

**MICROSCOPIA
ELETRÔNICA
DE
VARREDURA**
*APLICAÇÕES E
PREPARAÇÃO DE
AMOSTRAS*



A principal função de qualquer microscópio é tornar visível ao olho humano o que for muito pequeno para tal. A forma mais antiga e usual é a lupa seguida do microscópio óptico, que ilumina o objeto com luz visível ou luz ultravioleta. O limite máximo de resolução dos microscópios ópticos é estabelecido pelos efeitos de difração devido ao comprimento de onda da radiação incidente. Os microscópios ópticos convencionais ficam, então, limitados a um aumento máximo de 2000 vezes, porque acima deste valor, detalhes menores são imperceptíveis. Para aumentar a resolução pode-se utilizar uma radiação com comprimento de onda menor que a luz visível como fonte de iluminação do objeto. Além disso, a profundidade de campo é inversamente proporcional aos aumentos, sendo necessário, então, um polimento perfeito da superfície a ser observada, o que às vezes é incompatível com a observação desejada (KESRENBACHK, 1994).

Um microscópio eletrônico de varredura (MEV) utiliza um feixe de elétrons no lugar de fótons utilizados em um microscópio óptico convencional, o que permite solucionar o problema de resolução relacionado com a fonte de luz branca.

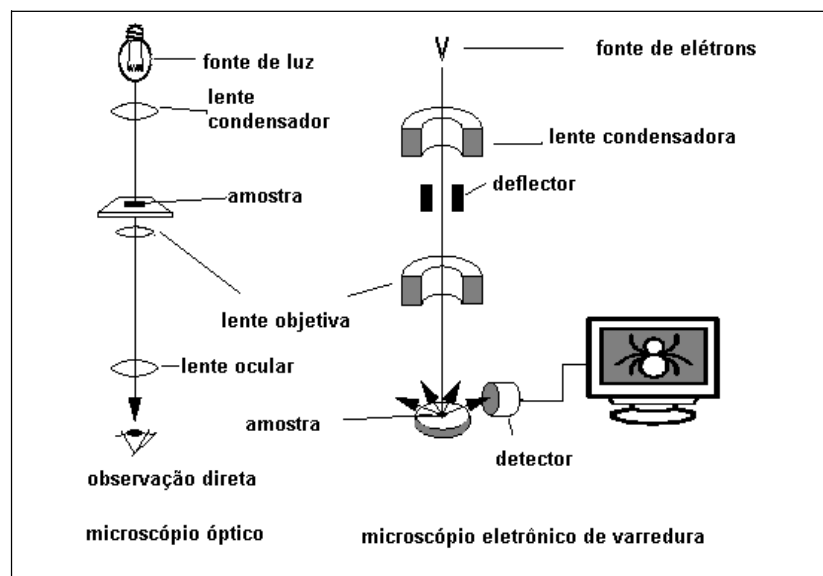


Figura 1.1 - Desenho esquemático para comparação entre microscópio óptico e microscópio eletrônico de varredura

De Bloglie, em 1925, mostrou o dualismo onda-partícula e, por conseguinte, que o comprimento de onda de um elétron é função de sua energia (DE BLOGLIE, 1925). A energia pode ser comunicada a uma nova partícula carregada por meio de um campo elétrico acelerador. Assim, sob uma voltagem suficientemente grande, por exemplo,

kV, elétrons de comprimento de onda extremamente curto ($\lambda=0,005\text{\AA}$) e, portanto, de poder de resolução potencialmente alto como uma fonte de iluminação, podem ser produzidos. Além disto, devido às suas cargas, os elétrons podem ser focalizados por campos eletrostáticos ou eletromagnéticos e, então, são capazes de formar imagens. Eles possuem, portanto, as características essenciais necessárias a um microscópio de alta resolução.

Como resultado tem-se que os aparelhos modernos permitem aumentos de

300.000 vezes ou mais, para a maior parte de materiais sólidos, conservando a profundidade de campo compatível com a observação de superfícies rugosas.

O MEV é um aparelho que pode fornecer rapidamente informações sobre a morfologia e identificação de elementos químicos de uma amostra sólida. Sua utilização é comum em biologia, odontologia, farmácia, engenharia, química, metalurgia, física, medicina e geologia.

O MEV é um dos mais versáteis instrumentos disponíveis para a observação e análise de características microestruturais de objetos sólidos. A principal razão de sua utilidade é a alta resolução que pode ser obtida quando as amostras são observadas; valores da ordem de 2 a 5 nanômetros são geralmente apresentados por instrumentos comerciais, enquanto instrumentos de pesquisa avançada são capazes de alcançar uma resolução melhor que 1 nm (NAGATANI et al. 1987).

Outra característica importante do MEV é a aparência tridimensional da imagem das amostras, resultado direto da grande profundidade de campo. Permite, também, o exame em pequenos aumentos e com grande profundidade de foco, o que é extremamente útil, pois a imagem eletrônica complementa a informação dada pela imagem óptica.

HISTÓRICO

O MEV é um dos mais versáteis instrumentos disponíveis para a observação e análise das características microestruturais de materiais sólidos. O primeiro trabalho reconhecido descrevendo o conceito de um MEV é o de Knoll (KNOLL, 1935). Mais adiante, Von Ardenne em 1938 construiu um microscópio eletrônico de varredura e transmissão (STEM) adaptando bobinas de varredura a um microscópio eletrônico de transmissão (VON ARDENNE, 1938).

O primeiro MEV usado para observar amostras espessas foi descrito por Zworykin e colaboradores em 1942 (ZWORYKIN et al., 1942). Os autores descreveram que a emissão de elétrons secundários poderia ser responsável pelo contraste topográfico da imagem gerada. O coletor foi polarizado positivamente em relação à amostra com 50Volts e os elétrons secundários coletados produziram uma queda de voltagem no resistor. Esta queda de voltagem foi enviada a uma tela de televisão para produzir a imagem; entretanto, a resolução atingida foi de apenas $1\mu\text{m}$. Esta resolução foi considerada insatisfatória pela equipe, visto que buscavam atingir uma resolução maior de $0,5\mu\text{m}$ atingida pelos microscópios ópticos. Ao reduzir o diâmetro do feixe eletrônico *spot*, bem como aperfeiçoar a razão sinal/ruído, foi

construído um novo instrumento. Uma análise detalhada da relação entre aberrações das lentes, brilho do canhão e tamanho do diâmetro do feixe resultou em um método para determinar o tamanho mínimo do diâmetro do feixe em função de sua corrente (ZWORYKIN et al., 1942). A contribuição posterior do grupo foi usar um tubo multiplicador dos elétrons, como um pré-amplificador para a corrente de emissão secundária (elétrons secundários) vinda da amostra, mesmo assim as imagens ainda apresentavam ruído. O sistema óptico-eletrônico do instrumento consistia de três lentes eletrostáticas com bobinas de varredura posicionadas entre a segunda e terceira lentes apresentando uma resolução aproximada de 50 nm (500Å). A etapa seguinte foi o aperfeiçoamento do detector de elétrons secundários pelo mesmo autor (ZWORYKIN et al., 1942). Porém, a etapa foi seguida por Everhart e Thornley (EVERHART; THORNLEY, 1960) que empregaram um cintilador para converter os elétrons em luz, os quais eram, então, transmitidos a um fotomultiplicador.

