



# *TOMOGRAFIA ELECTRÓNICA EN CIENCIA DE MATERIALES*

*Trabajo fin de master de Jesús González Casablanca  
Máster Universitario en Tecnologías Ópticas y de la Imagen  
de la Universidad Complutense de Madrid*

*Abril de dos mil diecisiete*

*Tutor UCM: J.M. López Alonso*

*Tutor CSIC-CNB: C.O. Sánchez Sorzano.*



## *Presentación*

Presentamos un documento sobre tomografía electrónica con dos partes diferenciadas.

La primera parte es una introducción teórica a la tomografía en general y a la tomografía electrónica en particular, donde hemos pretendido exponer las ideas y fundamentos en los que se basa la técnica de manera concisa y tan conceptual y ordenada como nos ha sido posible. Estas ideas son soportadas por una física y una matemática amplias que desarrollamos, hasta cierta extensión, en anexos adjuntos. La intención de este formato es que esta justificación físico-matemática, necesaria por otra parte, no dificulte la perspectiva general del proceso tomográfico.

El hecho de que los principios básicos de la tomografía no sean de aplicación directa a la microscopia electrónica da pie a la segunda parte de este proyecto, la experimental. La motivación principal de esta experimentación fue obtener series de imágenes de inclinación en un microscopio electrónico de transmisión, según determinados contextos, para valorar en qué medida estas series de imágenes son susceptibles de reconstrucción tomográfica, relacionando, en cada caso, los resultados obtenidos con lo expuesto en el desarrollo teórico previo.



## *Abstract*

We are presenting a work about electron tomography with two different parts.

The first part is an introduction to general tomography and electron tomography in particular, where we have tried to expose the ideas and fundamentals on which this technique is based on, and we have tried to do it in the most conceptual and orderly way that it has been possible for us. These ideas are supported by broad physic and mathematic, developed, to some extent, in attached annexes.

The aim of this format is that physical and mathematical justification, necessary on the other hand, does not hinder the general perspective of the tomographic process.

The fact that basic principles of tomography are not directly applicable on electron microscopy gives cause for the second part of this project, the experimental one. The main motivation for the experimentation was to obtain tilt series of images in a transmission electron microscope, according to some specific contexts, to evaluate to what extent these series of images are susceptible to tomographic reconstruction, relating the results obtained with the theory exposed previously for each case.



***“Todo debe hacerse tan sencillo como sea posible,  
pero no más”***

*A. Einstein*



# *Índice*

## **Primera parte:**

### **1. Introducción**

- 1.1 ¿Qué es tomografía?
- 1.2 Breve reseña histórica
- 1.3 La tomografía, un problema inverso

### **2. Fundamentos físicos y matemáticos: las transformadas de Radon y de rayos X**

- 2.1 La transformadas
- 2.2 Las transformadas inversas
- 2.3 Algoritmos para las transformadas inversas

### **3. Introducción a la microscopía electrónica de transmisión**

- 3.1 ¿Por qué microscopios de electrones?
- 3.2 El microscopio de transmisión de electrones: breve introducción técnica
- 3.3 Algunas ideas sobre microscopía de electrones
- 3.4 La imagen TEM
- 3.5 Microscopía STEM

## **Segunda parte:**

### **4. El proceso práctico de la tomografía electrónica**

### **5. Sobre la experimentación realizada**

### **6. Validación experimental de la tomografía TEM en diferentes contextos de aplicación**

- 6.1 Muestras que cumplen el requisito de proyección.
- 6.2 Muestras que no cumplen el requisito de proyección.
- 6.3 Muestras nanoestructuradas.
- 6.4 Tomografía STEM (breve comparativa).
- 6.5 Conclusiones



## 7. Bibliografía

### **Anexos:**

Anexo I: La transformada de Radon en órdenes superiores

Anexo II: Sobre la inversión analítica de la t. de Radon

Anexo III: Algoritmos para la t. inversa de Radon

III.I Método de Fourier: Th. de la sección Central

III.II La retroproyección y la retroproyección Filtrada

III.III Métodos algebraicos iterativos

Anexo IV: Sobre la formación de la imagen TEM.

IV.I Contraste de Amplitud

IV.II Contraste de fase

IV.III Contraste de difracción

IV.IV Conclusión

Anexo V: Sobre la imagen STEM



# ***1. Introducción***

## ***1.1- ¿Qué es “Tomografía”?***

“Tomografía” refiere a la reconstrucción de un objeto, o mejor dicho, a obtener un modelo del mismo, a partir de “secciones” de este objeto, ya que literalmente “tomografía” significa “visualización de secciones”.

Las raíces griegas de la palabra son “Tomos” que significa “corte”, “segmento” o “sección” y “Graphein” con el sentido de “grabar” o “escribir”. El sufijo “ia” que se interpreta como “cualidad de”.

Si bien literalmente “tomografía” refiere por tanto a componer un volumen desde cortes o secciones del mismo, hoy en día el término se asume en un sentido mucho más amplio como el conjunto de técnicas dirigidas a visualizar un objeto en tres dimensiones, aunque los datos de partida no sean estrictamente cortes o secciones del mismo. Estos datos de partida, pueden ser, por ejemplo, como es el caso de este trabajo, proyecciones bidimensionales del objeto completo.

La aplicación más relevante de la tomografía ha sido y es, sin duda alguna, como técnica de imagen para el diagnóstico médico. No es necesario mencionar los intereses e implicaciones económicas y sociales de este uso. Por otro lado, hay un interés creciente en las aplicaciones industriales de la tomografía o, como es el caso de este proyecto, en aplicaciones de investigación científica.

Una característica transcendental de la tomografía es que se trata de “un ensayo no destructivo”, en el sentido de que se pretende no alterar el objeto a estudio (o hacerlo en la menor medida posible). La relevancia de esta característica de la tomografía es obvia si se piensa, por ejemplo, en imagen médica ya que esto supone poder estudiar organismos vivos con un mínimo riesgo potencial para la salud.

En el caso de este trabajo vamos a centrarnos en objetos iluminados con una radiación externa, recogándose las imágenes de proyección en una pantalla o cámara digital. Ésta no es la única opción, en ocasiones no se usa tal fuente de radiación externa para iluminar el objeto, sino que es el propio objeto el que la emite porque se le ha otorgado de alguna manera esa capacidad de emitir radiación (por ejemplo, mediante la incorporación un isotopo radioactivo). Esto es práctica habitual en imagen médica.

Históricamente el desarrollo de la tomografía evoluciona íntimamente ligado al de los ordenadores, porque necesita de la potencia de cálculo de estos últimos para realizar los algoritmos matemáticos que compongan el modelo del objeto. Dado que esta potencia de cálculo de los ordenadores viene incrementándose espectacularmente en los últimos 40 o 50 años (prácticamente el número de operaciones por segundo sube un orden de magnitud cada cinco años) en esa misma progresión podemos hablar del avance de la tomografía. De ahí que “modernamente” el adjetivo “computarizada” vaya, casi inexorablemente, unido al término tomografía.

Todos tenemos nociones, al menos “intuitivas”, de que representa una radiografía convencional. Básicamente, los rayos X que pasan a través de un paciente o de una parte del mismo, se absorberán más o menos en función de la densidad de los diferentes tejidos y estructuras que encuentren a su paso: más en los huesos que en los tejidos blandos, por ejemplo. Esto es lo que determina el contraste de la imagen (Fig.1).



Fig.1. Se considera la primera radiografía médica de la historia la realizada por W. K. Röengent a la mano de su esposa

Esta primera “intuición” de lo que es una proyección, y que tendremos que revisar durante de este trabajo es, de momento, suficiente para continuar con esta introducción. Diremos que, si una imagen representa la verdadera proyección del objeto, lo hace porque el propio objeto en particular y el contexto de adquisición en general, cumplen “el requisito de proyección”, término que desarrollaremos a lo largo de esta introducción.

Es evidente la utilidad de este tipo de imágenes, pero también es evidente su gran limitación: las estructuras, los tejidos, los órganos quedan solapados o superpuestos al presentarlos en proyección. Un tejido de bajo índice de absorción superpuesto con otro de alto índice, prácticamente “no se ve”. Además, resulta imposible discernir que órganos están delante y cuales están detrás a partir de una simple radiografía. Todo lo que los médicos podían hacer antes de la tomografía era radiografiar al paciente desde diferentes ángulos para facilitar la interpretación de las imágenes.

Pensemos en la Tomografía Computarizada (en adelante TC) como una técnica que partiendo de un número determinado de imágenes 2D del objeto, como pudiesen ser radiografías, obtiene un modelo 3D del mismo. La TC es considerada el avance más significativo en la historia de la imagen médica desde el descubrimiento de los Rayos X por Röntgen en 1895.

En el caso particular de que realmente la tomografía se realice a partir de “cortes” del objeto (y no proyecciones), por ejemplo, porque la fuente de radiación sea un haz de rayos X limitado por una rendija a forma de “lámina” o de “abanico”, es frecuente referirse a esta TC como TAC (Tomografía Axial Computarizada), donde se añade el adjetivo “axial” en alusión a que los cortes son “vistas desde un eje”, que normalmente es el más longitudinal del objeto.

Por último, mencionar que, aunque ya nos hemos referido a la tomografía como un “ensayo no destructivo”, será frecuente en la práctica que los datos experimentales estén limitados por la dosis de radiación a la que se somete “el objeto” (entendiendo por “objeto” al paciente en TC médica, “una muestra” en caso de la microscopia electrónica, o “una pieza” en el caso de la tomografía industrial, por ejemplo). Esto resulta especialmente relevante el caso de personas o animales, dado que la fuente de radiación suelen ser rayos X, y habrá que buscar un compromiso entre la calidad de las imágenes y una dosis de radiación lo más baja posible.

## ***1.2- Breve reseña histórica***

El primer tomógrafo se debe al ingeniero inglés G. N. Hounsfield cuando en 1967 dirigía la sección médica del laboratorio central de investigación de la compañía industrial y discográfica EMI.

Antes de que Hounsfield construyese los primeros sistemas TC, en 1963 el físico norteamericano A.M. Cormack había indicado la posibilidad práctica de esas mediciones y sus potenciales aplicaciones en medicina, estableciendo las bases para ello. Por eso, históricamente, Cormack es considerado coinventor de la TC y por eso ambos compartieron el Nobel del 79.

En el 71 se realiza el primer escáner craneal en un hospital de Londres y la técnica se comercializa en el 73 (era el EMI Mark I, que generaba imágenes de 80x80 pixels y tardaba 9 horas en realizar ese escáner).

La configuración inicial era un fino haz lineal de rayos X con un detector enfrente en la que ambos elementos se desplazaban en paralelo para cubrir un plano, lo que obligaba a girar al paciente. Posteriormente se evolucionó a haces en forma de abanico y con múltiples detectores, donde eran estos últimos los que rotaban en torno a un paciente que ya no necesitaba moverse. De ahí a configuraciones cada vez más potentes y eficientes.

Es fácil imaginar la rápida evolución de la técnica si pensamos en las maravillas tecnológicas actuales, las cuales, a pesar del elevado coste computacional que suponen las reconstrucciones tomográficas, son tan rápidas que permiten visualizar en tiempo real procesos dinámicos como el latir del corazón.

### *1.3- La tomografía, un problema inverso*

Desde un “punto de vista matemático”, la tomografía constituye “un problema inverso” en el sentido de que tenemos que inferir el objeto (que conceptualmente es “la variable” de la “función proyección”) a partir de mediciones u observaciones de una función del mismo (valores concretos de esa “función proyección”).

El “problema directo” en general, sería calcular alguna función del objeto conocido este último. Por ejemplo, sería un problema directo calcular las imágenes de proyección partiendo de un objeto definido.

A diferencia de los problemas directos, en general los inversos suelen ser problemas “mal planteados”, y lo son porque no cumplen con alguno de los requisitos exigibles a los “problemas bien planteados” que son: existencia de solución al problema, que esta solución sea única y que esta solución sea estable.

Parece que el primero en plantearse como solucionar el problema inverso que estamos esbozando fue J. Radon en 1917, quien probó que es posible reconstruir un objeto a partir del conjunto de todas sus proyecciones posibles, y encontró una fórmula para calcular un modelo del objeto.

# ***1. Fundamentos físicos y matemáticos: las transformadas de Radon y de rayos X***

## ***2.1 Las transformadas***

Antes de introducir la transformada integral de Radon es necesario establecer “un contexto de aplicación”. Básicamente, suponemos que podemos considerar la radiación que empleamos para iluminar el objeto como un conjunto de rayos que se propagan en línea recta en cualquier medio que atraviesen, sea este medio homogéneo o no.

En lo sucesivo hablaremos de “luz” al referirnos a la radiación usada para la proyección del objeto, no necesariamente en el sentido de “luz visible” u ondas electromagnéticas. Es más, hablaremos también de “luz” al referirnos a radiación no electromagnética como es el caso del microscopio electrónico, donde “la luz” es en realidad otro tipo de ondas llamadas “de materia”, de “De Broglie” o también, para el caso de microscopios electrónicos, “ondas electrónicas”.

El hecho de modelizar la radiación como rayos nos permite a su vez entender cada punto de la imagen de proyección como una “integral de línea” en la forma que describiremos a continuación. Si imaginamos la radiación como un continuo de rayos paralelos, las líneas a las que aluden las anteriores integrales serían la trayectoria del rayo a través del objeto. La proyección del objeto será, por tanto, la representación bidimensional de una determinada propiedad física del objeto, típicamente la capacidad de éste de absorber (o transmitir) la luz utilizada en el experimento.

Modelizamos la luz como rayos y supondremos que cada uno de estos rayos atraviesa el objeto sin desviarse, cambiado tan sólo “su intensidad”. El rayo conceptual que entra al objeto se propaga por el mismo en línea recta, sin desviarse, y sale del objeto habiendo perdido parte de su energía que habrá sido absorbida por este último. En este contexto, y solo en este contexto, tiene aplicación lo que vamos a desarrollar a continuación, donde vamos a introducir las integrales de línea y las transformadas (directa e inversa) de Radon y de rayos X.

No hay que olvidar que la luz presenta también características ondulatorias y, por tanto, en alguna medida, habrá difracción, ya que esta es una característica inherente a propagación de la luz. Por el momento, vamos a obviar este hecho. Dicho de otra manera, consideraremos situaciones en las

que los “efectos difractivos” no son importantes en el sentido de que el resultado de la experimentación “se parece” al previsto por el modelo de rayos de la luz.

Probablemente el ejemplo más típico y de mayor interés por su aplicación en imagen médica sea la absorción de rayos X por cuerpos orgánicos (en general amorfos, sin estructura cristalina). En este contexto, la ley de Beer-Lambert establece la relación entre la intensidad del haz inicial del rayo  $I_0$ , el coeficiente de atenuación lineal  $\mu$ , el espesor del material  $x$ , y la intensidad del haz atenuado a la salida,  $I(x)$ :

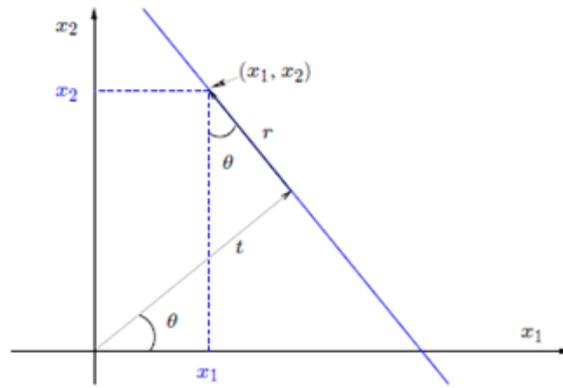
$$I(x) = I_0 e^{-\mu x}$$

Las diferentes partes del objeto atravesadas por el haz de rayos X pueden presentar distintos valores del coeficiente de atenuación lineal. Si el espesor total del objeto atravesado por el haz es  $d$  (entendamos  $x$  como la coordenada lineal en la dirección del rayo) la intensidad del haz atenuado, después de cruzar esa distancia, resulta:

$$I(d) = I_0 e^{-\int_0^d \mu(x) dx}$$

La imagen de proyección no es otra cosa más que una representación de intensidades  $I(d)$  para cada punto de esta proyección, la cual representa la atenuación de la  $I_0$  entrante (que se supone conocida por principio) según la anterior integral de línea. Lo que acabamos de exponer se corresponde bastante bien con la idea intuitiva de “sombra” de objetos translucidos que todos tenemos de la experiencia cotidiana. Cuando hablemos de “reconstruir el objeto” a partir de las imágenes de proyección descritas, nos referimos en realidad a reconstruir el objeto según la propiedad física que determine las proyecciones. Quizás fuese más propio decir que reconstruimos un modelo del objeto respecto de esa propiedad concreta, por ejemplo, respecto de su coeficiente de atenuación a los rayos X o a la luz visible.

Conviene en primer lugar recurrir a la ecuación normal de la recta (también llamada de Hesse). En esta ecuación las coordenadas cartesianas de la recta se expresan en función de los parámetros  $t$  y  $\theta$  que caracterizan la recta, y que son respectivamente la distancia de la recta al origen y el ángulo entre la normal a la recta y el eje de abscisas.



$$\begin{cases} x = t \cos \theta - r \sin \theta \\ y = t \sin \theta + r \cos \theta \end{cases}$$

$\Rightarrow x \cos \theta + y \sin \theta = t$  (ecuación de Hesse de la recta)

Definimos ahora la función  $\delta$  de Dirac sobre esa recta:

$$\delta (x \cos \theta + y \sin \theta - t)$$

La función  $\delta$  será nula en todo el plano XY excepto sobre los puntos de la recta donde será tendente a infinito. Con esto podemos introducir la integral de línea extendida a todo el espacio 2D, pero que resultará no nula sólo sobre puntos de la recta en los que además la propiedad del objeto que vinculamos a la proyección ( $f(x,y)$  en el esquema) tampoco sea nula. Solo estamos formalizando el concepto intuitivo de proyección. Esta idea de proyección se muestra en la siguiente figura:

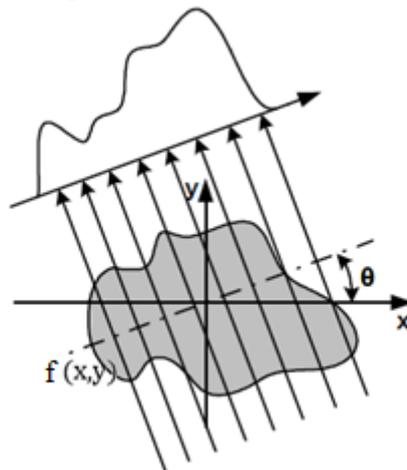


Fig. 2 Proyección de un objeto de densidad no homogénea

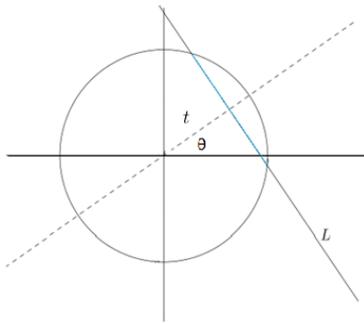
Así, fijado  $\theta$ , que marca la dirección de los rayos, la intensidad sobre de cada punto de la recta es a lo que vamos a llamar “proyección”  $P_\theta(t)$  de una función  $f(x, y)$ .

$$P_{\theta}(t) = \int_{-\infty}^{\infty} \int_{-\infty}^{\infty} f(x,y) \delta(x \cos \theta + y \sin \theta - t) dx dy$$

Es precisamente esta proyección a lo que llamamos *transformada de Radon* de la función objeto  $f(x,y)$ . También suele llamarse  $R\{f(x,y)\}$  alternativamente a  $P_{\theta}(t)$ . Este es el contexto preciso del “requisito de proyección” que ya habíamos mencionado en la introducción anterior.

En particular, si  $\theta = 0$ ,  $t$  coincide con el eje  $x$ . La función  $\delta$  se define sobre este eje y la proyección toma una forma más simple:

$$P_{\theta=0}(x) = \int_{-\infty}^{\infty} f(x,y) dy$$



Así, por ejemplo, un círculo (con densidad constante) tendrá la misma proyección en cualquier dirección. El valor de esta proyección sobre cada punto de la recta  $t$ , dependerá de la longitud del segmento contenido en el círculo (el tramo azul en dibujo).

Queda formalizado el concepto de proyección, incluso para el caso de objeto 3D a su imagen de proyección 2D, entendiendo el primero como una sucesión de secciones 2D a las que aplicar la transformada de Radon vista (Fig.3). También cabe entender la proyección del objeto como una aplicación directa del espacio tridimensional al bidimensional de la pantalla. Hablamos entonces de la transformada de rayos X, muy relacionada con la de Radon y que desarrollamos en el Anexo I. En este mismo anexo generalizamos la transformada de Radon a infinitas dimensiones porque nos parece interesante conceptualmente.

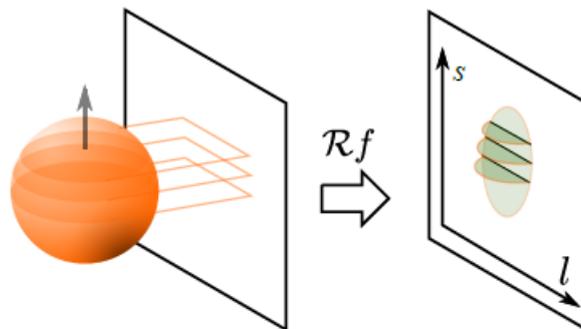


Fig.3 Proyección como sucesión de transformadas de Radon o de rayos X.

## 2.2 Las transformadas inversas

Asumiendo que vamos a tener acceso a la transformada de Radon o de rayos X del objeto, pero no al propio objeto, es decir, que tendremos acceso a las proyecciones bidimensionales del mismo, el reto que se plantea es obtener este objeto (o un modelo del mismo, más propiamente) a partir de las primeras. Esto supone en definitiva realizar “*la transformada inversa*”.

Un “cálculo analítico” de la transformada inversa de Radon es posible, pero resulta un proceso realmente complejo y tedioso que solo recogen algunos textos “especializados”. No reproduciremos en este trabajo esta resolución directa de la transformada inversa de Radon (que es la original del propio Radon). Remitimos a los lectores interesados al Capítulo IV del libro de S.R. Deans “*The Radon transform and some of its applications*” o al texto “*The Radon Transform*” de S. Helgason. En el Anexo II reproducimos la expresión de una función conocidas sus transformadas de Radon (del texto de S. Deans).

En todo caso, esta resolución analítica “directa” como tal, tiene escasa repercusión práctica porque exige conocer todas las posibles proyecciones del objeto, para todos los rayos que compongan esa proyección, lo cual no es factible como veremos a continuación al analizar el sentido de “todas las proyecciones posibles”. De hecho, en la bibliografía consultada para este trabajo, no hemos encontrado ninguna aplicación práctica de estos cálculos para reconstruir la muestra u objeto, es decir, para invertir la transformada de Radon.

Otra posible estrategia para abordar analíticamente la transformada inversa de Radon consiste en sustituir las funciones objeto,  $f(x, y)$ , y las funciones proyección,  $R\{f(x, y)\}$ , en la ecuación integral de Radon por sus desarrollos en serie de Fourier, pasando a llamarse entonces la ecuación de Fourier-Radon. Ahora es posible plantear un sistema de ecuaciones que determine los coeficientes de Fourier de la función objeto en base a los coeficientes de las funciones proyección, que son conocidos. Podemos componer así la función objeto a partir de sus coeficientes de Fourier. El inconveniente de manejar el desarrollo en serie de una función en lugar de esta, es que no sabemos a priori cuantos términos son necesarios para tener una aproximación suficiente a la función.

Lo importante hasta aquí es entender que una función objeto queda unívocamente definida por el conjunto de todas sus posibles proyecciones. Este es el problema que planteo y resolvió J. Radon en 1917, pero, ¿cuál es el conjunto de todas las proyecciones posibles del objeto?

Resulta que todas las posibles proyecciones del objeto lo son para  $\theta$  variando continuamente de 0 a  $\pi$ , pues entre  $\pi$  y  $2\pi$  sería equivalente al primer tramo. Es fácil ver que en la proyección no importa en sentido de la luz, solo su dirección. Dicho de otra manera, un objeto proyectado “de delante hacia atrás, da el mismo resultado que proyectarlo de atrás hacia delante” (realmente las proyecciones no son iguales, sino especulares, aunque contienen idéntica información).

Si representamos todas las proyecciones variando continuamente el ángulo  $\theta$  entre 0 y  $\pi$ , frente a la coordenada lineal  $t$ , tendremos la misma información que la contenida en la imagen del objeto, pero en distinta forma, que se llama “sinograma”. El sinograma se expresa en el espacio de Radon que es precisamente el sistema de referencia dado por el par  $(\theta, t)$ .

Un punto del objeto (que diste  $d$  del centro de coordenadas) aparecerá en el espacio de Radon como una función seno de amplitud  $d$ , de ahí deriva el nombre de sinograma. Lo mostramos en la figura siguiente. En este sentido el sinograma es una alternativa a la imagen como lo es la transformada de Fourier: todas tienen la misma información, solo que en diferente presentación. Al variar  $\theta$  de manera continua, hablamos de un número infinito de valores, de ahí que no sea ésta una alternativa práctica.

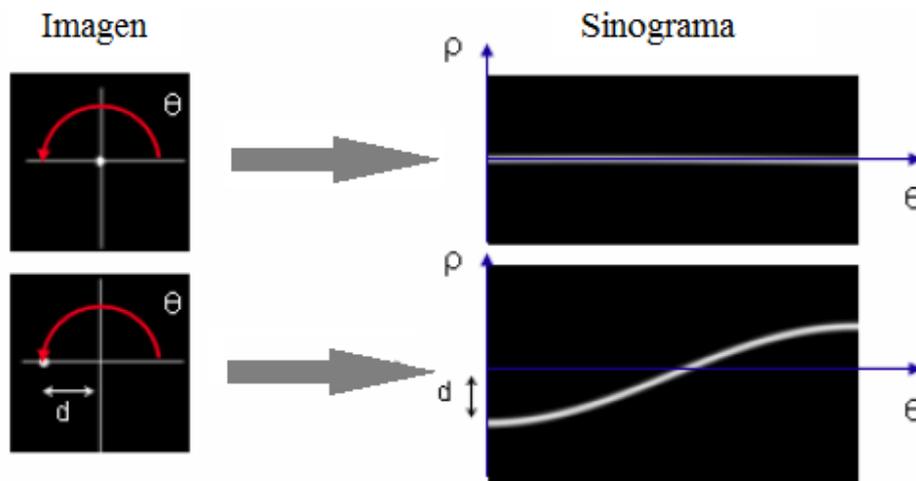


Fig.4 Sinograma fundamental, de un solo punto.

Nota: a los caracteres chinos tradicionales también se les llama sinogramas. Nada que ver con el concepto de sinograma que aquí tratamos.

A continuación, la simulación del sinograma de un objeto simple y un ejemplo de sinograma real (imagen médica):

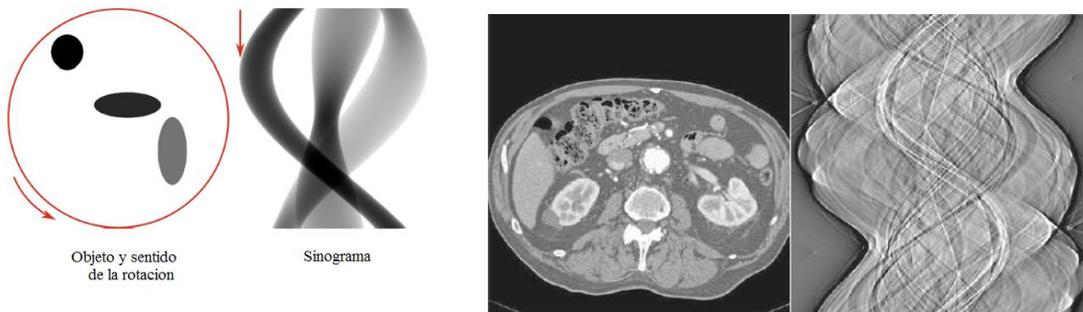


Fig.5 Ejemplos de sinogramas.

La imposibilidad práctica de manejar funciones continuas es lo que justifica el tremendo esfuerzo realizado por físicos, matemáticos e ingenieros durante las últimas décadas, para establecer métodos que permitan obtener un modelo del objeto a partir de datos reales, es decir, incompletos, con ruido y con los artefactos propios de una adquisición de datos experimental.

### ***2.3-Algoritmos para las transformadas inversas***

La implementación de algoritmos que permitan obtener un modelo del objeto partiendo de un conjunto, necesariamente discreto, de imágenes de proyección es, evidentemente, parte central del proceso tomográfico. Los métodos de reconstrucción más establecidos son los denominados métodos de Fourier, métodos de retroproyección y métodos algebraicos o iterativos.

No es el propósito de este trabajo analizar o comparar estos métodos, ni siquiera en su aplicación a la microscopía electrónica. Vamos a suponer de cualquiera de ellos que conduce a un modelo veraz del objeto si los datos de partida (la serie de imágenes de inclinación) también son proyecciones veraces.

No obstante, dado que se trata de una parte crucial del proceso de reconstrucción, incorporamos el Anexo III como una introducción a estos métodos, incluyendo los ejemplos y las demostraciones que consideramos más interesantes.

### ***3. Introducción a la microscopía electrónica de transmisión (TEM).***

Aunque la naturaleza de ondas electrónicas u ondas de materia es distinta a la de las ondas electromagnéticas, en particular a la luz visible, ambas son “ondas”, y de ahí que, muy afortunadamente, los principios de la óptica de luz visible, tan bien estudiados y conocidos, sus diseños y ecuaciones, sean extrapolables de manera “casi” directa a la óptica electrónica. Sin duda esta gran analogía conceptual entre la microscopía de luz visible y la electrónica tuvo mucho ver con el rápido desarrollo de ésta última en sus inicios, a principios de los años 30 del siglo XX.

#### ***3.1 ¿Por qué microscopios de electrones?***

Hoy día y desde hace décadas se construyen microscopios de luz visible tan perfectamente contruidos que su resolución está limitada por la propia naturaleza ondulatoria de la luz, es decir por la difracción. Así, un criterio clásico que limita la resolución que puede alcanzarse en un microscopio de luz visible es el de Rayleigh:

$$\delta = \frac{0.61 \lambda}{n \sin \alpha}$$

Donde  $\lambda$  es la longitud de onda de la luz utilizada para formar la imagen,  $n$  el índice de refracción del medio óptico imagen y  $\alpha$  el semiángulo de colección de los rayos de la lente objetivo. La clave ahora es darse cuenta que el límite de resolución depende de  $\lambda$  (en realidad esta expresión refiere a luz visible, pero es extrapolable a “luz de electrones”). Esta fórmula a veces se aproxima por  $\delta = 1/2 \lambda$  al introducir valores de  $n$  y  $\alpha$  “típicos” en un microscopio óptico, de modo que la mejor resolución alcanzable en un microscopio de luz visible serán unos 300 nm porque la longitud de onda de la luz visible está en torno a los 550 o 600 nm. Ya desde el siglo XVII la anterior limitación fue asumida con resignación en cualquier diseño de un microscopio óptico.

En 1925 Louis-Victor De Broglie teoriza sobre el comportamiento ondulatorio de las partículas en movimiento (ondas que se llamarán “de materia” o de “De Broglie”). La longitud de onda de estas ondas es  $\lambda = h/p$ , con  $h$  la constante de Plank y  $p$  la cantidad de movimiento de la partícula. En 1927 se comprueba experimentalmente esta hipótesis cuando se difractan partículas (precisamente electrones) en un material cristalino.

Esto abrió las puertas a utilizar esta nueva radiación que constituían los electrones en movimiento como fuente de luz para una nueva microscopia, dado que su longitud de onda podía ser cientos, incluso miles de veces menor que la de la luz visible. A modo de ejemplo, la  $\lambda$  de electrones acelerados con 200 kV de diferencia de potencial (que es una tensión “normal” en un TEM y concretamente coincide la de los utilizados en este proyecto) es de 0.0025 nm, de ahí que, como acabamos de mencionar, no sea esta  $\lambda$  la verdadera limitación a la resolución en microscopia electrónica. Este argumento es simplemente “la razón de ser” de la microscopia electrónica.

En 1931 Ernts Ruska construye el primer microscopio electrónico, también llamado “de electrones”. Paradójicamente, a título de “curiosidad histórica”, Ruska reconoció no conocer los postulados de De Broglie al diseñar ese primer TEM. De Broglie fue Nobel en 1929 y Ruska “tardíamente” en 1986.

Si bien con esta microscopia de electrones el límite por difracción a la resolución “se desvanece” a efectos prácticos, “el precio a pagar” es que los microscopios electrónicos son técnicamente mucho más complejos que los de luz visible. La limitación a la resolución la imponen realmente las aberraciones ópticas (cuyos fundamentos mantienen una gran analogía con la óptica de luz visible) y no, como hemos dicho, la difracción de la luz en cualquier elemento limitante del haz en el sistema óptico.

Cabe mencionar también una segunda característica de las ondas de electrones, además de la extremadamente corta longitud de onda asociada, que las hace “idóneas” como iluminación para un microscopio. Hablamos de su “relativa” capacidad de penetrar en la materia, en comparación con la luz visible. Los fotones visibles, cuya energía es típicamente inferior al electrón-voltio, limitan su penetración en materiales opacos a las primeras capas atómicas. Sin embargo, electrones acelerados con las tensiones habituales de un TEM (unos pocos keV de energía cinética), atraviesan típicamente espesores de muestra de decenas o incluso centenas de nanómetros. En cualquier caso, se trata, obviamente, de grosores extremadamente finos, pero contamos con técnicas que permiten obtenerlos en muestras de “casi” cualquier naturaleza. Esto último es determinante para que los electrones puedan utilizarse efectivamente como iluminación en microscopía electrónica.

Quizás cabría preguntarse por qué no utilizar radiación electromagnética de menor longitud de onda (léase rayos X o rayos  $\gamma$ ) en microscopia. La respuesta se fundamenta en que el índice de refracción de todos los materiales, con relación a los rayos X, es muy próximo a la unidad con pequeñas diferencias entre ellos. Efectivamente una refracción despreciable

concede todo el protagonismo en la imagen a la absorción, precisamente el requisito necesario para la proyección “en sentido Radon”. Además, con un gran poder de penetración en la materia, motivo por el cual los rayos X son tan utilizados en tomografía convencional. Pero, de otro lado, es precisamente esa refracción despreciable para rayos X en cualquier medio lo que hace imposible construir lentes refractoras para esta radiación. Por tanto, resulta imposible aplicar esta radiación a la microscopía. El proceso de formación de imágenes, como en el caso de la luz visible o las ondas electrónicas, no se puede llevar a cabo con los rayos X.

### ***3.2 El microscopio electrónico de transmisión: breve introducción técnica.***

Ya hemos comentados que existe una gran analogía conceptual en términos “de óptica” entre el microscopio electrónico de transmisión y el microscopio de luz visible transmitida, éste último generalmente mucho más conocido. Frecuentemente nos referimos al microscopio de luz visible simplemente como “microscopio óptico”, aunque estrictamente hablando, tan “óptico” es este microscopio como el electrónico.

Quizás, la mejor manera de introducir el TEM como instrumento sea compararlo con el óptico. Las enormes diferencias técnicas son consecuencia de que la iluminación de la muestra en el TEM se realiza con un haz de electrones de alta energía cinética (típicamente entre 100 y 300 keV) en vez hacerse con luz visible.

