
NOTAS TECNICAS

DESARROLLO DE LA MICROSCOPIA ELECTRONICA

Gabriel RODRIGUEZ*

Homenaje al III Congreso Latinoamericano de Microscopía Electrónica, efectuado en Santiago de Chile, entre el 22 y el 26 de noviembre de 1976.

IDIEM apoyó este evento no sólo colaborando en su organización sino también participando con seis trabajos originales en el campo de la ciencia de los materiales.

BREVE HISTORIA DE LA MICROSCOPIA

Podría afirmarse que el sentido de la vista en el hombre está polarizado hacia la observación a gran distancia, más bien que a la de corta distancia. En otras palabras, el ojo humano es mejor telescopio que microscopio. En efecto, para un ojo normal la menor distancia de visión es de 25 cm y la mayor, infinito. Podemos mirar una montaña distinguiendo detalles, pero somos incapaces de ver muchas estructuras en objetos relativamente pequeños del orden de milímetros

Así pues, es natural que el hombre, desde los más remotos tiempos, tuviese la inquietud de examinar, por algún medio, los detalles del micromundo que le rodea.

La primera oportunidad se la dio, sin duda, la naturaleza, al depositar por

* Investigador de IDIEM.

las mañanas transparentes gotas de rocío sobre los pétalos de las flores. La gota de agua, que no moja el pétalo debido a la tensión superficial, constituye un lente que permite ver a su través y con cierto aumento las estructuras que hay bajo ella.

El descubrimiento del vidrio por los egipcios constituyó la segunda oportunidad, ya que en la fusión y fabricación de objetos de cristal se forman accidentalmente lentes. Más de mil años pasan sin que este hecho, repetido hasta el cansancio, no constituyera algo más que una mera curiosidad. La historia no ha dejado recuerdo del artífice que pulió el primer lente, pero por los albores de la edad media se hizo común el uso de lupas o monóculos, que pronto se convertirían en gafas, con el propósito de ayudar a las personas con ciertos defectos visuales, tal como la común presbicia*.

Se dice que dos holandeses serían los que primero construyeron un microscopio: Zacarías Jansen y Cornelius Drebbel. No obstante, pocos saben que por aquel tiempo el gran Galileo Galilei, junto con construir su famoso telescopio en 1609, construyó también un microscopio de una potencia de unos diez aumentos, que permitía ver *una mosca del tamaño de un pollo* y que a un científico de la época permitió, años más tarde, publicar el primer estudio micrográfico que versó sobre la anatomía de la abeja².

Pero el verdadero padre de la microscopía es sin duda alguna un holandés, nacido en Delft en 1632, llamado Antonio van Leeuwenhoek, aprendiz de textil y luego eximio microscopista autodidacta. Aparte de adquirir una maestría inigualable en el tallado de diminutos lentes (fabricó más de 300 microscopios simples) pasó a la historia por sus impactantes hallazgos, tales como el descubrimiento de los glóbulos rojos en la sangre, los bacteriófagos del agua, los espermios en el líquido seminal, la partenogénesis, etc.

Los microscopios simples de Leeuwenhoek alcanzaron cerca de 200 aumentos, aunque había que tener una destreza prodigiosa para lograr interpretar lo que se lograba ver a través de ellos.

Su contemporáneo inglés, dos años menor que él, Robert Hooke, desarrolló el microscopio compuesto de Galileo, descubrió la célula e hizo minuciosos dibujos microscópicos de belleza inigualada que publicó en su famosa "Micrographia". Se cumplía así la primera gran etapa del desarrollo de la microscopía.

