

**“DISEÑO DE UN NUEVO MÉTODO ANALÍTICO EMPLEANDO LA  
FLUORESCENCIA DE RAYOS X CON APLICACIONES EN EL  
CONTROL OCUPACIONAL DEL SECTOR NUCLEAR”**

**CARRERA: ESPECIALIZACIÓN EN RADIOQUÍMICA  
Y APLICACIONES NUCLEARES**

Alumna: Gonzalez Florencia  
Directora: Cerchietti, M. Luciana  
Co-directora: Custo, Graciela S.

Febrero 2019



**UNSAM**  
UNIVERSIDAD  
NACIONAL DE  
SAN MARTÍN

# Contenido

<b>Resumen.....</b>	<b>2</b>
<b>Introducción .....</b>	<b>3</b>
1.1    Dosimetría interna .....	3
1.1.1    Monitoreo de la exposición ocupacional .....	3
1.1.2    Exposición a la irradiación interna.....	4
1.1.3    Toxicidad y Radiotoxicidad del uranio .....	10
1.1.4    Métodos de medición de uranio en orina .....	12
1.2    Fluorescencia de Rayos X.....	15
1.2.1    FRX convencional.....	15
1.2.2    Excitación de los elementos.....	16
1.2.3    Dispersión de los rayos X característicos .....	17
1.2.4    Detección de los rayos X .....	18
1.2.5    Reglas de selección. Nomenclatura en FRX .....	19
1.2.6    Fluorescencia de Rayos X por Reflexión Total.....	19
1.2.7    Cuantificación por TXRF.....	22
1.2.8    Interferencia Espectral. Rb K $\alpha$ (13.396 keV) - U L $\alpha$ (13.614 keV).....	23
1.3    Métodos separativos de análisis: Cromatografía.....	25
1.3.1    Extracción cromatográfica.....	25
<b>Objetivos .....</b>	<b>27</b>
<b>Desarrollo experimental .....</b>	<b>28</b>
2.1    Instrumentación.....	28
2.2    Determinación elemental en S2 Picofox .....	29
2.3    Uso de la columna cromatográfica Sr-Spec .....	30
2.4    Calibración de la sensibilidad de U .....	31
2.5    Relación de uranio y rubidio. ....	31
2.6    Perfil de Elución .....	32
2.7    Metodología experimental propuesta. Utilización de la columna Sr- Spec.....	33
2.8    Estimación de parámetros analíticos. Estimación experimental del límite de detección .....	33
<b>Resultados y discusiones .....</b>	<b>36</b>
3.1    Calibración de U.....	36
3.2    Relación Rb U .....	41
3.3    Perfil de Elución .....	42
3.4    Determinación de U en orina .....	46
3.5    Retención de Rb y Br.....	49
3.6    Estimación estadística del límite de detección. ....	49
<b>Conclusiones.....</b>	<b>52</b>
<b>Bibliografía .....</b>	<b>55</b>
<b>Anexo A .....</b>	<b>58</b>
<b>Anexo B .....</b>	<b>60</b>

## Resumen

Argentina es un país nuclear, pertenece al selecto grupo que maneja el Ciclo del Combustible Nuclear y posee centrales nucleares en funcionamiento y en vías de fabricación. La industria nuclear es una de las actividades más controladas en cuanto a la calidad de vida del trabajador como así también su impacto en el medio ambiente.

Por otro lado, las ventajas analíticas de la Fluorescencia de Rayos X (FRX), le permite estar presente en cada una de las etapas del Ciclo de combustible nuclear, desde la búsqueda de uranio, hasta la fabricación de elementos de combustibles y la construcción de reactores de potencia e investigación. La caracterización de muestras geológicas, la determinación elemental en componentes estructurales del combustible nuclear, los ensayos químicos vinculados con muestras ambientales y efluentes, los ensayos no destructivos de nuevos materiales y aleaciones especiales, entre otras aplicaciones.

Dentro de las tareas más relevantes de la Comisión Nacional de Energía Atómica y de la Autoridad Regulatoria Nacional (ARN), se encuentran el monitoreo ambiental y el monitoreo ocupacional. En este trabajo se propone el uso de la Fluorescencia de Rayos X por Reflexión Total (TXRF), una de las metodologías más actuales de FRX, en el control ocupacional de trabajadores expuestos a uranio. Aprovechando las cualidades tecnológicas actuales y las ventajas analíticas de la TXRF, se propone la determinación de uranio en orina, de manera rápida, con mínimo volumen de muestra y de parámetros analíticos adecuados para el monitoreo ocupacional en caso incidental de incorporación de uranio.

# Capítulo 1

## Introducción

### 1.1 Dosimetría interna

#### 1.1.1 Monitoreo de la exposición ocupacional

El monitoreo de los trabajadores expuestos a las radiaciones ionizantes es la herramienta fundamental que contribuye a alcanzar los objetivos de la protección radiológica ocupacional, esto es, asegurar que en condiciones normales de trabajo no se superen los límites de dosis establecidos y reducir las exposiciones al nivel más bajo que razonablemente pueda alcanzarse. (1)

El monitoreo individual con el propósito de la evaluación dosimétrica interna experimental, puede llevarse a cabo por mediciones de actividad de cuerpo y de los órganos, llamadas in vivo o mediciones directas, por bioensayos, llamados in vitro o mediciones indirectas, por muestreo ambiental o por una combinación de estas.

La elección de la adecuada técnica de medición depende de varios factores, así como del tipo de energía emitida por los radionucleidos, el comportamiento biocinético del compuesto, la sensibilidad instrumental, las posibilidades y las conveniencias de la técnica.

Los aspectos más importantes en un programa de monitoreo por bioensayos incluyen los criterios sobre el cual se realiza la tarea de control, la frecuencia de monitoreo y las acciones tomadas en base a los resultados de las mediciones. Se pueden distinguir cuatro tipos distintos de monitoreos, cada uno asociado a una frecuencia:

- La evaluación inicial de bioensayos determina el nivel de referencia, da indicio de la exposición previa del trabajador debido tanto a experiencias laborales previas, como a procedimientos médicos o incluso niveles corporales naturales.
- El monitoreo de rutina, que debe realizarse en los trabajadores donde existe una probabilidad de que reciba una dosis efectiva comprometida de 1 mSv por año (1/20 ALI, Límite Anual de Incorporación).
- Los monitoreos especiales de bioensayos, deben realizarse frente a una incorporación conocida o frente a una sospecha de incorporación de material radioactivo debido a un incidente anormal en el lugar de trabajo.

