

Historia de la espectroscopía:

De la identificación elemental a la determinación de la estructura electrónica precisa de los sitios metálicos de enzimas.

Mario U. Delgado-Jaime

Departamento de Química, CUCEI, Universidad de Guadalajara, Guadalajara, México,
email:mario.delgado0665@academicos.udg.mx

Resumen

La espectroscopía electrónica moderna permite identificar señales específicas como la vibración de una molécula como el O_2 en el sitio activo de metaloenzimas; o más sorprendente aún, las señales específicas de un solo átomo ligero en el espectro de emisión de rayos X de una gran proteína, como es el caso de la especie de carbono al centro del cofactor de FeMo de la nitrogenasa, la proteína responsable de fijar el nitrógeno de la atmósfera a los suelos. Pero, ¿cómo llegamos hasta este punto histórico? Todo comienza a finales del siglo XVII y principios del siglo XVIII con los primeros experimentos de difracción de la luz. Posterior a esto, han pasado tres siglos para comprender los principios de la espectroscopía y desarrollar las herramientas que hoy tenemos para el estudio de enzimas y de otros materiales basados en compuestos de coordinación. El siguiente es un recuento de algunos de los eventos más significativos en el desarrollo de la espectroscopía, así como de los avances y aplicaciones más significativos actuales de la espectroscopía de rayos X de alta resolución.

Espectroscopía atómica

A Isaac Newton se le atribuye el haber usado por primera vez la palabra espectro para describir el resultado de sus experimentos de difracción de la luz usando un prisma. Entre otras cosas, Newton observó como la luz difractada de un prisma estaba compuesta por luz de diferentes colores que iban del rojo al violeta. Newton interpretó que la luz debía poseer un color distinto y una refracción distinta con base en una propiedad fundamental distinta. En ese tiempo, Newton consideró que dicha propiedad de la luz era la masa,¹ pero hoy en día, sabemos que dicha propiedad fundamental de la luz que explica estos fenómenos es la diferencia en longitud de onda. Independientemente de esto, este experimento, replicado de manera independiente por René Descartes,² sentó las bases para dar paso al nacimiento de la espectroscopía atómica. Ya en el siglo XIX, gracias a numerosas contri-

Quimiofilia, 2022, LA QUIMICA Y LA LUZ

DOI: <https://doi.org/10.56604/qfla202229QUIMLUZ615>

Cite este artículo así: APA: Delgado-Jaime M. U. (2023). HISTORIA DE LA ESPECTROSCOPIA: De la identificación elemental a la determinación de la estructura electrónica precisa de los sitios metálicos de enzimas. *Quimiofilia*, 29, 6-15 ACS: Delgado-Jaime M. (2023). HISTORIA DE LA ESPECTROSCOPIA: De la identificación elemental a la determinación de la estructura electrónica precisa de los sitios metálicos de enzimas. *Quimiofilia*, 2023, 29, 6-15 DOI: <https://doi.org/10.56604/qfla202229QUIMLUZ615> Recibido: Abril 27, 2023. Aceptado: Mayo 09, 2023. Publicado: Mayo 30, 2023. www.quimiofilia.com ISSN: 2683-2364 Registro IMPI: 2052060 QUIMIOFILIA Reserva de derechos al uso exclusivo 2022: 04-2019-062013201300-203

buciones, tanto en el desarrollo de espectrómetros, como en el de las fuentes de luz, se logró atribuir correctamente las líneas de absorción y emisión observadas a la composición química elemental. De modo que si la fuente de luz tenía un cierto origen químico, o entraba en contacto con alguna sustancia química, este daría lugar a un espectro característico de acuerdo con los elementos que estuvieran presentes después de ser difractada a través de un prisma o de una rejilla de difracción monocromador (ver Figura 1). Se concluyó entonces que estos espectros estaban constituidos por un conjunto de líneas discretas únicas según la composición elemental de la fuente de luz. Estos hallazgos llamaron la atención de muchos científicos, entre ellos, Bunsen, Kirchhoff, Lyman, Paschen, Dewar, Barkla, y Rydberg,³ entre otros tantos, mismos que colectaron muchos de estos espectros y realizaron la primera clasificación de líneas espectrales observadas según la composición elemental, primero de sales de metales alcalinos y de gases elementales, y luego de otras sustancias químicas. Posteriormente, con el desarrollo de los tubos de rayos catódicos a finales del siglo XIX, estas observaciones se extendieron a un rango de energías y longitudes de onda que hoy conocemos como rayos X, los cuales comprenden una de las regiones más extensas en el espectro electromagnético. Concretamente en 1895, Roentgen observó que acelerando los electrones en tubos de rayos catódicos usando una diferencia de voltaje superior a los 5,000 V se producían rayos desconocidos, esto debido al frenado repentino (bremsstrahlung) de las cargas aceleradas por un cambio en su trayectoria al pasar cerca de otras partículas. En este principio básico se basa también el funcionamiento de un sincrotrón que ante cambios de trayectoria de los electrones acelerados - en este caso efectuados con ayuda de imanes - se produce una gran cantidad de radiación que comprende desde rayos infrarrojo hasta rayos X de alta energía.⁴ Pero antes del sincrotrón, el descubrimiento de los rayos X por Roentgen permitió el desarrollo de tubos de rayos X, los cuales permitieron ampliar, a principios del siglo XX, la clasificación de líneas espectrales elementales, mismas que ahora involucraban excitaciones con electrones cercanos al núcleo. Alrededor de 1906, Charles Barkla contribuyó a clasificar las líneas primarias de absorción

de los elementos en los grupos K, L, M, N, etc.⁵ según la energía de rayos X necesaria para su excitación y poco después descubrió que seguido de estos procesos primarios de absorción existían procesos de emisión con radiación secundaria de menor energía, la cual era única para cada elemento e independiente de la temperatura, estructura y composición química de la sustancia que lo contuviera. Más adelante, estas líneas fueron clasificadas por Manne Seigbahn.⁶ Históricamente, la nomenclatura que usamos en la actualidad para las líneas de absorción y emisión se deben entonces a Barkla y Seigbahn (ver Figura 1).

