# Microscópios Electrónicos

CARLOS PINTO MOREIRA DE SÁ Centro de Metalurgia e Ciências dos Materiais da U.P. (CEMMUP)

A atribuição do prémio Nobel da Física em 1986 a E. Ruska, que construiu o primeiro microscópico electrónico no ano de 1933, veio polarizar novamente a atenção sobre este tipo de equipamentos.

Têm já mais de cinquenta anos as primeiras imagens obtidas num microscópico electrónico de transmissão. Fruto do estudo aprofundado das propriedades dos feixes electrónicos e das suas interacções com campos eléctricos e magnéticos, o microscópio electrónico permitiu ultrapassar por várias ordens de grandeza a resolução característica da microscopia óptica  $(\sim 10^4 \text{ Å})$  e facultar, com o seu progressivo desenvolvimento, outras informações sobre as características locais das amostras observadas (nomeadamente químicas e de estrutura cristalina), de importância bem superior ao simples aumento do poder resolvente.

De facto, desde o estudo e caracterização estrutural, química e física de materiais dos mais diversos tipos às aplicações na Biologia e Medicina, passando pela Geologia, Química e Ciências dos Materiais — e envolvendo áreas que vão desde a investigação pura e aplicada ao desenvolvimento e controlo industrial de processos e produtos — a microscopia electrónica tem hoje um vastíssimo campo de aplicação.

#### 1. Limitações do Microscópio Óptico

Utilizado há mais de 300 anos para observação e estudo da matéria, só em 1873, mercê dos trabalhos de E. Abbe, ficou claramente compreendido e quantificado o limite de resolução de um microscópio óptico.

Devido à natureza ondulatória da luz, a nitidez da imagem obtida num microscópio óptico é perturbada pela difracção do feixe

10

luminoso produzida pela abertura finita da lente objectiva.



Fig. 1 — Efeito da difracção da luz numa lente na imagem de dois pontos.

Como se ilustra na Fig. 1, em resultado da difracção, a cada ponto objecto corresponde uma imagem constituída por um disco central (disco de Airy) rodeado por anéis menos brilhantes. A distância mínima entre dois pontos no objecto que originam ainda imagens diferenciadas, determinada de acordo com o critério de Rayleigh — de contraste mínimo central — permite definir o limite de resolução:

$$\mathbf{R} = 0.61 \ \lambda / (n \ \text{sen u}) \tag{1}$$

em que  $\lambda$  é o comprimento de onda da radiação luminosa utilizada, n é o índice de refracção do meio entre o objecto e a lente objectiva e u o ângulo que um raio marginal faz com o eixo da lente.

Decorre da relação anterior que a melhor resolução de um microscópio óptico é conseguida com a utilização de uma radiação visível com menor comprimento de onda (azul, violeta) e interpondo entre o objecto e a lente um meio de elevado índice de refracção (caso da lente de imersão). Como n  $\leq 1.5$  e sen u < 1 teremos R  $\geq 0.4 \lambda$ , pelo que em última análise é o comprimento de onda da radiação utilizada que limita a resolução do microscópio óptico.

Como ilustração prática, diremos que o objecto é colocado junto do plano focal da lente objectiva, sendo

sen u = 
$$\frac{D/2}{\sqrt{f^2 + (D/2)^2}}$$
 (2)

em que f é a distância focal e D o diâmetro da lente objectiva. Para um microscópio de boa qualidade pode tomar-se f = 2 mm, D = 6 mm e teremos sen u = 0.8. Para n = 1.5 (óleo de cedro) teremos  $R = 0.5 \lambda$ . Se utilizarmos  $\lambda = 5000$  Å (verde/azul) teremos R = 8500 Å, o que nos dá uma ideia da resolução disponível neste tipo de instrumentos.

Com referência, sabemos que as células dos seres vivos, com dimensões características da ordem de 10<sup>4</sup> Å podem ser facilmente observadas ao microscópio óptico. Já com um vírus, com dimensões entre 10<sup>2</sup> e 10<sup>3</sup> Å, tal não é possível, sendo porém observados facilmente com os microscópios electrónicos.