Desde o primeiro instrumento comercial de 1965 (Cambridge instrumentos científicos – modelo *Stereoscan*), muitos avanços foram obtidos. Atualmente, os modernos microscópios eletrônicos de varredura são equipados com estrutura digital que permite o armazenamento temporário da imagem para observação ou até mesmo a transferência por rede para outras partes do planeta. Além disso, alguns modelos podem operar com baixo vácuo (linhas de ecologia) e outros fazem parte da linha para produção em série, e são utilizados na inspeção e controle de qualidade de fármacos, semicondutores e peças de precisão.

PRINCÍPIO DE FUNCIONAMENTO

O princípio de um microscópio eletrônico de varredura (MEV) consiste em utilizar um feixe de elétrons de pequeno diâmetro para explorar a superfície da amostra, ponto a ponto, por linhas sucessivas e transmitir o sinal do detector a uma tela catódica cuja varredura está perfeitamente sincronizada com aquela do feixe incidente. Por um sistema de bobinas de deflexão, o feixe pode ser guiado de modo a varrer a superfície da amostra segundo uma malha retangular. O sinal de imagem resulta da interação do feixe incidente com a superfície da amostra. O sinal recolhido pelo detector é utilizado para modular o brilho do monitor, permitindo a observação. A maioria dos instrumentos usa como fonte de elétrons um filamento de tungstênio (W) aquecido, operando numa faixa de tensões de aceleração de 1 a 50 kV. O feixe é acelerado pela alta tensão criada entre o filamento e o ânodo. Ele é, em seguida, focalizado sobre a amostra por uma série de três lentes eletromagnéticas com um *spot* menor que 4 nm. O feixe interagindo com a amostra produz elétrons e fótons que podem ser coletadas por detectores adequados e convertidas em um sinal de vídeo.

Quando o feixe primário incide na amostra, parte dos elétrons difunde-se e constitui um volume de interação cuja forma depende principalmente da tensão de aceleração e do número atômico da amostra, conforme figura 1.2. Neste volume, os elétrons e as ondas eletromagnéticas produzidos são utilizados para formar as imagens ou para efetuar análises físico-químicas.

Para serem detectados, as partículas e/ou os raios eletromagnéticos resultantes da interação do feixe eletrônico com a amostra devem retornar à superfície da amostra e daí atingirem o detector. A profundidade máxima de detecção, portanto, a resolução espacial, depende da energia com que estas partículas ou raios atingem o detector, ou são capturadas pelo mesmo. Por exemplo: elétrons retroespalhados possuem maior energia do que os elétrons secundários, assim, o detector de elétrons retroespalhados irá operar na faixa de energia maior e o de elétrons secundários na faixa menor.

A imagem formada a partir do sinal captado na varredura eletrônica de uma superfície pode apresentar diferentes características, uma vez que a imagem resulta da amplificação de um sinal obtido de uma interação entre o feixe eletrônico e o material da amostra. Diferentes sinais podem ser emitidos pela amostra. Dentre os sinais emitidos, os mais utilizados para obtenção da imagem são originários dos elétrons secundários e/ou dos elétrons retroespalhados.

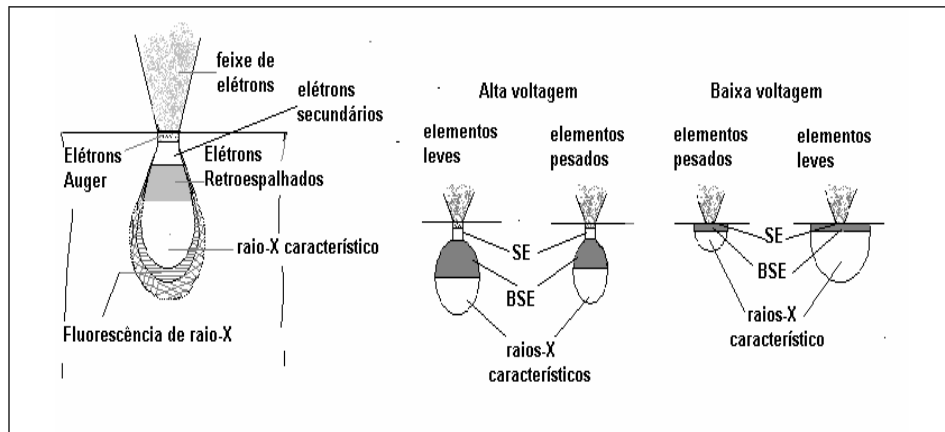


Figura 1.2 - Volume de interação: a) localização dos sinais emitidos pela amostra; b) relação da voltagem para elementos leves e pesados. Figura adaptada de KESTENBACH, 1994.

A imagem formada a partir do sinal captado na varredura eletrônica de uma superfície pode apresentar diferentes características, uma vez que a imagem resulta da amplificação de um sinal obtido de uma interação entre o feixe eletrônico e o material da amostra. Diferentes sinais podem ser emitidos pela amostra. Dentre os sinais emitidos, os mais utilizados para obtenção da imagem são originários dos elétrons secundários e/ou dos elétrons retroespalhados.

Elétrons Secundários (“secondary electron” –SE)

Os elétrons secundários no MEV resultam da interação do feixe eletrônico com o material da amostra. Estes elétrons resultantes são de baixa energia (<50eV), e formarão imagens com alta resolução (3-5 nm). Na configuração física dos MEV comerciais, somente os elétrons secundários produzidos próximos à superfície podem ser detectados. O contraste na imagem é dado, sobretudo, pelo relevo da amostra, que é o principal modo de formação de imagem no MEV. Os elétrons secundários, elétrons de baixa energia, gerados pelas interações elétron-átomo da amostra têm um livre caminho médio de 2 a 20 nm, por isso, somente aqueles gerados junto à superfície podem ser reemitidos e, mesmo estes, são muito vulneráveis à absorção pela topografia da superfície.