En 1913, Niels Bohr causó una revolución en el desarrollo de la mecánica cuántica, en el desarrollo de la espectroscopía electrónica y finalmente, en el desarrollo del modelo atómico. Todo centrado en el hecho de que su modelo atómico explicaba con mucha precisión las líneas de emisión y absorción del átomo de hidrógeno, con el que le daba sentido a las series de líneas clasificadas como Lyman, Balmer, Paschen, y Bracket, por ejemplo, además de que las predicciones en espectroscopía eran totalmente consistentes con los cálculos que había encontrado Rydberg de manera experimental.³ El modelo de Bohr introdujo también el primer número cuántico n

consistente con la agrupación de líneas primarias K, L, M, N, etc. descritas por Barkla. Central a todas estas interconexiones entre espectroscopia y estructura atómica estaba el tercer postulado del modelo, que parecería obvia en estos días, pero que en aquel tiempo fue una idea revolucionaria. Esta consistía en que la radiación absorbida y/o emitida por el átomo entre transiciones con capas de diferente número cuántico n , debe encontrarse en resonancia con la energía del fotón absorbido o emitido. La energía de un fotón ya había sido descrita para entonces según la teoría cuántica de Max Planck, como $h\nu$. Así que según el tercer postulado del modelo atómico de Bohr debía cumplirse que,

$$\Delta E = |E_{n_f} - E_{n_i}| = h\nu \quad (1)$$

En donde ΔE representa la diferencia de energía entre los niveles final (n_f) e inicial (n_i); h es la constante de Planck y ν es la frecuencia en resonancia de la radiación absorbida y/o emitida. Por otro lado, en el desarrollo de su modelo, Bohr no dio explicación de la cuantización de *momentum angular* a la que hizo alusión de acuerdo al nivel n ocupado por el electrón, según la expresión:

$$L = mvr = \frac{nh}{2\pi} \quad (2)$$

Esta expresión era necesaria para sostener todo el modelo, que además de las líneas espectrales predice correctamente el radio del átomo de hidrógeno, así como su energía de ionización.

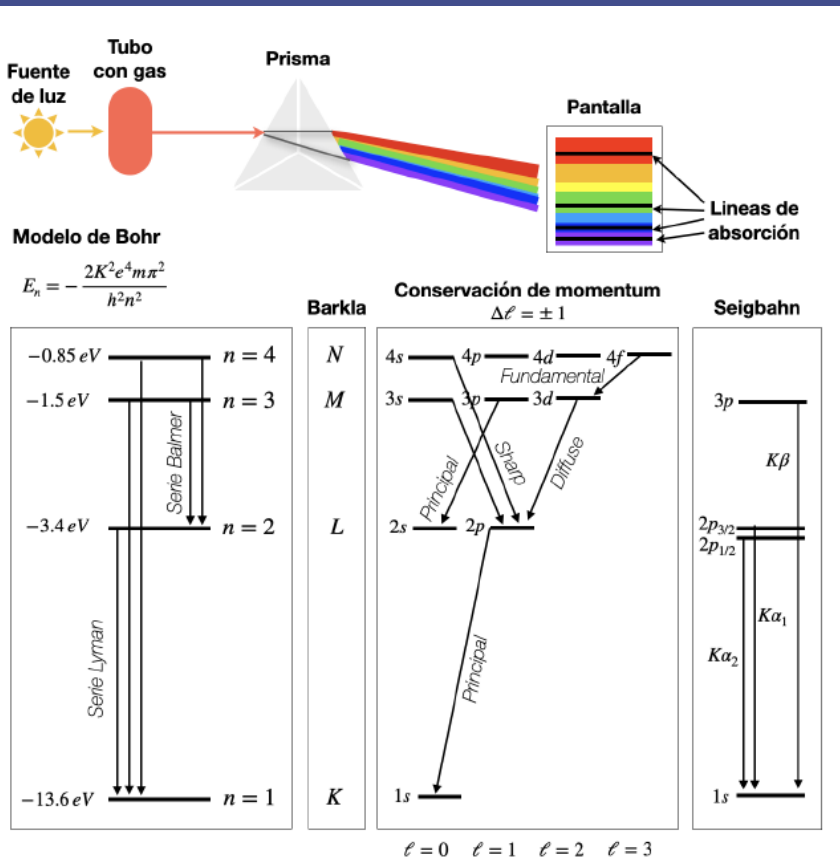


Figura 1. Desarrollo de la espectroscopia atómica y clasificación de las líneas espectrales observadas. Posterior a los hallazgos de Newton, científicos como Bunsen y Kirchhoff obtuvieron los primeros espectros atómicos, por ejemplo exponiendo a una de fuente luz tubos con gases o sales con metales alcalinos, lo que dio lugar a espectros únicos según la composición elemental. El descubrimiento de los rayos X permitió expandir la exploración de la estructura electrónica del átomo, en particular de los electrones cercanos al núcleo. Las primeras clasificaciones de los espectros de emisión y absorción, basadas en patrones observados de manera empírica finalmente tuvieron explicación una vez que se dio a conocer, primero el modelo de Bohr del átomo de hidrógeno y luego el de la mecánica cuántica.

Esta expresión, al no tener una explicación detallada, intrigó a muchos científicos de la época dando lugar eventualmente al desarrollo del modelo atómico de la mecánica cuántica en 1926, derivado de la ecuación de Schrodinger y/o del principio de incertidumbre de Heisenberg. Pero Bohr además contribuyó de una segunda manera a impulsar la revolución cuántica que arrojó un total de más de 15 premios Nobel. Organizó, con ayuda de su esposa, múltiples reuniones en Copenhague y luego en otras ciudades europeas en el que se debatían los hallazgos más significativos de la época; dejando claro desde entonces la importancia que tiene la discusión de ideas en el avance científico.