Casi 200 años pasan sin hitos importantes en el perfeccionamientos del instrumento hasta que, hace poco más de un siglo, en abril de 1873, Ernst Abbe, físico y profesor de Jena, imprime un decisivo impulso a la óptica teórica y práctica³. En efecto, hasta entonces se creía que el aumento obtenido por un microscopio sólo dependía de su óptica. Abbe deduce teóricamente que el aumen-

* Las primeras referencias a un lente se encuentran en unos versos del poeta Missner El Viejo, hacia 1270. Pocos años después el predicador Giordano di Rivalto dice que la invención de las gafas es un don de Dios. En todo caso, la localidad de Murano cerca de Venecia, famosa por sus cristales, fue la primera en establecer un centro fabril de lupas a fines del siglo XIII¹.

to depende más de la longitud de onda de la luz que de la calidad del sistema óptico. De esta forma asesta un golpe mortal al excesivo optimismo de microscopistas y físicos que sostenían lo contrario. Irónicamente, es la propia naturaleza de la luz la que impide obtener potencias substancialmente superiores a los 1000 aumentos, límite máximo al cual puede aspirar la óptica de vidrio. Corrían los últimos años del siglo XIX y podemos decir que la microscopía se había envejecido.

No obstante, el conocimiento del hombre en este campo se había nutrido de valiosa experiencia: ya nunca más el empirismo tendría el cetro en los futuros adelantos como lo había tenido hasta entonces.

Pero ¿cuál sería el nuevo camino? Los avances recientes de la ciencia surgidos especialmente de la teoría electromagnética de Maxwell, sugerían emplear un medio distinto a la luz, pero ondulatoriamente similar, aunque de longitud de onda menor, como lo exigía la ecuación de Abbe. En 1912, en una experiencia hoy clásica de difracción, Max Laue demuestra que los rayos X son ondas mil veces más pequeñas que la luz. Desgraciadamente debido a la fuerte acción penetrante de estas radiaciones, no ha sido posible encontrar, hasta hoy, una sustancia con índice de refracción distinto a la unidad, lo que ha imposibilitado la construcción de un microscopio de rayos X*.

Diversos acontecimientos científicos teóricos y experimentales confluían luego de concluida la Primera Guerra Mundial: los trabajos de Max Planck sobre la teoría cuántica, los de Albert Einstein sobre la relatividad, las determinaciones experimentales de Robert Millikan, etc., indujeron a Luis de Broglie -en 1924- a plantear la revolucionaria consideración de asociar una faceta ondulatoria a cada partícula en movimiento, cuya longitud de onda sería igual a las veces que la constante de Planck contiene el producto de la masa por la velocidad de la partícula⁴. Nació así la mecánica ondulatoria, perfeccionada rápidamente durante los años 25 al 30 gracias, entre otros, a los trabajos de Schrödinger y experimentalmente a los de Davisson y Germer.

La longitud de las ondas de De Broglie para electrones acelerados con sólo un millar de voltios, son 10 000 veces más pequeñas que la longitud de onda de la luz. Estaba allí el germen de la nueva microscopía.

La década siguiente es la del éxito práctico. Ruska, Knoll, Gabor, von Borries, Mahl, Zworykin, Hall, etc., llevan a feliz término las ideas teóricas de los años 20 y ya en 1934 se construye el primer microscopio electrónico con poder de resolución algo mejor que el microscopio de luz y en 1939 la firma Siemens, de Alemania, lanza al mercado el primer microscopio comercial con resolución 100 veces mejor⁵.

La 2ª Guerra Mundial interrumpe la popularización de esta técnica, pero en la postguerra se reinicia la fabricación masiva de instrumentos, desarrollados ahora

* Ciertos artificios geométricos han permitido obtener un "microscopio" de rayos X de algunos cientos de aumentos.

por las firmas de vanguardia en electrónica, como Siemens de Alemania; R.C.A. de los Estados Unidos; Hitachi de Japón; Phillips de Holanda, etc. Fig. 1.