Elétrons Retroespalhados (“backscattering electron”- BSE)

Os elétrons retroespalhados, por definição, possuem energia que varia entre 50eV até o valor da energia do elétron primário. Os elétrons retroespalhados, com energia próxima à dos elétrons primários, são aqueles que sofreram espalhamento elástico, e são estes que formam a maior parte do sinal de ERE. Os elétrons retroespalhados de alta energia, por serem resultantes de uma simples colisão elástica, provêm de camadas mais superficiais da amostra. Logo, se somente este tipo de elétrons forem captados, as informações de profundidade contidas na imagem serão poucas se comparadas com a profundidade de penetração do feixe. O sinal de BSE é resultante das interações ocorridas mais para o interior da amostra e proveniente de uma região do volume de interação abrangendo um diâmetro maior do que o diâmetro do feixe primário. A imagem gerada por esses elétrons fornece diferentes informações em relação ao contraste que apresentam: além de uma imagem topográfica (contraste em função do relevo) também obtém-se uma imagem de composição (contraste em função do número atômico dos elementos presentes na amostra).

Outros tipos de interações podem ser obtidos pela incidência do feixe primário na amostra, como segue:

- Elétrons transmitidos: sofrem espalhamento elástico (espalhamento de Rutherford) sendo, então, os responsáveis pela formação da imagem dos MET (microscópios eletrônicos de Transmissão).
- Elétrons absorvidos: perdem toda sua energia na amostra, e, portanto, geram uma corrente elétrica entre a amostra e o porta-amostra, que deverá ser aterrado para descarregá-la e garantir a integridade da mesma.
- Elétrons Auger: estes são os elétrons cuja energia (em torno de 1500eV) é característica do elemento que a emite e do tipo de ligação química. Estes elétrons possuem energia máxima de cerca de 2 keV, por isso, pode ser utilizada para análise elementar (principalmente óxidos e filmes muito finos). A profundidade de escape da interação é de aproximadamente 0,2 a 2,0 nm, a análise correspondente a este tipo de sinal é chamada espectroscopia Auger (AS).

Catodoluminescência

Quando materiais isolantes ou semicondutores são bombardeados pelo feixe de elétrons, fótons de grande comprimento de onda (ultravioleta e visível) são emitidos. O espectro obtido depende do material estudado e de sua pureza. Alguns materiais apresentam fluorescência na faixa de luz visível sob o bombardeio de elétrons, conforme ilustrado pelo fósforo dos tubos de raios catódicos. A radiação é, em muitos casos, uma função de níveis de impurezas dentro dos materiais e é muito utilizada em pesquisa de semicondutores e em muitas investigações mineralógicas.

Difração de Elétrons Retroespalhados

A técnica de EBSD (em inglês “Electron BackScatter Diffraction” ou difração de elétrons retroespalhados) permite a análise cristalográfica de um material, ou seja, a determinação da orientação cristalina pontualmente ou em áreas específicas. A superfície da amostra a ser analisada é posicionada no porta-amostras a um ângulo de 70° a 80° em relação ao feixe de elétrons de modo a diminuir o percurso dos elétrons retroespalhados e diminuir a fração de elétrons absorvidos. O feixe de elétrons é direcionado para o ponto ou a área de interesse. O espalhamento elástico dos elétrons incidentes prova a difração na condição de Bragg, como os elétrons da amostra. As figuras de difração são capturadas por uma tela de fósforo posicionada no interior da câmara de vácuo e conectada a uma TV ou câmara CCD. A imagem é processada e então comparada com padrões pré-estabelecidos. A largura das bandas formadas devido à difração está relacionada com a distância interplanar, e os ângulos entre as bandas correspondem ao ângulo entre os planos cristalinos (PINTO et al., 2003).

COMPONENTES DO MEV

O MEV convencional apresenta uma coluna óptico-eletrônica adaptada a uma câmara com porta-amostra aterrado, sistema eletrônico, detectores e sistema de vácuo.

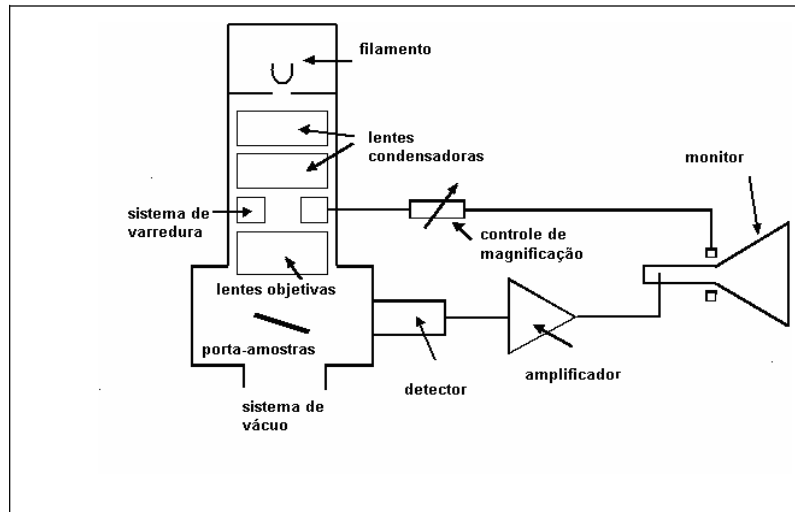


Figura 1.3 - Desenho esquemático dos componentes básicos do MEV. Adaptado de KESTENBACH, 1994

Coluna Óptico-Eletrônica

O projeto óptico-eletrônico do MEV visa à produção de um pequeno feixe de elétrons de alta intensidade. Bobinas de exploração eletromagnética de dupla deflexão, posicionadas no interior da lente final, são alimentadas por um gerador de varredura e fazem com que o feixe explore a superfície da amostra, seqüencialmente, iluminando áreas de aproximadamente 10 nm de diâmetro.

Câmara da Amostra

O compartimento onde são inseridas as amostras é chamado de câmara de amostras. A pressão na câmara é de, aproximadamente, 10^{-6} Torr ou menor e na pré-câmara, para os modelos que a apresentam, é de 10^{-3} Torr. A parte externa da câmara pode apresentar botões para ajustes manuais que permitem variar deslocamento da amostra segundo três direções (x, y, z), a rotação da amostra, sendo que estes também podem ser acessados via *software*.

A fonte de elétrons é chamada de canhão eletrônico e é composta basicamente por três elementos: filamento de tungstênio (W) ou de hexaboreto de lantânio (LaB₆) + cátodo (cilindro de Wehnelt) + ânodo. O filamento é aquecido (W geralmente a 2500^o C), o que causa uma emissão termiônica de elétrons. Os elétrons que são atraídos para o ânodo e mantidos em potencial positivo em relação ao filamento na faixa de 1 a 30 kV. Na figura 1.4 é mostrada uma representação do canhão, observando-se que os três constituintes são mantidos a diferentes potenciais elétricos.

O filamento, percorrido por uma corrente elétrica, emite espontaneamente os elétrons que são acelerados por um campo elétrico que lhes confere energia suficiente para atingir a amostra que está localizada na câmara. Durante o percurso do feixe de elétrons até amostra, existem vários dispositivos eletromagnéticos cuja a função é direcionar o feixe para o ponto de análise, que serão apresentados a seguir.

