

IMÁGENES ULTRARRÁPIDAS DE LA DINÁMICA DEL MUNDO NANOSCÓPICO: Fundamentos de nuevas técnicas en Espectroscopía, Microscopía y Difracción

JESÚS SANTAMARÍA ANTONIO*

Real Academia de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales, Valverde 22, 28004 Madrid; Facultad de C. Químicas, 28040 Madrid.
E-mail: jsanta@ucm.es

RESUMEN

La aplicación de los **métodos de imagen** (visualización) al seguimiento de **procesos ultrarrápidos** (movimientos de átomos y moléculas en el nanomundo) comenzó poco después de la aparición de los métodos difractométricos de Rayos X (1912) y electrones (1925) en cristales, mediante el estudio óptico del movimiento browniano y también de la espectroscopía de fluorescencia de sistemas que presentan pulsaciones cuánticas (1927). La imagen de un objeto en un sistema óptico es (E. Abbe, 1873) el efecto de interferencia en el plano imagen que sigue a un fenómeno de difracción en el plano focal (o sea, implica dos transformadas de Fourier consecutivas). Las imágenes vienen dadas por la **Microscopía** (óptica, electrónica, campo cercano, etc.), en la cual se puede medir directamente no sólo las amplitudes, sino también las fases de los factores de estructura, es decir esas imágenes están basadas en la coherencia espacial. Otras técnicas como la **Espectroscopía** (óptica, RMN, absorción de rayos X) atienden a la respuesta temporal o del dominio de frecuencias, y finalmente la **Difracción** (rayos X, electrones) se preocupa de la respuesta de la estructura espacial a una perturbación.

Hacía falta un nuevo método, el método estroboscópico no lineal (pulsos ultracortos consecutivos de bombeo y sondeo de gran intensidad, uno de los cuales es un pulso láser) para crear un retardo entre la excitación y la prueba del efecto logrado, con el fin de poder explorar sistemáticamente los cambios cedenciales ocurridos en el sistema a lo largo del proceso

originado. Esto ha conducido a una pléthora de *métodos pulsados* en Espectroscopía (nuevos métodos no periódicos, cartografía de velocidades, Femtoquímica, Attofísica), Microscopía (campo cercano STM y AFM, microscopio de reacción COLTRIM, UDM electrónica ultrarrápida, etc.), Interferometría, Difracción (rayos X de electrones libres XFEL, de imagen sin lentes), RMN (pulsado, n dimensional), etc., donde muchas veces desaparece la distinción entre los mismos, dado que los aparatos empleados implican el uso conjunto de diversas técnicas.

Tratamos de dar una visión de no especialista sobre los principios que subyacen en estas nuevas técnicas: coherencia, estroboscopía, no linealidad, etc., a la vez que presentaremos ejemplos de aplicaciones actuales de las mismas a procesos ultrarrápidos en Química y Física (relajación, dinámica estructural, cambios de fase, reacción química, dinámica electrónica) que van desde los microsegundos (10^{-6} s) hasta los attosegundos (10^{-18} s).

I. EVOLUCIÓN DE IDEAS Y NIVEL DE TRATAMIENTO

En una comunicación anterior (1) hablamos de cronoscopía de imágenes del mundo microscópico, es decir de la secuencia ultrarrápida a nivel microscópico de imágenes temporales de la dinámica del movimiento (similar a una película de cine) de los átomos en la escala de los femtosegundos (fs), tanto en la Dinámi-

ca Estructural de fases condensadas (materia dura y blanda) como en moléculas aisladas en Femtoquímica. También hemos tratado (2) de la dinámica ultrarrápida del movimiento de los electrones (aislados o en átomos y moléculas) en la escala de attosegundos (Attofísica y Attoquímica). Ahora vamos a volver a insistir en las mismas ideas (imagen, ultrarrapidez, mundo nanoscópico, etc.) pero atendiendo más a los fundamentos (coherencia, estroboscopía, no linealidad), avances y aplicaciones de las técnicas de imagen ultrarrápidas, es decir a los desarrollos de las nuevas técnicas de Espectroscopía, Microscopía, Difracción y sus combinaciones más llamativas (Microscopías de fluorescencia y bifotónicas, Difracción con imagen sin lentes, Espectroscopía resuelta temporal y espacialmente, etc.). Hablamos con más propiedad de mundo nanoscópico (10^{-9} m) que de mundo microscópico (10^{-6} m) ya que se alcanza el tamaño de las moléculas, que es del orden de los nanómetros (decenas de Ångstroms).

El objetivo que se persigue es ver en tres dimensiones (3D) a nivel nanoscópico y con resolución temporal de fs. Para detectar el movimiento de un objeto nanoscópico con resolución de 0.1 nm, que se mueve a la velocidad del sonido ($\approx 10^3$ m/s, velocidad de los átomos y moléculas) se precisa una resolución temporal de $\tau = 10^{-10} \text{ m} / 10^3 (\text{m/s}) = 100$ femtosegundos (1fs= 10^{-15} s). Dada la importancia de la imagen en la comprensión del mundo nanoscópico, es decir, recordando la importancia de la visualización de un fenómeno para elaborar ideas comprensivas, comenzaremos con un rápido repaso histórico de la Microscopía, con sus imágenes y logros, para pasar luego a la Difracción y Espectroscopía, aplicadas a la Dinámica Estructural en fases condensadas. Nos referimos, pues, al mundo nanoscópico en la escala temporal de los fs, más que a los movimientos ultrarrápidos de los electrones, que ocurren en la escala de los attosegundos (1as= 10^{-18} s) de los que trata la Dinámica Cuántica Ultrarrápida. La Dinámica Estructural se ocupa fundamentalmente de los movimientos atómicos y cambios en fases condensadas, tanto en materia dura (sólidos, superficies), como en blanda (líquidos y macromoléculas biológicas). Dejamos, por tanto, aparte la Dinámica Molecular Reactiva de moléculas aisladas (Femtoquímica), así como la Attoquímica (movimiento de los electrones de valencia que desencadena el desplazamiento siguiente de los núcleos en la reacción química). Por tanto, en esta comunicación, nos centraremos tanto en

Física como en Química o Biología. En efecto, el seguimiento de procesos complejos en Química, Biología y Materiales demanda una gran habilidad para lograr imágenes en unas escalas muy amplias de longitud y tiempo. Sin embargo, esta comunicación no es una revisión de todas las técnicas de visualización en Química, Biología y Medicina, pues dejamos aparte, por un lado, la Resonancia Magnética Nuclear de imagen (Nuclear Magnetic Resonance Imaging), la tomografía de emisión de positrones (PET, positron emission tomography), la tomografía axial computerizada (TAC) y las técnicas holográficas (D. Gabor, 1948) que nos dan imágenes de objetos macroscópicos (ratones, pulmones, etc.) y, por otro, los métodos de cartografía de velocidades (velocity map imaging) y microscopios de reacción de multipartículas (tales como COLTRIM, cold target recoil ion momentum spectroscopy, que da imágenes multifragmento en coincidencia de iones y electrones) los cuales nos hacen visualizar los estados dinámicos vibracional y orbital de los fragmentos de una colisión reactiva (1).

II. Importancia de la imagen

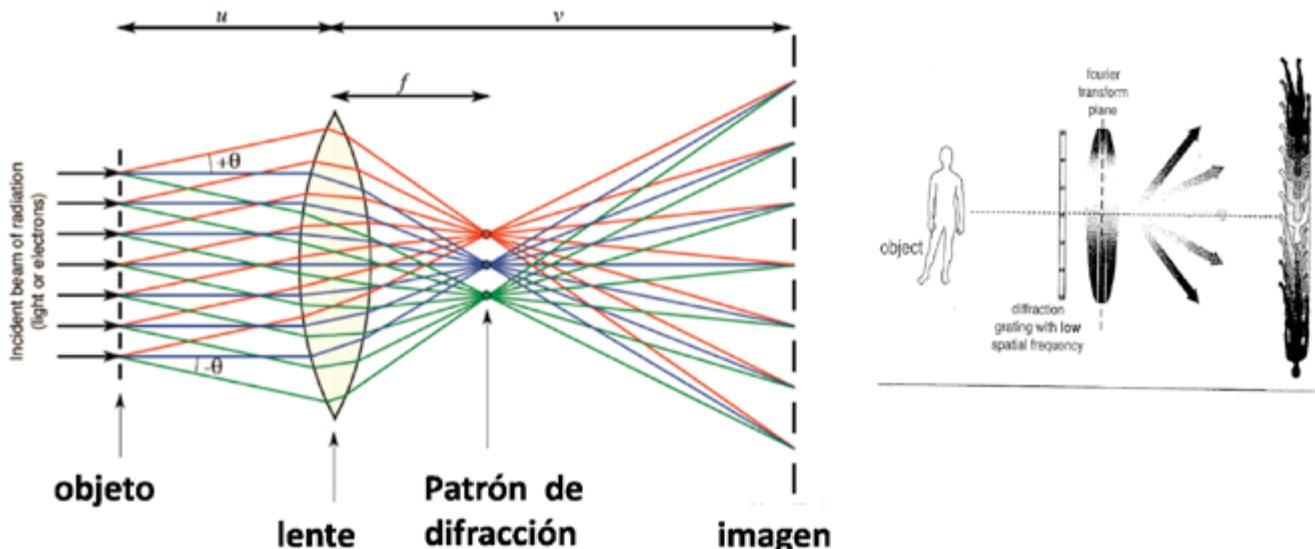
(Ver referencias 3, 4, 5)

La imagen viene asociada a la representación espacial visual de un objeto. Nos viene dada en la visión o a través de un espejo e implica la existencia de una lente o sistema de lentes. Los componentes de un microscopio son: fuente de luz, lente colimadora, objeto, lente objetivo, plano focal de difracción, plano imagen de interferencia, lente ocular e imagen real o virtual. La teoría de E. Abbe (1873) sobre el microscopio nos dice que "la imagen de un objeto en un microscopio es el efecto de interferencia en el plano imagen, que sigue a un fenómeno de difracción en el plano focal" e implica, por tanto, para un objeto (que posee una función de transferencia de contraste de Dufieux, 1946) dos transformadas de Fourier consecutivas, una del espacio real al espacio de momentos y otra desde este último de nuevo al espacio real (ver **Figura 1**).

Un requisito importante para la existencia de la imagen es la coherencia en fase de la amplitud de onda de la luz. Recordemos que en Espectroscopía no se exige la conservación de la fase (ni de la amplitud, ni de la función de onda mecanocuántica) con lo cual no hay imagen directa, mientras que en Difracción puede darse

FORMACIÓN DE IMAGEN EN UNA LENTE

Teoría de E. Abbe, 1877



**Imagen: Efecto de Interferencia después de un fenómeno de difracción
Dos procesos Fourier consecutivos**

$$d = 0.61\lambda / \text{NA}$$

$$\text{NA} = n \sin \alpha$$

Figura 1. Formación de imagen con una lente. Teoría de Abbe.

la conservación de solo la amplitud (con lo cual no se consigue imagen) o de la amplitud y fase (con lo cual se lograría posteriormente la imagen). En Difracción de Rayos X, la imagen puede obtenerse sin necesidad de lente óptica, como veremos, ya que no hay lente cuyo material sobreviva a los rayos X, ni tampoco espejo que los refleje. En Difracción de electrones sí pueden usarse lentes magnéticas que focalicen los haces electrónicos.

