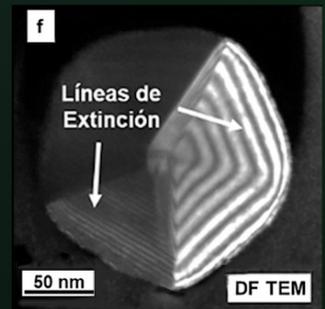
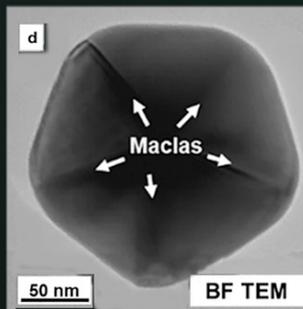
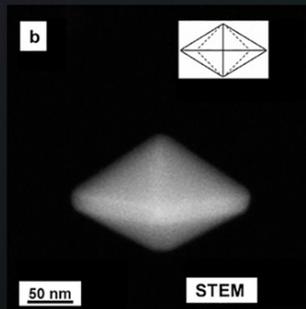
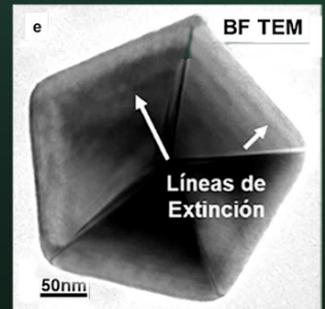
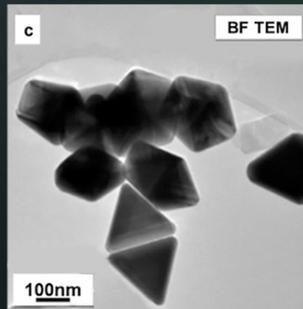
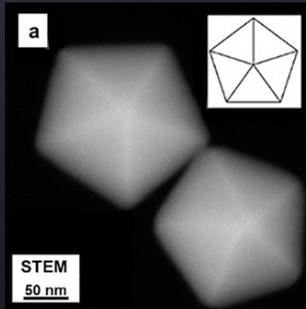


# La dimensión nano en la **microscopía electrónica**



- Cultivos 3D como una alternativa para las evaluaciones nanotoxicológicas



# Mundo Nano Revista Interdisciplinaria en Nanociencias y Nanotecnología

---

Vol. 13, No. 25, julio–diciembre 2020

[www.mundonano.unam.mx](http://www.mundonano.unam.mx)

# DIRECTORIO

## UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Enrique Graue Wiechers  
Rector  
Leonardo Lomelí Venegas  
Secretario General

Guadalupe Valencia García  
Coordinadora de Humanidades  
William Henry Lee Alardín  
Coordinador de la Investigación Científica  
Juan Manuel Romero Ortega  
Coordinador de Innovación y Desarrollo

Rodolfo Zanella Specia  
Director ICAT  
Mauricio Sánchez Menchero  
Director CEIICH  
Fernando Rojas Íñiguez  
Director CNYN

**Mundo Nano** • <http://www.mundonano.unam.mx>

### Editor en jefe

Rodolfo Zanella Specia • <https://orcid.org/0000-0002-2118-5898> • [rodolfo.zanella@icat.unam.mx](mailto:rodolfo.zanella@icat.unam.mx)

### Editores

Gian Carlo Delgado Ramos • <https://orcid.org/0000-0001-6851-9309> • [giandelgado@unam.mx](mailto:giandelgado@unam.mx)

Leonel Cota Araiza • [leonel@cny.n.unam.mx](mailto:leonel@cny.n.unam.mx)

### Editor asociado

Mario Rogelio López Torres • [mrlt@unam.mx](mailto:mrlt@unam.mx)

### Editores invitados

Margarita Rivera Hernández • [mrivera@fisica.unam.mx](mailto:mrivera@fisica.unam.mx) / Jesús A. Arenas Alatorre • [jarenas@fisica.unam.mx](mailto:jarenas@fisica.unam.mx)

## COMITÉ CIENTÍFICO

María Elena Álvarez-Buyllá  
<https://orcid.org/0000-0002-7938-6473>  
• [eabuylla@gmail.com](mailto:eabuylla@gmail.com)  
Universidad Nacional Autónoma de México.  
México

Rodolfo Omar Arellano Aguilar  
Universidad Nacional Autónoma de México.  
México

Simone Arnaldi  
• [simonearnaldi@gmail.com](mailto:simonearnaldi@gmail.com)  
Universidad de Padova. Italia

Sergio Fuentes Moyado  
• [fuentes@cny.n.unam.mx](mailto:fuentes@cny.n.unam.mx)  
<https://orcid.org/0000-0002-9843-408X>  
Universidad Nacional Autónoma de México.  
México

Jesús González Hernández  
• [jesus.gonzalez@cidesi.edu.mx](mailto:jesus.gonzalez@cidesi.edu.mx)  
<https://orcid.org/0000-0002-6906-5465>  
Centro de Ingeniería y Desarrollo Industrial,  
México

Emmanuel Haro Poniatowski  
• [haro@xanum.uam.mx](mailto:haro@xanum.uam.mx)  
Universidad Autónoma Metropolitana. México

Isaac Hernández Calderón  
<https://orcid.org/0000-0002-7606-4807>  
• [Isaac.Hernandez@fis.cinvestav.mx](mailto:Isaac.Hernandez@fis.cinvestav.mx)  
Centro de Investigación y de Estudios  
Avanzados. México

Catherine Louis  
Sorbonne Université, UPMC Univ Paris 06.  
Francia

Eugenio R. Méndez Méndez  
<https://orcid.org/0000-0002-7042-8622>  
• [emendez@cicese.mx](mailto:emendez@cicese.mx)

Centro de Investigación Científica y de  
Educación Superior de Ensenada. México

Luis Mochán Backal  
<https://orcid.org/0000-0003-0418-5375>  
• [mochan@em.fis.unam.mx](mailto:mochan@em.fis.unam.mx)

Universidad Nacional Autónoma de México.  
México

José Saniger Blesa  
<https://orcid.org/0000-0001-8024-2541>  
• [jose.saniger@ccadet.unam.mx](mailto:jose.saniger@ccadet.unam.mx)  
Universidad Nacional Autónoma de México.  
México

Pedro Serena Domingo  
Consejo Superior de Investigaciones  
Científicas. España

Roger Strand  
<https://orcid.org/0000-0001-6159-1586>  
• [roger.strand@svt.uib.no](mailto:roger.strand@svt.uib.no)  
Universidad de Bergen. Noruega

Julia Tagüeña Parga  
• [jtp@ier.unam.mx](mailto:jtp@ier.unam.mx)  
Universidad Nacional Autónoma de México.  
México

Sergio Ulloa  
<https://orcid.org/0000-0002-3091-4984>  
• [ulloa@ohio.edu](mailto:ulloa@ohio.edu)

Universidad de Ohio. Estados Unidos

Fern Wickson  
<https://orcid.org/0000-0002-2841-4155>  
GenØk Center for Biosafety. Noruega

Miguel José Yacamán  
<https://orcid.org/0000-0001-5124-7116>  
• [miguel.yacaman@utsa.edu](mailto:miguel.yacaman@utsa.edu)

Universidad de Texas en Austin. Estados  
Unidos

## COMITÉ EDITORIAL

Norma Blazquez Graf  
• [blazquez@unam.mx](mailto:blazquez@unam.mx)  
Universidad Nacional Autónoma de México.  
México

Ricardo Castaño  
Universidad Distrital Francisco José de  
Caldas, Colombia

Gabriela Alicia Díaz Guerrero  
<https://orcid.org/0000-0003-2160-2732>  
• [diaz@fisica.unam.mx](mailto:diaz@fisica.unam.mx)

Universidad Nacional Autónoma de México.  
México

Roberto Escudero Derat  
• [escu@unam.mx](mailto:escu@unam.mx)  
Universidad Nacional Autónoma de México.  
México

Ruben J. Lazos Martínez  
• [rlazos@cenam.mx](mailto:rlazos@cenam.mx)  
Centro Nacional de Metrología. México

Louis Lemkow  
• [Louis.Lemkow@uab.es](mailto:Louis.Lemkow@uab.es)  
Universidad Autónoma de Barcelona.  
España

Sofía Liberman Shkolnikoff  
Universidad Nacional Autónoma de México.  
México

Paulo Martins  
• [marpaulo@ipt.br](mailto:marpaulo@ipt.br)  
Instituto de Pesquisas Tecnológicas do  
Estado de São Paulo. Brasil

Aquiles Negrete Yankelevich  
• [aqny@unam.mx](mailto:aqny@unam.mx)  
Universidad Nacional Autónoma de México.  
México

Gerko Oskam  
Instituto Politécnico Nacional. México

Fernando Rojas Íñiguez  
• [frojas@cny.n.unam.mx](mailto:frojas@cny.n.unam.mx)  
Universidad Nacional Autónoma de México.  
México

Noboru Takeuchi Tan  
• [takeuchi@cny.n.unam.mx](mailto:takeuchi@cny.n.unam.mx)  
Universidad Nacional Autónoma de México.  
México

Joaquín Tutor Sánchez  
Universidad Pontificia Comillas. España

Isauro Uribe Pineda • [isauribe@unam.mx](mailto:isauribe@unam.mx)  
Editor técnico

Concepción Alida Casale Núñez  
Cuidado de la edición



*Mundo Nano. Revista Interdisciplinaria en Nanociencias y Nanotecnología*, Vol. 13, Núm. 25, julio-diciembre 2020, es una publicación semestral, en versión electrónica, editada por la Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad Universitaria, Coyoacán, 04510, Ciudad de México, México, a través del Instituto de Ciencias Aplicadas y Tecnología (ICAT), el Centro de Nanociencias y Nanotecnología (CNYN) y el Centro de Investigaciones Interdisciplinarias en Ciencias y Humanidades (CEIICH), Torre II de Humanidades 4º piso, Circuito Escolar, Ciudad Universitaria, Coyoacán, 04510, Ciudad de México, México. <http://www.mundonano.unam.mx>, [mundonanounam@gmail.com](mailto:mundonanounam@gmail.com). Editores responsables: Gian Carlo Delgado Ramos y Mario Rogelio López Torres. Reserva de Derechos al Uso Exclusivo Núm. 04-2015-062512122500-203, otorgado por el Instituto Nacional del Derecho de Autor, ISSN 2448-5691. Responsable de la última actualización de este número: Isauro Uribe Pineda, CEIICH-UNAM. Fecha de la última actualización: 30 de junio de 2020. Servicios que indexan a Mundo Nano: DOAJ, Latindex, REDIB, Conacyt, Scielo-México.

Las opiniones expresadas por los autores no necesariamente reflejan la postura de los editores. Prohibida la reproducción total o parcial de los contenidos e imágenes de la publicación sin la previa autorización por escrito de los editores responsables.



Atribución-NoComercial (CC BY-NC 4.0 Internacional)

# CONTENIDO / CONTENTS

Vol. 13, Núm. 25, julio–diciembre 2020 / doi: <https://doi.org/10.22201/ceiich.24485691e.2020.25>

## 5 EDITORIAL / EDITORIAL

### 7 PRESENTACIÓN / PRESENTATION

Margarita Rivera / Jesús Arenas  
*Editores invitados*

## ARTÍCULOS DE INVESTIGACIÓN / RESEARCH ARTICLES

### La dimensión nano en la microscopía electrónica The nano dimension in electron microscopy

- 9 El rol de la función de transferencia de contraste en la formación de imágenes de resolución atómica de nanopartículas  
The role of the contrast transfer function in the formation of atomic resolution images of nanoparticles  
Carlos Angeles Chávez
- 29 Biosíntesis y caracterización de nanoestructuras por microscopía electrónica  
Biosynthesis and characterization of nanostructures by electron microscopy  
Nayely Torres-Gómez, Rodolfo D. Ávila-Avilés, Alfredo R. Vilchis-Nestor
- 45 Resolución atómica de elementos ligeros utilizando HAADF y ABF-STEM con corrección de Cs y bajo voltaje  
Atomic resolution imaging of light elements using low voltage Cs-corrected HAADF and ABF-STEM  
Rodrigo Esparza
- 61 Nanoestructuras y su caracterización por medio de microscopía electrónica de transmisión; ciencia y arte  
Nanostructures and their characterization by transmission electron microscopy; science and art  
Miriam-Carolina Mendoza Ramírez, Miguel Avalos Borja

## ARTÍCULOS DE REVISIÓN / REVIEW ARTICLES

- 79 Breve reseña histórica de la microscopía electrónica en México y el mundo  
Brief history of electron microscopy in Mexico and the world  
José Reyes Gasga
- 101 Técnicas de microscopía electrónica usadas en el estudio de nanopartículas  
Electron microscopy techniques used in the study of nanoparticles  
Francisco Paraguay-Delgado
- 133 Microscopía electrónica de transmisión para observar átomos: principios y desarrollo  
Transmission electron microscopy to look at atoms: principles and development  
Héctor A. Calderón

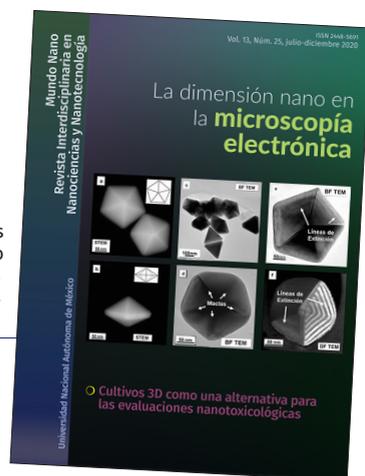
- 157 **Evaluando la toxicidad de nanomateriales en modelos celulares tridimensionales**  
**Evaluating the toxicity of nanomaterials in three-dimensional cellular models**  
Karla Juárez-Moreno, Kathya Angüis Delgado, Brenda Palestina Romero,  
Rafael Vázquez-Duhalt

173 **POLÍTICA EDITORIAL**

*Diseño de portada:* Martha Laura Martínez Cuevas  
*Imagen:* Nanopartículas decaedrales vistas bajo el microscopio electrónico de transmisión, en distintos modos de operación.

Fuente: figuras (a, b, c, e), Miguel Avalos; figuras (d, f), Miriam-Carolina Mendoza.  
Véase figura 3, pág. 70, en donde se describen ampliamente las seis imágenes.

**Correspondencia:** Revista *Mundo Nano*,  
Centro de Investigaciones Interdisciplinarias en Ciencias y Humanidades,  
Torre II de Humanidades 5º piso, Circuito Escolar, Ciudad Universitaria,  
Coyoacán, 04510, Ciudad de México, México.  
Correo-e: mundonano@unam.mx



## Editorial

## Editorial

El presente número está dedicado a la dimensión nano en la microscopía, con énfasis en el caso de México. Nuestros editores invitados, Margarita Rivera y Jesús Arenas, ambos del Instituto de Física de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), nos ofrecen un conjunto de reflexiones que permiten dar cuenta de la presencia y fortaleza de la microscopía en el estudio de materiales nanoestructurados en el país.

Con ya más de siete décadas, la microscopía tiene presencia en las principales entidades de investigación de México, desde aquellas de la UNAM y del Instituto Politécnico Nacional y su Centro de Investigación y de Estudios Avanzados, hasta en el Instituto Mexicano del Petróleo y en múltiples laboratorios del Conacyt, como el Laboratorio Nacional de Microscopía Avanzada (ubicado en la UNAM), el Laboratorio de Microscopía Óptica del Centro de Investigaciones en Óptica A. C., el Laboratorio de Metalografía y Microscopía Óptica del Centro de Investigación en Materiales Avanzados, o el Laboratorio Nacional de Investigaciones en Nanociencias y Nanotecnología del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A. C. Se suman muchos otros espacios de investigación de la red de universidades públicas del país como los que se encuentran en la Universidad Autónoma de Nuevo León, la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, la Universidad Autónoma de San Luis Potosí, la Universidad Autónoma del Estado de México, la Universidad Autónoma de Querétaro, la Universidad Autónoma de Baja California, entre otras. También hay presencia de algunos equipos en universidades privadas como el Tecnológico de Monterrey, la Universidad de las Américas Puebla o la Iberoamericana.

En suma, y como bien lo advierten Rivera y Arenas, la microscopía en México tiene un potencial aceptable, tanto en infraestructura como en personal altamente calificado.

Los siete artículos dedicados a la microscopía en este número abordan diversos temas: la historia de la microscopía electrónica, la arquitectura y las características de algunos microscopios de transmisión, las técnicas y métodos de interpretación.

Reyes presenta una reseña histórica sobre la microscopía en México y el mundo, la cual sitúa la temática de este número. Posteriormente, el artículo de Angeles Chávez ofrece una mirada a ciertos aspectos de la interpretación cuantitativa de imágenes de resolución atómica, en específico en torno a los principios de la formación de imagen en términos de la difracción de electrones y de la óptica electrónica, los cuales derivan en la función de transferencia de contraste y el desenfoque de la imagen del objeto.

Mendoza y Avalos abordan los alcances de la microscopía electrónica de transmisión en el estudio de nanopartículas, dando cuenta de las distintas técnicas y de las prácticas para describir y diferenciar el contraste observado y, en un tenor similar, Calderón describe algunas características de la microscopía electrónica de alta resolución y de resolución atómica, enfocándose en la interacción de los electrones con la muestra.

Por su parte, el artículo de Paraguay aborda las técnicas de microscopía electrónica usadas en el estudio de nanopartículas a partir del uso de tres tipos de microscopios electrónicos de transmisión. De igual modo, Esparza revisa cuestiones relativas a la resolución atómica en la caracterización mediante microscopía electrónica de barrido y transmisión, en específico en lo que se refiere a los parámetros instrumentales básicos del modo campo anular de gran ángulo y campo claro. Su trabajo valida las imágenes simuladas de cara a los resultados obtenidos mediante imágenes experimentales.

Asimismo, Torres, Ávila y Vilchis, introducen la biosíntesis y caracterización de nanoestructuras desde los denominados métodos de “síntesis verde”, para desde ahí abordar su caracterización con microscopía electrónica de transmisión.

Además de los siete trabajos antes descritos que componen la sección temática del presente número, se ha incluido también un artículo de Juárez y colegas, quienes hacen una revisión del efecto citotóxico de cultivos celulares tridimensionales o esféricos, en lugar de los arreglos monocapa, que no permiten dar cuenta de toda la complejidad de las interacciones entre las células. Los autores discuten algunos aspectos sobre el desarrollo de cultivos tridimensionales para evaluaciones nanotoxicológicas más robustas. Este aporte enriquece el esfuerzo que desde *Mundo Nano* se ha procurado para dar seguimiento a la temática, a la que se le dedicaron dos números consecutivos en 2018 (números 20 y 21).

En el próximo número abordaremos la temática de nanocatálisis de la mano de nuestras editoras invitadas, Aida Gutiérrez de la Facultad de Química de la UNAM y Dora Solís de la Universidad Autónoma del Estado de México.

Asimismo, anunciamos la apertura de un número dedicado al potencial de las nanociencias y la nanotecnología para entender y desarrollar soluciones para afrontar las múltiples problemáticas y retos que acarrea la actual pandemia de Covid-19. Dada la coyuntura, el número 27 ya está abierto en la sección de publicación continua en el portal de la revista donde se encuentran dos contribuciones. Invitamos a los investigadores e investigadoras de las ciencias naturales, exactas, de materiales, las ingenierías y las ciencias sociales a enviar propuestas sobre los diversos aspectos de esta temática.

Por último, queremos anunciar que *Mundo Nano. Revista Interdisciplinaria en Nanociencias y Nanotecnología* ha sido recientemente incluida en el catálogo de SciELO-México, lo que refrenda su posicionamiento, de la mano de otros índices de los cuales ya es parte: revistas científicas del Conacyt, DOAJ, Latindex y REDIB.

# Presentación

## Presentation

Desde 1946, año en que llegó a México el primer microscopio electrónico se comenzó a forjar una tradición en el uso de esta técnica en el país, tanto en el área biológica como en la de ciencia de materiales. Hoy en día, el desarrollo de la microscopía electrónica ha permitido alcanzar una resolución del orden de picómetros ( $10^{-12}$  m), siendo México uno de los pocos países en Latinoamérica en contar con esta tecnología de última generación. En este número de *Mundo Nano. Revista Interdisciplinaria en Nanociencias y Nanotecnología* dedicado a la microscopía electrónica, se presentan una serie de trabajos que muestran las capacidades tecnológicas y de análisis que se tienen en nuestro país, en particular en aquellas modalidades aplicadas al estudio de materiales nanoestructurados. Por lo anterior, los editores invitados consideramos importante mostrar las capacidades que se tienen en México en esta especialidad, y al mismo tiempo, dar a conocer algunas líneas de investigación que se trabajan en México relacionadas con el uso de la microscopía electrónica. A los investigadores e investigadoras que participan como autores en este número, nuestro agradecimiento y reconocimiento. Asimismo, no queremos dejar de reconocer a todos los microscopistas que han y siguen enaltecendo la microscopía mexicana dentro y fuera del país.

Este número consta de siete artículos, en los cuales se habla de la historia de la microscopía electrónica en México hasta la actualidad, y de la importancia y las ventajas de emplear bajas dosis del haz electrónico para evitar alterar las características reales de las partículas bajo estudio. También se aborda el tema de la función de transferencia de contraste (FTC), que tiene gran relevancia en la formación de imágenes de resolución atómica de nanopartículas, y del corrector de aberración esférica acoplado a una unidad STEM, que permite mejorar el contraste de columnas atómicas y puede emplearse para la detección de elementos ligeros de diversos materiales. Por otro lado, se muestran imágenes de varios tipos de nanopartículas empleando las distintas modalidades de un microscopio electrónico, en donde se aprecia el potencial de cada modo de operación para obtener información relevante y complementaria de los sistemas bajo estudio.

Finalmente, no resta más que comentar que México cuenta con un potencial aceptable tanto en infraestructura como en personal altamente calificado para realizar trabajo de trascendencia internacional en el campo de la microscopía electrónica. Sin embargo, se tiene el reto de continuar renovando la infraestructura actual, pero sobre todo, de incrementar la formación de jóvenes investigadores en esta área, ya que el futuro de la ciencia y la

tecnología se dirigen hacia escalas subnanométricas, que van a requerir el apoyo de este tipo de técnicas para el estudio y caracterización de nuevos materiales.

Margarita Rivera y Jesús Arenas  
*Editores invitados*

# El rol de la función de transferencia de contraste en la formación de imágenes de resolución atómica de nanopartículas

## The role of the contrast transfer function in the formation of atomic resolution images of nanoparticles

Carlos Angeles Chávez\*

**ABSTRACT:** High resolution transmission electron microscopy results can be quantitatively interpreted if an optimum adjustment is performed in the optical-electronic of the instrument during the atomic resolution images acquisition. This work qualitatively describes the principles of imaging formation by using the theory of electron diffraction and electronic-optics. At the end, the process is summarized through two parameters: contrast transfer function (CTF) and defocus of the image. The result is the modulation of the amplitude and phase in the CTF in order to obtain stronger phase contrast on the  $d$ -spacing of the nanoparticle under observation. Brighter or darker contrasts can be achieved from Scherzer focus and at values of bigger negative defocus. In this way, dark contrasts of  $WO_x$  clusters on crystalline lattice of bright contrast corresponding to the  $m$ - $ZrO_2$  nanoparticle through a controlled and precise manipulation of the defocus was evidenced.

**KEYWORDS:** high resolution transmission electron microscopy (HRTEM), atomic resolution, CTF, nanoparticle, phase contrast.

**RESUMEN:** Los resultados de microscopía electrónica de transmisión de alta resolución pueden ser cuantitativamente interpretados cuando se realizan los ajustes necesarios de la óptica-electrónica del instrumento para la adquisición de las imágenes de resolución atómica. En este trabajo se describen cualitativamente los principios de la formación de imagen en términos de la difracción de electrones y de la óptica electrónica. Al final, el proceso se resume a dos parámetros: la función de transferencia de contraste (FTC) y el desenfocado de la imagen del objeto. El resultado es el control preciso de la modulación de la amplitud y la fase de la FTC a través del desenfocado para conseguir contraste de fase más fuerte e intensos en los espaciados interplanares de la red cristalina de la partícula bajo estudio. Contrastes intensos brillantes u oscuros se pueden lograr a partir del foco de Scherzer hacia valores más negativos. De esta manera, se logró evidenciar clústeres de  $WO_x$  de contrastes oscuros sobre líneas de red de contraste brillante de la  $m$ - $ZrO_2$ , modulando la fase y amplitud de la FTC a través de la manipulación controlada y precisa del foco.

**PALABRAS CLAVE:** microscopía electrónica de transmisión (MET), imágenes, resolución atómica, nanopartícula, contraste de fase.

Recibido: 28 de enero de 2019.

Aceptado: 28 de abril de 2020.

\* Gerencia de Desarrollo de Materiales y Productos Químicos, Instituto Mexicano del Petróleo. Eje Central Lázaro Cárdenas 152, C. P. 07730, Ciudad de México, México.  
Correo electrónico: cangeles@imp.mx | cach6906@gmail.com

## Introducción

La microscopía electrónica de transmisión de alta resolución (HRTEM) es una técnica que permite observar los detalles estructurales de la materia sólida a escala atómica proporcionando un conocimiento directo de la estructura de la materia en forma de una imagen (Urban, 2008; Thomas, 2017; Su, D. 2017; Ophus, C. 2019, Van Tendeloo *et al.*, 2012).

Actualmente, los microscopios son capaces de resolver distancias tan pequeñas como 1 Å, lo suficiente como para separar las columnas atómicas en un cristal (Lentzen, 2008; Jia y Urban, 2004; Borodko *et al.*, 2012). A diferencia de la microscopía de barrido de tunelamiento (STM), la cual es su principal competidor en resolución pero que solo resuelve la superficie del objeto, la HRTEM es un método de proyección cuya señal generada es sensitiva al volumen del objeto y la información es transferida a una imagen bidimensional (Barthel, 2008; Peng *et al.*, 2008; Stroppa, *et al.*, 2009; Kleebe, *et al.*, 2010). Desafortunadamente, la interpretación no es tan sencilla como en la microscopía óptica de luz tradicional. La imagen bidimensional, capturada por la cámara (*charge-coupled device*) CCD, es producto de la interacción del haz de electrones-átomos del objeto y los efectos de incoherencia y aberraciones ópticas de la lente objetiva (Wen-Kuo *et al.*, 2004; Sibarita, 2005; Bals *et al.*, 2006). Así que, la información capturada está codificada y no es directamente interpretable o intuitiva.

Durante las últimas décadas, se ha invertido una gran cantidad de esfuerzo científico para resolver el problema de la interpretación. El resultado de mayor logro ha sido la simulación de imágenes (Peng, *et al.*, 2008; Stroppa, *et al.*, 2009; Wen-Kuo *et al.*, 2004). Es una de las técnicas que toma en cuenta la mecánica cuántica del proceso de la interacción entre electrones y átomos, y la transferencia del contraste óptico-electrónico para la formación de la imagen. La mayoría de las técnicas únicamente proporcionan una solución parcial o nula a la primera causa del problema, es decir, la mecánica cuántica (Sibarita, 2005; Hsieh, *et al.*, 2007).

En la técnica de simulación de imágenes (Horiuchi y He, 2000; Thust *et al.*, 1996; Hosokawa *et al.*, 2015), una imagen teórica es calculada a partir de una estructura atómica propuesta. Sobre la base de una evaluación subjetiva entre la imagen experimental y la imagen calculada, se determina la calidad del ajuste y el modelo de estructura propuesto puede ser aceptado o rechazado. Sin embargo, para estructuras de objetos muy complejos o aperiódicos (Thust *et al.*, 1996) esta técnica se vuelve tediosa o incluso con la cual es imposible conseguir un resultado aceptable debido a la falta total del conocimiento inicial de la estructura desconocida. Aun con esta desventaja, la simulación de imágenes, por tener en cuenta el complejo proceso de dispersión dentro del objeto, sigue siendo una herramienta indispensable para un análisis cuantitativo con mayor profundidad en las imágenes de HRTEM. Esto conlleva a que, para lograr una interpretación intuitiva de la imagen, sea necesario tomar en

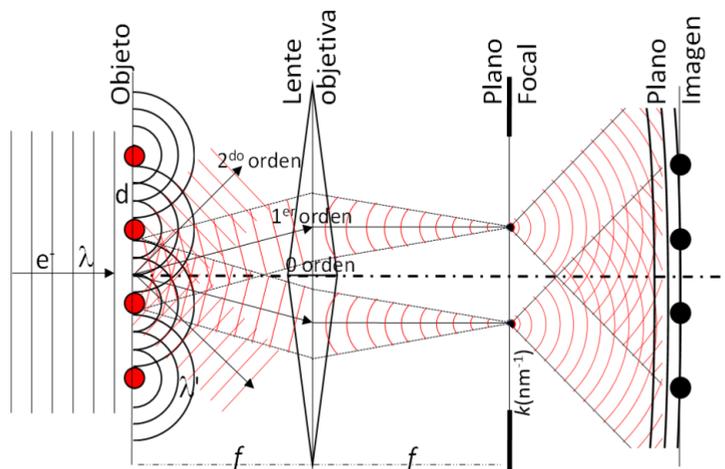
cuenta tanto el formalismo de la difracción como el formalismo de la formación de imágenes (Takai *et al.*, 1997; Danev *et al.*, 2002; Lentzen *et al.*, 2002; Brent y Howe, 2008). Las teorías de difracción de electrones e imagen electrónica describen cómo se genera la información de la estructura del objeto dentro del objeto y luego, al final, cómo se transfiere al detector de imagen. Ambas teorías son bastante complejas, así que solo sus conceptos básicos de forma descriptiva serán abordados en el marco de este trabajo.

En un microscopio, el efecto combinado del desenfoque, aberraciones ópticas y aperturas físicas, limita tanto la resolución del instrumento como el contraste en la imagen (Takai *et al.*, 1997). Hoy en día, es relativamente fácil obtener imágenes con detalles a escala atómica, sin embargo, relacionar la imagen con su estructura atómica es a menudo difícil. A menos que la imagen obtenida sea bajo ciertas condiciones durante la manipulación del instrumento. Análisis de estas condiciones y su implicación en la imagen grabada, son el objetivo de este estudio.

## Principio de formación de imagen de resolución atómica

El principio básico de formación de imagen en microscopía electrónica de transmisión (MET) sigue un esquema directo como lo representa el diagrama de la figura 1. Un haz de electrones con longitud de onda  $\lambda$  —que no está localizado en el espacio para que cada electrón pueda considerarse como un ente aislado— incide como una onda plana sobre un plano de columnas atómicas de la red cristalina. Por simplicidad, se considerará exclusivamente una fila de átomos pero en realidad es un arreglo tridimensional.

FIGURA 1. Diagrama esquemático de la formación de imagen.



Fuente: Elaboración del autor.

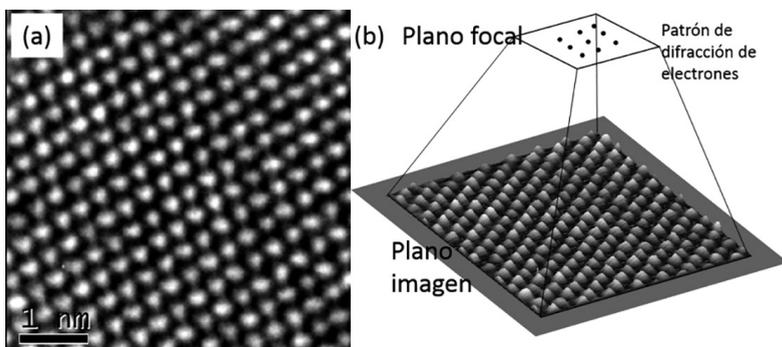
Durante la interacción, cada átomo de cada columna atómica produce ondas secundarias que interfieren con las otras ondas secundarias generadas por los átomos vecinos también. Estas interacciones múltiples finalmente producen una serie de interferencia de ondas constructivas y destructivas (Brent y Howe, 2008), y solo es posible si el cristal es lo suficientemente delgado, 10 nm de espesor como máximo, para permitir el paso de los electrones transmitidos y dispersados. Los máximos de las ondas secundarias entran en fase entre sí en una dirección bien definida. El caso más obvio es la dirección de la onda del electrón paralela a la onda entrante que corresponde al haz directo (no difractado) después de pasar el objeto. Este es identificado como un máximo orden cero. Otras líneas de máximos forman también planos de interferencia constructiva y ocurren en otras direcciones a un ángulo bien definido por el espaciado entre átomos del cristal y la longitud de onda de los electrones incidentes. Son identificados como haz de primer orden, segundo orden, y así sucesivamente, dando lugar a un patrón de difracción ocurrida en un plano bidimensional. El haz de primer orden tiene el ángulo de difracción más pequeño, por lo tanto, distancia entre átomos más grande. En el haz de segundo orden, el ángulo incrementa y la distancia entre átomos decrece, y así sucesivamente.

En este punto, los electrones difractados han sido afectados tanto en la fase como en la amplitud y pueden ser descritos mediante una función de onda de salida  $\Psi(r, z)$  (Allen *et al.*, 2004; Op de Beeck, *et al.*, 1996; Op de Beeck y Van Dyck, 1996). Donde  $r$  representa el plano del cristal perpendicular al haz de electrones incidentes y  $z$  el espesor del cristal perpendicular a  $r$ . Esta función de onda también puede ser representada por una serie de Fourier (Barthel, 2008). Los máximos de interferencia constructiva transportan información sobre la estructura atómica del objeto debido a la atracción del electrón incidente con los potenciales positivos atómicos de los núcleos de los átomos y los canales a lo largo de las columnas atómicas de la red cristalina. Posteriormente, los máximos de interferencia inciden en la lente objetiva, proyectándolos en el plano posterior focal como un patrón de puntos.

Matemáticamente, la lente objetiva convierte la función de onda de salida (serie de Fourier) en una transformada de Fourier (TF) y desplazamiento de fase (Peng *et al.*, 2008). Por lo tanto, la función de onda de salida después de la lente objetiva está representada por  $I(\theta) = \delta(\theta) + \Phi K(\theta)$  (Op de Beeck y Van Dyck, 1996), donde  $\delta$  representa la onda de electrones transmitidos,  $\theta$  el ángulo de dispersión entre la onda de electrones dispersados y la onda de electrones transmitidos,  $\Phi$  representa la TF de la fase de la función de onda y  $K(\theta)$  el desplazamiento de fase incurrido por las aberraciones de la lente objetiva.  $K(\theta)$  es conocido también como función de transferencia de contraste (FTC), la cual modula la amplitud y la fase del patrón de difracción de electrones formado en el plano focal de la lente objetiva.

Siguiendo el proceso de formación de imagen, el patrón de puntos formado en el plano focal es proyectado al plano imagen, que es el espacio real. Matemáticamente se describe como la inversa de la transformada de Fourier (ITF) de  $I(\theta)$  y se representa como el módulo cuadrado de la función de onda de electrones resultante (Op de Beeck y Van Dyck, 1996). Esta imagen, en el plano imagen, es finalmente ampliada por una serie de lentes electrónicas hasta la revelación visual de las columnas atómicas, como la ilustrada en la figura 2a, en la cámara CCD de los microscopios modernos (De Ruijter *et al.*, 1995). De este modo, la información sobre la estructura del objeto tridimensional queda transferido en una imagen bidimensional (Young-Min *et al.*, 2006). De manera esquemática, la figura 2b muestra la proyección de la información al plano imagen mostrando la intensidad de cada columna atómica. La variación en la intensidad es producto de las características de los átomos que la conforman tales como el ambiente químico y/o presencia de defectos.

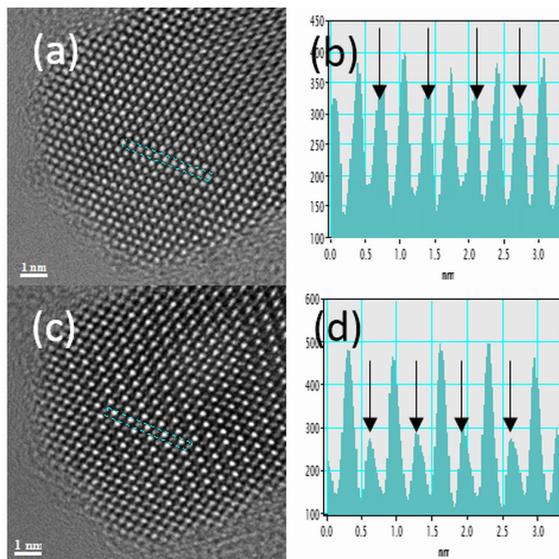
**Figura 2.** a) Típica imagen de HRTEM proyectada bidimensionalmente, y, b) representación tridimensional de la distribución de intensidad de cada de punto brillante.



Fuente: Elaboración del autor.

Con la minimización de las aberraciones ópticas de las lentes condensadoras sobre el haz de electrones incidente, la lente objetiva se convierte en la parte fundamental del microscopio para la transferencia de la información contenida en el patrón de interferencia postrada en la salida del cristal en la imagen (Hawkes, 2015). Sin embargo, la intensidad de los puntos cambia con el grado de desenfoque como lo ilustra la imagen de HRTEM de la figura 3a y c. Misma área de observación del cristal tomadas a dos diferentes grados de desenfoque. El perfil de intensidad de una de las filas de puntos brillantes, en la figura 3b, decrece apreciablemente con el cambio de foco en la figura 3d, marcado por las flechas negras. Por consiguiente, es de extrema importancia fijar criterios en el grado de desenfoque para grabar la información más real del objeto bajo análisis en la imagen.

**Figura 3.** a) y c) Imágenes de HRTEM de una partícula de  $m\text{-ZrO}_2$  tomadas a diferente desenfoque. b) y d) Perfil de intensidad de cada columna atómica en el mismo plano cristalino mostrando los cambios de intensidad con el desenfoque.



Fuente: Elaboración del autor.

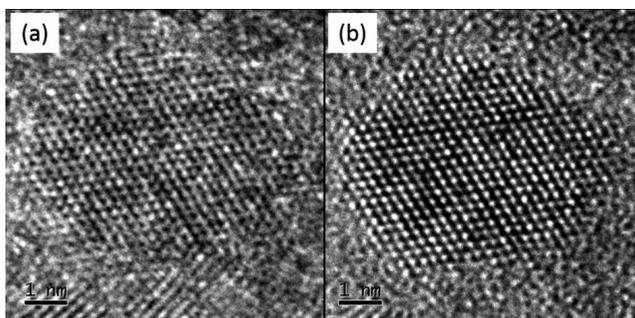
## Función de transferencia de contraste

Como se mencionó en el párrafo anterior, conseguir plasmar de forma más fiel en la imagen la información del cristal contenida en la función de onda del plano de salida después de cruzar la lente objetiva es de vital importancia. Así, la función de onda del plano de salida, fuertemente modificado durante su transferencia a través del sistema óptico del microscopio electrónico, es descrita por la FTC en el marco de un formalismo de onda-óptica por las denominadas aberraciones ópticas de la lente y las propiedades de imagen de la lente objetiva (Yang *et al.*, 2009; Tromp y Schramm, 2013); es independiente del objeto y proporciona un mecanismo conveniente para entender el proceso de formación de la imagen y el contraste o intensidad. Para un mejor entendimiento, la FTC puede ser formulada en términos de frecuencias espaciales ( $k$ ) o espacio recíproco (Hyeong-Seop *et al.*, 2013). Así,  $\Theta$  puede ser el producto  $\lambda k$  y, entonces, la FTC es descrita por  $K(k) = A(k)E(k)\text{Sen}[X(k)]$  donde  $A(k)$  es la función apertura que corta los haces dispersados arriba de un cierto ángulo crítico;  $E(k)$  la función envoltura que describe la atenuación de la onda para frecuencias espaciales altas;  $X(k)$  representa la función de las aberraciones del sistema óptico electrónico dado por  $\pi C_s \lambda^3 k^4 / 2 - \pi \Delta f \lambda k^2$  donde  $C_s$  es el coeficiente de aberración esférica,  $\lambda$  la longitud de onda del electrón y  $\Delta f$  el desenfoque. En el MET, la medición y control del grado de desenfoque que puede lograrse es de una precisión tal que los cambios en la forma de la FTC (Presenza-Pitman,

2009) y la modificación de la intensidad y nitidez de las frecuencias espaciales ( $k$ ) son fácilmente detectables.

En un microscopio, el foco ideal produce una imagen de mínimo contraste, clara indicación de ausencia de fase del objeto. En el MET, dado que las aberraciones de la lente funcionan como una placa de fase (Nagayama y Danev, 2008) en el plano focal posterior del sistema óptico, difícilmente se obtiene una imagen de mínimo contraste con ausencia de fase en el foco ideal en una muestra cristalina. En la imagen, se registran tenuemente los máximos de la interferencia constructiva de las ondas generadas a la salida del objeto, como lo ilustra la figura 4a.

**Figura 4.** Imágenes de HRTEM de una partícula c-Ni-ZrO<sub>2</sub> tomadas: a) desenfoque de mínimo contraste, y, b) desenfoque de máximo contraste.

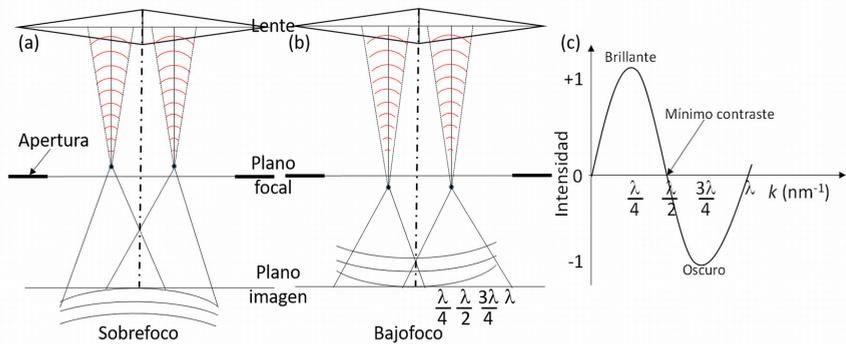


Nota: 4a: imagen adquirida en condiciones de foco, mínimo contraste, que contrasta fuertemente con la imagen ilustrada en la figura 4b, tomada a bajo foco en condiciones de máximo contraste brillante. Fuente: Elaboración del autor.

La generación de imágenes de máximo contraste ha sido ampliamente estudiada en microscopía de contraste de fase (Zhu *et al.*, 1997) y la descripción del mecanismo para la ganancia de máximo contraste será utilizada para explicar los resultados desplegados en la figura 4. En el microscopio electrónico de transmisión, a condición de foco  $\Delta f = 0$ , la lente objetiva (pieza polar) opera con una corriente eléctrica óptima (Barthel, 2008) y los puntos de difracción se localizan exactamente en el plano focal proyectando un frente de onda plano al plano imagen como se ilustra en la figura 1. Bajo estas condiciones, el contraste es mínimo o equivalente en cualquier parte de la imagen y nula o mínima información es visualizada en la imagen capturada. Cuando se incrementa la corriente eléctrica de la lente objetiva, más allá de la corriente óptima, el frente de onda en el plano imagen se convierte en convergente como esquemáticamente lo ilustra la figura 5a. El punto de difracción se mueve en dirección hacia la lente objetiva, indicando mayor excitación de la lente y operando en condiciones de mayor inestabilidad. La imagen del objeto se encontrará en una posición de desenfoque positivo o

sobrefoco  $\Delta f > 0$ . Si se disminuye la corriente, obtendremos una lente más relajada y de mayor estabilidad. El punto de difracción se alejará de la lente objetiva produciendo un frente de onda divergente y una imagen del objeto con menor afectación eléctrica se encontrará en la posición de desenfoco negativo o bajofoque  $\Delta f < 0$ . Este desenfoco retrasa la onda en fase con respecto a la onda en el eje óptico permitiendo obtener un incremento en el grado de contraste (figura 5b). Una mejor representación de esta descripción en términos de un desfase de una longitud de onda en el dominio de la frecuencia espacial se ilustra en la figura 5c.

**Figura 5.** Esquema de desenfoco que ayuda a visualizar la diferencia de fase en el objeto: a) sobrefoco; b) bajofoque, y, c) función de transferencia de contraste sin aberraciones ópticas.

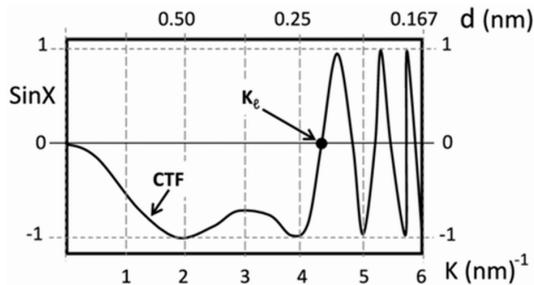


Fuente: Elaboración del autor.

Esta representación de la FTC que existe en el dominio de la frecuencia espacial o espacio recíproco  $k(nm^{-1})$  corresponde a un microscopio con una lente ideal, libre de aberraciones ópticas. En el origen, que corresponde al eje óptico del microscopio, la imagen del objeto se encuentra en foco y el valor de la FTC es cero, por lo tanto, el contraste en la imagen es mínimo. A medida que se va desenfocando la imagen, el frente de onda se va curvando y el plano imagen va detectando el desplazamiento de la fase hacia la cresta hasta alcanzar el máximo a un desenfoco de un cuarto de longitud de onda. El valor de la función de transferencia de contraste (FTC) es máximo y positivo generando una imagen de contraste brillante. Más incremento de desenfoco empezará a disminuir la brillantez hasta alcanzar el mínimo a la mitad de longitud de onda en el valor de la FTC igual a cero. Continuando con el desenfoco, la FTC empezará a tener valores negativos hasta alcanzar el mínimo a tres cuartos de longitud de onda y el contraste en la imagen será oscuro. Como lo ilustra el diagrama, el cambio gradual del desenfoco en uno u otro sentido cambiará sucesivamente el contraste de brillante a oscuro y viceversa. Sin embargo, en el microscopio electrónico de transmisión, la lente es demasiado imperfecta, tanto que las aberra-

ciones ópticas modifican fuertemente la FTC (Op de Beeck y Van Dyck, 1996) de una lente ideal generando un perfil totalmente diferente al presentado en la figura 5c. La FTC real correspondiente a un microscopio electrónico de 200 kV y Cs de 1 mm genera el perfil ilustrado en la figura 6.

**Figura 6.** FTC de un microscopio de 200kV y Cs de 1 mm.



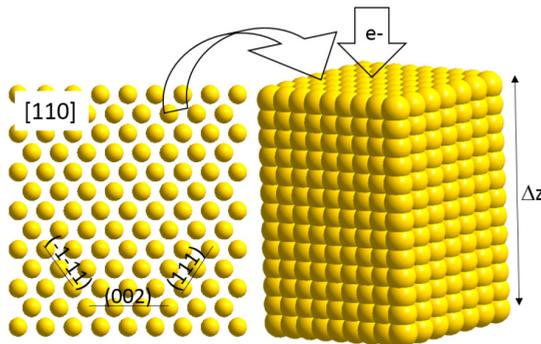
Fuente: Akhtar, 2012.

En el gráfico se puede notar que la FTC inicia en cero. Inmediatamente después, se convierte en negativo, y representa el contraste de fase positivo que produce un fondo brillante con las características atómicas oscuras. Permanece negativo en un amplio rango de frecuencias espaciales  $k$  proporcionando un amplio ancho de banda para resolver diferentes espaciados atómicos. En esta región, la información de la fase grabada en la imagen es directamente interpretable. Posteriormente, la FTC incrementa fuertemente su valor hasta intersectar con el eje X (Horiuchi y He, L. 2000). Aquí, en este valor de frecuencia espacial, la FTC fija el límite de resolución del instrumento y también fija el valor del foco en la imagen del objeto con el mínimo contraste (Lentzen, 2008; Vulovic *et al.* 2012) como el ilustrado en la figura 4a. A partir de este punto, la FTC es oscilatoria y la información de la fase no es directamente interpretable. Las imágenes obtenidas bajo estas condiciones corresponden a condiciones de sobrefoque y la interpretación es realizada a través de simulación computarizada como lo podría ser el resultado mostrado en la figura 4b.

## Imágenes de HRTEM a partir de cálculos teóricos

Puesto que la FTC modula la amplitud y la fase del patrón de difracción de electrones formado en el plano focal de la lente objetiva a través del desenfoque, es importante comprender su comportamiento con el espesor del cristal en una red cristalina. Esto se llevó a cabo a través de cálculos teóricos del modelo atómico de la estructura cristalina del Au con diferentes espesores. La figura 7 muestra la representación esquemática del modelo atómico utilizado orientado a lo largo de la dirección cristalográfica [110].

**Figura 7.** Modelo atómico de la estructura del oro vista en la dirección [110] perpendicular al haz de electrones incidente y su proyección tridimensional.



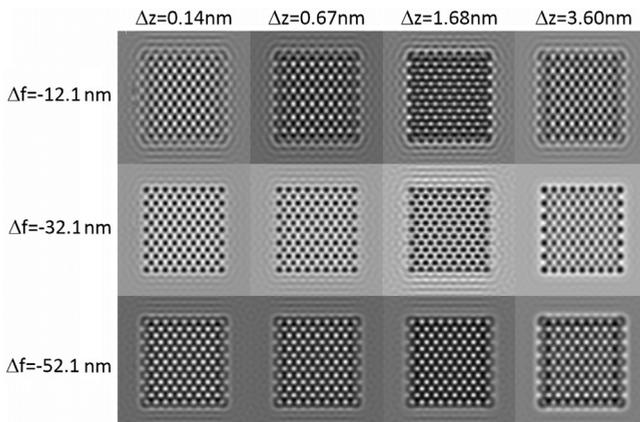
Fuente: Elaboración del autor.

Datos correspondientes a un microscopio electrónico de transmisión de 200 kV, con pieza polar de ultra alta resolución de 0.19 nm ( $k = 5.26\text{nm}^{-1}$ ) punto a punto y Cs de 0.5 mm fueron alimentados al *software* Simulatem (Rodríguez y Beltrán, 2001) para calcular las imágenes de HRTEM.

Con este poder de resolución, los únicos espaciados interplanares que son resueltos de la red cristalina del oro corresponden a los planos (111) y (002), respectivamente. La revelación de estos planos cuando el cristal se orienta a lo largo de las direcciones  $\langle 110 \rangle$  y  $\langle 001 \rangle$ , resuelven en la imagen columnas atómicas punto a punto. En otras orientaciones cristalográficas, el instrumento solo resuelve líneas de red. En el estudio, el cristal fue orientado a lo largo de la dirección [110] para visualizar las columnas atómicas de los planos (111) y (002) que deben ser proyectados en las imágenes simuladas. El patrón de puntos observado en la imagen debe reproducir el patrón de las columnas atómicas del modelo atómico en la dirección orientada para validar el cálculo teórico realizado por el *software*. Estos cálculos se realizaron para diferentes focos a un espesor de cristal definido observando la modulación de la FTC para cada cambio de foco. Al final se obtuvo una serie de imágenes con diferentes desenfoques, conocida como serie focal (Thust *et al.*, 1996). Posteriormente, se seleccionaron las imágenes más nítidas de mayor contraste de puntos brillantes en fondo oscuro y puntos oscuros en fondo blanco basado en la teoría de la FTC del apartado anterior. La figura 8 despliega la serie de imágenes obtenidas a diferentes desenfoques y espesores reproduciendo con mayor nitidez las columnas atómicas del modelo atómico presentado en la figura 7.

De acuerdo con el análisis de desenfoque desarrollado por Scherzer (Lentzen, 2008; Horiuchi y He, 2000), el contraste de fase más alto es logrado en el llamado desenfoque de Scherzer que es  $\Delta f_{Sc} = -1.2 (Cs\lambda) = -31.6$  nm; no obstante, la imagen con mayor contraste, a partir de un punto de

**Figura 8.** Imágenes de HRTEM simuladas de la estructura de oro en la dirección [110] para diferentes desenfoques y espesores del cristal.



Fuente: Elaboración del autor.

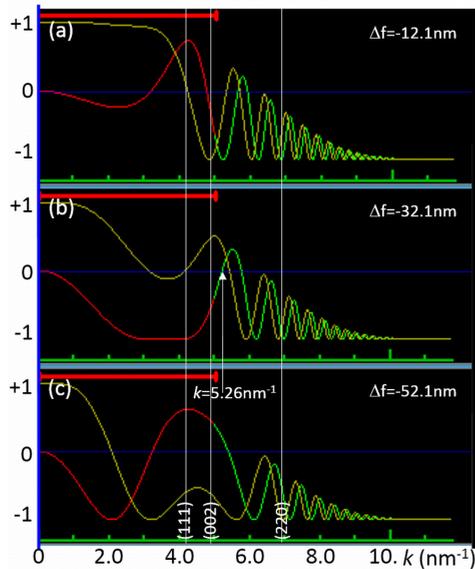
vista cualitativo, es fijada por el espesor del cristal que difiere ligeramente del foco de Scherzer. Por lo tanto, en la figura se expone la imagen de mayor contraste obtenida a tres diferentes desenfoques para cada uno de los espesores evaluados: sobrefoco ( $\Delta f = -12.1\text{nm}$ ), cercano al foco de Scherzer ( $\Delta f = -32.1\text{nm}$ ) y bajofoco ( $\Delta f = -52.1\text{nm}$ ).

La imagen correspondiente al cristal de espesor de 0.14 nm, tomado a sobrefoco, no muestra un contraste de fondo definido. El patrón de puntos brillantes es similar al patrón de puntos oscuros haciendo difícil determinar el tipo de contraste correspondiente a la columna atómica. Una imagen similar fue obtenida para el espesor de 3.6 nm mientras que para los espesores 0.67 y 1.68 nm, los puntos brillantes parecen estar sobre un fondo oscuro y podrían ligeramente asociarse con las columnas atómicas. A condiciones de sobrefoco, el espesor tiene un efecto en el contraste mientras que a condiciones de bajofoco el efecto es imperceptible como se describirá a continuación. A desenfoque  $\Delta f = -32.1\text{nm}$ , claramente se puede visualizar que las columnas atómicas corresponden a los puntos negros sobre fondo blanco, mientras que en las imágenes a bajofoco de  $\Delta f = -52.1\text{nm}$ , las columnas atómicas son brillantes sobre un fondo obscuro. Así que a desenfoques de  $\Delta f = -32.1$  y  $-52.1\text{nm}$ , cada punto generado en la imagen representa una columna atómica del modelo para los diferentes espesores del cristal. Como se aprecia en la imagen, el grado de nitidez de la imagen cambia ligeramente con el espesor, por lo cual la presentación de estos resultados sugiere encontrar el mejor grado de desenfoque que proyecte la imagen con mayor grado de nitidez y contraste. Por ejemplo, los mejores contrastes para un espesor de 3.6 nm (imágenes no mostradas) se encontraron a  $\Delta f = -35.1\text{nm}$  para puntos oscuros, y  $-55.1\text{nm}$ , para puntos claros.

Los contrastes observados en las diferentes imágenes de la figura 8 pueden ser mejor comprendidos analizando el perfil de la FTC y los espaciados inter-

planares en las gráficas de FTC de la figura 9. En particular para el espesor del cristal de 0.14 nm. Los planos atómicos (111), (002) y (220) de la estructura del Au fueron insertados sobre el eje de la frecuencia espacial  $k$  para visualizar el valor de la FTC al desenfocado evaluado y su interacción con el espaciado recíproco de dichos planos. Las gráficas claramente van ilustrando la modulación del contraste y la amplitud de la FTC en función del desenfocado. En el sobre foco,  $\Delta f = -12.1\text{nm}$ , la FTC es positiva cuando interseca con el espaciado recíproco del plano (111) y negativo con la intersección del plano (002). Esto podría explicar el patrón de contrastes claros–oscuros observado en la imagen. A  $\Delta f = -32.1\text{ nm}$ , la FTC es negativa en la intersección con ambos planos, por eso en la imagen se observan columnas atómicas oscuras sobre un fondo blanco. A  $\Delta f = -52.1\text{ nm}$ , la FTC es positiva en la intersección con ambos planos, proyectando en la imagen puntos brillantes sobre un fondo oscuro.

**Figura 9.** Gráficas de FTC para cada uno de los desenfocados utilizados para la simulación de las imágenes de HRTEM.



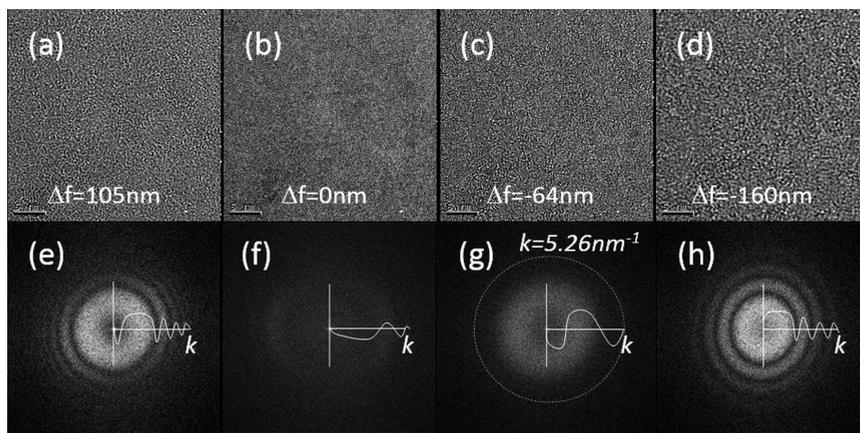
Fuente: Elaboración del autor.

## Imágenes experimentales de HRTEM de contrastes claros y oscuros

La FTC real modulando la amplitud y la fase del patrón de difracción de electrones en el microscopio electrónico de transmisión JEM2200FS de 200kV de voltaje de aceleración y pieza polar de alta resolución, que resuelve punto a punto 0.19 nm, es revelado a través de la transformada de Fourier de las

imágenes de HRTEM del soporte polimérico amorfo tomadas a diferentes desenfoques. Durante la adquisición de las imágenes, el soporte se mantuvo lo suficientemente estable para lograr medir con suficiente precisión el grado de desenfoque. Los resultados obtenidos se ilustran en la figura 10. Cuatro imágenes a desenfoques de  $\Delta f = 105, 0, -64$  y  $-160$  nm muestran en sus TF el comportamiento de la FTC dentro del rango de frecuencias espaciales del límite de resolución del microscopio.

**Figura 10.** a-d) Imágenes de HRTEM tomadas del soporte polimérico de una rejilla de cobre de TEM a diferentes desenfoques. e-h) Transformadas de Fourier de las imágenes de HRTEM mostrando el comportamiento de la FTC con el desenfoque.



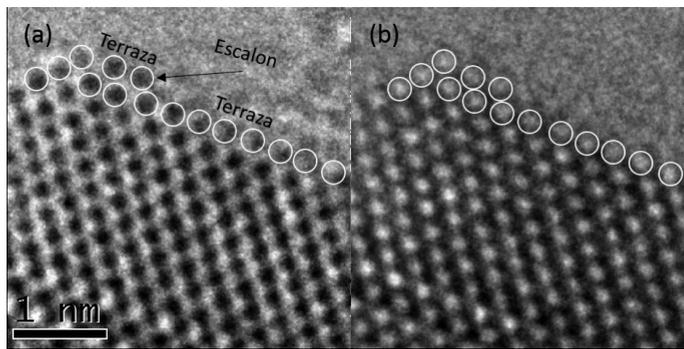
Fuente: Elaboración del autor.

Cada una de las FTC muestra claramente el ancho de banda donde las frecuencias espaciales serán brillantes (FTC positiva) y donde serán oscuras (FTC negativa) para cada grado de desenfoque de este espécimen en particular.

De acuerdo con los resultados de las imágenes teóricamente calculadas, insta tomar imágenes siempre a una menor excitación de la lente, es decir, a bajofoco  $\Delta f < 0$ . La menor inestabilidad inducida por la corriente a la lente conducirá a la formación de una imagen más real de la estructura cristalina con mayor resolución y mejor nitidez (Barthel, 2008). Por lo tanto, es recomendable obtener imágenes a bajofoco por debajo del foco del límite de resolución como los ilustrados en la figura 10g para puntos oscuros y figura 10h para puntos brillantes. Dependiendo del espesor del espécimen o nanopartícula y sus espaciados interplanares, se permitirá determinar el grado de bajofoco óptimo para conseguir que las columnas atómicas estén dentro de un rango de ancho de banda amplio, donde la FTC sea positiva o negativa, para que los contrastes de las columnas atómicas sean oscuros o brillantes y conseguir una interpretación más directa de la imagen. Para algunos casos —el

espaciado interplanar de la red cristalina del espécimen—, la FTC puede cubrir los espaciados interplanares tanto del lado positivo como del negativo permitiendo con el desenfoque a bajofoco obtener columnas atómicas oscuras para luego dar paso a las columnas brillantes a un mayor desenfoque como lo muestra la imagen de HRTEM de la figura 11. Defectos superficiales en la nanopartícula de zirconia claramente pueden caracterizarse en ambas imágenes.

**Figura 11.** Imágenes de HRTEM de una partícula de  $c\text{-Ni-ZrO}_2$  tomada a bajofoco de máximo contraste cuando la FTC es: a) negativo, columnas atómicas oscuras, y, b) positivo, columnas atómicas brillantes.



Nota: Defectos superficiales son claramente evidenciables.  
Fuente: Elaboración del autor.

## Imágenes experimentales de HRTEM en nanopartículas

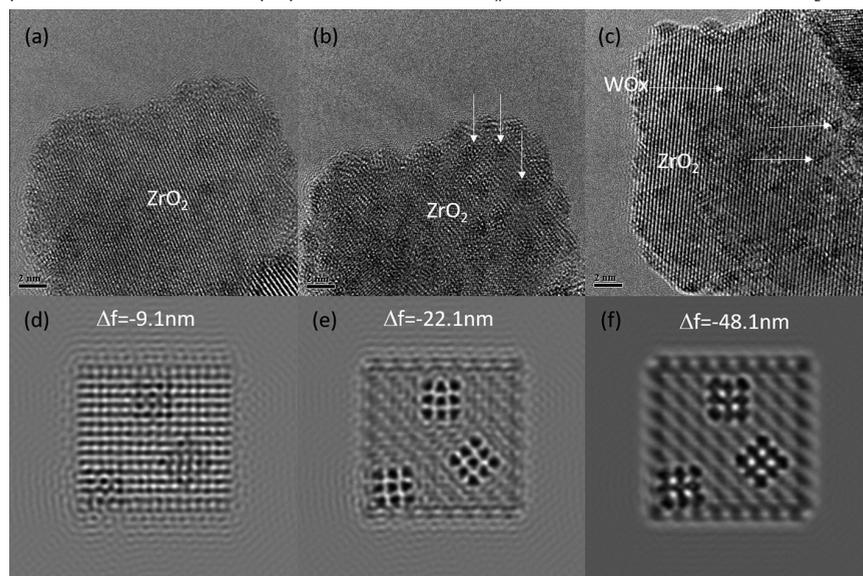
Basado en el conocimiento anteriormente descrito, imágenes experimentales de HRTEM evidenciando clústeres de  $\text{WO}_x$  sobre partículas de zirconia fueron obtenidas mediante análisis MET a través de la modulación de la amplitud y de la fase de la FTC producida por la manipulación precisa del foco. Inicialmente, los átomos de tungsteno se encuentran dentro de la estructura como solución sólida estabilizando la fase tetragonal de la zirconia. Con la calcinación a  $800\text{ }^\circ\text{C}$  de esta muestra, el tungsteno es segregado y la zirconia tetragonal se transforma en monoclinica (Angeles-Chávez *et al.*, 2006). El objetivo fue evidenciar directamente de la imagen, la presencia del tungsteno.