A lo largo del eje óptico del TEM se sitúan las lentes, bobinas de un hilo conductor que al ser recorridas por una corriente eléctrica continua del orden de los amperios, crean un campo magnético que actúa sobre los electrones del haz de manera análoga a las lentes de vidrio sobre la luz visible en el microscopio óptico. Estos devanados se disponen a lo largo del eje óptico del microscopio con sus ejes de revolución coincidiendo en lo posible con el primero. A pesar de la analogía de las lentes magnéticas como “medios refractores” con las lentes clásicas, existen diferencias. Por ejemplo, las lentes de vidrio tienen potencias definidas y constantes, mientras que la potencia de la lente magnética dependerá de la magnitud instantánea del campo magnético que crea. Este campo magnético depende de la excitación de la bobina por la corriente que circule y esta corriente es controlada a voluntad por el microscopista, de modo que hablamos de lentes de potencia o distancia focal variable.

La acción de las lentes magnéticas sobre los electrones resulta más sencilla de analizar considerando a los electrones del haz como partículas en vez de ondas, analizando las fuerzas que aparecen sobre estos al penetrar en la lente (fuerza de Lorentz). Esta fuerza les obliga a describir una trayectoria helicoidal, aunque recobran la trayectoria rectilínea al salir de la misma. Lo verdaderamente relevante desde el punto de vista óptico es que la lente magnética se comporta análogamente a una lente positiva o convergente en óptica del visible. También se utilizan lentes electrostáticas, pero como no se trata aquí de entrar en demasiados detalles técnicos, nos limitamos solo a mencionarlas y a remitir a los textos especializados a quien pudiese estar interesado en la tecnología, sugiriendo los capítulos 5 a 9 del William-Carter precisamente dedicados estos aspectos técnicos de la microscopía electrónica (referencia bibliográfica número 9).

Otra diferencia técnica fundamental entre el microscopio electrónico de transmisión y el óptico es el medio por el que viaja la radiación: la atmósfera en el segundo y alto vacío en el primero. Hemos de evitar que los electrones del haz sean dispersados por las moléculas del aire en su camino, que es típicamente de 1 o 2 m desde donde son generados (el cañón de electrones) hasta donde son observados (pantalla fluorescente o cámara CCD o CMOS). La única alternativa es retirar todo el aire (al menos a un nivel suficiente) del conducto por el que viajan los electrones a lo largo de la columna del microscopio.

La descripción anterior es una simplificación, casi llevada a extremo, de máquinas realmente complejas y que a nuestro entender son un excelente ejemplo del desarrollo técnico y científico alcanzado por el ser humano. Mostramos algunos microscopios modernos de este tipo.

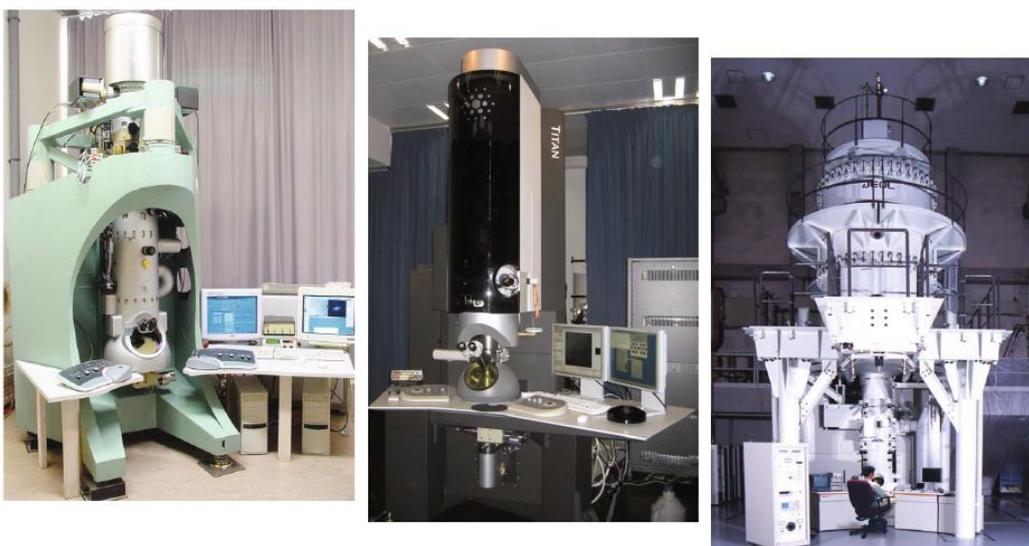


Fig.6 Algunos microscopios electrónicos de transmisión modernos

### 3.3 *Algunas ideas sobre microscopía de electrones.*

De acuerdo a los postulados de De Broglie, los electrones pueden considerarse ondas o partículas, pues son ambas cosas al mismo tiempo. En todo caso, los electrones son “ionizantes” en el sentido de que son capaces de arrancar otros electrones de los átomos de la materia con la que interactúan, incluso los más internos, que son los más fuertemente ligados al núcleo.

La principal ventaja de esta interacción con intercambio energético es que se producen muchas señales secundarias que pueden ser aprovechadas para, por ejemplo, realizar diferentes espectroscopias de la muestra. La principal desventaja es que esta interacción supone siempre, en alguna medida, que la muestra se dañe (se produce calentamiento, descomposición radio-química o radiólisis, rotura de enlaces químicos, etc.). Por supuesto, existen técnicas que tratan de minimizar este daño, como por ejemplo reducir todo lo posible la intensidad del haz de electrones (en especial si se disponen de detectores de alta sensibilidad) o enfriar la muestra durante la observación con un portamuestras especial, entre otras posibilidades. En este trabajo vamos a asumir que la muestra no es alterada significativamente durante la observación. Cualquier usuario de la microscopía electrónica sabe de lo arriesgado de esta suposición, ya que todas las muestras son alteradas en alguna medida por el alto vacío del microscopio y muy especialmente por el haz de electrones.

Un microscopio electrónico de transmisión trabaja siempre con muestras “finas”. A falta de cuantificar y dar sentido a este concepto, resultaría inmediato comprobar que muestras con más de “unas pocas micras” de grosor resultan opacas en un microscopio de transmisión operando a las tensiones habituales de 100 o 200 kV.

Al atravesar los electrones del haz esta muestra delgada, muchos de estos electrones pueden hacerlo sin prácticamente interactuar con la muestra, y por tanto sí alterar su trayectoria. Se llaman unscattered o no dispersados.

Los electrones no dispersados conforman lo que se denomina “el haz directo”, que también se llama “haz transmitido” por abuso del lenguaje porque todos los haces que atraviesen la muestra, aun habiendo sido desviados, son en realidad “transmitidos”.

Los electrones que nos interesan son los que efectivamente interactúan con la muestra, los que alteran su trayectoria al atravesarla, que son por tanto los que tienen información de la misma. Entre estos puede haber cesión, o no, de energía a los átomos de la muestra: hablamos de dispersión inelástica o elástica respectivamente. Los dispersados elásticamente son, como veremos, los más importantes de cara a la formación de la imagen (en realidad habría que hablar de los electrones que no pierden una fracción significativa de su energía cinética primaria, típicamente menos de 50 eV, pues estos son también considerados “elásticos”).

De otro lado, como ya hemos mencionando, las interacciones inelásticas son la base de diferentes espectroscopias asociadas a la microscopia de electrones: espectrometría por energía dispersiva de rayos X (X-EDS), espectrometría de pérdida de energía de electrones (EELS), excitación de plasmones, excitación de fonones, etc. No entraremos en ellas, ni siquiera en una descripción básica, porque en este trabajo solo interesa la formación de la imagen. Solo mencionar que en las interacciones elásticas predomina la interacción de los electrones primarios del haz con los núcleos de los átomos de la muestra, y en las inelásticas la interacción con la “nube electrónica”.

### ***3.4 La imagen TEM***

El contraste de la imagen TEM está condicionado por multitud de factores que alejarán o acercarán esta imagen a la verdadera proyección de la densidad de la muestra en el sentido que hemos venido considerando.

En resumen, pueden ser consideradas como tales proyecciones las imágenes de muestras sin estructura atómica cristalina, que sean “suficientemente finas” y que no se adquieran a “muy altos” aumentos. Este suele ser “el dominio natural” de la microscopia electrónica aplicada a la biología o los polímeros: se cumple en aproximación suficiente el requisito de proyección. No es necesariamente así en ciencia de materiales, precisamente donde nos proponemos realizar la experimentación de este proyecto.

Continuando con la idea de que esta introducción proporcione una perspectiva clara del proceso de la tomografía electrónica, sin desarrollos físicos y matemáticos que pudiesen distraer ese propósito, decidimos dejar para un anexo, el IV, la justificación de lo dicho en el párrafo anterior sobre la imagen TEM. Pensamos que con este formato podemos dedicar al crucial proceso de la formación de la imagen en el TEM la extensión que merece sin hacernos perder una perspectiva general de la tomografía.

### ***3.5 Microscopía STEM***

Dado que la cristalinidad de la muestra va a suponer un inconveniente importante a la hora de interpretar la imagen TEM como una proyección, y teniendo en cuenta que la mayoría de los materiales de interés en ciencia de materiales son cristalinos, con frecuencia “altamente” cristalinos, parece obvio el interés suscitado en desarrollar técnicas de microscopía electrónica que permitan asociar la imagen obtenida con la verdadera proyección de la densidad de la muestra, al menos en mayor medida de lo que puede hacerse con un TEM convencional. Hablamos del microscopio de Barrido-Transmisión o STEM (Scanning Transmission Electron Microscope), muy especialmente cuando se equipa con un detector de electrones HAADF (High Angle Annular Dark Field).

A este tipo de microscopio electrónico dedicamos el Anexo V para justificar que efectivamente las imágenes que proporciona esta técnica son proyecciones de la muestra, al menos, como decimos, en mayor medida de lo que cabe esperar en el TEM.

## ***4. El proceso práctico de la tomografía electrónica.***

Los datos de partida para la reconstrucción 3D de la muestra van a ser un conjunto de imágenes de esta muestra o de una zona de interés de la misma, obtenidas con diferentes ángulos de inclinación. Un incremento angular típico que se utiliza frecuentemente es un grado sexagesimal, pues se considera que es un buen compromiso entre datos “suficientes” para una reconstrucción “aceptable” de la muestra y datos “excesivos” que supongan demasiado tiempo de adquisición en el microscopio o demasiado tiempo de computación de los datos. Así, por ejemplo, suponiendo que dispongamos de un solo ángulo de inclinación de la muestra (pueden ser dos ángulos perpendiculares), con ángulos máximos en torno a  $\pm 70$  u  $\pm 80^\circ$ , hablamos de una colección de unas 140 o 160 imágenes como datos de partida. El peso de cada una de estas imágenes suele ser de 1 a 4 Mb, pues esa suele ser la resolución de las cámaras digitales en microscopía de transmisión.

Todos los fabricantes de microscopios electrónicos ofrecen paquetes de software para la adquisición automática de las series de imágenes (series de inclinación). Esta adquisición automática consiste en que el sistema graba una imagen, gira la cantidad programada (típicamente el grado mencionado)

para, a continuación, grabar la siguiente. El proceso se repite entre una inclinación inicial y final que el operador ha programado.

En el proceso de adquisición de la serie, la imagen siempre se desplaza en el plano XY en alguna medida al inclinarla, incluso aunque hayamos situado el portamuestras en la altura o posición según el eje Z que minimiza este desplazamiento, que llamamos “posición eucéntrica”. El software debe reposicionar la muestra después de cada incremento angular para compensar en lo posible ese desplazamiento. Además de lo anterior al inclinar la muestra también cabe esperar alguna variación en su altura Z que de nuevo tendrá que ser corregida por el sistema de adquisición automática o la imagen quedaría desenfocada.

Lógicamente, si no se disponen de estos medios automáticos, como fue nuestro caso, la adquisición de la serie puede hacerse “manualmente” con el inconveniente de que esto suele aumentar el tiempo de adquisición, lo que resulta especialmente desaconsejable con muestras sensibles a la radiación.

Por mucho que se optimice el proceso de adquisición de la serie, siempre va a existir cierto desplazamiento entre una imagen y la siguiente. El alineamiento preciso es el primer paso del proceso de reconstrucción propiamente dicho. También podría ser necesario tener que “rotar” ligeramente las imágenes y compensar así la rotación mecánica que pudiera haberse producido al inclinar la muestra y que pudiera deberse a inevitables histéresis mecánicas. Para este alineamiento preciso es frecuente “contaminar” la muestra con pequeñas partículas esféricas que se llaman “fiduciales”, típicamente nanopartículas de oro, de modo que no solo permita realizar el re-alineamiento preciso de las imágenes sino también identificar con precisión el eje de giro y el incremento angular entre cada dos imágenes consecutivas de la serie (Fig.7).

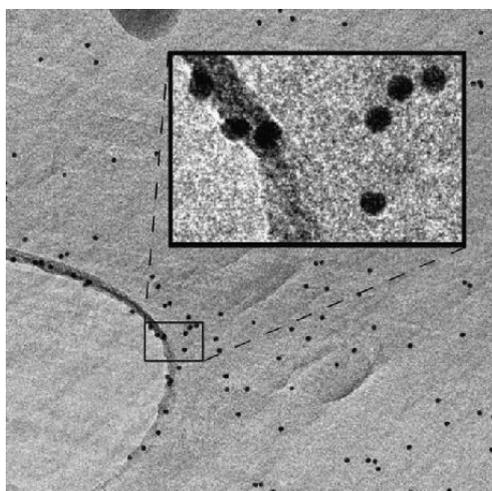


Fig.7 Partículas fiduciales en una imagen TEM

Cuando se prefiere preservar la muestra de estas partículas de referencia, el alineamiento de las imágenes suele hacerse mediante la función de correlación cruzada entre cada imagen y la siguiente. Esta última imagen “se desplazará” hasta que el coeficiente de correlación cruzada con la previa sea el máximo posible. Con esto resulta una buena aproximación al giro sin desplazamiento de la muestra. A partir de aquí, a este conjunto de datos que es la serie alineada de imágenes se le aplica alguno de los algoritmos vistos para la obtención del modelo tridimensional del objeto. Por supuesto siempre cabe todo el pre-procesado de las imágenes que se estime conveniente, como el filtrado del ruido, por ejemplo. También es habitual algún tipo de post-procesado del modelo obtenido.

Las aplicaciones informáticas disponibles para tomografía en general (reconstrucción y visualización del modelo) son muy numerosas, si bien cada una de ellas parece haber sido creada para alguna “variante” de las muchas posibles que engloban la tomografía. Por supuesto, buena parte de ellas se especializan en imagen médica. Entre estas aplicaciones muchas se ofrecen gratuitamente y otras son comerciales. Por mencionar algunas, entre las de libre acceso podemos citar las siguientes: IMOD, Serial EM, CHIMERA, BioView3D, EFTET-J, Protomo, UCSF tomography, Image J (más el plugin TomoJ), TOM Toolbox, TxBR, o ASTRA Toolbox.

Entre las aplicaciones comerciales: Amira, Avizo, Osirix, Imaris, BioVis3D, AVS/Express, Inspect3D, Eurolucida o Xplore3D, por ejemplo.

Dependiendo del programa en concreto que se utilice, será aplicable a una u otra geometría de adquisición de los datos: uno o dos ejes de inclinación, haz paralelo o divergente, etc. El modelo del objeto se calculará por uno u otro de los algoritmos disponibles. Es frecuente incluso que dentro de la misma aplicación se pueda optar por diferentes métodos de reconstrucción. Nosotros utilizaremos el programa ImageJ+TomoJ, de libre acceso, que es susceptible de utilizar varios de los algoritmos de reconstrucción vistos, y trabajaremos con series de imágenes obtenidas con un único ángulo de inclinación.

## 5. Sobre la experimentación realizada.

La experimentación de este trabajo se realizó principalmente en el Centro de Apoyo Tecnológico (CAT) de la Universidad Rey Juan Carlos (URJC), del cual el autor de este trabajo forma parte. El microscopio electrónico de transmisión que se empleó fue un Philips Tecnai 20T operando a 200 kV, el cual permite una inclinación máxima de la muestra de  $\pm 60^\circ$  (Fig.8).



Fig.8 TEM Philips Tecnai 20T del CAT de la URJC.

Las muestras seleccionadas para la experimentación fueron en todos los casos muestras en polvo. Algunas de estas presentaban desde el inicio tamaños de partículas suficientemente pequeños, de modo que la preparación se limitó por tanto a una dispersión de estas partículas sobre unos soportes específicos para esta microscopía que se denominan “rejillas” (Fig.9).

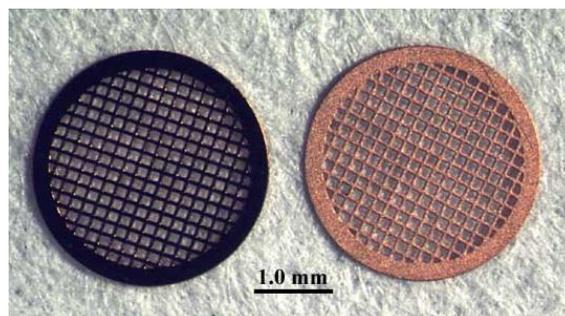


Fig.9 Rejillas TEM

Otras muestras tenían un tamaño de partícula excesivamente grande, pero no requirieron de métodos de preparación especiales distintos de la simple molturación para reducir su tamaño. Muestras en “polvo fino” suponen el único caso sencillo de preparación de muestra para el TEM. Mostramos a continuación una “típica” imagen TEM de una muestra en polvo a bajos aumentos.

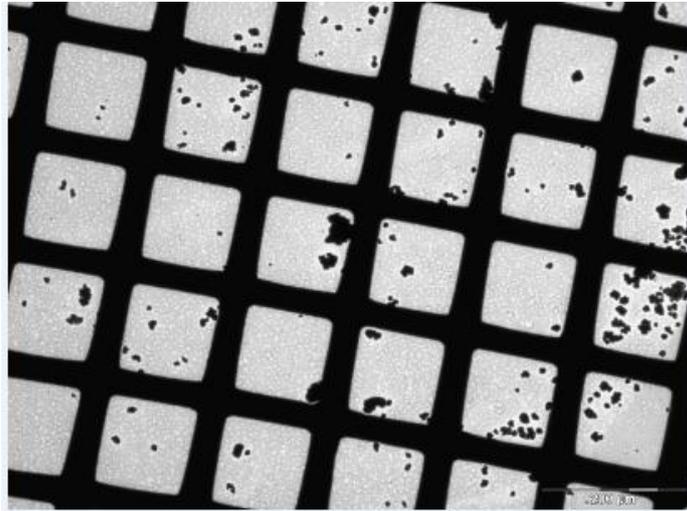


Fig.10 Imagen TEM de una muestra en polvo (bajos aumentos)

Las rejillas son a su vez soportadas en un portamuestras goniométrico para introducirlas al microscopio (Fig.11).

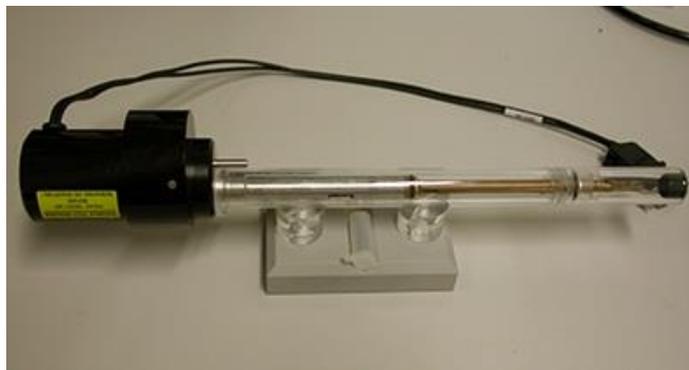


Fig.11 Portamuestras Philips de doble inclinación.

Las series de inclinación se obtuvieron de forma “manual”, lo cual pasa por introducir en el software de gestión del microscopio el valor del ángulo al que tomar cada imagen. Previamente a cada toma de imagen corregimos el desplazamiento que la imagen haya podido tener por variar la inclinación del portamuestras y, si es necesario, reenfoamos la imagen, todo esto de forma manual como decimos. Este procedimiento está lejos del actual estado del arte en tomografía electrónica, donde aplicaciones informáticas lo realizan de manera automática, mucho más rápida y eficiente.

## ***6. Validación experimental de la tomografía TEM en diferentes contextos de aplicación.***

En la parte experimental de este proyecto nos proponemos adquirir series de inclinación de imágenes en muestras de diferente naturaleza, de modo que el requisito de proyección discutido en el desarrollo teórico previo de este documento sea satisfecho en mayor o menor medida. Para entender la relación entre la verdadera proyección de la densidad de la muestra y la imagen que nos proporciona el microscopio, es necesario entender, al menos en lo fundamental, los mecanismos de formación de esta imagen, de ahí que en este momento nos parezca oportuno remitir al Anexo IV de este trabajo: “*Sobre la formación de la imagen TEM*”, al lector que pudiese no estar familiarizado con la microscopía electrónica de transmisión.

Al asumir las limitaciones a la interpretación de la imagen TEM como una proyección del objeto, se entiende los tres tipos de muestras que hemos seleccionado para la experimentación de este trabajo, y que describimos a continuación.

En primer lugar, trabajaremos con muestras con estructura atómica amorfa, donde, previsiblemente, vamos a obtener un modelo veraz del objeto.

En segundo lugar, pretendemos poner en evidencia que no es posible la reconstrucción tomográfica en muestras que no cumplan el requisito de proyección, para lo cual elegiremos una muestra de estructura atómica altamente cristalina.

En tercer y último lugar trabajaremos con muestras que, si bien no cumplirán estrictamente este requisito de proyección, cabe pensar que lo hacen con aproximación suficiente como para obtener un modelo veraz del objeto. Para ello hemos pensado en muestras de estructura atómica amorfa, pero que forman o replican estructuras periódicas nanométricas, por lo que se conocen como materiales “nanoestructurados”. En este caso, de cara a validar los resultados obtenidos, elegiremos muestras especialmente bien caracterizadas por otras técnicas.

En todos los casos, procuraremos que las muestras seleccionadas para la experimentación sean “fácilmente accesibles” (comerciales, baratas y de amplia distribución) de cara a un hipotético interés de terceros en reproducir los resultados que aquí obtengamos.

## 6.1 Muestras que cumplen el requisito de proyección.

Como ejemplo de muestra con estructura amorfa hemos seleccionado un abrasivo comercial que consiste en nanopartículas de óxido de silicio. Se trata en realidad de nanoesferas con un diámetro medio en torno a 25 o 30 nm. El nombre comercial del producto es SPM, y lo elegimos en el catálogo de abrasivos de la empresa distribuidora a laboratorios Presi. El hecho relevante para nuestra aplicación es que estas nanoesferas no tienen estructura atómica cristalina, esto es, se trata de  $\text{SiO}_2$  amorfo en cuanto a su ordenamiento atómico. Mostramos una imagen TEM y el patrón de difracción de electrones indicando que la muestra es de estructura amorfa.

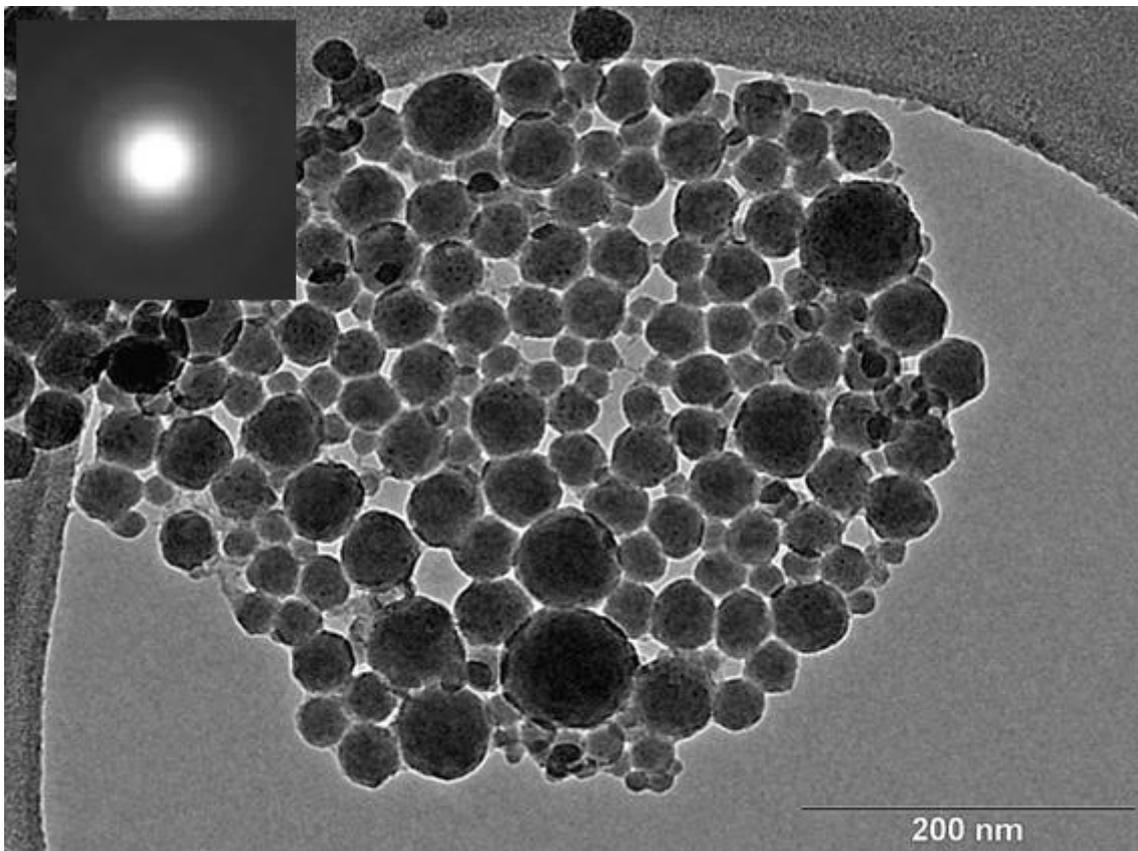


Fig.12 Aspecto general de la muestra SPM (imagen TEM)

Mostramos a continuación una breve secuencia de imágenes extraída de la serie de inclinación. Puede verse una variación “aproximadamente lineal” del contraste con la inclinación de la muestra. Por ejemplo, vemos que al superponerse dos o más nanoesferas se suman los contrastes en la zona común como corresponde a una proyección real.

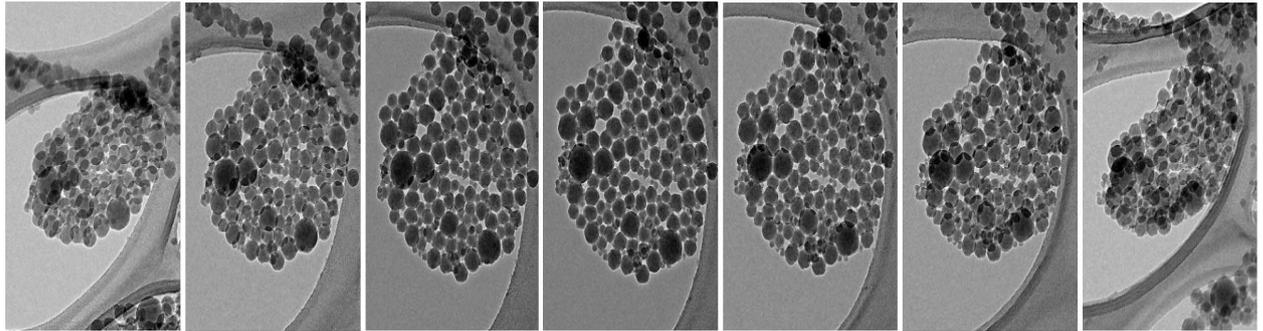


Fig.13 Secuencia de inclinación de la muestra SPM

En este caso y los siguientes, realizaremos el proceso de reconstrucción con la aplicación ImageJ + TomoJ para inferir el modelo. ImageJ es un software libre de procesamiento de imagen distribuido por el NIH (National Institutes of Health) de Estados Unidos. TomoJ un plugin específico del primero para tomografía desarrollado en el Instituto Curie de Francia.

En esta muestra, como ya hemos comentado, cabe esperar que obtengamos un modelo fiable del objeto, pues se trata del caso en el que la imagen TEM representa en mayor medida la proyección de la densidad de la muestra.

La manera en la que hemos pensado para comprobar la credibilidad del modelo obtenido consiste en generar proyecciones de este último según ángulos a los que ya tenemos las proyecciones experimentales, que son precisamente las imágenes a partir de las cuales hemos calculado el objeto. Lógicamente, si el modelo es correcto, las proyecciones experimentales y las calculadas deberían parecerse. El objeto reconstruido es presentado por la aplicación TomoJ como un “stack” o serie de imágenes en la que cada una de ellas representa un corte o sección de este “de un pixel de grosor”. ImageJ ofrece la posibilidad de calcular la proyección de este stack según las direcciones que se indiquen al programa.

Quizás sea oportuno comentar que las reconstrucciones tomográficas tienen un elevado coste computacional. Los resultados que aquí presentamos se realizaron en un ordenador de altas prestaciones para el cálculo gráfico (Workstation). Ordenadores personales requerían, en muchos casos, tiempos de cálculo de 30, incluso 60 minutos o más, lo que obviamente no resultaba práctico, máxime cuando era necesario realizar numerosas pruebas de reconstrucción hasta optimizar los parámetros.

Como parte del proceso de reconstrucción, la imagen es rotada para que el eje de inclinación de la serie coincida con el eje Y. Mostramos a continuación la imagen experimental y la proyección que se calcula del modelo según la dirección del eje Z, es decir a  $0^\circ$  de inclinación de la muestra.

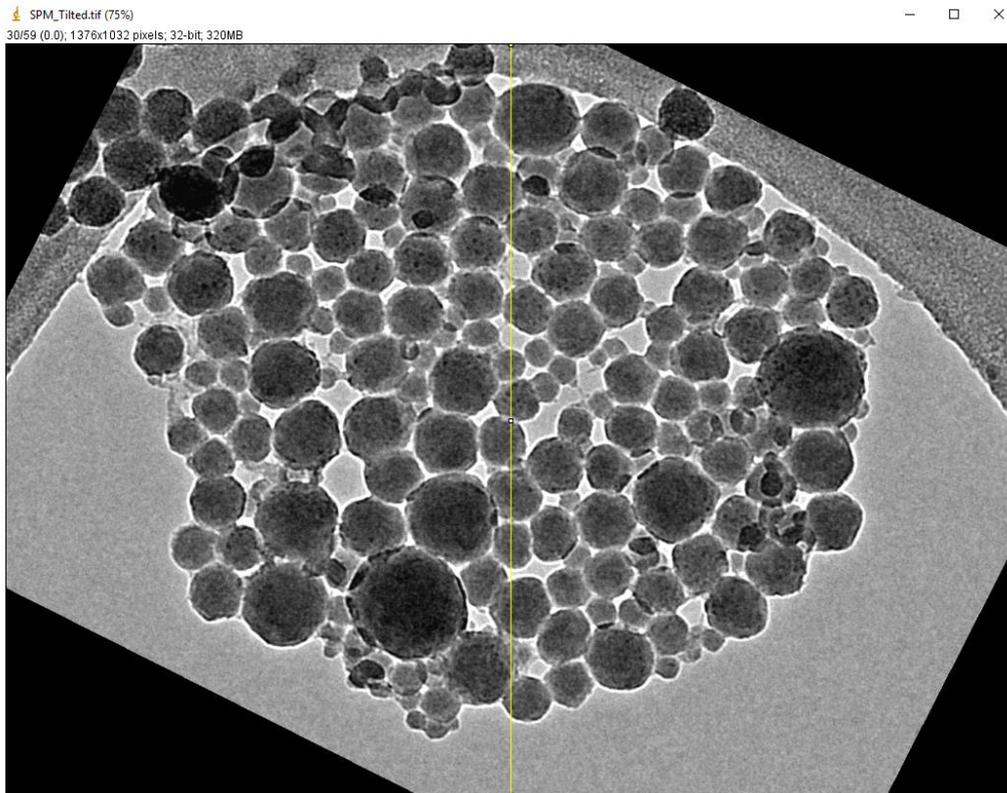


Fig.14 Imagen TEM a 0 grados de inclinación

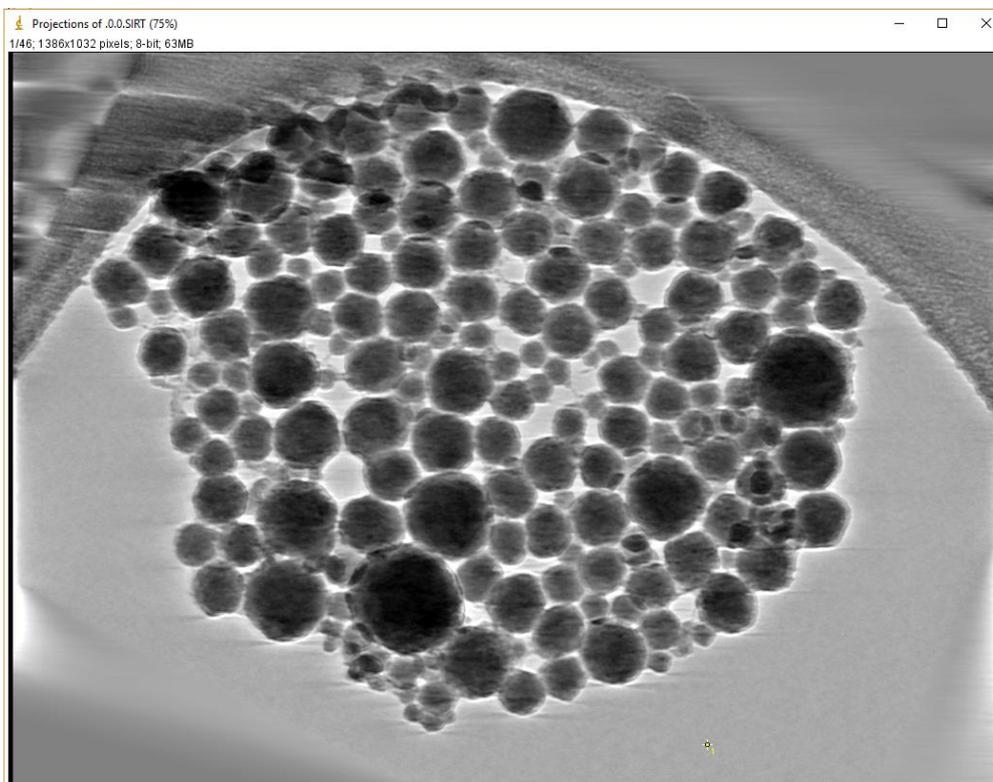


Fig.15 Proyección del modelo a 0 grados de inclinación (imagen calculada)

Es clara la similitud entre ambas imágenes: se mantienen las formas, los tamaños y las proporciones. En sí mismo, esto ya supone una gran satisfacción para quien escribe, que se inicia en la tomografía electrónica con este trabajo. Tengamos presente que estamos comparando proyecciones experimentales de un objeto real con proyecciones calculadas de un modelo matemático del objeto, obteniéndose un gran parecido entre ellas.

Es más, vamos a presentar imágenes experimentales a muy distintos ángulos y las proyecciones calculadas a esos mismos ángulos para seguir comprobando una más que aceptable similitud entre ellas (imágenes 16 a 23). En las zonas donde se superponen parcialmente esferas podemos comprobar que la coincidencia entre la imagen TEM y la simulación es muy alta, casi “sorprendente” mi opinión.

