

**ESTUDIO DE LOS MECANISMOS DE  
CRISTALIZACIÓN Y MADURACIÓN DE FOSFATOS  
DE CALCIO EN MEDIO BIOLÓGICO USANDO  
RADIACIÓN DE SINCROTRÓN**

José Amado Abraham

Presentado ante la Facultad de Matemática, Astronomía y Física como  
parte de los requerimientos para la obtención del grado de Doctor en Física  
de la

*Universidad Nacional de Córdoba*



Junio 2009  
©FaMAF – UNC 2009

Impreso en Diciembre 2010

Dirigida por Dr. Héctor Jorge Sánchez

Dedicado a  
MIS PADRES

ARMANDO Y ROSA

*Energy derives from both, the plus and negative*

James A. Hetfield

extraído de "Eye Of Beholder"

## PROPÓSITO Y RESUMEN DEL TRABAJO

Este trabajo ha tenido como propósito ofrecer resultados concluyentes y proponer nuevos puntos de referencia en el tema de la cristalización de fosfatos de calcio en un entorno biológico, específicamente, la formación de cálculo dental. Si bien ésta afección no es una enfermedad, de igual manera ha tomado la atención de científicos de diversas áreas, como la medicina, la biología y la química. A la pregunta de "porque sería importante estudiar el fenómeno de cristalización en fosfatos biológicos?" habría tres respuestas. La primera, ayudaría a entender el fenómeno de formación de depósitos pétreos en la boca que si bien no implica gran molestia o dolor, es comprobado que es disparador de severas enfermedades bucales crónicas como la periodontitis, además, claves en el estudio de formación también podría ser aplicable a otros depósitos pétreos como cálculos renales que en la mayoría de los casos requiere intervención quirúrgica. La segunda, podría revelar aspectos fundamentales en la formación de tejido óseo que serían de utilidad en la terapia de rehabilitación o en la recalcificación de fracturas óseas y más aun la enfermedad frecuente de personas mayores, la osteoporosis. La tercera, entender la fisicoquímica del proceso ofrecería un gran aporte para la fabricación de mejores prótesis óseas y dentales con un muy bajo nivel de rechazo por el organismo.

Entre los fosfatos de calcio que crecen en medio biológico existen tres clases diferentes, el tejido óseo que componen los huesos, el tejido dental y los depósitos pétreos. Se ha escogido este último como material de estudio ya que tienen composición elemental y estructura similar a los dos primeros y además por su fácil recolección. Se reconoce sin dudas, que el mecanismo de formación en los casos de tejido duro biológico será mucho más complejo ya que estos a diferencia del cálculo dental, cuentan para ello, con tejido conectivo y colágeno que en definitiva, ayudan a moldear las distintas componentes de la estructura ósea.

Por medio de técnicas de análisis basados en el uso de Radiación de Sincrotrón se ha logrado realizar un estudio de composición elemental, estructural y temporal del proceso de formación de cálculo dental. En muchos casos, los resultados cuantitativos fueron comparados a los obtenidos al de otros autores que usaron técnicas y métodos de análisis diferentes y no basados en rayos-X. Existió gran acuerdo entre los valores obtenidos y aquellos siempre que fue posible una comparación, dado que algunos hallazgos o parámetros determinados en este trabajo no fueron reportados previamente. A través del microanálisis se ha recogido información en el mecanismo de maduración de los fosfatos de calcio en cálculo dental al analizar diferentes regiones en la muestra y confirmar una suposición mantenida por años, que el cálculo dental madura por capas, resultado que fue sostenido al realizar estudios con espectrometría de Infrarrojo, y microscopía electrónica de transmisión. Madurar se entiende por ganar más estabilidad estructural en las fases de fosfatos.

Los análisis, resultados, discusiones y conclusiones son presentados a lo largo de los capítulos posteriores a los capítulos de fundamentos físicos y de planteamiento del escenario del problema. Los capítulos son presentados en la consecución natural en que fue desarrollada esta Tesis, guiada a medida en que los resultados y conclusiones de cada etapa se fueron obteniendo.

*Palabras Claves:* Radiación de sincrotrón, Fluorescencia de rayos-x, Reflexión total de rayos-x, Análisis elemental, Microanálisis, Espectroscopía de infrarrojo, Reflexión total atenuada, Biomineralización, Cociente molar Ca/P, Hidroxiapatita, Cálculo dental, Calcificación

## ABSTRACT

The present work has had the intention to offer conclusive results and propose new insights in the issue of calcium phosphate crystallization in biological environments, specifically, the dental calculus formation. Though this isn't an illness; likewise it has the attention of the scientific community in several areas like medicine, biology, chemistry and material engineering. To the question "why it could be important to study the phenomenon of biological calcium phosphates crystallization?", there would be three answers. The first one, it would help to understand the phenomenon of stone deposits formation in the mouth; though it doesn't represent real bother or even pain; it's proved this triggers several buccal chronic illness like periodontitis, besides, clues in the study of calculus formation could be also applicable to other kinds of stone deposits in the body like renal calculus, which in the majority of the cases, deserves surgical intervention. The second one, it could reveal fundamental aspects of bone tissue restoration which could be useful during rehabilitation therapy or in the recalcification of bone fractures and more even, to be applicable to the most frequent disease of old people, the osteoporosis. The third one, the understanding of the chemical physics of the process involved, would offer a valuable contribution for the manufacturing of bone and dental prosthesis with a low level of body rejection.

Between the calcium phosphates that grow in biological environments, three different classes exist, the osseous tissues which are made bones, the dental tissues and the stone deposits. I chose the last one as study material because they have elemental and structural composition similar to the first two classes and besides they are easy to be collected. Without doubts it's recognized the formation mechanism of the hard biological tissues is much more complex than for the case of dental calculus formation because unlike them, dental and bones tissues count with a tangle connective tissue and collagen which in definitive, help to mold and sustain the several osseous parts.

Using analytical techniques based on Synchrotron Radiation, was possible to fulfill the elemental and structural composition and temporal study of the dental calculus formation process. In almost all cases, my quantitative results were compared to those measured by authors who used different analytical techniques other than those based in X-Ray radiation. Was verified good agreement between them whenever the comparison was possible, in some cases it wasn't because my own result was reported for the first time. Through microanalysis was collected information of the calcium phosphate maturation mechanism in different regions of dental calculus and confirm a supposition maintained by years, it says, dental calculus grows by layers, statement induced by infrared spectroscopy studies and transmission electronic microscopy. Maturation means the calcium phosphates phases are gaining more structural stability in time.

The analyses, results, discussions and conclusions are presented along the chapters after the ones of the physical fundamentals and the setting the stage of the problem. The chapters are presented in a natural way the research was carried out along the years this Thesis was developed, guided by the results obtained on the way.

*Keywords:* Synchrotron Radiation, X-ray Fluorescence, X-ray Total Reflection, Elemental analysis, Microanalysis, Infrared Spectrometry, Attenuated total reflection, Biomineralization, Ca/P molar ratio, Hydroxapatite, Dental calculus, Calcification

## TABLA DE CONTENIDOS

<b>CAPÍTULO 1 .....</b>	<b>1</b>
1.1 BREVE HISTORIA DE LOS RAYOS-X.....	1
1.2 PRIMEROS AVANCES .....	1
1.3 ANÁLISIS CUANTITATIVO DE LOS RAYOS-X.....	1
1.4 ESPECTROMETRÍA DE RAYOS-X, DÍAS ACTUALES .....	2
1.4.1 <i>Revisiones</i> .....	2
1.5 INSTRUMENTACIÓN.....	2
1.5.1 <i>Instrumentación General y Fuentes de Excitación</i> .....	2
1.6 DETECTORES.....	3
1.7 ANÁLISIS DE ESPECTROS, CORRECCIÓN POR EFECTOS DE MATRIZ Y PROCEDIMIENTOS DE CALIBRACIÓN. ...	4
1.7.1 <i>Análisis de Espectros.</i> .....	4
1.7.2 <i>Correcciones por Matriz y Métodos de Calibración.</i> .....	4
1.8 ÓPTICA DE RAYOS-X .....	5
1.9 RADIACIÓN DE SINCROTRÓN .....	6
1.9.1 <i>Líneas de Haz y Ópticas</i> .....	6
1.10 APLICACIONES.....	6
1.11 ACTUALES TENDENCIAS.....	7
1.11.1 <i>Hardware – Nuevas Placas de mayor velocidad y volumen de Datos</i> .....	8
1.11.2 <i>Biología y Medicina usando SR-FRX confocalizado</i> .....	8
1.11.3 <i>Medio Ambiente – Control de Aerosoles Atmosféricos</i> .....	8
<b>CAPÍTULO 2 .....</b>	<b>11</b>
2.1 PRINCIPIOS DE LOS RAYOS-X.....	11
2.1.1 <i>Fluorescencia de Rayos-X</i> .....	11
2.2 EMISIÓN DE RAYOS-X CARACTERÍSTICOS.....	12
2.2.1 <i>Ionización de Capas Internas Atómicas</i> .....	12
2.3 SERIES DE LÍNEAS ESPECTRALES .....	13
2.4 LÍNEAS SATÉLITES DE RAYOS-X.....	14
2.5 EFECTO AUGER .....	14
2.6 PRODUCCIÓN DE FLUORESCENCIA .....	15
<b>CAPÍTULO 3 .....</b>	<b>18</b>
3.1 RADIACIÓN DE SINCROTRÓN .....	18
3.2 COMPONENTES Y PARÁMETROS DE UN SINCROTRÓN .....	20
3.2.1 <i>Cavidades RF</i> .....	20
3.2.2 <i>Magnetos de Deflexión</i> .....	20
3.2.3 <i>Dispositivos de Inserción</i> .....	21
3.3 LA FLUORESCENCIA DE RAYOS-X POR RADIACIÓN DE SINCROTRÓN.....	23
3.3.1 <i>Fluorescencia de rayos-X</i> .....	23
3.3.2 <i>Detectores</i> .....	23
3.4 ESPECTROMETRÍA DE FLUORESCENCIA DE RAYOS-X: UN ESPECTRO TÍPICO .....	24
3.4.1 <i>Picos Suma</i> .....	24
3.4.2 <i>Pico Escape</i> .....	24
3.5 NIVEL DE <i>BACKGROUND</i> O NIVEL DE FONDO EN LOS ESPECTROS MEDIDOS .....	24
3.5.1 <i>Componentes Básicas en el Background en SR-FRX</i> .....	24
3.5.2 <i>Dispersión Compton</i> .....	25
3.5.3 <i>Dispersión Elástica</i> .....	25
3.5.4 <i>Radiación de Bremsstrahlung de fotoelectrones en la Muestra</i> .....	25
3.5.5 <i>Mejoras para reducir el Background o Fondo</i> .....	25
3.6 ANÁLISIS CUANTITATIVO FRX .....	26
3.6.1 <i>Ecuaciones Básicas</i> .....	26
3.7 PRINCIPIOS DE CÁLCULO USADOS EN PROGRAMAS DE COMPUTACIÓN DE ANÁLISIS POR FRX .....	28
3.8 ANÁLISIS DE ESPECTROS Y CUANTIFICACIÓN – ECUACIONES BÁSICAS PARA ALGORITMOS.....	29
3.8.1 <i>Estimación del Fondo</i> .....	29

3.8.2	<i>Ajuste de un pico simple</i> .....	31
3.8.3	<i>Ajuste Múltiple de Picos</i> .....	32
3.8.4	<i>Límite de Detección Mínimo</i> .....	33
	<b>CAPÍTULO 4</b> .....	<b>35</b>
4.1	FOSFATOS CÁLCICOS .....	35
4.2	TIPOS ESTRUCTURALES DE APATITA.....	35
4.3	HIDROXIAPATITA .....	35
4.4	SUBSTITUTOS EN LAS APATITAS .....	36
4.5	SUBSTITUCIÓN POR IONES $X^-$ .....	37
4.6	APATITAS DE CARBONATOS .....	37
4.7	SUBSTITUCIÓN POR CATIONES.....	37
4.8	FOSFATO OCTOCÁLCICO.....	37
4.9	FOSFATOS TRICÁLCICOS .....	40
4.10	FOSFATO CÁLCICO AMORFO .....	40
4.11	ESTRUCTURAS TIPO GLASERITA.....	41
4.12	COMENTARIO.....	41
	<b>CAPÍTULO 5</b> .....	<b>44</b>
5.1	SISTEMAS BIOLÓGICOS.....	44
5.1.1	<i>Variabilidad en los sistemas biológicos</i> .....	44
5.2	FORMACIONES PÉTREAS EN EL ORGANISMO.....	45
5.3	CÁLCULO DENTAL.....	46
5.3.1	<i>Descripción</i> .....	46
5.4	TEORÍAS DE FORMACIÓN.....	46
5.5	CLASIFICACIÓN DE TIPOS DE CÁLCULO DENTAL.....	47
5.5.1	<i>Distribución en la Boca</i> .....	47
5.6	MÉTODOS DE ANÁLISIS EN MUESTRAS DE CÁLCULO DENTAL.....	47
	<b>CAPÍTULO 6</b> .....	<b>49</b>
6.1	DETERMINACIÓN DE COMPONENTES ELEMENTALES EN TÁRTARO POR SRFRX .....	49
6.2	INTRODUCCIÓN .....	49
6.3	PARTE EXPERIMENTAL .....	50
6.4	ANÁLISIS DE DATOS.....	51
6.5	CONCENTRACIONES ELEMENTALES – CORRELATIVIDAD ELEMENTAL.....	52
6.6	NOTAS FINALES DEL CAPÍTULO .....	55
	<b>CAPÍTULO 7</b> .....	<b>57</b>
7.1	ESTUDIO DE UN CASO DE COMPOSICIÓN ESTRUCTURAL Y ELEMENTAL DE CÁLCULO DENTAL DURANTE LAS VARIAS ETAPAS DE MADURACIÓN USANDO SRXRF .....	57
7.2	INTRODUCCIÓN .....	57
7.3	MUESTRAS COLECTADAS Y ARREGLO EXPERIMENTAL .....	58
7.4	CONCENTRACIONES ELEMENTALES EN LA MADURACIÓN .....	60
7.5	MATRIZ INORGÁNICA Y CRISTALIZACIÓN .....	62
7.6	NOTAS FINALES DEL CAPÍTULO .....	64
	<b>CAPÍTULO 8</b> .....	<b>66</b>
8.1	ANÁLISIS MICROSCÓPICO POR FLUORESCENCIA DE RAYOS-X USANDO RADIACIÓN DE SINCROTRÓN EN CÁLCULO DENTAL HUMANO .....	66
8.2	PROPÓSITO Y ESCENARIO DE ESTUDIO.....	66
8.3	DESARROLLO DE LA EXPERIENCIA.....	66
8.3.1	<i>Preparación de muestras y estándares</i> .....	66
8.3.2	<i>Mediciones</i> .....	67
8.4	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	69
	<b>CAPÍTULO 9</b> .....	<b>74</b>

9.1	ANÁLISIS DE TRAZAS POR MICRO-FLUORESCENCIA DE RAYOS-X EN FASES DE FOSFATO DE CALCIO SOBRE INTERFACES DIENTE-CÁLCULO DENTAL USANDO RADIACIÓN DE SINCROTRÓN .....	74
9.2	ENTORNO BIOLÓGICO Y QUÍMICO DE LA MINERALIZACIÓN .....	74
9.3	DESARROLLO DEL EXPERIMENTO.....	75
9.4	IMPLICANCIAS DE LOS RESULTADOS OBTENIDOS .....	77
9.4.1	<i>Elementos minoritarios y trazas</i> .....	77
9.4.2	<i>Elementos mayoritarios</i> .....	81
9.5	COMENTARIOS Y NOTAS FINALES DEL CAPÍTULO .....	82
	<b>CAPÍTULO 10</b> .....	<b>85</b>
10.1	ESTUDIO DE INTERFACES DE CALCULO DENTAL USANDO ESPECTROSCOPÍA DE INFRARROJO.....	85
10.2	CRISTALINIDAD .....	85
10.3	EXPERIMENTAL Y TRATAMIENTO DE ESPECTROS.....	86
10.4	ANÁLISIS DE BANDAS Y PRIMERAS CONCLUSIONES .....	88
10.5	NOTAS FINALES DEL CAPÍTULO .....	91
	<b>CAPÍTULO 11</b> .....	<b>93</b>
11.1	CONCLUSIONES FINALES.....	93
11.1.1	<i>Sobre agentes inhibidores</i> .....	94
11.1.2	<i>Saliva y Bio-indicadores</i> .....	95
11.1.3	<i>Agradecimientos Finales a Instituciones</i> .....	96

# Capítulo 1

## 1.1 BREVE HISTORIA DE LOS RAYOS-X

Wilhem Röntgen

En 1895 el físico alemán Wilhem Röntgen, experimentando con un tubo de rayos catódicos, produjo rayos tenues que causaban que una pantalla fluoresca, o centellee. Con la intención de crear un ambiente controlado, Röntgen ubicó el tubo catódico en una caja de cartón, demasiado gruesa para que atraviesen los rayos. Una vez que los rayos catódicos fueron encendidos, no obstante, Röntgen notó que otra pantalla en la habitación comenzó a destellar; como esta segunda pantalla estaba demasiado lejos como para ser alcanzado por los rayos catódicos, especialmente pasando a través de la lámina de cartón, Röntgen se dio cuenta que descubrió un nuevo tipo de rayo. Por medio de la experimentación él encontró que este nuevo rayo podía penetrar aun las paredes de su laboratorio. Röntgen envió un reporte detallando su hallazgo en Diciembre 28 de 1895 en el cual él admite que no conoce la precisa naturaleza de esos nuevos rayos y eligió nombrarlos Rayos-X puesto que “x” se usa para notar una incógnita en Matemáticas. Sus investigaciones incluyeron los efectos de espesores variables, densidad, índice refractivo y composición química de diversos objetos y probó varios tipos de materiales para obtener las imágenes como láminas y placas fotográficas de vidrio. También estudió el efecto de varias fuerzas en la trayectoria de los rayos-x incluyendo lentes de diversos materiales, campos magnéticos y electrostáticos.

Los primeros experimentos con muestras biológicas incluyeron las famosas imágenes de estructura esquelética de la mano humana y una variedad de objetos domésticos. Esas imágenes animaron los esfuerzos para obtener imágenes médicas en muchas partes del mundo con poca o no conciencia de los riesgos involucrados. Pocos descubrimientos han sido acompañados por tanta fanfarria como en el caso de los Rayos-X. Durante los doce meses siguientes a la publicación de Röntgen más de mil libros y artículos fueron escritos en el tema y el número creció a más de diez mil antes de 1910.

Röntgen fue galardonado con el Premio Nobel inaugural de Física en 1901 por su descubrimiento.

## 1.2 PRIMEROS AVANCES

Uno de los aspectos destacables de la historia científica de los Rayos-X fue la velocidad con la cual una enorme variedad de aplicaciones fue visionada e investigada. Antes del final de 1896, las primeras radiografías de diagnóstico habían sido hechas también con inmediatas aplicaciones militares. Experimentos han sido hechos con muestras móviles y aún el primer angiograma fue ensayado con inyecciones post-mortem de compuestos de mercurio. Los Rayos-X también fueron aplicados experimentalmente en un rango de enfermedades intratables incluyendo tuberculosis, lupus y cáncer. No fue hasta la muerte de Clarence Rally (asistente de Thomas Edison quien dirigió su habilidad inventiva al lucrativo mercado de los tubos de Rayos-X) en 1904, que la debida atención le fue dada al hecho de que si bien los rayos-x podían curar también podían matar y cuestiones sobre protección del operador como dosis a pacientes fueron puestas en consideración.

Una de las primeras aplicaciones industriales fue hecha durante la primera Guerra Mundial (1914-1918) para el testeo no destructivo de estructura de un biplano.

En 1927, la compañía Müller (la cual le había sido concedida los derechos de patente para la fabricación de tubos de Rayos-X a principios de 1899) fue comprada por Philips, la compañía de fabricación alemana. Philips ha estado involucrado en el negocio de los Rayos-X desde 1916, cuando el primer tubo de Rayos-X rotante fue construido. Por 1930 el lado industrial del mercado de Rayos-X se fue separando de las aplicaciones de imagen en medicina.

## 1.3 ANÁLISIS CUANTITATIVO DE LOS RAYOS-X

Tempranos intentos se realizaron para utilizar el potencial analítico y cuantitativo de los Rayos-X. En 1913 Moseley demostró las relaciones entre el número atómico y la reciproca de la longitud de onda y vio que era posible el análisis elemental basado en el espectro característico de rayos-X de cada elemento.

En 1915, William H. Bragg y su hijo W. Lawrence conjuntamente recibieron el premio Nobel en Física por su trabajo basado en la estructura cristalina y la difracción de Rayos-X de una red cristalina. Esas investigaciones también proveyeron medios para resolver la emisión de Rayos-X por dispersión en longitudes de onda y se construyó el primer aparato de análisis.

Investigaciones similares se llevaron a cabo por Max von Laue en 1914 and por P. Debye y P. Scherer en 1915, dieron origen a técnicas de análisis de estructuras cristalinas, materiales orgánicos y especímenes biológicos. La cristalografía permanece como una aplicación importante de los rayos-X, aportando a la investigación de los fenómenos más recientes de superconductividad. Cabe mencionar que las ecuaciones de difracción también fueron derivadas independientemente por Bragg en 1913 y por Torahiko Terada en la Universidad Imperial de Tokio, como una indicación de cuán rápido se desarrollaron las técnicas de análisis por rayos-X.

Al menos siete premios Nobel en Física y Química fueron galardonados antes de la segunda Guerra Mundial en trabajos relacionados con rayos-X y varios más en los años subsiguientes.

Habiéndose realizado investigaciones con fluorescencia de rayos-X (FRX) y establecido como técnica de análisis para muestras de minerales fue que en 1948 Friedman y Birks construyeron el primer espectrómetro de rayos-X. Éste tenía limitaciones por la absorción de radiación por el aire que fue subsiguientemente solucionado por la implementación de sistemas de vacío o con gas inerte.

Actualmente con la introducción de detectores de radiación de material semiconductor ha permitido el análisis elemental y ha dado avance a las técnicas de imágenes utilizando dispersión en energías (por la relación de Planck) con una apropiada colección y procesamiento electrónico de señal.

## 1.4 ESPECTROMETRÍA DE RAYOS-X, DÍAS ACTUALES

### 1.4.1 Revisiones

La fluorescencia de rayos-X ha desarrollado una envidiable *herencia histórica* y, tal vez por estímulo del centenario de Röntgen en 1995, se ha publicado una revisión hecha por Ryon[1], de la conexión entre el desarrollo del transistor (y la electrónica de semiconductor en general) con la espectrometría de energía dispersiva de rayos-X. Esta revisión interesante muestra como el desarrollo de la “cámara de ionización de estado sólido” involucró la convergencia de la física del estado sólido, la electrónica, la física nuclear y la química analítica que particularmente fue desarrollada en las instalaciones de la Bell Laboratory y Lawrence Berkley Laboratory. En cuanto al desarrollo de la instrumentación analítica, Gilfrich[2] publicó con énfasis la importancia de la contribución del grupo de investigación liderado por él en la Naval Research Laboratory, sobre el diseño y desarrollo de los primeros espectrómetros de FRX y los procedimientos de corrección por contribuciones de matriz.

Límites de detección y estimación de incerteza son tópicos concernientes a los parámetros analíticos que Rousseau[3] discutió desde el punto de vista de la fluorescencia de rayos-X. Aunque hay una convención internacional para el cálculo de esos datos, esas convenciones no son siempre respetadas y la forma que esos números son interpretados varía apreciablemente. En particular, ese trabajo sin ambigüedad distingue “límite de detección” de “límite de determinación” y consideró que la contribución a la incerteza es proveniente de la preparación de la muestra.

La *historia de desarrollo del espectrómetro*, lo que los autores llaman ‘la edad de oro’ fue revista por Wittry y Barbi[4]. Aunque está dedicado al desarrollo del espectrómetro de microsonda, enfatizando los avances en los diez años subsiguientes a la publicación de la tesis de Castaing’s, ésta revisión cubre las más modernas implementaciones y mejoras en los instrumentos de espectrometría que serán de interés para el espectroscopista de rayos-X.

## 1.5 INSTRUMENTACIÓN

### 1.5.1 Instrumentación General y Fuentes de Excitación

El desarrollo en la instrumentación de los espectrómetros de rayos-X siempre ha tenido interés tanto académico como comercial. Así por ejemplo, aquellos espectrómetros dispersivos en longitudes de onda han tomado cierta ventaja gracias al desarrollo de la tecnología de multicapa que se usan en

monocromadores. Ricardo *et al.*[5] ofrece un 28% de mejora en los límites de detección para el análisis de B en wafers de silicio por uso de multicapa de La/B<sub>4</sub>C. Similarmente, la medición de Al en wafers de silicio mostró sus beneficios con el uso de multicapas de WSi<sub>2</sub>/Si y Ta/Si con 42 y 60% de mejora en los límites de detección respectivamente, cuando fue comparado con las de W/Si que usan monocromadores convencionales. En este sentido, también fue ofrecido un nuevo monocromador con mejoras en la resolución y bajo fondo o *background* para energías alrededor de 1500 eV. La línea Al K $\alpha$ [6] fue usada para demostrar los beneficios de ésta tecnología la cual se basa en un enrejado de multicapas de amplitud laminar (LMAG). Consiste en multicapas laterales graduadas de capas de W y capas de C en forma de cuñas que fue diseñado por Liu[7] para aplicaciones de doble monocromadores de rayos-X con espaciamiento  $d$  que varía de 3.5 a 6.0 nm.

Behne *et al.*[8] describieron un filtro espacial de focalización en punto compacto para FRX y para estudios de dispersión con microscopios de rayos-X. Éste desarrollo es de interés para los que trabajan con fluorescencia en mediciones de estructura fina por absorción de rayos-X usando haz de micro-foco. Imágenes generadas por la detección de fluorescencia de rayos-X por cámara de dispositivo cargado acoplado (CCD) a una pantalla de fósforo por medio de fibra óptica plana fue reportada por Erre *et al.*[9]. El uso de esta óptica de orificio y el haz incidente de rayos-X creados en una SEM (microscopía electrónica de barrido), proveen imágenes topográficamente químicas con un tiempo de adquisición de pocos minutos para una superficie de muestra de unos pocos mm<sup>2</sup>.

Un aparato al vacío con chispa por arco de 1 kJ fue desarrollado por Georgescu *et al.*[10] como fuente pulsar de rayos-X para calibración de detectores y para aplicaciones de microscopía. Su trabajo analizó la influencia de cuatro sistemas de descargas para la reproducibilidad de emisión de rayos-X y concluyeron que una mayor potencia, mayor velocidad de descarga se han requerido para optimizar el sistema.

## 1.6 DETECTORES

*Detectores criogénicos de alta resolución.* El reto de construir un efectivo y práctico sistema detector criogénico por túnel de juntura superconductora (STJ) fue tomado por un grupo combinado de la Lawrence Livermore y la Lawrence Berkeley Laboratories en California[11]. El enfriador está basado en dos etapas del ADR (refrigerador por demagnetización adiabática) que permite alcanzar una temperatura <100 mK y mantenerse a <400 mK por 20 horas. El diseño cuidadoso del cryostat (dispositivo para mantener temperaturas criogénicas) permite al censor mismo ser operado en el extremo del puntal frío de 40 cm. lo cual es un logro meritorio. Una impresionante resolución de energía de 13 eV a 6 keV fue proclamado[12] como uno de los mejores reportados por lejos para STJ con un tramo de absorción de 20  $\mu$ m. La resolución de energía fue de 36 eV para 200  $\mu$ m de tramo absorbente. Por enfriamiento del resistor de retroalimentación, la corriente de ruido fue bajada a la mitad y el ruido electrónico medido resultó ser apenas de 8 eV.

*Detectores de Silicio.* Campbell hizo una contribución extensa en el mejoramiento del modelo de respuesta para los detectores Si(Li). En su primer estudio[13], las formas de las líneas fueron generada usando simulaciones Monte Carlo (MC) en la cual se incluyeron cinco características discretas. El resultado de la inclusión de estos parámetros fue observado en su propio detector el cual exhibió una tenue cola que permitió a sus relaciones ser conectadas cualitativamente con procesos físicos específicos o con las características del detector. Aquella excelente publicación proveyó de nuevas vistas en el efecto sobre la respuesta del detector en el frente de contacto y en la capa muerta y, en particular, en la naturaleza compleja de los picos en la región del espectro que contiene la barrera truncada y picos escape. En un segundo trabajo, Campbell[14] describió en detalle la complejidad del espectro alrededor del pico escape en donde se habían incluido todos los aspectos conocidos en el modelo. Los autores una vez más confirmaron que la separación del pico escape resultó ser de 1.740 keV, y establecieron una variación considerable (0.0040 a 0.0055) en el cociente entre la intensidad de pico de escape del K $\alpha$  Si y pico padre en el espectro de <sup>55</sup>Fe para nueve diferentes detectores de proveedores comerciales.

El cociente entre picos de escape y el pico padre también fue medido para detectores Ge(Li)[15] en el rango de energías entre 15.75 y 50 keV en donde la complejidad para la descripción de probabilidades de picos escapes resultó ser mayor que en el caso de detectores Si(Li).

Diodos PIN de silicio enfriados termo-eléctricamente (Peltier) han sido ampliamente comercializados desde hace unos años hasta hoy, pero en el caso de detectores Si(Li) enfriados por efecto Peltier, no fue el caso debido al desafío de mantener bajas corrientes de fuga para elevadas temperaturas de operación comparadas con lo que normalmente provee el enfriamiento con nitrógeno líquido. Aun así, se ha reportado[16] como muy satisfactorio el uso de detectores Si(Li) para análisis en modalidad

dispersivo en energías, EDXRF. La resolución de energía a 5.9 keV fue de 175 eV para un detector de área de 20 mm<sup>2</sup>, 3.5 mm de espesor y de 270 eV para una área impresionante de 100 mm<sup>2</sup> y 4.5 mm de espesor. La distribución del litio de compensación en el cristal de detector Si(Li) es crucial en la fabricación de detectores de alta performance. La efectividad de difusión del Li fue estudiado[17] por revestimiento/moteado con cobre en wafers compensados de Si(Li) con los cuales se estudió cuidadosamente las secciones eficaces por microanálisis de rayos-X. Se encontró que wafers tratados a 120 °C por 20 h tuvieron una mejora en la resolución de energía. Diodos PIN de silicio siguen siendo populares y la incorporación exitosa de germanio amorfo en silicio mejoró en un factor dos la eficiencia de detección[18]. Estos detectores también fueron usados y fabricados para contener mayor área y para trabajar en el rango de rayos-X duros como fue reportado en la misión ASTRO-E[19]. Los autores mostraron que el detector tenía efectos en las *alas* de pico debido a las estructuras de contacto y a la inhomogeneidad de los campos eléctricos. Finalmente, un grupo de investigación en Coímbra, Portugal reportó la performance de varios fotodiodos de avalancha de uso comercial de gran área en dispositivos P-N de silicio[20], los cuales fueron propuestos como muy convenientes para espectrometría por EDXRF.

*Detectores pixelados y micro-delgados gaseosos.* Aunque esos dispositivos son típicamente usados para la obtención de imágenes por rayos-X en vez de ser implementados como detectores de dispersión en energías, son igualmente de interés continuo. Un módulo de detectores de silicio PIN de gran área pixelado[21] fue reportado en el cual un arreglo de 448 × 64 píxeles de 150 × 150 μm fueron soldados individualmente a un chip usual de toma de datos. Una impresionante tasa de conteo de 200 Kbps por píxel fue logrado, produciendo una tasa de conteo por módulo de 6 × 10<sup>9</sup> cps, pero ninguna información sobre la energía de esos fotones puede ser obtenida de esos dispositivos. Un método mejorado para incrementar la eficiencia del píxel delgado del detector fue reportado[22] en el cual el arreglo pixelado fue recubierto con un centellador. Aunque no es específicamente usado en espectrometría dispersiva de rayos-X, es interesante notar el trabajo que se desarrolla para mejorar los detectores micro-delgados. Aplicaciones para EXAFS (estructura fina extendida por absorción de rayos-X) en alto conteo[23] debajo de los 4 keV y en dicróismo circular magnético[24] de rayos-X en el rango de 500 a 1000 eV. El dispositivo usado para esas mediciones tiene una impresionante nivel de eficiencia de 50% a 80 keV y una resolución de energía mejor que el 1.4% con resolución espacial de 350 μm.

*Contadores proporcionales de Gas.* Aunque han sido extensamente usados en los pasados 90 años, aún continúa teniendo avances. Se han publicado[25] los beneficios obtenidos en los sincrotrones de tercera generación, donde recientes desarrollos para tener alta tasa de conteo han mostrado sus ventajas. En Coímbra, Portugal, se trabaja[26] en la mejora de contadores proporcionales de gas de centelleo (GPSC) y en su uso portátil para sistemas EDXRF. Este nuevo sistema fue usado con éxito en un amplio rango de energías que llegaron hasta los 60 keV, también fue probado en campos magnéticos altos (5 T) con sólo una degradación en la resolución de energía del 10%. Finalmente, se ha desarrollado un GPC de 2300 cm<sup>2</sup> como detector para una misión espacial[27] que fue conectada a un novedoso sistema de adquisición de datos de alta velocidad.

## 1.7 ANÁLISIS DE ESPECTROS, CORRECCIÓN POR EFECTOS DE MATRIZ Y PROCEDIMIENTOS DE CALIBRACIÓN.

### 1.7.1 *Análisis de Espectros.*

Se ha investigado[28] la creciente contribución al ancho de línea natural de los picos K para números atómicos  $Z > 50$  en los anchos de picos detectados y tratados por deconvolución por el bien conocido programa de computación, AXIL. Los autores propusieron una corrección al pico por una función Voigt en vez de la más usual, la forma Gaussiana. Una investigación por simulación y experimental usando un ánodo de tungsteno a 130 kV/65 W en un tubo de rayos-X, mostró que hubo un corrimiento sistemático entre el ancho de pico calculado y el ajustado cuando fue usada una función Gaussiana. Este corrimiento fue proporcional al cociente entre el ancho de línea natural y la correspondiente resolución de energía.

### 1.7.2 *Correcciones por Matriz y Métodos de Calibración.*

La ionización múltiple es ignorada en algunos procedimientos de corrección en FRX y se ha mostrado[29] que puede introducir un error de hasta el 4% m/m en el análisis de muestras Al-Cu si el

efecto no es tenido en cuenta. El procedimiento usado fue FRX sin estándares basado en la simulación por computadora y en las mediciones experimentales en aquellas muestras.

Un número de trabajos han investigado los fenómenos que influyen la precisión de las correcciones en métodos de FRX. Se ha investigado la acción de la geometría[30] en la cuantificación de datos en FRX, y en particular con las interacciones asociadas con los fotones primarios producidos dentro de un blanco de tubos de rayos-X y con radiación secundaria generada dentro de la muestra. Por otro lado, se investigó la influencia del tamaño de partícula (en el rango de 15 a 360  $\mu\text{m}$ ) en la intensidad de fondo en FRX y se reportó que para muestras de fase simple, ésta decrece con el incremento del tamaño particular[31], mientras que no existe una tendencia clara con lo observado en muestras multi-fases. Existen objeciones en este sentido en que las muestras deberían ser normalmente pulverizadas por cerca o inferior a 63  $\mu\text{m}$  como requerimiento analítico. El hecho de que la intensidad de pico de dispersión en FRX está relacionada con el número atómico medio no es muy novedoso, pero Ertugrul[32] reportó una curva estándar del cociente entre la intensidad de radiación coherente e incoherente *versus* el número atómico, el cual lo comparó con valores experimentales y teóricos. También se focalizó específicamente en la optimización de excitación de blanco secundario usando diferentes combinaciones de ánodo secundario[33] y diferentes voltajes de operación. Ellos produjeron un algoritmo para describir las características de excitación en el blanco secundario que fue sugerido para ser aplicado en cualquier instrumentación con este diseño.

Como es usual, es continuo el reporte año a año de investigaciones cubriendo varios aspectos de los *procedimientos de corrección por matriz*. Se han estudiado las intensidades de elementos provenientes de láminas de elementos puros (Co, Cu, Fe, Ge, Mo, Nb, Ni, Y, Zn, Zr), óxidos (As, Ga, Mn, Se, Sr), y para métodos de ‘concentración baja’ (Br, Rb), obteniéndose buen acuerdo entre los tres métodos[34]. Esos datos fueron luego usados para estudiar las relaciones teóricas entre las intensidades, coeficientes de absorción másicos y parámetros de corrección que fueron de relevancia para el análisis por EDXRF. Malmqvist[35] aplicó el algoritmo ‘J. E. Fernández’ en la evaluación de intensidades de rayos-X medidas en discos de vidrio fundido. Con un software apropiado, se evaluó un procedimiento de calibración usando materiales de referencia internacionales cubriendo el rango de  $\text{mg kg}^{-1}$  hasta el orden de 1%. Otros autores estudiaron el efecto de reforzamiento[36] para combinaciones de óxidos de elementos de tierras raras (REE) y su dependencia con la concentración elemental usando energía de excitación de 59.5 keV.

En contribución a la aplicación del *método de parámetros fundamentales*, se han estudiado dos modelos paramétricos para la intensidad de excitación primaria que dieron buenos resultados[37] en el análisis de materiales de referencia certificados por NIST para aceros inoxidables. Esos modelos se basaron en la descripción del espectro de excitación por emisión de fluorescencia de apropiados blancos de elementos puros y se mencionaron particulares ventajas en ciertas aplicaciones cuando el espectro de excitación no posee ninguna discontinuidad (bordes de absorción). Se ha investigado también que la reducción en los errores sistemáticos[38] en el método de parámetros fundamentales puede ser logrado con una elección pequeña de muestras de referencia. El método de refinamiento de Rietveld que es ampliamente usado en el análisis de espectro por XRD también fue extendido[39] para FRX basado en la minimización de diferencia entre el espectro experimental y una función diseñada que tiene en cuenta los picos característicos, el espectro de fondo o *background* y la contribución del detector. El método fue evaluado para muestras metálicas excitadas por radiación monocromática de sincrotrón.

## 1.8 ÓPTICA DE RAYOS-X

Una innovación en la instrumentación de *micro-fluorescencia* fue descrita con el uso de placas de lentes micro-acanaladas[40], un detector CCD y una fuente convencional de bombardeo de electrones proveyeron de imágenes de alta resolución para un elemento particular en el orden del sub-mm. Esta innovación evolucionó desde las primeras mediciones como ‘prueba del principio’ involucrado y que fue explicado en una primera publicación[41]. En adición al mapeo elemental obtenido por fluorescencia, este instrumento también fue capaz de detectar reflexiones de Bragg de substratos policristalinos, lo cual ofreció la posibilidad de medir espacialmente la distorsión de la red introducida cuando las capas delgadas fueron depositadas sobre la superficie de la muestra.

Ebel[42] *et al.* investigaron el fenómeno de un inusual tipo de guía de onda, principalmente la que resultaba de la propagación de rayos-X en capas delgadas de  $n\text{-C}_{33}\text{H}_{86}$  depositadas sobre substratos de silicio bajo incidencia rasante. Esta investigación presentó un modelo teórico para la interpretación de este fenómeno y también explicó los resultados observados por Hayashi[43] *et al.* con muy buen acuerdo.

Los colimadores cónicos de policapilares fueron diseñados[44] para el análisis por FRX de pequeñas áreas de muestra. Estos son usados para capturar la radiación fluorescente proveniente de un área local de

la superficie de la muestra, sin importar el área excitada por la fuente. Un instrumento prototipo fue capaz de lograr una resolución espacial de 150  $\mu\text{m}$  usando además un detector de silicio de efecto Peltier.

## 1.9 RADIACIÓN DE SINCROTRÓN

### 1.9.1 Líneas de Haz y Ópticas

Hubo un continuo crecimiento en el número de sincrotrones de tercera generación aptos para el desarrollo de investigación tanto por la actualización de sincrotrones de segunda generación o por recomendación de nuevas líneas de haz. Un ejemplo de estas nuevas instalaciones es descrita en el trabajo de Görner[45] *et al.* quienes reportaron la primera línea de rayos-X duros en BESSY II, Berlín. Esta línea de haz incorporó un desplazador de longitudes de onda superconductor de 7 T y un monocromador doble-cristal/doble-multicapas capaz de seleccionar energías de hasta 50 keV. Las principales aplicaciones fueron hechas para FRX, micro-tomografía, topografía con rayos-X, calibración de detectores y reflectometría. Usando las mismas instalaciones en el sincrotrón, se presentaron los primeros resultados experimentales[46] usando la línea (U41-PGM) con ondulator microfocal de rayos-X blandos en BESSY II, equipado además con una grilla colimada plana para monocromatizar el haz y espejos toroidales para refocalizar ésta sobre el área de la muestra. En ESRF (European Synchrotron Radiation Facility) ubicado en Grenoble, la línea ID18F ha sido dedicada al análisis cuantitativo por micro-FRX[47]. Desarrollos técnicos en HASYLAB (Hamburgo) para la línea L de FRX contaron con la incorporación de actualizados sistemas ópticos con monocromadores doble-cristal/doble-multicapa y espejos para rayos-X instalados en una cámara de alto vacío. El haz resultante (el cual puede ser monocromatizado en el rango 2.4 a 80 keV) fue capaz de excitar las líneas K para  $16 < Z < 79$ . La óptica por capilares fueron usados en experimentos con micro-foco, incluyendo  $\mu$ -XANES y  $\mu$ -FRX. Los monocromadores de multicapas se usaron en experimentos de reflexión total de rayos-X, TXRF.

En lo que se refiere a las componentes de línea de haz, una variedad de innovaciones fueron realizadas. Un lente refractivo a base de compuestos fue usado a una energía de 14 keV para producir imágenes con un tamaño de haz de  $1 \times 10 \mu\text{m}^2$ . Este implemento fue usado para demostrar su alta exactitud en la obtención de imágenes cuantitativas[48] de elementos trazas en células simples congeladas en las cuales se determinó la aceptación de drogas anti-cancerígenas marcadas con yodo. Una placa de zonas de fase de tantalio fue usado en SPring-8 (línea BL24XU) para generar un micro-haz de  $0.8 \times 0.7 \mu\text{m}^2$  a 10 keV, el cual fue capaz de resolver estructuras tan pequeñas como 250 nm. También en el mismo sincrotrón (línea 39XU), Watanabe *et al.* usaron un sistema de espejos Wolter para producir rayos-X monocromáticos en el rango de 6 a 10 keV y tomaron imágenes por fluorescencia[49] en alambres de Cu, Fe y Ni. Haciendo mediciones desde 50 ángulos diferentes se obtuvieron reconstrucciones tomográficas 3-D para cada elemento seleccionando una apropiada energía de excitación. A más alta energía, más difícil es focalizar el haz de rayos-X, pero usando dos pilas de placas de zonas de Fresnel[50] se puede condensar una radiación de ondulator de 50 keV en un punto de  $9 \times 7 \mu\text{m}^2$ .

Una implementación para  $\mu$ FRX constó[51] de un pequeño espectrómetro dispersivo en longitud de onda de tipo Johansson instalado en la línea del ondulator (40XU) en SPring-8. Se reportó una excepcional resolución (comparado con detectores ED) para Co-K $\alpha$  y un impresionante límite de detección de varias decenas de ng/g para muestras sólidas.

## 1.10 APLICACIONES

Las aplicaciones e investigaciones mediante la espectrometría de rayos-X parecen no tener fronteras, son numerosas y muy diversas las disciplinas de la ciencia que hacen uso de esta poderosa herramienta de análisis. Por ejemplo, en el *análisis de muestras biológicas* en donde se analizaron elementos como Br, Cu, Fe, Pb, Sr y Zn en dientes colectados de dos diferentes poblaciones en las apartadas islas portuguesas de las Azores[52]. Las mediciones fueron llevadas a cabo en las instalaciones de microsonda del sincrotrón en Francia, LURE, y diferencias en la composición de los dientes entre ambas poblaciones han sido identificadas. Una de las más interesantes fue la alta concentración de Sr que aparentemente está relacionado con una dieta principalmente de carne antes que pescado. La distribución elemental en rodajas que van desde la cabeza del fémur en pacientes sanos y con osteoporosis, usando tomografía cuantitativa computarizada[53] permitió discutir la forma en la cual Ca, K, P, Sr y Zn intervienen en el

mecanismo de desmineralización en huesos. El análisis cuantitativo de Zn (y Ca) en cáncer de próstata y en tejidos normales por microanálisis con radiación de sincrotrón fue realizado para comprender las diferencias en densidad[54] y en los niveles de concentración de Zn estudiados. Distribuciones de Cr fueron mapeados en órganos reproductivos de ratones[55] después de exponerlos a  $\text{CrCl}_3$  usando análisis por microsonda de protones y por radiación de sincrotrón. Gonchar[56] *et al.* presentaron los resultados de sus estudios en el cuero cabelludo de pacientes con patología oncológica mamaria. Un significativo decrecimiento en las concentraciones de Se y Zn y un aumento en Cr fue detectado. El misterio de la increíble habilidad de ubicación de las palomas ha sido un tema de mucho interés y existe una amplia creencia que tal información del campo magnético de la Tierra tiene que ver en esto. Se ha puesto interés en la influencia de materiales magnéticos sobre ciertos órganos en peces y aves[57] para identificar sensores geomagnéticos, de los cuales el cerebro puede procesar información de navegación. Los autores reportaron que estos órganos constan de muy pequeñas partículas magnéticas que son sensibles a campos magnéticos como fue revelado por la detección de Fe. Martín[58] *et al.* aplicaron SR-FRX y SIMS al análisis de anillos de árboles de pino rojo de una área dañada por lluvia ácida y por polución los cuales fueron subsanados con limo. Los resultados mostraron una distribución no uniforme de metales en los tallos y cambios en el cociente Ca:Mg.

En los varios reportes de *análisis de materiales geológicos* con radiación de sincrotrón, los elementos Ba, Ce, La, Nb, Rb, Sr, Y y Zr fueron estudiados en rocas lunares[59] obtenidas en las misiones “Apollo” y “Luna”. De los resultados fue posible distinguir entre basalto de alta y muy alta alúmina y se propuso que esas rocas resultaron de la fundición parcial de varios magmas basálticos, pero no de aquellos provenientes del océano magmático. Los elementos REE son de interés para varios grupos científicos. Mediante un novedoso arreglo experimental, se ha logrado excitar líneas K de elementos de Z altos[60] incluyendo la REE usando haz de sincrotrón de 119 keV. Límites de detección de 100 ng/g para W (500 s. de conteo para JG-1, un material de referencia de granito) ha sido reportado demostrando el poder de esta metodología la cual es capaz de analizar hasta 30 elementos (incluyendo todas las de REE) en materiales geológicos, arqueológicos e industriales. Las temperaturas de las superficies marítimas pueden ser estudiadas midiendo la razón Sr:Ca en la aragonita coralina (una técnica conocida como paleotermometría del estroncio). En este contexto se han estudiado el cociente Sr:Ca en los esqueletos coralinos[61] tomando datos con 5  $\mu\text{m}$  de resolución.

*Otros estudios* incluyen investigaciones[62] de la disolución de metales durante la pasivación de aleaciones Fe-Cr. Se han realizado mediciones in situ como función de la composición de la aleación para poder determinar la concentración crítica de Cr que proveería una efectiva protección contra la corrosión. Los autores expusieron que su técnica podría resolver a una escala menor que una capa de átomos durante el tratamiento electroquímico. Otras investigaciones para la industria refieren al estudio de la distribución elemental y composicional de partículas emitidas por los gases de combustión de automóviles[63] realizadas con una combinación de técnicas de análisis como  $\mu$ -FRX y  $\mu$ -XANES que proveyeron un mapeo elemental y demás datos de especificación química. En la manufacturación de celdas solares, se determinaron que precipitados metálicos en escala nanométrica sobre superficies a base de silicio policristalino[64], dieron prueba directa de que las impurezas metálicas juegan un rol significativo en la performance de esos dispositivos. En referencia al análisis ambiental, se han realizado estudios en desperdicios sólidos volátiles[65] en ciudades no muy grandes. Usaron una energía de excitación de 27 keV para analizar la movilidad y con particular interés, la disolución y el filtrado de elementos como Cd, Pb, y Zn en el rango de concentración de  $\mu\text{g/g}$ . También se ha analizado la micro-heterogeneidad de elementos pesados en materiales de referencia certificados BCR CRM 680 (matriz poliolefínica dopadas con compuestos metálicos a niveles trazas) como resultado de un muestreo en masa muy pequeño[66], analizado por  $\mu$ -FRX con haz de sincrotrón y ablación por láser ICP-MS. Una satisfactoria concordancia se obtuvo al comparar ambos métodos.

## 1.11 ACTUALES TENDENCIAS

Esta sección solo enfocará sobre los recientes avances en el campo de la Fluorescencia de Rayos-X ya que es vastísimo citar los innumerables avances en todos los frentes de los métodos de análisis en general, basados en el uso del haz de rayos X.

### 1.11.1 Hardware – Nuevas Placas de mayor velocidad y volumen de Datos

En este sentido en lo que respecta al hardware, en la IAEA año 2006, ha sido desarrollada una placa prototipo para un espectrómetro digital multicanal basado en la familia Virtex-4 de FPGA equipado con dos ADC (convertidor digital-analógico) de 14 bits 105 MSPS (tasa de conversión) y dos ADC de 14 bits 160 MSPS y viene con su propias herramientas de software que provee un sistema de modelados y genera códigos para entornos Simulink y MATLAB. Este kit puede operar aun sin abrir el software correspondiente comunicándose con el host por USB (opcionalmente por Ethernet) o por conexión con el slot de PCI. El principal mérito de esta placa es que logra un óptimo cociente señal-ruido (SNR) cercano a la forma de cúspide para una señal de entrada exponencial. El filtro es manejado por la aritmética de punto fijo dado por Xilinx. Para remover las componentes DC de cambio lento en la señal de entrada, un restaurador de línea base (BLR) se ha diseñado como bloque de subsistema. Este continuamente monitorea la señal filtrada y la promedia sobre un tiempo definido, y solamente cuando no hay un pulso en la señal de entrada. Los valores promediados continuamente son restados de la señal filtrada. El resultado de la substracción alimenta el bloque de análisis de altura de pulso (PHA). Este bloque es básicamente un motor detector de picos condicionado por un subsistema en bloque que rebota señales de Pile-Up (PUR) que es disparado por un filtro rápido idéntico al filtro de energía excepto por un tiempo más corto en discriminación de picos. La amplitud calculada se guarda en el bloque de memoria compartida del Sistema Generador en tres ciclos, leer-incrementar-escribir, que es el que en realidad construye el espectro. Para la comunicación con la computadora anfitriona se ha creado un modulo VHDL dedicado que usa un reloj aparte de 40 MHz.