La Espectroscopía surgió como técnica (Espectroscopía infrarroja) en la segunda mitad del siglo XIX (Bunsen, Kirchhoff) para identificar señales de grupos atómicos específicos en moléculas, como huellas dactilares de los mismos, mientras que la Difracción de Rayos X sirvió para identificar la presencia de Rayos X (Roengen, 1895) y luego se comenzó a usar como método de identificación de estructuras (Difracción de

Laue, 1912 y Bragg, 1913). La Difracción de electrones, tras los experimentos de Davisson y Germer (1927), dio origen a la Microscopía electrónica en los años 30 del siglo pasado (E. Ruska, 1932).

Los primeros juegos con la variable tiempo en el seguimiento de objetos microscópicos comenzaron con el estudio sistemático del movimiento browniano mediante microscopios (ultramicroscopios de Zsigmondi, 1903), así como en la espectroscopía de fluorescencia de sistemas que presentan pulsaciones cuánticas, descubiertas al inicio del establecimiento de la Mecánica Cuántica (Heisenberg, 1927).

Los dispositivos de detección óptica (cámaras digitales CCD-charge coupled devices-, películas fotosensibles, ojo humano, etc.) no pueden medir la fase de

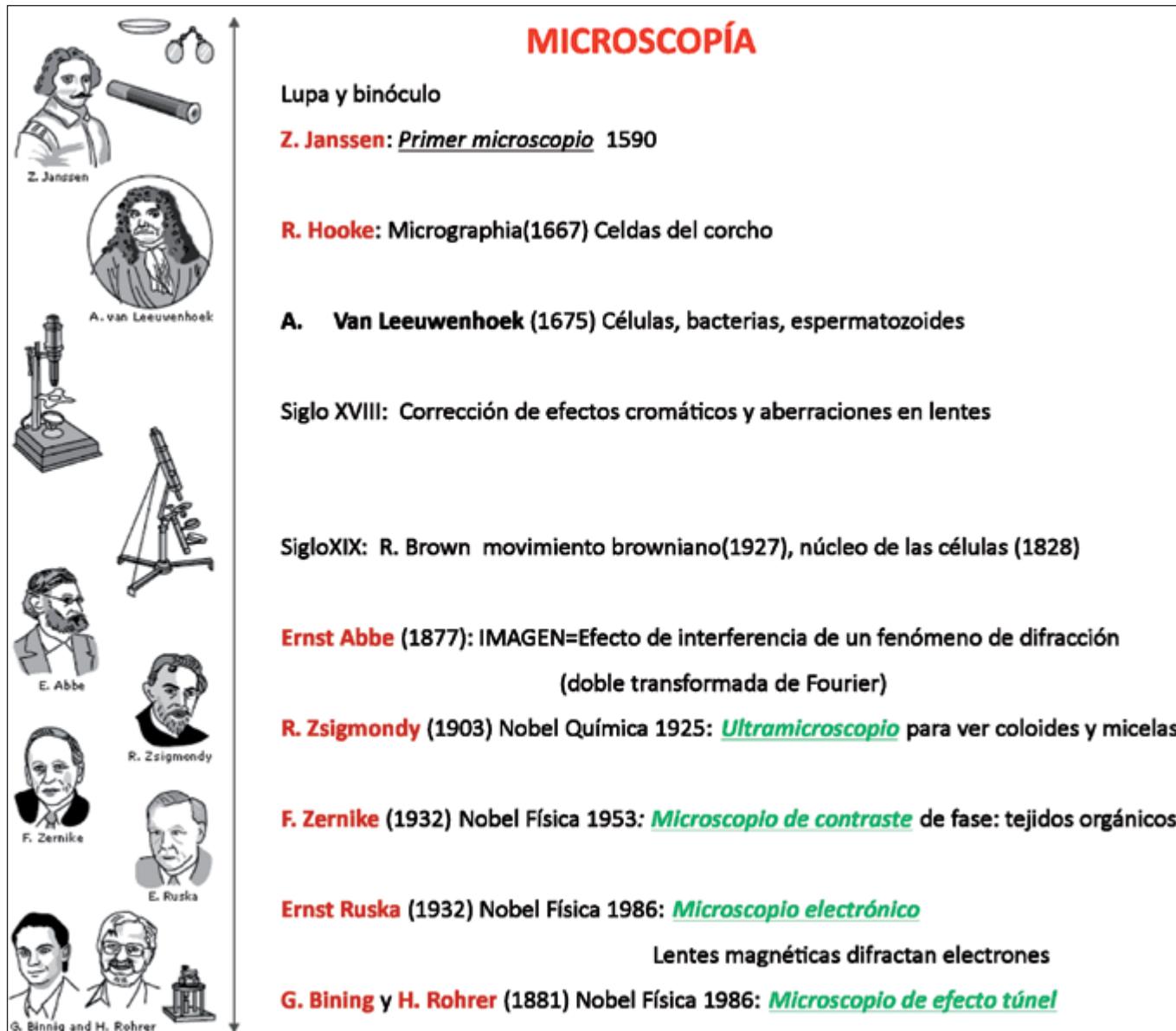


Figura 2. Avances históricos de la Microscopía.

la luz, debido a que se basan en convertir fotones en corriente de electrones, con lo cual no se conserva la fase, debido a que el campo electromagnético oscila a frecuencias de 10^{15} Hz que los electrones no pueden seguir. La recuperación de la fase es posible, sin embargo, mediante técnicas algorítmicas de imagen (6).

Casi todo lo que conocíamos hasta hace bien poco del mundo microscópico se había obtenido por Microscopía, donde la resolución Δr viene dada, según el criterio de Rayleigh por $\Delta r = \lambda/2AN$, donde λ es la

longitud de onda de la luz y AN la apertura numérica, con $AN = n \sin \alpha$, siendo n el índice de refracción y α el ángulo de apertura de la lente. Un breve resumen de la evolución óptica del microscopio, desde su generalización de uso a finales del siglo XVI, sin combinarlo con la Espectroscopía, es como sigue. En los años 30 del siglo pasado F. Zernike descubrió el *microscopio de contraste de fase*, basado en el hecho de que las luces directa y difractada están en diferente fase, pudiendo usarse este hecho para obtener información sobre el objeto, facilitando la visualización de objetos trans-

parentes sin necesidad de tinciones (muy usadas estas últimas, como sabemos, por Golgi y Cajal). Posteriormente los *microscopios confocales* (desde 1961) permiten aumentar la resolución usando una iluminación puntual y un pequeño agujero para eliminar la luz fuera de foco, en especímenes que son más gruesos que el plano focal, es decir estos microscopios impiden que los fotones fuera de foco alcancen el detector, y además permiten resolver estructuras en 3D (ver **Figura 2**).

La Difracción de Rayos X permite resoluciones en la escala interatómica d en cristales ($2ds\sin\alpha=n\lambda$), con lo cual, al ser $\lambda \approx d$, esta técnica viene a ser “el dorado” de las técnicas de análisis en Dinámica Estructural, aunque no es posible construir un microscopio de Rayos X con lentes. La difracción de electrones se convierte en Microscopía electrónica, usando lentes magnéticas que difractan los electrones, aunque la resolución es menor debido al efecto carga-espacio originado por su naturaleza fermiónica, y además tiene poco poder de penetración (gran sección eficaz en su interacción con los núcleos atómicos) (ver **Figura 3**). Se suele admitir que la primera observación al microscopio de átomos individuales fue realizada por E. Miller en 1956 usando un microscopio de campo iónico que detectaba la ionización de gases en la superficie de un metal. Por otra parte, H. Grewe en 1970 fue el primero en detectar átomos individuales mediante microscopía electrónica.

La obtención de la imagen en difracción a través de la recuperación de la fase, permite superar el límite de resolución de Abbe o Rayleigh, lo que se llama superresolución, que exige la coherencia de fase. Este método, del que se habla más adelante, se llama de Imagen difractiva coherente de Rayos X (XCDI, X Ray Coherent Diffractive Imaging).

También son técnicas difractométricas tanto la Espectrometría de masas (difracción de iones) como la Difracción de neutrones. En la primera, en sus dos variantes SIMS y MALDI, se producen imágenes ionizando un punto cambiante de la superficie de una muestra. En la técnica SIMS (secondary ion mass spectrometry) se obtiene información sobre la distribución espacial de elementos y compuestos de bajo peso molecular, así como de la estructura molecular de estos últimos. La técnica MALDI (matrix assisted laser desorption/ionization) da información espacial sobre compuestos de alto peso molecular (proteínas,

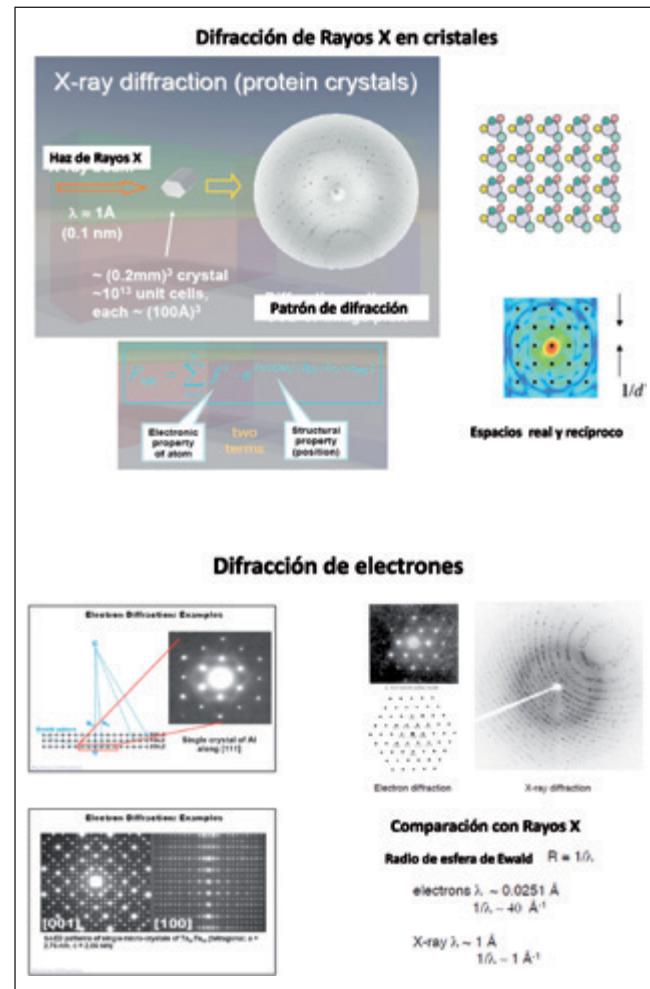


Figura 3. Comparación de las difracciones de Rayos X y electrones.

péptidos) incluyendo su distribución en tejidos, así como información de sus estructuras moleculares. En experimentos de Difracción de neutrones se usan generalmente neutrones térmicos ($\lambda=1.5 \text{ \AA}$) con un haz muy ancho que se debe colimar. Los neutrones, al no tener carga, no son difractados por los electrones sino por los núcleos, y se usan en estudios de la estructura de líquidos poliatómicos, siendo también sensibles al espín nuclear.

