

Fundamentos del microscopio electrónico y su aplicación en la investigación textil

por **A. Naik**, Ing.

HISTORIA

El primer microscopio óptico fue diseñado por Anton Van Leeuwenhock en el año 1675 y fue considerado como un juguete científico al que se le dio el nombre de "vidrio de mosca" ya que primariamente se usaba para observar insectos. Posteriormente el microscopio óptico fue recibiendo notables mejoras.

El microscopio electrónico es el resultado de diversos experimentos y concepciones teóricas. Tiene su origen en los experimentos de Sir J. J. Thomson quien estudió los rayos catódicos en tubos con gases enrarecidos (1). En el año 1924 de Broglie (2) propuso su teoría de la naturaleza ondulatoria de las partículas materiales. Después de unos años Busch (3) demostró que un rayo de electrones atravesando un campo magnético o eléctrico converge al foco y basándose en esto construyó la primera lente magnética en 1926. Davisson y Thomson (4) compartieron el premio Nobel por el descubrimiento de la difracción del electrón. Padre e hijo J. J. Thomson y G. P. Thomson (5) jugaron un papel fundamental en la historia del desarrollo del microscopio electrónico.

Las propiedades de una partícula cargada con electrones fueron explotadas por Knoll y Ruska (6) y construyeron el primer microscopio electrónico de lente magnética, utilizando un rayo de 60.000 voltios y obteniendo imágenes sobre una pantalla fluorescente. Las primeras microfotografías de materiales biológicos fueron conseguidas por Marton (7) en 1934. El primer microscopio electrónico de transmisión que operó en Estados Unidos en 1939 fue construido en la Universidad de Toronto por A. Prebus y J. Hiller bajo la dirección de E. Burton. Este microscopio era muy similar al tipo desarrollado por Van Borries y Ruska (8) como instrumento comercial.

En la actualidad, se dispone de un número considerable de microscopios, que pueden clasificarse fundamentalmente en dos grupos:

- Microscopios ópticos.
- Microscopios electrónicos de transmisión y de barrido.

MICROSCOPIO OPTICO

El ojo puede discriminar dos objetos si están situados no más cerca de 0,1 mm., mirando desde una distancia normal de 25 cm. Este es un factor límite del ojo humano y cualquier otro detalle más pequeño que éste, debe ser aumentado para ser visto. Se puede usar una lupa o un microscopio para aumentar la imagen. El objetivo del microscopio es el de hacer distinguir los detalles estructurales de la muestra a observar. Esta habilidad es expresada en términos de apertura numérica o "N. A.". Por apertura numérica de un sistema óptico se entiende, según Abbé, el producto del índice de refracción "n" del medio que se encuentra delante del sistema y el seno del semiángulo " σ " de abertura de este sistema.

$$A = n \cdot \text{Sen } \sigma$$

$$n (\text{aire}) = 1, n (\text{agua}) = 1,33, n (\text{aceite de inmersión}) = 1,52$$

Para explicar este concepto más detalladamente podemos dar dos ejemplos. Al tener aire entre el cubreobjetos y la lente frontal del objetivo —cosa dada en un sistema seco— entonces es el fenómeno de la reflexión total el que limita el haz de rayos cónicos. Pero si se utiliza en cambio, un medio de mayor índice de refracción como aceite de inmersión, entonces no existe ninguna refracción al salir el haz de rayos del cubreobjetos debido a la homogeneidad del medio y el haz de rayos cónicos, captado por el objetivo del microscopio es limitado por la abertura del objetivo. Los objetivos y condensadores del microscopio están señalados con este valor de “N. A.”.

El valor máximo de “N. A.” de un objetivo es 1,4. El poder de resolución —la distancia más estrecha entre dos puntos que puede observarse claramente en la imagen de un sistema óptico — viene dada por la fórmula,

$$R = \frac{\lambda}{2 \text{ N. A.}}$$

siendo R la distancia entre dos puntos en nanómetros (nm), λ es la longitud de onda de la luz utilizada para la iluminación en nm, y “N. A.” es la apertura numérica indicada sobre el objetivo.