### 1.11.2 Biología y Medicina usando SR-FRX confocalizado

Una de las preocupantes amenazas a la salud humana es la exposición a los metales pesados como Pb el cual está asociado a varias enfermedades crónicas en los sistemas nervioso, óseo, renal etc. Este metal tiene efecto acumulativo en los sistemas vivientes. Los últimos estudios en ésta área se realizaron con un arreglo de micro-haz confocalizado en HASYLAB, línea L. En ese arreglo, un volumen cuasi-cúbico definido por la superposición de los conos confocales por la óptica de dos rayos-X (uno en el haz primario y el segundo en frente del detector dispersivo en energía) ha sido irradiado para el análisis. La línea provee de dos monocromadores de doble cristal [Si(111) y Si(113)] para la resolución de energía y un monocromador de multicapas doble con pares de capas (NiC, W/C) para aplicaciones de alto flujo. La focalización del haz fue realizado con medio-lentes policapilares dando unos tamaños de puntos de 12  $\mu\text{m}$  para FWHM en diámetro. Esta variante ofrece la posibilidad de concretar análisis sensitivo en profundidad y fue usado para determinar la distribución 3-dimensional de Pb y otros metales (trazas) en hueso con una resolución de 10  $\mu\text{m}$  lateral y en profundidad. El límite mínimo de detección fue cerca de 10  $\text{ng g}^{-1}$  en las muestras biológicas.

### 1.11.3 Medio Ambiente – Control de Aerosoles Atmosféricos

Es un tema de interés mundial conocer más el desplazamiento y acumulación de contaminantes para el medio ambiente y en lugares de gran concentración humana como es el caso de algunos países europeos y asiáticos. En Antwerp (Bélgica) se ha formado un grupo de investigación abocado a esta problemática. Además de contar con espectrómetros portables con fuente de radioisótopo  $^{55}\text{Fe}/^{109}\text{Cd}$  y de tubo de rayos-X cuentan con un novedoso espectrómetro de FRX (Epsilon-5, PANalytical), el cual tiene la ventaja de ser selectivo en el blanco secundario de excitación y ser capaz de determinar elementos de numero atómico alto por sus líneas-K. Esto se logra con un tubo de ánodo de oro a 100 kV, 6 mA como fuente primaria y un detector de Ge con una ventana de entrada ultra-delgada. La unidad Epsilon-5 alcanza bajos límites de detección aplicando un haz de excitación polarizado en 3-D el cual efectivamente evita que la radiación de tubo dispersada alcance el detector. Además del instrumental dispuesto, se trata de desarrollar una investigación fundamental y metódica en el análisis elemental a nivel micro y traza. Los resultados serán de aplicación en ciencia de materiales y especialmente en el tema medio ambiental. El último incluye estudios de aerosoles atmosféricos (deposición de polutantes en mar y tierra, efectos en el clima) y en la interacción entre polutantes y legados culturales (edificios, pinturas, etc.).

En definitiva, lo que se muestra en esta última sección de este capítulo es que hay una clara tendencia y aplicabilidad de las técnicas de Fluorescencia de Rayos-X. En estos pocos ejemplos aquí

descriptos obviamente en forma resumida, muestran las áreas de trabajo actuales que se desarrollan en los principales centros de investigación y que pueden ser consultados en sus Reportes de Actividades. Claramente, estas áreas de interés son la biología, la medicina y la contaminación ambiental y aparentemente éste será el ámbito de estudio por tiempo más debido a los notorios cambios ambientales a nivel mundial de los cuales aun no se han medido su alcance. El análisis de muestras biológicas se está tornando casi primordial y este trabajo no ha podido escapar a esta tendencia.

### Referencias

- 1 R. W. Ryon, *X-Ray Spectrom.*, 2001, **30**(6), 361.
- 2 J. V. Gilfrich, *X-Ray Spectrom.*, 2001, **30**(4), 203.
- 3 R. M. Rosseau, *The Rigarku Journal*, 2001, **18**, 31.
- 4 D. B. Wittry and N. C. Barbi, *Microsc. Microanal.*, 2001, **7**(2), 124.
- 5 P. Ricardo, J. Wiesmann, C. Nowak, C. Michaelsen and R. Bormann, *Appl. Optics*, 2001, **40**(16), 2747.
- 6 J. M. Andre, R. Benbalagh, R. Barchewitz, M. F. Ravet, A. Raynal, F. Delmotte, F. Bridou, G. Julie, A. Bosseboeuf, R. Laval, G. Soullie, C. Remond and M. Fialin, *X-Ray Spectrom.*, 2001, **30**(4), 212.
- 7 C. A. Liu, A. Macrander, J. Als-Nielsen and K. Zhang, *J. Vac. Sci. Technol. A-Vac. Surf. Films*, 2001, **19**(4), 1421.
- 8 E. A. Behne, Y. J. Feng and G. T. Seidler, *Rev. Sci. Instrum.*, 2001, **72**(10), 3908.
- 9 D. Erre, H. Jibaoui, S. Rondot and D. Mouze, *Eur. Phys. J.-Appl. Phys.*, 2001, **14**(2), 143.
- 10 N. Georgescu, C. G. Serbanescu and G. Sandolache, *Nukleonika*, 2001, **46**, S17.
- 11 S. Friedrich, T. Niedermayr, O. Drury, M. F. Cunningham, M. L. van den Berg, J. N. Ullom, A. Loshak, T. Funk, S. P. Cramer, J. D. Batteux, E. See, M. Frank and S. E. Labov, *Nucl. Instrum. Methods Phys. Res., Sect. A*, 2001, **467**, 1117.
- 12 L. Li, L. Frunzio, C. Wilson, K. Segall, D. E. Prober, A. E. Szymkowiak and S. H. Moseley, *IEEE Trans. Appl. Supercond.*, 2001, **11**(1), 685.
- 13 J. L. Campbell, L. McDonald, T. Hopman and T. Papp, *X-Ray Spectrom.*, 2001, **30**(4), 230.
- 14 T. Papp and J. L. Campbell, *X-Ray Spectrom.*, 2001, **30**(2), 77.
- 15 R. Durak and Y. Ozdemir, *Instrum. Sci. Technol.*, 2001, **29**(3), 185.
- 16 A. Loupilov, A. Sokolov and V. Gostilo, *Radiat. Phys. Chem.*, 2001, **61**(3-6), 463.
- 17 H. Kume, H. Onabe, M. Obinata and T. Kashiwagi, *IEEE Trans. Nucl. Sci.*, 2001, **48**(4), 1012.
- 18 S. D. Liu, S. C. Lee and M. Y. Chern, *IEEE Trans. Electron Devices*, 2001, **48**(8), 1564.
- 19 M. Sugiho, T. Kamae, K. Makishima, T. Takahashi, T. Murakami *et al.*, *IEEE Trans. Nucl. Sci.*, 2001, **48**(3), 426.
- 20 L. M. P. Fernandes, J. A. M. Lopes, J. M. F. dos Santos and C. A. N. Conde, *X-Ray Spectrom.*, 2001, **30**(3), 164.
- 21 P. Seller, G. Derbyshire, G. Hall, G. M. Iles, A. Jordan, P. Murray, M. L. Prydderch *et al.*, *Nucl. Instrum. Methods Phys. Res., Sect. A*, 2001, **466**(1), 174.
- 22 E. Dubaric, C. Frojdh, H. E. Nilsson and C. S. Petersson, *Nucl. Instrum. Methods Phys. Res., Sect. A*, 2001, **466**(1), 178.
- 23 A. D. Smith, J. E. Bateman, G. E. Derbyshire, D. M. Duxbury, J. Lipp, E. J. Spill and R. Stephenson, *Nucl. Instrum. Methods Phys. Res., Sect. A*, 2001, **467**, 1136.
- 24 J. E. Bateman, G. E. Derbyshire, E. Dudzik, G. van der Laan, J. D. Lipp, A. D. Smith and R. Stephenson, *Nucl. Instrum. Methods Phys. Res., Sect. A*, 2001, **467**, 1140.
- 25 M. Kocsis, *Nucl. Instrum. Methods Phys. Res., Sect. A*, 2001, **471**(1-2), 103.
- 26 J. M. F. dos Santos, J. A. M. Lopes, J. Veloso, P. Simoes, T. Dias, F. P. Santos, P. Rachinhas, L. F. R. Ferreira and C. A. N. Conde, *X-Ray Spectrom.*, 2001, **30**(6), 373.
- 27 J. Isern, F. Giovannelli, L. Sabau, E. Bravo, J. Gomez-Gomar, M. Hernanz *et al.*, *Astrophys. Space Sci.*, 2001, **276**(1), 39.
- 28 D. Wegrzynek, A. Markowicz and A. M. Cuevas, *X-Ray Spectrom.*, 2001, **30**(6), 403.
- 29 H. Ebel, R. Svagera and M. F. Ebel, *X-Ray Spectrom.*, 2001, **30**(3), 139.
- 30 F. Teodori, J. E. Fernandez and V. Molinari, *Radiat. Phys. Chem.*, 2001, **61**(3-6), 353.
- 31 A. N. Smagunova, U. V. Ondar, V. G. Nikitina and V. A. Kozlov, *J. Anal. Chem.*, 2001, **56**(9), 833.
- 32 M. Ertugrul, *Instrum. Sci. Technol.*, 2001, **29**(4), 309.
- 33 C. Zarkadas, A. G. Karydas and T. Paradellis, *X-Ray Spectrom.*, 2001, **30**(2), 99.

- 34 Y. N. Hua, *J. Trace Microprobe Techn.*, 2001, **19**(1), 25.
- 35 J. Malmqvist, *X-Ray Spectrom.*, 2001, **30**(2), 83.
- 36 E. Tirasoglu, O. Dogan, U. Cevik, M. Ertugrul and H. Erdogan, *J. Trace Microprobe Techn.*, 2001, **19**(1), 99.
- 37 R. A. Barrea, V. D. Martinez and T. S. Plivelic, *X-Ray Spectrom.*, 2001, **30**(2), 93.
- 38 B. I. Kitov, *J. Anal. Chem.*, 2001, **56**(2), 131.
- 39 A. Carreras, R. Bonetto, G. Stutz, J. Trincavelli and G. Castellano, *X-Ray Spectrom.*, 2002, **31**(2), 173.
- 40 A. P. Martin, A. N. Brunton, G. W. Fraser and A. F. Abbey, *Nucl. Instrum. Methods Phys. Res., Sect. A*, 2001, **460**(2-3), 316.
- 41 A. P. Martin, A. N. Brunton, G. W. Fraser, A. D. Holland, A. Keay, J. Hill, N. Nelms, I. C. E. Turku, R. Allott, N. Lisi and N. Spencer, *X-Ray Spectrom.*, 1999, **28**(1), 64.
- 42 H. Ebel, R. Svagera and M. F. Ebel, *X-Ray Spectrom.*, 2001, **30**(3), 180.
- 43 K. Hayashi, J. Kawai, Y. Moriyama, T. Horiuchi and K. Matsushige, *Spectrochim. Acta, Part B*, 1999, **54**, 227.
- 44 C. Fiorini, A. Longoni and A. Bjeoumikhov, *IEEE Trans. Nucl. Sci.*, 2001, **48**(3), 268.
- 45 W. Gorner, M. P. Hentschel, B. R. Muller, H. Riesemeier, M. Krumrey, G. Ulm, W. Diete, U. Klein and R. Frahm, *Nucl. Instrum. Methods Phys. Res., Sect. A*, 2001, **467**, 703.
- 46 C. Jung, F. Eggenstein, S. Hartlaub, R. Follath, J. S. Schmidt, F. Senf, M. R. Weiss, T. Zeschke and W. Gudat, *Nucl. Instrum. Methods Phys. Res., Sect. A*, 2001, **467**, 485.
- 47 A. Somogyi, M. Drakopoulos, L. Vincze, B. Vekemans, C. Camerani, K. Janssens, A. Snigirev and F. Adams, *X-Ray Spectrom.*, 2001, **30**(4), 242.
- 48 S. Bohic, A. Simionovici, R. Ortega, D. Heymann, C. Schroer and A. Snigirev, *Nucl. Instrum. Methods Phys. Res., Sect. B*, 2001, **181**, 728.
- 49 N. Watanabe, K. Yamamoto, H. Takano, T. Ohigashi, H. Yokosuka, T. Aota and S. Aoki, *Nucl. Instrum. Methods Phys. Res., Sect. A*, 2001, **467**, 837.
- 50 S. D. Shastri, J. M. Maser, B. Lai and J. Tys, *Opt. Commun.*, 2001, **197**(1-2), 9.
- 51 K. Sakurai, H. Eba, K. Inoue and N. Yagi, *Nucl. Instrum. Methods Phys. Res., Sect. A*, 2001, **467**, 1549.
- 52 M. L. Carvalho, C. Casaca, J. P. Marques, T. Pinheiro and A. S. Cunha, *X-Ray Spectrom.*, 2001, **30**(3), 190.
- 53 Y. X. Zhang, F. Cheng, D. Y. Li, Y. S. Wang, G. L. Zhang, H. J. Xu, W. S. Liao, T. T. Tang, Y. Y. Huang and W. He, *Chin. Sci. Bull.*, 2001, **46**(13), 1138.
- 54 A. Ide-Ektessabi, S. Fujisawa, K. Sugimura, Y. Kitamura and A. Gotoh, *X-Ray Spectrom.*, 2002, **31**(1), 7.
- 55 R. Ortega, G. Deves, M. Bonnin-Mosbah, M. Salome, J. Susini, L. M. Anderson and K. S. Kasprzak, *Nucl. Instrum. Methods Phys. Res., Sect. A*, 2001, **181**, 485.
- 56 A. Gonchar, Y. Kolmogorov, A. Dikalova, V. Yelinova and V. Kondratev, *Nucl. Instrum. Methods Phys. Res., Sect. A*, 2001, **470**(1-2), 405.
- 57 Y. Harada, M. Taniguchi, H. Namatame and A. Iida, *Acta Oto-Laryngol.*, 2001, **121**(5), 590.
- 58 R. R. Martin, T. K. Sham, G. W. Won, K. W. Jones and H. Feng, *X-Ray Spectrom.*, 2001, **30**(5), 338.
- 59 V. B. Baryshev, A. F. Kudryashova, L. S. Tarasov, A. A. Ulyanov and K. V. Zolotarev, *Nucl. Instrum. Methods Phys. Res., Sect. A*, 2001, **470**(1-2), 422.
- 60 I. Nakai, Y. Terada, M. Itou and Y. Sakurai, *J. Synchrot. Radiat.*, 2001, **8**, 1078.
- 61 N. Allison, A. A. Finch, S. R. Sutton and M. Newville, *Geochim. Cosmochim. Acta*, 2001, **65**(16), 2669.
- 62 A. J. Davenport, M. P. Ryan, M. C. Simmonds, P. Ernst, R. C. Newman, S. R. Sutton and J. S. Colligan, *J. Electrochem. Soc.*, 2001, **148**(6), B217.
- 63 N. Molders, P. J. Schilling, J. Wong, J. W. Roos and I. L. Smith, *Environ. Sci. Technol.*, 2001, **35**(15), 3122.
- 64 S. A. McHugo, A. C. Thompson, A. Mohammed, G. Lambie, I. Perichaud, S. Martinuzzi, M. Werner, M. Rinio, W. Koch, H. U. Hoefs and C. Haessler, *J. Appl. Phys.*, 2001, **89**(8), 4282.
- 65 M. C. Camerani, A. Somogyi, M. Drakopoulos and B. M. Steenari, *Spectrochim. Acta, Part B*, 2001, **56**(8), 1355.
- 66 L. Kempenaers, N. H. Bings, T. E. Jeffries, B. Vekemans and K. Janssens, *J. Anal. At. Spectrom.*, 2001, **16**(9), 1006.

# Capítulo 2

## 2.1 PRINCIPIOS DE LOS RAYOS-X

### 2.1.1 Fluorescencia de Rayos-X

Cuando la excitación primaria de rayos-X incide en la muestra estos pueden ser absorbidos por los átomos o dispersados a través del material. El proceso en el cual un fotón de rayos-X es absorbido por un átomo por transferencia de toda su energía a un electrón interno, se llama efecto fotoeléctrico. Durante este proceso, si el fotón de rayos-X primario tiene suficiente energía, los electrones serán eyectados desde las capas más internas creando vacancias. Esas vacancias presentan una condición inestable para el átomo. Cuando el átomo retorna a una condición más estable, electrones de las capas más externas son transferidas a las capas más internas y en ese proceso producen un fotón de rayos-X característico cuya energía es la diferencia entre las dos energías de ligadura de las correspondientes capas. Los rayos-X así producidos en este proceso se llaman *rayos-X de fluorescencia* o FRX. El *análisis de rayos-X por fluorescencia* se llama al proceso de detección y análisis de los rayos-X emitidos. Usualmente las capas internas K y L son las detectadas en los análisis de FRX. En la Figura 2-1 se muestra un espectro de una muestra irradiada por rayos-X, se aprecian múltiples picos de diferentes intensidades.

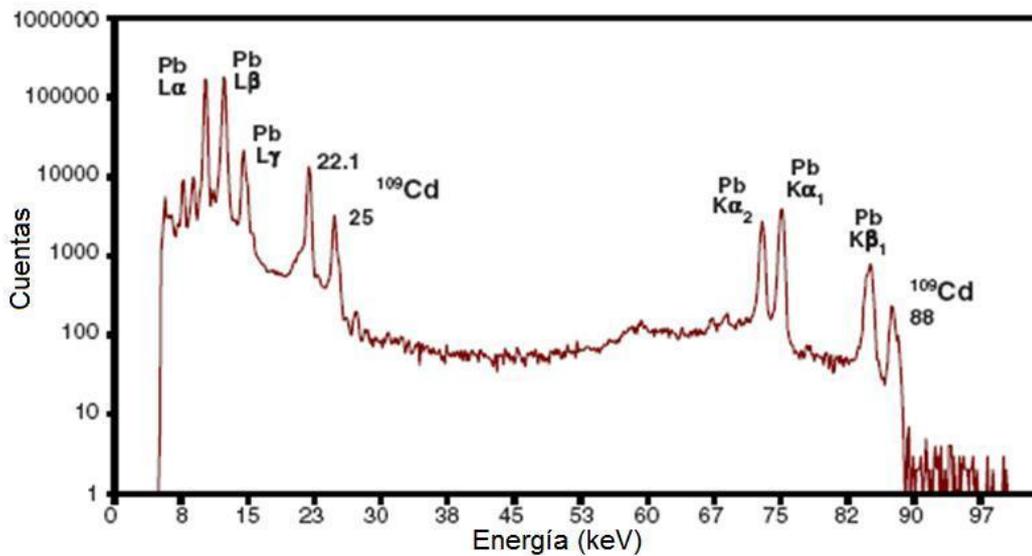


Figura 2-1. Espectro de fluorescencia de rayos-X usando un detector Amptek XR-100CR de 5 mm  $\times$  5 mm  $\times$  500  $\mu$ m con 20  $\mu$ seg. de *shaping time* (es el tiempo equivalente a la desviación estándar de un pico gaussiano a la salida del procesador de señal) y un analizador multicanal Amptek MCA8000A.

Las líneas características de rayos-X son marcadas con las letras K, L, M o N para denotar las capas desde donde han sido originadas. A su vez estas se designan con las letras  $\alpha$ ,  $\beta$  o  $\gamma$  para denotar la capa de más alta energía en la emisión involucrada. Entonces, una línea K $\alpha$  es producida desde una transición electrónica de la capa L a la capa K, K $\beta$  es la producida por una transición de la capa M a la capa K, etc. Puesto que dentro de cada capa existen múltiples órbitas para los correspondientes números cuánticos de momento angular, entonces una ulterior designación se hace denotando  $\alpha_1$ ,  $\alpha_2$  o  $\beta_1$ ,  $\beta_2$ , etc. para las transiciones electrónicas desde esas órbitas hasta la misma capa inferior.

Los métodos por FRX son ampliamente usados para la determinar la composición elemental de los materiales. Puesto que este método es rápido y no destructivo para la muestra, es el método a elegir para el campo de las aplicaciones y la producción industrial en el control de materiales. Dependiendo de la necesidad, la FRX no sólo puede ser producido usando rayos-X sino también por otras fuentes primarias de excitación como partículas alfa, protones o haces de alta energía.

Algunas veces, al retornar al átomo a su condición más estable, en vez de emitir un fotón de rayos-X característico éste transfiere la energía de excitación directamente a uno de los electrones externos causando que este sea eyectado del átomo. El electrón eyectado se llama electrón *Auger*. Este proceso es competitivo con FRX. Este efecto Auger tiene una probabilidad más alta de ocurrencia para elementos de bajo Z.

## 2.2 EMISIÓN DE RAYOS-X CARACTERÍSTICOS

### 2.2.1 Ionización de Capas Internas Atómicas

Como ya ha sido mencionado, la emisión de rayos-X característicos es precedido por la ionización de las capas internas atómicas, las cuales pueden ser producidas ya sea por partículas cargadas (e.g., electrones, protones, partículas alfa) o por fotones con suficiente energía. La sección eficaz de ionización de capas internas atómicas en el elemento  $i$  por electrones está dado por

$$Q_i = \pi \cdot e^4 \cdot n_s \cdot b_s \cdot \frac{\ln U}{U \cdot E_{c,i}^2}$$

donde  $U=E/E_{c,i}$  es el sobrevoltaje, definido como el cociente de la energía instantánea del electrón en cada punto de la trayectoria y la necesaria para ionizar un átomo de elemento  $i$ ,  $E_{c,i}$  es la energía crítica de excitación,  $n_s$  y  $b_s$  son constantes para una capa particular:

$$\begin{aligned} s = K : & \quad n_s = 2, b_s = 0.35 \\ s = L : & \quad n_s = 8, b_s = 0.25 \end{aligned}$$

La sección eficaz de ionización  $Q_i$  depende fuertemente del sobrevoltaje, la cual muestra un máximo a  $U \approx 3-4$ .

La probabilidad (o sección eficaz) de ionización de una capa interna atómica por una partícula cargada está dada por

$$\sigma_s = \frac{8\pi \cdot r_0^2 \cdot q^2 \cdot f_s}{Z^4 \cdot \eta_s}$$

donde  $r_0$  es el radio clásico del electrón igual a  $2.818 \times 10^{-15}$  m,  $q$  es la carga de la partícula,  $Z$  es el número atómico del material blanco,  $f_s$  es el factor dependiente de la función de onda del electrón de una capa particular y  $\eta_s$  es una función de la energía incidente de las partículas.

Cuando la vacancia es producida por radiación  $x$  o  $\gamma$  la ionización de las capas internas atómicas es el resultado del efecto fotoeléctrico. Este proceso implica la absorción completa del fotón incidente y la eyección fotoeléctrica de un electrón del átomo absorbente. La energía cinética de este electrón esta dado por la diferencia entre la energía que traía el fotón y la energía de ligadura del electrón  $E_c$  (también llamada energía de ionización). La longitud de onda crítica de absorción está dada por

$$\lambda(\text{\AA}) = 12.4/E_c(\text{keV}).$$

Para energías lejos del borde de absorción y no relativista, la sección eficaz  $\tau_K$  de eyección de un electrón de la capa K viene dado por:

$$\tau_K = \frac{32\sqrt{2}}{3} \cdot \pi \cdot r_0^2 \cdot \frac{Z^5}{(137)^4} \cdot \left(\frac{m_0 \cdot c^2}{h \cdot \nu}\right)^{7/2}$$

la ecuación anterior es inexacta cerca del borde de absorción y existen una serie de correcciones que se deben implementar para experimentos XANES o similares.

### 2.3 SERIES DE LÍNEAS ESPECTRALES

Cuando un electrón de una capa externa pasa a una capa interna, libera energía en forma de radiación electromagnética con una longitud de onda característica del elemento. Si  $E_1$  y  $E_2$  son las energías del nivel final e inicial respectivamente, entonces

$$\nu = \frac{E_1 - E_2}{h}$$

es la frecuencia del rayos-X característicos emitidos durante la transición electrónica.

No todas las transiciones electrónicas son posibles sino sólo aquellas dadas por la regla de selección para una aproximación dipolar y corresponden a las líneas más intensas y de mayor probabilidad de ocurrencia. Las reglas de transición estarán gobernadas por los cambios en los siguientes números cuánticos:

$$\Delta l = \pm 1 \quad \Delta j = 0 \text{ ó } \pm 1$$

siendo prohibida además la transición  $0 \rightarrow 0$  para  $j=0$ .

Transiciones que aparecen como prohibidas en esta aproximación pueden resultar permitidas si se consideran otros órdenes en el desarrollo multipolar de la radiación, o si se consideran también transiciones bipolares magnéticas. Estas consideraciones se tendrán en cuenta en experimentos tales como Dicroísmo por Absorción de Rayos-X Magneto Circulares[1] (MCXD). Un diagrama de niveles de energía y sus posibles transiciones se muestra en la Figura 2-2.

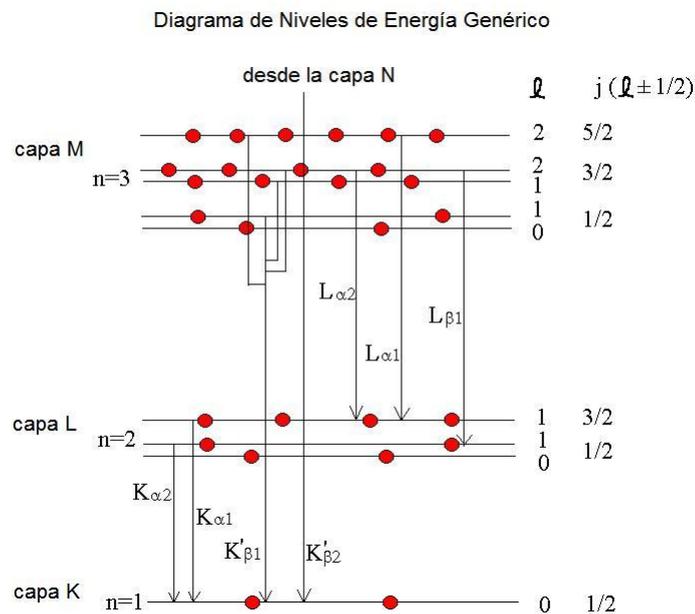


Figura 2-2: Niveles de energía atómicos y transiciones electrónicas permitidas designadas con la terminología usual en espectroscopía de rayos-X.

Una expresión general que relaciona la longitud de onda de una línea de rayos-X característico y el número atómico  $Z$  correspondiente al elemento está dada por la ley de Moseley:

$$\frac{1}{\lambda} = k \cdot (Z - \sigma)^2$$

donde  $k$  es una constante para una serie espectral y  $\sigma$  es la constante de apantallamiento por repulsión debida a los otros electrones en el átomo. Esta ley es importante para hacer un tratamiento sistemático de las líneas características. Existen en la literatura varias compilaciones de energías y longitudes de onda para las principales líneas de emisión de rayos-X y también se pueden acceder a ellas vía online.

Otra cantidad importante son las probabilidades de transición que en base a la gran cantidad de datos experimentales disponibles se han desarrollado fórmulas empíricas[2] con bajo error relativo. A continuación se dan las expresiones ajustadas de esos datos para las probabilidades para las líneas  $K\alpha$  y  $L\alpha$  en un amplio rango de números atómicos.

$$P_{K\alpha,i} = \begin{cases} 1.052 - 4.39 \times 10^{-4} \cdot Z_i^2 & 11 \leq Z_i \leq 19 \\ 0.896 - 6.575 \times 10^{-4} \cdot Z_i & 20 \leq Z_i \leq 29 \\ 1.0366 - 6.82 \times 10^{-3} \cdot Z_i + \\ + 4.815 \times 10^{-5} \cdot Z_i^2 & 30 \leq Z_i \leq 60 \end{cases}$$

$$P_{L\alpha,i} = \begin{cases} 0.944 & 39 \leq Z_i \leq 44 \\ -4.461 \times 10^{-1} + 5.493 \times 10^{-2} \cdot Z_i - \\ -7.717 \times 10^{-4} \cdot Z_i^2 + 3.525 \times 10^{-6} \cdot Z_i^3 & 45 \leq Z_i \leq 82 \end{cases}$$

## 2.4 LÍNEAS SATÉLITES DE RAYOS-X

Existen líneas espectrales que no se corresponden con las predichas por la regla de selección ni tampoco se ajustan a las correcciones multipolares. Estas líneas tienen origen en otro fenómeno que es de la múltiple ionización. Por analogía a las líneas satélites en el espectro óptico, estas se corresponderían cuando el impacto de un electrón de suficiente energía produce en el átomo varias vacancias. Siguiendo a esto, transiciones multielectrónicas resultan en la emisión de un solo fotón con energía mayor a una línea característica. En la práctica, las líneas satélites más importantes ocurren en la serie  $K_{\alpha}$ , y se notan con  $K_{\alpha_3, \alpha_4}$ , corresponden a una doble transición electrónica. La probabilidad de producirse una múltiple transición electrónica que resulte en una emisión de una línea satélite es más alta para  $Z$  bajos, por ejemplo, la intensidad de línea satélite  $AlK_{\alpha_3}$  es más o menos el 10% de la intensidad de la línea característica  $AlK_{\alpha_1, \alpha_2}$ .

## 2.5 EFECTO AUGER

Un efecto competitivo con la radiación por fluorescencia es el efecto Auger: el átomo excitado en lugar de relajar su estado de energía a otro más estable por medio de la emisión de un fotón característico, lo hace emitiendo un electrón de las capas menos ligadas. Este electrón se llama electrón Auger. La probabilidad que este efecto se produzca crece a medida que decrece la distancia entre los niveles de energía correspondientes y es más alto para los elementos de  $Z$  bajo. Puesto que los átomos excitados ya poseen una vacancia, digamos en la capa  $K$ , y si otro electrón es eyectado por efecto Auger, por ejemplo de la capa  $L$ , el átomo arriba a un estado de doble ionización. Ahora el átomo puede retornar a su estado más estable por simple o doble transición con emisión de radiación característica o satélite respectivamente.

Alternativamente, también podría haber hasta un tercer electrón Auger de otra capa, por ejemplo la capa  $M$ .

Las mediciones de las energías e intensidades de los electrones Auger también son aplicadas extensivamente en el estudio de la física de superficie, dando lugar a la espectroscopía de electrones Auger.

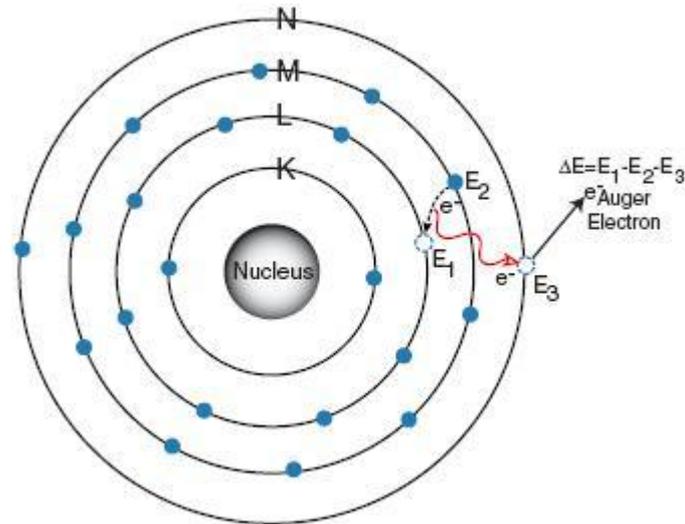


Figura 2-3: Efecto Auger, la excitación interna del átomo es transferida a un electrón de capas externas y éste es eyectado.

## 2.6 PRODUCCIÓN DE FLUORESCENCIA

Una consecuencia importante del efecto Auger es que puede causar que el número esperado de fotones de rayos-X creados al producirse una transición electrónica, sea menor al esperado porque esa vacancia puede llenarse sin radiación emitida. La probabilidad de que una vacancia en una capa o subcapa pueda ser llenada a través de una transición radiactiva se llama producción de fluorescencia. Así por ejemplo la aplicación de esta definición para la capa  $K$  es bastante directa

$$\omega_K = \frac{I_K}{n_K}$$

donde  $I_K$  es el número de fotones de rayos-X  $K$  característicos emitidos en la muestra y  $n_K$  es el número de vacancias primarias en esa capa.

La definición de producción de fluorescencia se torna más complicada para capas superiores a la  $K$  debido a que éstas consisten en varias subcapas y entonces depende de cómo las capas son ionizadas, y otra complicación importante son las transiciones Coster-Kronig, las cuales son transiciones no radiactivas entre subcapas de una misma capa.

En el caso de no estar presentes las transiciones Coster-Kronig, la producción de fluorescencia para la subcapa  $i$  de la capa cuyo número cuántico es indicado por  $X$  ( $X = L, M, \dots$ ) están dadas por

$$\omega_i^X = \frac{I_i^X}{n_i^X}$$

y se define como producción de fluorescencia  $\overline{\omega}_X$  promedio para la capa  $X$  a

$$\overline{\omega}_X = \sum_{i=1}^k N_i^X \cdot \omega_i^X$$

donde  $N_i^X$  es el número relativo de vacancias primarias en la subcapa  $i$  de la capa  $X$ :

$$N_i^X = \frac{n_i^X}{\sum_{i=1}^k n_i^X} \quad \sum_{i=1}^k N_i^X = 1$$

En las expresiones anteriores la suma se extiende sobre todas las subcapas  $k$  de la capa  $X$ . Por definición de la producción de fluorescencia promedio, la producción de vacancia primaria debe ser fija, esto es, las transiciones Coster-Kronig deben estar ausentes. Es de notar que  $\overline{\omega}_X$  no es generalmente una propiedad fundamental del átomo sino que depende tanto de la producción de fluorescencia de la subcapa  $\omega_i^X$  y del número relativo de vacancias primarias  $N_i^X$  que es característico del método usado para ionizar el átomo.

En presencia de transiciones Coster-Kronig existen dos formas alternativas de calcular la producción de fluorescencia para este caso. Una es calculando la producción de fluorescencia promedio  $\overline{\omega}_X$  como una combinación lineal de producción de fluorescencia por subcapa  $\omega_i^X$  considerando una distribución de vacancias Coster-Kronig

$$\overline{\omega}_X = \sum_{i=1}^k V_i^X \cdot \omega_i^X \quad \sum_{i=1}^k V_i^X > 1$$

donde  $V_i^X$  es el número relativo de vacancias en la subcapa  $i$  de la capa  $X$ , incluyendo las vacancias acomodadas en cada subcapa por transiciones Coster-Kronig. Los valores de  $V_i^X$  pueden ser calculados en términos del producto entre las cantidades relativas  $N_i^X$  de las vacancias primarias y de las probabilidades de transición Coster-Kronig para la muda de una vacancia desde la subcapa  $X_i$  a una capa superior  $X_j$  y es denotada por  $f_{ij}^X$

$$\begin{aligned} V_1^X &= N_1^X \\ V_2^X &= N_2^X + f_{12}^X N_1^X \\ V_3^X &= N_3^X + f_{23}^X N_2^X + (f_{13}^X + f_{12}^X f_{23}^X) N_1^X \end{aligned}$$

y así siguiendo.

Otra manera alternativa es calcular la producción de fluorescencia media como una combinación lineal pero esta vez del número relativo de vacancias primarias  $N_i^X$ :

$$\overline{\omega}_X = \sum_{i=1}^k N_i^X v_i^X$$

donde  $v_i^X$  significa el número total de rayos-X característicos que aparecen por vacancia primaria en la subcapa  $X_i$ . Las relaciones de transformación entre los coeficientes  $v_i^X$  y la producción de fluorescencia por subcapa  $\omega_i^X$  se pueden obtener de las tres últimas ecuaciones.

Finalmente podemos reunir los tres efectos, la producción de fluorescencia  $\omega_i^X$ , la producción Auger  $a_i^X$  y la probabilidad de transición de Coster-Kronig  $f_{ij}^X$  en una ecuación que deben cumplir:

$$\omega_i^X + a_i^X + \sum_{i=1}^k f_{ij}^X = 1$$

El valor medio de la producción Auger  $\overline{a}_X$  viene dado por

$$\overline{a}_X = \sum_{i=1}^k V_i^X a_i^X = 1$$

Los valores para la producción de fluorescencia de las capas  $K$ ,  $L$  y  $M$ , como también los valores de las probabilidades de transición de Coster-Kronig, están tabulados en compendios ampliamente difundidos.

*Referencias*

---

- 1 Crocombette, J.P.; Thole, B.T.; Jollet, F., *Journal of Physics: Condensed Matter*, Volume **8**, Issue 22, pp. 4095-4105 (1996).
- 2 J. Wernish, *X-Ray Spectrom.* **14**:109 (1985).

# Capítulo 3

En este capítulo se describirá una instalación para la generación de radiación de sincrotrón típica y algunos de sus principales componentes, así mismo, las ecuaciones básicas que muestran las principales características de este tipo de radiación. En la mitad de este capítulo se introducirán las ecuaciones de la producción de fluorescencia en el medio y en la parte final, se presentarán las ecuaciones y algunos métodos empleados para el tratamiento de espectros en forma general.

## 3.1 RADIACIÓN DE SINCROTRÓN

La radiación de sincrotrón (SR) se observó por primera vez en Abril de 1947 en la General Electric en un tipo avanzado de acelerador, un sincrotrón de electrones. Diez años después se tomó en cuenta que este efecto podía ser usado en muchas aplicaciones de la ciencia de materiales.

Cuando electrones o positrones se mueven a velocidades relativistas, esto es, cerca de la velocidad de la luz, y si son sujetas a campos magnéticos, las trayectorias siguen órbitas circulares y la SR se emite en la dirección tangencial. La energía de SR cubre un ancho espectro con un pico en la llamada energía crítica  $E_c$ , la cual es proporcional a la energía del electrón  $E$  y inversamente proporcional al radio de la trayectoria  $\rho$ , de acuerdo a:

$$E_c \text{ (keV)} = 2.218 E^3 \text{ (GeV)} / \rho \text{ (m)}$$

La razón de emisión fotónica, o el flujo de fotones  $F$  (fotones/sec./0.1% de ancho de haz), la densidad de flujo  $D$  (fotones/sec./mrad<sup>2</sup>/0.1% de ancho de haz) y la brillantez  $B$  (fotones/sec./mm<sup>2</sup>/mrad<sup>2</sup>/0.1% de ancho de haz) de la radiación de sincrotrón de electrones en una órbita circular en un campo magnético constante está dado por:

$$B = D / (2\pi \sqrt{\sigma_x^2 + \sigma_p^2} \sqrt{\sigma_y^2 + \sigma_{p'}^2})$$

$$D = F / (2\pi \sqrt{\sigma_{x'}^2 + \sigma_{p'}^2} \sqrt{\sigma_{y'}^2 + \sigma_{p''}^2})$$

$$F = 8.67 \times 10^9 I \text{ (mA)} \gamma \left( \frac{E}{E_c} \right)^{\frac{3}{2}} K_{\frac{2}{3}}^2 \left( \frac{E}{2E_c} \right) \Delta\theta$$

donde:

$I$  es la corriente del haz de electrones

$\gamma = 1957 \times E \text{ (GeV)}$  es un parámetro de la Relatividad

$K_{2/3}$  es la función de Bessel modificada de segunda clase

$\sigma_x, \sigma_y$  son las dimensiones horizontal y vertical del haz fotónico

$\sigma_p, \sigma_{p'}$  son la divergencia del haz electrónico y fotónico respectivamente.

Como ejemplo, la brillantez del sincrotrón LNLS en Brasil generado en el magneto de deflexión es mostrado en la Figura 3-1.

Lo que hace tan útil la radiación de rayos-X de sincrotrón, es su amplio rango de aplicaciones tanto en física, química y en el campo de la biología debido a sus propiedades únicas:

1. Elegibilidad de la longitud de onda del haz incidente de rayos-X. El coeficiente de absorción de un elemento, que depende de la longitud de onda incidente, es influenciado por los estados químicos de las sustancias, dando origen al método analítico de XAFS, espectroscopía de absorción de rayos-X por estructura fina. Usando este método uno puede obtener información del estado químico de los elementos.
2. Alto flujo de fotones. La radiación emitida tiene alta intensidad, aproximadamente unas 10 mil veces más que cualquier tubo de rayos-X convencional. Este aspecto da como resultado una gran eficacia por reducción del tiempo de medición.

3. Alta colimación. La alta colimación de SR es conveniente para el microanálisis. Este aspecto permite el análisis de elementos trazas metálicos contenidos en muestras biológicas aún a nivel celular.
4. Estructura pulsante en el tiempo. Fotones de la radiación de paquetes de electrones girando periódicamente en el anillo de sincrotrón manifiestan una estructura pulsante cuyos intervalos pueden controlarse. Este aspecto hace posible llevar a cabo mediciones que necesitan de una resolución temporal.
5. En la radiación es posible seleccionar distintivamente una polarización lineal o circular.

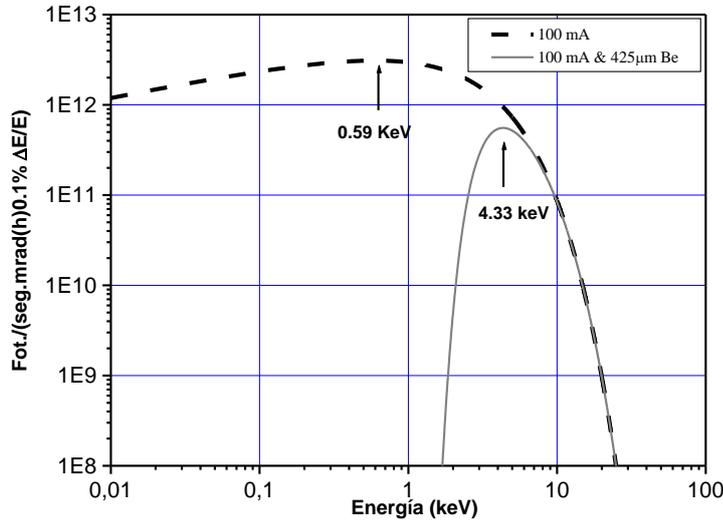


Figura 3-1. Espectro de Radiación de Sincrotrón generado en el LNLS con una corriente de 100 mA sin atenuación (en línea gruesa) y con atenuación (en gris) considerando todas las ventanas de Be en el tramo recto de extracción de haz en la línea D09B.

Estos ítems citados hacen de SR en muchos casos, la única forma de análisis localizado, no destructivo en materiales con una concentración extremadamente baja lo que es muy conveniente para aplicarlo en muestras biológicas. Los contenidos en las secciones siguientes estarán principalmente enfocados en un aspecto de la aplicación de la radiación de sincrotrón, la espectrometría de la fluorescencia de rayos-X, la cuantificación y la espectrometría de fluorescencia con energía selectiva.

La alta colimación viene expresada aproximadamente por el ángulo de emisión que es  $1/\gamma = mc^2/E$  pero es enteramente válido cuando  $E = E_c$ . Para cuestiones prácticas es importante conocer el ángulo de dispersión medio que viene dado por

$$\Delta\psi \approx \frac{2}{\gamma} \left(\frac{E_c}{E}\right)^{1/3} \quad E \ll E_c$$

$$\Delta\psi \approx \frac{2}{\gamma} \left(\frac{E_c}{3E}\right)^{1/2} \quad E \gg E_c$$

La polarización es un factor de primera importancia en la radiación de sincrotrón, ésta está 100% polarizada en el plano orbital y fuera de él solo elípticamente polarizada según el ángulo de observación. Si tomamos como definición de grado de polarización siguiente:  $P = (I_P - I_T)/(I_P + I_T)$  donde  $I_P$  es la intensidad de radiación correspondiente a la componente del campo eléctrico paralela al plano orbital e  $I_T$  la intensidad de la componente perpendicular, es posible luego escribir la polarización como función de la longitud de onda  $\lambda$  y el ángulo  $\psi$ :

$$P(\lambda, \psi) = \frac{K_{2/3}^2(\xi) - [(\gamma\psi)^2/(1+(\gamma\psi)^2)]K_{1/3}^2(\xi)}{K_{2/3}^2(\xi) + [(\gamma\psi)^2/(1+(\gamma\psi)^2)]K_{1/3}^2(\xi)}$$

### 3.2 COMPONENTES Y PARÁMETROS DE UN SINCROTRÓN

Temprano en la historia de la radiación de sincrotrón, las investigaciones sobre SR fueron llevadas a cabo en las instalaciones “parasíticas” (es decir, instalaciones auxiliares o satélites) en los laboratorios de aceleradores de alta corriente para física nuclear o de alta energía (la primera generación). En los 80’ se diseñaron y construyeron instalaciones dedicadas a la radiación de sincrotrón, la segunda generación. En los 90’ se desarrollaron las instalaciones de tercera generación, utilizando redes de magnetos optimizados y dispositivos de inserción para obtener haces de mayor brillantez que en los magnetos de deflexión. La tercera generación de instalaciones de SR pueden generar una brillantez de  $10^{11}$  a  $10^{12}$  veces más grande que en los tubos de rayos-X.

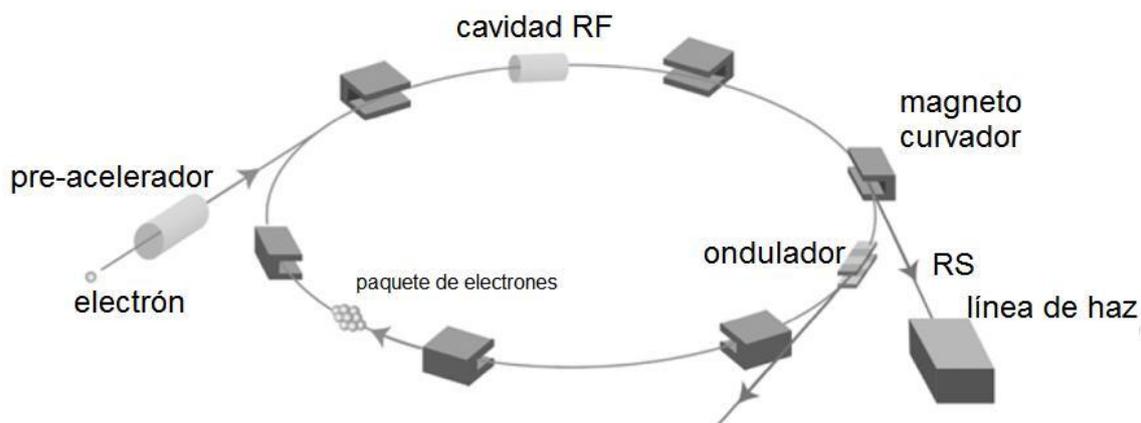


Figura 3-2. Vista esquemática de un anillo de sincrotrón y sus principales componentes.

Las instalaciones SR típicamente consisten de un sistema de inyección, un anillo de almacenamiento y líneas de extracción del haz. En el sistema de inyección, los electrones son generados, pre-acelerados y en ocasiones un segundo acelerador acelera más todavía esos electrones a más de 1 GeV antes de la inyección al anillo principal.

En el anillo, paquetes de electrones circulan periódicamente a velocidades relativistas por períodos de hasta varias horas. El anillo de almacenamiento consiste de cavidades de radio frecuencia (RF), magnetos deflectores, otros magnetos, dispositivos de inserción y otros sistemas de control. El esquema se muestra en la Figura 3-2.

#### 3.2.1 Cavidades RF

El sistema de cavidades RF restablece la energía que pierden los electrones a causa de la emisión de SR y estabiliza el paquete de electrones por el principio de estabilidad de fase. La frecuencia del voltaje de aceleración se fija a un múltiplo entero de la frecuencia orbital. Esto es, en la fase de RF, el voltaje es sincronizado cuando el electrón entra en la cavidad sobre la órbita de referencia, Figura 3-3. Electrones que están levemente rápidos, toman menos aceleración y se frenan porque la fase del voltaje de aceleración está adelantada y el voltaje de RF es menor. Por otro lado, electrones que están levemente lentos tomarán más aceleración y velocidad. Entonces así, los electrones exhiben ciertas oscilaciones longitudinales alrededor del centro de referencia del paquete o *bunch*. A la salida de la cavidad RF el paquete de electrones que son acelerados de esta forma habrá ganado mayor estabilidad.

#### 3.2.2 Magnetos de Deflexión

Los magnetos deflectores curvan la trayectoria de los electrones y los fuerzan a circular en una órbita. La radiación de sincrotrón se emite cuando un electrón recibe una fuerza centrípeta en el campo

magnético del magneto deflector. La radiación de sincrotrón emitida por un electrón viajando a casi la velocidad de la luz es altamente colimada por efectos relativistas. La magnitud del ancho angular relativista ( $\Delta\psi$ ) de radiación del magneto deflector está dado por:

$$\Delta\psi = 1/\gamma$$

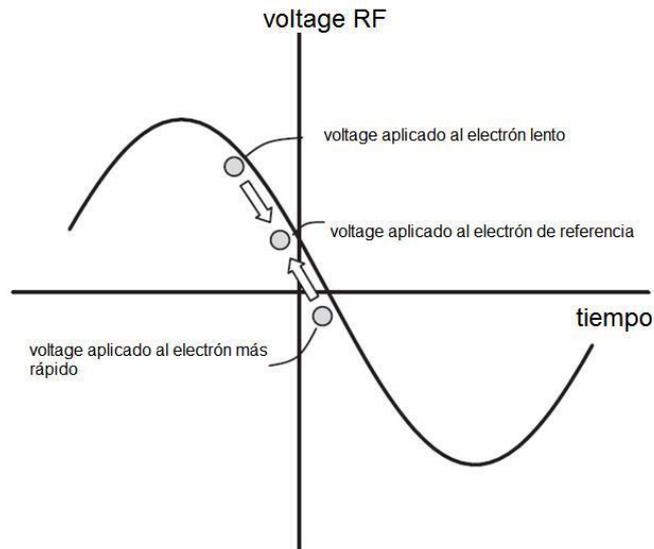


Figura 3-3. Gráfico del voltaje de la cavidad de radiofrecuencia versus el tiempo. El voltaje de cavidad al tiempo  $t = 0$  muestra el voltaje visto por el electrón de referencia que pasa a través de la cavidad.

La longitud de onda crítica está dada por:

$$\lambda_c = 18.64/(B \cdot E^2)$$

donde  $B$  (el campo magnético) está en Tesla y  $E$  (la energía del haz) está en GeV. La mitad de la potencia es radiada sobre la longitud de onda crítica y la otra mitad por debajo.

En el caso de Spring-8, el cual tiene un anillo de 8 GeV de consumo para acelerar las cargas, la radiación posee una amplitud angular cercana a 60 micro radianes, correspondiendo a un tamaño de haz de 3 mm a 50 m de la fuente.

### 3.2.3 Dispositivos de Inserción

La más alta intensidad de radiación de sincrotrón es producida por los dispositivos de inserción. El dispositivo de inserción está compuesto de un arreglo periódico de dipolos magnéticos con polaridad alternante. De acuerdo a la magnitud de la oscilación de la trayectoria del electrón, existen dos tipos de dispositivos de inserción, un ondulator y un wiggler. Los dispositivos de inserción son instalados en las secciones rectas de la trayectoria electrónica de los anillos de almacenamiento. A medida que los electrones pasan a través del dispositivo, la trayectoria zigzaguea repetidas veces y se emite radiación de sincrotrón. Los conos de radiación emitidos en cada curva de la trayectoria dan origen a efectos de interferencia.