12. Características de las nuevas técnicas de imagen en Dinámica Estructural

Hemos visto la importancia de la imagen en la descripción y seguimiento de los procesos a escala nanoscópica. De las tres técnicas generales, tanto la

Microscopía como la Difracción pueden dar imágenes directas, mientras que no ocurre lo mismo con la Espectroscopía, aunque, como veremos, se puede recuperar la imagen de manera indirecta mediante la pixelización (de pixel, acrónimo de picture element) del espacio de la muestra. Las características más salientes de las nuevas técnicas son: La coherencia en fase (longitudinal y transversal) del haz, la estroboscopía temporal (proceso de bombeo seguido de otro de prueba) y el régimen no lineal (presencia de varias partículas del haz interaccionante) del proceso.

La *coherencia longitudinal* (1) (o longitud de coherencia) viene asociada al cambio de la fase del movimiento de manera predecible al pasar por un punto fijo del espacio y está relacionada con el recorrido libre medio de las partículas del haz. Lleva asociado un tiempo de coherencia, dado por el cociente entre la longitud de coherencia y la velocidad de la luz o de los electrones. La resolución longitudinal que se consigue en microscopía electrónica puede llegar a 10^{-10} m, mientras que el microscopio óptico alcanza 10^{-7} m y el ojo humano 10^{-4} m.

Se define también una *coherencia transversal* o angular (o lateral) que da el mantenimiento de la fase en función del ángulo de dispersión del haz, lo cual es un requerimiento muy exigente y difícil de lograr. En medidas de Dinámica estructural es conveniente que la coherencia transversal abarque a toda la celdilla unidad. La coherencia transversal, d_t , en electrones se determina como $d_t = \lambda/(a/R)$, donde λ es la longitud de onda de De Broglie y a/R el ángulo (a es la distancia entre rendijas y R la distancia de la fuente a la muestra). De esta forma el volumen de coherencia V_c , viene dado por el producto de d_t^2 por $v_g \Delta t$, con v_g la velocidad de grupo, es decir $V_c = d_t^2 v_g (\hbar/\Delta E)$, con lo cual

$$V_c = \lambda^2/(a/R)^2 \cdot v_g (\hbar/\Delta E)$$

El tamaño del volumen de coherencia es del orden de 10^6 nm³ (100 nm de arista) para microscopios electrónicos de 100-200 KeV, tamaño que resulta mayor que el de las celdas unidad cristalográficas en muchos casos.

Por otra parte, la revolución en Femtoquímica (A. Zewail, Nobel de Química 1999) dentro de la Espectroscopía resuelta en el tiempo, ha popularizado las téc-

nicas estroboscópicas de bombeo y sonda (pump-probe techniques) donde se define un retardo (delay) entre el tiempo de excitación de la muestra, que se supone instantáneo y el de prueba, midiéndose así la evolución de la muestra en el estado o situación excitada. De esta forma, cambiando los retardos, puede seguirse la cronoscopía de procesos, no sólo en moléculas aisladas, sino en la materia dura (sólidos, superficies) y en la blanda (biopolímeros, clusters, etc.).

La necesidad de estudiar procesos muy finos, de baja sección eficaz, ha llevado a la necesidad de emplear fuentes de excitación muy intensas, lo que exige trabajar con más de un fotón o electrón, es decir, se debe actuar en condiciones láser o de fuentes de electrones de centenas de KeV. Estamos así en el régimen no lineal, con sus nuevas leyes de combinación.

En los métodos de Difracción hay que distinguir entre los modos de transmisión y de escaneo (1). En el modo de transmisión la fuente es extendida y se focaliza sobre el objeto antes que la segunda lente magnifique y forme la imagen, mientras que en el de escaneo, la fuente es puntual y la lente está situada antes del objeto, el cual es focalizado sucesivamente en sus partes. El esquema de ambos modos es geométricamente inverso el uno del otro. El modo de transmisión da mejor resolución, pero el escaneo permite obtener una imagen global y de mayor profundidad.

La organización de esta comunicación es la siguiente. En el Apartado II se describe la convergencia y generalización de las técnicas de imagen, como combinación de Microscopía, Espectroscopía y Difracción. A continuación en el Apartado III se fundamentan las técnicas resueltas en el tiempo, técnicas de pulsos, para estudiar la dinámica nanoscópica de las estructuras de las fases condensadas, así como, en particular, los avances logrados para superar las barreras de resolución de 50 ps en pulsos de Rayos X obtenidos en equipos sincrotrón y de 1ps en difracción electrónica usando cámaras rápidas convencionales (streak CCD cameras). En el Apartado IV se dará una breve descripción de los avances en el desvelamiento de procesos de Dinámica Estructural en Cristalografía, Biología, transiciones de fase, etc. Finalmente se mencionarán los retos a que se enfrentan estas técnicas, así como las conexiones con otros desarrollos paralelos en Dinámica Cuántica ultrarrápida.

II. CONVERGENCIA Y GENERALIZACIÓN DE LAS ACTUALES TÉCNICAS DE IMAGEN

Tratamos aquí de la desaparición de fronteras entre Espectroscopía, Microscopía y Difracción. En principio, las tres técnicas son netamente diferentes. La Microscopía da directamente la imagen, que implica una difracción seguida de una interferencia, lo cual exige la coherencia en fase de las ondas de luz. En Difracción (de rayos X y electrones) se obtiene una medida directa de la función de distribución radial del espaciado interatómico (densidad electrónica en el caso de Rayos x, función de distribución de los núcleos atómicos en difracción electrónica) la cual se consigue mediante la transformada de Fourier de momentos (espacio recíproco) y coordenadas de las amplitudes de rayos X o electrones difractados. Es, como si dijéramos, la primera parte de la Microscopía: Queda la segunda parte, la interferencia, es decir, el problema de las fases que da origen, precisamente por esa interferencia, a la imagen, lo cual no puede lograrse en Rayos X dada la imposibilidad de construir una lente o un espejo que refleje esos rayos, debido a su pequeña longitud de onda y al calor almacenado en el material de la lente o espejo. En Microscopía electrónica se puede pasar de la difracción a la imagen mediante la introducción de lentes magnéticas (campos magnéticos que difractan los electrones). La proyección directa del factor de estructura en el espacio Fourier viene dada por la esfera de Ewald, cuyo radio es proporcional al inverso de la longitud de onda $1/\lambda$ (en rayos X es del orden de 1 Å^{-1} , mientras que en electrones es unos 40 Å^{-1}) lográndose por tanto una mayor resolución con electrones. Por otra parte, se ha indicado que la Espectroscopía trabaja en el dominio temporal o de frecuencias y no da imágenes directas de los procesos estudiados. (**Figura 3**).

a. Combinación de Microscopía con Espectroscopía: Microscopías de fluorescencia, bifotónica y superresolución

Los avances en Microscopía se basaron al principio en incrementar el contraste, manteniendo una alta resolución, lo que se consigue controlando la calidad y cantidad de luz de iluminación mediante el diafragma de apertura que está situado en el plano focal de la lente condensadora (cuando se usa la

iluminación tipo Köhler). En los *ultramicroscopios* (Zsigmondi, 1903) los rayos de iluminación emergen del condensador con un ángulo de 90° respecto al eje óptico, lo que permite detectar partículas del tamaño de 4 nm. Posteriormente A. Köhler en 1904 construyó el primer *microscopio ultravioleta*, sacando partido del hecho que algunos objetos emiten luz de mayor longitud de onda (fluorescencia) tras iluminarlos con luz ultravioleta. Las dificultades radican en conseguir concentrar suficiente luz sobre la muestra y a continuación captar la luz fluorescente emitida, libre de ruido. Estaban, por tanto, usando la Espectroscopía óptica conocida. Otro avance consistió en detectar la transferencia de energía resonante Förster o de fluorescencia (FRET, Förster resonance energy transfer) que permite detectar la fluorescencia de la excitación electrónica transmitida entre un donador fluoróforo y un acceptor cromóforo, lo cual sigue la dependencia con el inverso de la sexta potencia de la distancia entre acceptor y donador, y, de esta manera, se consigue tener información de esta distancia inter o intramolecular entre partes señaladas de un complejo biológico (*Microscopía de fluorescencia*).

El avance más significativo en Microscopía se logró en los años 90 del siglo pasado con la excitación de dos fotones (*Microscopía de dos fotones o bifotónica*) donde un intenso rayo láser de longitud de onda fija (método mode locking) se focaliza sobre la muestra, logrando que los fluoróforos se exciten por absorción de dos fotones al realizar un escaneo con ese láser. Esta técnica ha revolucionado la Biología permitiendo imágenes a tiempos largos de preparados vivos de tejidos (neuronas y cromosomas en células vivas, etc.). Incluso se logran mejores resultados combinando esta técnica con la confocal, tal como hace Rafael Yuste en la Universidad de Columbia, N.Y. (10).

Un aspecto importante de todas las técnicas en Microscópica es la mejora de la resolución. Actualmente se supera fácilmente el límite de Abbe o Rayleigh, lo que se llama *superresolución*, generalmente en *Microscopía de fluorescencia* de campo lejano (11). Existen varios métodos de lograr esta mejora, unos basados en óptica no lineal, como el método STED (stimulated emission depletion) puesto a punto por Stefan Hell en 1994, y otros en métodos estocásticos de molécula individual, como los métodos PALM (photoactivated location depletion) introducido por E. Betzig y

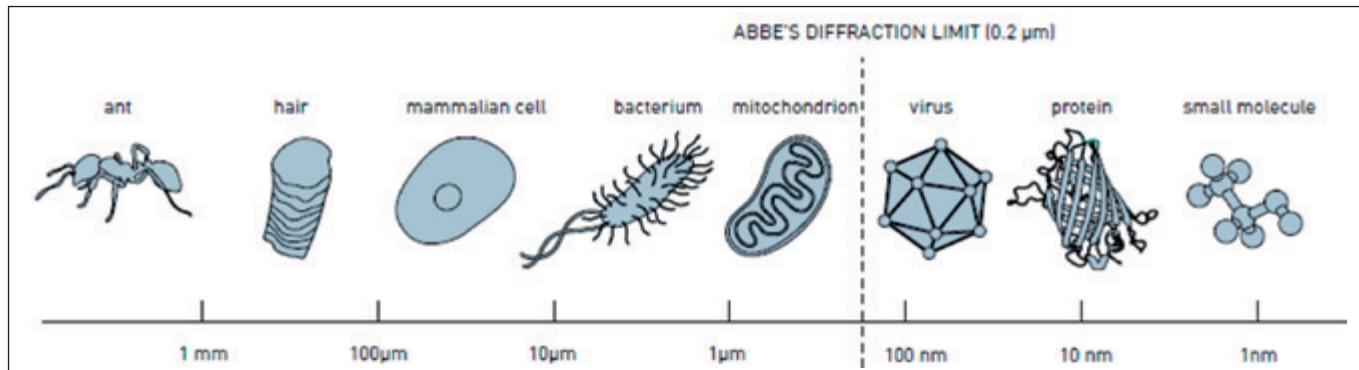


Figura 4. Límite de difracción de Abbe ($0.2 \mu\text{m}$) y tamaño de objetos. Con superresolución se alcanza el tamaño de las proteínas.