- Por último el monitoreo confirmatorio, el cual está destinado a verificar suposiciones sobre las condiciones de exposición radiológica.(9)

Existe una relación muy importante entre el límite de detección de la técnica analítica y la frecuencia de monitoreo, ya que el periodo entre monitoreos debe ser tal que no se pierda información de incorporaciones significativas debido a decaimientos de radionucleidos o excreción del cuerpo.

Asimismo, los datos de monitoreo de la zona de trabajo, son complementarios a la toma de decisiones en cuanto a la posible incorporación de radionucleidos.

### 1.1.2 Exposición a la irradiación interna

La Comisión Internacional de Protección Radiológica (*ICRP* sus siglas en inglés) establece límites de dosis que tienen como objetivo asegurar una protección adecuada, incluso para los individuos más expuestos, y el modo de acotar y controlar los riesgos derivados de la exposición a radiaciones, consiste en establecer límites de dosis equivalentes, límites secundarios, límites derivados, límites autorizados y niveles de referencia.

En el marco de la exposición ocupacional, el límite de dosis efectiva es 20 mSv en un año, este valor debe ser considerado como el promedio en 5 años consecutivos, no pudiendo excederse los 50 mSv en un único año. Debido a que no es posible estimar la dosis efectiva de un trabajador expuesto a un dado campo de radiación, porque no es posible medir la dosis equivalente media en varios órganos y/o tejidos del cuerpo, la estimación y por lo tanto el control radiológico en un programa de protección radiológica se lleva a cabo aplicando los límites autorizados sobre otras magnitudes, cuya medición es posible y directa, estos se denominan límites secundarios.

En el control ocupacional de la radiación interna, se define como límite secundario, el Límite Anual de Incorporación, (ALI). El ALI es la actividad máxima de un radionucleido que puede incorporarse por año al organismo de una persona para que la dosis comprometida asociada con la incorporación no supere el límite de dosis efectiva.

Los límites derivados, son límites referidos a condiciones ambientales, que facilitan el control de las situaciones de irradiación, y responden a modelos de situaciones que permiten determinar la correlación con los límites básicos. Se pueden establecer entonces, límites de tasa de dosis equivalente en un lugar de trabajo, límites de contaminación en aire, en superficies, etc.

El límite de contaminación de aire se encuentra establecido con la Concentración derivada en aire (DAC) que corresponde a la concentración de un radionucleido que

de ser respirado durante un año laboral de 2000 horas a 1.2 m<sup>3</sup>/h, se traduce en el ALI incorporado.

Por otra parte, los límites autorizados, se establecen en general y como resultado de los procesos de optimización, y son autorizados por la autoridad competente.

Los niveles de referencia son usados para determinar un curso de acción o decisión en un programa de protección radiológica. Los niveles de investigación, son los niveles a partir de los cuales, en el caso de ser sobrepasado, la autoridad debe investigar las posibles causas con el propósito de evitar que se excedan los límites autorizados. Mientras que el nivel de intervención, es el valor de dosis equivalente prefijado, que justifica la intervención de la autoridad para lograr corrección de aquellas circunstancias que hacen posible esos niveles de dosis.

La evaluación de la dosis debido a incorporaciones de radionucleidos depende del cálculo de la incorporación que puede estimarse por mediciones directas por ejemplo medición de cuerpo entero o de órganos específicos, por mediciones indirectas en orina o heces, o por mediciones de muestras medioambientales. La dosis efectiva entonces es calculada a partir de la incorporación y el coeficiente de dosis de referencia. (1)

Los cálculos de los coeficientes de dosis para radionucleidos específicos utilizan modelos dosimétricos y biocinéticos definidos. A través de las normas internacionales de protección radiológica (*International Commission on Radiological Protection*, ICRP), estos parámetros son fácilmente empleados a través de modelos que predicen en base a la forma química y tamaño de partícula del compuesto que forma el radionucleido, su distribución en el cuerpo, su retención y su excreción.

Las vías de incorporación de radionucleidos al organismos son

- Inhalación
- Ingestión
- Heridas
- a través de la piel.

En el caso de exposiciones de personal ocupacionalmente expuesto, la principal vía de incorporación de radionucleidos al organismo es por inhalación de gases y aerosoles y la velocidad de absorción depende de las características físico-químicas del material. De tal modo, para el modelo del tracto respiratorio publicado por la ICRP se divide los materiales en Tipo F (fast), Tipo M (moderate) y Tipo S (slow) de acuerdo a su solubilidad. (2)

La biocinética describe 4 procesos: la absorción, la distribución, la retención y la eliminación, del compuesto en el organismo.

- La absorción, es la difusión del material radiactivo desde las vías de entrada hacia los líquidos extracelulares, y los dos principales caminos son absorción en las membranas pulmonares o absorción en el intestino delgado.
- El transporte de un contaminante hacia los órganos del cuerpo depende sobre todo de la forma química en la que se presente el compuesto.
- La distribución y retención del material en el organismo se describe por modelos metabólicos específicos de cada elemento incorporado.
- Por último la excreción es la eliminación de radionucleido por el organismo, la cual se efectúa esencialmente a través de orina y heces. Una pequeña cantidad puede eliminarse a través de las glándulas sudoríparas o por exhalación.

Las propiedades fisicoquímicas del material, como tamaño de partícula, solubilidad, están relacionadas con el grado de penetración en el pulmón, en la incorporación vía inhalación, así como en la absorción y disolución en sangre del radionucleido.