Los resultados de HRTEM obtenidos del análisis de la muestra calcinada a  $800\text{ }^\circ\text{C}$  son desplegados en la figura 12a-c. Las figuras 12a y 12b corresponden a una partícula de zirconia tomada a dos diferentes grados de desenfoque. La primera imagen fue tomada después de haber modulado la amplitud y la fase de la FTC a través del foco en sentido negativo, hasta lograr que el ancho de banda fuera positivo en la frecuencia espacial de la red cristalina de la zirconia, generando las líneas de red brillantes. La segunda

imagen, figura 12b, fue tomada después de la modulación de la FTC hacia valores de foco aún más negativos hasta que incluyera en la región negativa las líneas de red correspondientes a  $WO_x$  y en la región positiva las líneas de red de la zirconia. La imagen proyectada reveló pequeñas regiones oscuras, marcadas con flechas blancas, sobre las líneas de red de la zirconia con baja resolución a este grado de desenfoco. Imagen de otra partícula, figura 12c, tomada bajo las mismas condiciones de modulación de la imagen de la figura 12b, reveló líneas de red de la zirconia de mayor espaciado interplanar mostrando nítidamente ambos contrastes: oscuros para los clústeres de  $WO_x$  y brillantes para la partícula de zirconia. La gran diferencia en resolución entre ambas partículas sugiere tomar en cuenta otros parámetros relacionados con sus características como la orientación cristalográfica, espesor, cristalinidad de las fases, dispersión de la fase, etc., para lograr proyectar la información contenida en el objeto en una imagen más interpretable como la ilustrada en la figura 12c.

Una validación de la interpretación de estos resultados experimentales se realizó a través del cálculo de la imagen proyectada de un modelo propuesto, es decir, clústeres de átomos de W y O de arreglo cristalino ortorrómbico de  $WO_3$  sobre un pequeño cristal de  $m$ - $ZrO_2$ . Los resultados obtenidos son desplegados en las figuras 12e-f, mostrando imágenes calculadas

**Figura 12.** a-c) Imágenes de HRTEM de partículas de  $m$ - $ZrO_2$  mostrando la modulación del contraste de fase e intensidad a través del foco para evidenciar los clústeres de  $WO_x$  de contraste oscuro sobre la red de  $ZrO_2$  de contraste brillante. d-e) Imágenes calculadas a diferentes grados de desenfocajes a partir de un modelo atómico propuesto: Clústeres de  $WO_x$  ortorrómbico sobre cristal de  $m$ - $ZrO_2$ .



Fuente: Elaboración del autor.

a  $\Delta f = -9.1$  nm,  $\Delta f = -22.1$  nm, y,  $\Delta f = -48.1$  nm. Las imágenes revelan cómo a través del desenfoque de la modulación de la amplitud y la fase de la FTC es posible develar los clústeres de  $WO_x$  sobre el cristal de  $m\text{-ZrO}_2$  mediante la ganancia de contraste oscuro generado por el incremento del grado de desenfoque en el sentido negativo. Puntos oscuros correspondientes a los átomos de W de los clústeres de  $WO_x$  son observados en las imágenes calculadas a  $\Delta f = -22.1$  nm y  $\Delta f = -48.1$  nm a diferencia de la imagen calculada a  $\Delta f = -9.1$  nm, donde únicamente las líneas de red correspondiente a la  $m\text{-ZrO}_2$  fueron reveladas nítidamente y perdida en los desenfoques posteriores. Como puede verse, son resultados muy congruentes con los resultados de las imágenes experimentales de la figuras 12a y 12b. Por lo tanto, la modulación de la transferencia de amplitud y fase del objeto con cambios precisos de foco permite seleccionar las frecuencias que serán brillantes y las frecuencias que serán oscuras para proyectar la información más real contenida en el objeto bajo estudio. Sin embargo, el alto grado de desenfoque conduce irremediamente a una disminución de la resolución del instrumento. Como resultado, aunque la morfología general de la muestra a escala nanométrica se puede deducir mediante imágenes bajo desenfoque, la información de resolución espacial más alta generalmente se pierde por lo que la imagen se deberá tomar en función de la información que se desea evidenciar.

## Conclusiones

La FTC y el desenfoque de la imagen del objeto tienen un papel importante en la modulación de la amplitud y la fase del patrón de difracción de electrones formado en el plano focal de la lente objetiva modificando fuertemente el contraste de las frecuencias espaciales de la red cristalina. La generación de imágenes más interpretables implica modular la fase y amplitud de la FTC mediante un control preciso del grado de desenfoque en el sentido negativo del foco hasta lograr intersectar las frecuencias espaciales en el contraste deseado a partir del valor del foco de Scherzer. El desenfoque hacia el lado negativo del foco implica suministro de menor corriente eléctrica a la lente objetiva lo que conduce a una menor inestabilidad y una mejora en la imagen proyectada. La validez total de la interpretación de una imagen siempre será respaldada a través de la imagen calculada teóricamente a partir de un modelo atómico del cristal.

## Referencias

- Akhtar, S. (2012). Transmission electron microscopy of graphene hydrated biomaterials nanostructures: Novel techniques and analysis. *Thesis dissertation*, Faculty of Science and Technology, Uppsala University, Uppsala, Sweden. <http://urn.kb.se/resolve?urn=urn:nbn:se:uu:diva-171991>

- Allen, L. J., McBride, W., O'Leary, N. L., Oxley, M. P. (2004). Exit wave reconstruction at atomic resolution. *Ultramicroscopy*, (100) 91. <https://doi.org/10.1016/j.ultramic.2004.01.012>
- Angeles-Chávez, C., Cortés-Jácome, M.A., Torres-García, E., Toledo-Antonio, J. A. (2006). Structural evolution of WO<sub>3</sub> nanoclusters on ZrO<sub>2</sub>. *Journal Materials Research*, 807. <https://doi.org/10.1557/jmr.2006.0100>
- Bals, R. S., Van Aert, S., Van Tendeloo, G., Avila-Brandé, D. (2006). Statistical estimation of atomic positions from exit wave reconstruction with a precision in the picometer range. *Phys. Rev. Lett.* (96): 096106. <https://doi.org/10.1103/PhysRevLett.96.096106>
- Barthel, J. (2008). Ultra-precise measurement of optical aberrations for sub-angstrom transmission electron microscopy. *Thesis dissertation*, Von der Fakultät für Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften der Rheinisch-Westfälischen Technischen Hochschule, Germany, N. p., Web. <https://www.osti.gov/edweb/biblio/21084262>
- Borodko, Y., Ercius, P., Pushkarev, V., Thompson, C., Somorjai, G. (2012). From single Pt atoms to Pt nanocrystals: Photoreduction of Pt<sup>2+</sup> inside of a PAMAM dendrimer. *J. Phys. Chem. Lett.*, (3): 236. <https://doi.org/10.1021/jz201599u>
- Brent, F., Howe, J. M. (2008). *Transmission electron microscopy and diffractometry of materials*, 3a ed. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg. <https://doi.org/10.1007/978-3-540-73886-2>
- Danev, R., Okawara, H., Usuda, N., Kametani, K., Nagayama, K. (2002). A novel phase-contrast transmission electron microscopy producing high-contrast topographic images of weak objects. *J. Biol. Phys.*, (28): 627. <https://doi.org/10.1023/A:1021234621466>
- De Ruijter, W. J., Sharma, R., McCartney, M. R., Smith, D. J. (1995). Measurement of lattice-fringe vectors from digital HREM images: experimental precision. *Ultramicroscopy*, (57): 409. [https://doi.org/10.1016/0304-3991\(94\)00166-K](https://doi.org/10.1016/0304-3991(94)00166-K)
- Hawkes, P. W. (2015). The correction of electron lens aberrations. *Ultramicroscopy*, (156) A1. [doi.org/10.1016/j.ultramic.2015.03.007](https://doi.org/10.1016/j.ultramic.2015.03.007)
- Horiuchi, S., He, L. (2000). *High-resolution transmission electron microscopy, characterization of high Tc materials and devices by electron microscopy*, Nigel D. Browning, Stephen J. Pennycook (eds.). Cambridge. <https://doi.org/10.1017/CBO9780511534829>
- Hosokawa, F., Shinkawa, T., Arai, Y., Sannomiya, T. (2015). Benchmark test of accelerated multi-slice simulation by GPGPU. *Ultramicroscopy*, (15): 856. <https://doi.org/10.1016/j.ultramic.2015.06.018>
- Hsieh, W. K., Anderson, E. H., Benner, G., Park, M. J., Gómez, E.D., Balsara, N.P., Kisielowski, C. (2007). Contrast transfer function design by an electrostatic phase plate. *Microsc. Microanal.*, (13): 2. <https://doi.org/10.1017/S1431927607073874>
- Hyeong-Seop, J., Hyo-Nam, P., Jin-Gyu, K., Jae-Kyung, H. (2013). Critical importance of the correction of contrast transfer function for transmission electron microscopy-mediated structural biology. *J. Anal. Sci. Technol.*, (4): 14. <https://doi.org/10.1186/2093-3371-4-14>
- Jia, C. L., Urban, K. (2004). Atomic-resolution measurement of oxygen concentration

- in oxide materials. *Science* (303): 2001. <https://doi.org/10.1126/science.1093617>
- Kleebe, H-J., Lauterbach, S., Müller, M. (2010). Transmission electron microscopy (TEM). *Bunsen-Magazin*, (5): 168. [https://doi.org/10.1017/S1431927608080045](https://www.yumpu.com/en/document/read/17191295/bunsen-magazin-deutsche-bunsengesellschaft-fur-physikalische-lentzen, M. (2008). Contrast transfer and resolution limits for sub-ångstrom high-resolution transmission electron microscopy. <i>Microsc. Microanal.</i>, (14): 16. <a href=)
- Lentzen, M., Jahn, B., Jia, C.L., Thust, A., Tillmann, K., Urban, K. (2002). High resolution imaging with aberration-corrected transmission electron microscopy, *Ultramicroscopy*, (92): 233. [https://doi.org/10.1016/S0304-3991\(02\)00139-0](https://doi.org/10.1016/S0304-3991(02)00139-0)
- Nagayama, K., Danev, R. (2008). Phase contrast electron microscopy: Development of thin-film phase plates and biological applications. *Phil. Trans. R. Soc. B*, (363): 2153. <https://doi.org/10.1098/rstb.2008.2268>
- Op de Beeck, M., Van Dyck, D. (1996). Direct structure reconstruction in HRTEM. *Ultramicroscopy*, (64): 153. [https://doi.org/10.1016/0304-3991\(96\)00006-X](https://doi.org/10.1016/0304-3991(96)00006-X)
- Op de Beeck, M., Van Dyck, D., Coene, W. (1996). Wave function reconstruction in HRTEM: the parabola method. *Ultramicroscopy*, (64): 167. [https://doi.org/10.1016/0304-3991\(96\)00058-7](https://doi.org/10.1016/0304-3991(96)00058-7)
- Ophus, C. (2019). Four-dimensional scanning transmission electron microscopy (4D-STEM): From scanning nanodiffraction to ptychography and beyond. *Microsc. Microanal.*, (25): 563. <https://doi.org/10.1017/S1431927619000497>
- Peng, Y., Oxley, M. P., Lupini, A. R., Chisholm, M. F., Pennycook, S. J. (2008). Spatial resolution and information transfer in scanning transmission electron microscopy, *Microsc. Microanal.*, (14): 36. <https://doi.org/10.1017/S1431927608080161>
- Prezenta-Pitman, G. (2009). Determination of the contrast and modulation transfer functions for high resolution imaging of individual atoms. *Thesis dissertation*, Department of Physics, University of Toronto, Toronto, Ontario. <https://www.researchgate.net/publication/253639776>
- Rodríguez, A. G., Beltrán, L. M. (2001). SimulaTEM: a program for the multislice simulation of image and diffraction patterns of non-crystalline objects. *Rev. Latin Am. Metal. Mat.* (21): 46. [http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0255-69522001000200009](http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0255-69522001000200009)
- Sibarita, J-B. (2005). Deconvolution microscopy. *Adv. Biochem. Engin./Biotechnol.*, (95) 201. <https://doi.org/10.1007/b102215>
- Stroppa, D. G., Montoro, L. A., Beltrán, A., Conti, T. G., Da Silva, R. O., Andrés J., Longo, E., Leite, E. R., Ramírez, A. J. (2009). Unveiling the chemical and morphological features of Sb-SnO<sub>2</sub> nanocrystals by the combined use of high-resolution transmission electron microscopy and ab initio surface energy calculations. *J. Am. Chem. Soc.*, (131): 14544. <https://doi.org/10.1021/ja905896u>
- Su, D. (2017). Advanced electron microscopy characterization of nanomaterials for catalysis. *Green Energy & Environment*, (2): 70. <https://doi.org/10.1016/j.gee.2017.02.001>
- Takai, Y., Ando, T., Ikuta, T., Shimizu, R. (1997). Principles and applications of defocus-image modulation processing electron microscopy. *Scanning Microscopy*, (11): 391. <https://www.ecmjournal.org/smi/pdf/smi97-30.pdf>

- Thomas, J. M. (2017). Reflections on the value of electron microscopy in the study of heterogeneous catalysts. *Proc. R. Soc. A*, (473): 20160714. <https://doi.org/10.1098/rspa.2016.0714>
- Thust, A., Coene, W. M. J., Op de Beeck, M., Van Dyck, D. (1996). Focal-series reconstruction in HRTEM: simulation studies on non-periodic objects. *Ultramicroscopy*, (64): 211. [https://doi.org/10.1016/0304-3991\(96\)00011-3](https://doi.org/10.1016/0304-3991(96)00011-3)
- Tromp, R. M., Schramm, S. M. (2013). Optimization and stability of the contrast transfer function in aberration-corrected electron microscopy. *Ultramicroscopy*, (125): 72. <https://doi.org/10.1016/j.ultramic.2012.09.007>
- Urban, K. W. (2008). Studying atomic structures by aberration-corrected transmission electron microscopy. *Science*, (321): 506. <https://doi.org/10.1126/science.1152800>
- Van Tendeloo, G., Bals, S., Van Aert, S., Verbeeck, J., Van Dyck, D. (2012). Advanced electron microscopy for advanced materials. *Adv. Mater.*, (24): 5655. <https://doi.org/10.1002/adma.201202107>
- Vulovic, M., Franken, E., Ravelli, R. B. G., Van Vliet, L. J., Rieger, B. (2012). Precise and unbiased estimation of astigmatism and defocus in transmission electron microscopy. *Ultramicroscopy*, (116): 115. <https://doi.org/10.1016/j.ultramic.2012.03.004>
- Wen-Kuo, H., Fu-Rong, Ch., Ji-Jung, K., Kirkland, A. I. (2004). Resolution extension and exit wave reconstruction in complex HREM. *Ultramicroscopy*, (98): 99. <https://doi.org/10.1016/j.ultramic.2003.08.004>
- Yang, C., Jiang, W., Chen, D. H., Adiga, U., Ng, E. G., Chiu, W. (2009). Estimating contrast transfer function and associated parameters by constrained non-linear optimization. *Journal of Microscopy*, (233): 391. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2818.2009.03137.x>
- Young-Min, K., Jong-Man, J., Jin-Gyu, K., Youn-Joong, K. (2006). Image processing of atomic resolution transmission electron microscope images. *J. Korean Phys. Soc.*, (48): 250. <https://www.springer.com/journal/40042>
- Zhu, J., Penczek, P. A., Schröder, R., Frank, J. (1997). Three-dimensional reconstruction with contrast transfer function correction from energy-filtered cryoelectron micrographs: Procedure and application to the 70S *Escherichia coli* ribosome. *J. Struct. Biol.*, (118): 197. <https://doi.org/10.1006/jsbi.1997.3845>



# Biosíntesis y caracterización de nanoestructuras por microscopía electrónica<sup>◇</sup>

## Biosynthesis and characterization of nanostructures by electron microscopy

Nayely Torres-Gómez,\* Rodolfo D. Ávila-Avilés,\*\* Alfredo R. Vilchis-Nestor\*\*\*

**ABSTRACT:** The methods to obtain nanostructures have been a fundamental area of study since the beginning of the nanotechnology. The biosynthesis of nanostructures is inspired by the behavior that some microorganisms and plants have for subsisting in environments with chemical stress. This paper presents newfangled examples of biosynthesis achieved by our research group in order to obtain Ag and Au nanostructures with tunable morphology using *Anemopsis californica* extract as reducing agent of Ag<sup>+</sup> and Au<sup>3+</sup> ions; as well the synthesis assisted by *Camellia sinensis* extract of magnetite nanoparticles (Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>) with homogeneous size and an excellent crystalline phase control in contrast with other biogenic methods reported in the literature. Additionally, the effective use of biotemplates to design nanostructured materials with green synthesis methods is demonstrated. Finally, the evidence of the nanomaterials generated from biosynthesis was shown via characterization with transmission electron microscopy, scanning electron microscopy and X-ray energy dispersion spectroscopy.

**KEYWORDS:** biosynthesis, *Camellia sinensis*, *Anemopsis californica*, Ag, Au and Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> nanoparticles, biotemplate, electron microscopy.

**RESUMEN:** Los métodos de obtención de nanoestructuras han sido un área de estudio fundamental desde el inicio de la nanotecnología. La biosíntesis de nanoestructuras se inspira en los mecanismos que tienen algunos microorganismos y plantas para subsistir en ambientes con estrés químico. En el presente trabajo se exhiben ejemplos novedosos de biosíntesis que han logrado nuestro grupo de investigación con el fin de obtener nanoestructuras de Ag y Au con morfología fácilmente sintonizable a partir del extracto de hierba del manso (*Anemopsis californica*) como agente reductor de los iones Ag<sup>+</sup> y Au<sup>3+</sup>; así como la síntesis asistida con el extracto de té verde (*Camellia sinensis*) de nanopartículas de magnetita (Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>) con tamaño homogéneo y un excelente control de fase cristalina en comparación con lo reportado en la literatura con

Recibido: 25 de febrero de 2020.

Aceptado: 22 de abril de 2020.

<sup>◇</sup> Agradecemos a los proyectos Conacyt No. 280518 y No. A1-S-34533, por el apoyo financiero otorgado.

\* Tecnológico Nacional de México/Campus Toluca. División de Posgrado e Investigación. Av. Tecnológico s/n Ex Rancho "La Virgen", CP 52140, Metepec, Estado de México, México. Tel. 7224068112. Correo electrónico: nash.togoz@gmail.com

\*\* Centro de Investigación y Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional (CINVESTAV-IPN), Departamento de Genética y Biología Molecular. Avenida Instituto Politécnico Nacional 2508, La Laguna Ticoman, CP 07360, Ciudad de México, México. Tel. +52-55-5747-3800 Ext. 5360. Correo electrónico: rodolfo.avila@investav.mx

\*\*\* Centro Conjunto de Investigación en Química Sustentable (CCIQS), UAEM-UNAM. Km 14.5, Toluca-Atacomulco Road, Toluca, Estado de México, México, CP 50200. Tel. +521-722276-6610 Ext. 7712.

Autor de correspondencia: arvilchisn@uaemex.mx

métodos biogénicos. Adicionalmente, se demuestra el uso efectivo de biotemplates para diseñar materiales nanoestructurados con métodos de síntesis verde. Por último, se presenta evidencia de las características estructurales, morfológicas y químicas de los nanomateriales generados a partir de biosíntesis con base en la caracterización con microscopía electrónica de transmisión, microscopía electrónica de barrido y espectroscopía de dispersión de energía de rayos-X.

**PALABRAS CLAVE:** biosíntesis, *Camellia sinensis*, *Anemopsis californica*, nanopartículas de Ag, Au y Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>, biotemplate, microscopía electrónica.

## Introducción

Los materiales con tamaño nanométrico poseen propiedades físicas y químicas diferentes a su contraparte “en bulto” asociadas con fenómenos que se presentan solo en la escala del orden de los nanómetros. Estas propiedades hacen que las nanoestructuras tengan un alto potencial para resolver problemas en áreas como la medicina, microelectrónica, remediación ambiental, desarrollo de sensores y catálisis. Dichas propiedades están íntimamente ligadas con las características (forma, tamaño, fase cristalina, composición química y arreglo estructural) de las nanoestructuras (Schmid, 1992; Kelly *et al.*, 2003)

Por esta razón, el desarrollo de metodologías para la síntesis direccionada de nanoestructuras con un control adecuado sobre las características de estas, continúa siendo uno objetivo fundamental de la nanotecnología. A la fecha se han logrado fabricar nanopartículas con una morfología bien definida (esféricas, hexagonales, triangulares, etc.), con un rango de tamaño estrecho y con una composición química homogénea (Sajanlal *et al.*, 2011; Xia *et al.*, 2013; Pileni, 2007) a través de métodos de síntesis químicos (Sau y Rogach, 2010) y físicos (Mohanpuria, Rana y Yadav, 2008), tales como la reducción química, la reducción electroquímica, la fotorreducción, la ablación láser, la evaporación térmica, entre otros. Sin embargo, el desarrollo de una metodología de síntesis eficiente, económica y “eco-amigable” permanece como un desafío, ya que las metodologías anteriores implican el uso altas cantidades de energía, equipo costoso y/o reactivos químicos tóxicos.

La biosíntesis también llamada síntesis “verde” (Mohanpuria, Rana y Yadav, 2008) se basa en el uso de microrganismos (bacterias y hongos) (Bhattacharya y Gupta, 2005), plantas vivas (Gardea-Torresdey *et al.*, 2003) y extractos de plantas (Iravani, 2011) para obtener nanoestructuras. La síntesis verde ha emergido en las últimas décadas como una alternativa a procedimientos sintéticos de tipo químico o físico, debido a que tiene como ventajas la eliminación de solventes orgánicos, agentes reductores y/o estabilizantes amigables con el ambiente, no se necesitan altos consumos de energía ni equipos sofisticados; además de que las reacciones se llevan a cabo en condiciones ambientales de presión, temperatura y pH.

Sin embargo, la síntesis de nanopartículas asistida con rutas biogénicas tiene como retos importantes el de conseguir un control morfológico y de tamaño al menos comparable con los métodos físicos y químicos, así como ge-

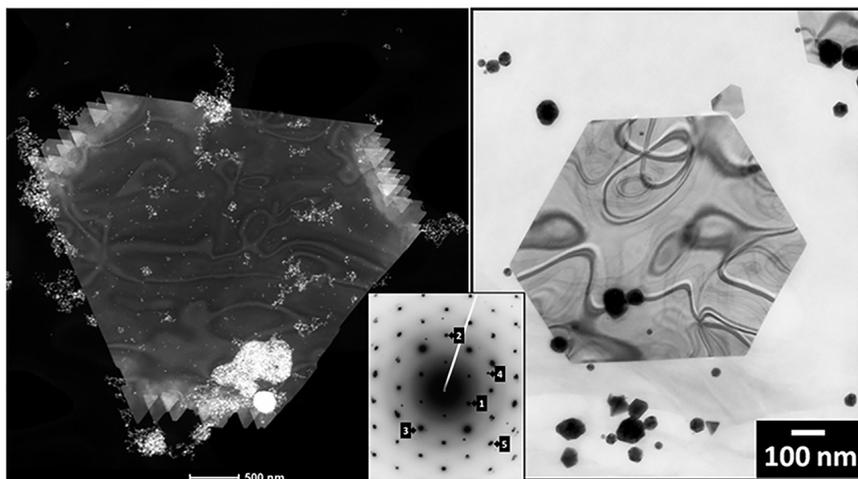
nerar arreglos nanométricos con la dimensionalidad deseada. Adicionalmente el abanico de nanopartículas que se obtienen por biorreducción ha estado limitado a elementos con un Potencial Estándar de Reducción positivo como el Au ( $E^\circ = 1.4 \text{ V}$ ) y la Ag ( $E^\circ = 0.8 \text{ V}$ ), (Yoosaf *et al.*, 2007) dejando fuera materiales de amplio interés en optoelectrónica y catálisis como lo son los óxidos y calcogenuros metálicos. Aunado a esto un desafío importante es la comprensión profunda de los mecanismos implicados en la biosíntesis de nanopartículas. La complejidad del sistema bioquímico hace que la identificación de las especies activas en la nucleación, crecimiento y estabilización de las nanoestructuras sea bastante difícil.

Las ventajas que ofrecen las rutas verdes de nanopartículas y sus retos asociados han convertido a la biosíntesis en un área de investigación con un considerable potencial de desarrollo, como lo demuestra el número creciente de publicaciones que se generan sobre el área a pesar de ser relativamente nueva. Una revisión breve del estado del arte de los procesos de síntesis verde para generar nanopartículas se puede explorar en los trabajos de (Kumar y Sudesh, 2009); (Sanchez-Mendieta y Rafael, 2012); (López *et al.*, 2013); (Quester, Avalos-Borja y Castro-Longoria, 2013).

La biosíntesis de nanomateriales había sido ya observada por los microbiólogos al estudiar un grupo de microorganismos llamado “extremófilos”. Particularmente las bacterias y los hongos a menudo están expuestos a condiciones ambientales extremas (temperaturas altas o bajas, pH altos o altas concentraciones de sales), por lo que para sobrevivir deben tener una estrategia para resistir ese estrés medioambiental. Cuando los microorganismos son expuestos a toxicidad por altas concentraciones de iones metálicos despliegan mecanismos de defensa que incluyen sistemas de flujo, alteraciones de la solubilidad y toxicidad, modifican el estado de oxidación de iones metálicos formando complejos, o precipitando los metales intracelularmente, así como bloqueando sistemas de transporte para un metal en específico. Estos bioprocesos son la base de la biolixiviación, la biorremediación, la corrosión microbiana, así como la biomineralización y la síntesis de nanopartículas.

El uso de organismos eucariontes, como los hongos, tiene mucho potencial para la biosíntesis de nanopartículas debido a que son fáciles de manejar en el laboratorio y secretan grandes cantidades de proteínas, que son las biomoléculas asociadas con la formación de nanoestructuras en estos sistemas. Además, se trata de procesos fácilmente escalables y económicamente viables, con la posibilidad de cubrir fácilmente grandes áreas de producción con un adecuado crecimiento de los micelios. En nuestro grupo de investigación se ha demostrado la versatilidad de los hongos para generar nanopartículas mono y bimetalicas de Au-Ag cuando se utiliza *N. crassa*. (Castro-Longoria *et al.*, 2011) Estudios posteriores demuestran que es posible favorecer crecimientos anisotrópicos dependiendo del tipo de hongo utilizado, como cuando se ocupa *B. Cinerea* para obtener nanoestructuras 2D de Au (figura 1).

Figura 1. Nanopartículas triangulares de Au obtenidas con *B. cinerea*.



Fuente: Imagen de contraste Z, cortesía del Dr. Miguel Ávalos-Borja, IPICYT.

Por otra parte, el empleo de plantas para la biosíntesis de nanopartículas tiene ventajas sobre los métodos que emplean microorganismos: no es necesario mantener cultivos celulares y no se requieren procesos de separación y/o purificaciones posteriores. Los procesos biosintéticos para nanopartículas son más útiles cuando se producen de forma extracelular, como sucede cuando se emplean extractos de plantas. Adicionalmente, su tamaño, dispersión y morfología se pueden controlar de forma más rápida y simple, además, el uso de plantas resulta adecuado para escalar a nivel industrial la síntesis de nanopartículas.

En el presente artículo se reporta la biosíntesis de nanopartículas de Au, Ag y  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  asistida con los extractos *Anemopsis californica* y *Camellia sinensis*, respectivamente. Así como su caracterización por microscopía electrónica y técnicas espectroscópicas.

## Procedimiento experimental

### Síntesis de nanopartículas de oro y plata usando extracto de *A. californica*

El nitrato de plata ( $\text{AgNO}_3$ ) y el ácido tetracloroáurico ( $\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ ) fueron proporcionados por Sigma Aldrich Chemicals, y fueron usados como se recibieron. Los solventes como metanol e isopropanol, ambos en grado reactivo, fueron obtenidos de Fermont Company y se usaron sin ninguna purificación. Se empleó agua desionizada en todos los pasos de las síntesis.

Las hojas de *A. californica* fueron obtenidas de Ensenada, México. Para el proceso de extracción se secaron a temperatura ambiente, posteriormente

fraccionadas con el propósito de incrementar la superficie de contacto, acto seguido se lavaron con agua desionizada para limpiarlas. El extracto acuoso de *A. californica* fue preparado mezclando la biomasa en agua desionizada a punto de ebullición por dos minutos, después se dejó enfriar a temperatura ambiente hasta llegar a 20 °C y filtrado para remover la biomasa. La misma metodología fue ocupada para preparar los extractos con metanol e isopropanol.

Las nanopartículas de plata fueron sintetizadas utilizando los extractos con diferente solvente (agua, metanol e isopropanol, respectivamente) de la siguiente manera: el de extracto de *A. californica* fue añadido a una solución acuosa  $10^{-3}$  M de nitrato de plata. Tras 24 hrs de reacción las nanopartículas fueron caracterizadas. La misma metodología fue utilizada para la síntesis de nanopartículas de oro a partir de una solución  $10^{-3}$  M de  $\text{HAuCl}_4$ .

### Síntesis de nanopartículas de óxidos metálicos con *Camellia sinensis*

Los reactivos se usaron como se suministran, sin posterior purificación. Sulfato férrico amónico dodecahidratado ( $\text{Fe}(\text{SO}_4)_2\text{NH}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ ), hidróxido de amonio ACS al 29% ( $\text{NH}_4\text{OH}$ ) marca Fremont, alcohol etílico al 96% ( $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$ ) marca Golden Bell, té verde marca Lagg's y agua desionizada.

Para la preparación del extracto se pesaron y homogenizaron en mortero de ágata 2 gramos de té verde (*Camellia sinensis*) marca Lagg's, el cual fue agregado a 20 ml de etanol ( $T = 60$  °C), y se mantuvo en agitación por 10 min. Dejándose enfriar a temperatura ambiente y filtrándose al vacío. Las nanopartículas de óxidos de hierro fueron preparadas como sigue: se agregó  $\text{NH}_4\text{OH}$  al 29% en 34 ml de agua desionizada, la solución "se sónico" por 5 minutos en un equipo Branson 2500, después se adicionó gota a gota una solución 0.1M de  $\text{Fe}(\text{SO}_4)_2\text{NH}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ , "se sónico"<sup>1</sup> 20 minutos, enseguida se agregó el extracto de té verde (0.5, 1 y 2ml; las cuales se asignaron con la notación F1, F2 y F3, respectivamente). La temperatura y el pH de la reacción se registraron después de cada intervalo de sonicación. Transcurrido el tiempo de síntesis, cada reacción se dejó enfriar a temperatura ambiente. El precipitado obtenido se lavó varias veces con etanol. Posteriormente se secó en una estufa por 30 minutos a una temperatura de 70 °C, para su ulterior caracterización.

### Síntesis de nano/microestructuras híbridas Ag-Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> usando como templete granos de polen

Para la síntesis de las nano/microestructuras híbridas, el nitrato de plata ( $\text{AgNO}_3$ ), sulfato férrico amónico dodecahidratado ( $\text{Fe}(\text{SO}_4)_2\text{NH}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ ), y el hidróxido de amonio ACS al 29 % ( $\text{NH}_4\text{OH}$ ) marca Fremont fueron utilizados como se suministran. Para la síntesis se ocuparon de granos de polen

<sup>1</sup> N. del E. de sonicación: acto de aplicación de energía del sonido (generalmente ultrasonido), para agitar partículas de muestra con diversos fines científicos e industriales.

recién colectado y mezclado en una solución 0.1 M de  $\text{AgNO}_3$ , mantenido en agitación magnética durante cuatro horas. Luego la solución fue filtrada al vacío ocupando un filtro de nitrocelulosa de 1.2 micrómetros, las nano/microestructuras fueron recuperadas y calcinadas a  $180^\circ\text{C}$  durante 12 h. Después de esto se colocaron los granos de polen funcionalizados con las nanopartículas de plata con una solución  $\text{FeSO}_4$  0.1 M, y se añadió  $\text{NH}_4\text{OH}$  por goteo manteniendo la agitación por 72 horas. Acto seguido, las nano/microestructuras híbridas fueron recuperadas por filtración y caracterizadas.

## Caracterización

### Microscopía electrónica de transmisión:

Cinco microlitros de cada muestra de nanopartículas ( $\text{AgNPs}$ ,  $\text{AuNPs}$  y  $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{NPs}$ ) fueron puestos en una rejilla de cobre (SPI-supplies) previamente cubierta por una capa fina de Formvar y recubierta con grafito mediante la deposición con un Sputtering DENTON a 30 mTorr de presión. Por otra parte, para caracterizar la formación de nanopartículas de plata funcionalizadas en granos de polen, la nano/microestructura fue embebida en resina epóxica, permitiendo la polimerización incubando a  $60^\circ\text{C}$  por 24 horas. Secciones ultradelgadas de 100 nm de la muestra fueron obtenidas utilizando un ultramicrotomo (Leica Ultracut R) y más adelante puestas en rejillas de cobre cubiertas con carbono (SPI-supplies). Las muestras de Au, Ag y  $\text{Ag-Fe}_3\text{O}_4$ /polen fueron analizadas con un microscopio de transmisión (TEM) JEOL-2100 operado con una aceleración de voltaje de 200 kV y equipado con dos detectores para STEM, de campo claro (BF-detector) y anular de campo oscuro (ADF-detector). Las nanopartículas de  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  se caracterizaron por TEM con el uso de un FEI TEM Titan G2 80-300 operado a 300 kV, con capacidades de microscopía electrónica de transmisión de exploración (STEM), y equipado con un campo oscuro anular de alto ángulo (HAADF) detector de Fision; un detector STEM de campo brillante de Gatan; un detector ADF STEM de Gatan; y un detector de espectroscopía de rayos X con dispersión de energía EDAX (EDXS). Las micrografías TEM, HRTEM, SAED y STEM ADF fueron analizadas usando el *software* Gatan Digital Micrograph TM y el *software* ImageJ para determinar el tamaño de partícula. Para los análisis realizados con HRTEM y SAED, los datos experimentales fueron indexados con base en la carta JCPDS 0-004-0783 para plata, 00-004-0784 para oro y 19-0629 para  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ , respectivamente. Para determinar la polidispersidad de las nanopartículas se consideraron más de 500 nanopartículas para la medición en cada muestra.

### Microscopía electrónica de barrido:

Las nano/microestructuras híbridas tras la síntesis fueron montadas sobre cinta de cobre para su análisis por microscopía electrónica de barrido y análisis de dispersión de energía (EDS) acoplado. Las muestras fueron analizadas utilizando un microscopio electrónico de barrido JEOL JSM-6510LV, con un voltaje de aceleración de 20 kV para obtener las micrografías y 15kV para los EDS, usando los detectores de electrones secundarios y retrodisper-

tos, en modalidad de alto vacío. El análisis químico elemental por EDS se llevó a cabo empleando un detector de rayos X de la marca Bruker modelo QUANTAX 200 y con resolución de 129 eV acoplado al microscopio.

### Espectroscopía Raman:

Para realizar las mediciones Raman, las muestras fueron preparadas con el siguiente protocolo: las nanopartículas de  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  se dispersaron en isopropanol y se coloca una gota de esta dispersión sobre un portaobjeto de vidrio dejándola secar a temperatura ambiente. Las muestras se analizaron en un sistema microRaman, marca Jobin Yvon Horiba, modelo LabRam HR800, con láser monocromático de 632.8 nm, obj x50, una potencia de 0.7 mW con 10 adquisiciones por 60 segundos, rejilla de 600 líneas/mm y una apertura de 400  $\mu\text{m}$ .

### Difracción de rayos X:

Las nanopartículas de  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  fueron analizadas con difractómetro de polvos Bruker D8 Advance con geometría Bragg-Bretano, radiación de  $\text{CuK}\alpha$ , y detector Linxeye. El equipo tiene capacidad para determinar el tamaño de cristalita y análisis de fases con la ayuda del programa PDF-2 conectado a la base CCDB. Fuente de rayos X: tubo de descarga con ánodo de cobre ( $\text{K}\alpha_1 = 0.1540 \text{ \AA}$ ).

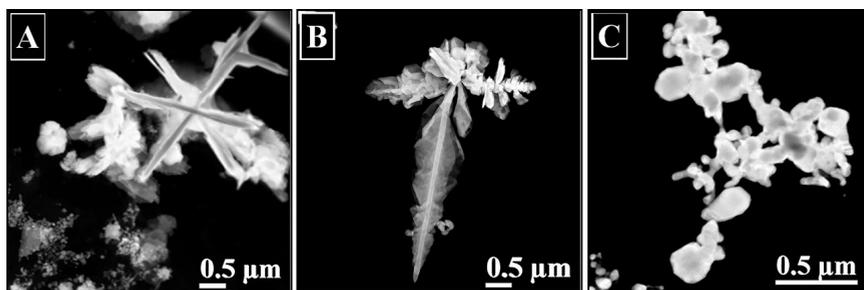
## Resultados y discusión

### Síntesis de nanopartículas de oro y plata usando extracto de *A. californica*

La síntesis de nanopartículas de metales nobles (Ag y Au) mediante la utilización de extractos de *Anemopsis californica* ha sido recientemente explorada por nuestro grupo de investigación. *A. californica* comúnmente conocida como hierba del manso o hierba mansa, es una planta nativa del suroeste de Estados Unidos y el norte de México. Estudios de composición de extractos de *A. californica* revelan la presencia de metil eugenol, timol, piperitona, éter timol metilo, R-pineno, 1,8-cineol, metilchavicol, y p-cimeno (Medina *et al.*, 2005) los cuales pueden servir como agentes reductores y estabilizadores en la síntesis de las nanopartículas metálicas. Del-Toro Sánchez y colaboradores reportaron y determinaron la presencia de fenoles y flavonoides totales, tanto en hojas, tallos y raíces de la planta, determinando la presencia de fenoles totales en 27 mg por gramo de biomasa seca y de 16 mg por gramo de biomasa para flavonoides en promedio en las hojas *A. californica* (Del-Toro-Sánchez *et al.*, 2015). Por otra parte, ha sido ampliamente reportado que flavonoides y fenoles son los encargados de la formación de nanopartículas de oro y plata gracias a la reducción de las sales precursoras; es así como proponemos que la presencia de dichos compuestos son los encargados de la síntesis de las nanopartículas biogénicas obtenidas por nuestro grupo de trabajo (Iravani, 2011).

Con la utilización de extractos de hojas de *A. californica*, se han obtenido nanopartículas metálicas que muestran distribuciones diferentes, así como diversas características en tamaño y forma. En el caso del uso de extractos acuosos se han obtenido nanoestructuras de plata con morfologías variadas como rodillos, inukshuks y flores (figura 2A, 2B, y 2C, respectivamente) de tamaños variables; en contraste con la obtención de nanopartículas poliédricas de plata obtenidas mediante el uso de extractos en base metanol e isopropanol; con un tamaño promedio que ronda los  $23 \pm 13.2$  nm (figura 3A).

**Figura 2.** Nanoestructuras de plata obtenidas con extracto acuoso de *A. californica*: A) rodillos (STEM-ADF); B) inukshuks (STEM-ADF), y, C) flores (STEM-ADF).

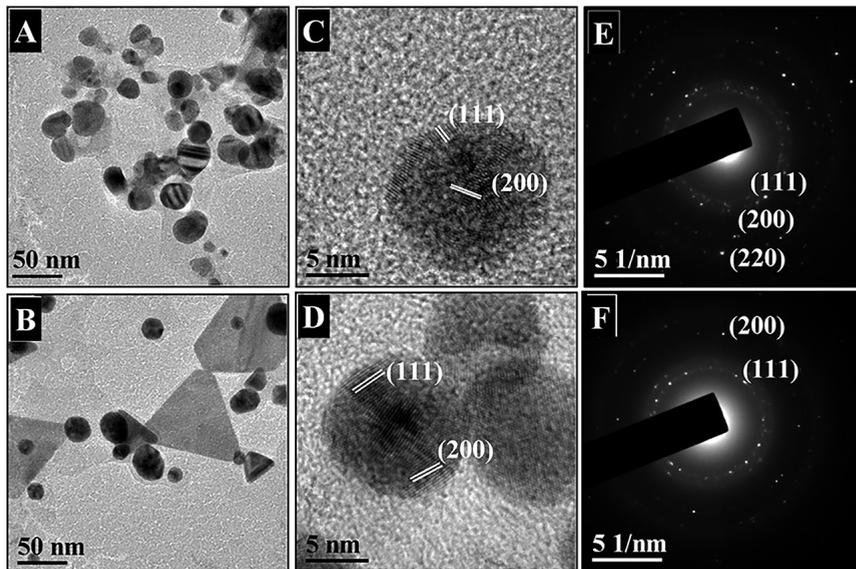


Fuente: Elaboración de los autores.

El patrón de difracción de electrones (SAED) revela la naturaleza policristalina de las nanopartículas de Ag (figura 3E) cuyos anillos de difracción se pueden indexar con base en la estructura FCC de la plata como (111) (220) y (200), respectivamente. La distancia interplanar obtenida por HRTEM (figura 3C) es consistente también con la estructura cúbica centrada en caras de la plata.

En el caso de las nanopartículas de oro, estas se obtuvieron con dos morfologías prevalentes: poliédricas y planas triangulares. El extracto acuoso de *A. californica* permite obtener nanopartículas poliédricas de un tamaño promedio de  $40 \pm 30.23$  nm, que es mayor al tamaño de las nanopartículas generadas con los extractos base metanol e isopropanol que tienen tamaños promedio de  $20 \pm 15.23$  y  $10 \pm 7.9$  nm, respectivamente (figura 3B). La formación de nanopartículas triangulares planas solo fue posible mediante el uso de extractos base agua y metanol, pero no con isopropanol. La imagen HRTEM en la figura 3D confirma la presencia de los planos (100) y (200) consistentes con la estructura FCC del Au. El patrón SAED de la figura 3F sugiere que el sistema es policristalino, aunque se observan puntos de difracción bien definidos que pueden estar asociados con las nanopartículas triangulares planas orientadas en la dirección [111] normal a la superficie de una de sus caras planas con respecto al haz de electrones.

**Figura 3.** Imágenes de TEM y patrones SAED representativas, las nanopartículas obtenidas con el extracto acuoso de *A. californica* de Ag (A, C, E) y Au (B, D, F), respectivamente.



Fuente: Elaboración de los autores.

### Síntesis de nanopartículas de óxidos metálicos con *Camellia sinensis*

Los óxidos metálicos nanoestructurados se han estudiado debido a las propiedades que presentan en la escala nanométrica. Entre estos materiales se encuentran los óxidos de hierro, principalmente la magnetita, que, al estar en tamaños menores de 20 nm, presenta superparagnetismo, ampliamente utilizado en aplicaciones biológicas, por ejemplo, en el posible tratamiento contra el cáncer. Existen muchos métodos de síntesis para obtener nanopartículas de  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  siendo los químicos los que dan mejor resultado en control de tamaño y morfología. La eficacia del extracto de *Camellia sinensis* para sintetizar nanopartículas de Ag y Au fue reportado por primera vez por nuestro grupo de investigación (Vilchis-Nestor *et al.*, 2008), y desde entonces se ha explorado el potencial del extracto de *Camellia sinensis* como alternativa para controlar el tamaño de varios tipos de nanopartículas gracias al contenido de polifenoles presentes en el extracto.

El extracto acuoso de *Camellia sinensis* contiene una variedad grande de polifenoles como flavonoides (catecol, epicatequina y cafeína) así como ácidos fenólicos (ácido 3,4-dihidroxibenzoico, ácido vanílico y ácido benzoico). Estos componentes contribuyen a la actividad antioxidante del extracto de té verde y están directamente relacionados con la formación y estabilización de nanopartículas. La extracción con agua alcanza  $59.8 \pm 1.8$  mg de CAE/g dw (miligramos de CAE = equivalentes de ácido clorogénico/ dw: gramos del té verde seco) lo que le confiere una capacidad antioxidante de  $70.1 \pm 2.4$  % (Rababah,

Hettiarachchy y Horax, 2004) y con ello amplias posibilidades para ser empleado en la biosíntesis de nanopartículas (Loo *et al.*, 2012). Se ha demostrado que la presencia de grupos carboxilo influye directamente en la estabilización de las nanopartículas (Yoosaf *et al.*, 2007) e incluso en la formación de agregados coloidales que ya han sido utilizados eficazmente para sensar iones metálicos en agua (Silva-De Hoyos *et al.*, 2019).

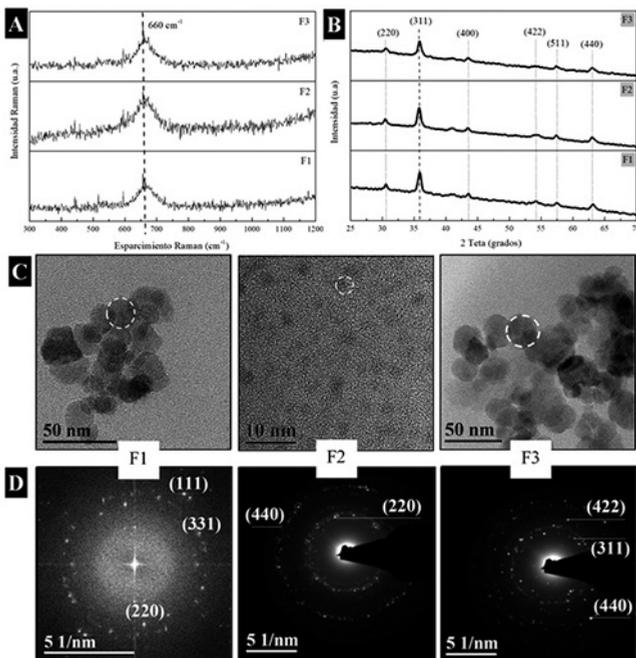
En la figura 4A se muestran los espectros Raman de todas las muestras sintetizadas. Los espectros se obtuvieron con un láser de 632.8 nm y una potencia de 0.7 mW, con la finalidad de no afectar la muestra y evitar que ocurra un cambio de fase por un aumento de temperatura generada por el láser. Olga N. Shebanova y Peter Lazor (Shebanova y Lazor, 2003) reportaron el efecto de la potencia del láser en el proceso de oxidación de la magnetita al ser analizada por espectroscopía Raman, y explican que se puede realizar una asignación errónea de las bandas que aparecen en los espectros. Considerando esto, podemos observar que las bandas características de la hematita que se encuentran alrededor de  $300\text{-}410\text{ cm}^{-1}$  no aparecen en los espectros de las muestras analizadas. Todos los espectros exhiben una banda ancha centrada en  $660\text{ cm}^{-1}$ ; asignada al enlace Fe-O de los sitios tetraédricos de magnetita.

Difracción de rayos X de polvos (DRX) es una técnica de gran utilidad cuando se pretende identificar alguna fase cristalina; nuestros productos mostraron cristalinidad y los resultados se correlacionan con lo mostrado en los espectros Raman; donde la fase cristalina presente corresponde a la magnetita. Los difractogramas fueron indexados y se compararon con la tarjeta cristalográfica JPCDS 19-0629 de la magnetita. En la figura 4B se presentan los difractogramas de las tres muestras sintetizadas de magnetita en donde el pico más intenso corresponde a la reflexión del plano (311). Los picos indexados corresponden a los planos (220), (311), (400), (422), (511) y (440) de la magnetita, que tiene una estructura cristalina cúbica centrada en las caras (FCC) con parámetro de red  $a = 8.393\text{ \AA}$ . No se encontró ningún pico correspondiente a la maghemita, por lo cual podemos confirmar los resultados obtenidos por Raman y decir que no hay impurezas de otra fase cristalina de hierro ni de los precursores en los productos obtenidos.

En la figura 4C pueden observarse las micrografías de TEM de las nanopartículas sintetizadas F1, F2 y F3, con los diferentes volúmenes de extracto (0.5, 1 y 2 ml). En las micrografías de TEM de la muestra F1, F2 y F3 se observa que la morfología prevaleciente es la esférica y la poliedral, con tamaños promedio de  $15.36 \pm 4.62\text{ nm}$ ,  $1.72 \pm 0.38\text{ nm}$  y  $21.03 \pm 5.60\text{ nm}$ , respectivamente.

Se obtuvieron patrones de difracción de electrones de área selecta (SAED) y se observa que las nanopartículas son policristalinas. Se indexaron los SAED de las tres muestras y se encontraron los planos (311), (220), (111), correspondientes a la fase de magnetita (figura 4D).

**Figura 4.** Caracterización de las nanopartículas de  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  obtenidas con 0.5, 1 y 2 ml de extracto de *Ca-mellia sinensis* (F1, F2 y F3, respectivamente). A) Espectros Raman. B) Patrones de difracción de polvos. C) Micrografías de TEM. D) Patrones de difracción de electrones (SAED).



Fuente: Elaboración de los autores.

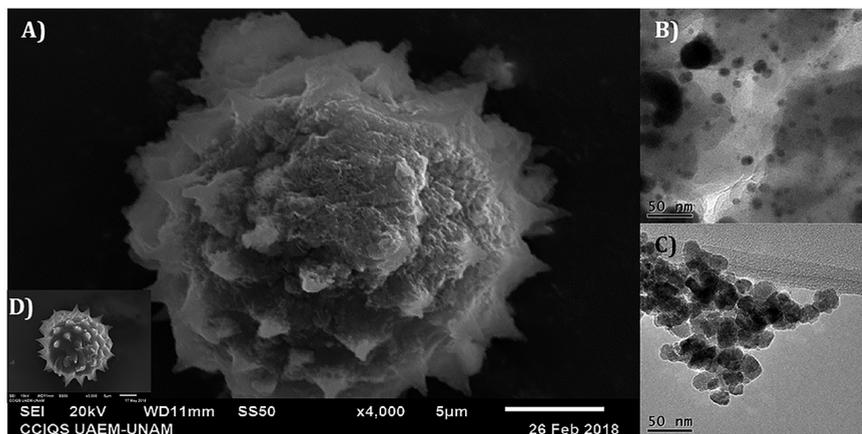
### Síntesis de nano/microestructuras híbridas Ag- $\text{Fe}_3\text{O}_4$ usando como templete granos de polen

La naturaleza provee innumerables fuentes de inspiración para el diseño de partículas con morfologías complejas. En este tenor, la generación de partículas bioinspiradas permite el enriquecimiento de las funciones y promoción de las propiedades buscadas. Por tal motivo, hemos implementado la utilización de granos de polen de la planta *Dimorphotheca ecklonis* como templete para la deposición de nanopartículas, permitiendo que las propiedades de las nanopartículas que lo funcionalizan se vean incrementadas y desarrolladas, debido al confinamiento de las mismas y a la morfología del templete. Por su parte, los granos de polen de *Dimorphotheca ecklonis* que hemos propuesto pueden ser utilizados en la formación de las nanopartículas de plata. Las nanopartículas pueden ser formadas gracias a la composición de la exina presente en el polen, la cual contiene compuestos aromáticos, fenilpropanoides, polifenoles y carotenoides que actúan como agentes reductores de las sales precursoras en la biosíntesis de nanopartículas (Scott, 1994).

Así, hemos logrado la obtención de nanopartículas de plata funcionalizando granos de polen de *Dimorphotheca ecklonis*, utilizando como agente re-

ductor y estabilizador los mismos granos. Aunado a esto, hemos decorado dichas estructuras con nanopartículas de magnetita (obtenidas por el método de precipitación) generando nano/microestructuras híbridas Ag-Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> (figura 5) sin modificar la estructura característica de los granos de polen como se puede observar en las figuras 5A y 5D. Por su parte, las nanopartículas de plata que conforman las nano/microestructuras rondan en un tamaño promedio de  $9.37 \pm 6.10$  nm con una morfología esférica, mostrando una distribución homogénea dentro del grano de polen (figura 5B), mientras que las nanopartículas de magnetita tienen un rango de tamaño entre 12 a 14 nm (figura 5C).

**Figura 5.** A) Micrografía SEM de nano/microestructuras híbridas Ag-Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> usando como templete granos de polen. B) micrografía TEM de corte de grano de polen funcionalizado con nanopartículas de plata. C) Micrografía TEM de nanopartículas de magnetita. D) Micrografía SEM de grano de polen de *Dimorphotheca ecklonis*.



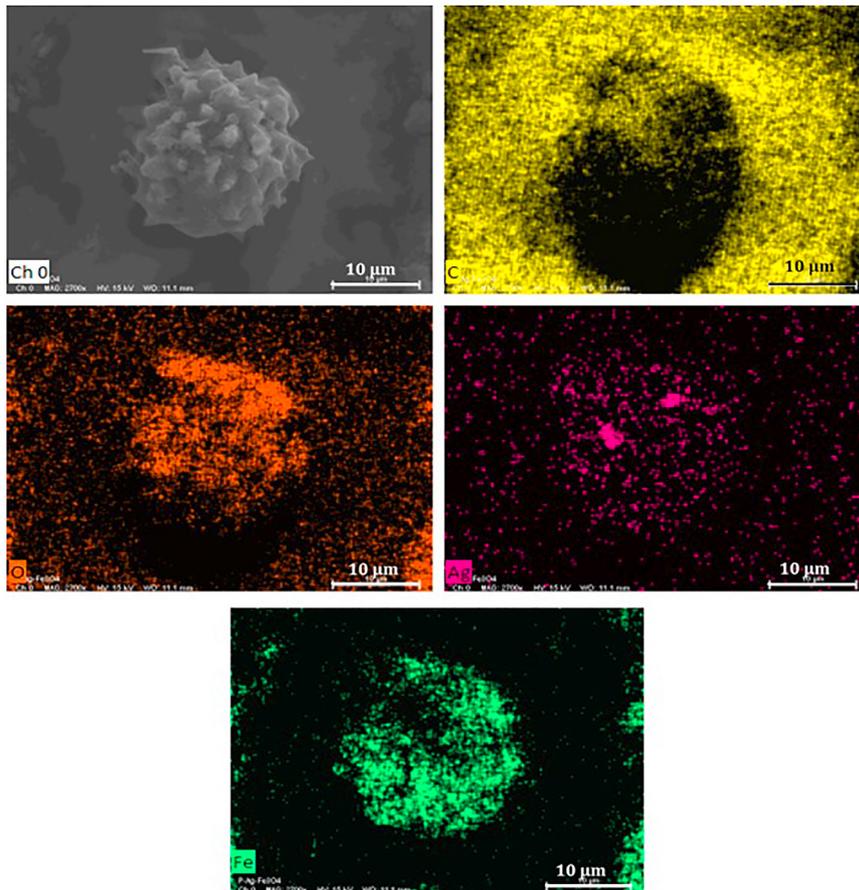
Fuente: Elaboración de los autores.

Ambos tipos de nanopartículas se encuentran distribuidos homogéneamente en el grano de polen como muestra el mapeo elemental por EDS (figura 6). La composición química (% en peso) determinada con EDS tiene los siguientes valores promedio: 56.82% carbono, 20.83% oxígeno, 18.45% Fe, y, 5.62% plata.

## Conclusiones

La intensa investigación sobre síntesis verde de nanomateriales ha conseguido resolver el problema del control de tamaño y forma sin perder las ventajas de la biosíntesis. El presente trabajo mostró que es posible obtener diferentes morfologías de nanopartículas de Au y Ag por primera vez cuando se utiliza el extracto de *Anemopsis californica*, así como obtener nanopartícu-

**Figura 6.** Mapeo elemental EDS de nano/microestructuras híbridas Ag-Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> para los elementos carbono, oxígeno, hierro y plata.



Fuente: Elaboración de los autores.

las de magnetita por biosíntesis en el rango de tamaño de  $1.72 \pm 0.38$  nm con un excelente control sobre la fase, utilizando el extracto de *Camellia sinensis*. A pesar de que aún se requieren estudios profundos sobre el mecanismo involucrado en la síntesis verde de estos sistemas, los resultados mostrados en este artículo y los observados en la literatura revelan que, imitando a la naturaleza, la biosíntesis de nanopartículas se posiciona como un procedimiento con inmenso potencial para la generación de materiales nanoestructurados de forma sencilla, de un mínimo impacto ambiental y ahora con un buen control sobre la forma, tamaño y composición.

## Referencias

- Bhattacharya, D. y Gupta, R. K. (2005). Nanotechnology and potential of microorganisms. *Critical Reviews in Biotechnology*. <https://doi.org/10.1080/07388550500361994>
- Castro-Longoria, E., Vilchis-Nestor, A. R. y Avalos-Borja, M. (2011). Biosynthesis of silver, gold and bimetallic nanoparticles using the filamentous fungus *Neurospora crassa*. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2010.10.035>
- Del-Toro-Sánchez, C. L. *et al.* (2015). Storage effect on phenols and on the antioxidant activity of extracts from *Anemopsis californica* and inhibition of elastase enzyme. *Journal of Chemistry*. <https://doi.org/10.1155/2015/602136>
- Gardea-Torresdey, J. L. *et al.* (2003). Alfalfa sprouts: A natural source for the synthesis of silver nanoparticles. *Langmuir*. <https://doi.org/10.1021/la020835i>
- Iravani, S. (2011). Green synthesis of metal nanoparticles using plants. *Green Chemistry*. <https://doi.org/10.1039/c1gc15386b>
- Kelly, K. L. *et al.* (2003). The optical properties of metal nanoparticles: The influence of size, shape, and dielectric environment. *Journal of Physical Chemistry B*. <https://doi.org/10.1021/jp026731y>
- Kumar, V. y Yadav, S. K. (2009). Plant-mediated synthesis of silver and gold nanoparticles and their applications. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*. <https://doi.org/10.1002/jctb.2023>
- Loo, Y. Y., Chieng B. W., Nishibuchi M. y Radu S. (2012). Synthesis of silver nanoparticles by using tea leaf extract from *Camellia sinensis*. *International Journal of Nanomedicine*. <https://doi.org/10.2147/IJN.S33344>
- López, G. *et al.* (2013). *Nanoestructuras metálicas; síntesis, caracterización y aplicaciones*. Libro de Editorial Reverté, Universidad Autónoma del Estado de México, 1-50.
- Medina, A. L. *et al.* (2005) Composition and antimicrobial activity of *Anemopsis californica* leaf oil. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. <https://doi.org/10.1021/jf0511244>
- Mohanpuria, P., Rana, N. K. y Yadav, S. K. (2008). Biosynthesis of nanoparticles: Technological concepts and future applications. *Journal of Nanoparticle Research*, 10(3): 507-517. <https://doi.org/10.1007/s11051-007-9275-x>
- Pileni, M. P. (2007). Control of the size and shape of inorganic nanocrystals at various scales from nano to macrodomains. *Journal of Physical Chemistry C*. <https://doi.org/10.1021/jp070646e>
- Quester, K., Avalos-Borja, M. y Castro-Longoria, E. (2013). Biosynthesis and microscopic study of metallic nanoparticles. *Micron*. <https://doi.org/10.1016/j.micron.2013.07.003>
- Rababah, T. M., Hettiarachchy, N. S. y Horax, R. (2004). Total phenolics and antioxidant activities of fenugreek, green tea, black tea, grape seed, ginger, rosemary, gotu kola, and ginkgo extracts, vitamin E, and tert-butylhydroquinone. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. <https://doi.org/10.1021/jf049645z>
- Sajanlal, P. R. *et al.* (2011). Anisotropic nanomaterials: structure, growth, assembly, and functions. *Nano Reviews*. <https://doi.org/10.3402/nano.v2i0.5883>

- Sánchez-Mendieta, V. y Rafael, A. (2012). Green Synthesis of Noble Metal (Au, Ag, Pt) Nanoparticles, Assisted by Plant-Extracts. *Noble Metals*. <https://doi.org/10.5772/34335>
- Sau, T. K. y Rogach, A. L. (2010). Nonspherical noble metal nanoparticles: Colloid-chemical synthesis and morphology control. *Advanced Materials*. <https://doi.org/10.1002/adma.200901271>
- Schmid, G. (1992). Large clusters and colloids. *Metals in the embryonic state Chem Rev*. <https://doi.org/10.1002/9783527616077>
- Scott, R. J. (1994). Pollen exine—the sporopollenin enigma and the physics of pattern. *Seminar series-society for experimental biology*. Cambridge University Press, 49.
- Shebanova, O. N. y Lazor, P. (2003). Raman study of magnetite (Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>): laser induced thermal effects and oxidation. *Journal of Raman Spectroscopy*. Wiley Online Library, 34(11): 845-852. <https://doi.org/10.1002/jrs.1056>
- Silva-De Hoyos, L. E. *et al.* (2019). Plasmonic sensing of aqueous-divalent metal ions by biogenic gold nanoparticles. *Journal of Nanomaterials*. <https://doi.org/10.1155/2019/9846729>
- Vilchis-Néstor, A. R. *et al.* (2008). Solventless synthesis and optical properties of Au and Ag nanoparticles using *Camellia sinensis* extract. *Materials Letters*, 62(17-18): 3103-3105. <https://doi.org/10.1016/j.matlet.2008.01.138>
- Xia, Y. *et al.* (2013). Shape-controlled synthesis of metal nanocrystals. *MRS Bulletin*. <https://doi.org/10.1557/mrs.2013.84>
- Yoosaf, K. Binil Itty Ipe, Cherumuttathu H. Suresh, K. George Thomas. (2007). In situ synthesis of metal nanoparticles and selective naked-eye detection of lead ions from aqueous media. *Journal of Physical Chemistry C*. <https://doi.org/10.1021/jp073923q>



# Resolución atómica de elementos ligeros utilizando HAADF y ABF-STEM con corrección de Cs y bajo voltaje\*

## Atomic resolution imaging of light elements using low voltage Cs-corrected HAADF and ABF-STEM

Rodrigo Esparza\*\*

**ABSTRACT:** Scanning transmission electron microscopy (STEM) can give structural and chemical information down to 0.1 nm of spatial resolution, which sub-ångstrom resolution is achieved with a spherical aberration corrector for the probe. In the STEM, the electron probe is focused and scanned over the sample and the image is formed by measuring the transmitted electron intensity arising after the electron-specimen interactions. The scattered electron intensity that cross the sample can be employed to obtain bright and dark field images. The STEM is a powerful instrument to understand the physical properties of nanostructures which requires the local structure and local chemistry to be determined at the atomic scale. Therefore, STEM is a technique able to identify the atomic columns and the position of atoms using simulation techniques. In this work, the basic instrumental parameters using high angle annular dark field (HAADF-STEM) and annular bright field (ABF-STEM) modes were evaluated using a standard sample of Si[110]. Also, experimental HAADF-STEM and annular bright field (ABF-STEM) images of LaAlO<sub>3</sub> sample were obtained at 80 kV and compared with simulated images obtained by using the multi slice dynamical diffraction method. Using the ABF-STEM technique, it was possible to clearly visualize the atomic columns of the La, O and Al elements included in the sample. Images simulated were found to agree well with experimental images.