STORM (stochastic optical reconstruction microscopy) presentado independientemente por Zhuang y por Hess. En el método no lineal STED la resolución que se alcanza viene dada como $\Delta r = \lambda / (2n \sin \alpha \sqrt{1 + I_{\text{STED}}/I_s})$, donde I_{STED} e I_s son las intensidades a ángulos cero y de saturación. En los métodos estocásticos se echa mano del teorema del límite central y la resolución es $\Delta r = \Delta r_0 / \sqrt{N}$, donde N es el número de fotones detectados en la muestra, es decir el límite de Abbe mejora en el factor $1/\sqrt{N}$. Las resoluciones que se logran en estos microscopios, alcanzan las decenas de nm, es decir, llegan hasta el tamaño de las proteínas (ver **Figura 4**). Precisamente el Premio Nobel de Química de 2014 ha sido concedido al desarrollo de la *microscopía de fluorescencia por superresolución*. En concreto a S. Hell por el método STED y a E. Betzig y W. Moerner por la microscopía de moléculas individuales (Moerner fue el primero en detectar fluorescencia de una molécula individual en 1989 y Betzig puso a punto el método PALM).

b. Combinación de Difracción con Microscopía. Imágenes sin lentes

Modernamente se puede hablar de imágenes sin lentes en el método de difracción de Rayos X coherente (CXDI, coherent XRay diffraction imaging) pudiéndose recuperar la fase echando mano de la teoría de información de Shannon, mediante un algoritmo interactivo, que extrae la información sobre la fase, muestreando adecuadamente los patrones de difracción como patrones continuos de muestras no periódicas (6).

c. Espectroscopía de imagen

En Espectroscopía óptica la variación del momento dipolar $\Delta \mu$ de la molécula provoca una interacción con el campo electromagnético E , $\Delta E = \Delta \mu \cdot E$ en un tiempo T (inverso de la frecuencia de Rabi, $\Omega = \Delta \mu \cdot E / \hbar$) que origina una absorción o emisión de magnitud correspondiente a un desnivel entre estados cuánticos i y j , es decir $\Delta E = \hbar \omega_{ij}$. En Espectroscopía no se puede hablar de imagen en el tiempo real, dado que, para modificar espacialmente las propiedades de la molécula, sólo puede modificarse el campo externo y éste lo hace en el dominio temporal o de frecuencias y no lo hace en el momento dipolar, el cual no puede modificarse por parte del experimentador (excepto indirectamente a campos muy intensos). Además, como es bien sabido en Espectroscopía, no se conserva la fase (no hay coherencia de fase) de la amplitud ni de las funciones propias mecanocuánticas, y, por tanto, no se pueden obtener directamente ni los patrones de difracción, ni las imágenes. Sin embargo, desde 1949, se puede resolver espacialmente el espectro de frecuencias de una muestra mediante la proyección geométrica de píxeles (8). El método original consistió en localizar espacialmente las especies químicas de cada zona (pixel) de la muestra, usando la Espectroscopía Infrarroja. El método es doble. Por una parte, con una cámara digital (o webcam) se recogen imágenes de cortes pixelados en un rango amplio de longitudes de onda ópticas, es decir, se obtiene una serie de espectros resueltos espacialmente (llamados píxeles), y por otra, se coleccionan imágenes individualizadas por cada valor o rango estrecho de longitudes de onda, dando una colección de imágenes resueltas espectralmente (llamados planos

PASO DE ESPECTROSCOPIA A IMAGEN. Proyección geométrica de píxeles

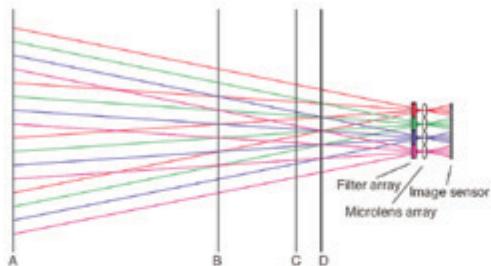
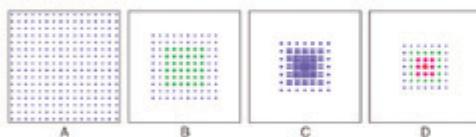


Fig. 4. Schematic diagram of multispectral image capturing.



R. Barer, R. H. Coler, H. W. Thompson: **Nature** 163, 198 (1945)

Idea de localizar espacialmente mediante píxeles las especies químicas de cada zona, usando la Espectroscopía Infrarroja.

Los colores de cada zona son asignados arbitrariamente.

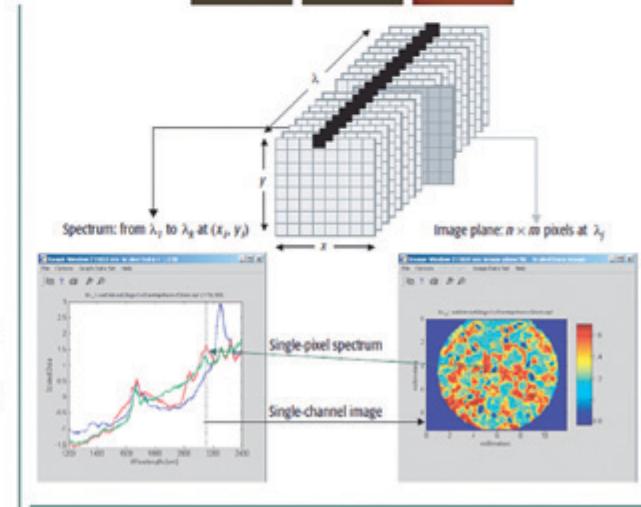
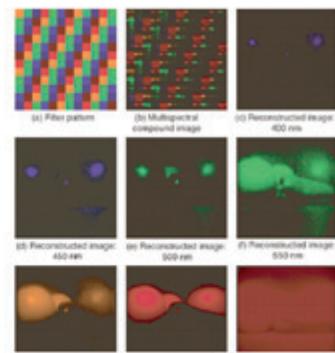


Figura 5. Espectroscopía IR resuelta espacialmente mediante pixelización.

imagen o canales). El objetivo último es generar un contraste químico altamente específico en una imagen, con el fin de visualizar e identificar la heterogeneidad química espacial en la muestra (ver **Figura 5**).

En trabajos fotográficos se obtiene una alta resolución de imagen usando cámaras CCD (charge coupled device) origen de la fotografía digital, tal como descubrieron Boyle y Smith en 1969 en el laboratorio de la Compañía Bell, que fueron un avance respecto al uso de semiconductores CMOS (complementary metal oxide semiconductor). En estas cámaras digitales, los electrones se transforman en fotones, que a su vez se convierten en fotoelectrones (9). Este doble proceso acarrea una cierta incompatibilidad en los requerimientos experimentales de procesos rápidos, dado que los electrones se mueven más lentamente que los fotones, y por lo tanto actualmente se usan sensores que detectan electrones directamente.

d. Espectroscopía de absorción de Rayos X

La Espectroscopía de absorción de Rayos X no es una técnica difractómetrica. Los espectros vienen caracterizados por bordes de absorción debidas a la excitación de electrones del core hasta el umbral de ionización, lo que da lugar a una fina estructura en la parte de baja energía (XANES, X ray absorption near-edge structure) y en la región de energía alta, a decenas o centenas de eV por encima del borde de absorción (EXAFS, extended X ray absorption fine structure). Estas características son debidas a efectos de interferencia de las ondas fotoelectrónicas salientes y rebotantes entre vecinos, y reflejan, por tanto, la naturaleza y estructura de los enlaces y los números de coordinación. Específico de estas técnicas es la información que se obtiene sobre la estructura electrónica del átomo estudiado, así como del medio local y por tanto de la dinámica estructural ultrarrápida a cortas

distancias. También puede emplearse con líquidos y medios amorfos, algo muy importante en Química, pero que no es fácil de conseguir mediante difracción.

e. Microscopía de campo cercano con Espectroscopía óptica

La primera generación de microscopios de campo cercano (STM-scanning tunneling microscope, 1981; AFM-atomic force microscope, 1986) estuvo basada en la detección de electrones por efecto túnel, mientras que los microscopios de campo cercano en general se basan en la detección de fotones no radiativos, tales como el microscopio óptico de campo cercano por escaneo (SNOM-scanning near field optical microscope).

Si ahora se introduce un campo externo láser (en IR por ejemplo) sobre una nanoestructura o superficie de un sólido, se puede estudiar la deformación producida mediante un microscopio de campo cercano (AFM) que actúa sobre la misma (ver **Figura 6**). Pueden así estudiarse efectos de transferencia de energía resonante Förster, experimentos de espectroscopía de absorción óptica o de IR, etc. (12).