En un **wiggler**, una secuencia de magnetos deflectores con campos magnéticos relativamente débiles causan un pequeño ángulo de deflexión, ( $< \gamma^{-1}$ ), y los efectos de interferencia producen una radiación que tiene un espectro continuo con altos flujos a longitudes de onda cortas. El wiggler es a menudo usado como una fuente para incrementar el flujo a longitudes de onda más cortas. Una secuencia de magnetos deflectores con  $n$  polos de polaridad alternada pueden levantar el flujo por  $2n$  veces (la curva suave superior de la Figura 3-4). La longitud de onda crítica para un wiggler es menor que en los magnetos deflectores.

En un **ondulador**, un arreglo periódico de fuertes magnetos dan como resultado un gran ángulo de deflexión ( $\gg \gamma^{-1}$ ), y el efecto de interferencia coherente produce una radiación altamente colimada la cual tiene uno o unos pocos estrechos picos espectrales (uno fundamental y armónicos). Para  $n$  polos, el ángulo de apertura del haz decrece por  $n^{1/2}$  y entonces la intensidad por ángulo sólido se incrementa por  $n^2$  (la curva de arriba de la Figura 3-4).

En el caso de un ondulador helicoidal de la línea de haz 40XU en Spring-8, por ejemplo, la energía de la radiación fundamental está concentrada en la coraza. La apertura angular de la radiación central es sólo de  $15 \mu\text{rad}$  (horizontal)  $\times 5 \mu\text{rad}$  (vertical), que corresponde a  $0.75 \times 0.25 \text{ mm}$  a 50 m de la fuente, y el flujo es de  $1.5 \times 10^{15}$  fotones/seg.

Una comparación de la brillantez de la SR para diferentes fuentes (Figura 3-4) muestra que la radiación de sincrotrón de un magneto deflector es cerca de ocho órdenes de magnitud más grande que el de un tubo de rayos-X convencional y en el rango de energía de 1-100 keV, el cual a su vez puede incrementarse por un orden de magnitud o dos por un wiggler y en cuatro órdenes para un ondulador.

El haz de radiación de sincrotrón es usualmente conducido hacia las áreas experimentales a través de rendijas, espejos focalizadores, y monocromadores.

Un **monocromador** se emplea para seleccionar una muy estrecha banda de energía del espectro y un sistema de focalización (e.g. sistemas de espejos Kirkpatrick-Baez) se usa para obtener un diámetro de haz de un submicrón. El tamaño de haz de radiación de sincrotrón puede entonces estar dentro de pocos micrones y además puede ser de energía variable (seleccionable).

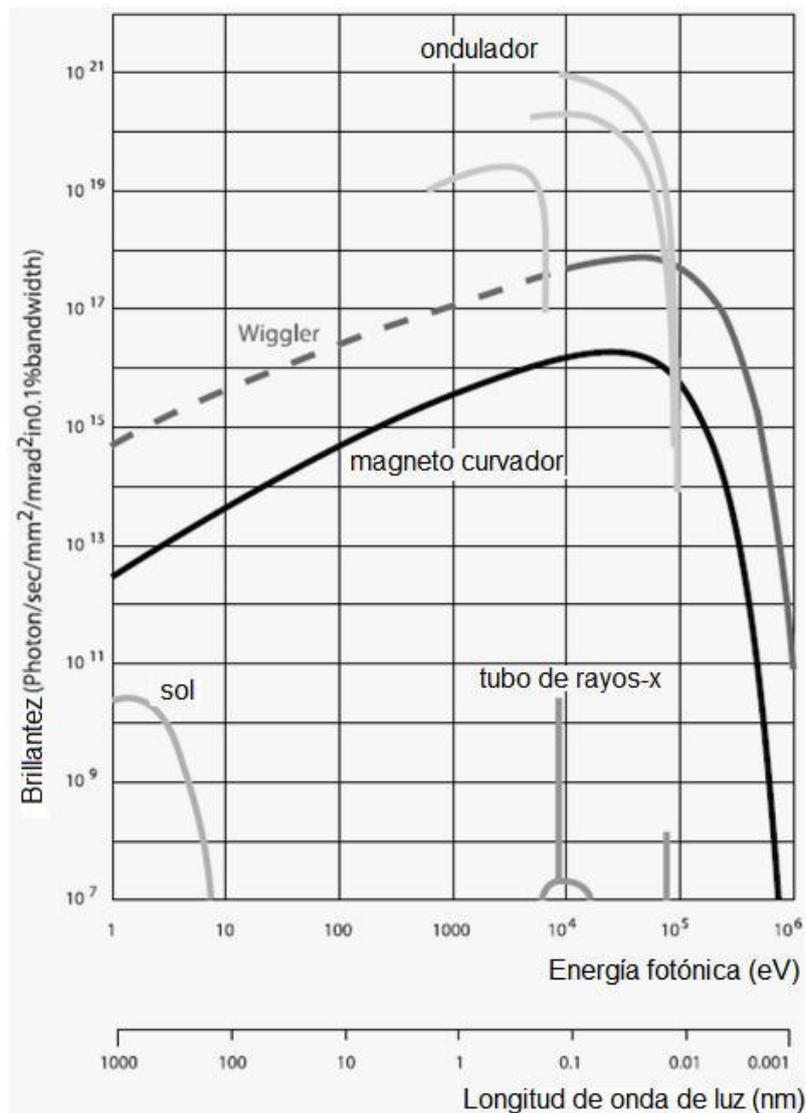


Figura 3-4. Comparación de brillantez entre la luz de radiación de un sincrotrón y algunas fuentes convencionales de rayos-X. Se puede ver que los rayos-X de radiación de sincrotrón son casi un billón de veces más brillante que las fuentes convencionales.

El extremo de estación o terminal de línea consiste de instrumentos para introducir muestras al haz y los detectores asociados para la medición de la radiación original y fluorescente, incluyendo instrumentación para controlar diversos motores de paso y también para medir la respuesta de los detectores.

Con la disponibilidad de la radiación de rayos-X duros también se pueden analizar grandes piezas de varios centímetros<sup>3</sup>. Seleccionando la energía de los rayos-X, uno también puede ajustar la profundidad de penetración, para lograr una sensibilidad superficial o volumétrica. Variando la incidencia de los ángulos rasantes, el haz de rayos-X puede ser usado como sonda superficial. Gracias a la estrecha divergencia del haz, este permite la investigación de finas capas o bañados. La alta intensidad permite una rápida adquisición de datos que a su vez permite llevar a cabo mediciones durante el procesamiento del material de estudio. Esos experimentos *in situ* proveen información sobre la dinámica del proceso el cual toma lugar durante la transformación de la muestra. La gran profundidad de penetración facilita el estudio de muestras en diferentes entornos como hornos, cryostats, celdas químicas o presurizadas.

### 3.3 LA FLUORESCENCIA DE RAYOS-X POR RADIACIÓN DE SINCROTRÓN

#### 3.3.1 Fluorescencia de rayos-X

Los aspectos más importantes del análisis de fluorescencia de rayos-X con fuente de sincrotrón, SR-FRX, están enumerados en los siguientes ítems:

1. Análisis de área usando microhaces
2. Posibilidad de medir en aire o agua
3. Mediciones sin contacto y no destructivos
4. Mediciones rápidas
5. Determinaciones precisas de elementos trazas

Especialmente, los ítems 2, 3 y 5 son superiores a cualquier otra técnica de análisis elemental.

Por medio del microanálisis de fluorescencia de rayos-X,  $\mu$ -FRX, con fuente de sincrotrón, uno puede colectar información sobre la distribución de constituyentes trazas de un material con gran resolución lateral. En vista de una alta sensibilidad para elementos pesados,  $\mu$ -FRX es particularmente valiosa para el microanálisis a nivel de trazas en muestras heterogéneas geológicas y en muestras biológicas.

La generación de la fluorescencia de rayos-X es causada por la excitación de las capas electrónicas internas y la transición de otro electrón de una capa más externa a esta vacancia.

#### 3.3.2 Detectores

Los detectores miden el espectro de energía de rayos-X, específicamente los rayos-X característicos cuyas concentraciones son proporcionales a la concentración del elemento en la muestra. La fluorescencia de rayos-X emitida por un átomo después de absorber la radiación de sincrotrón son medidas en detectores para el análisis cuantitativo. Los detectores de rayos-X más comunes son los contadores proporcionales y detectores de ionización de estado sólido, principalmente detectores de centelleo, detectores Si(Li) y dispositivos apareados de carga.

Los **detectores de estado sólido** cubren un amplio rango de energía (1-100 keV y más) y proveen un amplio ángulo sólido de detección. Lo último es muy importante en el análisis de cantidades extremadamente pequeñas de materiales. Para energías más altas de 20 keV, los sistemas dispersivos en longitudes de onda no son muy efectivos y los detectores de estado sólido surgen como dispositivos alternativos y más convenientes para detectar líneas K de elementos pesados.

Un detector de estado sólido es esencialmente un diodo polarizado inversamente con una juntura ancha (pocos mm) de portadores libres, una capa despoblada creada por compensación de material tipo-p con átomos donadores de tipo-n tal como el Li. Silicio dopado con litio, Si(Li), es el tipo más comúnmente usado, y el más reciente, el inherentemente intrínseco detector de Ge es también usado en espectrómetros de rayos-X. En esos detectores, la ionización por rayos-X en la región intrínseca produce pares electrón-hueco que son arrastrados por el campo eléctrico polarizado en inversa para producir un

pulso de corriente. El número de pares creados es proporcional a la energía incidente de rayos-X. La carga colectada en el ánodo es convertida a voltaje por un amplificador. Estos son subsecuentemente convertidos en pulsos de voltaje por un preamplificador y luego son amplificados y conformados por un amplificador lineal para optimizar el cociente señal-ruido. Las señales son después procesadas en un analizador multicanal (MCA) de altura de pulso para discriminarlas en el espectro de energías. Los detectores de estado sólido son conservados en nitrógeno líquido para prevenir la difusión de Li en la capa des poblada en el caso de Si(Li) y para reducir el ruido térmico en general.

### 3.4 ESPECTROMETRÍA DE FLUORESCENCIA DE RAYOS-X: UN ESPECTRO TÍPICO

Los espectros típicos que se mostrarán en este trabajo corresponderán a muestras sólidas o líquidas previamente secadas sobre superficies reflectoras. Las alturas de los picos, más precisamente el área bajo ellos, son proporcionales a la concentración del elemento en el espécimen. Un cuidadoso examen de los espectros muestra que los picos que representa cada elemento están superpuestos sobre una señal de “fondo”.

Un espectro usualmente contiene un número espurio de componentes discretas que aparecen como picos, estos pueden ser picos suma (también conocidos como picos de apilamiento) y picos escapes.

#### 3.4.1 Picos Suma

Es un pico que aparece a una energía que corresponde a la suma de dos o más energías de otros picos. Un pico suma ocurre como la suma de los pulsos eléctricos a tasas de conteo alto, debido a que los eventos nucleares o electrónicos suceden dentro de un período de tiempo menor que el tiempo que tarda en resolver el amplificador. Entonces una cuenta es perdida de cada pico y es sumada al pico suma.

#### 3.4.2 Pico Escape

Es un pico desplazado hacia el lado de menores energías en una cantidad bien definida. Un pico escape aparece del escape de fotones K del material del detector. En el caso de detectores de Si los picos escapes se esperan que aparezcan en el canal correspondiente a la energía  $(E - 1.74)$  keV, siendo  $E$  la energía del pico padre o pico analítico. La intensidad de los picos escapes es típicamente menor al 1% del pico del cual proviene.

### 3.5 NIVEL DE BACKGROUND O NIVEL DE FONDO EN LOS ESPECTROS MEDIDOS

#### 3.5.1 Componentes Básicas en el Background en SR-FRX

La interacción entre la radiación de la fuente de excitación y la sustancia tiene complicadas implicancias debido a una variedad de componentes sumadas al espectro de emisión de la muestra. Cuando un haz incidente de rayos-X tiene un gran flujo de *quantum*, los factores complicados son la densidad espectral de fondo en la región donde se analizan las líneas y la tasa de conteo del detector que determina principalmente la sensibilidad analítica. En el común de los casos la excitación por radiación monocromática de muestras con elementos de matriz liviana, el fondo o *background* tiene las siguientes formas:

1. Un pico de dispersión elástica de la radiación incidente,
2. Un pico de dispersión Compton de la misma radiación (simple para capas delgadas y múltiple para muestras gruesas),
3. Picos escapes por la emisión fluorescente en la superficie del detector, éstos están alejados de los picos elástico y Compton como también de las líneas espectrales muy intensas de la muestra. Se ubican en la energía de emisión fluorescente del material detector (9.9 keV  $K\alpha$  Ge por ejemplo)
4. Picos escapes de los *quantum* detectados y dispersado por proceso Compton en el detector a un ángulo cercano a 180° (medido desde la dirección de haz incidente) y saliendo de este por el

camino más corto. En este caso, el detector registra el electrón de retroceso solamente. Cuando hay muchas líneas intensas en el espectro de una muestra o cuando el detector es de un espesor insuficiente, los picos indicados forman un fondo continuo en la región de baja energía[1].

### 3.5.2 *Dispersión Compton*

Una onda electromagnética tiene propiedades de onda y de partícula. En la región de energía de los rayos-X, ésta tiende a mostrarse con propiedades de partícula. En los procesos de dispersión inelástica por electrones libres o débilmente ligados en una sustancia, los *quantum* de rayos-X pierden alguna fracción de su energía (en realidad, se aniquilan y re emergen después de la interacción con una energía menor). El fotón de rayos-X dispersado se caracteriza por una longitud de onda asociada algo más grande. Este fenómeno se llama dispersión Compton. Si la dirección y el ángulo sólido de detección son elegidos considerando propiedades ópticas de la luz, la aplicación de radiación de sincrotrón polarizada permite que la intensidad de este proceso sea considerablemente reducida por un factor de 10-100 y, desde luego, la sensibilidad sea mejorada o los tiempos de medición sean acortados cuando se usa fluorescencia de rayos-X por ejemplo.

### 3.5.3 *Dispersión Elástica*

Los electrones de una sustancia son obligados a oscilar por la acción de los rayos-X. La subsiguiente emisión de rayos-X a la misma frecuencia es causada por esas oscilaciones. Este fenómeno se llama dispersión elástica. El núcleo atómico de una sustancia también es obligado a oscilar por los rayos-X incidentes. Sin embargo, esto se desprecia generalmente debido a su muy pequeña amplitud. Con excitación de haz blanco de SR, la dispersión elástica puede volverse la componente básica del fondo debajo de los picos analíticos del espectro si la sección eficaz de dispersión elástica hacia el detector comienza a exceder la de dispersión Compton. Con excitación monocromática el pico de dispersión elástica yace fuera de las líneas de emisión detectadas de los elementos pero puede influenciar la sensibilidad analítica, creando una carga adicional al detector y a los dispositivos electrónicos. En este caso, el efecto será significativo si la sección eficaz de dispersión elástica se torna comparable o más grande que la sección eficaz de Compton[1].

### 3.5.4 *Radiación de Bremsstrahlung de fotoelectrones en la Muestra*

En la interacción de la radiación incidente con la muestra, surge un cierto número de fotoelectrones que son desacelerados en el volumen de la muestra como resultado de su interacción con el medio. Durante sus desaceleraciones, aparece una radiación con un espectro continuo dentro del rango de energías  $E_{\gamma} \leq E_e$  donde  $E_e$  es la energía de los fotoelectrones. Entre los factores más influyentes se sugiere que el que más limita la sensibilidad de la técnica SR-FRX es justamente el fondo por *bremsstrahlung* en los espectros analíticos[1].

### 3.5.5 *Mejoras para reducir el Background o Fondo*

La presencia de la polarización natural de SR es la ventaja cualitativa más importante para el análisis por fluorescencia de rayos-X sobre los otros tipos de radiación de rayos-X. Los gráficos de dispersión elástica e inelástica de la radiación incidente tienen un mínimo que depende del efecto combinado de la polarización media, del valor de energía elegido y de la apertura angular de colimadores en el sistema de detección. El decrecimiento de la intensidad de dispersión elástica y picos Compton puede realizarse ubicando el detector en el plano del vector  $E$  del haz SR monocromático a un ángulo de  $\theta = 90^\circ$  con respecto al haz y consecuentemente mejorar la altura basal del fondo debido a una colección incompleta de carga.

Si el espectro de emisión tiene picos en varios órdenes de magnitud diferentes en intensidad unos de otros, la excitación de algunas partes del espectro podría mejorarse si se excita separadamente variando las condiciones experimentales (la energía monocromática puede elegirse más alta y más baja que el borde K de absorción para un elemento de alta concentración). La excitación selectiva hace posible la

supresión de líneas de elementos pesados durante la detección de radiación fluorescente de los elementos más livianos.

El uso de aspectos específicos de la SR hace posible reducir sustancialmente el fondo debajo de los picos analíticos y entonces mejorar la sensibilidad y acortar los tiempos de medición.

### 3.6 ANÁLISIS CUANTITATIVO POR FRX

#### 3.6.1 Ecuaciones Básicas

Una representación esquemática de la interacción entre los rayos-X incidentes y la muestra se aprecia en la Figura 3-5. Los rayos-X incidentes con longitud de onda  $\lambda$  con la que se irradia la muestra son atenuados y generan rayos-X dispersados (dispersión Rayleigh y Compton) y rayos-X fluorescentes, acompañados por la creación de fotoelectrones.

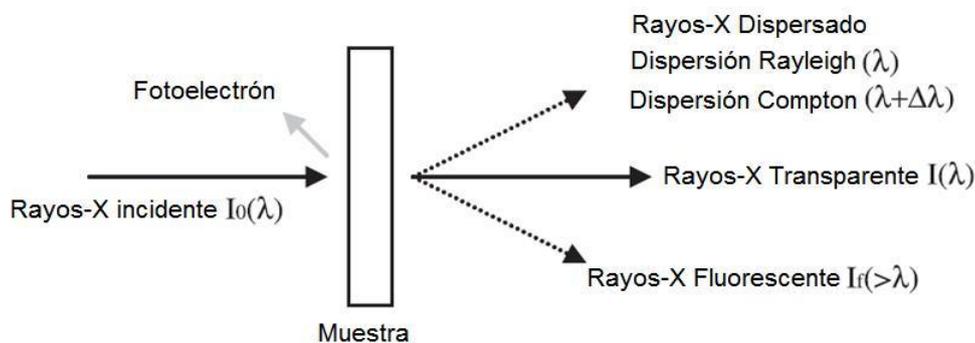


Figura 3-5. Dibujo esquemático de la interacción de los rayos-X con una porción de material de la muestra.

Cuando la muestra es pura de un elemento  $i$ , en acuerdo con la ley de Beer-Lambert, la intensidad de la radiación transmitida con longitud de onda  $\lambda$ ,  $I(\lambda)$ , está dada por

$$I(\lambda) = I_0(\lambda) \cdot \exp \{-\mu_i(\lambda)\rho_i t\}$$

donde  $I_0(\lambda)$  es la intensidad de los rayos-X con longitud de onda  $\lambda$ ,  $\mu_i(\lambda)$  es el coeficiente de atenuación másico efectivo del elemento  $i$  para la longitud de onda incidente  $\lambda$ ,  $\rho_i$  es la densidad del elemento  $i$ , y  $t$  es el espesor de la muestra. El coeficiente total másico de atenuación efectivo está dado simplemente por la relación

$$\mu(\lambda) = \mu_1(\lambda) \cdot W_1 + \dots + \mu_n(\lambda) \cdot W_n$$

donde  $W_1, \dots, W_n$  son las fracciones en peso de los componentes de la muestra.

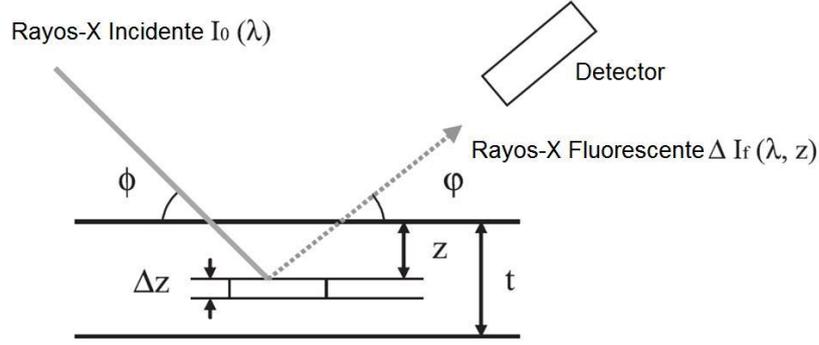


Figura 3-6. El esquema muestra una configuración típica en el análisis por fluorescencia de rayos-X entre el haz incidente, muestra y detector. También se indican las cantidades que representan las variables en las fórmulas descriptas en esta sección.

En la configuración experimental mostrada en la Figura 3-6, la intensidad que se alcanza a la profundidad  $z$ , representada por  $I(\lambda, z)$  está dada por

$$I(\lambda, z) = I_0(\lambda) \cdot e^{\{-\mu(\lambda) \cdot \rho \cdot \frac{z}{\sin \phi}\}}$$

donde  $\phi$  es el ángulo de incidencia y  $\rho$  es la densidad de la muestra. La intensidad de los rayos-X fluorescentes primarios generados en la muestra entre la profundidad  $z$  y  $z + \Delta z$ , representado por  $\Delta I_f(\lambda, z)$  está dado por

$$\begin{aligned} \Delta I_f(\lambda, z) &= P_i \mu_i(\lambda) W_i \rho \{I(\lambda, z) - I(\lambda, z + \Delta z)\} \\ &= P_i I(\lambda, z) \left\{ \mu_i(\lambda) W_i \rho \frac{\Delta z}{\sin \phi} \right\} \end{aligned}$$

donde  $P_i$  es la probabilidad de que la línea característica del haz de rayos-X del elemento  $i$  sea emitida, la cual está determinada principalmente por la sección eficaz de ionización y la producción de fluorescencia. La intensidad del haz de rayos-X fluorescentes primarios en la superficie de la muestra  $\Delta I_f(\lambda)$  está dado por

$$\begin{aligned} \Delta I_f(\lambda) &= \Delta I_f(\lambda, z) \times e^{\{-\mu(\lambda_f) \rho \frac{z}{\sin \phi}\}} \\ &= P_i I_0(\lambda) \mu_i(\lambda) W_i \rho \frac{\Delta z}{\sin \phi} e^{(-\bar{\mu} \rho z)} \end{aligned}$$

Donde

$$\bar{\mu} = \frac{\mu(\lambda)}{\sin \phi} + \frac{\mu_f(\lambda_f)}{\sin \phi}$$

$\lambda_f$  es la longitud de onda de la radiación X fluorescente y  $\phi$  es el ángulo de salida hacia el detector. Entonces, el haz de rayos-X fluorescente primario total produce una intensidad  $I_f$  proveniente de la muestra de espesor  $t$  que vendrá dado por

$$\begin{aligned} I_f(\lambda) &= \int_0^t \Delta I_f(\lambda) dz \\ &= P_i I_0(\lambda) \mu_i(\lambda) W_i \frac{1}{\sin \phi} \left\{ 1 - e^{(-\bar{\mu} \rho t)} \right\} \frac{1}{\bar{\mu}} \end{aligned}$$

En esta discusión, las muestras son secciones finas y sus mayores constituyentes son elementos livianos. Entonces la magnitud de  $\bar{\mu} \rho t$  es pequeña y la ecuación de arriba se puede aproximar a

$$I_f = P_i I_0(\lambda) \mu_i(\lambda) W_i \rho \frac{t}{\sin \phi} \propto W_i \rho t$$

Bajo esta aproximación, la intensidad del haz de rayos-X fluorescente de cada elemento es proporcional a la intensidad de rayos-X incidente y a la densidad de área  $W_i \rho t$ . La intensidad de rayos-X fluorescente que alcanza el detector de estado sólido  $I_f'(\lambda)$  viene dado por

$$I_f'(\lambda) = C(\lambda) C_i I_f(\lambda)$$

Donde  $C(\lambda)$  es una constante que es determinada por parámetros geométricos del arreglo instrumental, tales como el ángulo sólido subtendido por el detector y el camino de los rayos-X incidentes, y  $C_i$  es una constante determinada por el coeficiente de atenuación en el camino de los rayos-X fluorescentes correspondiente al elemento  $i$ , donde también se incluye la ventana de Be del detector de Si.  $C(\lambda)$  y  $C_i$  son constantes bajo las mismas condiciones experimentales.

La intensidad de rayos-X fluorescentes producidos que llegan al detector es directamente proporcional al área de pico  $A_{peak\ i}$  del elemento  $i$  en el espectro de FRX.

$$A_{peak\ i} = C' I_f'(\lambda)$$

Donde  $C'$  es la eficiencia del detector. Luego, combinando las últimas tres ecuaciones obtenemos la siguiente

$$(1) \quad A_{peak\ i} = \frac{1}{\sin\phi} C' C(\lambda) C_i P_i I_0(\lambda) \mu_i(\lambda) \rho'_i$$

donde  $\rho'_i = W_i \rho t =$  densidad en área del elemento  $i$ .

$C_i$ ,  $P_i$  y  $\mu_i(\lambda)$  pueden ser obtenidos de bases de datos ya existentes o de handbooks[2].  $I_0(\lambda)$  se monitorea por una cámara de ionización. El producto  $C' \cdot C(\lambda)$  puede ser calculado por comparación de la densidad en área del elemento  $i$  y el área de pico que son obtenidos de una muestra de referencia, para el cual la densidad en área del elemento  $i$  es conocido. Es posible, entonces, calcular la densidad en área de todos los elementos analizando el espectros de FRX debido a que el producto  $C' \cdot C(\lambda)$  es independiente de los elementos.

En las siguientes secciones se supondrá que las aproximaciones hechas hasta aquí son válidas. En el caso de que las muestras no sean suficientemente delgadas deben considerarse expresiones algo más complicadas y efectos de matriz más severos pero el principio de cálculo y conceptos como límites de detección son de aplicabilidad general.

### 3.7 PRINCIPIOS DE CÁLCULO USADOS EN PROGRAMAS DE COMPUTACIÓN DE ANÁLISIS POR FRX

En esta sección se describirá los fundamentos básicos para el desarrollo de procesamiento y cuantificación de espectro de rayos-X en el análisis de trazas enfocado al estudio de muestras biológicas.

La densidad en área de un elemento puede ser calculada de un espectro de FRX de acuerdo a las ecuaciones descriptas en la sección previa. Los constituyentes típicos detectados en el análisis por FRX en muestras biológicas son P, S, Cl, K y Ca los cuales son los principales componentes en tejido vivo. Eventualmente, esos picos pueden llegar a superponerse dificultando la descomposición del espectro y la determinación de las áreas correspondientes. Un ejemplo de espectro de FRX se muestra en la Figura 3-7 en donde los picos P, S, Cl y Ar se sobreponen en cierto grado que hay que determinar. Para solucionar este problema existen muchos algoritmos para la identificación de fondo y discriminación de picos que han sido reportados en muchos campos para la obtención de información cuantitativa, pero con varias limitaciones de acuerdo a un tipo específico de espectro[3]. Esos programas, lo que se proponen principalmente es automatizar el proceso numérico en obtener datos cuantitativamente correctos en los siguientes tres aspectos:

1. Identificación de la intensidad de fondo
2. Reconocimiento de picos existentes
3. Evaluación de sus posiciones e intensidades

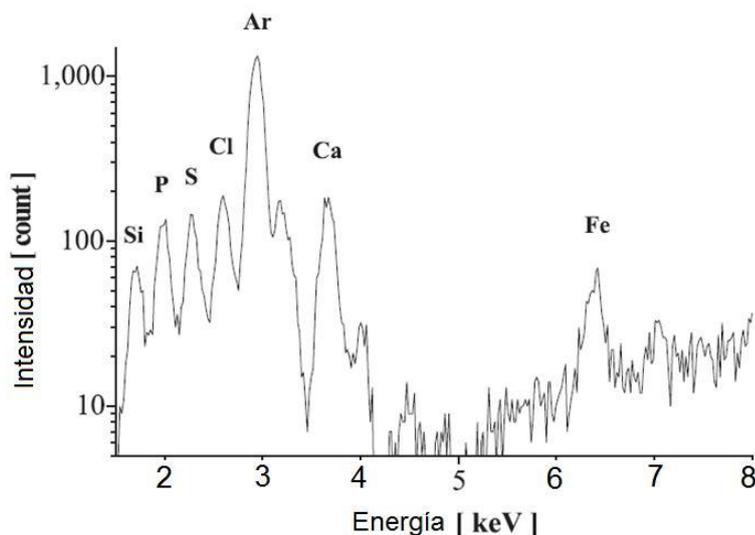


Figura 3-7. Espectro típico de fluorescencia de rayos-X de una muestra biológica. Se aprecia el solapamiento de los picos correspondientes a Si, P, S, Cl y Ar.

No existen muchos programas capaces de realizar un análisis cuantitativo por FRX usando radiación de sincrotrón, pero incidentalmente, se podría implementar un programa individual (e.g. en Visual Basic) que además de los tres requerimientos de arriba, consten con las siguientes propiedades:

4. Capacidad de analizar espectros que contengan ruido alto
5. Gran flexibilidad ante variadas condiciones experimentales
6. Una cuantificación rápida y simple de áreas de picos
7. Integración de múltiples datos

Muestras biomédicas generalmente contienen elementos pesados a baja concentración, y las distribuciones elementales no son homogéneas. Entonces los espectros no son claros como en el caso de análisis de minerales. Se requiere flexibilidad en el cambio de la longitud de camino o en la atmósfera experimental son también importantes porque se usan diferentes energías incidentes de acuerdo al propósito experimental. La calidad de la información cuantitativa es esencial porque de la precisión estadística pueden surgir aspectos subyacentes que a primera consideración no pueden ser observadas.

### 3.8 ANÁLISIS DE ESPECTROS Y CUANTIFICACIÓN – ECUACIONES BÁSICAS PARA ALGORITMOS

#### 3.8.1 Estimación del Fondo

El análisis cuantitativo de espectros de FRX requiere la remoción del fondo antes de la estimación del área neta de picos. Pero el coeficiente de absorción másico de la muestra, el cual es necesario para calcular la función del fondo, depende de la composición de la muestra y es originalmente desconocido. Luego, la extracción de fondo es generalmente llevado a cabo en varias formas numéricas[4]. Para procesar datos de un conjunto numeroso de puntos de análisis eficientemente, la aproximación del fondo deber poseer parámetros de ajuste libre para el usuario que permita un procesamiento por lotes (batch processing). A modo de ejemplo, la aproximación por *peak clipping* provee una estimación rápida y robusta. Este método está basado en la ecuación representada por

$$Y_i = \min(Y_i, m_i/2) \quad (m_i = Y_{i-1} + Y_{i+1})$$

donde  $Y_i$  es el conteo del canal  $i$  del analizador multicanal, y  $m_i$  es la media de los conteos del canal  $i - 1$  y  $i + 1$ . Cuando el conteo de cierto canal  $i$  es comparado con  $m_i$ , si  $Y_i$  es más grande que  $m_i$ , éste es reemplazado por  $m_i$ . Este procedimiento es repetido en la región de interés del espectro y las correcciones

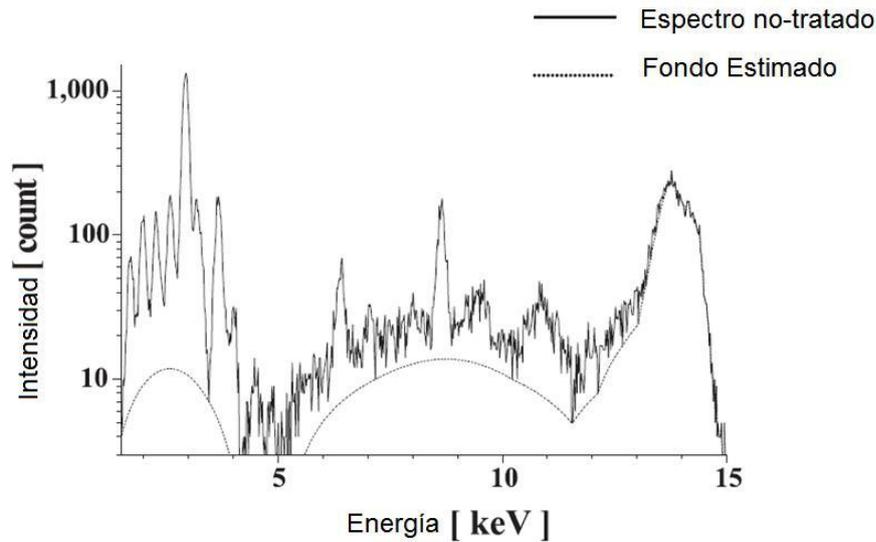


Figura 3-8. Ejemplo de estimación de fondo en fluorescencia de rayos-X del espectro de la figura anterior por el método *peak clipping*.

son gradualmente aplicadas. El fondo del espectro puede ser estimado fácilmente por repetición de este reemplazo. Al final, eventualmente, el suavizado del espectro puede ser aplicado si es necesario. Como ejemplo, se aplica este algoritmo al espectro de la figura anterior resultando el que se muestra en la

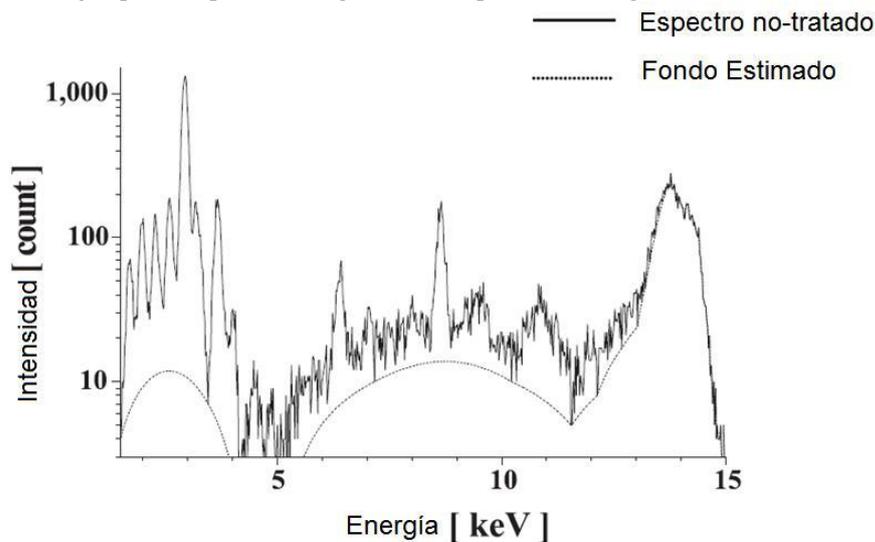


Figura 3-8.

En este trabajo se ha usado ampliamente también otro método de ajuste de fondo, el método de *Polinomios Ortogonales* que es de carácter más exhaustivo que el mencionado brevemente arriba. Básicamente se trata de usar una función que es el resultado de una combinación lineal de polinomios ortogonales y usar un parámetro de comparación entre el fondo real y esa función. Para ello se define la siguiente función de fondo

$$y_{fondo}(i) = \sum_{j=0}^m c_j P_j(x_i)$$

donde  $P_j(x_i)$  es algún polinomio ortogonal de grado  $j$ . Esta función de fondo se usará para minimizar el Chi cuadrado, el cual es la suma ponderada de los cuadrados en el rango del fondo, de las diferencias entre la función de fondo y el espectro medido  $y_i$ , o sea

$$\chi^2 = \sum_{fondo} w_i (y_i - y_{fondo}(i))^2 \quad \text{con} \quad w_i = \frac{1}{y_{fondo}(i)}$$

El paso crucial en este método es decidir qué canal pertenece al fondo y cual no. Un canal  $i$  no pertenece al fondo si su cuenta  $y_i$  es estadísticamente más grande que su aproximación  $y_{fondo}(i)$ , entonces en la parte de iteración del programa debería ir algo como

IF  $y_i > y_{fondo}(i) + r \cdot \sqrt{y_{fondo}(i)}$   
 THEN  $i \notin B$

donde  $B$  es el conjunto que agrupa a las variables que son canales del fondo y  $r$  es un parámetro de ajuste seleccionado previamente y generalmente varía entre 0.5 y 1.5. El orden de los polinomios dependerá de la forma del fondo en particular. Un número grande de fluctuaciones u oscilaciones en el fondo requerirá un orden polinomial grande. Un ejemplo de este método se muestra en la Figura 3-9.

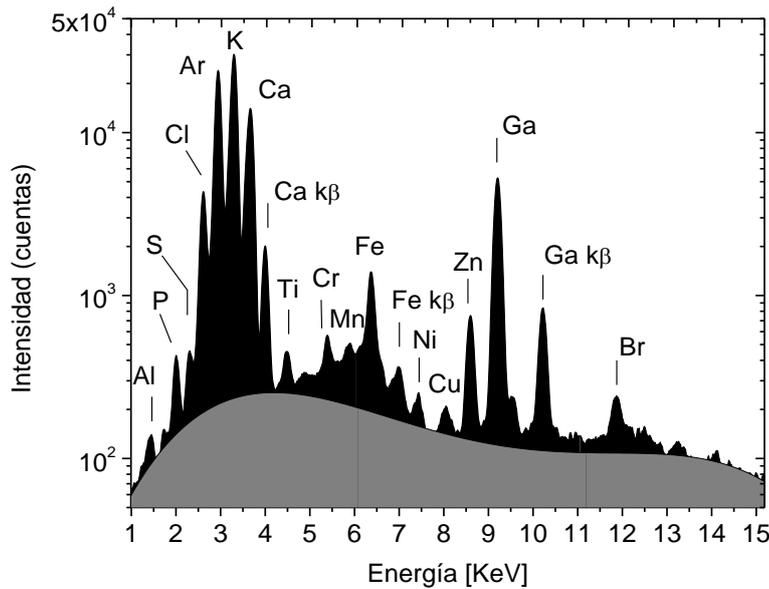


Figura 3-9. Espectro típico de fluorescencia de rayos-X medido en una muestra de fluido gingival humano. Se indican los elementos determinados y el fondo ajustado (gris) con polinomios ortogonales de grado cuatro. El espectro y el ajuste de fondo fueron tomados por el autor de este trabajo para un estudio que no se incluye en este manuscrito.

### 3.8.2 Ajuste de un pico simple

Una vez que el fondo ha sido evaluado, es posible llevar a cabo el ajuste de picos. Los picos son determinados por el método de cuadrados mínimos. Puesto que el modelo de funciones para la forma de picos es no-lineal con respecto a sus parámetros, se necesita de la iteración para realizar el ajuste por cuadrados mínimos. Un pico simple se puede ajustar por funciones Gaussianas que son representadas por

$$y(x) = H \exp\left\{-\frac{(M-x)^2}{S}\right\}$$

donde  $M$ ,  $S$  y  $H$  determinan la posición, FWHM (ancho completo a mitad del máximo) y la altura de los picos, respectivamente, y  $y(x)$  es el conteo del pico ajustado en el canal  $x$ . La función clave a calcular  $P$  está expresada por

$$P = \sum_i \{C(i) - B(i) - y(i)\}^2$$

donde  $C(x)$  es el conteo experimental obtenido en el canal  $x$ ,  $B(x)$  es el fondo estimado en el canal  $x$  e  $i$  recorre la extensión en los canales donde se aplica al ajuste. Un método posible de ajuste de los parámetros de interés es el de un ajuste no-lineal de los picos el cual modula las variables  $M$ ,  $S$  y  $H$  como

$$M = M - \frac{\partial P}{\partial M} dA, \quad S = S - \frac{\partial P}{\partial S} dA, \quad H = H - \frac{\partial P}{\partial H} dA$$

donde  $dA$  es el tamaño del paso. Cuando esas ecuaciones son directamente aplicadas, el gradiente absoluto de  $P$  cambia inestablemente, y  $M$ ,  $S$  y  $H$  a menudo divergen. Alternativamente, se puede saltar este obstáculo utilizando una versión modificada de las expresiones de arriba definiéndolas ahora como

$$(2) \quad M = M - W_M \frac{\partial P}{\partial M} dA, \quad S = S - W_S \frac{\partial P}{\partial S} dA, \quad H = H - W_H \frac{\partial P}{\partial H} dA$$

donde  $W_M$ ,  $W_S$  y  $W_H$  son funciones de peso para  $M$ ,  $S$  y  $H$  las cuales se han determinado empíricamente como

$$(3) \quad W_M = \frac{1}{H^2} \exp \frac{2}{S}, \quad W_S = \frac{20}{H}, \quad W_H = \frac{S}{5(1-4S^{2.5})}.$$

Esas funciones de peso son normalizadas por el valor absoluto del vector  $(W_M, W_S, W_H)$  cuando se toma  $dA = 1$ . Los pasos iterativos para las funciones  $M$ ,  $S$  y  $H$  se aplican hasta que éstas se estabilizan en un valor mínimo.

### 3.8.3 Ajuste Múltiple de Picos

Basados en la posición y ancho de los picos ajustados en la sección anterior se aplica el siguiente ajuste múltiple de picos al espectro de FRX, mencionando que también existen otros similares tratamientos con algunas modificaciones que no son sustanciales. Un pico simple está determinado por

$$y(x) = H \exp\left\{-\frac{(M'-x)^2}{S'}\right\}$$

donde de nuevo  $M'$ ,  $S'$  y  $H$  determinan la posición, FWHM y la altura de los picos respectivamente, y  $y(x)$  es el conteo del pico ajustado en el canal  $x$ .  $M'$  y  $S'$  son obtenidas de las ecuaciones (2) y (3) y no son moduladas en este proceso. En este caso la función  $P$  tomará la forma

$$P = \sum_{k=1}^n \sum_i \frac{1}{\omega_i^2} \{C(i) - B(i) - y_k(i)\}^2$$

donde  $C(x)$  es el conteo experimental obtenido en el canal  $x$ ,  $B(x)$  es el fondo estimado en el canal  $x$  e  $i$  recorre los canales en la región de interés.  $y_k$  es el  $k$ -ésimo pico al cual se le aplica el ajuste y  $n$  es el número de picos. La función de peso,  $\omega_i$ , está dada por

$$\omega_i = \begin{cases} C(i) - B(i) & (C(i) - B(i) > 10) \\ 10 & (C(i) - B(i) \leq 10) \end{cases}$$

Este factor permite procesar picos grandes y pequeños al mismo tiempo. El valor mínimo (=10) es elegido así para que este factor no sobrestime a los pequeños picos. Luego, el valor calculable  $H$  es determinado para cada pico ajustado por el método *steepest decent* y es modulado por

$$H_i = H_i - \frac{\partial P}{\partial H_i} dA, \quad i = 0, 1, \dots, n$$

donde  $H_i$  es la altura de  $i$ -ésimo pico y  $n$  es el número de picos ajustados.

Después del primer ajuste, se puede seguir ajustando cada pico con el procedimiento aplicado para un simple pico ya descrito. La posición, ancho, altura de cada pico continuarán refinándose hasta un ulterior procedimiento.

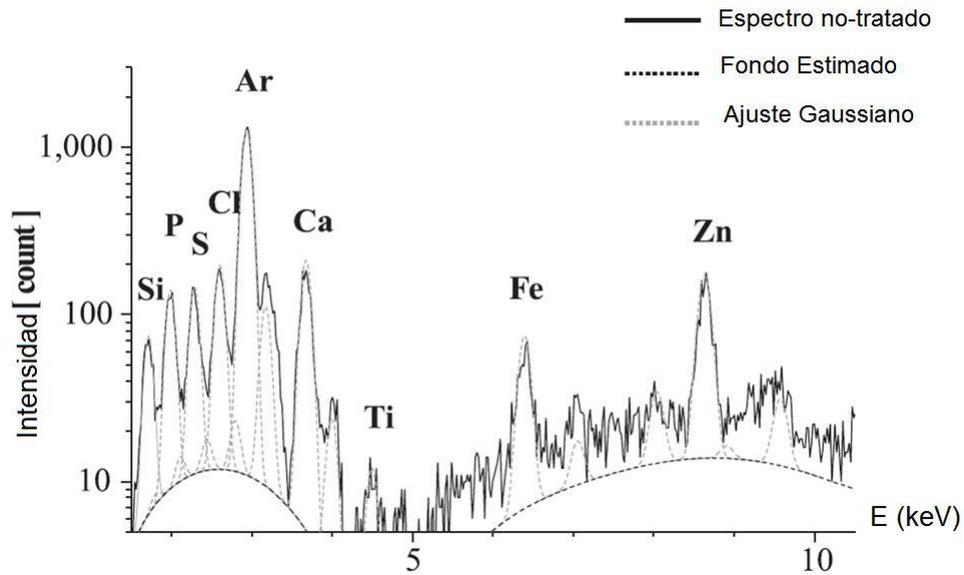


Figura 3-10. Resultado del múltiple ajuste aplicado al espectro anterior de una muestra biológica. El ajuste fue realizado por el método *steepest decent* modulando la altura de los picos.

Una vez que las Gaussianas se han ajustados en todos los picos del espectro FRX, se tienen ya el área neta de intensidad elemental. Las concentraciones, después, pueden calcularse de acuerdo a la ecuación (1).

#### 3.8.4 Límite de Detección Mínimo

Si la intensidad fluorescente de rayos-X se mide bajo las mismas condiciones, los efectos de matriz pueden ser desestimados (en el caso de muestras delgadas o usando muestras referencias) y la relación entre la concentración ( $W_i$ ) y la intensidad fluorescente  $I_i$  del elemento  $i$  se puede escribir como sigue

$$I_i = b_{0i} + b_{1i} \cdot W_i$$

Asumamos ahora que la muestra referencia con los elementos de interés cuya concentración es  $C_S$  se mide por análisis FRX. Si para  $t$  segundos de conteo el pico fluorescente de rayos-X y su fondo son definidos por  $N_{SP}$  y  $N_{SB}$ , respectivamente, la pendiente ( $\tan\beta$ ) de la línea de calibración está dada por

$$\tan\beta = \frac{N_{SP} - N_{SB}}{C_S}$$

De ésta despejamos el conteo de pico

$$N_{SP} = N_{SB} + \tan\beta \cdot C_S$$

Para una muestra desconocida, la concentración del mismo elemento  $W_i$  se puede derivar de los conteos de pico y fondo  $N_P$  y  $N_B$

$$W_i = \frac{N_P - N_B}{\tan\beta}$$

Los conteos en los picos muestran un patrón de distribución de Poisson. La desviación estándar del conteo neto de pico " $N_P - N_B$ " está dado por:

$$\sqrt{N_P + N_B}$$

Para que el pico sea detectable, la siguiente desigualdad debe satisfacerse.

$$\frac{N_P - N_B}{\sqrt{N_P + N_B}} > u_0$$

donde  $u_0 > 0$ . En la región del pico donde la concentración del elemento a ser detectado está en el límite mínimo de detección, los valores de  $N_P$  y  $N_B$  son casi iguales. Luego, la desigualdad anterior puede escribirse como

$$N_P - N_B > u_0 \sqrt{2N_B}$$

De las últimas cuatro expresiones el límite mínimo de detección  $C_{DL}$  se puede expresar como

$$C_{DL} = \frac{u_0 \sqrt{2} \cdot \sqrt{N_B} \cdot C_S}{N_{SP} - N_{SB}}$$

Para un nivel de confianza del 99%, el límite mínimo de detección  $C_{DL}$  se puede definir como

$$C_{DL} = \frac{3 \cdot \sqrt{N_B} \cdot C_S}{N_{SP} - N_{SB}}$$

Es necesario exhibir el tiempo de detección con  $C_{DL}$  porque el límite mínimo de detección cambia de acuerdo al tiempo de detección. Para obtener un  $C_{DL}$  pequeño, el valor de fondo tiene que ser disminuido y la pendiente de calibración tiene que ser más grande.

La mayoría de las ecuaciones presentadas aquí pueden ser encontradas en cualquier libro de tratamiento estadístico en espectroscopía o consultarse específicamente del capítulo 2 de "Synchrotron Radiation and X-Ray Fluorescence Spectroscopy" del libro *Micro Beams in Cell Micro Biology and Medicine*, Springer (2007).

### Referencias

- 1 V. Baryshev, G. Kulipanov, A. Krinsky, "Handbook of Synchrotron Radiation" vol. 3, ed. G.S. Brown and D.E. Moncton, (1991) pag. 639.
- 2 J.R. Tesmer, M. Nastasi, J.C. Barbour, C.J. Maggiore, J.W. Mayer, "Handbook of Modern Ion Beam Materials Analysis", Materials Research Society, 1995.
- 3 M.A. Kneen, H.J. Annegarn, *Nucl. Instrum. Meth. Phys. Res. B*, 1996, **109**, 209.
- 4 B. Vekemans, K. Janssens, L. Vincze, F. Adams, P. van Espen, *Spectrochim. Acta B*, 1995, **50**, 149.

# Capítulo 4

## 4.1 FOSFATOS CÁLCICOS

Los fosfatos cálcicos puros conocidos han sido clasificados en tres mayores tipos estructurales: (i) de tipo apatita,  $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6\text{X}_2$ , el cual incluye los derivados de hidroxiapatita ( $\text{X}=\text{OH}^-$ ) y fluorapatita ( $\text{X}=\text{F}^-$ ) y también aquellas relacionadas a las estructuras apatíticas como el fosfato octocálcico (OCP) cuya fórmula hidratada es  $\text{Ca}_8(\text{HPO}_4)_2(\text{PO}_4)_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  y el fosfato tetracálcico (TTCP),  $\text{Ca}_4(\text{PO}_4)_2\text{O}$ ; (ii) las de tipo glaserita las cuales pueden incluir todos los fosfatos tricálcicos (TCP) polimorfos,  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$  y finalmente (iii) los compuestos laminares de  $\text{Ca-PO}_4$ , los cuales incluyen dihidrato de fosfato dicálcico (DCPD),  $\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , anhídrido de fosfato dicálcico (DCPA),  $\text{CaHPO}_4$ , y fosfatos monocálcicos,  $\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$  y  $\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2$ . Es necesario también nombrar que siempre hay porciones de fosfato cálcico amorfo (ACP) y es considerado como un precursor de la bioapatita y puede ser relacionado con uno o más de los tipos de estructuras citados recién.

## 4.2 TIPOS ESTRUCTURALES DE APATITA

Podemos definir a las apatitas como compuestos estructurales de fórmula general  $\text{M}_{10}(\text{XO}_4)_6\text{Y}_2$  antes que especificar un compuesto particular. Se sabe que en general son capaces de acomodar una gran variedad de modificaciones y combinaciones de sustituciones de iones y grupos radicales en red cristalina. Aunque, el término “apatita” ha sido extensivamente como sinónimo usado para representar los fosfatos cálcicos,  $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6\text{X}_2$  donde  $\text{X}=\text{F}^-$ ,  $\text{OH}^-$  o  $\text{Cl}^-$ . Las apatitas son termodinámicamente la más estable de las fases entre los fosfatos cálcicos y por ende pueden ser considerados como el producto final en muchas reacciones.