Por ejemplo, en este caso el uranio absorbido en sangre, es mayoritariamente excretado por el sistema renal en un corto periodo de tiempo y un porcentaje es distribuido en diferentes órganos, y excretado por orina en periodos de tiempo mayores. La Figura 1, Figura 2 y Figura 3 presentan las curvas de excreción en orina para compuestos de U-238 tipo F, M y S respectivamente, para distintos tamaños de partículas (8). Ejemplos de estos compuestos son:

Tipo F:  $UF_6$ ,  $UO_2F_2$ ,  $UO_2(NO_3)_2$

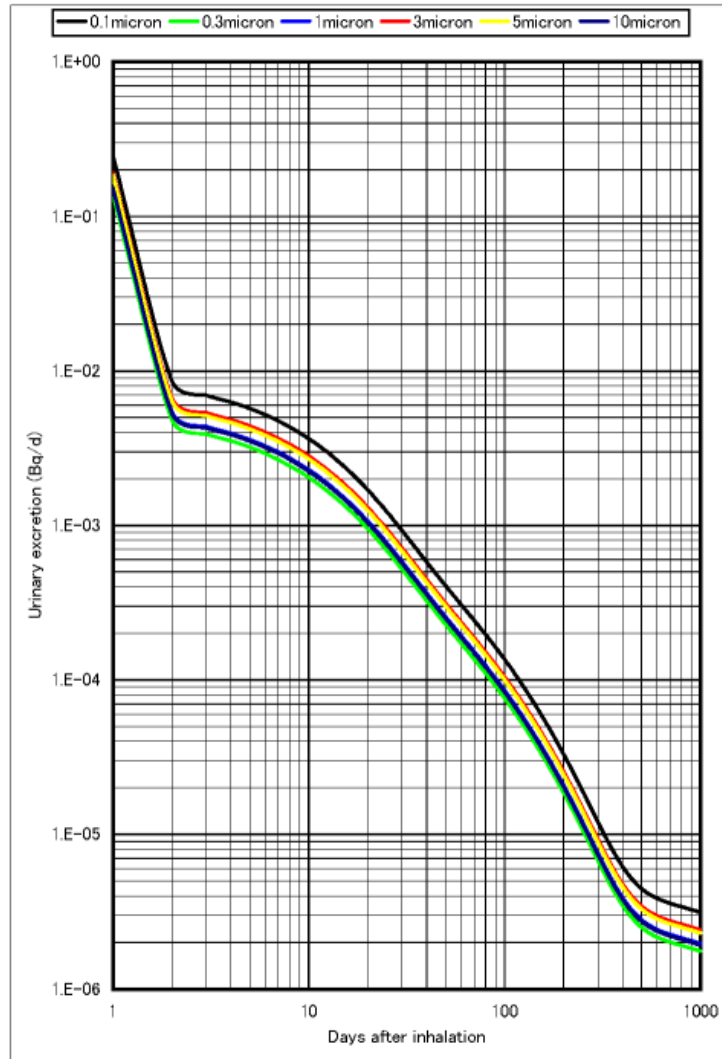
Tipo M:  $UO_3$ ,  $UF_4$ ,  $UCl_4$

Tipo S:  $UO_2$ ,  $U_3O_8$

En los tres casos, la actividad en la excreción es máxima en los primeros días luego de la exposición, es decir la mayor parte del uranio es eliminado en los primeros días y conjuntamente la tasa de eliminación es máxima (mayor pendiente en el gráfico) en las primeras 24 horas.

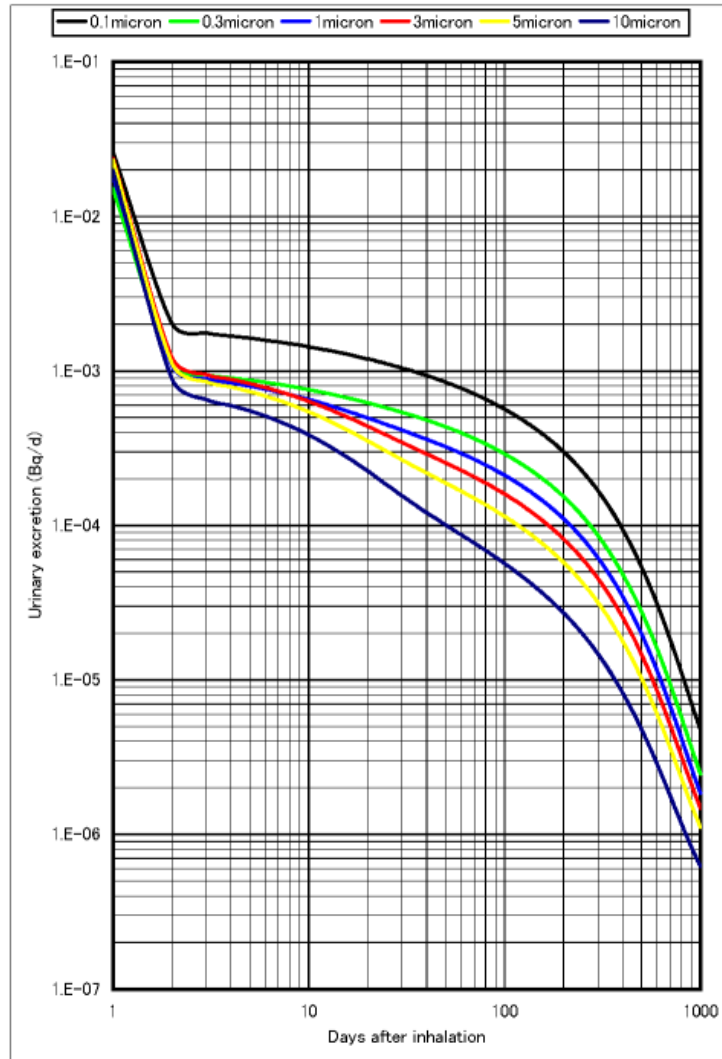
El uranio tiene una alta tasa de eliminación en orina, y de acuerdo al modelo biocinético, aproximadamente dos tercios de los átomos de uranio que ingresan a la sangre en el momento cero, se excretan en la orina durante las primeras 24 horas.