**KEYWORDS:** scanning transmission electron microscopy, annular bright field, high angle annular dark field, image simulations.

**RESUMEN:** La microscopía electrónica de barrido y transmisión (STEM) puede ofrecer información estructural y química con resolución espacial del orden de 0.1 nm, es posible alcanzar tal resolución utilizando un corrector de aberración esférica para el haz de prueba. En el STEM, un haz de electrones es enfocado y escaneado sobre la muestra, por lo que la imagen se forma midiendo la intensidad electrónica transmitida que surge después de las interacciones electrón-muestra. La intensidad de los electrones dispersados que atraviesan la muestra puede ser empleada para obtener imágenes de campo claro y campo oscuro. El microscopio STEM es un poderoso instrumento para estudiar las propiedades físicas de las nanoestructuras, que requieren de un análisis estructural y químico a nivel atómico. Por lo tanto, STEM es una técnica capaz de identificar columnas atómicas y la posición de los átomos auxiliándose con técnicas de simulación. En este trabajo, los parámetros instrumentales básicos del microscopio en modo campo

Recibido: 20 de febrero de 2020.

Aceptado: 20 de mayo de 2020.

\* R. Esparza agradece al Kleberg Advanced Microscopy Center de la UTSA por sus instalaciones.

\*\* Universidad Nacional Autónoma de México, Centro de Física Aplicada y Tecnología Avanzada, Boulevard Juriquilla 3001, Santiago de Querétaro, Qro., 76230, México.  
Correo electrónico: resparza@fata.unam.mx

oscuro anular de gran ángulo (HAADF-STEM) y campo claro (BF-STEM) fueron evaluados utilizando una muestra estándar de Si[110]. Además, imágenes experimentales de HAADF-STEM y campo claro anular (ABF-STEM) de una muestra de LaAlO<sub>3</sub>, se consiguieron a 80 kV de operación y comparadas con imágenes simuladas obtenidas con el método de multicapas, el cual se basa en la teoría dinámica de la difracción. Mediante la técnica ABF-STEM fue posible visualizar claramente las columnas atómicas de los elementos La, O y Al presentes en la muestra. Se encontró que las imágenes simuladas coinciden bien con las imágenes experimentales.

**PALABRAS CLAVE:** microscopía electrónica de transmisión/barrido, campo oscuro anular de alto ángulo, campo claro anular, simulación de imágenes.

## Introducción

El coeficiente de aberración esférica (Cs) ha sido el principal factor que restringe la resolución en el campo de la microscopía electrónica de transmisión (TEM). Sin embargo, la implementación del corrector de Cs en las últimas décadas ha incrementado el desarrollo de los microscopios electrónicos, alcanzando imágenes con una resolución por debajo de 0.1 nm. Aun más, los beneficios de la microscopía electrónica de barrido en transmisión (STEM) han sido mayores que los del TEM convencional, debido a la mejora en la relación señal/ruido, esto es posible gracias a la disponibilidad de un haz con mayor corriente (Haider *et al.*, 1998). Adicionalmente, las imágenes con resolución atómica en modo STEM de campo oscuro de gran ángulo presentan la gran ventaja de ser directamente interpretables, a diferencia de aquellas en modo TEM, en las que es necesaria su comparación con imágenes simuladas para conseguir una adecuada interpretación, debido a la influencia de los factores propios del sistema óptico-electrónico de un TEM (función de transferencia de contraste).

Un STEM es un microscopio donde los electrones pasan a través de una muestra delgada, al igual que en un TEM. Sin embargo, el STEM se diferencia del TEM convencional por enfocar el haz de electrones en un punto que escanea la muestra, similar al microscopio electrónico de barrido (SEM). Usando el STEM y un detector anular de gran ángulo, es posible formar imágenes donde el contraste de estas está directamente relacionado con el número atómico de la muestra (Crewe, Wall y Langmore, 1970).

El STEM también ofrece importantes beneficios en imágenes en el modo campo oscuro anular de gran ángulo (HAADF-STEM). En este modo, el ángulo interno del detector anular se hace tan grande que no se recogen electrones difractados de Bragg. Las imágenes, por lo tanto, provienen de electrones dispersados incoherentemente que han pasado muy cerca de los núcleos atómicos de la muestra. Por consiguiente, imágenes con alta resolución son posibles sin contraste de difracción, el cual es no deseado dado que puede enmascarar información estructural. La señal de HAADF-STEM es directamente proporcional a la densidad y/o espesor de la muestra y proporcional a  $Z^n$ , donde Z es el número atómico de los elementos de la muestra y el exponente  $n$  es cercano a 1.7. De este modo, es posible producir imágenes

que muestren contraste debido a la combinación del espesor másico, donde la intensidad es proporcional al número de átomos e imágenes de contraste  $Z$ , donde la señal es proporcional al número atómico promedio de la muestra (Pennycook *et al.*, 1996). HAADF-STEM es adecuado para muestras inorgánicas y orgánicas, así como para materiales cristalinos y amorfos.

En el pasado, se favoreció el uso del TEM con altos voltajes porque en esas condiciones de operación se reducen los efectos de aberración cromática ( $C_c$ ) y aumenta la resolución atómica debido a la disminución de la longitud de onda (Dupouy, 2017), sin embargo, el desarrollo de correctores de aberración esférica ( $C_s$ ) ha permitido la resolución atómica a voltajes de operación más bajos (Bell, Russo y Kolmykov, 2012). Actualmente, el STEM utilizando bajos voltajes es de gran interés porque produce menos daño durante las observaciones, principalmente en materiales sensibles al haz de electrones. No obstante, la reducción del voltaje de aceleración requiere aumentar el semiángulo de convergencia para formar un haz de electrones fino, e incrementa la dispersión inelástica de los electrones. Por lo tanto, es necesario compensar las aberraciones geométricas hasta semiángulos de convergencia más altos cuando se usan voltajes de aceleración bajos (Sasaki *et al.*, 2010). La incorporación de correctores de aberración, en particular la instalación exitosa del corrector de  $C_s$  para el haz de prueba en la columna del STEM, ha permitido aumentar la resolución hasta niveles sub-Ångstrom (Spence, 2013; Hawkes, 2004). Al incorporar el corrector en la columna óptica del microscopio, después de las lentes condensadoras, se tiene un STEM corregido por aberración que ha demostrado ser una herramienta versátil y poderosa para analizar nanomateriales avanzados a escala atómica (Esparza *et al.*, 2013; Mayoral *et al.*, 2011).

Como ejemplo de las aplicaciones del STEM, podemos mencionar la caracterización estructural de nanopartículas bimetálicas, tanto con una estructura del tipo núcleo-coraza como aleación. La morfología y estructura de las nanopartículas bimetálicas de AuPd se ha estudiado mediante la técnica de HAADF-STEM de alta resolución, donde las imágenes mostraron nanopartículas de Au con superficies enriquecidas con átomos de Pd (Esparza *et al.*, 2014). Mientras que en nanopartículas bimetálicas de PdPt con una estructura del tipo aleación se ha podido determinar, con la ayuda de métodos de simulación, la cantidad tanto de átomos de Pd como de Pt por columna atómica (Rodríguez-Proenza *et al.*, 2018). Asimismo, podemos mencionar imágenes de HAADF-STEM obtenidas de láminas de  $\text{MoS}_2$  donde el efecto del contraste- $Z$  es notable, debido a la diferencia en número atómico de los elementos Mo y S, consiguiendo un contraste débil para las columnas atómicas del S y un mayor contraste para las columnas de Mo (García *et al.*, 2014). Utilizando las imágenes experimentales, así como imágenes obtenidas por simulación, se realizó un análisis cuantitativo a nivel atómico para determinar el número de capas de  $\text{MoS}_2$ .

Por otro lado, las imágenes obtenidas de campo claro anular (ABF) en STEM ha estimulado el interés de la investigación en los últimos años debido

a su capacidad de una visualización directa de elementos ligeros (Zhou *et al.*, 2016; Ishikawa *et al.*, 2011; Okunishi *et al.*, 2009). La transferencia de contraste en ABF-STEM proporciona una mejor resolución, así como una transferencia de contraste no oscilante que el campo claro (BF)-STEM convencional, lo cual permite que las imágenes sean fácilmente interpretables a diferencia de BF-STEM (Okunishi *et al.*, 2009). Esto ha permitido identificar claramente átomos individuales; así, es importante una cuantificación de las imágenes mediante simulaciones teóricas, necesarias para una interpretación correcta de la imagen, porque la intensidad de la columna atómica depende en gran medida de la cantidad de desenfoque y el grosor de la muestra. Sin embargo, la simulación de imágenes de STEM presenta un desafío debido al tiempo requerido para generar datos para cada posición del haz de electrones (Dwyer, 2010).

El trabajo realizado en esta investigación está relacionado con la evaluación del rendimiento del instrumento STEM equipado con un corrector de Cs, para lo cual se utilizan muestras cristalinas de silicio (Si) orientadas a lo largo del eje de zona [110]. El STEM con aberración esférica corregida también se usó en la caracterización estructural de muestras de aluminato de lantano (LaAlO<sub>3</sub>) para la identificación de los elementos presentes en la muestra. Se llevaron a cabo comparaciones entre imágenes HAADF-STEM y ABF-STEM, así como simulaciones teóricas de imágenes de las muestras cristalinas.

## Procedimiento experimental

Las condiciones instrumentales del microscopio electrónico Jeol JEM-ARM200F con un cañón de emisión de campo tipo Schottky se muestran en la tabla 1. El voltaje de aceleración fue de 80 kV y una longitud de cámara de 80 mm. El microscopio está equipado con un corrector de aberración esférica (Cs) CEOS en el sistema de iluminación. El coeficiente de aberración esférica corregido es de aproximadamente 1  $\mu\text{m}$ . Los ángulos de recolección para las técnicas de imagen HAADF y ABF se ajustaron en el rango de 90-170 mrad y 11-22 mrad, respectivamente. Además, se obtuvieron imágenes HAADF-STEM y BF-STEM de una muestra estándar de Si orientada a lo largo de la dirección [110], así como de una muestra de LaAlO<sub>3</sub> (LAO).

La preparación de las muestras de Si[110] y LAO se realizó mediante el uso de un microscopio de doble haz (FIB). El procedimiento general para la preparación de las muestras consta de cuatro etapas: depósito de una capa de platino, desbaste en las secciones laterales a la capa de platino, corte y extracción del material (lamela) el cual se pega a una rejilla de Cu, finalmente se adelgaza la muestra con un espesor menor a de 50 nm.

Los coeficientes de las aberraciones del STEM se midieron a 80 kV y fueron obtenidos después de la alineación del corrector mediante el programa del corrector CEOS (tabla 1). Estos valores se consideraron para la si-

mulación de las imágenes y el ronchigrama. Las simulaciones de las imágenes HAADF, BF y ABF-STEM se realizaron utilizando el programa QSTEM (Koch, 2002) que utiliza el algoritmo modificado del método de multicapas (Kirkland, 1987) basado en la teoría dinámica de  $n$  haces de Cowley y Moodie (Cowley y Moodie, 1957). Para simular el ronchigrama se utilizó el programa Dr. Probe Light (Barthel, 2007). Este programa es aconsejable para interpretar imágenes de STEM que ayudan a comprender los efectos de las aberraciones y a optimizar el ronchigrama mediante la simulación avanzada del haz de electrones.

**Tabla 1.** Valores de los coeficientes obtenidos para el STEM medidos a 80 kV, notación de Haider.

Coeficientes	
Desenfoque $C_1$	-2.503 nm
Astigmatismo 2do. orden $A_1$	1.722 nm
Coma $B_2$	39.93 nm
Astigmatismo 3er. orden $A_2$	77.01 nm
Aberración esférica $C_3$	0.743 $\mu\text{m}$
Aberración Star $S_3$	67.29 nm
Astigmatismo 4to orden $A_3$	1.506 $\mu\text{m}$
Coma 5to orden $B_4$	22.23 $\mu\text{m}$
Astigmatismo 5to orden $A_4$	15.45 $\mu\text{m}$
Aberración esférica 5to orden $C_5$	-185.1 $\mu\text{m}$
Astigmatismo 6to orden $A_5$	1.165 nm

Fuente: Haider, Uhlemann y Zach (2000).

## Resultados

Actualmente, la disponibilidad de los correctores de aberración para microscopios electrónicos de barrido en transmisión (STEM) es bastante amplia, aunque todavía son relativamente costosos ( $\approx$  0.5 millones de US\$). Estos instrumentos proporcionan una resolución espacial que se acerca a menos de 0.1 nm. Los correctores de aberración producen haces de electrones más pequeños y brillantes que permiten incluso obtener imágenes de un solo átomo (Mishra *et al.*, 2017). La resolución espacial y la corriente del haz tienen como consecuencia directa el mejoramiento del instrumento. Sin embargo, los microscopios con aberración corregida son más sensibles a las vibraciones mecánicas, perturbaciones acústicas y electromagnéticas, así como a los flujos de aire. Por lo que la evaluación del rendimiento del instrumento es una práctica recomendada, particularmente en microscopios electrónicos nuevos.

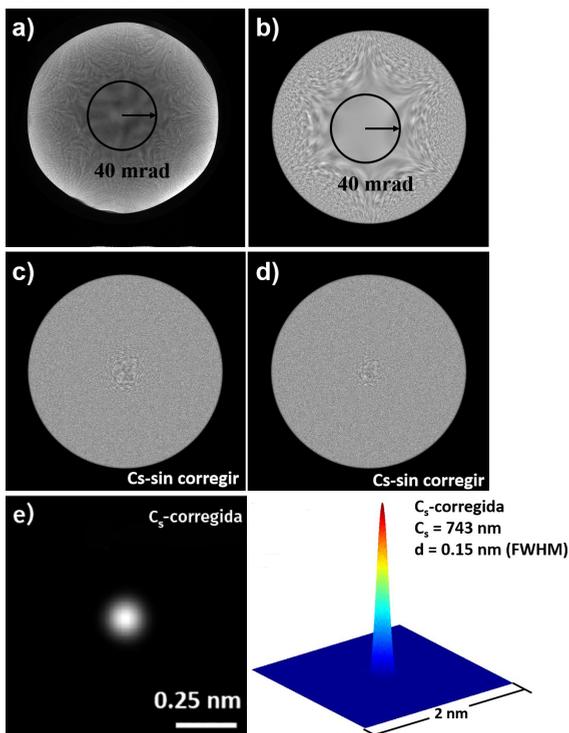
La ruta más efectiva para alinear un STEM es mediante el uso del ronchigrama (Haider *et al.*, 2009), el cual se puede describir en óptica como la imagen proyectada o la sombra de la imagen (*shadow image*) de una muestra formada en el plano de difracción por un haz de electrones convergente enfocado cerca de la muestra. Aunque este método ha sido utilizado durante muchos años por la comunidad interesada en las técnicas del STEM, no es muy socorrido por la comunidad que realiza microscopía electrónica de transmisión convencional (TEM) (Rodenburg y Macak, 2002). El uso del ronchigrama como parte de los procedimientos de alineación es fundamental en la alineación del corrector de aberración esférica disponible para un STEM, al permitirnos determinar las características ópticas (cantidad de aberración) del haz de electrones formado cerca de la muestra. Esto se debe a que la intensidad, formada en el plano de difracción Fraunhofer del microscopio, varía considerablemente con el ángulo, y esta variación es una función muy sensible de las aberraciones de la lente y el desenfoque (Cowley, 1986).

La figura 1a muestra el ronchigrama experimental observado de una película de carbono amorfo obtenido a 80 kV y un coeficiente de aberración esférica Cs de 0.743  $\mu\text{m}$ . Cabe mencionar que el carbono amorfo proviene de la membrana de soporte de una rejilla de Cu utilizada en microscopía de transmisión. El ronchigrama muestra un área plana coherente superior a 40 mrad en el ángulo medio, correspondiente al ángulo de convergencia de la fase uniforme (Sawada *et al.*, 2008), recordando que para compensar las aberraciones geométricas es necesario ángulos de convergencia más altos cuando se usan voltajes de aceleración bajos, el área plana no tiene una simetría totalmente esférica sino una forma similar a un eje 6 de simetría característico de un corrector Cs tipo hexapolo, en el que seis polos N/S alternan en torno al eje óptico; además del ronchigrama, queda clara el área plana libre de aberraciones. La presencia de aberraciones de orden inferior (véase la tabla 1) se hacen visibles en la parte central del ronchigrama y, por lo tanto, pueden corregirse. Esta área plana es más grande que las obtenidas en microscopios sin corrector Cs y también cuando el haz de electrones no está corregido o está desalineado. Cuando la excitación de cada componente del sistema de iluminación cambia ligeramente, se observan desalineaciones muy pequeñas en el ronchigrama, las cuales cambian severamente su simetría circular. Además, la presencia o ausencia de franjas de interferencia en el ronchigrama indica la cantidad de ampliación incoherente del haz debido a inestabilidades y al efecto del tamaño de la fuente.

La simulación del ronchigrama debe verse como una herramienta esencial para la comunidad que trabaja con STEM con aberración corregida. La figura 1b muestra el ronchigrama simulado usando las mismas condiciones de operación del microscopio (véase la tabla 1). Como se puede observar, el ángulo medio es del mismo tamaño que el ronchigrama experimental, además, no se observan franjas de interferencia en la región central del disco transmitido. Estas condiciones ópticas se utilizaron posteriormente en las simulaciones teóricas de las imágenes de STEM. Las figuras 1c y d muestran los ronchi-

gramas simulados utilizando como valor del coeficiente de aberración esférica 500  $\mu\text{m}$  y 1 mm, respectivamente. Como se puede apreciar, en condiciones donde la aberración esférica no está corregida, no existe un área plana coherente. Es importante mencionar que una vez que se alinea el haz de electrones, se coloca una apertura de la lente condensadora en el centro del ronchigrama para obtener un haz de electrones fino y con alta intensidad. Utilizando el STEM con el corrector de  $C_s$ , se pueden obtener imágenes simultáneas con alta resolución de las posiciones de los átomos pesados y ligeros, incluso en condiciones de contraste Z (Haider *et al.*, 1998). Algunos parámetros fuertemente relacionados con la forma de la distribución de intensidad del haz de electrones para medir el ancho a la altura media (FWHM) son: el desenfoque, el ángulo de convergencia, la aberración esférica y el nivel de cualquier ampliación incoherente del haz de electrones (James y Browning, 1999). Después de la corrección de la aberración esférica, el microscopio utilizado es capaz de proporcionar un haz de electrones con un FWHM de 0.15 nm (figura 1e).

**Figura 1.** a) Ronchigrama de una película de carbono amorfo obtenida a 80 kV y coeficiente de aberración esférica  $C_s = 0.743 \mu\text{m}$ ; b) ronchigrama simulado usando los parámetros del instrumento; c)  $C_s = 500 \mu\text{m}$ ; d) 1 mm, y, e) haz de electrones simulado con los coeficientes de aberración medidos durante el experimento, el haz de electrones tiene un FWHM de 0.15 nm.

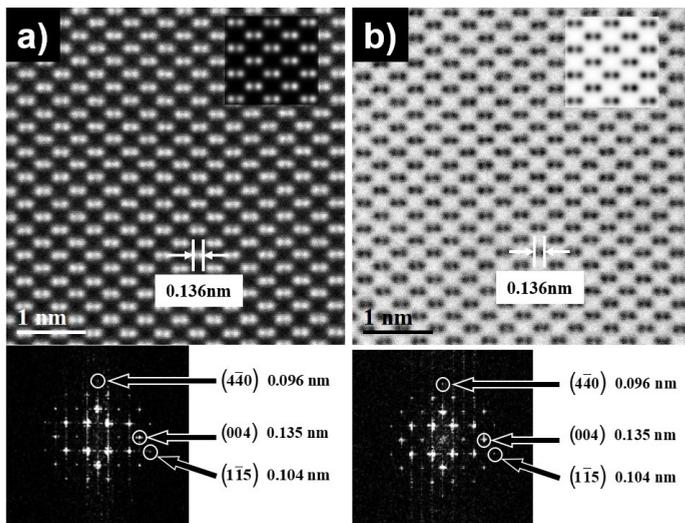


Fuente: Figura a) Cortesía del Kleberg Advanced Microscopy Center; b)-e) elaboración del autor.

Con el fin de evaluar las condiciones experimentales del microscopio, se obtuvieron imágenes de campo oscuro anular de alto ángulo (HAADF)-STEM y de campo claro (BF)-STEM de estándares de Si a lo largo de la dirección [110]. Las figuras 2a y 2b muestran las imágenes de HAADF-STEM y BF-STEM obtenidas de la muestra de Si orientada a lo largo de la dirección [110]. En las imágenes, se incluye un recuadro relacionado con la simulación teórica de cada imagen. La simulación de las imágenes se basa en el método multicapas de la teoría dinámica de la difracción de electrones (Koch, 2002). En las figuras también se muestra la transformación rápida de Fourier (FFT) obtenida de cada imagen. Ambas imágenes exhiben las columnas atómicas del Si claramente resueltas con una distancia atómica entre ellas de 0.136 nm. Las imágenes aparecen libres de cualquier distorsión importante. El contraste de las imágenes simuladas de STEM (recuadros), que se basa en los parámetros instrumentales, enumerados en la tabla 1, es muy similar al contraste de las imágenes experimentales. Es importante mencionar que la comparación entre las imágenes experimental y simulada puede dar información sobre la cuantificación atómica y el espesor de la muestra, pero es necesario considerar más parámetros como, por ejemplo, la eficiencia del detector anular (Jones *et al.*, 2014). No obstante, como es conocido, la preparación de la muestra es muy importante en la microscopía electrónica. En el caso particular del STEM con aberración corregida, el grosor de las muestras debe ser menor que el espesor típico de las muestras TEM. Esto se debe a que cuando aumenta el espesor de la muestra, la señal de los electrones dispersados por la muestra se atenúa antes de la detección, debido a eventos múltiples de dispersión elásticos e inelásticos a medida que los electrones viajan a través del sustrato, lo cual hace que en el caso de la imagen HAADF-STEM sea muy sensible al espesor de la muestra (Benetatos *et al.*, 2005). El resultado es una disminución de la relación señal/ruido que reduce significativamente la calidad de la imagen. Las FFT de las imágenes muestran una resolución espacial de 0.09 nm. Esto se ilustra con la presencia de la reflexión (4-40). Además, reflexiones correspondientes a las periodicidades del plano (002), que en la estructura espacial real están cinemáticamente prohibidas, se pueden observar en las FFT (Geuens y Van Dyck, 2003). Estas reflexiones, que deberían estar extintas, son débilmente visibles debido a la dispersión múltiple, confirmando aún más que el tamaño del haz es menor de 0.15 nm. Además de estos puntos, en la FFT se pueden observar una gran cantidad de reflejos a una frecuencia espacial muy alta en la dirección vertical. Estos puntos no corresponden a ninguna resolución espacial en la imagen, sino al ruido del barrido del haz e inestabilidades presentes en la muestra (Klie y Zhu, 2005).

Campo claro anular en STEM (ABF-STEM) es una técnica de imagen propuesta hace décadas y utilizada cada vez con mayor frecuencia. La técnica consiste en un detector de campo claro (BF-STEM) en el que el área central queda obstruida —puede hacerse con el bloqueador del haz (*beam stopper*) del microscopio—, con la finalidad de producir imágenes que muestran co-

**Figura 2.** a) HAADF-STEM y b) BF-STEM imágenes de Si[110] tomadas a 80 kV, las imágenes muestran una resolución espacial de 0.09 nm.

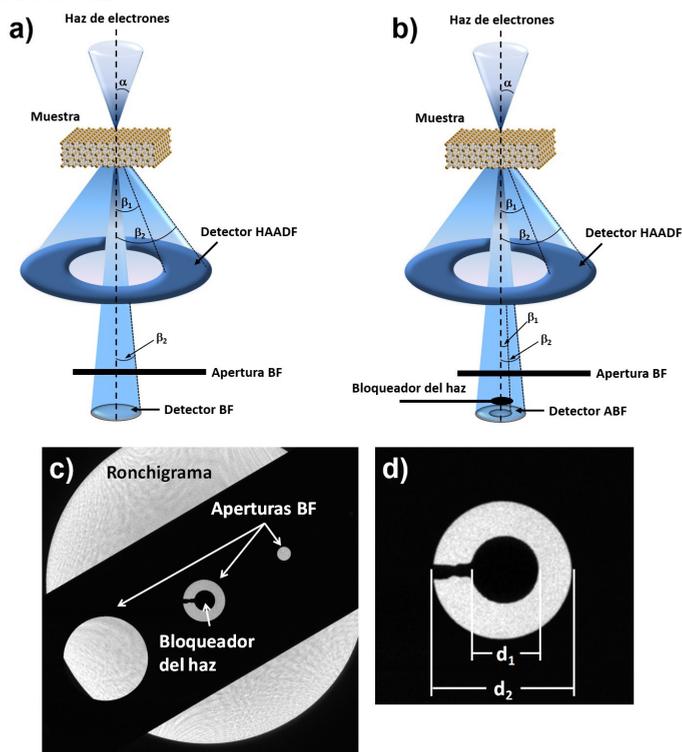


Fuente: Imágenes cortesía del Kleberg Advanced Microscopy Center; recuadros y FFT, elaboración del autor.

lumnas de elementos ligeros y pesados (Findlay *et al.*, 2009). La figura 3a muestra la configuración esquemática donde el detector de HAADF es anular y se coloca por encima de la pantalla de visualización, y el detector BF se coloca debajo de la apertura limitadora de ángulo externo (apertura BF, figura 3c). La figura 3b muestra la misma configuración, pero en este caso un disco bloqueador para la formación del ángulo interno es introducido (bloqueador del haz) formando la imagen ABF-STEM. Ambas imágenes HAADF-STEM y ABF-STEM se pueden adquirir simultáneamente usando esta configuración. El semiángulo de la apertura para la formación del haz de electrones se denota por  $\alpha = 40$  mrad. Los ángulos interno y externo del detector anular están dados por  $\beta_1$  y  $\beta_2$ . Para HAADF,  $\beta_1 = 90$  mrad y  $\beta_2 = 170$  mrad, y para ABF,  $\beta_1 = 11$  mrad y  $\beta_2 = 22$  mrad. Punto interesante es el hecho de que el ángulo externo es dos veces mayor que el ángulo interno ( $\beta_2 \approx 2\beta_1$ ), lo que se puede observar en la figura 3d, donde la relación de los diámetros de los discos es  $d_2 \approx 2d_1$ .

Para comprobar la configuración anterior, las figuras 4a y b muestran las imágenes experimentales de HAADF-STEM y ABF-STEM, respectivamente, de la fase  $\text{LaAlO}_3$  (LAO) que tiene una estructura cúbica y un grupo espacial Pm-3m (221), con lantano (La) en las esquinas, aluminio (Al) en el centro y tres átomos de oxígeno (O) en los centros de las caras. A partir de las imágenes experimentales, se obtuvieron distancias interplanares de 0.382, 0.268, 0.191 y 0.171 nm. Dichas distancias interplanares corresponden a los

**Figura 3.** a) Configuración del STEM; b) configuración para obtener imágenes ABF-STEM; c) ronchigrama con las aperturas de campo claro y el bloqueador del haz, y d) detalle de la apertura de campo claro y el bloqueador del haz.



Fuente: a) y b) adaptado de (Kotaka, 2012); c) y d) elaboración del autor.

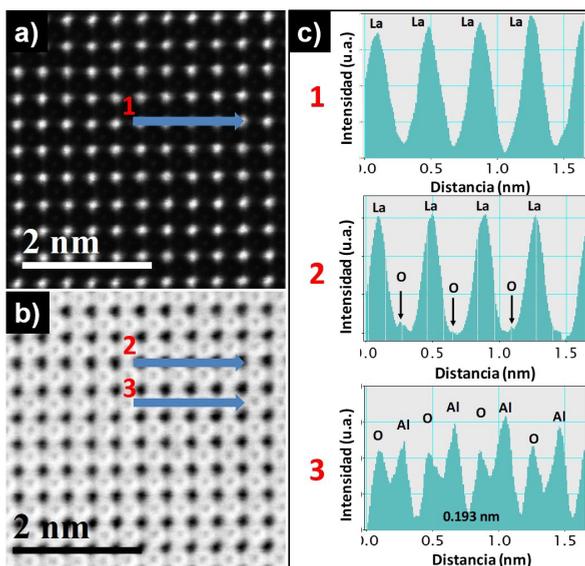
planos cristalinos (001), (011), (002) y (012), respectivamente, de la estructura del LAO con  $a_0 = 0.3812$  nm, y orientada en el eje de zona [001] (ICDD JCPDF 01-070-4123) (Lee *et al.*, 2016).

La imagen de HAADF-STEM muestra una secuencia de puntos muy brillantes, estos puntos brillantes corresponden a la contribución de las columnas de La, dado que La tiene un número atómico mayor que Al y O (57, 13 y 8, respectivamente), de modo que la contribución de dispersión de los átomos de Al y O es muy débil. Imágenes de HAADF-STEM obtenidas de interfaces de  $\text{LaAlO}_3/\text{Si}$  y  $\text{BiFeO}_3/\text{LaAlO}_3$  han sido reportadas previamente, donde la intensidad de las columnas Al-O de la fase LAO aparecen débiles en comparación con las columnas de La, como lo mostrado en este trabajo, así como también que las columnas de O no contribuyen significativamente al contraste de la imagen (Klenov *et al.*, 2005; Huang *et al.*, 2014). De la misma manera, en imágenes de HR-TEM de la fase LAO, esencialmente solo son visibles las columnas atómicas de Al-O (Maurice *et al.*, 2006). Sin embargo,

como se mencionó anteriormente, las imágenes ABF-STEM proporcionan una señal en la que se pueden analizar claramente tanto columnas de elementos ligeros como pesados con buena relación señal/ruido. En la figura 4b se distinguen los átomos de La, Al y O, el contraste medio corresponde al Al y las columnas O son visibles como puntos con un contraste menor, mientras que los puntos con mayor brillantez corresponden a los átomos de La.

Para comparar la intensidad de las diferentes columnas atómicas, se obtuvieron perfiles de intensidad de ambas imágenes. La figura 4c muestra los perfiles de intensidad realizados a lo largo de las líneas indicadas en las figuras 4a y b. A partir de los perfiles de intensidad, está claro que hay picos con diferente intensidad, lo cual refleja el contraste Z de las columnas atómicas. El perfil de intensidad etiquetado con el número 1 es obtenido de la imagen HAADF-STEM, este perfil solo muestra la contribución de los átomos de La como se esperaba. Los perfiles etiquetados como números 2 y 3 se obtuvieron de la imagen ABF-STEM, por lo tanto, se pueden observar elementos ligeros como el Al y O, así como el La. El perfil etiquetado con el número 2 muestra la contribución de La, que son los picos de mayor intensidad, y también se muestran algunos picos con baja intensidad, que están asociados con O. Es interesante observar en este perfil de intensidad las columnas atómicas de O, que en la imagen de HAADF-STEM no se apreciaban. El perfil de intensidad etiquetado con el número 3 muestra claramente la

**Figura 4.** a) y b) imágenes de HAADF y ABF-STEM de la fase  $\text{LaAlO}_3$  a lo largo del eje de zona [001]; c) diferentes perfiles de intensidad obtenidos de las imágenes STEM.

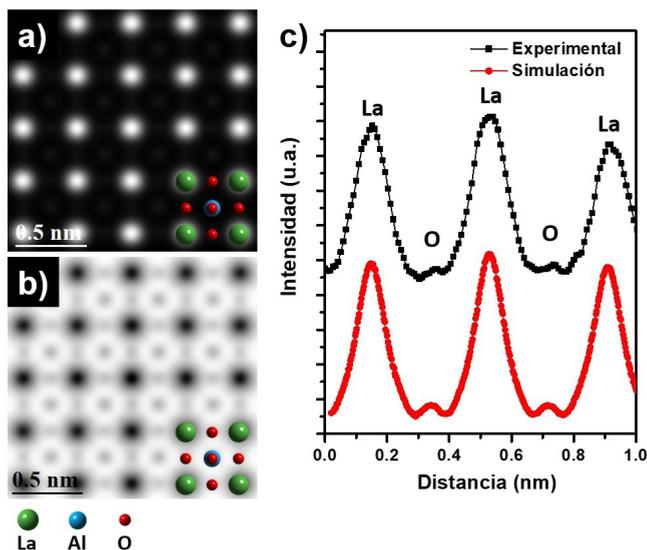


Fuente: Elaboración del autor.

contribución del Al y O, con una buena relación señal/ruido. Por consiguiente, la técnica ABF-STEM mejora el contraste de las columnas atómicas de elementos ligeros y se puede emplear con éxito para detectar la posición de los elementos ligeros en los materiales.

La simulación de las imágenes ABF y HAADF-STEM se realizó utilizando el programa QSTEM (Koch, 2002) que utiliza el algoritmo de multicapas. Se encontró que las imágenes simuladas con las condiciones instrumentales concuerdan con las imágenes experimentales. Las figuras 5a y b muestran las imágenes simuladas de HAADF-STEM y ABF-STEM de la fase  $\text{LaAlO}_3$  vistas a lo largo de la orientación  $[001]$ , respectivamente. De la figura 5a, las columnas atómicas correspondientes al La son claramente visibles. Un contraste débil entre estas columnas sugiere la ubicación de las columnas de Al, pero no se resuelven claramente en esta imagen. En la imagen simulada ABF-STEM (figura 5b), todas las columnas visibles aparecen con contraste negativo. Como se menciona en la imagen experimental ABF-STEM (figura 4b), las columnas La, Al y O se distinguen con una mejor intensidad de señal/ruido. La comparación directa de las imágenes experimentales y simuladas de ABF-STEM se lleva a cabo mediante la comparación de los perfiles de intensidad determinados a través de las columnas atómicas La-O (figura 5c). La curva negra muestra el perfil de intensidad de la imagen experimental ABF-STEM, esto servirá como punto de referencia. La curva roja muestra el perfil de intensidad de la imagen simulada ABF-STEM de la fase  $\text{LaAlO}_3$ . El pico co-

**Figura 5.** a) y b) Imágenes simuladas de HAADF y ABF-STEM de la fase  $\text{LaAlO}_3$ ; c) perfiles de intensidad a través de las imágenes experimentales y simuladas de ABF-STEM.



Fuente: Elaboración del autor.

rrespondiente a La tiene la misma intensidad en comparación con la curva experimental; incluso la relación entre los picos de los perfiles de intensidades de La y O es consistente con la imagen experimental. De este modo, para obtener imágenes directas de la estructura atómica de una muestra, se pueden utilizar tanto HRTEM como STEM. Ambas brindan información en el espacio real, lo que facilita la visualización directa de la estructura y defectos cristalinos de los materiales. Sin embargo, debido a la sensibilidad de las imágenes HAADF-STEM y ABF-STEM al contraste por número atómico, hace que estas sean muy útiles para visualizar tanto elementos pesados como ligeros que en HRTEM convencional sería muy difícil.

## Conclusiones

Se evaluó el rendimiento del STEM equipado con un corrector de Cs. Las aberraciones axiales de un sistema de lentes formadoras del haz de electrones son directamente visibles en un ronchigrama, por lo cual se considera como parte fundamental del procedimiento de alineación de los correctores de aberración disponibles en un STEM. La efectividad de la metodología de simulación propuesta demostró una comparación entre los ronchigramas experimentales y simulados obtenidos con los parámetros del instrumento con un ángulo medio superior a 40 mrad. Las transformadas rápidas de Fourier obtenidas de las imágenes de STEM de Si[110] tomadas con un voltaje de aceleración de 80 kV muestran una resolución espacial de hasta 0.09 nm. STEM con corrección de Cs visualiza con precisión la estructura atómica tanto de elementos ligeros como de pesados, obteniendo imágenes simultáneas de ABF-STEM y HAADF-STEM controlando los ángulos de recolección del detector circular BF y del detector anular ADF, respectivamente. Las condiciones experimentales para visualizar las columnas atómicas de la muestra  $\text{LaAlO}_3$  fueron para ABF 11-22 mrad y para HAADF con 90-170 mrad. Mediante la técnica ABF-STEM se demostró que se pueden detectar tanto elementos ligeros como pesados en las redes cristalinas, en este caso fue posible visualizar las columnas atómicas del La, Al y O presentes en la muestra LAO. Las simulaciones de las imágenes de ABF-STEM y HAADF-STEM basadas en el método multicapas de Cowley y Moodie se han utilizado como herramienta para identificar el contraste de las diferentes columnas atómicas. ABF-STEM, es una técnica que mejora el contraste de las columnas atómicas y puede emplearse para la detección de elementos ligeros de diversos materiales.

## Referencias

- Barthel, J. (2007). <http://www.er-c.org/barthel/drprobelight/>
- Bell, D. C., C. J. Russo y D. V. Kolmykov. (2012). 40 keV atomic resolution TEM. *Ultramicroscopy*, 114: 31-37. <https://doi.org/10.1016/j.ultramic.2011.12.001>

- Benetatos, N. M., B. W. Smith, P. A. Heiney y K. I. Winey. (2005). Toward reconciling STEM and SAXS data from ionomers by investigating gold nanoparticles. *Macromolecules*, 38: 9251-9257. <https://doi.org/10.1021/ma051419i>
- Cowley, J. M. (1986). Electron diffraction phenomena observed with a high resolution STEM instrument. *Journal of Electron Microscopy Technique*, 3: 25-44. <https://doi.org/10.1002/jemt.1060030105>
- Cowley, J. M. y A. F. Moodie. (1957). The scattering of electrons by atoms and crystals. I. A new theoretical approach. *Acta Crystallographica*, 10: 609-619. <https://doi.org/10.1107/S0365110X57002194>
- Crewe, A. V., J. Wall y J. Langmore. (1970). Visibility of single atoms. *Science*, 168 (3937): 1338-1340. <https://doi.org/10.1126/science.168.3937.1338>
- Dupouy, G. (2017). Chapter four – Electron microscopy at very high voltages. En *Advances in Imaging and Electron Physics*. Elsevier, 261-340.
- Dwyer, C. (2010). Simulation of scanning transmission electron microscope images on desktop computers. *Ultramicroscopy*, 110(3):195-198. <https://doi.org/10.1016/j.ultramic.2009.11.009>
- Esparza, R., A. F. García-Ruiz, J. J. Velázquez Salazar, R. Pérez y M. J. Yacamán. (2013). Structural characterization of Pt-Pd core-shell nanoparticles by Cs-corrected STEM. *Journal of Nanoparticle Research*, 15(1): 1342. <https://doi.org/10.1007/s11051-012-1342-2>
- Esparza, R., O. Téllez-Vázquez, G. Rodríguez-Ortiz, A. Ángeles-Pascual, S. Velumani y R. Pérez. (2014). Atomic structure characterization of Au-Pd bimetallic nanoparticles by aberration-corrected scanning transmission electron microscopy. *The Journal of Physical Chemistry C*, 118(38): 22383-22388. <https://doi.org/10.1021/jp507794z>
- Findlay, S. D., N. Shibata, H. Sawada, E. Okunishi, Y. Kondo, T. Yamamoto y Y. Ikuhara. (2009). Robust atomic resolution imaging of light elements using scanning transmission electron microscopy. *Applied Physics Letters*, 95: 191913. <https://doi.org/10.1063/1.3265946>
- García, A., A. M. Raya, M. M. Mariscal, R. Esparza, M. Herrera, S. I. Molina, G. Scavello, P. L. Galindo, M. J. Yacamán y A. Ponce. (2014). Analysis of electron beam damage of exfoliated MoS<sub>2</sub> sheets and quantitative HAADF-STEM imaging. *Ultramicroscopy*, 146: 33-38. <https://doi.org/10.1016/j.ultramic.2014.05.004>
- Geuens, P. y D. Van Dyck. (2003). About forbidden and weak reflections. *Micron*, 34: 167-171. [https://doi.org/10.1016/S0968-4328\(03\)00032-5](https://doi.org/10.1016/S0968-4328(03)00032-5)
- Haider, M., S. Uhlemann y J. Zach. (2000). Upper limits for the residual aberrations of a high-resolution aberration-corrected STEM. *Ultramicroscopy*, 81(3-4): 163-175. [https://doi.org/10.1016/S0304-3991\(99\)00194-1](https://doi.org/10.1016/S0304-3991(99)00194-1)
- Haider, M., P. Hartel, H. Müller, S. Uhlemann y J. Zach. (2009). Current and future aberration correctors for the improvement of resolution in electron microscopy. *Philosophical Transactions of the Royal Society A*, 367: 3665-3682. <https://doi.org/10.1098/rsta.2009.0121>
- Haider, M., S. Uhlemann, E. Schwan, H. Rose, B. Kabius y K. Urban. (1998). Electron microscope image enhanced. *Nature*, 392(6678): 768-769. <https://doi.org/10.1038/33823>

- Hawkes, P. W. (2004). *Advances in imaging and electron physics*: Elsevier.
- Huang, R., H. C. Ding, W. I. Liang, Y. C. Gao, X. D. Tang, Q. He, C. G. Duan, Z. Zhu, J. Chu, C. A. J. Fisher, T. Hirayama, Y. Ikuhara y Y. H. Chu. (2014). Atomic scale visualization of polarization pinning and relaxation at coherent BiFeO<sub>3</sub>/LaAlO<sub>3</sub> interfaces. *Advanced Functional Materials*, 24(6): 793-799. <https://doi.org/10.1002/adfm.201301470>
- Ishikawa, R., E. Okunishi, H. Sawada, Y. Kondo, F. Hosokawa y E. Abe. (2011). Direct imaging of hydrogen-atom columns in a crystal by annular bright-field electron microscopy. *Nature Materials*, 10(4): 278-281. <https://doi.org/10.1038/nmat2957>
- James, E. M. y N. D. Browning. (1999). Practical aspects of atomic resolution imaging and analysis in STEM. *Ultramicroscopy*, 78: 125-139. [https://doi.org/10.1016/S0304-3991\(99\)00018-2](https://doi.org/10.1016/S0304-3991(99)00018-2)
- Jones, L., K. E. MacArthur, V. T. Fauske, A. T. J. van Helvoort y P. D. Nellist. (2014). Rapid estimation of catalyst nanoparticle morphology and atomic-coordination by high-resolution Z-contrast electron microscopy. *Nano Letters*, 14: 6336-6341. <https://doi.org/10.1021/nl502762m>
- Kirkland, E. J., R. F. Loane y J. Silcox. (1987). Simulation of annular dark field stem images using a modified multislice method. *Ultramicroscopy*, 23: 77-96. [https://doi.org/10.1016/0304-3991\(87\)90229-4](https://doi.org/10.1016/0304-3991(87)90229-4)
- Klenov, D. O., D. G. Schlom, H. Li y S. Stemmer. (2005). The interface between single crystalline (001) LaAlO<sub>3</sub> and (001) silicon. *Japanese Journal of Applied Physics*, 44 (5L): L617. <https://doi.org/10.1143/JJAP.44.L617>
- Klie, R. F. y Y. Zhu. (2005). Atomic resolution STEM analysis of defects and interfaces in ceramic materials. *Micron*, 36(3): 219-231. <https://doi.org/10.1016/j.micron.2004.12.003>
- Koch, C. (2002). *Determination of core structure periodicity and point defect density along dislocations*. USA: Arizona State University.
- Kotaka, Y. (2012). Direct visualization method of the atomic structure of light and heavy atoms with double-detector Cs-corrected scanning transmission electron microscopy. *Applied Physics Letters*, 101(13): 133107. <https://doi.org/10.1063/1.4756783>
- Lee, P. W., V. N. Singh, G. Y. Guo, H. -J. Liu, J. -C. Lin, Y. -H. Chu, C. H. Chen y M. -W. Chu. (2016). Hidden lattice instabilities as origin of the conductive interface between insulating LaAlO<sub>3</sub> and SrTiO<sub>3</sub>. *Nature Communications*, 7: 12773. <https://doi.org/10.1038/ncomms12773>
- Maurice, J. L., C. Carrétéro, M. J. Casanove, K. Bouzehouane, S. Guyard, É. Larquet y J. P. Contour. (2006). Electronic conductivity and structural distortion at the interface between insulators SrTiO<sub>3</sub> and LaAlO<sub>3</sub>. *Physica Status Solidi*, 203(9): 2209-2214. <https://doi.org/10.1002/pssa.200566033>
- Mayoral, A., R. Esparza, F. L. Deepak, G. Casillas, S. Mejía-Rosales, A. Ponce y M. J. Yacamán. (2011). Study of nanoparticles at UTSA: one year of using the first JEM-ARM200F installed in USA. *Jeol News*, 46 (1): 1-5.
- Mishra, R., R. Ishikawa, A. R. Lupini y S. J. Pennycook. (2017). Single-atom dynamics in scanning transmission electron microscopy. *MRS Bulletin*, 42(9): 644-

652. <https://doi.org/10.1557/mrs.2017.187>

- Okunishi, E., I. Ishikawa, H. Sawada, F. Hosokawa, M. Hori y Y. Kondo. (2009). Visualization of light elements at ultrahigh resolution by stem annular bright field microscopy. *Microscopy and Microanalysis*, 15(S2):164-165. <https://doi.org/10.1017/S1431927609093891>
- Pennycook, S. J., D. E. Jesson, A. J. McGibbon y P. D. Nellist. (1996). High angle dark field STEM for advanced materials. *Microscopy*, 45(1): 36-43. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals/jmicro.a023410>
- Rodenburg, J. M. y E. B. Macak. (2002). Optimising the resolution of TEM/STEM with the electron ronchigram. *Microscopy and Analysis*, 5-7.
- Rodríguez-Proenza, C. A., J. P. Palomares-Báez, M. A. Chávez-Rojo, A. F. García-Ruiz, C. L. Azanza-Ricardo, A. Santoveña-Uribe, G. Luna-Bárceñas, J. L. Rodríguez-López y R. Esparza. (2018). Atomic surface segregation and structural characterization of PdPt bimetallic nanoparticles. *Materials*, 11(10): 1882. <https://doi.org/10.3390/ma11101882>
- Sasaki, T., H. Sawada, F. Hosokawa, Y. Kohno, T. Tomita, T. Kaneyama, Y. Kondo, K. Kimoto, Y. Sato y K. Suenaga. (2010). Performance of low-voltage STEM/TEM with delta corrector and cold field emission gun. *Journal of Electron Microscopy*, 59(S1): S7-S13. <https://doi.org/10.1093/jmicro/dfq027>
- Sawada, H., T. Sannomiya, F. Hosokawa, T. Nakamichi, T. Kaneyama, T. Tomita, Y. Kondo, T. Tanaka, Y. Oshima, Y. Tanishiro y K. Takayanagi. (2008). Measurement method of aberration from ronchigram by autocorrelation function. *Ultramicroscopy*, 108(11): 1467-1475. <https://doi.org/10.1016/j.ultramic.2008.04.095>
- Spence, J. C. H. (2013). *High-resolution electron microscopy*. OUP Oxford.
- Zhou, D., K. Müller-Caspary, W. Sigle, F. F. Krause, A. Rosenauer y P. A. van Aken. (2016). Sample tilt effects on atom column position determination in ABF-STEM imaging. *Ultramicroscopy*, 160: 110-117. <https://doi.org/10.1016/j.ultramic.2015.10.008>

# Nanoestructuras y su caracterización por medio de microscopía electrónica de transmisión; ciencia y arte<sup>◇</sup>

## Nanostructures and their characterization by transmission electron microscopy; science and art

Miriam-Carolina Mendoza Ramírez,\* Miguel Avalos Borja\*,\*\*

**ABSTRACT:** The description of nanometric systems is still being a challenging topic, for this reason the transmission electron microscopy (TEM) scope is exemplified in a didactic way using several nanosystems (Au nanoparticles and thin Si films). Throughout this work, conventional TEM techniques such as bright field (BF), dark field (DF), high angle annular dark field (HAADF), selected area electron diffraction (SAED) and electron energy loss spectroscopy (EELS) are shown, emphaticizing the differences with less conventional techniques such as convergent beam electron diffraction (CBED), large angle convergent beam electron diffraction (LACBED) and precession electron diffraction (PED). Also, some practical suggestions are given for describing contrast found on several TEM techniques, offering a striking, clear and didactic vision of the current scopes of TEM in Mexico.

**KEYWORDS:** transmission electron microscopy, electron diffraction, precession and convergent beam.

**RESUMEN:** En el presente trabajo se describen de forma didáctica los alcances de la microscopía electrónica de transmisión (TEM) para el estudio de nanosistemas. Las ilustraciones mostradas se adquirieron empleando muestras ilustrativas (nanopartículas de Au y películas de Si). A lo largo de este escrito se ejemplifica el uso de algunas técnicas TEM convencionales, como BF, DF, HAADF, SAED y EELS, así como también se ejemplifica el empleo de técnicas avanzadas de difracción, como CBED, LACBED y PED. También se brindan algunas sugerencias prácticas que permitirán describir y diferenciar de forma sencilla el contraste observado en algunas de las técnicas disponibles en el TEM. Todo con el objetivo de ofrecer una visión, llamativa, clara y didáctica de los alcances actuales de la microscopía electrónica en México.

**PALABRAS CLAVE:** microscopía electrónica de transmisión, difracción de electrones, precesión y haz convergente.

Recibido: 7 de febrero de 2020.

Aceptado: 4 de mayo de 2020.

<sup>◇</sup> Los autores agradecen al LINAN y a la UNaC, por facilitar el uso de sus instalaciones y equipos para ilustrar el presente trabajo, también a los técnicos académicos Héctor Gabriel Silva Pereyra e Israel Gradilla Martínez, así como a Óscar Edel Contreras López, por las facilidades brindadas en apoyo al presente trabajo.

\* Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, División de Materiales Avanzados, San Luis Potosí, S.L.P., México.

\*\* Autor de correspondencia: miguel.avalos@ipicyt.edu.mx

## Introducción

Los materiales nanoestructurados han sido señalados como candidatos ideales para el desarrollo de aplicaciones novedosas en áreas diversas (Zhang *et al.*, 2005; Daniel *et al.*, 2004; Tomar *et al.*, 2013; Das *et al.*, 2011). Incluyendo catálisis (Zhou *et al.*, 2012), ciencia de materiales (Morin *et al.*, 2011) o medicina (Eustis y El-Sayed, 2006). De manera particular, las nanopartículas anisotrópicas han atraído gran atención debido a sus propiedades ópticas y a su inusual comportamiento físico y químico (Vigderman *et al.*, 2012; Major *et al.*, 2013). Estas nanopartículas se caracterizan por crecer con morfologías no definidas por el estado de equilibrio (bastones, platos, decaedros, etc.) (Barmparis *et al.* 2015) las cuales comúnmente se preparan usando métodos coloidales (Millstone *et al.*, 2008; Nikoobakht y El-Sayed, 2003; Yao *et al.*, 2017). El control y entendimiento de los sistemas nanométricos coloidales es fundamental para el desarrollo de aplicaciones, lo cual ha incentivado la creación de distintas técnicas capaces de acercarnos al “nanomundo”. Estas, en su conjunto, se conocen como “técnicas de caracterización”. A pesar de que la comprensión de cada una de estas técnicas requiere cierta profundidad, de manera muy general pueden dividirse en aquellas que nos permiten obtener: espectros, imágenes o patrones de difracción.

Las técnicas espectroscópicas, como UV-VIS NIR, RAMAN, EDS, entre otras, permiten caracterizar propiedades como la respuesta óptica y la composición química. Por otra parte, las técnicas que producen imágenes, como SEM, BF TEM o CL, son capaces de diferenciar morfología, composición e incluso propiedades como luminiscencia. Las limitaciones y requerimientos para cada una de estas técnicas están relacionadas generalmente con el tipo de radiación que se emplea como sonda ya que es posible hacer incidir: fotones, electrones o iones de distintos materiales y con distinta energía.

Finalmente, para el análisis de estructura de materiales, la técnica por excelencia es la difracción, este fenómeno es observado siempre que exista una fuente de radiación monocromática con longitud de onda comparable con la distancia interatómica de un cristal, actualmente ya se han desarrollado sistemas que usan rayos X, electrones o neutrones.

El presente trabajo se centra en una técnica imprescindible para el estudio del mundo nanométrico: la microscopía electrónica de transmisión (TEM). Esta versátil y poderosa técnica es capaz de adquirir: imágenes (en campo claro u oscuro, en barrido, con contraste de número atómico, con contraste de difracción tanto de amplitud como de fase), espectros (caracterizando composición química, espesor, estados de oxidación) o patrones de difracción (observando la estructura de un material simultáneamente, describiendo celdas unitarias, distancias interplanares, ausencias sistemáticas, grupo espacial, entre otros) mediante el uso de sus diversas variantes (Zou *et al.*, 2012).

Las muestras para TEM se fabrican típicamente con espesores menores a 100 nm, las cuales deben poseer cierta tolerancia al daño por radiación io-

nizante causado por electrones o en su defecto ser sometidas a preparación especial usando metales pesados y la técnica de corte por ultramicrotomo (esto último es especialmente válido para muestras biológicas).

A lo largo de este trabajo, se describen de forma didáctica: las técnicas típicas para el estudio de materiales nanométricos y la obtención de información química, morfológica y estructural para diversos sistemas nanométricos anisotrópicos; incluyendo platos, bastones y decaedros, y se introduce la aplicación de técnicas avanzadas de difracción, como haz convergente (CBED) (Morniroli, 2006) y haz convergente de amplio ángulo (LACBED) (Tanaka *et al.*, 1980; Morniroli, 2003.), también se presenta una técnica única en el país: la técnica de difracción de electrones en precesión (PED) (Avilov *et al.*, 2007). Para ilustrar las técnicas de difracción en TEM, se emplearon muestras didácticas de Si. Este trabajo brinda algunas recomendaciones prácticas que permitirán discernir fácilmente el significado del contraste en las micrografías TEM que observamos día con día.

## Experimental

### Síntesis de nanopartículas de Au

Para ilustrar el presente trabajo se sintetizaron nanopartículas de oro de tres morfologías distintas, nanorrodillos, nanoplatos, y nanodecaedros. Todas las partículas se sintetizaron usando procesos de nucleación heterogénea, mediados por semillas, usando surfactantes y medios distintos. Para sintetizar decaedros y barras, se empleó el método de preparación de semillas de Turquevich (Nikoobakht y El-Sayed, 2003; Sánchez-Iglesias *et al.*, 2006), mientras que para la preparación de platos se empleó un proceso de tipo Polyol (Kan *et al.*, 2010).

### Preparación de muestras

#### Usando desbaste iónico

Para la fabricación de películas delgadas de Si se empleó la técnica de desbaste iónico, dicha técnica permite adelgazar una pieza de material sólido de dimensiones mesométricas hasta convertirlo en una lámina delgada de espesor nanométrico. Típicamente el cristal mesométrico es adelgazado hasta formar un agujero en el centro de la muestra, cuyos bordes acuñados tienen espesores nanométricos, siendo esta la única parte observable en TEM. Para la preparación de muestra TEM, se seleccionó un monocristal de Si de aproximadamente de 1 mm de espesor, el cristal se adhirió a una rejilla ranurada usando pegamento epóxico. Más adelante, la muestra fue sometida a un proceso sistemático de adelgazamiento usando: discos de SiC (hasta 100  $\mu\text{m}$  de espesor aprox.), un desbastador tipo trípode Polisher 590W SPI (hasta 10  $\mu\text{m}$  de espesor aprox.), y, finalmente, un erosionador iónico Precision Ion Polishing System de Gatan.

## Usando nanofabricación

Puesto que la técnica de desbaste iónico presenta distintas limitaciones técnicas, existe una alternativa usando sistemas de nanofabricación acoplados a un microscopio de barrido, mediante este sistema es posible fabricar muestras especializadas que son conocidas como “lamelas”. Estas muestras son segmentos rectangulares con variaciones constantes de espesor, en cuyo borde se puede apreciar una cuña de unos pocos nanómetros de espesor.

El proceso de preparación de lamela para una muestra de Si, se ilustra en la figura 7. Para las ilustraciones mostradas en el presente artículo, se empleó un equipo de nanofabricación acoplado a un microscopio electrónico de barrido JEOL JIB-4500, usando cañones de Pt y Ga, así como el uso de un nano-manipulador Omniprobe.

## Caracterizaciones usando microscopía electrónica de transmisión (TEM)

Todas las caracterizaciones TEM fueron realizadas usando un microscopio FEI Tecnai-F30 TEM a 300 kV. Para analizar la morfología se adquirieron imágenes en campo claro (BF) y oscuro (DF). Para los experimentos de difracción se usaron cuatro técnicas distintas: difracción de área selecta (SAED), difracción en precesión de haz (PED), difracción con haz convergente (CBED) y difracción de haz convergente de amplio ángulo (LACBED). Se hizo uso de bayonetas de inclinación sencilla y de doble inclinación. Las micrografías se adquirieron usando una cámara digital Gatan™ Orius SC200. En las micrografías mostradas, el contraste, brillo y gamma, fueron modificados ligeramente para maximizar el contraste de visualización.

## Espectroscopía EELS

La espectroscopía de pérdida de energía de electrones (EELS), permite observar la interacción inelástica de los electrones al atravesar una muestra. El presente texto no profundiza en el fundamento y la realización práctica de esta técnica; sin embargo, la consulta del libro de R. F. Egerton se recomienda ampliamente para este propósito (Egerton, 1986).

De forma breve, para la obtención de un espectro EELS, el haz transmitido es recolectado por un prisma magnético, el cual deflecta los electrones en función de la pérdida de energía que estos mismos experimentan al atravesar la muestra. Esta poderosa técnica tiene distintas variantes y permite analizar (en distintas partes del espectro y en función de la monocromaticidad del haz) propiedades como: espesor, composición química, estados de oxidación y de valencia, por mencionar algunos.

En este trabajo, se muestra un ejemplo didáctico para el cálculo de espesor de una muestra plana de Au usando espectroscopía EELS y el *software* Digital Micrograph (DM) por medio de la metodología “Log-ratio”. Mediante esta metodología, es posible estimar el espesor relativo de una muestra

como función del camino libre inelástico medio (MFP), simplemente adquiriendo espectros EELS en la zona de bajas pérdidas (de 0 a 180 eV, aproximadamente) y precisando los siguientes parámetros: la energía del haz incidente ( $E_0$ ), el semiángulo de convergencia ( $\alpha$ ), el semiángulo de recolección ( $\beta$ ) así como el número atómico efectivo (Egerton, 1986).

### Campo claro (BF)

Este es el modo de operación básico en TEM, se caracteriza porque los objetos de interés contrastan en escala de gris a negro, sobre un fondo claro. Para las imágenes adquiridas en BF se usó iluminación paralela convencional y apertura objetiva (para mejorar el contraste debido a cambios en masa-espesor o difracción).

### Campo oscuro (DF)

Este es un modo de operación básico, que permite resaltar el contraste generado por la difracción de un haz difractado en particular. La aplicación de esta técnica se ejemplifica en la figura 3h. El procedimiento para obtener una imagen en campo oscuro consiste en alinear uno de los haces difractados con el eje óptico del microscopio, filtrando esta información mediante el uso de la apertura objetiva.

### Adquisición de patrones de difracción de área selecta (SAED)

Esta es la técnica básica y más empleada en cuanto a difracción, aunque irónicamente es una de las menos útiles, puesto que la difracción SAED se ve fuertemente afectada por el comportamiento “dinámico” de los electrones. Motivo por el cual esta técnica no se recomienda para la determinación de modelos estructurales. Para obtener un patrón de difracción convencional SAED basta con seleccionar un área de interés por medio de la apertura de área selecta (SA) y ejercer cambios en las lentes intermedias del microscopio, dichos cambios provocan que en la pantalla fluorescente del microscopio se observe el plano focal posterior en lugar del plano imagen. Mediante un patrón de difracción SAED podemos observar algunas de las simetrías características de un cristal.

### Técnicas de difracción con precesión de haz (PED)

La alineación para la obtención de patrones en precesión se muestra en la figura 6b. Esta técnica ofrece importantes ventajas en comparación con la adquisición convencional SAED. Para este tipo de adquisición se precisa el uso de bobinas deflectoras, las cuales se ubican en un plano superior e inferior a la muestra y tienen acción directa sobre el haz de electrones. Las bobinas deflectoras tienen la función de rotar el haz de electrones para formar un ángulo sólido en movimiento de precesión. El haz cónico y cíclico que incide y atraviesa la muestra es reintegrado en un punto por medio de un segundo grupo de bobinas deflectoras situadas en un plano inferior a la muestra.

Mediante esta técnica se pueden obtener patrones que lucen de manera similar a un patrón SAED (cuya indexación se basa en los mismos criterios) pero con la ventaja de que mediante este tipo de adquisición, se minimizan los efectos de doble difracción y de difracción dinámica. Además, mediante el uso de esta técnica, es posible analizar de forma integral la información difractada en los “relrods” del espacio recíproco, midiendo patrones con intensidad cuantificable. Siendo la técnica ideal para el estudio estructural detallado de cristales nanométricos (Midgley y Eggeman, 2015; Vincent y Midgley, 1994). Los patrones PED mostrados en el presente trabajo fueron adquiridos usando haz paralelo y una unidad de precesión SpinningStar P-20, con ángulos de precesión menores a 2 grados.

### Técnicas de difracción con haz convergente (CBED y LACBED)

La técnica LACBED es la más desafiante de las técnicas de difracción, para su realización se requiere un amplio conocimiento cristalográfico y excelentes habilidades operativas (Morniroli, 2003 y 2006), debido a que la obtención de una imagen con contraste adecuado depende de distintas variables y de varios recursos indispensables, como: un portamuestras de doble inclinación, un microscopio con aperturas condensadoras grandes y una sonda pequeña (STEM Nanoprobe), además de que se requiere un área iluminada lo suficientemente grande. Por tales razones, se precisan muestras relativamente grandes y gruesas (muestras mayores a  $5 \mu\text{m}^2$  y con espesores entre los 15 y 30 nm).

Considerando los retos inherentes a la técnica, se propuso ilustrar el presente artículo con muestras de Si monocristalino, mismas que fueron preparadas por desbaste iónico en rejilla de una ranura y muestras tipo “lamele” en media rejilla. Para estas muestras fue posible adquirir, patrones de Kossel y patrones LACBED BF en distintos ejes zonales. Empleando las siguientes condiciones operativas: Modo STEM nanoprobe, con una apertura C2 de 200  $\mu\text{m}$ . Para separar los patrones de discos superpuestos (Kossel) se aplicó la metodología de Tanaka,<sup>16</sup> la cual consiste en separar los discos realizando movimientos de la muestra de forma paralela al eje óptico del microscopio, para nuestro caso particular, se alcanzaron condiciones de foco a valores negativos del eje óptico alrededor de las 280  $\mu\text{m}$ . De acuerdo con esta metodología, después de separar los discos, es posible filtrar la información obtenida, seleccionando un haz con la apertura de área selecta; si el usuario selecciona el haz transmitido se obtiene un patrón LACBED en campo claro (LACBED BF) en cambio si se selecciona un haz difractado se observa un patrón LACBED en campo oscuro.