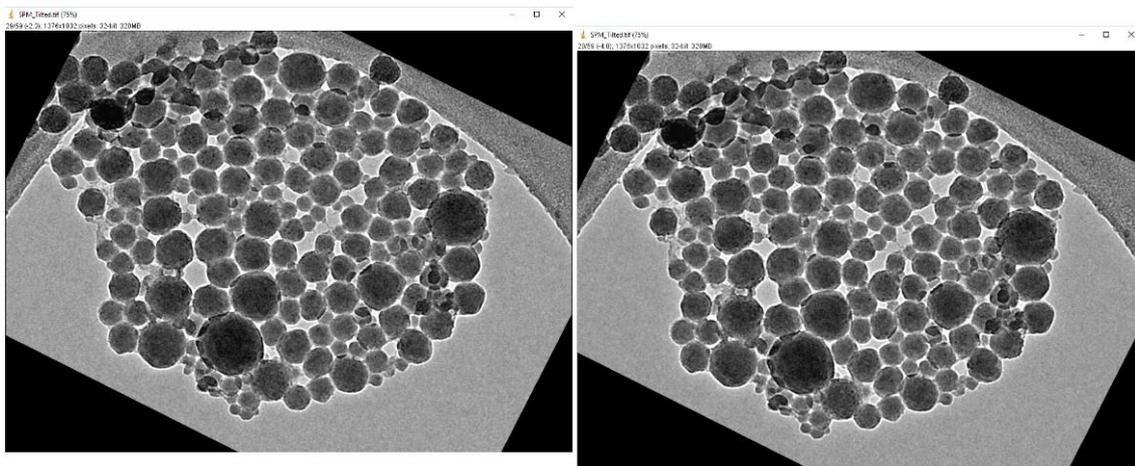


Fig.16 Imágenes TEM a 2 y 4°

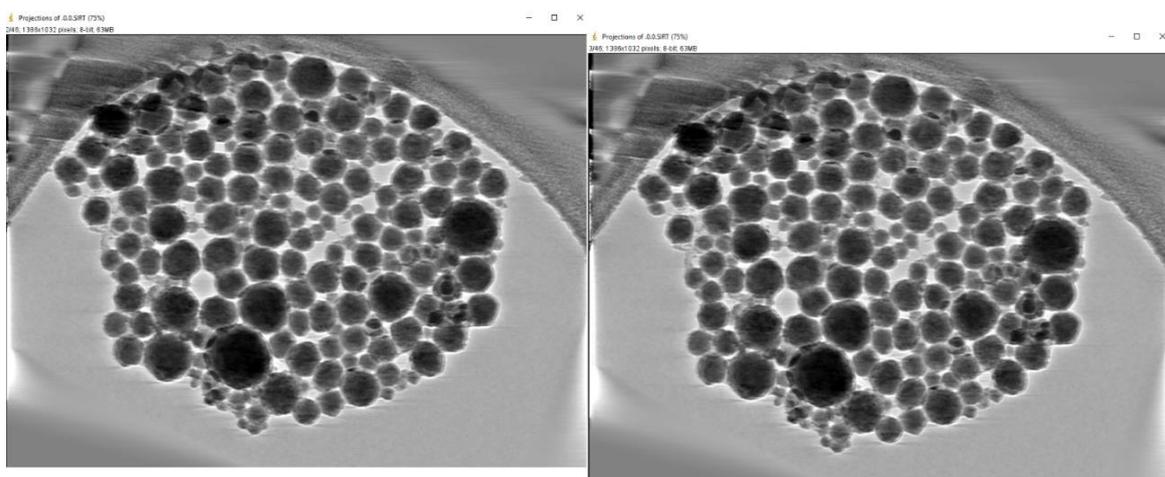


Fig.17 Proyecciones calculadas a 2 y 4°

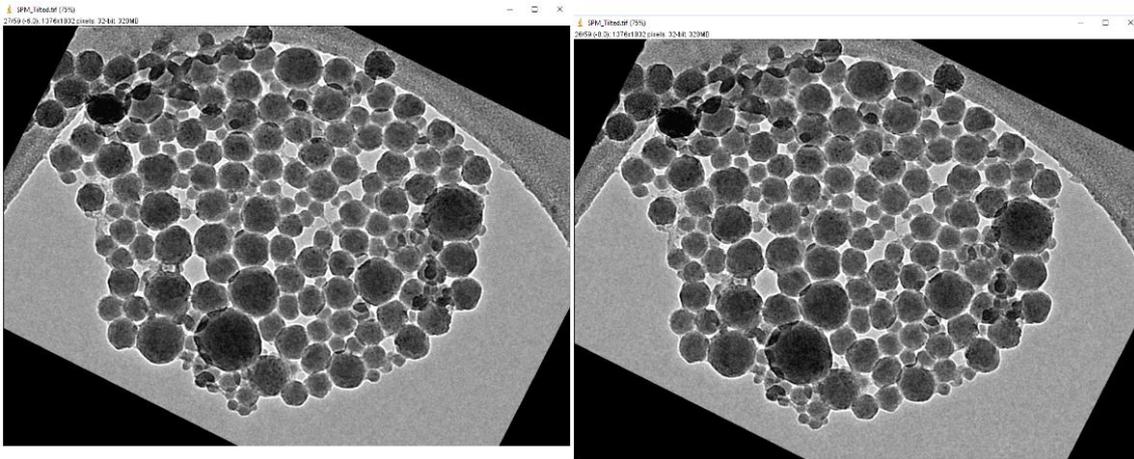


Fig.18 Imágenes TEM a 6 y 8°

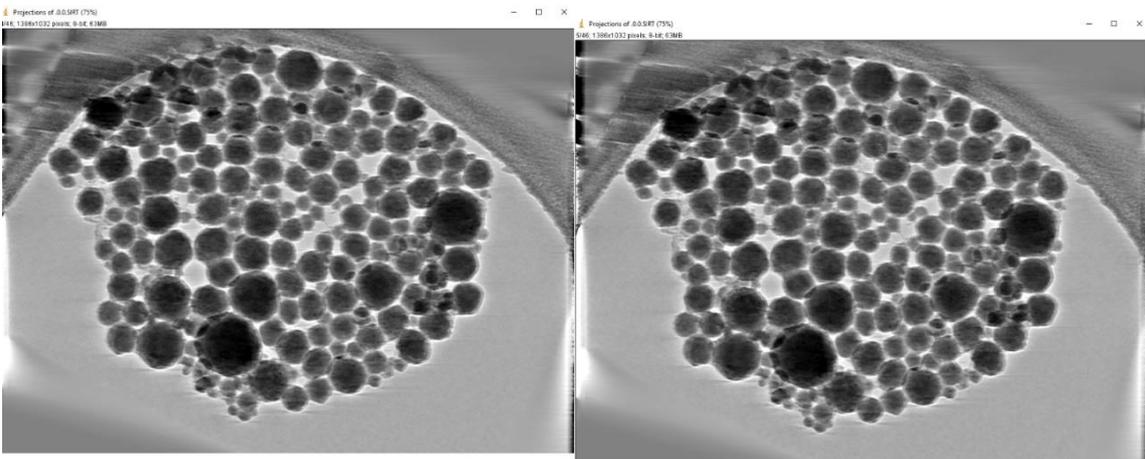


Fig.19 Proyecciones calculadas a 6 y 8°

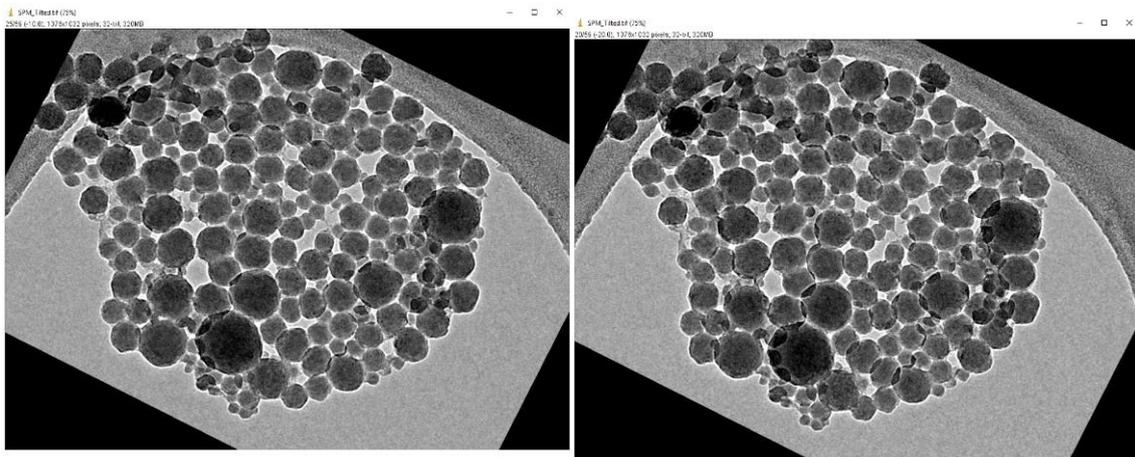


Fig.20 Imágenes TEM a 10 y 20°

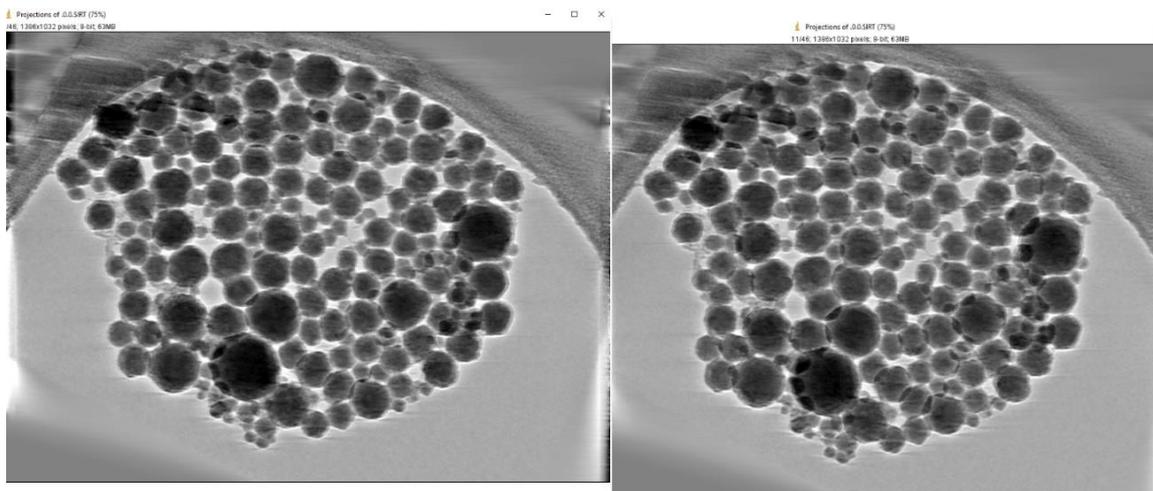


Fig.21 Proyecciones calculadas a 10 y 20°

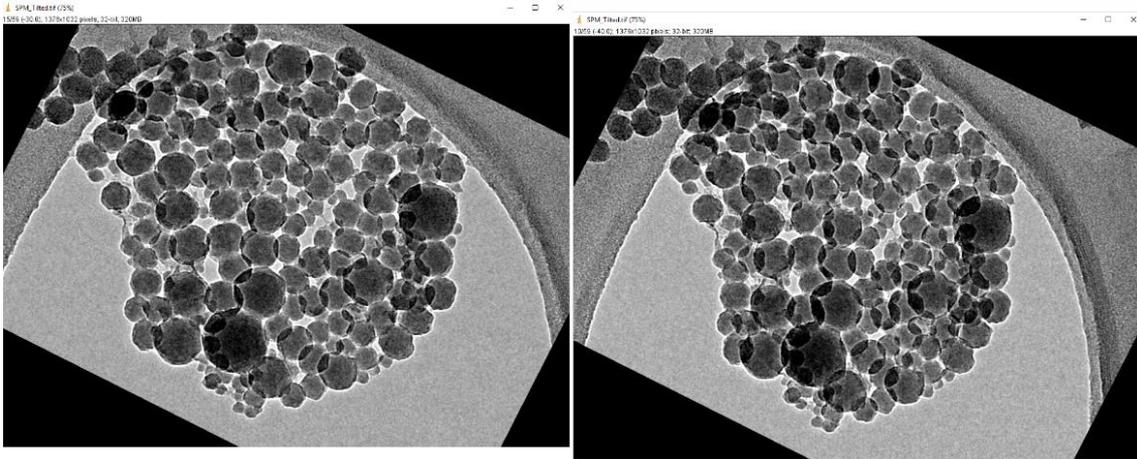


Fig.22 Imágenes TEM a 30 y 40°

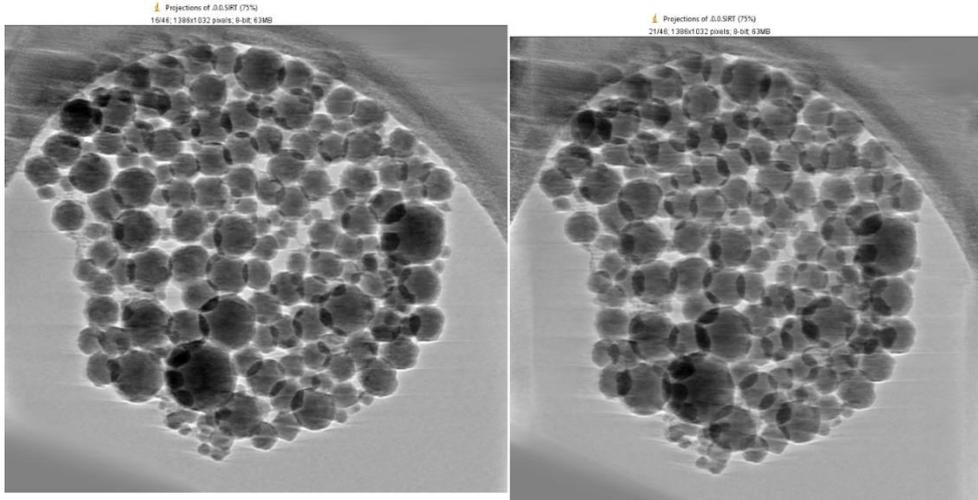


Fig.23 Proyecciones calculadas a 30 y 40°

Mostramos a continuación una de estas secciones de modelo reconstruido. Concretamente de una reconstrucción por un método algebraico iterativo, al que también corresponden las proyecciones anteriores, si bien en este caso particular de muestra amorfa todos los métodos de reconstrucción probados disponibles en TomoJ (iterativos y de retroproyección) condujeron a similares resultados, todos ellos de calidad.

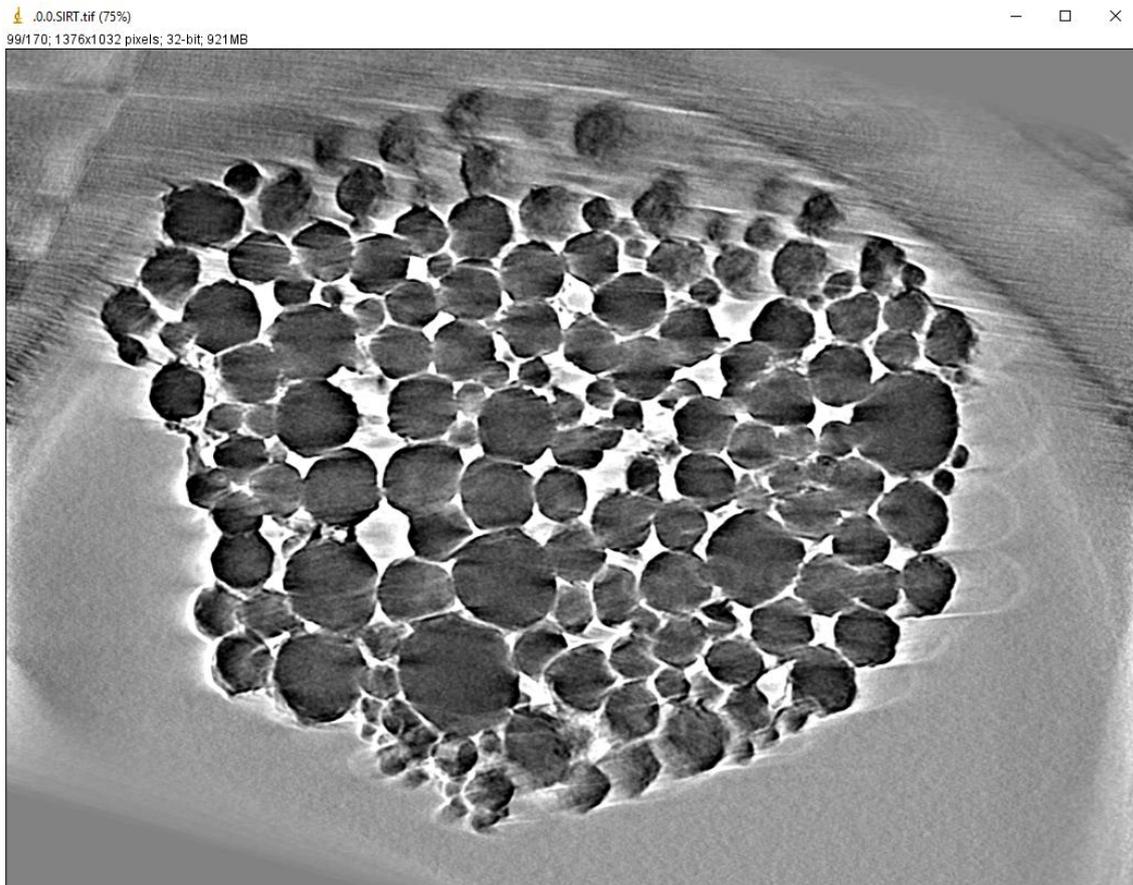


Fig.24 Un corte o “slice” del modelo reconstruido

A modo de conclusión de este apartado, decir que hemos puesto de manifiesto que la tomografía electrónica, con muestras y condiciones de adquisición de imágenes satisfaciendo el requisito de proyección, permiten la obtención de un modelo fiable y veraz del objeto.

## 6.2 Muestras que no cumplen el requisito de proyección.

De la infinidad de muestras que, en principio, no van a cumplir el requisito de proyección por ser cristalinas o parcialmente cristalinas, elegimos para las próximas pruebas una “altamente” cristalina, con el propósito de evidenciar hasta qué punto puede alejarse la imagen TEM de la verdadera proyección de la densidad de la muestra.

Obtenemos imágenes de una partícula de carburo de silicio con dimensiones lineales del orden de 200 o 300 nm, de la que comprobamos que es cristalina mediante su diagrama de difracción. No es relevante para nuestro propósito determinar la estructura, ni los parámetros de red.

Se muestra a continuación la imagen y el patrón de difracción obtenidos.



Fig.25 Aspecto de la muestra SiC y su diagrama de difracción.

Basta variar ligeramente la inclinación de la partícula respecto al haz de electrones ( $2^\circ$  entre imágenes de la siguiente secuencia), para que se evidencien drásticos cambios de contraste (Fig.26) que solo se explican como el contraste de difracción que analizamos en el Anexo IV.

Piénsese que tratamos con un cristal real, con defectos estructurales, tensiones, dislocaciones y, por supuesto, irregular topografía de fractura en sus superficies, lo que determina estos complejos patrones de interferencia observados.



Fig.26 Cristal de SiC con dos grados de diferencia de inclinación entre imágenes consecutivas.

Hemos presentado un caso extremo de muestras que no cumplen el requisito de proyección donde no deberían caber los algoritmos de reconstrucción analizados en la teoría, ya que estos presuponen este requisito. Aun así, es posible encontrar el modelo que mejor se adapte al conjunto de “supuestas proyecciones” de las que partimos, modelo del cual esperamos que reproduzca la forma del cristal, sus límites o bordes, pero en ningún caso el contraste de difracción.

Mostramos a continuación los resultados obtenidos. En primer lugar, la imagen TEM a  $0^\circ$  de inclinación y la proyección calculada del modelo matemático del objeto, este último calculado mediante un método iterativo.

Encontramos que coincide la forma y tamaño de las partículas, también se reconstruye bien la película soporte, pero no el contraste que se da en el interior de la partícula, precisamente el que asociamos a la difracción de Bragg. Este hecho se ve de manera aún más evidente si comparamos imágenes experimentales con las simulaciones de proyección a diferentes ángulos: vemos que las primeras cambian radicalmente su contraste en cada incremento angular de dos grados, mientras que las imágenes calculadas no lo hacen (Figuras 27 a 32). La conclusión es clara, el contraste de difracción no puede ser reproducido en el modelo calculado porque no se corresponde con la proyección del objeto.

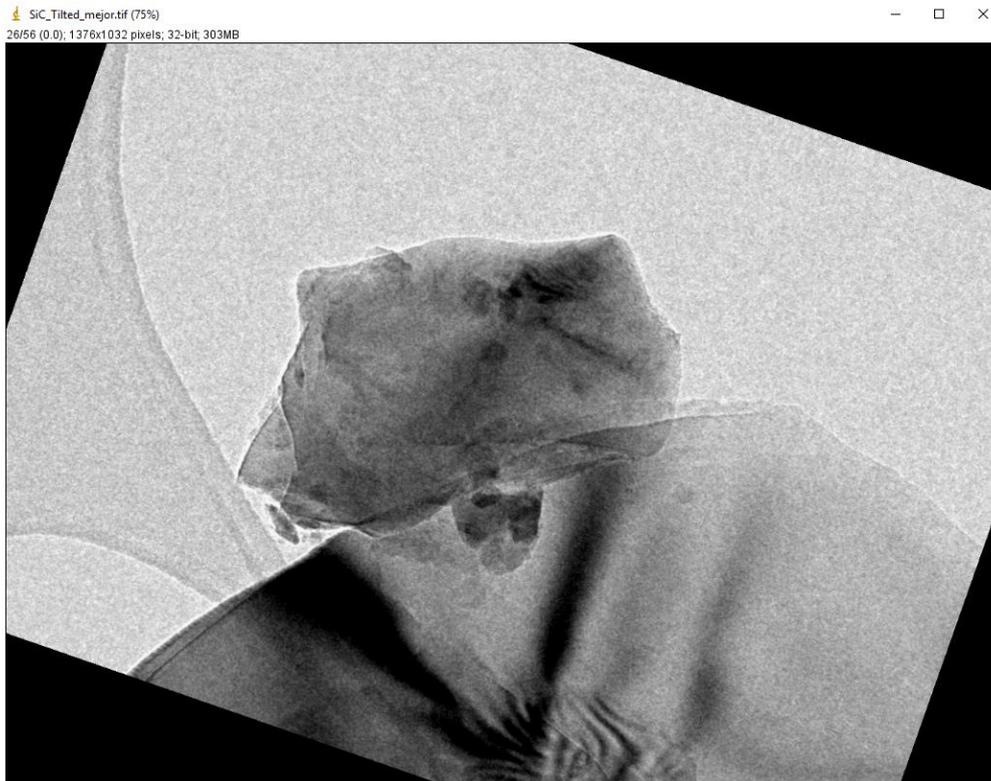


Fig.27 Imagen TEM a 0°

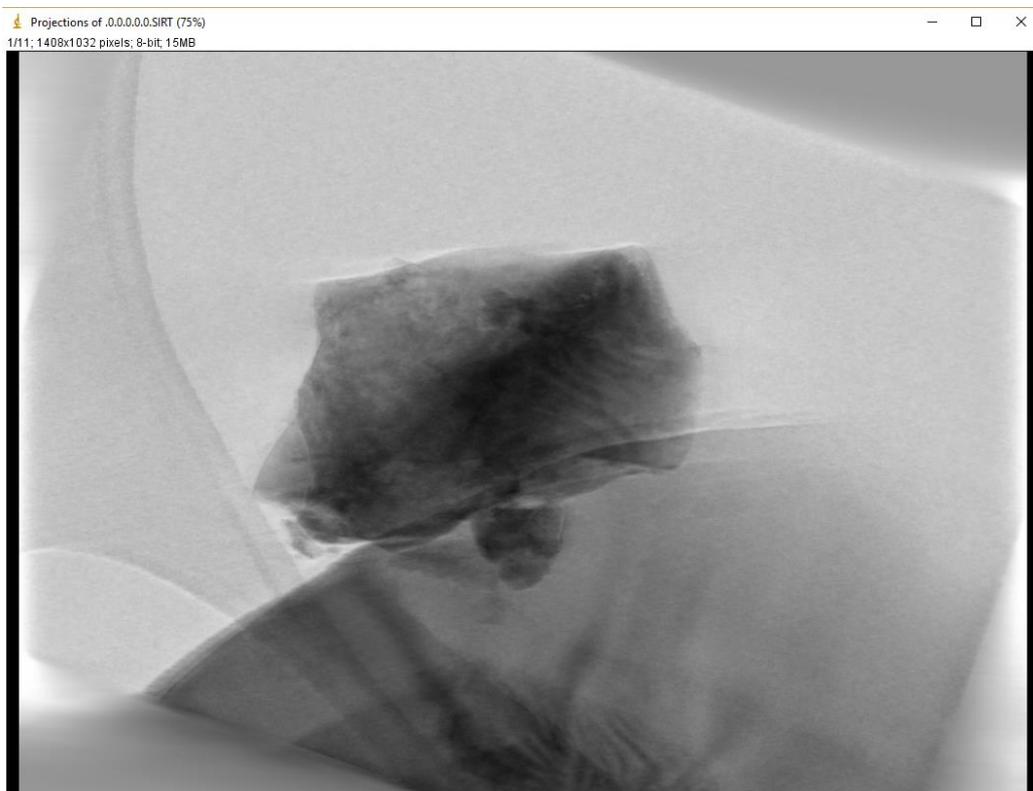


Fig.28 Proyección simulada a 0°

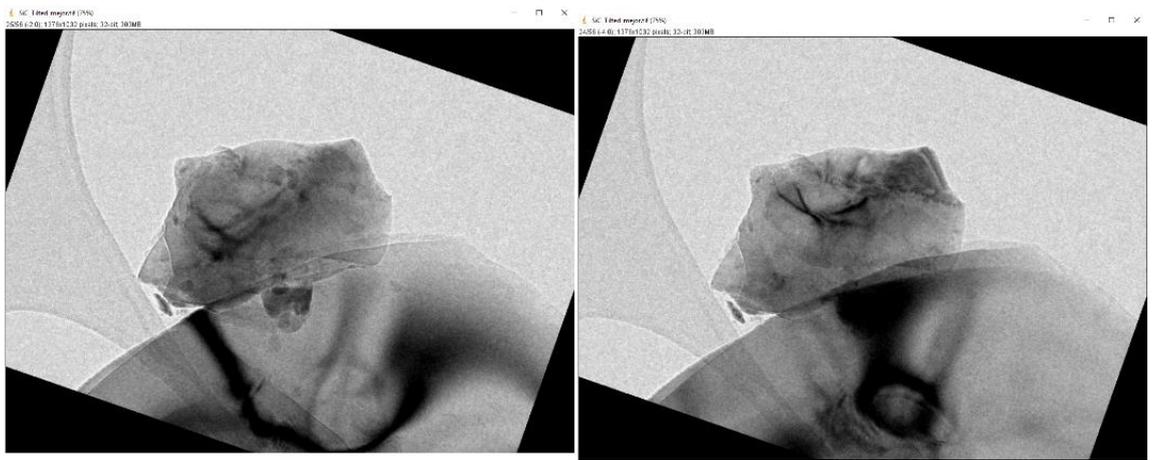


Fig.29 Imágenes TEM a 2 y 4°

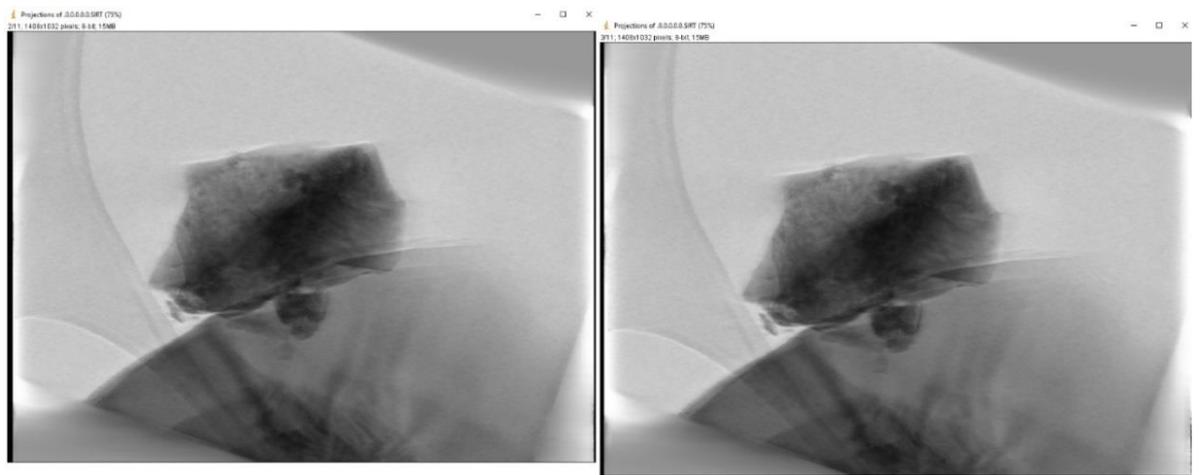


Fig.30 Proyecciones calculadas a 2 y 4°

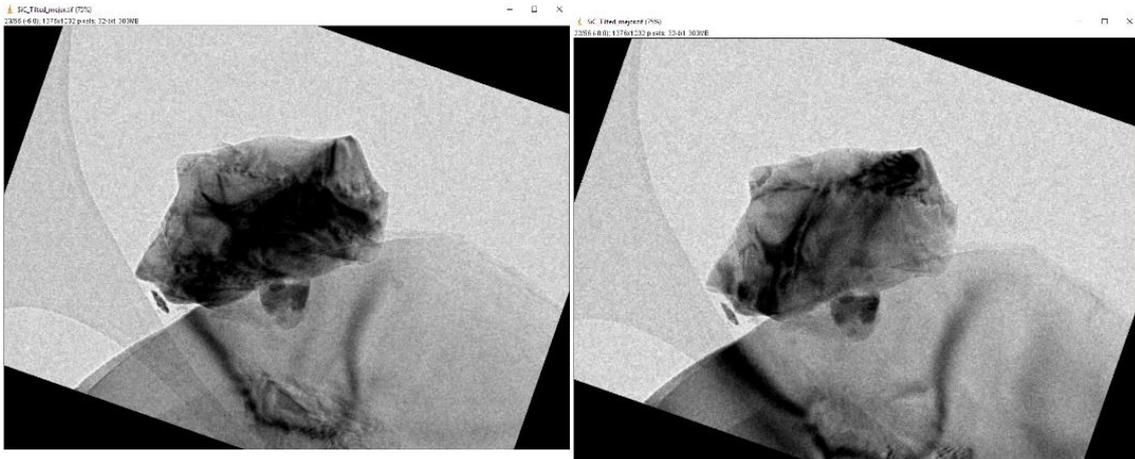


Fig.31 Imágenes TEM a 6 y 8°

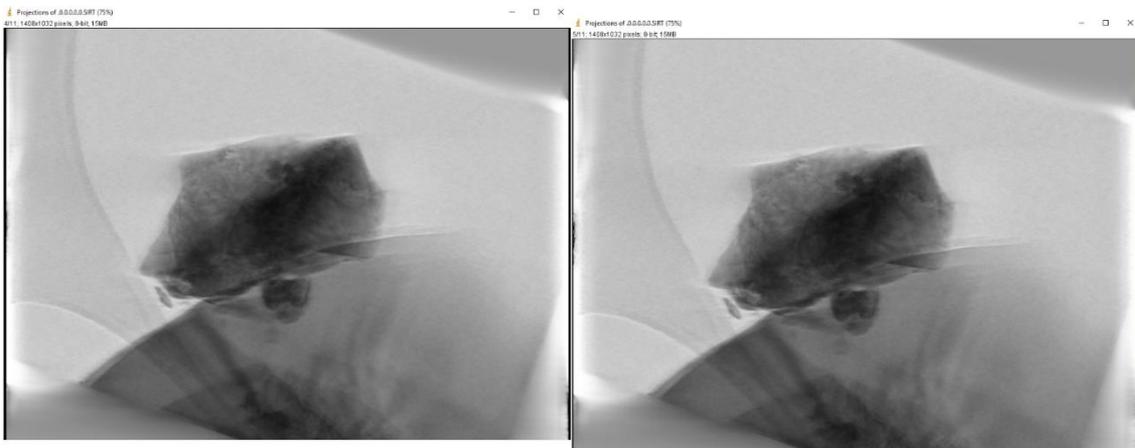


Fig.32 Proyecciones a 6 y 8°

### 6.3 Muestras nanoestructuradas

Trabajamos ahora con muestras en las que esperamos que haya contraste de masa y espesor (que nos acerca a la proyección) y en cierta medida también contraste de difracción (que nos aleja de la proyección). Son muestras de naturaleza amorfa, pero que forman algún tipo de estructura periódica nanométrica: se llaman materiales nanoestructurados.

Al ser los espaciados o parámetros de repetición en la muestra mucho mayores que los interatómicos, serán muchos menos los “centros dispersores” provocando difracción, y por tanto cabe esperar que este contraste no sea tan predominante como en el caso anterior. Además, estos espaciados “tan grandes” provocarían que todos los haces difractados estén muy próximos en el espacio recíproco, transmitiéndose por la apertura de objetivo y contribuyendo por tanto “casi todos”, o al menos los más significativos, los de ordenes menores, a la imagen. Esto apunta a que el contraste de difracción será secundario al de amplitud para este caso.

El material elegido para este experimento es también un óxido de silicio amorfo pero que forma unos “canales huecos” que se disponen paralelos entre sí formando un patrón periódico. Se llaman SBA (acrónimo de Santa Barbara Amorphous). En particular elegimos el tipo SBA-15. Justificamos esta elección en que son materiales muy bien caracterizados por muchas otras técnicas, lo que nos permitirá valorar si la reconstrucción obtenida refleja la verdadera estructura que tienen estos materiales.

La SBA-15 se forma a partir de unas micelas cilíndricas orgánicas que en la situación de equilibrio físico-químico se disponen paralelamente entre ellas. El espacio menos denso entre estos cilindros se rellena con  $\text{SiO}_2$  amorfo y posteriormente se retira el orgánico por calcinación o por disolución química. El proceso de elaboración de la SBA-15 se representa en la siguiente figura.

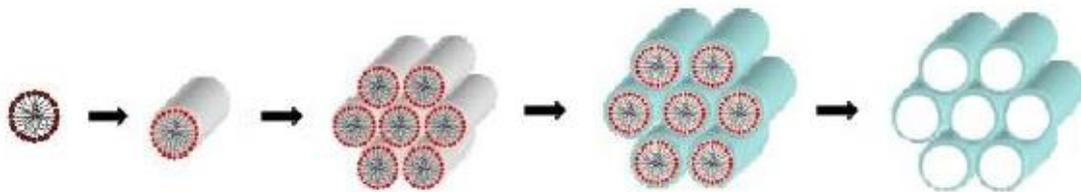


Fig.33 Proceso de fabricación de la SBA (formación y agrupamiento de las micelas, incorporación del precursor de  $\text{SiO}_2$  y extracción del orgánico)

Es característica también la forma de las partículas que forman estas agrupaciones de los tubos, que responde también al equilibrio físico-químico en la reacción de formación. Se muestra esta forma de las partículas en las siguientes imágenes.