De manera temprana en el desarrollo del modelo mecánico cuántico, las investigaciones de Louis de Broglie con haces de electrones permitieron, por un lado, dar explicación a la expresión (2) utilizada por Bohr en su modelo; y revelaron además el comportamiento dual onda-partícula de los sistemas cuánticos. En este sentido, el experimento más famoso y revelador realizado por de Broglie, fue el de la doble rendija. En este experimento se utiliza un haz de electrones y a través de este se coloca una doble rendija. Del otro lado se tiene una pantalla que permite detectar los electrones que pasan a través de la doble rendija. Si el comportamiento de los electrones fuera meramente corpuscular, entonces se esperaría observar eventos en los que los electrones han pasado a través de cada rendija, en una misma proporción. Sin embargo, lo que se observa es que mientras los eventos ocurren a través de cada rendija en la misma proporción, se observa el doble de eventos justo entre ambas rendijas, lo que es consistente con un comportamiento ondulatorio en el que la interferencia constructiva entre los eventos en los cuales los electrones pasan a través de una u otra rendija. Un segundo aspecto que se ilustra con este experimento es la interpretación que le da Max Born años más tarde a la función de onda, como soluciones a la ecuación de Schrodinger de un sistema cuántico. Dicha interpretación tiene que ver con una distribución de probabilidad. En este sentido, para el caso del experimento de la doble rendija, la distribución de probabilidades que se predice según la función de onda para este sistema es consistente con la distribución de la ocurrencia de eventos que son observados.

El modelo atómico para el átomo de hidrógeno que emerge de la mecánica cuántica permitió también explicar más detalladamente las observaciones hechas por los espectroscopistas de principios de siglo XX respecto a las características de las líneas de emisión. Se había reportado, por ejemplo, que algunas series de líneas estaban mejor definidas que otras. Otras clasificaciones o términos empleados para referirse a las líneas espectrales incluían también la designación de líneas principales y fundamentales. Partiendo del modelo mecánico cuántico, ahora se sabe que dichas clasificaciones deben su origen a los estados electrónicos con distinta cuantización en el momento angular orbital total L . En efecto, el nombre de los orbitales s , p , d y f , según su número cuántico de momentum angular orbital, ℓ deben su origen a esta clasificación de las líneas espectrales (es decir de las palabras sharp, principal, diffuse, fundamental.⁷) El trabajo realizado posteriormente por Paul Dirac y popularizado por Fermi permite explicar de manera fundamental las diferencias entre las líneas espectrales consistentes con la conservación de la energía y con la conservación de momentum angular en el siguiente sentido: cuando la radiación electromagnética interactúa con la materia, debe conservarse la energía (consistente con el tercer postulado de Bohr), y además debe conservarse el momentum angular. Previo al trabajo de Paul Dirac, la publicación de la teoría electromagnética en 1865 por James Clerk Maxwell, es fundamental.^{8,9} De hecho, esta enorme contribución ha hecho que la fuerza electromagnética sea la mejor comprendida de las 4 fundamentales que existen en la naturaleza. Usando los principios de la teoría electromagnética, fue Einstein uno de los primeros en interesarse en el estudio de lo que ocurre cuando la radiación electromagnética interactúa con la materia, lo que también permitió explicar el efecto fotoeléctrico, que entre otras aplicaciones prácticas ha permitido a su vez desarrollar la espectroscopía fotoelectrónica y en conexión con esta la espectroscopia de emisión de rayos X. En palabras de Einstein, los hallazgos de Maxwell transformaron el mundo,⁹ pues sus propias ideas sobre teoría de la relatividad fueron influenciadas por la teoría electromagnética de Maxwell. La representación de la radiación electromagnética propuesta por Maxwell, que coloca el campo eléctrico y magnético perpendicular entre sí y propagándose sinusoidalmente, contempla en realidad solo los componentes principales correspondientes al dipolo eléctrico y al dipolo magnético de la luz, ambos con momentum $\ell = 1$. Luego entonces, la

conservación del momento angular implica que solo las transiciones electrónicas entre orbitales con diferencia de 1 en su momento angular ($\Delta\ell = \pm 1$) son permitidas. La conocida regla dorada de Fermi combina entonces la conservación de energía y momento angular y permite explicar, no solo las reglas de selección en espectroscopía electrónica sino que la inclusión del principio de incertidumbre permite también comprender el origen del ensanchamiento natural de las líneas espectrales.¹⁰ Una aplicación interesante de la espectroscopía atómica es la composición elemental del sol y de otras estrellas, así como de la atmósfera de otros planetas. Los primeros experimentos en este sentido fueron realizados por Fraunhofer en 1814 en el que se revelaba un patrón de líneas oscuras en los espectros de emisión de la luz solar, observando también que con la luz de otras estrellas se observaba un patrón distinto. En el caso del sol, además de las líneas características del hidrógeno se observan líneas ahora atribuibles al sodio (línea D), calcio y hierro, gracias a las demostraciones realizadas posteriormente por Kirchhoff y Bunsen. Pero no solo se puede caracterizar la composición elemental usando la espectroscopía de emisión. De hecho, antes de que el cambio climático se convirtiera en uno de los problemas por resolver más importantes de nuestro tiempo, los científicos ya habían advertido incluso antes de 1970 que el uso desmedido de combustibles fósiles tendría un impacto significativo y peligroso para el clima en la tierra, toda vez que se había observado por espectroscopía de emisión, que el planeta Venus poseía una atmósfera rica en CO_2 , lo cual debía ser responsable de las temperaturas inusualmente altas que se habían determinado en la superficie de ese planeta.^{11,12}