El mínimo poder de resolución para un sistema óptico se puede conseguir usando la radiación ultravioleta, que tiene la menor longitud de onda aplicable. En resumen, puede decirse que no tiene sentido incrementar los aumentos del microscopio utilizando un ocular más potente, si la apertura del objetivo no basta para resolver la estructura del objeto. Más bien debe elegirse el valor, de tal manera que el aumento del microscopio tome un valor entre 500 y 1.000 veces mayor que la apertura del objetivo.

MICROSCOPIO ELECTRONICO

Debido al limitado poder de resolución del microscopio óptico, se probaron varias fuentes de iluminación tales como rayos X de muy pequeña longitud de onda (0,5 nm) sin tener éxito ya que no pudieron enfocar estos rayos. Sin embargo, las investigaciones que comenzaron en 1923 sobre difracción electrónica, sentaron las bases para la construcción del primer microscopio electrónico.

Cuando los electrones son acelerados mediante una diferencia de potencial de V volt., tienen la longitud de onda λ igual a $\frac{1,23}{\sqrt{V \text{ nm}}}$. Así pues un electrón

de 50 Kv. tiene $\lambda = 0,0055$ nm. Si sustituimos este valor en la fórmula de la resolución $R = \frac{\lambda}{2 \text{ N. A.}}$ obtendremos $R = 0,27$ nm. Esta resolución es 1.000

veces mayor que la de la luz blanca utilizada para la iluminación en el microscopio óptico. Se puede conseguir poder de resolución hasta 0,1 nm (1 Å) con los nuevos diseños del microscopio electrónico. La tabla núm. 1 resume las unidades de longitud utilizadas en el microscopio.

TABLA I
Tabla de conversión de unidades de longitud utilizadas en el microscopio

<i>Unidad</i>	<i>Metros (m)</i>	<i>Centímetros (cm)</i>	<i>Milímetros (mm)</i>	<i>Micrómetros (μm)</i>	<i>Nanómetros (nm)</i>	<i>Angstrom (Å)</i>
1 metro (m)	1	100	1.000	1.000.000	1.000.000.000	1×10^{10}
1 centímetro (cm)	0,01	1	10	10.000	10.000.000	1×10^8
1 milímetro (mm)	0,001	0,1	1	1.000	1.000.000	1×10^7
1 micrómetro (μm)	1×10^{-6}	0,0001	0,001	1	1.000	10.000
1 nanómetro (nm)	1×10^{-9}	1×10^{-7}	1×10^{-6}	0,001	1	10
1 Angstrom (Å)	1×10^{-10}	1×10^{-8}	1×10^{-7}	0,001	0,1	1

La distancia de enfoque del objetivo en el microscopio electrónico de 100 Kv es de 1,1 mm. Este factor mejora la profundidad del campo y es cientos de veces mayor que la conseguida por el microscopio óptico. El microscopio electrónico moderno está basado en los principios generales de la lente electromagnética.

MICROSCOPIO ELECTRONICO DE TRANSMISION (TEM)

El microscopio electrónico más sencillo es muy similar al microscopio óptico. Ambos tienen lentes y condensadores para concentrar la iluminación sobre la muestra. Fig. 1.