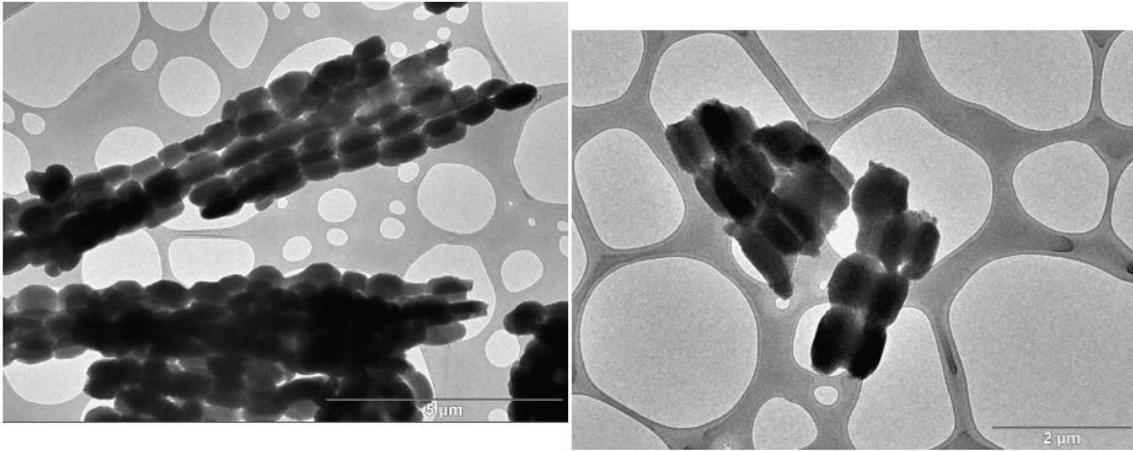


Fig.34 Imágenes TEM mostrando partículas de SBA-15.

La estructura descrita para la SBA debe ser complementada con la caracterización específica de cada síntesis particular, ya que influyen multitud de variables experimentales que, a su vez, condicionan el resultado de esta síntesis. La SBA-15 que elegimos para la reconstrucción fue caracterizada previamente por difracción de rayos X para determinar la separación de los nanoporos y por adsorción-desorción de nitrógeno para determinar los diámetros de estos poros.

Reproducimos a continuación el modelo de la SBA y la caracterización obtenida del mismo por difracción de rayos X y adsorción-desorción.

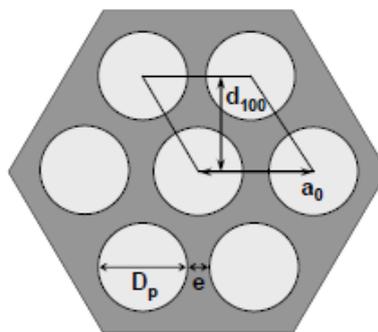


Fig.35 Modelo de SBA-15

En relación a la figura anterior, la difracción de rayos X determina 10.41 nm para la distancia  $d_{100}$ , de modo que la distancia entre centros de poros contiguos ( $a_0$ ) son 12.0 nm ( $10.41/\cos 30^\circ = 12.02$ ).

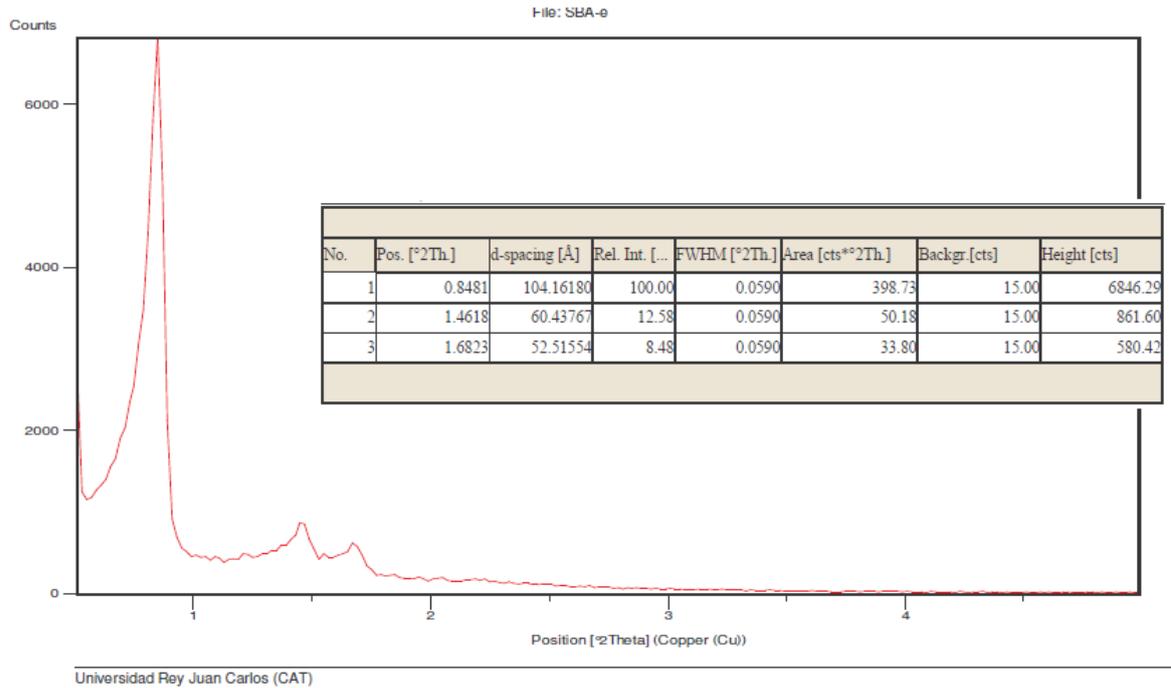


Fig.36 Difractograma de la muestra SBA-15

La adsorción-desorción de N<sub>2</sub> indica un diámetro de poro (D<sub>p</sub>) de 9.2 nm (Fig.36), de modo que el espesor mínimo de pared (e) debe ser de 2.8 nm (12.0-9.2=2.8)

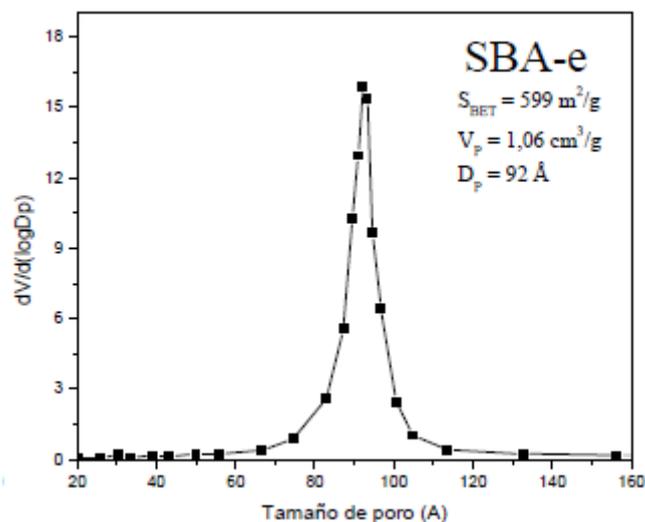


Fig.37 Adsorción-desorción de nitrógeno de la SBA-15

La anterior caracterización coincide bien con lo que se observa en el microscopio, con pequeñas diferencias en los espaciados (en torno al 10%), pero la morfología coincide plenamente con la de modelo propuesto. La imagen 38 muestra el aspecto de los nanoporos y su patrón de difracción.

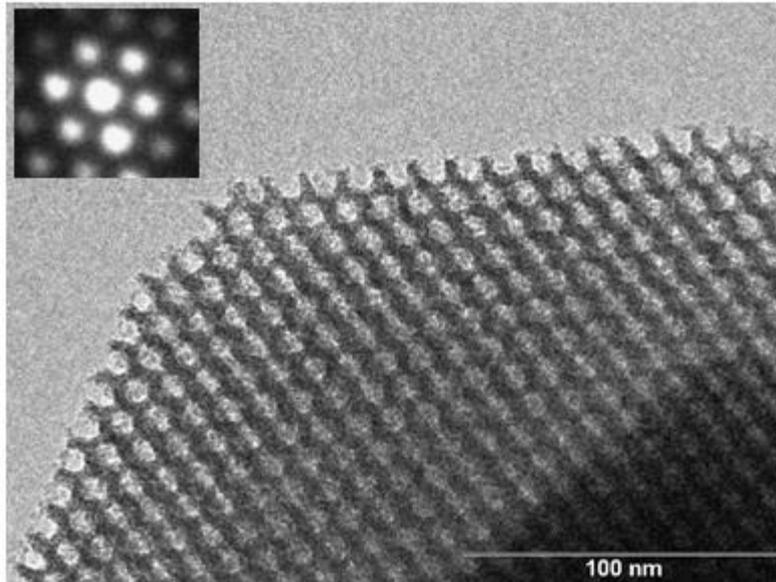


Fig.38 Vista de los nanoporos de la SBA (imagen TEM)

Podemos comprobar que el diagrama de difracción de electrones muestra efectivamente reflexiones discretas, lo que evidencia que, en alguna medida, la imagen tiene contraste de difracción en sentido “Bragg”.

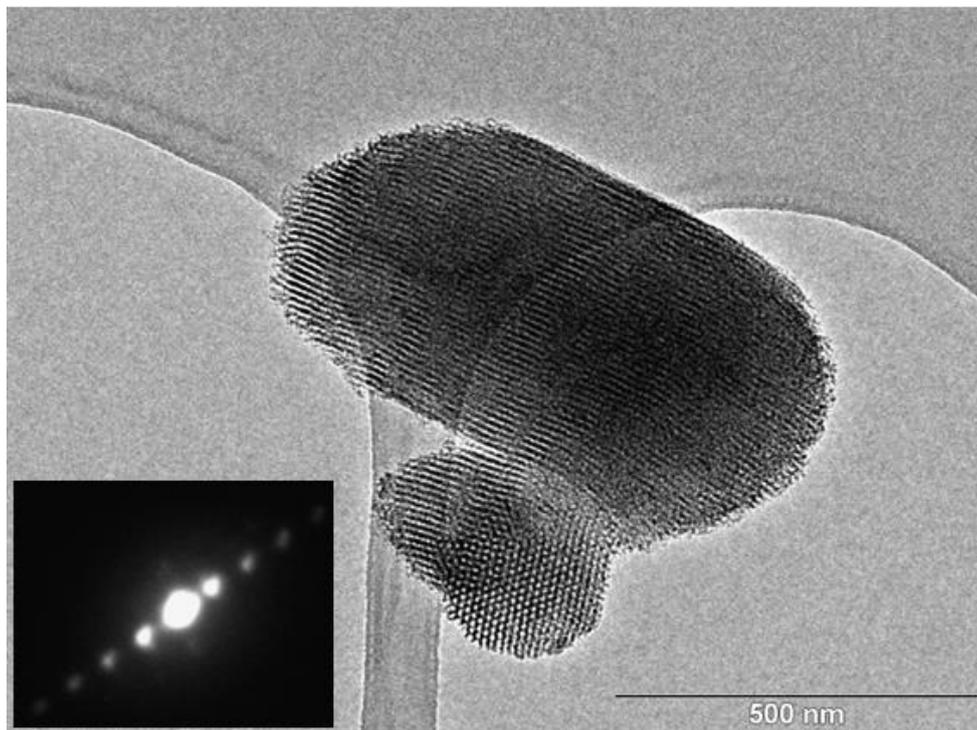


Fig.39 Partícula de SBA y su patrón de difracción.

Captamos la serie de inclinación y las procesamos para obtener el modelo.

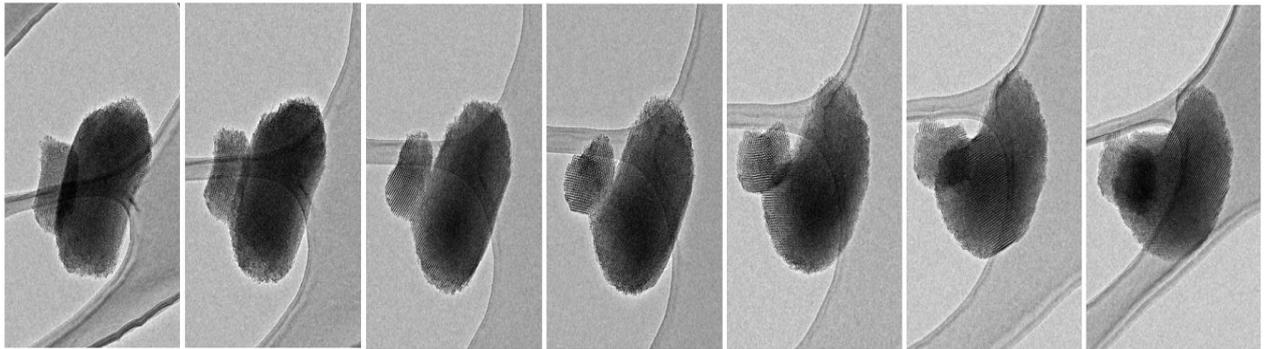


Fig.40 Resumen de la serie de inclinación obtenida

Del modelo obtenido, de nuevo por un método algebraico iterativo, presentamos algunos cortes o secciones a continuación.

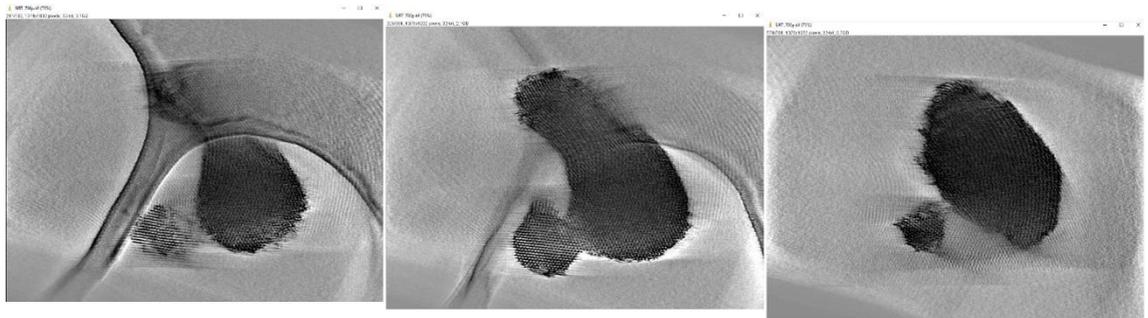


Fig.41 Algunas secciones del modelo

A continuación, la imagen experimental y la correspondiente simulación a  $0^\circ$  de inclinación.

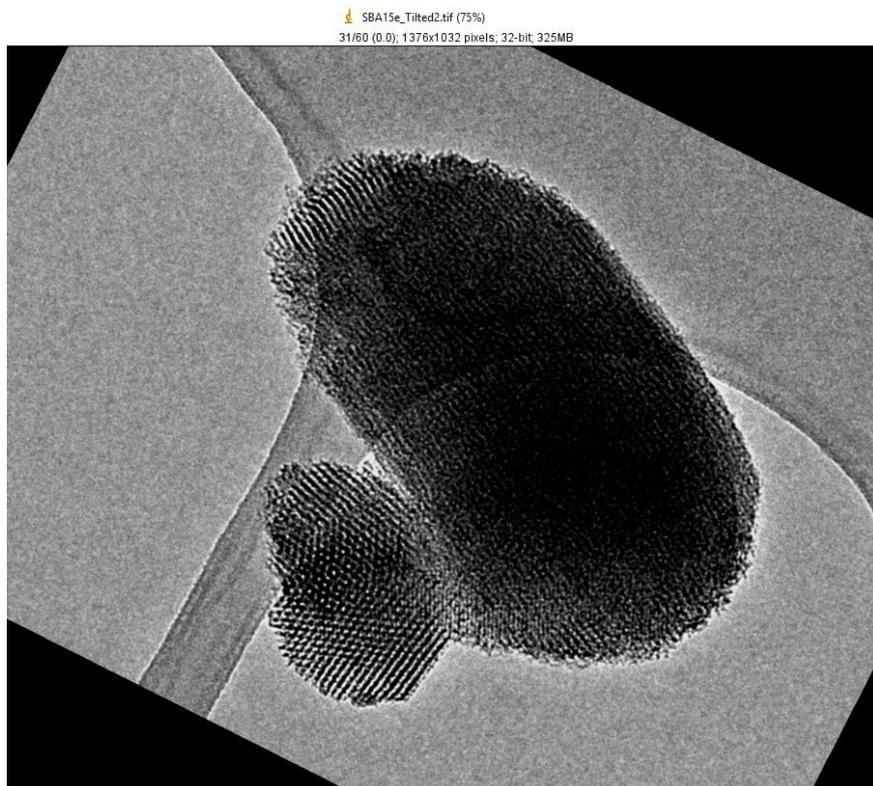


Fig.42 Imagen TEM a  $0^\circ$

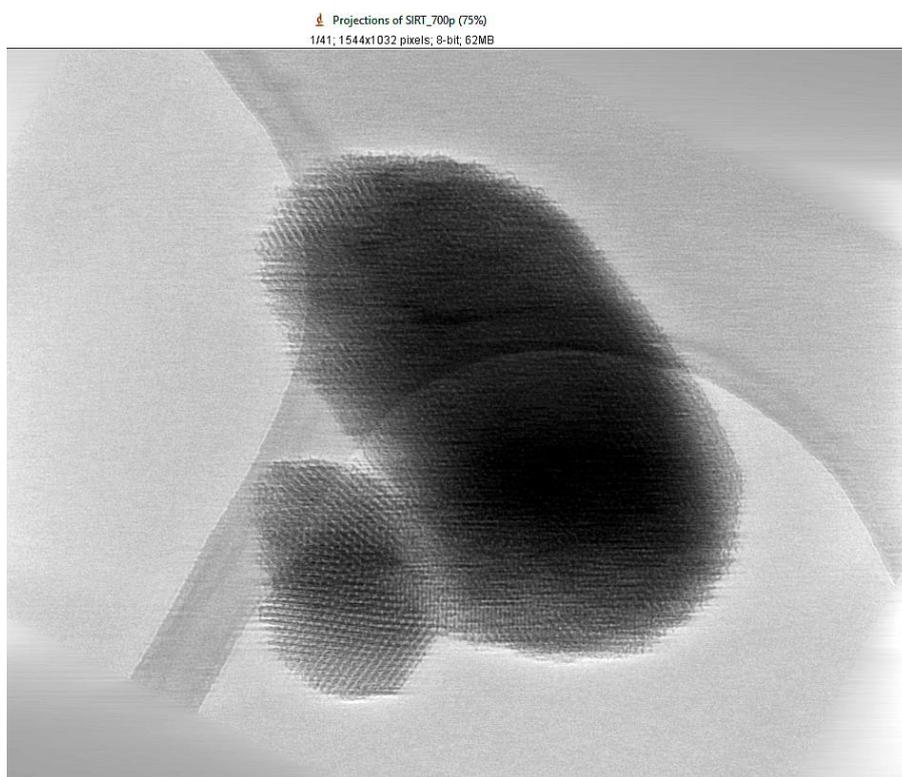


Fig.43 Proyección calculada a  $0^\circ$

Realizamos la simulación a otros ángulos, aquellos para los que tenemos imagen. Llegamos incluso a ángulos tan altos como 40° (imágenes 44 a 51).

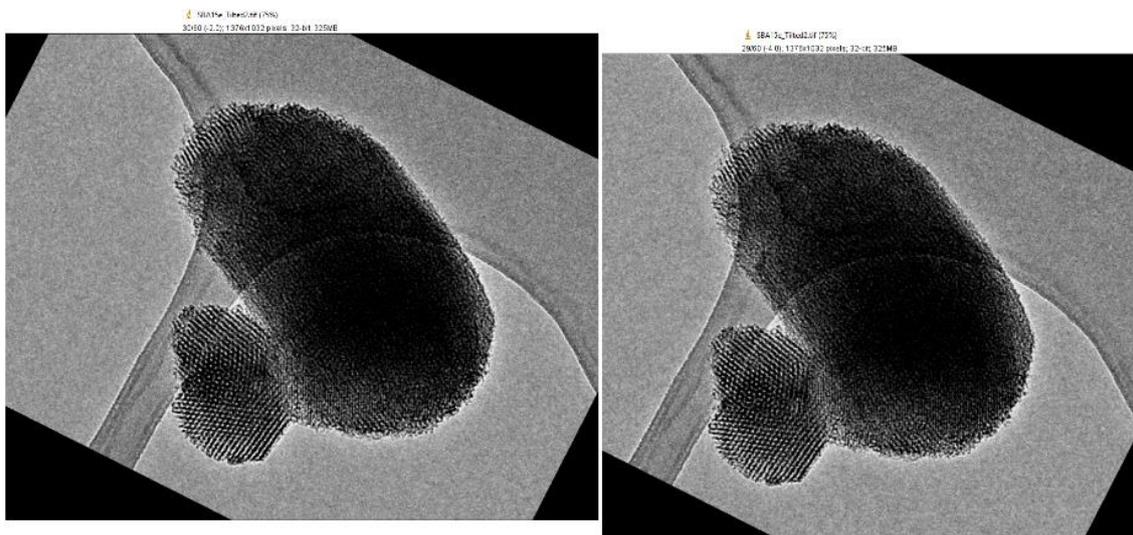


Fig.44 Imágenes TEM a 2 y 4°

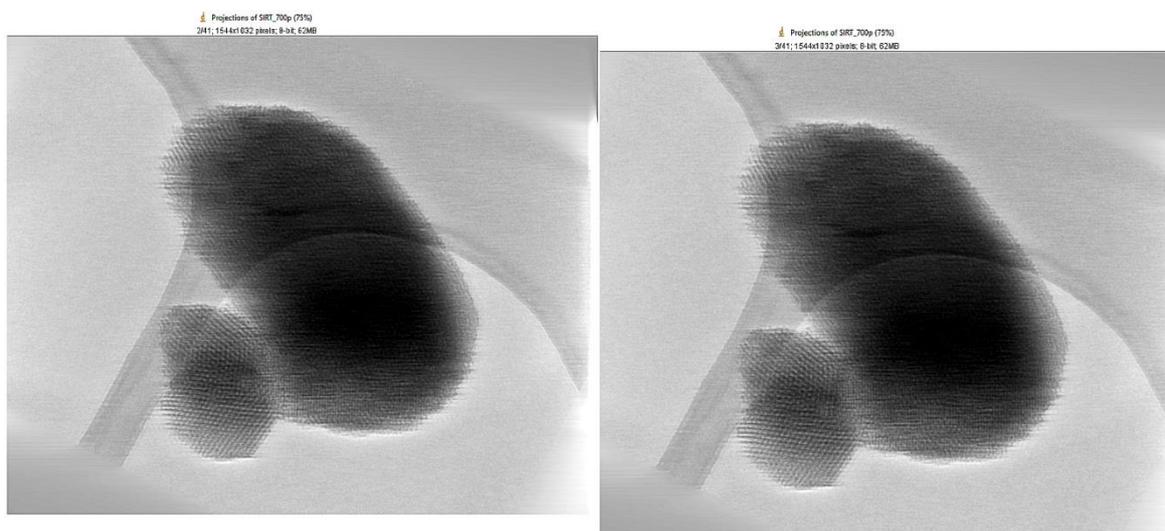


Fig.45 Proyecciones calculadas a 2 y 4°

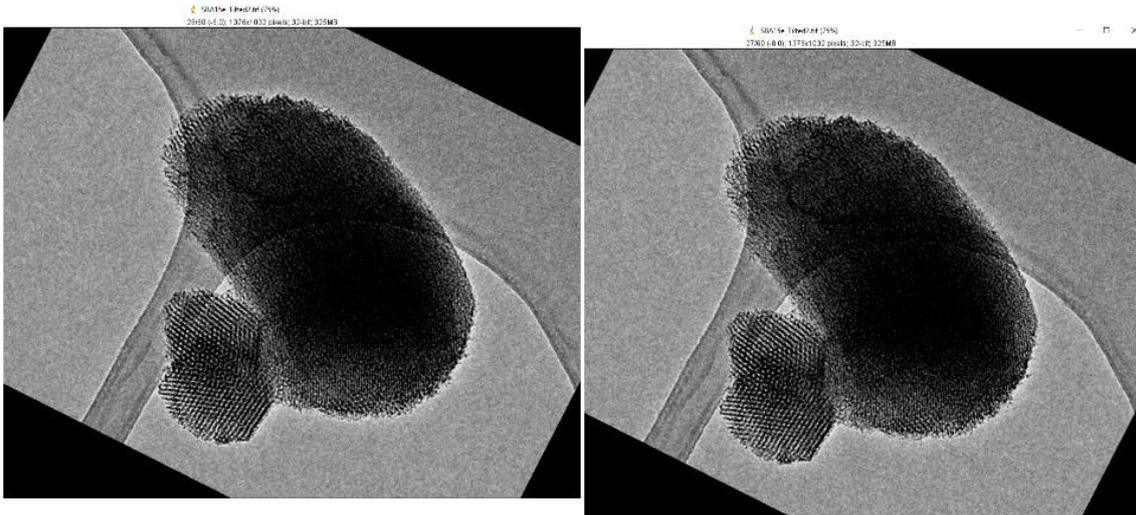


Fig.46 Imágenes TEM a 6 y 8°

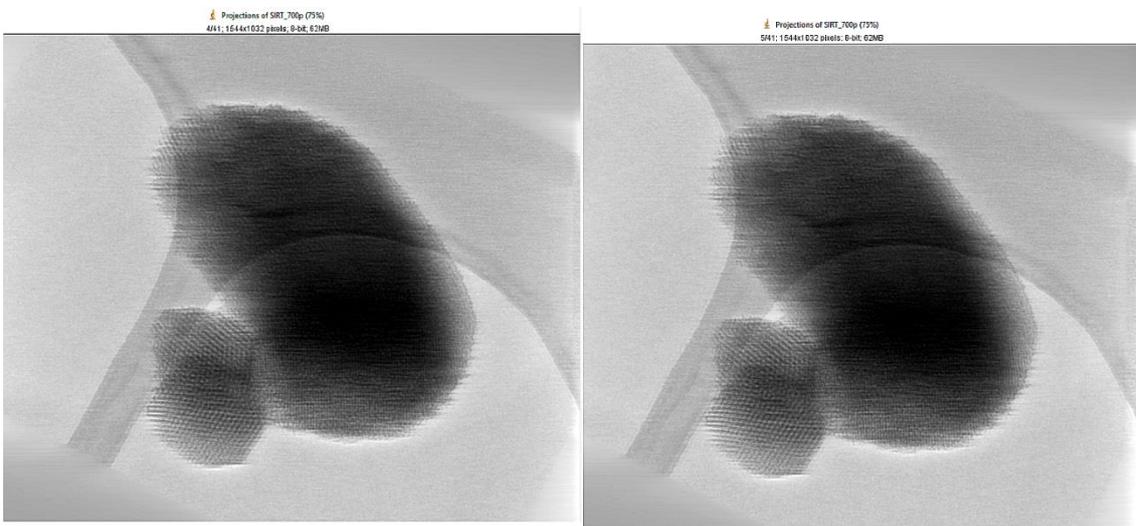


Fig.47 Proyecciones calculadas a 6 y 8°

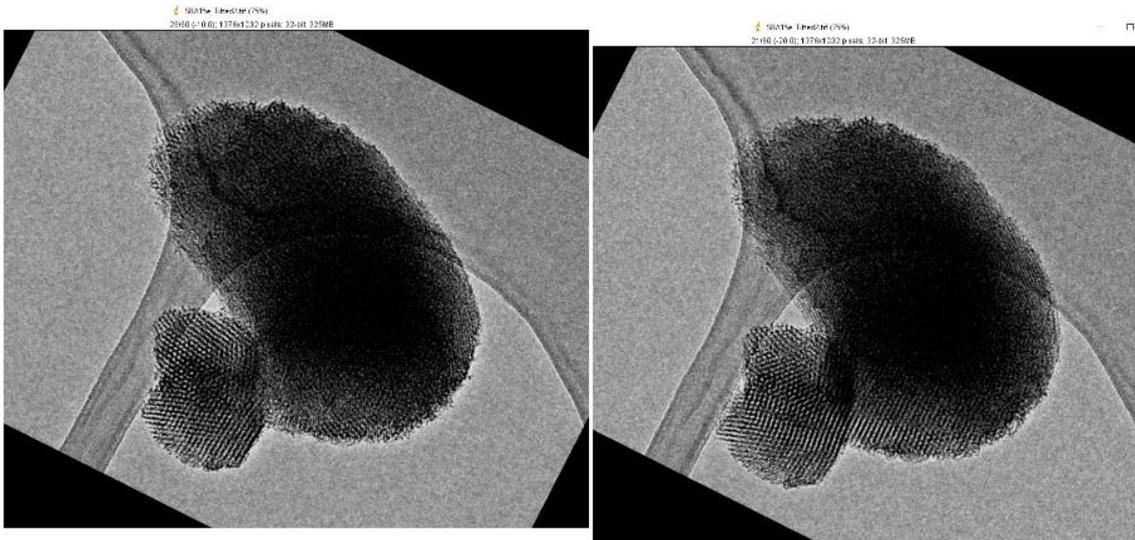


Fig.48 Imágenes TEM a 10 y 20°

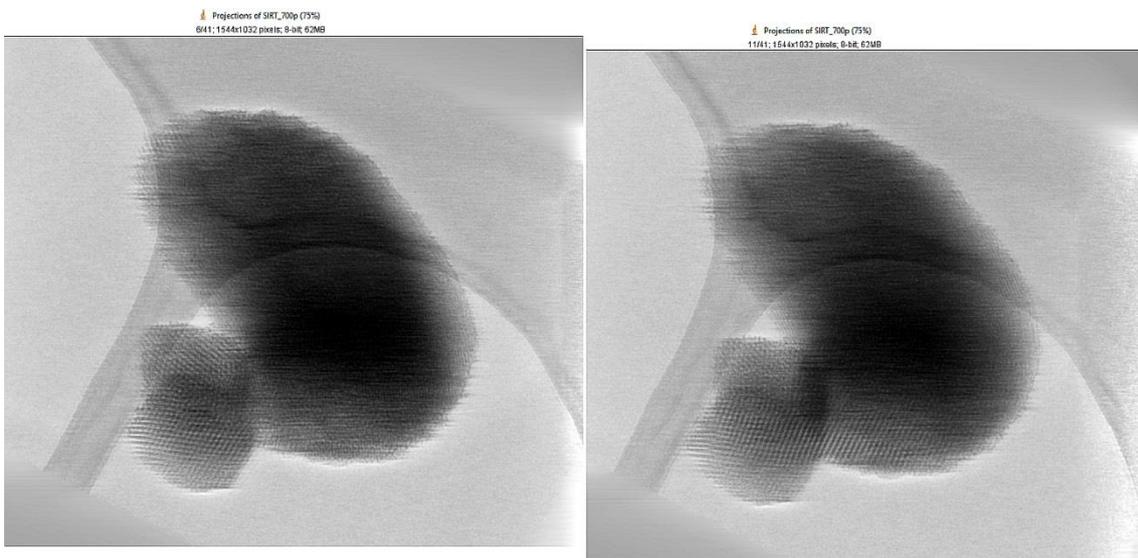


Fig.49 Proyecciones calculadas a 10 y 20°

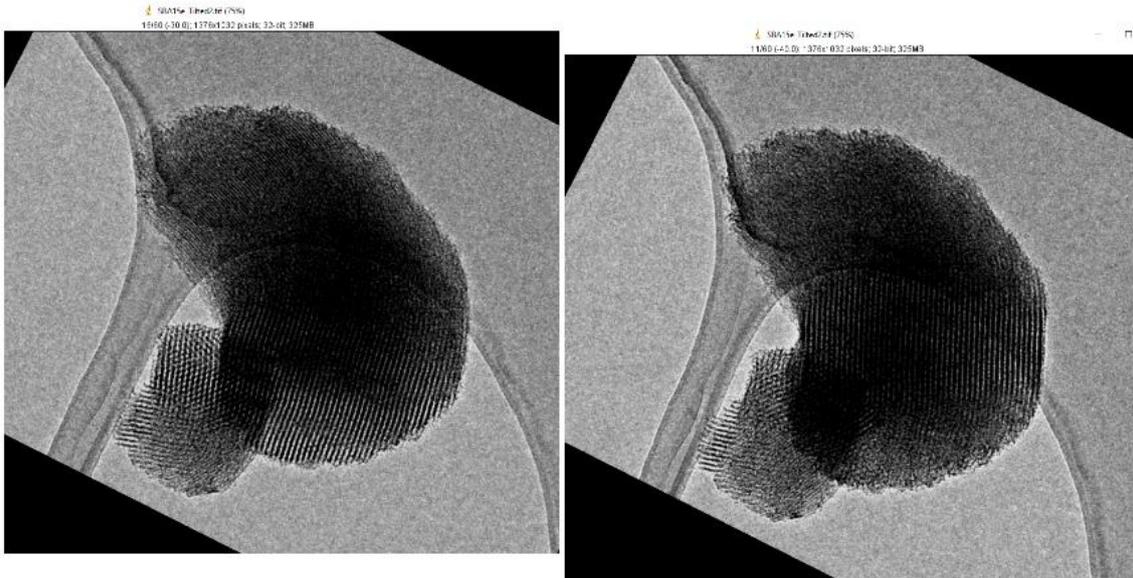


Fig.50 Imágenes TEM a 30 y 40°

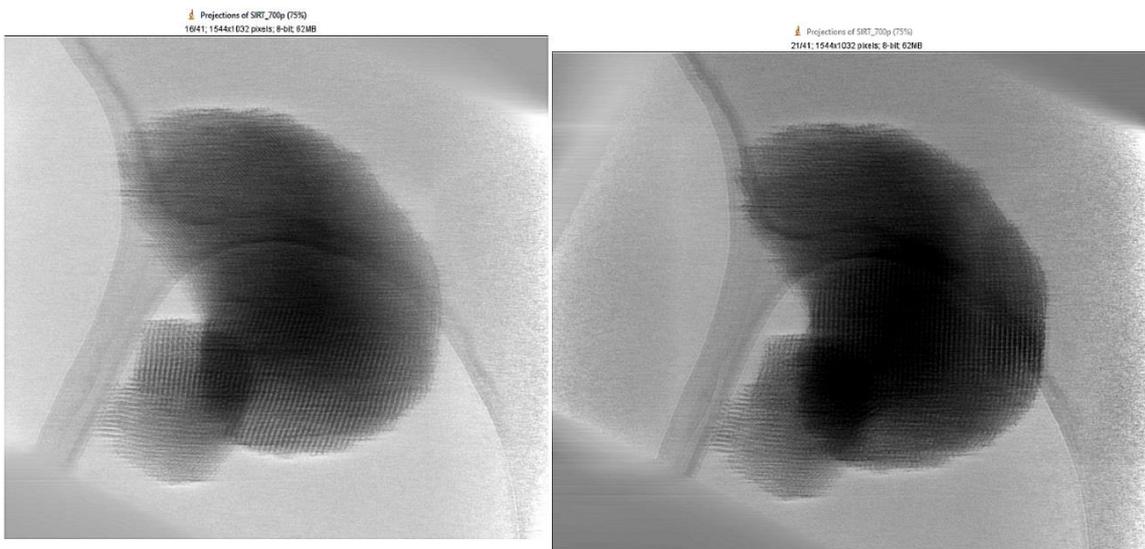


Fig.51 Proyecciones calculadas a 30 y 40°

Probablemente fuese aconsejable ampliar las proyecciones simuladas para ver que efectivamente reproducen, con muy aceptable fidelidad, el contraste periódico de los nanoporos de la SBA. A falta, quizás, de optimizar los parámetros de la reconstrucción, si fuese posible aumentar el ángulo de adquisición y disminuir el incremento angular entre imágenes, también de mejorar el preprocesado de las imágenes y cualquier otra mejora del método, concluimos que las imágenes TEM de materiales nanoestructurados son perfectamente susceptibles de reconstrucción tomográfica. Evidenciamos que cumplen en aproximación suficiente el requisito de proyección.