Desarrollo del Sincrotrón

El descubrimiento de los rayos X mostró como estos podían ser producidos por la aceleración de electrones a altos voltajes dentro de un tubo de rayos catódicos.⁴ Aunque la teoría de Bohr del átomo de hidrógeno causó muchos de los esfuerzos en física al desarrollo de la mecánica cuántica, durante la década de 1920 parte de esta atención regresó al desarrollo de la espectroscopia y al desarrollo de fuentes de rayos X más sofisticados. Fue en esa década que se desarrollaron los aspectos teóricos y después tecnológicos que dieron lugar a los primeros aceleradores de partículas y even-

tualmente al sincrotrón.¹³ Los primeros desarrollos dieron lugar al betatrón, que es un predecesor directo del primer sincrotrón y que aún se utiliza comercialmente como una fuente de radiación. Posteriormente, la primera fuente de luz sincrotrón se desarrolló en 1947 y desde entonces se han desarrollado numerosas fuentes de luz sincrotrón en distintas partes del mundo con una creciente brillantez y variedad de rangos de radiación con las cuales un mayor número de experimentos y con un mayor alcance, ha sido posible. El sincrotrón moderno incluye un anillo de aceleración, seguido de un anillo de almacenamiento con un diámetro típico de entre 850 m y 1450 m, que es donde los electrones al desacelerarse pierden energía que se manifiesta en forma de radiación con energía ajustable que oscila entre la radiación infrarroja y los rayos X de alta energía, también conocidos como rayos gamma (ver Figura 2).^{4,13} Cada estación experimental dentro del sincrotrón está dedicada a un tipo de experimentos en particular, dependiendo de los elementos ópticos, la instrumentación con la que esta sea equipada y de la energía de la radiación para la cual la estación experimental esté optimizada. Uno de los experimentos más utilizados y desarrollados a gran escala durante las décadas de 1980 y 1990 es la espectroscopía absorción de rayos X.¹⁴ En esta técnica, los electrones cercanos al núcleo, típicamente los electrones 1s de un metal en un compuesto de coordinación son excitados a los orbitales moleculares desocupados y a mayores energías ionizados. Esta técnica resulta ser una alternativa muy útil a la espectroscopía UV-Visible en varios sentidos. En primer lugar, se trata de una técnica elemento-específica, lo que quiere decir que cada elemento tiene sus bordes de absorción característicos y ampliamente espaciados dentro del espectro de rayos X; en comparación con un rango de energía muy reducido en espectroscopia UV-Visible en donde varios cromóforos pueden absorber. Además, la interpretación se facilita respecto a UV-Visible debido a que en absorción de rayos X el orbital donador es un orbital atómico localizado en el centro metálico, mientras que en el caso de espectroscopía UV-Visible, tanto el orbital donador como el orbital aceptor son orbitales moleculares. Una ventaja de que el orbital donador sea un orbital localizado en un átomo es que el espectro obtenido corresponda a un mapa o una proyección de las contribuciones de ese elemento en los orbitales moleculares del compuesto estudiado y que entonces, este tipo de espectros sean altamente sensibles al estado fundamental del elemento. En el caso de los metales de la primera serie de transición esto resulta particularmente útil considerando que

muchos de ellos al tener una ocupación parcial de la capa 3d tienen la opción de que se establezca un gran número de estados electrónicos dependiendo de su entorno, o campo de los ligandos. Esto hace que los metales de transición sean idóneos para activar sustratos siguiendo distintas trayectorias, dependiendo en primera instancia de su estado basal.

El desarrollo de la espectroscopía de absorción de rayos X ayudó significativamente a impulsar el estudio de los metales en sistemas biológicos, lo que además catalizó el desarrollo de otras técnicas basadas en absorción de rayos X. En particular destaca la absorción de rayos X de estructura fina extendida (EXAFS), impulsada principalmente en el sincrotrón de la universidad de Stanford (SSRL) durante la década de 1980 en donde se desarrollaron los primeros instrumentos para poder detectar absorción de rayos X mediante la colección de la fluorescencia total que resulta de la creación de huecos 1s en el metal de transición.^{13,14} Esto ha permitido desde entonces el que sea posible medir espectros de EXAFS de metaloproteínas en soluciones congeladas de donde es posible deducir información geométrica en torno a los sitios activos de biomoléculas en concentraciones de hasta menos de 1 mM. De hecho, la primera estructura para el cofactor FeMo de la nitrogenasa, una proteína de más de 240 KDa y responsable de la fijación de N_2 en el suelo, fue deducida a partir de datos de EXAFS colectados en SSRL, primero desde el punto de vista del hierro y luego desde el punto de vista del molibdeno.¹⁵

Espectroscopia de rayos X de alta resolución

Mientras que los primeros detectores de fluorescencia permitían registrar la intensidad de esta como respuesta a la fotoionización de los electrones cercanos al núcleo,¹⁴ durante la década de 1990 se impulsó el desarrollo de espectrómetros que permitían distinguir o resolver energéticamente dicha fluorescencia.¹⁶⁻¹⁸ En ese tiempo se desarrollaron espectrómetros que podían albergar cristales analizadores desmontables que tuvieran la función de monocromadores de fluorescencia y que permitiera resolver las diferentes líneas de emisión en alta resolución. Se trata pues de las mismas líneas que había descubierto Barkla y que después había clasificado Seigbahn a inicios del siglo XX, pero con la capacidad de medirlas en alta resolución. Los

