo); C. Formación de la imagen en un MEB por e^- secundarios (imagen C tomada de https://myscope-explore.org/2_9_howistheimagemade.html).

¿Por qué el MEB es una herramienta en la investigación agrícola y pecuaria?

El MEB aporta información valiosa sobre la micromorfología externa e interna de estructuras vegetales y animales, lo cual puede impactar en el estudio de plagas y enfermedades agropecuarias, hasta la tecnología poscosecha como se revisará a continuación.

Caracteres estructurales

La estructura del polen puede ser usada para la identificación de plantas. Es conocido que el polen es fuente común de alergias causadas por proteínas que se ubican en la pared del grano de polen (Figura 2).

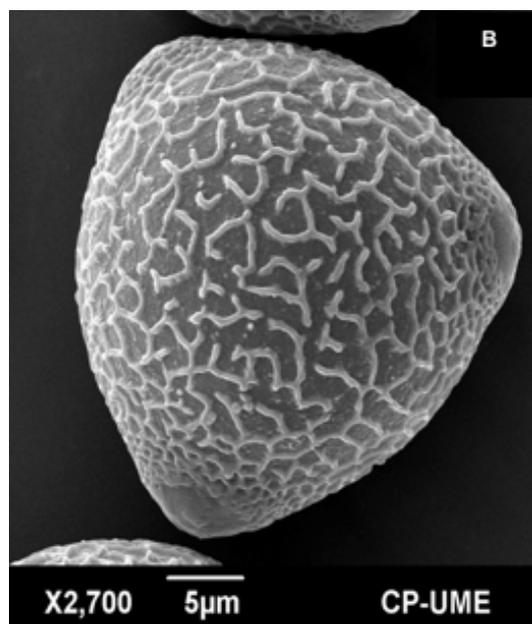
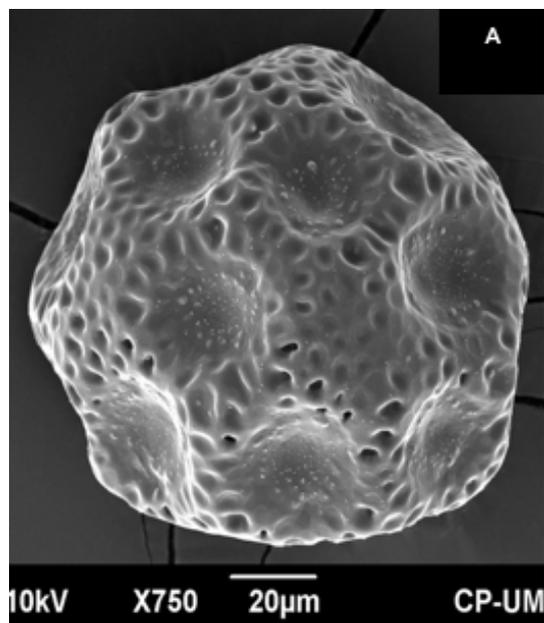


Figura 2. Microestructura de granos de polen. A. Grano de polen de nopal (*Opuntia* spp.); B. Grano de polen del árbol de Colorín (*Erythrina coralloides*) con Microscopía Electrónica de Barrido (JEM-6390) resolución de 3 nm. Imagen generada en el Laboratorio de Microscopía Electrónica del Colegio de Postgraduados (COLPOS).

Enfermedades en cultivos

El MEB es una herramienta valiosa para la observación, caracterización e identificación de los agentes causales de enfermedades en cultivos que ocasionan grandes pérdidas en el campo. Por ejemplo, México es el 2.º productor mundial de chile verde (*Capsicum annum*) con 3,324,260 ton anuales y hoy es el 1.º exportador mundial (1). El tipo de chile de mayor producción en el país es el jalapeño, seguido por el morrón y el poblano. Por ejemplo, con



técnicas moleculares y microscópicas se identificaron dos hongos que causan la pudrición en plántulas de chile poblano representando grandes pérdidas económicas (2) (Figura 3).

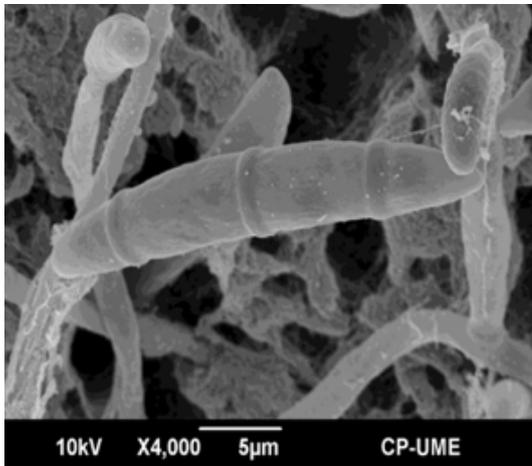


Figura 3 Micrografía electrónica de barrido de macroconidias de *Fusarium oxysporum* y *F. solani* hongos causantes de la pudrición de plántulas de chile poblano. (Cortesía: Hilda Victoria Silva Rojas y Maly N. Rivera-Jiménez, COLPOS, Montecillo).

Plagas y parásitos de cultivos

Un insecto plaga que daña las plantaciones comerciales de soya (*Glycine max* L. Merr.) es el picudo de la soya, *Rhyssomatus nigerrimus* Fahraeus, un curculiónido que posee en sus antenas una diversidad de sensilas que le sirven para localizar a la pareja, alimento y sitios de ovoposición (3) (Figura 4).

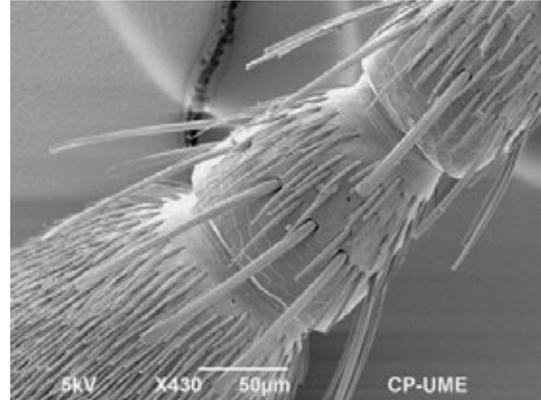


Figura 4. Antenas y sensilas de *R. nigerrimus*, observadas con Microscopía Electrónica de Barrido. Estas estructuras están formadas por un escapo, un pedicelo y un flagelo de nueve segmentos. Cortesía: Juan Cibrián-Tovar y Elsy María Delgado-García, COLPOS, Montecillo.