## 6.4 Tomografía STEM (breve comparativa)

Por tener acceso limitado a un microscopio de barrido-transmisión, hemos realizado una única reconstrucción tomografía STEM de una partícula SBA-15. Esta muestra es similar a la utilizada en la reconstrucción TEM, excepto porque estaba dopada con nanopartículas metálicas.

Las dimensiones de la partícula SBA son de unos 400 nm en su mayor dimensión. Nuestro principal interés fue comprobar que efectivamente esta técnica también es capaz de reproducir el contraste propio de los nanoporos del interior de la partícula.

Mostramos algunas unas imágenes STEM, tomadas con el detector HAADF a diferentes ángulos de inclinación de la muestra (los fundamentos teóricos de esta técnica los tratamos en el Anexo V). Obsérvese que son imágenes de campo oscuro porque este detector no recoge el haz directo.

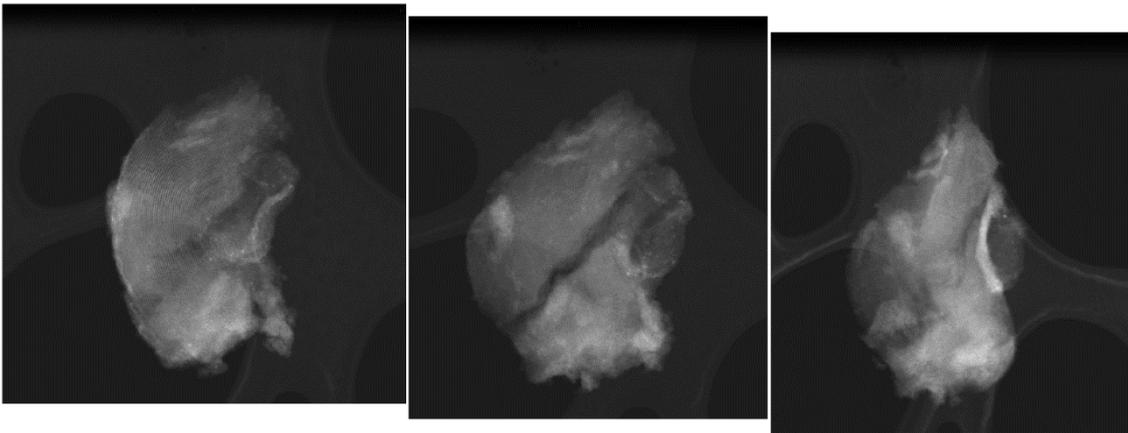


Fig.52 Algunas imágenes STEM-HAADF

Para concluir esta breve comparativa presentamos también unos cortes del modelo calculado (Fig.53).

A la luz de estos resultados no parece claro que la reconstrucción STEM sea mucho mejor que la reconstrucción TEM en este contexto particular, con este tipo de muestras. En ambas hemos comprobado que se pueden reproducir la nanoestructura de poros. No dudamos sin embargo que, en otros tipos de muestras, con mayor predominancia del contraste de difracción, la reconstrucción STEM resulte más fiable y realista que la reconstrucción TEM.

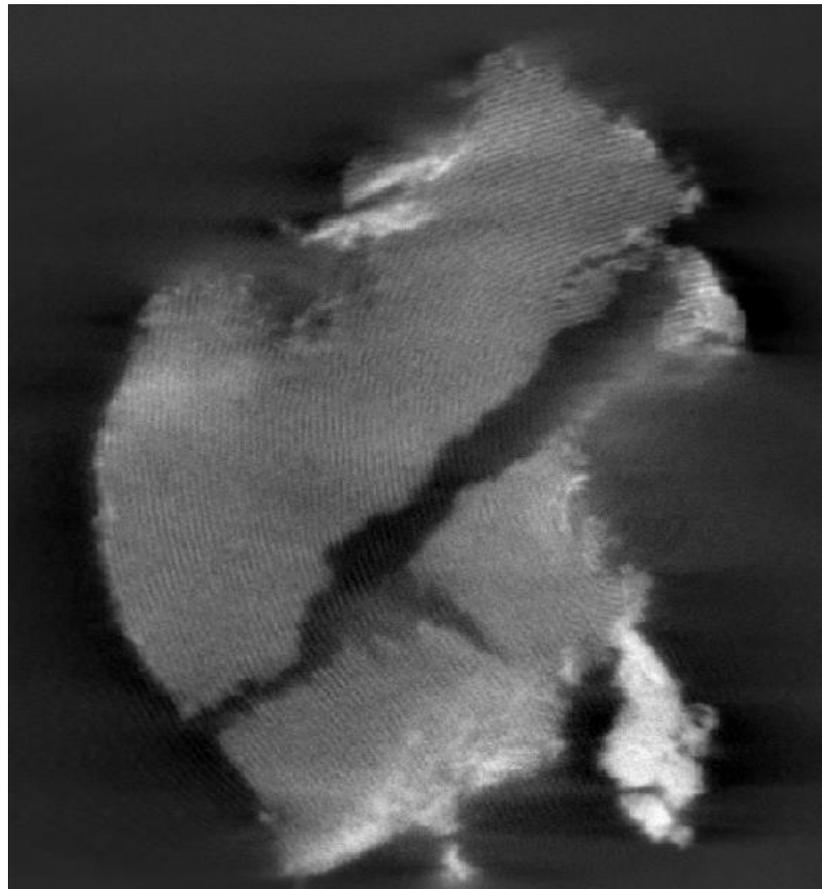
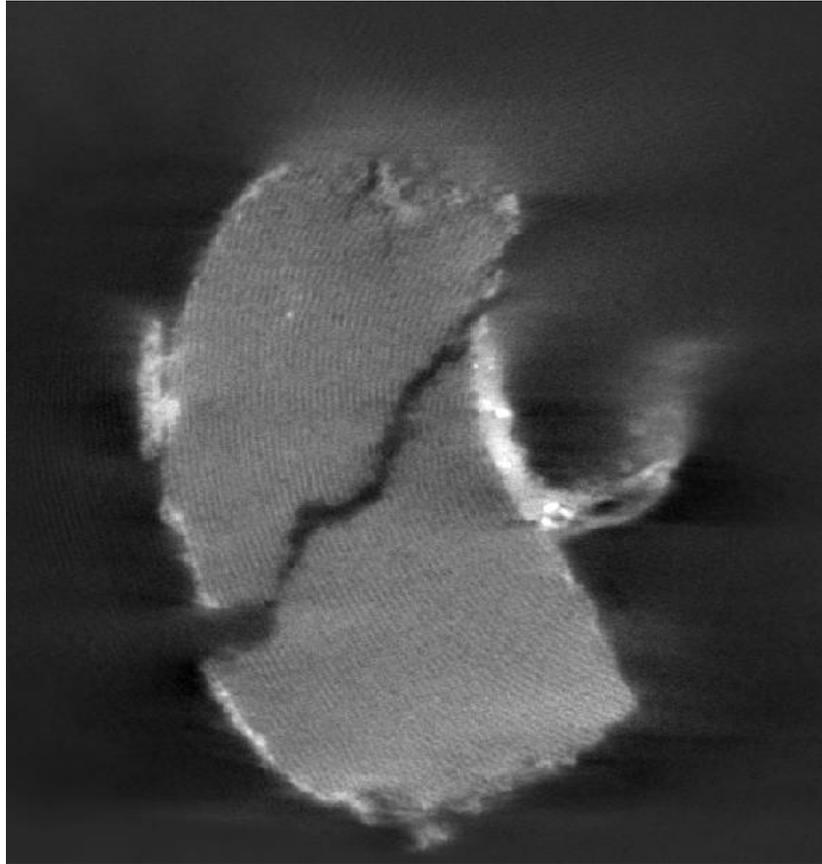


Fig.53 Unos cortes del tomograma

## 6.5 Conclusiones.

Hemos comprobado experimentalmente lo predicho en la teoría recogida en este trabajo en lo relativo a la reconstrucción tomográfica de objetos según la medida en la que estos satisfagan el requisito de proyección. Así, en muestra amorfas la reconstrucción resultó plenamente satisfactoria, comprobamos que la reconstrucción colapsaba con muestras cristalinas y que con las muestras nanoestructuradas elegidas, esta reconstrucción resulta de calidad suficiente, incluso superior a nuestras expectativas previas, en el sentido de que obtuvimos un modelo del objeto muy próximo al que se le supone.

## 7. Bibliografía.

- 1- The Radon Transform and some of its applications, Deans, 1983.
- 2- The Radon transform, S. Helgason, 1999.
- 3- Principles of Computerized Tomographic Imaging. Kak and Slaney, 1999.
- 4- Image Reconstruction from Projections: The Fundamentals of Computerized Tomography, Herman, 1980.
- 5- Electron Tomography: three-dimensional imaging with the transmission electron microscope, Frank, 1992.
- 6- Óptica, Hecht y Zajac, 1974.
- 7- Introduction to Fourier Optics, J.W. Goodman, 1996.
- 8- Óptica de Fourier, C. Lemmi, 2011.
- 9- Transmission Electron Microscopy, William and Carter, 1996.
- 10- Transmission Electron Microscopy, Reimer and Kohl, 2008.
- 11- Principles of Phase Contrast Electron Microscopy, M. van Heel. Imperial College (London), 2014 (artículo).



***ANEXOS AL TFM: TOMOGRAFIA  
ELECTRÓNICA EN CIENCIA DE MATERIALES***

*Trabajo fin de master de Jesús González Casablanca  
Máster Universitario en Tecnologías Ópticas y de la Imagen  
de la Universidad Complutense de Madrid*

*Abril de dos mil diecisiete*

*Tutor UCM: J.M. López Alonso*

*Tutor CSIC-CNB: C.O. Sánchez Sorzano.*



***Anexos:***

Anexo I: La transformada de Radon en órdenes superiores

Anexo II: Sobre la inversión analítica de la t. de Radon

Anexo III: Algoritmos para la t. inversa de Radon

III.I Método de Fourier: Th. de la sección Central

III.II La retroproyección y la retroproyección Filtrada

III.III Métodos algebraicos iterativos

Anexo IV: Sobre la formación de la imagen TEM

IV.I Contraste de Amplitud

IV.II Contraste de fase

IV.III Contraste de difracción

IV.IV Conclusión

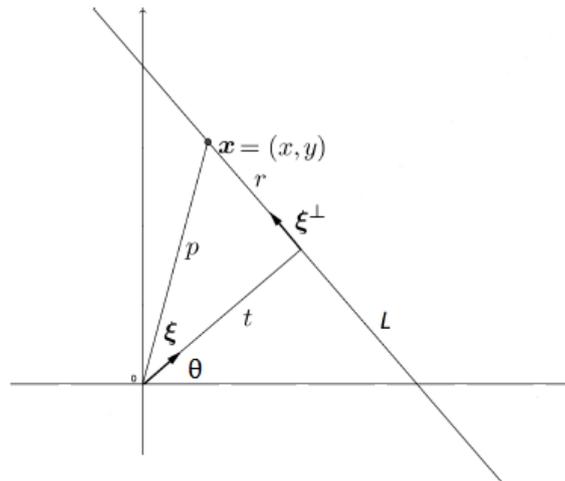
Anexo V: Sobre la imagen STEM



## Anexo I: La transformada de Radon en órdenes superiores.

### La transformada de rayos X.

Redefinimos la transformada de Radon (2D) con idea de facilitar su generalización a dimensiones de órdenes superiores. Situamos ahora un punto cualquiera  $(x, y)$  de la línea de proyección  $r$  (definido por su vector de posición  $\mathbf{x}$ ) mediante dos vectores unitarios: uno según la recta  $t$  sobre la que proyectamos ( $\xi$ ) y otro que será perpendicular a este ( $\xi^\perp$ ), es decir, según la dirección de proyección  $r$ .



Así,  $\mathbf{x} = t \xi + r \xi^\perp$

Basta recuperar la expresión de  $P_\theta(t)$  que manejábamos en la introducción de este trabajo para la transformada de Radon:

$$P_\theta(t) = \int_{-\infty}^{\infty} \int_{-\infty}^{\infty} f(x, y) \delta(x \cos \theta + y \sin \theta - t) dx dy$$

E introducir que  $\mathbf{x} = (x, y)$  y que  $\xi = (\cos \theta, \sin \theta)$ :

$$P_\theta(t) = \int_{-\infty}^{\infty} f(\mathbf{x}) \delta(\xi \mathbf{x} - t) d\mathbf{x}$$

Esta nueva expresión de la transformada de Radon se presta a su extensión a tres o más dimensiones, simplemente aumentando el número de coordenadas de  $\mathbf{x}$  y componentes de  $\xi$ .

Así, por ejemplo, en 3D la transformada de Radon de  $f(x, y, z)$  será de nuevo una función unidimensional (aunque que dependerá de dos parámetros angulares)

$$P_{\theta,\gamma}(t) = \int_{-\infty}^{\infty} \int_{-\infty}^{\infty} \int_{-\infty}^{\infty} f(x, y, z) \delta(x\xi_1 + y\xi_2 + z\xi_3 - t) dx dy dz$$

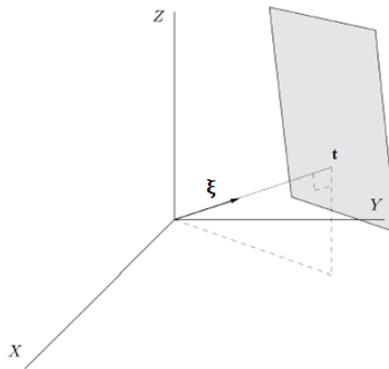
Donde la integración se ha realizado en el plano (hiperplano en general):

$$x\xi_1 + y\xi_2 + z\xi_3 - t = 0$$

O bien, con la notación vectorial anterior, simplemente:

$$R\{f(x, y, z)\} = P_{\xi}(t) = \int_{-\infty}^{\infty} f(\mathbf{x}) \delta(\xi\mathbf{x} - t) d\mathbf{x}$$

Recordando que ahora  $\mathbf{x} = (x, y, z)$ ;



En la transformada de Radon la integración de una función n-dimensional se realiza siempre en un hiperplano de dimensión n-1, de modo que esta transformada tendrá siempre dimensión unitaria. El caso 3D lo representamos con la imagen que sigue.

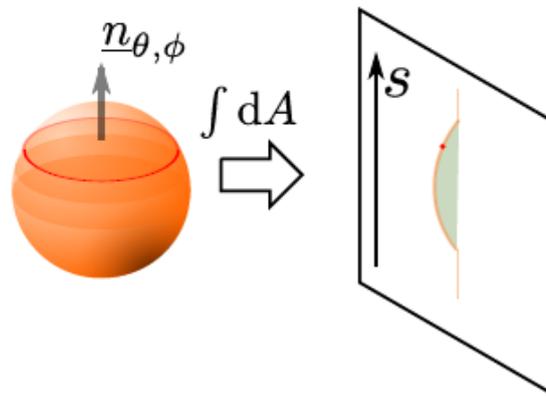


Fig.A1 Idea de la transformada 3D de Radon: cada plano o sección del objeto determina un punto de la transformada.

Hemos mencionado que una imagen de proyección (2D) de un volumen (3D) puede interpretarse como un conjunto de transformadas de Radon aplicadas a las “lonchas” en las que descomponemos conceptualmente el objeto. Efectivamente es así, pero cabe aquí definir otra transformada integral, íntimamente relacionada con la de Radon, conocida como transformada de rayos X (así llamada por su aplicación en radiología) en la cual la integración se realice por líneas en vez de planos. Para esta transformada, el espacio transformado para este objeto 3D tendrá dimensión 2. Generalizando, si  $n$  es la dimensión del espacio objeto, la dimensión del espacio transformado por rayos X será  $n-1$ .

Para una función bidimensional, la transformada de Radon y de rayos X coinciden, pero no para órdenes mayores. La imagen de proyección de un volumen 3D es realmente la transformada de rayos X de ese volumen, aunque a veces se llama también transformada de Radon a esta integración por líneas, a sabiendas de que se trata de un abuso del término.

Si partimos de imágenes de proyección de un objeto tridimensional cómo será el caso de las radiografías convencionales o las imágenes de microscopía electrónica, cabe entender el objeto 3D como un conjunto de cortes 2D, de modo que cabe entender la imagen de proyección como el correspondiente conjunto de transformadas de Radon aplicada a cada sección. Esta forma de aplicar Radon equivale conceptualmente a la transformada de rayos X.

La idea de proyección (3D a 2D) como sucesión de transformadas de Radon (2D a 1D), la mostramos en el siguiente esquema.

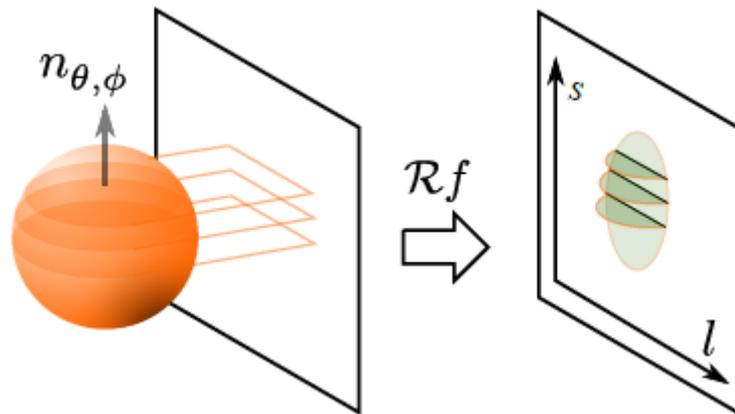


Fig.A2 Idea proyección 3D a 2D mediante la T. de Radon

Resulta bastante claro que la geometría de los rayos que iluminan el objeto para la adquisición de los datos es determinante y debe ser conocida a la hora de tratar estos datos para inferir el objeto. Entendida la radiación según el modelo de rayos, estos rayos pueden ser paralelos entre sí o pueden ser rayos divergentes desde un foco común.

También, los haces de rayos podrían ser limitados por una apertura con forma de rendija y tendríamos entonces un haz con forma “de lámina” o “de abanico” como se intuye fácilmente. En estas geometrías el haz ilumina “lonchas” del objeto que se proyectarán en la pantalla. Este es el caso del TAC médico, pero no del TEM en el que un haz extenso ilumina un área también extensa de la muestra (“extensa” en el sentido de “no un punto, ni una línea”, pero en todo caso un área microscópica).

En este trabajo de introducción a la tomografía nos ceñiremos a proyecciones paralelas (de rayos paralelos iluminando el objeto) por ser este el contexto de nuestra experimentación. Los fundamentos (proyección como integral de línea) son perfectamente aplicables a la configuración de haz divergente o de haz en abanico aunque, lógicamente, con la preceptiva adaptación geométrica.

## **Anexo II: Sobre la inversión analítica de la transformada de Radon**

Reproducimos en este anexo los resultados de la inversión analítica de transformada de Radon que mencionábamos en la introducción de este trabajo, que es la solución recogida en los libros de Helgason o Deans. Esta resolución distingue que la dimensión del espacio donde se defina la función objeto sea par o impar, aunque también se propone una formula genérica.

Siendo  $\mathbf{x}$  el vector de dimensión  $n$ ,  $\xi$  el unitario de la misma dimensión que indica la recta, plano o hiperplano en general de proyección (tal como vimos en los casos bi o tridimensional) y  $\Delta_x$  el operador laplaciano en la dimensión en cuestión, la fórmula de inversión que se encuentra en estos textos mencionados es la siguiente:

Si  $n$  es impar e igual o mayor que 3:

$$f(\mathbf{x}) = C_n \Delta_x \int P_\xi(t) d\xi$$

Si  $n$  es par e igual o mayor a 2:

$$f(\mathbf{x}) = C_n \Delta_x^{(n-1)/2} \int P_\xi(t) d\xi$$

Siendo en ambos casos  $C_n$  una constante dependiente de la dimensión del espacio, de valor:

$$C_n = \frac{1}{2} \frac{1}{(2\pi i)^{n-1}}$$

Por ejemplo, si  $n=3$ ,  $C_3 = -\frac{1}{8\pi^2}$

El operador  $\Delta_x$  en esta dimensión equivaldría a:

$$\Delta_x \equiv \left( \frac{d^2}{dx^2} + \frac{d^2}{dy^2} + \frac{d^2}{dz^2} \right)$$

Si se consultan los libros mencionados sobre la transformada de Radon, se verá que la integración para hallar la inversa se realiza en un círculo (o esfera) de radio unidad en vez de extenderla al espacio infinito. Esto es solo una “estrategia de cálculo” porque si la función objeto es finita (condición necesaria) siempre cabe “redimensionar” los ejes de modo que esta función esté contenida en la esfera. Es relativamente frecuente encontrar en los textos y artículos la siguiente formula de inversión de Radon para el caso bidimensional:

$$f(x, y) = \frac{1}{2\pi^2} \int_0^\pi \int_{-\infty}^\infty \frac{\frac{\partial [R\{f(x, y)\}]}{\partial \rho}}{x \cos \theta + y \operatorname{sen} \theta - \rho} d\theta d\rho$$

### ***Anexo III: Sobre los algoritmos para la transformada inversa de Radon.***

Lo que sigue solo puede entenderse como una introducción a los principios matemáticos en los que se basan las aplicaciones informáticas que procesan las series de imágenes de proyección. Pondremos especial interés en transmitir la idea principal de cada método, pero sin entrar en los pormenores que justifican el que haya multitud de artículos, incluso textos completos dedicados a cada uno de estos métodos.

#### ***III.I Método de Fourier: Teorema de la Sección Central de Fourier.***

Vamos a introducir y justificar del Teorema de la Sección Central de Fourier (en adelante TSCF). Mencionar que el título en castellano para este teorema “de la Sección Central de Fourier” no es único, depende del texto que se consulte. Hay más consenso en inglés donde se le conoce como “The Fourier Slice Theorem”

Consideremos una función objeto  $f(x, y)$  con dos dimensiones. Pensemos en esta función como “un objeto bidimensional” o también, si se quiere, como “una loncha” del objeto tridimensional. El TSCF se enuncia como sigue:

*“La transformada unidimensional de Fourier de la proyección (esta última según rayos paralelos) de una función objeto  $f(x, y)$ , formada esta proyección sobre la recta que mantiene un ángulo  $\theta$  con el eje  $x$ , es el corte de la transformada bidimensional de Fourier de esta función  $f(x, y)$  a lo largo de una línea que forme este mismo ángulo  $\theta$  con el eje  $u$  del espacio de Fourier, siendo  $u$  el eje de frecuencia espacial relativa al eje  $x$ ”.*

Probablemente con la demostración del teorema se entienda mucho mejor su sentido. La transformada de Fourier de la función objeto es:

$$F(u, v) = \int_{-\infty}^{\infty} \int_{-\infty}^{\infty} f(x, y) e^{-i 2\pi(ux+vy)} dx dy$$

Primero veamos cómo sería la transformada de Fourier anterior sobre el eje de frecuencias espaciales  $u$ , esto es para  $v=0$ :

$$F(u, 0) = \int_{-\infty}^{\infty} \int_{-\infty}^{\infty} f(x, y) e^{-i 2\pi ux} dx dy$$

La función exponencial no depende de  $y$ , de modo que podemos reordenar de la siguiente manera:

$$F(u, 0) = \int_{-\infty}^{\infty} \left[ \int_{-\infty}^{\infty} f(x, y) dy \right] e^{-i 2\pi ux} dx$$

Si recordamos la expresión de la proyección de  $f(x, y)$  para  $\theta=0$  que vimos en la introducción a la transformada de Radon:

$$P_{\theta=0}(x) = \int_{-\infty}^{\infty} f(x, y) dy$$

Nota: tengamos presente que hablamos de  $P_{\theta=0}(t)$  o bien de  $P_{\theta=0}(x)$ , pues el eje  $x$  coincide ahora con la recta  $t$ .

Resulta inmediato comprobar que:

$$F(u, 0) = \int_{-\infty}^{\infty} P_{\theta=0}(t) e^{-i 2\pi ut} dt$$

Que, a su vez, corresponde con la transformada de Fourier (unidimensional, respecto de la variable  $t$ ) de la proyección  $P_{\theta=0}(t)$ , que nombraremos  $S_{\theta=0}(u)$ .

$$S_{\theta=0}(u) = \int_{-\infty}^{\infty} P_{\theta=0}(t) e^{-i 2\pi ut} dt$$

Con lo cual:

$$F(u, 0) = S_{\theta=0}(u)$$

Este resultado no es otra cosa más que la expresión matemática del teorema de la Sección Central de Fourier, que habíamos expresado en prosa al inicio de este apartado (particularizado en  $\theta = 0$ ).

A continuación, generalicemos a un ángulo  $\theta$  cualquiera, no necesariamente nulo. Definimos unos ejes cartesianos “rotados” un ángulo  $\theta$ , que llamaremos  $(t, s)$ , a partir de los habituales  $(x, y)$ , de modo que para estos ejes rotados se dé exactamente la situación en la que deducimos el Teorema de la Sección Central de Fourier, es decir que la proyección se haga según la

dirección de uno de estos ejes (el  $s$ , por ejemplo) o sea, proyectamos el objeto, que ahora es  $f(t,s)$ , sobre o a lo largo del eje  $t$ .

Para esto, simplemente aplicamos al sistema  $(x, y)$ , la matriz de la rotación correspondiente a un ángulo  $\theta$  (que es el ángulo que subtiende  $t$  con  $x$ ).

$$\begin{bmatrix} t \\ s \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} \cos\theta & \sin\theta \\ -\sin\theta & \cos\theta \end{bmatrix} \begin{bmatrix} x \\ y \end{bmatrix}$$

Ya sabemos que la proyección del objeto sobre el eje  $t$ , es decir proyectado en la dirección de  $s$ , se expresa como una integral simple:

$$P_\theta(t) = \int_{-\infty}^{\infty} f(t, s) ds$$

Reproduciendo lo razonado en la deducción del TSCF:

$$F(u, 0) = S_{\theta=0}(u)$$

Donde  $F(u, 0)$  es la transformada de Fourier de  $f(t, s)$ . Como buscamos relacionar  $S_{\theta=0}(u)$  con la transformada de Fourier de  $f(x, y)$ , lo hacemos mediante la relación de transformación entre ambos sistemas de referencia, es decir la rotación de ángulo  $\theta$ . Está claro que la simple rotación del sistema de coordenadas es una transformación de variables que mantiene las áreas, por lo que el jacobiano de la transformación es uno. Basta sustituir  $t$  y  $s$  por su expresión, según la relación de la rotación para obtener:

$$\begin{aligned} S_{\theta=0}(u) &= \int_{-\infty}^{\infty} \int_{-\infty}^{\infty} f(t, s) e^{-i 2\pi ut} dt ds \\ &= \int_{-\infty}^{\infty} \int_{-\infty}^{\infty} f(x, y) e^{-i 2\pi u(x \cos\theta + y \sin\theta)} dx dy = S_\theta(w) \end{aligned}$$

Donde llamo  $w$  a un “nuevo eje” del espacio de Fourier tal que  $w = u \cos \theta + u \sin \theta$ . En definitiva, esta última integral representa la transformada de Fourier 2D de  $f(x, y)$  sobre la dirección  $(\cos \theta, \sin \theta)$  es decir sobre la dirección que mantenga un ángulo  $\theta$  con el eje  $u$ , recíproco del eje  $x$ , como se pretendía demostrar.

Para interpretar este Teorema de la Sección Central de Fourier podemos partir de un objeto 2D o considerar un “loncha” del objeto 3D como venimos mencionando, de modo que, a efectos, nuestro objeto tenga dos dimensiones, de ahí que consideremos  $f(x,y)$ . Esta idea, la mostramos en la figura A3.

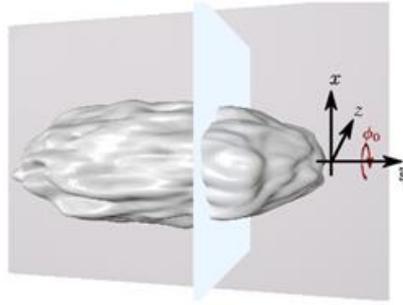


Fig.A3 Objeto 2D como sección del objeto 3D

Proyectamos esta sección según una determinada dirección. Lógicamente esta dirección estará contenida en el plano del objeto “loncha”. La proyección se realiza sobre la recta perpendicular a la dirección de proyección y obtendríamos  $P_{\theta=0}(t)$ .

Si calculamos la transformada de Fourier de esta proyección, llamémosla  $S_{\theta}(w)$ , esta coincidirá con el corte, según esa misma dirección, del espacio de Fourier de la función objeto  $F(u, v)$ , como pretendemos mostrar en la siguiente figura.

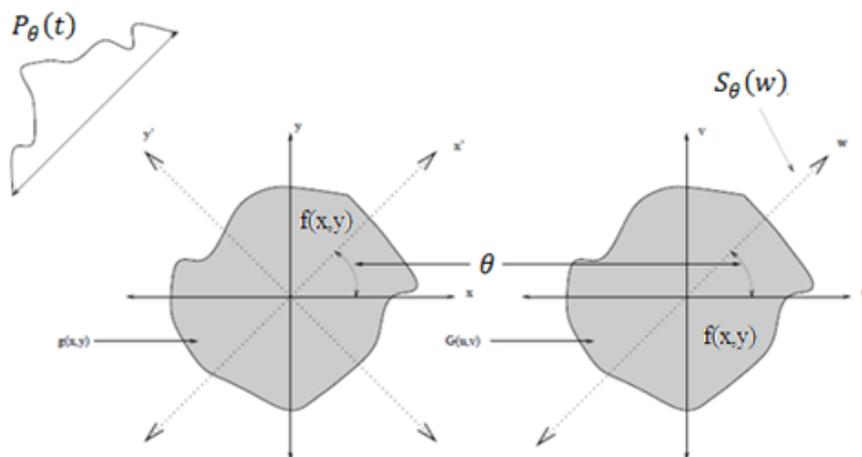


Fig.A4 Ilustración del TSCF

Vamos a aprovechar este teorema para diseñar un procedimiento general que nos permita, al menos teóricamente, representar el objeto en el dominio de Fourier (al que habitualmente me refiero también como espacio recíproco o de frecuencias).

La estrategia ya parece clara, vamos a completar la transformada de Fourier de la función objeto en este espacio a base de líneas o corte radiales (tantos como proyecciones tengamos), para obtener después el objeto propiamente mediante la transformada inversa de Fourier. Si tuviésemos “todas” las proyecciones posibles, tendríamos completamente definida la transformada de Fourier del objeto y por tanto el propio objeto.

Aunque quedan sentadas las bases “teóricas” de la tomografía por el método de Fourier, la realidad practica está condicionada por multitud de factores. Por ejemplo, nunca contaremos en la práctica con las infinitas proyecciones posibles que supondría la variación continua de  $\theta$  entre  $0$  y  $\pi$ , porque eso supondría un número infinito de proyecciones. En su lugar nuestros datos de partida serán una colección de proyecciones correspondientes a la variación discreta de ese ángulo y normalmente en un rango de variación total o recorrido que será inferior a  $\pi$  radianes. Este rango vendrá condicionado por limitaciones técnicas como veremos que ocurre en nuestra aplicación a la microscopia electrónica de transmisión.

De otro lado, para cada imagen de proyección tampoco tendremos un “registro continuo”, sino un muestreo discreto y periódico de esta imagen, debido a que será captada en algún soporte digital (típicamente una cámara CCD o CMOS).

Otro problema practico es que si componemos el espacio 2D de Fourier con líneas radiales de muestreos equiespaciados, es fácil entender que el espacio de Fourier tendrá una densidad de muestreo tanto mayor cuanto más cerca estemos del origen. Esto puede suponer un inconveniente, dado que los algoritmos para realizar la transformada o transformada inversa de Fourier presuponen un muestreo uniforme del espacio (real o reciproco respectivamente). En concreto los algoritmos FFT (Fast Fourier Transform) y IFFT (Inverse FFT) requieren que la función a transformar este regularmente muestreada, problema que suele resolverse transformando el muestreo “radial” directamente obtenido por la aplicación del TSCF a un muestreo “en rejilla” por interpolación de los datos, como mostramos en la figura A5. Este es un proceso de interpolación que se conoce como “gridding”. Mencionar que en estos últimos años se han desarrollado algoritmos alternativos a la FFT y la IFFT que no exigen un muestreado uniforme del espacio, denominados NUFFT (Non Uniform Fast Fourier Transform) y INUFFT (Inverse NUFFT).

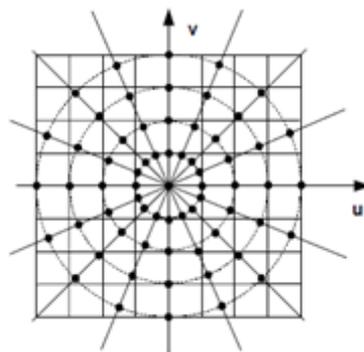


Fig.A5 Gridding o interpolación del muestreo.

Cabe pensar, y efectivamente así ocurre, que el espacio de Fourier muestreado muy densamente en frecuencias bajas (cerca del origen), podría dar lugar a artefactos de aliasing en la reconstrucción. Además de todos estos problemas prácticos, hay que mencionar que las imágenes de proyección experimentales tendrán siempre, en alguna medida, ruido aleatorio que se sumara a la verdadera imagen de proyección.

Todos estos problemas generales mencionados y los que pudiesen ser propios de cada técnica de adquisición de imagen, deberán ser tenidos en cuenta y corregidos, en la medida de lo posible, para conseguir una reconstrucción realista del objeto, minimizando artefactos.

El TSCF visto para funciones objeto 2D tiene “su extensión natural” a la tercera y sucesivas dimensiones. Como venimos comentado, siempre es posible considerar el objeto 3D como una sucesión de figuras planas 2D. No obstante, las aplicaciones informáticas que trabajan directamente en 3D son generalmente más eficientes que la que trabajan “con cortes 2D”, si bien el resultado debe ser, lógicamente, muy similar, sino igual.

El TSCF 3D se deduce de manera similar a lo visto anteriormente para una función objeto 2D, con la salvedad de que son necesarios dos ángulos para definir la dirección de proyección. La idea es la misma, esto es, definir un sistema ortonormal de modo que uno de los ejes coincida con la dirección de proyección, calcular la proyección y su transformada de Fourier en el sistema rotado, y expresar esta última en los ejes euclídeos ordinarios para comprobar que:

*“La transformada de Fourier de la proyección 2D de la función  $f(x, y, z)$ , según una dirección determinada, corresponde con un plano de corte de la transformada de Fourier de esta función  $f(x, y, z)$  que mantenga la misma orientación en el espacio de frecuencias”*

Parece claro que a través del TSCF vamos a reconstruir en todo caso un parte del espacio recíproco, pero no todo. Si no tenemos el objeto completamente definido en el dominio de frecuencias, tampoco lo tendremos en el dominio espacial. En nuestro caso experimental, el microscopio electrónico de transmisión, la muestra u objeto se gira en torno a un eje dado un ángulo máximo típicamente de unos  $\pm 60$  o  $\pm 80^\circ$  (dependerá del microscopio)

Si hacemos una proyección cada “pocos” grados de inclinación en ese rango mencionado, el espacio recíproco quedará muestreado con cortes como se representa a continuación según la inclinación sea en uno o dos ejes.