## 4.3 HIDROXIAPATITA

Hidroxiapatita (HAp),  $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ , es usado como modelo de componente inorgánico de hueso y dientes. Entonces, las apatitas como ocurren en forma biológica, en formas minerales y productos de laboratorio pueden incorporar una gran variedad de impurezas y son rara vez encontrados en forma estequiométrica pura.

La forma más común es la hexagonal y la estructura cristalina ha sido descrita en el grupo espacial  $\text{P6}_3/\text{m}$  (No. 176) con los parámetros de red  $a=b=9.432 \text{ \AA}$  y  $c=6.881 \text{ \AA}$ ,  $Z=1[1]$ , la estructura se muestra en la Figura 4-1. Los diez iones de  $\text{Ca}^{2+}$  ocupan dos sitios de simetría diferentes,  $4f$  y  $6h$ . Cuatro iones de  $\text{Ca}^{2+}$  ( $4f$ ) están en columnas a lo largo de ejes triples en  $1/3$ ,  $2/3$ ,  $0$  y  $2/3$ ,  $1/3$ ,  $0$  separados aproximadamente a un medio del eje  $c$ . Se referencia comúnmente como Ca1 (o columna Ca).

Ca1 está coordinado con nueve átomos de O, con seis ligaduras más cortas que definen un prisma trigonal y tres ligaduras más largas demarcando las caras de los prismas. El poliedro  $\text{Ca-O}_9$  comparte las caras trigonales para formar cadenas paralelas al eje  $c$ .

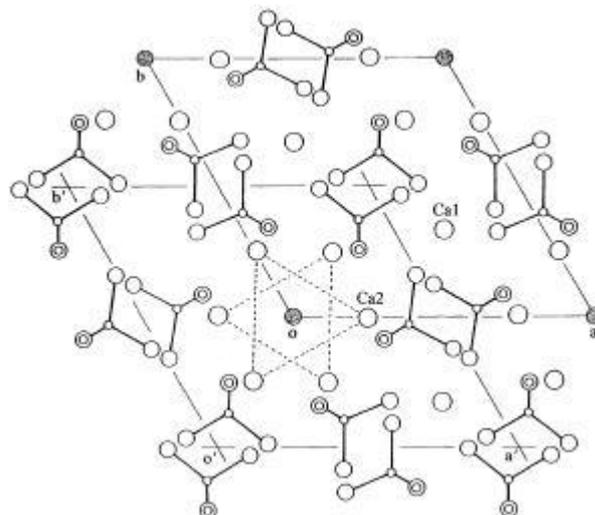


Figura 4-1: Estructura cristalina de FAp o hexagonal HAp proyectado sobre el eje c. Las esquinas de la celda unitaria (círculos sombreados) son ocupados por  $F^-$  en FAp y por  $OH^-$  en HAp. Una elección alternativa de la celda unitaria está dada por  $a'$  y  $b'$ .

Los restantes seis iones de  $Ca^{2+}$  (sitios  $6h$ , comúnmente referidos como Ca2 o Ca triangular) forman dos conjuntos triangulares en  $z=1/4$  y  $3/4$  en los planos especulares. Los siete iones Ca2 están coordinados con seis átomos de O y un anión  $OH^-$ . Los seis  $PO_4^{3-}$  ocupan las posiciones  $6h$  similares a los iones Ca2, en posiciones triangulares expandidas. El Ca1 adyacente y el poliedro Ca2 están unidos a través de átomos de oxígeno del tetraedro  $PO_4^{3-}$ . Debido a la simetría especular cristalográfica impuesta por el grupo espacial, cada anión  $OH^-$  debe considerarse que ocupa posiciones ( $4e$ ) desordenadas estadísticamente por encima y por debajo del plano especular en  $z=1/4$  y  $3/4$ . Mediante estudios por difracción de neutrones[1] se ha determinado que los átomos de oxígeno en los iones hidróxidos están a  $0.34 \text{ \AA}$  del plano especular con la dirección de  $OH^-$  apuntando hacia fuera de estos planos. Una estructura promedio podría implicar que aproximadamente en la mitad de la celda unitaria los iones  $OH^-$  apuntan hacia fuera y en la restante otra mitad apuntan hacia adentro del plano especular. Sin embargo, este desorden estadístico no requiere ser completamente aleatorio. Al menos un orden de corto alcance puede invocarse algo como el siguiente esquema  $OH-OH-OH\dots HO-HO$ . Para hacer esto posible se requiere la presencia de otros aniones por lo que probablemente una estructura hexagonal de la hidroxiapatita nunca será estrictamente estequiométrica.

La hidroxiapatita (HAp) es descrita como monoclinica, grupo espacial  $P2_1/b$  con parámetros de celda  $a=9.4214(8) \text{ \AA}$ ,  $b=2a$ ,  $c=6.8814(7) \text{ \AA}$ ,  $\gamma=120^\circ$ , con el doble en unidad de fórmula por celda unitaria como tenga el hexágono unidad[2]. La estructura está muy relacionada a la forma hexagonal, sin restricciones impuestas por la simetría de reflexión. Los iones  $Ca^{2+}$  y  $PO_4^{3-}$  ocupan posiciones similares a la forma hexagonal. Sin embargo, los iones  $OH^-$  están ubicados en dos columnas diferentes. Dentro de cada columna todos los aniones  $OH^-$  tienen la misma dirección de desplazamiento de  $z=1/4$  en forma hexagonal. Todos los aniones  $OH^-$  en una columna apuntan hacia arriba, mientras que en la otra columna apuntan hacia abajo. Luego, no hay un desorden en los aniones  $OH^-$  en la forma monoclinica aunque solo se forman bajo condiciones termales favorables.

#### 4.4 SUBSTITUTOS EN LAS APATITAS

La hidroxiapatita puede incorporar una gran variedad de substitutos para  $Ca^{2+}$ ,  $PO_4^{3-}$  y/o  $OH^-$ . Substitutos de otros elementos para  $Ca^{2+}$  y  $PO_4^{3-}$  en la mayoría de las muestras minerales naturales. Minerales naturales con composición,  $Ca_{10}(PO_4)_6(F,OH,Cl)_2$  exhiben grandes variaciones en el contenido de  $F^-$ ,  $OH^-$  y  $Cl^-$ . Especímenes puros son muy raros en la naturaleza, pero las composiciones binarias y terciarias son ampliamente reportadas.

Las apatitas biológicas rara vez son estequiométricas, usualmente son deficientes en calcio y contienen una gran variedad de átomos o grupos sustituyentes. Un gran número de propuestas se han hecho en referencia a la no-estequiometría de las bioapatitas. La mayor causa de la no-estequiometría es la incorporación de impurezas, usualmente las que substituyen al calcio, pero también aquellas

intersticiales. Ambas,  $\text{HPO}_4^{3-}$  y la incorporación estructural del agua ocurren en apatitas biológicas y sintéticas aunque su localización estructural es muy conocida.

#### 4.5 SUBSTITUCIÓN POR IONES $X^-$

Las posiciones de los iones  $X^-$  en las apatitas o los “canales iónicos  $X^-$ ”, como usualmente se refieren, parecen tener una interesante actividad en las apatitas. Los sitios  $X^-$  en apatitas son substituidos por una variedad de iones, frecuentemente por  $\text{OH}^-$ ,  $\text{F}^-$  y  $\text{Cl}^-$  pero también por  $\text{CO}_3^{2-}$  y  $\text{O}_2^-$ , o por vacancias o alguna combinación de aquellos. En la forma pura cada ión  $X^-$  toma una posición particular pero cuando dos o más iones están presentes al mismo tiempo, ellos interactúan unos con otros para producir efectos no predichos en base al conocimiento sobre las estructuras de los productos finales[3,4]. Los parámetros posicionales de los iones  $X^-$  están corridos de sus posiciones normales en el espécimen puro, pero los efectos son más pronunciados cuando se trata de iones de  $\text{Cl}^-$ . Una forma monoclinica de apatitas ternaria natural,  $\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3(\text{F}_{0.29}, \text{Cl}_{0.47}, \text{OH}_{0.24})$ , con grupo espacial  $P2_1/b$ , ha sido publicado[4]. Hay dos columnas de aniones en la celda unidad y ambas columnas contienen los tres aniones. La reducción en simetría de hexagonal a monoclinica resulta de la ordenación en cada columna de aniones en una de las dos simetrías equivalentes para los sitios de aniones presentes en la apatita ternaria.

#### 4.6 APATITAS DE CARBONATOS

Las apatitas carbonatadas son de especial interés en sistemas biológicos como componente inorgánico de huesos y dientes. Hay generalmente dos sitios aceptados para el ión  $\text{CO}_3^{2-}$  en la red de apatita: uno en el eje de la red hexagonal en el sitio de  $\text{OH}^-$  (tipo-A) y el otro en el sitio  $\text{PO}_4^{3-}$  (tipo-B). La substitución tipo-B requiere que se involucren iones adicionales para el balance de cargas. Las apatitas biológicas son principalmente las carbonatadas del tipo-B, pero con una pequeña porción del tipo-A[5]. No obstante, ninguno de esos casos ha sido confirmado por un análisis estructural completo y una descripción de las apatitas carbonatadas permanece controversial.

#### 4.7 SUBSTITUCIÓN POR CATIONES

La incorporación de cationes foráneos en la red de la apatita se cree que cambia las propiedades generales de la apatita. Las estructuras de un número de apatitas substituidas fueron investigadas para evaluar los cambios estructurales asociados con la substitución. El plomo es conocido como un “buscador de hueso” en el sentido en que este tiende a acumularse en huesos y dientes. En un estudio de plomo en apatita, la corta distancia observada en  $\text{Pb-O}$  indica que es una unión covalente la cual hace posible esta incorporación de plomo[6]. La estructura de apatita calcio-lantano muestra que el ordenamiento de cationes en las apatitas son fuertemente dependientes de las propiedades de los iones constituyentes[7]. Sin embargo, en una serie de apatitas a base de bario, tierras raras y sodio[8] las substituciones resultaron ser inesperadamente complejas como para derivar una predicción general.

#### 4.8 FOSFATO OCTOCÁLCICO

La estructura cristalina del fosfato octocálcico (OCP),  $\text{Ca}_8(\text{HPO}_4)_2(\text{PO}_4)_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  fue inicialmente determinada en 1962 y refinada mas tarde. Los cristales son triclinicos, grupo espacial  $P\bar{1}$ , con parámetro de celda  $a=19.692(4)\text{Å}$ ,  $b=9.523(2)\text{Å}$ ,  $c=6.835(2)\text{Å}$ ,  $\alpha=90.15(2)^\circ$ ,  $\beta=92.54(2)^\circ$ ,  $\gamma=108.65(1)^\circ$  y  $Z=2$ . La estructura de OCP es ilustrada en la Figura 4-2. La posición de todos los átomos en la región  $x=0$  a  $x\approx 1/4$  en OCP se corresponde cercanamente al de la hidroxiapatita. Esta porción consiste de dos  $\text{Ca}^{2+}$  y dos grupos  $\text{PO}_4^{3-}$ , correspondiente a cada conjunto triangular y dos posiciones de Ca en una columna de apatita, completando así la unidad  $\text{Ca}_6(\text{PO}_4)_4$ . El centro de inversión en 0.1/0.2 extiende esta región hasta  $x\approx 1/4$  y esta región de OCP entre  $x\approx 1/4$  y  $x\approx 3/4$  ha sido nombrada como la “capa apatítica”. Entre  $x\approx 1/4$  a  $x\approx 3/4$ , la composición y las posiciones atómicas son bastante diferentes de la hidroxiapatita. Esta

porción de estructura que contiene diez moléculas de agua en la celda unidad se llama “capa hidratada”. Las moléculas de agua, O5, localizadas cerca del centro de la región hidratada, no están coordinadas con ningún ión  $\text{Ca}^{2+}$ . Los grandes parámetros térmicos de O5 pueden indicar ocupaciones parciales en estos sitios o desorden en varias posiciones a lo largo de este canal. La poca certeza en el número de moléculas en OCP puede ser debido a la débil ligadura de O5 que le permite entrar y salir de la estructura de OCP, dependiendo de las condiciones externas. Independiente de la cantidad de agua O5, esta región provee un canal abierto a lo largo del eje-c para el transporte de  $\text{Ca}^{2+}$  u otros iones que pueden ser incorporados en los productos finales de apatita durante la transformación o la hidrólisis de OCP.

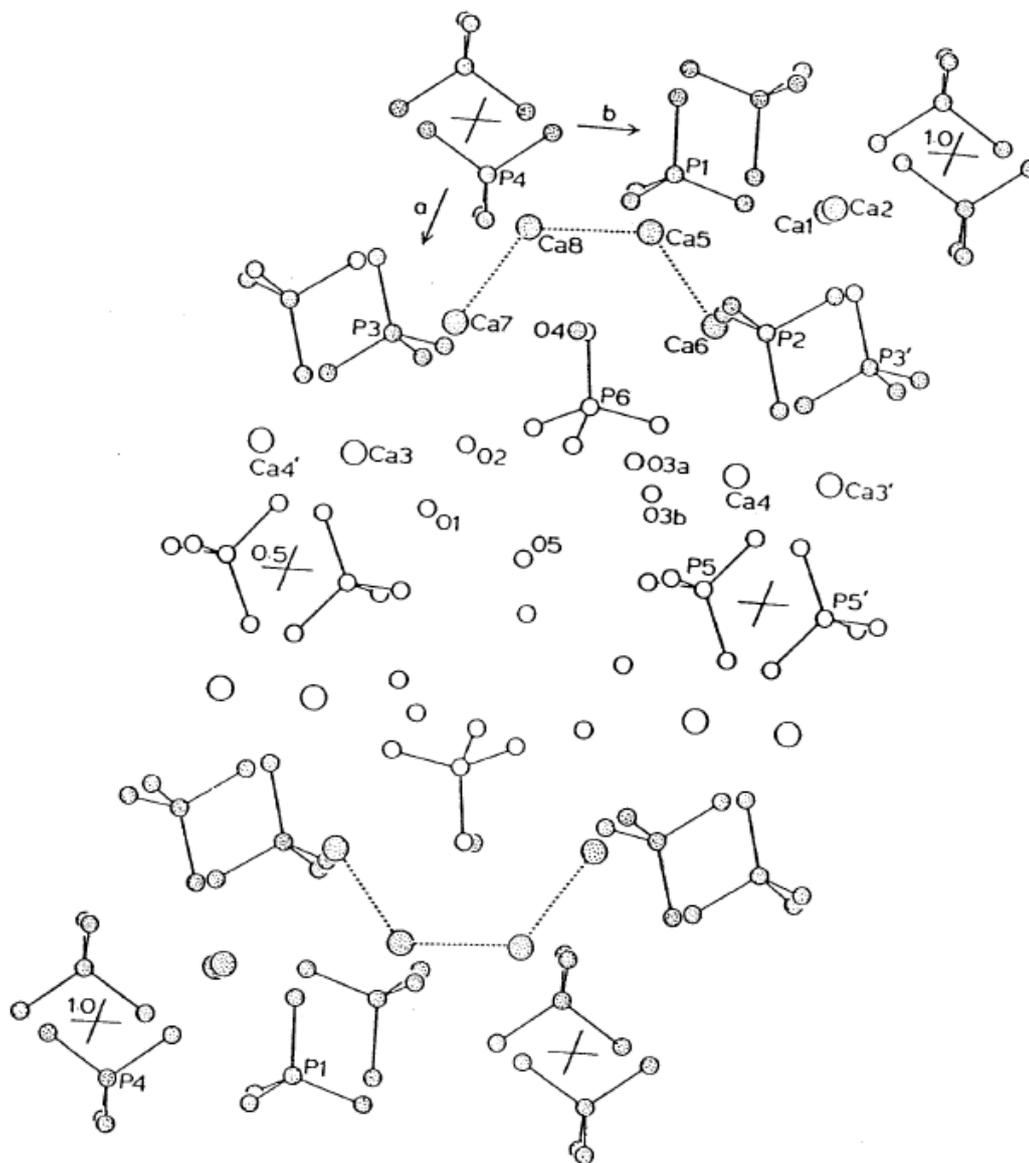


Figura 4-2. Estructura cristalina del fosfato octocálcico proyectado sobre el eje-c. La región con átomos sombreados es muy similar al de HAp y se llama capa ‘apatítica’. Los átomos de hidrogeno son omitidos por claridad.

La relación estructural global de OCP y HAp se muestra en la Figura 4-3, donde las posiciones atómicas de OCP están superpuestas en la estructura de HAp. Algunas similitudes se pueden observar aun en la capa hidratada. Las posiciones de los dos iones  $\text{Ca}^{2+}$  en la capa hidratada están también cerca de la columna de iones  $\text{Ca}^{2+}$  en la apatita. Otro notable aspecto es la localización de las moléculas de agua (O4) y un átomo de oxígeno de  $\text{HPO}_4^{2-}$  en la unión de las capas hidratada y de apatita ( $x \approx 1/4$ ). Ellos corresponden a las posiciones pivót de los iones  $\text{OH}^-$  en las esquinas de la celda unidad de HAp ( $z \approx 1/4$  y  $\approx 3/4$ ). La importancia de este aspecto y la cercanía en el ajuste de estas estructuras de OCP y HAp puede ser vista si la “capa apatítica” completa de OCP es comparada con la celda unidad de HAp, como se muestra en la Figura 4-1. Si O4 ocupa un par de esquinas, A y B en  $z=1/4$ , el oxígeno de  $\text{HPO}_4^{2-}$  estará en

$z=3/4$  de esas esquinas. Las posiciones serán inversas para las esquinas C y D. Para que los cristales crezcan como HAp, todas esas posiciones de las esquinas (ABCD para  $z=1/4$  y  $3/4$ ) deben ser ocupadas por iones  $\text{OH}^-$  en vez de agua de  $\text{HPO}_4^{2-}$ . La unidad pseudo-apatítica (ABCD, Figura 4-4) que contiene las moléculas de agua incorporadas en los cristales de HAp ofrece una ruta plausible en consideración para la red de moléculas de agua encontradas en apatita. Los cálculos de ligaduras por valencia han indicado que la molécula de agua O4 en OCP, es probable que sea al menos parcialmente substituida por un ion  $\text{OH}^-$  [9]. Este aspecto es también respaldado por estudios de MNR que muestran la presencia de iones  $\text{OH}^-$  en la capa apatítica de OCP[10]. La existencia de OCP polimorfos es atribuida a la posible diferencia de ligadura entre iones  $\text{HPO}_4^{2-}$  y las moléculas de agua[11] pueden estar relacionados a una posible desorden/substitución de las moléculas de agua O4 y/o O5.

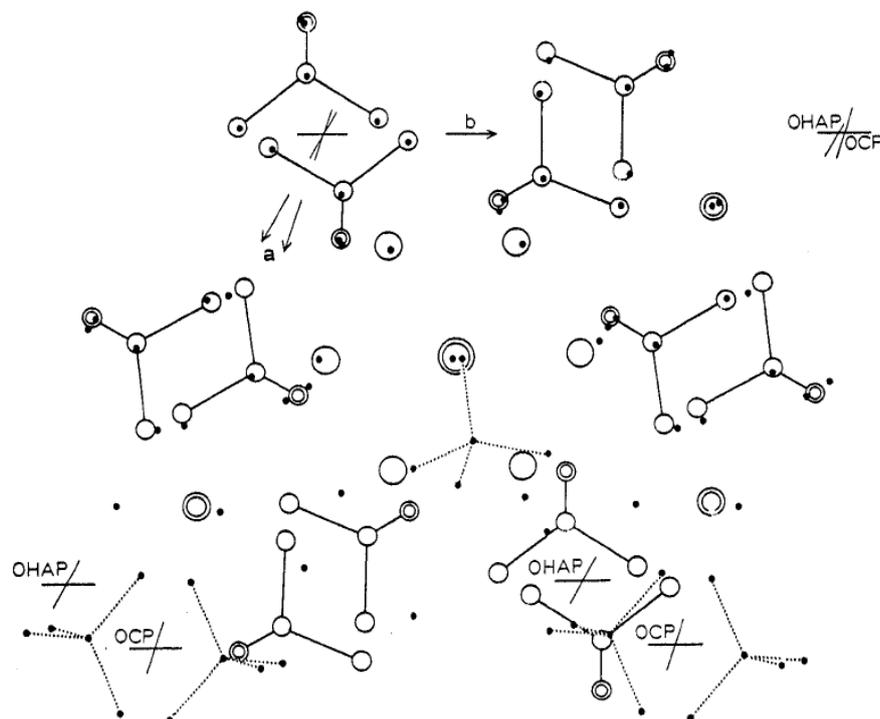


Figura 4-3. Superposición de una celda HAp (la elección alternativa indicada en la Figura 4-1) con la mitad de la celda de OCP proyectada en el eje-c. Los círculos vacíos representan las posiciones atómicas en HAp mientras que los pequeños círculos llenos representan aquellos en OCP.

La cercanía de ajuste en las estructuras de OCP y HAp ha sido considerada para intentar explicar el crecimiento epitaxial y la formación de intercalas o mezcla de laminas de esos dos compuestos[12]. Investigaciones en modelos estructurales han predicho el crecimiento epitaxial de un compuesto sobre el otro[13]. En estudios de difracción de rayos-X en cristales de fosfato cálcico que tenían propiedades ópticas intermedias entre OCP y HAp se encontró que difractaban como cristales independientes de OCP y HAp con sus ejes b y c colineales[12]. No obstante cuando las capas OCP y HAp son muy finas y al azar, pueden ser caracterizadas como una mezcla de intercapas de ambos cristales. Los picos de difracción interactúan unos con otros tal que las posiciones de los picos ( $h00$ ) se desplazan con la razón molar Ca/P de los cristales intercalados[14]. La estructura básica de las capas consiste en láminas de apatita alternándose con láminas de OCP[15].

La existencia de esta estructura inter-laminar de OCP y HAp ha proveído pistas en los procesos de biomineralización, ciertas propiedades y la no-estequiometría de las apatitas biológicas y en los modelos estructurales para los fosfatos cálcicos amorfos[16,17].

## 4.9 FOSFATOS TRICÁLCICOS

Existen cuatro anhídros de fosfatos tricálcicos, TCP polimorfos:  $\alpha$ - $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$  ( $\alpha$ -TCP), es una fase estable entre 1120 °C y 1470 °C, pero es metaestable debajo de 1120 °C;  $\alpha'$ -TCP, estable por encima de 1470 °C;  $\beta$ - $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$  ( $\beta$ -TCP) estable debajo de 1120 °C y por último  $\beta'$ -TCP que es estable a altas presiones[18]. Ninguno de esos compuestos se conoce que conformen los sistemas biológicos. Aun así, su relevancia en biomineralización es clara considerando el hecho de que  $\alpha$ -TCP es fácilmente hidrolizada a OCP y a la whitlockita mineral, la cual es encontrada en muchas mineralizaciones biológicas, tiene una estructura muy similar a la  $\beta$ -TCP[19]. Aunque existen referencias en la literatura[20] acerca de los fosfatos tricálcicos hidratados, no han sido claramente identificados como discretos compuestos cristalinos.

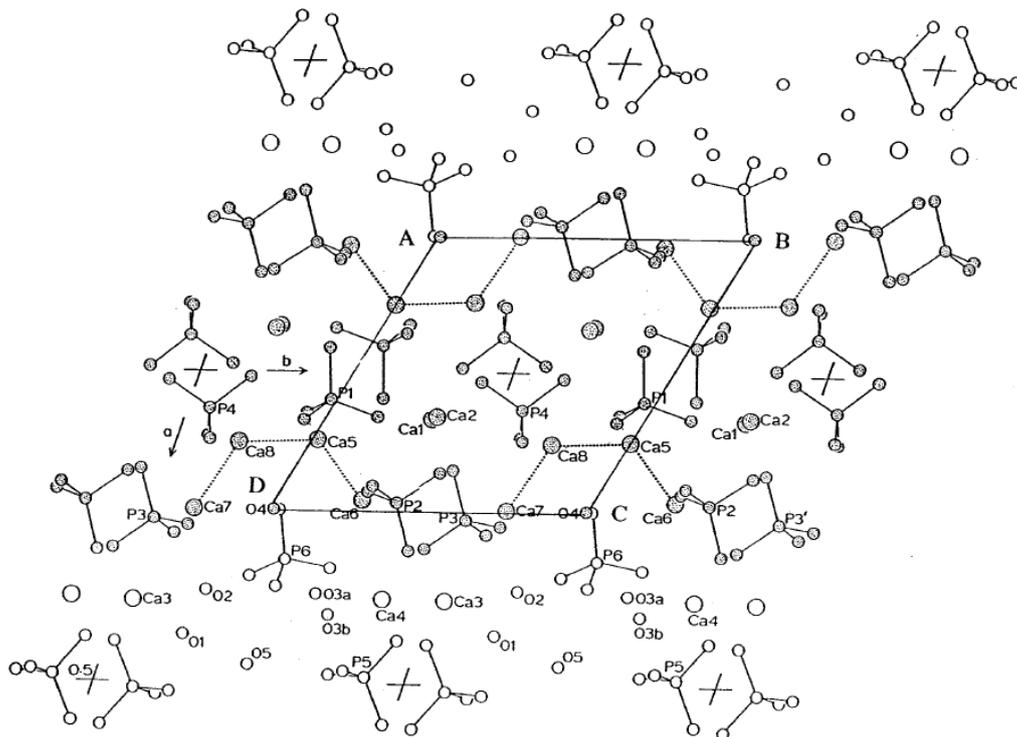


Figura 4-4. Otra vista de la celda unidad de OCP mostrando la capa apatítica como región central. También se muestra una celda unidad correspondiente a la celda hexagonal de HAP. La capa hidratada arriba y abajo representa el estado de transición.

## 4.10 FOSFATO CÁLCICO AMORFO

El fosfato cálcico amorfo (ACP) basado generalmente en la fórmula molecular  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2 \cdot n\text{H}_2\text{O}$  puede ser incluido también como una clase de fosfato tricálcico. Aunque no hay una evidencia concluyente de que ACP sea un componente mineral integral en los tejidos duros, éste juega un rol especial probablemente como una fase transitoria en la biomineralización. En solución, es fácilmente convertido a fases cristalinas más estables tales como OCP u otros productos de apatita. Basado en un análisis de distribución radial de perfiles de difracción de rayos-X ha sido propuesto que la unidad básica de ACP consiste de *clúster* semiesféricos de 9,5 Å de diámetro[21] a base de iones  $\text{Ca}_9(\text{PO}_4)_6$ . Las moléculas de agua ocupan los espacios entre *clúster* y de los agregados de éstos. Aun así estudios de EXAFS indican que el orden local ronda los 3.0 Å[22]. Análisis por espectrometría de Infrarrojo muestra una similar falta de orden cristalino[23]. Esta aparente carencia de orden cristalino es uno de los aspectos más destacados del ACP. Aún la constancia en composición del ACP sobre un amplio rango de condiciones sobre la solución sugiere la posibilidad de una unidad estructural bien definida[24].

#### 4.11 ESTRUCTURAS TIPO GLASERITA

Estructuras como  $\alpha$ - y  $\beta$ -TCP se han clasificado como de tipo glaserita por su semejanza con el mineral de glaserita descubierto antes,  $K_3Na(SO_4)_2$ .

$\alpha$ -TCP cristaliza en el grupo espacial monoclinico  $P2_1/a$  con  $a=12.887(2)\text{\AA}$ ,  $b=27.280(4)\text{\AA}$ ,  $c=15.219(2)\text{\AA}$ ,  $\beta=126.20(1)^\circ$ ,  $Z=24$ . Los iones  $Ca^{2+}$  y  $PO_4^{3-}$  son empaquetados en dos clases de columnas a lo largo del eje- $c$ , una conteniendo solo iones  $Ca^{2+}$  y la otra conteniendo ambos iones  $Ca^{2+}$  y  $PO_4^{3-}$  en proporción 1:2 (Figura 4-5). Todas las columnas están distorsionadas de la linealidad. El arreglo de esas columnas en forma pseudo-hexagonal es similar a la de la glaserita. Sin embargo, puesto que  $\alpha$ -TCP no posee una razón 2:1 catión-anión, su emulación a la estructura glaserita requiere vacancias de cationes con la fórmula  $Ca_3\Box(PO_4)_2$  donde  $\Box$ = vacancia. Todas las vacancias de cationes están en la columna de catión anión solamente con la secuencia  $\dots P - \Box - P - Ca \dots$ . Los detalles en la región circundante al ion  $Ca^{2+}$  en  $\alpha$ -TCP son muy diferentes a la de los cationes en glaserita como se espera, debido a los diferentes tamaños de iones en las dos estructuras y también por las vacancias.

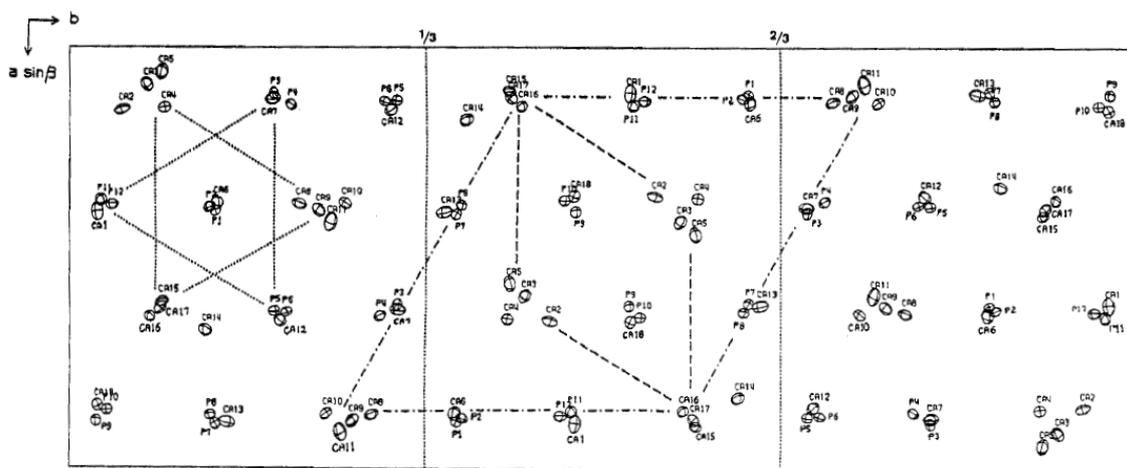


Figura 4-5. La figura muestra un esquema de  $\alpha$ - $Ca_3(PO_4)_2$  sobre el plano (001) para mostrar el arreglo columnar. Los átomos de oxígeno del grupo  $PO_4^{3-}$  se han omitido por claridad. La línea de guiones del centro contornea una celda correspondiente a glaserita, mientras que la línea guión-punto corresponde a la de HAp.

$\beta$ -TCP cristaliza en el espacio romboedro  $R3c$  con parámetros de celda unidad  $a=10.439(1)\text{\AA}$ ,  $c=37.375(6)\text{\AA}$ ,  $Z=21$  (conformación hexagonal). La estructura de  $\beta$ -TCP ha sido descrita como una versión distorsionada de la estructura de  $Ba_3(PO_4)_2$  la cual tiene columnas idénticas de  $PO_4$ -Ba-Ba- $PO_4$  en arreglo hexagonal. Sin embargo, debido a que los iones  $Ca^{2+}$  son demasiado pequeños para otorgar el empaquetamiento ideal de  $Ba_3(PO_4)_2$ , uno de cada ocho fórmula unidad está ausente y como resultado ocurren vacancias en los sitios de catión y anión. En  $\beta$ -TCP las columnas se dividen en dos tipos, ambas contienen cationes y aniones. La de tipo I retiene una similitud a la estructura  $Ba_3(PO_4)_2$ . La otra, de tipo II, tiene vacancias en ambos sitios, en los correspondientes a aniones y cationes. Cada columna del tipo II está rodeada por seis columnas del tipo I; cada columna del tipo I es a su vez rodeada por cuatro del tipo II y dos del tipo I. La principal diferencia entre las estructuras  $\alpha$ - y  $\beta$ -TCP es que no existen columnas catión-catión en las del tipo  $\beta$ .

#### 4.12 COMENTARIO

En este capítulo se han descrito las estructuras y características de las principales fases de fosfatos de calcio que usualmente están presentes en los depósitos calcáreos de la boca como también en los huesos y dientes. En lo concerniente al cálculo dental, estas fases pueden convivir unas con otras y en principio no habría un orden para su distribución como se observan usualmente en fotografías TEM (microscopía electrónica de transmisión) que exhiben una distribución heterogénea de los distintos tipos de granos cristalinos que se corresponden con las distintas estructuras. También existe entre estas fases una interconversión ya que como se ha descrito, las estructuras cristalinas no son muy diferentes y

presuponen un consumo relativamente bajo de energía para cambiar de fase, que pueden tomar del entorno químico o de otras fases colindantes. Esto ya es conocido por muchos ensayos en condiciones controladas y que simulan un medio parecido al oral, es decir, se prepara un medio acuoso parecido químicamente a la saliva donde hay fases de fosfatos de calcio coexistentes y se verifican cambios de fase. Esto podría ser parte de la historia pero en realidad el medio biológico aporta muchas otras condiciones y variables de las que no se tiene control.

### Referencias

- 1 M. I. Kay, R. A. Young, and A. S. Posner, "Crystal structure of hydroxyapatite", *Nature* **204**, 1050-1052 (1964).
- 2 J. C. Elliot, P. E. Mackie, and R. A. Young, "Monoclinic hydroxyapatite", *Science* **180**, 1055-1057 (1973).
- 3 K. Sudarsanan and R. A. Young, "Structural interactions of F, Cl and OH in apatites", *Acta Crystallogr.* **B34**, 1401-1407 (1978).
- 4 J. M. Hughes, M. Cameron, and K. D. Crowley, "Crystal structures of natural ternary apatites: Solid solution in the  $\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3\text{X}$  (X = F, OH, Cl) system", *Amer. Mineral.* **75**, 295-304 (1990).
- 5 J. C. Elliot, D. W. Holcomb, and R. A. Young, "Infrared determination of the degree of substitution of hydroxyl by carbonate ions in human dental enamel", *Calcif. Tissue Int.* **37**, 372-375 (1985).
- 6 M. Mathew, W. E. Brown, M. Austin, and T. Negas, "Lead álcali apatites without hexad anion: The crystal structure of  $\text{Pb}_2\text{K}_2(\text{PO}_4)_6$ ", *J. Solid State Chem.* **35**, 69-76 (1980).
- 7 L. W. Schroeder and M. Mathew, "Cation ordering in  $\text{Ca}_2\text{La}_2(\text{SiO}_4)_6\text{O}_2$ ", *J. Solid State Chem.* **26**, 383-387 (1978).
- 8 M. Mathew, I. Mayer, B. Dickens, and L. W. Schroeder, "Substitution in barium—fluoride apatite: The crystal structures of  $\text{Ba}_{10}(\text{PO}_4)_6\text{F}_2$ ,  $\text{Ba}_6\text{La}_2\text{Na}_2(\text{PO}_4)_6\text{F}_2$ , and  $\text{Ba}_4\text{Nd}_3\text{Na}_3(\text{PO}_4)_6\text{F}_2$ ", *J. Solid State Chem.* **28**, 79-95 (1979).
- 9 M. Mathew, W. E. Brown, L. W. Schroeder, and B. Dickens, "Crystal Structure of octacalcium bis(hydrogenphosphate) tetrakis(phosphate) pentahydrate,  $\text{Ca}_8(\text{HPO}_4)_2(\text{PO}_4)_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ", *J. Crystallogr. Spectrosc. Res.* **18**, 235-250 (1988).
- 10 J. P. Yesinowski and H. Eckert, "Hydrogen environments in calcium phosphates. 1H MAS NMR at high spinning speeds", *J. Amer. Chem. Soc.* **109**, 6274-6282 (1987).
- 11 B. O. Fowler, M. Markovic, and W. E. Brown, "Octacalcium phosphate. 3. Infrared and Raman vibrational spectra", *Chem. Mater.* **5**, 1417-1423 (1993).
- 12 W. E. Brown, J. R. Lehr, J. P. Smith, and A. W. Frazier, "Crystallographic and chemical relations between octacalcium phosphate and hydroxyapatite", *Nature* **196**, 1050-1055 (1962).
- 13 B. Dickens and L. W. Schroeder, "Investigation of epitaxy relationships between  $\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3\text{OH}$  and other calcium orthophosphates", *J. Res. Natl. Bur. Stand. (U.S.)* **85**, 347-362 (1980).
- 14 W. E. Brown, L. W. Schroeder, and J. S. Ferris, "Interlayering of crystalline octacalcium phosphate and hydroxyapatite", *J. Phys. Chem.* **83**, 1385-1388 (1979).
- 15 M. Iijima, H. Tohda, and Y. Moriwaki, "Growth and structure of lamellar mixed crystals of octacalcium phosphate and apatite in a model system of enamel formation", *J. Crystal Growth* **116**, 319-326 (1992).
- 16 W. E. Brown, M. Mathew, and M. S. Tung, "Crystal chemistry of octacalcium phosphate". *Prog. Crystal Growth Charact.* **4**, 59-87 (1981).
- 17 W. E. Brown, M. Mathew, and L. C. Chow, "Roles of octacalcium phosphate in surface chemistry of apatites, Adsorption on and surface chemistry of hydroxyapatite", D. N. Misra, ed., Plenum (1984).
- 18 P. Roux, D. Louer, and G. Bonel, "Chimie minerale—sur une nouvelle forme cristalline de phosphate tricalcique", *Compt. Rend. Acad. Sc. Paris* **286**, 549-551 (1978).
- 19 C. Calvo and R. Gopal, "The crystal structure of whitlockite from the Palermo Quarry", *Amer. Mineral.* **60**, 120-133 (1975).
- 20 R. Wallaeyns and G. Montel, "Structure et proprietes du phosphate tricalcique hydrate", *Bull. Soc. Chim. France*, 496-498 (1959).
- 21 F. Betts and A. S. Posner, "An x-ray radial distribution study of amorphous calcium phosphate", *Mater. Res. Bull.* **9**, 353-360 (1974).
- 22 E. D. Eanes, L. Powers, and J. L. Costa, "Extended X-ray absorption fine structure (EXAFS) studies on calcium in crystalline and amorphous solids of biological interest", *Cell Calcium* **2**, 251-262 (1981).

- 
- 23 J. D. Termine and D. R. Lundy, "Vibrational spectra of some phosphate salts amorphous to x-ray diffraction", *Calcif. Tiss. Res.* **15**, 55-70 (1974).
- 24 E. D. Eanes, "Amorphous calcium phosphate: Thermodynamic and Kinetic considerations, in *Calcium Phosphates in Biological and Industrial Systems*", Zahid Amjad, ed., Kluwer Academia Publishers (1998).

# Capítulo 5

## 5.1 SISTEMAS BIOLÓGICOS

Al estudiar los sistemas biológicos y tratar de obtener información de ellos mediante mediciones, debemos tener en cuenta la enorme complejidad en las formas que se relacionan las partes constituyentes de estos sistemas, entre variables internas propias y ellas con el entorno. Sabemos que los sistemas vivos están constituidos de una gran variedad y cantidad de participantes, desde los más simples como iones libres y pequeñas moléculas orgánicas; otros de complejidad media como enzimas y proteínas; y finalmente agentes más complejos como células, micro-organismos y bacterias. Entonces si intentamos alterar dichos sistemas para observar las consecuencias de nuestra acción externa muchas veces deberemos ser devotos de la aplicación de tratamientos estadísticos de decisión sobre los resultados obtenidos y limitarnos a decir que a menos de un cierto margen de error (dado por la estadística), nuestras conclusiones pueden ser correctas. Esto es ampliamente usado en el testeo de nuevas drogas en sistemas de *ensayo* como ratones, monos, etc. que poseen similitudes con los humanos.

El grado de interacción con estos sistemas puede ser fuerte o leve y de hecho que la cantidad de información que se pueda obtener no depende de la magnitud de esta interacción. En los sistemas vivos las interacciones se producen a órdenes de los eV, es decir a ordenes de energías propias de interacciones moleculares como Van Der Waals, dipolar, de puente- Hidrógeno y energías de enlace moleculares. Interacciones a este nivel son muy fuertes como en el caso de aplicaciones de drogas o medicamentos dado que se lleva a cabo por acción de molécula a molécula. Las perturbaciones con rayos-X o infrarrojo son más leves y pueden ser muy útiles para la identificación de moléculas o para estudiar su dinámica sin alterar sus propiedades químicas. Con este tipo de análisis no es usual planificar un tratamiento estadístico posterior a las mediciones en la mayoría de los casos.

### 5.1.1 Variabilidad en los sistemas biológicos

Los sistemas biológicos poseen un rango de complejidad bastante amplio para ser estudiados. Puede abarcar desde sistemas simples como micro-organismos unicelulares a sistemas multicelulares enormemente complejos como una planta, un insecto, etc. Aunque en realidad *complejidad* es un término muy relativo, dependiendo de la escala en que un estudio sobre un sistema propuesto sea planteado hacerse. Así, si se pretende entender los mecanismos de defensa y reproducción de un virus mortal, semejante empresa puede tardar décadas. Debido a un gran número de variables y partes que componen un sistema biológico muchas veces se debe hacer una elección de una estrategia estadística para encontrar tendencias en las variables o para descartar las menos importantes. También se puede realizar un estudio *in vitro* para aislar en una probeta los agentes principales del hecho en estudio y tener un mayor control sobre las variables en juego sin perder de vista que se debe llevar a cabo la experiencia en un ambiente con las condiciones más próximas posibles al ambiente biológico real.

Las magnitudes o características de los sistemas de este tipo pueden variar mensurablemente en diferentes puntos de una pequeña área de muestra aun si son medidas simultáneamente. Claramente, es de esperar que en cada punto también varíe en el tiempo dado que los sistemas vivientes están en continuo cambio debido a su metabolismo constante. Así mismo, es muy factible observar fluctuaciones, notorias en algunos casos, en las mediciones que hayan podido ser tomadas incluso en puntos contiguos, sujeto a mismas condiciones de entorno.

Una componente importante en la variabilidad de los sistemas biológicos es la variación individual. Es un factor de variación de una magnitud cuantitativa sobre una característica mensurable común a todos los individuos de un grupo. Esta variación se observa de individuo a individuo que aunque se desarrollen en un mismo entorno y bajo condiciones muy similares. Dado que ningún individuo es una réplica exacta de los demás componentes de una población, es de esperar que haya un amplio rango de valores de una magnitud medida en esa población. Así por ejemplo, un productor de zanahorias estaría interesado en que este rango de variación sea mínimo y con una gran mayoría que pasen el control de calidad. Mediante estudios estadísticos y agropecuarios (manipulación genética tiene muchas restricciones legales) el productor puede mejorar la calidad de su producción. Las variaciones individuales producen generalmente una distribución normal.

Variables	Variation among plants	Variation among lots within a plant	Coefficient of variation
	Total variation (%)		
Sweetness	87.01	12.99	15.73
Sour taste	84.00	16.00	6.96
Bitterness	99.92	0.08	12.50
Moisture	90.63	9.37	1.42
pH	87.74	12.26	2.35
Lightness	93.49	6.51	4.32
Chroma	82.65	17.35	8.25
Hue	97.54	2.46	6.38
Viscosity	90.82	9.18	23.19
Total soluble phenolics	86.88	13.12	26.19
Total carotenoids	89.54	10.46	19.02
6-MM	54.12	45.88	239.61
Total sugar	69.60	30.40	12.26
Total acid	99.82	0.18	18.51

Tabla 5-1. Se muestran la variación y los coeficientes de variación de las principales variables de importancia, primera columna, en la producción de zanahorias que son tenidas en cuentas como parámetros de calidad. En ese estudio[1], se tomaron tres plantas de procesamientos bien separados e independientes y de cada planta se extrajeron 53 muestras al azar. La variación individual está mostrada en la tercera columna, obsérvese cuán grande puede ser en algunos casos aun para un número alto de muestreo.

En esta sección se ha querido dar cuenta de los tipos de sistemas que se pretenden estudiar y de las limitaciones a la que estarán sometidas las inferencias como resultado de los estudios que sobre ellos se realicen. Estos conceptos generales vertidos aquí, serán puntualizados en el tema de esta tesis a medida que sea necesario en los capítulos siguientes y muchas veces serán recitados siendo necesario a favor del énfasis de una discusión o conclusión.

A continuación, en lo que resta del capítulo se presentará el tema de estudio por el lado biológico y mineralógico estableciendo los escenarios posibles por donde esta investigación pasará y además dando a conocer ciertos términos odontológicos y sus descripciones que deberán recordarse en el resto del manuscrito. También se citarán las teorías conocidas de formación de cálculo dental al momento de iniciarse esta Tesis.

## 5.2 FORMACIONES PÉTREAS EN EL ORGANISMO

Las formaciones pétreas que se producen en el organismo humano generalmente empiezan manifestándose en los órganos que tienen que ver con la digestión de alimentos. Estos órganos poseen ciertas propiedades químicas, un determinado valor pH de acidez y una concentración conveniente de ciertos iones libres. Además, el pasaje de fluido a través de ellos debe ser suficientemente lento para dar tiempo a la formación de cristales semillas si las condiciones químicas fueron más o menos estacionarias. Así por ejemplo, se observan formaciones pétreas en la boca, adheridas a las piezas dentarias, cálculos renales, y cálculos también en las vías respiratorias (garganta). Básicamente estas formaciones están hechas a base de Ca debido a la fácil disponibilidad de este ion en muchos alimentos y en el agua de consumo. Los sinónimos de formaciones pétreas empleados en la jerga médica son cálculos, depósitos, tártaros, piedras, sarro.

Si bien estas depósitos pétreos no son una enfermedad, sino que son el resultado de una conjunción de condiciones químicas, pueden en una primera instancia producir molestias o disminuir la calidad de vida eventualmente. Si estas condiciones persisten con el tiempo entonces sí pueden dar origen a enfermedades que en algunos casos pueden ser graves y hasta crónicas como la periodontitis que no tiene

cura actualmente. En lo que concierne a este trabajo, se desarrolla en los próximos párrafos la descripción y definiciones sobre cálculo dental humano.

### 5.3 CALCULO DENTAL

#### 5.3.1 Descripción

El cálculo dental es un depósito duro de color blanquecino que aparece adherido a la superficie de las piezas dentales de la boca. De consistencia frágil en los inicios de su formación y que va ganando más dureza y adhesión al transcurrir el tiempo. Está formado principalmente de una parte orgánica, bacterias y micro-organismos, lípidos y algunas proteínas; y de una parte inorgánica compuesta de varias clases de fosfatos de calcio. Dichos fosfatos pueden ser:

- DCPD, brusita o fosfato dicálcico dihidratado,  $\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ .
- OCP, fosfato octocálcico,  $\text{Ca}_8\text{H}_2(\text{PO}_4)_6 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ .
- WHT, whitlockita, si contiene magnesio se llama  $\beta$ -TCP,  $(\text{Ca},\text{Mg})_3(\text{PO}_4)_2$ .
- HAP o HAp, hidroxiapatita,  $(\text{Ca},\text{M})_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH},\text{X})_2$ , donde M puede ser  $\text{Sr}^{+2}$ ,  $\text{Pb}^{+2}$ ,  $\text{K}^{+2}$ ,  $\text{Na}^{+2}$ , etc. y X puede ser Cl o F y a menudo puede ser también  $\text{CO}_3$ .

### 5.4 TEORÍAS DE FORMACIÓN

Han pasado 42 años desde que Bambauer y Schroeder han publicado su renombrado trabajo[2] en donde por primera vez se publicaba una descripción y un estudio sobre la formación de cálculo dental. Parece increíble pero aun en la actualidad no hay una descripción detallada sobre los mecanismos de formación. Sin embargo, varias teorías pueden considerarse:

- Por precipitación de sales de calcio provenientes de la saliva para formar cálculo. Esto sería debido a la liberación de dióxido de carbono de la saliva.
- Por presencia y actividad bacteriana.
- Por un tipo de precipitación coloidal.
- Por actividad de la enzima de fosfatasa.

Estas teorías han tenido comprobación experimental pero sin terminar de cerrar todo en una explicación completa del proceso de formación. Hodge & Leung[3] demostraron mediante experiencias *in vitro* que la pérdida de dióxido de carbono produce un aumento del pH de la saliva lo que en consecuencia produce la precipitación de sales de Ca si la saliva esta supersaturada con respecto al ion  $\text{Ca}^{+2}$ .

La presencia y actividad bacteriana parece ser importante para crear los primeros depósitos de cálculo. La superficie de los dientes está cubierta de una enorme variedad de microorganismos. Entre una de las más importantes se encuentra la *Leptotricia Buccalis* que ha demostrado ser el único organismo, entre varios analizados[4], necesario para la precipitación de cálculo en un medio calcificado. Un estudio más detallado en este sentido, fue llevado a cabo por Naeslund[5] quien demostró que no sólo la *Leptotricia* es importante para la calcificación de depósitos dentales sino también otra bacteria, la *Actinomicia*. Usualmente la primera crea una capa sobre la colonia ya formada de la segunda. El autor postuló que la actividad de esas bacterias produce cambios bioquímicos que promueven la captación de precipitados de la saliva o fluido gingival por bacterias sobre la superficie de dientes. También demostró en un ensayo *in vitro* que con ausencia de esas bacterias no se registró formación de depósito alguno y presentó una discusión que pone en duda la importancia de pérdida de dióxido de carbono para la formación de cálculo dental. Sin embargo, en sus ensayos de formación de depósitos, los productos obtenidos carecían de las características de formación por capas que evidenciaban los cálculos dentales naturales.

En la precipitación coloidal se cree que sustancias coloidales en la saliva se tornarían viscosas y formarían una matriz para la precipitación de cálculo. Dichas sustancias se condensarían alrededor de

‘núcleos inanimados’ y luego sales inorgánicas de calcio y magnesio a ángulos rectos de esta superficie formando un perfil radiante. Después, partículas coloidales llenarían espacios entre esas sales formando así una apariencia laminar. Colyer & Sprawson[6] están en acuerdo con estas hipótesis y además establecieron que la alcalinidad de la saliva es esencial para la formación de cálculo y no debido a la pérdida de dióxido de carbono.

En la teoría de formación por acción de enzimas se sospecha que éstas y la fosfatasa son factores importantes en la hidrólisis de fosfatos orgánicos presentes en saliva, para producir fosfatos inorgánicos que podrían precipitar como sales de calcio. Se cree que estas enzimas se producen en el tejido oral a nivel de las encías pero los resultados son controversiales. En análisis de saliva se encontró que la fosfatasa está presente en saliva en ambos tipos de individuos, aquellos proclives a formar cálculo y en aquellos que tienen muy poca incidencia. Los niveles de fosfatasa hallados fueron similares en ambos tipos[7]. Interés en el rol de fosfatasa en la formación de cálculo dental probablemente fue estimulado por las investigaciones de Robison et al. quien la vinculó con la mineralización de tejido óseo[8]. El postulado que las enzimas de fosfatasa podrían hidrolizar esteres fosfóricos de la sangre para producir un incremento de iones de fosfato hasta que se produzca la precipitación de fosfatos de calcio. También esta teoría es muy cuestionada[9] aunque sí se reconoce que esta enzima es fundamental en la formación de matriz orgánica en huesos. La formación de fosfato estérico actúa como plantilla para una cristalización catalítica en huesos.