## Resultados

En esta sección se ilustran los resultados típicos obtenidos por las distintas técnicas disponibles en TEM Tecnai-F-30. En las figuras (1-5) se pueden observar los resultados obtenidos en cuanto a las síntesis de nanopartículas. Se lograron

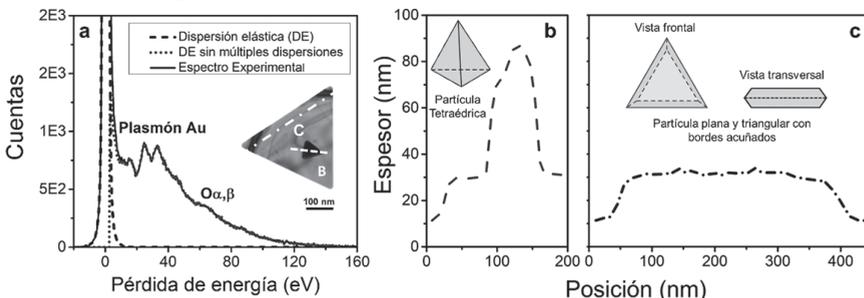
sintetizar exitosamente barras (figura 2), decaedros (figuras 4a-f) y partículas tipo plato con morfologías triangulares y hexagonales (figuras 1a y 4 a-b). Las muestras fueron analizadas mediante distintas técnicas en el TEM, las micrografías y espectros que se muestran en esta sección se seleccionaron para resaltar propiedades particulares de cada una de las técnicas de TEM empleadas.

### Imagen y espectroscopía de pérdida de energía (EELS)

En la figura 1a, se observa el espectro EELS representativo para la partícula triangular insertada en la gráfica de la figura 1a, en el rango correspondiente a bajas pérdidas de energía. En esta micrografía se observan dos partículas con morfología triangular las cuales tienen una diferencia de contraste significativa. Ambas partículas fueron analizadas mediante espectroscopía EELS, los espectros de ambas partículas presentaban el plasmón característico de Au, similares al mostrado en la figura 1a, por lo cual se determinó que ambas poseen la misma composición. Dado que la composición es la misma para ambas partículas, la diferencia significativa de contraste puede ser atribuida únicamente a cambios en el espesor. Aunque este cambio no se observa de forma directa en la micrografía, es claro y evidente en los perfiles observados en la figura 1b-c. Estos perfiles fueron realizados usando espectroscopía EELS y la metodología “log-ratio” disponible en el *software* DM<sup>®</sup>. Las trazas (B y C) se indican en la micrografía de la figura 1a y estas corresponden a los perfiles mostrados en la figura 1 (b y c), respectivamente. En estas trazas puede observarse claramente el perfil de cada una de las partículas, relacionándose con el contraste observado. Mediante este perfil se logró inferir la morfología tridimensional de las partículas, mostrada esquemáticamente en los perfiles mostrados: para (b) una partícula tetraédrica y para (c) un plato plano con bordes acunados.

De esta manera, se puede complementar el uso de una técnica de análisis espectroscópico como EELS, con el uso de una técnica de imagen TEM BF

**Figura 1.** En esta figura se puede apreciar un análisis químico y de morfología realizado para las partículas mostradas en el espectro (a) usando espectroscopía EELS en la zona de bajas pérdidas. En el espectro (a) pueden apreciarse los tres picos característicos del plasmón de Au, así como la banda característica de la capa  $O_{\alpha, \beta}$ . Los perfiles de espesor mostrados en (b) y (c) permitieron establecer diferencias morfológicas entre las partículas.

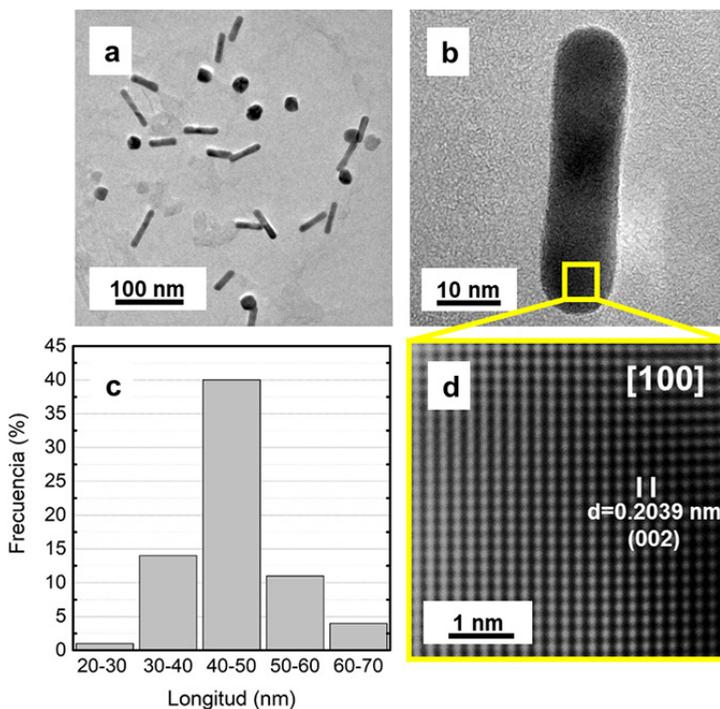


Fuente: Elaboración de los autores.

para el estudio de la morfología tridimensional de partículas que, analizadas a simple vista, lucen de forma similar.

En la figura 2, se observa otro ejemplo de caracterización típico para el estudio de nanopartículas en campo claro (BF). En la micrografía mostrada en (a) se observa la síntesis de nanobastones en una micrografía BF TEM a bajas magnificaciones. Este tipo de imagen es útil para realizar conteos estadísticos de partículas, tal y como se muestra en el histograma de frecuencias mostrado en la figura 2c. En el acercamiento mostrado en la micrografía (b) se puede observar un ejemplo de contraste por espesor, la barra mostrada, tiene contraste uniforme, dicha propiedad puede ser relacionada con su espesor que, en consecuencia, debe ser constante. Si el perfil del plato no tuviese estas características observaríamos “líneas de extinción”, las cuales son ejemplificadas en la figura 3e y 3f, para partículas decaedrales con perfil tipo acunado.

**Figura 2.** En (a) se observa la dispersión en tamaño y forma de la síntesis obtenida para la preparación de nanobastón. En (b) puede observarse la morfología típica de un nanobastón, el contraste uniforme en la micrografía es un indicativo de un espesor uniforme. En el histograma mostrado en (c) se muestra que la longitud típica de las barras es de 40-50 nm en el 40% de las partículas medidas; finalmente, se muestra un acercamiento a la partícula (d) en el cual es posible observar una imagen en alta resolución, los planos observados en esta imagen pueden relacionarse con los planos {002} de Au con distancia interplanar  $d=0.2039$  nm.



Fuente: Elaboración de los autores.

Como se comentó en el párrafo anterior, la figura 3 ejemplifica resultados típicos obtenidos para partículas decaedrales, usando dos técnicas distintas: STEM (microscopía electrónica de transmisión en barrido) y TEM BF/DF.

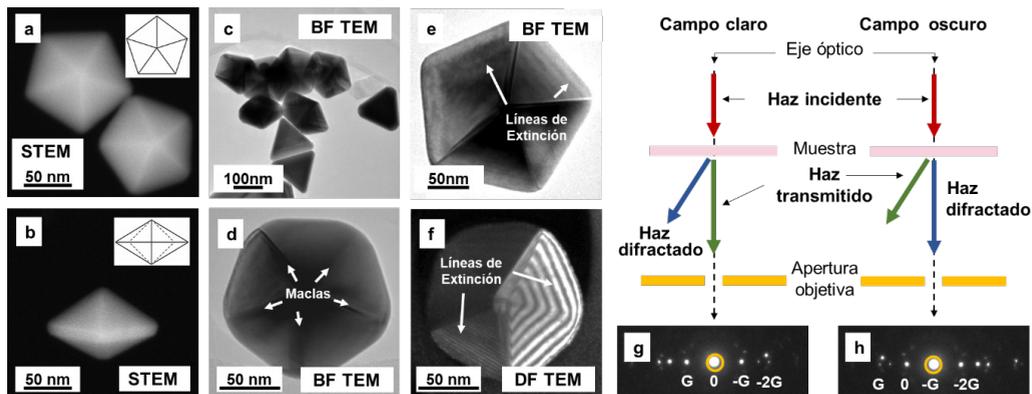
Las imágenes STEM-HAADF (figura 3 a y b) minimizan el contraste por espesor y difracción, maximizando el contraste por masa, siendo conocida también como técnica de contraste-Z, cuyo nombre hace referencia a la sensibilidad de la técnica ante el número atómico de los elementos analizados. Operacionalmente, esta técnica se caracteriza porque emplea haz convergente, además de sonda muy pequeña conocida como “nanoprobe”, la cual barre la muestra para formar una imagen que es detectada por un detector anular. El contraste de este tipo de imágenes se caracteriza por tener un fondo oscuro con muestras contrastadas en tonos de gris, cuya intensidad depende del número atómico. En la figura 3, se pueden apreciar las claras diferencias entre STEM HAADF (a, b) y TEM BF (c-d) para el mismo tipo de partícula. Aunque en el presente escrito únicamente se ilustra la técnica de STEM HAADF, STEM es utilizado ampliamente en otros modos de operación tanto en campo claro como aplicando adquisición tomográfica.

En las imágenes de la figura 3 a y b, puede apreciarse claramente la morfología de las partículas, tanto en vista frontal como en vista transversal, esta forma se muestra también esquemáticamente insertada en las micrografías (a y b). Como puede observarse, las partículas en vista transversal muestran un perfil acuñado, el cual no puede ser inferido directamente en la vista frontal de las imágenes STEM. No obstante, en BF (figura 3e) puede observarse claramente la presencia de “líneas de extinción”, estas se muestran paralelas al borde exterior de cada uno de los tetraedros que forman la partícula decaedral, tanto en campo claro como oscuro, este tipo de contraste es característico de muestras con espesor no uniforme, su observación y análisis resulta útil para describir la morfología tridimensional de una partícula, además, otro tipo de defectos, conocidos como maclas (figura 3d) se aprecian claramente en este tipo de imagen.

En la figura 3, se compara un par de imágenes en BF (d) y DF (f), respectivamente. Ambas técnicas se realizan usando iluminación paralela convencional, como se muestra en el diagrama de rayos de la figura 3, siendo la diferencia principal entre estas técnicas, la alineación de los haces transmitidos o difractados con respecto al eje óptico de microscopio. Pues, para campo claro, se alinea el haz transmitido con el eje óptico del microscopio y se filtran las demás reflexiones mediante el uso de una apertura objetiva, obteniendo imágenes de fondo blanco con contraste en negro.

Mientras que para campo oscuro se alinea el eje óptico del microscopio con alguno de los haces transmitidos, generando una imagen de fondo negro con contraste en blanco. Una imagen en campo oscuro convencional (figura 3f) puede diferenciarse de una imagen de STEM (que también es campo oscuro) (figura 3a-b), gracias al contraste de difracción el cual se encuentra di-

**Figura 3.** En esta figura se analiza la morfología típica de partículas decaedrales usando HAADF (a y b) las partículas mostradas en (a) exhiben el mismo contraste debido a que tienen la misma composición. El contraste mostrado en las imágenes en campo claro (BF) puede relacionarse con la morfología y estructura cristalina. En (e) se observan líneas de espesor características de perfiles acunados. En campo claro y en campo oscuro pueden observarse claramente la presencia de planos maclados. Los cuales se forman por cinco cristales tetraédricos maclados y presentan el perfil acunado que se muestra en la figura (b). En (c) se observa una imagen en campo claro en donde pueden observarse varias partículas decaedrales y triangulares. A la derecha se observan diagramas de rayos simplificados que ejemplifican la adquisición de imágenes en campo claro y campo oscuro convencional.



Fuente: Elaboración de los autores.

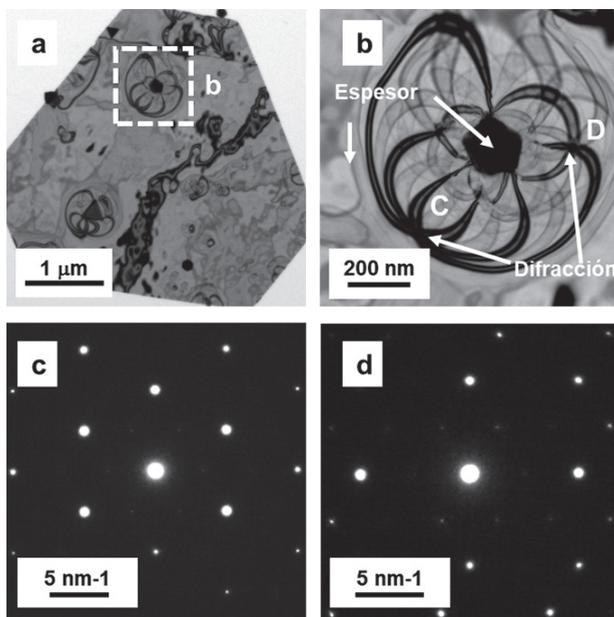
rectamente relacionado con los haces observados en patrón, lo que permite relacionar las imágenes DF con la estructura de un material.

La relación entre la simetría observada en un patrón de difracción y el contraste en BF puede ser apreciado también de forma clara en el ejemplo mostrado en la figura 4. En esta se muestra un plato de Au de espesor nanométrico (se puede saber que el plato es muy delgado debido a que luce “transparente” al haz de electrones) con morfología hexagonal, este plato delgado tiene una partícula decaedral (mucho más gruesa) que provoca que la partícula se doble, produciendo los contornos de doblado observados en la figura 4b, los contornos de doblado tienen su origen en la difracción de Bragg, debido a esta, la presencia de estos contornos, en ciertas condiciones de inclinación, mantienen una relación directa con los haces observados en difracción. En la práctica, este tipo de contraste puede ser diferenciado fácilmente pues aparece, desaparece o cambia si se reorienta la muestra.

Además de producir un contraste muy interesante, los contornos de doblado guardan relaciones simétricas que coinciden con los haces observados en difracción. Por ejemplo, en la figura 4b, se seleccionó el cruce de las seis bandas de doblado señalado con la letra (C) usando la apertura de “Área Selecta”, obteniendo el patrón de difracción (c) en el cual se observan seis haces difractados con un ángulo de 60 grados entre cada reflexión. De forma similar, al seleccionar el cruce generado por las bandas de doblado indicadas

con la letra (D) se observa el patrón de difracción (d) en donde se aprecian dos conjuntos de reflexiones principales, separadas a 90 grados. Después de este ejemplo, el lector podrá concluir fácilmente que los contornos de doblado no solo son una linda curiosidad, sino que también resultan muy útiles para orientar muestras en BF y obtener patrones alineados en ejes zonales.

**Figura 4.** En esta figura se observa un plato delgado y transparente al haz de electrones con espesor nanométrico. En (b) se muestra un acercamiento de la partícula decaedral b, esta se encuentra sobre el plato delgado y provoca que este se doble, produciendo “contornos de doblado”. Los patrones de difracción (c y d) fueron adquiridos en los puntos marcados como C y D, respectivamente en (b).



Fuente: Elaboración de los autores.

El contraste por contornos de doblado también puede ser relacionado por sus similitudes con las líneas de Bragg (dinámicas y cinemáticas) presentes en los patrones de difracción de amplio ángulo (LACBED), esta similitud puede ser apreciada en la figuras 7d y 8d, en donde se presentan algunos patrones de difracción adquiridos usando esta técnica.

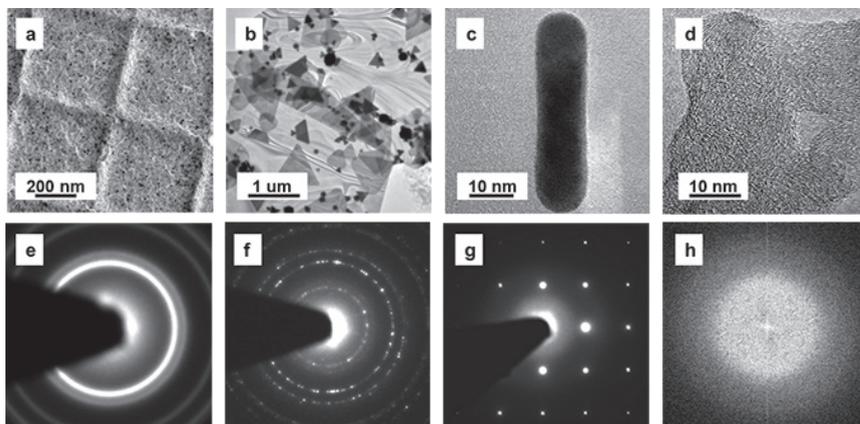
## Difracción de electrones aplicada al estudio de muestras nanométricas

A continuación, se introducirán de forma breve las diferencias primordiales entre las principales técnicas de difracción empleados en TEM.

## Análisis de patrones SAED (difracción de electrones de área selecta)

SAED es la técnica más difundida y una de las más usadas, al permitir obtener calibraciones o identificar el carácter cristalino o amorfo de una muestra. Algunos ejemplos de los patrones típicos que se pueden obtener usando SAED se muestran en la figura 5.

**Figura 5.** En esta figura se observan distintos tipos de muestras, así como el tipo de patrón de difracción característico que se podría obtener para cada una de estas. (a) Muestra policristalina de calibración y su correspondiente patrón de anillos (e). En (b) se observa la difracción de policristales “no infinitos” como un patrón de anillos discontinuos (f). Cuando se selecciona un solo cristal (c) se puede obtener difracción de monocristal (g). Cuando se observa un material amorfo no se observan puntos intensos, sino que se observa un continuo en espacio recíproco, (la figura (h) es una transformada de Fourier de la imagen (d), equivalente al patrón de difracción).



Fuente: Elaboración de los autores.

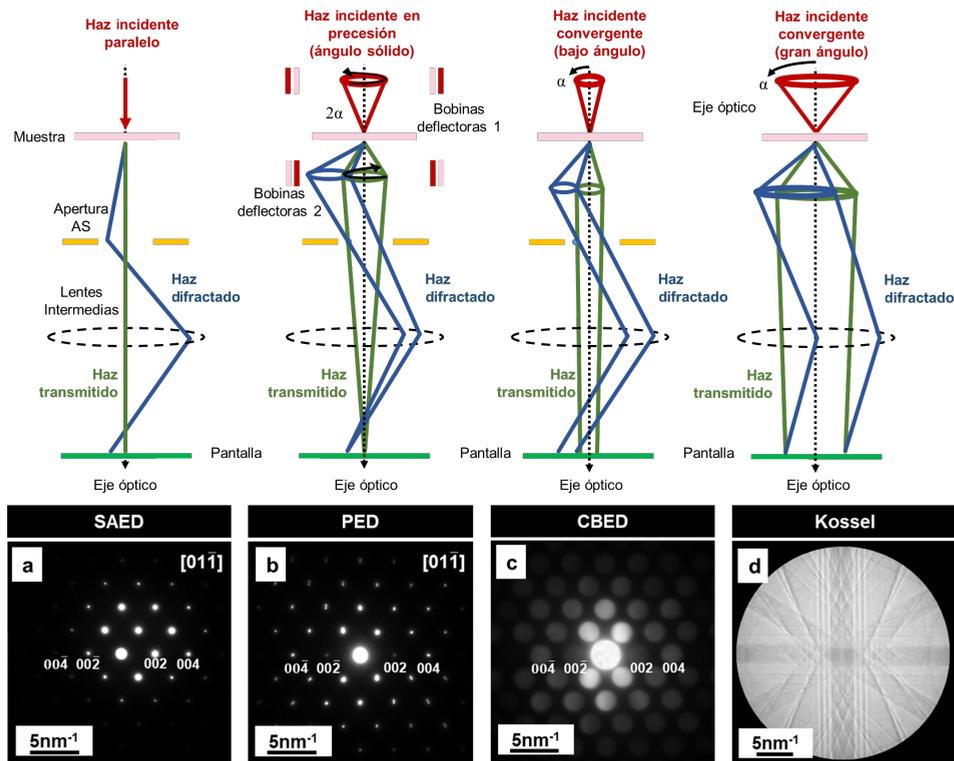
En la figura 5a, se observa una muestra policristalina cuyo patrón de difracción característico se presenta en la figura 5e, exhibiendo círculos concéntricos en donde cada círculo corresponde a una familia de planos de los cristales en cuestión. Cuando el número de cristales no es “infinito” como en el caso de la figura 5a, el patrón de difracción no muestra anillos continuos sino discontinuos (figuras 5b y 5f). Si nos es posible obtener difracción de monocristal, como en el caso de la figura 5c, entonces el patrón de difracción es de una sola “familia” de puntos, como se ve en la figura 5g. Y, por último, si la muestra es amorfa, entonces no hay ni puntos ni anillos, tal como se observa en la figura 5h.

Para la forma técnica en la obtención de un patrón SAED es preciso iluminar la muestra con un haz de electrones colimado de forma paralela al eje óptico del microscopio (figura 6a). El área a analizar se selecciona por medio de una apertura llamada de “área selecta”, la cual se localiza en un plano ópticamente equivalente al plano sobre la muestra, finalmente el patrón se visualiza en la pantalla fluorescente al realizar ajustes en las lentes intermedias.

A pesar de la belleza de los patrones adquiridos con SAED, su utilidad técnica ha quedado relegada al ser esta técnica muy sensible a efectos dinámicos de “doble difracción”, lo cual produce que haya puntos falsos (que no deberían existir) en el patrón de difracción (también llamados “reflexiones prohibidas”). Es por eso que se considera al SAED como una técnica no adecuada para ser relacionada con la estructura cristalina (a través del factor de estructura).

Para ejemplificar este caso, se obtuvo un patrón de difracción SAED en Si (figura 6a); como es sabido, este material tiene grupo espacial 227 con condiciones de reflexión  $h00: h = 4n$ . De acuerdo con estas características, la primera reflexión observable en el patrón mostrado en la figura 6a, debería ser la  $\{004\}$ , sin embargo, se observa que las “reflexiones prohibidas” por grupo espacial  $\{002\}$  (que no deberían percibirse) están fuertemente excitadas, debido a efectos dinámicos. Además, puede advertirse que el patrón luce ligeramente desalineado.

**Figura 6.** En esta figura se ejemplifican (usando diagramas de rayos simplificados) las diferencias en el haz incidente que permiten la obtención de distintos patrones de difracción. (a) Patrón SAED; (b) Patrón PED; (c) CBED, y, (d) Patrones de Kossel.



Fuente: Elaboración de los autores.

### Ventajas del uso de PED (difracción de electrones en precesión)

En esta técnica se hace incidir un haz de electrones con cierta inclinación (menor a 5 grados) y de manera cíclica (precesión). Esto se logra modificando las tarjetas electrónicas que controlan la iluminación, a través de dispositivos externos, para nuestro caso se empleó una unidad SpinnigStar P-20. Con este procedimiento se logran minimizar los efectos de difracción dinámica observados en el método SAED. La diferencia principal entre un patrón PED y uno SAED, es que los primeros tienen intensidades adecuadas para ser utilizados en la determinación de estructuras, siendo comparable a la intensidad medida en la difracción de rayos X convencional. Otra ventaja adicional es que los patrones “lucen” perfectamente alineados, aunque la orientación no sea tan precisa, este detalle puede observarse comparando los patrones a y b de la figura 6, los cuales fueron adquiridos en las mismas condiciones de orientación. También se observa que en el patrón de difracción PED de la figura 6b se disminuye la intensidad de los puntos “prohibidos”, cumpliendo con las condiciones de reflexión esperadas para este tipo de cristal.

### El uso de técnicas CBED (difracción de electrones con haz convergente)

En este caso la iluminación del haz de electrones no es paralela (como en el caso de SAED), sino que es convergente (como se ilustra en la figura 6c). Debido a la convergencia del haz, los “puntos” de difracción no se ven pequeños como en el caso de SAED, sino que lucen como discos. El diámetro de los discos cambia de forma proporcional al ángulo de convergencia de haz. Las técnicas de haz convergente se dividen en técnicas de bajo ángulo, en donde los discos no se superponen y de amplio ángulo, en donde los discos difractados crecen tanto que se superponen con el haz transmitido.

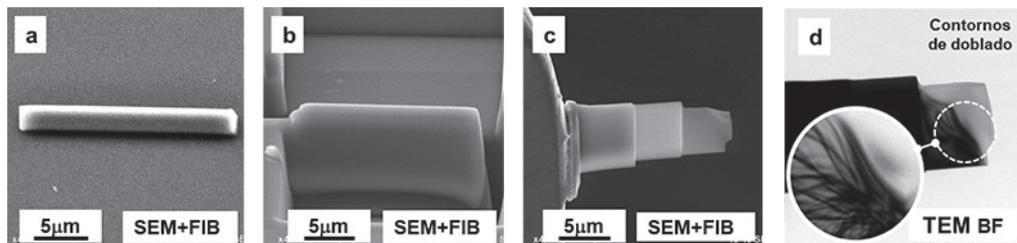
Usando iluminación convergente también es posible disminuir los efectos dinámicos de la difracción de electrones (similar al modo PED), por lo que las reflexiones prohibidas reducen su intensidad. Los cambios en intensidad entre reflexiones hacen de la técnica CBED una herramienta mucho más útil en comparación a la técnica SAED convencional. Sin embargo, la principal limitación de las técnicas de haz convergente es que se precisan muestras lo suficientemente grandes y gruesas.

### Preparación de muestras por FIB (haz de iones enfocados)

La preparación de lamelas empleadas para las diversas técnicas con haz convergente se ilustra a continuación. La figura 7 (a-d) muestra el proceso de preparación de muestras delgadas (lamelas) preparadas utilizando iones, en un microscopio especial llamado microscopio de iones enfocados o FIB (por sus siglas en inglés). La figura 7a muestra la superficie de silicio con una protección de platino de manera horizontal. En la parte superior y posterior de la protección se hacen “trincheras” utilizando iones de Ga (figura 7b), finalmente, dicha lamela se corta de la placa de silicio utilizando el mismo cañón de iones. Dicha lamela se monta en una rejilla especial utilizando un nano

manipulador (figura 7c) y se pule y adelgaza con el cañón de iones de Ga, hasta hacerla transparente a los electrones, como puede verse en la imagen de TEM de la figura 7d.

**Figura 7.** En esta figura se ejemplifica el proceso de preparación de lamelas. Las micrografías (a-c) fueron obtenidas en SEM; (a) muestra el sustrato de Si con Pt; (b) muestra el corte de la lamela, y, (c) La lamela terminada después del desbaste iónico. El borde de la lamela es tan delgado que se dobla. Este detalle se ve claramente en transmisión, pues esta técnica es sensible al contraste de difracción el cual claramente se aprecia en (d) como contornos de doblado.



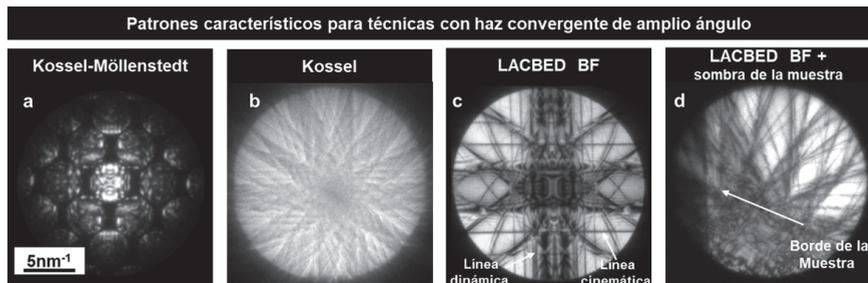
Fuente: Elaboración de los autores.

### Difracción LACBED (difracción de electrones con haz convergente de amplio ángulo)

Usando las técnicas de haz convergente es posible ver información cristalina en cada uno de los círculos observados en el patrón (siempre y cuando la muestra sea lo suficientemente gruesa). Los círculos de difracción observados contienen información referente a la estructura, este fenómeno es conocido como “contraste dinámico” y puede ser observado en el patrón mostrado en la figura 8a. Si un patrón en haz convergente muestra círculos que no se superponen se le conoce como patrón de Kossel-Möllenstedt (figura 8a); no obstante, si el ángulo de convergencia de haz aumenta, los círculos comenzarán a superponerse, si un patrón llega al punto tal en el que todos los círculos se superponen completamente, se conocerá como patrones de Kossel (figuras 6d y 8b). En este tipo de patrones se presenta toda la información difractada en un solo disco; aun así, de esta manera es imposible su análisis. Para obtener información útil es preciso, seleccionar únicamente un disco de interés mediante el uso de aperturas, si se selecciona el haz transmitido se obtiene un patrón LACBED BF (en campo claro) como se muestra en las figuras 8a y 8d, por el contrario, si se selecciona alguno de los haces transmitidos se obtiene, un patrón LACBED DF (en campo oscuro).

Debido a que el método de obtención de patrones de amplio ángulo de convergencia (LACBED) es complejo no se discute a profundidad. Sin embargo, sí se resaltan algunas de las maravillas de esta técnica. En la figura 8c, se muestra el haz transmitido filtrado para el patrón de Kossel observado en la figura 6d, en este patrón se observa intenso contraste de “líneas de Bragg”, las cuales pueden originarse por eventos de difracción dinámica y cinemá-

**Figura 8.** En los patrones de difracción (a-d) se muestran varios patrones de difracción con haz convergente. (a) patrón de discos separados (K-M); (b) patrón de discos completamente sobrepuestos o patrón de Kossel; (c) patrón LACBED en campo claro; (d) patrón LACBED, en este último patrón puede observarse de forma simultánea el patrón de difracción y la “sombra de muestra” (lamela mostrada en figura 7d).



Fuente: Elaboración de los autores.

tica. Estas líneas son particularmente útiles para la caracterización de defectos cristalinos, además, LACBED es la única técnica de difracción que puede mostrar (en ciertas condiciones de foco) la muestra y el patrón de difracción simultáneamente, como se observa en la figura 8d, dicho patrón fue adquirido de la lámina mostrada en la figura 7d, el borde de la lamela puede observarse de manera simultánea al patrón LACBED en BF.

Tal y como se ilustró a lo largo de este artículo, el microscopio electrónico de transmisión (TEM), provee de un variado grupo de “herramientas” para el estudio de la materia a nivel nanométrico. Con estas herramientas podemos estudiar la morfología de los materiales en 3D (aunque la información de la tercera dimensión la conozcamos de manera indirecta), la química de los materiales (a nivel cualitativo y también cuantitativo), así como la información cristalográfica en cuanto al arreglo de los átomos dentro de las muestras.

## Conclusiones

Se mostró esquemáticamente y mediante el uso de micrografías didácticas la versatilidad del uso de la microscopía electrónica de transmisión para el estudio de nanopartículas y muestras con espesor nanométrico. Se resaltaron los alcances de esta técnica para el estudio de la composición química y la morfología. En la parte estructural se ejemplificaron las diferencias que pueden ser observadas en materiales, policristalinos, monocristalinos y amorfos por difracción de electrones, además de que se mostró como puede identificarse la presencia de ausencias sistemáticas por medio de distintas técnicas de difracción.

Se mostraron esquemáticamente las principales diferencias en la implementación de las técnicas de difracción, SAED, PED, CBED Y LACBED, además, se presentaron ejemplos del contraste característico esperado para cada una de estas técnicas

## Referencias

- Avilov, A. *et al.* (2007). Precession technique and electron diffractometry as new tools for crystal structure analysis and chemical bonding determination. *Ultramicroscopy*, 107: 431-444. <https://doi.org/10.1016/j.ultramic.2006.09.006>
- Barmparis, G. D., *et al.* (2015). I. N. Nanoparticle shapes by using Wulff constructions and first-principles calculations. *Beilstein J. Nanotechnol.* 6: 361-368.
- Daniel, M.-C. *et al.* (2004). Gold nanoparticles: Assembly, supramolecular chemistry, quantum-size-related properties, and applications toward biology, catalysis, and nanotechnology. *Chem. Rev.* 104: 293-346. <https://doi.org/10.1021/cr030698+>
- Das, M., *et al.* (2011). Review on gold nanoparticles and their applications. *Toxicol. Environ. Health Sci.* 3: 193-205. <https://doi.org/10.1007/s13530-011-0109-y>
- Egerton, R.F. (1986). *Electron energy-loss spectroscopy in the electron microscope.* Springer Science+Business Media.
- Eustis, S. y El-Sayed, M. (2006). Why gold nanoparticles are more precious than pretty gold: noble metal surface plasmon resonance and its enhancement of the radiative and nonradiative properties of nanocrystals of different shapes. *Chem. Soc. Rev.* 35: 209-217. <https://doi.org/10.1039/B514191E>
- Kan, C. *et al.* (2010). Synthesis of high-yield gold nanoplates: Fast growth assistant with binary surfactants. *J. Nanomater.* 2010: 1-9. <https://doi.org/10.1155/2010/969030>
- Major, T. A. *et al.* (2013). Optical and dynamical properties of chemically synthesized gold nanoplates. *J. Phys. Chem. C* 117: 1447-1452. <https://doi.org/10.1021/jp311470t>
- Midgley, P. A. y Eggeman, A. S. (2015). Precession electron diffraction – a topical review. *IUCrJ*, 2: 126-136. <https://doi.org/10.1107/S2052252514022283>
- Millstone, J. E., *et al.* (2008). A. Iodide ions control seed-mediated growth of anisotropic gold nanoparticles. *Nano Lett.*, 8: 2526-2529. <https://doi.org/10.1021/nl8016253>
- Morin, S. A. *et al.* (2011). Screw dislocation-driven growth of two-dimensional nanoplates. *Nano Lett.* 11: 4449-4455. <https://doi.org/10.1021/nl202689m>
- Morniroli, J. P. (2003). CBED and LACBED analysis of stacking faults and antiphase boundaries. *Mater. Chem. Phys.*, 81: 209-213.
- Morniroli, J. P. (2006). CBED and LACBED characterization of crystal defects. *J. Microsc.* 223: 240-245. [10.1016/S0254-0584\(02\)00564-3](https://doi.org/10.1016/S0254-0584(02)00564-3). <https://doi.org/10.1111/j.1365-2818.2006.01630.x>
- Nikoobakht, B. y El-Sayed, M. A. (2003). Preparation and growth mechanism of gold nanorods (NRs) using seed-mediated growth method. *Chem. Mater.*, 15: 1957-1962. <https://doi.org/10.1021/cm020732l>
- R. Vincent. P. A. Midgley. (1994). Double conical beam-rocking system for measurement of integrated electron diffraction intensities. *Ultramicroscopy*, 53: 271-282. [https://doi.org/10.1016/0304-3991\(94\)90039-6](https://doi.org/10.1016/0304-3991(94)90039-6)
- Sánchez-Iglesias, A. (2006). *et al.* Synthesis and optical properties of gold nanodeca-

- hedra with size control. *Adv. Mater.*, 18: 2529-2534. <https://doi.org/10.1002/adma.200600475>
- Tanaka, M., *et al.* (1980). LACBED. *J. Electron Microsc.*, 29: 408-412.
- Tomar, A. *et al.* (2013). Short review on application of gold nanoparticles. *Glob. J. Pharmacol.* 7, 34–38. <https://doi.org/10.5829/idosi.gjp.2013.7.1.66173>
- Vigderman, L. *et al.* (2012). Functional gold nanorods: Synthesis, self-assembly, and sensing applications. *Adv. Mater.*, 24: 4811-4841. <https://doi.org/10.1002/adma.201201690>
- Yao, Q. *et al.* (2017). Understanding seed-mediated growth of gold nanoclusters at molecular level. *Nat. Commun.*, 8: 1-10. <https://doi.org/10.1038/s41467-017-00970-1>
- Zhang, J., *et al.* (2005). Surface enhanced Raman scattering effects of silver colloids with different shapes. *J. Phys. Chem. B*, 109: 12544-12548. <https://doi.org/10.1021/jp050471d>
- Zhou, S., *et al.* (2012). Highly active NiCo alloy hexagonal nanoplates with crystal plane selective dehydrogenation and visible-light photocatalysis. *J. Mater. Chem.*, 22: 16858-16864. <https://doi.org/10.1039/C2JM32397D>
- Zou, X., Hovmöller, S. y Oleynikov, P. (2012). *Electron crystallography: electron microscopy and electron diffraction*. Oxford: Oxford University Press.

# Breve reseña histórica de la microscopía electrónica en México y el mundo\*

## Brief history of electron microscopy in Mexico and the world

José Reyes Gasga\*\*

**ABSTRACT:** The contribution of the electron microscope to nanosciences has been exceptional since it is the type of equipment that allows the study and analysis of nanometric materials. A brief historical review of the discovery and evolution of the transmission electron microscope (TEM) and scanning electron microscope (SEM) and the installation in Mexico of these electron microscopes is presented. The writing is in such a way that the text and illustrations complement each other.

**KEYWORDS:** electron microscopy, transmission electron microscopy, scanning electron microscopy, electron microscopy in Mexico.

**RESUMEN:** La contribución del microscopio electrónico a las nanociencias ha sido excepcional por ser el equipo que permite estudiar y analizar materiales nanométricos. En este trabajo se presenta una breve reseña histórica sobre el descubrimiento y evolución del microscopio electrónico de transmisión (TEM, por sus siglas en inglés) y el electrónico de barrido (SEM, por sus siglas en inglés), así como la instalación de estos microscopios electrónicos en México. El escrito se presenta de tal manera que el texto y las ilustraciones se complementen.

**PALABRAS CLAVE:** microscopía electrónica, microscopio electrónico de transmisión, microscopio electrónico de barrido, reseña histórica, microscopía electrónica en México.

## Introducción

Un concepto importante en el campo de la microscopía es la resolución, la cual se define como la distancia más pequeña que es posible observar con un instrumento óptico, y depende de varios factores como, la longitud de onda de la fuente de iluminación y los defectos de las lentes. Entre estos están las aberraciones esféricas, cromáticas y astigmatismo. A medida que se reducen la longitud de onda y los defectos de las lentes la resolución se mejora. Actualmente, la resolución del microscopio electrónico de barrido (SEM, por

---

Recibido: 4 de noviembre de 2019.

Aceptado: 8 de mayo de 2020.

\* Algunas de las ilustraciones presentadas son del dominio público y fueron tomadas de [www.google.com.mx/search](http://www.google.com.mx/search)

\*\* Universidad Nacional Autónoma de México, Instituto de Física. Circuito de la Investigación s/n, Ciudad Universitaria, 04510 Coyoacán, Ciudad de México, México.  
Correo electrónico: [jreyes@fisica.unam.mx](mailto:jreyes@fisica.unam.mx)



**Figura 2.** Ernst Abbe, padre de la microscopía de luz moderna. En 1897 Abbe comentó que "la microscopía de luz ha alcanzado el límite de resolución".



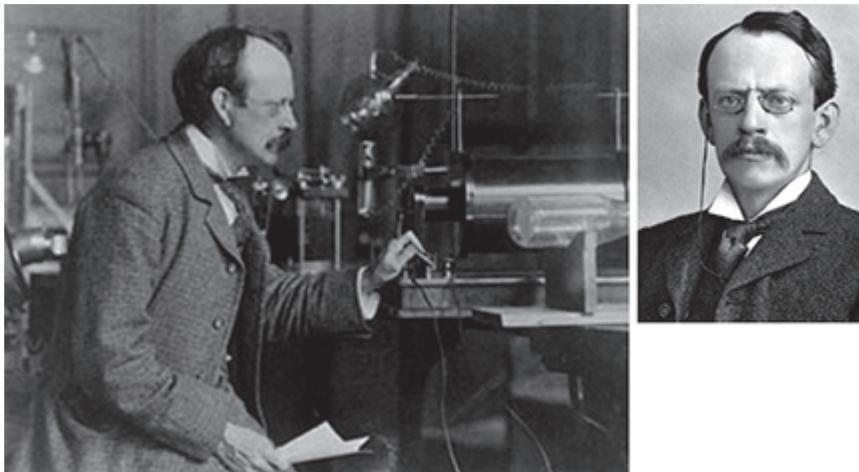
Fuente: [www.google.com.mx/search](http://www.google.com.mx/search)

microscopio de luz (unas décimas de micra). Obtener imágenes por debajo de 200 nm de resolución solo sería posible en un microscopio que usara una iluminación con longitudes de onda más pequeñas que las de la luz (Brenton, 2004; Nixon, 1998).

En 1895, Wilhelm Conrad Röntgen descubre los rayos X y se inicia una vorágine de experimentos con el objetivo de determinar su origen y naturaleza. De esta manera, Joseph John Thomson descubrió los electrones (del griego *elektron*: ámbar) en 1897, al realizar estudios con tubos de rayos catódicos (figura 3). Los electrones son partículas cargadas negativamente (con carga de  $-1.6 \times 10^{-19}$  C y masa de  $9.1 \times 10^{-31}$  Kg) las cuales giran alrededor del núcleo, y son estas partículas las que tendrían un papel decisivo en el

desarrollo de un nuevo tipo de microscopios. En un principio solo se observaron sus manifestaciones corpusculares puesto que en ese momento no existía en el campo de la física la idea de que las partículas pudieran presentar un comportamiento ondulatorio. A principios de siglo XX, se desarrolla la mecánica cuántica cuando Max Planck descubre que la radiación electromagnética es emitida en paquetes de energía y Albert Einstein indica que la luz visible está constituida de cuantos de energía llamados fotones.

**Figura 3.** En 1897, el físico inglés Joseph John Thompson descubre el electrón.



Fuente: [www.google.com.mx/search](http://www.google.com.mx/search)

En 1924, Luis de Broglie (figura 4) sacude los cimientos de la física de su época al enunciar el carácter ondulatorio de los electrones y asignarles longitudes de ondas de acuerdo con la velocidad que presentan (por ejemplo, en un microscopio electrónico de 100 kV, la longitud de onda de los electrones es de 0.0037 nm). Este planteamiento teórico, que luego fue confirmado experimentalmente en 1926 por Davisson y Germer, sentó las bases para el desarrollo de la mecánica ondulatoria electrónica.

## Invencción del microscopio electrónico de transmisión

Basado en las ideas de Louis de Broglie, en 1929, Hans Busch indica que es posible enfocar un haz de electrones con campos electromagnéticos (bobinas) de la misma manera en que las ondas de luz se enfocan mediante las lentes de vidrio. Este aporte fue crucial para la construcción del microscopio electrónico de transmisión (TEM) correspondió a Ernst Ruska y Max Knoll (figura 5), (Brenton, 2004).

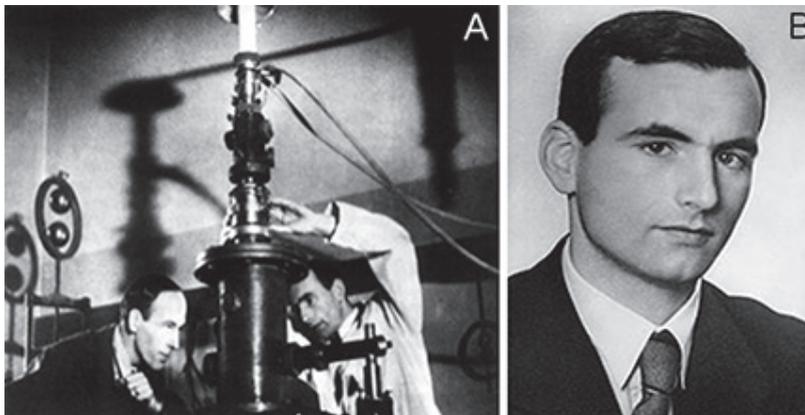
De acuerdo con Louis de Broglie, los electrones en movimiento presentan una longitud de onda más pequeña que la luz y, por lo tanto, podrían ofrecer una resolución mejor que el microscopio de luz. Así, en 1931, Ernst Ruska cons-

**Figura 4.** En 1924, el físico francés Louis de Broglie desarrolla la teoría ondulatoria del electrón donde se propone que una partícula se comporta como onda.



Fuente: [www.google.com.mx/search](http://www.google.com.mx/search)

**Figura 5.** A) En 1931, Ernst Ruska (derecha) y Max Knoll construyen el prototipo del TEM. B) Ernst August Friedrich Ruska en 1933.



Fuente: [www.google.com.mx/searchs](http://www.google.com.mx/searchs)

truye un microscopio cuya fuente de iluminación era un conjunto de electrones acelerados (el haz electrónico) bajo la tutoría de Max Knoll (figura 5) y, en 1933, la compañía Siemens presenta el prototipo del TEM de Ruska. En 1938, junto con Bodo von Borries (figura 6), Ruska reporta una resolución de 10 nm la cual rebasa por mucho la resolución del microscopio de luz. Este microscopio contaba con un recipiente tipo “lavabo” como sistema de enfriamiento por agua (Goldstein, 1992). Este diseño permitió generar los primeros microscopios producidos en serie; tenían un voltaje de aceleración de 70 kV y una resolución de 7 nm. Ernst Ruska recibió el Premio Nobel en 1986 por su invención.

En 1940, James Miller de la Radio Corporation of America (RCA) construye un microscopio electrónico bajo la supervisión de Vladimir K. Zworykin e inventaron, además, el cinescopio de la televisión (Nixon, 1998; Toledo, 2005). La compañía inglesa Vickers Metropolitan produjo el prototipo mejorado del TEM llamado EM1, al mismo tiempo, la compañía Phillips presenta en Holanda un microscopio TEM comercial. El primer modelo comercial de la compañía RCA presentó una resolución de 2.5 nm y se instaló en la Universidad de Stanford en diciembre de 1940, durante la segunda guerra mundial.

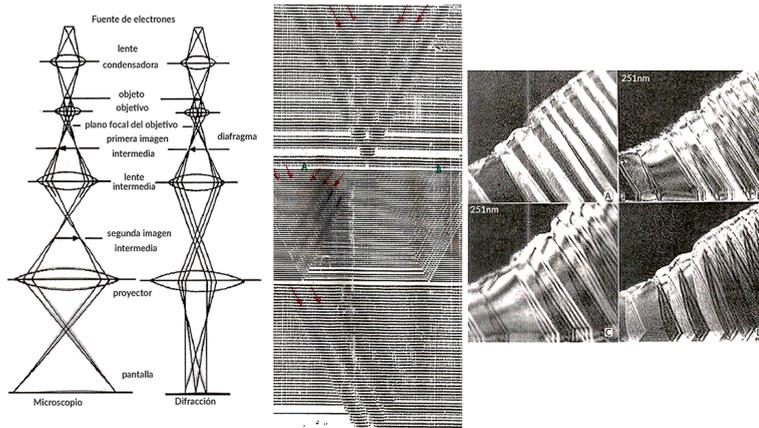
En la Universidad de Toronto, Canadá, también se construye un TEM bajo la supervisión de Eli Franklin Burton, A. Prebus y James Miller. Un instrumento similar es construido en Estados Unidos por Cecil E. Hall. Ladislaus L. Marton construyó un TEM en Bruselas, Bélgica, y obtuvo la imagen de una bacteria (Kimoto, 1985). A pesar del avance tecnológico en el campo de la microscopía electrónica de transmisión, no fue sino hasta la década de los años setenta del siglo XX que Hirsh y colaboradores desarrollaron la teoría de formación de imágenes en el TEM (Hirsch *et al.*, 1977) lo que permitió interpretar correctamente las imágenes de TEM en condición de dos haces (figura 7).

**Figura 6.** A) Bodo von Borries (1905-1956), colaborador de Ruska y Knoll, y fundador de la Federación Internacional de Sociedades de Microscopía Electrónica (IFSEM). B) Fotografía de mayo de 1932 del grupo de trabajo del Dr. Knoll. Ernts Ruska (sentado, de traje) y Bodo von Borries.



Fuente: [www.google.com.mx/searchs](http://www.google.com.mx/searchs)

**Figura 7.** En la década de los años 70 del siglo XX, Hirsch y colaboradores desarrollan la teoría de formación de imágenes en el TEM



Fuente: Hirsch *et al.* (1977), Yacamán y Reyes Gasga (1998).

## Invencción del microscopio electrónico de barrido

Después de la invención del TEM surgió la propuesta de un microscopio electrónico de barrido (SEM) por el propio Knoll en 1935, pero fue necesario esperar más de 30 años para que el primer SEM saliera al mercado debido a problemas tecnológicos, pues era necesario comprender y solucionar los efectos causados por las aberraciones y lograr un sistema de barrido con suficiente rapidez de respuesta (Goldstein, 1992).

En 1938, Manfred von Ardenne (figura 8) introduce un sistema de barrido dentro del diseño de un TEM, lo cual significó la obtención de un nuevo tipo de microscopio: el microscopio electrónico de barrido-transmisión (STEM, por sus siglas en inglés). Un año después, Boersch logra haces electrónicos con lon-

**Figura 8.** En 1938, Manfred von Ardenne y el primer microscopio STEM.



Fuente: [www.google.com.mx/searchs](http://www.google.com.mx/searchs)

gitudes de onda del orden de los 2.5 nm, lo que implicó una mejoría considerable en el diseño del SEM (Scott, 1983).

En plena segunda guerra mundial, en 1942, se produce un salto considerable en el desarrollo del SEM con los trabajos de Vladimir K. Zworykin, Charles William Oatley y colaboradores (figura 9) de donde se obtiene un prototipo del detector de electrones secundarios. Para su obtención se aplicó una carga de recolección de +50V a una caja de Faraday y se acopló a un tubo fotomultiplicador (Scott 1983). A pesar de estos aportes, la resolución del microscopio SEM solo llegó a los 50 nm y a 8,000x de aumento. En 1943, se inicia el desarrollo de la espectroscopía por pérdida de energía (EELS).

En 1944, Manfred von Ardenne logra una resolución de 1.5 nm en el microscopio STEM, pero se presentan importantes problemas de mantenimiento, reparación y, principalmente, de interpretación de las imágenes observadas con el TEM (Hirsch *et al.*, 1977). En 1946, James Hiller obtiene una resolución de 1 nm. En 1947, James Hiller y Edward G. Ramberg desarrollan una lente objetiva con corrección de astigmatismo.

En 1948, bajo la dirección de Charles Williams Oatley, Dennis McMullan (figura 9) desarrolla una fuente estable de alto voltaje para alimentar el filamento de electrones y se introduce en el tubo de rayos catódicos (TRC) como sistema de observación de las imágenes del SEM. Estas nuevas adiciones representaron un importante avance en el desarrollo de la microscopía electrónica (Nixon, 1998).

En 1951, Raimond Castaing inicia el desarrollo de la espectroscopía por rayos X característicos (EDS, por sus siglas en inglés) (Scott, 1983), que al incorporarla al sistema óptico del SEM lo convertía en un instrumento analítico. También, en 1951, James M. Lafferty descubre que los cristales de  $\text{LaB}_6$  emiten una mayor densidad de electrones que los alambres de W, con un área de emisión correspondiente a un solo átomo, pero requieren de un sistema de vacío

**Figura 9.** Charles William Oatley y sus estudiantes en una reunión por su 90 aniversario.



Fuente: [www.google.com.mx/searchs](http://www.google.com.mx/searchs)

que produzca un vacío de  $10^{-7}$  torrs como mínimo (Kimoto, 1985). A la par, Erwin Wilhem Muller y Kanwar Bahadur inventan el microscopio de campo iónico (FIM) y observan posiciones atómicas por primera vez (Breton, 2004).

En 1956, ocurre otro avance importante en la microscopía electrónica cuando K. C. A. Smith introduce el procesamiento no lineal de las señales, el barrido con doble deflexión del haz, la corrección electromagnética del astigmatismo y un sistema eficaz de centrado de las aperturas. Dando continuidad a los trabajos de Dennis McMullan, Thomas E. Everhart y Richard F. M. Thornley desarrollan, en 1960, un detector basado en el empleo de un dispositivo centellador (Breton, 2004).

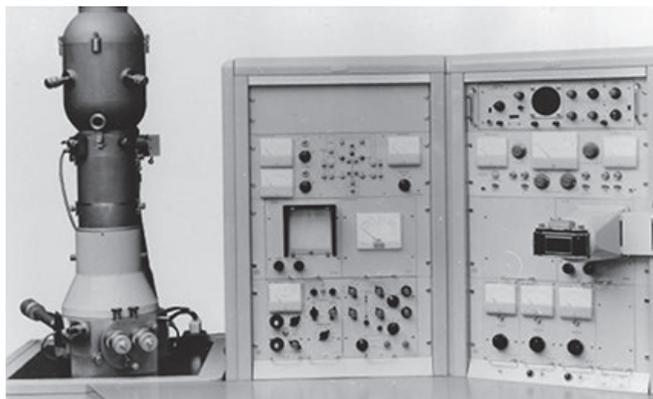
## Comercialización del microscopio electrónico de barrido

En los años sesenta, varios fabricantes de microscopios electrónicos trabajaron en el desarrollo de un SEM que pudiera ser comercializado, claro está. La compañía Cambridge Scientific Instruments fabrica el SEM MARK I STEREOSCAN, equipo que sale al mercado en diciembre de 1965 (figura 10), seguido muy de cerca por JEOL, que comercializa su primer SEM en enero de 1966 (Kimoto, 1985). El SEM “Stereoscan 1” tenía 20 kV de voltaje de aceleración y resolución de 30 nm.

Un aporte importante en el desarrollo de la microscopía electrónica estuvo relacionado con el mejoramiento de los filamentos de emisión de electrones. En 1970, los filamentos de Wolframio (W) dominaban el campo. Sin embargo, en 1969, Alec N. Broers presenta el filamento de  $\text{LaB}_6$ , y casi simultáneamente Albert Victor Crewe y J. Wall realizan mejoras en el uso del filamento de Emisión de Campo.

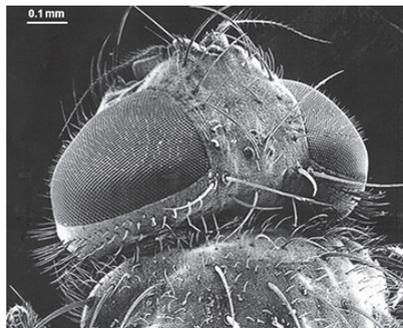
A partir de la década de los setenta del siglo pasado se producen mejoras en las lentes de los microscopios, así como en el desarrollo de diferentes sistemas de

**Figura 10.** El SEM “Stereoscan 1”, fabricado por la compañía Cambridge Instruments en 1964.



Fuente: [www.google.com.mx/searchs](http://www.google.com.mx/searchs)

**Figura 11.** En 1980, el SEM alcanza una resolución de 2 nm.



detección. En 1980, el SEM alcanza una resolución de 2 nm (figura 11). En 1985, la firma Carl Zeiss (que luego pasa a ser la compañía LEO; Stokes, 2012) obtiene un resultado importante al introducir el primer SEM con el barrido controlado de forma digital. Este nuevo componente sería determinante para lograr imágenes (“mapeos”) de rayos X mucho más eficaces y para corregir defectos de imagen por acumulación de cargas en la muestra en estudio (Stokes, 2012).

## La microscopía electrónica actual

En 1980, se presentaron mejoras en los sistemas de vacío del TEM con el uso de bombas turbomoleculares y se obtiene la resolución de 0.2 nm. También se desarrollan nuevas técnicas de análisis tales como la difracción electrónica de haz convergente (CBED, por sus siglas en inglés) y mejoras en el funcionamiento del microscopio STEM. El desarrollo de la técnica de difracción de haz convergente da un importante impulso a la cristalografía electrónica. El uso de filamentos de emisión de campo permite a los microscopios SEM alcanzar resoluciones por debajo de 2 nm y a los microscopios TEM por debajo de 0.1 nm. En 1986, surgen los primeros prototipos de microscopios electrónicos controlados por computadora.

En ese momento se usaron computadoras con un propósito específico y a estos equipos se les llamó de “primera generación”, para diferenciarlos de los que surgieron en el año 1992 llamados de “segunda generación” o “G2”, en los que una computadora personal toma el control de todo el sistema. En 1990, la compañía Jeol presenta el microscopio JEM-1210 (figuras 12 y 13) operado completamente a través de *software* computacional (Cadwell, 1996). Las características técnicas de los actuales

**Figura 12.** Microscopio TEM JEM-1210 de la compañía Jeol operado a través de *software* computacional.



Fuente: [www.jp.caeonline.com/jeol-jem-1210](http://www.jp.caeonline.com/jeol-jem-1210).

**Figura 13.** Los microscopios electrónicos actuales son operados a través del *software* de una computadora.

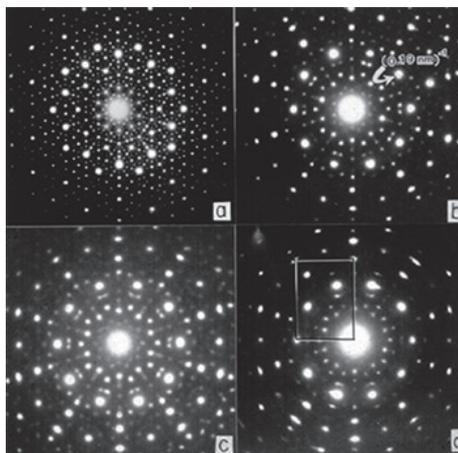


Fuente: [www.es.m.wikipedia.org/wiki/archivoJEOLJSM-6340F](http://www.es.m.wikipedia.org/wiki/archivoJEOLJSM-6340F)

microscopios permiten estudiar *in situ* las transformaciones estructurales de los materiales (figura 14).

De manera paralela, en 1981, Heinrich Rohrer y Gerd Binnig, investigadores de la IBM de Zurich, Alemania, inventan el microscopio de barrido de tunelaje (STM), el cual revela la topografía de la superficie de la muestra a nivel atómico (Scott, 1983). En 1986, Binnig, Quate y Gerber inventan el microscopio de fuerza atómica (AFM). Ellos junto con Ernst Ruska reciben el Premio Nobel el 10 de diciembre de 1986 (figura 15). De

**Figura 14.** Las características técnicas de los actuales microscopios permiten estudiar *in situ* las transformaciones estructurales de los materiales.



Fuente: Yacamán y Reyes-Gasga (1998).

**Figura 15.** El 10 de diciembre de 1986, Ernst Ruska recibe el Premio Nobel por la invención del microscopio electrónico.



Fuente: [www.google.com.mx/searchs](http://www.google.com.mx/searchs)

acuerdo con la Sociedad Nobel, el TEM es “uno de los inventos más importantes del siglo XX”.

A finales de la década de los años ochenta y principios de los noventa del siglo XX, tuvo lugar otro avance importante en la microscopía electrónica de barrido. Hasta ese momento, se había considerado como inevitable que la muestra observada en un microscopio electrónico debía estar al alto vacío, condición que imponían tanto el camino libre de los electrones y la duración del filamento. En este periodo la compañía Philips (luego llamada FEI) desarrolla la opción de diferenciar el vacío del cañón y la columna del microscopio con el vacío de la cámara donde se coloca la muestra. Estos microscopios SEM se conocen como ambientales (Stokes, 2012).

En 1995, Ondrej Krivanek desarrolla el filtro de energía (los prismas electrónicos) los cuales son actualmente usados como monocromadores en el cañón electrónico y como seleccionadores de energía en la espectroscopía por pérdida de energía (EELS). En los últimos años se ha visto el surgimiento de la microscopía remota controlada vía Internet, lo cual facilita el estudio de muestras a distancia (Breton, 1997). También se ha trabajado con éxito en la obtención de equipos “inteligentes” capaces de fijar las condiciones de trabajo con un alto grado de independencia, a partir de algunos datos elementales sobre la muestra (Caldwell, 1996).

En la actualidad, la evolución de la microscopía electrónica no se ha detenido. Aunque han surgido otros microscopios como los de fuerza atómica con resoluciones en el rango atómico, el SEM y el TEM conservan aún un importante sector en los requerimientos de una gran cantidad de ramas del conocimiento humano. En el campo de la microscopía TEM se ha avanzado decididamente en la obtención de la microscopía de aberración corregida

(Lentzen, 2006). En 2010, se desarrollaron los detectores para la dispersión a alto ángulo (contraste Z) por Stephen J. Pennycook y colaboradores y el sistema del STEM alcanzó la resolución de 50 picómetros. No cabe duda de que en el futuro la microscopía electrónica continuará prestando un invaluable servicio a la comunidad científica en los campos de la física, matemáticas, química, biología, arqueología, la medicina, la botánica, la ciencia de materiales y las ciencias forenses, por mencionar algunas.

Datos adicionales sobre la evolución de las técnicas de microscopía para el estudio de materiales y de nanomateriales se pueden consultar en Rivera *et al.* (2019).

## La microscopía electrónica en México

El desarrollo de la microscopía electrónica en México se inicia con la llegada del microscopio de luz en nuestro país, lo cual sucede en 1690, es decir, un siglo después de su invención, cuando Carlos Sigüenza y Góngora trae a México un microscopio tipo Hooke para estudiar un problema de plaga en el maíz (Martínez-Mena, 1988). Sin embargo, no existe reporte alguno sobre este tema salvo una carta familiar donde se hace el comentario. La primera investigación formal realizada y reportada con un microscopio de luz data de 1869 en la revista *La Naturaleza*, volumen I, página 26, con el título *El microscopio y la fotografía aplicados a las ciencias naturales*, y firmado por José Joaquín Arriaga. A principios del siglo XX, Isaac Ochotorena publica 3 trabajos en el área de la histología con el microscopio de luz como herramienta básica. El primer curso de enseñanza formal en microscopía de luz data de los años veinte del siglo XX (Martínez-Mena, 1988). Fue en el área de la botánica y fue dictado por Enrique Beltrán en la Facultad de Altos Estudios (que después sería la Facultad de Filosofía y Letras de la UNAM). Este curso quedó registrado como “Curso libre de microscopía botánica”. En 1941, Enrique Beltrán publica el artículo “El microscopio electrónico y sus posibilidades” en la revista mexicana *Ciencia*.

## La microscopía electrónica de barrido en México

La microscopía electrónica en México se inició en 1946 cuando se fundó el Laboratorio de Microscopía Electrónica en la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas del IPN (Martínez-Mena, 1988; Yacamán y Krakow, 1998). El primer microscopio electrónico en México fue un microscopio SEM de la marca RCA modelo I-MC-1 con 30 kV de aceleración, resolución de 5 nm y con amplificaciones de hasta 5,000x. Con este equipo se estudiaron muestras biológicas y puede decirse que los primeros microscopistas electrónicos fueron Antonio González Ochoa y Gerardo Varela, quienes estudiaron agentes microbiológicos. En 1949, Nicolás Aguilera Herrera (figura 16) presenta la primera tesis de licenciatura realizada en México usando la microscopía electrónica. El maes-

tro Aguilera obtuvo la licenciatura de químico bacteriólogo parasitólogo con la tesis *Estudio de arcillas y suelos de México usando microscopía electrónica*. En este trabajo, el maestro Aguilera y el físico Efrén Fierro utilizan el microscopio SEM para el estudio de arcillas marcando así el inicio de la investigación en microscopía electrónica aplicada a los suelos de México y Latinoamérica. Por esta razón, el maestro Aguilera es considerado como el pionero en la aplicación de la microscopía electrónica al estudio de las arcillas de suelos en México. En 1950, el doctor Jorge González Ramírez, del Instituto de Estudios Médicos y Biológicos del IPN, realiza estudios de tejidos usando un SEM, y es el primer mexicano en llevar a cabo estudios de microscopía electrónica de alto nivel en el área biológica (Martínez-Mena, 1988).