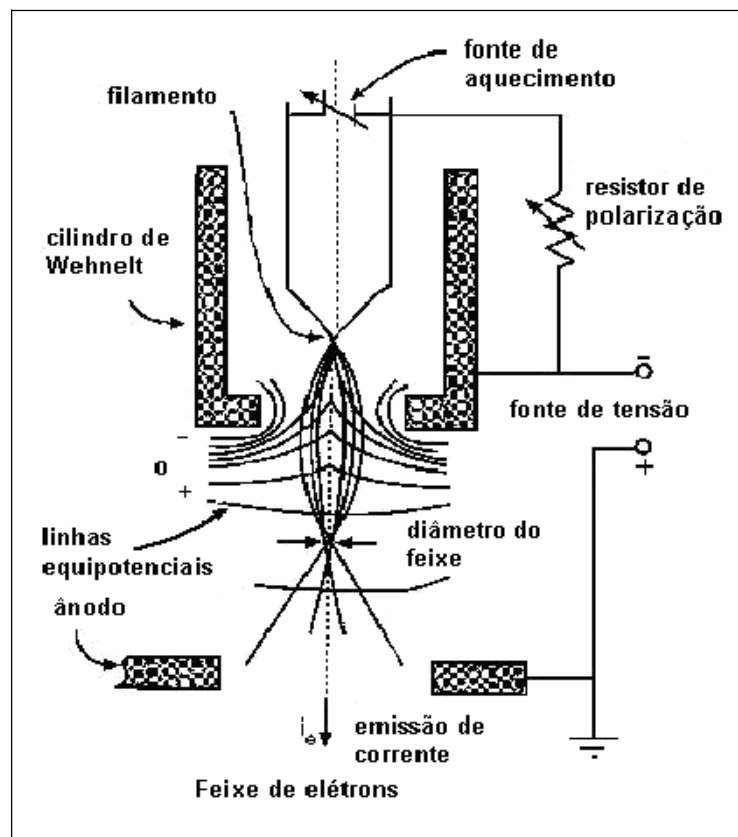


Figura 1.4 - Representação esquemática de canhão eletrônico tradicional com

filamento de tungstênio. Adaptada de GOLDSTEIN, 1992.

Detectores

Coletam o sinal emitido pelos diferentes tipos de interações entre o feixe primário e a amostra (elétrons secundários ou retroespalhados, raios-X, elétrons Auger, etc) que ficam ligados a uma tela de visualização e um sistema de gravação de imagens. O detector pode ser um cintilador polarizado positivamente, acelerando os elétrons sobre a área reativa e, a partir desta, transmitindo um sinal através de um guia de luz e um fotomultiplicador aos amplificadores de sinal e aos processadores e, finalmente, para o tubo de raios catódicos. Os elementos ópticos: diafragma e lentes eletrostáticas ou magnéticas são responsáveis pela correção das aberrações das aberturas ou cromáticas (redução do diâmetro do feixe e focalização sobre o objeto), e o Sistema de varredura: bobinas defletoras comandam o ponto de impacto dos elétrons sobre a amostra.

Detector de elétrons secundários

Os elétrons são atraídos para o interior do detector devido à voltagem positiva (200V) da grade localizada na frente do detector. Dentro do detector os elétrons são acelerados até 10kV para um guia de luz de quartzo coberto com material cintilador. Esta aceleração resulta na emissão de fótons que percorrem o guia de luz até o fotomultiplicador que produzirá uma corrente de elétrons. O pulso amplificado gera um ponto na tela de tubos de raios catódicos (TRC).

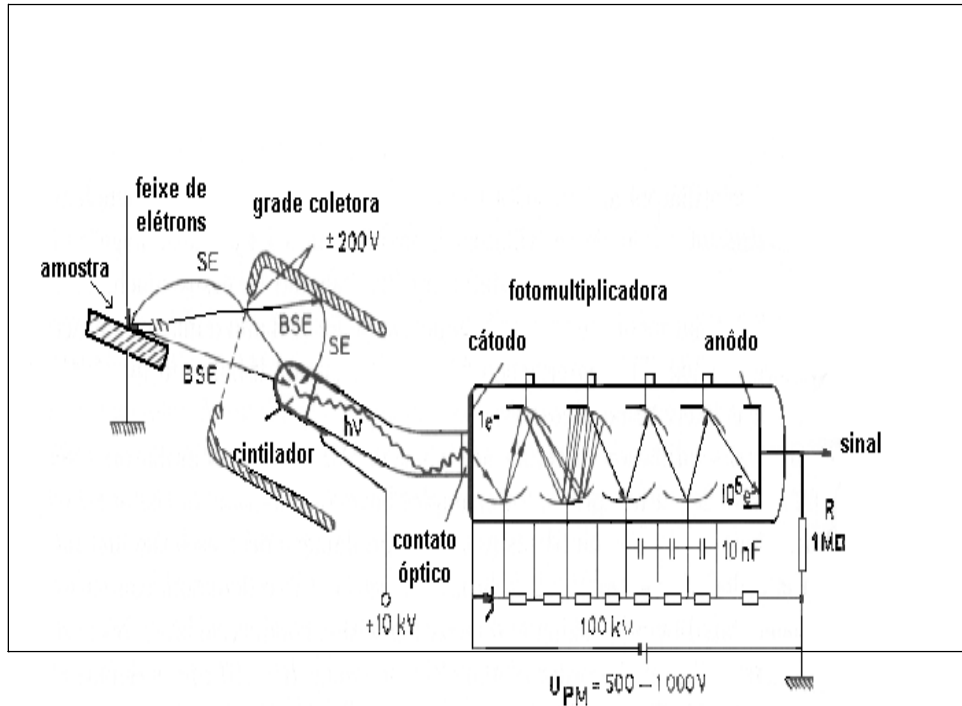


Figura 1.5 - Detector de elétrons secundários. Adaptado de KESTENBACH, 1994.

Detector de elétrons retroespalhados

O detector de elétrons retroespalhados pode separar as informações de composição e topografia. Existem dois tipos comerciais sendo utilizados em MEV, o de estado sólido (semicondutor) e o Robison que usa um cintilador para detecção de elétrons retroespalhados, conforme é mostrado na figura 1.6. O detector de estado sólido é o mais moderno, se compõem de um par de semicondutores dispostos simetricamente com o eixo óptico, cuja simetria e disposição dependem do fabricante.

A amplificação é independente do foco da lente e pode se variar rapidamente centralizando-se num ponto fixo da superfície. Embora usando exposição a duas dimensões, as imagens produzidas são caracterizadas por seu aspecto tridimensional e por níveis de cinza relacionados a composição da superfície da amostra. O registro da imagem usa um segundo tubo de raios catódicos de alta resolução e um sistema de câmera convencional acoplada ou registro digitalizado. As imagens produzidas pelo detector de BSE (elétrons retroespalhados) são imagens de relativa facilidade de interpretação por equipe não especializada.