Ninguna de las teorías de formación de cálculo han provisto una explicación satisfactoria a las variaciones observadas en la formación de cálculo en humanos. Las teorías arriba delineadas no explican la presencia de cálculo en algunos individuos y la ausencia en otros. Se cree que tal vez se deba a un hecho sistémico o a un desbalance nutricional.

## 5.5 CLASIFICACIÓN DE TIPOS DE CÁLCULO DENTAL

Se clasifican en dos tipos de cálculo de acuerdo a su posición con respecto al diente. El cálculo supragingival es aquel que se observa sobre el margen gingival y el cálculo subgingival el que está por debajo de este margen. El margen gingival es la línea de contacto entre la superficie dentaria y la encía, entonces el cálculo supragingival es el que queda expuesto, visible; y el otro tipo de cálculo es el que queda por debajo de la encía pegado al diente. Esta clasificación es de origen clínico más que una significativa diferenciación de ambos tipos. Es posible en algunos casos que el cálculo subgingival se torne supragingival cuando la encía se retrae y al inverso, cálculo supragingival puede volverse subgingival a medida que se desarrolla una enfermedad periodontal, entonces creándose así un tipo combinado de cálculo dental.

### 5.5.1 Distribución en la Boca

Es bien sabido que una buena mayoría de cálculo supragingival está presente en las superficies linguales de los dientes anteriores posteriores y decrece el número de casos que pueden observarse a medida que aumenta la proximidad con el tercer molar. En la zona del maxilar, el cálculo supragingival frecuentemente aparece en los molares en contacto con la mejilla. Es decir, en ambos casos se observarán cálculo supragingival en aquellas piezas dentarias cercanas a los ductos salivales. Los ductos salivales son tubos que transportan saliva de las glándulas salivales, ubicadas en la boca y garganta, hacia la cavidad oral. La desembocadura de estos ductos se ubica en el piso de la boca y en la zona maxilar.

El cálculo subgingival también exhibe una especificidad en los sitios donde se desarrolla aunque es mucho menos aparente que su contraparte supragingival. Sin embargo este tipo de cálculo es más probable hallarlo en la zona lingual que en la zona facial o del lado de la mejilla. En la superficie lingual de las piezas dentarias, los primeros molares inferiores son los más proclives a poseer cálculo subgingival. En el lado de la mejilla o facial de las piezas dentarias, los dientes antero inferiores y molares inferiores también poseen una cierta tendencia a aparecer cálculo subgingival.

## 5.6 MÉTODOS DE ANÁLISIS EN MUESTRAS DE CÁLCULO DENTAL

Una buena variedad de métodos de análisis han sido usados para analizar distintos aspectos relacionados a la composición elemental, morfología, estructura cristalina etc. de los cálculos dentales. A

medida que se iban produciendo nuevos avances tecnológicos y avances en la física y/o química a partir de mediados del siglo pasado, nuevas y poderosas herramientas de análisis fueron aplicadas al estudio de este tema. En 1961 Söremark y Samsahl[10] por medio de activación de neutrones y por espectroscopía de rayos-gamma estudió los constituyentes inorgánicos en cálculo dental. El uso del microscopio electrónico de barrido para estudiar la morfología[11] en la superficie e interfaces de cálculo dental ya data de 1972, en ese trabajo se discutieron también las características de la superficie dentaria que favorecen a la aparición de depósitos pétreos. Por medio de difracción de rayos-X, en 1983, se estudiaron *in situ* algunos componentes cristalográficos del tártaro[12] irradiando en porciones seleccionadas obteniendo una noción de la distribución de algunas fases cristalográficas en cálculo dental. En 1983 Kunitila *et al.*[13] empleando el método de espectrometría de absorción atómica determinó los principales elementos constituyentes y también a nivel traza en cálculo dental humano y estudió las correlaciones en concentraciones de estos elementos y el posible rol de las trazas en el proceso de mineralización.

En los siguientes capítulos se desarrollarán todas las tareas, estrategias y experiencias realizadas por el autor de este trabajo para abordar el problema de la descripción del mecanismo de formación de los depósitos dentales. Allí, se aplicarán todas las herramientas de análisis posibles con el uso de haz de sincrotrón como FRX,  $\mu$ -FRX, TXRF y espectrometría de Infrarrojo como herramienta de análisis complementaria.

### Referencias

- 1 S.T. Talcott, L.R. Howard and C.H. Brenes, "Factors contributing to taste and quality of commercially processed strained carrots", *Food Research International* **34** (2001) 31-38.
- 2 Schroeder HE, Bambauer HU "Stages of calcium phosphate crystallization during calculus formation" *Archives of Oral Biology* (1966); **11**:1-14.
- 3 Hodge HC, Leung SW. "Calculus formation", *J Periodontol* (1950): **21**: 211-221.
- 4 Bulleid A. "A symposium on calculus: the bacteriological aspect", *Dent Pract* (1954): **4**: 224-227.
- 5 Naeslund CA. "A comparative study of the formation of concretions in the oral cavity and in the salivary glands and ducts", *Dent Cosmos* 1926: **68**: 1137-1144.
- 6 Colyer JE, Sprawson E. "Dental surgery and pathology", 6<sup>th</sup> edn. London, Longmans, Green and Co., (1931): chapter XX.
- 7 Helman EZ, Mitchell DF. "Phosphatase in human saliva: its relationship to calculus and lactobacillus counts", *J Dent Res* (1954): **33**: 335-338.
- 8 Robison R, Macleod M, Rosenheim AH. "The possible significance of hexosephosphoric esters in ossification", *Biochem J.* (1930): **24**:1927-1941.
- 9 Sobel AE, Burger M, Deane BC, Albaum HG, Cost K. "Calcification. XVIII. Lack of correlation between calcification in vitro and glycolytic enzymes", *Proc Soc Exp Biol Med* (1957): **96**: 32-39.
- 10 Söremark R and Samsahl K, "Analysis of Inorganic Constituents in Dental Calculus by means of Neutron Activation and Gamma ray spectrometry", *J. Dent. Res.* (1962) **41**(3): 596-602.
- 11 Jones S J, "Morphology of calculus formation on the human tooth surface", *Proc R Soc Med.* (1972) October; **65**(10): 903-905.
- 12 Kani T, Kani M, Moriwaki Y and Doi Y, "Microbeam x-ray diffraction Analysis of Dental Calculus", *J. Dent. Res.* (1983) **62**(2):92-95.
- 13 Knuutila, M.; Lappalainen, R.; Kontturi-Närhi, V. *Scand. J. Dent. Res.* (1980), **88**, 513

# Capítulo 6

## 6.1 DETERMINACIÓN DE COMPONENTES ELEMENTALES EN TÁRTARO POR SRFRX

En esta sección se presentan los resultados de los estudios de composición elemental de cálculos dentales humanos usando la técnica de fluorescencia de rayos-X con fuente de luz de Sincrotrón. Las características intrínsecas de la radiación de sincrotrón permiten determinar cuantitativamente concentraciones altas, medias y trazas para elementos por encima de fósforo. Con el propósito de estudiar aspectos de los mecanismos de cristalización de los fosfatos de calcio biológicos además de la determinación de concentración elemental, también se estudiará la correlación inter-elemental y las posibles causas asociadas. Así mismo, se determinarán los cocientes molares Ca/P para determinar el mayor componente cristalino en las muestras de cálculo colectadas y su grado de formación.

## 6.2 INTRODUCCIÓN

Un buen número de trabajos sobre cálculo dental (también conocido como “sarro” o “tártaro”) que estudiaron su composición mineral como su estructura fueron publicadas[1,2,3]. Enfocados desde varios puntos de vista (clínico, periodontológico, histoquímico y morfológico) este tópico ha sido el disparador de muchas investigaciones que estuvieron dirigidas a dar claves para el control de desarrollo de cálculo, prevención, remoción y el mejoramiento de la acción de dentífricos.

Recordemos, el cálculo dental se clasifica en dos tipos de acuerdo a su posición en la boca[4]. Cálculo supragingival es aquella formación de sarro sobre el margen gingival y cálculo subgingival es la que se forma debajo de este margen. En la realidad, es a menudo difícil hacer esta discriminación precisa debido a que el margen gingival no es fijo sino que depende del grado de inflamación de la encía y sucede que el cálculo dental es una combinación de ambos tipos. Una muestra de cálculo presenta una fase inorgánica o mineral y otra fase que es orgánica. Análisis espectroquímicos han revelado la presencia de varios minerales en los tártaros, los más abundante son calcio, fósforo y magnesio; en menor medida se encuentran sodio, potasio y plomo. También es posible hallar, como ha sido reportado[5,6], cantidades trazas de metales como hierro, cobre, silicio, bario, estroncio, níquel, zinc, manganeso, cobalto y oro.

La estructura cristalina promedio de las fases de fosfato cálcico de los cálculos dentales pasa por varios estadios durante su formación y maduración en la boca. En depósitos maduros (más de seis meses), la forma cristalina más abundante es la hidroxiapatita ( $\text{Ca}_{10}[\text{PO}_4]_6\cdot\text{H}_2\text{O}$ ), con menores cantidades de fosfatos octocálcicos ( $\text{Ca}_8[\text{HPO}_4]_4$ ), whitlockita (usualmente llamado fosfato tricálcico  $\text{Ca}_3[\text{PO}_4]_2$ ), y brucita ( $\text{Ca}[\text{HPO}_4]\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ). En depósitos jóvenes (de 1-3 meses), aproximadamente la mitad de las fases corresponden a brucita. Un estudio longitudinal de crecimiento de cálculo mostró que brucita (B) aparece en los primeras etapas de formación, luego prepondera la fase correspondiente a fosfatos octocálcicos (OCP) para luego dar paso a las fases de fosfato tricálcico (TCP) e hidroxiapatita (HAp) en un estadio ulterior de maduración[7]. En cuanto al aspecto morfológico, esto fue determinado por estudios con microscopía electrónica[8].

Hidroxiapatita tiene una considerable flexibilidad estructural, lo cual promueve un dinámico proceso de intercambio de iones con el medio circundante, en este caso la saliva y demás fluidos orales. Los sitios ocupados por el calcio pueden ser ocupados por varios cationes divalentes (y trivalentes), el grupo fosfato puede ser reemplazado por vanadatos, cromatos, ferratos, arsenatos, silicatos etc., y el grupo fluoruro por cualquier haluro y otros aniones [9,10]. Como un caso particular, iones de zinc pueden reemplazar al calcio. Este hecho parece tener un rol de importancia durante la formación de cálculo[11].

Varios métodos fueron empleados para realizar esas determinaciones, tales como técnicas radioquímicas[1], espectrometría de absorción atómica[12] y análisis por difracción de rayos-X[13] con razonable acuerdo entre ellas y todas requieren un pre-tratamiento de las muestras como también cantidades grandes[1] de estas si se quieren detectar elementos trazas y por ello generalmente se colectan varias muestras de un mismo individuo y se mezclan para formar una. En este estudio las mediciones fueron realizadas en cada muestra individualmente.

Es bien sabido que el uso de radiación de sincrotrón en el análisis de trazas por fluorescencia de rayos-X permite una reducción de los límites de detección y el mejoramiento de la sensibilidad elemental[14,15]. Las características intrínsecas de la radiación de sincrotrón (alta intensidad, polarización, colimación natural, etc.)

y la construcción de fuentes dedicadas a la producción de esta radiación hace posible el mejoramiento sustancial de los límites de detección para elementos trazas en varios órdenes de magnitud comparados con las técnicas convencionales[16]. Una de las utilidades más preciadas del uso de radiación de sincrotrón es la posibilidad de analizar cantidades muy pequeñas de muestras con razonable tasa de conteo usando estas propiedades de la radiación de este tipo de fuentes de rayos-X. En tales muestras es muy difícil realizar análisis con técnicas convencionales debido a los imprácticos tiempos de mediciones necesarios.

La fluorescencia de rayos-X por radiación de sincrotrón (SRXRF) ha sido usada en muy diversas áreas de la ciencia y la tecnología con especial aplicación en el análisis de muestras biológicas o materiales relacionados. El estudio por SRXRF en tejidos dentales mineralizados ya ha sido publicado en varios trabajos[17,18,19] muchos de los cuales usaron técnicas de mapeo. Desconcertantemente, la cantidad de publicaciones sobre cálculos dentales u otros tipos de formaciones pétreas en el cuerpo son de mucha menor proporción en comparación con aquellas y son las principales causantes de afecciones periodontales o renales.

El propósito principal del estudio de esta sección es determinar las composiciones elementales de los cálculos dentales usando radiación de sincrotrón y analizando los espectros de fluorescencia para determinar la composición cristalina media de los cálculos supragingival y subgingival por medio de la razón molar Ca/P y finalmente comparar entre ambas éstas y otras características obtenidas como la capacidad de intercambio iónico en ambos tipos de muestras. La razón molar es el cociente de concentraciones de dos elementos expresados en sus equivalentes molares respectivamente.

### 6.3 PARTE EXPERIMENTAL

*Recolección de Muestras.* Especímenes de cálculo dental humano fueron extraídos de 17 pacientes adultos afectados de enfermedades periodontales quienes requirieron tratamiento odontológico. Todas las muestras de cálculo tuvieron más de 6 meses de formación. Las muestras fueron extraídas de la siguiente manera: los especímenes supragingivales fueron colectados de los dientes antero-inferiores (incisores y caninos), en la zona lindante al piso de la lengua; y los subgingivales fueron tomados de los molares superiores de la superficie mesial. Las muestras colectadas por lo general no excedieron el miligramo.

Tabla 6-1. Composición de los estándares usados para ajustar la curva de calibración.

Muestra	% Concentración Elemento	% Matriz Oscura
Apatita	P, 18	H, 0.2
	Ca, 39.9	O, 41.4
Standard 194 A-SO2	Al, 9	
	Si, 25	
	P, 0.3	
	K, 3.08	
	Ca, 0.69	
	Ti, 0.55	
	Mn, 0.09	
	Fe, 3.73	
Cu <sub>2</sub> O	Cu, 89	O, 11
Zinc	100	

*Preparación de Muestras.* Las diecisiete pares de muestras de cálculo (supragingival y subgingival) fueron extraídas y luego correspondientemente rotuladas y almacenadas herméticamente en contenedores de baja humedad. Las muestras tomadas presentaban una forma irregular y de consistencia pétreas por lo que para llevar a cabo el análisis solo fue necesario reducir las a muy pequeños granos en un mortero de cerámico. Luego el polvo obtenido así fue depositado a presión sobre una superficie adherente circular hecha con dos cintas adhesivas comerciales en la cual sobre una se ha practicado un agujero de 0,5 cm. de diámetro y luego se pegaron entre sí. Este proceso de preparación se realizó rutinariamente con todas las muestras y entre cada etapa todos los elementos usados fueron convenientemente limpiados con alcohol y ultrasonido. Las masas depositadas fueron determinadas por diferencias en peso de las cintas con y sin muestras adheridas a ellas.

Mismo procedimiento fueron realizados sobre los estándares seleccionados, los detalles de los mismos provistos por el fabricante se muestran en la Tabla 6-1.

*Mediciones.* Los experimentos fueron llevados a cabo en la estación de alto vacío de la línea FRX del Laboratorio Nacional de Luz Sincrotrón (LNLS, Campinas, Brasil)[20]. La energía de los electrones que giran dentro del anillo fue de 1.37 GeV con campo dipolar magnético de 1.65 T, lo cual produce una energía crítica de radiación de 2.08 keV.

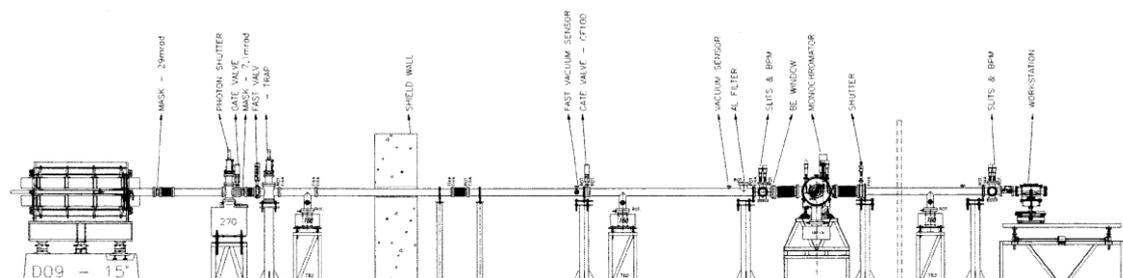


Figura 6-1. Vista esquemática de la línea D09 – XRF en el sincrotrón LNLS, Brasil, Campinas.

La radiación de la fuente de sincrotrón para la línea XRF es la proveniente del magneto D09B(15°) del anillo de almacenamiento. Las componentes de la línea incluyen ventanas de berilio de 125  $\mu\text{m}$  para aislar el vacío de la línea del haz con el vacío del anillo y también de la atmósfera, un monocromador de cristal channel-cut y rendijas controladas por motores a paso para limitar el ancho de haz. La figura 6-1 muestra la línea de haz y sus principales componentes.

El sistema de detección está compuesto por dos detectores, uno de Si(Li) y el otro HPGe. Ambos están a 90° con respecto al haz incidente y uno de ellos (HPGe) está optimizado para la detección de bajo Z (sin ventana).

Todas las mediciones fueron hechas en geometría convencional (45° + 45°), excitando con haz blanco y durante 200 segundos de tiempo vivo por cada muestra, la atmósfera circundante fue aire y el detector de estado sólido utilizado fue Si(Li).

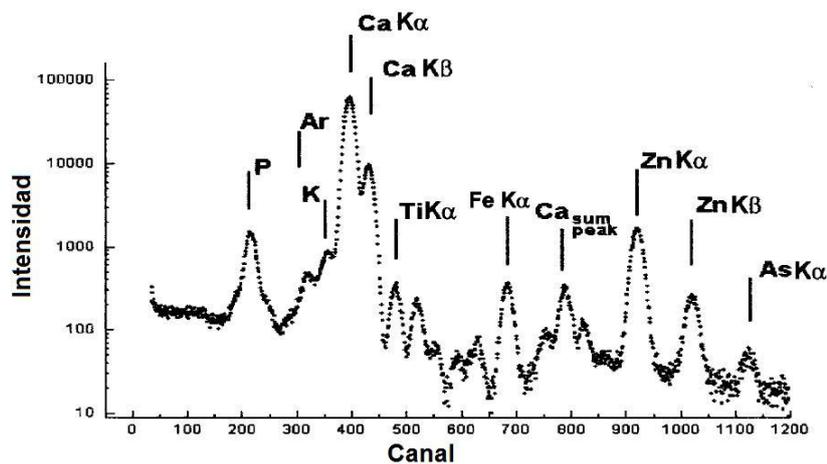


Figura 6-2. Espectro fluorescente típico para una muestra de cálculo supragingival.

## 6.4 ANÁLISIS DE DATOS

La Figura 6-2 muestra un espectro típico de fluorescencia en cálculo supragingival. Todos los espectros fueron analizados usando el paquete de programas AXIL[21] considerando un fondo con un modelo polinomial de grado 9, picos escapes y correcciones en la forma de algunos picos.

Las intensidades fluorescentes de las muestras estándares fueron usadas para obtener la curva de calibración en el rango de los elementos de interés (Figura 6-3). El método de sensibilidades elementales[21,22] que viene en uno de los paquetes de software de AXIL, fue usado para calcular las composiciones elementales.

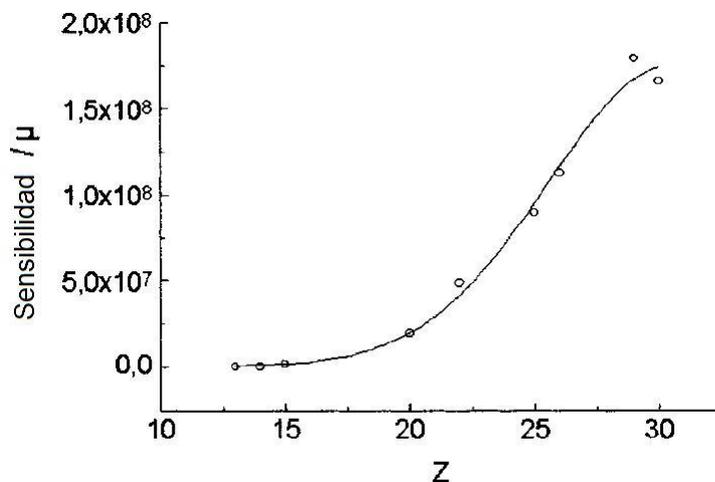


Figura 6-3. Curva de sensibilidades para el arreglo experimental dispuesto. Los puntos corresponden a las sensibilidades obtenidas para los estándares y la línea sólida al ajuste de dichos puntos.

## 6.5 CONCENTRACIONES ELEMENTALES – CORRELATIVIDAD ELEMENTAL

Los valores promedios de las concentraciones elementales medidas están presentados en la Tabla 6-2. Esos valores se encuentran en buen acuerdo con los reportados por otros métodos tales como análisis radioquímico, absorción atómica y difracción de rayos-X[1,12,13]. Las mayores concentraciones elementales corresponden a Ca y P como se esperaba. Las desviaciones en los valores promedios resultaron aceptables en tártaro supragingival pero un poco más grande en cálculo subgingival. Otros elementos tales como Si, S, Cl y K mostraron desviaciones de aproximadamente el 15%. Por otro lado en los elementos trazas tales como Ti, Mn, Zn y Fe las gaussianas estadísticas fueron más anchas. Esto indicaría que esos elementos no solo dependen del medio oral sino también de agentes externos y están sujetos a más variaciones. En el caso de Mn, se ha sugerido que sus concentraciones pueden depender de la concentración local de este metal en el agua corriente[12] lo cual explicaría la alta desviación observada, 88%[1].

Tabla 6-2. Concentraciones elementales promedios medidas para las muestras de cálculo subgingival y supragingival analizadas.

Elemento	Calc. Supragingival	Calc. Subgingival	Tendencia
Si [%]	5 ± 1	5.9 ± 0.1	64.7
P [%]	22 ± 3	24 ± 5	24.0
S [%]	0.43 ± 0.08	0.62 ± 0.09	82.3
Cl [%]	0.24 ± 0.03	0.40 ± 0.06	82.3
K [%]	0.85 ± 0.09	1.0 ± 0.2	70.6
Ca [%]	37 ± 5	44 ± 11	64.7
Ti [ppm]	230 ± 100	360 ± 160	52.9
Mn [ppm]	60 ± 20	90 ± 80	41.1
Fe [ppm]	20 ± 3	50 ± 30	82.3
Co [ppm]	20 ± 5	25 ± 3	52.9
Cu [ppm]	7 ± 2	12 ± 4	82.4
Zn [ppm]	55 ± 58	280 ± 230	82.3

La última entrada en la Tabla 6-2 llamada tendencia, representa el porcentaje de casos en el cual la concentración de un particular elemento en cálculo subgingival fue más grande que el correspondiente en cálculo supragingival (del mismo paciente) analizados en los 17 pares de muestras. Este hecho puede ayudar a caracterizar cada clase de cálculo de acuerdo a la cantidad de un dado elemento.

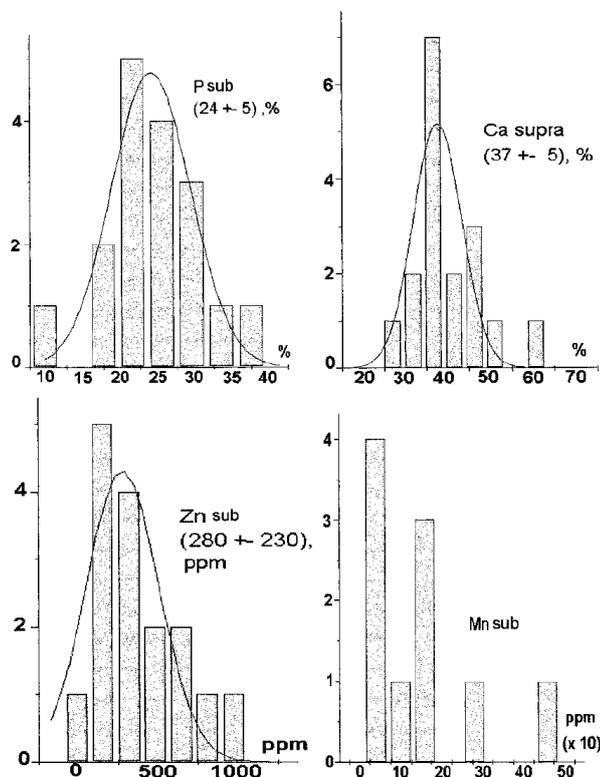


Figura 6-4. Histograma de concentraciones para algunos elementos estudiados. La ordenada corresponde a la frecuencia estadística. Se observa que Mn no tendría una distribución gaussiana.

Por inspección en la Tabla 6-2, todos los elementos analizados tienen concentraciones más altas en cálculo subgingival, lo cual está en acuerdo con el hecho de que el fluido gingival intersticial es más rico en esos elementos que en la saliva. Como se mencionó antes, Mn exhibe una excepción a esta tendencia[1]. Como ejemplo, en la Figura 6-4 se muestran histogramas de concentraciones para algunos elementos. A diferencia de Mn, el cual muestra valores más dispersos, el resto de los elementos presentan distribuciones tipo gaussianas. Como se indicó anteriormente, la fase inorgánica o mineral de tártaro usualmente consiste de diferentes fosfatos de calcio. Entonces, la razón molar Ca/P puede ser usado para estimar la estructura cristalina más preponderante por comparación de estos valores con los que se obtienen de una computación estequiométrica. En la Tabla 6-3 se presentan esas comparaciones y como puede observarse los cocientes molares corresponden en promedio a la estructura de fosfato tricálcico, lo cual está en acuerdo con el hecho de que los cálculos analizados correspondieron a muestras de más de 6 meses de maduración. Esos cristales e hidroxiapatita son las fases más abundantes en tártaros viejos[23].

Los cristales de hidroxiapatita pueden hospedar una gran variedad de sustituyentes iónicos, tantos cationes como aniones, por ejemplo  $F^-$  y  $Cl^-$  pueden reemplazar iones  $OH^-$ . En un modelo simple de incorporación de iones a la hidroxiapatita, se esperaría una correspondencia lineal de la concentración elemental de éstos. Las diferentes pendientes de estas rectas darían una idea de las diferentes probabilidades de que un sitio vacante sea ocupado por uno u otro ion. Muchas de estas correlaciones fueron encontradas, véase las Figura 6-5 a-e y los valores calculados se presentan en la Tabla 6-4. Esta tabla muestra las correlaciones entre Ca y Fe y entre Co y Ni las cuales aparecen debido a que en la hidroxiapatita, los sitios de Ca pueden ser reemplazados por otros cationes divalentes[24,25] tales como  $Fe^{2+}$ ,  $Co^{2+}$ ,  $Ni^{2+}$ ,  $Mg^{2+}$ , etc. y en algunos casos también por iones trivalentes. Además de esta correlación con el calcio, también fueron observadas otras como por ejemplo entre K-S, Cl-S (ver Figura 6-5e), Zn-Cu, etc. Experimentos previos

levados a cabo por otros autores usando microsonda con radiación de sincrotrón también mostró una correlación entre Zn y Cu[26].

Tabla 6-3. Cocientes Molares Ca/P para fosfatos cálcicos puros y valores promedios para cálculo supragingival, subgingival.

Supragingival	Subgingival	Fosfatos Cálcidos Puros			
		DCP	OCP	$\beta$ -TCP	HAp
$1.41 \pm 0.07$	$1.41 \pm 0.09$	1.00	1.33	1.50	1.70 - 2.30

Ingram *et al.*[27] reportaron que zinc tendería a sustituir átomos de calcio en algunos fosfatos de cálcico, este resultado fue obtenido en ensayos in vitro usando hidroxiapatita sintética. En acuerdo a los resultados obtenidos en esta etapa se puede inferir que en condiciones reales, Zn parece no mediar en la concentración de Ca sino hasta que el zinc tenga una concentración superior a 200 ppm (ver figura 6-5d). Más allá de ese valor, la pendiente muestra una leve correlación negativa entre Ca y Zn. Posiblemente un cambio en el pH en la saliva promociona el intercambio iónico entre esos dos elementos facilitando la locación de átomos de Zn dentro de la red cristalina[28].

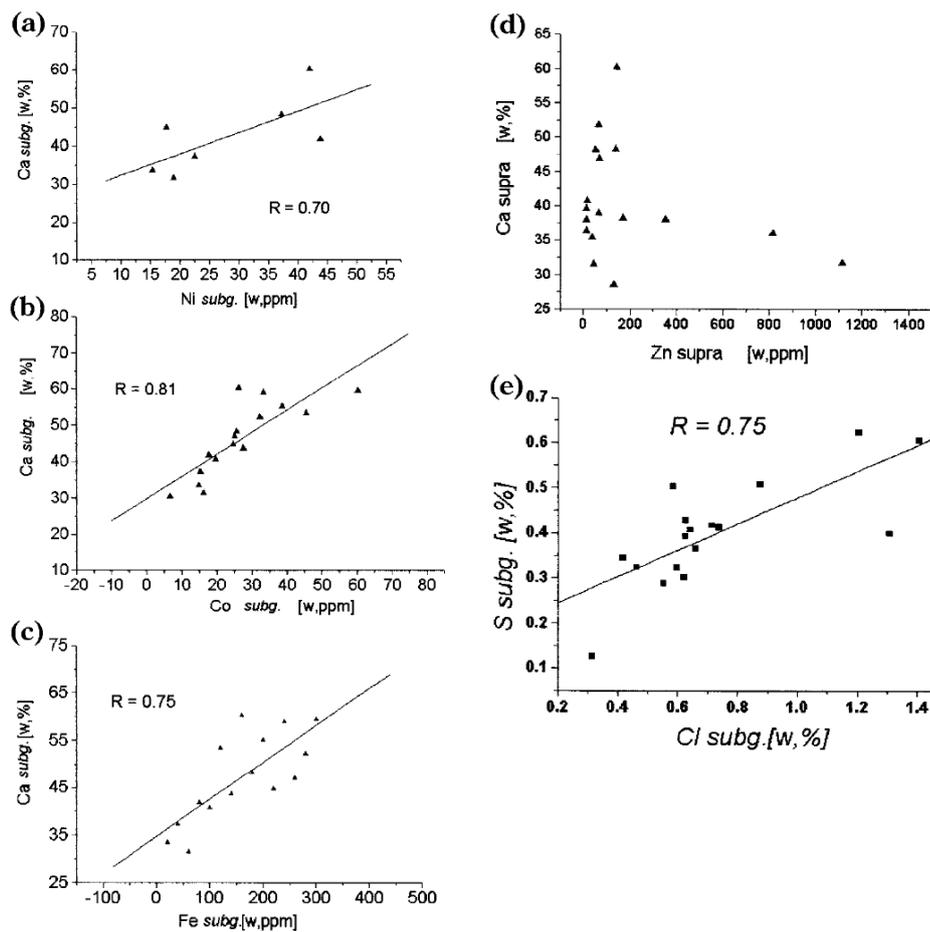


Figura 6-5. Rectas de correlación lineal para los elementos apareados que se muestran en la figura, R es el coeficiente de regresión lineal del ajuste.

Al presente, se asume que el zinc es absorbido en la superficie de los fosfatos cálcicos en especial por las fases amorfas e inhibiría un ulterior desarrollo o maduración de esta fase afectando su proceso de aumento de cristalinidad o incluso revirtiéndola[29].

Tabla 6-4. Coeficientes de correlación para pares de elementos en cálculo Supra y Subgingival.

Elementos							
	Ca, Co	Ca, P	Zn, Cu	Ca, Fe	Cl, S	Cl, P	Ca, Ni
<b>supragingival</b>	0.80	0.88	0.46	0.32	0.73	-0.17	0.73
<b>subgingival</b>	0.80	0.80	0.71	0.75	0.75	-0.23	0.70
	Ca, Zn	K, S	Zn, Ti	P, S	Fe, Zn	Ca, K	
<b>supragingival</b>	-0.29	0.62	0.49	-0.13	0.61	0.84	
<b>subgingival</b>	-0.06	0.56	0.30	-0.52	0.19	0.67	

## 6.6 NOTAS FINALES DEL CAPÍTULO

Después de un procedimiento simple de preparación de muestras, una cantidad de especímenes de cálculos dentales fueron estudiados por fluorescencia de rayos-X usando radiación de sincrotrón. Cada muestra fue estudiada independientemente según el tipo de cálculo (supra- y subgingival) y la correlación entre ambos en cuanto a las concentraciones elementales analizadas. Las propiedades de la radiación de sincrotrón (brillantez, alta intensidad y polarización) tuvieron un rol importante debido a las cantidades muy pequeñas en masa de las muestras estudiadas. El uso de una fuente convencional de rayos-X sería impráctico debido a que demandarían inaceptables tiempos de medición.

Las diferencias de composición en tártaro supragingival y subgingival fueron analizadas. La participación de la saliva y del fluido gingival en la formación del cálculo también fue tenido en cuenta mostrando la importancia de estos medios como fuente de iones que difunden a través de los fosfatos de calcio. Por primera vez se ha realizado un análisis de composición discriminando el tipo de cálculo (sub y supra) proveniente de pacientes individuales.

La relevancia de los resultados obtenidos en este trabajo demuestra que SRXRF puede ser usado para establecer como programa sistemático para estudiar la composición cristalina y su dinámica de cambio en un estudio temporal. Además, una investigación fina de las fases de fosfatos cálcicos, su composición y estructura pueden contribuir a la determinación de la influencia real de ciertos elementos en el proceso de mineralización del cálculo[13,27] y si una concentración anormal de éstos pueden relacionarse con anomalías biológicas y/o en el cuerpo mismo. La plausibilidad de todos estos planteamientos serán abordados en los siguientes capítulos.

### Referencias

- 1 Lundberg, M.; Söremark, R.; Thilander, H. J., *Periodontal Res.* (1966) **1**, 245.
- 2 Baumhammers, A.; Rohrbaugh, E. A., *J. Periodontol.* (1970) **41**, 39.
- 3 Theilade, J., *Arch. Oral Biol.* (1964) **9**, 97.
- 4 Hazen, S. P., *Periodontology 2000* (1995), **8**, 125.
- 5 Mighailov, M. G., *Dent. Abstr.* 1958, **3**, 181.
- 6 Tonagai, K.; Yoshioka, S., *J. Dent. Res.* (1957) **36**, 653.
- 7 Schroeder, H. E., *Formation and Inhibition of Dental Calculus*; Verlag Hans Huber: Bern, 1969.
- 8 Lustmann, J.; Lewin-Epstein, J.; Shteyer, A., *Calcif. Tissue Res.* (1976) **21**, 47.
- 9 De Boer, B. G.; Sakthivel, A.; Cagle, J. R.; Young, R. A., *Acta Crystallogr.* (1991) **B47**, 683.
- 10 Montel, G., *Colloq. Int. CNRS* (1975) **230**, 13.

- 11 LeGeros, R. Z., *Am. J. Dent.* (1999) **12**, 65.
- 12 Knuuttila, M.; Lappalainen, R.; Kontturi-Närhi, V., *Scand. J. Dent. Res.* (1979) **87**, 192.
- 13 Knuuttila, M.; Lappalainen, R.; Kontturi-Närhi, V., *Scand. J. Dent. Res.* (1980) **88**, 513.
- 14 Synchrotron Radiation Research; Winick, H., Doniach, S., Eds.; Plenum: New York, 1980.
- 15 Gordon, B. M.; Jones, K. W. *Nucl. Instrum. Methods* (1985) **B10**, 293.
- 16 Iida, A.; Sakurai, K.; Matsushita, T.; Gohshi, Y., *Nucl. Instrum. Methods* (1985) **228**, 556.
- 17 Sánchez, H. J.; Burattini, E.; Riveros, A.; Rubio, M.; Barraco, G.; Balesio, P. L.; Dolci, G., *Physica Medica* (1993) **9**, 267.
- 18 Sánchez, H. J.; Pérez, C. A.; Grenón, M., *Nucl. Instrum. Methods* (2000) **B170**, 211.
- 19 Carvalho, M. L.; Cassaca, C.; Marques, J. P.; Pinheiro, T.; Cunha, A. S., *X-ray Spectrom.* (2001) **30**, 190.
- 20 Rodrigues, A. R. D.; Farias, R. H. A.; Ferreira, M. J.; Franco, G. S.; Janhnel, L. C.; Lin, L.; Lira, A. C.; Neuneschwander, R. T.; Pardine, C.; Rafael, F.; Rosa, A.; Scorzato, C.; Gonçialves da Silva, C. E. T.; Romeu da Silva, A.; Tavares, P. F.; Wisnivesky, D.; Craievich A., Proceedings of the Particle Accelerator Conference - PAC97, Vancouver, 1997.
- 21 Van Espen, P.; Nullens, H.; Adams F., *Nucl. Instrum. Methods* (1977) **142**, 243.
- 22 Handbook of X-ray Spectrometry; Van Grieken, R., Markoicz, A., Eds.; Marcel Dekker: New York, 1993.
- 23 Le Geros R. Z., *Prog. Crystal Growth Charact.* (1981) **4**, 1.
- 24 Le Geros, R. Z.; Taheri, M.; Quirologico, G.; Le Geros J., *Proc. 2nd Int. Phosphorus*, Boston, IMPHOS, Paris, 1989; pp 89-103.
- 25 Baravelli, S.; Bigi, A.; Foresti, E.; Ripamonti, A.; Roveri, N., *J. Inorg. Biochem.* (1984) **1**, 20.
- 26 Pérez, C.; Sánchez, H. J.; Grenón, M.; Barrea, R. "Elemental Distribution in Human Dental Calculus by Using SR-FRX Microprobe"; *Activity Report 99*; Laboratorio Nacional de Luz Síncrotron: Campinas, Brazil, (1999) ISSN 1518-0204.
- 27 Ingram, G. S.; Horay, C. P.; Stead W. J., *Caries Res.* (1992) **26**, 248.
- 28 Davey, H. P.; Embery, G.; Cummins D., *Caries Res.* (1997) **31**, 434.
- 29 Bigi, A.; Foresti, E.; Gandolfi, M.; Gazzano, M.; Roveri, N., *J. Inorg. Biochem.* (1995) **58**, 49.

# Capítulo 7

## 7.1 ESTUDIO DE UN CASO DE COMPOSICIÓN ESTRUCTURAL Y ELEMENTAL DE CÁLCULO DENTAL DURANTE LAS VARIAS ETAPAS DE MADURACIÓN USANDO SRXRF

En esta sección se presenta un estudio de composición elemental y la determinación de la estructura cristalina preponderante en los cálculos dentales humanos durante su maduración en la boca por el período de un año. La técnica de fluorescencia de rayos-X por fuente de radiación de sincrotrón con haz blanco fue usada como método de análisis. El conjunto de muestras fueron extraídas de diferentes piezas dentales de un mismo paciente quien no requirió ningún otro tipo de cuidado dental. Por medio del análisis de la razón molar Ca/P se realizó una estimación de la principal estructura cristalina por simple comparación con los valores estequiométricos de los fosfatos cálcicos que componen el tártaro. Los resultados mostraron una lenta transformación progresiva de la estructura cristalina inicial (brusita) hacia una estructura más estable (hidroxiapatita) pasando primero por fosfato octocálcico y whitlockita. La concentración de los componentes mayoritarios (Ca y P) en función del tiempo siguió una curva sigmoidal. La correlación entre las concentraciones de elementos trazas versus el tiempo exhibieron muy poca o nula dependencia de lo que se infiere que estos tienen muy poca influencia en la cinética de la cristalización.

## 7.2 INTRODUCCIÓN

En el capítulo anterior se había enfocado en la determinación de las concentraciones elementales aprovechando las ventajas de usar luz sincrotrón y también se estimó el fosfato cálcico preponderante en los cálculos supragingival y subgingival. Se ha podido establecer las inter-correlaciones existentes entre varios elementos debido a un proceso de sustitución y/o incorporación de iones presentes en saliva que son integrados a la red cristalina de estas fases. Otro aspecto importante es poder estudiar de qué forma los fosfatos cálcicos biológicos van atravesando por las distintas fases, empezando por fases amorfas de fosfatos hasta llegar a la fase más estable que es la hidroxiapatita. Para ello, recordemos algunas teorías de formación de los cálculos dentales.

La aparición y formación de cálculos dentales como de otros tipos de formaciones pétreas en el cuerpo humano no son bien comprendidas en la actualidad. Existen varias teorías y entre ellas la más promulgada[1] es la que considera una precipitación de sales de calcio de la saliva supersaturada como resultado de un incremento de pH causado por la pérdida de dióxido de carbono. La teoría por precipitación coloidal[2] asume que sustancias coloidales en la saliva aumentan su viscosidad y forman matrices para la precipitación de fosfatos. Aparentemente, también la presencia de bacterias desempeña un importante rol a través de acciones químicas e enzimáticas[3]. También intervienen factores externos como la dieta, el ambiente y hábitos de higiene los cuales varían de un individuo a otro en la aparición del cálculo. Seguramente una combinación de todos estos aspectos mencionados, media en la formación de tártaros. Además, una dependencia individual existiría debido a que dos sujetos con similar estado de salud, en el mismo ambiente, misma dieta etc. pueden tener muy diferentes tendencias a formar cálculos. Debido a que los mecanismos de formación no son claramente conocidos, de igual manera, los cambios estructurales en las fases de fosfatos cálcicos durante la maduración de cálculo tampoco lo son. Una comprensión de esos cambios de fase y de la acción de los agentes participantes contribuiría a esclarecer los procesos de mineralización biológica y como un plus la inhibición de crecimiento de cálculo.

Recordemos que las principales fases de fosfatos de calcio[4] en los tártaros son la hidroxiapatita  $[\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2]$ , brusita  $(\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O})$ , whitlockita o fosfato tricálcico  $[(\text{Ca},\text{Mg})_3(\text{PO}_4)_2]$  y fosfato octocálcico  $[\text{Ca}_8\text{H}_2(\text{PO}_4)_6 \cdot 5\text{H}_2\text{O}]$ . Desde un punto de vista termodinámico, en un sistema donde varias fases coexisten, como en el caso de los cálculos dentales, presentan problemas en conjunto complicados para resolver en física. Además esas fases cristalinas interaccionan con el medio líquido (saliva y fluido gingival) mediante el continuo intercambio de iones. La hidroxiapatita (HAp) permite la sustitución de muchos iones ( $\text{K}^+$ ,  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{F}^-$ ,  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{CO}_3^{2-}$ ,  $\text{HPO}_4^{2-}$ , etc.) los cuales introducen cambios en las dimensiones de la celda unidad. Más aun, HAp también puede absorber varios compuestos orgánicos como las proteínas salivares[5]. El ritmo y la cinética del proceso global también dependerán de la

temperatura y del pH local, los cuales son factores importantes en la cristalinidad y que son muy importantes la fabricación de prótesis óseas[6].

Los depósitos iniciales de cálculo requieren un largo periodo de maduración (alrededor de un año) para transformarse en una fase cristalina más estable. Schroeder y Bambauer[7] usando difracción de rayos-X encontraron brusita en las primeras etapas de formación (unas pocas semanas), mientras que fosfato octocálcico (OCP) fue detectado en todas las etapas. También, se debe mencionar que en los métodos de difracción se presentaron algunos problemas de resolución debido que los ángulos de difracción de OCP son muy cercanos de a los de HAp lo que hace que la identificación de estructuras sea dificultosa[8] en algunos casos. Tsuda y Arends[9] usaron espectroscopía Raman para estudiar las fases minerales en cálculo supragingival humano (entre 1 a 6 meses de formación) pero no encontraron significantes diferencias entre los espectros medidos. Algunos problemas en las mediciones Raman es que dependen de la presencia de materiales orgánicos en las muestras, más aun, las posiciones de algunos picos son especialmente dependientes de la potencia del láser y pueden producir cambios químicos que alteran algunas fases[8].

En esta etapa del trabajo, se implementará el uso de radiación de sincrotrón para el estudio de los cambios de las concentraciones de elementos trazas como también la transformación de las fases de fosfato de calcio durante el proceso de maduración del cálculo dental. La presencia de trazas ya sea en sitios intersticiales o de vacancia afecta la estabilidad estructural de la red cristalina lo que puede propiciar los cambios de fase. Debido a los extensos tiempos que estos cambios consumen se ha estudiado un caso simple siendo a conocimiento del autor un estudio que no ha sido reportado con anterioridad a este trabajo.

### 7.3 MUESTRAS COLECTADAS Y ARREGLO EXPERIMENTAL

Varios cálculos dentales de dimensiones pequeñas fueron colectadas de un paciente masculino quien no presentaba enfermedades periodontales (afecciones en encía, paladar, etc.) ni tampoco sistémicas. Las muestras consistieron de cálculo supragingival, y fueron tomadas de distintas piezas dentales como se muestra en la Tabla 7-1. Antes de iniciar las extracciones de muestras, el paciente fue totalmente limpiado de cualquier depósito pétreo previo al inicio de este estudio. Posteriormente se le instó a mantener sus hábitos personales de limpieza bucal. La primera muestra se extrajo a los 30 días posteriores al inicio y subsiguientemente se siguieron extrayendo cada 30 días muestras de cálculo dental de diferentes piezas dentales. De esta forma, los depósitos pétreos fueron indexados en localización y fecha de aparición y extracción. Una vez retirada la muestra, ésta fue limpiada con agua destilada y secada al aire. La ulterior preparación del espécimen para ser analizada por SRXRF se llevó a cabo como se describió en un trabajo previo[10]. En breve, el cálculo dental fue pulverizado en un mortero y luego depositado sobre la superficie adherente circular de cinta Kapton de diámetro 0.5 cm. Cuando la muestra era demasiado pequeña, ésta fue simplemente puesta entera sobre la cinta. Para la cuantificación, estándares certificados de apatita, suelos y  $\text{SO}_2\text{Zn}$  fueron usados. Especial cuidado se tuvo en la limpieza de los utensilios para la preparación de muestras y estándares, se realizaron con ultrasonido y alcohol al final de cada oportunidad en que fueron usadas.

Tabla 7-1. Ubicación de las piezas dentarias de las cuales fueron extraídas las muestras.

Sitio	M41	D41	M31	D31 MD33	M32 D42	D32 M42	M42 D32	D42 M32	MD43 MD33 D31	M31	D41	M41
Mes	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12

Entre una extracción y la siguiente pasó un mes.  
M: mesial ; D: distal

Las mediciones por fluorescencia de rayos-X fueron llevadas a cabo en la línea D09B-XRF en el Laboratorio Nacional de Luz Sincrotrón (LNLS, Campinas, Brasil). El anillo de almacenamiento y las características del haz fueron descritas previamente[10]. Las condiciones preparadas para las mediciones son mostradas en la Tabla 7-2. Las propiedades y energías de la radiación incidente hacen éste método

analítico insensible a la presencia de materiales orgánicos y no induce cambios en las estructuras cristalinas.

Todo el proceso de alineamiento del haz, configuración, y posicionamiento fue hecho por motores de paso controlados remotamente y monitoreado con video cámaras. En esta forma, la muestra entera fue irradiada durante las mediciones, manteniendo la excitación en la parte de Kapton para reducir contribuciones por dispersión.

La alta intensidad de la radiación de sincrotrón, combinada con la alta concentración de calcio en esta clase de muestras, produjo la saturación del detector de Si(Li) y un tiempo muerto inaceptable. Para evitar este problema se colocaron filtros de aluminio en frente del detector para mantener la pasividad electrónica debajo de 13%.

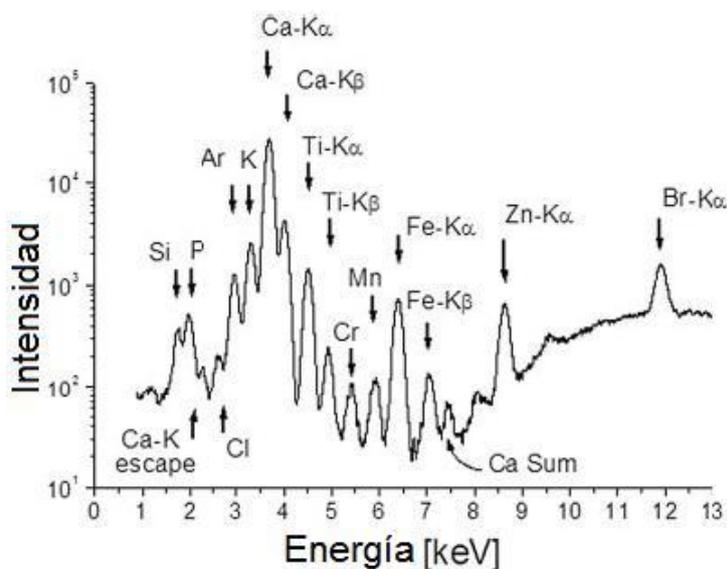


Figura 7-1. Espectro fluorescente típico mostrando los elementos detectados. Los picos suma de Ca (cerca de picos de P) son indicados en la figura.

Un espectro de fluorescencia típico se muestra en la Figura 7-1, los picos fluorescentes de algunos elementos están indicados en ésta. El pico Br que se observa correspondió al material de soporte. En la figura se observa un bajo *background* hasta 8 keV; por encima de esta energía se manifiesta la dispersión en elementos livianos que produce un levantamiento del fondo. Sin embargo, una buena razón señal-ruido (aprox. 100) fue obtenido. Todavía la alta tasa de conteo para Ca produjo la aparición de picos suma y picos escapes, éste último montado cerca del pico de fósforo.

Tabla 7-2. Características del haz, de las muestras, y del set-up experimental.

Espectro-haz	Energía crítica	Flujo Fotónico <sup>a</sup>	Área irradiada	Filtros	Geometría	Detector
Blanco	12 keV	3.092 E12	5 mm <sup>2</sup>	Al 0.5 mm	45° - 45°	Si(Li)
Atmósfera	Tiempo vivo	Nº muestras	Área de Muestra	Contenedor de muestra	Masa de muestras	Estándares
Aire	200 seg./muestra	19	< 4 mm <sup>2</sup>	Kapton	15-65 mg/cm <sup>2</sup>	Apatita, suelo, SO <sub>2</sub> Zn

<sup>a</sup>Flujo medido en fotones/mrad s(0.1% ΔE/E)

Los espectros fueron analizados por el programa AXIL[11] para realizar el ajuste correspondiente. En todos los espectros de las muestras se usó un modelo polinomial de grado 2 para ajustar el fondo en la región de interés. Los picos de escape y suma de Ca también fueron considerados en el ajuste además de

los que la biblioteca del programa ya poseía. Las concentraciones elementales fueron calculadas por medio de parámetros fundamentales[12] del mismo paquete de programas de AXIL.