Un segundo microscopio SEM de la marca RCA modelo Universal 2A con 50 kV de aceleración y 2.5 nm de resolución llegó a México en 1951 a la Escuela Nacional de Agricultura para realizar el estudio de la estructura de los suelos mexicanos. En la década de los años sesenta del siglo pasado, la UNAM adquiere varios microscopios electrónicos SEM para las Facultades de Medicina y la de Ciencias y para el Instituto de Física. Se puede decir que los cimientos de la microscopía electrónica en México se establecieron entre 1960 y 1970, principalmente en el área de las ciencias biológicas. Varios hospitales y laboratorios del sector público también adquirieron microscopios SEM (Yacamán y Krakow, 1998).

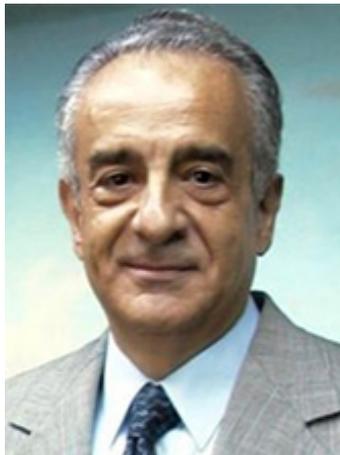
**Figura 16.** Nicolás Aguilera Herrera.



Nota: Nació en Yuriria, Guanajuato, el 21 de octubre de 1920. Realizó estudios en la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas del IPN. Inició su actividad docente en 1949 en la Escuela Nacional de Agricultura, dictando un curso de microscopía. En el Colegio de Postgraduados, realizó investigación sobre los suelos derivados de las cenizas volcánicas de la parte central de México. En 1965, en el Departamento de Biología de la Facultad de Ciencias de la UNAM, produce un número considerable de trabajos en el área de microscopía electrónica de barrido e imparte cursos y conferencias sobre este tema. El Colegio de Postgraduados le otorgó el Doctorado Honoris Causa, unos días antes de su fallecimiento, acaecido el 7 de septiembre de 1996.

Fuente: [www.fciencias.unam.mx/vida-en-ciencias/distinciones](http://www.fciencias.unam.mx/vida-en-ciencias/distinciones).

Figura 17. Adolfo Martínez Palomo.



Nota: Nació en la Ciudad de México en 1941. Es médico cirujano por la Facultad de Medicina de la UNAM. Realizó el doctorado en Ciencias Médicas de la Facultad de Medicina de la UNAM en 1971 y fue jefe del Laboratorio de Microscopía Electrónica del Instituto Nacional de Cardiología de 1968 a 1972. Ha sido miembro de Juntas de Gobierno de la UNAM y de El Colegio de México. Ha participado en la Comisión de Investigación en Salud de la Universidad de Harvard, el Foro Global para la Investigación en Salud (Ginebra), y los comités asesores de investigación en salud de la Organización Mundial de la Salud (Ginebra) y de la Organización Panamericana de la Salud (Washington, EUA). Fue miembro de comités científicos de la Fundación Rockefeller, del Instituto Internacional de Vacunas (Seúl) y del Centro de Prevención y Control de Enfermedades (CDCP, Atlanta), así como presidente del Comité Internacional de Bioética de la UNESCO (París). Es miembro de El Colegio Nacional e investigador emérito del Sistema Nacional de Investigadores y profesor emérito del Cinvestav del IPN, institución de la que fue director general (1995-2002), fundador y jefe del Departamento de Patología Experimental.  
Fuente: [www.google.com.mx/search](http://www.google.com.mx/search)

Uno de los principales impulsores de la microscopía electrónica en México en el área de las ciencias biológicas fue el doctor Adolfo Martínez Palomo (figura 17), quien hizo su tesis profesional con el doctor Issac Costero, creador de la Escuela de Patología de la UNAM (Martínez-Mena 1988). En 1966, Martínez Palomo estudió microscopía electrónica en Francia y en cuya estancia fue pionero en ver las uniones en los contactos entre células tumorales con el microscopio electrónico. Durante varios años de investigación en el Instituto Nacional de Cardiología, estudió el sistema de conducción del corazón con el microscopio electrónico.

## Microscopios electrónicos de transmisión en México

El primer microscopio dedicado a la investigación en el área de ciencia de materiales fue instalado en el Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del IPN bajo la dirección de Juan Luís del Valle (Yacamán y Kravov, 1998). El primer microscopio electrónico de transmisión en la UNAM dedicado al estudio de materiales llegó como donación al Instituto de Física. Este

fue un microscopio electrónico Phillips 100 horizontal modelo 1952. Entre los pioneros de la microscopía electrónica en los estudios de materiales se encuentra el doctor Gabriel Torres Villaseñor (figura 18), quien fungió como coordinador de dicho microscopio.

A mediados de los años setenta del siglo XX, se instala en el Instituto de Física de la UNAM un microscopio electrónico TEM de la marca Jeol modelo 200CX con resolución de 0.3 nm para el grupo encabezado por el doctor Miguel José Yacamán. Casi al mismo tiempo, se instala otro microscopio similar en el Instituto de Investigaciones en Materiales de la UNAM, para el grupo dirigido por el doctor Gabriel Torres Villaseñor. Es precisamente con estos microscopios que la microscopía electrónica TEM en México alcanza niveles de calidad internacional en el área de las ciencias físicas y de materiales. El doctor Yacamán (figura 19) y sus estudiantes, los doctores David Romeu Casajuana, Alfredo Gomez Rodriguez y Pablo Schabes, realizan una serie de trabajos de alto nivel en la interpretación del contraste observado en los microscopios TEM (Yacamán y Reyes-Gasga, 1998). En 1984, el Instituto de Física de la UNAM transfirió este microscopio electrónico Jeol 200CX al Departamento de Nanoestructuras del Centro de Nanociencias y Nanotecnología de la UNAM en Ensenada, Baja California Norte, que en aquel tiempo formaba parte del instituto (figura 20).

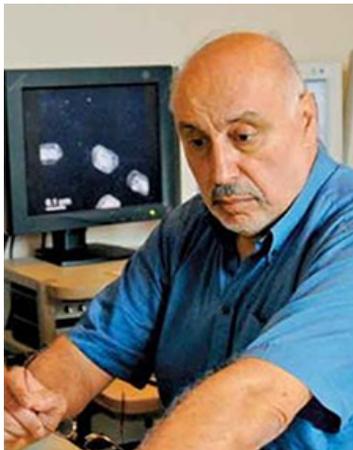
**Figura 18.** Gabriel Torres Villaseñor.



Nota: Nació en la Ciudad de México en 1944. Obtuvo la licenciatura y la maestría en Física en la Facultad de Ciencias de la UNAM y el doctorado en Ciencias de Materiales en Case Western Reserve University, en Cleveland, Ohio, EUA. Fue jefe del Departamento de Metalurgia y Cerámicos del Instituto de Investigaciones en Materiales de la UNAM y miembro del Consejo Universitario, del Consejo Consultivo de Ciencias de la Presidencia de la República y del Editorial Advisory Board of Materials Science Foundations de EUA. Recibió el Premio Nacional de Ciencias y Artes y el premio Manuel Noriega en 1984, otorgado por la Organización de Estados Americanos. Actualmente, es Investigador Emérito de la UNAM en el Instituto de Investigación en Materiales de la UNAM.

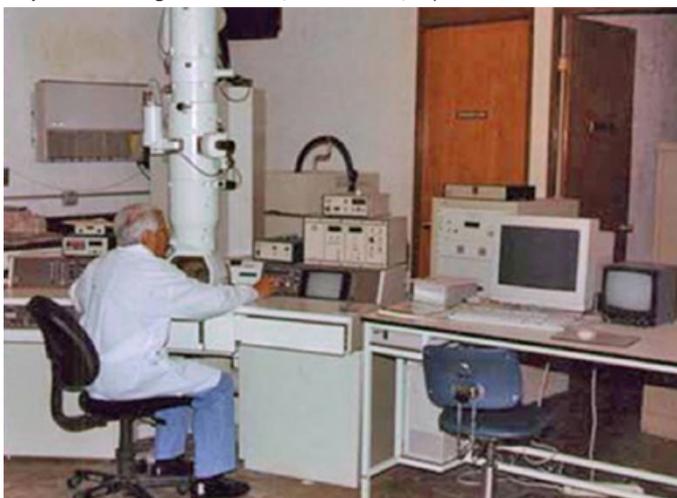
Fuente: Archivo personal del autor.

Figura 19. Miguel José Yacamán.



Nota: Nació en la ciudad de Córdoba, Veracruz, en 1946. Desarrolló su tesis de licenciatura en física con el Dr. Alonso Fernández y obtuvo el doctorado en Física en la Facultad de Ciencias de la UNAM en 1973, realizando su tesis doctoral con el Dr. Eduardo Muñoz Picone, en colaboración con Alan Basset, primero en Cambridge y luego en Warwick. Sus campos de especialidad son la ciencia de materiales, caracterización de materiales por microscopía, difracción de electrones y materiales nanoestructurados. Fue director del Instituto de Física de la UNAM; director adjunto de Investigación Científica del Conacyt; secretario ejecutivo del Sistema Nacional de Investigadores; director general del Instituto Nacional de Investigaciones Nucleares. Profesor de la Universidad de Texas en Austin y en San Antonio. Perteneció al Consejo Consultivo de Ciencias de la Presidencia. Recibió la Beca Guggenheim; el Premio de la Academia de la Investigación Científica; la presea del Estado de México "Antonio Alzate" en Ciencias Exactas; el Premio Nacional de Ciencias y Artes y The Mehl Award and Distinguish Lecturer of The Metals Society TMS de Estados Unidos.  
Fuente: [www.google.com.mx/search](http://www.google.com.mx/search)

Figura 20. Microscopio electrónico Jeol 200CX en el Departamento de Nanoestructuras del Centro de Nanociencias y Nanotecnología de la UNAM, en Ensenada, Baja California Norte.



Fuente: Archivo personal del autor.

**Figura 21.** Microscopio electrónico Jeol 100CX, instalado en el Instituto de Física de la UNAM en 1982.



Fuente: Archivo personal del autor.

En 1982 se instala en el Instituto de Física de la UNAM el microscopio electrónico de transmisión y barrido (STEM) Jeol 100CX (figura 21) de 100 kV de voltaje de aceleración, que cuenta con un detector de rayos X característicos (EDS) y con resolución de 0.25 nm, dedicado a la ciencia de materiales. En 1988 se instala nuevamente en el Instituto de Física de la UNAM el microscopio electrónico de alta resolución Jeol 4000EX (figura 22) con voltaje de aceleración de 400 kV y resolución de 0.17 nm, primero de su tipo que se instala en Latinoamérica.

A inicios de los años noventa del siglo XX, la microscopía TEM en la ciencia de los materiales y en ciencias biológicas alcanza los niveles de alta

**Figura 22.** Microscopio electrónico de alta resolución Jeol 4000EX instalado en el Instituto de Física de la UNAM en 1988.



Fuente: Archivo personal del autor.

especialidad y calidad en México con un número considerable de artículos de investigación en revistas de circulación internacional y de formación de recursos humanos.

La Asociación Mexicana de Microscopía fue fundada el 9 de noviembre de 1991. Esta fue establecida por los doctores Miguel José Yacamán, Jorge Larriva, Alfonso Cárabez Trejo, David Ríos Jara, Pablo Schabes Retchkiman, Victor Tsutsumi y Leonel Cota Araiza. Durante el evento de fundación de la Asociación, el doctor Ruy Pérez Tamayo, de la División de Medicina Experimental de la Facultad de Medicina de la UNAM, vaticinó que la Asociación Mexicana de Microscopía tendría una vida cada vez más activa a medida que se fuese fortaleciendo. El doctor Ciro Falconi, responsable de la Unidad de Microscopía del CINVESTAV, expresó que las continuas innovaciones en la microscopía obligan a los expertos a una permanente actualización. El doctor Gerardo Vázquez Nin del Laboratorio de Microscopía Electrónica del Departamento de Biología de la Facultad de Ciencias de la UNAM indicó la necesidad de contar con personal capacitado para manejar los microscopios electrónicos, por lo que la Facultad de Ciencias estableció una especialización en microscopía electrónica en el área biológica a nivel posgrado. Además, comprometió a la Asociación Mexicana de Microscopía a establecer una serie de cursos de microscopía electrónica tanto en el área de las ciencias biológicas como en el área de las ciencias físicas. El doctor René Druker, del Instituto de Fisiología Celular de la UNAM, consideró que la creación de la Asociación fue un paso muy acertado al existir excelentes microscopistas en México.

En 1992, la Asociación Mexicana de Microscopía en conjunto con las Sociedades de Microscopía Electrónica de Venezuela, Brasil, Argentina, Estados Unidos y Cuba establecen, durante el Primer Congreso Atlántico de Microscopía Electrónica, celebrado en Mérida, Venezuela, del 25 al 29 de mayo, el Comité Interamericano de Sociedades de Microscopía Electrónica (CIASEM), con el objetivo de incrementar y difundir la ciencia y la enseñanza de la microscopía electrónica en el continente americano, y pasa a formar parte de la Confederación Internacional de Sociedades en Microscopía Electrónica (IFSEM) fundada en 1951 por Bodo von Borries, colaborador de Ruska y Knoll. El doctor Miguel José Yacamán fue el primer presidente del CIASEM, y cabe mencionar que México ha sido siempre pieza clave en la organización y funcionamiento del CIASEM.

En la década de los años noventa, México cuenta con varios microscopios electrónicos en varias universidades del país. La Asociación tuvo un papel importante en la elección de México como sede del II Congreso Iberoamericano de Microscopía Electrónica, realizado en 1993, y, en 1994, la IFSEM en su Asamblea General celebrada en París, Francia, confiere a México la organización y celebración del 14 Congreso Internacional de Microscopía Electrónica, celebrado en Cancún, Quintana Roo, en septiembre de 1998, con la participación de más de 1500 microscopistas de todo el mundo (Calderón-Benavides *et al.*, 1998).

En la actualidad hay más de 100 microscopios electrónicos operando en México, tanto SEM como TEM, siendo uno de los países latinoamericanos con mayor número de microscopios. Los laboratorios de microscopía electrónica en México se encuentran instalados principalmente en la UNAM, el IPN y en el sector salud, pero en casi todos los estados del país se tiene al menos un laboratorio de microscopía electrónica, principalmente en las instalaciones de las universidades estatales y en los tecnológicos. En 1998 la revista *Microscopy Research and Technique* dedicó un número especial al trabajo de microscopía electrónica realizado en México. Varios de los actuales investigadores en microscopía electrónica, tanto en el área de las ciencias biológicas como en el área de ciencia de materiales, publicaron parte de su trabajo en dicho volumen.

Hoy en día, también se imparte un número considerable de cursos en microscopía electrónica en varias dependencias de la UNAM, del IPN y en varias universidades del país. Por ejemplo, en el Laboratorio de Microscopía Electrónica de la Facultad de Ciencias de la UNAM, se imparte la especialización en microscopía electrónica aplicada a las ciencias biológicas, como parte del posgrado de la UNAM.

Con respecto a los equipos modernos, tanto el IPN (en el Laboratorio Avanzado de Nanoscopia Electrónica del CINVESTAV y en el Centro de Nanociencias y Micro y Nanotecnologías, del IPN), la UNAM (en el Instituto de Investigaciones en Materiales) y el Instituto Mexicano del Petróleo cuentan actualmente con el microscopio electrónico Jeol ARM200F, con corrector de aberración esférica, el cual permite obtener imágenes en el modo de barrido por transmisión (HAADF-STEM) con una resolución de 78 picómetros (0.078 nm). La resolución con que se cuenta en los microscopios TEM de última generación es de 50 picómetros, es decir, dentro del mundo atómico, y la física cuántica tiene la palabra.

## Comentarios finales

La actividad actual en los laboratorios de microscopía electrónica a nivel mundial se ha modificado considerablemente. En un principio, las actividades se enfocaron completamente en la observación de diferentes materiales con el microscopio electrónico y en la interpretación y análisis de las imágenes. Ahora, las actividades se pueden dividir en aquellas que se interesan por el desarrollo de la ciencia de la microscopía electrónica *per se* y las que se interesan solo por la técnica, pero estas actividades no son excluyentes.

El objetivo primordial de la microscopía electrónica como ciencia es aumentar la resolución y calidad, e interpretar las imágenes que se obtienen con el SEM y TEM. Para mejorar la resolución y la calidad de las imágenes se requiere el entendimiento completo de la óptica electrónica; la interpretación de imágenes requiere el conocimiento de la interacción del haz electrónico con los materiales en estudio. Por otro lado, dar servicio a los usuarios de la micros-

copía electrónica implica usarla solo como una técnica que aporta información sobre la morfología, estructura y composición química de las muestras. Tanto la ciencia como la técnica son actividades muy importantes y no son excluyentes, pero requieren de diferente tiempo de uso de los equipos. Un laboratorio de microscopía electrónica moderno requiere de científicos dedicados a la ciencia de la microscopía electrónica y técnicos dedicados a dar los servicios, pero ambos serán responsables de las actividades de enseñanza de la microscopía electrónica.

En cuestión de equipo, un laboratorio de microscopía moderno estará conformado por al menos un par de microscopios SEM, de mediana y de última generación, y al menos un microscopio TEM de última generación. De igual modo, debe contar con una serie de equipos de preparación y manejo de muestras. La generación de recursos para el mantenimiento recaerá casi en su totalidad en los microscopios SEM y en el equipo de preparación de muestras. La realización de la ciencia recaerá casi completamente en el equipo TEM.

El microscopio electrónico se inventó y perfeccionó en los años treinta del siglo XX, pero en México, la microscopía electrónica se desarrolló en los setenta, prácticamente 50 años después. Actualmente, la microscopía electrónica realizada en México tiene reconocimiento internacional, pero está muy lejos de encontrarse en la frontera de la investigación en esta área.

Realizar investigación en el campo de la microscopía electrónica en México requiere de un apoyo económico considerable, tanto por el costo de estos equipos (se cotizan en más de un millón de dólares), como por el costo de mantenimiento y consumibles, cifra que puede alcanzar los 100 mil dólares anuales.

Así, en la mayoría de los laboratorios de microscopía los directivos han optado por los servicios, por lo cual la mayoría de las actividades de microscopía electrónica se centran en la generación de fondos para poder cubrir el mantenimiento y el costo de los materiales de consumo. Sin embargo, en México, el único microscopio que puede generar los recursos económicos requeridos es el SEM, al ser un equipo que permite obtener en un tiempo relativamente corto las imágenes reconocibles del objeto de estudio, así como su composición química. Si se cuenta con los detectores adecuados, es posible obtener, además, las propiedades ópticas y electrónicas de las muestras.

Otra limitante es que son los técnicos del laboratorio quienes manejan los microscopios electrónicos mientras que los estudiantes y usuarios son meros espectadores. Esta situación ha repercutido en el poco interés del estudiante por el desarrollo de temas relacionados con la microscopía electrónica, reduciendo así la formación de recursos humanos. Como resultado, se genera también un déficit en el personal requerido para el funcionamiento de los laboratorios de microscopía electrónica. Las personas que tienen la necesidad de usar este equipo, la mayoría de las veces solo buscan obtener las imágenes, sin importar el profundizar en los resultados. Una imagen bonita es más que suficiente.

Hacer ciencia de frontera en el campo de la microscopía electrónica requiere, por consiguiente, una cantidad considerable de recursos económicos anuales y la formación de recursos humanos de las últimas generaciones. Definitivamente, en nuestro país esto implica la colaboración interinstitucional y gubernamental, si es que se quiere que la ciencia en el campo de la microscopía electrónica sea una opción para nuestros futuros científicos

## Referencias

- Breton, B. C., Chand, G., Caldwell, N. H. M., Holburn, D. M. (1997). Remote microscopy in the real world. *Microscopy and Analysis* (Eur. Edn.), septiembre: 9-21.
- Breton, B. C. (2004). *The early history and development of the scanning electron microscope*. Engineering Department, Cambridge University. [www-g.eng.cam.ac.uk/125/achievements/oatley/history.html](http://www-g.eng.cam.ac.uk/125/achievements/oatley/history.html)
- Calderón Benavides, H. A., José Yacamán M. (1998). *Proceedings of the 14th-ICEM*, México, Institute of Physics Publishing, Bristol. Vols. I, II y III. ISBN-10: 0750305681. ISBN-13: 9780750305686.
- Caldwell, N. H. M., Breton, B. C., Holburn, D. M. (1998). Making SEMs smarter. *Microscopy and Analysis*, noviembre: 9-11. Wiley Analytical Science.
- Goldstein, J. I. (1992). *Scanning electron microscopy and X-ray microanalysis*. Nueva York: Plenum Press. ISBN 978-1-4613-0491-3.
- Hirsch, P., Howie, A., Nicholson, R. B., Pashley, D. W., Whelan, M. J. (1977). *Electron microscopy of thin crystals*. Nueva York: Krieger Publishing Company, NY. ISBN-13: 978-0882753768. ISBN-10: 0882753762.
- Kimoto, S. (1985). *The scanning microscope as a system*. JEOL News, Jeol Ltd.
- Lentzen, M. (2006). Progress in aberration-corrected high resolution TEM using hardware aberration correction. *Microscopy Microanalysis*, 12: 191-205. <https://doi.org/10.1017/S1431927606060326>
- Martínez-Mena, A. (1988). Algunos aspectos de la historia de la microscopía en México. *Revista Ciencias: Revista de Cultura Científica*. Facultad de Ciencias, UNAM. 25-28. ISSN: 0187-6376.
- Nixon, W. (1998). History and early developments of the scanning electron microscopy. *Proceedings of the 14th-ICEM*. Institute of Physics Publishing, Mexico.
- Rivera, M., Arenas-Alatorre, J. (2019). De los micrómetros a los picómetros: evolución de las técnicas de microscopía para el estudio de nanomateriales. *Mundo Nano. Revista Interdisciplinaria en Nanociencias y Nanotecnología*, 12 (23): 1e-25e. <https://doi.org/10.22201/ceiich.24485691e.2019.23.67334>
- Scott, V. D., Love, G. (1983). *Quantitative electron-probe microanalysis*. Ellis Horwood Ltd. ISBN-10:0853125147. ISBN-13: 978-0853125143.
- Stokes, D. J. (2012). Environmental scanning electron microscopy for biology and polymer science. *Microscopy and Analysis*, 67-71. [www.microscopy-analysis.com](http://www.microscopy-analysis.com)
- Toledo, C. A., Varela, R. (2005). *40 años del microscopio electrónico de barrido*. Proc. V. Congreso de Microscopía Electrónica, Habana, Cuba. [www.sld.cu/galerias/pdf](http://www.sld.cu/galerias/pdf)

Yacamán, M. J., Krakow, W. (1998). Introduction to microscopy in Mexico. *Microscopy Research and Technique*, 40(1): 1.

Yacamán, M. J., Reyes-Gasga, J. (1998). *Microscopía electrónica: una visión del microcosmos*. México: Fondo de Cultura Económica. ISBN-10: 9681646215, ISBN-13: 978-9681646219.

# Técnicas de microscopía electrónica usadas en el estudio de nanopartículas\*

## Electron microscopy techniques used in the study of nanoparticles

Francisco Paraguay-Delgado\*\*

**ABSTRACT:** The phenomena involved in the interaction between electrons and matter are suitable signals for the study of nanoparticles. Each type of interaction is explained to know in detail the characteristics of nanomaterials such as: shape, size, crystallinity and composition. This work briefly describes the architecture and specific characteristics of three transmission electron microscopes, with the aim of demonstrating how the physical properties of nanomaterials can be studied and determined using techniques related to these instruments. A systematic and detailed study of two types of nanoparticles is also presented, specifically interpreting each experimental results obtained with different capacities of each electron microscopes used. The methodologies exposed in the materials characterization are reinforced with the inclusion of diverse nanomaterials studies.

**KEYWORDS:** electron microscopy, nanomaterials, nanotechnology, electron diffraction, semiconductor oxides.

**RESUMEN:** Los fenómenos involucrados en la interacción de electrones con la materia son señales adecuadas para el estudio de nanopartículas. Se explica cada tipo de interacción para conocer en detalle las características de los nanomateriales como: la forma, el tamaño, la cristalinidad y la composición. En este trabajo, se describen brevemente la arquitectura y las características específicas de tres microscopios electrónicos de transmisión con el objetivo de demostrar cómo se puede estudiar y determinar las propiedades físicas de los nanomateriales utilizando técnicas involucradas con estos instrumentos. También se presenta un estudio sistemático y detallado de dos tipos de nanopartículas, interpretando específicamente cada resultado experimental obtenido con diferentes capacidades de cada microscopio electrónico utilizado. Se refuerzan las metodologías expuestas en la caracterización de los materiales incluyendo, como ejemplos, varios estudios de nanomateriales

**PALABRAS CLAVE:** microscopio electrónico, nanomateriales, nanotecnología, difracción de electrones, óxidos semiconductores.

Recibido: 10 de febrero de 2020.

Aceptado: 30 de abril de 2020.

\* Agradezco a los colegas del NaNoTeCh-CIMAV, a los estudiantes de doctorado que tuve y tengo, quienes me han ayudado para avanzar y terminar esta contribución. Gracias a la Dra. Mou Pal por facilitar las muestras A y B. También gracias a mis hijas Fabiola y Gabriela por dedicarle tiempo en revisar la redacción, haciendo este trabajo cada vez más entendible.

\*\* Laboratorio Nacional de Nanotecnología (NaNoTeCh): Centro de Investigación en Materiales Avanzados SC. (CIMAV). Miguel de Cervantes 120, complejo industrial Chihuahua, CP 31136 Chih. México.

Correo electrónico: francisco.paraguay@cimav.edu.mx

## Introducción

Los sistemas ópticos son instrumentos formados con más de una lente con propósitos específicos, tanto para ver objetos microscópicos (microscopios) como para objetos alejados como planetas o galaxias (telescopios). Las lentes pueden ser para luz (fotones) o para partículas cargadas (electrones, iones, etc.). En el caso de las partículas cargadas, las lentes están basadas en campos eléctricos y campos magnéticos generados por cargas eléctricas e imanes, respectivamente. De forma general, los sistemas ópticos se conforman con diferentes radiaciones cuyas longitudes de onda para luz visible (4000 y 8000 Å): neutrones (1.5 a 5 Å): rayos-X (1.5 Å): iones y electrones (menores a 0.01 Å). Con cada tipo de radiación mencionada se pueden construir microscopios, para ello es necesario “guiar o direccionar” la radiación respectiva, es decir, juntar o expandir (este proceso lo hacen las lentes). Entonces en la mayoría de las radiaciones usadas para construir microscopios es posible desviar con facilidad y en otras con mayor dificultad.

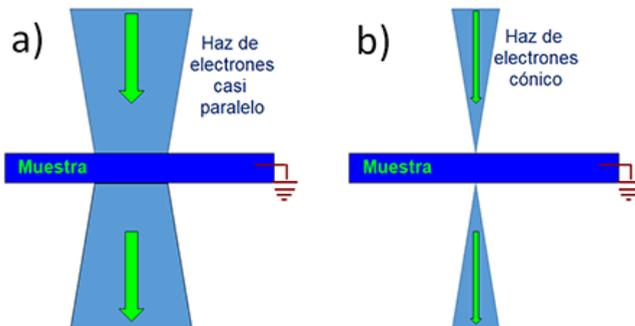
De allí la importancia de elegir la radiación adecuada para construir microscopios. Usar iones o electrones proporciona una gran facilidad debido a que son cargas eléctricas, estas partículas cargadas se pueden direccionar con campos electromagnéticos, construyendo lentes electrostáticas y/o magnéticas para, finalmente, ensamblar estas lentes una tras otra hasta construir los microscopios. Actualmente, hay microscopios comerciales contruidos con iones (Galio  $\text{Ga}^{+3}$ , Helio  $\text{He}^{+2}$ ) y electrones ( $e^-$ ): cada uno de ellos para propósitos específicos. En el caso de los microscopios electrónicos (usan radiación de electrones): la longitud de onda con la que trabajan depende específicamente del voltaje de aceleración y de la configuración de las lentes magnéticas. Ya sea para iluminar con haces casi paralelos (modo de transmisión) o para rastrear con un haz cónico (escaneo en modo de transmisión): en ambos casos los electrones atraviesan la muestra tal como se indica en la figura 1.

Los microscopios contruidos con radiación de electrones son de gran utilidad para el estudio de materiales en la actualidad. Una de las ventajas es que los electrones, debido a su carga y energía tienen una fuerte interacción con los átomos que conforman el material en estudio (muestra). Este es un mecanismo útil para conocer las características del nanomaterial. Los fenómenos que ocurren son similares al que sucede en el experimento con el que Rutherford descubrió el núcleo del átomo.<sup>1</sup> De forma similar, en los microscopios electrónicos al lanzar electrones sobre el material en estudio, detectaremos electrones transmitidos, desviados y radiaciones electromagnéticas. A diferencia de la tecnología usada por Rutherford (película fotográfica): la ventaja que tenemos ahora es que existen detectores de electrones (cámaras digi-

---

<sup>1</sup> Experimento de Rutherford. En el que, al hacer incidir un haz de partículas alfa sobre una lámina de oro, se dio cuenta de que el núcleo atómico desvía las partículas alfa en distintas direcciones.

**Figura 1.** Esquemas de las formas de iluminar a la muestra con: a) haz casi paralelo (modo transmisión), y, b) haz cónico (escaneo en modo transmisión).



Fuente: Elaboración del autor.

tales) con alta sensibilidad para registrar en forma de imagen todos los electrones desviados, con lo cual obtenemos un resultado más completo acerca de la dispersión de electrones en diferentes direcciones. Luego, al interpretar los resultados experimentales (imágenes) entenderemos el material en estudio de forma específica y clara.

Con este propósito, en este trabajo se dará una explicación concreta de los microscopios electrónicos de transmisión y sus características principales. Luego se interpretan las imágenes obtenidas para conocer cada tipo de material nanométrico en estudio.

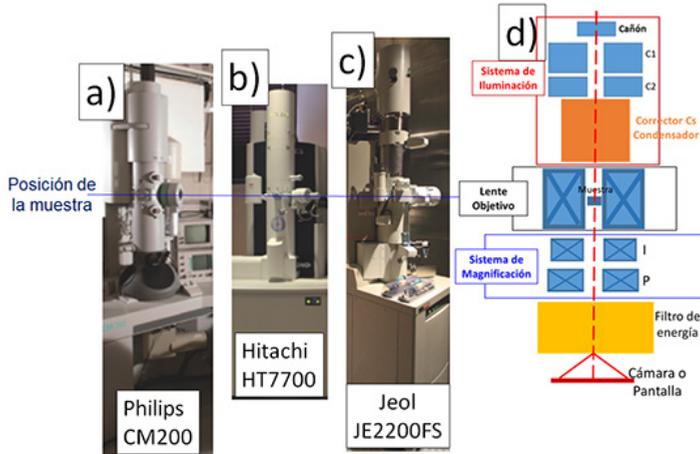
## Descripción de la arquitectura básica de los microscopios electrónicos de transmisión

Los microscopios electrónicos están compuestos de varios sistemas para funcionar adecuadamente. Los principales son: sistema óptico, alto voltaje, fuente de electrones, vacío en la columna, refrigeración, sistema electrónico y detectores. El sistema óptico sirve para formar las imágenes, este es el proceso fundamental en la microscopía por eso se explicará en detalle la forma en la que viajan los electrones por las diferentes partes de la columna, en la literatura a esta parte se le denomina óptica-electrónica. Entender con claridad este sistema es de importancia, para interpretar los resultados experimentales —las imágenes obtenidas— que se generan por la interacción del haz de electrones con la muestra.

En la figura 2 se muestra el sistema óptico (columna) de tres microscopios electrónicos de transmisión (MET) que se encuentran en el Laboratorio Nacional de Nanotecnología (NaNoTeCh) del CIMAV.<sup>2</sup> La figura 2d muestra el esquema de las lentes electromagnéticas que están agrupadas en tres: sistema

<sup>2</sup> <https://ntch.cimav.edu.mx/>

**Figura 2.** Sistema óptico de los MET. a) CM200 Philips; b) HT7700 Hitachi; c) JEM2200FS Jeol, y, d) esquema general del MET mostrando sistema de iluminación, objetivo y magnificación.



Fuente: Elaboración del autor, imágenes de los equipos de Nanotech, CIMAV, Chihuahua.

de iluminación, formación de imagen (lente objetiva) y sistema de magnificación. Además, cada sistema puede mejorar añadiendo correctores. Por ejemplo, en el sistema de iluminación se puede incluir un monocromador — para uniformizar la energía de los electrones incidentes (C<sub>c</sub>) y/o corrector de aberración esférica (C<sub>s</sub>)— para mejorar el enfoque del haz de electrones, haciéndole más intenso y delgado. También se puede añadir un filtro de energía en el sistema de magnificación para separar los electrones emergentes de la muestra en función de su energía. En la figura 2, vemos que los tres microscopios provienen de distintas marcas comerciales. Por consiguiente, presentan configuraciones diferentes en cada columna, las diferencias principales entre ellos se muestran en la tabla 1. Desde el punto de vista de la utilidad para la investigación, estos equipos son complementarios entre ellos ya que no todos tienen los mismos elementos en la columna. La línea horizontal en la parte media de la figura 2, representa la posición de la muestra en cada instrumento. Por tanto, la parte superior de la muestra se llama **sistema de iluminación**, esta parte está diseñada para lanzar los electrones sobre la muestra. La parte media donde se encuentra la muestra es la parte más importante de cada microscopio y se denomina **lente objetivo**, aquí se forman las imágenes debido a la interacción del haz de electrones con la muestra. Finalmente, a toda la parte inferior después del lente objetivo se le denomina **sistema de magnificación**, aquí se amplía en cascada la imagen para obtener un tamaño final más grande a través de las diferentes lentes y, si tiene filtro de energía, este separará los electrones en función de su energía para obtener una imagen con mejor resolución. A continuación, se describirá con más detalle cada uno de estos sistemas ópticos del MET.

**Tabla 1.** Diferencias entre los tres MET del CIMAV-NaNoTeCH. Se incluye el año de instalación y procedencia en la primera columna.

Modelo	Voltaje (kV)	Filamento	Filtro de energía	Modos de operación y resolución (Å)	Análisis elemental EDS	Detectores
<b>CM200 Philips</b> 1996 Holanda	200	LaB <sub>6</sub>	después de columna DIGI PEELS 766	<b>MET</b> entre líneas 1.8 entre puntos 2.5 <b>STEM</b> BF 50	EDAX USA	Placa fotográfica  BF DF
<b>JEM2200FS Jeol</b> 2009 Japón	200	Emisión de campo tipo Schottky	en columna tipo Omega	<b>MET</b> entre líneas 1 entre puntos 1.8 <b>STEM</b> BF 1.36 HAADF 1	Oxford Inglaterra	Cámara digital OneView (Gatan)  BF HAADF
<b>HT7700 Hitachi</b> 2015 Japón	120	LaB <sub>6</sub>	No	<b>MET</b> entre líneas 2 entre puntos 2.9 <b>STEM</b> BF = HAADF 15	Bruker Alemán	Cámara digital AMT sCMOS  BF HAADF

EDS: Energy Dispersive Spectroscopy.  
 PEELS: Parallel Electron Energy Loss Spectroscopy.  
 BF: Bright Field.  
 DF: Dark Field.  
 STEM: Scanning Transmisión Electron Microscope.  
 Fuente: Elaboración del autor.

**Sistema de iluminación.** Como se mencionó, este sistema está configurado para extraer, acelerar, expandir, juntar, hacer paralelo o cónico el haz de electrones y dosificar la incidencia sobre la muestra. El sistema básico consta del cañón de electrones, zona de aceleración, lentes condensadoras (C1 y C2) y las bobinas deflectoras (para más detalle ver manual de cada instrumento). Opcionalmente, puede tener monocromador de energía o corrector de aberración esférica (Cs). En este sistema la fuente de electrones puede ser desde un filamento de tungsteno, cristal de hexaboruro de Lantano (LaB<sub>6</sub>) o emisión de electrones por campos eléctricos desde un filamento súper-puntiagudo de tungsteno recubierto por óxido de zirconio a diferentes temperaturas.

**Lente objetivo.** Es el sistema que forma la primera imagen de la muestra y el patrón de difracción en el plano imagen y en el plano focal, respectivamente. Esta lente es configurable con el suministro de la corriente para tra-

bajar como una lupa o como una lente condensadora, dependiendo del propósito deseado. Es decir, podemos configurar al mismo equipo para distintos propósitos específicos. Algunos equipos tienen corrector de aberración esférica para esta lente (no es el caso de NaNoTeCh).

**Sistema de magnificación.** Esta parte del MET está formada por lentes intermedias (I), lentes proyectoras (P) y bobinas deflectoras. También, de acuerdo con el interés del usuario, en esta parte se seleccionará la imagen o el patrón de difracción. Entonces, si queremos ver la imagen (formada en plano imagen de la lente objetiva) estas lentes amplían la imagen en cascada sin perder la resolución. Por otro lado, si queremos ver o registrar el patrón de difracción (formado en el plano focal de la lente objetiva) también magnifica manteniendo la resolución. Pero de acuerdo con la selección, el usuario podrá ver la imagen o patrón de difracción en la parte final del sistema óptico (cámara, figura 2d).

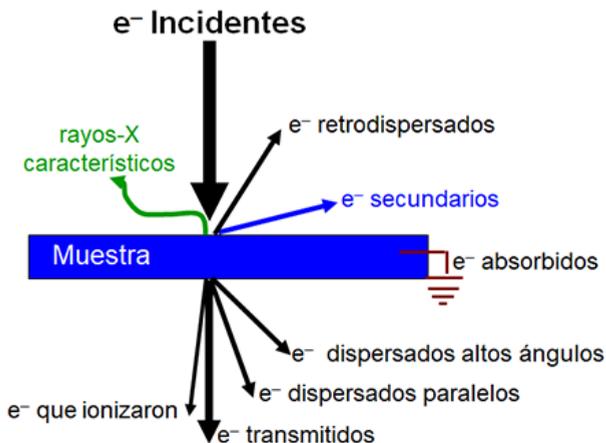
En el caso del filtro de energía, dos microscopios del CIMAV incluyen, uno en columna (JEM2200FS) y el otro en pos-columna (CM200 solo espectroscopía). Esta parte del instrumento, clasifica los electrones que atravesaron la muestra en función de su energía. Luego, el usuario elige las zonas del espectro para mejorar la calidad de las imágenes, determinar el plasmón, energía de enlace, entre otras de las muestras en estudio (Egerton, 2011).

## Interacción del haz de electrones con la muestra

Los electrones que inciden sobre la muestra interactúan a nivel atómico con los elementos químicos que conforman. Entonces los resultados que obtendremos serán solamente de la zona de interacción y sus vecindades cercanas. Por consiguiente, el resultado que deseamos saber dependerá de la zona y forma de hacer incidir los electrones sobre la muestra (figura 1); para este propósito se usa el sistema de iluminación. Por ejemplo, en el caso de nanomateriales es de mucho interés obtener información de una sola nanopartícula (NP) o solo de alguna zona de esta. Como los nanomateriales son menores a 100 nm (100 millonésima parte de milímetro): entonces nuestro sistema de iluminación del haz de electrones debe generar haces paralelos o cónicos cuyos diámetros sean menores a 100 nm y 1 Å sobre la muestra, respectivamente.

Las principales interacciones del haz de electrones incidentes con la muestra se describen en la figura 3. En esta parte podemos hacer una analogía con una persona que no ve (invidente): entonces ¿cómo distingue él un camino que nunca transitó?, habrá huecos, desniveles y demás obstáculos, ¿cómo sabe si en una pared hay una ventana o una puerta?, etc. El invidente interactúa con ayuda del oído y el tacto usando un bastón para escanear las superficies y sus características. De forma similar, si queremos investigar o averiguar cómo es un nanomaterial, hacemos incidir electrones y tenemos que identificar si son los mismos electrones incidentes o son electrones de la muestra. La dificultad está en ¿cómo distinguir unos de otros?; si se desvían los electrones incidentes

Figura 3. Principales señales debido a la interacción del haz de electrones con la muestra.



Nota: Color negro: electrones provenientes del cañón. Color azul: electrones de la muestra. Color verde: onda electromagnética generada por la transición de electrones.  
Fuente: Elaboración del autor.

¿en qué ángulo lo hacen?, etc. Entonces un electrón que incide sobre la muestra tiene varias posibilidades (figura 3) estos pueden: atravesar sin desviarse, ionizar al átomo de la muestra, desviarse en un ángulo o interactuar con el núcleo de los átomos que conforman la muestra. Las preguntas a responder son: ¿cuál de todos estos fenómenos ocurrió?, ¿hay forma de distinguir uno de otro? La respuesta a ambas preguntas es: sí, podemos distinguir lo que pasó de forma clara. ¿Cómo se hace?, para ello se ponen los detectores adecuados en las posiciones convenientes (estratégicas) y el detector nos dirá si llegaron electrones o no. ¿Cómo sabremos en dónde poner los detectores?, para responder a esta pregunta tendremos que estudiar la dispersión de electrones por átomos fijos en una muestra, existe una basta y amplia literatura en esta área (David y Barry, 2009). Ahora bien, tomando en cuenta el análisis previo, podemos imaginarnos que los detectores tienen que estar cerca de la muestra a una distancia adecuada. Para entender con más detalle las interacciones de los electrones incidentes, los separaremos en dos grupos: electrones que ionizan a los átomos de la muestra y los electrones que se dispersan debido a la interacción con la muestra. (Para entender estos fenómenos se usa el modelo atómico de Rutherford).

Una parte de los electrones incidentes ioniza los átomos de la muestra

Para que un electrón llegue a la muestra se debe acelerar y, por consiguiente, lleva energía suficiente para ionizar. Entonces, cuando un electrón ioniza al átomo de la muestra, tenemos dos opciones para conocer acerca de la mues-

tra en estudio: determinando la energía que perdió el electrón incidente al ionizar es responder ¿qué pasa con el átomo ionizado?

En la primera opción, el electrón sigue su viaje hasta llegar a un medidor de energía (filtro de energía) para determinar cuanta energía perdió en el proceso de la ionización (figura 3, electrones que ionizaron). Por este método conocemos la energía con la que estuvo ligada el electrón al átomo de la muestra y así determinaremos el elemento químico que conforma la muestra. Además, con este proceso de medir la energía perdida en la ionización, es posible determinar la energía de enlace o el estado de oxidación de los átomos que conforman la muestra. Resultando un método adecuado para caracterizar los nanomateriales.

En la segunda opción, el átomo se queda sin un electrón en alguna capa electrónica. Por ejemplo, cuando el átomo queda ionizado en la capa K. Entonces, al caer un electrón del nivel energético superior (L, M, N) emite rayos-X característicos (figura 3): la energía de estos rayos-X son la huella digital del átomo donde se originan las transiciones del electrón. Por consiguiente, al medir la energía de estos rayos-X característicos, nos revela la composición elemental de la zona donde incidió el haz de electrones. Por esta técnica se determinan las zonas en la que está un tipo de átomo que conforma la muestra. Y un material en estudio (muestra) puede contener varios átomos; luego, con el proceso de medir la energía de los rayos-X característicos, sabremos en qué posiciones de la muestra está un determinado tipo de átomo.

### Otra buena parte de los electrones incidentes en la muestra se dispersan

Esta desviación de electrones incidentes por la muestra puede ser: paralela o en distintas direcciones arbitrarias.

En el primer caso, la desviación paralela a diferentes ángulos se genera por un efecto similar al que generaría una superficie conformada por espejos. ¿Hay “espejos” para los electrones incidentes en la muestra? la respuesta es sí, los átomos que conforman un material (muestra) en su gran mayoría están perfectamente ordenados. Es decir, están formados o alineados como los militares en un desfile cívico, tan perfectamente alineados al punto de generar la ilusión de ver como un único soldado a toda una fila o columna de soldados formados. A este proceso en los materiales se le denomina cristalización. En un cristal, los átomos están enlazados formando figuras geométricas perfectas. Este tipo de materiales cristalinos desvían a los electrones incidentes de forma paralela a distintos ángulos determinados (figura 3). A este último fenómeno se le llama difracción de electrones; y es provocado por la existencia de planos cristalinos en las muestras cristalinas “espejos”. Estos electrones nos dan información acerca del tipo de cristales. Por consiguiente, podemos determinar las distintas formas cristalinas de los nanomateriales con este tipo de señal. A la imagen obtenida con estos electrones se le llama patrón de difracción de electrones.

En el segundo caso, la desviación de los electrones es en distintas direcciones arbitrarias, es decir, no es procedente de planos cristalinos. Entonces, ¿quién provoca esta forma de desviación?, la respuesta es: un material no necesariamente está conformado por un mismo tipo de átomos, cada átomo puede ser de distinto tamaño (átomos ligeros y pesados). Por ejemplo, los óxidos están conformados por un enlace entre un metal y un oxígeno, también algunas aleaciones de materiales (muestras) contienen átomos pesados y ligeros. Al interactuar con el núcleo de estos átomos, los electrones incidentes desvían a los electrones en diferentes ángulos, algunos inclusive se regresan (figura 3, electrones retrodispersados y dispersados altos ángulos —como en el caso del experimento de Rutherford) (video YouTube consultado, 2020)<sup>3</sup>—. Al detectar estos electrones desviados sabemos del tipo de núcleos que tienen los átomos que conforman la muestra en estudio, debido a que los átomos pesados tienen núcleos más grandes y desvían mayor cantidad de electrones incidentes. Por consiguiente, con este tipo de imágenes obtenemos la composición de las muestras, es decir, podemos distinguir átomos ligeros y pesados. La detección de estos electrones desviados en diferentes direcciones nos da información de los materiales en donde los átomos están desordenados (materiales no cristalinos). Los nanomateriales no necesariamente están ordenados, también pueden estar conformados por diferentes tipos de átomos. Los electrones desviados por el núcleo de los átomos se registran con el detector llamado *high angle annular dark field* (HAADF) y a la imagen obtenida con estos electrones se le llama contraste-Z, esta imagen lleva información acerca del tipo de núcleo atómico que conforman las muestras.

Estos fenómenos explicados en la interacción de electrones incidentes y las muestras en estudio se deben tener presentes, para la interpretación de las distintas imágenes que se obtienen con los microscopios electrónicos.

## Ejemplos en el estudio de nanomateriales

A continuación, mostraré ejemplos del estudio de materiales por microscopía electrónica. En cada caso se explicará la interpretación correspondiente, basada en los fenómenos que se describieron en la sección anterior. Primero, presentaré un estudio sistemático detallado de dos nanopartículas mostrando la diferencia entre ellas, luego se incorporarán otros ejemplos. Para cada caso se explicarán en detalle las imágenes obtenidas debido a la interacción del haz de electrones con la muestra.

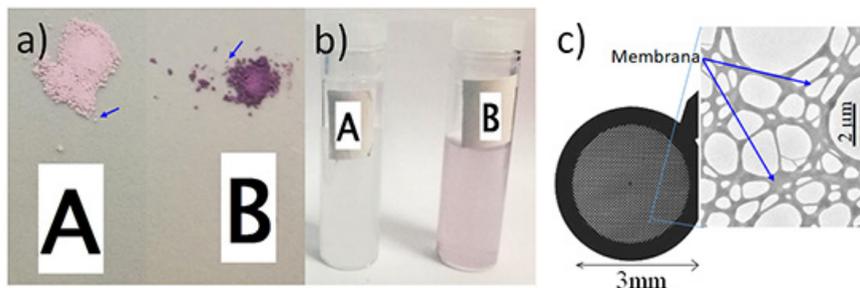
Se requiere estudiar dos muestras en forma de partículas (polvo) de diferente color (figura 4a). Responderemos tres preguntas iniciales: ¿cómo es la forma de cada una de las partículas?, ¿a qué se debe la diferencia de color?, y, ¿qué tamaño tendrán las partículas? A simple vista solo se alcanzan a distinguir los colores, mas no podemos saber el tamaño ni qué partículas con-

<sup>3</sup> <https://youtu.be/knlrOsqHzLU>

forman la muestra. Quizás pueden tener tintes, veamos cómo se verían si las dispersamos en agua tri-distilada. Ambas muestras se dispersan en viales separados (figura 4b): en cada una se puso la cantidad mínima señalada con flechas en la figura 4a. En la dispersión, hay una diferencia en la tonalidad, una es blanca (A) y la otra es más o menos color rojizo (B) y esta última, ahora se parece a la muestra A de la figura 4a en color. Al dispersar las partículas en agua, no podemos distinguirlas entre ellas. En el afán de responder a nuestras tres preguntas iniciales, podemos poner una gota de cada dispersión en el portamuestras para el MET (figura 4c): la dejamos secar para que se evapore el agua y solo queden las partículas de interés —en la gota deben ir algunas partículas por lo menos—. Ahora bien, la pregunta es ¿podremos ver las partículas en el microscopio electrónico?, ¿será suficiente la cantidad de muestra? En la figura 4c, se observa el tipo de rejilla que usamos, vemos la membrana señalada con flechas azules, las partículas quedan ancladas sobre ésta para ser estudiadas por MET. Este procedimiento que se describió es la forma de preparar muestras en forma de polvo para MET.

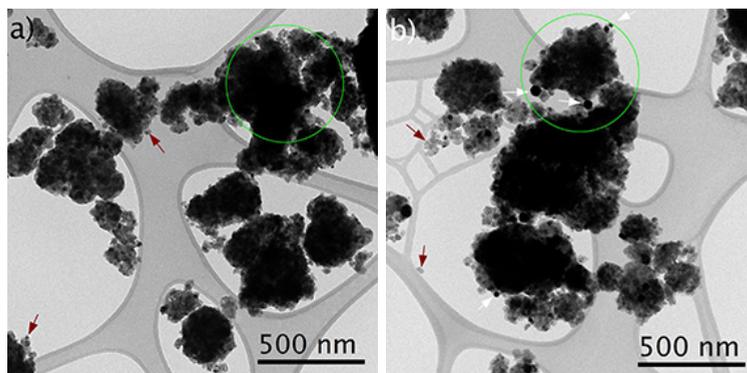
Ya que ambas muestras quedaron preparadas para el estudio por MET, iniciaremos el procedimiento para responder una de nuestras tres preguntas iniciales: ¿podremos distinguir las partículas que dan color a cada vial de la figura 3b? Para esto, usaremos un microscopio electrónico de transmisión marca Hitachi modelo HT7700, año de fabricación 2015 (Espinosa Magaña, 2016). Las imágenes se adquieren en el modo de transmisión (figura 5): es decir, formamos las imágenes con los electrones que no se han desviado. Estas imágenes nos muestran unas partículas del orden de 20 nm señaladas con flechas (color guinda): también vemos aglomeraciones de estas partículas con tamaños del orden de 250 nm. Vemos que ambas imágenes son casi iguales salvo algunos puntos oscuros en la imagen de la figura 5b señalados con flechas (color blanco) que casi no se distinguen. Por consiguiente, con estas imágenes obtenidas en esta modalidad aun no es posible distinguir categóricamente

**Figura 4.** Partículas con distinto color, imágenes obtenidas con cámara de celular. a) Partículas, y, b) viales con dispersión de las partículas en agua tri-distilada. c) Portamuestra de Cu para TEM con membrana de carbón con huecos, donde quedan anclada las partículas.



Fuente: Elaboración del autor, imágenes obtenidas en laboratorio CIMAV.

**Figura 5.** Imágenes con electrones transmitidos: a) muestra A, y, b) muestra B.



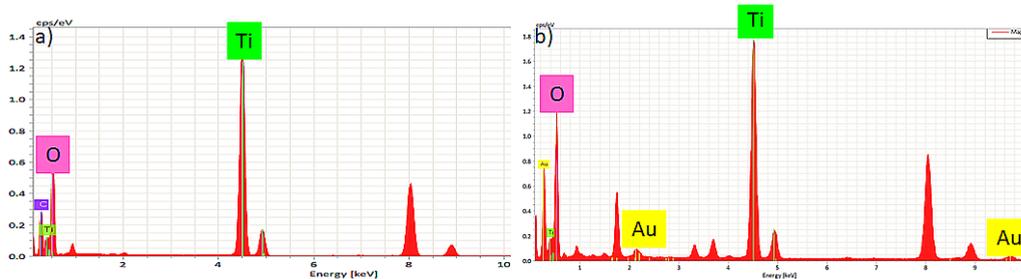
Fuente: Elaboración del autor, imágenes obtenidas en laboratorio CIMAV.

entre ambas partículas. A pesar de que estas imágenes tienen una magnificación de 30 mil veces, no es posible diferenciarlas al usar electrones transmitidos. Como aún no se distingue claramente entre las dos muestras, recurriremos a otro tipo de interacción de electrones con la muestra, en busca de poder identificar mejor la diferencia entre ambas.

Revisando las capacidades del microscopio en uso encontramos que el equipo tiene para medir los rayos-X característicos (detector EDS). Esta señal es generada por cada átomo ionizado, al pasar un electrón de niveles energéticos superiores a inferiores. Entonces, con la ayuda del detector EDS mediremos la energía de los rayos-X característicos, para ver si hay átomos diferentes entre las muestras A y B. Para este propósito se iluminan con los electrones incidentes en las zonas marcadas con círculo de color verde (figura 5): luego, al activar el detector EDS, se obtienen los espectros de la figura 6; en el espectro para la muestra A (figura 6a) vemos las intensidades correspondientes al C, Ti, O y Cu; los del C y Cu pertenecen a la rejilla que se usó para soportar las partículas (figura 4c). Entonces, a la muestra A le pertenecen solo Ti y O, podría ser que este material sea óxido de titanio. En el caso del espectro de la muestra B, encontramos las intensidades que corresponden al C, Ti, O, Cu y Au, igual que en la otra muestra las intensidades del C y Cu corresponden a la rejilla, pero el Au sí es de la muestra. En conclusión, encontramos que en la muestra B hay Ti, O y Au. Ahora la pregunta es ¿cómo estará el Au en la muestra B?, ¿distribuido uniformemente, aglomerado como partículas, o solamente estará en algunas zonas localizadas?, etc. Lo importante es que se encontró una primera diferencia entre las muestras A y B.

Para identificar las zonas donde está cada elemento químico detectado, se hará un mapeo elemental. Para lo cual debemos hacer un mapeo (imagen) en el modo STEM (con iluminación cónica en modo escaneo): esta es otra técnica del microscopio para construir imágenes con el detector EDS. Para

Figura 6. Espectros del contenido elemental con detector EDS de las muestras a) A, y, b) B.



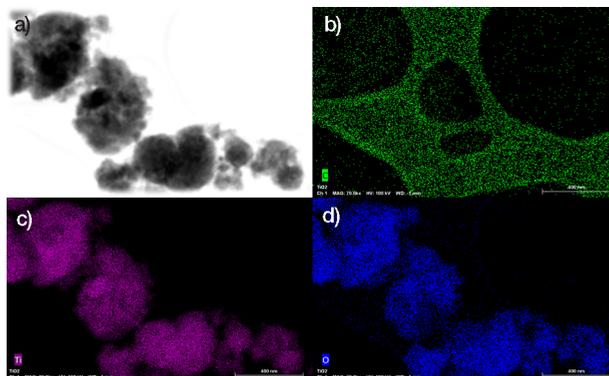
Fuente: Elaboración del autor, imágenes obtenidas en laboratorio CIMAV.

ello, se sincroniza la zona de incidencia del haz de electrones convergente y el detector EDS. Al estar sincronizada la posición de incidencia del electrón sobre la muestra y la detección de rayos-X característicos, se construyen imágenes con estas señales, a esto se le denomina mapeo elemental.

Las imágenes de las figuras 7 y 8 pertenecen a los mapeos elementales correspondientes a las muestras A y B, respectivamente. En el caso de las imágenes de la muestra A (figura 7): la imagen de la muestra se correlaciona con las imágenes formadas para los elementos Ti y O, es decir, están en las mismas posiciones. También vemos la membrana de carbón que corresponde al soporte de la rejilla, en consecuencia, podríamos decir que Ti y O están enlazados químicamente formando un compuesto.

En el caso de la muestra B (figura 8) la imagen también se correlaciona con las formadas para los elementos Ti y O; sin embargo, los puntos más oscuros de la imagen se correlacionan en ubicación con la imagen para el Au.

Figura 7. Mapeo elemental de la muestra A. a) Imagen en modo STEM, campo claro de la zona de análisis elemental, imágenes donde están los elementos químicos; b) c) Ti, y, d) O.

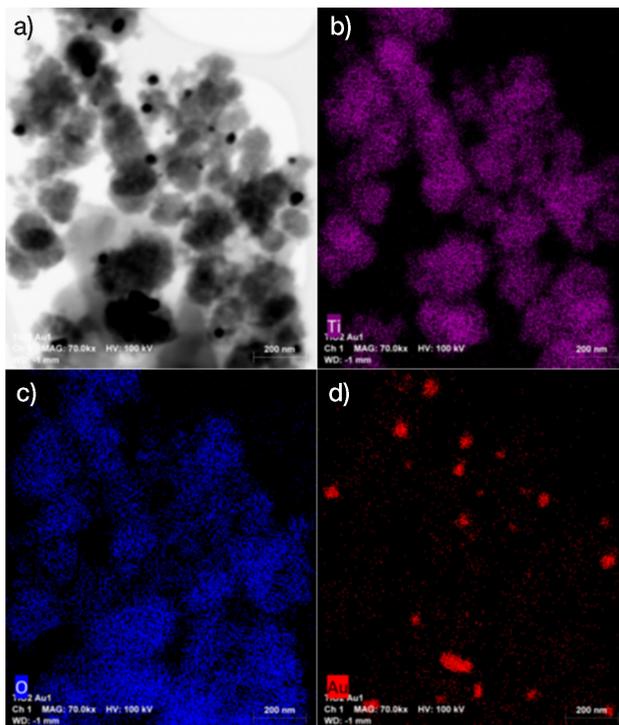


Fuente: Elaboración del autor, imágenes obtenidas en laboratorio CIMAV.

Así, en ambas muestras están los mismos átomos, pero en el caso del oro están en algunas zonas localizadas, lo cual nos permite intuir o proponer que Ti y O están enlazados formando óxido de titanio ( $\text{TiO}_2$ ) y el Au está disperso como metal. El Au está formando partículas metálicas nanométricas, esto lo sabemos debido a que los diámetros son menores a 100 nm. En conclusión, haciendo uso de la detección de rayos-X característicos espectralmente y también haciendo mapeos, encontramos la diferencia entre las dos muestras A y B. En la muestra B, las NPs de Au están dispersas en un soporte de  $\text{TiO}_2$ , esta es la razón por la que las partículas difieren en color.

Hasta ahora se identificó la morfología, composición química y la distribución elemental de ambas muestras. Para hacer un estudio completo de los materiales en estudio, también se debe identificar si son cristalinas o no. Por eso es indispensable detectar si hay electrones dispersados paralelamente (electrones difractados). Para ello se seleccionan zonas circulares con diámetro  $\sim 500$  nm (círculo color verde en la figura 5) y se cambia el microscopio al modo de difracción para ver los patrones respectivos para cada muestra.

**Figura 8.** Mapeo elemental de la muestra B. a) Imagen en modo STEM, imagen campo claro de la zona de análisis, imágenes donde están los elementos químicos; b) Ti; c) O, y, d) Au.



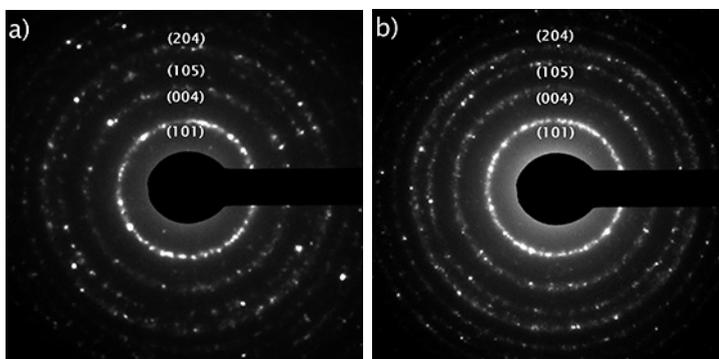
Fuente: Elaboración del autor, imágenes obtenidas en laboratorio CIMAV.

La figura 9 muestra los patrones de difracción de electrones desde las zonas seleccionadas para las muestras A y B, respectivamente. Estas imágenes nos muestran líneas circulares, con distintos tamaños de radio. Cada círculo pertenece a una familia de planos cristalinos, de tal modo que estos círculos provienen de varias distancias interplanares. Estos patrones de difracción son circulares debido a la superposición de electrones difractados provenientes de muchos cristales. En la figura 5, vemos una gran aglomeración de cristalitos, cada uno con tamaños del orden de 20 nm, esto significa que los electrones interactúan con todos estos cristales, por eso se ven círculos concéntricos en el patrón de difracción procedente de un conjunto de cristales. Estos patrones de difracción son similares para ambas muestras y según la indexación el material es  $\text{TiO}_2$  fase anatasa, porque las distancias interplanares coinciden para este material. En la figura 9 se ponen los índices de Miller (notación —3 números entre paréntesis) para cada círculo. No vemos diferencia en esta modalidad, ni tampoco se distinguen los haces difractados de las partículas de oro en la muestra B. Esto es porque la gran mayoría de los cristales son de  $\text{TiO}_2$ , concluyendo que ambas muestras son policristalinas.

Hasta este momento sabemos que la muestra B tiene dispersas partículas nanométricas de oro. Las siguientes preguntas a responder serían en cuanto al  $\text{TiO}_2$  y al Au ¿qué forma tendrán cada tipo de partícula?, ¿serán cristalinas cada una de ellas?, ¿se podrán ver distancias interplanares?, y, ¿se podrán ver columnas atómicas? Para responder estas preguntas necesitamos usar otro microscopio electrónico con mayor capacidad en resolución, con una fuente de electrones que provea mayor cantidad de electrones (emisión de campo): con corrector de aberración esférica en modo de escaneo (STEM) y con detectores más precisos y eficientes.

Uno de los equipos que cumple con estos requerimientos es el microscopio JEM2200FS (tabla 1) del Laboratorio Nacional de Nanotecnología-CIMAV (Espinosa Magaña, 2016). Por consiguiente, estudiaremos las mismas

**Figura 9.** Patrones de difracción de electrones de las muestras a) A, y, b) B.



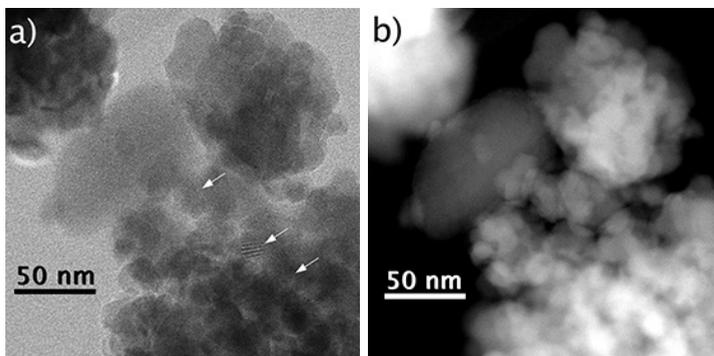
Fuente: Elaboración del autor, imágenes obtenidas en laboratorio CIMAV.

muestras con el microscopio JEM2200FS. En este equipo, usaremos el modo STEM para obtener imágenes con los detectores de electrones transmitidos (campo claro) y detector de electrones dispersados por el núcleo de los átomos (HAADF) para obtener imágenes en contraste-Z.