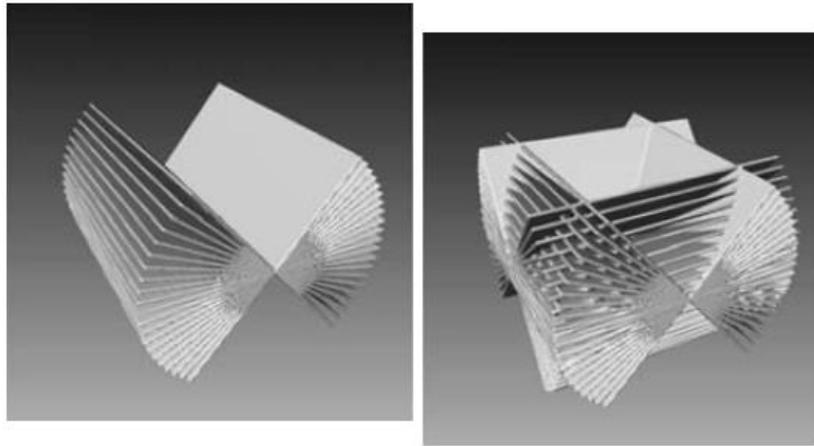


Fig.A6 Posibles configuraciones del espacio explorado

Como ya debe de quedar claro, los algoritmos de recuperación de la función objeto basados en el TSCF componen primero este objeto en el espacio de frecuencias, y después se lleva este objeto al dominio espacial mediante la transformada inversa de Fourier, en un proceso que tenemos que entender con todas las limitaciones a las que hemos hecho referencia, principalmente a que solo tendremos un conocimiento parcial del objeto en el espacio de Fourier y por tanto solo un conocimiento parcial del mismo el en espacio real.

Nótese que la orientación de la partícula a reconstruir no es indiferente de cara a la calidad de la reconstrucción. Dado que irremediamente vamos a dejar “inexplorado” una parte del espacio recíproco (con forma de dos “cuñas” con una arista común si disponemos de un solo ángulo de giro, o de dos “pirámides” unidas por su vértice, en caso de doble inclinación, como mostraron las últimas imágenes) perderemos la información que ese volumen del espacio de frecuencias contuviera, y esto depende a su vez de la orientación de la partícula. Pensemos, por ejemplo, en una partícula con forma de “aguja” orientada con su eje longitudinal en la dirección del haz de electrones (eje Z). Su transformada de Fourier 3D será “muy densa” en este eje Z, y mucho menos en direcciones perpendiculares. Como perdemos información en un entorno de este eje Z, perderemos “mucho” información. Todo lo contrario ocurre si la aguja se orienta con su eje en una dirección normal al Z. El eje Z recíproco contendrá ahora menos coeficientes de Fourier dado que estarán mucho más espaciados entre ellos. Perdemos, en definitiva, menos información en el espacio recíproco y, a la postre, en el real (no entramos ahora en que, además, esta última orientación de la aguja también sería más favorable por ofrecer un menor grosor efectivo al haz de electrones del microscopio como analizaremos en el Anexo IV)

### *III.II La retroproyección y la retroproyección filtrada.*

Veremos que el nombre de este método para invertir la transformada de Radón: “retroproyección” resulta muy gráfico una vez entendida “su filosofía”. Imaginemos que tenemos un objeto, e imaginémoslo bidimensional, pongamos que se trate de la muy recurrida “cabeza de fantasma de Sheep-Logan”, que es una figura compuesta de elipses de distinta densidad. Por cierto, la razón de usar elipses es que su proyección para un ángulo cualquiera puede ser calculada de manera “sistemática” por lo que resulta muy apropiada para comprobar la fidelidad de los métodos de reconstrucción.

Imaginemos que realizamos la proyección de esta función objeto desde diferentes direcciones y que registramos de alguna manera esta imagen de proyección.

Imaginemos ahora que retiramos el objeto y que la luz es proyectada desde cada uno de esos registros (en sentido inverso a cuando se iluminaba el objeto, de ahí el nombre de “retroproyección”) de modo que todos estos haces de luz coincidan en el espacio que antes ocupaba el objeto. En ese espacio se formará una imagen del objeto tanto más fiel al mismo, cuanto mayor sea el número de proyecciones “retroproyectadas”.

En la siguiente figura se simula la retroproyección de 1, 10, 20 y 50 proyecciones del fantasma:

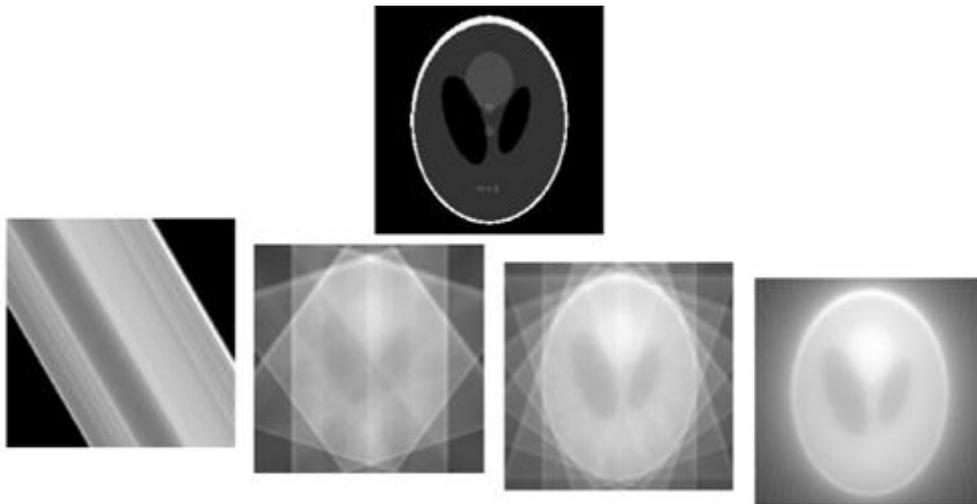


Fig.A7 Ejemplo de retroproyección con diferentes números de proyecciones

Intentaremos ahora formalizar la idea anterior:

Planteamos la función objeto  $f(x, y)$  como la transformada inversa de su transformada de Fourier:

$$f(x, y) = \int_{-\infty}^{\infty} \int_{-\infty}^{\infty} F(u, v) e^{i 2\pi(ux+vy)} du dv$$

Realizamos un cambio de coordenadas en el espacio de Fourier, de cartesianas  $(u, v)$  a polares  $(w, \theta)$ :

$$\begin{cases} u = w \cos \theta \\ v = w \sen \theta \end{cases}$$

En el cambio a polares, la relación de áreas en la transformación es:

$$du dv = w dw d\theta$$

Queda, por tanto:

$$f(x, y) = \int_0^{2\pi} \int_{-\infty}^{\infty} F(w, \theta) e^{i 2\pi w(x \cos \theta + y \sen \theta)} w dw d\theta$$

Dividimos la anterior integral en dos recorridos complementarios, de 0 a  $\pi$  y de  $\pi$  a  $2\pi$ , para “manipular” el segundo de ellos:

$$\begin{aligned} f(x, y) &= \int_0^{\pi} \int_{-\infty}^{\infty} F(w, \theta) e^{i 2\pi w(x \cos \theta + y \sen \theta)} w dw d\theta + \\ &\quad \int_{\pi}^{2\pi} \int_{-\infty}^{\infty} F(w, \theta) e^{i 2\pi w(x \cos \theta + y \sen \theta)} w dw d\theta \\ &= \int_0^{\pi} \int_{-\infty}^{\infty} F(w, \theta) e^{i 2\pi w(x \cos \theta + y \sen \theta)} w dw d\theta + \\ &\quad \int_0^{\pi} \int_{-\infty}^{\infty} F(w, \theta + \pi) e^{i 2\pi w[x \cos(\theta + \pi) + y \sen(\theta + \pi)]} w dw d\theta \end{aligned}$$

Usaremos la siguiente propiedad de la transformada de Fourier:

$$F(w, \theta + \pi) = F(-w, \theta) = F(w, \theta)$$

Para reescribir  $f(x, y)$ :

$$f(x, y) = \int_0^{\pi} \left[ \int_{-\infty}^{\infty} F(w, \theta) e^{i 2\pi w(x \cos \theta + y \sen \theta)} |w| dw \right] d\theta$$

Renombramos como  $t$  a  $(x \cos\theta + y \sen\theta)$ , de modo que:

$$f(x, y) = \int_0^\pi \left[ \int_{-\infty}^\infty F(w, \theta) e^{i 2\pi w t} |w| dw \right] d\theta$$

En esta última expresión cabe sustituir la transformada de Fourier de la función objeto  $F(w, \theta)$  por la transformada de Fourier de la proyección (Th. de la Sección Central de Fourier),  $S_\theta(w)$ , y quedaría:

$$f(x, y) = \int_0^\pi \left[ \int_{-\infty}^\infty S_\theta(w) e^{i 2\pi w t} |w| dw \right] d\theta$$

Si ahora llamamos:

$$Q_\theta(t) = \int_{-\infty}^\infty S_\theta(w) e^{i 2\pi w t} |w| dw$$

Obtenemos  $f(x, y)$  como “acumulación” de estas funciones  $Q_\theta(t)$  en el espacio real. Son las “retroproyecciones” que introdujimos “visualmente” al inicio de este apartado.

$$f(x, y) = \int_0^\pi Q_\theta(t) d\theta$$

Donde la aparente contradicción en las coordenadas de ambos miembros se resuelve al tener en cuenta que  $(x, y)$  dependen de  $(t, \theta)$ :

$$f(x, y) = \int_0^\pi Q_\theta(x \cos\theta + y \sen\theta) d\theta$$

Como es lógico, para un ángulo  $\theta$  dado,  $t$  vale lo mismo para cualquier pareja de valores  $(x, y)$  de la recta de proyección, luego todos los puntos de esa recta contribuyen en igual medida a la retroproyección. Este resultado no es más que otra manera de realizar la transformada inversa de Radon.

En realidad, estos términos  $Q_\theta(t)$  no son exactamente las retroproyecciones de las que hablábamos, porque esas no tenían en cuenta el término  $|w|$  del integrando.

Si se tiene en cuenta, como corresponde a la verdadera reconstrucción de la función objeto  $f(x, y)$  se habla más propiamente de “retroproyecciones filtradas”, debido a que la integral está ponderada por  $|w|$ . Se la llama “filtrada” porque “la corrección”  $|w|$  se aplica en el espacio de las frecuencias. A esta “versión filtrada” del método de la retroproyección se la conoce por las siglas en inglés FBP (Filtered Back Projection).

Si tenemos en consideración el filtro  $|w|$  la mejora de la reconstrucción es clara. Veámoslo para una simulación de 2, 5, 40 y 100 retroproyecciones.

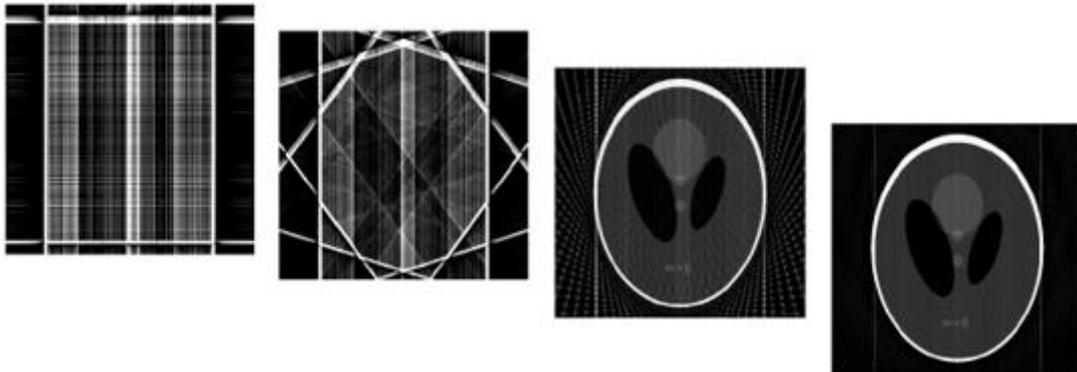


Fig.A8 Ejemplos de retroproyección “filtrada”

Una ventaja de este método frente a los basados en el TSCF es que se evita el proceso de interpolación o “gridding”, necesario en los primeros, al menos cuando se utilizan los algoritmos convencionales FFT e IFFT. Dado que la interpolación supone a todas luces introducir una falta de precisión en los datos a procesar (cuando no artefactos) en este sentido la reconstrucción por FBP suele tener mejor calidad.

Esto último unido a la robustez del método FBP frente a la presencia de ruido en la imagen y frente a la no completitud de datos, el menor coste computacional de sus algoritmos y la simplicidad del método, hacen que sea unos de los más usados en la práctica para la reconstrucción 3D. Además, otra ventaja es que la reconstrucción del objeto puede empezar a procesarse desde que se obtienen las primeras proyecciones, a diferencia del método basado en el TSCF que reconstruye previamente todo el espacio recíproco posible del objeto para recuperar a posteriori este objeto.

En los conjuntos de imágenes de las figuras anteriores, tanto en la retroproyección como en la retroproyección filtrada, puede verse el artefacto más característico de este método, que consiste en las líneas radiales que parten del objeto reconstruido y que le dan aspecto “de estrella”. Este artefacto se hace especialmente visible cuando el número de retroproyecciones es bajo.

### *III.III Métodos algebraicos o iterativos.*

Estos métodos proponen un enfoque radicalmente distinto de la reconstrucción del objeto a los dos anteriores, porque no aluden a la transformada de Radón o de rayos X y operan solamente en el dominio espacial o espacio real. Se llaman “algebraicos” por razones históricas, pero no hay nada en ellos que les haga más algebraicos que cualquiera de los otros métodos que hemos visto.

Para la introducción conceptual a estos métodos iterativos resulta muy útil entender el objeto como un conjunto de pequeños volúmenes (típicamente “cúbicos”) que se llaman “Voxels” (término inglés que proviene de combinar “Volume x Element”). Se trata de una idea que intentamos recoger en la siguiente imagen.

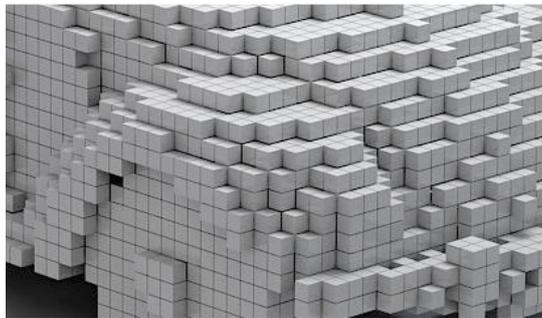


Fig.A9 “Discretización” del objeto en voxels

Como vienen siendo habitual, haremos razonamientos para “una sección 2D” de ese objeto “discretizado” que después podrá extenderse a 3D. Así, consideremos “una capa” del objeto, es decir una sección “de un voxel de grosor” y un rayo de luz que se propague sin desviarse por esta capa (Fig.A10).

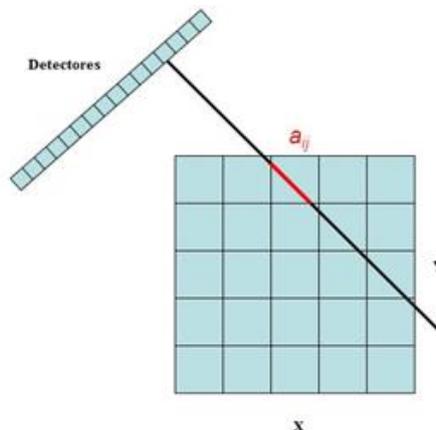


Fig.A10 Idea de rayo “lineal”

Pensemos que cada voxel vendrá caracterizado por un valor característico de atenuación a la luz utilizada en el experimento. Supondremos también que este valor de atenuación es constante dentro de cada voxel (lo cual siempre puede ser una suposición realista si estos elementos de volumen son suficientemente pequeños). Es obvio este rayo se atenuará en función de los voxels que atraviese en su trayectoria.

Aunque este modelo es válido para esta introducción, es fácil ver que sería más preciso considerar que el rayo no es una línea conceptual, sino que tiene una determinada anchura (marcada en muchos casos por tamaño del pixel del detector) y que este rayo se atenúa en cada voxel en función del área (o volumen, para el caso 3D) del mismo que realmente atraviese (marcada en rojo en la siguiente figura). Esta consideración es solo una más de las muchas que pueden ser tenidas en cuenta por los algoritmos para la reconstrucción del objeto por estos métodos.

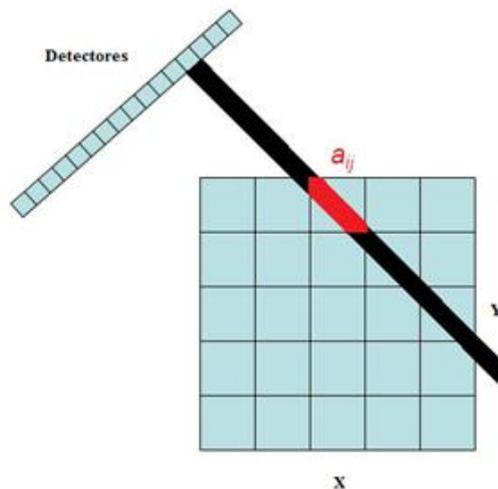
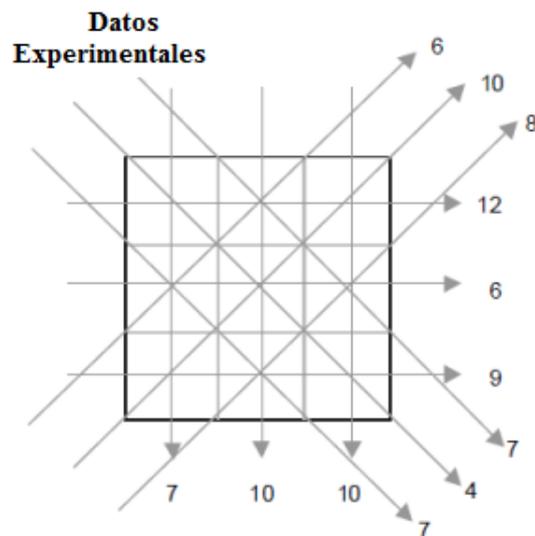


Fig.A11 Idea de rayo “grueso”

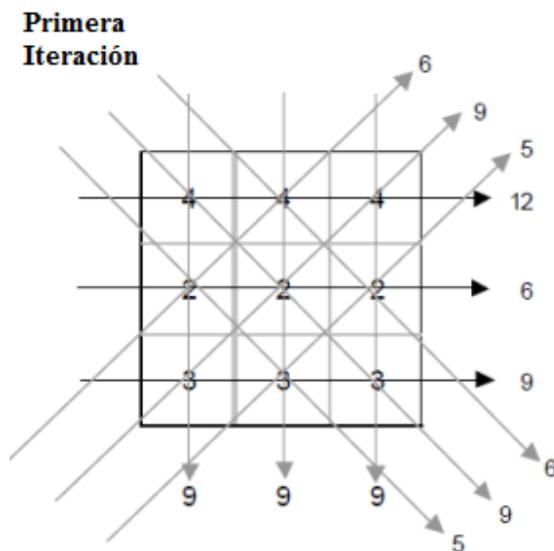
La idea básica es sencilla. Consiste en proponer una estructura inicial para el objeto (por ejemplo, que este sea completamente homogéneo), calcular sus proyecciones y compararlas con las obtenidas en el experimento. En función de la comparación de las proyecciones experimentales y calculadas se modifica el modelo para aproximarlos al que daría estas proyecciones experimentales. De nuevo calculamos sus proyecciones, las comparamos con los datos experimentales, recalculamos el modelo del objeto y así sucesivamente hasta obtener cierta convergencia entre las proyecciones calculadas y las empíricas, de ahí el nombre de “iterativo”.

A continuación un “esbozo” de un método iterativo (ART) en un objeto de 3x3 voxels. Este simple método era el del tomógrafo original de Hounsfield.

Supongamos los siguientes datos de proyección, indicados al final de cada línea, en este conjunto de 9 voxels. El objetivo es, lógicamente, asignar a cada uno de ellos el correspondiente coeficiente de atenuación de modo que la distribución de coeficientes sea compatible con lo medido.

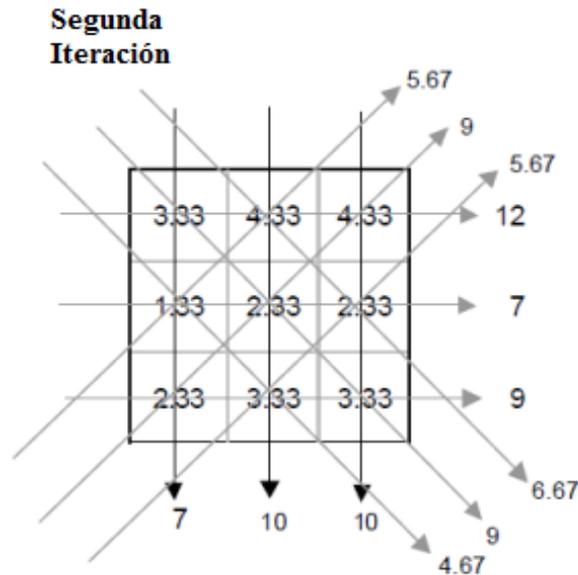


Tomamos una dirección, la horizontal, por ejemplo, y proponemos una primera distribución uniforme por filas, que será las medidas realizadas en esa dirección dividida por el número de voxels en esa misma dirección. Esta primera distribución ya es compatible con las lecturas realizadas en la dirección horizontal, aunque, normalmente, discrepará en el resto de las direcciones medidas.

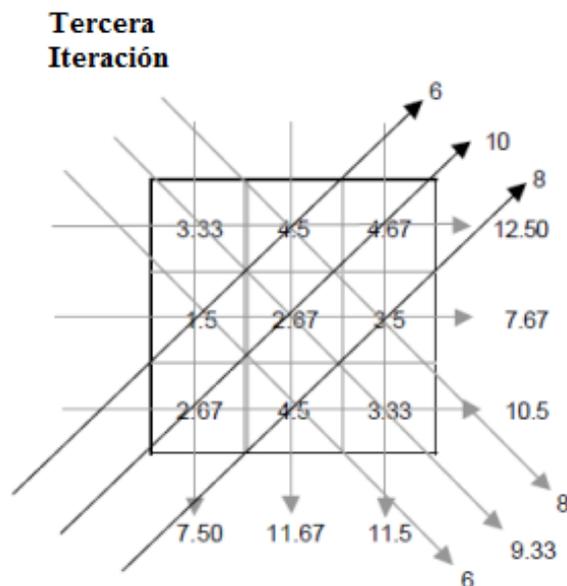


Tomemos ahora otra dirección, la vertical, por ejemplo. En cada posición restamos a esta primera propuesta la lectura experimental menos la que correspondería a esta distribución dividida por el número de pixel en esta dirección.

Por ejemplo, en la primera posición de la primera columna  $4 - \frac{7-9}{3} = 3.33$



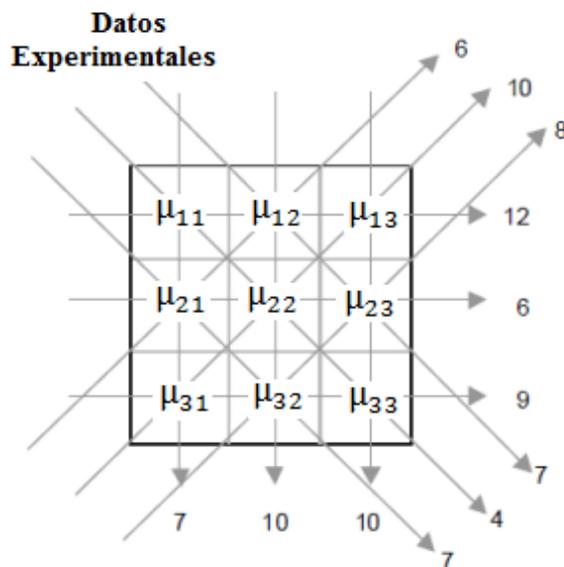
Repetimos el proceso para otra dirección disponible, por ejemplo, la diagonal de pendiente positiva. De manera análoga llegamos a una tercera distribución. Progresivamente vamos acotando una distribución de coeficientes de absorción para estos 9 voxels cada vez más compatible con las medidas experimentales.



Tras procesar todas las direcciones disponibles, el método puede volver a repetirse desde el principio, tantas veces como sea necesario hasta que las diferencias entre lo calculado y lo medido sean menores que una cantidad fijada de antemano. Hay que mencionar que la solución que se encuentra no es única, aunque, lógicamente, las diferencias no deben ser significativas. De hecho, incluso, en el simple algoritmo de este ejemplo, la solución final depende de la dirección por la que empezemos.

Claramente se trata de una aplicación “ideal” para un ordenador: un número ingente de operaciones sencillas. A pesar de que en la práctica el volumen a reconstruir se divide en millones de voxels este cálculo iterativo se puede realizar en un tiempo “razonable” por ordenadores modernos.

En realidad, lo que hemos hecho ha sido resolver por iteración “los sistemas de sistemas de ecuaciones” que se plantean “de forma natural” al proyectar el conjunto de voxels según el cual entendemos el objeto. Así, en nuestro ejemplo, suponiendo por simplicidad que dos datos de intensidad transmitida corresponden a porcentajes de la intensidad de entrada  $I_0$ , el sistema que se plantearía sería:



De la dirección horizontal,

$$I_0 - I_0(\mu_{11} + \mu_{11}\mu_{12} + \mu_{11}\mu_{12}\mu_{13}) = 0.12 I_0$$

$$I_0 - I_0(\mu_{21} + \mu_{21}\mu_{22} + \mu_{21}\mu_{22}\mu_{23}) = 0.06 I_0$$

$$I_0 - I_0(\mu_{31} + \mu_{31}\mu_{32} + \mu_{31}\mu_{32}\mu_{33}) = 0.09 I_0$$

De las diagonales (simplificando  $I_0$ ):

$$(\mu_{21} + \mu_{21}\mu_{12}) = 0.08$$

$$(\mu_{31} + \mu_{31}\mu_{22} + \mu_{31}\mu_{22}\mu_{13}) = 0.10$$

$$(\mu_{32} + \mu_{32}\mu_{23}) = 0.08$$

$$(\mu_{12} + \mu_{12}\mu_{23}) = 0.07$$

$$(\mu_{11} + \mu_{11}\mu_{22} + \mu_{11}\mu_{22}\mu_{33}) = 0.04$$

$$(\mu_{21} + \mu_{21}\mu_{32}) = 0.07$$

Los métodos iterativos son un conjunto de métodos en realidad, cada uno de ellos, lógicamente, con sus particularidades. Son conocidos en muchos casos por las siglas de sus nombres en inglés: ART (Algebraic Reconstruction Techniques), SART (Simultaneous Algebraic Reconstruction Technique), SIRT (Simultaneous Iterative Reconstructive Technique), ML-EM (Maximum likelihood-expectation maximization), OSEM (Ordered subset expectation maximum), SAGE (Space-alternative generalized expectation maximum), LSQ (Least squares minimization), MAP (Maximum a posteriori approach) o ME (Maximum entropy) entre otros.

A favor de estos métodos, decir que no resultan muy sensibles al ruido en los datos de partida y son relativamente robustos ante datos incompletos. También son muy utilizados en la práctica.

#### ***Anexo IV: Sobre la formación de la imagen TEM.***

En lo sucesivo vamos a adoptar el modelo de los electrones del haz como partículas independientes o bien conformando todos ellos en conjunto un frente de ondas. En los cuerpos cuánticos, de los cuales los electrones en movimiento son un excelente ejemplo, dos propiedades complementarias, como son precisamente la naturaleza ondulatoria y corpuscular, no se pueden medir simultáneamente con total precisión, de manera que cuanto más precisión se obtiene en una de ellas, menos se obtiene de la complementaria (Principio de Complementariedad). Esto significa que cuando recurramos al modelo corpuscular para explicar una observación (lo que haremos en alguno de los mecanismos de contraste de los siguientes apartados) entonces no cabe el modelo de onda electrónica. De otro lado, en los experimentos que expliquemos satisfactoriamente mediante el modelo ondulatorio de los electrones, difícilmente podríamos haberlo hecho con el corpuscular y viceversa.

Puesto que el propósito de nuestra experimentación consiste en validar o rechazar diferentes contextos de adquisición de imágenes TEM para tomografía, parece lógico dedicar un esfuerzo a entender los mecanismos de formación de estas imágenes.

Pensemos que si partiésemos de un conjunto “cualquiera” de imágenes, las cuales interpretásemos como proyecciones de un objeto a diferentes ángulos aunque no lo fuesen, siempre sería posible realizar la reconstrucción 3D, en el sentido de encontrar el objeto que resultase “más compatible” con ese supuesto conjunto de proyecciones. Incluso, ¿por qué no?, aunque se trate de imágenes aleatorias o completamente inconexas o incoherentes entre sí. Obviamente, esto carecería de cualquier lógica.

Igualmente obvio resulta que nuestra meta es una reconstrucción “realista” del objeto, y dando por supuesto que los diferentes algoritmos de reconstrucción ya analizados conducen al objeto real, el verdadero condicionante para una reconstrucción veraz del objeto es que las imágenes de partida sean realmente proyecciones, “proyecciones” tal y como las hemos definido a lo largo de este trabajo. Es fácil entender entonces que cualquier efecto que aleje nuestro conjunto de imágenes de partida de las verdaderas proyecciones (léase refracción o difracción entre otros posibles) supondrá que el modelo obtenido discrepe del objeto real, tanto más, en la medida en que las imágenes de partida discrepen a su vez de las verdaderas proyecciones.

El hecho de que la tomografía de electrones sea una técnica bastante difundida y consolidada (aunque reciente, pues su implementación práctica se sitúa a principios de los años 80), nos hace pensar que efectivamente es

posible considerar el microscopio de transmisión de electrones como un proyector de la estructura de objeto, o al menos que existen determinadas condiciones o contextos en lo que esto es realmente así. Veremos que el microscopio se comporta realmente como tal proyector solo en condiciones concretas, a las que deberemos ceñirnos para hacer una reconstrucción realista de la muestra (en microscopía nos referimos normalmente al objeto como “muestra”)

En la microscopía óptica la mayor fuente de contraste es la absorción de la luz en el objeto (incluso absorción “selectiva” que da origen a los colores en la imagen). En el TEM, en condiciones normales de observación, la absorción no contribuye significativamente al contraste de la imagen y este puede ser debido a tres mecanismos que llamamos contraste de fase, contraste de difracción y contraste de amplitud (este último también llamado de masa y espesor). Estos mecanismos de contraste operan siempre “mezclados” en alguna medida, si bien lo normal es que uno de ellos sea predominante. Los mecanismos derivados de la interacción haz-muestra, que proporcionan los diferentes contrastes mencionados son demasiado complejos para que una teoría razonablemente sencilla o “manejable” pueda contemplarlos. Lo que hacemos es recurrir en cada caso, según el contexto de la observación, al modelo más sencillo que explique de manera satisfactoria lo observado. Este “contexto de observación” viene determinado por multitud de factores: muestra amorfa o cristalina, altos o bajos aumentos, campo claro o campo oscuro, longitud de onda de la radiación, posición y tamaño de la apertura de objetivo, etc.

El modelo de electrones como partículas sirve bien para interpretar la imagen del TEM en muchos casos (no en todos porque no recoge fenómenos de interferencia) por lo que recurriremos a este modelo cuando se demuestre suficientemente realista dado que es más sencillo que el ondulatorio. El modelo de ondas electrónicas, que a diferencia del corpuscular sí que contempla posibles interferencias, explica el contraste de la imagen en cualquier contexto, pero como resulta mucho más complicado analíticamente que el corpuscular solo recurriremos a este cuando sea necesario, esto es, cuando el corpuscular falle. Así, el contraste de masa y espesor puede ser explicado desde el modelo corpuscular para los electrones del haz, pero necesitaremos del ondulatorio en otros contextos de observación, por ejemplo, al observar muestras cristalinas, pues solo desde este modelo se explica el contraste de fase o de difracción que se veía en la imagen.

## ***IV.I Contraste amplitud o masa-espesor.***

El contraste de amplitud es mecanismo de contraste más interesante de cara a la aplicación en tomografía porque es el modelo que mejor relaciona este contraste en la imagen con una característica lineal y monótona de la muestra: la masa acumulada en cada línea de espesor, de ahí que también se le llame contraste de masa-espesor. Explicaremos este mecanismo de contraste y veremos qué contexto debe darse para que sea el que predomine en la imagen TEM.

Vamos a considerar los electrones del haz como partículas, modelo corpuscular por tanto, y abordamos el proceso de la siguiente manera: vamos a entender cada átomo de la muestra como “un ente” con un determinado radio efectivo para cada proceso de interacción concreto. Es decir, entenderemos los átomos de la muestra como “áreas”, las que “ve” el electrón primario del haz. Este electrón interactuará con esa área según una determinada probabilidad para cada determinado proceso. De esa manera, hablaremos del “área eficaz” para que el electrón primario sea dispersado en un determinado intervalo angular, o el área eficaz para que el electrón del haz ceda una determinada cantidad de energía y así para para cada posible interacción haz-muestra.

Es precisamente el análisis de esta interacción (esto es cuantificar estas probabilidades) lo que requiere conocimientos de física fundamental y de estado sólido que sobrepasan el alcance de este trabajo. No obstante, resulta lícito para nuestros propósitos utilizar este modelo, sin necesidad entrar en mayor análisis. Así, pensemos en el área de un átomo aislado que “ve” un electrón del haz, esta es:

$$\sigma_{atomo} = \pi r^2$$

Siendo  $r$  el radio efectivo para la interacción concreta que tratemos.

La idea de estas áreas efectivas se entiende bien si pensamos en una ventana de  $1 \text{ m}^2$ , por ejemplo, contra la cual lanzamos una pelota de tenis. Si comprobamos que 9 de cada diez veces la pelota rebota y la vez restante se rompe, diríamos que el área efectiva de la ventana para “la dispersión elástica de la pelota” es de  $0.9 \text{ m}^2$ , y de  $0.1 \text{ m}^2$  para la inelástica.

Supongamos que este radio refiere a la dispersión angular. Este parámetro es entonces especialmente interesante de cara a la formación de la imagen porque determina que electrones llegarán a formar imagen y cuales no: solamente los electrones dispersados menos de un determinado ángulo (el

que imponga la apertura de lente objetivo) contribuirán a la imagen. Por esto este contraste es llamado “de amplitud”, porque atiende solo “al número” de electrones que llegan a cada punto de la imagen.

Físicamente, aunque podemos abstraernos de ello, lo determinante para esta dispersión elástica es la distancia a la que el electrón primario del haz se acerque a un núcleo de la muestra, pues de ello depende la fuerza de Rutherford entre ambos (Fig. A12).