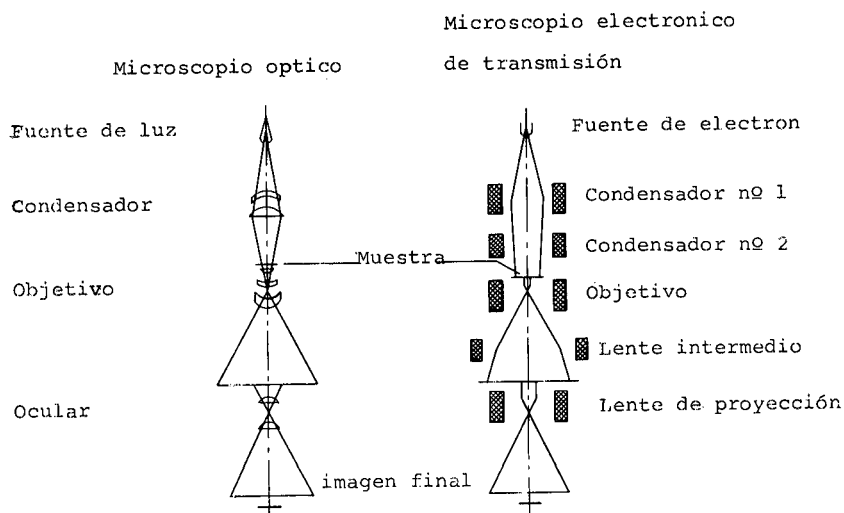


Figura 1.- Esquema simplificado ilustrando la semejanza entre microscopio óptico y microscopio electrónico de transmisión.

Los rayos de iluminación atraviesan la muestra y son enfocados por las lentes del objetivo y de proyección para formar una imagen aumentada sobre una pantalla fluorescente. Sin embargo el microscopio electrónico es mucho más complejo. Para que los electrones puedan ser acelerados hasta la velocidad prefijada, debe trabajarse en condiciones de alto vacío (10^{-4} a 10^{-6} torr; 1 torr = 1 mm de mercurio a 0°C). El sistema central del microscopio electrónico incluyendo la pantalla fluorescente y el equipo fotográfico, lo constituye un tubo hueco. El equipo eléctrico que suministra la corriente necesaria se halla generalmente situado a una cierta distancia para evitar la interferencia de los campos magnéticos dispersados. La mayoría de los microscopios están equipados con dispositivos de seguridad que no permiten conectar el filamento de alto voltaje hasta que no se ha conseguido el vacío apropiado (9).

Las lentes magnéticas del microscopio electrónico están formadas por imanes en forma de herradura. El imán puede ser permanente o de tipo electromagnético. Variando la potencia de la corriente a la lente se consigue el efecto de variar la distancia focal de la lente continuamente, lo cual es muy similar al sistema de "zoom". Sin embargo, normalmente se preselecciona la corriente deseada. Se pueden ajustar los voltajes de aceleración en una gama que incluye 40, 60, 80

y 100 Kv, etc. Ajustando Kv a un nivel inferior, se consigue aumentar el contraste.

Componentes del microscopio electrónico de transmisión (TEM)

Cañón electrónico

El tipo más usado de cañón electrónico consiste de un filamento de alambre de tungsteno (10) doblado en forma de V. El electrodo de control se denomina cilindro de Wehnelt, y tiene una apertura circular de 1 a 3 mm de diámetro centrada en el ápice del filamento. La superficie cóncava hace las funciones de ánodo, y utilizando una superficie convexa la imagen de la fuente electrónica puede reducirse en tamaño respecto al electrodo cóncavo. La intensidad total del haz de cátodo a ánodo puede ser de 10 a 400 microamperios, pero solamente una pequeña fracción de éste llega hasta la muestra.

Condensadores

Los dos condensadores son capaces de dar una amplia gama de intensidad ajustando el cañón electrónico. Esto reduce el área iluminada en la muestra. Sin embargo, otras partes de la muestra también sufren los efectos del haz electrónico. El primer condensador reduce la imagen de la fuente mientras que el segundo condensador obtiene la adecuada intensidad de iluminación.

Plataforma para la colocación de la muestra

La plataforma para colocar la muestra está situada en frente del objetivo. Se introduce la muestra en la columna del microscopio a través de una abertura.

Objetivo

El objetivo es la lente más importante en el microscopio electrónico. La distancia focal de esta lente está comprendida entre 1 y 5 milímetros, siendo 1,1 mm la más frecuente. Cuanto menor es la distancia focal, mayor es la resolución. Debido a que el haz de imagen tiene la máxima apertura angular en el primer objetivo, esta lente controla la calidad de la imagen producida. Se puede corregir la aberración esférica usando un "stigmator", que es un dispositivo que permite introducir metal para compensar la inhomogeneidad inherente de la lente, y obtener elevada resolución. Otro accesorio importante, permite regular la apertura del objetivo, la cual limita la dispersión de los electrones, evitando así la degradación de la imagen. Esta apertura mejora el contraste siendo 20 y 40 micrómetros (μm) los más frecuentes.