Los ácaros son arácnidos extremadamente pequeños (< 1 mm) que son parásitos y plagas de muchas plantas y cultivos como los *Tetranychus* spp que succionan los contenidos celulares de más de 1000 especies de plantas cultivadas y no cultivadas (Figura 5).

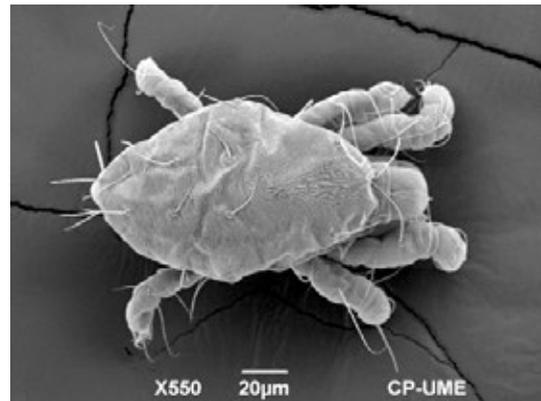


Figura 5. Larva del ácaro *Tetranychus urticae* de tamaño de 1/10 de mm. Con el MEB pueden distinguirse los pliegues en su cuerpo. Cortesía: Dr. Gabriel Otero Colina, Entomología, COLPOS, Montecillo.

Enfermedades poscosecha

Un fruto mexicano de gran potencial es el mamey (*Pouteria sapota*), pero este requiere refrigerarse (13.°C) para su exportación debido a que presenta susceptibilidad a pudriciones internas inducidas por hongos. Con base en características morfológicas y moleculares, los hongos asociados a la pudrición del fruto se identificaron como *Pestalotiopsis paeoniicola* y *Lasiodiplodia theobromae* (4) (Figura 6).

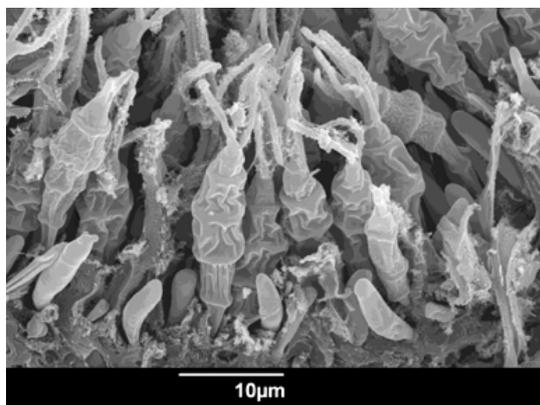


Figura 6. Fotografía MEB, de conidios y conidióforos de *Pestalotiopsis paeoniicola* causantes de pudriciones poscosecha en mamey. Cortesía: Daniel Nieto-Ángel y Rafael Gómez-Jaimes, COLPOS, Montecillo.

Tecnología poscosecha de carne

La tecnología poscosecha tiene la finalidad de mejorar la calidad y vida en anaquel de la carne. El efecto de tratamientos físicos en la microestructura de carne (bovino). El ultrasónico de alta intensidad (HIU) modifica las propiedades fisicoquímicas y funcionales de los productos cárnicos, donde la capacidad de retención de agua y la textura muscular son los más relevantes, propiedades relacionadas con el rendimiento, jugosidad y suavidad de la carne (5). El tratamiento con HIU desorganiza los arreglos fibrilares y miofibrilares e inhibe o mata microorganismos; este ultrasonido ablanda la carne y alarga su vida en anaquel (Figura 7A, 7B). Estas modificaciones estructurales pueden evaluarse con detalle en un MEB.

Nutrición de rumiantes

La calidad nutricional de los pastos forrajeros disminuye con la edad. Es importante conocer la estructura vegetal de los pastos, así como los microorganismos ruminales que degradan la pared

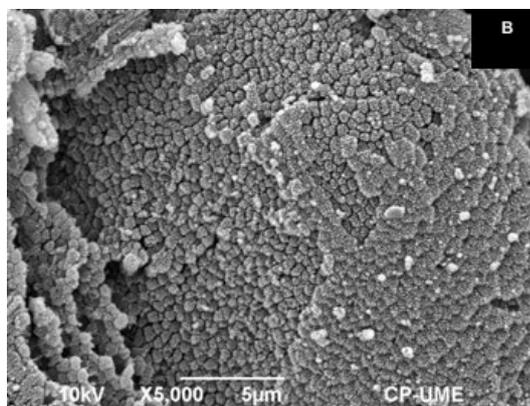
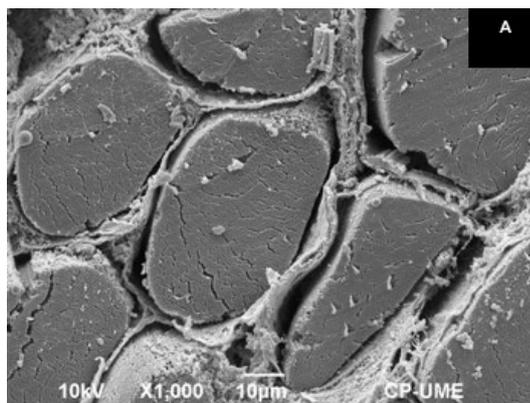


Figura 7. Efecto de ultrasonido en la microestructura de carne de bovino. A. Corte transversal mostrando fibras y espacios interfibrilares; B. Miofibrillas dentro de la fibra muscular. Cortesía: Luis Manuel Carrillo-López y Alma Delia Alarcón-Rojo, Universidad Autónoma de Chihuahua.

celular, afectando la digestibilidad y el potencial nutricional del pasto para el ganado. Con ayuda del MEB se ha caracterizado la degradación de estos pastos en el rumen de las vacas (*in situ*), lo que permite entender la interacción del microbiota bajo diversos tratamientos (6) (Figura 8).

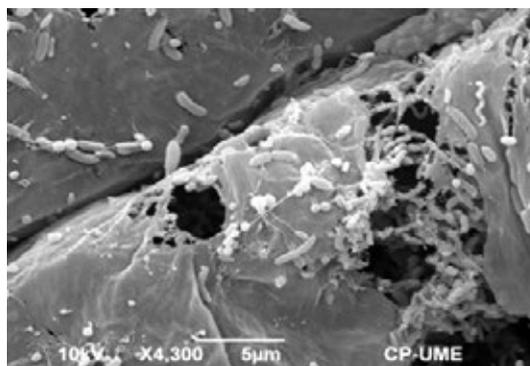


Figura 8. Imagen de MEB. Degradación de *Festulolium* por bacterias y levaduras después (48 h) de la ingesta por una vaca. Cortesía: Sergio S. González-Muñoz e Isaac Almaraz-Buendía, COLPOS, Montecillo y Universidad Autónoma de Hidalgo.