Recientemente Zewail (13) ha desarrollado una nueva técnica que combina los principios de la luz convencional (láser) con la microscopía electrónica de campo cercano, logrando imágenes con resolución temporal de femtosegundos y espacial de nanómetros. Esta técnica llamada PINEM (photon induced near field electron microscopy) está especialmente diseñada para proyectar imágenes magnificadas de nanostructu-

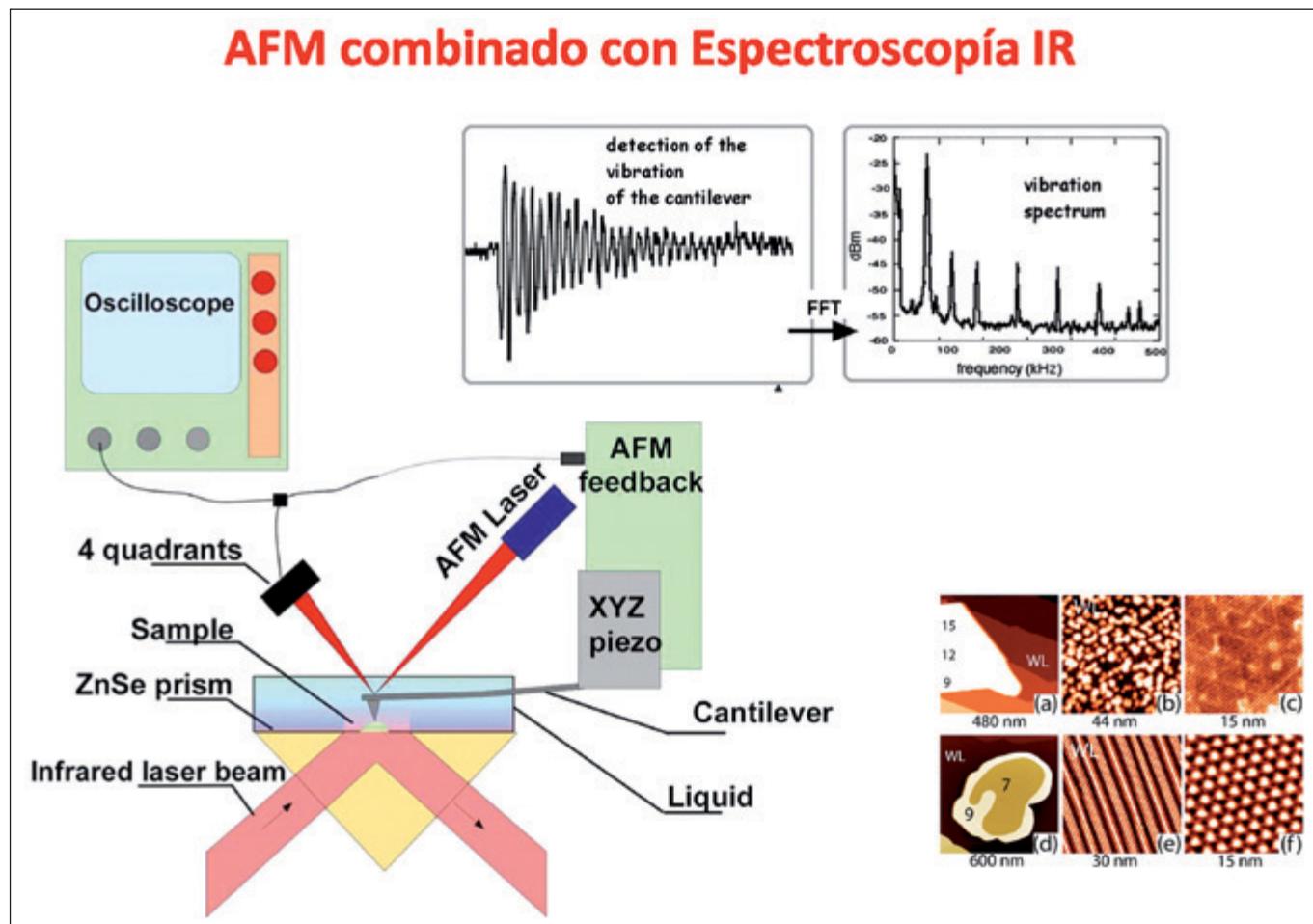


Figura 6. Esquema de un microscopio de fuerza atómica (AFM) con Espectroscopía IR.

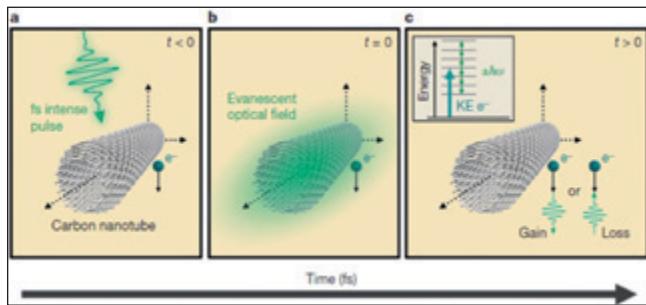


Figura 7. Interacción entre el electrón, el fotón y el campo evanescente (A. Zewail).

ras. El microscopio de campo cercano selecciona los electrones que han tenido una ganancia de energía, formando imágenes en un proceso que retiene la resolución espacial característica de la microscopía electrónica de transmisión. La parte fotónica, que produce la interacción electrón-luz durante un pequeño intervalo de tiempo, requiere campos de luz intensos, lo cual se logra usando dos pulsos de luz de femtosegundo sincronizados: El primero se dirige al disparador de electrones del microscopio, que origina un pulso de electrones por fotoemisión, mientras que el segundo, con intensidad entre 10-100 GW/cm² se enfoca sobre la nanoestructura, lo cual provoca la emisión (o absorción) multifotónica (hasta 8 fotones) por cada electrón que pasa. Los pulsos láser tienen una duración de unos pocos centenares de fs (resolución temporal) y el retraso se controla mediante diferencia de caminos ópticos (ver **Figura 7**).

III. NUEVOS AVANCES EN EL DISEÑO DE TÉCNICAS DE IMAGEN ULTRARRÁPIDA EN DINÁMICA ESTRUCTURAL

Como hemos indicado, introducir la variable tiempo supone emplear el método estroboscópico (o a veces el holográfico) con dos pulsos de luz o uno de luz y otro electrónico, lo cual implica instrumentos con una geometría única (deben confluir los dos haces sobre la muestra) para lograr resoluciones no sólo espaciales (del orden del nm como hemos visto) sino temporales (entre ps y fs, o incluso de attosegundos). En parte ya tratamos en una comunicación anterior (1) de estas técnicas. Aquí insistiremos en los avances en resolución temporal y en las ideas para mejorar el diseño de equipos.

La variable tiempo es la magnitud conocida con mayor precisión, lo que se consigue a través de las técnicas de peine de frecuencias (T. Hänsch, J. Hall, Nobel de Física 2005). Por otra parte, los láseres ultrarrápidos pulsados, fueron un resultado temprano de la óptica no lineal, la cual ya se conoció en el siglo XIX, con la aparición del efecto Kerr (1875). Los avances sucesivos en láseres pulsados han incluido los métodos: Q-switching, mode locking de C. Shank (1981) y W. Sibbet (1991), CPA-chirped pulse amplification de G. Mourou (1985), Femtoquímica de Zewail (1987) y peines de frecuencia (optical frequency comb de J. Hall y Hänsch).

La fotografía basada en el método estroboscópico (E. Muybridge, 1872; Edgerton, 1934) permite seguir el movimiento de un objeto mediante disparos de flash muy rápidos y seguidos, donde el tiempo de apertura τ del obturador es igual a la resolución espacial Δr dividida por la velocidad v del objeto, $\tau = \Delta r/v$. Para seguir el movimiento de los átomos hay que recordar que su velocidad viene dada por la velocidad del sonido en el medio y la resolución espacial exigida en estudios nanoscópicos está también dada por el tamaño del átomo $\approx 1\text{\AA}$, por lo tanto, el tiempo τ entre disparos será $\tau = 10^{-10} \text{ m}/10^3 \text{ m/s} = 10^{-13} \text{ s} = 100 \text{ fs}$. También la Teoría del Estado de Transición en Cinética Química da un tiempo similar, que es el inverso de la frecuencia $k_B T/\hbar = 10^{13} \text{ s}^{-1}$. Fotografiar un átomo no puede hacerse directamente no sólo porque la resolución espacial (incluso la superresolución) aún no ha logrado llegar al Ångstrom, sino porque debido al principio de incertidumbre la interacción partícula excitante (fotón, electrón) con el átomo modifica el estado cuántico de este, produciendo una imprecisión en momento y posición. No obstante, combinando los principios de incertidumbre momento-posición y energía-tiempo se llega a la expresión $\Delta x = (p/m)\Delta t$, que relaciona las incertidumbres espacial Δx y temporal Δt del paquete de ondas, donde se consigue una localización del paquete de ondas de la partícula Δx , a pesar de una gran imprecisión en la energía ($\Delta E = (p/m)\Delta p$). Así, a un pulso de 50-100 fs le corresponde una $\Delta E = 100-50 \text{ cm}^{-1}$. Se debe trabajar, por tanto, con las velocidades de fase y grupo del paquete mecanocuántico de la partícula y con su modificación instantánea en la perturbación. El método estroboscópico emplea no sólo átomos o partículas distintas en cada proceso de bombeo y prueba de interacción (procesos separa-

dos por retardos temporales) sino colectivos distintos (grupos de partículas contenido del orden de 10^8 individuos) que pueden tener, sin embargo, la misma coherencia. Esto es lo que se hace en Femtoquímica (14). Es decir, un colectivo coherente de partículas y caracterizado por una velocidad de grupo, se excita coherentemente a un estado nuevo, que, después de un cierto retardo, se prueba por otro pulso láser, obteniéndose así un punto dinámico (un estado del sistema a un cierto tiempo Δt_1). A continuación con otro colectivo equivalente se hace lo mismo, pero con distinto retardo Δt_2 , y así sucesivamente hasta obtener una trayectoria dinámica de la partícula.

En los estudios por difracción de la Dinámica Estructural, no se cambia a veces el material entre pares de disparos, permitiéndose que se disipe la interacción (calor) sobretodo con Rayos X (los electrones no penetran el material). El principal reto de la Ciencia Estructural ultrarrápida es obtener pulsos ultracortos de las partículas excitantes (fotones, electrones) con una longitud de onda adecuada para poder interferir con la estructura atómica del material (sustancia dura, blanda, superficie) estudiado.

Un problema básico en los estudios temporales es lograr pulsos intensos y muy estrechos. Como hemos indicado los pulsos láser logrados mediante mode-locking (como el láser de estado sólido Ti-Zafiro de Sibbet, 1991) pueden agudizarse mediante la técnica de amplificación de barrido de frecuencias (CPA-chirp pulse amplification de Mourou 1985) (15). En el caso de difracción de electrones, la anchura se mide con cámaras digitales (fast streak cameras) dando resolución en picosegundos (5).

Desde el punto de vista del diseño técnico, es importante poder definir el *tiempo cero* y la *longitud del pulso* para la observación del movimiento estudiado. El *tiempo cero* en Rayos X se mide por el solapamiento de pulsos de bombeo y prueba (en Attofísica se puede llegar más lejos teniendo en cuenta la fase del grupo envolvente CEP-carrier envelope phase) mediante la función de correlación temporal $I(t)=\int E^*(\omega,t)E(\omega,t)d\omega$, donde $E(\omega,t)=E_0(t)\exp(i\omega_L t+\varphi(t))$, siendo φ la función de fase. En cuanto a la *longitud del pulso* se puede llegar, como hemos dicho a tiempos de aproximadamente 100 fs.

III.1 Desarrollo de nuevas técnicas de difracción de Rayos X (5, 17)

Las fuentes sincrotrón (tercera generación de fuentes de luz) proporcionan un flujo de Rayos X con longitud de onda sintonizable y resolución temporal del orden de 100 ps. De esta forma, se han detectado intermedios de reacción, cambios conformacionales lentes y reordenaciones cristalinas de largo alcance. Sin embargo, con el almacenaje de electrones en sincrotrones de tercera generación, estamos a tres órdenes de magnitud por encima del requerimiento de longitud de pulso de rayos X (100 fs) para observar átomos en movimiento. Mediante la técnica de cortes del paquete electrónico realizada con un pulso láser de fs (slicing stored electron bunch) se puede seleccionar un paquete estrecho de electrones mediante un pulso láser de fs, que provoca un pulso de Rayos X también estrecho, aunque de poca intensidad o brillo, similar a los dispositivos convencionales de mesa con formación de plasmas (18).