Lente intermedia

La lente intermedia puede aumentar o disminuir la imagen. Se puede conseguir esto, aumentando o disminuyendo la potencia de la corriente a esta lente.

Lente de proyección

La lente de proyección corresponde al ocular del microscopio óptico. Su función es la de proyectar la imagen real sobre la pantalla fluorescente, y permite

una amplia gama de aumentos. Se puede variar la ampliación de 100 X hasta 300.000 X usando lentes intermedias y de proyección.

Cámara de observación

La cámara de observación y la pantalla fluorescente están situadas en el fondo de la columna. La imagen se enfoca sobre un punto marcado y el enfoque fino se consigue con unos binoculares de 6 y 10 X. El diámetro del punto de enfoque es de 100 μm , por lo tanto la imagen debe ser mayor que este diámetro para ser resuelta. La cámara de observación está protegida por un vidrio grueso de plomo para evitar la emisión de rayos X.

Cámara fotográfica

La cámara fotográfica está situada debajo de la pantalla fluorescente. La pantalla fluorescente está sujeta por un lado, y al quitar el paso del haz electrónico la imagen se centra sobre la película fotográfica. Se pueden usar varios tipos de películas y placas de vidrio.

MICROSCOPIO ELECTRONICO DE BARRIDO SEM

El primer microscopio electrónico de barrido fue desarrollado en 1930 en Alemania y en 1949 en Estados Unidos y finalmente en Inglaterra en 1950. El primer modelo comercial fue presentado en 1964 por "The Cambridge Scientific Instrument Company"; posteriormente muchos otros fabricantes han desarrollado nuevos modelos.

El principio del sistema SEM consiste en que si se hace incidir sobre la muestra un haz de electrones finamente enfocado, emite una señal que puede registrarse en una pantalla mediante un tubo de rayos catódicos.

Los componentes principales del microscopio de barrido SEM son los siguientes: (Fig. 2).

Fuente de energía

La fuente de energía del microscopio electrónico de barrido depende de varios factores, siendo los más importantes el voltaje de aceleración, la intensidad de la corriente y el diámetro de haz. Para usos prácticos debe asegurarse una alta estabilidad de la corriente.

En unos puntos el haz de electrones es desviado 1, 2, 3 ... n veces por los campos magnéticos controlados por el generador de barrido. Como consecuencia el haz es movido sobre la superficie de la muestra y la señal es detectada por el colector de electrones (11). Se puede ajustar el colector para detectar cualquier emisión como rayos X, luz infrarroja, ultravioleta, etc.

Portamuestras

La muestra montada sobre un soporte puede moverse en tres direcciones, ser calentada, enfriada, estirada, etc. dentro del instrumento. Para el estudio de ciertos tipos de muestras tales como, metales, minerales, semiconductores, etc., se requiere calefacción de la muestra. La calefacción puede conseguirse por medio de un hilo-incandescente o calentando la muestra en un crisol aplicando directamente a la muestra una corriente eléctrica (12).