A caracterização morfológica e identificação de uma amostra observada ao microscópio óptico de transmissão ou reflexão — conforme a luz que entra na objectiva atravessa a amostra (em biologia) ou é reflectida pela sua superfície (em metalurgia e estudo de materiais) — apoia-se na diferenciação dos constituintes pelas suas propriedades ópticas — poder de absorção e reflexão, cor, acção de polarização — dependentes das características do material e das técnicas utilizadas na sua preparação.

O limite da utilidade da microscopia óptica é, por este facto, determinado não apenas pela resolução das imagens que é possível obter, mas fundamentalmente pelo conteúdo de informação que as características ópticas de um material revelam em relação às propriedades de interesse.

# 2. Os diferentes métodos de Microscopia Electrónica

Os microscópios electrónicos são instrumentos que permitem a observação, com elevada resolução, de amostras com características muito diferenciadas utilizando como radiação incidente («iluminação») um feixe electrónico previamente acelerado.

O seu desenvolvimento resultou fundamentalmente dos progressos verificados nos sistemas de «óptica» electrónica e do conhecimento do comportamento ondulatório de um feixe electrónico (De Broglie, 1924).

De facto, se comunicarmos aos electrões uma velocidade (v) muito elevada (p.ex. acelerando-os com um potencial electrostático V;  $eV = 1/2 mv^2$ ), o comprimento de onda associado a cada electrão é dado pela conhecida fórmula de De Broglie:

$$\lambda = h / mv \tag{3}$$

onde h (h =  $6.6256 \cdot 10^{-34}$  J.s) é a constante de Planck, m (m=9.1091  $\cdot 10^{-31}$  kg) é a massa do electrão. Por exemplo, se acelerarmos um electrão com uma diferença de potencial de 100 KV, a correspondente velocidade será extremamente elevada, v =  $1.73 \cdot 10^8$  m/s, isto é, cerca de metade da velocidade da luz! Introduzindo na expressão (3) obtém-se um comprimento de onda muito pequeno ( $\lambda = 0.037$  Å) que de acordo com a eq. (1) deverá conduzir, em princípio, a uma resolução R muito pequena.

Foram considerações deste tipo que motivaram os trabalhos desenvolvidos na Alemanha, na década de 1930/40, por várias equipas de investigação na espectativa de conseguirem a realização de instrumentos de observação, utilizando feixes electrónicos, com resolução superior à do microscópio óptico. Como consequência, é colocado em funcionamento em 1933 o primeiro microscópio electrónico de transmissão (TEM: transmission electron microscope) realizado por E. Ruska, sendo em 1938 comercializado, pela Siemens, com uma resolução de 7 nm (70 Å). Por comparação com o microscópio óptico trata-se de um progresso espetacular na melhoria da resolução para a observação da matéria.

Também neste período são dados os primeiros passos em técnicas semelhantes mas envolvendo modos diferentes de operação, e que só muito mais tarde vieram a sofrer desenvolvimento significativos:

## Microscopia electrónica de varrimento (SEM) (SEM: Scanning electron microscopy)

A imagem é neste caso realizada num ecran fluorescente, sendo o brilho em cada ponto determinado pelo número de electrões emergentes do ponto correspondente da amostra (espessa), cuja superfície é percorrida sequencialmente (e em sincronismo com o varrimento do écran) por um feixe electrónico finamente focado.

Esta técnica tem um grande desenvolvimento na década de 1950 (C. W. Oatley -GB), sendo em 1965 comercializado o primeiro SEM (Cambridge).

# Microscopia electrónica de varrimento e transmissão (STEM)

Tem fundamentalmente um modo de funcionamento semelhante ao SEM, com um feixe electrónico a percorrer sequencialmente a amostra, mas utilizando amostras finas (em transmissão).

Tem desenvolvimento nas décadas de 1960/70 (Crewe-USA) com a realização de equipamentos de elevada resolução e múltiplas possibilidades de operação.



Fig. 2-Métodos utilizados em microscopia electrónica a-transmissão, b-varrimento, c-varrimento e transmissão.

Num dos parágrafos seguintes veremos com mais detalhe a estrutura e operação dos microscópios correspondentes a estes modos de operação.

#### 3. Interacção feixe electrónico-amostra

A construção da imagem em microscopia electrónica pode ser realizada aproveitando os electrões ou diversas radiações provenientes da interacção entre o feixe electrónico incidente e a amostra, sendo a natureza da informação obtida dependente dos processos físicos que estão na sua origem.