Con la llegada de los láseres de electrones libres (cuarta generación de fuentes de luz), que producen rayos X duros (XFEL- X ray free electron lasers) basados en aceleradores lineales como los disponibles en USA (LINAC SLAC de Stanford, Berkeley, Brookhaven, etc.) Japón (SCSS- Spring 8 Compact Sase Source) y Europa (FELSH de DESY en Hamburgo, etc.) la intensidad de brillo de los rayos X se ha multiplicado por 10^9 con respecto a las fuentes de plasma o de corte y la duración del pulso está por debajo de los 100 fs (18).

Los dispositivos de mesa actuales también proporcionan pulsos de fs de rayos X mediante la formación del plasma del material (p.e. de Cu) cuando una muestra sólida se irradia con pulsos láser de fs, donde el poder de pico del láser de fs es mayor que 10^{16} W/cm². El mecanismo consiste en la generación de electrones libres que se aceleran de nuevo sobre la muestra mediante el altísimo campo del pulso óptico de fs. Como se sabe, la radiación de rayos X se origina por transición de electrones de capas externas atómicas a huecos del core del átomo en cuestión, provocando las líneas características (p.e. K _{α} , K _{β} en el caso del Cu). En la **Figura 8** se da el esquema de un equipo de fuente plasma de rayos X de fs en vacío, donde aparecen los dos haces, el de bombeo del láser y el de rayos X. La superficie de la muestra sufre la ablación por formación

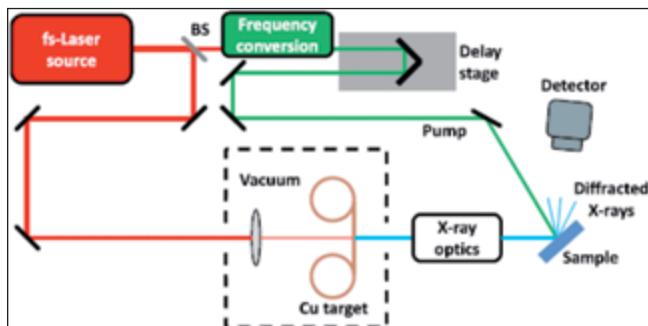


Figura 8. Esquema de diseño de equipo convencional de Difracción ultrarrápida de rayos X. Los dos haces de bombeo (láser de fs) y prueba (rayos X) se focalizan en ángulo sobre la muestra (ver ref.5).

del plasma y por tanto se debe desplazar ligeramente entre disparos consecutivos del láser. La longitud del pulso de rayos X depende de la duración del pulso láser y del tiempo de propagación de los electrones en la muestra. Este último factor para muestras de $\approx 10\mu\text{m}$ de espesor es despreciable y por tanto la longitud del pulso de rayos X es similar a la del pulso láser.

Para realizar estudios efectivos de rayos X con resolución temporal se requiere una intensidad de más de 10^8 fotones/estereoradián² y es muy deseable un brillo de fuente de $10^9\text{-}10^{11}$ fotones/estereoradián². El poder del pico del láser sobre la muestra viene a ser $\approx 10^{18}\text{ W/cm}^2$, unas 5 órdenes de magnitud mayor que el umbral para la formación de plasma en muestras materiales.

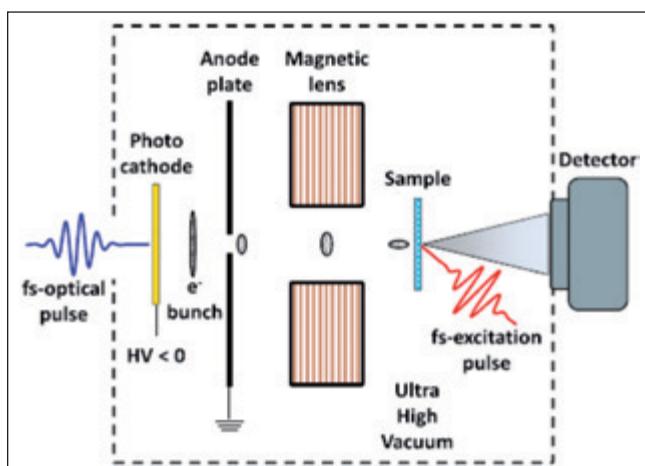


Figura 9. Esquema de un equipo convencional de difracción ultrarrápida de electrones. Los dos haces (laser y electrones) inciden en diferente ángulo sobre la muestra (ver ref.5).

Existen, por otra parte, serias limitaciones para la longitud de coherencia en los láseres de electrones libres, más en la coherencia transversal que en la longitudinal, aunque incluso en esta última no se superan los 50 nm. La duración del pulso de rayos X es el parámetro más crítico en Difracción y Espectroscopía de Rayos X y no se puede caracterizar con cámaras digitales convencionales, dado que con ellas no se obtienen resoluciones por debajo de unos pocos picosegundos, necesitándose otros métodos (indirectos) muy sofisticados.

III 2. Desarrollo de nuevas técnicas de difracción de electrones (5, 19, 20)

Los aparatos de difracción de electrones en fs son equipos estándar tipo DTEM (dynamic transmission electron microscopy) de mesa, constituidos por photocátodo con campos eléctricos DC o AC fuertes, lentes magnéticas para colimar y focalizar el haz electrónico, y detectores extendidos para recoger los patrones de difracción. Se da un esquema en las **Figuras 9** y **10**. Los electrones se emiten por efecto fotoeléctrico a partir de una película de Au de unos 20 nm de espesor. El photocátodo se mantiene a un alto voltaje negativo (entre 30-100 KV) y la distancia al ánodo es la adecuada para dar un campo eléctrico DC de unos 10^7 V/m . El haz electrónico se acelera y colima, mediante lentes magnéticas, antes del scattering con la muestra, para producir luego un patrón de difrac-

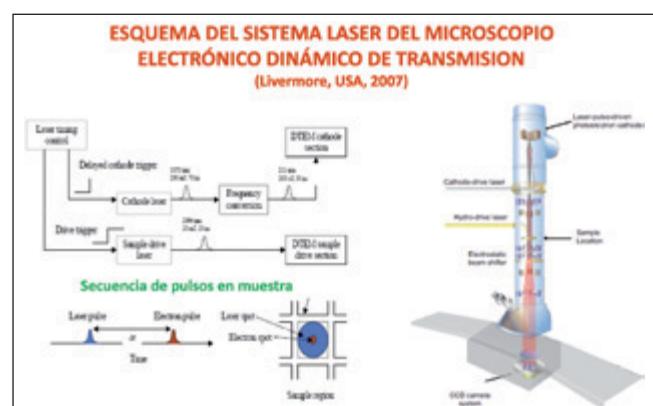


Figura 10. Izda: Diagrama secuencial de los pulsos láser y electrónicos, mostrando la focalización de cada uno. Decha: Detalle de un equipo convencional de difracción electrónica dinámica de transmisión.

ción en un pantalla de fósforo. Los electrones, ser fermiones cargados, se repelen provocando un fuerte efecto espacio-carga, lo que conduce a un ensanchamiento del pulso electrónico, lo cual es un factor muy limitante. Este efecto espacio-carga se puede reducir trabajando en condiciones de baja intensidad (en el límite de electrón único) o bien mediante fuentes compactas de electrones. En el primer método, existe una limitación técnica dado que se necesitan del orden de 10^5 - 10^6 electrones difractados para obtener un patrón de difracción razonable, lo que supone que la muestra tolere 10^6 fotones o que haya 10^6 muestras. Este ha sido el método seguido por A. Zewail, después de sus estudios en fase gas, para tratar muestras cristalinas usando además geometrías oblicuas (21) para sintonizar los haces de fotones (láser) y de electrones. En el segundo método, se usa una tendencia opuesta, es decir, en lugar de usar un único electrón se busca incrementar la intensidad del pulso, mediante un diseño de cañón electrónico compacto con pequeña distancia de propagación para asegurar una coherencia espacial transversal local, lográndose pulsos de 600 fs con 10^4 electrones por pulso. Con este diseño se logra que el pulso electrónico origine un barrido de frecuencia (chirp) extremadamente lineal, lo que hace que el pulso pueda comprimirse usando un elemento dispersivo lineal simple. Este es el método más usado hoy día, que ha sido puesto a punto por E. Miller (19), actualmente en el Instituto Structure and Dynamics of Matter del Max Planck de Hamburgo.

Debido a la naturaleza fermiónica de los electrones, hay además una limitación intrínseca para la coherencia espacial. Esta se define como la distancia máxima entre dos objetos para los que la interferencia es visible. La relación entre coherencia longitudinal L_z y transversal L_x viene dada por la relación $L_z = L_x(p/\Delta p)$, donde p es el momento y Δp su variación en la dirección transversal. La longitud de coherencia transversal viene dada en función de la λ de de Broglie ($\lambda = h/p$) según el principio de incertidumbre, es decir $L_x = \lambda p / (2\pi\Delta p) = h / (2\pi\Delta p)$.

La determinación de la longitud del pulso de electrones puede hacerse mediante una cámara digital con fotointerrupción, que transforma la longitud del pulso electrónico en dispersión espacial en la dirección del campo eléctrico (ver **Figura 11**). Otra manera de medir esa longitud es mediante la fuerza ponderomotriz

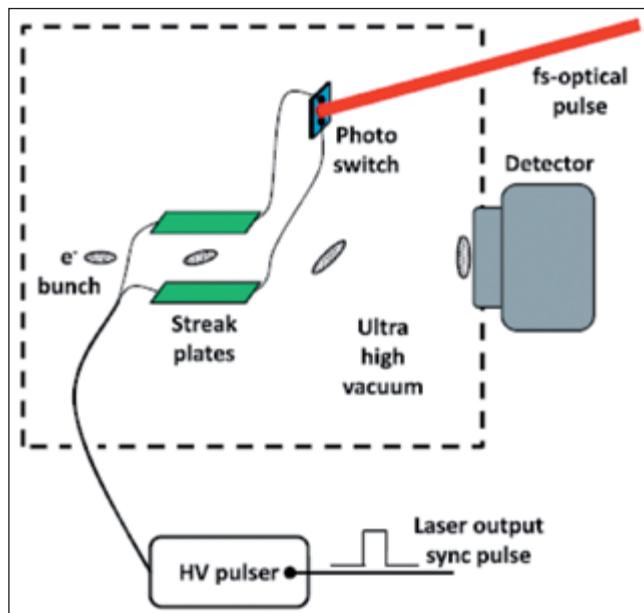


Figura 11. Cámara digital con fotointerrupción en microscopía electrónica. La longitud del pulso electrónico se transfiere como dispersión espacial en la dirección del campo eléctrico (ver ref. 5).

variable creada por el pulso láser sobre las distintas secciones del pulso electrónico, dando así un perfil temporal de este último.