U-238, Type F, Daily urinary excretion



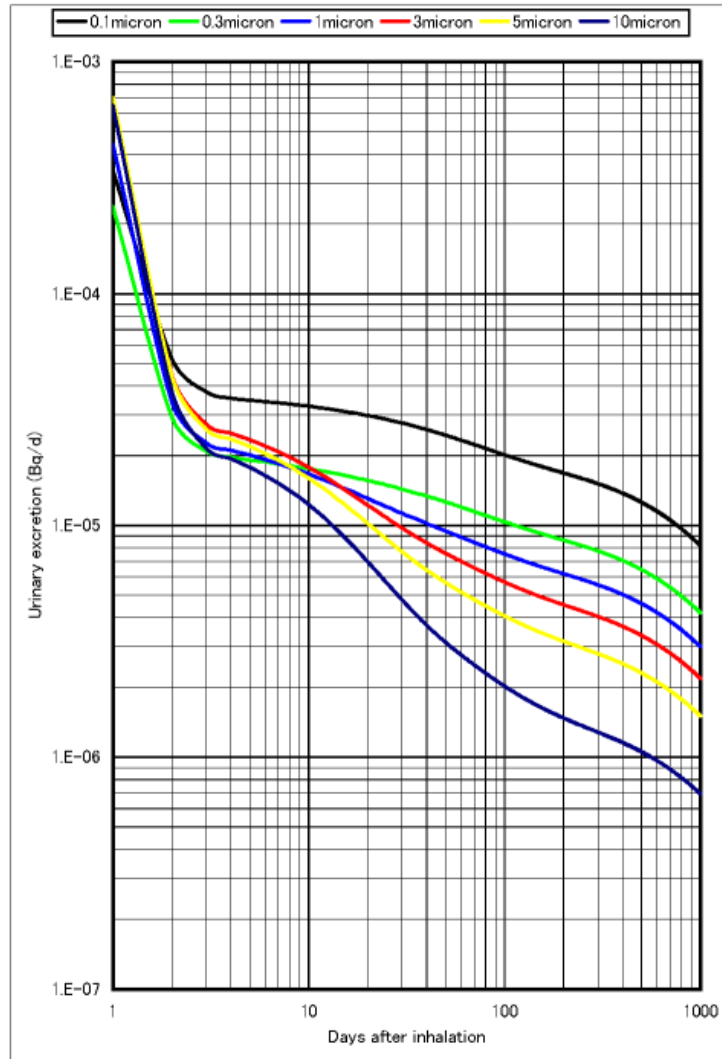
**Figura 1. Excreción de U- 238 en orina en función de los días luego de la inhalación. Compuestos Tipo F (8)**

U-238, TypeM, Daily urinary excretion



**Figura 2. Excreción de U- 238 en orina en función de los días luego de la inhalación. Compuestos Tipo M (8)**

U-238, Type S, Daily urinary excretion



**Figura 3. Excreción de U- 238 en orina en función de los días luego de la inhalación. Compuestos Tipo S (8)**

### 1.1.3 Toxicidad y Radiotoxicidad del uranio

El monitoreo ocupacional a trabajadores expuestos al uranio debe considerar que este posee tanto propiedades radiológicas como tóxicas, las cuales dependerán del enriquecimiento isotópico y de las formas físicas y químicas del compuesto de uranio.

Los efectos radiológicos se deben a la emisión de radiación ionizante y su efecto en los tejidos del cuerpo. Todos sus isótopos son radioactivos, y la emisión de radiación de alta energía genera serios efectos biológicos.

Además, el uranio es un metal pesado, y como tal es tóxico.

Así, los valores de los límites establecidos en la determinación de uranio por los distintos métodos, tales orina, heces, se basan en el límite que sea más restrictivo, el límite radiológico o el límite toxicológico.

El límite toxicológico se basa en que la carga de uranio en el riñón del trabajador se encuentre muy por debajo del límite que causa nefrotoxicidad luego de la exposición, así la concentración de uranio en el riñón no debe exceder 1.0  $\mu\text{g U/g}$  de riñón. Por otro lado, el límite radiológico se basa en la dosis efectiva comprometida en un periodo de un año, establecida en 0.02 Sv como promedio de 5 años, y que no debe exceder 0.05 Sv en un año. (10)

En el caso de encontrar valores por encima o valores que eventualmente podrían superar de 0.3  $\mu\text{g U/g}$  de riñón o la dosis efectiva anual 0.02 Sv, se requiere una investigación, dado que el confinamiento de uranio o los controles no dan un margen adecuado de seguridad. En cambio, si la concentración en riñón excede el límite de 1.0  $\mu\text{g U/g}$  de riñón o la dosis efectiva excede 0.05 Sv, se requieren acciones inmediatas, en este caso el confinamiento, la protección respiratoria o el programa de monitoreo no son aceptables. Estos se denominan, nivel de investigación y nivel de acción inmediata respectivamente.

Estos niveles basados en la carga del riñón y la dosis efectiva comprometida son denominados primarios y no son medibles. Debido a esto, se establecen los niveles secundarios tales como concentración o actividad de uranio en orina, heces, aire, los cuales son derivados de los niveles primarios y estimados por modelos biocinéticos y modelos dosimétricos. (10)

Los niveles derivados de concentración de uranio en orina, dependen de las condiciones de exposición, incorporación aguda o crónica, el compuesto químico de uranio inhalado, el tamaño de la partícula, el tiempo transcurrido desde la exposición a la recolección de la muestra de orina. Los modelos biocinéticos permiten estimar la relación entre la concentración de uranio en orina en mg/L y la carga del riñón en  $\mu\text{g}$  de U/g de riñón. En el Anexo se presentan los resultados de la aplicación de estos modelos en caso de incorporación aguda de uranio y de incorporación continua de uranio.

La Figura 4 presenta una tabla extraída de (10) donde se resumen los niveles de investigación y niveles de acción inmediata, para el caso de incorporación de un compuesto desconocido de uranio, asumiendo que el monitoreo se realiza trimestralmente y que la cantidad de uranio insoluble es despreciable. En el caso de la medición de concentración de uranio en orina, el límite de investigación se encuentra 10 µg/L y el nivel de acciones inmediatas en 33 µg/L. Estos niveles, que se establecen para un caso de incorporación de un compuesto desconocido de uranio, se basan en la situación más desfavorable para el trabajador: 100% material tipo F, lo que implica una absorción relativamente alta en la sangre, y con respecto a su composición isotópica 100% de la actividad medida de U-234, por ser el isótopo con coeficientes de dosis efectivas (dosis por unidad de actividad) ligeramente más altos que U-235 o U-238.