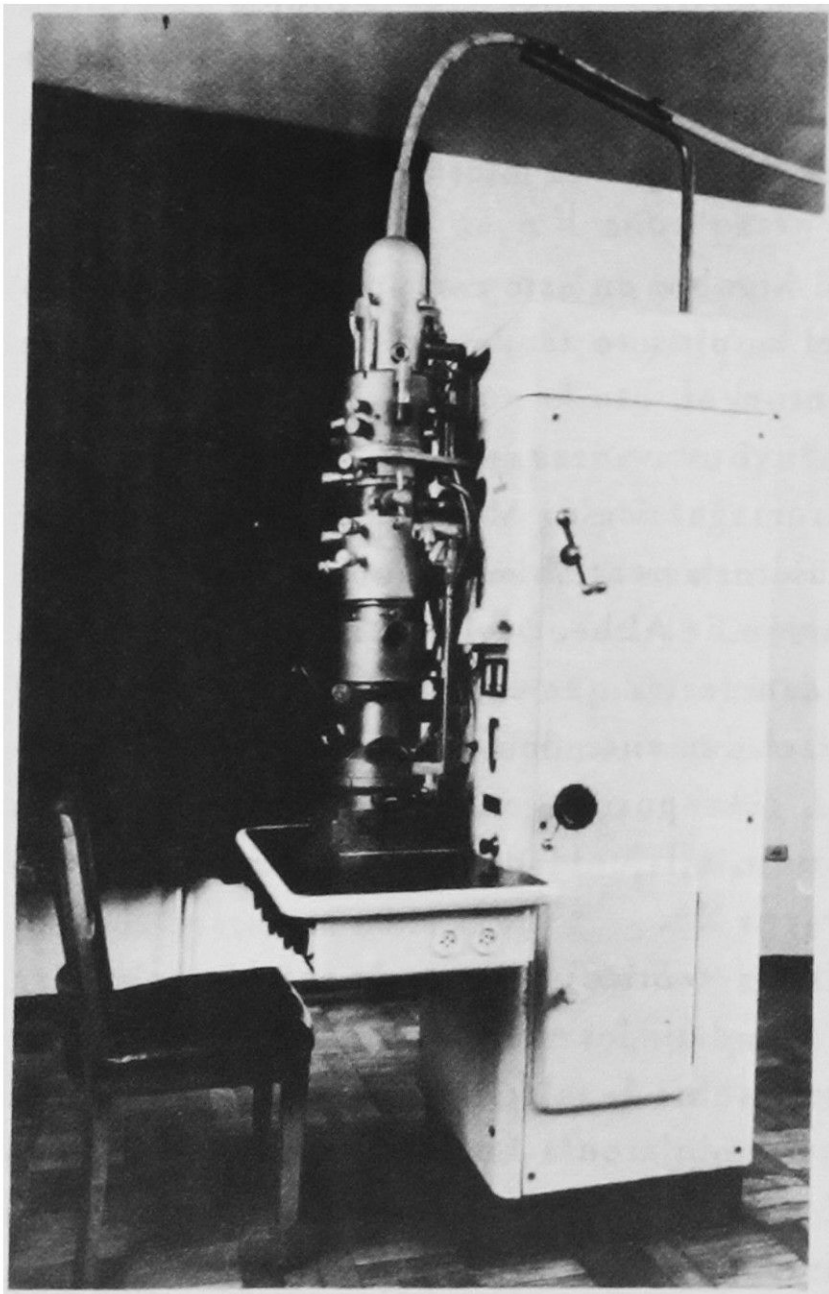


Fig. 1. Microscopio de Transmision Siemens modelo Elmiskop I, adquirido por IDIEM en 1955. Resolución de 12 Å con un aumento efectivo de 200.000 X. Voltaje acelerador de 40, 60, 80 y 100 kV.

Para 1955 se había llegado a resoluciones de 10 Å con aumentos directos de 1/4 de millón de diámetros y voltajes aceleradores de 100 000 voltios.