III.3. Comparación de las técnicas de difracción de rayos X y electrones (22)

Ambas técnicas deben sincronizar los cambios estructurales de la muestra en estudio con un proceso fotoinducido (la luz es el movimiento más rápido) en el cual un pulso láser ultracorto que se lanza primero sobre la muestra, esté bien sincronizado con un segundo pulso de prueba estructural ultracorto (pulso de rayos X o de electrones) para poder así monitorizar y controlar el movimiento de los átomos. Generalmente los experimentos requieren excitar el 10% de las moléculas o celdas unidad para poder resolver la dinámica. A estos niveles de excitación, las moléculas están altamente perturbadas y no recuperan totalmente las condiciones iniciales, es decir, los efectos térmicos de los procesos no radiativos, y los intermedios de larga vida y los fotoproductos, alteran la composición de la muestra. Es el evento primero de excitación y no el de monitorización el

que hace que el proceso sea irreversible. Por tanto, debemos lograr que las fuentes de electrones o rayos X sean suficientemente intensas para obtener estructuras totales con resolución atómica. Además se debe trabajar lo más próximo posible en el tiempo al límite de disparo único (el retardo debe ser muy pequeño) o consecutivo para lograr una película de cinematógrafo; en caso contrario la cantidad de muestra requerida hace intratable el experimento.

Por otra parte, se requiere desarrollar fuentes con la combinación adecuada de altas resoluciones temporal (unos 100 fs) y espacial (orden del nm), así como también de suficiente intensidad para poder focalizar los movimientos atómicos.

La comparación de técnicas de difracción actuales se debe hacer en base a los siguientes conceptos: Sección eficaz de scattering, longitud de onda de las partículas, velocidad del haz, penetración en la muestra, daños a la misma, logística operativa, etc., que fueron resumidos en una comunicación anterior (1). Todavía hoy día los Rayos X siguen siendo “el dorado” de los estudios de difracción, aunque la Microscopía Electrónica va resolviendo muchos problemas, acercándose al modelo. Al ser los electrones partículas cargadas, su sección eficaz es aprox. 10^6 veces mayor que la de Rayos X, con la consiguiente disminución del poder de penetración y la ventaja de aplicación a moléculas y superficies y muestras de fino espesor. Por la misma razón, su divergencia es mayor y su coherencia menor (dada por el recorrido libre medio) y presentan un scattering múltiple. La resolución temporal es mayor con rayos X generalmente. No obstante, los electrones poseen ciertas ventajas en cuanto a focalización (con lentes magnéticas) pudiéndose lograr una resolución espacial mayor. Dado que, por otra parte, son las nubes electrónicas las que interfieren con los rayos x (los electrones interfieren con los núcleos atómicos), el fenómeno fototérmico (y/o posible daño de la muestra) se presenta más con Rayos X que con electrones, ya que éstos permiten o toleran la dosificación de carga y se acumula menos calor en la muestra. Finalmente, los equipos de difracción de electrones son técnicas convencionales de laboratorio, mientras que las fuentes de Rayos X exigen facilidades internacionales muy costosas (ver p.e. cuarta generación de XFEL en Hamburgo, que será operativa en 2015).

IV. AVANCES EN ESTUDIOS DE DIFRACCIÓN

Vamos a referirnos brevemente a experimentos en Dinámica Estructural resuelta en el tiempo, es decir a procesos generalmente en fase condensada (sólidos, superficies, líquidos) y estructuras químicas complejas (biomoléculas) más que a reacciones químicas de moléculas aisladas (14) de Femtoquímica propiamente dicha o a movimientos electrónicos (dinámica coherente de electrones) en moléculas, tales como la migración de carga, etc. (2, 23) en Attofísica y Attoquímica. Los patrones de difracción que se obtienen son, en esencia, transformadas de Fourier de la estructura molecular en el espacio del vector momento proyectado (espacio Fourier). Tradicionalmente se sigue admitiendo que la difracción de electrones es la técnica preferida para el estudio de superficies, mientras que los Rayos X lo son para biomoléculas (24, 25).

a. Química

Debemos recordar que los estudios en fase gas por difracción electrónica para la determinación de intermedios y fotoproductos de la reacción de dissociación del $C_2F_4I_2$, llevado a cabo por el grupo de A. Zewail (20) en la última década del pasado siglo, todavía constituyen un logro notable. El límite de resolución temporal, dado por la diferencia entre la velocidad de la luz y la de los electrones, está limitado a unos pocos ps, lo que no es suficiente para estudiar la rotura y formación del estado de transición. Puede mejorarse la resolución usando geometrías oblicuas que permiten copropagar los pulsos (óptico y electrónico) sobre la muestra.

También se ha estudiado, por difracción de Rayos X en ps, reacciones químicas en disolución, en concreto la recombinación del Iodo en tetracloruro de Carbono (26). La función de distribución radial del Iodo, $g(r)$ está relacionada con la señal difractada $S(k)$ mediante la relación

$$S(k) = 1 + 4\pi\rho/k \int (g(r)-1) \sin(kr) dr$$

lo cual permite obtener la distribución de átomos de Iodo para retardos de 100 ps.

b. Materiales

En el estudio de materiales pueden explorarse estructuras cristalinas, amorfas y procesos de superficie. Un aspecto interesante, en el estudio de fases condensadas, es el proceso de fusión de sólido a líquido, que presenta una discontinuidad en la entropía y volumen (derivadas primeras de la energía Gibbs respecto a la temperatura y presión respectivamente). Se supone que p.e. el hielo se funde desde la superficie hacia el interior, lo que se conoce como nucleación heterogénea. Sin embargo si se suministra calor a una velocidad mayor que la del movimiento del sonido en el medio (movimiento de los átomos) entonces se puede lograr que la fusión comience desde adentro hacia afuera (nucleación homogénea). Esto pudo lograrse en procesos de bombeo (láser) y prueba (haz de electrones) lo que se conoce como transición de fase fotoinducida en fusión no térmica, dado que el proceso normal de fusión viene a durar del orden de 10 ps. También pueden estudiarse, mediante fuentes brillantes de electrones, la dinámica de reacciones fotoinducidas que incluye transiciones aislante-conductor en moléculas con carga ordenada y cierre de anillos en diarieleno (27).

Mediante fuentes de plasma de Rayos X, se pudo estudiar la transición de fase fotoinducida en VO_2 (ver **Figura 12**) siguiendo la relajación estructural, mientras que en Espectroscopía dinámica es imposible separar los términos electrónicos de los nucleares (28). También se han detectado estados excitados que implican

cruce entre sistemas (intersystem crossing) mediante transiciones prohibidas de espín (29), etc.

Por métodos de corte del haz de electrones (slicing) se consiguen pulsos de rayos X en fs para estudiar transiciones de fase estructurales y desplazamientos electrónicos en enlaces químicos (30), así como transferencias concertadas electrón-protón y cambios de distribución electrónica en los compuestos LiH y NaBH_4 (31).

c. Biomoléculas

En el estudio de las biomoléculas, las fuentes electrónicas de fs no tienen aún la coherencia transversal espacial suficiente para dar resolución atómica y poder estudiar celdas unitarias mayores de 6 nm, que aparecen en cristalográfica de proteínas. Por este motivo, el estudio de procesos bioquímicos se hace por las últimas técnicas de Rayos X, en concreto por láseres de electrones libres (XFEL) a longitudes de onda de rayos X duros (18). Así se han estudiado cambios estructurales fotoinducidos en la proteína amarilla fotoactiva, en la xantosina y en la mioglobina (32). Uno de los estudios más interesantes ha sido el de la dependencia temporal de la migración del CO y la relajación estructural en cristales de la proteína carboximiyoglobina (en abreviatura MbCO) mediante pulsos de Rayos X de sólo unos 100 ps (33). (Ver **Figura 13**).

En estudios biológicos hay que tener en cuenta la cooperatividad molecular expresada en los modos colectivos, para descubrir las fluctuaciones estocásticas de las proteínas, es decir la función de respuesta biológica es el resultado de movimientos correlacionados de un gran número de átomos, lo que hace tremadamente complejo el estudio de estos sistemas. Se requieren por tanto millones de disparos (tiempo de exposición de unos 40 fs) en diferentes orientaciones para producir otros tantos patrones de difracción, mediante el método estándar de cristalográfica en serie, o, más aún, en métodos de supermuestreo del método de imagen sin lentes, para resolver el problema de la fase. La limitación radica, por tanto, en el uso de muchas muestras, exigido para paliar el daño radiativo causado por el disparo láser, lo que en la práctica lleva a la situación de "difractar y destruir" cada vez (ver **Figura 14**). Se emplea por tanto la nanofabricación de chips cristalo-

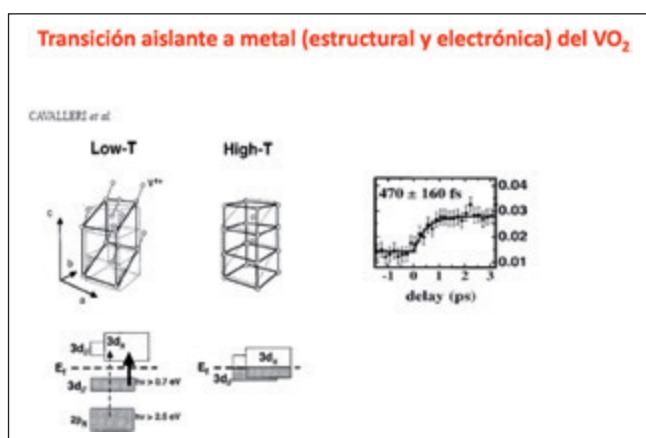


Figura 12. Transición de fase (estructural y electrónica) aislante-metal en VO_2 .



Figura 13. Dinámica estructural de la carboximiglobina.

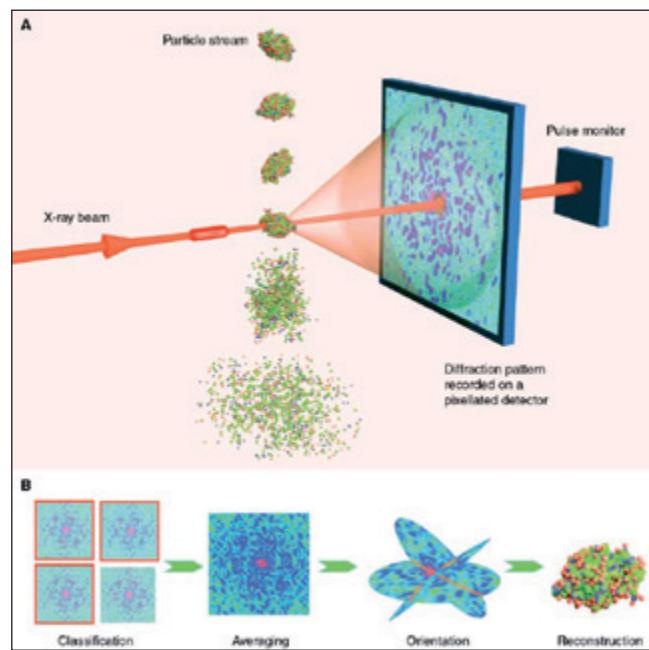


Figura 14. A. Imagen de difracción de una partícula compleja con pulsos XFEL. B. recuperación de la imagen 3D promediando sobre orientaciones.

gráficos que proporciona miles de cristales por segundo en diferentes orientaciones que se van expulsando por una válvula (skimmer) antes de chocar perpendicularmente con los pulsos láser.