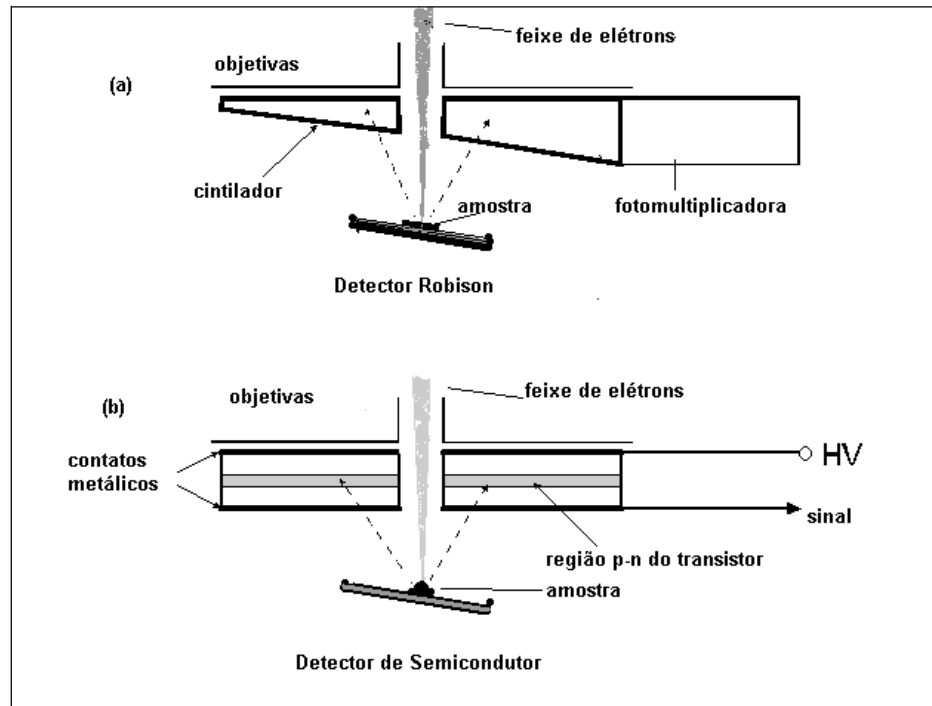


Figura 1.6 - Esquema de funcionamento de detectores de elétrons retroespalhados. Sendo que em (a) o tipo Robison e em (b) o de estado sólido ou semicondutor.

Sistema de Vácuo

Para atingir o vácuo apropriado para as análises na câmara do MEV, geralmente é utilizado um conjunto de bombas operando com uma bomba mecânica para o vácuo primário (em torno de 10^{-3} Torr) e outra para o vácuo secundário (em torno de 10^{-6} Torr). Dependendo do modelo do microscópio eletrônico, podem ser usadas uma bomba mecânica seguida de uma bomba turbomolecular ou difusora para a câmara e uma ou duas bombas iônicas para a coluna do MEV.



Figura 1.7 - Vista geral de um MEV modelo XL30 da Phillips

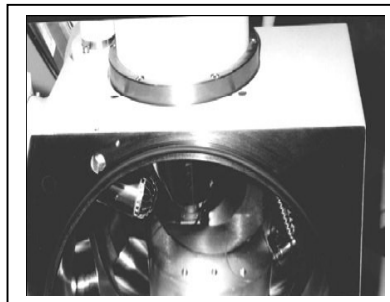
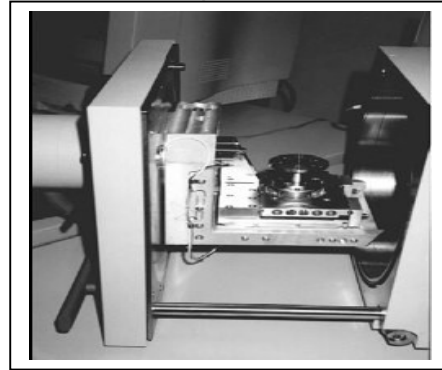


Figura 1.8 - (A) Coluna óptico-eletrônica, (B) câmara da amostra com mesa para fixação dos suportes metálicos, (C) detalhe dos detectores de elétrons secundários, detectores de elétrons retroespalhados e sonda de EDS.

RESOLUÇÃO DAS IMAGENS

Os parâmetros que mais influenciam na resolução da imagem em um MEV são:

a) tensão de aceleração dos elétrons; b) corrente da sonda: quanto maior a

corrente, maior é o diâmetro do feixe; c) a distância de trabalho – que é a distância entre a amostra e a lente objetiva. Quanto menor a distância de trabalho, melhor será a resolução. Por outro lado, quanto maior a distância de trabalho tanto maior será a profundidade de campo obtida. Mesmo que o diâmetro do feixe seja de somente alguns nanômetros, o feixe se espalha dentro da amostra sofrendo choques. Portanto, o sinal que se utiliza pode vir de uma zona mais estendida que o diâmetro da sonda. A resolução que se pode obter com o MEV depende do tamanho da zona de onde vem o sinal utilizado para formar a imagem. A resolução será determinada pelo diâmetro sobre o qual vai sair o sinal (SE, BSE ou raios-X) que será utilizado para formar a imagem, e não será possível observar detalhes de tamanho inferior a este diâmetro.

Os elétrons secundários são bem pouco energéticos. Eles não podem percorrer um trajeto importante dentro do material. Eles provêm, portanto, de uma zona da ordem de alguns angstroms (Å) em torno do feixe incidente. Os elétrons secundários são as interações que permitem obter a melhor resolução.

Os elétrons retroespalhados possuem uma energia que é em torno daquela do feixe incidente (choques elásticos). A resolução será, portanto, maior à medida que a tensão for mais fraca. Mas é preciso salientar o fato de que se produzem menos elétrons retroespalhados à medida que a tensão diminui.

O diâmetro da região de interação do feixe incidente com a amostra, para gerar os elétrons retroespalhados, depende da profundidade de penetração dos elétrons a qual depende essencialmente de três fatores: a) tensão de aceleração; b) número atômico da amostra; c) ângulo de incidência do feixe com a superfície.

Aparentemente, a profundidade da penetração dos elétrons é maior à medida que a tensão de aceleração é mais forte. A profundidade de penetração dos elétrons pode variar de algumas dezenas a vários micrômetros. O número atômico faz, igualmente, variar a profundidade de penetração dos elétrons. Quanto maior o número atômico menor o poder de penetração dos elétrons. Da mesma forma, a penetração será maior quando a superfície for perpendicular ao feixe incidente. Em conclusão, a melhor resolução é obtida com elétrons secundários em materiais de peso atômico elevado.