La figura 10 muestra dos imágenes de la misma zona en modo STEM de la muestra A, ambas obtenidas con distintos detectores. La imagen en la figura 10a fue obtenida con el detector de campo claro (electrones transmitidos) donde podemos distinguir de forma más clara el aglomerado de partículas con distintos tamaños. En las zonas marcadas con flechas vemos las famosas bandas de Moire (líneas claras y oscuras): éstas se forman debido a la interferencia generada por dos cristales de la misma distancia interplanar o similares, pero ligeramente rotadas o desplazadas entre ellas. Las partículas de  $\text{TiO}_2$  son del orden de 20 nm y parecen ser láminas casi circulares. Sin embargo, en la figura 10b se muestra la imagen obtenida de la misma zona con el detector HAADF (electrones dispersados por el núcleo de los átomos): en esta podemos observar que las partículas no son laminares, más bien, tienen un determinado volumen. La obtención de esta imagen se basa en la cantidad de interacciones de los electrones incidentes con el núcleo de los átomos de la muestra. Entre más gruesa es la zona estudiada, hay mayor interacción y, por consiguiente, esa zona se ve más brillante (intensa). Por lo tanto, ambas imágenes son complementarias para obtener información morfológica de la muestra.

Continuando con el estudio de las dos muestras A y B, las imágenes mostradas en la figura 11 pertenecen a la muestra B, que, como sabemos, contiene NPs de Au. La imagen de la figura 11a fue obtenida con el detector de campo claro donde las zonas de las partículas de Au se ven más oscuras, esto es debido a que el metal Au tiene un número atómico más alto (átomo pesado). Esta característica impide el paso de muchos electrones, porque los

**Figura 10.** Imágenes de la misma zona en el modo STEM de la muestra A. Se obtuvieron con: a) electrones transmitidos (campo claro); y, b) electrones dispersados altos ángulos (contraste-Z).



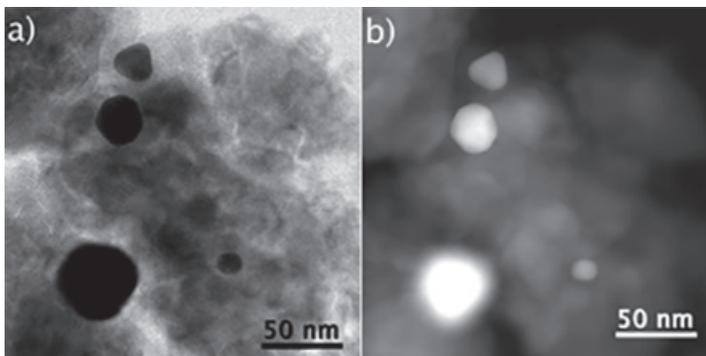
Fuente: Elaboración del autor, imágenes obtenidas en laboratorio CIMAV.

dispersa con el núcleo, razón por la cual se ve más oscuro, pues transmite pocos electrones. Ahora veamos la imagen obtenida con electrones dispersados en distintas direcciones por el núcleo (contraste-Z, figura 11b). En esta imagen, las NPs de Au se ven brillantes (intensas) debido a su núcleo atómico y dispersan más a los electrones, por eso llegan más electrones. Estas partículas tienen formas geométricas triangulares, en general poliédricas, se ve claramente la forma y las caras de cada NP. La partícula más grande no se define con claridad debido a que no está a la misma altura o nivel de las otras partículas claras. En la imagen de la figura 8a, las partículas de Au se veían de forma circular debido al modo de trabajo y a la resolución del microscopio usado, ahora pudimos distinguir su forma.

Con detectores apropiados y con el microscopio electrónico adecuado, es posible distinguir muy bien la forma de las NPs. La calidad con la que se obtienen las imágenes depende mucho de la cantidad de electrones incidentes, es decir, a mayor cantidad de electrones se genera mayor cantidad de interacciones y más señal para los detectores.

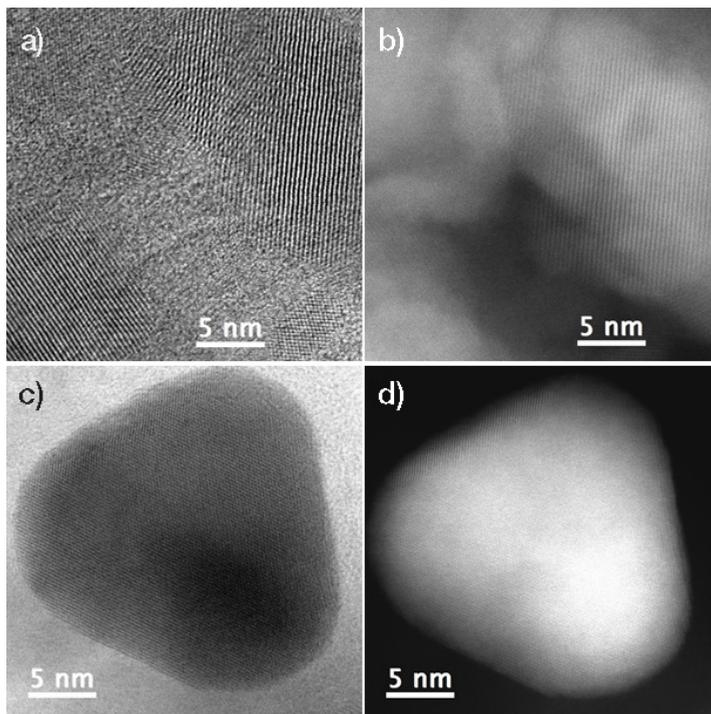
Para responder la pregunta ¿cómo son los planos cristalinos? debemos magnificar la imagen mucho más y así poder ver las distancias interplanares. En las imágenes siguientes se ven las distancias interplanares obtenidas de la misma zona con los dos tipos de detectores (campo claro y contraste-Z). Las imágenes de las figuras 12a y 12b son de la zona del  $\text{TiO}_2$ , donde vemos líneas hacia diferentes direcciones en ambas imágenes. La primera imagen (figura 12a) fue adquirida con el detector de campo claro, estas líneas se generaron debido a la interferencia de electrones transmitidos y difractados (ondas transmitidas y difractadas —por dualidad onda partícula). La segunda imagen (figura 12b) fue formada por la dispersión de electrones con los núcleos, a esta imagen se le denomina la verdadera imagen de alta resolución. En el caso de las imágenes mostradas en las figuras 12c y 12d, estas

**Figura 11.** Imágenes de la misma zona, en el modo STEM de la muestra B con detectores: a) campo claro, y, b) contraste-Z.



Fuente: Elaboración del autor, imágenes obtenidas en laboratorio CIMAV.

**Figura 12.** Imágenes que muestran distancias interplanares, para  $\text{TiO}_2$ : a) campo claro, y, b) contraste-Z. Para una partícula de oro: c) campo claro, y, d) contraste-Z.



Fuente: Elaboración del autor, imágenes obtenidas en laboratorio CIMAV.

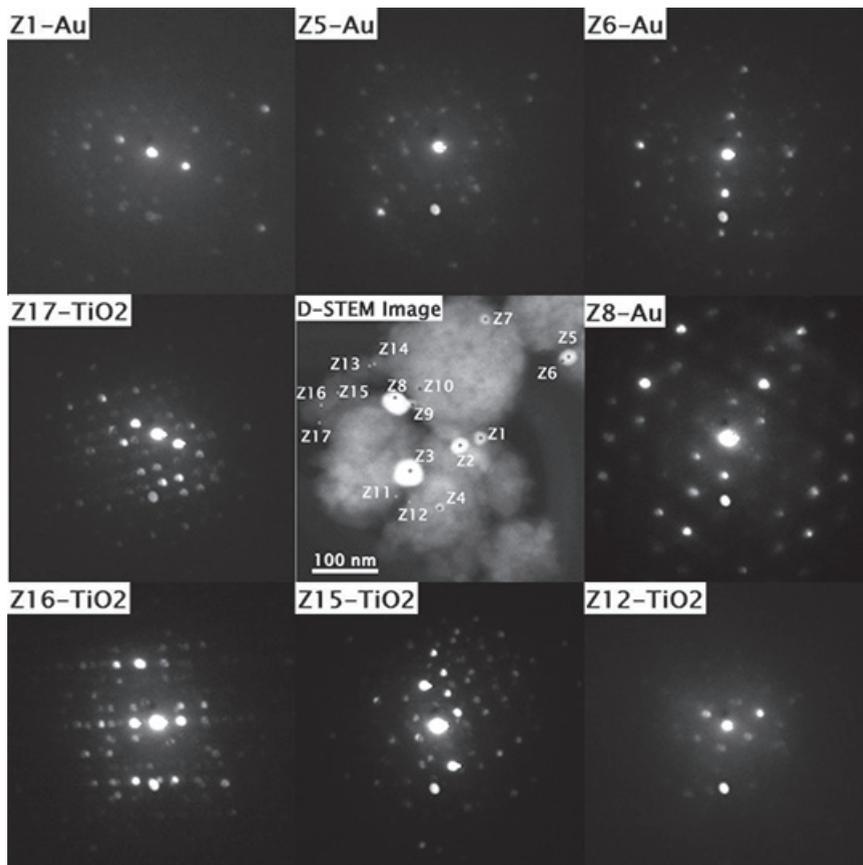
proceden de una de las partículas triangulares de oro, aquí también se ven las distancias interplanares aún más cercanas.

Para obtener estas imágenes con mayor magnificación, se irradia con gran cantidad de electrones áreas pequeñas de la muestra, en muchos casos se generan daños a la muestra, por la irradiación de electrones energéticos. En conclusión, las partículas tanto del  $\text{TiO}_2$  como Au son cristalinas, por eso se ven los planos cristalinos en las imágenes correspondientes.

Si queremos conocer aún más acerca de la estructura cristalina de las muestras, es necesario conocer sus parámetros cristalinos. Las preguntas a responder serían ¿cómo serán las celdas unitarias en cada tipo de material?, ¿qué simetrías tendrán estos materiales en estudio?, ¿cómo están apilados los átomos en las NPs? En muchos tipos de NPs interesa saber cuáles son los parámetros cristalinos, para tal propósito es necesario hacer difracción de electrones a cada una de las NPs. Esto quiere decir que se deben obtener los patrones de difracción de electrones de cada NP (véase la figura 3). Para ello, es necesario hacer incidir un haz de electrones paralelos solamente en una NP.

Normalmente los MET vienen configurados para hacer difracción de electrones desde áreas grandes ( $\geq 0.15 \mu\text{m}$ ). Para estudiar cada NP es necesario tener un haz paralelo con diámetro menor o igual a 30 nm; entonces, cada usuario tiene que reconfigurar el sistema de iluminación del equipo (lentes condensadoras) de acuerdo con su necesidad. En nuestro caso fue necesario reconfigurar la corriente en las lentes del sistema de iluminación del microscopio JEM2200FS en el modo STEM. A este proceso se le conoce como: la configuración del microscopio para un interés específico; esto es como personalizar tu computadora para un uso exclusivo, donde solo instalas el *software* que más utilizas y los botones del teclado se configuran para un propósito específico. De igual forma, el microscopio electrónico también se personalizará, es decir, no se usa en la configuración comercial del fabricante. En este caso, el microscopio JEM2200FS fue configurado para hacer patrón de difracción en el modo STEM, cuyo haz casi paralelo tiene un diámetro del orden de 15 nm (Paraguay-Delgado, *et al.* en preparación). Con esta nueva configuración del equipo se obtuvieron las imágenes de la figura 13 desde la muestra B. La imagen de la parte central se obtuvo con el detector HAADF, imagen en contraste-Z y los patrones de difracción se adquirieron en campo claro (electrones transmitidos en este caso difractados). Se muestran cuatro patrones de difracción correspondientes al oro (figura 13 en su parte superior) y otros cuatro pertenecientes al  $\text{TiO}_2$  (figura 13 en su parte inferior). En la imagen central (D-STEM Image): se marcan las zonas desde donde se obtuvieron los patrones de difracción que se muestran con los nombres Z1-Au, Z5-Au, Z6-Au y Z8-Au (Z# significa las distintas zonas de la imagen central y el Au pertenece al oro). Estas son zonas más brillantes y pertenecen a las partículas de oro, podemos distinguir que de una misma partícula de oro provienen diferentes formas de patrón de difracción, esto quiere decir que la partícula puede estar pegada con otro cristal de oro orientado en distinta dirección (imágenes Z5-Au y Z6-Au). También se muestran los patrones de difracción de las partículas del  $\text{TiO}_2$  con los nombres Z12- $\text{TiO}_2$ , Z15- $\text{TiO}_2$ , Z16- $\text{TiO}_2$  y Z17- $\text{TiO}_2$ . Estos patrones de difracción pertenecen a partículas del  $\text{TiO}_2$  orientadas en diferentes direcciones, por eso las simetrías en cada uno de los patrones de difracción registrados son diferentes. Dichos patrones de difracción no están indexados, lo cual quiere decir que cada punto brillante se debe identificar con la familia de planos cristalinos en la notación de índices de Miller, este proceso puede ser fácil o tedioso. Los patrones de difracción pueden venir desde una partícula o más de una, es decir, pueden estar superpuestas más de una partícula en la zona de estudio. Lo que se mostró con las imágenes de la figura 13, es la capacidad de configurar un microscopio comercial, para la obtención de resultados muy específicos y de gran utilidad para el estudio de NPs. No obstante, en los ejemplos siguientes de este trabajo se mostrarán los patrones completamente indexados para algunos materiales.

**Figura 13.** Patrones de difracción con haz paralelo nanométrico en modo D-STEM, de las partículas de Au y de TiO<sub>2</sub> de forma independiente.



Fuente: Elaboración del autor, imágenes obtenidas en laboratorio CIMAV.

En resumen, este estudio comparativo de las muestras A y B, pudimos distinguir la diferencia entre ellas haciendo uso de las distintas técnicas del MET, usando más de un solo instrumento con diferentes capacidades. Se identificó el contenido de los elementos químicos, donde encontramos que en ambas está presente el TiO<sub>2</sub>, y en la muestra B hay NPs de oro con diferentes formas geométricas. También se encontró que las partículas de TiO<sub>2</sub> y oro son cristalinas, pues se observaron planos cristalinos los cuales fueron confirmados por los patrones de difracción de área selecta y por difracción con haz paralelo nanométrico de cada partícula, dando mejor calidad de información acerca de la cristalinidad de las partículas en estudio.

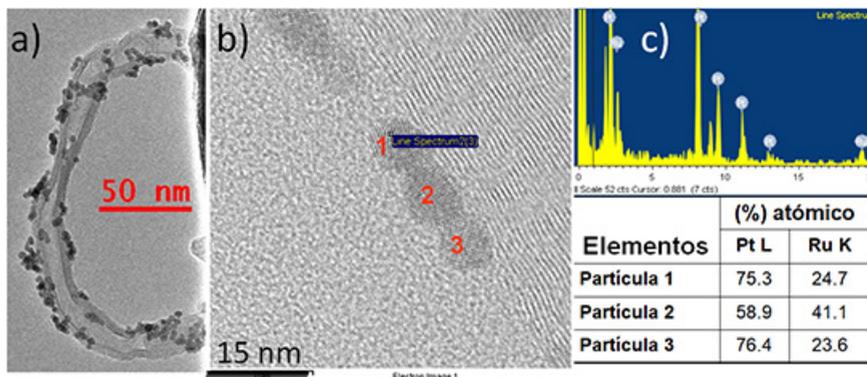
## Estudio de otras partículas nanométricas

### Nanopartículas Pt-Ru sobre nanotubos de carbón

En el área de generación de nuevas fuentes de energía se necesita aleación de NPs para ser usado como electro-catalizador. Por ejemplo, para generar hidrógeno a partir del agua se usan materiales denominados electrocatalíticos. Los mejores catalizadores en este tipo de reacciones químicas están formados por NPs de metales nobles muy costosos como platino, rutenio y paladio. En la imagen de la figura 14, se muestra el estudio de un electro-catalizador, aquí el objetivo fundamental de los investigadores fue sintetizar NPs de Pt-Ru distribuidas sobre nanotubos de carbón, con la composición elemental de igual cantidad —50% de cada elemento— en cada partícula. En la imagen de la figura 14a se ve el nanotubo de carbón decorado con nanopartículas, esta imagen se obtuvo con electrones transmitidos. La medición del diámetro de las partículas dio un promedio de  $3.7 \pm 0.4$  nm, mostrando gran uniformidad. Sin embargo, al hacer el análisis elemental por EDS de tres partículas en modo STEM cuyas posiciones se enumeran en la imagen de la figura 14b, la cuantificación del contenido de los elementos desde los espectros similares a la figura 14c difieren (los resultados se muestra en la tabla adjunta). Los porcentajes atómicos del contenido de Pt y Ru son distintos en cada partícula, de modo que no se cumple con el objetivo fundamental de la síntesis. La tarea es, entonces, encontrar la diferencia y el contenido elemental o compuesto de cada nanopartícula. Para ello, haremos difracción de electrones con un haz nanométrico paralelo a cada partícula.

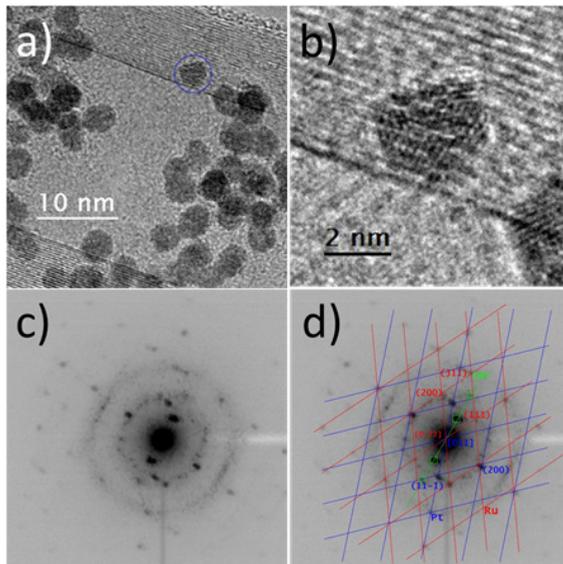
En la figura 15 se muestra la obtención y su indexación de un patrón de difracción de electrones con haz nanométrico paralelo de una sola partícula. Estas imágenes se obtuvieron en modo de transmisión, con el microscopio electrónico Hitachi modelo HT300 ubicado en National Institute for Nano-

**Figura 14.** Partículas bi-metálicas sobre nanotubos de carbón multicapa. a) Imagen TEM; b) imagen STEM; c) espectro por EDS y tabla de la composición elemental de tres partículas.



Fuente: Elaboración del autor, imágenes obtenidas en laboratorio CIMAV.

**Figura 15.** Difracción de electrones con haz manométrico. a) Partículas sobre nanotubo de carbón; b) zoom de la partícula; c) NBD obtenido, y, d) NBD indexado.



Fuente: Paraguay-Delgado, *et al.* (2014).

technology (NINT) localizado en la provincia de Alberta, en la ciudad de Edmonton, Canadá. El equipo tiene la opción para hacer patrón de difracción con haz nanométrico paralelo (NBD *nanobeam electron diffraction*) cuyo diámetro de haz paralelo es del orden de 3.5 nm (Malac *et al.*, 2008).

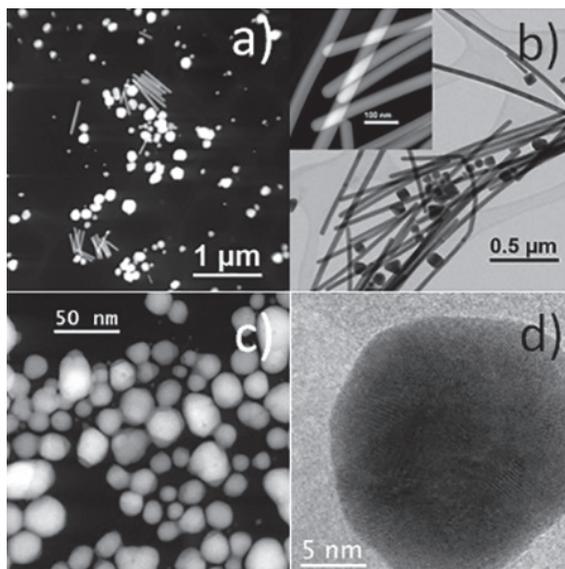
La imagen en la figura 15a muestra la distribución de las partículas sobre un nanotubo multipared. En las imágenes vemos distancias interplanares (figura 15b) de los nanotubos y de las partículas, pero midiendo estas distancias no fue posible identificar si es solo Pt, Ru o ambos. Para distinguirlos, se realizó un patrón de difracción con haz nanométrico paralelo a la partícula marcada en círculo azul (figura 15a). La imagen de la figura 15c muestra el patrón de difracción donde los puntos negros son los haces difractados por una familia de planos cristalinos de la partícula, ahora queda la interpretación adecuada de esta imagen. A este proceso se le llama indexación del patrón de difracción. La imagen de la figura 15d muestra la indexación, donde el arreglo de las líneas azules corresponde al Pt y el arreglo con las líneas rojas corresponde al Ru, además, se identifican los haces difractados por el nanotubo de carbón, mostrados sobre la línea verde. La indexación de los haces difractados por la partícula nos dice que está conformada por Pt-Ru. La información mostrada en este trabajo, complementa la información que publicamos en el artículo “Structure and composition of single Pt-Ru electrocatalyst nanoparticles supported on multiwall carbon nanotubes” (Paraguay-Delgado *et al.*, 2014):

donde se muestra que otras partículas tienen diferente composición. Siendo esta técnica de la difracción con haz nanométrico paralelo útil para identificar las NPs dispersas en un medio (matriz).

### Estudio de nanopartículas de plata

Las NPs metálicas tienen diversas aplicaciones en nanotecnología. En el caso de la plata, se usa en catálisis, electrónica, óptica, ambiental, antibacterial y biotecnología. Para este tipo de aplicaciones se usan las diferentes propiedades fisicoquímicas. Por ejemplo, la frecuencia de oscilación colectiva de las cargas depende de su morfología, es decir, de la forma y tamaño de las partículas. Con estos valores de frecuencia se mejoran la efectividad en las aplicaciones tecnológicas mencionadas, de allí el interés de sintetizar distintas morfologías. En la figura 16 se muestran algunas morfologías de las NPs de plata, la imagen de la figura 16a se adquirió por contraste-Z y en ella se aprecian morfologías alargadas denominadas “varillas”, todas con el mismo diámetro y casi todos del mismo tamaño. No obstante, las partículas de forma casi esférica tienen un diámetro muy variable, no presentan homogeneidad. La imagen de la figura 16b se adquirió con electrones transmitidos y en la esquina superior izquierda se incluye una imagen a mayor magnificación, ambas imágenes nos muestran varillas mucho más largas con diámetro homogéneo del orden de 50 nm. También vemos partículas con formas poligonales

**Figura 16.** NPs de plata, diferentes morfologías: a) varillas y esféricas; b) cubos, triángulos y varillas; c) poliedrales; d) láminas.



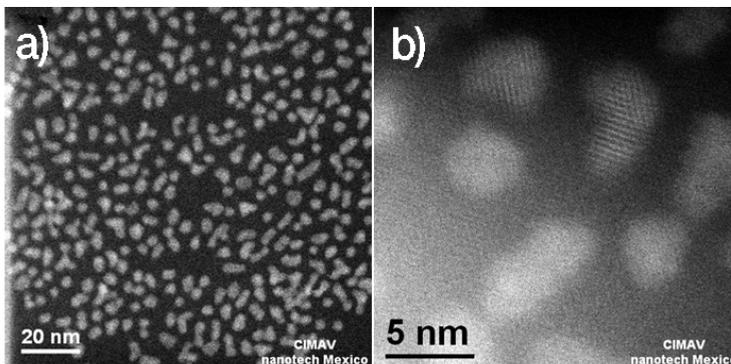
Fuente: Elaboración del autor, imágenes obtenidas en laboratorio CIMAV.

triangulares y cubos con superficie lisa. El estudio de las propiedades de estos materiales se puede encontrar en una tesis de ingeniería química de la Universidad Autónoma de Chihuahua (Escobedo, 2015). La imagen de la figura 16c es de contraste-Z, aquí se ven tamaños muy variados de poliedros con superficie lisa cuyos diámetros son menores a 40 nm. En la figura 16d, vemos la imagen de una sola partícula obtenida con electrones transmitidos, la cual tiene un diámetro aproximado de 18 nm, se pueden observar las distancias interplanares pertenecientes al apilamiento de átomos de plata. Reportamos el estudio detallado de los plasmones de estas partículas en función de la irradiación de la luz y morfología en el artículo “Synthesis of silver colloids with a homemade light source” (Sato-Berru *et al.*, 2018).

### Quantum dots y su encapsulación en polímeros

Los *quantums dots* (QDs) son partículas muy pequeñas en tamaño que se están usando en varias aplicaciones nanotecnológicas. Estas partículas generalmente tienen tamaños menores a 5 nm, la característica principal es que las cargas o los electrones son atrapados en la zona de la partícula y tienen diferentes estados energéticos, con lo cual actúan como átomos gigantes con niveles de energía cuantizados. Las imágenes de la figura 17 son de QDs de selenuro de cadmio (CdSe): esta imagen se adquirió con el detector de contraste-Z, donde se ve una distribución uniforme sin aglomeraciones en cada uno de ellos (figura. 17a) con tamaño promedio del orden de 4 nm. En el caso de la figura 17b, vemos las distancias interplanares, demostrando que cada partícula es cristalina. Reportamos el estudio más detallado de estas partículas en el diseño de un nanosensor de transferencia de energía por resonancia de fluorescencia en el artículo publicado en la revista *Science of Advanced Materials* (Tirado-Guizar *et al.*, 2014).

**Figura 17.** QDs de CdSe, imágenes obtenidas en contraste-Z mostrando: a) dispersidad de cada uno, y sus, b) planos cristalinos.



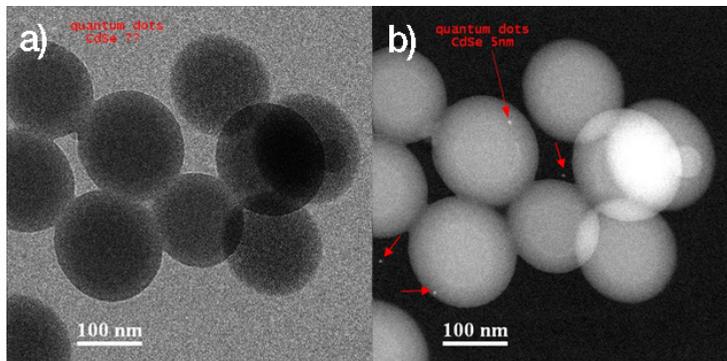
Fuente: Elaboración del autor, imágenes obtenidas en laboratorio CIMAV.

Una de las aplicaciones más prometedoras de los QDs es su propiedad de fluorescencia. En el caso del CdSe, encapsulando las partículas en polímeros se puede mantener su estabilidad química y sus propiedades de emisión por mucho tiempo. En la imagen de la figura 18a vemos las esferas del polímero polystireno (látex): el propósito fue encapsular las partículas de CdSe en estas esferas, pero no se ve la presencia del QDs en esta imagen obtenida con electrones transmitidos. Sin embargo, cuando la imagen se adquiere en contraste-Z (figura 18b) vemos los puntos brillantes indicados con flechas de color rojo, los QDs, donde 2 partículas (QDs) están fuera del látex y otras dos sobre el látex. La intención de los investigadores fue encapsular dentro del látex, en este caso no se encapsuló. Para estar encapsulados, los puntos brillantes deberían estar en el centro de cada esfera de látex vista desde cualquier dirección. Esto debido a que en el MET vemos siempre objetos de tres dimensiones proyectados en dos dimensiones. Los QDs se ven brillantes en esta imagen (figura 18b) debido a que el núcleo del átomo de Cd es grande, razón por la cual dispersa una mayor cantidad de electrones, por ende, registra más electrones el detector de contraste-Z. Estas imágenes son un ejemplo adecuado para entender que los elementos pesados dispersan más los electrones debido al tamaño de su núcleo —por eso el CdSe brilla más—. Nuestros colegas del CIMAV reportaron un estudio del proceso de encapsulación y sus propiedades fluorescentes en el artículo “Effect of synthesis variables on the fluorescence properties of CdSe-polystyrene látexes” (Rubio-Ríos *et al.*, 2012).

### Materiales laminares o en dos dimensiones.

En los últimos años han llamado la atención los materiales en dos dimensiones o materiales con crecimiento en capas. Los materiales más populares en esta categoría son los sulfuros de metales: NbTe<sub>2</sub> (teleruro de niobio) y grafenos, entre otros.

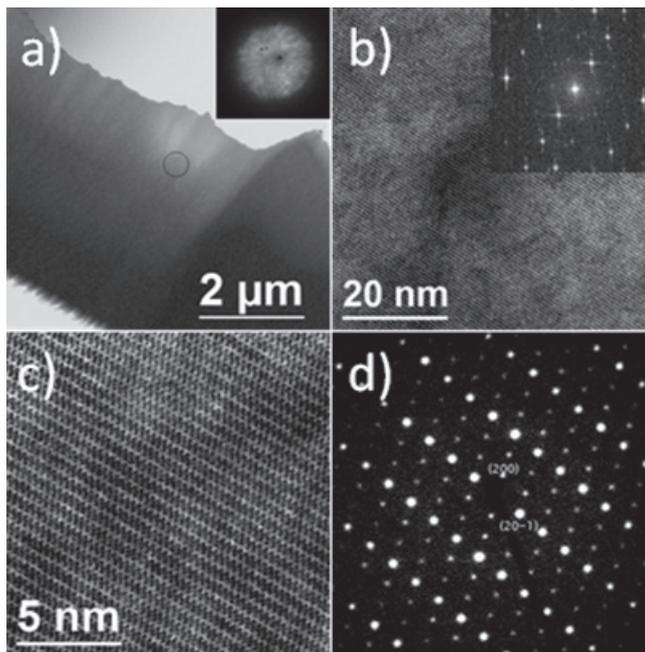
**Figura 18.** Quantum dots de CdSe: a) imagen en campo claro, y, b) imagen en contraste-Z.



Fuente: Elaboración del autor, imágenes obtenidas en laboratorio CIMAV.

Hoy en día, el caso del  $\text{NbTe}_2$  es relevante por su crecimiento en dos dimensiones. En el estudio de este material se adquieren todas las imágenes con electrones transmitidos. En la imagen de la figura 19a vemos la zona de estudio a baja magnificación por MET y en la esquina superior derecha se ve con más claridad. Vemos esta imagen a mayor magnificación en la figura 19b, donde se muestran claramente las distancias interplanares y su transformada de Fourier, ubicada en la esquina superior derecha. En la imagen de la figura 19c se ve con más claridad la columna de átomos y se puede observar que las líneas más oscuras corresponden a las regiones de Van der Waals que separan las capas Te-Nb-Te. También, la cristalinidad del material fue confirmada con el patrón de difracción de electrones (figura 19d): la variación sistemática de las intensidades en esta imagen nos dice que el material presenta una simetría bien ordenada. En el proceso de indexación, se determinó que la de mayor intensidad corresponde a la familia de planos (20-1) y el otro al (200). Con estos dos planos se determinó el eje de zona del cristal en la orientación [010]. Publicamos un estudio detallado acerca de este material en el artículo “Crystalline structure, electronic and lattice-dynamics properties of  $\text{NbTe}_2$ ” (Barajas-Aguilar *et al.*, 2018).

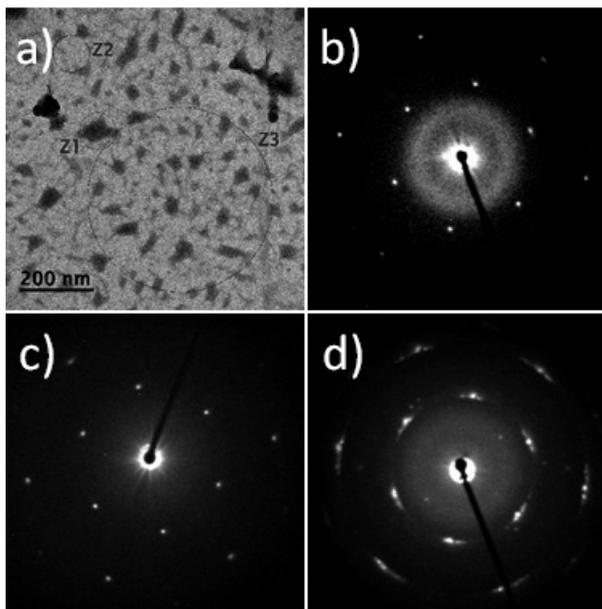
**Figura 19.** Imágenes del  $\text{NbTe}_2$ : a) zona del estudio; b) a mediana magnificación; c) imagen con mayor resolución, se ven las columnas de átomos, y, d) patrón de difracción en el eje de zona [010].



Fuente: Figura 19a) elaboración del autor. Figuras 19b), c) y d): Barajas-Aguilar, *et al.* (2018).

La otra familia de materiales en dos dimensiones son los grafenos. Estos materiales son capas de grafito que van desde una sola capa hasta varias, hay muchos reportes y aplicaciones tecnológicas de este material. En la figura 20, vemos la imagen con electrones transmitidos y tres patrones de difracción obtenidos desde las zonas marcadas con círculos de color azul sobre la imagen (figura 20a). El patrón de difracción mostrado en la figura 20b es de la parte más oscura de la imagen zona uno (Z1); en este patrón, vemos que las intensidades presentan una simetría hexagonal, esta simetría nos muestra cómo son los arreglos atómicos en este material. En el grafeno, los átomos de carbono están enlazados formando una simetría hexagonal. Sin embargo, en este mismo patrón se ve un círculo ancho difuso, este tipo de dispersión de electrones es generado por átomos que no forman cristales y se denominan amorfos. Entonces, en esta zona de la imagen más oscura hay material amorfo, razón por la cual se ve más oscura. El patrón de difracción mostrado en la figura 20c se adquirió de la parte más clara de la imagen zona dos (Z2): en este patrón no está la banda ancha, esto quiere decir que no hay material amorfo en las zonas claras del material. Finalmente, el patrón de difracción mostrado en la figura 20d es de la zona tres (Z3): donde se muestran las intensidades alargadas intermitentes a lo largo de los círculos concéntricos, pero siguen manteniendo una simetría hexagonal. La forma de las intensi-

**Figura 20.** Estudio del grafeno, vemos: a) imagen y zonas desde donde se obtienen los patrones de difracción; b) Z1; c) Z2, y, d) Z3.



Fuente: Elaboración del autor, imágenes obtenidas en laboratorio CIMAV.

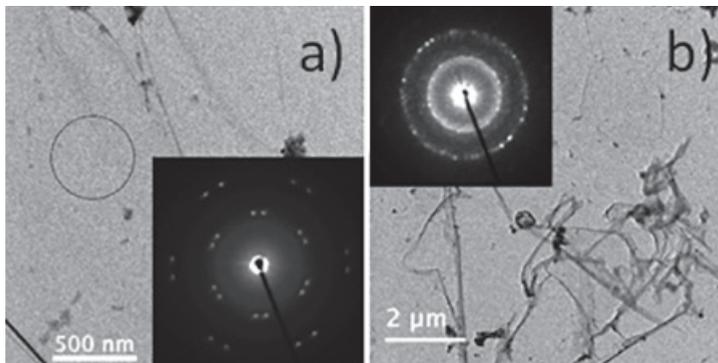
dades se debe a que provienen de muchos pedacitos de grafeno superpuestos, pero girados ligeramente entre ellos, además, está presente la banda ancha proveniente de las zonas amorfas. En conclusión, este material es una superposición de partículas de grafeno con partículas amorfas. Es decir, una parte del material se está acumulando desordenadamente sin formar material cristalino y se encuentra en las zonas más oscuras de la imagen (figura 20a). Este tipo de partículas se obtienen debido a la secuencia de procesos y/o síntesis usados para obtener el material.

Para la obtención del grafeno se usan diferentes procesos fisicoquímicos. Entre estos métodos esta la exfoliación (deshojar) del grafito cristalino con ayuda de procesos químicos o por molienda, etc. (Krishnamoorthy *et al.*, (2013). La figura 21 muestra las imágenes del proceso en la obtención del grafeno, ambas imágenes se tomaron con electrones transmitidos y también se incluye su patrón de difracción respectivo para ambas. En la imagen de la figura 21a vemos zonas uniformes y algunas líneas oscuras; aquí, el patrón de difracción se adquirió desde la zona uniforme, donde sigue presentando una simetría hexagonal, pero con dos intensidades separadas a la misma distancia. Este tipo de intensidades provienen de dos cristales rotados uno con respecto al otro, debido a que en la zona marcada con círculo azul se encuentran dos cristales superpuestos. En el caso de la imagen de la figura 21b, vemos varias líneas oscuras, las cuales son grafenos enrollados y superpuestos, su respectivo patrón de difracción muestra dos círculos concéntricos que pertenecen al grafeno. En este caso se ven las intensidades formando dos círculos, debido a que hay haces difractados de grafenos en muchas direcciones.

### Óxidos semiconductores

La síntesis y estudio de las diferentes morfologías de los óxidos semiconductores se han incrementado a la fecha. La aplicación tecnológica de estos ma-

**Figura 21.** Imagen y patrón de difracción del grafeno por exfoliación, patrón de difracción desde: a) superposición de dos cristales, y, b) superposición de grafenos enrollados.

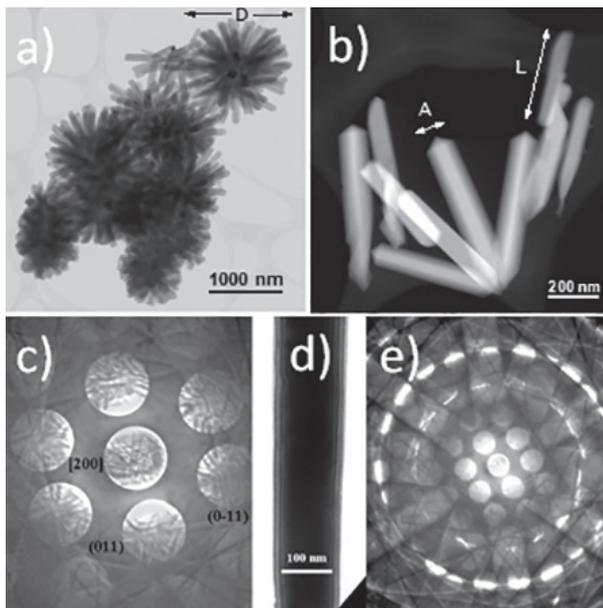


Fuente: Elaboración del autor, imágenes obtenidas en laboratorio CIMAV.

teriales depende de la forma, tamaño y composición. Estos óxidos se están aplicando en optoelectrónica, que son dispositivos que convierten señales ópticas en señales eléctricas o viceversa. Entre otros usos, también se utilizan para aplicaciones fotocatalíticas y sensores de gases.

Las imágenes en la figura 22 muestran la morfología del óxido de estaño ( $\text{SnO}_2$ ) en forma de varillas y en la figura 22d su patrón de difracción de electrones con haz convergente desde una sola varilla mostrada. Las imágenes de las figuras 22a y 22b fueron obtenidas con electrones transmitidos y contraste-Z, respectivamente. En la primera imagen se ve el crecimiento desde la parte central siguiendo la dirección radial y en la imagen (figura 22b) en contraste-Z vemos la superficie lisa de cada uno de ellos con terminación piramidal, mostrando claramente las aristas en cada uno de ellos. Las dos imágenes en las figuras 22c y 22e son patrones de difracción con haz convergente, la primera es la parte central y la segunda muestra la simetría del material y las diferentes zonas de HOLZ (*high order laue zones*) círculos concéntricos intermitentes. Procesando estos patrones de difracción es posible encontrar características de las partículas e información perteneciente de la celda unitaria. La optimización del proceso de síntesis de estas morfologías esta publicado en el artículo “Shape and size contro-

**Figura 22.** Crecimiento de  $\text{SnO}_2$ : a) forma de flores; b) detalle da cada varilla; c) patrón de difracción con haz convergente parte central; d) varilla orientada en el eje de zona [200], y, e) difracción de haz convergente mostrando la simetría del cristal de  $\text{SnO}_2$ .



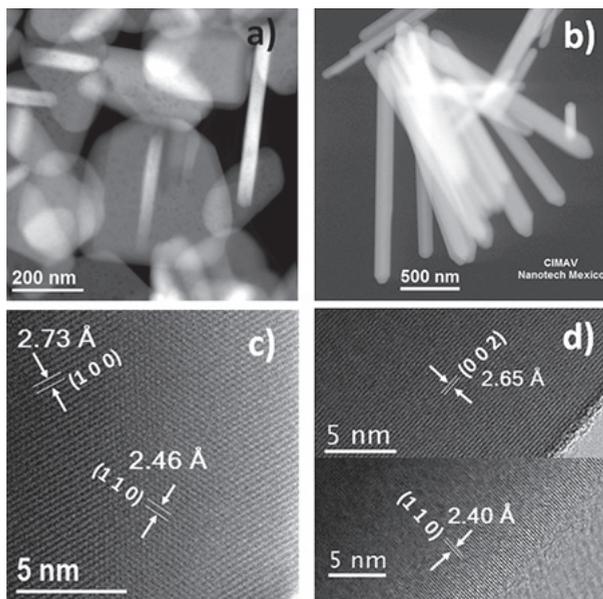
Fuente: a) elaboración del autor, imagen obtenida en laboratorio CIMAV; b)-e), Vázquez et al. (2016).

lled growth of SnO<sub>2</sub> nano-particles by efficient approach” (Vázquez *et al.*, 2016).

Las imágenes de la figura 23 muestran dos morfologías de las partículas de óxido de zinc (ZnO). Las figuras 23a y 23b son imágenes obtenidas con electrones dispersados por el núcleo (contraste-Z): la primera es de partículas laminares y la segunda de las varillas. Algunas partículas laminares se ven de perfil con un espesor aproximado de 50 nm y la terminación de las varillas es una pirámide con base hexagonal. En las imágenes de las figuras 23c y 23d se muestran las distancias interplanares correspondientes en ambos tipos de partículas, los valores de la medición pertenecen al ZnO y se asigna a la familia de planos en la notación de índices de Miller. La aplicación de estas partículas puras y con dopantes en la detección de gases se señala en el artículo “Role of oxygen vacancies and in-doping on the sensing performance of ZnO particles” (Montes-Fonseca *et al.*, 2017). Recientemente publicamos otras variantes en la morfología de estas partículas, en relación con su efectividad como material antifúngico: “Shape-dependent antifungal activity of ZnO particles against phytopathogenic fungi” (Pariona *et al.*, 2020).

Hay muchos tipos de materiales nanométricos en estudio, espero que los ejemplos mostrados permitan entender la aplicación del MET en el estudio de nanopartículas, ya que esta es la base de la nanotecnología.

**Figura 23.** Morfologías del ZnO: a) laminas; b) varillas y distancias interplanares de: c) laminas, y, d) varillas.



Fuente: Elaboración del autor, imágenes obtenidas en laboratorio CIMA V.

## Conclusión

Los microscopios electrónicos se deben usar según sea la necesidad para obtener resultados específicos del material. Cada instrumento tiene sus capacidades limitadas y los usuarios deben saber elegir el instrumento adecuado para obtener el resultado necesario, con la finalidad de caracterizar completamente el material en estudio. Es importante tener presente cómo ocurre la interacción del haz de electrones con la materia para poder interpretar adecuadamente las imágenes obtenidas.

Hoy en día, todos los microscopios comerciales tienen la opción de reconfigurar las lentes de acuerdo al interés del usuario para obtener resultados específicos, siendo esta una alternativa para hacer investigación en el estudio de las partículas nanométricas.

Es de gran importancia conocer a detalle las características del MET a usar, sus modalidades de trabajo y sus detectores, para obtener resultados experimentales en su máxima capacidad y no subutilizarlo.

Se mostró el estudio de varios nanomateriales como ejemplo en diferentes microscopios electrónicos con la configuración comercial y con la configuración específica de acuerdo con el interés del usuario. Aún quedan más opciones y variantes en la configuración de los tres equipos del CIMAV para hacer otros estudios específicos de los materiales.

Con los ejemplos presentados en este trabajo, los futuros usuarios del MET (estudiantes en el área de ciencia de materiales o nanotecnología) habrán obtenido elementos y criterios para abordar casos particulares en la interpretación de resultados experimentales procedentes de distintos microscopios.

## Referencias

- Barajas-Aguilar, A. H., Irwin, J. C., Garay-Tapia, A. M., Schwarz, T., Paraguay-Delgado F., Brodersen, P. M. y Sandoval, S. J. J. (2018). Crystalline structure, electronic and lattice-dynamics properties of NbTe<sub>2</sub>. *Scientific reports*, 8(1): 1-14. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-35308-4>
- Escobedo, Priscila Ivette. (2015). Optimización de parámetros geométricos en nanotubos de plata, tesis para ingeniero químico. Universidad autónoma de Chihuahua, México.
- Espinosa Magaña, F. (2016). Laboratorio Nacional de Nanotecnología-CIMAV. *Mundo Nano. Revista Interdisciplinaria en Nanociencias y Nanotecnología*, 9(16): 157-167.
- Krishnamoorthy, K., Kim, G. S. y Kim, S. J. (2013). Graphene nanosheets: ultrasound assisted synthesis and characterization. *Ultrasonics sonochemistry*, 20(2): 644-649. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2012.09.007>
- Malac, M., Beleggia, M., Taniguchi, Y., Egerton, R. F., y Zhu, Y. (2008). Low-dose performance of parallel-beam nanodiffraction. *Ultramicroscopy*, 109(1): 14-21. <https://doi.org/10.1016/j.ultramicro.2008.07.004>

- Montes Fonseca, F., Olive Méndez, S. F., Holguín Momaca, J. T., Alonso Núñez, G. y Paraguay-Delgado, F. (2017). Role of oxygen vacancies and in doping on the sensing performance of ZnO particles. *Physica status solidi c*, 14(1-2): 1600226. <https://doi.org/10.1002/pssc.201600226>
- Paraguay-Delgado, F., Malac, M., y Alonso-Nuñez, G. (2014). Structure and composition of single Pt-Ru electrocatalyst nanoparticles supported on multiwall carbon nanotubes. *Materials Research Express*, 1(4): 045026. <https://doi.org/10.1088/2053-1591/1/4/045026>
- Pariona, N., Paraguay-Delgado, F., Basurto-Cereceda, S., Morales-Mendoza, J. E., Hermida-Montero, L. A., y Mtz-Enriquez, A. I. (2020). Shape-dependent anti-fungal activity of ZnO particles against phytopathogenic fungi. *Applied Nano-science*, 10(2): 435-443. <https://doi.org/10.1007/s13204-019-01127-w>
- Rubio-Ríos, A., Aguilar-Castillo, B. A., Flores-Gallardo, S., Hernández-Escobar, C. A., Zaragoza-Contreras, E. A., Zhao, Z., y Carpenter, M. A. (2012). Effect of synthesis variables on the fluorescence properties of CdSe-polystyrene látexes. *Journal of Polymer Research*, 19(3): 9833. <https://doi.org/10.1007/s10965-012-9833-5>
- Sato-Berru R. Y, Vasquez-Olmos A. R, Mejia-Uriarte E. V, Mata-Zamora M. E, Solis-Gomez A, Paraguay-Delgado F, Saniger J. M. (2018). Synthesis of silver colloids with a homemade light source. *Journal of Cluster Science*, 29(4): 719-724. <https://doi.org/10.1007/s10876-018-1392-4>
- Tirado-Guizar, A., Pina-Luis, G., Paraguay-Delgado, F., y Ramirez-Herrera, D. (2014). Size-dependent enhanced energy transfer from tryptophan to CdSe/mercapto-propionic acid quantum dots: a new fluorescence resonance energy transfer nanosensor. *Science of Advanced Materials*, 6(3): 492-499. <https://doi.org/10.1166/sam.2014.1742>
- Vásquez, F. C., Paraguay-Delgado, F., Morales-Mendoza, J. E., Antúnez-Flores, W., Lardizabal, D., Alonso-Nuñez, G., y Berhault, G. (2016). Shape and size controlled growth of SnO<sub>2</sub> nano-particles by efficient approach. *Superlattices and Microstructures*, 90: 274-287. <https://doi.org/10.1016/j.spmi.2015.12.014>



# Microscopía electrónica de transmisión para observar átomos: principios y desarrollo\*

## Transmission electron microscopy to look at atoms: principles and development

Héctor A. Calderón\*\*

**ABSTRACT:** Electron microscopy is an important tool in characterizing nanomaterials. In its high resolution mode, it is possible to obtain images of the columns of atoms that make up a sample or if the thickness is a monolayer, images of atoms can be obtained. Normally the product image has specific intensities that require proper interpretation, additionally there is a need to consider the electron beam interaction with the sample. In this work, some important characteristics of high resolution and atomic resolution electron microscopy are described. Examples are given with observations in different materials. The beam-sample interaction is given special attention in order to avoid sample damage by an intense electron beam.

**KEYWORDS:** electron microscopy, atomic resolution, spatial resolution, simple-beam interaction, electron dose.

**RESUMEN:** La microscopía electrónica es una herramienta importante en la caracterización de nanomateriales. En su modalidad de alta resolución, es posible obtener imágenes de las columnas de átomos que conforman una muestra, o si el espesor es una monocapa, pueden obtenerse imágenes de átomos. Normalmente, el producto es una imagen con intensidades específicas, que para ser interpretado correctamente, se debe considerar la interacción del haz electrónico con la muestra. En este trabajo, se describen algunas características importantes de la microscopía electrónica de alta resolución y de resolución atómica. Asimismo, se proporcionan ejemplos de observaciones en materiales específicos. Se da atención especial a la interacción de los electrones con la muestra para obtener imágenes que reproduzcan la distribución atómica genuina y sin modificación por un haz electrónico demasiado intenso.

**PALABRAS CLAVE:** microscopía electrónica, resolución atómica, resolución espacial, interacción del haz, dosis electrónica.

## Introducción

En el ámbito del día a día se considera que la microscopía en general es un tema que no requiere mayor esfuerzo. Se trata de tomar fotografías y eso es fácil.

---

Recibido: 3 de abril de 2020.

Aceptado: 19 de mayo de 2020.

\* Reconocimiento: El trabajo de microscopía se realizó en la Molecular Foundry del Laboratorio Nacional de Berkeley (LBNL), en instalaciones del National Center for Electron Microscopy (NCEM). El trabajo en el Molecular Foundry fue financiado por el Office of Science, Office of Basic Energy Sciences, del U.S. Department of Energy under Contract No. DE-AC02-05CH11231.

\*\* Instituto Politécnico Nacional, Escuela Superior de Física y Matemáticas, UPALM Zacatenco. CDMX, 07883. México.

Correo electrónico: calderonbenavidesh@gmail.com

Este enfoque se comparte en películas o series de televisión y se encuentra en el sentido común de muchas personas. Cualquiera puede tomar fotografías. En realidad, la microscopía tiene relación con imágenes y cuando se trata de luz visible quizás en algún tipo de simplificación, esto pueda “reducirse” a tomar fotografías. Sin embargo, no hay por qué simplificar el arte de tomar fotografías en donde la luz y sus efectos nunca pueden considerarse simples. Por otro lado, la microscopía electrónica sufre de una sobre simplificación similar, incluso cuando las imágenes que se obtienen no pueden considerarse fotografías. En especial, la microscopía electrónica de transmisión (TEM) o de transmisión barrido (STEM) forma imágenes que resultan de la interacción de los electrones como radiación con el objeto o muestra. En algunos casos, las imágenes son fruto de fenómenos de interferencia o de dispersión incoherente. Además, el objetivo principal de la microscopía ha sido durante mucho tiempo determinar las posiciones atómicas en las estructuras que la materia puede tener y para ciertos objetivos relacionarlas con las propiedades de los materiales. El concepto de resolución espacial o mínima distancia que puede distinguirse en una imagen representó durante mucho tiempo las características de los microscopios electrónicos. Con el desarrollo de correctores de aberración, la resolución espacial ha evolucionado a resolución atómica, es decir, la capacidad para distinguir el tipo de átomos directamente en las imágenes. La microscopía no es simple y se necesita mucho empeño para dominar la técnica y conocimiento de la interacción entre electrones y objeto para interpretar las imágenes que se producen.

Este artículo trata sobre el desarrollo de la microscopía electrónica de transmisión, sus avances y principalmente sobre la necesidad de conocer el instrumento y el análisis óptimo de las imágenes para satisfacer el objetivo de la técnica. Esto es, resolver la posición y la naturaleza de los átomos que constituyen un objeto a caracterizar. Para iniciar, se describe la física del instrumento, su construcción básica o lentes que lo conforman y las técnicas de análisis, para concluir con varios ejemplos.

## Desarrollo de la microscopía

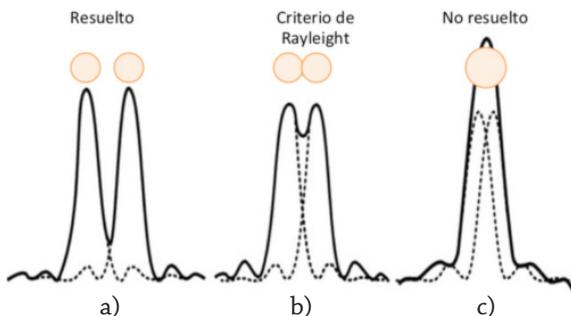
La microscopía electrónica de transmisión es de importancia especial por su capacidad para resolver la estructura de la materia y determinar su composición química. Sus metas consisten en determinar el arreglo de átomos en una muestra y, al mismo tiempo, determinar la composición química correspondiente. Los parámetros relevantes en esta disciplina son la resolución espacial, la resolución analítica y la sensibilidad del método.

La microscopía electrónica da inicio con los estudios de Ernst Ruska quien logra el premio Nobel de Física en 1986, por su trabajo sobre los fundamentos de la óptica de electrones y el diseño del primer microscopio electrónico en 1933, con un instrumento capaz de lograr una amplificación de 400x. El trabajo teórico de Louis de Broglie inicia el desarrollo del microscopio elec-

trónico, al encontrar que la longitud de onda es inversamente proporcional al momento. En 1926, Hans Busch descubre que los campos magnéticos pueden actuar como lentes al provocar que los electrones converjan a un foco. Max Knoll y Ernst Ruska desarrollan en 1931 una lente electrónica a partir de embobinados electromagnéticos que puede usarse para obtener una imagen de un objeto irradiado con electrones. Al acoplar dos lentes de electrones se produjo un microscopio electrónico primitivo en 1933, que claramente superó a los microscopios que usan radiaciones en el espectro visible, es decir, microscopios ópticos (The Nobel Prize in Physics 1986). Las ventajas de usar electrones para generar imágenes se fundamentan en la gran resolución espacial que puede obtenerse. La resolución espacial es la distancia más pequeña que puede distinguirse en una imagen y es directamente proporcional a la longitud de onda de la radiación en uso. La figura 1 muestra el concepto de resolución e ilustra el Criterio de Rayleigh que define a la resolución.

La mínima distancia de separación  $d$  resuelta por un microscopio está dada por  $d = \lambda / \mu \text{ sen}\theta$ , en donde  $\lambda$  es la longitud de onda utilizada,  $\mu \text{ sen}\theta$  resume las características del medio ( $\mu$  es el índice de refracción) y la dispersión que se asume a través de una rendija circular. La resolución y  $d$  son inversamente proporcionales, por lo cual, este criterio sugiere que para mejorar la resolución es necesario disminuir la longitud de onda y emplear medios con altos índices de refracción. En un microscopio óptico que utiliza luz visible, la resolución es cercana a 400 nm. Por otro lado, la longitud de onda de electrones con una energía de 100 keV es de aproximadamente 0.0037 nm. Estas características podrían fijar un poder de resolución ilimitado, pero es necesario considerar la mecánica cuántica que establece las características de los electrones como ondas y, por lo tanto, introduce una incertidumbre en la determinación de la posición. Lo anterior se convierte en un límite teórico a la resolución para los potenciales de aceleración que normalmente se usan (100 keV a 300 keV) del orden de 0.05 a 0.1 nm. Este límite no fue fácilmente alcanzable debido a otro aspecto técnico de impor-

**Figura 1.** Resolución espacial o mínima distancia distinguible en una imagen. a) Máximos de intensidad resueltos; b) Criterio de Rayleigh de resolución; c) máximos de intensidad no resueltos.



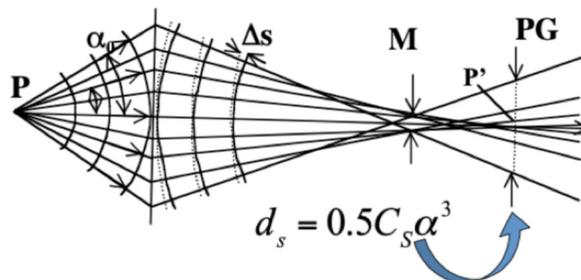
Fuente: Elaboración del autor.

tancia. La resolución espacial se ve limitada por la presencia de aberraciones en las lentes electromagnéticas. Hasta aproximadamente 2002, la resolución real de los microscopios electrónicos solo alcanzó niveles cercanos a 0.2 nm.

Las aberraciones de las lentes electromagnéticas limitan severamente la resolución de los microscopios electrónicos. Las aberraciones más importantes son el astigmatismo, la aberración esférica, la aberración cromática y el coma. Estas aberraciones han podido corregirse con aditamentos y dispositivos especiales para alcanzar actualmente una resolución espacial de aproximadamente 0.1 nm, un valor muy cercano al límite de resolución teórico. La aberración se presenta en todas las lentes del microscopio electrónico y actualmente se conocen dispositivos de corrección para dos tipos de aberración, la cromática y la esférica, así como dispositivos monocromadores que permiten obtener imágenes con un rango limitado de longitudes de onda. La aberración esférica es uno de los factores limitantes más importantes para la resolución espacial de un microscopio electrónico de transmisión. En este caso, la radiación electrónica que impacta los extremos de la lente es enfocada en un punto diferente a aquella que cruza la lente cerca del eje óptico. Ópticamente la dispersión del enfoque produce imágenes con menor resolución o borrosas. La figura 2 ilustra este efecto, un punto en el objeto (ilustrado con P) se convierte en un disco de confusión en M debido a la diferencia de enfoque de los haces. El Telescopio Espacial Hubble también tuvo este problema y fue necesario corregirlo a través de un dispositivo corrector de aberración esférica. La figura 3 ilustra las diferencias en resolución sin y con corrección de aberración esférica para este telescopio. Los efectos negativos sobre la nitidez y calidad de la imagen se aprecian claramente.

En cuanto a la aberración cromática, se manifiesta cuando la radiación electrónica tiene diferencias en el potencial de aceleración y puede corregirse también por medio de dispositivos especiales incluyendo correctores y monocromadores.

**Figura 2.** Diagrama de la aberración esférica que provoca un disco de confusión.  $C_s$  es la constante de aberración particular de una lente,  $\alpha$  es el ángulo de convergencia y M se sitúa en el plano de mínima confusión. PG es el plano de imagen gaussiano (rayos paraxiales) y se muestran los frentes de onda con (línea continua) y sin aberración esférica (línea punteada).



Fuente: Elaboración del autor.

**Figura 3.** Imágenes de una cámara de rango amplio en el Telescopio Espacial Hubble. Efecto cualitativo del efecto de la aberración esférica en la calidad de la imagen. NASA Servicing Mission SM1. Shuttle misión: STS-61.



Fuente: Elaboración del autor.

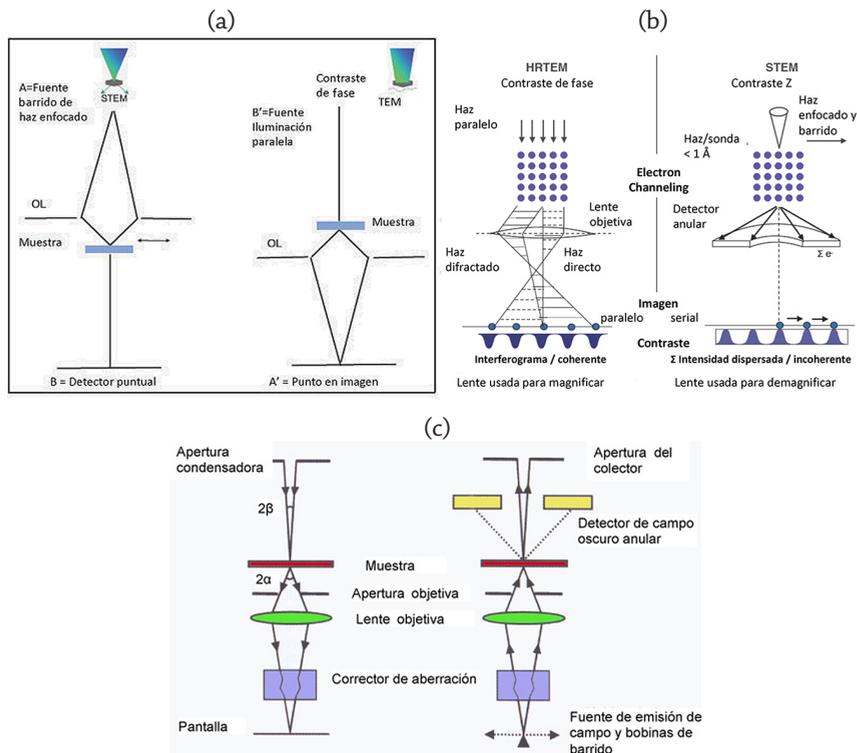
## La microscopía electrónica de transmisión

Los electrones en su carácter de ondas pueden usarse para obtener imágenes en el microscopio electrónico. Existen dos tipos de microscopios electrónicos de alta resolución espacial, el microscopio de transmisión (TEM) y aquel de transmisión barrido (STEM), aunque en algunos casos, se integran ambas modalidades en un solo instrumento. En esencia son similares y pueden relacionarse a partir del llamado principio de reciprocidad que se ilustra en la figura 4. Las figuras 4a-b muestran que las trayectorias de los electrones y los procesos de dispersión elástica, tienen una simetría inversa en función del tiempo; mientras en el TEM, la iluminación paralela produce un punto de interferencia en la imagen (contraste de fase), en el STEM, la iluminación se enfoca en la muestra y se produce un punto en el detector. La figura 4c incluye un giro de  $180^\circ$  para hacer más obvio el concepto de simetría inversa. Por supuesto, este argumento en óptica ondulatoria es válido para un haz infinitamente pequeño y las implementaciones técnicas son de importancia debido a que la fuente de electrones no es puntual. De esta manera, cuando se usa un TEM, la iluminación es paralela (figura 4b) y produce una imagen directa desde el primer instante del tiempo, es única y la misma, siempre y cuando el haz no altere la constitución de la muestra. Toda la imagen transmitida en TEM se forma al mismo tiempo y es producto de interferencia coherente entre el haz electrónico y las columnas de átomos en la muestra, asumiendo un material cristalino, esto es, un interferograma coherente, como se indica en la figura 4b. Un punto en la imagen representa un máximo de intensidad de interferencia y no coincide con las posiciones atómicas del objeto. En este caso, las lentes se usan para amplificar la imagen. La imagen no muestra posiciones exactas de los átomos en la muestra sino máximos de intensidad del interferograma, este interfero-

grama y su contraste de fase, en cuanto a distancias entre máximos de intensidad, tienen valores muy cercanos a aquellos de la red cristalina, pues se forman picos de intensidad con distancias muy similares a aquellas de la red que dan origen a la interferencia. Sin embargo, sus características y contraste no pueden relacionarse de manera intuitiva con la naturaleza de la muestra. De manera natural es posible lograr una buena resolución espacial, pero las imágenes simples de contraste de fase (TEM) contienen un contraste atómico o relacionado con la constitución de la muestra que puede interpretarse solo cuando se considera la interferencia. En el caso de un STEM, hay varios métodos de operación y normalmente se utiliza el campo oscuro con un detector anular para imágenes con resolución atómica. En este caso, se obtiene un contraste incoherente a altos ángulos de dispersión y que puede relacionarse con la constitución de la muestra, es decir, se tiene contraste Z que depende del número atómico, o sea, de la naturaleza de los átomos en interacción con el haz electrónico. En consecuencia, el haz electrónico debe enfocarse al mínimo tamaño posible y para formar una imagen completa se realiza un barrido en áreas seleccionadas. A menor área barrida, mayor se vuelve la amplificación. La imagen se forma moviendo el haz y procesando la intensidad dispersada en cada posición del haz durante el barrido. Entonces, en general se emplea un haz enfocado para formar imágenes en una secuencia de puntos y se logra barriendo la muestra en un área predeterminada y acorde con la magnificación deseada. La intensidad dispersada a altos ángulos de dispersión en un detector anular depende de las características de la muestra, ver figura 4b. En resumen, la figura 4 ilustra que en TEM de alta resolución (HRTEM) se obtiene un contraste de la fase por interferencia y en el STEM se obtiene un contraste Z (número atómico) basado en intensidades dispersadas pero incoherentes y relacionado con la naturaleza de la muestra. En muchos casos, el TEM y el STEM utilizan correctores de aberración que van situados como se indica en la figura 4c, y como consecuencia del proceso de formación de imágenes arriba descrito. En el TEM, la imagen se forma usando una lente objetiva de manera que la corrección de aberración instrumental se realiza en ese punto para lograr una imagen libre de aberración o corregida. En el STEM, el corrector de aberración se coloca en la lente condensadora de manera que pueda corregirse la aberración del haz que barre la muestra y la imagen resultante esté libre de aberración.