São diversas as interacções que se exercem entre os electrões do feixe incidente — com energias desde poucos keV, em SEM, até às centenas de keV, em TEM e STEM — e a amostra:

a—interacção elástica, de que resulta apenas uma mudança de direcção da trajectória do electrão incidente: difusão/difracção;

b—interacção não elástica, envolvendo perda de energia e eventual mudança de trajectória do electrão incidente, e que pode ocorrer em diferentes condições:

b1—interacção com os electrões das orbitais atómicas periféricas, com reduzida perda de energia do electrão incidente; pode resultar a emissão de um electrão de baixa energia e ainda, no caso de materiais semicondutores e isolantes, a emissão de um fotão (que pode ocorrer no domínio do visível). Nos semicondutores ocorre geração local de portadores;

b2—interacção com os electrões das camadas electrónicas internas, com expulsão de um electrão; há posteriormente, por regresso do átomo ao estado fundamental, a emissão de um fotão de raios X ou de um electrão Auger com energia quantificada (este segundo processo mais frequente nos elementos de baixo número atómico). Em qualquer dos casos a energia associada à radiação é característica do elemento químico envolvido; b3—interacção com o núcleo atómico com emissão de um espectro contínuo de raios X, por desaceleração do electrão no campo eléctrico produzido pelo núcleo.

Dependendo da espessura da amostra, cada electrão incidente sofre os efeitos de diferentes interacções até perder a totalidade da sua energia cinética inicial ou abandonar a amostra.

Podemos agrupar em categorias com interesse específico, para cada modo de observação habitualmente utilizado, as diferentes radiações anteriormente consideradas, como se vê na Fig. 3:



Fig. 3 - Radiações emitidas pela amostra.

#### a. Electrões transmitidos

Constituem o feixe utilizado nas observações em transmissão (amostra fina, de espessura muito menor que o comprimento médio de difusão do feixe electrónico no interior da amostra) e contém diferentes informações:



Fig. 4 — Volume de emissão para as diferentes radiações (amostra espessa).

- n.º atómico - o número de electrões do feixe incidente que atravessa a amostra sem mudança de direcção e com perda reduzida de energia decresce com aumento do número atómico médio local;

- estrutura cristalina - a interacção local do feixe electrónico com os átomos dos cristais produz a emergência de elevado número de electrões, com reduzida perda de energia, em direcções preferenciais (reflexões de Bragg). O seu estudo permite a identificação e caracterização da rede cristalina local;

 composição química: a medida das perdas de energia sofridas pelos electrões transmitidos permite identificar alguns dos elementos envolvidos nas interacções locais (perdas reduzidas — uma única interacção com perda quantificada de energia);



Fig. 5 – Distribuição energética dos electrões emitidos (amostra espessa).

#### b. Electrões rectrodifundidos

(utilizados apenas em m.e. de varrimento).

São os electrões emergentes da superfície da amostra com energia próxima da do feixe incidente, e que resultam de interacções elásticas ou com perdas reduzidas de energia, mas forte desvio angular.

O coeficiente de rectrodifusão (n.º de electrões rectrodifundidos/n.º de electrões incidentes), depende do ângulo de incidência do feixe electrónico, e cresce com o número atómico médio local da amostra. Por este facto as imagens obtidas em SEM utilizando esta radiação contêm informação:

-química : do n.º atómico médio local;
-topográfica: relevo da superfície da amostra;

e ainda informações associadas a outras características da amostra que afectam as condições de penetração do feixe primário ou de emergência dos electrões rectrodifundidos: orientação cristalina, domínios magnéticos, etc.

#### c. Electrões secundários

(utilizados apenas em m.e. de varrimento)

Designam-se desta forma os electrões de baixa energia (<50 eV), que resultam fundamentalmente dos processos de interacção de electrões periféricos nos átomos, quer com electrões primários (incidentes) quer com electrões rectrodifundidos. Pela sua energia, provêm de uma vizinhança do ponto de impacto do feixe primário e de uma profundidade máxima de algumas dezenas de Å. O seu número depende fortemente do ângulo de incidência do feixe primário.

Estas características explicam que as imagens obtidas com electrões secundários apresentem forte contraste topográfico, cumulativamente com informação relativa às propriedades que afectam a emissão de electrões rectrodifundidos.