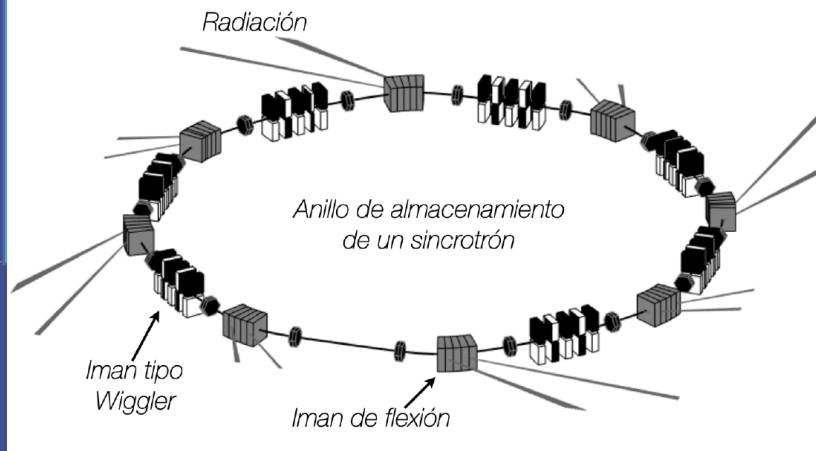


Figura 2. Anillo de almacenamiento de un sincrotrón moderno. Los electrones acelerados casi a la velocidad de la luz en donde con el cambio de trayectoria inducida por imanes de flexión o por imanes de tipo Wiggler se produce una gran cantidad de radiación que va desde los rayos infrarrojo hasta los rayos gamma, pero con una gran brillantez centrada en la región de rayos X. Las estaciones experimentales, que contienen un monocromador específico se posicionan en secciones lineales estratégicas desde donde emerge la radiación electromagnética.

cristales analizadores de estos espectrómetros funcionan bajo los mismos principios de difracción de la ley de Bragg. En este sentido, los planos cristalográficos de los materiales en los cristales analizadores (típicamente germanio o silicio) son el equivalente a las rejillas de difracción que se utilizan en los monocromadores, por ejemplo en equipos de luz ultravioleta-Visible. Entonces, cada medición realizada a un diferente ángulo de difracción se corresponde con una energía distinta en el espectro de emisión. Dependiendo del elemento de interés y de la línea espectral a medirse, y dada una geometría definida para el espectrómetro, se eligen entonces los cristales analizadores a montarse. Por ejemplo, para medir las líneas de emisión $K\alpha_1$ y $K\alpha_2$ de Fe (que emergen de las transiciones electrónicas $2p \rightarrow 1s$ en ese elemento); o de las líneas $K\beta$ de Mn (que emergen de la emisión $3p \rightarrow 1s$), se utilizan cristales analizadores de germanio que utilizan los planos cristalográficos 422 para difractar la radiación y poder entonces medir a la vez una sola frecuencia al desplazar los cristales y detector en el espectrómetro desde un ángulo de Bragg, θ_i hasta un ángulo de Bragg θ_N (ver Figura 3). Además de observar en alta resolución los espectros de emisión $K\alpha$ y $K\beta$ de compuestos de metales de transición, el desarrollo de estos espectrómetros ha impulsado, entre 2000 y 2016, la técnica conocida como espectroscopía de emisión de rayos X (XES) de *valence-to-core*,^{18,19} la cual permite la obtención de un mapa detallado de la estructura electrónica de los orbitales moleculares ocupados en complejos metálicos, desde el punto de vista del metal de transición. Esta técnica, al tener gran sensibilidad por los ligandos que rodean al metal de transición, ha resultado en la obtención de huellas muy específicas de moléculas o átomos pequeños unidos directamente al metal.¹⁹

Uno de los hallazgos más significativos que se han obtenido por esta técnica es la elucidación de la especie atómica encontrada al centro del cofactor FeMo de la nitrogenasa.²⁰ En 2003, la primera estructura cristalina obtenida en alta resolución para esta proteína había revelado que en el centro del cofactor se debía encontrar un átomo pequeño consistente con la densidad de carbono, nitrógeno u oxígeno. Y aunque muchos investigadores se inclinaban porque ese átomo fuera precisamente nitrógeno en la forma de nitruro, la técnica de *valence-to-core* XES ayudó a revelar que la identidad de dicho átomo es carbono en la forma de carburo, similar al que se observa en el cúmulo metálico de $\text{Fe}_6\text{C}(\text{CO})$,¹⁶ en el que un carburo se encuentra rodeado de 6 iones de Fe (ver Figura 4).^{19,20}

Posteriormente, pensando en que se había podido encontrar la huella de un solo átomo de carbono (en la forma del ion carburo) en una proteína de casi 250 kDa, se pensó entonces en la posibilidad de detectar una huella de un solo átomo de hidrógeno, el cual se encuentra unido al Fe y al Ni en el sitio activo de las hidrogenasas de NiFe.²¹ Y en efecto, logró identificarse

una señal específica para el hidruro unido al Fe y al Ni. Más aún, se descubrió que según la conformación en torno al níquel, el hidruro puente localizado entre Ni y Fe, puede o no encontrarse en una forma activa, o en una forma que promueve su inactividad y su almacenamiento. En este sentido, si la conformación del níquel es cercana a la de un plano cuadrado, el análisis de los espectros *valence-to-core* XES ayudaron a revelar que el orbital $3d_z^2$ del centro de Ni se encontraría energéticamente muy lejano para interactuar con el hidruro. Por el contrario, si el entorno de níquel cambia a tetraédrico el orbital $3d_z^2$ se encuentra disponible para interactuar con el hidruro de manera muy favorable y entonces, en conjunto con el Fe lo estabilizarían. Estos hallazgos sugieren que cuando la bacteria necesita almacenar hidrógeno (en forma de H^+ y H^-), se efectúa un cambio conformacional en la enzima de tal manera que el entorno geométrico del níquel sea tetraédrico; en tanto que si la bacteria necesita hacer uso del hidrógeno, entonces el cambio conformacional consiste en cambiar el entorno del Ni al de un plano cuadrado.²¹