Las características de los electrones y la corrección de aberraciones han hecho posible alcanzar los límites teóricos de la resolución espacial. La figura 5 ilustra el desarrollo tecnológico de la microscopía electrónica como función del tiempo. La fortaleza de los electrones como radiación es clara y supera a otras radiaciones como neutrones o rayos X por su mayor brillantez, una gran resolución espacial, mayor dispersión elástica (sin pérdida de energía) y por su gran interacción con la materia. Es precisamente en esta última parte en donde la integridad de los materiales nano y microestructurados debe considerarse. No puede asumirse que la explotación de las propiedades mencionadas al usar un haz de electrones y en el borde de la tecnología, mantendrá

**Figura 4.** Tipos de microscopios electrónicos con alta resolución, TEM (Transmisión) y STEM (Transmisión/barrido). a) Esquemas de iluminación en STEM y TEM mostrando el principio de reciprocidad. Las trayectorias de los electrones y los procesos de dispersión elástica tienen una simetría inversa en el tiempo. b) Formación de imágenes en TEM (contraste de fase) y STEM (contraste Z). c) Esquemas de iluminación en TEM y STEM incluyendo correctores de aberración.

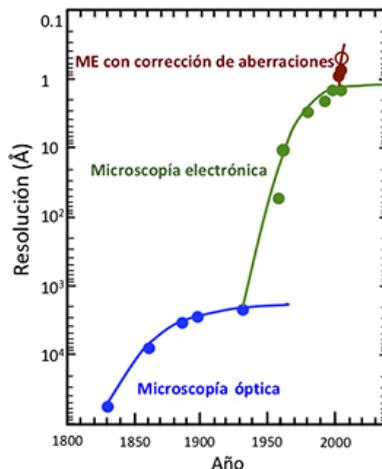


Fuente: Elaboración del autor.

las muestras con la integridad deseada. En consecuencia, el deterioro de las muestras nanoestructuradas es un fenómeno adicional a considerar en el uso de haces electrónicos en TEM o STEM.

La interacción entre el haz de electrones y la muestra puede generar cambios en las estructuras o arreglos atómicos originales de la muestra. Tales cambios pueden suceder por mecanismos como desplazamientos de átomos o difusión en intervalos de tiempo muy cortos y son, en consecuencia, difíciles de detectar. Como se muestra en la literatura (Kisielowski *et al.*, 2001), no hay un límite mínimo para desplazar átomos de superficies o defectos debido a que las energías de enlace pueden variar y ser muy pequeñas en comparación con la energía de los electrones en el haz. En un microscopio electrónico eficiente, se requiere alrededor de  $10,000 \text{ e}^-/\text{Å}^2$  en el haz para detectar un átomo de C. En materia suave, la muestra comienza a dañarse si la dosis en el haz excede los  $20 \text{ e}^-/\text{Å}^2$  (biología). Por lo que existe un enorme intervalo en la dosis entre lo necesario

Figura 5. Desarrollo de la resolución en equipos de microscopía. El límite físico de 1 Å se alcanzó hace una década.



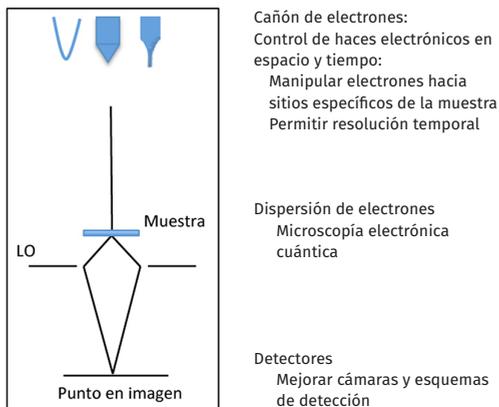
Fuente: Adaptada de Pennycook *et al.* (2006).

y el límite de daño, con un valor de aproximadamente 500 para carbono y de alrededor de 50 para átomos más pesados. Hay varios métodos para superar este intervalo entre los que se encuentra el uso de bajas dosis, la crió microscopía, el uso de placas de fase, microscopía electrónica de tiempo resuelto, entre otros. La figura 6 cubre algunas de estas posibilidades. En principio es posible producir imágenes con bajas dosis, reduciendo la iluminación y el número de electrones que impacta a la muestra. Otro desarrollo probable se encuentra en manipular el haz en tiempo, por ejemplo, pulsando la corriente y produciendo un haz intermitente con la dosis adecuada. Controlando el número de electrones en sitios de la muestra e intermitentemente en el tiempo hará posible reducir la dosis de observación y obtener imágenes genuinas de las muestras sin daño alguno. Asimismo, controlando la dispersión de electrones con haces reducidos puede hacer posible 'cuantizar' la interacción y obtener imágenes sin distorsión en cualquier muestra. Sin duda, el mejoramiento de cámaras, haciéndolas de mayor dimensión en cuanto al número de píxeles y a su sensibilidad permitirá también reducir la interacción con el haz sin mermar la calidad de las imágenes.

## Microscopía electrónica para materiales nanoestructurados

Los materiales nanoestructurados requieren de una caracterización con alta resolución espacial en donde el uso de TEM o STEM en bajas dosis es importante. La investigación de materiales puede convertirse en un diseño apropiado de materiales cuando se conoce la relación entre las propiedades y la estructura, es decir, la posición y distribución de los átomos en el nanomate-

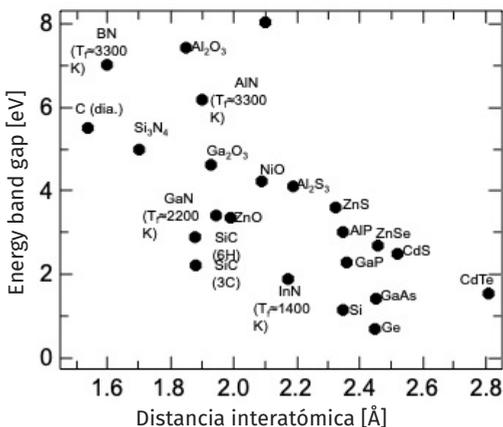
**Figura 6.** Resumen de métodos para contrarrestar daño por radiación y correspondientes avances tecnológicos realizados o por realizar en la microscopía electrónica.



Fuente: Elaboración del autor.

rial. En lo que respecta a la posición de los átomos, la figura 7 muestra que un ligero cambio en la distancia interatómica del orden de 0.1 nm puede alterar el intervalo de energía (gap) en semiconductores en aproximadamente 50 meV, lo cual equivale al calor de fusión del hielo. En consecuencia, para el diseño de las propiedades ópticas de los semiconductores (ingeniería del intervalo) o para las propiedades de nanoestructuras en general, es necesario poder medir y controlar las posiciones atómicas con una precisión del orden de picómetros. Para lograrlo, la resolución del microscopio tiene que superar

**Figura 7.** Precisión requerida en la posición de los átomos.



Nota: La banda prohibida en semiconductores varía considerablemente para variaciones del orden de 1 Å.

Fuente: Kisielowski et al. (2006).

1 Å, lo cual, en el caso del Si, permite observar siete diferentes distancias interatómicas o interplanares; así, el análisis puede realizarse con diferentes ejes de zona o de proyección, dando la oportunidad de hacer una caracterización en tres dimensiones y adicionalmente reconocer especies atómicas en las imágenes. Esto es, lograr una resolución atómica (resolviendo especies atómicas y posiciones) en adición a la resolución espacial. En este objetivo, es posible mejorar la resolución espacial con diferentes métodos. En la literatura, la resolución alcanzada con STEM incoherente ha sido de 0.078 nm (Nellist, 2016) y con el uso de altos voltajes se llega a 0.089 nm de resolución puntual (Mobus, 1997). Usando TEM y la reconstrucción directa de ondas se alcanza una resolución de 0.085 nm (Kisielowski *et al.*, 2001) con una compensación de la aberración esférica (Haider *et al.*, 1998).

TEM y STEM son dos métodos posibles para alcanzar la resolución espacial necesaria y para lograr resolución atómica, lo cual conlleva al control de propiedades de los nanomateriales al asegurar la determinación de posiciones atómicas con la precisión suficiente. En estas técnicas se tienen trayectorias de electrones y procesos de dispersión elástica con una simetría inversa en el tiempo. TEM es ideal para capturar señales específicas rápidamente y con un amplio campo de visión, STEM es ideal para extraer la máxima información de un volumen dado al detectar varias señales simultáneamente. La diferencia en su uso se encuentra en el problema específico a resolver. No obstante, si se cuenta con la suficiente resolución espacial y con acceso a resolución atómica, el principal problema en nanomateriales es caracterizar la muestra sin dañarla. El interés se centra, entonces, en controlar la dosis del haz de electrones, es decir, en conocer cuántos electrones impactan la muestra por unidad de tiempo y de área. La dosis con un haz paralelo normalmente se encuentra entre 1 y 10,000  $e^-/\text{Å}^2\text{s}$  (TEM) y en el caso de un haz enfocado en valores de 6 a 600  $\times 10^6 e^-/\text{Å}^2\text{s}$  (STEM), lo que se traduce en un intervalo de tiempo para adquisición de imágenes de entre 0.1 y 10 s para un haz amplio y entre 1 ms y 100 ms para un haz enfocado. Claramente es muy difícil satisfacer estos criterios y se requiere una estrategia diferente para disminuir la dosis que impacta un nanomaterial y emplear las características específicas de TEM o STEM. Resumiendo, en el caso del TEM el contraste puede formarse por interferencia entre los haces que llegan al detector, esto es, el contraste depende de las diferencias de fase y se le llama contraste de fase, que puede producirse por el espesor de las muestras y por su composición además de las aberraciones. Este alcanza valores óptimos de alrededor del 20%, lo que hace el método ideal para muestras delgadas que incluyen elementos químicos ligeros. El contraste de fase utiliza dispersión débil y, por lo tanto, normalmente es necesario hacer simulación de imágenes para una interpretación correcta. En el caso del STEM normalmente se usa en modo de campo oscuro anular (con contraste Z) usando dispersión incoherente sobre un detector angular. En esta técnica se integran muchos haces dispersados pero con una baja eficiencia en el uso de electrones. Las intensidades de los haces difrac-

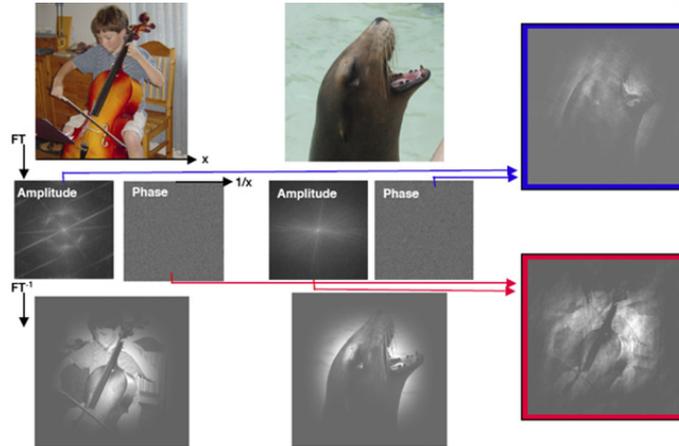
tados en imágenes en contraste Z representan apenas un 1% del haz incidente. En general, STEM resulta ideal para elementos pesados o muestras relativamente más gruesas en comparación con el TEM debido a la naturaleza de la dispersión incoherente. El contraste Z permite utilizar condiciones de operación intuitivas, por ejemplo, para enfocar la imagen.

La interacción entre el haz de electrones y la muestra debe considerarse de manera primordial ya que puede propiciar cambios indeseables en la estructura y arreglo atómico de materiales que deben evitarse durante su caracterización por microscopía electrónica. Todas las condiciones operativas y características de los métodos específicos deben aprovecharse para reducir dicha interacción y mantener sus atractivos en cuanto a resolución atómica y espacial. Estos cambios a la estructura de nanomateriales pueden darse en un instante y pueden no notarse al operar el equipo, por lo cual es necesario usar condiciones específicas y que comprobadamente eviten daño. En la medida de las condiciones descritas, los microscopios electrónicos actuales pueden equiparse con correctores de aberración cromática, esférica y monocromadores en la columna del instrumento. Tales aditamentos crean un equipo costoso y difícil de operar, pero eso no es suficiente para lograr el objetivo final. El objetivo final es lograr una buena resolución espacial y una resolución atómica en nanomateriales pero sin cambios a su distribución atómica. En consecuencia, cualquiera que sea el método elegido de observación, TEM o STEM, la interacción haz electrónico-muestra no debe ignorarse a riesgo de obtener imágenes de una muestra alterada por el haz.

## Reconstrucción de ondas de salida en TEM

Entre los métodos de operación basados en el TEM se encuentra la reconstrucción de ondas de salida. A continuación se describirá la reconstrucción de la onda de salida y su aplicación para obtener imágenes de fase y de amplitud. Es decir, a partir de la ecuación de onda de salida reconstruida y por métodos numéricos en una rutina numérica específica, se logra descomponer la onda en sus componentes para la obtención de imágenes de cambios de fase y de cambios en amplitud de la onda que entra a la muestra. En consecuencia, se obtienen imágenes que caracterizan la muestra. Las imágenes de fase cuentan con contraste atómico y buena resolución espacial. La imagen de fase es importante debido a que conserva la mayor parte de la información de la muestra. La importancia de la imagen de fase puede apreciarse en la figura 8 en donde dos imágenes se emplean para generar una imagen de fase y otra de amplitud. Posteriormente, la imagen de fase de uno de los objetos se mezcla con la imagen de amplitud del otro. En la imagen resultante predominan las características de la imagen de fase. Adicionalmente, el método de reconstrucción de onda de salida permite reducir la deslocalización del objeto que reduce la calidad de la imagen. En algunos casos, la formación de imágenes de interferencia en el TEM pierde algunas frecuencias y se producen imágenes deslocalizadas como se ilustra en la figura 9.

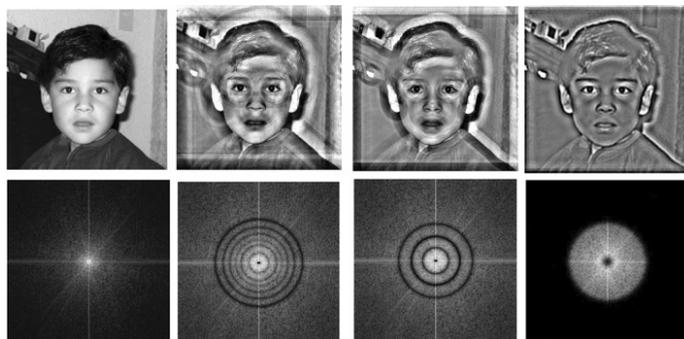
Figura 8. Importancia de la imagen de fase.



Nota: Se muestran dos imágenes y su correspondiente fase y amplitud. Al combinar la fase de una imagen con la amplitud de la otra, la imagen resultante muestra características de la fase utilizada.  
 Fuente: Elaboración del autor.

La necesidad de hacer una reconstrucción de onda también puede expresarse a través de la función de transferencia de contraste. En esta función se mezclan las fases y las amplitudes, y puede utilizarse para estimar a través del inicio de fluctuaciones, el vector de dispersión ( $q$ ) máximo que puede interpretarse directamente. La imagen que se observa en TEM de alta resolución (HRTEM) normalmente es un interferograma de electrones, la función de transferencia y el inicio de sus oscilaciones en función de  $q$  puede ayudar a determinar el rango en que inician las oscilaciones y en donde el contraste puede interpre-

Figura 9. Deslocalización de imágenes.

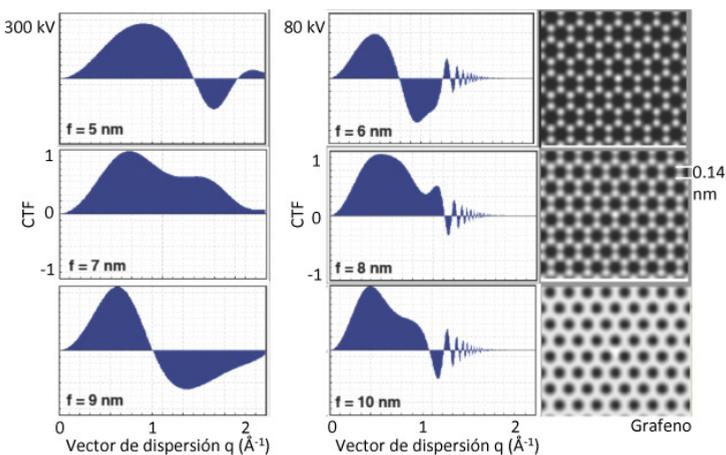


Nota: Se muestra una secuencia de imágenes a las que se les ha sustraído diversas frecuencias y pierden nitidez o se deslocalizan debido a que las posiciones adquieren incertidumbre. La sustracción de frecuencias específicas se realiza en la transformada de Fourier correspondiente. La imagen deslocalizada se obtiene al realizar una transformada inversa a la FFT incompleta.  
 Fuente: Elaboración del autor.

tarse directamente. El contraste más alto no siempre es aquel de las posiciones correspondientes a columnas de átomos en la muestra, debido a variaciones de contraste. Estas complicaciones pueden evitarse y subsanarse a través de la reconstrucción de ondas de salida en donde la interpretación de imágenes es directa. La figura 10 muestra la evaluación de la función de transferencia de contraste (FTC) y la consecuente deslocalización de la imagen para dos voltajes de aceleración y asumiendo grafeno como muestra. La imagen de grafeno corresponde al voltaje de aceleración de 80 keV. Los patrones en la imagen cambian para una misma configuración atómica en una escala equivalente a la variación inherente de foco  $\Delta f$ . Esta variación de foco se considera estrecha (0.7 – 1 nm) cuando el ancho o espesor de las muestras normalmente es ligeramente mayor.

Las imágenes mostradas son diferentes entre sí, y aunque pueden reconocerse la estructura y distribución atómica del grafeno (hexágonos), se tiene una fuerte variación de contraste. Los máximos de intensidad no corresponden a las posiciones atómicas sino al resultado de interferencia. En la figura 10 puede verse que para alcanzar una resolución espacial dentro del límite de información (FTC sin cambio de signo) es necesario realizar una reconstrucción de onda. Esta reconstrucción de onda debe hacerse a partir de imágenes experimentales y usando una función de apertura de la lente para lograr reconstruir la imagen de fase proyectada y la estructura atómica correspondiente. En otras palabras, se trata de una reconstrucción holográfica que se realiza de manera cuantitativa con la ayuda de diversas imágenes a diversos enfoques. Este es un problema clásico para resolver el problema de fase u holo-

**Figura 10.** Función de transferencia de contraste (FTC) en relación con el vector de dispersión  $q$ , para dos energías de aceleración del haz electrónico, 300 keV y 80 keV.

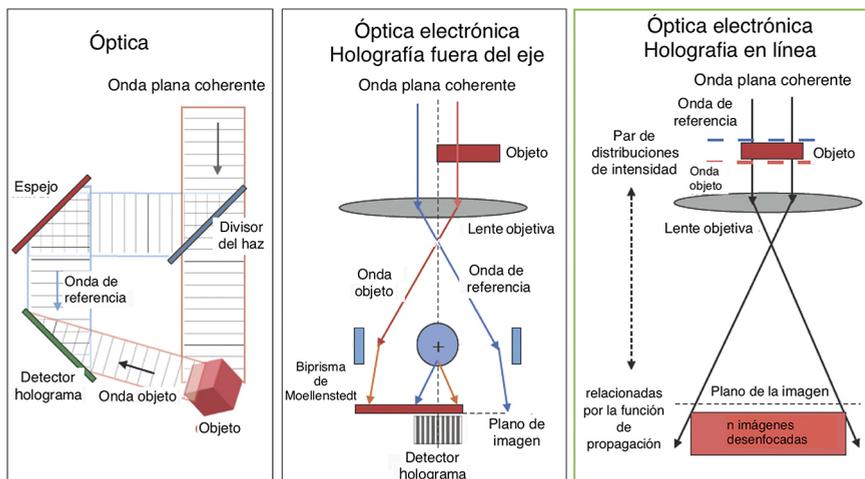


Nota: Se muestra la FTC para tres diferentes posiciones de enfoque indicadas en la figura. Los patrones en las imágenes cambian en una escala relacionada con el ancho de enfoque. El enfoque usado es  $f$ . Fuente: Elaboración del autor.

grafía (Lichte y Lehman, 2008) que se esquematiza en la figura 11. Experimentalmente, se usa un número  $n$  de imágenes a diferentes desenfoques para poder calcular la onda de salida (Gerchberg y Saxton, 1972; Hsieh *et al.*, 2004).

La reconstrucción de la onda electrónica de salida es un procedimiento necesario para recuperar una imagen de la muestra con las posiciones atómicas precisas. El método forma parte básicamente de holografía en línea, en donde el objetivo es encontrar la función de onda de salida óptima  $\Psi_0$  con dos ondas límite en la función  $\chi^2$ : la onda plana incidente  $\Psi_0$  y la onda de salida  $\Psi_e$ . El material experimental necesario consiste en una serie focal de  $n$  imágenes ( $n > 3$ ). En esta técnica holográfica se realiza una superposición de una onda de referencia y del objeto y es iterativa empleando un método de entropía máxima y el algoritmo de Gerchberg-Saxton, usando una auto correlación. Hay varias ventajas en el uso de estas condiciones (Hsieh *et al.*, 2004) y se encuentra implementado en varios paquetes de *software*, por ejemplo, MacTempass® (Kilaas, R.). El resultado es una función de onda de salida (EWF) y puede usarse para obtener imágenes de fase y de amplitud que pueden ser interpretadas directamente en cuanto a resolución atómica. La EWF se encuentra idealmente libre de desviaciones y artificios en la imagen y se determina exclusivamente con el objeto y la longitud de onda del electrón  $\lambda$ . Por el contrario, una imagen en alta resolución de TEM (HREM) es una convolución del objeto y las propiedades del microscopio como resultado de la aberración esférica  $C_s$ , cromática  $C_t$ , y el desenfoque  $\Delta f$ . El límite de información del microscopio no se ve alterado. En este método, la función de onda se reconstruye a partir de una serie de imágenes to-

**Figura 11.** Técnicas de holografía para resolver el problema de fase ( $I = \Psi\Psi^*$ ). a) Óptica; b) óptica electrónica fuera del eje; c) holografía en línea con electrones. Intensidad  $I$ , la amplitud de onda en la imagen  $\Psi$  y su conjugado  $\Psi^*$ .



Fuente: Elaboración del autor.

madras en valores de enfoque equidistantes. Es importante enfatizar que la reconstrucción de onda debe realizarse en valores de desenfoque cercanos al desenfoque de Lichte. Este valor es ideal para realizar hologramas (Lichte, 1991). Hay que recordar que la intensidad en TEM es una función de la amplitud dispersada y que no está relacionada con la fase de la onda de salida. Se ofrece a continuación una comprobación simplificada de este problema llamado el problema de fase, y en donde se usa la naturaleza ondulatoria del electrón. La intensidad  $I$  en una imagen de TEM de alta resolución puede escribirse como sigue:

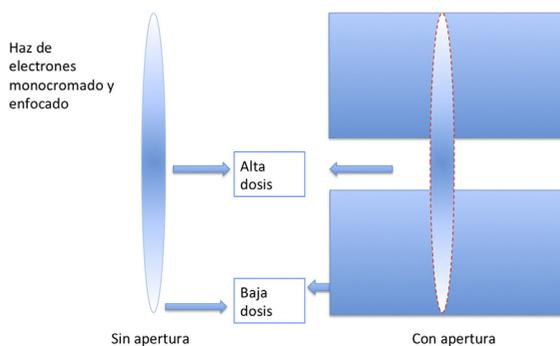
$$I = \Psi\Psi^* = Ae^{i\phi} = Ae^{-i\phi}$$

en donde  $\Psi$  y  $\Psi^*$  son la amplitud de onda y su conjugado en la imagen, respectivamente, y  $A$  representa el módulo o amplitud con  $\phi$  como la fase. Por lo tanto, en una imagen de TEM no se recupera la fase y el método de reconstrucción de ondas de salida ofrece, por lo tanto, una posible alternativa útil. En dicho método, es necesario resolver un sistema de ecuaciones y recuperar la fase de la onda de salida, así como la amplitud de la misma. Es en esencia un método holográfico pero en línea y utilizando imágenes diferentes en lo que respecta a su desenfoque pero conservando todos los otros parámetros del instrumento constantes y bajo control. Detalles de esta técnica pueden encontrarse en la referencia (Lichte y Lehman, 2008).

La reconstrucción de onda de salida es el método ideal para recuperar la posición de los átomos en un nanomaterial. El microscopio tiene también que ser caracterizado de manera que todos sus parámetros importantes se calibren y conozcan, entre ellos están los siguientes: constante de aberración esférica  $C_s$ , ancho de desenfoque  $\Delta f$ , ángulo de convergencia del haz electrónico, magnificación efectiva, tasa de muestreo o tamaño efectivo del pixel. Aunque para un usuario obtener esta información puede resultar engorroso, es un trabajo necesario y útil para los encargados del equipo que conlleva al conocimiento y calibración del instrumento.

A continuación se ofrecen ejemplos de observaciones en materiales sensibles al haz. En todos estos casos se han usado microscopios con corrección de aberración esférica y con monocromador, de manera que la dispersión de energía alcanza un máximo de 100 meV (Tiemeijer *et al.*, 2012). La iluminación del haz adquiere una forma elipsoidal como la que se esquematiza en la figura 12 y se conoce como iluminación de Nelson. En esta situación, se pueden intercambiar altas y bajas dosis en segundos, moviendo el haz a través de los controles del microscopio. El control de la dosis se puede hacer tanto en dirección horizontal como vertical. Durante la calibración del instrumento a diferentes energías de aceleración es posible seleccionar la opción más conveniente en lo que respecta a contraste optimizado o corrección de aberraciones remanentes. En el caso del microscopio utilizado para los ejemplos siguientes, se encuentra que 80 keV es la opción con mejor contraste y que para voltajes menores, resulta más complicado corregir aberraciones remanentes. El con-

**Figura 12.** Iluminación para un haz electrónico monocromado y enfocado, conocida como Iluminación nelsoniana. Dependiendo de la zona del haz enfocado en uso, es posible obtener imágenes con altas o bajas dosis. En el esquema, la apertura se sitúa en la región de la lente condensadora del microscopio.

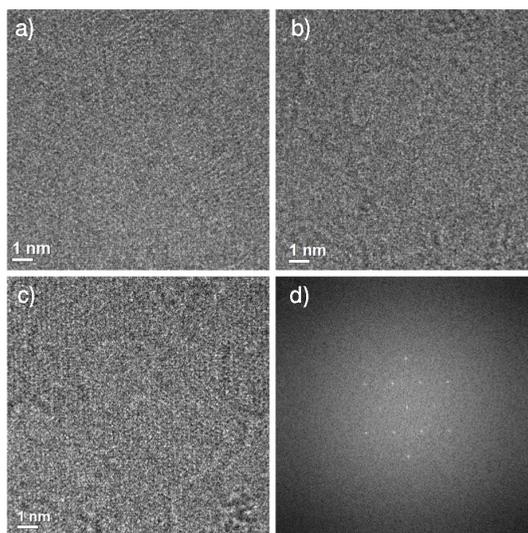


Fuente: Elaboración del autor.

El control instrumental y sus parámetros permiten alcanzar un contraste atómico que diferencie en la imagen elementos pesados de ligeros, es decir, lograr una resolución atómica en adición a una buena resolución espacial.

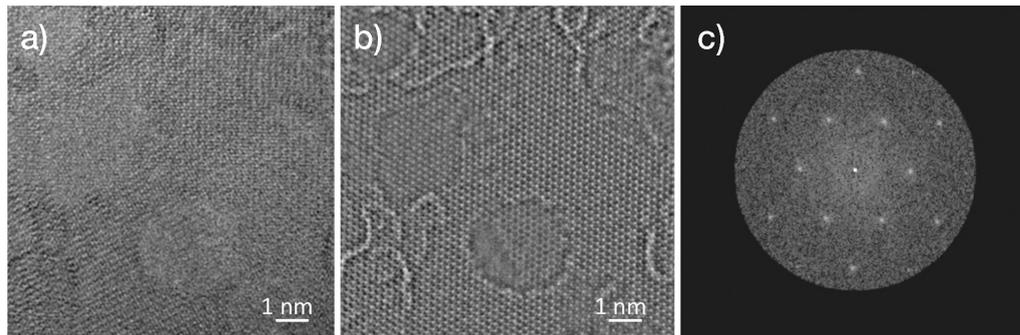
La figura 13 muestra imágenes experimentales de grafeno (figura 13a-c) a diferentes valores de enfoque y con una dosis temporal de  $60 \text{ e}^-/\text{\AA}^2\text{s}$ . Las

**Figura 13.** Imágenes de grafeno a diferentes posiciones de enfoque. a) +15 nm; b) -9 nm; c) 20 nm; d) FFT de (a).



Nota: Todas las imágenes han sido obtenidas con una dosis temporal de  $60 \text{ e}^-/\text{\AA}^2\text{s}$ .  
Fuente: Elaboración del autor.

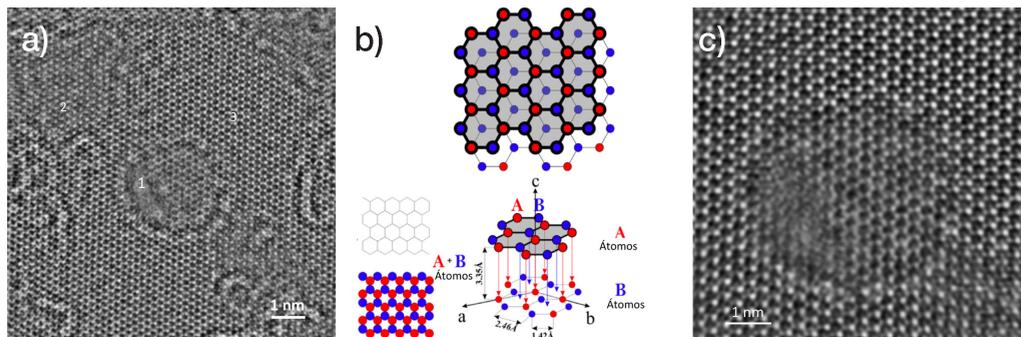
**Figura 14.** a) Imagen de amplitud; b) imagen de fase; c) patrón de difracción de una muestra de grafeno después de reconstrucción de la onda de salida a partir de 40 imágenes experimentales en una serie focal.



Fuente: Elaboración del autor.

imágenes tienen un contraste muy bajo para poder distinguir detalles específicos; sin embargo, contienen información relevante como lo muestra la transformada de Fourier en la figura 13d. Usando 40 imágenes en una serie focal alrededor del desenfoque de Lichte, se obtiene la función de onda reconstruida con ayuda del *software* MacTempass<sup>®</sup>. A partir de esta onda se recuperan las imágenes de amplitud y de fase que se muestran en la figura 14a-b. El patrón de difracción correspondiente (figura 14c) es más intenso pero idéntico al mostrado anteriormente en la figura 13d. La imagen de fase tras un filtrado débil produce la imagen en la figura 15a. En estas imágenes de fase se pueden distinguir claras diferencias de contraste en los máximos de intensidad que deben relacionarse directamente con el número de átomos en cada punto. La imagen de fase representa la proyección en espesor de la muestra punto por punto o átomo por átomo. La figura 15b presenta una comparación entre la simulación de la proyección de la estructura del grafeno y la imagen de fase. A partir de estas comparaciones es posible concluir acerca del número de átomos y, en consecuencia, el número de capas en espesor de la muestra, como se indica en la imagen de la figura 15a. La imagen de fase proporciona todos los elementos para comparar con un modelo de la distribución atómica del grafeno y concluir sobre el espesor de las distintas zonas (Barton *et al.*, 2012). La imagen en la figura 15c es una amplificación de la zona central de la muestra investigada. Aquí, es posible distinguir plenamente el contraste atómico y al comparar con la estructura simulada es posible caracterizar completamente la muestra. Los números en la figura 15a indican el número de capas de espesor de la muestra para diversas regiones en la imagen. En la región de una sola capa puede inferirse una ligera inclinación de la muestra en regiones cercanas al vacío. El contraste atómico en esta imagen se relaciona directamente con la inten-

**Figura 15.** Interpretación de imagen. a) Imagen de fase con un filtrado de Wiener débil. Los números indican la cantidad de capas atómicas de espesor en la región específica. b) Modelo atómico del grafeno. c) Región central de (a) con contraste atómico. Las diferencias en intensidad se relacionan con el número de átomos que tiene la muestra en un punto dado.



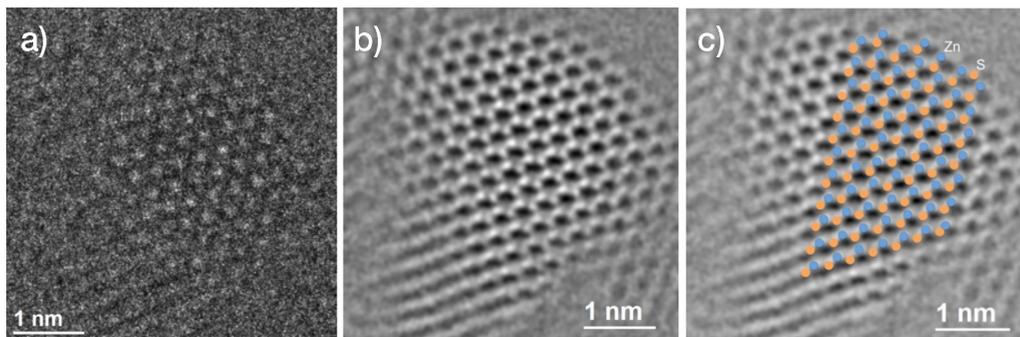
Fuente: Elaboración del autor.

sidad relativa de los máximos de intensidad y el número de átomos presentes. La zona de la monocapa tiene un contraste homogéneo de sus máximos de intensidad, la zona de tres capas muestra las diferencias de contraste correspondientes al arreglo atómico que puede inferirse de la figura 15b. La estructura del grafeno implica una sucesión de capas atómicas desplazadas que coinciden en puntos específicos cuando se proyecta en una dirección específica como en el caso de este experimento. Hay que recordar que la imagen mostrada en las figuras 15c y 15a se forma como resultado de una proyección de la estructura atómica a lo largo de la dirección del haz electrónico.

Los compuestos ZnS Bipy son materiales híbridos (orgánico-inorgánico) que han sido desarrollados como catalizadores para fotocatalisis (Ramírez-Rave *et al.*, 2015). La caracterización por microscopía electrónica se realizó con éxito a pesar de ser un material extremadamente sensible al haz electrónico y usando series focales para dar como resultado imágenes de fase y amplitud. La figura 16a exhibe una imagen experimental con una dosis temporal de  $30 e^-/\text{Å}^2\text{s}$  obtenida en una serie focal en el microscopio TEAM 0.5 del NCEM en el Lawrence Berkeley National Laboratory de Berkeley California. Este microscopio está equipado con un monocromador y corrector de aberración esférica. Existe un contraste débil en la imagen experimental, pero la imagen de fase correspondiente (figura 16b) tiene contraste atómico claro y se encuentra cercana al límite de resolución teórico.

Las imágenes de fase obtenidas presentan la estructura del compuesto ZnS y la estructura del material orgánico (bipiridina) que mimetiza al ZnS en algunas regiones. Las columnas atómicas presentan una intensidad diferente de acuerdo con el peso atómico del elemento mayoritario que las com-

**Figura 16.** Compuesto híbrido ZnS Bipi. a) Imagen experimental a un desenfoco de -20 nm. b) Imagen de fase de zona delgada de la muestra con resolución atómica; se observan diferencias de intensidad en las columnas atómicas de acuerdo con su peso atómico. c) Simulación sobreimpuesta de la estructura del compuesto ZnS.

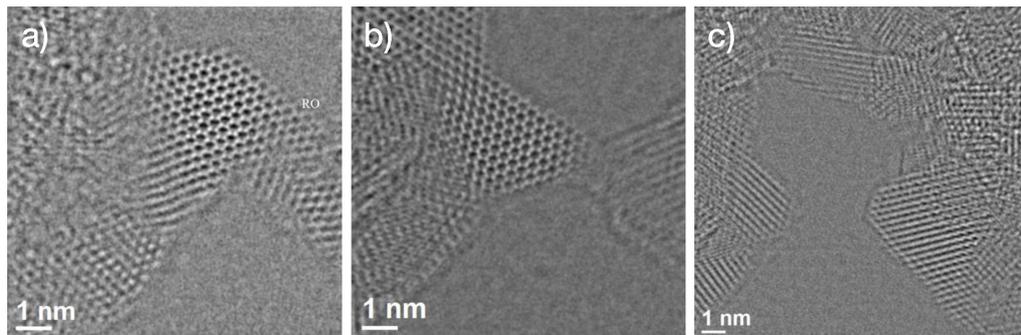


Fuente: Elaboración del autor.

pone. El compuesto orgánico adquiere la simetría del compuesto inorgánico, en la esquina derecha de la figura 16b se logra retener al compuesto orgánico (la simetría se vuelve difusa) con la baja dosis utilizada. En la figura 16c, se presenta la estructura del compuesto inorgánico ZnS simulada y sobrepuesta en la imagen de fase. Este ejercicio identifica plenamente la muestra, y justifica el análisis realizado que concuerda con la distribución atómica encontrada experimentalmente.

La figura 17a muestra la zona anterior en un campo de vista más amplio. La muestra tiene una sección muy delgada en donde las dos fases, orgánica e inorgánica pueden observarse en contacto y corresponde a la sección mostrada en la figura 16. Adicionalmente, la figura 17a muestra una sección que pierde el ordenamiento estricto del ZnS y que muy probablemente consiste de una región puramente orgánica y se identifica con RO. Esta región puede conservarse en 40 imágenes experimentales y observarse en la imagen de fase como resultado de la baja dosis de electrones en uso, y permite mantener la estructura genuina sin afectar zonas tan sensibles de la muestra. Cualquier aumento de la dosis provoca una reacción en la región orgánica que termina con la expulsión de materia en esa región particular. La figura 17b muestra la misma zona después de 10 s con una dosis más alta de  $380 \text{ e}^-/\text{\AA}^2\text{s}$ , como resultado de la mediana interacción con el haz, la región se ha comprimido considerablemente pero el contraste atómico y la baja dosis temporal usada para la serie focal de reconstrucción permite mantener la estructura cristalina sin mayor daño, aunque con dimensiones reducidas. Un nuevo ejercicio de aumento de dosis por un tiempo de 5 s provoca un adelgazamiento subsecuente y el resultado se muestra en la imagen de la figura 17c. La pérdida de átomos como resultado de la interacción con el haz es

**Figura 17.** Efecto de la dosis e interacción con la muestra de ZnS-bipiridina, en todos los casos se utiliza una dosis temporal de  $30 \text{ e}^-/\text{\AA}^2\text{s}$  para adquirir 40 imágenes y recuperar imágenes de fase. a) Muestra sin irradiación adicional; b) muestra irradiada por 10 s; c) muestra irradiada 20 s en total. La irradiación se hace con una dosis temporal de  $380 \text{ e}^-/\text{\AA}^2\text{s}$ .

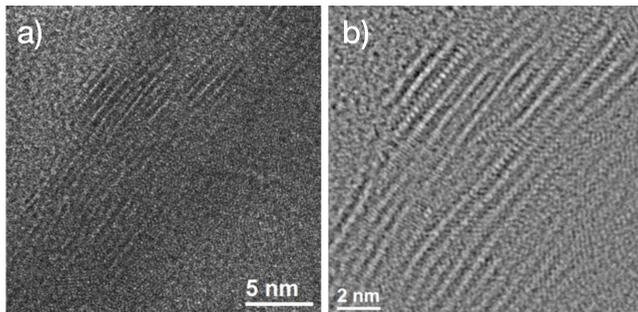


Fuente: Elaboración del autor.

clara y ha afectado considerablemente la muestra. Resulta aparente que el control de la cantidad de electrones que impactan la muestra es de suma importancia para mantener la estructura genuina del nanomaterial a caracterizar, especialmente en este caso con una muestra sensible.

El desarrollo de baterías recargables de bajo costo con materiales abundantes y simples es de importancia considerable en aplicaciones energéticas como transportación eléctrica y de almacenamiento de energía en redes. Las baterías de Mg representan una tecnología segura y de alta energía pero tienen el inconveniente de una gran escasez de materiales adecuados para el cátodo de la batería, esto se debe a la difusión lenta en estado sólido de los iones polarizantes y divalentes de Mg (Yoo *et al.*, 2015). Un método para optimizar el transporte de Mg consiste en realizar una expansión de intercapas al nivel atómico, el objetivo es transformar los materiales intercalando residentes originales inactivos en materiales eficientes para almacenar Mg sin introducir efectos adversos. En una publicación reciente, experimentalmente se intercaló óxido de polietileno (PEO) en una material inorgánico  $\text{MoS}_2$  para aumentar la distancia intercapas del material de 0.62 nm a 1.45 nm. La figura 18 muestra una imagen experimental en bajas dosis ( $15 \text{ e}^-/\text{\AA}^2\text{s}$ ) del compuesto PEO- $\text{MoS}_2$ , y una imagen de fase después de reconstrucción, las capas de material orgánico e inorgánico son aparentes y su espesor puede medirse con relativa sencillez. La imagen conserva detalles del PEO y del compuesto inorgánico  $\text{MoS}_2$  que pueden correlacionarse a las propiedades a través del espaciamiento entre capas, esto y su relación con el proceso de síntesis se describe en la publicación referida (Yoo *et al.*, 2015). Es importante constatar que la muestra no fue afectada por el haz, a pesar de la gran sensibilidad de PEO al flujo electrónico.

**Figura 18.** Material compuesto MoS<sub>2</sub>-PEO para baterías. a) Imagen experimental con un desenfoque de 0 nm; b) imagen de fase con resolución atómica.

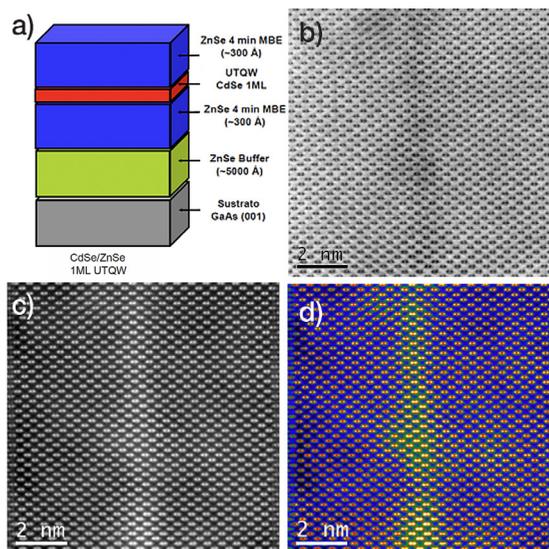


Fuente: Elaboración del autor.

## Imágenes de STEM

Las imágenes de STEM de alta resolución se producen al enfocar el haz en un punto y registrar la intensidad dispersada en un detector y tienen características de contraste Z. Especies atómicas con altos números atómicos tienen una fuerte dispersión incoherente y el detector anular registra altas intensidades, esto es, átomos pesados producen intensidades más altas que elementos más ligeros. La dependencia entre la intensidad incoherente dispersada y el número atómico es relativamente regular con Z y puede representarse con una curva. En la aplicación de técnicas de STEM, también es importante considerar la dosis de electrones en uso pues, un haz concentrado o enfocado como el que se emplea en el método, puede alterar la morfología de los nanocristales (nanopartículas, nanoalambres o capas nanométricas) en la muestra al promover variaciones en el arreglo atómico de estos. Normalmente, el barrido se realiza con una dosis baja menor a  $100 \text{ e}/\text{Å}^2 \text{ s}$  y se aumenta el contraste para mejor visualización traslapando numéricamente las imágenes. Es decir, se requiere usar un método de alineación muy preciso y registrar la intensidad acumulada en el traslape por cada pixel en la imagen. Se emplean series de 20-40 imágenes sucesivas adquiridas con barridos rápidos y en idénticas condiciones instrumentales, solo tienen un contraste bajo debido a las bajas dosis en uso. Un ejemplo de este método se presenta en la figura 19, la cual muestra pozos cuánticos de CdSe en ZnSe en STEM con resolución atómica. La geometría de los pozos cuánticos se presenta en la figura 19a. Durante la síntesis del conjunto se emplea, por supuesto, material de soporte y el pozo cuántico de CdSe con unas cuantas monocapas de espesor entre capas de ZnSe. Las imágenes de STEM se presentan en las figuras 19b-d, en ellas se observa un contraste diferente para el pozo cuántico ultradelgado de CdSe/ZnSe en campo claro (figura 19b), campo oscuro de alto ángulo (HAAD, figura 19c) y la imagen con colores artificiales (figura 19d) para hacer más clara la geometría del pozo cuántico. En

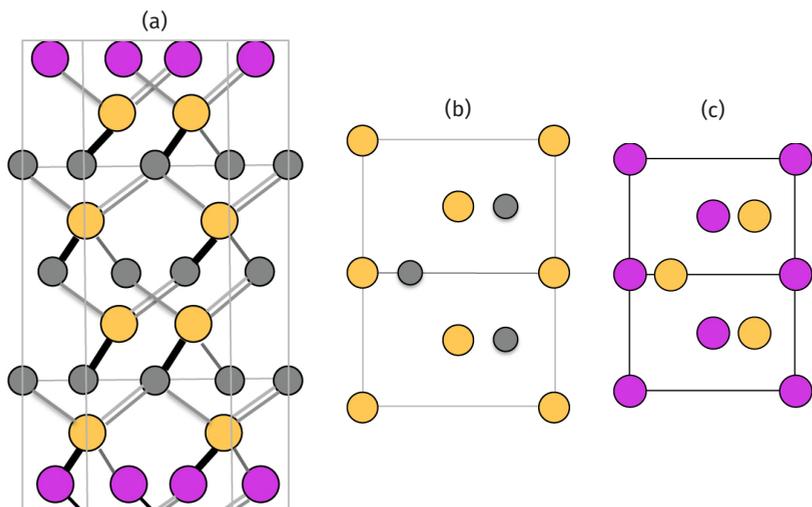
**Figura 19.** Pozos cuánticos de CdSe/ZnSe. a) Geometría del arreglo de capas depositadas para formar pozos cuánticos. b) Imagen de STEM en campo claro. c) Imagen de STEM en campo oscuro de ángulo alto (HAAD) en el detector anular. d) Imagen con colores artificiales y mayor contraste.



Fuente: Elaboración del autor.

todos los casos, la dosis electrónica usada es menor a  $100 \text{ e}/\text{Å}^2 \text{ s}$ . La emisión excitónica de estos pozos cuánticos pseudomórficos con un espesor de algunas monocapas estructurales (ML) puede ajustarse en el intervalo espectral comprendido entre el verde-amarillo y azul. Así, resultan materiales muy atractivos para emplearse en la fabricación de LEDs y láseres. Estructuralmente CdSe y ZnSe son similares, ambos compuestos son cúbicos y tienen parámetros reticulares muy cercanos ( $a_{\text{ZnSe}} = 0.566 \text{ nm}$ ;  $a_{\text{CdSe}} = 0.608 \text{ nm}$ ) por lo que existe una coherencia perfecta en arreglos de hasta 3 ML. La figura 20 exhibe resultados de simulación de estas estructuras, indispensables para una correcta interpretación del trabajo experimental. La figura 20a muestra la simulación del arreglo estructural de estos pozos cuánticos, mientras que en las figuras 20b-c se muestran las proyecciones estructurales de ambos compuestos en la dirección  $B = [011]$ . Los modos del STEM se definen anteriormente en la figura 4, el campo claro se toma con la señal transmitida directamente mientras que el HAAD se obtiene usando un detector anular. En las imágenes de la figura 19 se observa contraste Z con una resolución de aproximadamente 0.1 nm. Las parejas de átomos en la proyección corresponden con la simulación presentada en la figura 20b para el eje de zona  $B = [011]$ . Las columnas de átomos ricos en Cd, Se y Zn pueden distinguirse claramente en las imágenes experimentales e interpretarse adecuadamente con ayuda de la simulación.

**Figura 20.** Simulación estructural de pozos cuánticos CdSe/ZnSe. a) Arreglo de estructuras de pozo cuántico. b) Proyección estructural del compuesto CdSe de acuerdo con su estructura cúbica c) Proyección de la estructura cristalina del compuesto ZnSe. En ambos casos la proyección se realiza usando la dirección  $B = [011]$  como eje de proyección (dirección cristalina paralela al haz de electrones en el experimento). La representación atómica es como sigue: Se ●, Cd ●, Zn ●.



Fuente: Elaboración del autor.

## Comentarios finales

La microscopía electrónica de transmisión es una herramienta útil en la caracterización de materiales nanoestructurados. Esta técnica puede proveer información de importancia acerca de la distribución de átomos en un material con alta resolución espacial y con sensibilidad a la naturaleza de los componentes, es decir, una resolución atómica. Este trabajo se centra en la descripción y aplicación de esta herramienta mostrando diversos ejemplos en los que aplica un método de trabajo con bajas dosis del haz electrónico. Las ventajas de esta aplicación son conservar la integridad de los materiales y poder utilizar el resultado directamente para correlacionarse con las propiedades de interés de los nanobloques.

## Referencias

- Barton, B. Jiang, C. Y. Song, Petra Specht, H. A. Calderon y C. Kisielowski. (2012). *Microscopy and Microanalysis*, 18 (05): 982-994. <https://doi.org/10.1017/S1431927612001213>
- Gerchberg, R. W., W. O. Saxton. (1972). *Optik*, 35: 237.

- Haider, M., H. Rose, S. Uhlemann, E. Schwan, B. Kabius, K. Urban. (1998). *Ultramicroscopy*, 75: 53-60. [https://doi.org/10.1016/S0304-3991\(98\)00048-5](https://doi.org/10.1016/S0304-3991(98)00048-5)
- Hsieh, W. K., Hsieh, F.-R. Chen, J.-J. Kai, A.I Kirkland. (2004). *Ultramicroscopy*, 98: 99. <https://doi.org/10.1016/j.ultramic.2003.08.004>
- Kilaas, R. Software package. <https://www.totalresolution.com>
- Kisielowski, C. H. Frei, I. D. Sharp, J. A. Haber, S. Helveg (2016). *Adv. Struct. Chem. Imaging*, 2: 13. <https://doi.org/10.1186/s40679-016-0027-9>
- Kisielowski, C., C. J. D. Hetherington, Y. C. Wang, R. Kilaas, M. A. O'Keefe, A. Thust. (2001). *Ultramicroscopy*, 89: 243-263. [https://doi.org/10.1016/S0304-3991\(01\)00090-0](https://doi.org/10.1016/S0304-3991(01)00090-0)
- Lichte, H., M. Lehman. (2008). *Rep. Prog. Phys.* 71: 016102. <https://doi.org/10.1088/0034-4885/71/1/016102>
- Lichte, H. (1991). *Ultramicroscopy*, 38(13). [https://doi.org/10.1016/0304-3991\(91\)90105-F](https://doi.org/10.1016/0304-3991(91)90105-F)
- Mobus, G., F. Phillipp, T. Gemming, R. Schweinfest, M. Ruhle. (1997). *J. Electron Microscopy*, 46: 381-395. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.jmicro.a023534>
- Nellist, P. D. y S. J. Pennycook. (1998). *Phys. Rev. Lett.*, 81: 4156. <https://doi.org/10.1103/PhysRevLett.81.4156>
- Pennycook, S. J., Varela, M., Hetherington, C. J. D. y Kirkland, A. I. (2006). Materials advances through aberration- corrected electron microscopy. *MRS Bulletin*, 31: 36-43. <http://dx.doi.org/10.1557/mrs2006.4>
- Press Release. The Nobel Prize in Physics 1986. The Royal Swedish Academy of Sciences. Octubre 15, 1986.
- Ramírez-Rave, S., A. Hernández-Gordillo, H. A. Calderón, A. Galano, C. García-Mendoza y R. Gómez. (2015). *New Journal of Chemistry*, 39: 2188-2194. <https://doi.org/10.1039/C4NJ01891E>
- Tiemeijer, P. C., M. Bischoff, B. Freitag, C. Kisielowski. (2012). *Ultramicroscopy*, 118: 35-43. <https://doi.org/10.1016/j.ultramic.2012.03.019>
- Yoo, H.-D., Y. Liang, Y. Li, H. A. Calderón, F. Robles, S. Jing, L. C. Grabow y Y. Yao. (2015). *Nano Letters*, 15: 2194-2202. <https://doi.org/10.1021/acs.nanolett.5b00388>

# Evaluando la toxicidad de nanomateriales en modelos celulares tridimensionales<sup>◇</sup>

## Evaluating the toxicity of nanomaterials in three-dimensional cellular models

Karla Juárez-Moreno,<sup>\*,\*\*,\*</sup> Kathya Angüis Delgado,<sup>\*\*\*</sup> Brenda Palestina Romero,<sup>\*</sup> Rafael Vázquez-Duhalt<sup>\*</sup>

**ABSTRACT:** Traditionally, *in vitro* evaluations to determine the cytotoxic effect of nanomaterials in cell cultures have been carried out in two-dimensional cultures, because the protocols to assess it have been adapted from those used in toxicology. However, the interactions between cells are much more complex than those found in a monolayer arrangement. Thus, this is the main reason to promote the implementation of three-dimensional cell cultures also known as spheroids, to assess the effect of nanomaterials on cell cultures. Abundant information supports the idea that spheroids represent a better model for the study of cellular responses, since they emulate more precisely the cellular junctions, communication and physiology that occur in a tissue within an *in vivo* model. Herein, we discuss some points about the development of 3D cultures as a new and better methodology for nanotoxicological evaluations.

**KEYWORDS:** spheroids, nanotoxicology, cytotoxicity, cell culture.

**RESUMEN:** Las evaluaciones *in vitro* para determinar el efecto citotóxico de los nanomateriales en cultivos celulares se han realizado de forma tradicional en cultivos bidimensionales. Esto se debe a que dichos protocolos se han adecuado a partir de aquellos utilizados en la toxicología. Sin embargo, las interacciones entre las células son mucho más complejas que las observadas en un arreglo en monocapa, siendo esta la principal razón por la que, desde hace algunos años, se promueve la implementación de los cultivos celulares tridimensionales, a los que se les conoce como esferoides, para ser usados en las evaluaciones del efecto de los nanomateriales en cultivos celulares. Cada vez son más las evidencias que soportan la idea de que los esferoides representan un mejor modelo para el estudio de las respuestas celulares, pues emulan con mayor precisión las uniones celulares, comunicación y fisiología que sucede en un tejido dentro de un modelo *in vivo*. En este artículo, discutimos algunos aspectos sobre el desarrollo de los cultivos 3D como una nueva y mejor metodología para las evaluaciones nanotoxicológicas.

**PALABRAS CLAVE:** esferoides, nanotoxicología, citotoxicidad, cultivo celular.

Recibido: 14 de octubre de 2019.

Aceptado: 17 de febrero de 2020.

<sup>◇</sup> Los autores agradecen al proyecto Conacyt INFR-269071, al proyecto de Cátedras Conacyt No. 53 "Nanotoxicología: evaluación toxicológica de los nanomateriales", al proyecto DGAPA-PAPIME PE209319, al apoyo brindado por el Departamento de Bionanotecnología del CNYN-UNAM y a la Dra. Katrin Quester por su apoyo técnico.

<sup>\*</sup> Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), Centro de Nanociencias y Nanotecnología. Km. 107, Carretera Tijuana-Ensenada, Ensenada, Baja California, México. C.P. 22840.

<sup>\*\*</sup> Cátedras Conacyt en el Centro de Nanociencias y Nanotecnología-UNAM.

<sup>\*\*\*</sup> Universidad Xochicalco, Escuela de Medicina.

<sup>◇</sup> Autora de correspondencia: kjuarez@cny.unam.mx

Correos electrónicos: kathyangu@gmail.com, bpr.roon@gmail.com, rvd@cny.unam.mx

## Introducción

El creciente interés por la evaluación toxicológica de los nanomateriales (NMs) se debe en gran medida a sus diversas aplicaciones, principalmente en las áreas de la salud, alimentación e industrial. La revolución nanotecnológica ha facilitado la síntesis de NMs con propiedades fisicoquímicas peculiares muy interesantes, sin embargo, ha llegado el punto en que la síntesis ha sobrepasado la capacidad de análisis de los NMs. Actualmente las ventajas de las aplicaciones de los NMs son grandes; no obstante su creciente uso en productos comerciales ha despertado un inquietante cuestionamiento sobre su seguridad toxicológica. ¿Será posible que las bondades de los NMs superen sus desventajas? ¿Somos capaces de evaluar el impacto ambiental y de salud que el uso prolongado e ilimitado de los NMs puede ocasionar en los diferentes sistemas biológicos? Y si ese fuera el caso, ¿cuáles son los mejores modelos para su evaluación *in vitro* e *in vivo*? En este artículo, exponemos uno de los modelos celulares de reciente uso que se ha adaptado para la evaluación nanotoxicológica: los esferoides. Este modelo celular es utilizado actualmente en las evaluaciones nanotoxicológicas, porque refleja con mayor detalle el comportamiento del arreglo tridimensional de las células cultivadas *in vitro*, de tal forma que la respuesta celular obtenida sea más parecida a la que podría presentarse en un sistema biológico multicelular *in vivo*.

## ¿Qué es la nanotoxicología y cuáles propiedades de los nanomateriales contribuyen a su toxicidad?

La nanotoxicología es una rama de las nanociencias que surge de forma emergente ante la necesidad actual de evaluar el efecto toxicológico de los NMs en diferentes sistemas biológicos, con la finalidad de explicar los fenómenos y respuestas celulares inducidas por la exposición a los diferentes NMs.

Debido a las peculiares interacciones fisicoquímicas que los NMs exhiben con otros compuestos y moléculas biológicas, ha sido necesario adecuar las técnicas convencionales de la toxicología, para el análisis del efecto de los NMs en diferentes sistemas biológicos. En muchos casos, tales modificaciones no han sido exitosas y son limitadas por las características fisicoquímicas intrínsecas de los NMs como su insolubilidad, capacidad de aglomeración, agregación y sedimentación, entre otras (Xia *et al.*, 2010; Gagner *et al.*, 2012). Además, una característica determinante de algunos NMs es su gran reactividad química con las proteínas y otros componentes presentes en los medios de cultivo celular. Las proteínas presentes en los medios biológicos y que eventualmente pueden rodear al NM forman lo que se conoce como “corona proteica”, esta capa de moléculas bioactivas alrededor del NM puede cambiar su química superficial, su tamaño y carga, modulando así sus interacciones con la célula y afectando de forma directa los procesos de internalización del NM y, por lo tanto, la actividad biológica del mismo (Laurent *et al.*, 2012; Zhdanov, 2019).

Un NM es aquel material que al menos una de sus dimensiones tiene un tamaño entre 1 a 100 nm, existen diferentes tipos, siendo las nanopartículas (NPs) las más estudiadas y utilizadas, estas se caracterizan al estar todas sus dimensiones en la escala nanométrica anteriormente señalada. Existe una enorme cantidad de NMs, con diferentes propiedades fisicoquímicas que afectan sus interacciones y efectos en los sistemas biológicos y, en consecuencia, es muy importante contar con la mayor información relacionada con las características fisicoquímicas de los NMs. Las mediciones típicas iniciales incluyen la determinación de la distribución del tamaño del NM, su forma, composición química, porosidad, química superficial, estructura cristalina y potencial Zeta, estabilidad en medios acuosos, entre otros (Hussain *et al.*, 2015). Si el NM tiene propiedades fisicoquímicas adicionales como, por ejemplo, luminiscencia o magnetismo, entonces se requiere de análisis fisicoquímicos que soporten estas propiedades específicas, por ejemplo, para el caso de los NMs luminiscentes ensayos de fotoluminiscencia, decaimiento y rendimiento cuántico, entre otros estudios que aportan información para sustentar las actividades de estos NM en una célula.

Así pues, para garantizar la seguridad química y biológica de los NMs, es indispensable contar con un estudio completo de sus propiedades fisicoquímicas, para relacionarlas con sus respectivas actividades o propiedades biológicas y las respuestas celulares que puedan ocasionar.