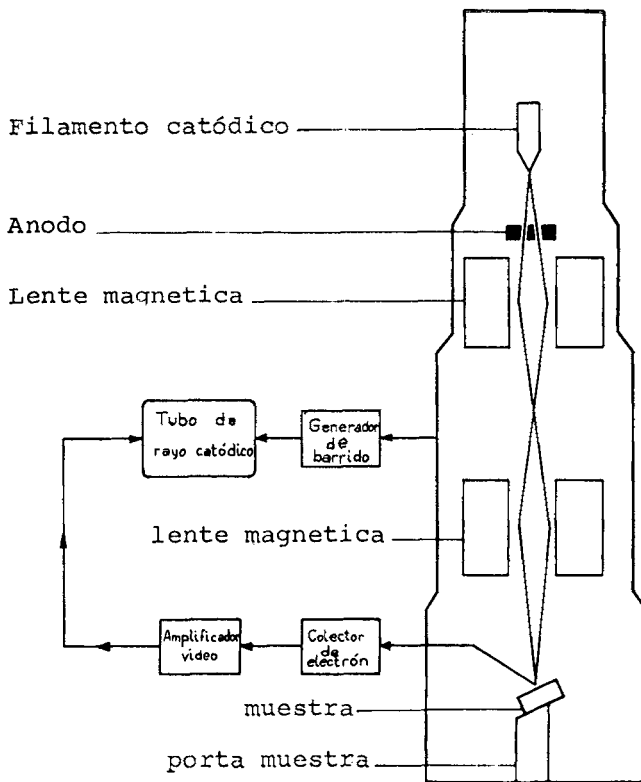


Figura 2.- Componentes del Microscopio electrónico de barrido.

Los métodos de enfriamiento se usan principalmente en la preparación de muestras biológicas.

Para la deformación mecánica en el estudio de muestras tales como metales, polímeros o fibras, es necesario determinar una escala de fuerzas ya que la fuerza requerida varía considerablemente según el tipo de material.

Sistema de amplificación

El sistema de amplificación recoge las señales y procesa la información procedente de la muestra, al mismo tiempo que el haz de electrones barre la muestra. El generador de barrido está conectado al tubo de rayos catódicos (CRT) para que el haz de electrones en este tubo sea barrido en la misma forma que, el haz principal. Sin embargo, la potencia de la corriente suministrada a la columna principal para el barrido puede ser atenuada mientras que el tubo de la pantalla es barrido sobre una área constante. Como consecuencia de ello, cualquier reducción en el área de la muestra barrida da lugar a un aumento de la imagen. Este aumento viene determinado por la relación del área de la pantalla del tubo (constante) respecto al área de la muestra barrida (variable).

Características de SEM

Las características más importantes de SEM son: poder de resolución, profundidad del campo y contraste.

Poder de resolución

El poder de resolución en el microscopio electrónico de barrido (SEM) depende de varios factores, tales como la dimensión del haz de electrones, la difusión del mismo en la muestra antes de la emisión de los electrones secundarios, y la corriente estabilizada de la lente. La dimensión del haz puede reducirse de muchas formas. Se pueden emplear filamentos apuntados o usando elevado potencial de Kv. Por ejemplo a potencia de 1 Kv, la resolución es 140 nm, mientras que a 30 Kv, la resolución es 20 nm (200 A).

Se puede prevenir la difusión del haz de electrones en la muestra, aumentando la potencia de la corriente. Finalmente, la alimentación de corriente debe ser muy estable, del orden de 1 parte en 100.000, para conseguir alta resolución.

Profundidad de campo

Se utilizan lentes magnéticas con simetría axial con el fin de producir un fino haz de electrones. De todos modos hay que considerar que la aberración esférica de las lentes magnéticas no puede conseguirse con ningún tipo de lente de simetría axial. Si se quiere obtener un fino haz de electrones, el ángulo de abertura de la lente del objetivo ($2^\circ C$) debe reducirse con el fin de permitir sólo los haces paraxiales.

La profundidad del campo de la superficie de la muestra viene dada por la siguiente fórmula:

$$D = \pm \frac{M}{2^\circ C} \left(\frac{\gamma}{d} \right)^{-1}$$

siendo M la amplificación de la imagen, d, el diámetro del haz y γ la longitud mínima discriminable a simple vista.

El haz de electrones mide solamente 30 mm y se mueve en forma de líneas paralelas a través de la muestra. Se puede cambiar la amplificación en escalones de 20 X a 100.000 X aunque la resolución de 25 nm es restringida a aumentos de 10.000 X a 20.000 X.

La gran profundidad de campo permite observaciones especiales de la muestra. En general la profundidad del campo es tan grande como la mitad de una cara del área bajo observación.