A reduzida energia dos electrões secundários ocasiona também forte sensibilidade da intensidade da radiação detectada à presença de campos eléctricos e magnéticos locais, o que permite a obtenção de imagens contendo a correspondente informação associada.

#### d. Catodoluminescência

(utilizada apenas em m.e. de varrimento)

Consiste na emissão de fotões no domínio do visível, ou de comprimentos de onda próximos, que ocorre em materiais isolantes e semicondutores. A sua detecção possibilita a obtenção de informação sobre a composição química ou estrutura física local do material.

#### e. Electrões Auger

(utilizados apenas em m.e. de varrimento).

Trata-se de electrões de baixa energia (até algumas centenas de eV), resultantes do regresso ao estado fundamental de átomos que foram ionizados (interacção b2), e que apresentam por isso uma energia característica do elemento emissor.

Pelas suas características de baixa energia só podem resultar da emissão das primeiras camadas de átomos da amostra, permitindo com a utilização de um espectrómetro de electrões, a análise química elementar pontual da superfície (primeiras camadas atómicas) das amostras.

A sua detecção exige uma redução drástica da contaminação superficial da amostra, impondo a utilização de níveis de vácuo inferiores a  $10^{-8}$  torr, só possíveis em equipamentos de grande qualidade de concepção e construção, vocacionados para a análise de superfícies.



Fig. 6 – Distribuição em comprimento de onda dos raios X (amostra espessa).

f. Raios X

(utilizados apenas em m.e. de varrimento).

A emissão de raios X compreende duas componentes:

— um fundo contínuo cuja intensidade e distribuição espectral depende do número atómico médio local da amostra e da energia do feixe incidente (interacção b3) — e que é normalmente um elemento perturbador;

- radiação característica dos elementos presentes no microvolume excitado pelo feixe electrónico.

A utilização de espectrómetros de raios X para detecção e análise da radiação emitida

pela amostra permite a análise química elementar, qualitativa ou quantitativa, do microvolume considerado, considerando todos os elementos desde o boro (B) ao urânio (U).

# 4. Características e funcionamento dos diferentes tipos de Microscópios Electrónicos

Correspondendo a diferentes métodos de microscopia electrónica desenvolveram-se equipamentos que, partilhando elementos base comuns (mesmo com equipamentos que utilizam como sondas outros feixes de partículas), apresentam também características fundamentais bem diferenciadas.

Em todos estes equipamentos a radiação primária incidente na amostra é um feixe electrónico acelerado, que percorre um sistema óptico electromagnético e interactua com a amostra. O conjunto encontra-se confinado a uma câmara em que se assegura um nível de vácuo de pelo menos  $10^{-5}$  torr (mm de Hg). Um nível de vácuo tão acentuado no interior dos microscópios electrónicos resulta das exigências de propagação dos electrões e outras radiações emitidas pela amostra, do funcionamento do canhão de electrões e das limitações impostas à contaminação.

## - O Microscópio Electrónico de Transmissão (TEM - Transmission electron microscope)

No microscópio electrónico de transmissão, que é estruturalmente muito próximo do microscópio óptico de projecção, a imagem (real) tornada visível sobre um alvo por fosforescência é obtida utilizando os electrões transmitidos.

A fonte luminosa é um canhão de electrões, normalmente constituído por um filamento de tungsténio aquecido a uma temperatura elevada (2700 K) por forma a libertar electrões (efeito termoiónico) que são acelerados num campo eléctrico até energias de 100 a 200 keV (há microscópios que vão a 1 MeV).

Um conjunto de lentes electromagnéticas, operando de forma semelhante às lentes utili-

zadas nos sistemas, ópticos, permitem a obtenção de uma imagem.



Fig. 7-Microscópio electrónico/Microscópio óptico.

- C-Condensador
- O-Objectiva
- P-Lente projectora
- A-Amostra
- I —Imagem

O controlo da ampliação é realizado pelo ajustamento da distância focal da objectiva, que no caso das lentes electromagnéticas depende directamente da intensidade de corrente que percorre a respectiva bobina, pelo que é possível com o mesmo sistema óptico obter uma vasta gama de ampliações.

As amostras observáveis são de pequenas dimensões e, por razões de transparência ao feixe electrónico, muito reduzida espessura – de 10 a 100 nm –, normalmente suportadas numa grelha de 3 mm de diâmetro.