Tecnología de alimentos: también se han caracterizado encapsulados de proteínas, probióticos y diferentes compuestos que se emplean en la industria alimenticia humana y de rumiantes. Por ejemplo, la caracterización con MEB fue esencial para conocer el diseño y evaluación *in vitro* de microcápsulas acarreadoras de urea para mejorar la liberación y disponibilidad en el rumen de bovinos (7) (Figura 9).

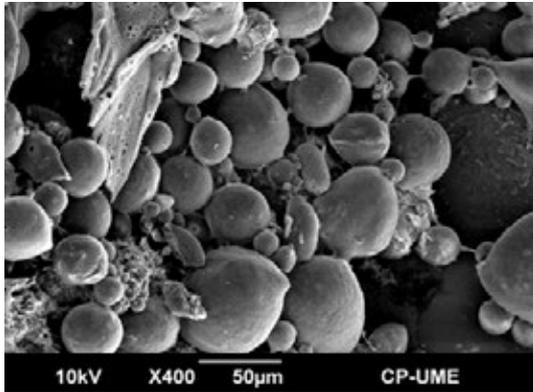


Figura 9. Micrografías obtenidas en MEB de microcápsulas acarreadoras de urea, encapsuladas con carbón activado y eudragit. Cortesía: J. Efrén Ramírez-Briebesca y Raymundo Lira-Casas, COLPOS, Montecillo.

Agradecimientos:

Los autores agradecen al Biol. Simón Morales Rodríguez, investigador del Colegio de Postgraduados, quien produjo las fotografías de Microscopía Electrónica de Barrido, en la Unidad de Microscopía Electrónica del Colegio de Postgraduados, SADER.

Referencias

1. https://nube.siap.gob.mx/gobmx_publicaciones_siap/pag/2021/Panorama-Agroalimentario-2021
2. Rivera-Jiménez, M., Zavaleta-Mancera, H., Rebollar-Alviter, A., Aguilar-Rincón, V., García-de-los-Santos, G., Vaquera-Huerta, H. *et al.* Phylogenetics and histology provide insight into damping-off infections of 'Poblano' pepper seedlings caused by *Fusarium wilt* in greenhouses. *Mycological Progress* (2018), 17(11):1237-1249.
3. Delgado-García, E., Cibrián-Tovar, J., González-Camacho, J., Valdez-Carrasco, J., Terán-Vargas, A., Azuara-Domínguez, A. Caracterización Morfológica de las Sensilas Antenales de *Rhyssomatus nigerrimus* (Coleoptera: Curculionidae). *Southwestern Entomologist* (2016), 41(1):225-240.
4. Gómez-Jaimes, R., Nieto-Ángel, D., Téliz-Ortiz, D., Mora-Aguilera, A., Martínez-Damián, M., Vargas-Hernández, M. Evaluación de la calidad e incidencia de hongos en frutos refrigerados de zapote mamey (*Pouteria sapota* (Jacq.) H. E. Moore and Stearn. *Agrociencia* (2009), 43(1):37-48.
5. Carrillo-Lopez, L., Huerta-Jimenez, M., Garcia-Galicia, I., Alarcon-Rojo, A. Bacterial control and structural and physicochemical modification of bovine *Longissimus dorsi* by ultrasound. *Ultrasonics Sonochemistry* (2019). 58: 104608.
6. González-Muñoz, S., Zavaleta-Mancera, H., Miranda-Romero, L., Loera-Corral, O., Pinos-Rodríguez, J., Campos-Montiel, R. *et al.* Histochemical changes in early and mature *Festulolium* and maturation's effects on rumen bacteria activity and *in vitro* degradation. *Grassland Science* (2018), 65(1): 23-31.
7. Lira Casas, R., Efrén Ramírez Briebesca, J., Zavaleta Mancera, H., Hidalgo Moreno, C., Cruz Monterrosa, R., Crosby Galvan, M. *et al.* Designing and evaluation of urea microcapsules *in vitro* to improve nitrogen slow release availability in rumen. *Journal of the Science of Food and Agriculture* (2018).



IMPORTANCIA DE LA CARACTERIZACIÓN MICROESTRUCTURAL

POR MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE BARRIDO EN LOS MATERIALES DE CONSTRUCCIÓN

ING. AZUCENA KAREN ALVARADO PÉREZ¹
DR. WILFRIDO MARTÍNEZ MOLINA²
DRA. ELIA MERCEDES ALONSO GUZMÁN²
DR. MIGUEL ÁVALOS BORJA¹

¹Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, San Luis Potosí, SLP

²Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, Morelia, Michoacán

Los materiales de construcción son materias primas, productos y subproductos que sirven para la creación de obras civiles y edificaciones, sus características físicas y mecánicas son de gran importancia para garantizar el buen funcionamiento de la obra en cuestión a lo largo de su vida útil, sin generar costos extraordinarios de mantenimiento.

En años recientes se han probado con nuevas composiciones, aditivos, adiciones o sustituciones con el objetivo de desarrollar materiales de construcción más resistentes, durables y con menor impacto ambiental (1); estos nuevos materiales son rigurosamente ensayados para comprobar sus cualidades físicas y mecánicas, por tal motivo son sometidos a pruebas de compresión, tensión, flexión, resistencia a penetración de agentes externos, entre otros igual de importantes; sin embargo, este tipo de ensayos no aportan información sobre la morfología microestructural resultado de las modificaciones que se han realizado; siendo la microestructura la que proporciona las propiedades a la macroestructura (y no al revés), es importante conocerla, estudiarla y entenderla con el fin de tomarla en cuenta en las decisiones de diseño y aplicación de materiales.

Un instrumento que puede ser de gran utilidad para cumplir con este propósito es el Microscopio Electrónico de Barrido (SEM, por sus siglas en inglés, Scanning Electron Microscope), que por su configuración (figura 1) puede detectar señales que nos permiten observar y caracterizar la superficie de los materiales estudiados, proporcionando información de la morfología y composición química (2).

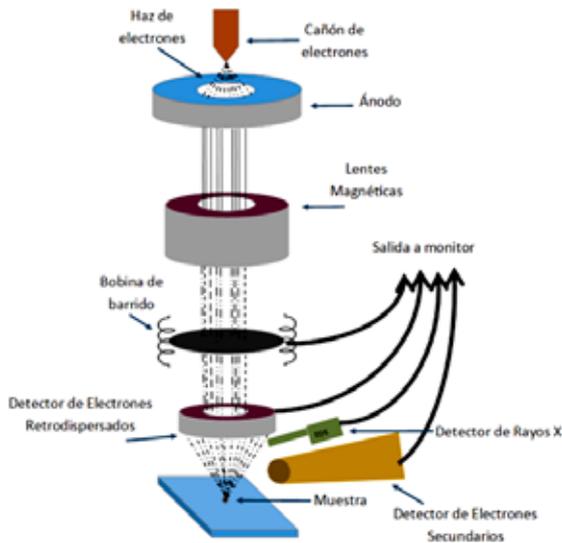


Figura 1. Esquema de un Microscopio Electrónico de Barrido.