Recientemente, se están logrado grandes avances en la resolución (de hasta 3.2 Å) mediante la técnica de Criomicroscopía electrónica. Esto se consigue mediante una nueva generación de detectores electrónicos directos (no cámaras CCD). Así se ha logrado resolver, por ejemplo, la estructura de la subunidad mayor del ribosoma mitocondrial de la levadura (24).

V. CONSIDERACIONES FINALES

En esta comunicación nos hemos centrado en el fundamento y aplicaciones de las técnicas de imagen con base en la difracción de rayos X y electrones. Los retos a que se enfrentan los avances, en concreto en las técnicas de Rayos X, tanto en resolución como en intensidad y brillo de las fuentes, conducen a la necesidad de disponer de unas potentes instalaciones, centradas en unos aceleradores lineales de varios kilómetros de longitud (ver **Figura 15**). Además hay que tener un control de la repetición y tamaños estándar de las muestras, lo que exige una normalización muy exigente del disparo.



Figura 15. Esquemas y panorámica de la gran instalación XFEL de Hamburgo.

No hemos insistido en las técnicas de procesado de imagen, extracción de datos y análisis de la imagen que requieren un elevadísimo tratamiento de estadístico de datos, algoritmos de segmentación de imagen, procesos de suavizado de imagen, etc., que superan el nivel de detalle de esta comunicación (24).

En cuanto al amplio campo de estudios que está a la espera de estas mejoras y desarrollos, destacan los estudios de dinámica de proteínas: Estructura, dinámica y función (p.e. proteínas G). En concreto, se requiere desentrañar la cooperatividad molecular e identificar las unidades topológicas, así como avanzar en el estudio de las correlaciones de alta dimensionalidad, base de las funciones de respuesta biológicas. Así mismo, el estudio de los movimientos alejados del equilibrio, que es la base de toda la Química, y los avances en la síntesis y aplicaciones de los nuevos materiales, se acelerarán, sin duda, con los progresos en estas técnicas.

Por otra parte estos estudios experimentales necesitan el complemento de la simulación mediante ordenador, que está logrando también avances espectaculares, tanto en Dinámica Molecular de grandes sistemas de partículas, como en estudios cuánticos basados en la ecuación de Schrödinger dependiente del tiempo.

En estos estudios nos centramos en la coherencia de los movimientos atómicos, es decir, en la coherencia del movimiento de los núcleos, pero existen también estudios avanzados de la coherencia de los movimientos de los electrones en moléculas y átomos (Attofísica y Attoquímica), que combinan ambas dinámicas (nuclear y electrónica) para desentrañar el problema de la estructura molecular y sus modificaciones tal como se dan en la Dinámica de la reacción química (22).

Finalmente, debemos recordar que el impacto de estos estudios en Dinámica Estructural, está provocando la aparición de una extensa literatura de alto índice de impacto, en Revistas específicas, entre las que destaca *Structural Dynamics*, creada por el American Institute of Physics y la American Crystallographic Association de la que es primer editor el Profesor Majed Chergui de la Universidad de Lausanne.

En el caso concreto de la microscopía óptica, la concesión del Premio Nobel de Química 2015 por el desarrollo de la *Microscopía de fluorescencia por superresolución* (lo que significa la superación definitiva del límite de difracción de Abbe/Rayleigh) a los investigadores Hell, Betzig y Moermer (35), ha venido a reconocer los avances de la Microscopía en el estudio de moléculas individuales y de las técnicas no invasivas de células vivas, con multitud de aplicaciones en Biología y Medicina.

REFERENCIAS

- [1] J. Santamaría, Rev. R. Acad. Cienc. Exact. Fís. Nat. (Esp) **103**, 357 (2009).
- [2] J. Santamaría, Rev. R. Acad. Cienc. Exact. Fís. Nat. (Esp) **105**, 129 (2012); Ibid. 105, 281(2012).
- [3] S. W. Hell, *Farfield Optical Nanoscopy*, Science **316**, 1153 (2007).
- [4] W. E. King y otros, *Ultrafast Electron Microscopy in Materials Science, Biology and Chemistry*, J. Appl. Phys. **97**, 111101 (2005). R. Falcone y otros: “*New directions in X-Ray Microscopy*”, Contemporary Physics **52**, 293 (2011).
- [5] M. Haida, K. Pechugin, y G. Sciaiani: “*Ultrafast structural dynamics with table top fs hard X-Ray and electron diffraction setup*”, Eur. Phys. J. Special Topics **222**, 1093 (2013).
- [6] J. W. Miao, D. Sayre y otros, Nature **400**, 342 (1999); H. N. Chapman y K. A. Nugent, Nature Photonics **4**, 833 (2010).
- [7] W. Demtröder, *Laser Spectroscopy: Experimental Techniques*, 4th Ed. (Springer, 2008).
- [8] R. Barer, R. H. Coler y H. W. Thompson: Nature **163**, 198 (1949); M. A. Harthcock y S. C. Atkin, J. Appl. Spectroscopy **42**, 3 (1988); E. N. Lewis, J. Schoppelrei y E. Lee, Spectroscopy **19**, 26 (2004).
- [9] J. R. Janesick: “*Scientific charge coupled devices*” (SPIE Press 2001).
- [10] V. Nikolenko, B. Nemet y R. Yuste, Methods **30**, 3(2003); Y. Ikegaya, G. Aaron, R. Cossart, D. Aronov, I. Lampl, D. Ferster y R. Yuste, Science **304**, 559 (2004).
- [11] S. W. Hell y J. Wichman (Método STED), Opt. Lett **19**, 780 (1994); S. W. Hell Y M. Krong, Appl.Phys. B **60**, 449 (1995); S. W. Hell, Scence **316**, 1153 (2007); C. Eggeling, S. W. Hell y otros, Nature **457**, 1159 (2009); W. Moerner y L. Kador, Phys. Rev. Lett, **62**, 2535 (1989); E. Betzig, Opt. Lett **20**, 237 (1995); E. Betzig y otros (Método PALM), Science **313**, 1642 (2006); M. J. Rust, M. Bates y X. Zhuang (Método STORM), Nat. Methods **3**, 793 (2006); S. T. Hess y otros, Biophys. J. **91**, 4258 (2006); B. Huang, W. Wang, M. Bates y X. Zhuang, Science **319**, 810 (2008); J. Bechhoefer, Phys Optics, 6 mayo 2014.
- [12] M. Lucas y E. Riedo, Rev. Sci. Instrum. **83**, 061101 (2012); D. Courjon y C. Bainier, Rep. Prog. Phys. **57**, 989 (1989).
- [13] B. Barwick, D. J. Flannigan y A. H. Zewail, Nature **462**, 902 (2009); F. J. Garcia de Abajo, Nature **462**, 861 (2009).
- [14] J. Santamaría, Rev. R. Acad. Cienc. Exact. Fís. Nat. (Esp) **101**, 329 (2007).

- [15] D. Strickland y G. Mourou, Opt. Commun. **56**, 219 (1985); D. E. Spence, P. N. Kean y W. Sibbet, Opt. Lett. **16**, 42 (1991); W. T. Silvart: “*Laser Fundamentals*” (Cambridge U. Press, 2004).
- [16] B. J. Siwick, J. R. Dwyer, R. E. Jordan Y R.J. D. Miller, Chem. Phys. **299**, 285 (2004).
- [17] R. J. D. Miller, Science **343**, 1108 (2014); R. Falcone y otros, Contemporary Physics **52**, 293 (2011).
- [18] J. C. H. Spence, U. Weierstall y H. N. Chapman, Rep. Prog. Phys. **75**, 106101 (2011); P. Emma y otros, Nat. Photonics **4**, 641 (2010).
- [19] G. Sciajini y R. J. D. Miller: “*Fs Electron Diffraction: Heraldng the era of atomically resolved Dynamics*”, Rep. Prog. Phys. **75**, 102601 (2012); R. J. D. Miller, Acta Cryst. **A66**, 137 (2010).
- [20] J. C. Willianson, J. Cao, H. Ihee, H. Frey Y A. H. Zewail, Nature **386**, 159 (1997); H. Ihee, A. H. Zewail y otros, Science **291**, 458 (2001).
- [21] C.Y. Ruan, V. A. Lobastov, F. Vigliotti, S. Chen y A. H. Zewail, Science **386**, 159 (1997); P. Baum y A. H. Zewail, PNAS **103**, 16105 (2006).
- [22] M. Chergui y A. H. Zewail, Chem. Phys. Chem. **10**, 28 (2010).
- [23] F. Lepine, M. Y. Ivanov y M. J. J. Vrakking, Nature Photonics **8**, 195 (2014).
- [24] R. J. D. Miller, Science **343**, 1108 (2014); A. Amunts y otros, Science **343**, 1485 (2014); W. Kühlbrandt, Science **343**, 1443 (2014).
- [25] J. M. Thomas y P. A. Midgley, Chem. Phys. **385**, 1 (2011).
- [26] A. Plech, S. Bratos, F. Mirloup , P. A. Anfinrud y otros, Phys. Rev. Lett.**92**, 125505 (2004).
- [27] A. Cavalieri y otros, Phys. Rev. Lett. **87**, 237401 (2001).
- [28] M. Gao y otros, Nature **496**, 343 (2013); H. Jean-Ruel y otros J. Chem. Phys. B **117**, 15894 (2013).
- [29] P. Copens y otros, Acta Crystal. **A66**, 179 (2010).
- [30] E. Möhr-Vorobera y otros, Phys. Rev. Lett.**107**, 036403 (2011).
- [31] T. Elsaeser, M. Voermer, Acta Crystal. **A66**, 168 (2010); M. Voermer y otros, J. Chem. Phys. **133**, 064509 (2010); V. Juvé y otros, Phys. Rev. Lett. **111**, 217401 (2013).
- [32] D. Bourgeois, P. Anfinrud y otros, PNAS **100**, 8704 (2003); Z. Ren, K.Moffat y otros, Biochemistry **40**, 13788 (2001); S. Anderson, K. Moffat y otros, Structure **12**, 1039 (2004).
- [33] F. Schoffe, P. A. Anfinrud y otros, Science **300**, 1924 (2006); D. Bourgeois, P. Anfinrud y otros, PNAS 1034924 (2006).
- [34] Ver p.e. “*Visualizing Chemistry: The progress and Promise of Advanced Chemical Imaging*” (National Academy Press, Washington DC, 2006).
- [35] The Royal Swedish Academy of Sciences, (8 de Octubre de 2014): Superresolved Fluorescence Microscopy (Scientific background on the Nobel Prize in Chemistry 2014).