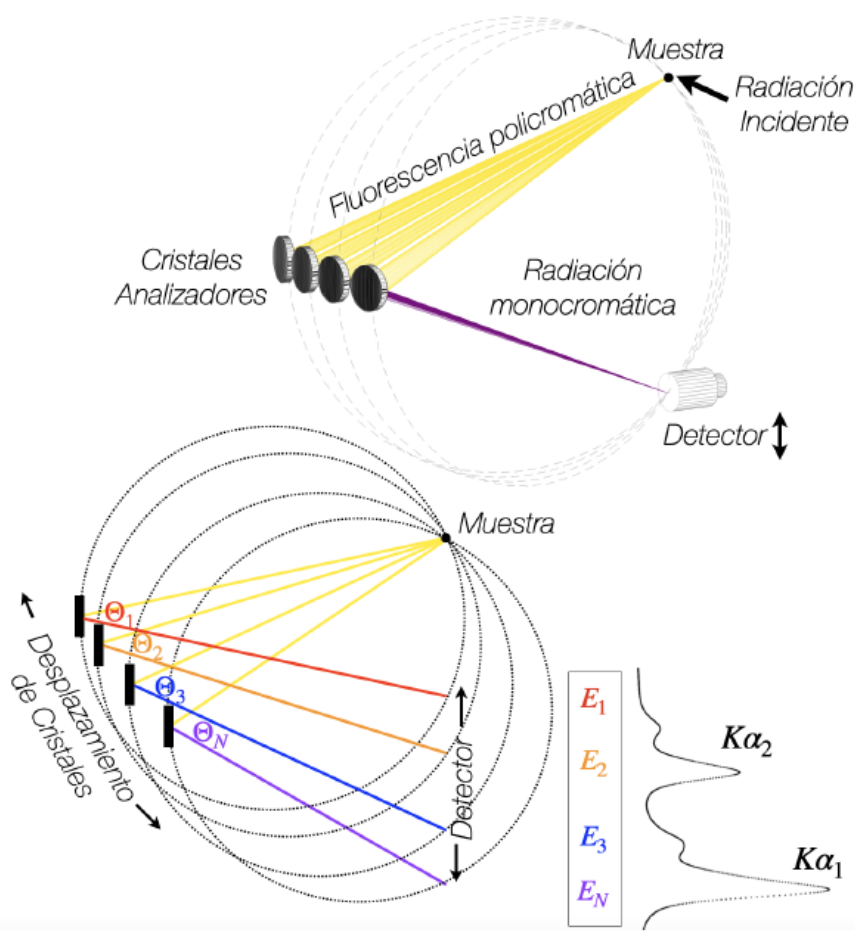


Figura 3. Espectrómetro moderno de emisión de rayos X de alta resolución. La muestra, los cristales analizadores y el detector deben encontrarse dentro de un círculo de Rowland. Después de que la muestra interacciona con rayos X se generan huecos en los orbitales internos de metales de transición (típicamente de orbitales $1s$). La fluorescencia que se origina posterior a la ionización puede entonces separarse usando cristales analizadores específicos cuyos planos cristalográficos realizan la función monocromador, de modo que para cada ángulo de Bragg (θ_i) se corresponde una energía E_i distinta. El movimiento coordinado de los cristales analizadores y el detector es lo que permite que se establezca un ángulo de Bragg distinto y por consiguiente la detección de una energía distinta. El espectro de emisión se registra entonces incidiendo rayos X sobre la muestra seguido del movimiento sistemático de cristales y detector de modo que para cada posición se mide la intensidad correspondiente a cada energía.

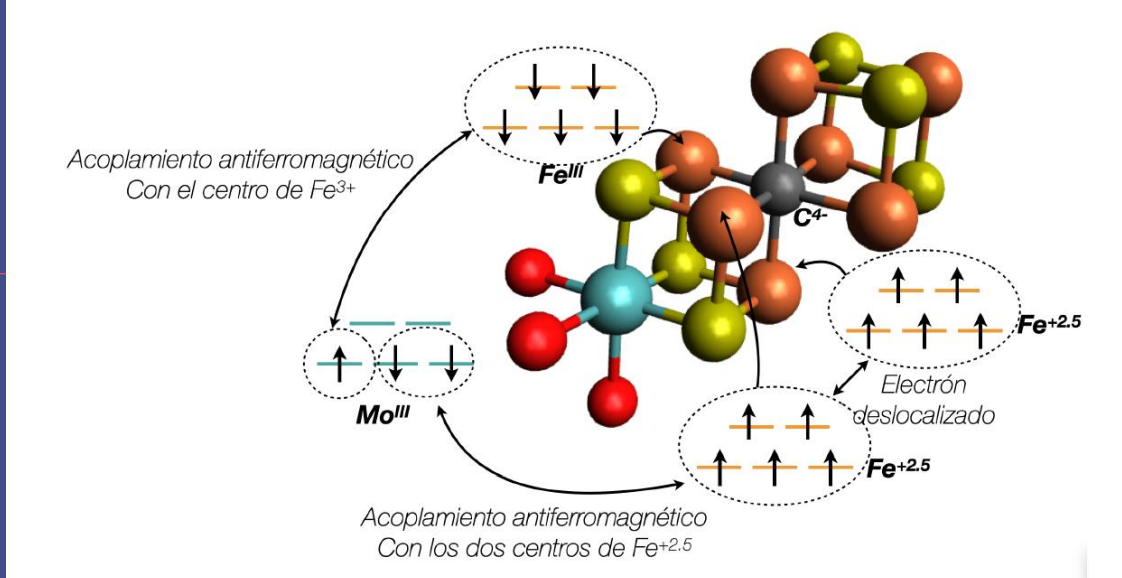


Figura 4. Detalles estructurales recientemente revelados para el cofactor FeMo de la nitrogenasa. El carburo (C^{4-}) central fue revelado en 2011 usando espectroscopía de emisión de rayos X en alta resolución en la región de *valence-to-core*.²⁰ Más recientemente, el estado de oxidación del Mo así como su estado de espín han sido revelados por espectroscopía de absorción en alta resolución y por experimentos de dicroísmo circular magnético de rayos X, respectivamente.^{22,23} El estado de espín inusual para un centro de Mo(III) en un ambiente octaédrico permite coordinar la comunicación a distancia con los centros de Fe(III) y Fe(II) involucrados en la reducción de N_2 . La disrupción en este ordenamiento da lugar a la inactividad de la enzima.