Un ejemplo de la aplicación de este tipo de análisis en materiales de construcción se presenta en la figura 2; las micrografías corresponden a mortero base cemento portland (CP) con una edad de siete días, los cuales fueron elaborados según como lo señala el Ing. Fidel Bautista en su investigación “Evaluación de la durabilidad de matrices de cemento portland, con adición de mucílago de nopal”. La diferencia significativa entre la composición de cada una de las muestras que se presentan en las micrografías es que la etiquetada como (a) corresponde a una mezcla testigo que tiene los componentes típicos de un mortero (agua, CP y arena); en cambio, a las muestras (b) y (c) se les añadió mucílago (baba) de nopal como líquido de mezclado (3), esto con el fin de aumentar la resistencia a la infiltración de agentes agresivos externos y por ende aumentar su durabilidad.

La presencia de mucílago en las mezclas de mortero retrasa el proceso de endurecimiento y por ende aumentan los tiempos de fraguado (4); en las micrografías de la figura 2 es posible observar este fenómeno. En la figura 2a, correspondiente a la mezcla de mortero sin adiciones de mucílago, se puede apreciar la presencia de cristales con forma de “aguja”

alargadas que emergen de un núcleo más consolidado; estas formas son características del proceso de hidratación del CP. Por otro lado, en la figura 2b que corresponde a una mezcla con cierta adición de mucílago de nopal, los cristales con forma de agujas que se presentan son de menor tamaño y espesor; para el caso de la figura 2c, donde la mezcla tiene un porcentaje de mucílago mayor que en la muestra b, la formación de estas geometrías apenas es perceptible.

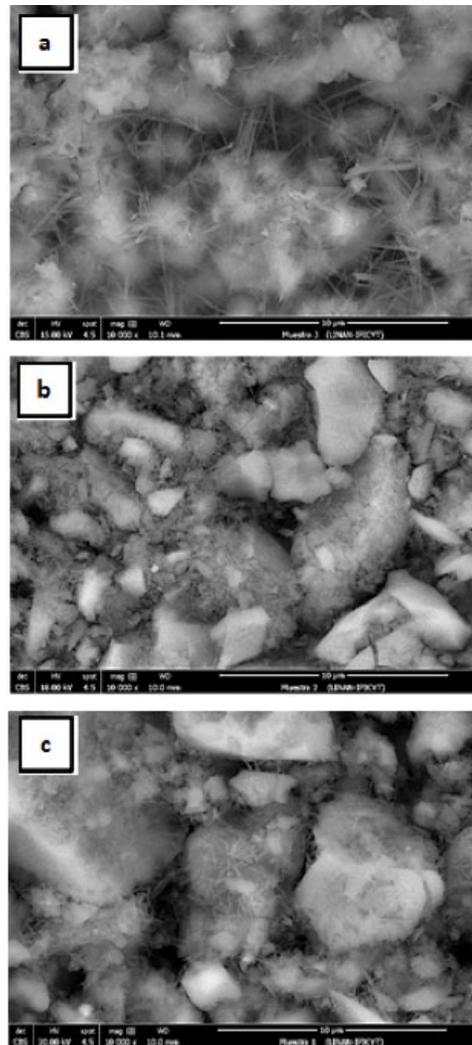


Figura 2. Micrografías de morteros base CP con edades de siete días, utilizando detector de electrones retrodispersados. a) mezcla de cemento, arena y agua; b) y c) mezclas de cemento, arena y mucílago de nopal, en donde b) tiene menor adición de mucílago que c).



Adicionalmente con la ayuda de un análisis elemental EDS (por sus siglas en inglés, Energy Dispersive X-Ray Spectroscopy) es posible verificar cuáles elementos químicos se encuentran presentes en las geometrías identificadas y mediante un análisis semi-cuantitativo conocer su porcentaje de presencia; de esta manera es posible corroborar que los cristales que se van formando tienen la misma composición en los tres casos. En la figura 3 se muestra un ejemplo de este tipo de análisis, en donde se observa la presencia de los elementos Ca, O, Si, C, Al entre otros, propios del CP y del agregado pétreo que se utilizó.

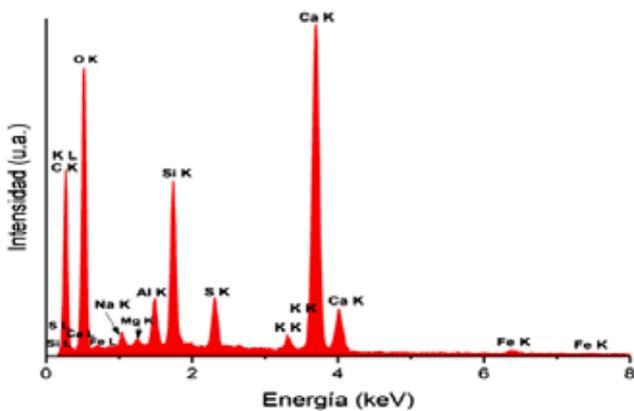


Figura 3. Espectro EDS de la muestra b (con adición de mucílago de nopal) a una edad de siete días.

Esta información es de gran importancia, ya que nos confirma que, aunque los tiempos de endurecimiento son más largos, la formación de las estructuras que dan las propiedades mecánicas y físicas deseables en los morteros base CP se siguen llevando a cabo, de igual manera nos indica que, debido al incremento en los tiempos de fraguado, se deben tomar medidas extraordinarias en los procesos constructivos tales como períodos más prolongados en el uso de moldes para garantizar el endurecimiento con la forma deseada.

El seguimiento en la evolución de la formación de las diferentes fases, resultado de la hidratación del CP, concluirá si la adición de mucílago es beneficioso para la mezcla de mortero o no; sin embargo, con este ejemplo podemos observar la importancia de la caracterización por medio de SEM en el diseño de materiales de construcción. Este tipo de análisis nos permite conocer de qué manera el cambio de composición, uso de aditivos o adiciones afectan la microestructura, modificando el comportamiento físico y la resistencia mecánica del material en general.