La microscopía electrónica adquiría así su mayoría de edad. No obstante, todo el esfuerzo se había centrado en el desarrollo de la microscopía de transmisión, en la que los electrones (entes muy livianos) debían atravesar el preparado. Si bien su principal ventaja es la alta resolución alcanzada, que raya en los límites atómicos, tiene una limitación de orden práctico importante: un haz de electrones, aun acelerado con voltajes del orden de los 100 000 voltios, no es capaz de atravesar preparados de un espesor mayor de 100 millonésimas de milímetro (0.1 μm). Espesores menores son muy difíciles de conseguir aun con todas las técnicas y aparatos que se crearon y perfeccionaron exclusivamente para este propósito.

Fue así como se justificó desarrollar la microscopía de alto voltaje, en la cual, para aumentar el poder penetrante de los electrones, éstos se aceleran con voltajes de 500 000 a 3 millones de voltios. De esta manera se pueden observar por transparencia preparados de un espesor de hasta 5 micrones. Pero el tamaño y precio de estos instrumentos ha dificultado la construcción comercial,

siendo los de más alto poder, ejemplares experimentales únicos.

En la década de 1960, estas circunstancias impulsaron el desarrollo en otro sentido: la microscopía electrónica de barrido.

Gracias a los avances recientes de las técnicas de televisión y de la microcircuitaría electrónica ha sido posible construir compactas unidades de factura y manejo prácticos.

Este nuevo microscopio es un aparato auténticamente electrónico, ya que, a diferencia de sus antecesores, no hay similitud alguna con el microscopio tradicional. De hecho no hay parte "óptica" pues se basa en recorrer ordenadamente, línea por línea, la superficie del preparado con un fino haz de electrones, detectando las anomalías que esos electrones sufren o producen a nivel del impacto. Un detector recoge estas anomalías y modula con ellas un tubo de rayos catódicos en donde se "reconstruye la imagen".

Innumerables investigadores en todo el mundo y las firmas de mayor prestigio trabajan en el perfeccionamiento de estos aparatos.

A esta altura es difícil citar nombres sin hacer omisiones importantes. Sin embargo, si hubiese que hacerlo, no podría olvidarse al profesor Gastón Dupouy del Laboratoire d'Optique Electronique de Toulouse donde se ha construido el más grande microscopio de alto voltaje⁶, de 3 millones de volts y en microscopía de barrido las publicaciones de Zworykin 1942⁷ y Mc Millan, 1953.

Como todo avance tecnológico importante, la microscopía electrónica ha dado pie a que se creen y perfeccionen técnicas subsidiarias y colaterales. Entre ellas cabe recordar la ultramicrotomía (técnica de cortes superfinos), las técnicas de depósitos en alto vacío, la difracción electrónica de películas delgadas y el microanálisis de rayos X. Estas técnicas, unidas a las de microscopía electrónica, han pasado a ser las más potentes, sofisticadas y útiles herramientas que el hombre ha creado para la investigación directa de la materia en los últimos 30 años.

Tanto o más útil que en las ramas de la física, las nuevas microscopías lo han sido en la biología, ciencia que aun pisa en gran medida el terreno de lo cualitativo y en donde la visión directa a nivel molecular permite adentrarse hasta llegar a los mismos ladrillos elementales del edificio de la vida, como son las investigaciones sobre las complejas moléculas de ácidos ribonucleicos.

La importancia de la microscopía puede medirse por el hecho que desde 1946 y cada cuatro años, se están realizando Congresos Internacionales a nivel mundial, además de numerosos eventos continentales y nacionales, organizados por las Sociedades de Microscopía Electrónica regionales. Aun más, desde 1968 se hacen congresos separados para la microscopía de barrido, lo que indica la importancia de esta nueva técnica.

También las revistas de mayor prestigio en diversas ciencias, publican trabajos de esta técnica, habiéndose creado otras especialmente para este propósito, tales como: *Journal of Microscopy*, *Journal de Microscopie*, *Microscopica Acta*, *Ultramicroscopy*, etc.