En el caso de que se conozca el tipo o forma de U incorporado los niveles de investigación y de acción inmediata, basados en uranio urinario, pueden calcularse a partir de las tablas correspondientes a la forma de uranio inhalado, limitando la atención a una forma específica de uranio.

Measure	Level	Action level <sup>a,b</sup>	
		Mass concentration or content of U	Activity concentration or content of U <sup>c</sup>
Concentration of unknown form of uranium in air	Investigation level		
	Average over a 40-h workweek	60 µg/m <sup>3</sup>	4.8 Bq/m <sup>3</sup>
	Average over 2 consecutive weeks	45 µg/m <sup>3</sup>	3.6 Bq/m <sup>3</sup>
	Average over a month	30 µg/m <sup>3</sup>	2.4 Bq/m <sup>3</sup>
	Average over 3 months	15 µg/m <sup>3</sup>	1.2 Bq/m <sup>3</sup>
	Immediate action level		
	Average over a 40-h workweek	200 µg/m <sup>3</sup>	12 Bq/m <sup>3</sup>
	Average over 2 consecutive weeks	150 µg/m <sup>3</sup>	9.0 Bq/m <sup>3</sup>
Average over a month	100 µg/m <sup>3</sup>	6.0 Bq/m <sup>3</sup>	
Average over 3 months	50 µg/m <sup>3</sup>	3.0 Bq/m <sup>3</sup>	
Concentration of uranium in urine after inhalation of unknown form	Investigation level	10 µg/L	0.6 Bq/L
	Immediate action level	33 µg/L	1.5 Bq/L
Concentration of uranium in feces <sup>d</sup>	Investigation level	Not specified	0.025 Bq/g
	Immediate action level	Not specified	0.06 Bq/g
Total activity of uranium in the chest	Investigation level	Not specified	200 Bq
	Immediate action level	Not specified	500 Bq

Figura 4. Límites secundarios, niveles de investigación y de acciones inmediatas (10)

Por otro lado, se debe considerar que en alimentos y en agua el uranio está presente naturalmente, por consiguiente, se incorpora alrededor de 2 µg de uranio natural por día, y una cantidad similar es excretada por orina y heces cada día. La estimación de la concentración de uranio en orina no es fácil, y se ha observado que varía en un amplio rango de concentración, dependiendo de la zona de residencia. Numerosos estudios publican niveles de excreción diaria que se pueden tomar como referencia, por ejemplo (12), donde las muestras de hombres y mujeres en edad entre 3 y 97 años, para U-238 se encuentra en un rango entre 0.44–30.5 mBq/día y de U-234 en un rango 0.33–28.61 mBq/día. Además, se estima que por heces se excreta la mayor parte del uranio incorporado, entre 1.4 y 1.8 µg/día, y en orina se pierde entre 0.05 y 0.5 µg/día.

Es necesario destacar que la variabilidad tanto individual como temporal, en el contexto ambiental, dificulta la interpretación de los resultados de bioensayos. En este sentido, se debe determinar si el resultado difiere de un blanco analítico, si este es el caso se debe decidir si la cantidad detectada es mayor que la que se esperaría en una población que no está expuesta ocupacionalmente. (11)

#### 1.1.4 Métodos de medición de uranio en orina

Desde hace varias décadas, el interés en la búsqueda de nuevas metodologías de análisis para caracterizar el uranio tanto en masa como en actividad se ve reflejado en las numerosas publicaciones del área.

La selección del método analítico aplicado en dosimetría interna depende de varios factores y básicamente se debe garantizar la aplicabilidad del mismo (más allá de la selección del tipo de monitoreo rutinario o especial), por lo que obliga a establecer claramente el límite de detección para la concentración de uranio, la incertidumbre del resultado, la rapidez del ensayo, su costo, la capacidad de analizar varias muestras simultáneamente, etc.

En la bibliografía se encuentra un gran número de metodologías aplicadas en función del análisis de concentración de uranio en orina y por otro lado la determinación de la concentración de actividad de cada isotopo (U-234, U-235, U-238). En líneas generales, para analizar uranio se emplean métodos como la fluorimetría, la fosforescencia laser y aquellos que determinan las relaciones isotópicas y/o actividad como TIMS (espectrometría de masas con ionización térmica), AAN (análisis por activación neutrónica), ICP-MS (espectrometría de masas con acoplamiento de plasma inductivo), espectrometría alfa.(13) (14) (15) (16) (17) (18) (19) (20) (21) (22)

El manejo de las muestras biológicas involucra complicaciones vinculadas a la baja concentración del analito y la presencia de matriz variable y de alto contenido salino. Así, los métodos para analizar orina requieren de esfuerzos analíticos vinculados al tratamiento y destrucción de la materia orgánica y/o a implementar equipos capaces

de medir en diluciones con los niveles de exactitud y precisión que se requiere en muestras de monitoreo. (14)(15)(16)

Los métodos más comunes aplicados a la determinación de uranio en orina son: la fluorimetría y la espectrometría alfa. (14)

La metodología para determinar la concentración de uranio aplicando la fluorimetría es una práctica rutinaria en muestras ambientales y biológicas. Se puede aplicar en muestras directas. La técnica analítica consiste en tomar una alícuota de la muestra, evaporar a sequedad en cazoletas de platino, agregar fluoruro de sodio y fundir a 1100°C. Posteriormente se mide la fluorescencia emitida por el compuesto de uranio ( $\lambda = 555\text{nm}$ ), al ser excitado con luz ultravioleta ( $\lambda = 365\text{ nm}$ ). La concentración de U se obtiene de la curva de calibración realizada conjuntamente con la muestra, empleando orina de personas no expuestas como matriz, y soluciones estándares de uranio. Los límites de detección varían entre 10-30  $\mu\text{g/L}$  para muestras sin tratamiento.

El empleo de la espectrometría alfa, requiere de un proceso largo y fuertemente dependiente del operador, es una metodología conocida y referida en dosimetría para la determinación de la concentración de actividad de actínidos. Por lo general, se trata el material de orina 24hs con diversas herramientas que involucran la destrucción del material, ya sea por microondas o por vía húmeda, o también una disminución del volumen a través de una coprecipitación selectiva empleando fosfatos o hidróxidos, logrando una concentración del analito y eliminación de la matriz. Actualmente, los métodos involucran separaciones cromatográficas empleando resinas de intercambio iónico o extracción, las cuales posibilitan la concentración de los radionucleidos.