Agradecimientos: A la M. en C. Ana Iris Peña Maldonado por la obtención de las micrografías presentadas, al LINAN e IPICYT por las facilidades prestadas y al Conacyt por la beca otorgada.

Referencias

1. Khatib, J. (2016). *Sustainability of construction materials*. Second edition, Woodhead Publishing.
2. Zhou, W., et al. (2006). "Fundamentals of scanning electron microscopy (SEM)". *Scanning microscopy for nanotechnology*. Springer, 1-40.
3. Bautista-León, F. (2017). Evaluación de la durabilidad de matrices de Cemento Portland, con adición de Mucílago de Nopal [Tesis de licenciatura]. Morelia, UMSNH.
4. Ramírez-Arellanes, S., et al. (2012). "Propiedades de durabilidad en concreto y análisis microestructural en pastas de cemento con adición de mucílago de nopal como aditivo natural". *Materiales de Construcción*, 62(307): 327-341.



LA TÉCNICA DE ESPECTROSCOPIA DE DISPERSIÓN DE ENERGÍA COMO AUXILIAR PARA CONOCER MEJOR LOS MATERIALES

DR. MIGUEL ÁVALOS BORJA, M. EN C. ADRIANA VÁZQUEZ PELAYO
Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, San Luis Potosí, SLP



Figura 1. Configuración de un SEM.
Tomada de referencia 2.

La ciencia del siglo XXI requiere de un mayor conocimiento de los materiales tanto de nivel morfológico, como de la composición química de los mismos, y más aún, no solo de la composición química de los materiales, sino también de la distribución de los elementos. Por otro lado, los desarrollos tecnológicos modernos requieren el estudio de todos esos detalles en muestras de dimensiones cada vez menores. Un instrumento que nos ayuda a contestar todas esas preguntas es el microscopio electrónico de barrido (SEM, por sus siglas en inglés de Scanning Electron Microscope).



Este instrumento cuenta con una fuente de iluminación de electrones, en lugar de fotones (luz) y de lentes electromagnéticas en lugar de lentes de vidrio¹ (Figura 1²). Con estas modificaciones se logran ampliaciones mucho mayores que con un microscopio óptico. Por ejemplo, la figura 2 presenta una imagen de la traza de un indentador de dureza en el orden de micrómetros, en una muestra que contiene Ta, W, C y O. Podemos ver claramente la morfología de la muestra y la huella dejada por el indentador de diamante sobre esta, pero no conocemos ni la composición química ni la distribución de los elementos en la muestra.

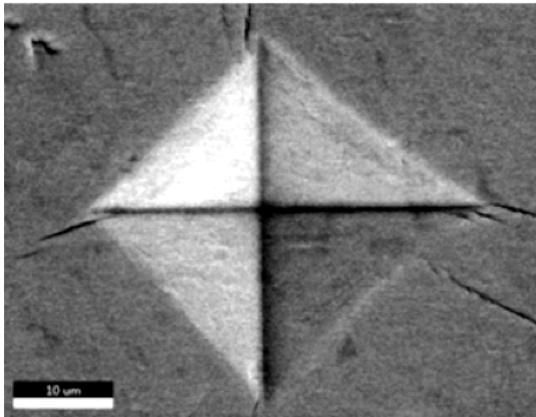


Figura 2. Huella de indentación de muestra de TaC.

En la figura 1 podemos observar la configuración de un SEM. En el microscopio se pueden detectar distintas señales que nos permiten determinar la morfología y la composición química de la muestra. Para elucidar la composición química se utiliza la Energía de Dispersión de rayos X (EDS, por sus siglas en inglés), en la cual se aprovechan los rayos X generados por el haz de electrones cuando interactúan con la muestra (Figura 3).

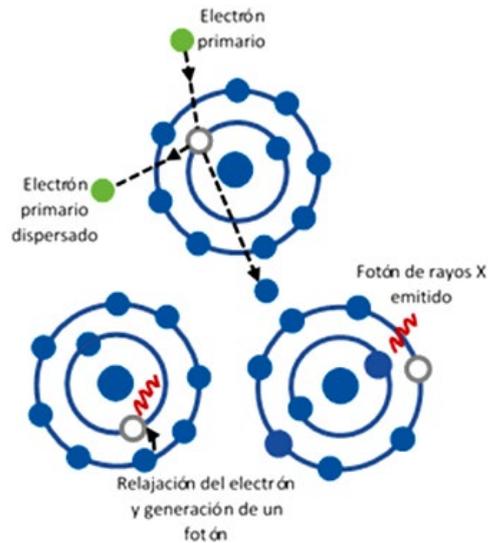


Figura 3. Generación de rayos X característicos de un elemento.

Dichos rayos X son característicos de cada elemento, porque dependen de la diferencia energética de los niveles electrónicos de los elementos de la tabla periódica y, por lo tanto, se pueden usar para hacer análisis químico. El análisis químico se realiza colectando todos los rayos X producidos por la muestra y graficándolos en función de la energía, como se muestra en la figura 4. La identificación de los elementos se lleva a cabo porque cada vez que un electrón incidente saca un electrón de un átomo de la muestra deja un hueco y dicho hueco (conocido como nivel atómico excitado), se desexcita cuando un electrón de un nivel superior baja a llenar el hueco referido y la diferencia de energía la descarga como un fotón de rayos X (Figura 4). Por ejemplo, si el hueco se realizó en el nivel más profundo del átomo (nivel K) y el electrón que llega a ocupar ese nivel proviene del nivel L, el rayo X emitido se etiquetará como $K\alpha$ (Figura 5). Análogamente, si el hueco se hizo en el nivel L y el electrón que llena el hueco bajó del nivel N, el fotón emitido se llamará $L\beta$.

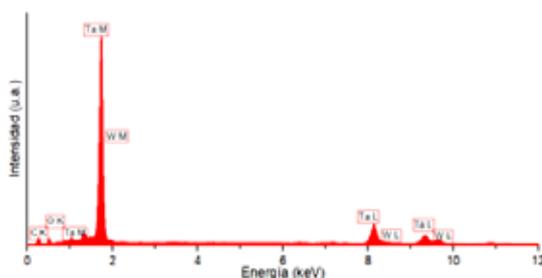


Figura 4. Espectro EDS de la muestra de la Figura 2.