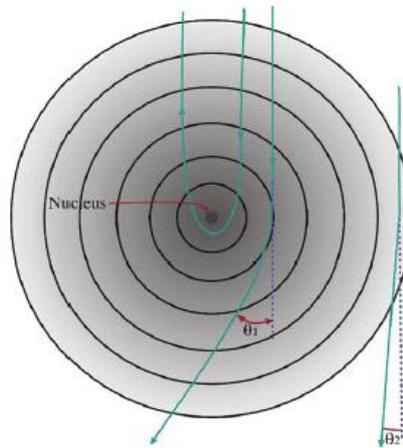


Fig.A12 Interacción haz-muestra

Definimos la sección transversal diferencial de scattering para un átomo aislado como  $d\sigma/d\Omega$ . Donde  $\Omega$  es el ángulo sólido correspondiente a ángulo plano de dispersión o scattering,  $\theta$ . (Fig. A13)

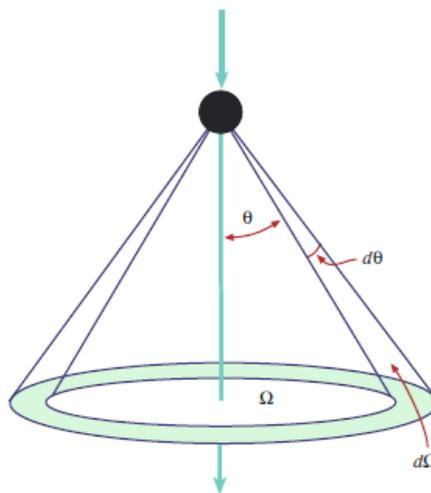


Fig.A13 Sección diferencial de scattering

En realidad,  $d\sigma/d\Omega$  no representa un área física. Más bien debemos entenderlo como la probabilidad de que el electrón sea dispersado dentro del anillo  $d\Omega$  (al pasar por el área efectiva  $\sigma_{\text{atomo}}$ ).

Por geometría diferencial:

$$\Omega = 2\pi(1 - \cos\theta)$$

$$\Rightarrow d\Omega = 2\pi \operatorname{sen}\theta d\theta$$

$$\frac{d\sigma}{d\Omega} = \frac{1}{2\pi \operatorname{sen}\theta} \frac{d\sigma}{d\theta}$$

Podemos integrar entre 0 y  $\theta_1$ , siendo este último el ángulo límite que imponga la apertura de objetivo (o el elemento limitante que sea), al que ya nos hemos referido.

$$\sigma_{\text{atomo}} = \int_0^{\theta_1} d\sigma = \int_0^{\theta_1} 2\pi \operatorname{sen}\theta \frac{d\sigma}{d\Omega} d\theta$$

Obviamente, las muestras reales no son un solo átomo sino un número de estos del orden del número de Avogadro ( $N_A$ ). De hecho, vamos a tener  $N$  átomos por unidad de volumen, siendo:

$$N = N_A \rho / A$$

Con  $\rho$  la densidad y  $A$  el peso atómico de los átomos de la muestra (suponemos un solo tipo de átomos para simplificar).  $N_A$  tiene unidades de  $\text{mol}^{-1}$ ,  $\rho$  son  $\text{kg m}^{-3}$  y el peso atómico  $A$  son  $\text{kg mol}^{-1}$

De este modo podemos entender  $\sigma_{\text{total}} = N \sigma_{\text{atomo}}$  como el número de eventos de dispersión por unidad de volumen. Multiplicando ambos miembros por el espesor de la muestra que “ve” el haz de electrones ( $t$ ) y sustituyendo  $N$ .

$$\sigma_{\text{total}} t = \frac{N_A \sigma_{\text{atomo}} \rho t}{A}$$

Observamos que fijado un tipo de átomos en la muestra hay más eventos de dispersión cuanto más densa sea la materia o cuanto mayor sea el espesor que el electrón primario atravesase, otra razón para el nombre “masa-espesor”. Parece explicación suficiente para entender la imagen del microscopio de electrones como “un mapa de densidades” de la muestra si no fuese por un trascendental “matiz” que comentamos a continuación. Si los eventos de dispersión del electrón primario son “muchos” en el espesor  $t$ , no podemos relacionar este número de eventos con la dispersión angular media, porque

los electrones, que son necesariamente alejados de su trayectoria inicial en una primera dispersión, pueden reconducirse, o no, hacia esta trayectoria original en los sucesivos eventos de dispersión. El proceso es menos “determinista” cuantos más eventos de dispersión experimente cada electrón del haz al atravesar la muestra.

En definitiva, solo podemos relacionar la dispersión media de los electrones del haz con número de eventos de dispersión, esto es, solo podemos relacionar la densidad local de la muestra con su contraste en la imagen si el espesor de esta muestra es suficientemente delgado como para que la dispersión múltiple o scattering múltiple sea poco probable. Dicho de otra manera, el espesor de la muestra debe ser del orden o inferior al recorrido medio entre dos eventos de dispersión de los electrones del haz en la muestra (que se llama “recorrido libre medio” y se define como el inverso de  $\sigma_{total}$ ). Este es el verdadero sentido de “fina” o “delgada” al que nos referimos desde el principio de este documento al hablar de la muestra es microscopía electrónica de transmisión.

El recorrido libre medio de los electrones depende de la velocidad de los mismos, la que a su vez depende de la tensión de aceleración del microscopio y, por supuesto, de la propia naturaleza de la muestra. A modo de ejemplo, y considerando eventos de dispersión elástica, esta distancia es de unos 200 nm en una muestra de carbón y del orden de 9 nm en una de platino para un TEM operando a 100 Kv. Si doblamos la tensión a 200 Kv, este recorrido libre medio, y por tanto los espesores de muestra admisibles para interpretar la imagen como una “proyección de densidades”, pasarían a unos 400 nm en carbón y unos 14 en platino.

Es evidente que hemos simplificado mucho una teoría compleja. Por ejemplo, hemos obviado el hecho de que habrá también electrones inelásticamente dispersados en direcciones donde sea más probable la dispersión elástica y viceversa, de modo que nunca tendremos un modelo de contraste “puro”. No obstante, en muestras biológicas, poliméricas o inorgánicas no cristalinas, el análisis hecho se demuestra, en general, suficientemente realista. Este modelo de contraste no contempla fenómenos interferenciales, de ahí que colapse en situaciones donde estos últimos sean importantes.

Es claro que podemos entender el contraste de amplitud como un contraste de absorción aun sin serlo en realidad, porque electrones excluidos de la imagen por la apertura de objetivo es lo mismo, a efectos de la imagen final, que electrones absorbidos por la muestra ya que, en definitiva, no

contribuyen a esta imagen. Esto es clave para interpretar nuestra imagen TEM como una proyección en la que el contraste de deba a la absorción (Fig.A14).

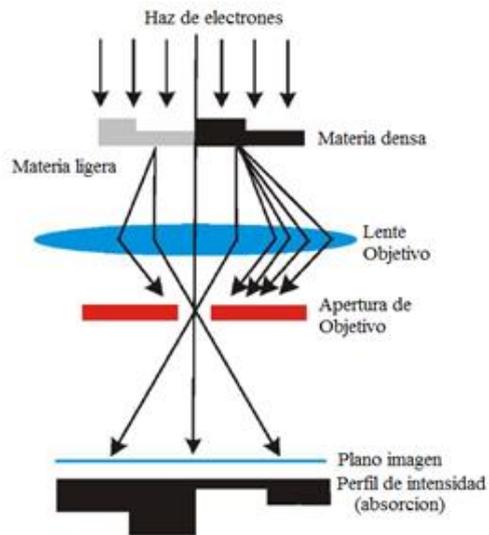


Fig.A14 Representación del contraste de masa-espesor en el TEM

Es muy habitual en microscopía en general y en microscopía de electrones en particular hablar de imágenes de “campo claro” y de “campo oscuro”, en función de que el haz directo participe o no en la imagen. El nombre deriva de que si no hubiera muestra interpuesta al haz de electrones la pantalla del microscopio aparecería oscura en campo oscuro y brillante en el modo de campo claro. Al hablar de imagen TEM nos referiremos, salvo que se especifique otra cosa, al campo claro (Fig.A15).

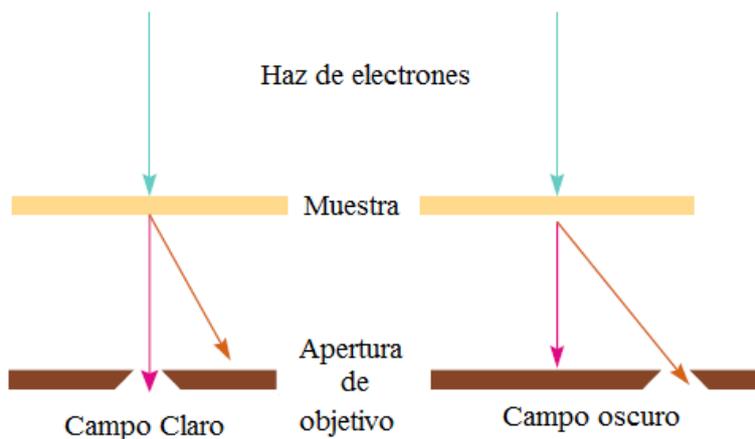


Fig.A15 Configuraciones de campo claro y campo oscuro

### **Nota sobre el espesor de la muestra:**

Ya sabemos que tener un espesor de muestra suficientemente fino es determinante para poder interpretar las imágenes: el grosor de la muestra debe ser, como máximo, del orden del recorrido libre medio de los electrones primarios al transmitirse por esta muestra. La preparación de la muestra que nos permita tener esos grosores, al menos en alguna parte de esta, es fundamental en microscopía electrónica de transmisión.

Los métodos de preparación de muestra son muchos, y el que se utilice dependerá principalmente de la naturaleza de la muestra, ya que deben garantizar en lo posible que la característica de la muestra a estudiar en el microscopio no se alterará significativamente durante el proceso de preparación.

De cara a la tomografía electrónica, lo deseable es partir de un espesor de muestra incluso notablemente inferior al recorrido libre medio mencionado dado que vamos a inclinarla. Ya sabemos que necesitaremos obtener una serie de imágenes de inclinación con las que realizar la reconstrucción tomográfica. El “grosor efectivo” de muestra, que el haz “vea” es el que realmente tenga (sin inclinar) corregido por el ángulo de inclinación (dividido por el valor absoluto de su coseno). Por ejemplo, una muestra de 100 nm de espesor, tendrá, a efectos, del orden de 300 cuando la inclinemos 70 u 80°. Este incremento efectivo del grosor con la inclinación de la muestra puede llegar a ser la verdadera limitación al ángulo máximo alcanzado en la serie de imágenes, y no el ángulo máximo que permita mecánicamente el microscopio. Mostramos este efecto en la siguiente figura.

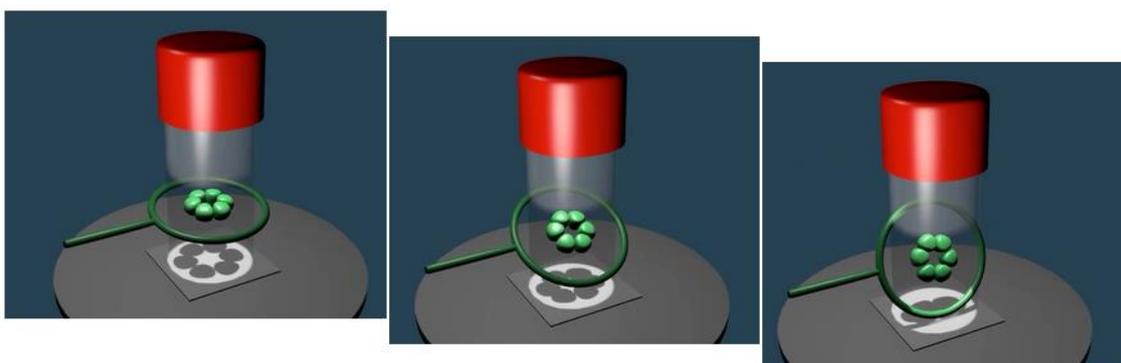


Fig.A16 El “espesor efectivo” de la muestra depende de la inclinación

El Capítulo X del libro de William y Carter, por ejemplo, se dedica exclusivamente a técnicas de preparación de muestras de ciencia de materiales para microscopía electrónica de transmisión.

## *IV.II Contraste de fase*

En el siguiente análisis del contraste de fase vamos a hacer uso implícito de la *Teoría Escalar de la Difracción* de la luz, la cual se basa en el principio de Huygens-Fresnel.

Según esta teoría cada punto de un frente de ondas puede ser considerado como un emisor de tamaño diferencial, y por tanto emisor de ondas esféricas, que emite con una amplitud y fase característica. El campo en cualquier punto del espacio en la dirección de propagación se calcula como la superposición de todos los campos emitidos por estos emisores puntuales. Es precisamente al resultado de esa superposición de campos a lo que llamamos campo propagado o campo difractado, que, en particular, será la entrada para el siguiente elemento óptico. La operación que determina esta propagación a distancia solo puede ser una integral, la “integral de difracción”.

Según el contexto en el que se pretenda solucionar esta integral de difracción, “cerca” o “lejos” del frente considerado, caben unas u otras aproximaciones que dan lugar, respectivamente a las llamadas difracción de Fresnel o de Fraunhofer respectivamente, pero planteamiento en ambas difracciones es exactamente el mismo: la naturaleza ondulatoria de la luz.

Esta teoría escalar de la difracción de la luz es a su vez solo una aproximación a la realidad física pues trata la luz, más propiamente sus componentes eléctrica y magnética “como escalares independientes” (de hecho, suele ignorarse este último campo, obviando el hecho de que ambas componentes son en realidad vectores acoplados según las ecuaciones de Maxwell). Tener en consideración el acoplamiento de los campos eléctrico y magnético de la luz según las ecuaciones de Maxwell daría pie a la *Teoría Vectorial de la Difracción*, aún más general que la escalar pero analíticamente más compleja.

Afortunadamente, la aproximación escalar es aceptable, en el sentido de ajustarse a las observaciones experimentales en muchos contextos prácticos habituales, concretamente si la extensión del frente de ondas que se difracta es “grande” respecto de la  $\lambda$  de la radiación primaria y siempre que no analicemos esta superposición de campos “demasiado cerca” del frente que se difracta (a pocas longitudes de onda).

El hecho clave para nosotros es que volveremos a analizar el microscopio electrónico y las ondas de materia propagándose por el mismo (y a través de la propia muestra) como si fuese un sistema óptico convencional de luz.

Desconozco si existe modelos del microscopio electrónico de transmisión no basados en la teoría escalar de la difracción sino en lo que sería estrictamente representativo: solucionar la ecuación de Schrödinger dentro y fuera de la muestra, esto es, propagación de la onda de materia por los potenciales magnéticos de las lentes y por la distribución de potencial que supone la muestra. En todo caso es aceptado, y así lo confirma la experimentación, que la analogía entre la óptica convencional y la óptica electrónica es completamente realista.

A continuación queremos poner de manifiesto como la naturaleza ondulatoria de la luz puede proporcionarnos una imagen del objeto distinta de su verdadera proyección. Este “enfoque ondulatorio” del proceso de interacción haz-muestra es de hecho es el único enfoque realista cuando, por ejemplo, se obtienen imágenes a tantos aumentos que se pone de manifiesto la naturaleza no continua o discreta de la materia, es decir su distribución atómica. Las imágenes de alta resolución solo se interpretan si consideramos los posibles efectos de interferencia entre los haces dispersados por la materia (teoría escalar de la difracción). Se habla entonces de contraste de fase. Lo que planteamos en realidad es la dispersión de un frente de ondas plano (el haz de electrones o haz primario) en un conjunto (en principio continuo) de haces secundarios (Fig. A17)

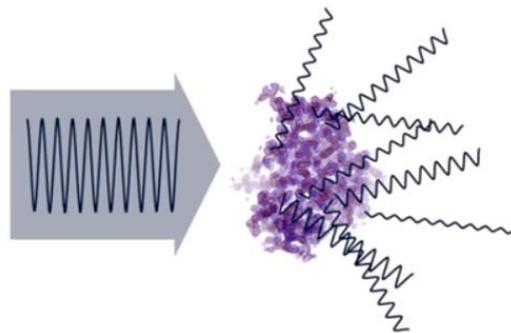


Fig.A17 Dispersión del haz primario por el objeto

Estos haces dispersados (o “difractados”, enseguida veremos el “matiz” entre ambos términos) tendrán diferentes valores fase relativos a la onda incidente, lo que dependerá del campo de potencial que supone la muestra a través de la cual se propaga la onda. También estas ondas “secundarias” podrían haber experimentado un cambio en la amplitud debido a procesos de cesión de energía de los electrones primarios del haz a los átomos de la muestra (cambios “pequeños” en general).

Al igual que en microscopía óptica donde es posible limitar la sección transversal del haz de luz dispersado por la muestra utilizando aperturas (o aberturas), en microscopía electrónica también se utiliza este mecanismo. La apertura más importante en este sentido es la apertura de objetivo (de la lente objetivo) porque su tamaño y posición condiciona drásticamente el contraste de la imagen. Dependiendo de qué haces secundarios pasen realmente por la apertura de objetivo y de cómo interactúen las fases de estas ondas, así será el contraste que se observará finalmente en la imagen: el enfoque de la imagen condiciona absolutamente esta interacción hasta el punto de que en alta resolución un átomo puede verse como un punto brillante o como oscuro (se dice que el contraste es positivo si los átomos aparecen oscuros en fondo claro y negativo si aparecen brillantes en fondo oscuro).

Dado que el sistema óptico que es microscopio electrónico proyecta en la pantalla de observación (o cámara digital) un plano muy próximo al plano objeto, lo que nos muestra en realidad es el patrón de difracción de campo cercano, que llamaríamos “de Fresnel” en óptica de luz visible (de nuevo la analogía con la óptica convencional es muy grande). Por establecer un símil con una experiencia “cotidiana” donde se visualicen “efectos difractivos”, podemos pensar en la imagen del filo de una cuchilla iluminado con luz coherente y monocromática (como un láser). Es claro que imagen (patrón de Fresnel en realidad) no representa fielmente la forma física del objeto. Obsérvese este efecto en la siguiente imagen.



Fig.A18 Ejemplo de difracción de Fresnel

La distribución de franjas (de Fresnel) que observemos dependerá de cual sea el “plano objeto” traslademos realmente al plano imagen.

En un TEM variar el plano objeto, es decir el conjugado del plano del detector (este último es fijo) es tan sencillo como cambiar la potencia de la lente objetivo (es un bobinado eléctrico), basta variar la corriente que circula, de modo que veremos con facilidad como cambian estas franjas de interferencia de Fresnel. Las franjas de Fresnel se aprecian rutinariamente en el TEM en los bordes del objeto o de la membrana de polímero y carbono que sirve normalmente como soporte de la muestra. Esto último es lo que queremos mostrar en la figura siguiente.

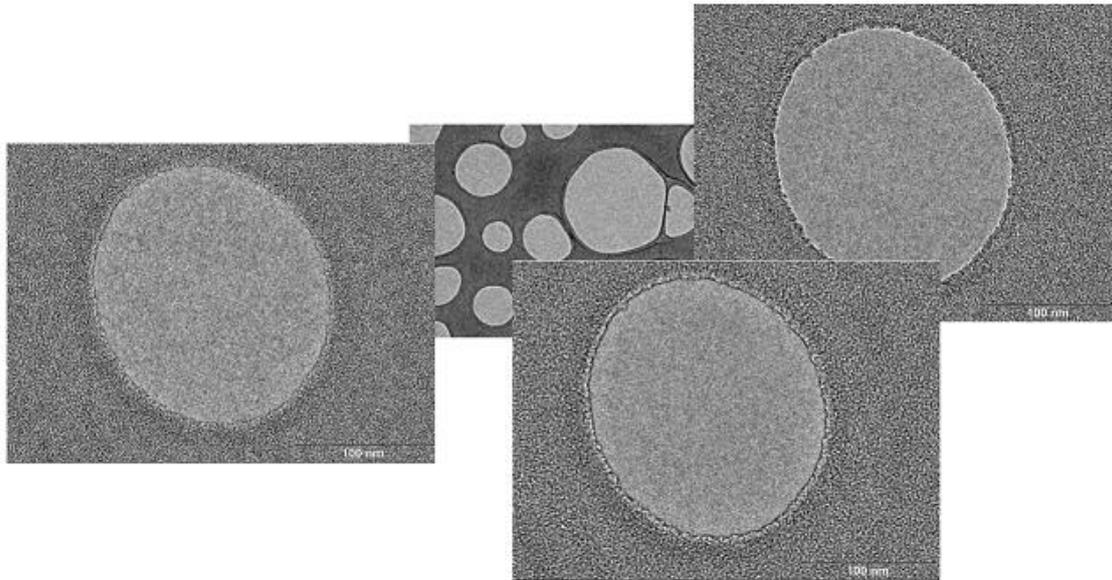


Fig.A19 Ejemplo de franjas de Fresnel en imágenes TEM

Tengamos en cuenta que el haz de electrones de un microscopio es parcialmente coherente, más o menos coherente dependiendo de la tecnología del “cañón” donde es generado: termoiónico o de efecto túnel (también llamados de “emisión de campo”), pero parcialmente coherentes en todo caso. En definitiva, siempre vamos a ver claramente efectos difractivos en la imagen, como lo son estas franjas de Fresnel, que alejarán la imagen de su verdadera proyección.

Hasta aquí tan solo hemos querido poner de manifiesto que los efectos difractivos en la imagen pueden suponer que no podamos interpretar una imagen TEM como la proyección de la densidad del objeto. El resto de este apartado lo dedicaremos a introducir una teoría más general que nos permita, hasta cierto punto, la interpretación de la imagen. Para ello vamos a asumir en lo sucesivo algunas ideas básicas de la óptica de Fourier.

Entenderemos a la muestra u objeto como “un ente” que va a modificar localmente fases y amplitudes de la onda primaria incidente al transmitirla. A efectos, la muestra será “una función compleja”. Entenderemos la lente como “una ventana” moduladora solamente de las fases por ser perfectamente transparente a los electrones.

Otra premisa que adoptamos de la óptica de Fourier será suponer que “idealmente” en el BFP de la lente objetivo se tiene una distribución de luz que podemos asociar formalmente a la transformada de Fourier del objeto y que en el plano imagen tendremos una representación de este objeto (con el correspondiente factor de aumento, de haberlo).

La idea del objeto como “una función compleja” que va a multiplicar, a “modular”, la onda electrónica cuando pase a su través, tanto en amplitudes como en fases, la queremos mostrar en este dibujo:

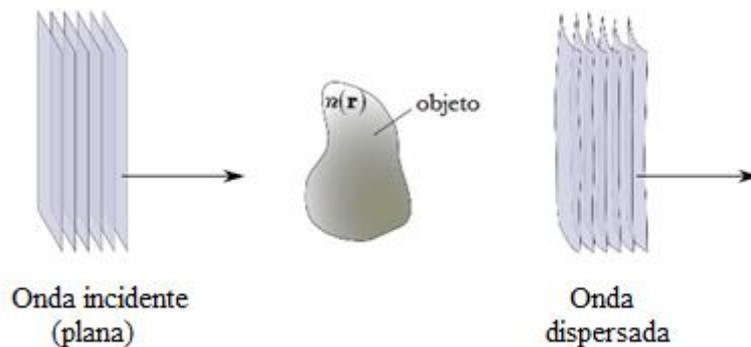


Fig.A20 La onda objeto “codifica” al objeto

Así, después del objeto tendríamos una onda que debe “codificar” al objeto en el sentido de contener toda la información sobre este. Caracterizamos esta onda dispersada por el objeto por sus diferencias con la onda plana incidente (en amplitud y fase). A este concepto es a lo que llamamos “onda objeto”:

$$W(r) = O_0(r) e^{-i\psi(r)}$$

En esta expresión, la amplitud  $O_0(r)$  describe cómo la onda primaria ha sido atenuada por el objeto, es su “transmitancia”. De otro lado,  $\psi(r)$  representa el retraso de fase que este objeto ha introducido la onda primaria.

Es realista suponer que, en condiciones ordinarias de observación del TEM, el desfase  $\psi(r)$  es muy pequeño. A este contexto se llama aproximación WPO (Weak-Phase Object), y facilita enormemente el tratamiento matemático del proceso como vamos a ver. Esta es la primera aproximación crítica que asumimos.

Valores de  $\psi(r)$  muy pequeños, junto con el hecho de la transmitancia del objeto  $O_0(r)$  va a tener valores próximos a 1 para todos los puntos del objeto permiten la siguiente aproximación:

$$W(\vec{r}) = O_0(r)e^{-i\psi(r)} \approx 1 - i\psi(r)$$

En microscopia electrónica de trasmisión, hablar de objetos “casi” transparentes a la onda electrónica y que cambian muy poco la fase de esta última es hablar de muestras “finas”, según el concepto de “fina” que hemos venido discutiendo en apartados anteriores.

Ahora pasamos al plano focal posterior de la lente objetivo (suele llamarse BFP: Back Focal Plane) donde, caso de tener una lente objetivo ideal, puede entenderse que tendremos la transformada de Fourier de  $W(r)$ .

$$\hat{W}(k) = TF\{1 - i\psi(\vec{r})\} = \hat{\delta}(k) - i\hat{\psi}(k)$$

En esta y sucesivas expresiones  $k$  representa la variable de Fourier o frecuencia espacial,  $\hat{\delta}(k)$  es la distribución delta de Dirac y  $\hat{\psi}(k)$  es la transformada de  $\psi(r)$ , esto es,  $TF\{\psi(r)\}$ .

Nota: usamos el símbolo de acento circunflejo para denotar que las funciones están definidas en el espacio de Fourier.

Como decimos, si la lente objetivo fuese ideal, podríamos entender que tendremos en su BFP la TF de la función objeto y esta misma función objeto en plano imagen (con cierto aumento, que en microscopia electrónica suele ser de unas 20 o 25 veces)

En sistemas reales tenemos lentes que no son ideales sino aberradas, con defectos, en particular con aberración esférica. Vamos a introducir esta última aberración de la lente como “un desfase adicional” a cada armónico o termino de Fourier presente en este plano. Representemos este desfase adicional por  $\hat{\chi}(k)$  del cual supondremos además que es “pequeño”, lo cual es también una suposición realista en el contexto del TEM. De hecho, algunos modernos microscopios corrigen esta aberración a valores muy próximos a cero.

Físicamente se está alterando la fase de cada “emisor” de ondas esféricas que podemos imaginar en el BFP antes de que interfieran para formar la imagen en el proceso que asociamos a la transformada inversa de Fourier (Fig.A21). Como veremos este desfase adicional va a tener dos partes, una fija, debida a un coeficiente no nulo de aberración esférica (Cs) de la lente objetivo y otro que dependerá del foco que la lente tenga en ese momento (la potencia de una lente magnética es variable como ya mencionamos).

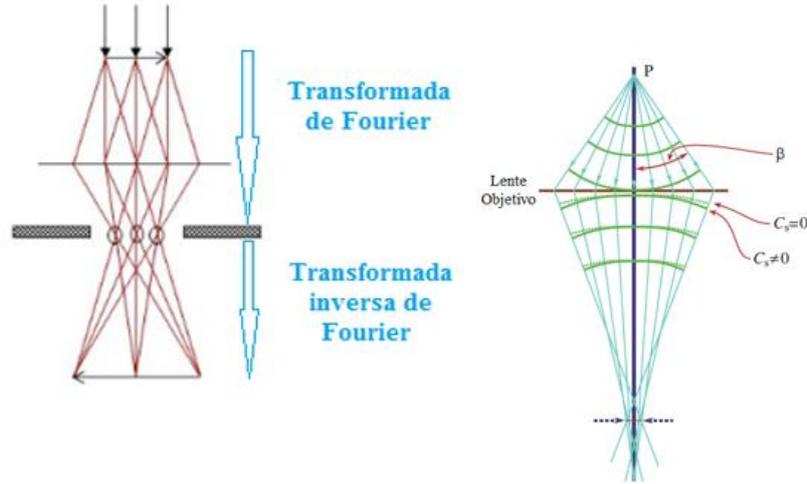


Fig.A21 Imagen TEM como transformada inversa de la transformada “aberrada”

Definimos esta función “de error de fase”  $\hat{\chi}(k)$  en el dominio de Fourier, de modo que va a multiplicar a la función objeto  $\hat{W}(k)$ :

$$\hat{W}'(k) = e^{-i\hat{\chi}(k)} \hat{W}(k)$$

Introduciendo:  $e^{i\hat{\chi}(k)} = \cos \hat{\chi}(k) + i \sin \hat{\chi}(k)$

$$\hat{W}'(k) = \{ \cos \hat{\chi}(k) \hat{W}(k) + i \sin \hat{\chi}(k) \hat{W}(k) \}$$

La función  $\hat{W}'(k)$  será la que realmente ocupe el BFP de la lente objetivo.

Estamos considerando la aproximación WPO, por tanto, podemos hacer:

$$\hat{W}(k) \approx \hat{\delta}(k) - i \hat{\psi}(k)$$

Con lo cual:

$$\hat{W}'(k) \approx \{ \cos \hat{\chi}(k) \cdot (\hat{\delta}(k) - i \hat{\psi}(k)) + i \sin \hat{\chi}(k) \cdot (\hat{\delta}(k) - i \hat{\psi}(k)) \}$$

$$\hat{W}'(k) \approx \hat{\delta}(k) (\cos \hat{\chi}(k) + \sin \hat{\chi}(k)) - i \cos \hat{\chi}(k) \hat{\psi}(k) + \sin \hat{\chi}(k) \hat{\psi}(k)$$

En término relevante es el último (es el que depende del objeto). De hecho, aprovechando que la aberración de fase  $\hat{\chi}(k)$  también es pequeña, el primer término suele aproximarse como:  $\hat{\delta}(k) \cdot (\cos \hat{\chi}(k) + \sin \hat{\chi}(k)) \approx \hat{\delta}(k)$ .

Queda:

$$\hat{W}'(k) \approx \hat{\delta}(k) - i \cos \hat{\chi}(k) \hat{\psi}(k) + \sin \hat{\chi}(k) \hat{\psi}(k)$$

Donde  $\hat{\delta}(k)$  es el armónico de orden cero en este espacio de Fourier. Físicamente es el haz directo o no difractado.

De la manera equivalente a como hemos caracterizado la aberración de la lente objetivo en el espacio de Fourier mediante la función  $\hat{\chi}(k)$ , podríamos haberlo hecho en el real, es decir en la imagen que crea esta lente, mediante la PSF (Point Spread Function). Desde un tratamiento óptico clásico, tan solo estamos considerando que la OTF (Optical Transfer Function) de la lente objetivo, que es la TF de la PSF, tiene por módulo 1 (para las frecuencias efectivamente transmitidas por la apertura de objetivo) es decir que la MTF (Modulation Transfer Function) vale 1 para todas las frecuencia transmitidas y que la PTF (Phase Transfer Function) de esta OTF es precisamente lo que hemos llamado  $\hat{\chi}(k)$ . Esto se explica porque estamos obviado los efectos difractivos derivados del confinamiento del haz por las aperturas del microscopio, lo que a su vez se sustenta por la extremadamente corta  $\lambda$  de los electrones primarios.

$$TF(PSF) = OTF = MTF \cdot e^{i PTF} \equiv e^{\hat{\chi}(k)}$$

Expresemos ahora la “función objeto aberrada” en el espacio real:

$$\hat{W}'(k) \approx \hat{\delta}(k) - i \cos \hat{\chi}(k) \hat{\psi}(k) + \text{sen } \hat{\chi}(k) \hat{\psi}(k)$$

$$W'(r) = TF^{-1}\{\hat{W}'(k)\} \approx \{1 - i PSF_{cos}(r) * \psi(r) + PSF_{sen}(r) * \psi(r)\}$$

Donde el operador \* simboliza la convolución de funciones y hemos llamado  $PSF_{cos}(r)$  a  $TF^{-1}\{\cos \hat{\chi}(k)\}$  y  $PSF_{sen}(r)$  a  $TF^{-1}\{\text{sen } \hat{\chi}(k)\}$

Resta aún calcular la imagen que registrará el detector, la cual corresponderá a la distribución de energía de esta onda. La obtenemos al multiplicar  $W'(r)$  por su conjugada compleja:

$$I(r) = W'(r) \cdot W'^*(r)$$

$$I(r) = \{PSF_{cos}(r) + iPSF_{sen}(r)\} * W(r) \cdot \{PSF_{cos}(r) + iPSF_{sen}(r)\} * W^*(r)$$

$$I(r) \approx \{1 - i PSF_{cos}(r) * \psi(r) + PSF_{sen}(r) * \psi(r)\} \cdot \{1 + i PSF_{cos}(r) * \psi(r) + PSF_{sen}(r) * \psi(r)\}$$

$$= 1 + 2 PSF_{sen}(r) * W(r) + [PSF_{cos}(r) * \psi(r)]^2 + [PSF_{sen}(r) * \psi(r)]^2$$

La aproximación WPO nos va a permitir despreciar los términos de segundo orden donde interviene el pequeño valor  $\psi(r)$ . Por tanto:

$$I(r) \approx 1 + 2 PSF_{sen}(r) * W(r)$$

Volvamos al espacio de Fourier para analizar esta imagen:

$$\hat{I}(k) = TF\{I(r)\} \approx \hat{\delta}(k) + 2 \operatorname{sen} \hat{\chi}(k) \hat{\psi}(k)$$

La “crucial” función **sen  $\hat{\chi}(\mathbf{k})$**  determina como se traduce al contraste de la imagen final los defectos de fase introducidos por la aberración esférica de la lente objetivo del microscopio. Se la conoce como PhCTF (Phase Contrast Transfer Function) aunque la mayoría de los autores la llaman simplemente CTF (Contrast Transfer Function) o Función de Transferencia de Contraste en castellano. Tan extendido está este último nombre, en opinión del autor de este trabajo menos afortunado que PhCTF, que lo usaremos en el resto de este anexo para referirnos a la función  $\operatorname{sen} \hat{\chi}(k)$ .

Son muchos textos sobre microscopia electrónica que calculan el error de fase  $\hat{\chi}(k)$  en función del coeficiente  $C_s$ , la longitud de onda  $\lambda$  y el desenfoque  $\Delta f$ . Nos permitimos remitir el lector interesado en ello nada menos que al trabajo “pionero” al respecto de Otto Scherzer: número 20 de la revista *Journal of Applied Physics* de 1949. Como ya hemos mencionado, aparece un término debido al coeficiente  $C_s$  (un desfase fijo, porque es fijo este  $C_s$ ) además de un término que dependerá del desenfoque  $\Delta f$  (desfase variable, que se controla a voluntad en el TEM):

$$\chi(k) = \pi/2 \cdot (-C_s \lambda^3 k^4 + 2 \Delta f \lambda k^2)$$

El desenfoque  $\Delta f$  se entiende como la distancia entre el plano del cual la lente objetivo forma la imagen y plano-objeto “teórico” para el sistema de aumento (plano conjugado del detector). Existen aplicaciones informáticas para simular la CTF para cualquier par  $C_s$  y  $\Delta f$ . Mostramos en el siguiente ejemplo un cálculo de CTF.