Contraste

El contraste en SEM es logrado por el sistema colector. La muestra recibe los electrones del haz de barrido y genera electrones secundarios. Estos electrones emitidos son recogidos por el colector. Los electrones se desplazan en línea recta cuando la muestra es uniforme. Se consigue el contraste óptimo cuando el colector puede recoger el máximo de electrones secundarios. La eficiencia de la emisión de los electrones es máxima cuando el plano de la muestra está inclinado con res-

pecto al haz primario. Por este motivo las microfotografías obtenidas por SEM parecen muy naturales.

PREPARACION DE LAS MUESTRAS

La preparación de las muestras para la observación microscópica es una de las técnicas más importantes. Generalmente la preparación de las muestras biológicas requiere muchas precauciones y se desarrolla en dos o más etapas. Por otro lado la preparación de los distintos reactivos (13) consume mucho tiempo. Este apartado está detalladamente descrito en la bibliografía especializada y se aparta del objetivo de este artículo que se refiere a materias textiles.

La preparación de las muestras textiles puede dividirse en tres grupos:

- I. Preparación para la observación en el microscopio óptico.
- II. Preparación para la observación en el microscopio electrónico de transmisión (TEM).
- III. Preparación para la observación en el microscopio electrónico de barrido (SEM).

Preparación para la observación en el microscopio óptico

Se observan las fibras textiles en sección longitudinal o transversal. La preparación de las fibras para observación longitudinal es muy sencilla. Sobre un portaobjetos se pone una gota de aceite de inmersión y con una pinza se coloca fibra por fibra, cortadas en una longitud de 1 a 1,5 cm. Cuando es preciso observar una longitud determinada se utiliza un microtomo manual para cortar las fibras a la longitud deseada. Se pone un cubreobjetos sobre la zona de fibras antes de ser observadas en el microscopio. Para evitar la formación de burbujas de aire, es preferible mojar el cubreobjetos con un poco de aceite.

Para observar la fibra en sección transversal se necesita un microtomo. Existen diversos tipos de microtomos tanto sencillos como más sofisticados. Para el microscopio óptico basta usar un microtomo sencillo. El grosor del corte debe ser de 8 a 10 micras.

Preparación de la muestra para la observación en el microscopio electrónico de transmisión

Permite observar la sección transversal de las fibras textiles para estudiar su estructura interna.

En primer lugar, se procede a la eliminación de la humedad de las fibras mediante secado en una estufa a 40°C durante 1 hora. Luego, deben colocarse en el seno de una resina tipo epoxi, que pueda polimerizarse fácilmente. Existen varias resinas pero para las fibras textiles la más adecuada es la siguiente:

Araldit® M ——— 4 ml.
Endurecedor 956 — 1 ml.

Se utilizan unas cápsulas de plástico para la polimerización de la resina. Se pasan las fibras a través de la cápsula, Fig. 3, y luego se llena la cápsula con la resina.

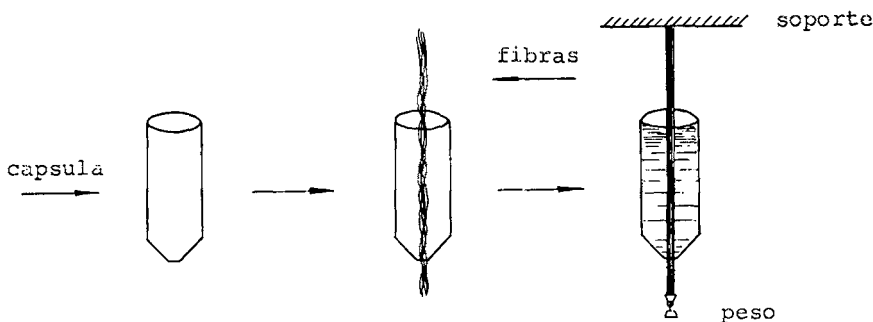


Figura 3.- Preparación de las fibras para la obtención de corte transversal.