Para ilustrar lo antes mencionado, la diferencia de energía entre los niveles L y K del carbón (C) es de 277 electrón volts (0.277 keV), el carbón tiene 6 electrones, por lo que solo habrá transición $K\alpha$ y aparecerá a 0.277 keV en la gráfica de la figura 4 (llamado también espectro). Para el caso del oxígeno (O), dicha diferencia de energías es del orden de 0.515 keV y para el Tantalio (Ta) la transición $K\alpha$ corresponde a 57.450 keV, la cual está fuera del intervalo del espectro, sin embargo, podemos observar que aparecen transiciones de menor energía como las L y M, esto ocurre debido a que los átomos de los elementos más pesados tienen muchos subniveles, por lo cual aparecen varias transiciones del tipo “Ta L” o “W L” (Figura 4).



Figura 5. Principales líneas de emisión de rayos X.

Como cada elemento tiene diferente número de fotones en el espectro de la figura 4, puede, en principio, suponerse que a mayor número de cuentas, corresponderá una mayor cantidad de átomos de dicho elemento. En teoría eso es

cierto, excepto por varios detalles, entre ellos, que la sensibilidad a fotones de baja energía se ve muy disminuida ya que dichos fotones tienen que atravesar algunas ventanas para llegar al detector y ser contados, por lo tanto, un pico pequeño en las bajas energías en realidad corresponde a una cantidad considerable de material. A partir de energías del orden de 1 keV este efecto no es tan importante. En la práctica, para hacer una cuantificación más precisa hay que tomar en cuenta la corrección ZAF, que tiene que ver con el número atómico (Z), la absorción de rayos X por el mismo material (A) y la fluorescencia (F). Por ejemplo, para el caso de la muestra a la que nos referimos, la cuantificación de los elementos C, O, Ta y tungsteno (W) se muestra en la figura 6, en la cual podemos observar el porcentaje atómico y el peso de cada elemento presente en la muestra.

| Elemento | % Peso | % Atómico |
|----------|--------|-----------|
| CK | 10.24 | 61.92 |
| OK | 0.59 | 2.68 |
| Ta L | 26.15 | 10.50 |
| W L | 63.01 | 24.89 |

Figura 6. Análisis cuantitativo de la muestra de la figura 2 considerando ZAF.

En los microscopios modernos, además de la morfología y el análisis químico cualitativo y cuantitativo, también se pueden tener imágenes que den una idea clara de la distribución de los elementos en la superficie de la muestra. Cuando el detector recibe señal de alguno de los elementos de interés se marca un punto en la pantalla de un color característico. Por ejemplo, en la figura 7b el equipo marca con un puntito blanco cada vez que el haz de electrones, en su viaje por la muestra, se encuentra con la presencia de carbono.

En la figura 7c marca con un punto rojo cada vez que encuentra oxígeno, y análogamente



marca en las figuras 7e y 7f la presencia de tántalo (puntos azules) y tungsteno (puntos verdes). Estos se conocen en el campo como los “mapas” de los elementos correspondientes, en este caso: C, O, Ta y W. La figura 7d sobrepone todas las imágenes en una sola, esto es que presenta los mapas químicos de los 4 elementos en cuestión de una sola imagen. Con esto nos damos cuenta claramente de la distribución química de los elementos, que en este caso en particular resalta la inhomogeneidad de la distribución del Ta en la muestra. Además, podemos observar que en las zonas donde se acumula el Ta, el W se percibe en menor cantidad. De esta manera, utilizando SEM y EDS podemos realizar una caracterización completa de los materiales que incluye: morfología, composición química cuantitativa y semicuantitativa y distribución espacial de los elementos en la superficie de la muestra.

Agradecimientos: Al Dr. Ignacio Becerril Juárez por la obtención del mapeo presentado, al LINAN por las facilidades prestadas y al Conacyt por la beca otorgada a AVP.

Referencias

1. Zhou, W., Apkarian, R., Wang, Z. L. & Joy, D. (2007). “Fundamentals of scanning electron microscopy (SEM)”. *Scanning Microscopy for Nanotechnology: Techniques and Applications*. https://doi.org/10.1007/978-0-387-39620-0_1
2. Salman, A. (2020). Application of Nanomaterials in Environmental Improvement. *Nanotechnol. Environ.* 1-20. <https://doi.org/10.5772/intechopen.91438>
3. Schneider, R. (2011). “Energy-Dispersive X-Ray Spectroscopy (EDXS)”. *Surface and Thin Film Analysis: A Compendium of Principles, Instrumentation, and Applications*, second edition. <https://doi.org/10.1002/9783527636921.ch18>
4. Hodoroaba, V. D. Energy-dispersive X-ray spectroscopy (EDS). (2019). *Characterization of Nanoparticles: Measurement Processes for Nanoparticles*. Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-814182-3.00021-3>

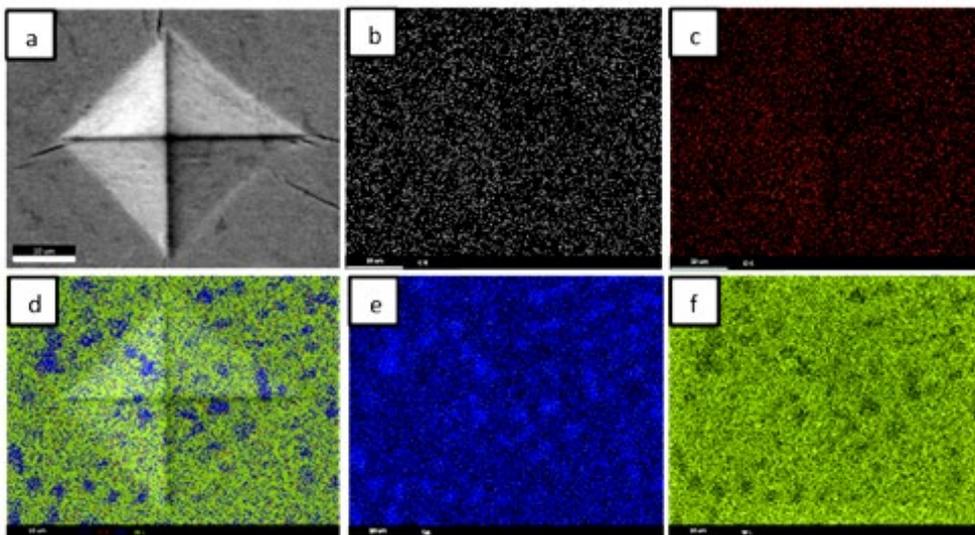


Figura 7. a) Huella de indentación, b) Mapeo del C, c) Mapeo del O, d) Mapeo de la distribución de los elementos en la muestra, e) Mapeo de Ta y f) Mapeo de W.



¿PREPARAR O NO A LOS ESPECÍMENES BIOLÓGICOS PARA ESTUDIARLOS CON EL MICROSCOPIO ELECTRÓNICO DE BARRIDO?