Otra aplicación de los espectrómetros de alta resolución consiste en la medición de procesos de dispersión inelástica.^{18,24} En 1928, el físico Chandrasekhara V. Raman descubrió el efecto de dispersión inelástica que consiste en un proceso de dos fotones, en el que con el primero se logra la excitación de un electrón hasta un estado intermedio de alta energía a partir del cual se emite un fotón con el que se alcanza un estado final con energía superior al estado inicial. El término inelástico implica de hecho que la energía entre el fotón absorbido y emitido no se conserva. Una aplicación temprana de este fenómeno es en espectroscopía vibracional. Mientras que la espectroscopía de infrarrojo permite detectar modos de vibración vía la absorción de luz infrarrojo en la que ocurre una excitación desde un nivel vibracional inicial ν_1 hasta un nivel vibracional final ν_2 , en espectroscopia Raman, es posible relacionar estos dos estados vibracionales por medio de dos fotones en lugar de uno, primero absorbiendo luz en la región visible desde el estado ν_1 hasta un nivel virtual intermedio; y luego emitiendo un fotón de menor energía hasta llegar a ν_2 (ver Figura 5). Las reglas de selección en la medición directa vía espectroscopía de infrarrojo y en la de Raman resultan diferentes por lo que es posible observar diferentes modos vibracionales en cada caso, según las propiedades simétricas del compuesto estudiado. Más aún, cuando la fuente de luz en Raman se hace coincidir con una banda de absorción del UV-Visible, las señales correspondientes a vibraciones

que tienen relación con la transición electrónica se amplifican en relación con el resto de las señales. Por ejemplo, si se incide con un láser cuya longitud de onda coincide con una transición electrónica de transferencia de carga de uno de los ligados al metal, entonces las señales correspondientes a vibraciones que tienen que ver con el enlace metal-ligando implicado se verán amplificadas. Esta variante de la técnica de espectroscopía Raman se le conoce como resonancia Raman y es extremadamente útil para el estudio de vibraciones muy específicas en biomoléculas. Por ejemplo, las relativas a la activación del oxígeno (O_2), en donde ha sido posible identificar en que forma se encuentra esta molécula al interactuar con centros de Fe y de Cu en enzimas biológicas, ya sea en forma de O_2^0 molecular, en forma del ion superóxido, O_2^{-1} , en forma de peróxido, O_2^{-2} , o incluso en una forma más debilitada cercana a la escisión en dos iones de óxido.

El efecto Raman puede también utilizarse entonces en espectroscopía de absorción de rayos X para mejorar la resolución de los espectros de absorción.^{4,18} Esto se logra mediante la medición del espectro de absorción de rayos X en resonancia con el máximo de la línea de emisión $K\alpha_1$. Es decir, que en lugar de detectar toda la fluorescencia que emerge de la muestra posterior al proceso de absorción y para el cual se ha creado un hueco en el orbital 1s, se selecciona exclusivamente un ángulo de Bragg correspondiente a la difracción del máximo en la línea $K\alpha_1$ con ayuda de un espectrómetro en

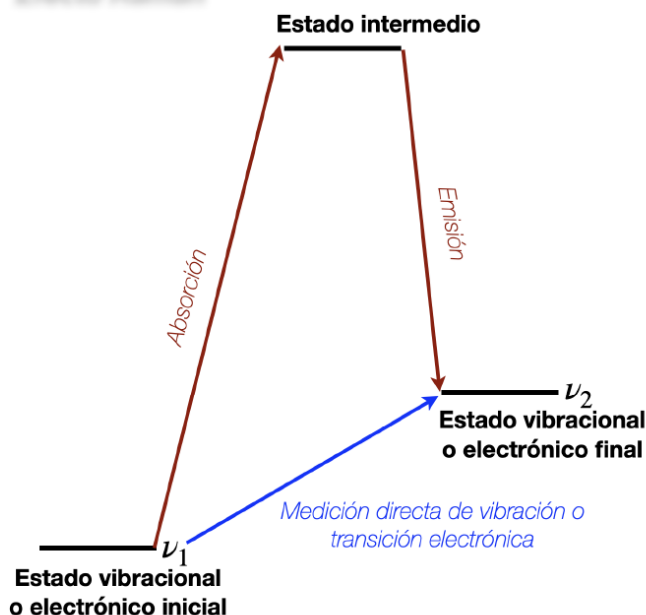


Figura 5. Efecto Raman y sus aplicaciones en espectroscopía vibracional y en espectroscopia de rayos X. Cuando la medición de absorción entre un estado vibracional o electrónico inicial, ν_1 y un estado vibracional o electrónico final ν_2 , alternativamente es posible alcanzar el mismo estado final absorbiendo fotones de mas alta energía para alcanzar un estado intermedio desde donde se puede decaer hasta el estado final mediante la emisión de luz. Aún cuando los estados inicial son los mismos, las reglas de selección cambian. Esto implica que la información revelada por espectroscopia Raman (vibracional o electrónica) no esta necesariamente disponible mediante el proceso de medición directo.

donde se le han montado cristales analizadores específicos para resolver las líneas K_α del metal estudiado. Esto hace que los espectros de absorción de rayos X incrementen significativamente su resolución. Gracias a esto se ha podido deducir por ejemplo el estado de oxidación del molibdeno en el cofactor de FeMo de la nitrogenasa, el cual ha resultado ser Mo(III) y no Mo(V) como se había pensado anteriormente.²² En un estudio más reciente, también por espectroscopía de absorción de rayos X se ha comprobado además, que el estado de espín del Mo(III) no corresponde al que predice la regla de Hund con tres electrones desapareados en la capa 4d orientados en la misma dirección. En lugar de ello, se observa que el estado basal es consistente con tres electrones desapareados, pero con el espín de uno de ellos en sentido opuesto al de los otros dos.^{22,23} Esto se debe a una coordinación de los espines entre todos los centros metálicos del cofactor. Esta armonía entre los espines de los distintos centros metálicos, que emula una comunicación o coordinación a distancia, resulta clave para dirigir la reducción del nitrógeno hasta iones amonio (que requiere la transferencia de un total de 6 electrones), de tal manera que si esta armonía se modifica, la reacción no ocurriría.