Es muy importante que las fibras en la cápsula queden bien rectas y que no se rizen. Para conseguir esto se fija un extremo de las fibras a un soporte y en el otro extremo se coloca una pequeña carga, suficiente para eliminar el rizado en las fibras. La resina se polimeriza en 14 horas en ambiente standard.

Después de la polimerización de la resina, se hace un corte a lo largo de la cápsula y se quita el polímero moldeado conteniendo las fibras en su eje central. Este bloque se coloca en el microtomo para obtener el corte transversal.

El microtomo lleva cuchillas de vidrio. La preparación de dichas cuchillas es muy importante ya que una cuchilla defectuosa dañaría la muestra. Se pueden preparar cuchillas usando un corta-vidrios y unos alicates especiales de mordazas anchas, o bien usando un aparato especial (14). En la Fig. 4 se muestran las distintas etapas a seguir para la preparación de la cuchilla.

Debido a que la dureza y otras propiedades de las distintas fibras textiles varían de caso en caso, es necesario disponer de un juego de cuchillas con diferentes ángulos de filo, con el fin de poder elegir la cuchilla más adecuada para obtener un corte liso y perfecto.

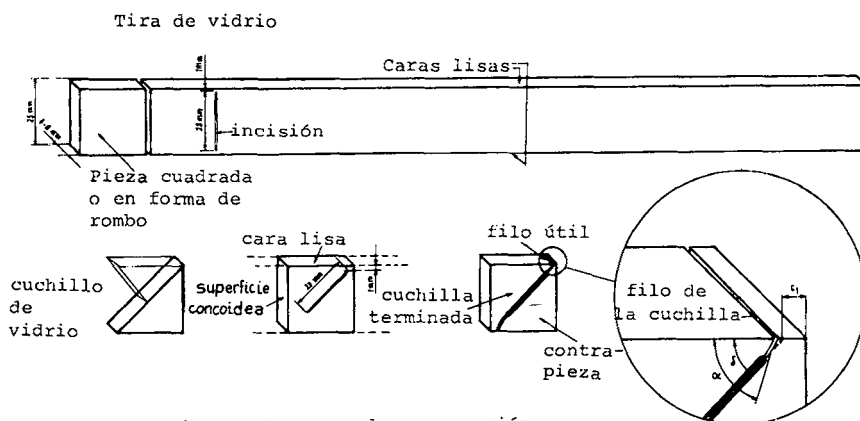


Figura 4.- Distintas etapas en la preparación de la cuchilla

La facultad de hacer cuchillas de vidrio, con posibilidad de reproducción, así como la de medir los ángulos de la cuchilla, permite controlar una de las variables más delicadas del corte metódico. Las cuchillas de igual ángulo de filo

pueden tener diferentes propiedades de corte, y la elección de la cuchilla y su ajuste con respecto al movimiento de la muestra durante la operación de corte es muy importante.

El grosor de la sección transversal debe estar comprendido entre 100 y 1.000 Å ya que de lo contrario el haz de electrones no puede atravesar la muestra. Una sección gruesa producirá una microfotografía de muy baja calidad y sin detalles. Una de las formas de conseguir una microfotografía de buena calidad de una sección gruesa es usar el microscopio electrónico de barrido.

La sección transversal obtenida se fija sobre una rejilla metálica de 2,3 ó 3 mm de diámetro y de 0,2 mm de espesor. Estas rejillas son de distintos metales como cobre, níquel, acero inoxidable, oro y platino.

Preparación de la muestra para la observación en el microscopio de barrido SEM

En el microscopio electrónico de barrido se observa la estructura superficial de la muestra, por lo tanto las fibras deben prepararse en una sección longitudinal.

Las fibras deben de estar completamente secas. Existen varios aparatos para secar las muestras. Una vez que se hayan preparado las fibras deben colocarse sobre el portamuestras. Hay varios tipos de portamuestras: portamuestras para la observación de muestras normales, para muestras voluminosas, portamuestras con posibilidad de seleccionar la superficie deseada de la muestra, portamuestra con microcircuito y con posibilidad de ser calentada o enfriada, etc.