En cada método analítico seleccionado, se debe incluir el uso de materiales de referencia en la matriz seleccionada, trazadores activos, y muestras blanco.

El empleo de la espectrometría alfa involucra el uso de celdas de electrodeposición donde se prepara la fuente radiactiva, y el empleo de detectores semiconductores de iones implantados (PIPS) que poseen muy bajo fondo espectral. Sin embargo, el empleo de la espectrometría debe realizarse con trazadores activos (U-233) puesto de los rendimientos en la electrodeposición pueden ser variables (34). En este caso, esta técnica resulta muy importante puesto que se pueden estimar la concentración de actividad de cada isotopo del uranio, estimando la dosimetría.

En el caso del análisis de masa de uranio, también es posible encontrar métodos donde se emplea la fosforescencia laser como KPA (analizador por fosforescencia cinética). Estos equipos permiten el cálculo de la concentración de uranio en muestras ambientales, a muy bajos límites de detección, sin embargo, se encuentra algunas dificultades en la aplicación en muestras de alta concentración salina, obligando a diluir la muestra y con ello aumentando las fuentes de incertidumbre, haciendo poco aplicable en método de rutina con alto número de muestras.

La técnica de ICP-MS puede ser aplicada en muestras biológicas para el monitoreo de uranio, tiene la ventaja que se pueden determinar los isótopos del mismo y alcanzar bajos niveles de detección (14), sin embargo, los procesos de preparación del material, a través de destrucción, separación y concentración con el uso de columnas cromatográficas, junto con el alto costo de uso, hace que la técnica sea aplicada en ciertas ocasiones.

Asimismo, se puede emplear la técnica de centelleo líquido para la caracterización de alfa total, en simultáneo con la determinación de la masa de uranio por fluorimetría. Esta forma de trabajo, presenta la ventaja de que se puede acceder al valor de la actividad con la misma muestra y procedimiento general que la concentración de uranio, sin embargo, varias veces los resultados no son convergentes.

Cada una de las etapas de una técnica analítica implica el aumento de fuentes de incertidumbre siendo clave en aquellos resultados analíticos que implican la toma de decisiones dosimétricas. Como así también el tiempo de respuesta frente a una eventual incorporación.

Teniendo en cuenta estos antecedentes analíticos, se propone una nueva metodología de análisis empleando equipamientos nuevos, de alta tecnología que facilitan la adquisición de bajos niveles de concentración, son rápidos, a relativamente bajo costo y pueden proveer información elemental adicional en cuanto a la composición de la muestra. Asimismo, no se requiere el uso de trazadores, mientras el método se encuentre validado según la ISO 17025.

## 1.2 Fluorescencia de Rayos X

### 1.2.1 FRX convencional

Fluorescencia de Rayos X (FRX) es una técnica analítica, espectroscópica que permite el análisis químico multielemental, tanto cualitativo como cuantitativo, de los elementos comprendidos entre el carbono (C) y el uranio (U) en una gran variedad de muestras líquidas, sólidas, polvos, matrices complejas, utilizando mínima cantidad de muestra.

El análisis por FRX es rápido, tanto la medición como la preparación de la muestra, lo que disminuye la probabilidad de contaminaciones y fuentes de incertidumbre. Asimismo FRX es una técnica no destructiva y no tiene efecto memoria.

Cuando un haz de rayos X incide en una muestra provoca la excitación de los elementos que la componen, se produce la eyección de los electrones de los niveles más internos de los átomos, y como consecuencia de esto, electrones de los niveles de energía mayores realizan un salto cuántico para llenar la vacancia. Cada transición electrónica constituye una pérdida de energía para el electrón, esta energía es emitida en la forma de un fotón de rayo X, de energía característica y definida para cada elemento, Figura 5. (23)

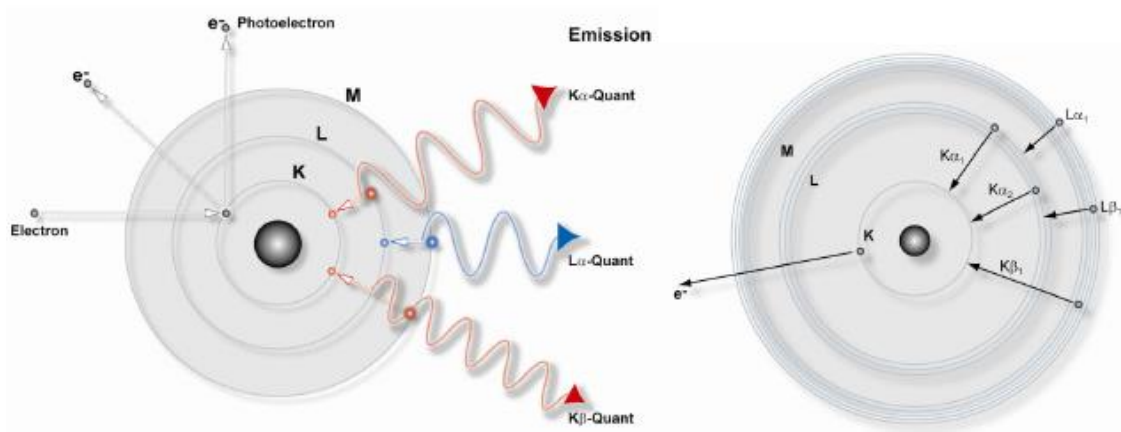


Figura 5. Rayos X- Transiciones electrónicas (23)

Existen dos metodologías principales XRF – Fluorescencia de Rayos X Dispersiva en energía (EDXRF) y Fluorescencia de Rayos X dispersiva en longitud de onda.

Hasta 1966 los espectrómetros de XRF eran dispersivos por longitud de onda WDXRF, (abreviatura del inglés *wavelength dispersive X-ray fluorescence*), basados en la ley de Bragg, los cuales necesitan de un movimiento sincronizado y preciso entre el cristal difractor y el detector.

Con el desarrollo del detector semiconductor de Si(Li), de alta resolución, capaz de discriminar rayos X de energías próximas, fue posible el surgimiento de la fluorescencia de rayos X con dispersión de energía (EDXRF, *energy dispersive X-ray fluorescence*).