La matriz oscura fue estimada ajustando la suma total de todas las concentraciones a 100%. Para los elementos minoritarios de la matriz oscura, se fijaron valores de concentración predeterminados, los cuales fueron, Mg 0.8% y F 0.04%, que son valores típicos encontrados en los cálculos dentales[13]. Solo se permitió variar libremente los valores de oxígeno que está en forma abundante en la matriz oscura y así cumplir con el requerimiento arriba mencionado.

## 7.4 CONCENTRACIONES ELEMENTALES EN LA MADURACIÓN

Las razones molares Ca/P pueden ser empleados para estimar la principal estructura cristalográfica en los cálculos dentales al compararlos con los fosfatos de calcio puros (Tabla 6-3). Además de la simplicidad de éste método, produce resultados satisfactorios cuando es comparado con métodos de cristalografía más específicos como difracción[14] de rayos-X. Sin embargo, en este estudio el método propuesto es usado para estimar la principal estructura cristalina de las fases que componen el cálculo dental a través de los estadios de maduración.

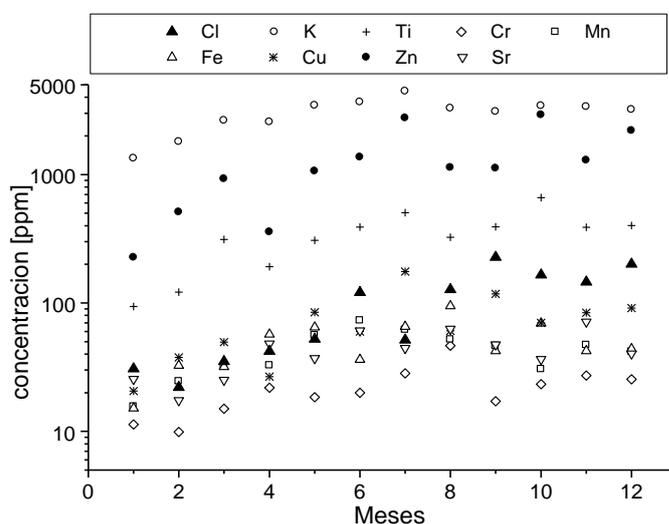


Figura 7-2. Evolución temporal de las concentraciones trazas durante el periodo de análisis.

La Figura 7-2 muestra las concentraciones de los elementos trazas versus el tiempo de maduración. Para el caso particular de los principales constituyentes, esto se muestra en la Figura 7-3 donde también se muestra la evolución de la razón molar Ca/P. Los elementos trazas seguirían una curva exponencial de tasas de crecimiento similares siendo un orden de magnitud el aumento de la concentración inicial en el periodo de tiempo de análisis.

De acuerdo a la Figura 7-3, las concentraciones de Ca y P siguen similares tendencias con valores iniciales cercanos a las fases de baja cristalinidad (Ca 12%, P 9%), subsiguientemente después de los dos meses, hay un aumento del ritmo de concentración para luego alcanzar una zona de plató. Las pendientes en esta zona de aumento es diferente para estos elementos, la concentración de fósforo se estabiliza antes que las correspondientes de calcio. El valor estable de fósforo (~18%) es alcanzado aproximadamente al tercer mes y el de calcio (~38%) se alcanza después del sexto mes.

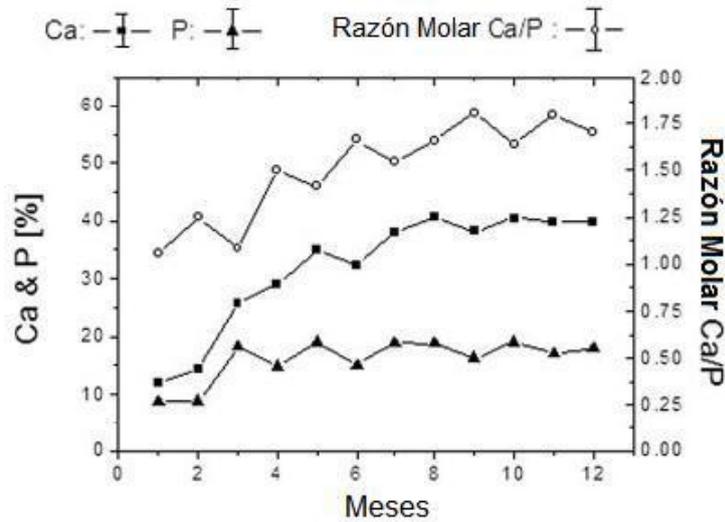


Figura 7-3. Concentraciones de P y Ca en función del tiempo de estudio y variación de la razón molar Ca/P.

Estos comportamientos en las concentraciones producen una curva de cociente molar Ca/P como se muestra también en la Figura 7-3. La misma muestra cómo progresivamente los fosfatos de calcio en el cálculo dental van tendiendo a una fase similar a la de la hidroxiapatita por inspección del índice molar Ca/P.

La transformación de fase se lleva a cabo a expensas de una toma de iones de  $\text{Ca}^{++}$  del medio circundante. La Figura 7-4 muestra una curva sigmoideal ajustando los valores experimentales y la Figura 7-5 muestra una derivada de este ajuste la cual representa la velocidad de toma de calcio incorporadas a las fases en transformación. Como puede observarse, el ritmo de toma de calcio crece monótonamente hasta el tercer mes desde el momento de aparición del cálculo en las piezas dentales, luego se estabiliza unas semanas para luego decrecer monótonamente a cero.

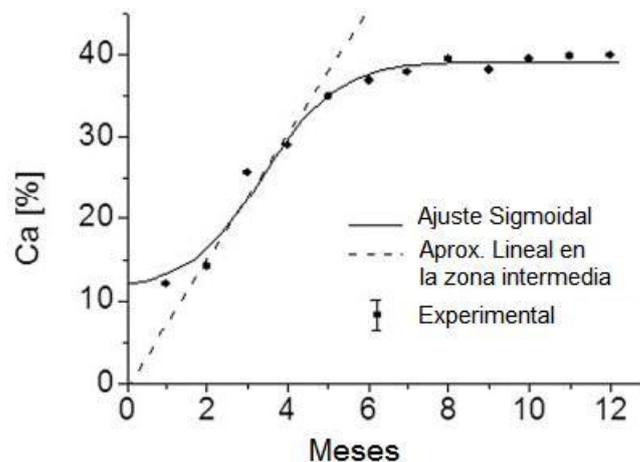


Figura 7-4. Ajuste de la variación de concentración de Ca en función del tiempo por una curva sigmoideal.

Los elementos trazas se comportan distintos comparados a la descripción recién hecha para los elementos mayoritarios; ellos presentaron un crecimiento exponencial en la concentración con grandes variaciones y no mostraron alcanzar un valor estacionario al menos en el periodo de estudio.

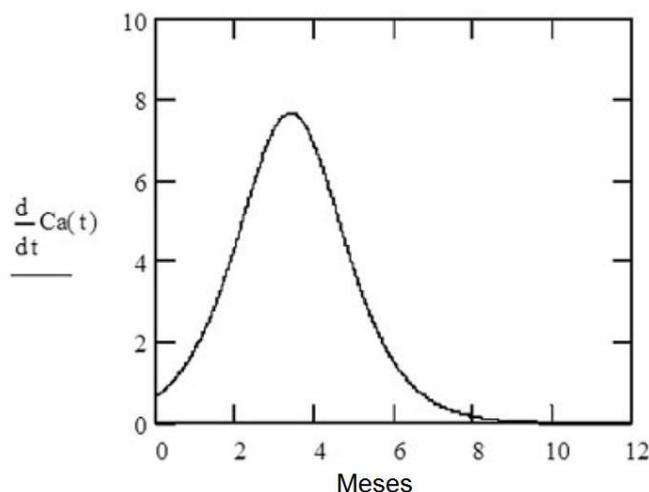


Figura 7-5. Derivada temporal de la curva ajustada en la Figura 7-4 donde se muestra la velocidad de adquisición de Ca en la estructura de los fosfatos de calcio del cálculo dental.

Algunas correlaciones o ritmos similares de aumento fueron observadas entre algunos elementos como se ven en la Figura 7-6 y Figura 7-7. Esto se corresponde con el hecho de que varios de estos elementos poseen radios atómicos y propiedades químicas similares otorgándoles probabilidades similares de ocupar un sitio vacante en la red cristalina de los fosfatos cálcicos. La correlación entre Cu y Zn observada en los cálculos en formación también fue verificada anteriormente en un estudio de barrido 2D en superficies de cálculos maduros[15].

## 7.5 MATRIZ INORGÁNICA Y CRISTALIZACIÓN

Los depósitos de cálculo dental pasan a través de varias etapas desde su formación inicial en la superficie dentaria hasta llegar a una etapa de maduración. Esas etapas pueden ser caracterizadas por la predominancia de ciertas fases de fosfatos y por su morfología que están relacionadas con la cinética de la reacción involucrada. En el proceso entero los fosfatos cálcicos seguirán la Regla de Ostwald de las fases[16], esto es, una fase metaestable cambiará hacia la próxima fase más estable pero, bajo ciertas condiciones, no necesariamente hacia la más estable de todas las posibles. Entonces los depósitos pétreos pasarán por pasos las transformaciones y debido a que es un sistema no controlado, es de esperar que coexistan varias fases simultáneamente. Cuando éste, en la mayor parte de su constitución, alcance esta etapa final diremos que ha alcanzado un estado de maduración y lo logra a través de un mecanismo de mineralización. La hidroxiapatita ha resultado ser la fase más estable de los fosfatos de calcio según un gran número de estudios sobre su formación sintetizada. Videau *et al.*[17] concluyó que para variadas fases iniciales de estos fosfatos formados por precipitación resultó siempre ser la hidroxiapatita el resultado final en medios de pH 7. En este trabajo, de acuerdo al cociente molar Ca/P mostrado en la Figura 7-3 y en base a la Tabla 6-3, en las primeras etapas de formación del cálculo, brusita es el mineral que prevalece, la transformación continúa a través de una toma de calcio del medio para formar fases intermedias como fosfatos octocálcicos y whitlockita; finalmente se alcanza la fase más estable, hidroxiapatita, después del octavo mes, ver Figura 7-4 y Figura 7-5. Este hecho estaría en acuerdo con los resultados de Bambauer y Schroeder[7].

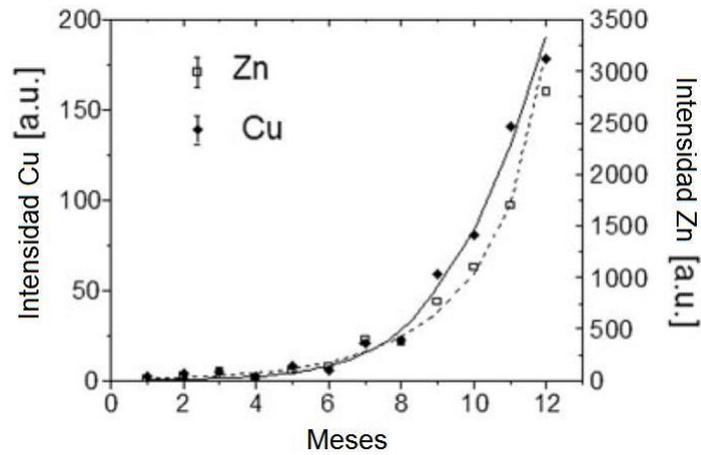


Figura 7-6. Ritmo de crecimiento de concentración de Cu y Zn. Las intensidades son proporcionales a las concentraciones respectivas. Las líneas corresponden al ajuste de los puntos experimentales y muestran la gran correlación entre ambos elementos.

La cinética de la transformación de los fosfatos cálcicos está fuertemente relacionada con la toma de  $\text{Ca}^{++}$  del medio e incorporada a la fase, en este caso el medio lo constituyen la saliva y los fluidos gingivales. Un estudio de síntesis de hidroxiapatita microcristalina[18] donde se monitoreó la concentración de calcio en la solución y los niveles de cristalinidad de la fase, confirmó esta aseerción. Por otro lado y volviendo a este estudio, la concentración de fósforo fue casi insensible a los cambios de fase debido a que, estequiométricamente, ésta varía entre 18.5-20% en las cuatro principales fases que conforman el cálculo dental. Este hecho está mostrado en la Figura 7-3.

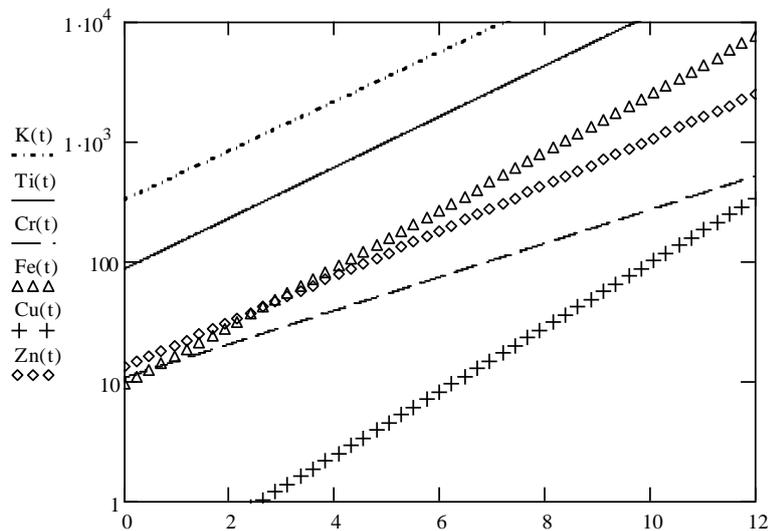


Figura 7-7. Ajuste con funciones exponenciales de las concentraciones de algunos elementos analizados, nótese ciertas correlaciones existentes especialmente entre K y Ti.

Las Figura 7-4 y Figura 7-5 proveen información útil acerca de la velocidad del proceso y de eventos temporales involucrados en la maduración del cálculo. La curva sigmoideal de la Figura 7-4 es comparable a aquellas observadas en reacciones que poseen procesos de nucleación y proliferación cristalina en ciertos mecanismos autocatalíticos[19]. Este régimen está ubicado entre los meses 2 y 5. En este período, la conformación de muchos núcleos con estructura semejante a hidroxiapatita son creados en forma rápida, al mismo tiempo que esta etapa avanza se producen cambios de fase desde ésta, amorfa, a otras como whitlokita y fosfatos octocálcicos. La extensión de este período de proliferación de cristales puede

ser alterado por presencia bacteriana. Un estudio de microscopía electrónica[20] sugiere la clasificación de dos distintos centros de mineralización, la de “tipo A” que es debida a la calcificación de bacterias en cristales de hidroxiapatita, y las de “tipo B” de origen no-microbiano formado por cristales incipientes de brusita. Los de tipo A son los que más infieren en la catálisis, según los autores.

El proceso de mineralización y el consiguiente proceso de crecimiento de cristales son afectados por factores químicos y termodinámicos. Un factor termodinámico relevante para la activación de la energía libre de nucleación es la energía libre interfacial entre los núcleos y el medio circundante[21]. Parámetros químicos como el pH de la solución pueden acelerar o aletargar la cristalización. Otro factor a tener en cuenta es la acción de impurezas o elementos trazas[22], que es un ítem importante en las áreas de fabricación de materiales en general y en biomateriales en particular. Debido a que los fosfatos cálcicos biológicos admiten la sustitución o incorporación de una gran cantidad de iones foráneos, los efectos de estos iones pueden influenciar el proceso de maduración del cálculo dental. Sin embargo, en este estudio esto no fue observado. La concentración de trazas versus tiempo (Figura 7-2) y el ritmo de transformación (Figura 7-4 y Figura 7-5) no mostraron tener una correlación definida. Todos los elementos trazas presentaron aproximadamente un comportamiento exponencial sin mostrar indicios de apartamiento de esta tendencia en el periodo de tiempo analizado. Luego, el proceso de mineralización se llevaría a cabo sin mayor influencia de la incorporación de estos elementos, al menos en los niveles de concentración que normalmente se encuentran en el fluido oral. No obstante, varios trabajos[23,24] han reportado que en altas concentraciones de zinc, éste actúa como inhibidor de crecimiento en experimentos con apatitas sintéticas. Aplicar este resultado para los cálculos dentales no es sencillo de establecer debido al complejo sistema biológico inherente y la interacción de este medio con tales iones.

## 7.6 NOTAS FINALES DEL CAPÍTULO

La transformación de fases en los fosfatos cálcicos biológicos comienza con fases deficientes en calcio, una razón molar Ca/P cercana a 1.0, mientras se inicia un periodo de toma de calcio del medio (fluido oral) a velocidad creciente hasta el tercer mes a partir del cual comienza a desacelerarse este proceso. Luego se arriba a una fase estable después del sexto mes de maduración, tal fase se correspondería a la hidroxiapatita debido que la estimación de la razón molar Ca/P es próximo al valor de 1.7. El proceso descrito semeja a un proceso de tipo catalítico.

Las concentraciones de elementos trazas presentaron un crecimiento monótono durante el periodo de estudio. Éstas aumentaron uno o dos órdenes de magnitud en 10 meses y a un ritmo similar (Figura 7-7). Se estima que estos valores ulteriormente tenderán a alcanzar los niveles nominales que usualmente son encontrados en análisis químicos de tártaros mientras que el proceso de estabilización de las fases de fosfatos no se verá afectada.

De acuerdo a esos resultados y por artículos previos que ya han citados aquí[23,24], la aplicación de agentes anti-cálculos serían más efectivos antes de los seis meses de maduración, esto es, cuando el proceso de maduración aun no ha alcanzado la fase más estable (hidroxiapatita) y se requiera más energía para desestabilizarla.

Hasta aquí sólo se han analizado las muestras en forma masiva (bulk) y la información colectada corresponde a valores medios pero también convendría indagar los detalles de la variación de éstos en porciones acotadas de la muestra. Porciones que deben elegirse convenientemente como aquellas en donde por ejemplo se produce una zona de transición entre cálculo supra y subgingival o entre tejido dentario y cálculo dental. Cambios en concentración elemental o de estructura podrían atribuirse a diferencias no evidentes entre un lado y otro de la zona de interface. En los próximos dos capítulos se realizarán estudios de microanálisis por FRX para obtener un mapeo elemental y estudiar variaciones en la estructura cristalina en las regiones mencionadas.

### Referencias

- 1 Burchard HH. “Varieties of dental calculi”. *Dent Cosmos* (1898) **40**:1–9.
- 2 Colyer JF, Sprawson E. “Dental surgery and pathology”, 6th ed. London: Longmans, Green and Co.; 1931. Chapter XX.
- 3 Naeslund CA. “A comparative study of the formation of concretions in the oral cavity and in the salivary glands and ducts”, *Dent Cosmos* (1926) **68**:1137–1144.

- 4 Rowles SL. "The inorganic composition of dental calculus". In: Blackwood HJJ, editor. *Bone and tooth*. Proc. Ist. Eur. Symp. London: Pergamon; 1963. p 175–183.
- 5 Lamkin MS, Arancillo AA, Oppenheim T. "Temporal and compositional characteristics of salivary protein adsorption to hydroxyapatite". *J Dent Res* (1996) **75**:803–808.
- 6 Seckler MM, Danese M, Derenzo S, Valarelli JV, Giulietti M, Rodríguez-Clemente R. "Influence of process conditions on hydroxyapatite crystallinity obtained by direct crystallization". *Mater Res* (1999) **2**:59–62.
- 7 Schroeder HE, Bambauer HU. "Stages of calcium phosphate crystallisation during calculus formation". *Arch Oral Biol* (1966) **11**:1–14.
- 8 Schroeder HE. "Formation and inhibition of dental calculus". Vienna: Hans Berne Publishers; 1969.
- 9 Tsuda H, Arends J. "Raman spectra of human dental calculus", *J Dent Res* (1993) **72**:1609–1613.
- 10 Abraham J, Grenón M, Sánchez HJ, Pérez C, Barrea R. "Spectrochemical análisis of dental calculus by synchrotron radiation x-ray fluorescent", *Anal Chem* (2002) **74**:324–329.
- 11 Van Espen P, Nullens H, Adams F. "A computer analysis of X-ray fluorescence spectra", *Nuclear Instrum Methods* (1977) **142**:243–250.
- 12 Criss JW., *Advances in X-ray analysis*, vol. **23**. New York: Plenum; 1980. p 93.
- 13 Grøn O, Van Campen GJ, Lindstrom I. "Human dental calculus—inorganic chemical and crystallographic composition". *Arch Oral Biol* (1967) **12**:829–837.
- 14 Mishima H, Yamamoto H, Sakae T. "Scanning electron microscopy—energy dispersive spectroscopy and x-ray diffraction analyses of human salivary stones", *Scan Micros* (1992) **6**:487–494.
- 15 Pérez C, Sánchez HJ, Barrea R, Grenón M, Abraham J., "Microscopic x-ray fluorescence análisis of human dental calculus using synchrotron radiation", *J. Anal. At. Spectrom.* (2004) **19**:392–397.
- 16 Kemenade MJ, Van Bruyn PL. "A kinetic study of precipitation from supersaturated calcium phosphate solutions", *J Colloid Interface Sci* (1987) **118**:564–585.
- 17 Videau JJ, Portier J, Piriou B. "Raman spectroscopic studies of fluorophosphate glasses", *J Non-Cryst Solids* (1982) **48**: 385–392.
- 18 Boskey A, Posner S. "Conversion of amorphous calcium phosphate to microcrystalline hydroxyapatite", *J Phys Chem* (1973) **77**:2313–2317.
- 19 Harrison LG. *Comprehensive chemical kinetics*, vol. **2**. In: Bamford CH, Tipper CFH, editors. Amsterdam: Elsevier; 1969. p 377.
- 20 Lustmann J, Lewin-Epstein J, Shteyer A. "Scanning electron microscopy of dental calculus", *Calcif Tissue Res* (1976) **21**:47–55.
- 21 Boistelle R, Astier JP. "Crystallization mechanisms in solution", *J Crystal Grow* (1988) **90**:14–30.
- 22 Rauls M, Bartosch K, Kind M, Kuch S, Lacmann R, Mersmann A. "The influence of impurities on crystallization kinetics—a case study on ammonium sulfate", *J. Crystal Growth* (2000) **213**:116–128.
- 23 Davey HP, Embery G, Cummins D. "Interaction of zinc with a synthetic calcium phosphate mineral", *Caries Res* (1997) **31**:434–440.
- 24 LeGeros RZ, Bleiwas CB, Retino M, Rohanizadeh R, LeGeros J. "Zinc effect on the in vitro formation of calcium phosphates: relevance to clinical inhibition of calculus formation", *Am J Dent* (1999) **12**:65–71.

# Capítulo 8

## 8.1 ANÁLISIS MICROSCÓPICO POR FLUORESCENCIA DE RAYOS-X USANDO RADIACIÓN DE SINCROTRÓN EN CÁLCULO DENTAL HUMANO

En esta sección, se presentan nuevos resultados de la distribución espacial en una y dos dimensiones de los componentes mayoritarios, minoritarios y elementos trazas que fueron estudiados en cálculo dental. Una vez más, la poderosa herramienta de fuente de luz sincrotrón fue usada para inducir fluorescencia en los especímenes. Las mediciones fueron llevadas a cabo en la estación de microsonda montada en la línea de fluorescencia de rayos-X en las instalaciones del LNLS, Laboratorio Nacional de Luz Sincrotrón en Campinas Brasil. Las distribuciones dos-dimensionales de Calcio, el mayor componente elemental, mostraron un patrón uniforme en el área de análisis mientras que los elementos trazas se distribuyeron no-uniformemente. En varios barridos lineales en la dirección de crecimiento de cálculo se constató una alta correlación entre Cu y Zn determinada semi-cuantitativamente usando estándares de calibración. Se observó que esos metales se acumularon preferentemente en cálculo subgingival, cerca de la superficie dental. Esos resultados indican que los procesos de mineralización, que se llevan en ambos tipos de cálculos, son en principio diferentes.

## 8.2 PROPÓSITO Y ESCENARIO DE ESTUDIO

Además de las ventajas ya conocidas de la radiación de sincrotrón para el análisis de trazas debido a una enorme mejora en los límites de detección[1] en varios órdenes de magnitud en comparación con métodos convencionales, también permite el análisis de pequeñas áreas de escala micrométrica, gracias a la colimación natural y alta intensidad.

En este estudio se usó la técnica de análisis con microsonda de fluorescencia de rayos-X para determinar la concentración elemental de componentes mayoritarios, minoritarios y trazas en las muestras biológicas de cálculo dental humano extraído de pacientes adultos que requirieron tratamiento periodontal.

Ya mencionamos la comprobada flexibilidad natural de las redes cristalinas de los fosfatos de calcio en general, como brucita que aparece en los primeros estadios de formación o como en fosfato octocálcico que aparece en un estadio medio y se incluye por supuesto, la hidroxiapatita, que es el resultado final del proceso de maduración de las fases de estos fosfatos. Esta flexibilidad estructural produce complicados intercambios iónicos con el medio acuoso circundante, saliva y fluido gingival. El Zn es un elemento importante en la mineralización de la placa dental y algunos autores han reportado que es un nucleador en whitlokita[2] pero al mismo tiempo es un inhibidor[3] de crecimientos de cristales de hidroxiapatita. Por otro lado, el efecto de Cu es dañino en el proceso de mineralización en apatitas sintéticas[4] y en huesos[5]. El Cu también se encuentra en varias enzimas y está involucrado en la formación de proteínas y en el tejido conectivo, también participa inhibiendo el crecimiento de placa bacteriana y reduce la producción de ácido como residuos.

Aunque varios estudios relacionados a la composición química de cálculo dental ya han sido reportados, un estudio espacial de esos constituyentes aun no es bien conocido, especialmente para los elementos trazas.

## 8.3 DESARROLLO DE LA EXPERIENCIA

### 8.3.1 Preparación de muestras y estándares

Las muestras consistieron de pequeños fragmentos de cálculo dental extraído de pacientes adultos que concurrieron al centro odontológico. Se tomó cuidado especial durante la extracción y posterior manipulación en orden de preservar la forma y la orientación espacial de ambos tipos de cálculos. Después de la remoción, las muestras fueron lavadas con agua destilada y dejadas secar al aire para ser conservadas en contenedor seco y hermético. Luego, los fragmentos fueron fijados en una resina acrílica

que una vez endurecidas fueron seccionadas a una altura conveniente y dicha superficie fue pulida. Previas inspecciones bajo el microscopio de las muestras originales comparadas con las muestras tratadas mostraron que el procedimiento de pulido no adicionó impurezas a los especímenes. Las muestras fueron cortadas de tal manera que quedaban expuestas ambos tipos de cálculo, Figura 8-1, supra y subgingival y la interface que las limitaban. Un conjunto de estándares fueron preparados por mezcla de suspensiones de hidroxiapatita estequiométrica ( $Ca/P=1.69$ ) y urea de diferentes volúmenes conteniendo iones de Mn, Fe, Cu, Zn y Sr. De esta forma, los estándares fueron preparados en soluciones con concentración de 25, 50, 100, 150 y 200 ppm de los mencionados elementos. Cada suspensión fue homogeneizada en baños de ultra-sonido, secados en una placa caliente a 250 °C y mantenida 2 horas en una campana de contención para eliminar completamente la urea. Así se obtuvo el apropiado grado de homogenización.

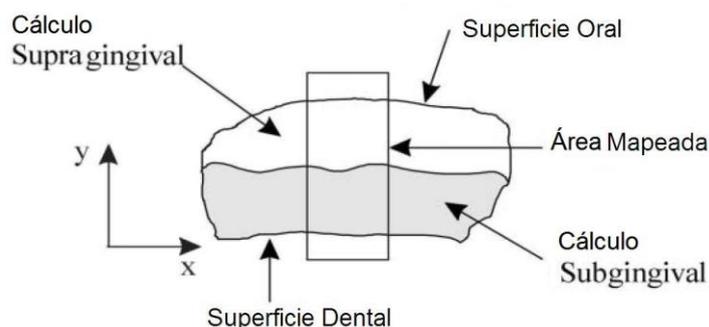


Figura 8-1. Vista esquemática de las muestras analizadas y el área de barrido seleccionado que comprendían ambos tipos de cálculo.

### 8.3.2 Mediciones

Los experimentos fueron llevados a cabo en la estación de micro-fluorescencia de rayos-X de la línea XRF en las instalaciones del LNLS, sincrotrón de Campinas, Brasil. Una descripción detallada de la línea y su aparatología actual ya fue presentada[6]. La micro-área de excitación se consiguió usando un fino capilar para condensar el haz de sincrotrón[7]. Todas las mediciones fueron hechas en condiciones de temperatura y presión ambiente. El área de la muestra fue seleccionada con microscopio óptico el cual fue ubicado perpendicularmente al área de interés. La geometría de excitación estándar ( $45^{\circ}+45^{\circ}$ ) fue elegida.

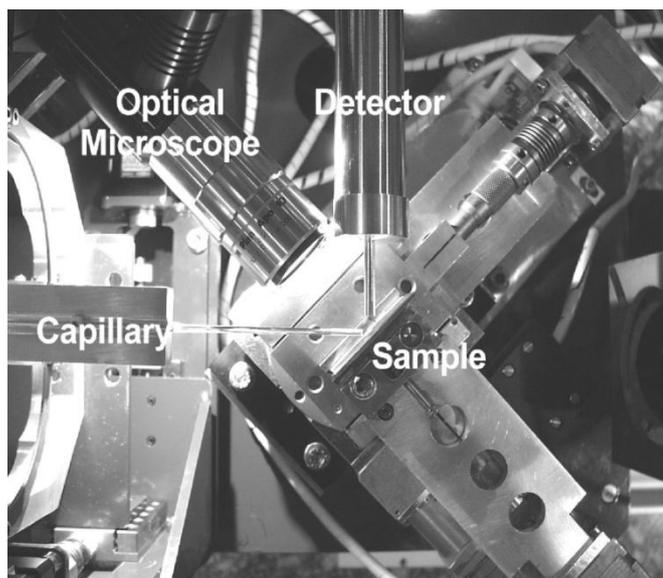


Figura 8-2. Detalle del espectrómetro de micro-fluorescencia,  $\mu$ SRXRF, montado en la línea experimental de fluorescencia en el LNLS.

Un detector de estado sólido Si(Li) dispersivo en energías fue usado para coleccionar la radiación fluorescente y dispersada proveniente de las muestras. Una vista detallada del arreglo experimental se muestra en la Figura 8-2. Un barrido *filo-de-cuchillo* de una hoja delgada de oro fue realizado a lo largo del eje vertical y horizontal para determinar el tamaño de haz. En la Figura 8-3 se muestra el perfil del haz junto con la primera derivada y su correspondiente ajuste Gaussiano.

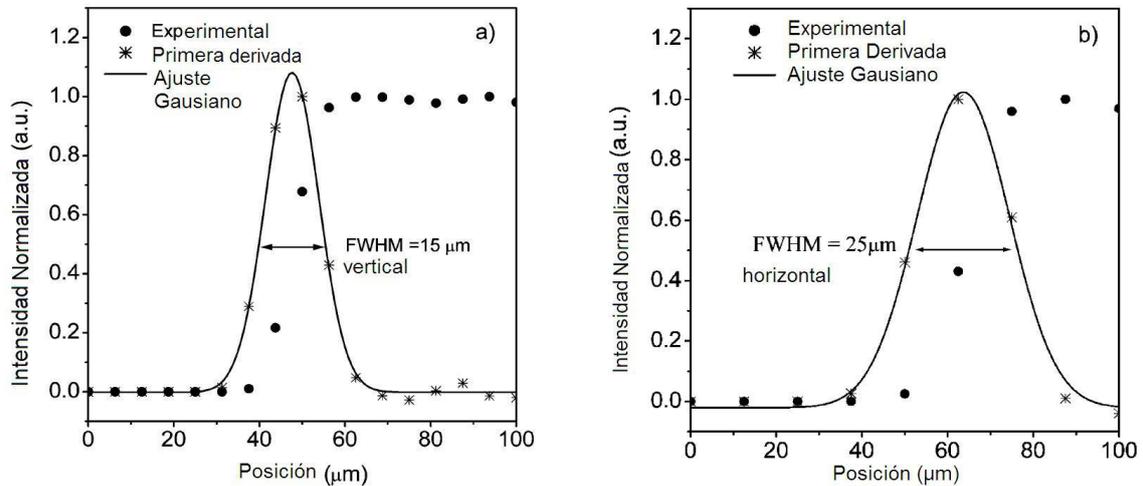


Figura 8-3. Perfil de filo de cuchillo en el barrido por el microhaz a la salida del capilar, a) dirección vertical, b) dirección horizontal.

El tamaño real del haz sobre la muestra fue tomado como 4 veces la desviación estándar obtenida del ajuste. De acuerdo a esto, la dimensión vertical y horizontal del punto fueron 25 y 42  $\mu\text{m}$ , respectivamente. En este estudio muestro los mapeos tomados de las muestras marcadas como HDC-1, HDC-2, HDC3 y HDC-4 donde en cada una se han cubierto áreas que incluían ambas tipos de cálculos.

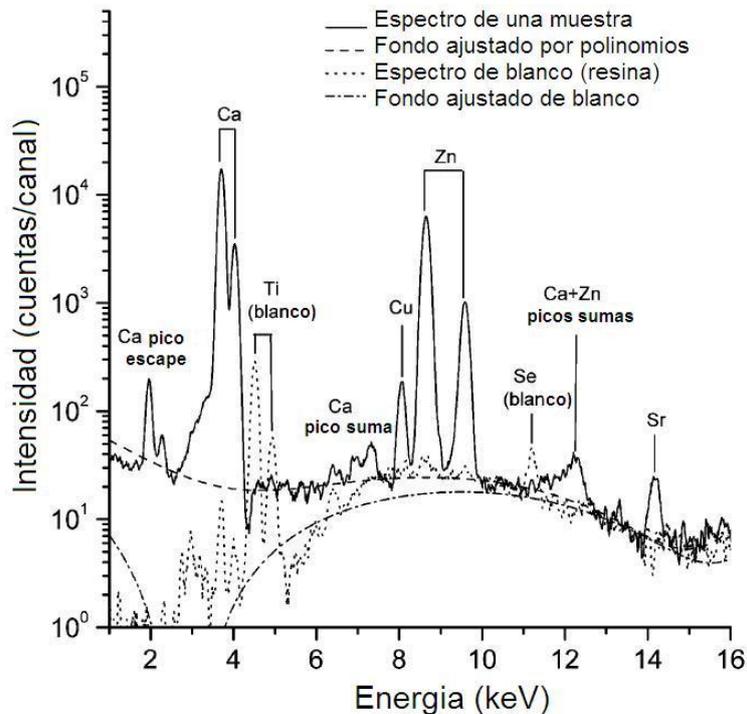


Figura 8-4. Un espectro típico tomado en la parte de cálculo subgingival de la muestra HDC-3, se exhibe el espectro de blanco (resina acrílica) y el ajuste de fondo.

El número de píxeles no fue constante sino que dependió del área demarcada para estudiar. El tiempo de medición de cada pixel fue preestablecido de 60 segundos en todos los análisis. En la Figura 8-4 se aprecia un espectro tomado en un área de la zona de cálculo subgingival de la muestra HDC-3, un espectro medido en la resina acrílica (blank) y también sus modelos de fondo. Como se aprecia claramente de esta figura, Ti y Se aparecen como los únicos contaminantes debido a la resina acrílica los cuales no están presentes en las muestras.

Con el objetivo de realizar un análisis semi-cuantitativo local, se llevó a cabo un barrido lineal en la zona de interface supra-sub en el cálculo dental. Para este caso, el tiempo de medición fue fijado a 300 segundos para tener una muy buena estadística en los picos fluorescentes. Los estándares también fueron medidos con este tiempo. Los valores medios de la intensidad fluorescente de cada elemento en 5 puntos diferentes sobre los estándares, fueron usados para calcular las curvas de calibración.

## 8.4 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La sensibilidad de cada elemento fue obtenida por medio de un ajuste lineal de cada curva de calibración para los estándares; los límites de detección (DL) han sido determinados de acuerdo a la siguiente expresión[8]:

$$DL = \frac{3C_i}{I_i} \sqrt{\frac{I_{b,i}}{t}}$$

Donde  $I_{b,i}$  e  $I_i$  son las intensidades medidas del fondo y de la fluorescencia del elemento  $i$ ,  $t$  es el tiempo vivo y  $C_i$  es la concentración de dicho elemento. Las Figura 8-5 y Figura 8-6 muestran el comportamiento de DL y de la sensibilidad para 300 segundos de tiempo de medición como función del número en el intervalo  $25 \leq Z \leq 38$ .

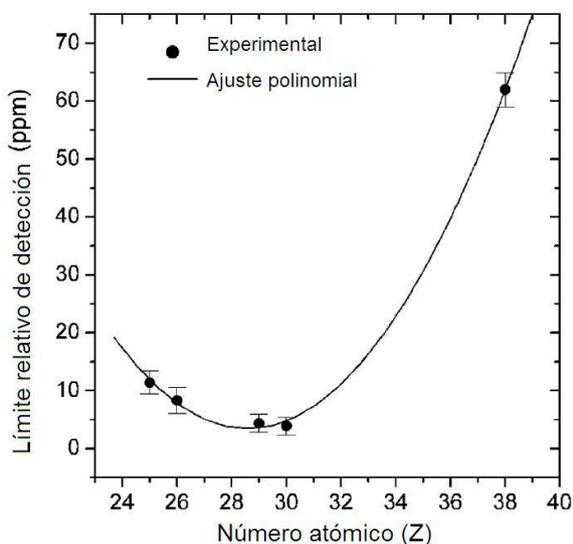


Figura 8-5. Límites de detección medidos de las muestras estándares obtenidos.

El programa AXIL[9] para el ajuste y tratamiento de espectros ha sido usado para calcular las intensidades netas de los elementos detectados en las muestras y estándares. El fondo fue restado después de ajustarlo con un polinomio de grado 9. La atenuación de la señal fluorescente debido a la colocación de filtros entre detector y muestras también fue corregida. Un código especial, escrito en MATLAB[10], fue diseñado para los archivos de espectros de AXIL y construir las imágenes de las distribuciones elementales.

Errores de propagación en las intensidades medidas, considerando las desviaciones estándares obtenidas de los programas de ajuste para las intensidades netas y los procesos de normalización, indicaron que los errores de intensidad variaron entre 5% y 24% dependiendo del conteo estadístico de cada elemento en cada punto del barrido. Considerando la precisión espectro-a-espectro, es decir, reproducibilidad de espectros, los datos medidos tuvieron la típica reproducibilidad para esta clase de espectrómetros, o sea, para variables aleatorias que siguen una distribución de Poisson.

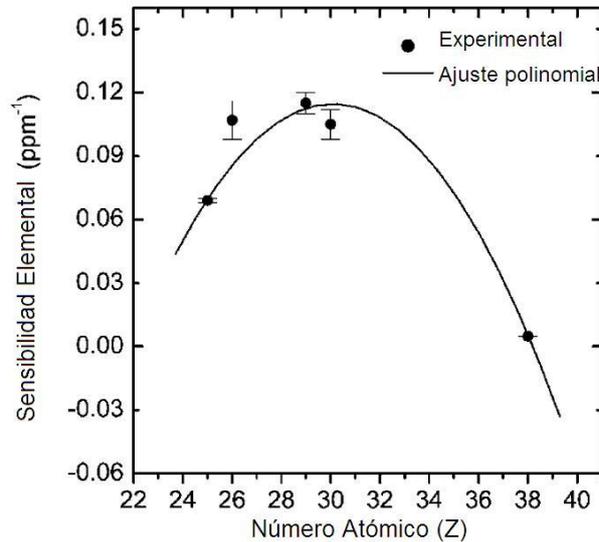


Figura 8-6. Curva de sensibilidad medida para los estándares preparados.

La Figura 8-7 muestra un ejemplo de los resultados obtenidos para el mapeo 2-dimencional de las distribuciones de Ca, Mn, Fe, Cu, Zn y Sr en las muestras tomadas. Los pixeles más oscuros indican mayor intensidad. De esos resultados, se puede inferir que mientras el mayor constituyente, Ca, está homogéneamente distribuido, todos los demás elementos, trazas en su mayoría, mostraron distribuciones no-homogéneas en el área mapeada. Mn y Fe aparecieron más localizados en la interface más exterior de

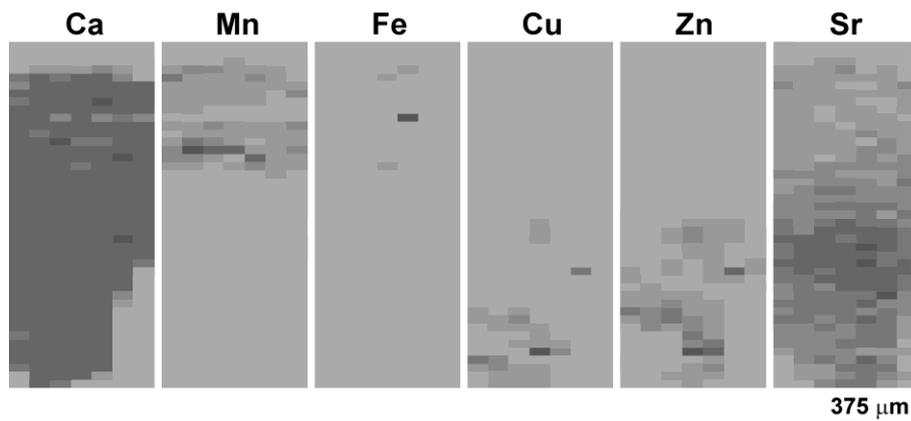


Figura 8-7. Mapeo de  $\mu$ XRF de varios elementos medidos en la muestra HDC-3. El tamaño de la imagen es de  $7 \times 43$  pixeles y el tiempo medido por pixel fue de 60 segundos. Tonos más oscuros indican mayor intensidad y niveles más claros corresponden con menor intensidad fluorescente.

la parte supragingival (esto es, la superficie oral). Como se puede ver, existe una remarcada tendencia de Cu, Zn y Sr a estar preferencialmente localizado en cálculo subgingival; en esta zona, Sr presenta también una distribución suave mientras que los otros dos elementos muestran valores grandes en la interface interior (la que va contigua a la superficie dentaria).

Puesto que este proceso de mapeo es un proceso que consume demasiado tiempo, una técnica diferente debe ser empleada para obtener resultados más precisos. Un barrido lineal fue llevado a cabo en forma perpendicular a la interface de las partes supra y subgingival. Este eje está asociado con la dirección de crecimiento del cálculo. Como ejemplo, la Figura 8-8 muestra una comparación entre barridos lineales para diferentes elementos en el espécimen HDC-3. Hay una aparente discrepancia entre los ritmos de crecimiento de las intensidades de Ca y Sr en los primeros 250  $\mu\text{m}$  de barrido como se aprecia en la Figura 8-8d. Esto es explicado debido a los diferentes rangos de escala usados para la comparación. Comportamientos similares pueden ser observados también en las otras muestras. De acuerdo a los resultados de los mapeos, la concentración de Sr en cálculo subgingival es mayor que en la parte supragingival; este hecho concuerda con reportes de otros autores usando espectroscopía de absorción atómica[11]. Las distribuciones de Cu y Zn de remarcable interés, mostraron una significativa correlación pixel por pixel.

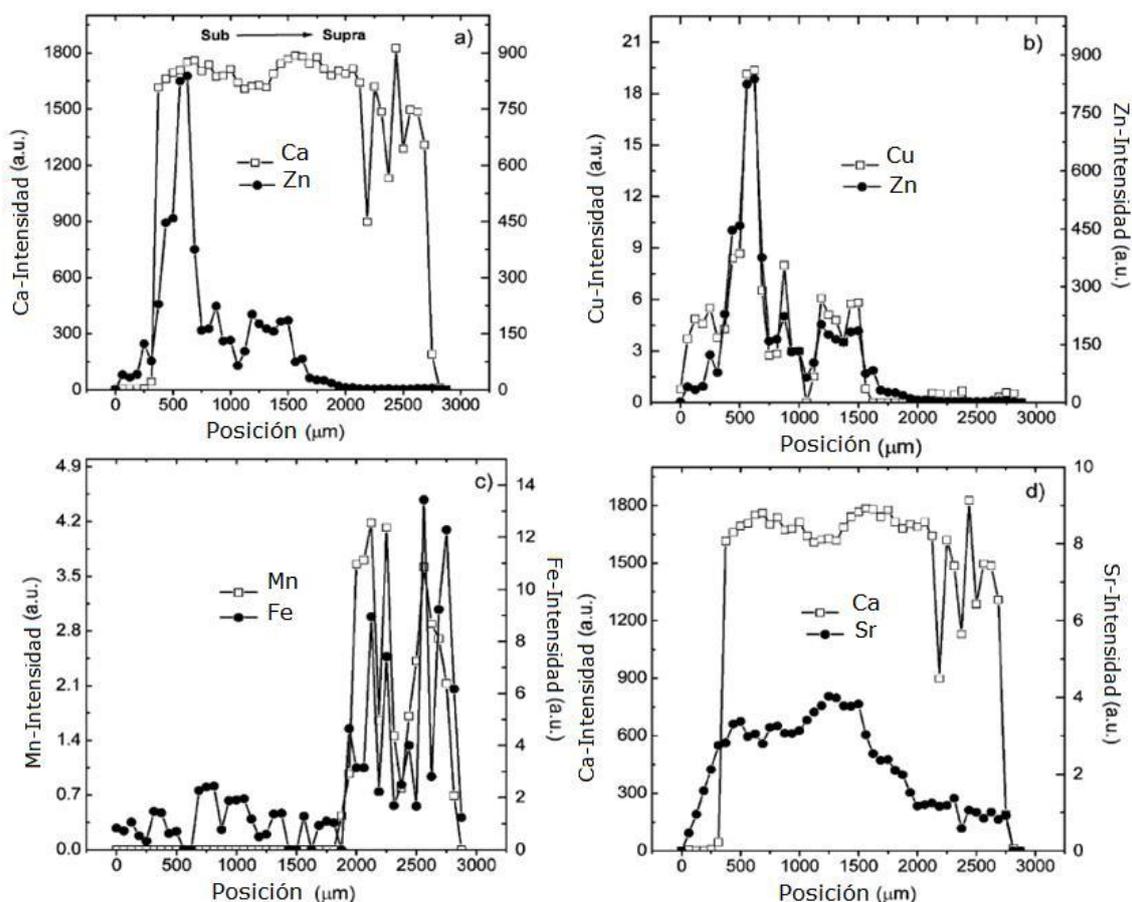


Figura 8-8. Inter-comparación en intensidades de pares de elementos en el barrido lineal sobre la muestra HDC-3, a) Ca-Zn; b) Cu-Zn; c) Mn-Fe; d) Ca-Sr.

Los resultados tales como los que se obtienen de las Figura 8-7 y Figura 8-8 muestran que Zn está localizado principalmente cerca de la superficie dental pero no cerca de la superficie más externa, o sea la que está en contacto con la saliva. Esto podría indicar que los fluidos orales son más ricos en cationes de zinc que en el caso de la saliva y, como su pH está cerca de 6 ó 7, esas condiciones parecen promocionar la adquisición e interacción de  $\text{Zn}^{2+}$  con los grupos fosfatos de la superficie y paralelamente también favorecerían la calcificación de cálculo en contacto con la superficie dentaria. Estos hallazgos estarían en acuerdo con ensayos practicados en soluciones de zinc y minerales de fosfatos de calcio sintético[12].

Las distribuciones unidimensionales de Cu y Zn fueron usadas para realizar un análisis semi-cuantitativo por medio de las curvas de calibración. La Figura 8-9 muestra los perfiles de concentración obtenidas. En los resultados mostrados en la sección 6.5 se determinaron las concentraciones elementales en las muestras masivas de cálculo supra y subgingival. Una comparación de esos hallazgos con los presentados aquí es dificultosa dado que la información superficial se pierde en el análisis masivo o de bulk. Además la preparación de muestras es bien diferente. No obstante, una tendencia gruesa se puede

ver estimando una media de la concentración en las partes de ambos tipos de cálculo para hacer una comparación con los resultados del análisis masivo. Procediendo de esta manera, un acuerdo bastante bueno se observa; por ejemplo, para Zn la concentración en bulk en cálculo subgingival es de  $(280 \pm 230)$  ppm y el promedio de concentración en el mapeo lineal resultó ser  $(555 \pm 460)$  ppm mientras que en cálculo supragingival la concentración en bulk resultó  $(55 \pm 58)$  ppm y en el barrido promediado arrojó como promedio  $(74 \pm 89)$  ppm.

Ha sido reportado por otros autores que la concentración Zn en cálculo subgingival es cerca de cuatro veces más alta que la concentración de Zn en cálculo supragingival[11]. Este resultado está en acuerdo con nuestros datos, Figura 8-9. Más aun, algunos autores reportaron un comportamiento similar de zinc también en huesos[13]. En aquel trabajo los autores mostraron que el zinc detectado en osteones (estructura laminar ósea alrededor de los canales Harvesianos donde pasan pequeñas arterias) no estaba uniformemente distribuido, alcanzando una concentración más alta en la superficie Harvesiana ósea. También encontraron que éste estaba co-distribuido con una proteína de fosfatasa alcalina (ALP), que indicaría una positiva contribución a la mineralización ósea. La no-uniforme distribución de Zn, Cu y Sr principalmente, indican que los procesos de mineralización son esencialmente diferentes.

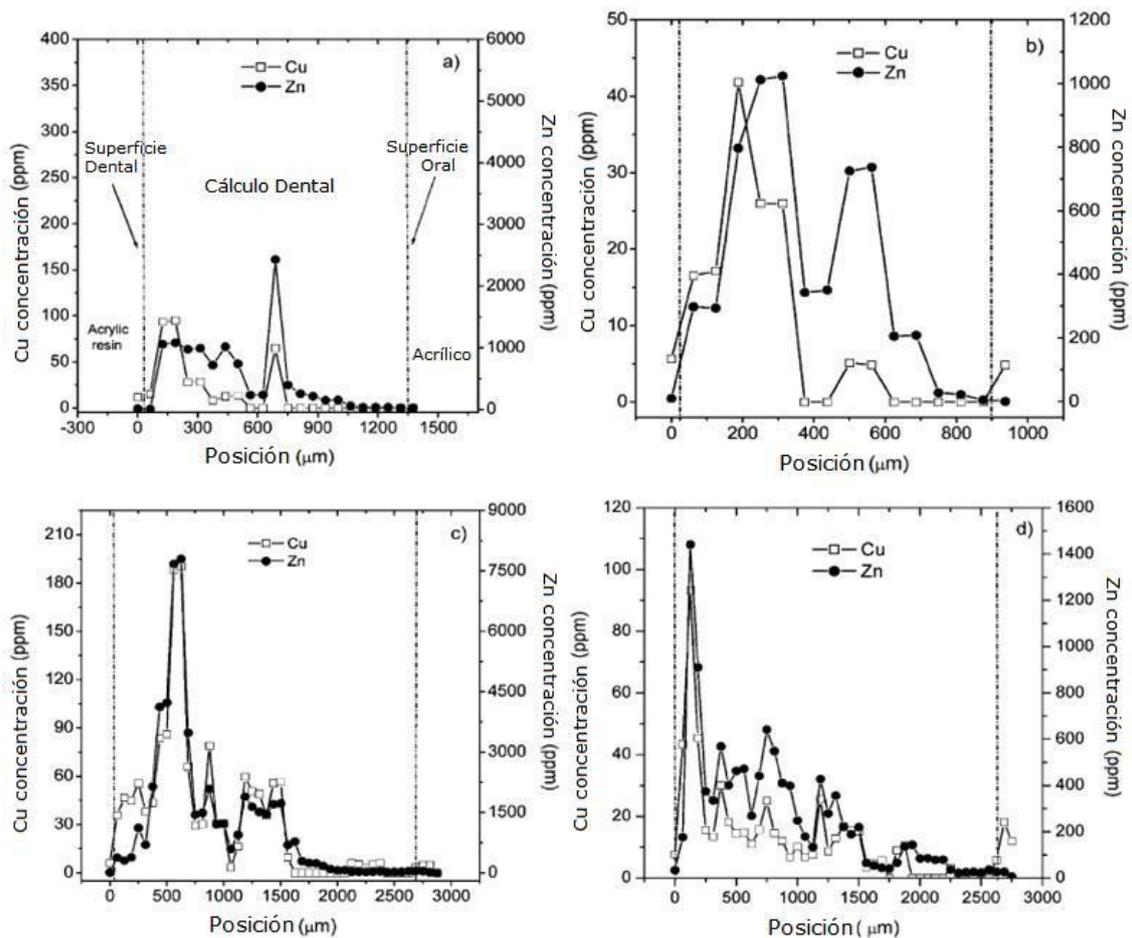


Figura 8-9. Perfiles de concentración elemental de Cu y Zn medido a lo largo del barrido lineal, a) HDC-1; b) HDC-2; c) HDC-3; d) HDC-4.