Conclusiones

Han transcurrido más de 3 siglos desde los primeros experimentos de difracción de la luz que dieron paso al desarrollo de la espectroscopía; más de 150 años desde que Maxwell publicó los principios de la teoría electromagnética, que permitieron comprender la interacción entre la materia y la luz; y más de 100 años desde que Bohr publicó su modelo del átomo de hidrógeno, que ayudó a darle sentido a los primeros hallazgos en espectroscopía y a impulsar la revolución cuántica. El desarrollo más reciente de instrumentación y de fuentes de luz modernas de alta brillantez, como es el sincrotrón, ha permitido diversificar las técnicas y las aplicaciones, logrando incrementar a cada paso, la resolución de los datos. Destaca en todo esto el nivel de detalle en la estructura electrónica de los sitios metálicos a los que se tiene acceso mediante el uso de técnicas de rayos X de alta resolución, lo que nos permite revelar correlaciones de estructura-reactividad en la química efectuada por catalizadores biológicos que de otra manera no podrían ser estudiadas. Una vez que se ha podido aumentar significativamente la resolución espacial de los espectros de rayos X, los desarrollos actuales más ambiciosos tienen que ver con el desarrollo de fuentes de cuarta generación^{4,13} conocidas como láser de electrones libres (FEL) para los cuales se hace uso de aceleradores lineales de varios kilómetros con lo cual es posible producir pulsos muy cortos de radiación con una alta brillantez, lo que permite medir espectros de rayos X de procesos dinámicos extremadamente rápidos en escalas de tiempo por debajo de los picosegundos. Usando estos aceleradores, se han podido medir, por ejemplo, las primeras estructuras geométricas de una de las especies intermedias en el fotosistema II, que es la proteína responsable de la evolución del oxígeno (O_2) a partir de la separación del agua,



durante la reacción de fotosíntesis.²⁵ Esta reacción ocurre en una escala de tiempo por debajo de los picosegundos. Otros desarrollos más accesibles involucran el seguimiento de reacciones químicas mientras estas ocurren usando catalizadores en condiciones operando y más recientemente usando microfluidos en flujo continuo,²⁶ poniendo con esto un énfasis en poder emplear otras áreas de oportunidad tiene que ver con el desarrollo de instrumentación para poder aplicar de manera directa técnicas con rayos X blandos (con energía menor a

1000 eV) en muestras de especies moleculares y en enzimas, tomando en cuenta que típicamente en este rango los experimentos hacen uso de vacíos extremos, tomando en cuenta que los gases como nitrógeno y oxígeno, así como prácticamente todos los solventes absorben de manera muy significativa. Además se mantiene como un reto el poder separar los procesos de fotoionización que ocurren de manera coherente con los procesos de emisión K_{α} y K_{β} . En este sentido, las técnicas de espectroscopía de emisión de rayos X de alta resolución aglomeran mucha información proveniente de estados asociados a diferentes trayectorias de fotoionización de los electrones $1s$.²⁷ Sería deseable entonces que pudiera medirse la emisión desde solo alguno o algunos de estos estados de manera similar a como ocurre en la espectroscopía Raman de rayos X, a fin de que pudiera resultar en una técnica mucho más informativa de lo que ya lo es actualmente.

Referencias

1. Newton, I., *Opticks Or, A Treatise of the Reflections, Refractions, Inflections, and Colours of Light*, **1704**.
2. Sabra, A., *Theories of Light from Descartes to Newton*; **Cambridge University Press: 1981**.
3. Rydberg, J. R. XXXIV. On the structure of the line-spectra of the chemical elements. *The London, Edinburgh, and Dublin Philosophical Magazine and Journal of Science* **1890**, 29, 331-337. 10
4. Cramer, S. *X-ray Spectroscopy With Synchrotron Radiation, Fundamentals and Applications; Biological and Medical Physics, Biomedical Engineering*; Springer: **2020**.
5. Barkla, C. XXXIX. The spectra of the fluorescent Röntgen radiations. *The London, Edinburgh, and Dublin Philosophical Magazine and Journal of Science* **1911**, 22, 396-412.
6. Seigbahn, M. Relations between the K and L Series of the High-Frequency Spectra. *Nature* **1916**, 96, 676.
7. Jensen, W. The Origin of the s, p, d, f Orbital Labels. *Journal of Chemical Education* **2007**, 84, 757.
8. Beléndez, A. La unificación electromagnética: 150 aniversario de las ecuaciones de Maxwell. *Métode* **2015**, 16-21.
9. Maxwell, J. Dynamical Theory of the Electromagnetic Field. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London* **1865**, 155, 459-512.
10. Dirac, P.; Bohr, N. The quantum theory of the emission and absorption of radiation. *Proceedings of the Royal Society of London. Series A, Containing Papers of a Mathematical and Physical Character* **1927**, 114, 243-265.
11. Sagan, C. The Surface Temperature of Venus. *Astronomical J.* **1960**, 65, 352-353.
12. Sagan, C. The Planet Venus. *Science* 1961, 133, 849-858.
13. Robinson, A. L., *History of Synchrotron Radiation sources; X-Ray Data Booklet*; Lawrence Berkeley National Laboratory: 2009.
14. Lytle, F.W. The EXAFS family tree: a personal history of the development of extended X-ray absorption fine structure. *Journal of Synchrotron Radiation* 1999, 6, 123-134.
15. Ma, L.; Gavini, N.; Liu, H.; Hedman, B.; Hodgson, K. y Burgess, B. Large scale isolation and characterization of the molybdenum-iron cluster from nitrogenase. *Journal of Biological Chemistry* 1994, 269, 18007-18015.
16. Hämäläinen, K.; Siddons, D. P.; Hastings, J. B. y Berman, L. E. Elimination of the inner-shell lifetime broadening in x-rayabsorption spectroscopy. *Phys. Rev. Lett.* 1991, 67, 2850-2853.