A resolução, da ordem de 2 a 10 Å, resulta fundamentalmente de compromissos associados às aberrações do sistema deflector electromagnético, permitindo ampliações máximas superiores a 1 000 000 vezes.

É frequente, especialmente nos equipamentos para aplicação na área dos materiais, a associação de uma unidade de varrimento a estes microscópios por forma a possibilitar o seu funcionamento como STEM, o que permite explorar sequencialmente as características da amostra, utilizando todas as radiações emitidas (com os detectores convenientes). Esta possibilidade torna-se particularmente interessante se ao microscópio for associado um espectrómetro de raios X permitindo a realização de microanálise com uma resolução espacial da ordem das centenas de Å (amostra delgada). Neste modo de observação a resolução é de algumas dezenas de Å.

### Microscópio Electrónico de Varrimento (SEM – Scanning electron microscope)

Em microscopia electrónica de varrimento a superfície da amostra é percorrida sequencialmente por um feixe electrónico finamente focado. As radiações, incluindo os electrões, emitidas em cada ponto são recolhidas por detectores adequados a cada tipo de radiação, colocados na vizinhança da amostra e dão origem a um sinal eléctrico que vai modular o brilho de um ecran de observação cujo varrimento é síncrono com o da superfície da amostra.

O sistema «óptico» electromagnético conduz a um feixe electrónico de diâmetro reduzido, que determina o limite de resolução, e que vai excitar pontualmente a superfície da amostra. O sincronismo do varrimento da superfície da amostra e do ecran de observação estabelece uma relação biunívoca ponto objecto/ponto imagem. A imagem observada é construída ponto por ponto com um brilho pontual proporcional à intensidade da radiação utilizada.

A ampliação é simplesmente o cociente da largura da imagem observada pela largura da superfície da amostra varrida pelo feixe electrónico, e o seu controlo envolve apenas a fixação das dimensões da superfície da amostra que é examinada, sem fazer intervir qualquer elemento do sistema óptico.

Embora a resolução dependa fortemente das características da amostra e da radiação utilizada na observação (volume de interacção; Fig. 4) — sendo máxima em electrões secundários — o sistema óptico electromagnético é no entanto responsável pela resolução máxima disponível, da ordem dos 30 a 100 Å, permitindo a obtenção de ampliações superiores a 100 000.



de varrimento.

A reduzida dispersão angular do feixe incidente ( $<10^{-2}$  rad) está na origem da grande profundidade de campo conseguida, que possibilita o exame de amostras com relevo significativo a ampliações elevadas, mantendo em foco planos da amostra muito distantes entre si. Esta característica possibilita a observação de amostras, que mesmo a baixas ampliações (ao nível das conseguidas no microscópio óptico) é impossível examinar por qualquer outro meio.

A utilização simultânea dos sinais de vários detectores das radiações provenientes da amostra, cujo conteúdo analisamos anteriormente, permite caracterizar cada ponto da amostra tendo em conta uma grande variedade de propriedades:

- topografia (electrões secundários, e rectrodifundidos; ex. Figs. 9a) b);

--n.º atómico (electrões rectrodifundidos; Fig. 9c));

- composição química elementar (raios X;
  Fig. 9d), mapa de raios X);
- propriedades cristalinas (electrões rectrodifundidos);

e muitas outras resultantes da selecção do modo de funcionamento mais adequado. Na Fig. 9 mostram-se imagens obtidas em SEM, em possibilidades do conjunto (\*).

Particularmente interessante é o acopulamento de espectrómetros de raios X, de dispersão de energias (EDS) ou comprimentos de onda (WDS), que possibilitam a caracterização qualitativa e mesmo quantitativa da composição elementar dos constituintes da amostra ao nível do microvolume — alguns  $\mu$ m<sup>3</sup> — e aumentam extraordinariamente as possibilidades do conjunto.

As possibilidades do SEM, equipado com espectrómetros de raios X, aproximam-se muito das da microsonda electrónica, instrumento que tendo seguido uma via de desenvolvimento diferenciado é estruturalmente muito semelhante.

A gama de tensões de aceleração disponível, bastante menor do que o utilizado em transmissão, é tipicamente de 0 a 40 kV, por passos, possibilitando a exploração de condições de funcionamento diversificadas.