La gran correlación entre Cu y Zn graficada en la Figura 8-9 (el coeficiente de correlación calculado en cálculo subgingival fue de 0.74) indican que ambos elementos tienen un comportamiento químico muy similar respecto de los grupos aniónicos en el tejido mineralizado[14]. Un coeficiente de correlación similar también fue obtenido entre Cu y Zn en el análisis masivo de 34 muestras de cálculo descrito en la sección 6.5. Debido a la buena linealidad mostrada, el cociente Cu/Zn puede ser usado como indicador de crecimiento anómalo de células que está asociado con cambios en los niveles de cobre y zinc. Este cociente ha sido usado y es útil para establecer un índice de actividad de enfermedad en pacientes con leucemia linfocítica crónica[15]. Aparte, Gal *et al.* han sugerido que el cociente Cu/Zn podría ser usado

como indicador de desarrollo de tumores ginecológicos malignos como el cáncer de ovario[16], por determinación de Cu/Zn en muestras de suero. Se podría llegar a un resultado similar si se calcula esta razón en cálculo subgingival dado que éstos están en contacto con exudado gingival el cual tiene origen sérico.

Investigaciones futuras podrían plantearse en tratar de esclarecer las razones reales de la alta concentración de Cu y Zn en la porción de cálculo subgingival contigua a la superficie dentaria. La acumulación de estos dos elementos podría tener origen bacteriano y proteico presentes en los primeros estadios de mineralización de la placa. Ellos podrían interactuar con las fases de fosfatos de calcio formadas inhibiendo el crecimiento y permitiendo la acumulación de fases más solubles[17]. Otra posible fuente de esos iones podría ser por procesos de desmineralización que ocurren en la superficie dentaria en los primeros momentos de la formación de tártaro. En ambos casos, la magnitud de la variación local de pH será un factor importante.

Una mejor comprensión de los mecanismos de formación del cálculo dental humano también puede ser extendida por el estudio de la incorporación de estos iones dentro de las principales estructuras que conforman el tártaro. Estudios en el medio local circundante de Zn en cálculo subgingival recientemente han sido reportados por otros autores[18]. Es también importante considerar los otros varios factores que también afectan a la aparición de éstos depósitos pétreos, tales como hábitos alimenticios, medicamentos y enfermedades de los pacientes.

En el siguiente capítulo se ahondará más en el tema de la correlación entre Cu-Zn que a este nivel los resultados han mostrado con toda claridad el evidente paralelismo entre ambos iones como no ha sido hecho antes. Además también se investigarán las correlaciones locales entre otros elementos trazas que ya evidenciaron este comportamiento en la sección 6.5 donde fue hecho a nivel masivo. Estudiar la variación de las estructuras cristalinas a través de las fases de cálculo dental y tejido dentario puede proveer información sustancial, en el próximo capítulo se presenta una forma alternativa de estudiar este aspecto usando también  $\mu$ FRX.

### Referencias

- 1 A. Iida, T. Matsushita and Y. Gohshi, *Nucl. Instrum. Methods A*, (1985) **235**, 597.
- 2 M. Knuutila, R. Lappalainen and V. Kontturi-Närhi, *Scand. J. Dent. Res.*, (1980) **88**, 513.
- 3 G. S. Ingram, C. P. Horay and W. J. Stead, *Caries Res.*, (1992) **26**, 248.
- 4 R. Z. LeGeros, *J. Dent. Res.*, 1977, **56**(Special Issue A), IADR Abstr.52.
- 5 J. R. Rest, *Br. J. Nutr.*, (1976) **36**, 243.
- 6 C. A. Pérez, M. Radtke, H. J. Sánchez, H. C. N. Tolentino, R. T. Neuenschwander, W. Barg, M. Rubio, M. I. S. Bueno, I. M. Raimundo and J. J. R. Rohwedder, *X-Ray Spectrom.*, (1999) **28**, 320.
- 7 M. Radtke, C. A. Pérez and W. Barg, *Activity Rep. LNLS 97-98*, (1999) **6/7**, 15.
- 8 P. Wobrauschek, P. Kresgsamer, W. Ladisich, R. Rieder and C. Strel, *Spectrochim. Acta B*, (1996) **48**, 143.
- 9 P. Van Espen, K. Janssens and J. Nobels, *Chemo Lab*, (1986) **1**, 109.
- 10 MATICK, Matlab Mathwork, MA, 1995.
- 11 M. Knuutila, R. Lappalainen and V. Kontturi-Närhi, *Scand. J. Dent. Res.*, (1979) **87**, 193.
- 12 H. Davey, G. Emberry and D. Cummins, *Caries Res.*, (1997) **31**, 434.
- 13 S. Gomez, R. Rizzo, M. Pozzi-Muzelli, E. Bonucci and F. Vittur, *Bone*, (1999) **25**, 33.
- 14 M. Knuutila, R. Lappalainen, M. Rajala and H. Markkanen, *Scand. J. Dent. Res.*, (1983) **91**, 130.
- 15 Y. Beguin, F. Brasseur, G. Weber, J. Bury, J. M. Delbroux, I. Roelandts, G. Robaye and G. Fillet, *Cancer*, (1987) **60**, 1842.
- 16 D. Gal, S. Lischinsky, M. Friedman and O. Zinder, *Gynecol. Oncol.*, (1989) **35**, 246.
- 17 G. H. Nancollas and M. A. S. Johnsson, *Adv. Dent. Res.*, (1994) **8**, 307.
- 18 R. Barrea, C. A. Pérez, A. Y. Ramos, H. J. Sánchez and M. Grenón, *X-Ray Spectrom.*, (2003) **32**, 387.

# Capítulo 9

## 9.1 ANÁLISIS DE TRAZAS POR MICRO-FLUORESCENCIA DE RAYOS-X EN FASES DE FOSFATO DE CALCIO SOBRE INTERFACES DIENTE-CÁLCULO DENTAL USANDO RADIACIÓN DE SINCROTRÓN

En este capítulo fueron estudiados los tejidos dentales duros como la dentina y cemento junto con los depósitos calcificados (cálculo dental) en varias piezas dentarias de humanos adultos de la misma región geográfica. Un par de cortes transversales fueron practicados a nivel de la raíz dentaria de especímenes provenientes de pacientes que requerían una extracción dental. Sobre la superficie de corte quedaron expuestos para el análisis con haz de sincrotrón los distintos tejidos dentarios y el material de cálculo adherido a ellos. Un barrido sobre una trayectoria recta con el haz de dimensiones micrométricas fue practicado en las muestras para analizar la concentración elemental y por ende determinar la variación de éstos a lo largo del camino lineal. Las concentraciones de los elementos como K, V, Cu, Zn, As, Br y Sr mostraron diferentes comportamientos en las varias zonas estudiadas. Una posible conexión entre la dinámica de mineralización con los procesos biológicos en los tejidos duros es presentada en la sección de discusión. La variación de las concentraciones de los elementos mayoritarios Ca y P también fue medida y con ello fue calculado el cociente molar Ca/P de los fosfatos de calcio para hacer una estimación de la composición promedio y su cambio a través de las regiones analizadas. Los datos reunidos son importantes para mostrar un aspecto de los mecanismos de cristalización tanto en fase biológica (diente) como en fase mineral biológica (cálculo dental) de los cuales los reportes en este tema son escasos actualmente.

## 9.2 ENTORNO BIOLÓGICO Y QUÍMICO DE LA MINERALIZACIÓN

La aparición de depósitos pétreos en las superficies dentarias es el resultado de una conjunción de factores biológicos y químicos. Recordemos que las fases primarias de cristales al transcurrir el tiempo, van pasando por transformaciones estructurales en todo el volumen y posiblemente esto no se dé en forma homogénea sino que lo haría por estratos. Estas transformaciones de fase se producen al mismo tiempo que el cálculo dental va ganando mas masa y volumen con la nueva formación o tal vez adición de pequeños cristales de fosfatos cálcicos formados inicialmente en la saliva, pero esto está todavía en el campo de las conjeturas ya que a mi conocimiento no se ha comprobado experimentalmente. Muy probablemente el crecimiento de cálculo dental se produce por la conformación de nuevos cristales sobre otros preexistentes en la superficie ya que sería energéticamente más económico. En el caso de tejidos óseos, el crecimiento y conformación son mucho más complejos debido que es prácticamente controlado por variables biológicas que responden a una orden o función determinada, la formación de una vértebra responde a necesidades diferentes a la que se requiere de una falange de la mano por ejemplo. Entonces la distinción entre dos piezas óseas es hecha en base a la funcionalidad diferente a la que deben responder. Las formas y ritmos de crecimientos de las conchas de moluscos marinos que también están formadas por fosfatos de calcio básicamente, responden a dos necesidades principales, la de proteger al animal de su parte blanda contra depredadores y además también debe soportar la abrasión del medio externo. En forma directa o indirecta el exterior también puede moldear la forma y el crecimiento de los fosfatos de calcio biológicos. Por otro lado, en cálculo dental claramente ni su formación ni su ritmo de crecimiento responden a ninguna funcionalidad biológica entonces ésta quedará determinada por el medio únicamente. Como se mencionó anteriormente, intervendrán variados factores tanto en la aparición como en el subsiguiente crecimiento del cálculo dental. Recordemos que algunos de ellos eran por ejemplo la variación local de pH, la dieta del individuo, posible medicación, la actividad bacteriana, la flexibilidad estructural inherente de la hidroxapatita y la abundancia en solución (saliva y fluidos gingivales) de iones sueltos de concentración variable. Justamente sobre este último factor es que esta sección dedica su estudio en parte también motivado por el trabajo y los resultados previos mostrados en la sección anterior. Se pretende estudiar la influencia de los elementos trazas en el mecanismo de formación del cálculo dental humano. Hay una gran variedad de iones presentes en saliva y en los exudados gingivales tales como  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{Sr}^{2+}$  que pueden intercambiarse con  $\text{Ca}^{2+}$  y otros como  $\text{F}^-$  o  $\text{Cl}^-$  que pueden suplantar  $\text{PO}_4^{3-}$  en los sitios de las redes cristalinas. En determinados niveles, la abundancia de iones

específicos pueden afectar la estabilidad estructural de las fases; como ya se dijo, Zn situado en sitios del cristal produce defectos estructurales afectando el subsiguiente crecimiento[1]. Fluoruros, carbonatos, pirofosfatos y sodio pueden notoriamente influenciar la velocidad de maduración de las apatitas[2]. En metalurgia, es bien conocido el hecho de que las trazas de metales pueden modificar mucho las propiedades de los materiales; en ese sentido, por ejemplo se ha reportado que Sr afecta la dureza y densidad de los tejidos duros dándole un mejor mecanismo de respuesta[3].

La difusión de iones en fosfatos de calcio como lo son los cálculos dentales y dientes debe ser estudiado para poder medir su grado de participación en los procesos de mineralización de estas fases. La posible injerencia de los iones trazas y su relativa movilidad a través de la red cristalina serían dos cualidades importantes a tener en cuenta por el rol que interpretarían para los procesos de fabricación de materiales sintéticos que simulan huesos. Además, esto también tendría significativa importancia en la elaboración de prótesis dentales y optimización de amalgamas[4].

En esta sección, presento un estudio semi-cuantitativo de las concentraciones de elementos trazas en las diferentes regiones e interfaces dentarias y de cálculo dental con el propósito de determinar el grado de incidencia de estos elementos en la cristalización y sus implicancias biológicas de igual modo. Además, el barrido lineal a lo largo de la dirección de crecimiento del cálculo y de tejido dentario podrá dar información del grado de maduración de las fases en esas diferentes regiones es decir, obtener una *vista congelada* del mecanismo de crecimiento y maduración sucedido durante el tiempo de desarrollo.

### 9.3 DESARROLLO DEL EXPERIMENTO

Se prepararon siete piezas dentarias con cálculo supragingival adheridos a ellas que fueron extraídas de pacientes adultos que requerían extracción debido a indicaciones odontológicas. Los sujetos eran de aproximadamente la misma edad, estado general de salud y no tomaban medicación alguna. El tiempo estimado de los cálculos fue de más de un año de formación. Las muestras fueron limpiadas con agua destilada, secadas al aire en condiciones normales y almacenadas en contenedores herméticos de baja humedad. Luego fueron embebidas en resina de acrílico para que una vez endurecida la pasta acrílica ser cortadas transversalmente en dos secciones paralelas a la altura de las raíces formando, todo el conjunto, una placa delgada ( $\approx 1\text{mm}$  de espesor) con el tejido dentario y cálculo expuestos en ambas caras listas para ser analizadas. Se practicó un muy leve lijado en las caras y después fue chequeado en el microscopio si no fue contaminada con partículas. En la Figura 9-1 se muestra la superficie de la muestra M7 con los diferentes tipos de tejidos y cálculo dental claramente distinguidos.

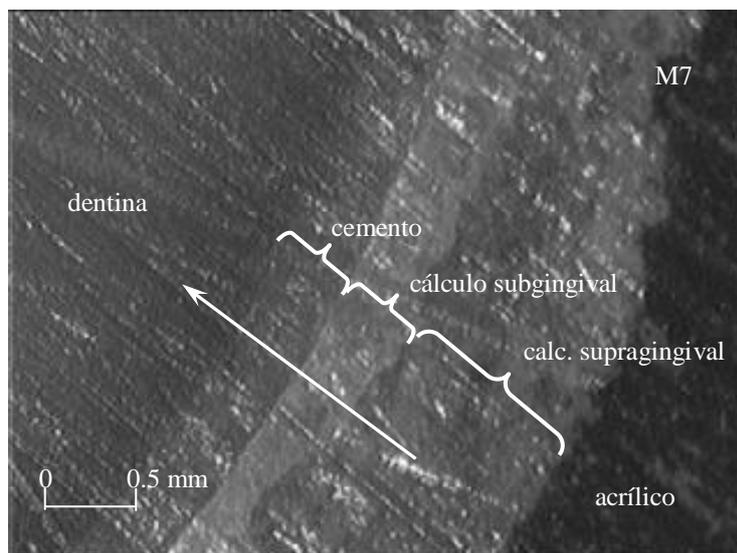


Figura 9-1. Una imagen de la muestra M7 donde se exhiben las zonas de análisis. La flecha indica la dirección y trayectoria de barrido. Se aprecian diferenciablemente, las zonas de tejido y cálculo dental.

El barrido lineal fue llevado a cabo irradiando en micro-áreas de la muestra sobre un camino predefinido recto atravesando las zonas de interés convenientes como se observa en la Figura 9-1. En todos los casos, el primer espectro fue tomado en la zona de acrílico, es decir el barrido siempre comenzó

en esta zona y luego moviendo la muestra con respecto al haz se analizó consecutivamente, el margen externo de cálculo (que originalmente era bañada por los fluidos orales, ahora en contacto con acrílico), la interface cálculo supra-subgingival, la interface cálculo subgingival-cemento, la interface cemento-dentina y obviamente también se analizó las zonas intermedias.

Las mediciones han sido tomadas en la estación de micro-fluorescencia de la línea XRF instalada en el LNLS, Campinas, Brasil. El haz blanco producido por el anillo de almacenamiento fue concentrado por un monocapilar de vidrio en pequeñas áreas sobre la muestra produciendo un punto de 30  $\mu\text{m}$  de diámetro aproximadamente[5]. El espectro de rayos-X del haz incidente después del monocapilar es mostrado en

Figura 9-2. Los experimentos se realizaron en atmosfera de aire en condiciones normales de presión y temperatura usando la geometría convencional ( $45^\circ+45^\circ$ ) para la excitación. Aquí también se ubicó un microscopio óptico en frente de la superficie de la muestra para elegir el área conveniente para análisis. Un detector de estado sólido Si(Li) dispersivo en energías fue usado para analizar la radiación fluorescente y dispersada proveniente de las muestras; la resolución del detector fue de 160 eV para la línea  $K\alpha$  de Mn. Un filtro de aluminio de 0.5 mm de espesor fue interpuesto entre el detector y la muestra con el objeto de atenuar el alto flujo de la línea de  $K\alpha$  de Ca y así mantener los tiempos muertos del sistema electrónico debajo del 15%. El tiempo vivo elegido convenientemente fue de 100 segundos por pixel o punto de barrido. La muestra fue movida con respecto al haz por medio de motores de paso que controlaban el porta-muestra. El número de puntos tomados a lo largo del barrido varió entre 30 y 60 según fue necesario. Demás detalles del arreglo experimental están mostrados en la Tabla 9-1.

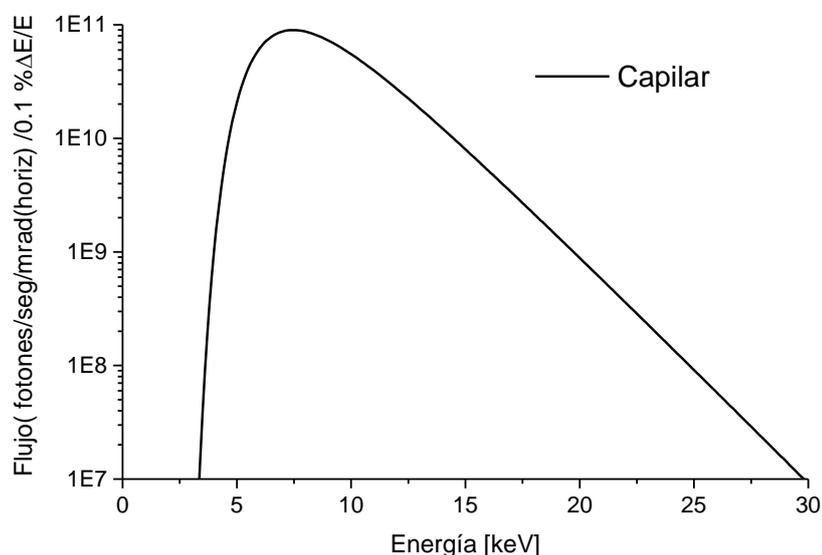


Figura 9-2. Distribución del flujo de fotones en función de la energía a la salida del monocapilar.

Tabla 9-1. Detalles del sistema de detección y focalización conjuntamente con las características del haz incidente y parámetros de medición.

Arreglo Experimental	
Haz de Sincrotrón	Focalización
Espectro: haz blanco	Sistema focalizador: microcapilar vítreo
Energía Crítica: 2.08 keV	Resolución espacial: 30 $\mu\text{m}$ diámetro
Flujo fotónico: $3 \times 10^{12}$ ph/sec. mrad. (h)	Posicionamiento de muestra: plano XY con resolución 1 $\mu\text{m}$
0.1%	
Sistema de Detección	Medición
Detector: Si(Li)	Área de análisis: $2 \times 2 \text{ mm}^2$
Resolución: 160 eV para $K\alpha$ de Fe	Longitud de barrido: 37.5 – 75 $\mu\text{m}$
Analizador multicanal: 8 Kb, 15 $\mu\text{s}$ DT	Tiempo de medición: 100 sec/pixel (LT)
Tiempo muerto: $\leq 15\%$	Atmósfera : aire
	Geometría: $45^\circ - 45^\circ$
	Filtro: aluminio 0.5 mm

De nuevo, los espectros fluorescentes fueron analizados con el paquete de programas incluidos en AXIL[6]. Las intensidades netas se calcularon teniendo en cuenta los picos escapes y picos sumas de las líneas más intensas. Polinomios ortogonales de grado 3 o 5 fueron usados para ajustar el fondo. Se realizó un análisis semi-cuantitativo de las concentraciones elementales por medio del algoritmo de parámetros fundamentales incluido en el mismo paquete de programas de AXIL. En los cálculos se usaron las compilaciones de sección eficaz de McMaster *et al.*[7] y Heinrich[8], las probabilidades de emisión fueron tomadas de Scofield[9], y Khan y Kamiri[10], los datos de producción de fluorescencia se obtuvieron de la compilación de Bambynek[11] *et al.*; y los incertezas totales se computaron por propagación. Debido a las características de la muestra y a la imposibilidad de producir estándares externos o internos convenientes, se ha usado un método alternativo de calcular las concentraciones. Muchos algoritmos para cuantificar pueden ser aplicados si algunos elementos presentes en las muestras son usados como estándares internos para realizar la calibración[12]. Esto es sólo posible cuando la concentración elemental de aquellos elementos son conocidos con un cierto grado de confianza. En este trabajo, los elementos Ca y P en cemento y dentina fueron usados como estándares internos debido a la poca variabilidad de sus valores en un amplio rango de tipos de muestras en individuos humanos y a la gran disponibilidad de esos datos en incontables reportes. El valor medio de los coeficientes de calibración fue entonces calculado para esos elementos en cada muestra y el error relativo obtenido fue menor al 15%.

La composición promedio de las fases de fosfatos de calcio en cada pixel irradiado en cada muestra, fue estimada por medio de la razón molar Ca/P los cuales fueron computados usando las concentraciones medidas de calcio y fósforo. Ese valor corresponde o está asociado al área circular de 30  $\mu\text{m}$  irradiada por el haz. Se puede estimar la fase promedio en esta área debido a que usualmente los tamaños de los cristalitas de las diferentes fases coexistentes son de aproximadamente de 10  $\mu\text{m}^2$ [13]. Este método simple de determinación de fases promedio mostraron un buen acuerdo con resultados provenientes de otros métodos más específicos como los cristalográficos que fueron reportados previamente por otros autores[14]. De acuerdo a la Tabla 6-3, esta razón solo puede variar entre 1.0 y 2.0 dependiendo de la abundancia de cada fase. Un cociente molar Ca/P cercano a 1.0 correspondería a una fase de fosfatos de calcio débil, poco compacto que comúnmente se encuentra en los primeros estadios de la mineralización de hidroxiapatita; un cociente molar Ca/P cercano a 2.0 corresponde a una fase más compacta, estable, consistente, la cual se encuentra en el último intervalo de mineralización de hidroxiapatita. Es necesario notar que, calculando el valor molar Ca/P, varias fuentes de incertezas como tamaño de partículas, efectos de textura de superficie, etc. son minimizados y otros factores geométricos tampoco están presentes.

## 9.4 IMPLICANCIAS DE LOS RESULTADOS OBTENIDOS

### 9.4.1 Elementos minoritarios y trazas

Varias consideraciones acerca de los resultados de los análisis semi-cuantitativos para elementos trazas se pueden hacer. En trabajos previos usando espectrometría de absorción atómica[15] mostraron una correlación lineal entre Cu y Zn para muestras masivas de cálculo dental. Como se aprecia en las Figura 9-3, los resultados obtenidos en este trabajo en todos los barridos medidos están en acuerdo con los obtenidos en la sección previa. Considerando la distribución espacial de Zn y Cu en cálculo dental, esos elementos exhibieron un alto valor en concentración cerca de la superficie más externa de cálculo, solo dos de las siete muestras analizadas mostraron una concentración elevada en zonas intermedias también. Para el caso de Zn, el valor de la concentración de éste cerca de la superficie externa fue 10 veces la concentración en las regiones más internas, las contiguas a la superficie dental donde van adheridas. Esto podría ser como consecuencia de la difusión de Zn presente en la estructura de la hidroxiapatita hacia la superficie externa y a la absorción iónica de este elemento de los fluidos orales circundantes. La migración de iones de Zn hacia la superficie externa probablemente es como resultado de un efecto colateral de la calcificación de cálculo puesto que estructuras intermedias no suficientemente compactas contienen diferentes cantidades de fases amorfas o deficientes de calcio.

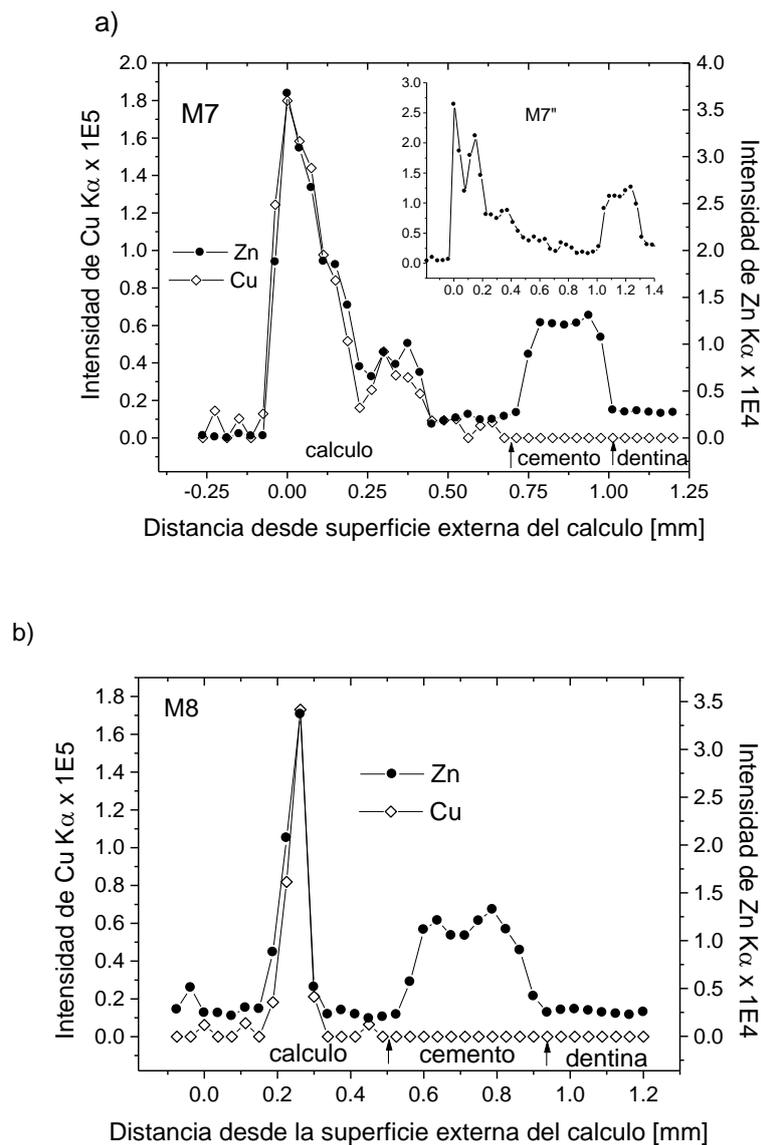


Figura 9-3. Intensidades fluorescente de Cu y Zn medidas a lo largo del barrido. a) los picos están situados sobre el borde exterior del cálculo. El recuadro interno muestra un barrido en las mismas interfaces a 2 mm en paralelo desde donde se midió el gráfico grande. b) aquí, los picos se hallan en una zona interna.

Mientras esas estructuras intermedias evolucionan hacia estructuras más compactas, es decir la hidroxiapatita, sitios de vacancia son retomados por átomos de Ca desplazando así a los átomos de Zn hacia regiones de menos estabilidad estructural. Una difusión de zinc hacia regiones internas de cálculo dental no debería ser esperado debido a que en esas zonas las fases son más parecidas a las de la hidroxiapatita[16]. De esta forma, la difusión solo puede tomar lugar en la dirección hacia zonas donde las fases tienen baja cristalinidad[17]. Una posible evidencia de este hecho se observa en la Figura 9-3<sup>a</sup>, la figura inserta corresponde al perfil de concentración de Zn medido a 2 mm de separación respecto al perfil mostrado en la figura principal. El gradiente de Zn en la figura interna muestra dos picos cerca de la superficie más externa y una leve cola extendida hacia regiones internas; por otro lado, en la figura principal no se aprecia tal cola y la intensidad de zinc es mayor. Esto sugeriría estos iones se difundirían hacia las zonas externas del cálculo dental. Este hecho también fue observado para iones de cobre, probablemente debido a que Cu y Zn forman enlaces similares con los grupos aniónicos[14] y poseen radios atómicos parecidos entonces sus perfiles de concentraciones similares responden al hecho de sus equivalencias químicas.

Tabla 9-2. Valores promedio de concentraciones elementales y razón molar Ca/P calculadas en cada región de la muestras.

Elemento	Zona		
	Cálculo	Cemento	Dentina
P [wt.%]	20 ± 2	16 ± 2	15 ± 4
K [wt.%]	1.5 ± 0.7	1.1 ± 0.6	0.7 ± 0.3
Ca [wt.%]	41 ± 2	37 ± 6	35 ± 6
V [ppm]	58 ± 30	38 ± 10	43 ± 20
Cu [ppm]	6 ± 5	-	-
Zn [ppm]	364 ± 200	484 ± 200	144 ± 10
As [ppm]	-	0.7 ± 0.3	-
Sr [ppm]	230 ± 30	200 ± 50	150 ± 50
Molar Ca/P	1.6 ± 0.1	1.7 ± 0.1	1.9 ± 0.2

En la región de tejido dental, la concentración de Zn presentó significantes diferencias entre dentina y cemento siendo más o menos constante sobre esta última región y exhibiendo una caída en la interface con la dentina como se determinó en todas las muestras analizadas. El contenido promedio de zinc en cemento resultó  $484 \pm 200$  ppm, ver Tabla 9-2, el cual es algo inferior al reportado por otros autores[18]. En dentina, la concentración promedio de Zn resultó ser de  $144 \pm 10$  ppm, el cual está en acuerdo con resultados previos[19]. Una comparación entre diferentes trabajos debería ser hecha cuidadosamente porque el contenido de zinc en tejidos dentales es sensible al tipo de dieta del sujeto[20] y también a factores ambientales[21], por otro lado también se reportó que la concentración de Zn tiende a decrecer con la edad del individuo. Sin embargo, es muy notorio el contraste en contenido de zinc en ambos tipos de tejidos. Esto podría estar relacionado con las diferentes exigencias biomecánicas a que son demandadas esos tejidos; por ejemplo, cemento, debería tener buena respuesta mecánica a la compresión a la que son sometidas las piezas dentarias en la masticación y por otro lado también debe poseer un grado de resistencia contra la desmineralización en un eventual medio ácido[22]. Con respecto a Cu, muy por el contrario de lo observado en cálculo dental, no se observó el mutuo comportamiento entre Zn y Cu en ningunas de las muestras analizadas.

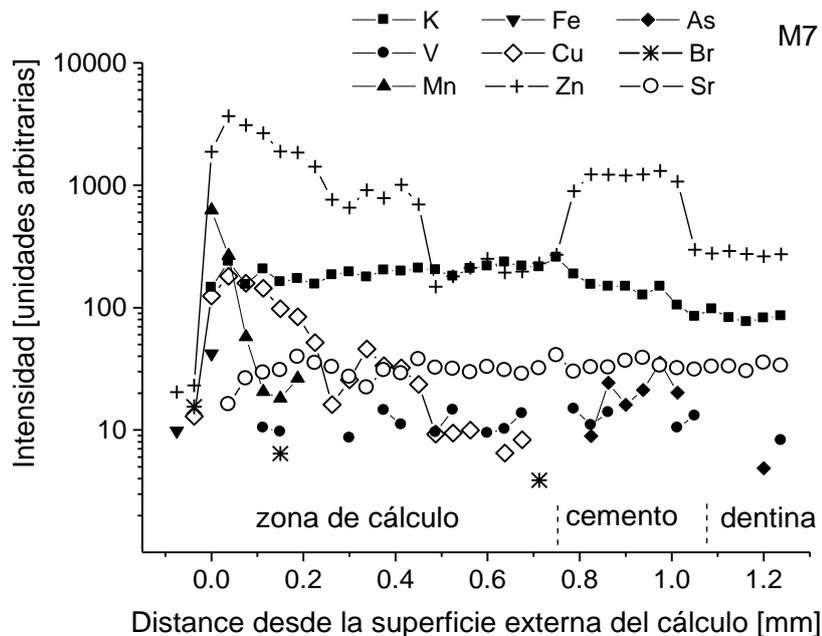


Figura 9-4. Variación de las intensidades de línea fluorescente de los demás elementos minoritarios analizados en las varias zonas de las muestras.

Consideremos ahora los otros elementos trazas analizados en este trabajo de los cuales algunos resultados se pueden notar. Las tendencias en los valores de concentración encontrados en las diferentes zonas para los elementos trazas están compilados en la Figura 9-4. En esa figura se aprecia que los elementos K, V y Sr mostraron valores casi constantes en cálculo y en tejido dentario; sus concentraciones medias están en muy buen acuerdo con los reportados en la literatura[23,24] empleando diferentes métodos de análisis. Potasio está relacionado con la biomineralización de la hidroxiapatita[25] y juega un importante rol en el proceso de maduración de los fosfatos de calcio[26] y disminuye a medida que la mineralización avanza. De acuerdo a esto, la presencia de este elemento en cálculo dental y a muy bajos niveles en los tejidos dentarios sería esperable. Un comportamiento similar de Sr en cálculo y en diente sería también expectable debido a que este elemento ayuda a evitar la disolución de hidroxiapatita e incrementa la consistencia de las fases en general. Esto es bien conocido y aplicado en los tratamientos contra la osteoporosis[27] debido a los efectos benéficos para restablecer la dureza en los huesos. En el caso de Mn fue observado en sólo una muestra, aquella que se muestra en la Figura 9-4, su rápido decaimiento en concentración a partir de las regiones más exteriores de cálculo dental sugieren un efecto de absorción. Arsénico fue solo detectado en cemento y su concentración calculada es comparable a la encontrada por otros autores usando análisis por activación[28]. La presencia de vanadio es de poca importancia, en general este elemento es considerado como una impureza en esta clase de tejidos duros. Las concentraciones de elementos Br y Mn fueron determinados cerca de los límites de detección y conclusiones definitivas no pueden ser aseguradas.

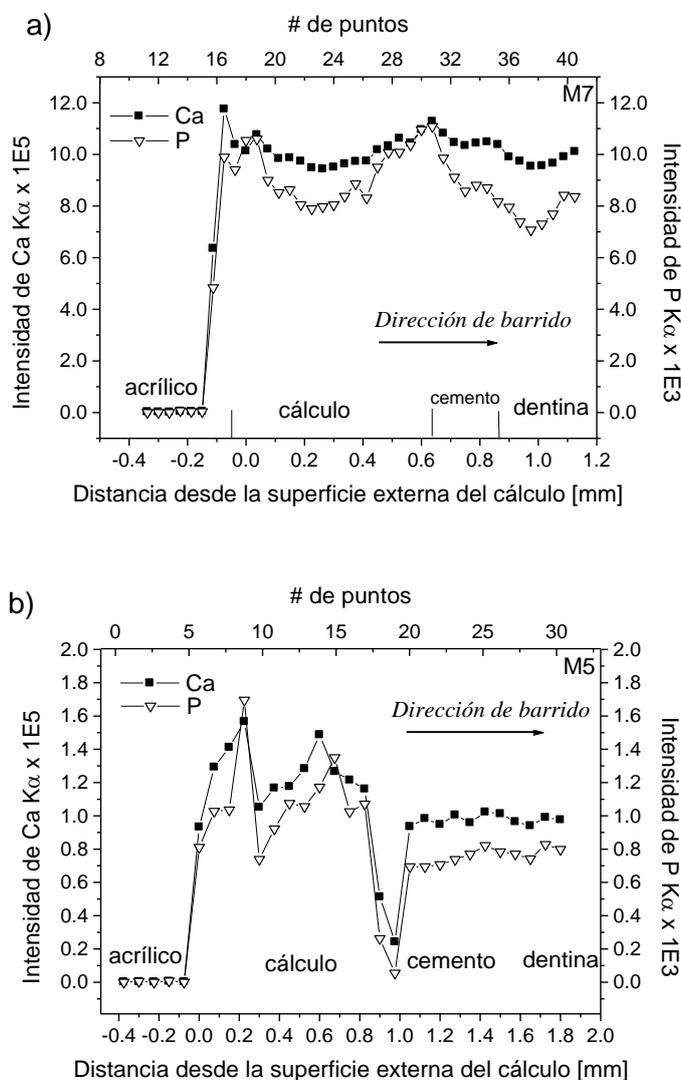


Figura 9-5. Intensidades de Ca y P a lo largo del barrido lineal, a) mostraron una variación suave en todas las fases, b) ídem al anterior excepto por una abrupta caída en la interface cálculo-cemento debido a fracturas o porosidades en la superficie.

## 9.4.2 Elementos mayoritarios

En las Figura 9-5 se muestran las relativas intensidades de Ca y P medidos sobre la trayectoria de barrido sobre la muestra. Las intensidades de calcio y fósforo presentaron valores más uniformes en la zona dental que en cálculo dental. Esas variaciones en intensidad en la región de cálculo dental podrían ser atribuibles a varios factores como los debido a efectos de superficie[29] es decir, la topografía de superficie en cálculo, otro efecto es la inhomogeneidad en la composición debido a la coexistencias de las varias fases de fosfatos de calcio que componen el cálculo y por último, en menor incidencia, los efectos de porosidad.

El primer factor mencionado es más evidente en la Figura 9-5 en la interface cálculo-cemento. Una característica similar fue observado por otros autores[30] y corresponde al marcado cambio de fases en esta zona de interface. La abrupta caída en intensidad en 0.2 mm (pixel 10) corresponde a una pequeña fractura en esa parte de cálculo dental confirmada por observación con el microscopio óptico.

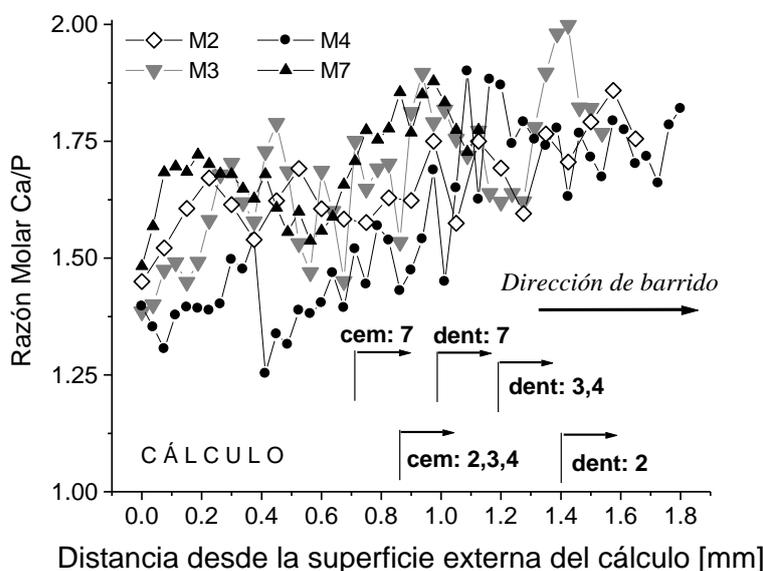


Figura 9-6. Tendencia mostrada por la razón molar Ca/P en las fases analizadas en las muestras 2, 3, 4 y 7. Las flechas indican los límites de cada zona de las muestras correspondientes.

La variación de las razones molares Ca/P a lo largo de los caminos de barrido realizados en las muestras son mostradas en la Figura 9-6. En la zona de tejido dental presenta una razón molar Ca/P más alta en dentina que en cemento. En dentina, la razón molar resultó ser de  $1.9 \pm 0.1$  mientras que en cemento el cociente Ca/P dio  $1.7 \pm 0.1$ , este valor está más cercano al cociente molar de la hidroxiapatita pura. Recordemos que la fase más estable, más densa y dura entre los fosfatos de calcio es justamente la hidroxiapatita, esto implicaría que el cemento es un material con propiedades muy similares a aquella. Consideremos también que la función biológica de cemento, que es la capa exterior ósea de las piezas dentarias a nivel de la raíz, es soportar estrés mecánico principalmente y también acciones químicas externas. En cambio, dentina, la porción interna del tejido dentario, es un tejido blando. Su cociente molar Ca/P posiblemente corresponda a una mezcla de hidroxiapatita, CaO y  $\beta$ -TCP. No debe olvidarse también tener en cuenta el efecto de la porosidad para una elucidación más precisa[31]. En la parte de cálculo, la Figura 9-6 muestra que en el sentido interior a exterior, la tendencia general de las razones molares Ca/P es decreciente, en acuerdo con los resultados mostrados en previos trabajos[32]. Sin embargo, la existencia de regiones dentro de cálculo dental pueden exhibir una tendencia opuesta como se puede ver en la muestra M7. Esto podría ser explicado por la abundancia de ciertos granos cristalinos de forma aplanada[12] de elevado Ca/P que eventualmente forman pequeños *clústeres*. En la última columna de la Tabla 9-2 se muestra la razón molar promedio sobre todas las muestras analizadas en cada región de estudio. En cálculo dental el cociente molar promedio dio  $1.6 \pm 0.1$  el cual se corresponde con los valores encontrados para cálculos maduros analizados por masa; por otro lado, en la región cercana a la más externa, la razón molar varía entre 1.25 y 1.50, indicando que esas zonas estarían compuestas de fases

primarias de fosfatos de calcio, sin descartar otras posibles componentes como OCP y W. La presencia de estas fases y su baja cristalinidad en la superficie externa del cálculo sugiere que un proceso de agregación-nucleación[33] es el más apropiado mecanismo para describir la aparición y formación de depósitos pétreos dentales.

## 9.5 COMENTARIOS Y NOTAS FINALES DEL CAPÍTULO

Los elementos trazas no mostraron una clara influencia en la cristalización o en el proceso de maduración de cálculo dental, evidenciado al considerar la forma de variación de las concentraciones en el barrido transversal. Una excepción de esto es mostrada por Zn, elemento que tiende a acumularse cerca de la superficie externa del cálculo durante su maduración. Mientras esta progresa, Zn es empujado hacia zonas de menor cristalinidad inhibiendo en alguna forma un ulterior crecimiento de cálculo. En acuerdo con esta aserción, el grosor del cálculo en las regiones de acumulación superficial de zinc fue menor que en las zonas de pobre contenido de Zn. Por otro lado, la correlación observada entre Zn y Cu sólo vista en cálculo dental es debida a diferentes razones, su similitud química principalmente. Ambos metales podrían ser usados como indicadores de la concentración media temporal, dado que ambos se acumulan en cálculo dental con el tiempo, y ya que estos provienen de los fluidos orales, podrían considerarse como bioindicadores de algunas enfermedades oncológicas.

La concentración de K en tejido dental fue menor que en cálculo en concordancia con el grado de mineralización que ambas fases poseen. En contraste, se encontró que la concentración de Sr en diente como en cálculo dental fueron muy similares significando que este ión es *transparente* tanto para los fosfatos de calcio biológico como del tipo mineral. Los resultados muestran que vanadio puede ser considerado meramente como una impureza y parece solo depender de condiciones ambientales o tipo de dietas dado que no fue hallado en todas las muestras. Estas mismas consideraciones también se aplicarían para los hallazgos de As en cemento.

Los resultados aquí mostrados indican que la fase cristalina de los tejidos dentales es más compacta que la correspondiente en cálculo dental. Además quedó evidenciada la poca estabilidad e inhomogeneidad de esta última debido a las fracturas y *clústeres* fácilmente detectados por notorias variaciones en los perfiles de concentración de Ca y P.

Con respecto a las variaciones del cociente molar Ca/P comenzando en tejido dental, estas mostraron que tanto dentina como cemento poseen similares composiciones de fase con alguna composición extra de carbonatos o CaO en la primera.

En cálculo dental el cociente Ca/P mostró un decrecimiento gradual desde los estratos internos hasta los más externos sugiriendo que la maduración de las fases de fosfatos se lleva a cabo en esa dirección. Este hecho apoyaría la hipótesis de que el cálculo dental crece por agregación de fases nuevas creadas sobre la superficie externa.

Se considera la posibilidad de usar un nuevo detector para bajas energías e implementando condiciones de vacío en futuras mediciones en la línea experimental D09 en el LNLS.

En base a resultados obtenidos en este capítulo, ha surgido la intención de estudiar la cristalinidad de las fases de fosfato de calcio como también su variación en forma radial y establecer u objetar la vieja presunción de que el mecanismo de crecimiento y maduración de cálculo dental se lleva a cabo en forma radial, es decir, por capas y que la cristalización da lugar a un gradiente en la cristalinidad. Para responder estas cuestiones se ha empleado el método de microanálisis por Espectrometría de Infrarrojo explotando las ventajas de un último aparato de infrarrojo en la línea SIMBAD, Frascati – Italia.

### Referencias

- 1 A. Bigi, E. Foresti, M. Gandolfi, M. Gazzano, N. Roveri, “Inhibiting effect of zinc on hydroxyapatite crystallization”, *J. Inorg. Biochem.* **58** (1995) 49–58.
- 2 J.D. Termine, R.A. Peckauskas, A.S. Posner, “Calcium phosphate formation in vitro”, *Arch. Biochem. Biophys.* **140** (1970) 318–325.
- 3 S.P. Nielsen, D. Slosman, O.H. Sorensen, B. Basse-Cathalinat, P. De Cassin, C.R. Roux, P.J.Meunier, “Influence of strontium on bone mineral density and bone mineral content measurements by dual X-ray absorptiometry”, *J. Clin. Densitom.* **2** (4) (1999) 371–379.

- 4 M.L. Carvalho, J.P. Marques, J. Brito, C. Casaca, A.S. Cunha, "Hg, Bi, Cu and Zn distribution in human teeth treated by dental amalgam measured by synchrotron microprobe", *Nucl. Instrum. Methods B* **196** (2002) 148–154.
- 5 M. Radtke, C.A. Pérez, W. Barg, *Activity Report LNLS 97–98*, 6/7, 1999, p. 15.
- 6 P. Van Espen, H. Nullens, F. Adams, "A computer analysis of X-ray fluorescence spectra", *Nucl. Instrum. Methods* **142** (1977) 243–250.
- 7 W.H. McMaster, N. Kerr del Grande, J.H. Mallet, J. Hubbell, "Compilation of X-ray Cross Sections", Report UCRL 50174, Sect 2. Rev. 1. Lawrence Radiation Laboratory, Livermore CA, 1969.
- 8 K. Heinrich, in: J. Brown, R. Packwood (Eds.), "X-ray Optics and Microanalysis", University of Western Ontario, Ontario, 1987, p. 67.
- 9 J.H. Scofield, "Exchange corrections of K X-ray emission rates", *Phys. Rev. A* **9** (1974) 1041–1049.
- 10 Md.R. Khan, M. Karimi, "K $\beta$ /K $\alpha$  ratios in energy-dispersive X-ray emission analysis", *X-Ray Spectrom.* **9** (1980) 32–35.
- 11 W. Bambynek, B. Crasemann, R.W. Fink, H.U. Freund, M. Mark, "X-ray fluorescence yields, Auger, and Coster–Kronig transition probabilities", *Rev. Mod. Phys.* **44** (1961) 716–813.
- 12 V. Zaichick, N. Ovchjarenko, S. Zaichick, "In vivo energy dispersive X-ray fluorescence for measuring the content of essential and toxic trace elements in teeth", *Appl. Radiat. Isotopes* **50** (2) (1999) 283–293.
- 13 T. Kodaka, Y. Ohohara, K. Debary, "Scanning electron microscopy and energy-dispersive X-ray microanalysis studies of early dental calculus on resin plates exposed to human oral cavities", *Scanning Microsc.* **6** (2) (1992) 475–486.
- 14 H. Mishima, H. Yamamoto, T. Sakae, "Scanning electron microscopy– energy dispersive spectroscopy and X-ray diffraction analyses of human salivary stones", *Scanning Microsc.* **6** (2) (1992) 487–494.
- 15 M. Knuuttila, R. Lappalainen, M. Rajala, H. Markkanen, "Copper in human subgingival calculus", *Scand. J. Res.* **91** (2) (1983) 130–133.
- 16 R. Rohanzadeh, R.Z. LeGeros, "Ultrastructural study of calculus–enamel and calculus–root interfaces", *Arch. Oral Biol.* **50** (1) (2005) 89–96.
- 17 R.Z. LeGeros, "Variations in the crystalline components of human dental calculus: I. Crystallographic and spectroscopic methods of analysis", *J. Dent. Res.* **53** (1974) 45–50.
- 18 D.D. Cohen, E. Clayton, T. Ainsworth, Preliminary investigations of trace element concentrations in human teeth, *Nucl. Instrum. Methods* **188** (1981) 203–209.
- 19 C.A. Pineda-Vargas, M.E. Eisa, U.M.E. Chikte, J.L. Conradie, "High resolution nuclear microprobe elemental mapping of teeth enamel–dentine interface exposed to acidic conditions", *Radiat. Phys. Chem.* **71** (2004) 937–942.
- 20 A. Attramadal, J. Jonsen, "The content of lead, cadmium, zinc and copper in deciduous and permanent human teeth", *Acta Odontol. Scand.* **34** (1976) 127–131.
- 21 K.M. Hambidge, C.E. Casey, N.F. Krebs, "Zinc. Trace Elements in Human and Animal Nutrition 2", Academic Press Inc., Orlando, 1986, pp. 1–109.
- 22 F. Brudevold, L.T. Steadman, M.A. Spinelli, B.H. Amdur, P. Grøn, "A study of zinc in human teeth", *Arch. Oral Biol.* **8** (1963) 135–144.
- 23 M. Knuuttila, R. Lappalainen, V. Kontturi-Närhi, "Concentrations of Ca, Mg, Mn, Sr and Zn in supra- and subgingival calculus", *Scand. J. Res.* **87** (1979) 192–196.
- 24 I. Hoyer, P. Gaengler, R. Bimberg, "In vivo remineralization of human enamel and dental calculus formation", *J. Dent. Res.* **63** (9) (1984) 1136–1139.
- 25 H.P. Wiesmann, U. Plate, K. Zierold, H.J. Hohling, "Potassium is involved in apatite biomineralization", *J. Dent. Res.* **77** (8) (1998) 1654–1657.
- 26 M. Kumar, J. Xie, K. Chittur, C. Riley, "Transformation of modified brushite to hydroxyapatite in aqueous solution: effects of potassium substitution", *Biomaterials* **20** (15) (1999) 1389–1399.
- 27 E. Shorr, A.C. Carter, "The usefulness of strontium as an adjuvant to calcium in the remineralization of the skeleton in man", *Bull. Hosp. Joint Dis. Orthop. Inst.* **13** (1952) 59–63.
- 28 G.S. Nixon, H. Smith, "Estimation of arsenic in teeth by activation analysis", *J. Dent. Res.* **39** (1960) 514–516.
- 29 E.D. Bertin, "Principles and Practice of X-ray Spectrometric Analysis", 2<sup>nd</sup> edition, Plenum Press, New York, 1975 Section 10.5.