ARMANDO ZEPEDA RODRÍGUEZ

La microscopía electrónica revela maravillas ocultas a simple vista, con electrones se crean imágenes magnificadas a partir de estructuras mili, micro y nanométricas, mostrando espectaculares detalles de la morfología celular y sobre todo de la textura de las superficies vistas a través del SEM.

Con el advenimiento del microscopio electrónico de barrido (SEM) en la segunda mitad del siglo xx, científicos de diversas disciplinas contribuyeron tanto al desarrollo de los mismos microscopios como a la búsqueda de métodos eficientes para resolver los inconvenientes que presentaban organismos y células para poder ser analizados en las exigentes condiciones de vacío de las columnas de los microscopios electrónicos. El estado de hidratación y el bajo número atómico de la composición química de la materia viva fueron, en un principio, grandes inconvenientes. En esa época, ambas configuraciones de los microscopios electrónicos de transmisión (TEM) y SEM se utilizaron como fuente de iluminación termo-electrones originados en un filamento de tungsteno (W) calentado y sometido a una diferencia de potencial eléctrico para emitir electrones acelerados que, en algún momento de su trayectoria, entrarían en interacción con el material orgánico.



Algunas de las características que hacen diferente al SEM respecto del TEM en su diseño son: 1. Tiene una columna con lentes electromagnéticas, generalmente más corta y carece de lentes proyectoras; 2. La diferencia de potencial eléctrico tiene un máximo de 30 kilo electrón volts; 3. Una de las lentes está diseñada especialmente para producir que el haz de electrones se mueva con un desplazamiento cíclico y repetitivo, que recorre una superficie determinada línea por línea en un sistema de coordenadas (X, Y, Z).

La interacción entre el haz de electrones y la superficie del espécimen genera una zona de inestabilidad por colisiones llamada volumen de interacción de la que emergen dos tipos de señales: electrones y rayos X. La información que brindan esas señales es colectada por detectores específicos para cada señal producida (Reyes, 2019).

Si la muestra por analizar está libre de agua y su composición química está conformada por elementos de medio o alto número atómico, entonces quedaría libre de daño al interactuar con los electrones del haz principal. En otro caso, si la muestra es orgánica y sin preparación previa, al ser impactada por el haz de electrones se presentarían daños irreversibles en el espécimen, sin la posibilidad de obtener información morfológica ni de su composición química (figura 1).

Por todo lo expuesto anteriormente, la materia orgánica requiere de un intenso y minucioso protocolo para conferirle al espécimen estabilidad mediante la fijación, eliminar el estado líquido y conferirle conductividad eléctrica. Todas estas medidas están dirigidas a preservar sin alteraciones la morfología integral de los especímenes biológicos ante el impacto de los electrones, además de optimizar todos los beneficios que la microscopía electrónica de barrido ofrece (figura 2).



Figura 1. Imagen en que se observa el daño causado a un espécimen mal preparado para SEM.

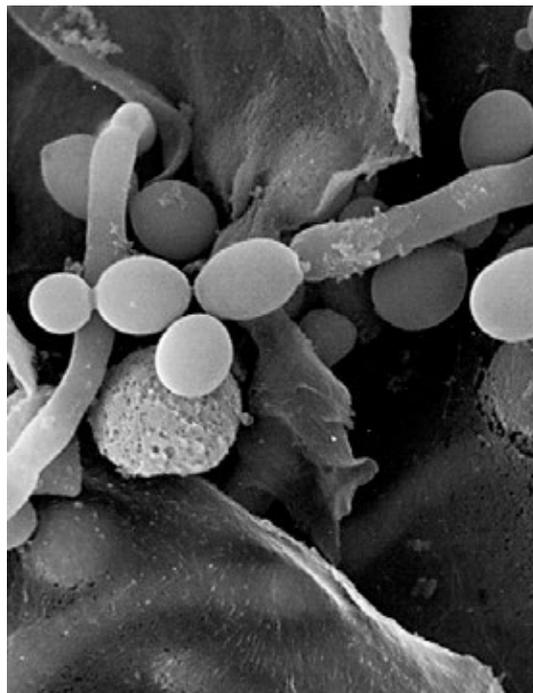


Figura 2. Esporas de *Cándida sp.* observada en SEM. Morfología característica de las esporas sin alteraciones morfológicas.



Actualmente es posible poner bajo el haz de electrones de un SEM todo tipo de material orgánico como son pequeñas muestras de animales, vegetales u órganos; tejidos, células y organelos celulares; hongos e incluso bacterias y virus, todos ellos con proporciones importantes de agua en su estructura.

El protocolo general a partir del cual se pueden procesar cualquiera de los materiales orgánicos antes mencionados es el siguiente:

Tabla 1. Protocolo de preparación para especímenes biológicos

| PROCESO | |
|---------|-------------------------------|
| 1 | Selección y limpieza |
| 2 | Lavado |
| 3 | Fijación |
| 4 | Lavado |
| 5 | Postfijación |
| 6 | Lavado |
| 7 | Deshidratación |
| 8 | Desecación |
| 9 | Montaje |
| 10 | Recubrimiento por evaporación |
| 11 | Recubrimiento por ionización |

Todos y cada uno de los procesos mencionados en la tabla anterior son esenciales y determinantes para conseguir el objetivo de preparar especímenes biológicos con alto grado de calidad sin alterar la forma y las características propias de cada ejemplar procesado.

Antes de iniciar cualquier proyecto debemos recabar información fundamental respecto del material biológico con el que trabajaremos, como son las condiciones fisiológicas del entorno de ese material, pH y osmolaridad, entre otros, que servirán de referencia para preparar los reactivos que se utilizarán durante la

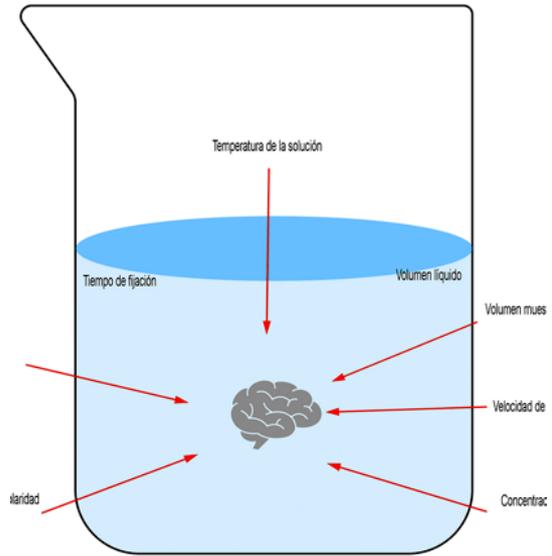


Figura 3. Representación de los factores más importantes para preservar el estado nativo de un espécimen biológico

técnica (figura 3) con características semejantes a las de su entorno (Echlin, 2009).