Pela sua estrutura estes microscópios possibilitam a manipulação de amostras (espessas) de grandes dimensões — com vários centímetros de diâmetro e mais de um centímetro de espessura.

# -Microscópio Electrónico de Varrimento e Transmissão

(STEM – Scanning Transmission Electron Microscope)

É um microscópio electrónico de varrimento optimizado do ponto de vista de resolução, pela utilização de um canhão electrónico (de cátodo frio) de elevada intensidade e produzindo um feixe electrónico de reduzido diâmetro, e preparado para funcionar em transmissão.

(\*) EDS : energy dispersive spectroscopy; WDS: wavelength dispersive spectroscopy.









Fig. 9-a) Cristais de zinco; b) Fractura de aço; c) inclusão em liga de alumínio; d) Distribuição de ca na amostra c). Estas características permitem o aproveitamento da totalidade das radiações provenientes da amostra, e porque a utilização de amostras delgadas minimiza o volume de interacção, nas melhores condições de resolução.

É possível a obtenção de imagens com uma resolução da ordem de 2 Å, e uma resolução para análise elementar de poucas dezenas de Å. A utilização de níveis de vácuo melhores que  $10^{-8}$  torr assegura uma contaminação reduzida e a possibilidade de análise de superfície (electrões Auger).

As amostras utilizadas para observação em microscopia electrónica, para além da adequação dimensional—o que em transmissão e para muitos materiais implica a utilização de técnicas complexas para obter lâminas delgadas— e eventual preparação por forma a assegurar a observação das características desejadas, devem ter estabilidade física e química nas condições de observação— alto vácuo e incidência de um feixe electrónico energético— e um mínimo de condutividade eléctrica (que pode ser obtida por revestimento) que assegure o escoamento da carga eléctrica resultante da absorção total ou parcial do feixe electrónico incidente.

Estas exigências não são impedimento, como já referimos, da aplicação da microscopia electrónica aos mais diversos materiais, e nas mais diversas áreas, como técnica privilegiada de caracterização microscópica.

Em Portugal a microscopia electrónica vem sendo utilizada há algumas dezenas de anos em aplicações na área da Medicina e Biologia, existindo um elevado número de microscópios electrónicos de transmissão (TEM) instalados em hospitais e centros de investigação.

Na última década verificou-se um crescente interesse pela aplicação dos microscópios electrónicos de varrimento (SEM), nomeadamente no estudo e caracterização de materiais – Ciência dos Materiais e Engenharia – com a instalação de diversos equipamentos em centros de investigação e mesmo em laboratórios da indústria.

# Richard D. Jeynman

Já na fase de impressão do presente número, a Comissão Redactorial da Gazeta de Física tomou conhecimento da morte do Prof. R. Feynman, ocorrida em Los Angeles a 15 de Fevereiro passado. Tinha 69 anos.

Feynman foi um dos físicos mais notáveis e influentes deste século, tendo sido um dos laureados com o prémio Nobel da Física em 1965, pela sua contribuição fundamental nos campos da Electrodinâmica Quântica e da Superfluidez do Hélio líquido.

Dotado de uma rara originalidade e intuição física, com uma elegância ímpar no tratamento das questões que abordava, Feynman sempre conseguiu transmitir uma mensagem viva e actuante do pensamento científico, despertando um profundo optimismo, entusiasmo e gosto pela Física em sucessivas gerações de jovens estudantes, cientistas e professores. A sua salutar irreverência, humanismo e um raro sentido de comunicação, aliados à extrema facilidade com que aplicava métodos não convencionais na resolução de problemas complexos, são facetas inesquecíveis de Feynman, que marcaram todos quantos leram os seus escritos ou que com ele privaram.

O seu Curso de Física, ministrado no California Institute of Technology e editado em livro nas célebres «Feynman Lectures on Physics» (1963), passou desde então a constituir um ponto de referência obrigatória para todos os físicos, e uma fonte permanente de novas ideias inspiradoras, despertando sempre um grande prazer intelectual na sua leitura. Feynman tinha, de facto, uma curiosidade intelectual insaciável, tendo encontrado na Física um desafio supremo e permanente.

Gazeta de Física procurará prestar uma homenagem singela à memória de Richard Feynman, publicando em próximos números, artigos sobre a sua vida e obra, nas suas vertentes científica e humana.