- 
- 30 P. Anderson, S.E.P. Dowker, J.C. Elliott, C.R. Thomas, "Synchrotron X-ray fluorescence microprobe analysis in the study of dental mineralized tissues", *J. Trace Microprobe Tech.* **14** (1996) 541–560.
  - 31 T.P. Hoepfner, E.D. Case, "The influence of the microstructure on the hardness of sintered hydroxyapatite", *Ceram. Int.* **29** (3) (2003) 699–706.
  - 32 H.J. Sánchez, C.A. Pérez, M. Grenón, "SRXRF analysis with spatial resolution of dental calculus", *Nucl. Instrum. Methods B* **170** (2000) 211–218.
  - 33 S. Lazic, "Microcrystalline hydroxyapatite formation from alkaline solutions", *J. Cryst. Growth* **147** (1995) 147–154.

# Capítulo 10

## 10.1 ESTUDIO DE INTERFACES DE CALCULO DENTAL USANDO ESPECTROSCOPIA DE INFRARROJO

En este capítulo se va a estudiar un aspecto importante que resulta del proceso de cristalización que es la *cristalinidad* de las fases de fosfatos de calcio que se desarrollan en un medio biológico como lo es el medio oral y las fases a estudiar son tejidos dentales con depósitos de cálculo adheridos a ellos como se detallan en la sección experimental. Además, se indagará en la variación de la cristalinidad en tejido dentario y en cálculo dental sobre una línea transversal atravesando, dentina, cemento, interface cemento-cálculo hasta la zona exterior de cálculo. Se usará la técnica de ATR (Attenuated Total Reflection) ya que permite realizar microanálisis *in situ* con poca o nula preparación de muestra. Las mediciones fueron llevadas a cabo en la línea experimental SIMBAD, en las instalaciones del sincrotrón en DAΦNE, Italia.

## 10.2 CRISTALINIDAD

El estudio de cristalinidad en fosfatos de calcio biológico es importante en diversos aspectos. Desde el punto de vista biológico conocer la cristalinidad o el grado de cristalización es importante como herramienta de diagnóstico en enfermedades que implican una disolución de la masa ósea como la osteoporosis. En el área de la ortopedia, conocer con detalle cómo es la cristalinidad ósea es útil para fabricar prótesis ya que éstas llevan un recubrimiento de fosfatos de calcio sobre el armazón metálico para disminuir una posibilidad de rechazo y se busca que este recubrimiento tenga una estructura muy similar a la de los huesos. De igual manera, se espera conseguir esto en el área de la odontología donde además de ser muy útil conocer la cristalinidad en la piezas dentarias también es un ítem importante si se conoce cómo varía la cristalinidad en los depósitos pétreos llamados cálculo dental. Datos sobre variación podrían dar pistas para la implementación de compuestos que inhiban su crecimiento o también para disminuir su estabilidad estructural y producir su remoción espontánea de la superficie dentaria.

La cristalinidad se refiere al grado de orden en una sustancia cristalina dada. Sustancias de gran cristalinidad están caracterizadas por tamaños de cristal grandes y poca tensión estructural mientras que sustancias de baja cristalinidad, tales como tejido óseo nuevo están caracterizados por cristales de pequeño tamaño y alta tensión estructural debido a irregularidades en la red. Considerando en primer lugar el tejido dentario, es de suponer a priori que diferentes partes de su constitución ósea tengan diferentes grados de cristalinidad debido a que la pieza dental está sometida a estrés mecánico no uniforme y a su vez también depende de su ubicación en la boca. La unión dentina-esmalte representa la separación de dos tejidos calcificados de muy distinta función biomecánica[1]. El esmalte dentario, que es como una cobertura de las piezas dentarias, es más duro y frágil; se torna más blando a medida que se avanza hacia zonas más internas en el diente hasta llegar a la dentina la cual consta de cristales de apatita deficiente, ricas en carbonatos en forma de rodillos de 4 ó 5  $\mu\text{m}$  en diámetro[2,3].

Se cree que sobre la superficie del cálculo que está en contacto con los fluidos orales, llamaremos a ésta como la superficie exterior, se forman fases amorfas (ACP) de calcio y fosfatos de muy baja cristalinidad que sirven como precursores a la formación a alguna fase más estable. A diferencia del tejido dentario, en cálculo los cambios de fase se producen por las condiciones químicas del entorno por factores como pH, iones libres, temperatura y en algún grado por la acción de bacterias.

Estudios de cristalinidad en estos tipos de muestras no abundan en la literatura aun siendo éste un factor importante para poder entender los procesos de cristalización en el complicado entorno biológico. Estudios de cristalinidad en apatitas sintéticas dieron información sobre sustituciones e intercambio iónico que se producen durante la sintetización en diferentes medios de preparación[4]. La determinación de la cristalinidad en huesos, esto es, tamaños de dominios cristalinos de hidroxiapatita, está relacionada inversamente con la solubilidad de la fase que se traduce en pérdida de masa ósea en la osteoporosis por ejemplo y también en otras enfermedades óseas[5]. Sobre la cristalinidad en cálculo hay poco material bibliográfico y la mayoría sólo son resultados cualitativos que muestran indicios sobre su cristalización[6,7,8].

Murata y Norman[9] por métodos cristalográficos determinaron la cristalinidad de hidroxiapatita en una escala del 0 al 10 a través de la razón de los cocientes de los picos de difracción (112) y (211) con los

valores de referencia. Termine y Posner[10] desarrollaron un método por espectroscopía IR basado en el cambio del modo  $\nu_4$  entre  $550$  y  $650\text{ cm}^{-1}$ . Para la determinación del grado de cristalinidad de las muestras se usará un resultado semi-empírico realizado por Pleshko *et al.*[11] quien basado en un estudio de espectroscopía por transformada de Fourier en infrarrojo determinó cierta correlación entre la cristalinidad de la hidroxiapatita sintética y el cociente del área relativa de la banda "B", aproximadamente en  $1055\text{ cm}^{-1}$ , en el rango de frecuencias de  $900$  a  $1200\text{ cm}^{-1}$ . Los autores mostraron que la cristalinidad de fase está en relación inversa con el área relativa B para varias formas de preparación y proclamaron que éste método de determinación del grado cristalino es independiente de los sustituyentes iónicos.

### 10.3 DESARROLLO EXPERIMENTAL Y TRATAMIENTO DE ESPECTROS

Para este estudio se prepararon 3 muestras de la siguiente manera, se extrajeron piezas dentarias con depósitos de cálculo adherido a ellas de pacientes adultos que concurren al consultorio dental en un estado de salud bucal que requerían esta operación. Todos los individuos pertenecieron a la misma zona geográfica circundante a la ciudad de Córdoba-Argentina. Las piezas dentarias fueron embebidas en acrílico formando cilindros y luego cortadas transversalmente en dos secciones próximas para que las fases de cálculo y diente queden fijas en el centro del disco al enfriarse el material. Finalmente, se lijaron las caras del disco con un papel levemente abrasivo para aminorar los efectos de rugosidad en las superficies de análisis. Los cortes practicados fueron en todos los casos a la altura donde comienza la raíz dentaria. En la Figura 10-1(a) se muestra el resultado de este procedimiento.

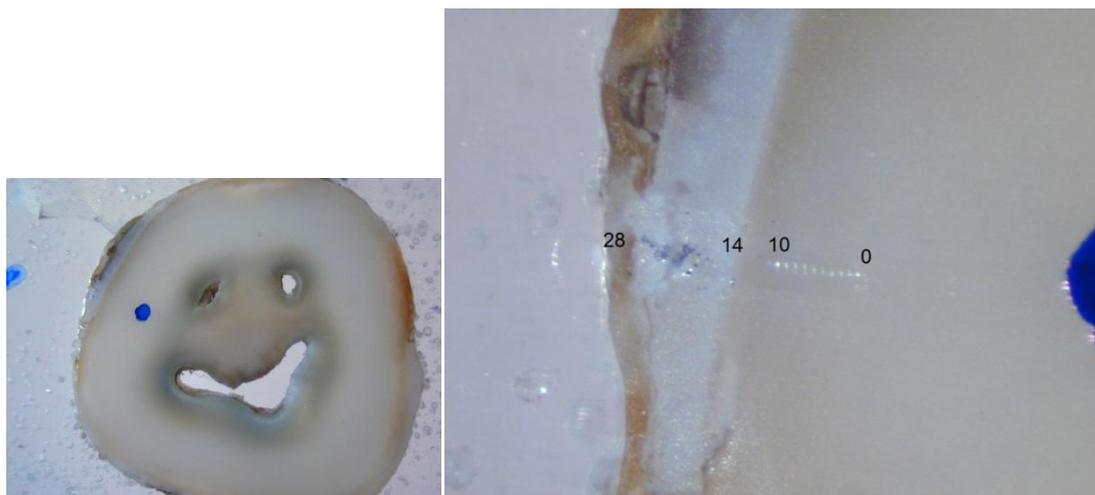


Figura 10-1.(a) Corte transversal de la pieza dentaria casi a nivel de la encía donde se aprecian los conductos de los nervios e irrigación. También se muestran las zonas donde se encuentra cálculo dental adherido y los puntos en azul indican la línea donde se realizará el barrido. (b) Detalle donde se muestran las marcas dejadas por el diamante del aparato de ATR sobre las fases expuestas en el corte transversal practicado sobre las piezas dentarias. La fotografía corresponde a la muestra 3.

El espectrómetro usado fue un interferómetro Bruker Equinox 55 para tomar todos los espectros y además un microscopio Bruker Hyperion 3000. La fuente de luz fue GLOBAR y el divisor de haz fue de KBr. El detector fue de MCT (Mercurio-Cadmio-Telurio) trabajando a temperatura de nitrógeno líquido. La resolución espectral en todos los espectros fue de  $8\text{ cm}^{-1}$  y cada espectro fue el promedio de 300 espectros tomados, el fondo espectral también fue promediado.

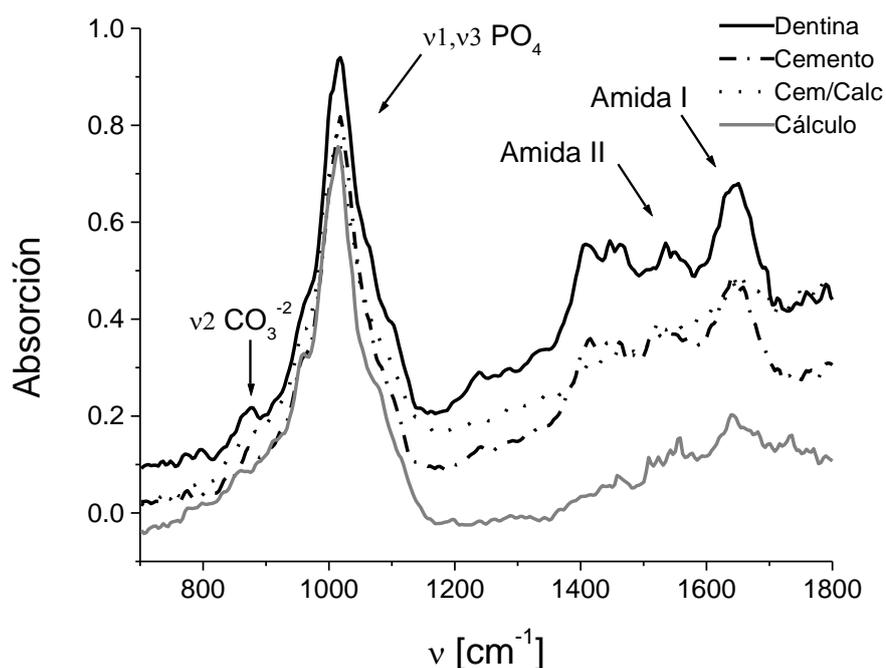


Figura 10-2. Espectro infrarrojo de absorción medido en distintas fases e interfaces como dentina, cemento, cemento-cálculo y cálculo. Se indican las principales bandas vibracionales identificadas como las correspondientes a amida I y II presentes en colágeno. En este punto, no se suavizaron los espectros ni tienen corrección por fondo.

A fin de realizar el barrido infra-rojo en las distintas fases de fosfatos cálcicos de la muestra, la punta de diamante del aparato fue asentada en 28 puntos sobre una línea atravesando las distintas regiones desde dentina hasta la superficie exterior de cálculo dental y cuyas marcas se pueden observar en la b. En cada uno de estos puntos se obtuvo un espectro de absorción como el que se muestra en la Figura 10-2, dichos puntos fueron más o menos equiespaciados y la longitud de trayectoria de barrido varió entre 2 a 3 mm. En el espectro de la Figura 10-2 se observan las principales bandas de absorción de interés en el rango 900-1200  $\text{cm}^{-1}$  y también las bandas correspondientes a colágeno en la parte de tejido dentario en el intervalo 1400-1700  $\text{cm}^{-1}$ .

Este estudio se centra principalmente en el análisis de las bandas de absorción de los modos vibracionales de los iones fosfatos en la estructura de ACP y HAp. Los modos  $\nu_1$  y  $\nu_3$  corresponden a modos de encogimientos (stretching) de P-O simétrico y anti-simétrico respectivamente y sus frecuencias son 962  $\text{cm}^{-1}$  para  $\nu_1$  y dos componentes de  $\nu_3$  en 1040 y 1092  $\text{cm}^{-1}$ [12]. La componente denominada B que se ubica en 1060  $\text{cm}^{-1}$  aproximadamente, está entre las dos componentes de  $\nu_3$  y decrece a medida que crece el eje-c de los cristales. Este comportamiento es verificado en el rango de 135 a 195 Å de longitud del eje-c[11]. Se especula que este hecho se debe a la incorporación de diferentes aniones a la celda unidad de hidroxiapatita que perturban los modos de vibración de  $\text{PO}_4^{3-}$  como también a una ubicación estructural desordenada de éstos.

Para este método se requiere determinar las bandas subyacentes en la región 900-1200  $\text{cm}^{-1}$ , para este propósito los espectros fueron suavizados con el método Savitzky-Golay tomando 7 puntos y la función resultante fue derivada dos veces para la estimación inicial de la posición de los picos en este rango de frecuencias Figura 10-3. El perfil del espectro fue ajustado en forma iterativa con varias restricciones en sus parámetros una de las cuales no permitía variar la posición de los picos a más de 1% debido a que de otra manera producía resultados no aceptables. En todos los espectros ajustados el coeficiente de regresión fue cercano al 0.998. La Figura 10-3 resume parte del tratamiento de los espectros y muestra la magnitud del área del pico B en comparación con el área de los picos restantes.

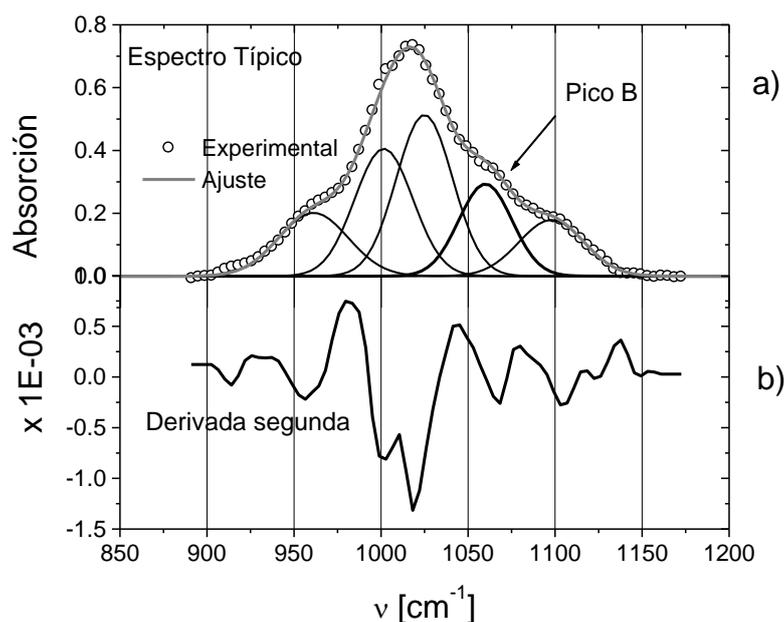


Figura 10-3. Determinación de los picos subyacentes en el perfil de absorción entre  $900\text{-}1150\text{ cm}^{-1}$  previamente (a) suavizadas a 7 puntos por Savitzky-Golay y fondo corregido. (b) La ubicación inicial de los picos fueron determinadas mediante derivadas segundas.

#### 10.4 ANÁLISIS DE BANDAS Y PRIMERAS CONCLUSIONES

La presencia de componente orgánico en los espectros analizados se observa en la región  $1400\text{-}1700\text{ cm}^{-1}$  y corresponde a las bandas de absorción principalmente de colágeno en los tejidos dentales por lo que estas bandas solo fueron observadas en cemento y dentina pero no en cálculo dental como se aprecia en la Figura 10-2. En la misma figura también se nota el pico de absorción del modo  $\nu_2$  de  $\text{CO}_3^-$  hacia  $872\text{ cm}^{-1}$  pero solamente en los espectros que corresponden a la fase dentaria y no así en la fase de cálculo dental. Los iones carbonatos son un componente común en las hidroxiapatitas no puras ya que estos tienden a substituir a los iones  $\text{PO}_4^{3-}$  produciendo desestabilización de la estructura cristalina y un aumento de su solubilidad. Este reemplazo es un proceso continuo en el tiempo de allí es que es poco probable hallar la presencia de carbonatos en fosfatos de calcio tempranos pero tiende a aumentar con el tiempo[13]. La inclusión de iones  $\text{CO}_3^-$  en la celda unidad modifica principalmente la dimensión de la constante de red  $a$ [14] pero la constante de red  $c$  del cristal de hidroxiapatita casi no se ve alterado y por ende el grado de cristalinidad aunque algunos autores consideran que la influencia de carbonatos en las fases puede ser considerada y eligen un método distinto, como espectroscopía Raman, para relacionarla con el avance de cristalización[15].

Otro aspecto notorio que surge por inspección de los espectros de absorción en el intervalo de frecuencias de  $800\text{ a }1200\text{ cm}^{-1}$ , ver Figura 10-4 y Figura 10-5, es una banda que está presente solo para aquellos espectros correspondientes a la zona dentaria y que no es distinguida en la región de cálculo dental. Esta banda se ubica aproximadamente entre  $1060\text{-}1090\text{ cm}^{-1}$  y su aparición puede tener varios orígenes. Uno puede ser debido a la incorporación de iones  $\text{H}^+$  en la celda unidad para formar iones  $\text{HPO}_4^{2-}$  cuyo modo de vibración se encuentra en  $1060\text{ cm}^{-1}$ , esta incorporación de iones hidrogeno es común en hidroxiapatitas con un grado de deficiencia en calcio. Por otro lado, podría ocurrir que a diferencia de la fase dentaria, en cálculo dental sea más favorable la incorporación de iones metálicos que son abundantes en los fluidos orales en vez de la incorporación de  $\text{H}^+$  debido a que muchos de ellos son químicamente similares a  $\text{Ca}^{++}$ , por ejemplo  $\text{Mg}^{++}$ ,  $\text{Cu}^{++}$ ,  $\text{Zn}^{++}$ , etc. Otra razón plausible es la presencia de carbohidratos en tejido dentario que recibe junto con otros nutrientes durante su vida. Los carbohidratos tienen bandas de absorción justo en la zona mencionada comprendida entre  $1060\text{-}1090\text{ cm}^{-1}$ . En la fase de cálculo dental no sería esperado encontrar estas bandas debido a que estos depósitos carecen de una componente biológica y que aunque pueden alojar micro-organismos, estos no producen carbohidratos.

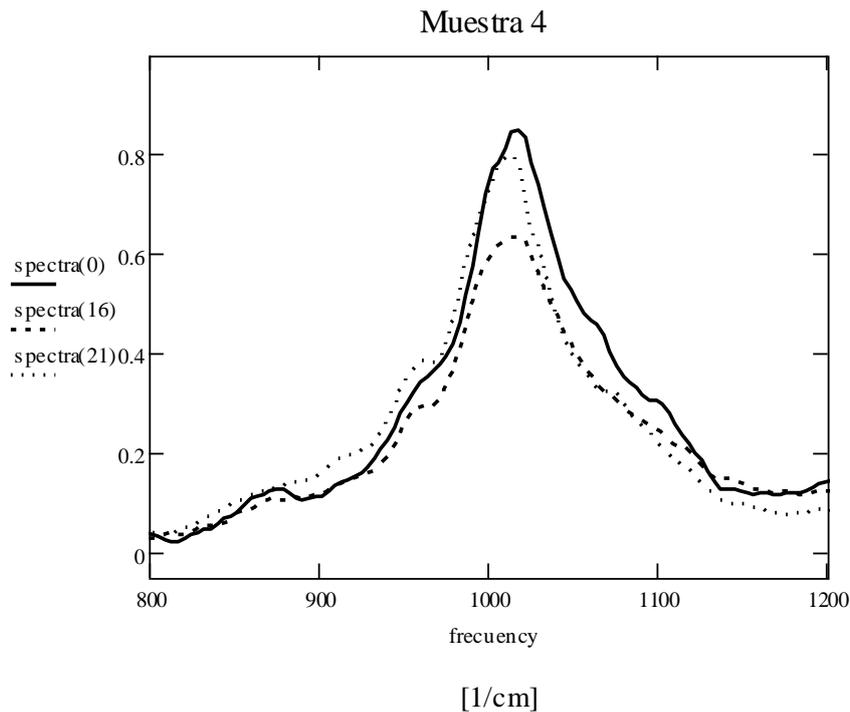


Figura 10-4. Espectros comparativos donde se muestra una componente extra ubicada entre 1060 y 1100  $\text{cm}^{-1}$  aproximadamente en los espectros de absorción en diente (—), que no es vista en los espectros en cálculo interior (---) y cálculo exterior (....).

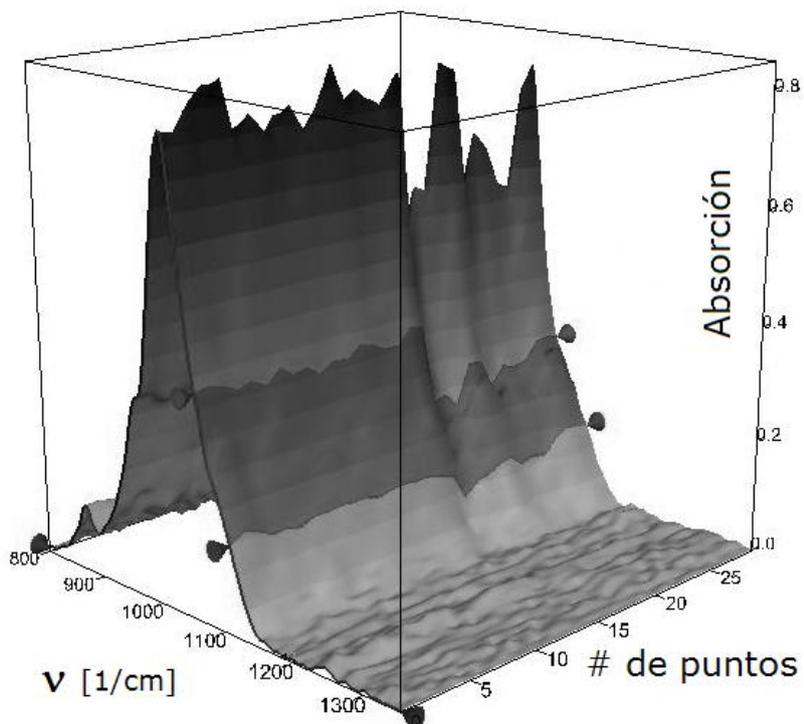


Figura 10-5. El área sombreada muestra la región de los perfiles de absorción que quedan contenidos entre dos planos perpendiculares que pasan por  $X=1060$  y  $X'=1100 \text{ cm}^{-1}$ . Se aprecia claramente una banda extra en los espectros correspondientes a tejido dentario. La interface diente-cálculo está aproximadamente en #15. [0-15 diente, 15-30 cálculo]

De acuerdo al método descrito por Pleshko et al.[11], fue posible diferenciar el grado de cristalización y sus características en función del porcentaje del pico B calculado en las distintas zonas de análisis mostradas en las Figura 10-6 y Figura 10-7, es decir, en las fases dentaria y de cálculo adherido. En la fase dental, no hay una variación apreciable en cristalización entre cemento y dentina. Se podría haber esperado una tal diferencia en la cristalinidad entre ambas regiones dado que está documentado[16] el contraste en el nivel de dureza entre ambas zonas, como el doble entre una y otra, que hubiese sido reflejado en el grado de cristalización [nota: la dureza se mide por indentación, ampliamente contado en cualquier lado, una fase de baja cristalinidad implica cristales más pequeños luego la punta del analizador se hunde mas con igual carga que en zonas con cristales mas grandes o sea, mayor cristalinidad]. Aunque ambos son de similar constitución, fases de fosfato de calcio con tejido conectivo y colágeno; biológica y mecánicamente éstos cumplen funciones distintas. Las características estructurales distribuyen la carga durante la exigencia mecánica a la que son sometidas las piezas dentarias. La dentina está formada por una estructura tubular radial mientras que el cemento tiene una estructura más parecida a la de los huesos, en forma laminar, de allí que sus durezas deben ser distintas verificándose un valor más alto en la dentina. Además de esta diferencia estructural interviene también la densidad de la fase inorgánica que recientes estudios[16] han mostrado que es mayor en dentina y que además tiene un cociente molar Ca/P más cercano al de la hidroxiapatita pura que en la parte de cemento [17].

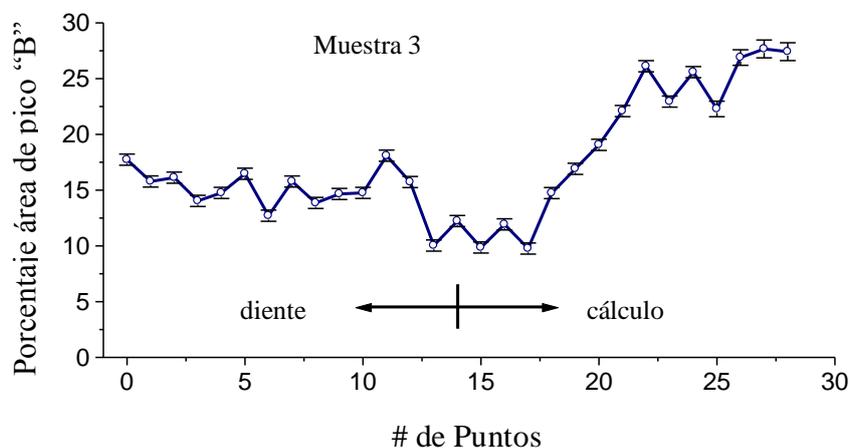


Figura 10-6. Variación de la cristalinidad a través del tejido dentario y a través de las capas de cálculo dental.

Trabajos por otros autores[7] mostraron una diferencia gradual en la cristalinidad del cálculo dental usando métodos cristalográficos al comparar los espectros tomados en las regiones de cálculo contiguas a la superficie dentaria, en la región media y en la región exterior, la que está en contacto con el fluido oral. Si bien ésta fue un hallazgo importante para tratar de entender el proceso de formación de cálculo ésta fue basada en observaciones cualitativas. Las Figura 10-6 y Figura 10-7 muestran el grado de cristalización en cálculo dental por primera vez en forma cuantitativa y revelan un perfil de variación de cristalinidad común en las muestras analizadas. Cerca de la interface con la superficie dentaria la cristalinidad es mayor o del orden de la de cemento y decrece hacia las zonas más externas. La alta cristalinidad de cálculo dental sobre la interface está en acuerdo con un estudio reciente donde los autores[18] mediante imágenes TEM mostraron que los cristales de hidroxiapatita en esa zona son por lo general más grandes que los cristales del tejido dentario, hecho que explicaría la buena adhesión del tártaro a los dientes y apoya la idea de la nucleación heterogénea como mecanismo de génesis de los depósitos calcificados. La disminución gradual de la cristalinidad observadas en las Figura 10-6 y Figura 10-7 estaría en acuerdo con la presunción de que el proceso de crecimiento del cálculo dental se produce por capas, es decir, una nueva sucesión de fosfatos de calcio amorfos o de muy baja cristalinidad se forma encima de la superficie exterior de tártaro. Entonces, la diferencia entre las velocidades de formación de nuevas capas y la velocidad de maduración, esto es, el ritmo de incorporación de iones de calcio[8], es la que da la variación gradual de cristalinidad en cálculo dental observada en las figuras.

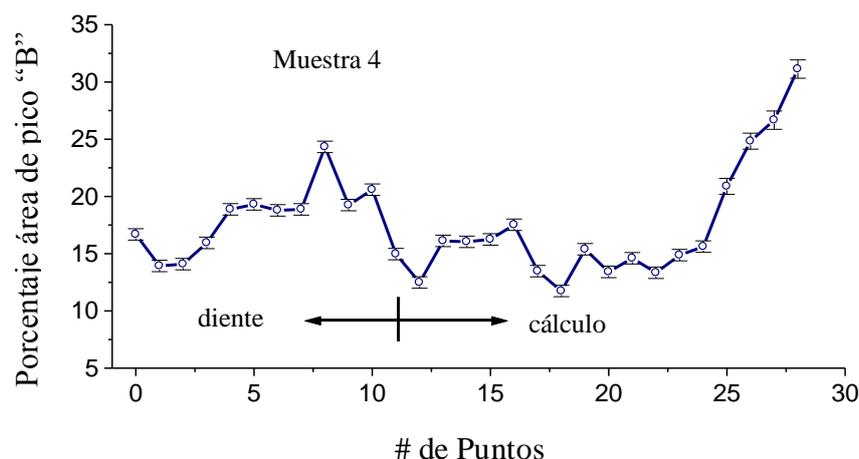


Figura 10-7. Variación de la cristalinidad a través del tejido dentario y a través de las capas de cálculo dental.

## 10.5 NOTAS FINALES DEL CAPÍTULO<sup>1</sup>

Si bien este estudio fue diseñado en base a un estudio de cristalización en apatita sintética, ha permitido echar luz sobre el grado de cristalización en cálculo dental y en tejido dentario. Este estudio ha mostrado una variación en términos cuantitativos por primera vez de la cristalinidad en el bulk de cálculo dental en la dirección que va desde los estratos más internos, aquellos en contacto con la superficie dentaria hasta los más externos, aquella superficie de cálculo en contacto directo con el medio líquido oral, saliva y fluido gingival. Mediante el área relativa del pico B, se determinó que el grado de cristalinidad es elevado en la zona de contacto con tejido dentario, igual o un tanto mayor que en diente, luego la cristalinidad decae gradualmente hacia las partes externas. Esto apoya la suposición del crecimiento por capas del cálculo dental y también apoya la afirmación de que la adherencia de éste a la superficie dentaria se debe a la copia que hace de la estructura cristalina dentaria ya existente, de allí el alto grado de cristalización.

En base a esta confirmación, esfuerzos en agentes anti-cálculo deberían estar dirigidos a atacar o evitar la adhesión en la zona de interface diente-cálculo.

### Referencias

- 1 Lin, C. P., Douglas, W. H. & Erlandsen, S. L. "Scanning electron microscopy of Type I collagen at the dentin enamel junction of human teeth". *J. Histochem. Cytochem.* **41**, 381–388 (1993).
- 2 White, S. N. *et al.* "The dentino-enamel junction is a broad transitional zone uniting dissimilar bioceramic composites". *J. Am. Ceram. Soc.* **83**, 238–240 (2000).
- 3 Ten Cate, A. R. "Oral Histology: Development, Structure, and Function" 4th edn (Mosby, St. Louis, Missouri, 1994).
- 4 Jacqueline A.M. van der Houwen, Cressey G., Cressey B. A., Valsami-Jones E., "The effect of organic ligands on the crystallinity of calcium phosphate", *Journal of Crystal Growth* **249** (2003) 572–583.
- 5 Thompson, D. D., A. S. Posner, W. S. Laughlin, and N. C. Blumenthal, "Comparison of bone apatite in osteoporotic and normal eskimos", *Calcif. Tissue Int.* (1983) **35**:392-393.
- 6 H. W. Kaufman and I. Kleinberg, "X-ray diffraction examination of calcium phosphate in dental plaque", *Calcif. Tissue Inter.*, (1972) **11**(2): 97-104.

<sup>1</sup> Este trabajo fue aprobado durante la impresión de esta Tesis Doctoral para su publicación en *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, Springer, 2010.

- 7 LeGeros R.Z., "Variations in the crystalline components of human dental calculus. I. Crystallographic and spectroscopic methods of analyses", *J. Dent. Res.* (1974) **53**:45-50.
- 8 J. Abraham, M. Grenón, H. J. Sánchez, C. Pérez, R. Barrea, "A case study of elemental and structural composition of dental calculus during several stages of maturation using SRXRF", *J. Biom. Mat. Res. Part A*, **75A** (3): 623 – 628; (2005).
- 9 Murata, K. J., Norman II, M. B.: *Am. J. Sci.* **276** (1976) 1120.
- 10 Termine, J. D., and A. S. Posner. (1966), "Infra-red determination of the percentage of crystallinity in apatitic calcium phosphates", *Nature* (Lond.) **211**:268-270.
- 11 Pleshko N., Boskey A. and Mendelsohn R., "Novel infrared spectroscopic method for the determination of crystallinity of hydroxyapatite minerals", *Biophys. J.*, (1991) **60**: 786-793.
- 12 Fowler, B. O., E. C. Moreno, and W. E. Brown. (1966), "Infra-red spectra of hydroxyapatite, octacalcium phosphate and pyrolysed octacalcium phosphate", *Arch. Oral Bio.* **11**:477-492.
- 13 Legeros R., Balmain N. and Bonel G., "Age-related changes in mineral of rat and bovine cortical bone", *Calcif Tissue Int.* (1987) **41**(3):137-44.
- 14 Leventouri T., Chakoumakos B.C., Papanearchou N. and Perdikatsis V., "Comparison of crystal structure parameters of natural and synthetic apatites from neutron powder diffraction" *J. Mater. Res.* (2001) **16**: 2600-2606.
- 15 G. Penel, G. Leroy, C. Rey and E. Bres, "MicroRaman Spectral Study of the PO<sub>4</sub> and CO<sub>3</sub> Vibrational Modes in Synthetic and Biological Apatites", *Calcif. Tissue Int.* (1998) **63**:475–481.
- 16 Sunita P. Ho, Mehdi Balooch, Sally J. Marshall, Grayson W. Marshall, "Local properties of a functionally graded interphase between cementum and dentin", *J Biomed Mater Res A.* (2004) **70**(3):480-9.
- 17 Abraham J.A., Grenón M.S., Sánchez H.J. et.al., "μX-ray fluorescence analysis of traces and calcium phosphate phases on tooth–tartar interfaces using synchrotron radiation", *Spectrochimica Acta B: Atomic Spectroscopy*, (2007) **62**(6-7):689-694.
- 18 Ramin Rohanizadeh, Racquel Z. LeGeros, "Ultrastructural study of calculus-enamel and calculus-root interfaces" (short communication), *Archives of Oral Biology* (2005) **50**:89-96.

# Capítulo 11

## 11.1 CONCLUSIONES FINALES

Las técnicas basadas en el uso de rayos-X han demostrado una vez más ser una poderosa herramienta de análisis que aun continúa en constante expansión y aplicabilidad en muchas áreas de ciencia e ingeniería y se está lejos de avizorar algún fin o límite. Y sin ánimo de afrentar o atacar a otros investigadores que usan otros métodos experimentales, las técnicas basadas en rayos-X es una de las pocas, sino el único, método de estudio que ha tenido esta particularidad desde sus comienzos hace 110 años atrás.

Convengamos que los átomos de calcio y fósforo poseen particularidades especiales para formar moléculas debido a la facilidad de sus orbitales para formar enlaces o cambiar sus orientaciones espaciales con relativa poca energía. No sorprende encontrar en la Naturaleza que la enorme cantidad de seres vivos basan su estructura ósea en la conformación de fosfatos de calcio y en otros casos por ejemplo, usan estos elementos para una estructura de recubrimiento de sus partes blandas, como en el caso de moluscos, o de defensa como el marfil.

Este trabajo ha echado luz en muchos puntos del proceso de formación de depósitos pétreos o cálculos dentro de los sistemas biológicos y ha tratado, a pesar de la enorme cantidad de variables que pueden tomar parte, de poner en evidencia aquellos parámetros o factores que son más relevantes en dichos procesos. En cualquier medio acuoso rico en iones de calcio y fósforo y en condiciones más o menos estables de temperatura y acidez hace muy probable la creación de cristales de fosfatos de calcio. Si estas condiciones son mantenidas como también el suministro de ambos iones, se pueden formar cristales indefinidamente como las recientemente halladas en Naica, una caverna en México, en donde enormes cristales de selenita ( $\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ) de varios metros de longitud y gran cristalinidad han sido documentados y actualmente analizados. Se estima que son de una antigüedad del orden de cientos de miles de años!. En este caso el azufre juega el rol del fósforo en la hidroxiapatita. La cavidad bucal es un medio similar, ya que es húmedo, tiene un pH ligeramente debajo de 7 y existe poca variación de temperatura, alrededor de 36 °C y la saliva con los fluidos orales tienen concentraciones propicias de Ca y P que es casi *anormal* que no se desarrollen depósitos calcáreos en la boca. Ahora, también es verdad que hay sujetos que muestran una baja o nula predisposición al desarrollo de cálculo bucal, en este trabajo no han sido investigado los factores que influyen en esta particularidad y considero que hubiera sido de mucha importancia. La razón principal para no haber investigado en esta área es que es muy difícil conseguir una cantidad suficiente estadísticamente de sujetos con esta particularidad ya que son casos raros. Sin embargo, este trabajo ha atacado la cuestión de describir el proceso de formación y los factores más y menos relevantes que participan con éxito en dicho proceso. En base a los resultados obtenidos aquí, los primeros granos cristalinos de cálculo dental se forman usualmente sobre la superficie dentaria mediante un proceso heterogéneo, es decir, aprovechando el modelo (o molde) de los fosfatos de calcio de la superficie de los dientes como fue revelado en fotografías TEM recientemente [LeGeros, Arch. Oral Biol. (2005) **50**:89-96] y en análisis de cristalinidad [sección 10.4] de este trabajo. De esta forma, el proceso de formación de las primeras fases es menos costoso energéticamente si se tiene un *molde previo* que formar un grano cristalino espontáneamente, aunque eventualmente también pueden formarse pequeños cristales en el seno del fluido oral [Figura 11-1] y a veces pueden depositarse no sobre la superficie dentaria sino sobre los conductos salivales [Indian J. Otolaryngol. Head Neck Surg., **60**:287–288, (2008)]. Algunos autores también señalaron que los primeros granos pueden formarse sobre los restos calcificados de bacterias orales que en un anterior momento formaron la placa bacteriana, esto es totalmente plausible aunque no corroborado en este trabajo. Una vez formados estos primeros granos sobre la superficie dentaria, comienza un proceso de consolidación y crecimiento autosostenido cuya curva característica en estos tipos de mecanismos es la que se mostró en la sección 7.4, Figura 7-4. La participación de los elementos trazas como Cl, K, Ti, Cr, Mn, Fe, Cu y Sr no ha mostrado tener gran participación o influencia en esta curva ni guarda relación la forma con que ellos varían en el período de tiempo analizado. Como se describió allí, la primera etapa de esa curva comienza con un cada vez más rápido incremento de la concentración de Ca y P a medida que se van produciendo dos sucesos simultáneos, las transformaciones de fases cristalinas conjuntamente con el aumento de masa y volumen de los depósitos pétreos. Este régimen dura estadísticamente de 7 a 9 meses luego del cual la velocidad de adquisición de iones de Ca comienza a cesar y la concentración tiende a un valor constante que es el que incontables reportes han manifestado y también verificado en este trabajo, sección 6.5. Ahora, como he

dicho más arriba, las condiciones químico-físicas de la cavidad bucal son estables y la fuente de iones Ca y P provistas por los fluidos orales es permanente, ¿por qué cesaría el crecimiento de cálculo dental en un momento?, ¿por qué usualmente no se ven individuos con grandes depósitos de cálculo dental aun en aquellos que no practican limpieza dental de ninguna clase?. Bueno, en realidad el cálculo dental continúa creciendo debajo de la encía denominándose así cálculo subgingival, con las peculiaridades que la difieren del cálculo supragingival nombradas en la sección 6.2, pero aun también este tipo de depósito subgingival crece hasta un determinado tamaño. Recordemos que los fosfatos de calcio entre ellos la hidroxiapatita, poseen gran flexibilidad estructural que permite alojar una gran cantidad de iones metálicos intersticiales pero con muy pocos de ellos puede formar versiones modificadas de hidroxiapatita por sustitución de cationes o aniones [sección 4.4]. La razón para el fenómeno de un crecimiento acotado en el tamaño del cálculo dental puede atribuirse al  $Zn^{+2}$ . Este ion de relativa abundancia en la saliva, (1 nmol/L) es de tamaño atómico pequeño 88 pm, comparado con las dimensiones de la celda unidad de la hidroxiapatita, entonces pueden difundirse a través de la red cristalina. En este estudio se ha determinado que los átomos de zinc se dirigen hacia la superficie exterior del cálculo, sección 9.4.1 - Figura 9-3, es decir, aquella superficie bañada por la saliva, y que por encima de una determinada concentración (superficial) empieza a manifestarse su acción inhibitoria citada por muchos autores y bien sabido actualmente que algunos dentífricos específicos contienen este metal en su composición. Esta característica del Zn ya fue notada en el primer trabajo publicado durante este doctorado y que fue citada en la sección 6.5, Figura 6-5. También ha sido notado que Cu sigue un comportamiento paralelo a Zn muy probablemente porque comparten características químicas muy similares debido a su proximidad en la tabla periódica. La razón por la cual Zn tiende a difundirse en la dirección determinada, puede explicarse por el estadio de maduración más avanzado de las zonas internas en el cálculo dental con respecto a las más externas. En las regiones donde los fosfatos de calcio son más maduros, esto es, más semejantes a la hidroxiapatita, las longitudes de enlace deben ser menores expeliendo a Zn hacia zonas de menor cristalinidad, es decir, hacia las zonas externas donde están las fases primarias de fosfatos de calcio y cristales amorfos de hidroxiapatita. En la oración anterior acabo de introducir la idea de maduración gradual, es decir, la maduración de los fosfatos de calcio no se produce homogéneamente en todo el volumen del depósito sino que avanza desde las capas internas hacia las externas, existe un gradiente de maduración con dirección exterior. Este proceso está presente ya desde las primeras semanas desde la aparición visible del sarro dental y continúa aún después de que la ganancia volumétrica ha cesado.

### 11.1.1 Sobre agentes inhibidores

La fabricación comercial de pastas dentales o enjuagues bucales están destinados prioritariamente a la prevención de la acción bacteriana sobre el esmalte dental (caries), pero en realidad la acción contra la formación de cálculo dental parece ser ineficiente ya que aun en los individuos que usan estos productos se verifica el desarrollo de cálculo dental. Se han logrado dos agentes efectivos contra la aparición de cálculo dental a saber, pirofosfatos y zinc. Como ha sido proclamado por muchos autores, la acción del primero está dirigida hacia la disminución de la placa bacteriana y posterior calcificación de esta que sirve como agente precursor de cálculo dental. En cambio zinc está dirigido a la componente mineral del cálculo dental, muchos reportes han medido su efecto inhibitorio en el crecimiento y maduración por medio de la creación de fallas estructurales en los diversos fosfatos de calcio que lo componen, esto hace que el volumen de los depósitos pétreos sean mínimos y de fácil remoción mecánica. En la actualidad se puede leer en los prospectos de las pastas y enjuagues bucales que están compuestos por uno o ambos de estos agentes inhibidores, sin embargo muchas veces el cálculo dental aparece de igual manera, a menos que el esfuerzo por la limpieza y pulcritud oral sea un tanto obsesivo en el uso de dichos productos. Un objetivo importante sería conseguir la remoción del cálculo dental por medios químicos para evitar la remoción por medios mecánicos que implican, sangrado y posibilidad de infección. Lograr este objetivo posibilitaría también su aplicación a otros tipos de cálculos biológicos que se producen en otras regiones del cuerpo mucho menos accesibles como en el caso de cálculos renales o vesiculares en donde la remoción de dichos depósitos conllevan situaciones traumáticas considerables. Este trabajo se ha enfocado al estudio del mecanismo de aparición, maduración y distribución estructural del cálculo dental pensando ambiciosamente, como colorario, lograr dilucidar un punto vulnerable en su desarrollo para atacar al problema de aparición de estos depósitos y ofrecer una solución a esto que ha sido descripto por los primeros médicos varios siglos antes de Cristo.

La zona crítica del mecanismo de maduración es la cercana a la pendiente máxima de la curva de la Figura 7-4 o de derivada nula en la Figura 7-5 donde se da una rápida toma de iones de  $Ca^{++}$ , sugiero que es allí donde se debería otorgar al medio oral otro tipo de ion libre o ion complejo que compita

fuertemente por los sitios de red formando un estructura endeble, y más tarde abandonar dichos sitios por afinidad a otra sustancia (externa dada) desarmando así los cristales previos. En la zona donde la pendiente vuelve a ser nula (Figura 7-5) ya se han conformado los cristales de hidroxiapatita y su desintegración es muy difícil o inviable por medios que tengan en cuenta el entorno biológico. Encontrar qué iones libres o complejos son los que podrían formar la estructura endeble y luego dejarlas por efecto de afinidad química, será tema de un ulterior y planificado estudio.

### 11.1.2 Saliva y Bio-indicadores

La saliva oral ha tomado en los últimos años más relevancia como contenedor de bio-indicadores de enfermedades sistémicas. En este estudio paralelo al de esta tesis, han sido analizadas las variaciones de las concentraciones elementales para el caso de alteraciones físico-química por el habito de fumar en el ambiente oral y se demostró estadísticamente que a nivel elemental pueden establecerse diferencias notables. En un futuro, podría implementarse con solo una toma de muestra de saliva y un espectrómetro portable de rayos-X, un rápido diagnóstico a *prima facie* como primera lectura del problema. Por supuesto, siguen siendo los análisis biológicos en saliva los que más información provee al profesional y si bien son más certeros también son los que más tiempo llevan en ofrecer ese resultado. El autor de este trabajo, en este sentido también quiere mencionar que ha publicado recientemente los resultados de un estudio en muestras de saliva y fluido oral en individuos con osteoporosis y osteopenia y puede consultarse con el siguiente dato bibliográfico: *Spectrochimica Acta B*, **63(12):1485-1488**, Diciembre 2008. El autor también quiere comunicar que en los días de la edición de este trabajo, está realizando el análisis de los espectros infrarrojo de muestras de saliva y en la siguiente Figura 11-1 se muestran algunas particularidades interesantes como se comenta debajo de la misma. El análisis de muestras líquidas por espectrometría de infrarrojo y Raman desde hace una década atrás ha comenzado a tomar gran importancia en muchas áreas de la medicina y biología por su rapidez y sensibilidad que en muchas obras ya ha sido citado. Creo así, que en cualquier laboratorio donde se realicen análisis elemental en muestras biológicas por algún método basado en rayos-X también no debería faltar un espectrómetro de IR como herramienta de análisis simultaneo molecular por su rapidez comparada con la fluorescencia de rayos-X y mutuamente pueden complementarse. Esta pequeña incursión en la espectrometría de Infrarrojo ha sido definitivamente provechosa.

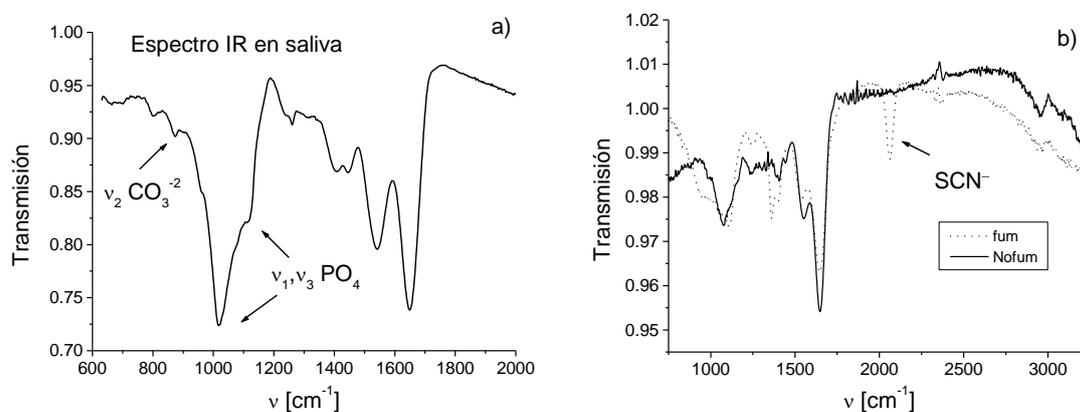


Figura 11-1. a) Espectro Infrarrojo de transmisión en muestra de saliva tomado a un individuo del grupo estudiado en la sección 10.3. Se aprecia en forma inconfundible las bandas de absorción muy parecidas a las de la hidroxiapatita, esto implicaría que existirían pequeños cristales de cálculo en suspensión en saliva y que no siempre estos se formarían por nucleación heterogénea sobre la superficie dental. Esta idea mencionada antes por otros autores como una elucubración, estaría apoyada por este hallazgo. De 17 espectros tomados en 3 individuos se ha notado esta particularidad notable. b) el pico indicado en el espectro de transmisión infrarroja, medida por el autor de esta Tesis Doctoral, corresponde a los modos vibracionales de la molécula  $\text{SCN}^-$  en 2060  $\text{cm}^{-1}$  que solo fue detectado en las muestras de saliva del grupo fumador y no así en las muestras del grupo control. La profundidad de este pico está directamente relacionada con la severidad de la acción de la nicotina en el medio oral [*Am J Public Health* 1981; 71: 1320-1324].

### *11.1.3 Agradecimientos Finales a Instituciones*

FaMAF – Facultad de Matemática, Astronomía y Física  
Universidad Nacional de Córdoba – Argentina

SeCyT – UNC  
Universidad Nacional de Córdoba

LNLS – Laboratorio Nacional de Luz Sincrotrón  
Campinas – Brasil

DAΦNE – LNF – Laboratori Nazionale di Frascati  
Frascati – Italia

DASIM  
Karlsruhe – Alemania