MICROANÁLISE DE RAIOS-X

A microanálise eletrônica consiste na medida de raios-X característicos emitidos de uma região microscópica da amostra bombardeada por um feixe de elétrons. As linhas de raios-X característicos são específicas do número atômico da amostra e, o seu comprimento de onda ou sua energia podem ser utilizados para identificar o elemento que está emitindo a radiação.

Espectros de raios-X podem ser obtidos para todos os elementos da tabela periódica, com exceção do hidrogênio. Entretanto, a emissão dos primeiros dez elementos de baixo número atômico consiste de bandas na região de baixa energia onde as perdas por absorção na amostra são grandes. Assim, elementos como carbono, oxigênio e nitrogênio são freqüentemente determinados por estequiometria.

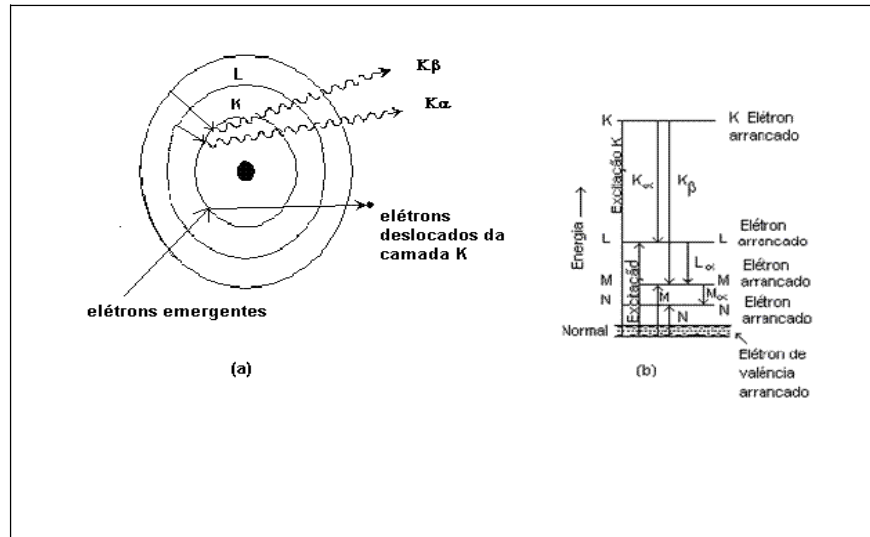


Figura 1.9 - Esquema ilustrativo da emissão de raios-X. Adaptado de KESTENBACH, 1994.

Os raios-X emitidos da amostra devido ao bombardeio de elétrons do feixe podem ser detectados pelo espectrômetro convencional de cristais ou pelos dispositivos de estado sólido, Silício dopado com Lítio. O detector de raios-X e o MEV são concepções alternativas de projeto do mesmo instrumento básico, isto é, partem do mesmo princípio físico para resultados diferenciados. O feixe de elétrons é suficientemente energético para ionizar camadas profundas dos átomos e produzir também a emissão de raios-X, além da emissão de outras partículas como os elétrons retroespalhados utilizados na formação da imagem. A resolução espacial da análise depende da energia do raio-X detectado e da natureza do material. A figura 1.9 mostra, de forma esquematizada, o processo de excitação de elétrons para produção de raios-X. Através da análise dos picos obtidos no espectro pode-se determinar os elementos presentes na amostra, porém, tendo o cuidado de observar se há o aparecimento do pico de ionização do Silício (quando se utiliza o detector de estado sólido). Dois tipos de detectores que

captam raios-X característicos podem ser utilizados: por dispersão de energia (EDS) ou por dispersão em comprimento de onda (WDS). Será discutida neste estudo somente a espectroscopia por dispersão de energia (EDS), por ser largamente utilizada. Na tabela 1.1 apresenta-se uma comparação entre as técnicas WDS e EDS.

Tabela 1.1 - Comparação entre as técnicas WDS e EDS

	WDS	EDS
Elementos detectáveis	Z>4	Z>11
Concentração Mínima em (ppm)	220-750	1000
Volume Mínimo da Amostra	10 ⁸ nm	
Massa Mínima	10 ⁻¹⁸ g	
Resolução	10 eV	150 eV
Profundidade da Amostra		>500 nm
Precisão Quantitativa Relativa		1-10% (utilizando ZAF)

*Correção ZAF: Z (número atômico), A (probabilidade de absorção), F (fluorescência de raios-X secundária)

A técnica de EDS considera o princípio de que a energia de um fóton (E) está relacionada com a frequência eletromagnética (ν) pela relação $E = h\nu$, onde “h” é a constante de Planck. Fótons com energias correspondentes a todo espectro de raios-X atingem o detector de raios-X quase que simultaneamente, e o processo de medida é rápido, o que permite analisar os comprimentos de onda de modo simultâneo.

No caso do WDS, a separação dos raios-X é obtida por difração dos fótons incidentes característicos dos elementos presentes na região atingida pelo feixe de elétrons do canhão do MEV. A lei de Bragg fornece a relação entre o comprimento de onda de raios-X, λ , e o ângulo crítico θ de incidência do feixe, para a interferência construtiva, isto é, $n\lambda = 2d\sin \theta$, onde “n” é um número inteiro e “d” o espaçamento interplanar da família de planos difratados.

Na configuração de um microscópio eletrônico podem-se acoplar os dois detectores de raios-X (EDS e WDS), que permitem coletar fótons produzidos pelo feixe de elétrons primários.

A zona analisada será, portanto, aquela que é percorrida pelo feixe. Se estivermos trabalhando no modo de varredura (formação de uma imagem), então a análise será de toda a superfície da imagem. É possível, também, parar a varredura e analisar em um ponto (*spot*), área ou linha selecionada na imagem.

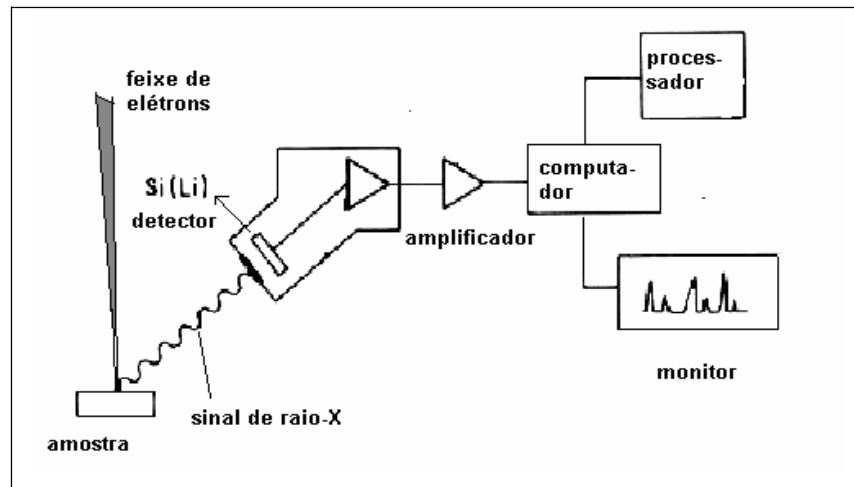


Figura 1.10 - Detector de raios-X usado para espectroscopia por dispersão de energia (EDS). Adaptado de KESTENBACH, 1994.