Ahora revisaremos los puntos del proceso. En el punto número uno, se refiere a la selección del método de obtención de la muestra y eliminar todo aquello que esté sobre su superficie y que impida el contacto con los reactivos, mediante lavados, agitación amable o bien por sonicación e incluso por métodos enzimáticos. El punto número dos del procedimiento, se aplica para eliminar todas las partículas y residuos de soluciones que quedaron del proceso anterior, utilizando un buffer o amortiguador isotónico con las características fisiológicas de la muestra. Punto tres, la fijación primaria es un proceso en el que se presenta una amplia gama de características y de variantes. Lo primero que hay que considerar como prioridad es que debe realizarse en el menor tiempo posible, debido a que cuando el espécimen vivo se aísla de sus condiciones vitales, se desencadenan procesos de autólisis. Los fijadores suspenden esos procesos autolíticos inmovilizando



los componentes celulares para preservar el estado nativo de ese sistema biológico, además participan otros factores que determinan la eficiencia del fijador. En la figura 3 se ejemplifica la participación de esos factores (Bozzola, 1999). Punto cuatro, para eliminar los residuos de fijador se repite el lavado con solución amortiguadora como en el punto número dos.

Punto cinco, de la posfijación, también conocida como fijación secundaria. El propósito de este proceso es estabilizar las membranas biológicas con tetra óxido de Osmio que tiene alta reactividad y afinidad por sus lípidos, después de cumplirse el tiempo de acción del segundo fijador, se pasa al punto número seis en el que se eliminan los residuos del osmio con lavados con el amortiguador inicial. Dada su alta volatilidad se recomienda utilizarlo bajo condiciones extremas de bioseguridad con equipo de protección como mascarillas de media cara o cara completa con cartuchos que filtren vapores orgánicos. Respecto del punto siete, la deshidratación, el objetivo de este proceso es reducir la tensión superficial mediante el reemplazo del agua de la estructura biológica por un agente deshidratante como el etanol, cuando el agua haya sido sustituida por etanol absoluto, inmediatamente se pasa al siguiente proceso; punto ocho desecado por la técnica de Punto crítico, cuyo objetivo es reemplazar el etanol absoluto por bióxido de carbono (CO_2) en estado líquido en condiciones controladas de temperatura y presión en un desecador de Punto crítico, en este equipo el CO_2 es llevado a sus constantes críticas (32°C y 1072 PSI) en las que el CO_2 cambia de su estado líquido a su estado gaseoso sin cambiar su densidad (Douglas, 2001). En una siguiente etapa, el gas contenido tanto en la muestra como en su entorno se liberará lentamente, cumpliendo el objetivo de eliminar todo ves-

tigio de agua (tensión superficial cero) de la materia orgánica. Este método fue introducido por Anderson en 1970.

Para el punto nueve, los especímenes desecados se colocan sobre una platina de material no magnetizable (aluminio, bronce o carbono) adheridos con pegamento conductor a base de carbono o plata. Finalmente, los puntos diez y once se refieren al proceso de recubrir la superficie de los especímenes con elementos químicos que sean buenos conductores eléctricos como el carbono, oro o bien aleaciones de oro-paladio u oro-platino.

Las evidencias de haber utilizado este protocolo a lo largo de la historia demuestran que es altamente confiable y, sobre todo, eficiente, conservando la morfología nativa de todo tipo de especímenes biológicos.

El desarrollo de técnicas de preparación evolucionó paralelamente con los avances tecnológicos de los microscopios, el tipo de filamentos, las mejoras en las lentes electromagnéticas y el tipo de detectores dieron resultados muy importantes en la magnificación y resolución, particularmente en los microscopios electrónicos de alto vacío (HVSEM).

El siguiente reto fue observar en los microscopios de barrido especímenes biológicos con cada vez menos preparación al material orgánico. A partir de la última década del siglo xx las compañías fabricantes de microscopios electrónicos hicieron modificaciones en los sistemas de vacío, así conocimos los microscopios de bajo vacío (LVSEM) y después lanzaron al mercado los microscopios conocidos como ambientales (ESEM), con presión en la cámara del espécimen muy cercana a la ambiental. Con todos estos esfuerzos, se han logrado observaciones de especímenes vivos y en medios líquidos, aunque sólo por



tiempos cortos y con resoluciones por debajo de las expectativas (Schatten, 2008).

Ya iniciado el siglo XXI, los fabricantes incorporaron nuevas tecnologías en las cámaras del espécimen de los microscopios como nuevos y múltiples detectores y micro manipuladores, además de un cañón de iones de Galio para manipular materiales no biológicos (microscopios de doble haz); sin embargo, cada vez se realizan más esfuerzos por aprovechar esos recursos en el trabajo con especímenes biológicos hidratados aunque hasta el momento los tiempos de observación en la cámara del espécimen son muy cortos, por lo que debemos esperar a que esta restricción pueda ser superada hasta obtener mejores resultados.

Por otro lado, para TEM se han desarrollado importantes avances tecnológicos para observar experimentos en material biológico *in vivo* y en tiempo real, expuestos al haz de electrones. Sin duda, en años próximos veremos importantes aplicaciones en los microscopios electrónicos de barrido.

Referencias

- Bozzola, J. J. & Russell, L. D. (1999). *Electron microscopy: Principles and techniques for biologists*. 2nd ed. Jones and Bartlett Publisher.
<https://doi.org/10.22201/ceiich.24485691e.2020.25.69610>
- Douglas, B. (2001). Critical Point Drying of Biological Specimens for Scanning Electron Microscopy. *Methods in Biotechnology*, vol. 13, Supercritical Fluid Methods and Protocols. Edited by: JR Williams and AA Clifford. Humana Press Inc.
- Echlin, P. (2009). *Handbook of sample preparation for scanning electron microscopy and X-Ray microanalysis*. Springer Science.
- Hawkes, P. W. & Spence, J. C. (2007). *Science of Microscopy*, vol. 1. Springer Science.
- Reyes, G. J. Breve reseña histórica de la microscopía electrónica en México y en el mundo. *Mundo Nano*, 13 (25), 79-100.
- Schatten, H., Pawley, J. B. (2008). *Biological Low-Voltage Scanning Electron Microscopy*. Springer Science.
- An introduction to electron microscopy. (Published on Jul 15, 2010). FEI Co.

*Si quieres encontrar los secretos del universo,
piensa en términos de energía, frecuencias
y vibración.*

Nikola Tesla