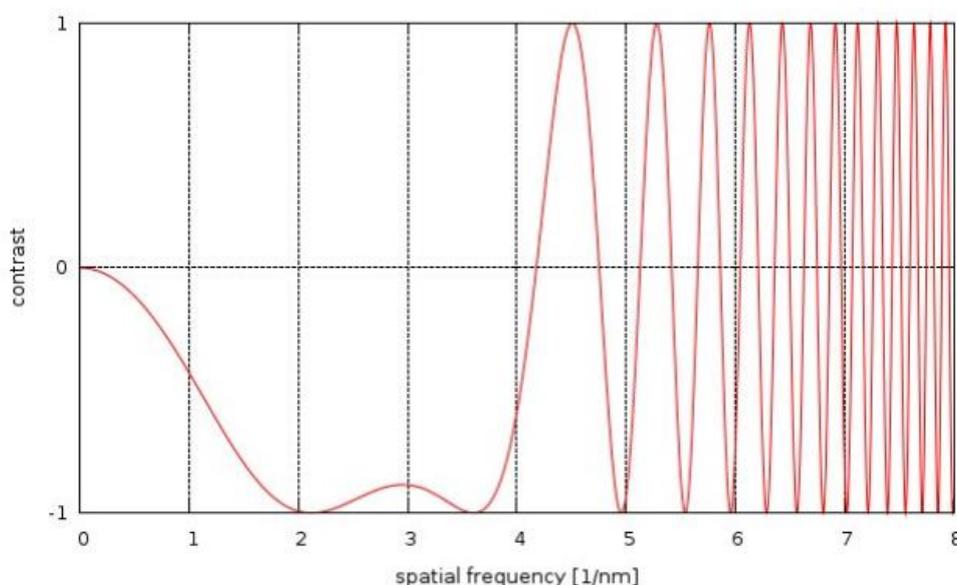


Fig.A22 Simulación de CTF para  $C_s=1.1$  mm,  $\lambda=0.0025$ nm (200KV) e  $\Delta f=60$  nm.

Esta CTF muestra el coeficiente (entre 1 y -1) que multiplica cada armónico de Fourier al formar la imagen final. Es evidente que esta función dista mucho de la CTF ideal que valdría 1 para cualquier frecuencia. Puede ya vislumbrarse, a la vista está CTF, que la PSF de un microscopio electrónico (la FT inversa de esta CTF) tendrá también una forma “compleja”, muy alejada de una gaussiana o cualquier otra forma simple y, por supuesto, de la utópica delta de Dirac. Por no mencionar que el isoplanatismo asumido en esta explicación no es tal, aunque podamos admitirlo en el contexto de la aproximación realizada.

Si ahora consideramos que el haz primario tiene coherencia temporal solamente parcial dado los electrones son emitidos dentro de un rango de energías (del orden de eV) pequeño pero no nulo y que la coherencia espacial tampoco puede ser perfecta dado que los electrones se emiten desde una zona muy pequeña pero no puntual, necesariamente esto va a limitar progresivamente la transmisión de las frecuencias más altas, lo que va a reflejarse en la CTF mediante una función envolvente de la anterior que tienda a cero y que marque efectivamente la resolución del microscopio. La siguiente grafica recoge este efecto.

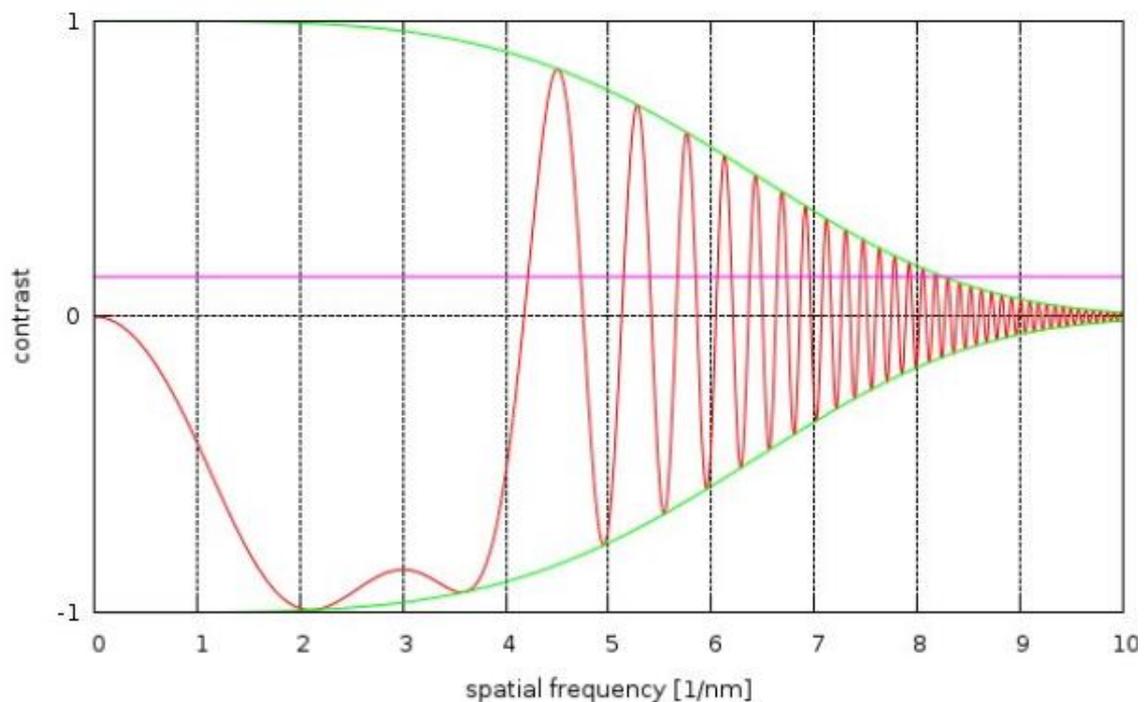


Fig.A23 Simulación de la CTF y su función envolvente.

Es claro que habrá frecuencias objeto que serán claramente visibles en la imagen (las que tengan coeficientes próximos a la unidad), que habrá frecuencias que se perderán (coeficientes de transmisión próximos a cero) y frecuencias que contribuyan a la imagen “restando” su intensidad a la del haz directo o armónico de orden cero (las frecuencias de coeficientes próximos a -1).

Un valor de desenfoque “célebre” es el llamado foco de Scherzer, que extiende al máximo el primer cero de la CTF, lo cual facilita la interpretación hasta esa frecuencia, máxime si a apertura de objetivo bloquea las superiores.

Para este foco de Scherzer la amplitud de la CTF a “altas” frecuencias decae más rápidamente que para otros valores de desenfoque, reduciéndose el llamado “límite de información”. Debido a que la CTF real dista mucho de la ideal (de valor 1 para todas las frecuencias) no podemos interpretar la imagen directamente como una proyección de la densidad de la muestra, al menos no en todos los casos.

Una preciosa simulación del efecto de la CTF en la imagen se puede realizar sobre la imagen de prueba conocida como “Siemens Star”, donde se ve como alguna frecuencia pueden desaparecer o invertirse (la simulación se ha realizado en la mitad derecha de figura para comparar con la original)

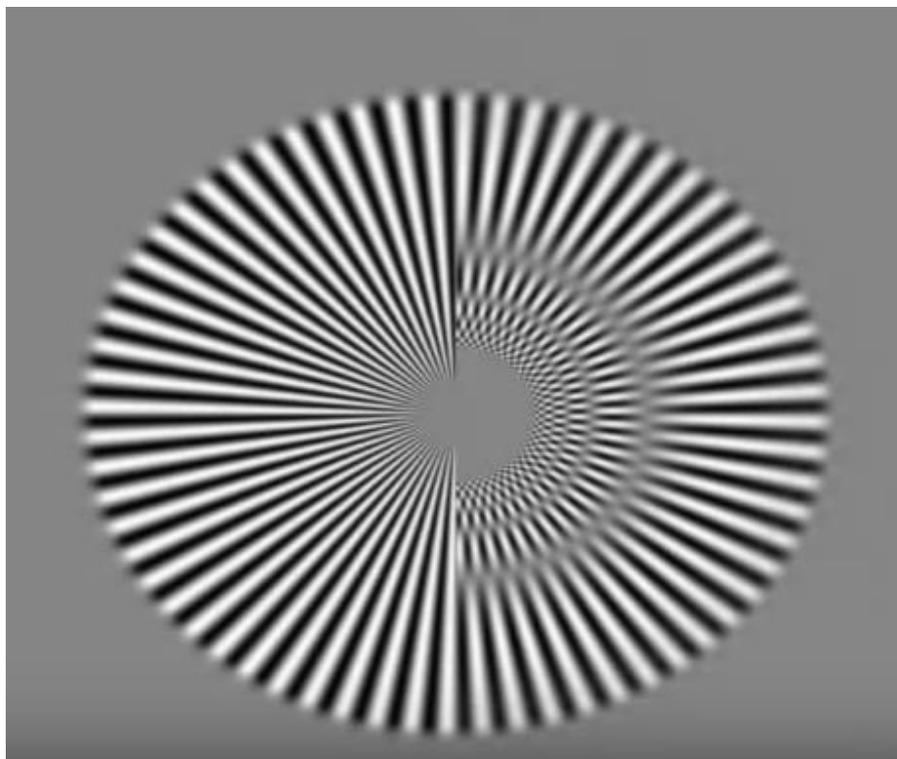


Fig.A24 Visualización del efecto de la CTF en el test “Estrella Siemens”

Podemos entender el microscopio como un sistema capaz de transformar el contraste de fase (invisible en la imagen) a contraste de amplitud (al que es sensible cualquier detector) pero queda claro que la interpretación de una imagen afectada de CTF no puede ser directa. Para poder interpretar la imagen necesitamos que esta represente la verdadera proyección del objeto.

En general, la CTF impide la interpretación directa ante lo que caben dos posibilidades:

Una posibilidad es limitar las frecuencias transmitidas a las previas (menores) al primer cero de la CTF. Este filtro lo impone una apertura de objetivo suficientemente pequeña. Estas condiciones experimentales son “relativamente fáciles” de configurar en la práctica, o al menos de “aproximar”, pues conocemos los diámetros de las aperturas de objetivo disponibles y por tanto hasta que resolución en la imagen limita cada una de ellas, conocemos también el coeficiente  $C_s$  de la lente objetivo y podemos “estimar”  $\Delta f$  porque podemos identificar el enfoque correspondiente a  $\Delta f = 0$ . Este desenfoque se llama “de Gauss” y supone una CTF tal que las bajas frecuencias no son prácticamente transmitidas, mostrando la imagen mínimo contraste. En estas condiciones tendríamos así una imagen “interpretable” aunque de “baja” resolución. Este contexto sería aceptable si la imagen tiene resolución suficiente para nuestros propósitos. Esta situación se corresponde a lo que también explicábamos mediante el contraste de masa-espesor.

Para imágenes que tengan de mayor resolución (las captadas con mayores aumentos) necesitamos que frecuencias-objeto más altas participen, pero esto supone que no podríamos interpretarlas directamente. Aquí cabe una segunda posibilidad: “corregir” el efecto de la CTF mediante el procesado de la imagen, lo cual puede hacerse “hasta cierto punto”.

La idea básica es estimar la CTF con la que se ha captado una imagen mediante el procesado de esta última (viendo que frecuencias componen su espectro de Fourier). Es decir, si sabemos que una frecuencia se transmitió a la imagen con amplitud 0.5, corregimos esas frecuencias por un factor 2 en su espectro de Fourier. Si se transmitió con coeficiente -0.1 se corregiría con factor -10, y así sucesivamente. En definitiva, se trata de “corregir” la CTF efectiva para que quede como se muestra en la siguiente figura (que mostramos corregida hasta cierta frecuencia). Lógicamente no será posible recuperar un entorno de las frecuencias perdidas (no se puede dividir por 0). En la práctica estas frecuencias “perdidas” se recuperan captando otras imágenes con distinto foco, y por tanto con distinta CTF, donde efectivamente aparezcan, para incorporarlas a la imagen final como parte del procesado.

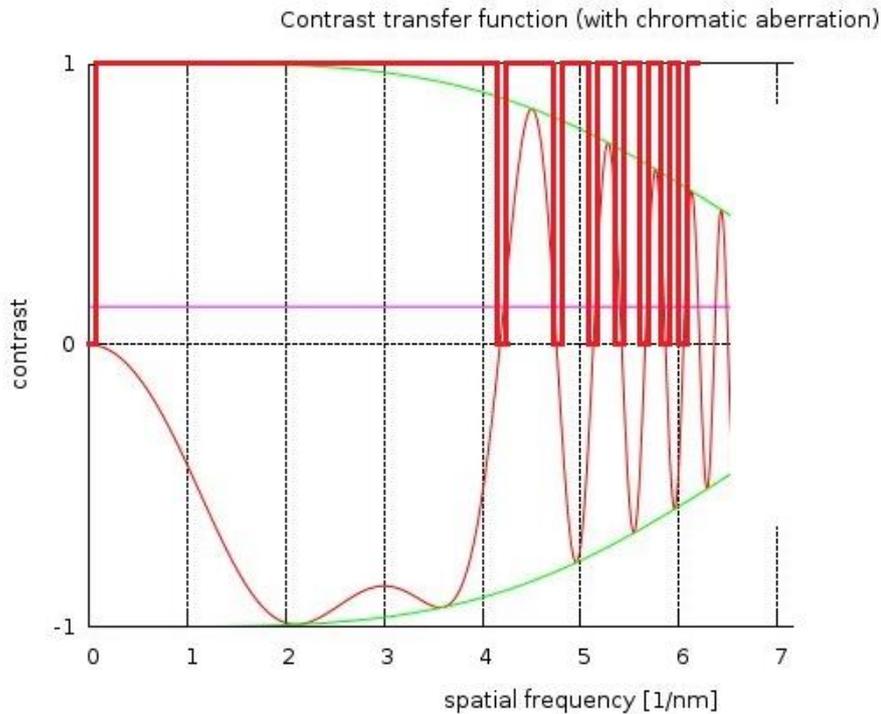


Fig.A25 Idea de “CTF corregida”

Solo hemos esbozado el método de corrección de la CTF, si bien cabe mencionar que a medida que tratamos con frecuencias más altas se hace cada vez más difícil y susceptible de cometer errores dado que la oscilación es cada vez más rápida, de modo que la CTF estimada y la real podrían discrepar fuertemente. Al menos “teóricamente” podremos extender la resolución de la imagen, en el sentido de que podremos interpretarla como la verdadera proyección de la densidad de la muestra, hasta frecuencias más altas para las que la envolvente de la CTF hace que esta se aproxime a cero (este es el “límite de información” que ya hemos mencionado).

Cabe mencionar aquí que por ser la CTF en esencia una función sinusoidal (seno de otra función), necesariamente un entorno de la frecuencia espacial cero no puede transmitirse a la imagen, es decir, inevitablemente perderemos esta información (cualquier CTF que calculemos vale cero a frecuencia cero). Especialmente cuando trabajemos con imágenes de bajos aumentos (baja resolución) esto puede suponer un conveniente porque habrá detalles “gruesos” que no se vean, que prácticamente no tengan contraste. Es muy habitual, por ejemplo, cuando se trabaja con muestras biológicas o de polímeros. En este caso se procede desenfocando fuertemente la imagen, de modo que la CTF tenga una pendiente muy elevada desde el origen y permita la transferencia a la imagen de estas muy bajas frecuencias. En contraposición, el primer cero de la función (distinto del origen, que muchas

veces se llama “crossover”) se produce a frecuencia más baja que en el foco de Scherzer, lo que dificulta la interpretación de frecuencias altas (salvo que sean bloqueadas por la apertura de objetivo, caso en el cual simplemente no participarían de la imagen).

Mencionar, por último (probablemente ya resulte evidente), que la acepción de CTF en microscopía óptica es distinta a la electrónica. En óptica del visible, la CTF alude al contraste de la imagen cuando el objeto es expresamente un patrón de franjas de igual grosor con periodicidad característica.

### ***IV.III Contraste de difracción***

No hay diferencia conceptual significativa entre este contraste de difracción y el anterior contraste de fase. Simplemente cuando los centros dispersores de la onda primaria están regularmente ordenados, por ejemplo, por tratarse de una muestra de estructura atómica cristalina, solemos referirnos a la propagación de la onda como “difracción”, lo que no deja de ser “un matiz del leguaje”. Me permito reproducir una definición, en mi opinión, particularmente acertada, de “difracción” enunciada por Taylor en 1987: “*Any interaction between a wave of any kind and an object of any kind*”.

En cristalografía el análisis de la difracción de la onda primaria por una muestra cristalina se analiza por la ley de Bragg, que no es más que un modelo simplificado para formular o explicar la difracción de campo lejano o de Fraunhofer (de manera cualitativa, pues no alude a la intensidad de los rayos difractados). Simplemente plantea las direcciones en las que los rayos difractados tendrían una diferencia de fase de un número entero de veces la longitud de onda de la radiación incidente, pues en esas direcciones se producirá interferencia constructiva (Fig.A26)

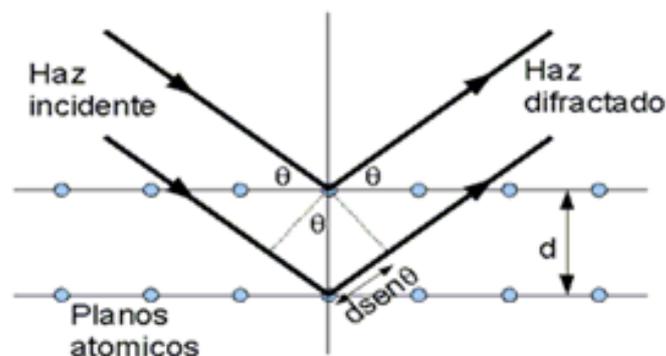


Fig.A26 Ley de Bragg:  $2d \text{ sen } \theta = n \lambda$

Muchos textos dan una bonita demostración grafica de esta ley para un arreglo periódico de átomos (Fig.A27 y A28):

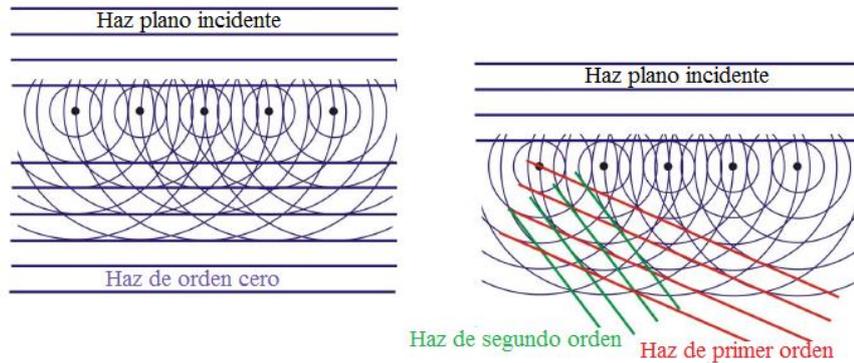


Fig.A27

Si cambiamos el periodo de separación de los átomos o la longitud de onda, tendremos otras direcciones para los haces difractados:

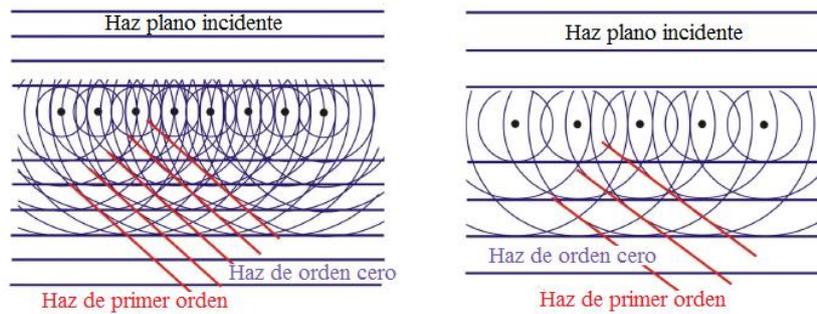


Fig.A28

Se trata aquí solo de entender que el haz difractado por la muestra, será en realidad un conjunto discreto de haces y no un continuo como se daba a entender implícitamente en el anterior modelo del contraste de fase (Fig.A29)

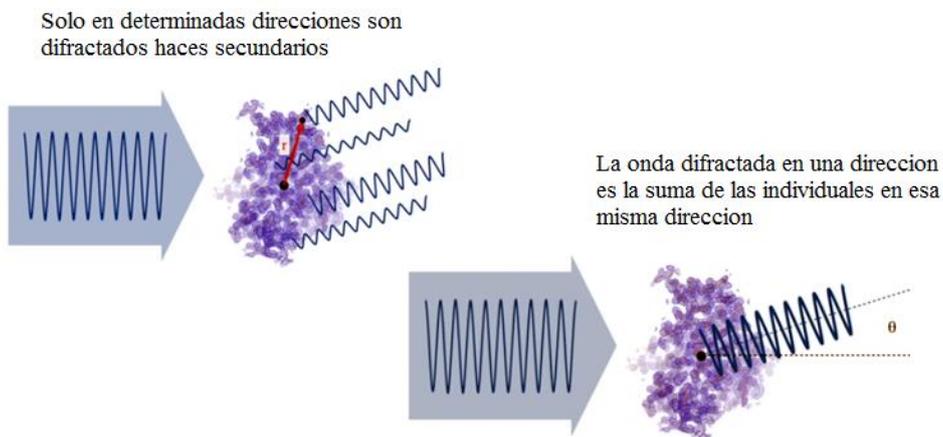


Fig.A29 Difracción de Bragg

Análogamente, podemos considerar que los centros dispersores son “grupos de átomos” en vez de átomos simples. El razonamiento es similar si bien las ondas difractadas lo serán con ángulos aun menores por ser las distancias entre estos grupos de átomos mayores que las distancias entre átomos individuales (Fig.A30)

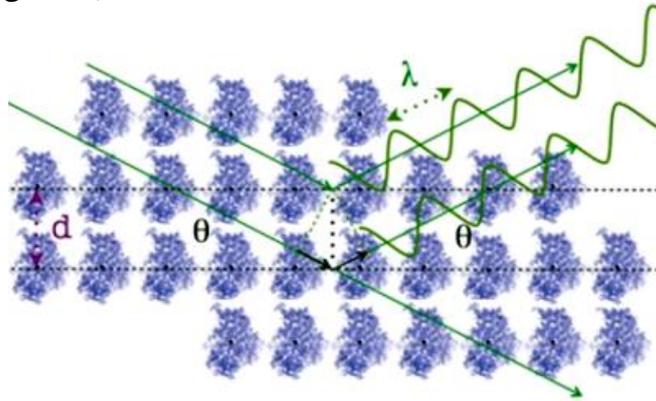


Fig.A30 Difracción por “grupos” de átomos

Estamos considerando interacciones elásticas, luego la muestra tiene que ser “suficientemente fina” para que estos procesos primen. Resulta bastante evidente que en una muestra “gruesa” priman las interacciones inelásticas hasta el punto de que el haz llega a ceder toda su energía a la muestra, esto es, se absorbe completamente si esta muestra fuese muy gruesa.

La clave es entender que si un cristal es orientado en condiciones de Bragg respecto al haz de electrones se produce una gran dispersión angular según ángulos mucho mayores que si la muestra careciese de esa ordenación.

Muchas de estas reflexiones de Bragg, las difractadas a ángulos mayores, se perderán al no ser colectadas por la apertura de objetivo (o simplemente por incidir sobre las paredes internas del microscopio). Esto supone en definitiva un mecanismo “de refuerzo” del contraste para orientaciones muy concretas y definidas de la muestra respecto del haz, que no puede ser interpretado como proyección. En la práctica, estas imágenes no se prestan a un procesado que elimine este contraste “anómalo”, debido a la complejidad estructural de los cristales reales como quedará claramente de manifiesto en la parte experimental de este trabajo.

A continuación mostramos la difracción de  $\text{SiO}_2$  cristalino y amorfo, para mostrar que en el primer caso los ángulos de los haces difractados son mucho mayores y el efecto de la apertura de objetivo sobre la imagen es drástico.

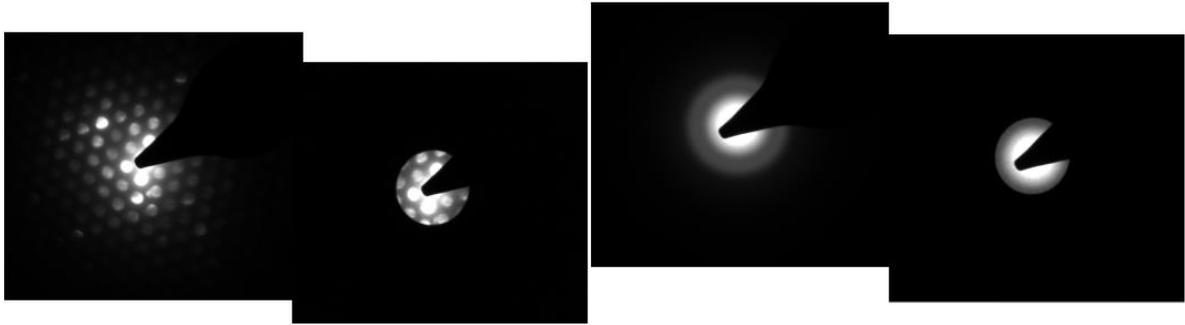


Fig. A31 Comparativa de la difracción de SiO<sub>2</sub> cristalino y amorfo

Tan abruptamente como surgió este contraste de difracción se perderá al abandonar una orientación de Bragg concreta. No se apreciará por tanto que los contrastes que vemos en la imagen varíen con el coseno del ángulo de inclinación, como correspondería a una verdadera proyección.

La apertura de objetivo (en realidad se trata de un conjunto de aperturas, seleccionables por el microscopista) está precisamente situada en el plano de difracción o plano focal posterior de la lente objetivo. Proyectando este plano sobre la pantalla de observación es inmediato ver qué haces difractados contribuyen a la imagen y cuales son excluidos por esta apertura. En principio este tipo de contraste será más pronunciado a medida que la apertura excluya más reflexiones de Bragg, esto es con aperturas más pequeñas.

Nótese que aplicar el razonamiento del contraste de difracción a una muestra no cristalina o amorfa supondría que las fases dispersadas serían aleatorias sin que se produjesen estas claras interferencias constructivas (que es la base del contraste de difracción). Simplemente estaríamos hablando del contraste de fase que describimos en el apartado anterior.

Para finalizar este apartado, comentar la "paradoja" que supone lo siguiente. Si se calcula el número de electrones por segundo que llegan a la muestra, teniendo en cuenta su carga, su velocidad y las corrientes de haz ordinarias de un TEM, se encontraría que llegan a la muestra aproximadamente "de uno en uno". Cuesta concebir que un solo electrón, máxime si lo imaginamos como una partícula, pase por toda la muestra en conjunto y no por un solo punto de la misma, lo que es necesario para que se difracte. Esta es una conocida "paradoja" de la mecánica cuántica muy similar a la difracción de fotones por un conjunto de rendijas o aperturas.

#### ***IV.IV Conclusión***

A modo de conclusión general de este anexo, cabe esperar que el microscopio de transmisión de electrones se comporte como un verdadero proyector de estructuras siempre que las muestras observadas no tengan estructura cristalina y las imágenes captadas no sean de “altos” aumentos susceptibles de contener frecuencias alteradas por la CTF. En este caso, hablamos de un contraste que puede ser explicado por el modelo de amplitud o masa-espesor. Las imágenes de “alta” resolución no son susceptibles de interpretación directa y necesitan de procesado para su interpretación, según lo desarrollado en el modelo del contraste de fase.

Además de lo anterior, en el caso de que la muestra presente algún tipo de ordenamiento, bien por ser de naturaleza cristalina o bien por reproducir algún otro tipo de estructura periódica, la imagen discrepara siempre, en alguna medida, de la verdadera proyección, lo que puede suponer que estas imágenes no sean apropiadas para reconstrucción tomográfica. Dependerá en cada caso de la relevancia que tenga en la imagen el contraste de difracción.

Mencionar de nuevo que solo con muestras “suficientemente finas” es de aplicación todo lo desarrollado en este anexo, pues esa es la premisa de los razonamientos, aproximaciones y cálculos que hemos realizado.

#### ***Anexo V: Sobre la imagen STEM.***

El STEM (Scanning Transmission Electron Microscope) es “un híbrido” entre el microscopio de transmisión y el de barrido. A este último también se le llama SEM por sus siglas en inglés (Scanning Electron Microscope). Básicamente mantiene la configuración (y el aspecto) del primero, pero toma del de barrido que el haz es dinámico, en el sentido de que converge sobre la muestra (la cual sigue siendo “delgada”) y la “barre” trazando líneas paralelas muy próximas entre sí.

Respecto de la formación de la imagen, el STEM es similar al SEM en el sentido de que no hay un sistema óptico posterior a la muestra que forme la imagen. La imagen “se sintetiza” simplemente asignando a cada “punto” de la imagen un nivel de brillo correspondiente a la excitación de un determinado detector, cuando el haz de electrones está precisamente sobre la posición correspondiente de la muestra. Es fácil comprender que la resolución de un microscopio de este tipo dependerá del tamaño del punto

o “spot” que los electrones del haz tengan sobre la muestra, por lo cual estos deben ser focalizados fuertemente sobre ella. En esto, el microscopio STEM es similar al microscopio de barrido de electrones o SEM.

La idea fundamental es que se reducen enormemente los efectos difractivos (interferenciales) al iluminar la muestra con un haz casi “puntual” en vez de un haz “extenso” como ocurre en un TEM, aun cuando la muestra sea cristalina. Esto es así porque iluminamos “un numero bajo” de átomos en la muestra, y la difracción en el sentido de “difracción de Bragg” se justifica como un fenómeno cooperativo entre un número “alto” de átomos dispersores en la muestra.

De cara a formar imágenes que sean lo más fielmente posible una proyección de las densidades de la muestra nos interesa coleccionar electrones del haz que hayan sido dispersados elásticamente en la muestra al pasar cerca de los núcleos atómicos, y que además los hayan sido con un ángulo “elevado” por lo que veremos a continuación.

Parece razonable, y así ocurre realmente, que átomos más pesados en la muestra dispersen más, con mayor ángulo promedio, los electrones primarios del haz, que aquellos átomos que sean más ligeros. De hecho, se demuestra que para estos electrones elásticamente dispersados el contraste en la imagen depende casi exclusivamente del número atómico medio de cada zona de la muestra (más concretamente, depende aproximadamente del cuadrado de este número  $Z$ ).

Modernamente, en especial desde la aparición unos “accesorios” para las lentes de los microscopios electrónicos que corrigen casi totalmente la aberración esférica (en este caso nos interesa corregir la lente condensadora), que se llaman “correctores de aberraciones” por motivos obvios, es posible focalizar el haz a diámetros de spot comparables con los radios atómicos, de modo que en esta situación extrema el haz “ve átomos aislados” y podríamos aplicar con realismo lo visto para la interacción del haz de electrones con un átomo (sin tener que recurrir al modelo ondulatorio para contemplar el contraste de fase).

Precisamente disponer de un tamaño de spot tan pequeño es lo que permite que estos microscopios STEM alcancen incluso resolución atómica (no solo para la imagen, sino también para diferentes espectrometrías asociadas a la microscopía electrónica). Por supuesto esto es solo una simplificación: la nube electrónica alrededor de cada núcleo depende de los otros núcleos a los que se enlace, luego no se trata en ningún caso de un átomo “aislado”. Además, excepto en casos muy especiales, la muestra nunca tiene un

espesor de una sola capa atómica, de ahí que la interacción del haz con un átomo aislado sea, como decíamos, solo una simplificación conceptual. Se da por supuesto que la muestra es suficientemente fina como para que la dispersión múltiple sea poco probable, por exactamente los mismos argumentos que vimos en el caso del TEM.

En general el haz de electrones en el STEM no trabaja en esta configuración de un spot tan pequeño e ilumina un conjunto de átomos en la muestra, de modo que, si la muestra es cristalina, siempre se produce, en alguna medida difracción de Bragg en determinadas direcciones, como vimos en el caso del modo TEM.

Aunque la difracción de Bragg tenga menos relevancia que en el caso TEM, no nos interesa esta información cristalográfica, motivo por el que se desarrollaron los detectores HAADF. Basta introducir en la ley Bragg distancias interatómicas y longitudes de onda electrónica “típicas” en un TEM o STEM, para comprobar que los haces difractados (al menos los más intensos, que son los órdenes de difracción “n” más bajos) mantienen ángulos muy pequeños con el haz directo. Para evitar estos haces difractados se incorpora un detector que solo recoge los dispersados a ángulos mayores que estas reflexiones de Bragg significativas. Son los ya mencionados detectores HAADF, cuya configuración muestro en el siguiente esquema.

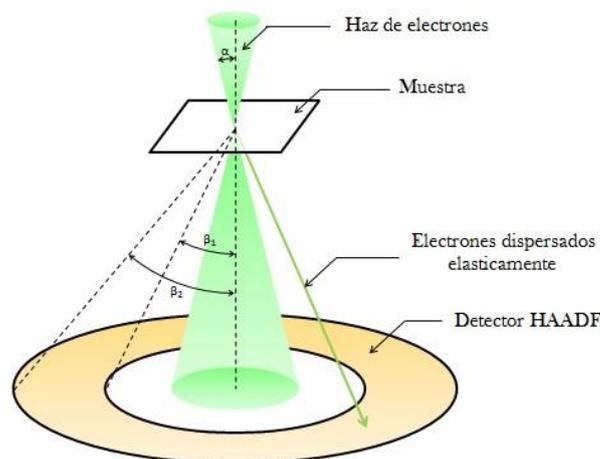


Fig.A32 Esquema de un detector HAADF

Lógicamente, los radios interno y externo del detector (marcados por  $\beta_1$  y  $\beta_2$  en el dibujo), son las características más relevantes de este tipo de detectores. Por evitarse el haz directo, las imágenes de este detector son de campo oscuro. Cabe esperar que en el ángulo sólido de colección de electrones del HAADF “caigan” otros electrones además de los dispersados

elásticamente (aunque de forma incoherente), que interesan ahora. De hecho, en la siguiente simulación vemos que para cada intervalo angular puede ser mucho más probable la dispersión elástica, pero que también ocurre, en alguna medida, la inelástica y viceversa (Fig.A33).

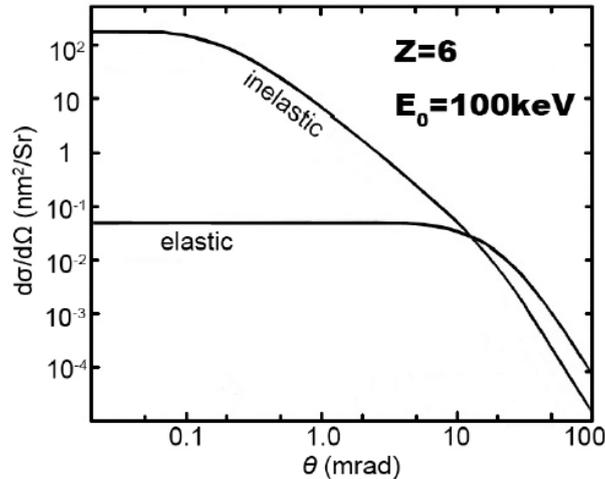


Fig.A33 Dispersión angular elástica/inelástica

A este respecto, mencionar que es posible seleccionar “casi” solamente electrones elásticamente dispersados mediante la incorporación de otro accesorio, un filtro de energías. Con ello nos aproximaríamos aún más a la interpretación veraz de la imagen como una proyección de densidades de la muestra al seleccionar solo los electrones dispersados elásticamente.

En definitiva, a diferencia del TEM, en cual hemos de ceñimos a un contexto de experimentación concreto para poder interpretar sus imágenes como proyecciones de la densidad de la muestra, en el STEM esta interpretación es válida en un sentido más amplio, incluso a “altos” aumentos, incluso en imágenes de “alta resolución” (que muestren la distribución atómicas de la materia) e incluso aunque la muestra sea de naturaleza cristalina. Las imágenes STEM serán, en principio, susceptibles de reconstrucción tomográfica en un rango de aplicaciones más amplio que el caso TEM.