De modo resumido, el análisis por fluorescencia de rayos X consiste en tres etapas: excitación de los elementos que constituyen la muestra, dispersión de los rayos X característicos emitidos por la muestra y detección de esos rayos X.

### 1.2.2 Excitación de los elementos

La excitación puede ser producida por partículas aceleradas generadas en un acelerador, por rayos X generados por un tubo de Rayos X; partículas alfa, beta negativa o rayos gamma emitidos por radionucleidos.

La energía mínima para producir la eyección de un electrón de las capas más internas de los átomos, debe ser superior a la energía de ligación del electrón en esa capa, denominada energía de ligación electrónica o también de corte de absorción. La cual puede calcularse de modo aproximado según la Ecuación 1 aplicando la teoría atómica de Bohr para el átomo de hidrogeno y átomos hidrogenoides, y posteriormente, haciendo algunas consideraciones sobre las experiencias de Moseley.

$$E = \frac{me^4(Z - b)^2}{8\epsilon_0^2 h^2 n^2}$$

**Ecuación 1**

Donde:

E = energía de ligación electrónica (joules),

m = masa de reposo del electrón =  $9,11 \cdot 10^{-31}$  kilogramos,

e = carga eléctrica del electrón =  $1,6 \cdot 10^{-19}$  coulombs,

Z = número atómico del elemento emisor de los rayos X,

b = constante de Moseley, con valores iguales a 1 y 7,4, para las capas K y L, respectivamente.

$\epsilon_0$  = permitividad eléctrica en el vacío =  $8,8534 \cdot 10^{-12}$  coulombs.newton<sup>-1</sup>.metro<sup>-2</sup>,

h = constante de Planck =  $6,625 \cdot 10^{-34}$  joules.s, e

n = número cuántico principal del nivel electrónico (n = 1 para capa K, n = 2 para capa L, etc.),

Sustituyendo por los valores de las constantes se obtiene la Ecuación 2. Al ocurrir el reordenamiento electrónico luego de la excitación, un electrón más externo ocupa la vacancia y produce la emisión de rayos X, de energía característica, igual a la diferencia entre la energía de los dos niveles de energía. En consecuencia tanto la

energía de ligadura, como la energía del rayo X emitido son proporcionales a Z, el número atómico del elemento.

$$E = \frac{13.65 (Z - b)^2}{n^2}$$

Ecuación 2

### 1.2.3 Dispersión de los rayos X característicos

La Figura 6 y Figura 7 representan esquemáticamente, los dos tipos de dispersión de FRX usados generalmente, EDXRF dispersivo en energía y WDXRF dispersivo en longitud de onda respectivamente.

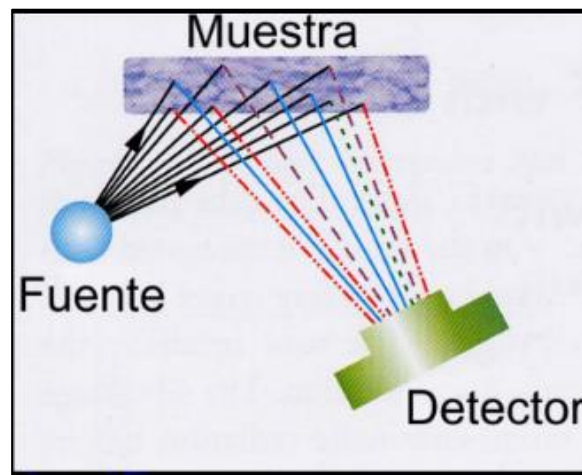


Figura 6. Espectrómetro EDXRF

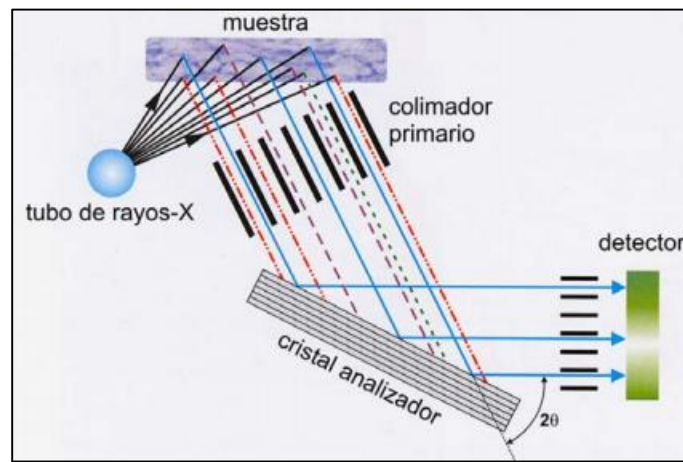


Figura 7. Espectrómetro WDXRF

En WDXRF, los rayos característicos son seleccionados por un cristal difractor de acuerdo a la ley de Bragg de difracción Ecuación 3.

$$n \cdot \lambda = 2d \sin \theta$$

Ecuación 3

Donde:

$\lambda$  = longitud de onda de los rayos X difractados (nm),

$d$  = distancia interplanar del cristal difractor (nm),

$\theta$  = ángulo entre la dirección del haz de rayos X incidente y superficie del cristal, o ángulo de incidencia,

$n$  = número entero = 1, 2, 3, también denominado de orden.

De manera de seleccionar las longitudes de onda emitidos por distintos elementos, el ángulo de incidencia sobre el cristal debe ser alterado así como la posición del detector. Los componentes del equipo están montados sobre un goniómetro, de tal manera de que exista una rotación sincronizada entre el detector y el cristal de difracción para que el ángulo de incidencia cambie secuencialmente a fin de discriminar las longitudes de onda o las energías de los rayos X emitidos por la muestra. Es por esto que en estos equipamientos, el barrido del espectro es de forma secuencial.

En cambio en EDXRF es necesario la utilización de un detector de alta resolución. Los rayos X son seleccionados a través de los pulsos electrónicos producidos en un detector apropiado, siendo estos pulsos directamente proporcionales a las energías de los rayos X. Los detectores más utilizados son los centelladores sólidos de NaI(Tl) y los semi-conductores de Si(Li), Ge(Li) y Ge hiperpuro.