## ¿Cuáles son los modelos estándares para la evaluación citotóxica de los NMs y qué variables hay que evaluar?

De forma muy general se considera que un determinado NM puede inducir 4 tipos de respuestas en las células:

- 1) Cambios en la morfología celular.
- 2) Cambios en la viabilidad celular (comúnmente conocidos como efectos citotóxicos que involucran la muerte y la proliferación celular).
- 3) Genotoxicidad (alteraciones o daños en el material genético de la célula), y,
- 4) Activación de la respuesta inmune (mediante la inducción de una respuesta pro- o anti-inflamatoria en el caso de las células animales, o bien, una respuesta de defensa en el caso de bacterias, protozoarios, hongos y plantas).

Tomando en cuenta estas respuestas, las evaluaciones mínimas dentro de un estudio nanotoxicológico deberían ser los cambios en la morfología celular, citotoxicidad, genotoxicidad e inflamación.

En el caso de los análisis utilizados para determinar el efecto citotóxico en células animales, los modelos estándares para la evaluación *in vitro* son realizados en cultivos bidimensionales, en los cuales crece un número cono-

cido de células en una placa o caja de cultivo celular. En este tipo de superficies, las células que tienen la capacidad de adherencia a un sustrato, crecen sobre este formando un estrato continuo de células, a esta estructura se le conoce como “monocapa”.

## Ensayos para la evaluación de la citotoxicidad de nanomateriales en cultivos *in vitro*

Los análisis para medir la viabilidad y proliferación celular en los cultivos bidimensionales en monocapa se realizan, en su mayoría, a través de ensayos colorimétricos. Algunos de estos son muy sencillos, se denominan ensayos de exclusión por colorimetría y se basan en la capacidad que tiene la célula de excluir el paso de un reactivo solo si la membrana plasmática conserva intacta su estructura física, algunos ejemplos de este tipo de reactivos son el azul de tripano o el rojo neutro. En cualquier caso, es posible identificar si las células son viables pues adquieren una coloración diferente a la de las células muertas, por esta razón el nombre del ensayo es *exclusión*.

Otros análisis colorimétricos más complejos tienen como fundamento medir el cambio de coloración de un reactivo mediante su reducción por enzimas citoplasmáticas o mitocondriales, las cuales tienen un papel fundamental en la fisiología celular. De este modo, el funcionamiento y actividad de estas enzimas, refleja el estado vital y metabólico de la célula. Al reducir el compuesto en cuestión, las enzimas generan un producto con coloración o fluorescencia, que puede ser cuantificado mediante espectrofotometría o fluorimetría y determinar así, con base en la cantidad del compuesto reducido, la cantidad de células existentes. También es posible correlacionar el resultado de estos experimentos con el estado metabólico de las células, después de que fueron expuestas a diferentes concentraciones de NMs y durante una ventana de tiempo definida. Ensayos más elaborados para medir la viabilidad celular, se basan en la cuantificación de moléculas clave del metabolismo celular, por ejemplo, la cuantificación de la concentración intracelular del ATP o de la enzima lactato deshidrogenasa, entre otras.

En este sentido, el fenómeno de la muerte celular pareciera albergar una pregunta determinante: ¿existe la muerte celular inducida por un NM? Sin embargo, la respuesta a esta interrogante no es dicotómica en el sentido de ausencia o presencia. Por el contrario, conocer cuál tipo de muerte celular fue originada por la exposición a un NM, proporciona información particular sobre el efecto y la respuesta celular que un NM determinado puede desencadenar en un sistema biológico.

Por lo tanto, si existe un conocimiento previo de que un NM ocasiona muerte celular, entonces, los análisis posteriores deberían involucrar el estudio sobre el tipo de muerte celular inducida por el NM y determinar si se indujo necrosis, apoptosis, necroptosis o autofagia. La información obtenida en los ensayos permite definir el mecanismo molecular y bioquímico de la to-

xicidad y deducir *a priori* si el NM pudiera tener un potencial efecto genotóxico o de inflamación en un determinado sistema biológico.

Si bien los análisis de citotoxicidad han sido establecidos en cultivos en monocapa desde hace muchos años, con el descubrimiento e implementación de los cultivos tridimensionales (3D) se ha generado una controversia sobre si las evaluaciones citotóxicas en cultivos bidimensionales (2D) proporcionan información real sobre la respuesta celular hacia algún agente tóxico (Laurent *et al.*, 2012). Esto se debe a que el crecimiento de una monocapa celular adherida al plástico de la caja de cultivo, provoca que las células adquieran una arquitectura diferente y, por lo tanto, su fisiología y las respuestas celulares ante los estímulos podrían variar (Verjans *et al.*, 2018) y ser diferentes a las observadas en un organismo multicelular, ante un estímulo interno o externo. En este sentido, las respuestas diferenciales entre los cultivos 2D y 3D hacia algunos tipos de fármacos anticancerígenos, sugieren que existen distintas zonas de crecimiento celular muy definidas dentro del esferoide (Jarockyte *et al.*, 2018). Cada una de ellas con características particulares en relación con el metabolismo, disponibilidad de oxígeno, nutrientes y comunicación celular, las cuales están implicadas en la capacidad de un esferoide para responder a la exposición ante un fármaco. Existe un arreglo celular 3D, cuyas interacciones determinan en conjunto la respuesta específica (Kapałczyńska *et al.*, 2018; Huang y Gao, 2018). Además, se ha reportado que los patrones de expresión de proteínas en los cultivos 3D, son más cercanos o similares a aquellos encontrados en los tejidos y en las muestras de tumores primarios (Verjans *et al.*, 2018). De esa forma, desde hace algunos años se han utilizado estructuras celulares tridimensionales para las evaluaciones nanotoxicológicas *in vitro*, con la finalidad de emular con mayor precisión el comportamiento celular 3D ante un NM determinado, lo cual ha revelado información sorprendente, como se describe a continuación.

## Un poco de historia sobre los esferoides

El arreglo tridimensional de las células animales inicia desde el desarrollo embrionario, esta conformación celular permite el contacto célula-célula y célula-matriz extracelular, fundamental para el mantenimiento de la homeostasis, proliferación y diferenciación celular, entre otras funciones (Laschke y Menger, 2017). Estas estructuras 3D forman naturalmente una esfera multicelular, que se organiza en capas celulares, razón por lo que se les ha denominado *esferoides*. Este tipo de arreglo celular exhibe diferentes propiedades a aquellas células que crecen en una monocapa 2D, algunas de las características mejoradas por este tipo de estructuras son: incremento en la viabilidad celular, morfología estable, capacidad de polarización, interacciones y uniones celulares, y una actividad metabólica incrementada, (Antoni *et al.*, 2015; Kapałczyńska *et al.*, 2018; Huang y Gao, 2018).

En los años 50 del siglo pasado se inició la investigación sobre las primeras estructuras celulares *in vitro* con arreglos 3D para estudios de proliferación e invasión celular (McElwain *et al.*, 1993), pero no fue si no hasta 1971, que existió el primer reporte en donde se utilizó el término “esferoide” para nombrar a este tipo de estructuras celulares en 3D (Sutherland *et al.*, 1971). Ya en los años 90’s se empezó a estandarizar la técnica para el cultivo *in vitro* de esferoides, no solo de células de cáncer sino de otros tipos celulares (Djordjevic y Lange, 1990), siendo así posible reconocer la importancia que tiene la matriz extracelular en la dinámica celular (Nederman *et al.*, 1984).

De esta forma, los esferoides como modelo celular *in vitro* se utilizaron como una herramienta para estudiar los procesos fundamentales de los mecanismos de la biología celular del cáncer. De acuerdo con los reportes, esto se debe a que el ensamblaje tridimensional de los esferoides es capaz de emular el microambiente celular y, por otro lado, se ha distinguido que las células tumorales y su contraparte *in vitro* en una conformación tipo esferoide, comparten similitudes no solo estructurales, sino funcionales, moleculares y, por supuesto, biológicas (Weigelt *et al.*, 2015).

Sin embargo, estas estructuras se empezaron a utilizar en diferentes áreas, por ejemplo, como otro modelo celular en las evaluaciones toxicológicas (Weiswald *et al.*, 2015), para los estudios de farmacocinética y farmacodinamia (Griffith *et al.*, 2006), en la ingeniería de tejidos para el co-cultivo de células (Pampaloni y Stelzer, 2010), para los estudios de migración, crecimiento y diferenciación celular (McElwain y Pettet, 1993), entre otros (figura 1).

**Figura 1.** Cultivo de células de fibroblastos de ratón L929 para la formación de esferoides.



Nota: En la parte superior se ilustra el método de “gota colgante” utilizado para la formación de esferoides y la representación de la formación de esferoides. En la parte inferior, se presentan micrografías de células de fibroblastos de ratón L929, cultivadas para la formación de esferoides, en donde se evidencia el cambio en la distribución de las células conforme aumentan los días del cultivo celular y, finalmente, la formación de un esferoide en el último día de cultivo.

Fuente: Ilustraciones y fotografías proporcionadas por las autoras K. Angüis Delgado y K. Juárez-Moreno, respectivamente.

## ¿Cuáles son las ventajas y desventajas de los esferoides respecto de otros cultivos?

Las ventajas del crecimiento celular en estructuras 3D radica principalmente en que no requieren de un andamio celular para proliferar. Además de ello, se ha observado que el comportamiento 3D de las células arregladas en esferoides se asemeja por mucho al comportamiento que las células tienen *in vivo* en un organismo multicelular (Fey y Wrzesinski, 2012; Huang y Gao, 2018). En lo que concierne a los estudios de toxicología, se ha reportado que los esferoides son uno de los modelos biológicos preferidos, al tener una mayor vida media y, en consecuencia, ser adecuados para realizar estudios de exposición crónica a ciertos agentes tóxicos (Messner *et al.*, 2013). Además de lo anterior, en el campo de la biología del cáncer, se han utilizado los esferoides porque al igual que en esa patología, las células que los constituyen también son heterogéneas (Huang y Gao, 2018).

Algunas de las ventajas para el uso de los esferoides respecto de su contraparte en 2D, es que permiten el estudio de las interacciones célula-célula y célula-matriz extracelular como sucede en un tumor (tabla 1).

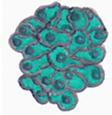
Por otro lado, los estudios realizados en cultivos 3D se han intensificado por la necesidad de generar modelos *in vitro* de células humanas, lo cual permitirá estudiar a profundidad las respuestas celulares y moleculares derivadas de este tipo de células. Un ejemplo es el caso de la hepatitis C, en el que las evaluaciones clínicas de la respuesta a patógenos especie-específicos y la toxicidad hepática ha sido evaluada en cultivos 3D, permitiendo crear un modelo predictivo adecuado, para evitar que las evaluaciones clínicas fallen (Sivaraman *et al.*, 2005).

El cultivo de células en estructuras 3D provee conocimiento sobre la dinámica y mecánica celular, muy diferente al observado en un cultivo 2D. Esto se debe a que las proteínas de adhesión celular y los procesos de señalización pueden ser afectados directamente por el tipo de arreglo celular. Este arreglo tridimensional le permite a la célula depositar la matriz extracelular para comunicarse con el exterior, llevar a cabo procesos de morfo-diferenciación y remodelación, por mencionar algunos procesos biológicos importantes (Griffith y Swartz, 2006).

Se ha demostrado también que los esferoides presentan una mayor resistencia a los fármacos que las células que han crecido en estructuras bidimensionales, este comportamiento es atribuido a las propiedades del microambiente donde se encuentran los esferoides, reflejando con mejor detalle las condiciones existentes en el microambiente tumoral *in vivo* (Mikhail *et al.*, 2013).

En el caso de las evaluaciones de NMs en sistemas 3D, se ha reportado que la unión e internalización de estos puede ser diferente a la respuesta en monocapa, debido a la compleja fisiología de los cultivos esferoidales. Por ejemplo, en un estudio se realizó la comparación morfológica de 40 líneas celulares de diferentes orígenes tumorales que fueron cultivadas para la forma-

**Tabla 1.** Ventajas y desventajas de los cultivos en monocapa (2D) y en esferoides (3D).

	2D MONOCAPA	3D ESFEROIDES
		
<b>Ventajas</b>	<p>Heterogeneidad celular: se pueden utilizar co-cultivos.</p> <p>Resistencia a los fármacos.</p> <p>De fácil manejo y no requiere matriz especial para su crecimiento.</p> <p>Se pueden cultivar células en suspensión y adherentes.</p> <p>De bajo costo y alta reproducibilidad.</p>	<p>Heterogeneidad celular: distintos tipos de células pueden ser usadas para producción de esferoides.</p> <p>La expresión génica y el fenotipo son similares a los tumores <i>in vivo</i>.</p> <p>Una vez establecidas las condiciones es de alta reproducibilidad.</p>
<b>Desventajas</b>	<p>No imita la organización 3D de tumores o tejidos <i>in vivo</i>.</p> <p>Expresión débil de proteínas ECM y pobre interacciones entre células ECM.</p>	<p>Tienen un núcleo necrótico y una capa periférica de células con tasa alta de proliferación.</p> <p>No todas las líneas celulares pueden formar esferoides y, por lo tanto, se requiere utilizar una matriz de inducción del crecimiento.</p> <p>Tiempo de crecimiento lento, además de ser un poco más costoso.</p>
<b>Formas de cultivo</b>	<p>Placas multipozo de cultivo celular.</p> <p>Cajas de Petri para cultivo celular.</p> <p>Frascos de cultivo.</p>	<p>Placas de baja adherencia.</p> <p>Placa multipocillo Seivax NanoCulture.</p> <p>Placas para cultivo por método de gota colgante: Perfecta3D and GravityPLUS 3D.</p>

Fuente: Elaboración de los autores.

ción de esferoides, con ello se logró identificar tres grupos de esferoides de acuerdo con su arquitectura celular: a) esferoides estrechos; b) esferoides de agregación compacta, y, c) esferoides de agregación laxa (Vinci *et al.*, 2015). Estos modelos *in vitro* de cultivo celular, tratan de imitar en la medida de lo posible, el microambiente celular *in vivo*, siendo además de ello, un modelo relativamente sencillo y mucho más barato que los modelos animales (Tchoryk *et al.*, 2019). Por lo que de forma tradicional se ha reconocido a los esferoides como el modelo celular intermediario entre los análisis *in vitro* y los estudios *in vivo* (Mikhail *et al.*, 2013).

## Ejemplos de nanomateriales evaluados con esferoides

La gran mayoría de los estudios reportados sobre el uso de esferoides para la evaluación citotóxica de nanopartículas (NPs) se basan en la comparación de sus efectos citotóxicos, su capacidad de internalización y difusión en cultivos celulares en monocapa (2D) y en esferoides (3D). En ese sentido, se presentan reportes en los cuales se describe la evaluación de NPs de metales y óxidos en estos sistemas tridimensionales.

Se ha evaluado el efecto citotóxico y la capacidad de internalización de nanopartículas de dióxido de titanio (NPs  $\text{TiO}_2$ ) en cultivos celulares de osteoblastos humanos para estudiar las respuestas de la interacción célula-célula en el tejido óseo (Souza *et al.*, 2019). Los resultados de esa investigación demostraron que después de 72 horas de exposición a las NPs  $\text{TiO}_2$ , la viabilidad celular no se afectó. Sin embargo, la incubación de los esferoides de osteoblastos con concentraciones elevadas de NPs  $\text{TiO}_2$ , influenciaron su ciclo celular permitiendo su diferenciación y mineralización. Un hallazgo importante es que las concentraciones elevadas de NPs  $\text{TiO}_2$  indujeron la expresión de citosinas pro-inflamatorias y factores de crecimiento involucrados en la homeostasis del hueso y la osteólisis (Souza *et al.*, 2019). En otro estudio, se evaluó la eficacia de la terapia fotodinámica utilizando NPs de  $\text{TiO}_2$  en células de glioma cultivadas en esferoides, los resultados muestran una disminución significativa de la viabilidad celular en las primeras 6 horas post-tratamiento inducida por la radiación con luz UV (Yamaguchi *et al.*, 2010). También se ha evaluado el papel de la deposición de colágeno y la capacidad de diferenciación de células óseas y la producción de citosinas pro-inflamatorias en presencia de NPs de  $\text{TiO}_2$  en modelos 3D de osteoblastos (Souza *et al.*, 2019).

Otras NPs de óxidos que han sido evaluadas en cultivos de 2D y de esferoides son las de óxido de zinc (ZnO NPs). Un estudio reportó la capacidad de las ZnO NPs de 25 nm de diámetro de inducir una respuesta citotóxica de muerte celular dependiendo del tipo de arreglo dimensional que tenían las células del colon (Chia *et al.*, 2015). Una contribución importante de los autores es su propuesta sobre la dinámica de recambio celular presente en los esferoides, los cuales se comportan como “capas de cebolla”, cuyas células se desprenden por el daño generado y por los procesos de inflamación causados por la exposición a las NPs; esto permite que exista un capa inferior de células viables la cual responde de forma diferente a los efectos de las NPs dependiendo de su arreglo dimensional (Chia *et al.*, 2015).

Las nanopartículas de oro (AuNPs) también han sido estudiadas en los cultivos esferoidales, y se han reportado NPs ultrapequeñas con tamaños menores a los 10 nm, son capaces de internalizarse con mayor rapidez que las de 15 nm. Además, se determinó que las AuNPs de 2 a 6 nm se encontraban en el citoplasma y podían penetrar la membrana nuclear, en tanto que las AuNPs de 15 nm solo se localizaban en el citoplasma. En el artículo publicado, los autores comparan los resultados de los cultivos *in vitro*, con la

penetración de las AuNPs en un tumor *in vivo* y concluyen que los modelos 3D o esféricos representan una buena aproximación para el estudio de la internalización y distribución de las NPs *in vitro* (Huang *et al.*, 2012). Por otro lado, se han realizado evaluaciones de la internalización de nanopartículas de oro (AuNPs) con diferentes formas como nanoanillos y nanobastones (Yang *et al.*, 2018), en este caso se ha evaluado su papel como nanocarreadores de fármacos antineoplásicos en cultivos en monocapa y se han comparado con los esféricos (Mikhail *et al.*, 2013). Otros estudios sugieren que la morfología de las AuNPs, ya sean en forma de rodillo o esféricas, tienen capacidades distintas de poder ser internalizadas por las células (Lu y Stenzel, 2018). Adicionalmente, los esféricos de células de cerebro se han utilizado como modelo *in vitro*, para determinar la biocompatibilidad y la capacidad de las AuNPs y las NPs de ácido poliláctico de atravesar la barrera hematoencefálica (Matsumoto *et al.*, 2019).

Se ha comparado la toxicidad de NPs bimetálicas de plata y oro (Ag/Au NPs), en esféricos de células de cáncer de mama, colon, riñón e hígado, y las mismas células cultivadas en 2D, concluyendo que los cultivos esféricos son mucho más susceptibles a la toxicidad de las NPs (Katifelis *et al.*, 2018).

Otras NPs no metálicas también han sido evaluadas en los cultivos 3D, por ejemplo, se ha comparado el efecto citotóxico de diferentes concentraciones de NPs de SiO<sub>2</sub> de varios tamaños y funcionalizaciones, en cultivos 2D y 3D de células de cáncer de pulmón (A549), carcinoma bucal (células KB) y fibroblastos murinos (L929) (Pellen-Mussi *et al.*, 2018). Los autores encontraron que las NPs de SiO<sub>2</sub> no eran citotóxicas en las células de cáncer de pulmón y los fibroblastos, sin embargo, sí afectaban la viabilidad de las células KB y este efecto era más evidente en los cultivos en esféricos, por lo cual concluyen que la susceptibilidad de las células a las NPs depende del tipo y arreglo dimensional (Pellen-Mussi *et al.*, 2018). También, existen reportes de la incorporación de nanoalambres en esféricos de células cardíacas para generar redes de conductividad eléctrica para mejorar las contracciones de los cardiomiocitos (Tan *et al.*, 2015).

Asimismo, se han realizado estudios sobre la internalización de NPs de poliestireno de 44 y 100 nm de tamaño en fibroblastos y fibrosarcoma (cáncer de piel) y se encontró que la difusión de las NPs de 100 nm en los cultivos 3D, era significativamente más lenta que en los cultivos 2D. Es importante mencionar que el citoesqueleto tiene un papel determinante en la internalización de las NPs en los cultivos 3D, no así en los 2D, siendo la macropinocitosis el mecanismo principal por el cual las NPs se internalizan en los cultivos 3D (Belli *et al.*, 2017).

La citotoxicidad de algunos nanomateriales luminiscentes también ha sido evaluada mediante el uso de esféricos, como, por caso, nanopartículas de sílica mesoporosa cargadas con gadolinio (Matsumoto *et al.*, 2019).

Algunos datos muy interesantes relacionados con la comparación citotóxica entre los cultivos 2D y 3D hacia los NMs incluyen algunos estudios que

reportan que los cultivos esferoideales de células de cáncer de colon (HT29) y células de riñón (SPEV), exhiben una citotoxicidad diferencial a las AuNPs, siendo las de cáncer mucho más susceptibles a la exposición de esas nanopartículas (Pavlovich *et al.*, 2017). Otro caso incluye la susceptibilidad diferencial de fibroblastos (NIH-3T3) y células de cáncer de pulmón (A549) hacia ZnO NPs y TiO<sub>2</sub> NPs. Siendo los esferoides de las células A549 mucho más sensibles a las ZnO NPs en comparación con los cultivos en monocapa, es probable que esto se deba a la conformación laxa de los esferoides formados por las células de pulmón. Por el contrario, los esferoides formados por los fibroblastos son mucho más compactos, y no muestran una citotoxicidad diferencial hacia las ZnO NPs respecto de su contraparte en dos dimensiones (Sambale *et al.*, 2015).

Es importante resaltar que las TiO<sub>2</sub> NPs resultaron no ser citotóxicas en ninguna de las dos líneas celulares, sin embargo, el parámetro que se afectó por la presencia de esos NMs fue la formación de los esferoides, ocasionando que su tamaño disminuyera considerablemente (Sambale *et al.*, 2015).

En la actualidad, el uso de cultivos esferoideales para las evaluaciones nanotoxicológicas es una ventaja y es cada vez más evidente que los modelos 3D podrían emular el microambiente celular que existe en un organismo, además al proveer información importante sobre las distintas respuestas asociadas con la arquitectura celular, permite la comparación entre los cultivos bidimensionales en monocapa y el entendimiento de las respuestas celulares hacia los NMs en relación con el arreglo arquitectónico de las células (Lu y Stenzel, 2018).

## Conclusiones

La nanotoxicología es una ciencia emergente originada por la necesidad de evaluar el impacto de los materiales nanoestructurados en la salud y el ambiente, por esta razón, los protocolos convencionales de las evaluaciones toxicológicas han tenido que ser adaptados, y algunas veces su optimización es complicada debido a las características fisicoquímicas de los nanomateriales. En ese sentido, las evaluaciones del efecto citotóxico y de proliferación celular de los nanomateriales se han realizado de forma tradicional en cultivos bidimensionales (2D). No obstante, los cultivos celulares de arreglos tridimensionales se utilizan cada vez más, al existir evidencias contundentes sobre la diferencia en la susceptibilidad que tienen los cultivos 2D respecto de los esferoides o cultivos en 3D.

La mayoría de los estudios apuntan a que los cultivos de esferoides representan una mejor aproximación a la organización de las células en un sistema *in vivo*, por consiguiente, las repuestas celulares que arrojan emulan con mayor precisión aquellas que se presentan en un modelo *in vivo*.

La susceptibilidad de las células a los nanomateriales es diferente en los cultivos 2D que en los 3D, y todo indica que las células cultivadas en arreglos

de dos dimensiones tienen una mayor resistencia a los agentes químicos, necesitando de mayores concentraciones para que estos ejerzan una actividad citotóxica considerable. Con este artículo, evidenciamos la necesidad de implementar los cultivos tridimensionales en esferoides como un parámetro importante de comparación al momento de realizar evaluaciones en materia de nanotoxicología.

## Referencias

- Antoni, D., Burckel, H., Josset, E., Noel, G., Antoni, D., Burckel, H., Noel, G. (2015). Three-dimensional cell culture: A breakthrough *in vivo*. *International Journal of Molecular Sciences*, 16(12): 5517–5527. <https://doi.org/10.3390/ijms16035517>
- Belli, V., Guarnieri, D., Biondi, M., della Sala, F. y Netti, P. A. (2017). Dynamics of nanoparticle diffusion and uptake in three-dimensional cell cultures. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 149: 7-15. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2016.09.046>
- Chia, S. L., Tay, C. Y., Setyawati, M. I. y Leong, D. T. (2015). Biomimicry 3D gastrointestinal spheroid platform for the assessment of toxicity and inflammatory effects of zinc oxide nanoparticles. *Small*, 11(6): 702-712. <https://doi.org/10.1002/smll.201401915>
- Djordjevic, B. y Lange, C. S. (1990). Clonogenicity of mammalian cells in hybrid spheroids: a new assay method. *Radiation and Environmental Biophysics*, 29(1): 31-46. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2305028>
- Fey, S. J. y Wrzesinski, K. (2012). Determination of drug toxicity using 3D spheroids constructed from an immortal human hepatocyte cell line. *Toxicological Sciences*, 127(2): 403-411. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfs122>
- Gagner, J. E., Shrivastava, S., Qian, X., Dordick, J. S. y Siegel, R. W. (2012). Engineering nanomaterials for biomedical applications requires understanding the nano-bio interface: A perspective. *Journal of Physical Chemistry Letters*, 3(21): 3149-3158. <https://doi.org/10.1021/jz301253s>
- Griffith, L. G. y Swartz, M. A. (2006). Capturing complex 3D tissue physiology *in vitro*. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 7(3): 211-224. <https://doi.org/10.1038/nrm1858>
- Huang, B. W. y Gao, J. Q. (2018). Application of 3D cultured multicellular spheroid tumor models in tumor-targeted drug delivery system research. *Journal of Controlled Release*, enero 28; 270: 246-259. Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2017.12.005>
- Huang, K., Ma, H., Liu, J., Huo, S., Kumar, A., Wei, T., ... Liang, X.-J. (2012). Size-dependent localization and penetration of ultrasmall gold nanoparticles in cancer cells, multicellular spheroids, and tumors *in vivo*. *ACS Nano*, 6(5): 4483-4493. <https://doi.org/10.1021/nn301282m>
- Hussain, S. M., Warheit, D. B., Ng, S. P., Comfort, K. K., Grabinski, C. M. y Braydich-Stolle, L. K. (2015). At the crossroads of nanotoxicology *in vitro*: Past achievements and current challenges. *Toxicological Sciences*, 25, septiembre. Oxford University Press. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfv106>

- Jarockyte, G., Dapkute, D., Karabanovas, V., Daugmaudis, J. V., Ivanauskas, F. y Rotomskis, R. (2018). 3D cellular spheroids as tools for understanding carboxylated quantum dot behavior in tumors. *Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects*, 1862(4): 914-923. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2017.12.014>
- Kapałczyńska, M., Kolenda, T., Przybyła, W., Zajączkowska, M., Teresiak, A., Filas, V., ... Lamperska, K. (2018). 2D and 3D cell cultures – a comparison of different types of cancer cell cultures. *Archives of Medical Science*, 14(4): 910-919. <https://doi.org/10.5114/aoms.2016.63743>
- Katifelis, H., Lyberopoulou, A., Mukha, I., Vityuk, N., Grodzyuk, G., Theodoropoulos, G. E., ... Gazouli, M. (2018). Ag/Au bimetallic nanoparticles induce apoptosis in human cancer cell lines via P53, CASPASE-3 and BAX/BCL-2 pathways. *Artificial Cells, Nanomedicine and Biotechnology*, 46(sup3), S389-S398. <https://doi.org/10.1080/21691401.2018.1495645>
- Laschke, M. W. y Menger, M. D. (2016). Life is 3D: Boosting spheroid function for tissue engineering. *Trends in Biotechnology*, 35(2): 133-144. <https://doi.org/10.1016/J.TIBTECH.2016.08.004>
- Laurent, S., Burtea, C., Thirifays, C., Häfeli, U. O. y Mahmoudi, M. (2012). Crucial ignored parameters on nanotoxicology: The importance of toxicity assay modifications and “cell vision.” *PLoS ONE*, 7(1): e29997. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0029997>
- Lu, H. y Stenzel, M. H. (2018). Multicellular tumor spheroids (MCTS) as a 3D *in vitro* evaluation tool of nanoparticles. *Small*, 14(13): 1702858. <https://doi.org/10.1002/smll.201702858>
- Matsumoto, K., Saitoh, H., Doan, T. L. H., Shiro, A., Nakai, K., Komatsu, A., ... Tamanoi, F. (2019). Destruction of tumor mass by gadolinium-loaded nanoparticles irradiated with monochromatic X-rays: Implications for the Auger therapy. *Scientific Reports*, 9(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-019-49978-1>
- McElwain, D. L. S. y Pettet, G. J. (1993). Cell migration in multicell spheroids: Swimming against the tide. *Bulletin of Mathematical Biology*, 55(3): 655-674. <https://doi.org/10.1007/BF02460655>
- Messner, S., Agarkova, I., Moritz, W. y Kelm, J. M. (2013). Multi-cell type human liver microtissues for hepatotoxicity testing. *Archives of Toxicology*, 87(1): 209-213. <https://doi.org/10.1007/s00204-012-0968-2>
- Mikhail, A. S., Etezadi, S. y Allen, C. (2013). Multicellular tumor spheroids for evaluation of cytotoxicity and tumor growth inhibitory effects of nanomedicines *in vitro*: a comparison of docetaxel-loaded block copolymer micelles and Taxotere®. *PloS One*, 8(4): e62630. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0062630>
- Nederman, T., Norling, B., Glimelius, B., Carlsson, J. y Brunk, U. (1984). Demonstration of an extracellular matrix in multicellular tumor spheroids. *Cancer Research*, 44(7): 3090-3097. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6373002>
- Pampaloni, F. y Stelzer, E. (2010). Three-dimensional cell cultures in toxicology. *Biotechnology & Genetic Engineering Reviews*, 26: 117-138. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21415878>
- Pavlovich, E., Volkova, N., Yakymchuk, E., Perepelitsyna, O., Sydorenko, M. y Golt-

- sev, A. (2017). *In vitro* study of influence of Au nanoparticles on HT29 and SPEV cell lines. *Nanoscale Research Letters*, 12. <https://doi.org/10.1186/s11671-017-2264-9>
- Pellen-Mussi, P., Tricot-Doleux, S., Neaime, C., Nerambourg, N., Cabello-Hurtado, F., Cordier, S., ... Jeanne, S. (2018). Evaluation of functional SiO<sub>2</sub> nanoparticles toxicity by a 3D culture model. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*, 18(5): 3148-3157. <https://doi.org/10.1166/jnn.2018.14619>
- Sambale, F., Lavrentieva, A., Stahl, F., Blume, C., Stiesch, M., Kasper, C., ... Scheper, T. (2015). Three dimensional spheroid cell culture for nanoparticle safety testing. *Journal of Biotechnology*, 205, 120-129. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2015.01.001>
- Sivaraman, A., Leach, J. K., Townsend, S., Iida, T., Hogan, B. J., Stolz, D. B., ... Griffith, L. G. (2005). A microscale *in vitro* physiological model of the liver: predictive screens for drug metabolism and enzyme induction. *Current Drug Metabolism*, 6(6): 569-591. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16379670>
- Souza, W., Piperni, S. G., Laviola, P., Rossi, A. L., Rossi, M. I. D., Archanjo, B. S., ... Ribeiro, A. R. (2019). The two faces of titanium dioxide nanoparticles bio-camouflage in 3D bone spheroids. *Scientific Reports*, 9(1): 9309. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-45797-6>
- Sutherland, R. M., McCredie, J. A. e Inch, W. R. (1971). Growth of multicell spheroids in tissue culture as a model of nodular carcinomas. *Journal of the National Cancer Institute*, 46(1): 113-120. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/5101993>
- Tan, Y., Richards, D., Xu, R., Stewart-Clark, S., Mani, S. K., Borg, T. K., ... Mei, Y. (2015). Silicon nanowire-induced maturation of cardiomyocytes derived from human induced pluripotent stem cells. *Nano Letters*, 15(5): 2765-2772. <https://doi.org/10.1021/nl502227a>
- Tchoryk, A., Taresco, V., Argent, R. H., Ashford, M., Gellert, P. R., Stolnik, S., ... Garnett, M. C. (2019). Penetration and uptake of nanoparticles in 3D tumor spheroids. *Bioconjugate Chemistry*, 30(5): 1371-1384. <https://doi.org/10.1021/acs.bioconjchem.9b00136>
- Verjans, E.-T., Doijen, J., Luyten, W., Landuyt, B. y Schoofs, L. (2018). Three-dimensional cell culture models for anticancer drug screening: Worth the effort? *Journal of Cellular Physiology*, 233(4): 2993-3003. <https://doi.org/10.1002/jcp.26052>
- Vinci, M., Box, C. y Eccles, S. A. (2015). Three-dimensional (3D) tumor spheroid invasion assay. *Journal of Visualized Experiments*, 2015(99). <https://doi.org/10.3791/52686>
- Weigelt, B., Ghajar, C. M. y Bissell, M. J. (2014). The need for complex 3D culture models to unravel novel pathways and identify accurate biomarkers in breast cancer. *Advanced Drug Delivery Reviews*, abril. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2014.01.001>
- Weiswald, L.-B., Bellet, D. y Dangles-Marie, V. (2015). Spherical cancer models in tumor biology. *Neoplasia*, 17(1): 1-15. <https://doi.org/10.1016/J.NEO.2014.12.004>
- Xia, X., Monteiro-riviere, N. A. y Riviere, J. E. (2010). An index for characterization

- of nanomaterials in biological systems. *Nature Nanotechnology*, 5(agosto): 671-675. <https://doi.org/10.1038/nnano.2010.164>
- Yamaguchi, S., Kobayashi, H., Narita, T., Kanehira, K., Sonezaki, S., Kubota, Y., ... Iwasaki, Y. (2010). Novel photodynamic therapy using water-dispersed TiO<sub>2</sub>-polyethylene glycol compound: evaluation of antitumor effect on glioma cells and spheroids *in vitro*. *Photochemistry and Photobiology*, 86(4): 964-971. <https://doi.org/10.1111/j.1751-1097.2010.00742.x>
- Yang, C.-C., Tseng, P.-H., Low, M. C., Hua, W.-H., Yu, J.-H., He, Y., ... Kiang, Y.-W. (2018). Evaluations of cell uptake capabilities of gold nanoparticle and photosensitizer in a cell spheroid, (Conferencia de presentación). En X.-J. Liang, W. J. Parak y M. Osiński (eds.), *Colloidal nanoparticles for biomedical applications XIII* (vol. 10507: 27). SPIE. <https://doi.org/10.1117/12.2287592>
- Zhdanov, V. P. (2019). Formation of a protein corona around nanoparticles. *Current Opinion in Colloid and Interface Science*, junio 1. Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.cocis.2018.12.002>



## Temática y alcance

*Mundo Nano. Revista Interdisciplinaria en Nanociencias y Nanotecnología* es una revista científica de acceso abierto revisada por pares, dirigida a especialistas en nanociencias y nanotecnología. Tiene como objetivo dar a conocer los principales resultados de investigación en el área, incluyendo sus implicaciones sociales, ambientales, éticas y legales. Por su naturaleza es una publicación de alcance internacional. Publica artículos exclusivamente de investigación y revisiones del campo de conocimiento de interés, escritos tanto en inglés como en español.

Se publica dos veces al año (los meses de enero y julio), en formato impreso y electrónico. Editada y patrocinada desde 2008 de forma ininterrumpida por la Universidad Nacional Autónoma de México.

## Política de secciones

### Editorial

Escrita por los integrantes del Comité Editorial y, cuando así corresponda, también por los editores invitados. Los textos aquí incluidos destacan las temáticas abordadas en cada fascículo, haciendo énfasis en las principales tendencias de investigación en el área. De igual forma, es un espacio donde se presentan los avances y logros de la revista, así como temas de interés editorial.

### Artículos de revisión

Por invitación de los editores o del Comité Editorial. Versan sobre los avances y controversias en el campo de las nanociencias y la nanotecnología, con una amplia revisión bibliográfica, destacando puntos de vista analíticos. Su principal propósito es ofrecer una actualización integral acerca de los temas que trata la revista. Todas las colaboraciones solicitadas para esta sección serán sometidas a dictamen académico bajo la modalidad pares ciegos.

### Artículos de investigación

Artículos de alto nivel producto de investigaciones originales e inéditas dentro del campo de las nanociencias y la nanotecnología, tomando en consideración sus implicaciones sociales, ambientales, éticas y legales. Hallazgos o resultados originales de proyectos de investigación que evidencien una postura teórica, metodología clara, resultados, discusión y conclusiones. Todas las colaboraciones dirigidas a esta sección serán sometidas a dictamen académico bajo la modalidad pares ciegos.

## Dictamen editorial

Los autores que postulen un artículo para su posible publicación en *Mundo Nano* deberán remitir—completa y en su versión final— la documentación indicada en la sección [requisitos para la postulación de originales](#). Una vez que el equipo editorial acredite el cumplimiento de todos los requisitos de postulación, el texto será remitido a dictamen editorial el cual contempla las siguientes etapas:

1. Acreditar una revisión bajo la herramienta aprobada por el Comité Editorial para detección de plagio. Sólo posterior a ello será posible continuar con las siguientes etapas del dictamen editorial.
2. Se verificará que el texto postulado guarde relación con el enfoque y alcance de la revista. No se considerarán

aquellos trabajos que no contemplen explícitamente como componente relevante la dimensión nano.

3. Se revisará que el texto cumpla con todas y cada una de las indicaciones de forma señaladas en los [requisitos para la postulación de originales](#) y [requisitos para la entrega de originales](#) así como en las [instrucciones para los autores](#).
4. Se revisará que la bibliografía a la que se recurre sea pertinente y actualizada, y que esté debidamente estandarizada según la norma Chicago ver: [http://www.chicagomanualofstyle.org/tools\\_citationguide.html](http://www.chicagomanualofstyle.org/tools_citationguide.html)
5. De acuerdo con los lineamientos de política editorial aprobados por el Comité Editorial, se dará prioridad a los textos cuya bibliografía se entregue gestionada electrónicamente y con hipervínculos activos a los DOI respectivos, en todos los casos que así corresponda.

Una vez que el artículo postulado acredite el dictamen editorial, se notificará formalmente al autor de contacto el registro e inicio del proceso de dictamen académico.

## Dictamen académico

Los artículos deberán acreditar favorablemente el proceso de dictamen académico el cual operará bajo la modalidad de doble revisión por pares ciegos, donde la identidad tanto de los autores como de los dictaminadores permanecerán en anonimato, para ello se tomarán en consideración los siguientes lineamientos:

1. Los artículos que acrediten el dictamen editorial serán enviados a académicos expertos en la misma área disciplinar y temática que las del texto postulado. Los revisores serán seleccionados de entre la cartera de árbitros—integrada por especialistas de instituciones nacionales e internacionales— quienes emitirán comentarios acerca de la pertinencia y calidad académica del texto propuesto y determinarán la factibilidad de la publicación del texto en cuestión.
2. Los dictaminadores tendrán bajo su responsabilidad revisar y analizar la pertinencia académica, teórica y metodológica de todos y cada uno los artículos que les sean asignados. Serán ellos los responsables de revisar la presencia explícita del apartado teórico-metodológico, así como su congruencia respecto del campo de estudios, la coherencia entre el aporte académico y la relevancia de los hallazgos descritos, así como la actualidad y oportunidad de la bibliografía a la que se recurre.
3. Todos los textos serán remitidos a dos expertos—adscritos a una institución distinta de la adscripción de los autores— quienes emitirán sus comentarios. En caso de discrepancia en los dictámenes, se recurrirá a un tercer evaluador para que dirima el desacuerdo.
4. Finalmente, con base en las recomendaciones de los revisores, la decisión de los editores de *Mundo Nano* será:
  - a. Recomendar su publicación sin modificaciones.
  - b. Recomendar su publicación con cambios menores, y que no hacen necesaria una segunda revisión por parte de los árbitros.
  - c. Condicionar su publicación a la realización de cambios importantes, lo que obliga a una nueva revisión por parte de los revisores. Este proceso se puede repetir hasta un máximo de tres rondas, si a este

punto el documento aún no es recomendado para su publicación, el artículo será rechazado sin opción a un nuevo envío.

d. No recomendar su publicación.

5. Para que un texto sea aprobado para su publicación es indispensable que al menos dos de los tres dictámenes sean positivos.
6. La dirección editorial garantizará, en todos los casos, que los dictámenes entregados a los autores contengan argumentos sólidos que respalden la decisión editorial.
7. Los resultados del proceso de dictamen académico serán inapelables en todas las circunstancias.
8. En caso de recibir observaciones, el autor tendrá un plazo de veintidós días naturales para hacer llegar al editor la nueva versión del trabajo. De hacerlo fuera de este plazo, el documento iniciará un nuevo proceso de dictamen.
9. El tiempo para que el documento sea turnado a dictamen estará en función del número de artículos en la lista de espera. Los árbitros, una vez recibido el artículo, tendrán cuatro semanas para realizar la revisión y entregar el resultado.
10. Los documentos aceptados iniciarán el proceso de edición (corrección de estilo, marcaje de metadatos, formación, maquetación etc.), para, posteriormente, ser incluidos en el fascículo que corresponda, según la decisión de los editores responsables.
11. Una vez concluido el proceso editorial (corrección de estilo, marcaje de metadatos, formación y maquetación), la versión preliminar del texto será turnada a los autores para su última revisión y aprobación. Los autores tendrán un plazo de tres días naturales para la entrega del visto bueno, si no se entregaran comentarios en dicho plazo, la coordinación editorial de la revista asumirá que los autores han dado su aprobación tácita.

## Política de acceso abierto

Los autores que publiquen en *Mundo Nano* aceptan las siguientes condiciones:

1. De acuerdo con la legislación de derechos de autor, *Mundo Nano, Revista Interdisciplinaria en Nanociencias y Nanotecnología* reconoce y respeta el derecho moral de los autores, así como la titularidad del derecho patrimonial, el cual será transferido —de forma no exclusiva— a la revista para su difusión en acceso abierto.
2. *Mundo Nano* no realiza cargos a los autores por enviar y procesar artículos para su publicación.
3. Todos los textos publicados por *Mundo Nano* —sin excepción— se distribuyen amparados bajo la licencia *Creative Commons 4.0 Atribución-No Comercial (CC BY-NC 4.0 Internacional)*, que permite a terceros utilizar lo publicado siempre que mencionen la autoría del trabajo y a la primera publicación en esta revista.
4. Los autores pueden realizar otros acuerdos contractuales independientes y adicionales para la distribución no exclusiva de la versión del artículo publicado en *Mundo Nano* por ejemplo incluirlo en un repositorio institucional o darlo a conocer en otros medios en papel o electrónicos, siempre que indique clara y explícitamente que el trabajo se publicó por primera vez en *Mundo Nano. Revista Interdisciplinaria en Nanociencias y Nanotecnología*.

5. Para todo lo anterior, los autores deben remitir el formato de carta-cesión de la propiedad de los derechos de la primera publicación debidamente requisitado y firmado. Este formato debe ser remitido en archivo PDF al correo: mundonano@unam.mx



Esta obra está bajo una licencia *Creative Commons Reconocimiento-No Comercial 4.0 Internacional*.

## Código de ética

*Mundo Nano. Revista Interdisciplinaria en Nanociencias y Nanotecnología* se suscribe al código de ética para la actuación y desempeño de los actores involucrados en el proceso de publicación de esta revista (editores, comité editorial, autores y revisores) establecidos por el Comité de Ética para Publicaciones (COPE, por sus siglas en inglés) y disponible en <https://publicationethics.org/resources/code-conduct>

## Detección de plagio

En *Mundo Nano. Revista Interdisciplinaria en Nanociencias y Nanotecnología* se utiliza un software especializado para la detección de plagio. Los textos recibidos serán sometidos a revisión antes de enviarlos a dictamen editorial y académico, se rechazarán si el porcentaje de similitud con otro texto publicado o disponible en internet sea superior a 50%.

Si se detecta o sospecha el uso de información redundante o duplicada en un texto postulado, el procedimiento a seguir es el que COPE resume en el siguiente diagrama: <https://publicationethics.org/files/Spanish%20%281%29.pdf>

## Preservación de archivos

Esta revista utiliza el sistema LOCKSS para crear un sistema de almacenamiento distribuido entre las bibliotecas participantes y permite la creación de archivos permanentes en la revista con fines de conservación y restauración ver más: <https://www.lockss.org/>

## Lineamientos y buenas prácticas editoriales

Estos lineamientos hacen referencia a las políticas de buenas prácticas editoriales del COPE y disponible en: <http://publicationethics.org/resources/guidelines>

### Funciones y responsabilidades del Comité Científico

- Promover entre la comunidad académica nacional e internacional la postulación de trabajos para su publicación en la revista.
- Sugerir lineamientos académicos para actualizar la política editorial de la revista.
- Promover la difusión de la revista en medios académicos nacionales e internacionales.
- Participar como dictaminadores de trabajos recibidos para su publicación o recomendar a otros expertos como dictaminadores.

### Funciones del Comité Editorial

- Promover entre la comunidad académica nacional e internacional la postulación de trabajos para su publicación en la revista.

- Apoyar en la selección de los dictaminadores para los trabajos recibidos, así como deliberar sobre las mejores opciones de dictaminadores en casos necesarios.
- Decidir sobre la pertinencia de publicación de los materiales recibidos, apoyándose en los dictámenes de expertos.
- Aprobar el contenido propuesto para cada número de la revista.
- Revisar y evaluar cada número publicado.
- Colaborar con las instancias correspondientes para mantener la periodicidad establecida para la publicación.

#### Funciones y responsabilidades del editor en jefe y editores

- Coordinar las acciones conducentes al cumplimiento de los objetivos de la revista.
- Procurar un alto nivel académico en el contenido que se publica.
- Recibir los trabajos propuestos para su publicación y solicitar los dictámenes académicos.
- Vigilar el cumplimiento de las recomendaciones de los dictaminadores.
- Informar a los autores la fase del proceso editorial en la que se encuentre el texto enviado.
- Informar al Comité Editorial sobre el proceso de arbitraje de todos los materiales recibidos, cuidando la confidencialidad
- Proponer al Comité Editorial el contenido de cada número de la revista, a partir de los textos que estén corregidos y aprobados al momento.

#### Funciones y responsabilidad del editor asociado

- Coordinar el proceso de dictamen editorial.
- Planificar y coordinar el proceso de producción editorial de la revista.
- Supervisar el procesamiento técnico de los materiales aprobados por el Comité Editorial, una vez que han cubierto los requisitos académicos establecidos.
- Supervisar la corrección de estilo y la calidad técnica de la revista.
- Colaborar para mantener la periodicidad establecida para la publicación de la revista y para que la difusión y distribución de cada número inicie durante el primer mes del periodo correspondiente.

#### Responsabilidades de los autores

- Atender los requisitos de publicación de la revista relativos a: originalidad, que el texto sea inédito, pertinencia.
- Presentar sus resultados con honestidad y sin mentira, falsificación o manipulación de datos.
- Asumir la responsabilidad colectiva, si es el caso, para el trabajo presentado y publicado.
- Las fuentes de financiamiento y los conflictos de interés pertinentes deben señalarse en el artículo.
- Citar el trabajo de los demás con precisión y sólo referir publicaciones utilizadas en el texto.
- Los autores deben informar a los editores si los resultados han sido publicados con anterioridad o si varios informes o análisis múltiples de un mismo conjunto de datos están bajo consideración para su publicación en otro lugar. Los autores deben proporcionar copias de las publicaciones o trabajos afines presentados a otras revistas.

#### Responsabilidades de los dictaminadores

- Aceptará la revisión de textos que se ajusten a su área de especialidad, con el fin de realizar una evaluación adecuada.
- Declarará desde el inicio del proceso si existe conflicto de interés. Si se tiene sospecha de la identidad del autor(es), notificar a la revista si este conocimiento plantea cualquier posible conflicto de intereses.
- Rechazará la revisión de inmediato si no le es posible entregarla en el plazo acordado.
- Emitirá su evaluación basándose en la originalidad, la contribución del artículo a la temática, la metodología empleada, la pertinencia y actualidad de la bibliografía utilizada; el estilo, la coherencia y la calidad en la estructura y en la redacción del texto.
- Informará a la revista, de inmediato, si durante la evaluación encuentra o descubre que no tiene la experiencia necesaria para evaluar todos los aspectos del texto.
- Sus críticas serán objetivas, específicas y constructivas.
- Definirá con claridad la aprobación, rechazo o condicionamiento del texto.
- Emitirá su evaluación en el plazo acordado.
- Respetará la confidencialidad durante y después del proceso de evaluación.
- No utilizará contenido del texto revisado o en revisión.
- No involucrará a otras personas en la revisión que le fue solicitada.
- Comunicar a la revista si detecta similitud del texto con otro que haya revisado o si identifica cualquier tipo de plagio.
- No se permite transferir la responsabilidad de realizar un dictamen a ninguna otra persona, asistente o colaborador.

#### Registro en directorios y bases de datos de contenido científico

 <b>DOAJ</b> DIRECTORY OF OPEN ACCESS JOURNALS	Directory of Open Access Journals
	Sistema Regional de Información en Línea para Revistas Científicas de América Latina, el Caribe, España y Portugal (Latindex-Catálogo)
	Red Iberoamericana de Innovación y Conocimiento Científico (REDIB)
	Índice de Citas Latinoamericanas en Ciencias Sociales y Humanidades de la UNAM (CLASE)
	Bibliografía Latinoamericana (Biblat)
	Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología
	Scientific Electronic Library Online

## Envíos online

¿Ya cuenta con nombre de usuario/contraseña para *Mundo Nano. Revista Interdisciplinaria en Nanociencia y Nanotecnología*?

VAYA A IDENTIFICACIÓN

¿Necesita un nombre de usuario/a/contraseña?

VAYA A REGISTRO

Es necesario registrarse e identificarse para poder enviar artículos *online* y para comprobar el estado de los envíos.

## Requisitos para la postulación de originales

Los artículos que sean postulados para su posible publicación en *Mundo Nano. Revista Interdisciplinaria en Nanociencia y Nanotecnología* deberán remitir la siguiente documentación completa y en su versión final a través de la interfase Open Journal Systems. No se aceptarán postulaciones que no sean enviadas por este medio:

1. **Carta de originalidad y no postulación simultánea**, esta carta también debe ser llenada con los datos del autor o autores, y, en el caso de artículos con dos o más autores, se deben proveer los datos de todos y cada uno de ellos. Se deberá identificar al autor que firma como responsable del texto, así como al autor de correspondencia.
2. **Formato de cesión de derechos patrimoniales**, debe ser llenado y firmado con los datos del autor o autores. En el caso de artículos con dos o más autores, se deben proveer los datos de todos y cada uno de ellos, y se deberá identificar al autor que firma como responsable del texto, así como al autor de correspondencia.
3. Anexar el contenido completo del artículo que se postula y los archivos adicionales, en su versión final. No se aceptarán cambios una vez iniciado el proceso.

## Requisitos para la entrega de originales

Para la entrega del material se deberán tomar en consideración los siguientes criterios:

1. **Página de presentación**: se deberá anotar el título del artículo, el cual deberá ser corto y atractivo; el nombre del autor —o autores— y una breve semblanza curricular de no más de tres líneas. Se deberán indicar las instituciones de adscripción de cada autor, con las direcciones postales y electrónicas, así como los números telefónicos. En esta página también se deberá precisar al autor que firma como responsable del texto, así como al autor de correspondencia.
2. Entregar el contenido textual en archivos en formato electrónico para procesador de textos, sin clave de contraseña (el envío de archivos en PDF no es pertinente para el proceso editorial).
3. Entregar fotografías e imágenes en archivos electrónicos en formato jpg (o compatible) con al menos 300 dpi de resolución. Es indispensable anexar las gráficas, tablas o cuadros en hoja de cálculo por separado. Las imágenes de gráficas, cuadros o tablas no son pertinentes para el proceso editorial.
4. Contar con los derechos de reproducción del material gráfico, imágenes, fotografías, obra artística, etcétera, ya sea por parte del propio autor (autores), o bien de terceros.
5. Una vez cumplidos los requisitos de postulación el texto será remitido a **Dictamen Editorial**.

## Instrucciones para autores

1. **Naturaleza de los trabajos**: las contribuciones que se reciban para su eventual publicación deben ser resultados originales derivados de un trabajo académico de alto nivel. Sólo se aceptarán documentos vinculados con la nanociencia y la nanotecnología, incluyendo abordajes que destaquen sus implicaciones sociales, ambientales, éticas y legales, con la condición de presentar de manera explícita y detallada las estrategias teórico-metodológicas a las que se recurre y enfatizar los hallazgos producto de su aplicación.
2. **Extensión y formato**: los artículos de investigación podrán tener una extensión de entre 8,000 y 10,000 palabras, y las revisiones de entre 5,000 y 8,000 palabras. Deberán estar escritos en procesador de textos, en tamaño carta con márgenes de 2.54 centímetros, Times New Roman de 12 puntos, interlineado doble, sin espacio entre párrafos. Las páginas deberán estar foliadas desde la primera hasta la última en el margen inferior derecho. La extensión total incluye abordaje textual, bibliografía, tablas, gráficas, figuras, imágenes y todo material adicional.
3. **Exclusividad**: los trabajos enviados a *Mundo Nano* deberán ser inéditos y sus autores se comprometen a no someterlos simultáneamente a la consideración de otras publicaciones, por lo que es necesario adjuntar este documento: **Carta de originalidad y no postulación simultánea**.
4. **Coautorías**: de acuerdo con la política editorial y respecto de la autoría colectiva, se aceptarán como máximo cuatro autores, si se postularan artículos con más autores se deberá justificar la razón y naturaleza de la coautoría, quedando a juicio del Comité Editorial la aceptación o rechazo editorial del documento. En todos los casos se deberá indicar el tipo de participación de cada uno de los autores. Por ningún motivo se aceptará cambio en el orden en que fueron presentados los autores al momento de la postulación, y no será posible omitir ni agregar ningún autor que no hubiese sido señalado desde el inicio, por lo que será necesario identificar dicha información en los datos de registro.
5. **Frecuencia de publicación**: cuando un autor ha publicado en *Mundo Nano*, deberá esperar un año para publicar nuevamente.
6. **Idiomas de publicación**: se recibirán textos escritos tanto en español como en inglés.
7. **ID Autores**: es indispensable que todos y cada uno de los autores proporcionen su número de identificador normalizado ORCID. Para mayor información ingresar a [www.orcid.org](http://www.orcid.org)
8. **Institución de adscripción**: es indispensable señalar la institución de adscripción y país de todos y cada uno de los autores, evitando el uso de siglas o acrónimos. Se debe evitar la traducción de los nombres de instituciones.
9. **Anonimato en la identidad de los autores**: los artículos no deberán incluir en el cuerpo del artículo, ni en las notas a pie de página información que revele su identidad, ello con el fin de asegurar una evaluación anónima por parte de los pares académicos que realizarán el dictamen. Si es preciso, dicha información podrá agregarse una vez que se acredite el proceso de revisión por pares.
10. **Estructura de los artículos**: los artículos incluirán una introducción que refleje con claridad los antecedentes

del trabajo, el método o estrategia de análisis a la que se recurre, discusión, resultados, conclusiones y bibliografía. Si así lo consideran los autores se podrán presentar secciones y apartados propiamente jerarquizados y diferenciados sólo con el uso de tipografía (sin usar números arábigos o romanos).

11. **Título:** el título del artículo de máximo 15 palabras deberá estar en español e inglés y deberá expresar de manera clara, concisa y descriptiva el contenido.
12. **Resumen y abstract:** deberá integrarse un resumen en español e inglés, de máximo 150 palabras, donde se describa el tema, propósito y resultados principales del trabajo. Se recomienda que el resumen responda a los siguientes temas: pregunta a la que responde el texto, marco o perspectiva teórica asumida, metodología empleada y principales hallazgos.
13. **Palabras clave y keywords:** se deberá incluir una lista de 3 a 5 palabras clave en español e inglés.
14. **Uso de siglas y acrónimos:** para el uso de acrónimos y siglas en el texto, la primera vez que se mencionen, se recomienda escribir el nombre completo al que corresponde y enseguida colocar la sigla entre paréntesis. Ejemplo: Petróleos Mexicanos (Pemex), después sólo Pemex.
15. **Anexos y apéndices:** los artículos no incluirán anexos o apéndices, para ese caso se sugiere al autor el depósito de los mismos en repositorios de datos y, en su caso, indicar el DOI correspondiente para consulta.
16. **Notas:** las notas deberán indicarse a pie de página, estar numeradas y ser las estrictamente necesarias. Las notas a pie de página se reservarán para ampliaciones al texto o aclaraciones del/la autor/a, no podrán utilizarse para indicar bibliografía con locuciones latinas.
17. **Tablas y figuras:** se incluirán al final del artículo con la anotación precisa para su inclusión en el lugar donde son mencionados en el texto. Por ejemplo: Aquí tabla 1. La numeración de las tablas será consecutiva, en orden ascendente y con números arábigos. De igual manera el título se ubicará en la parte superior y la fuente completa a pie de tabla. Los autores tendrán la obligación de revisar que la fuente de todas las tablas y figuras esté indicada en la bibliografía final.
18. **Elementos gráficos:** todos los elementos gráficos, esquemas, mapas, etc., se nombrarán Figuras y tendrán una numeración consecutiva en números arábigos. El título se ubicará en la parte superior y la fuente completa a pie de cada figura. El autor tendrá la obligación de revisar que las fuentes de todas las figuras estén indicadas en la bibliografía final. Además de incluirlos en el artículo, todo elemento gráfico se entregará en archivo independiente en formato jpg (o compatible), con una resolución mínima de 300 dpi. Si las gráficas son elaboradas en Microsoft Excel, se deberá anexar el archivo fuente.
19. **Información adicional:** los artículos no incluirán epígrafes ni dedicatorias.
20. **Las referencias y citas bibliográficas:** al final del artículo deberán indicarse todas y cada una de las fuentes citadas en el cuerpo del texto (incluyendo notas, fuentes de las tablas y figuras). El autor debe revisar cuidadosamente que no haya omisiones ni inconsistencias entre las obras citadas y la bibliografía. Se incluirán en la lista de referencias sólo las obras citadas en el cuerpo y notas del artículo. La bibliografía deberá presentarse estandarizada recurriendo a la norma Chicago, tomando como guía los siguientes ejemplos:

Artículos en revistas (no se abrevien los títulos ni de los artículos ni de las revistas):

- Takeuchi, N. 1998. Cálculos de primeros principios: un método alternativo para el estudio de materiales. *Ciencia y Desarrollo*, 26(142): 18.
- Libros:
- Delgado, G. C. 2008. *Guerra por lo invisible: negocio, implicaciones y riesgos de la nanotecnología*. México: CEIICH, UNAM.
- Internet:
- NobelPrice.org. 2007. The Nobel Prize in Physics 1986. [http://www.nobelprize.org/nobel\\_prizes/physics/laureates/1986/press.html](http://www.nobelprize.org/nobel_prizes/physics/laureates/1986/press.html)

Estos lineamientos fueron aprobados por el Comité Científico y el Comité Editorial de *Mundo Nano*. *Revista Interdisciplinaria en Nanociencias y Nanotecnología*, el día 12 de febrero de 2018, y se reflejará en los contenidos que se publiquen a partir de 2019).

### Lista de comprobación de preparación de envíos

Como parte del proceso de envío, se les requiere a los autores que indiquen que su envío cumpla con todos los siguientes elementos, y que acepten que envíos que no cumplan con estas indicaciones pueden ser devueltos al autor.

1. El envío no ha sido publicado previamente ni se ha enviado previamente a otra revista (o se ha proporcionado una explicación en Comentarios al / a la editor/a).
2. El archivo enviado está en procesador de palabras, sin contraseña de lectura.
3. Se han añadido direcciones web para las referencias donde ha sido posible.
4. El texto tiene interlineado simple; el tamaño de fuente es 12 puntos; se usa cursiva en vez de subrayado (exceptuando las direcciones URL); y todas las ilustraciones, figuras y tablas están dentro del texto en el sitio que les corresponde y no al final del todo.
5. El texto cumple con los requisitos bibliográficos y de estilo indicados en las instrucciones para autores, que se pueden encontrar en Acerca de la revista.
6. Si está enviando a una sección de la revista que se revisa por pares, tiene que asegurarse de que las instrucciones en garantizar una evaluación por pares anónima han sido seguidas.

### Declaración de privacidad

Los nombres y direcciones de correo-e introducidos en esta revista se usarán exclusivamente para los fines declarados por esta revista y no estarán disponibles para ningún otro propósito u otra persona.

### Garantizar una evaluación por pares anónima

Para asegurar la integridad de la evaluación por pares anónima para el envío a la revista, se debe intentar que los autores y los revisores desconozcan sus identidades entre ellos. Esto implica que los autores, editores y revisores (los cuales suben documentos como parte de su revisión) comprueben si los siguientes pasos se han seguido cuidadosamente en cuanto al texto y las propiedades del archivo:

1. Los autores del documento han eliminado sus nombres del texto, con "Autor/a" y el año que se usa en las referencias y en las notas a pie de página, en vez del nombre de los autores/as, el título del artículo, etcétera.
2. En los documentos de Microsoft Office, la identificación del autor también debe eliminarse de las propiedades del archivo.

Para **Microsoft 2003** y versiones previas, y versiones de Word de **Macintosh**:

- Seleccione en el menú Archivo: Guardar como > Herramientas (u Opciones en Mac) > Seguridad > Eliminar información personal en las propiedades del archivo al guardar > Guardar.

Para **Macintosh Word 2008** (y futuras versiones):

- En el menú Archivo seleccione "Propiedades".
- En la pestaña Resumen elimine la información identificativa de todos los campos.
- Guarde el archivo.

Para **Microsoft 2007** (Windows):

- Haga clic en el botón de Office en la esquina superior izquierda de la aplicación Office
- Seleccione "Preparar" en el menú Opciones.
- Seleccione "Propiedades" para el menú Opciones de "Preparar".

- Elimine toda la información de los campos de propiedades del documento que aparecen debajo de menú principal de opciones.
- Guarde el documento y cierre la sección de campos de propiedades del documento.

Para **Microsoft 2010** (Windows):

- En el menú Archivo seleccione "Preparar para compartir".
- Haga clic en el icono "Comprobación de problemas".
- Haga clic en el icono "Inspeccionar documento".
- Desmarque todas las casillas excepto "Propiedades del documento e información personal".
- Ejecute el inspector de documento, el cual realizará una búsqueda en las propiedades del documento e indicará si algún campo de propiedades del documento contiene alguna información.
- Si el inspector de documento encuentra información se lo notificará y le dará la opción "Eliminar todo", en la cual tendrá que hacer clic para eliminar todas las propiedades del documento y la información personal.

Para archivos **PDF**:

- En los PDFs, los nombres de los autores/as también deben ser eliminados de las propiedades del documento que se encuentran debajo de Archivo en el menú principal de Adobe Acrobat.





Coordinación de la  
Investigación Científica



COORDINACIÓN  
DE HUMANIDADES



**ICAT**  
Instituto de Ciencias  
Aplicadas y Tecnología