LA MICROSCOPIA ELECTRONICA EN CHILE

Su inicio ocurre en 1955 con la llegada al país de tres microscopios electrónicos casi al mismo tiempo: EM 100 para el Instituto de Neurocirugía; Elmiskop II para la Universidad Técnica Federico Santa María y Elmiskop I para el Instituto de Investigaciones y Ensayes de Materiales (IDIEM). Serían los pioneros, alrededor de los cuales se formarían los primeros grupos de investigadores en esta nueva técnica de investigación.

En 1957 se realiza el primer curso de microscopía, ofrecido por el profesor M. Luxoro en el Instituto de Neurocirugía. Una treintena de profesionales asisten a él.

Entre tanto, el Laboratorio de Microscopía Electrónica del IDIEM* empieza a adquirir relieve e inicia, en 1960, el segundo curso dado en Chile. Pronto se transforma en el laboratorio de más sostenida y fructífera labor, cuya producción hoy supera el centenar de trabajos, más de la mitad de los cuales han sido realizados por sus propios investigadores y muchos de ellos se han presentado a Congresos Internacionales o se han publicado en las revistas de mayor prestigio mundial^{8,9,10}.

Grupos importantes se forman también, en la Escuela de Medicina, Departamento de Biología; en el Departamento de Física (Facultad de Ciencias Físicas y Matemáticas), ambos de la Universidad de Chile, y en el Departamento de Biología Celular de la Universidad Católica de Chile.

En los años siguientes nuevos microscopios llegan al país, formándose laboratorios, además, en las Facultades de Ciencias de Santiago y Valparaíso (Universidad de Chile) y en las Universidades de Concepción y Austral de Valdivia.

Hoy hay 16 microscopios, 11 de los cuales trabajan en los campos de la biología, el resto lo hace en ciencias de la ingeniería y física, en tanto que otros tres están en vías de adquisición.

En 1974 la Sociedad Latinoamericana de Microscopía Electrónica nombra Presidente a J. Pereda (Chile) y Secretaria General a I. Dümler (Chile)**, quienes organizan el III Congreso Latinoamericano de Microscopía Electrónica, junto con J. Vial (Chile) que lo preside. Al evento, que se realizó en noviembre de 1976, Chile envió 34 trabajos, seguido de Brasil con 32, Venezuela con 11, Argentina con 9, Estados Unidos con 5, Perú, Uruguay, Canadá y México con 2 por país, y Francia, Alemania, Suecia e Inglaterra con 1 cada país¹¹.

Entretanto, en IDIEM sentimos justificado orgullo por el positivo aporte a esta especialidad y porque en este momento ocurre la feliz coincidencia de tener funcionando el viejo microscopio de 1955, (que en el futuro será pieza de museo, ya que corresponde al segundo instrumento producido por la firma Siemens de

* El autor estuvo al frente de este laboratorio por espacio de 14 años.

** Actualmente al frente del Laboratorio de Microscopía Electrónica, IDIEM.

la serie Elmiskop 1, del cual se han fabricado más de mil, Fig. 1 y Fig. 2), y porque tenemos recién instalado el más moderno microscopio electrónico de barrido: un Siemens-ETEC Autoscan, Fig. 3, con el cual pensamos, como hace 20 años, situarnos a la vanguardia en este campo. Una recopilación de los microscopios existentes en el país, que se presenta en la Tabla 1.1 dará una visión cronológica de conjunto de esta actividad en Chile.



Fig. 2. Aluminio puro deformado visto al microscopio de transmisión. Ataque electroquímico y químico dejando a la vista microfiguras de corrosión. Aumento 5 000 X. De un trabajo del autor.