La distribución de la intensidad de señales producidas en la muestra es función de la composición de ésta y de la energía de los electrones. La intensidad de las señales emitidas por la muestra viene determinada por la distribución de señales producidas y por su absorción por la propia muestra. La profundidad normal para que las señales sean emitidas es de menos de 500 Å para electrones secundarios.

Las fibras textiles por no tener capacidad de reflejar los electrones, deben ser cubiertas por plata u oro. Las fibras preparadas se fijan sobre el portamuestras.

Antes de introducir la muestra preparada en el microscopio es necesario aislar la cámara del sistema y luego introducir aire seco o nitrógeno antes de retirar todo el soporte del portamuestras.

DEFECTOS COMUNES EN MICROSCOPIA ELECTRONICA (15)

<i>Apariencia del negativo</i>	<i>Causas posibles</i>	<i>Remedios</i>
1. Bajo contraste	Preparación de la muestra y exposición incorrecta. Revelación del negativo incorrecta.	Empleo de reactivos para mejorar el contraste, apertura adecuada, aumento en la exposición, revelador adecuado para el contraste.
2. Imagen borrosa, falta de detalles	Inestabilidad del instrumento, columna contaminada.	Debe prepararse la muestra correctamente. Comprobar los detalles según el manual de instrucciones.

- | | | | |
|----|--|--|--|
| 3. | Líneas de difracción alrededor del área de la muestra. | Sistema de lentes contaminado o enfoque incorrecto. | Limpiar el sistema de lentes y ajustar "stigmator". |
| 4. | La pantalla de observación no está iluminada uniformemente. | El haz no está bien centrado. Las lentes de los condensadores están mal ajustadas. | Centrar la luz y ajustar condensadores. |
| 5. | Una pequeña área con elevada densidad en el centro del campo | Escape de la luz cuando no se usa apertura. | Empleo de pantalla de alta intensidad empleo de apertura del objetivo. |
| 6. | Marcas estáticas o grietas en emulsión. | Permanencia de la película en vacío por mucho tiempo.
Avance de la película demasiado rápido. | No debe cargarse la película si no se va a utilizar. Avance muy lento. |
| 7. | Rayas y puntos blancos. | Polvo sobre el negativo antes de ser expuesto. Marcas de dedos al cargarse. | Los negativos deben estar limpios y deberán cogerse por los extremos. |

BIBLIOGRAFIA

- (1) J. J. Thomson, Phil. Mag. 44, 293 (1897).
- (2) De Broglie, Phil. Mag. 47, 446 (1924).
- (3) H. Busch Ann. d. Physik 81. 974 (1926).
- (4) C. J. Davisson, Nature 119, 558 (1927).
- (5) J. J. Thomson, G. P. Thomson Nature 119, 890 (1927).
- (6) M. Knoll and E. Ruska, Ann. d. Physik 12, 607 (1932); Zeit f. Phy, 12, 389 (1931).
- (7) L. Morton, Hnn. Bull. Soc. Roy Med. Nat. Bruselas 92 106 (1934).
- (8) B. Van Borries and E. Ruska, Z. Wiss. Mikroskop 56, 317 (1939).
- (9) Fundamentals of transmission electron microscopy. Robert D. Heidenreich.
- (10) A. Kodak. Data book. no. p -267 cat. 179 7703.
- (11) «Introduction to Scanning Electron Microscopy» W. C. Nixon 1969 Proceedings of and Annual Scanning Electron Microscopy Symposium, Patrocinado por IIT Research Institute.
- (12) Joel News. Vol. 10, n.º 2.
- (13) Apuntes del cursillo de «Teoría y práctica del microscopio electrónico» dirigido por el Dr. Ooki de la Universidad de Córdoba, Argentina.
- (14) Un aparato LKB para hacer cuchillas. «Knife Maker».
- (15) Electron Microscopy and Photography. Kodak Publication.