O detector é capaz de determinar a energia dos fótons que ele recebe. Fica possível, portanto, traçar um histograma com a abscissa sendo a energia dos fótons (keV) e a ordenada o número de fótons recebidos (contagens). O tempo necessário para adquirir o espectro de boa qualidade fica em torno de 2 minutos.

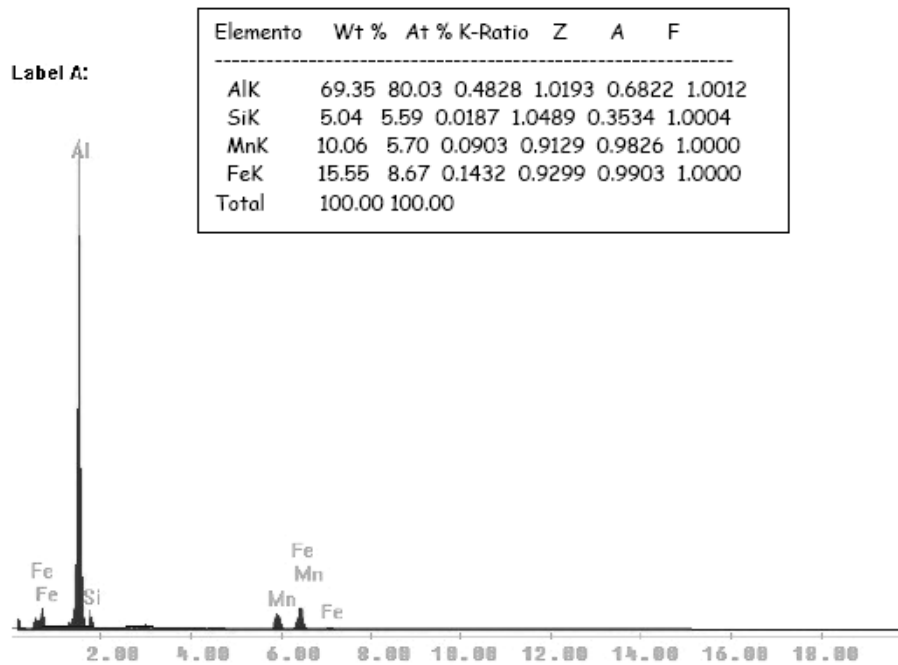


Figura 1.11 - Espectro obtido por microanálise de raios-X característicos por EDS com tabela de discriminação dos elementos analisados.

A interpretação dos espectros é facilitada por uma base de dados que contém, para cada elemento, as energias e a intensidade das raias que as produziu. É possível localizar, para cada energia do espectro, a lista dos elementos que possuem uma raia neste domínio energético. E, também para cada elemento, fazer aparecer sobre o espectro um diagrama em barras representando a posição e as energias das raias deste elemento. Cabe salientar que os elementos em quantidade inferior a 0,2% em massa não poderão ser detectados. Os elementos hidrogênio (H), lítio (Li), berílio (Be) não poderão ser detectados pelas técnicas citadas. É importante escolher uma tensão de aceleração compatível com os elementos que se quer analisar. É possível conhecer, por meio de cálculos complexos, as quantidades respectivas dos diferentes elementos analisados.

Aspectos Quantitativos

A determinação das porcentagens dos elementos por microanálise de raios-X é uma operação possível no microscópio eletrônico. Existem vários métodos para quantificação dos elementos químicos presentes na amostra, sendo o método mais simples o sem padrões. Neste caso, a análise é

denominada semiquantitativa. O princípio consiste em avaliar a superfície dos picos que é proporcional à quantidade de átomos que produziu a raia. A quantificação consiste, portanto, em medir a superfície dos picos que se tem previamente identificada a ser atribuído um coeficiente e então calcular as porcentagens. As dificuldades são inúmeras: há, infelizmente, além da quantidade, muitos outros parâmetros (fora aqueles ligados ao material) que fazem variar a superfície dos picos a considerar como: a) tensão de aceleração; b) natureza dos outros elementos presentes com os quais se faz a quantificação: as raias de um elemento podem ser mais ou menos absorvidos pelos outros elementos que estão presentes no volume analisado; c) repartição dos elementos no volume analisado (os programas de cálculo quantitativo são elaborados para os elementos que seriam repartidos de modo homogêneo, fazer atenção, portanto à análise de material com múltiplas fases (camadas, lamelas, inclusões)) e d) geometria da superfície analisada (os programas de cálculo quantitativo são elaborados para superfícies planas, polidas).

Na prática para determinar a superfície dos picos é preciso fazer a deconvolução do espectro. Esta operação consiste em fazer seguir os contornos do espectro por uma curva matemática sobre a qual serão efetuados os cálculos desejados. É necessário, ainda, efetuar uma correção sobre as superfícies medidas de maneira a levar em conta as diferentes interações físicas que intervêm no material. Por exemplo, pode-se utilizar a correção "ZAF", que permite ter em conta a influência do número atômico dos elementos sobre a eficácia da excitação e da detecção (fator Z), da probabilidade que um raio-X seja absorvido antes mesmo de ser detectado (fator A) e da contribuição dos raios-X emitidos por um outro elemento (fluorescência secundária, fator F).

A análise quantitativa consiste em se obter a concentração a partir de relações de intensidade de raios-X da amostra em estudo e de um padrão apropriado. Quando a composição do padrão é próxima da composição da amostra, os efeitos da matriz sobre a intensidade de raios-X são insignificantes e a análise se reduz à comparação das intensidades observadas. Entretanto, na maioria dos casos utilizam-se padrões de elementos puros porque é possível caracterizá-los com bastante precisão, mas nestes casos a precisão da análise depende essencialmente do modelo de correção (GOLDSTEIN et al., 1992).

Influência da Tensão de Aceleração na Microanálise

A tensão de aceleração do feixe de elétrons incidente é um dos parâmetros importantes para a microanálise. Os elétrons incidentes não poderão ejetar elétrons de uma energia superior à sua, o espectro irá, portanto, parar sobre o eixo das abscissas em um valor de energia que corresponde à tensão de aceleração. Por exemplo, se utilizada uma tensão de aceleração de 15kV, o fóton mais energético detectado terá uma energia de 15 kV. A quantidade de fótons produzida em uma gama de energia é também função da tensão de aceleração. O máximo de fótons de uma dada energia será produzido por uma tensão de aceleração 2,5 vezes superior à

energia dos fótons. Por exemplo, uma tensão de aceleração de 15 kV será eficaz para produzir fótons de 6 keV.