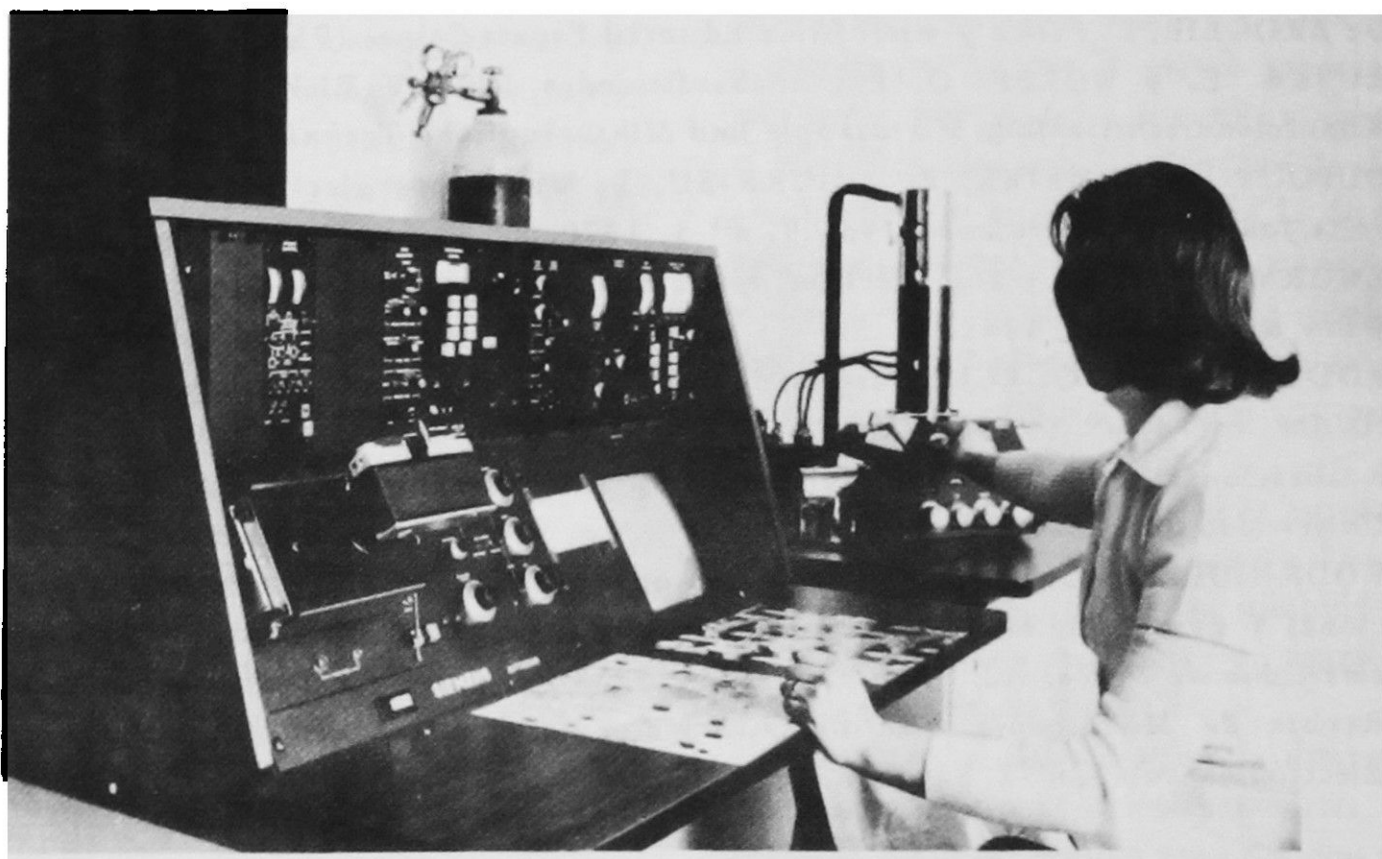


Fig. 3. Microscopio de barrido Siemens - ETEC modelo Autoscan recién adquirido por la Universidad de Chile para IDIEM. Rango de aumentos 5 x hasta 240000 x. Resolución 100 Å.