É importante escolher uma tensão de aceleração compatível com os elementos que se analisa. Tensões de até 10 kV para elementos leves deverão ser utilizadas, dando-se prioridade às tensões maiores que 10 kV para os elementos mais pesados. Portanto, é indispensável para a quantificação levar em conta a tensão de aceleração com a qual se faz a medida, porque pode-se encontrar um grande pico sem que este signifique, obrigatoriamente, uma quantidade importante. Este cuidado é feito automaticamente pelo programa analisador de espectro.

PREPARAÇÃO DE AMOSTRAS

Materiais biológicos, em geral, após passar pelo processo de fixação e desidratação, serão transferidos para a câmara do equipamento de secagem ao ponto crítico do CO₂ (CPD - critical point drying). Com a câmara isolada, em um volume de etanol absoluto ou acetona, injeta-se o CO₂ líquido, fazendo-se várias substituições até remoção total do etanol ou acetona, esta troca ocorre entre 0 e 5°C. A amostra permanece sempre imersa na fase líquida. Eleva-se a temperatura dentro da câmara entre 40 e 45 °C e, conseqüentemente, a densidade da fase líquida diminui. O aumento da pressão (de aproximadamente 73 atm) causa o aumento da densidade na fase gasosa, pois devido ao aumento gradual da temperatura, as moléculas adquirem energia cinética e se convertem em gás, o que aumenta a pressão interna na câmara. Quando estamos próximos da temperatura crítica significa que as densidades da fase gasosa e líquida estão próximas. Logo, quando o ponto crítico é excedido, a fase gasosa e líquida apresentam a mesma densidade, garantindo que a temperatura está em torno de um valor crítico onde não há limites entre as fases, ou seja, o menisco de transição de fases desaparece. Nesta situação, a tensão superficial é igual a zero e todo o líquido se converteu em gás, assim se evita o efeito da tensão superficial sobre a amostra. A câmara é, então, despressurizada até pressão atmosférica, e a amostra é removida da câmara. A amostra pode então ser montada em um suporte metálico e metalizada para ser observada no microscópio eletrônico de varredura. A figura 1.12 mostra um exemplar de uma câmara de CPD típica disponível comercialmente. O processo de secagem ao ponto crítico não é totalmente livre de problemas. Alguns tipos de tecidos podem sofrer contração significativa, variando de 10 a 15% para tecidos nervosos a 60% para tecidos embrionários (BOZZOLA et al., 1999).

Para amostras fixadas em lâminas ou lamínulas de vidro ou em filtros, pode-se utilizar peças especiais para depositar as amostras na câmara de CPD, fabricadas em aço inoxidável, que previnem a quebra dos suportes dentro da câmara evitando que a amostra seja danificada.

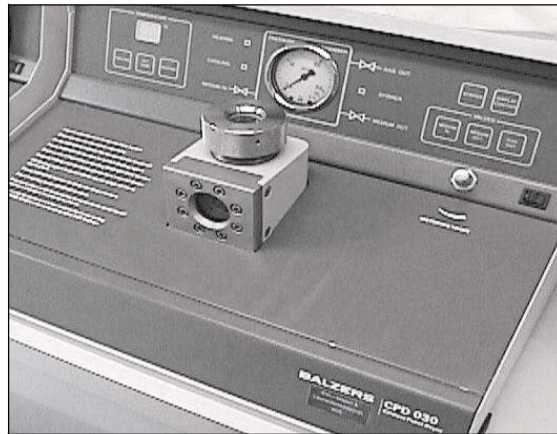


Figura 1.12 - Equipamento de ponto crítico utilizado para secagem de amostras biológicas.

Devido à necessidade de interação do feixe eletrônico com a amostra, alguns elétrons são absorvidos pela amostra que deve conduzi-los para o fio terra, por isso, é preciso que as amostras sejam condutoras. Caso isto não ocorra, é possível torná-las condutoras através de vários processos físicos como evaporação ou a deposição de íons (*sputtering*). Outro motivo para o recobrimento das amostras, é que as camadas depositadas podem melhorar o nível de emissão de elétrons, pois emitem mais elétrons que o material da amostra, facilitando a construção da imagem (GOLDSTEIN et al., 1992).

Geralmente o mais utilizado é o recobrimento por deposição de íons metálicos de ouro (Au), liga de ouro-paládio (Au-Pd) ou platina (Pt), entre outros. Neste processo, as amostras são colocadas em uma câmara com pressão em torno de 0,1 a 0,05 mbar e o alvo metálico é bombardeado com átomos de gás inerte como, por exemplo, argônio. Os átomos do alvo são depositados sobre a amostra. As máquinas utilizadas para esta finalidade são denominadas metalizadoras e oferecem como parâmetros de ajuste: corrente aplicada (em mA), tempo de deposição e altura da amostra em relação ao alvo, a fim de que seja calculada a espessura do metal depositado. No recobrimento a partir da evaporação, normalmente é utilizado o carbono. O revestimento com carbono é usado para recobrir regiões da superfície em que os átomos de ouro não têm cobertura efetiva, uma vez que são átomos maiores; ou ainda, quando não é desejada a incorporação de átomos na superfície como, por exemplo, para análise por raios-X para determinação de ouro ou elemento próximo a ele na tabela periódica. O carbono também é recomendado para superfícies com diferenças de altura, pois, pelo método da evaporação, os átomos espalham-se de forma mais uniforme. Fibras de carbono são aquecidas em torno de 2000°C em vácuo e evaporadas sobre a amostra. Para este procedimento utiliza-se a câmara de uma metalizadora a qual é acoplado um sistema para aquecimento das fibras de carbono.

Apesar do carbono não ser um bom emissor de elétrons, este

elemento pode fornecer um caminho condutor sobre as amostras mesmo em camadas muito finas. O método de impregnação metálica com OsO₄ é também utilizado para evitar estes efeitos. A figura 1.13 mostra um equipamento que pode ser utilizado para recobrimento das amostras por *sputtering* ou por evaporação. Os recobrimentos metálicos utilizados por estes procedimentos visam apenas tornar as amostras condutoras de modo a gerar imagens com boa resolução no MEV, portanto, é preciso um controle da espessura depositada a fim de evitar artefatos na imagem que podem mascarar a superfície real da amostra.



Figura 1.13 - Equipamento utilizado para recobrimento com carbono ou deposição metálica sobre as amostras não condutoras.

Amostras metálicas podem ser observadas sem recobrimento, desde que a faixa de tensão usada no microscópio seja apropriada para o material em estudo.