TABLA 1.1.
MICROSCOPIOS ELECTRONICOS EN CHILE

Marca	Modelo	Institución* *	Aplicación	Año
1 Siemens	Elmiskop I	IDIEM, U. de Chile	Materiales	1955
2 Siemens	Elmiskop II	U.T.F.S.M. Valparaíso	Metalurgia	1955
3 Phillips	EM 100	Instituto Neurocirugía U.C de Ch.	Biología	1955
4 Siemens	Elmiskop II	Biología Celular, U.C. de Chile	Biología	1957
5 Siemens	Elmiskop I	Departamento Histología, U. de Ch.	Biología	1964
6 AEG - Zeiss	M 8	Fac. de Ciencias, Valpo. U. de Ch.	Biología	1965
7 Phillips	EM 200	Medicina, U. de Concepción	Biología	1965
8 Siemens	Elmiskop I A	Fac. de Ciencias, U. de Chile	Biología	1966
9 Siemens	Elmiskop I A	Biología Celular, U.C. de Chile	Biología	1967
10 Phillips	EM 200	Instituto Neurocirugía, U. de Chile	Biología	1967
11 Phillips	EM 300	Departamento Física, U. de Chile	Física	1968
12 Phillips	EM 300	Universidad Austral de Valdivia	Biología	1970
13 Phillips	EM 300	Facultad de Ciencias U. de Chile	Biología	1971
14 Leitz	AMR 1000*	U.T.F.S.M. Valparaíso	Metalurgia	1975
15 Siemens	Elmiskop 101	Biología Celular, U. C. de Chile	Biología	1976
16 Siemens ETEC	Autoscan*	IDIEM, Universidad de Chile	Materiales	1977
OTROS INSTRUMENTOS OPTICOS — ELECTRONICOS				
17 Cameca	Microsonda de Castaing	Escuela de Geología, U. de Chile	Mineralogía	1968
18 Metropolitan Vickers	Cámara de difracción	Departamento de Física, U. de Ch.	Física	1959

* Microscopio de barrido

** Cuando no se nombra ciudad, se entiende Santiago.

BIBLIOGRAFIA

1. KLINCKOWSTROEM, C. von. *Historia de la técnica*. Editorial Labor, 1965.
2. PAPP, D. *Ideas revolucionarias de la ciencia*. I tomo. Editorial Universitaria, 1975.
3. SCHUTZ, W. Ernst Abbe, profesor universitario y físico industrial. *Suplemento Revista Jena*, 1966.
4. De BROGLIE, L. *Física y microfísica*. Editorial Espasa-Calpe, 1951.
5. RUSKA, E. y WOLFF, O. Ein hochanfläsendes 100 kV Elektronenmikroskop mit Klinnfelddurchstrahlung. *Mikroskopie und Mikroskopische Technik*, vol. 62, n° 8, 1956.
6. DUPOUY, G. PERRIER, F. y DURRIEU, L. Microscope électronique 3 millions de volts. *Journal de Microscopie*, vol. 9, n° 5, 1970.
7. ZWORYKIN, V. K. y col. *Electron optics and the electron microscope*. Editorial John Wiley & Sons, N.Y., 1945.
8. RODRIGUEZ, J. G. El laboratorio de microscopía electrónica del IDIEM. *Revista del IDIEM*, vol. 4, n° 1, 1965.
9. Realizaciones del laboratorio de microscopía electrónica del IDIEM. *Boletín de la Universidad de Chile*, n° 68, 1966.
10. RODRIGUEZ, J. G. The electron microscopy laboratory of the Instituto de Investigaciones y Ensayes de Materiales IDIEM, Universidad de Chile. *Boletín del Centro Latinoamericano de Física*, vol. 1, n° 8, Brasil, 1964.
11. *Revista de Microscopía Electrónica*. 3^{er} Congreso Latinoamericano de Microscopía Electrónica, vol. 3, n° 1, Santiago, 1976.