#### 1.2.4 Detección de los rayos X

En los sistemas WDXRF se utilizan en general los detectores de gas proporcional y el cristal centellador solido NaI(Tl) para la detección de los rayos X, y no detectores de alta resolución, ya que la selección de los rayos X y la discriminación en las longitudes de onda o las energías de los rayos X emitidos son realizadas en un cristal difractor. El detector de gas proporcional normalmente es utilizado para rayos X de baja energía (1-15 keV), donde tiene una alta eficiencia de detección, en cuanto que el cristal centellador es utilizado para rayos X de alta energía (15-100keV). En este tipo de análisis además se cuenta con componentes electrónicos. Se obtiene así, un espectro donde la altura del pico registrado es proporcional a la intensidad del rayo X emitido por un elemento.

En los espectrómetros EDXRF, se utilizan detectores semiconductores de alta resolución que produzcan pulsos electrónicos proporcionales a las energías de los rayos X, el más utilizado es el detector de Si activado con Li. En este caso el área

debajo del pico del espectro, es proporcional a la intensidad del rayo X emitido por un elemento.

### 1.2.5 Reglas de selección. Nomenclatura en FRX

Solo algunas transiciones electrónicas están permitidas por lo que se conocen reglas de selección. Estas reglas se resumen a continuación:

$\Delta n \neq 0$  donde n es el número atómico principal.

$\Delta l = \pm 1$  donde l es el número cuántico azimutal, momento angular

$\Delta j = \pm 1$  o 0 donde j es la suma entre l y s (momento de spin).

El símbolo de una línea espectral como por ejemplo Ni  $K\alpha_1$  consiste en, el símbolo del elemento químico, el símbolo de las series K, L, M, N, etc., que es la línea donde se origina la vacancia electrónica y por último la letra griega  $\alpha, \beta$  (seguida de un numero) que describe la línea en particular de la serie.

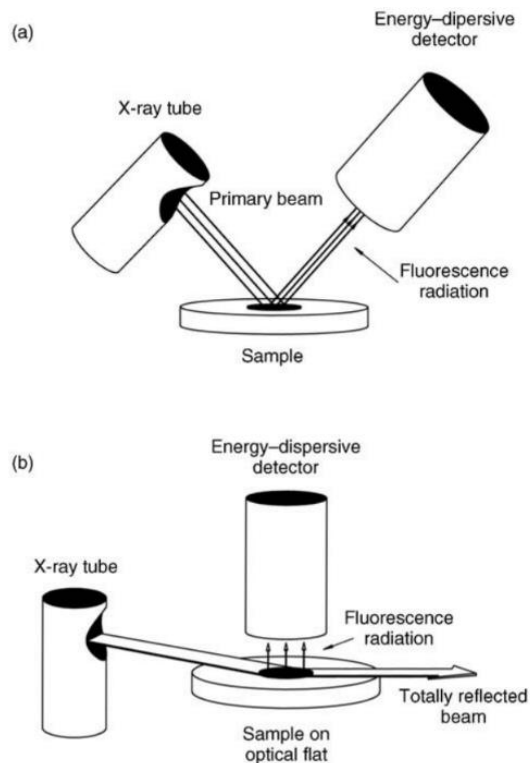
Así, la línea  $\alpha_1$  es la más intensa de la serie, y las líneas  $\alpha$  corresponden a la transición  $\Delta n = 1$ . La línea  $\beta_1$  es en general la segunda línea más intensa. Figura 5

En ocasiones se utiliza el símbolo  $K\alpha$ , que tiene una energía igual al promedio ponderado entre  $K\alpha_1$  y  $K\alpha_2$ , de intensidades relativas 2:1. (23)

### 1.2.6 Fluorescencia de Rayos X por Reflexión Total

Fluorescencia de Rayos X por reflexión Total, TXRF, es una variación de un equipo de EDXRF. El haz de Rayos X que incide sobre la muestra lo hace en un ángulo rasante por debajo del ángulo crítico de reflexión total. Debido a esto se produce la reflexión total de todos los haces incidentes sobre la muestra la cual forma un film delgado y está depositada sobre un reflector pulido. En un EDXRF el haz incide a  $45^\circ$  mientras que TXRF utiliza ángulos por debajo de  $0.1^\circ$  Figura 8. La alta eficiencia de reflexión sobre el soporte y la muestra disminuye la dispersión del haz incidente, disminuyendo así el fondo espectral.

TXRF permite un análisis a nivel ultratrazas, llegando a límites de detección de los  $\mu\text{g/L}$  o ng de muestra.



**Figura 8. (a) Espectrómetro EDXRF (b) Espectrómetro TXRF**

Un equipo de TXRF está compuesto por un tubo de rayos X, un monocromador, y un detector semiconductor que se posiciona muy cerca sobre la muestra, la cual está depositada en un reflector formando un film delgado, la Figura 9 ilustra un diagrama de la disposición de estos componentes dentro del equipo. El haz de excitación se dirige a la superficie del portamuestras con un ángulo de incidencia rasante y es reflejado de nuevo por ésta. Mediante la reflexión del haz de excitación sobre la superficie del portamuestras, se produce una doble excitación del material de la muestra. Este efecto contribuye a la elevada sensibilidad del método.

Debido a que el detector se encuentra muy cerca de la muestra, se detecta con gran eficacia la radiación de fluorescencia de rayos X, lo que contribuye a garantizar una elevada sensibilidad absoluta del método. (35)

Los portamuestras para TXRF de Bruker, consisten en discos de 30 mm de diámetro y  $3 \text{ mm} \pm 0.1 \text{ mm}$  de espesor y debido a su importancia en la obtención de resultados óptimos, son estrictos los requisitos tanto en su geometría como en la pureza de material. Además la superficie del portamuestra debe estar extremadamente pulida, ya que cualquier modificación en el grado de pulido provoca un incremento del fondo de dispersión en el espectro.

Existen 4 tipos de portamuestras comercializados actualmente por Bruker, reflectores de cuarzo, de zafiro, de plexiglás y cristal al carbono. Cada uno tiene

ventajas y desventajas en relación con el resto, a modo de ejemplo: en los reflectores de cuarzo, se observa la señal de Si, mientras que en los de Plexiglás no, pero estos últimos presentan un fondo muy elevado.

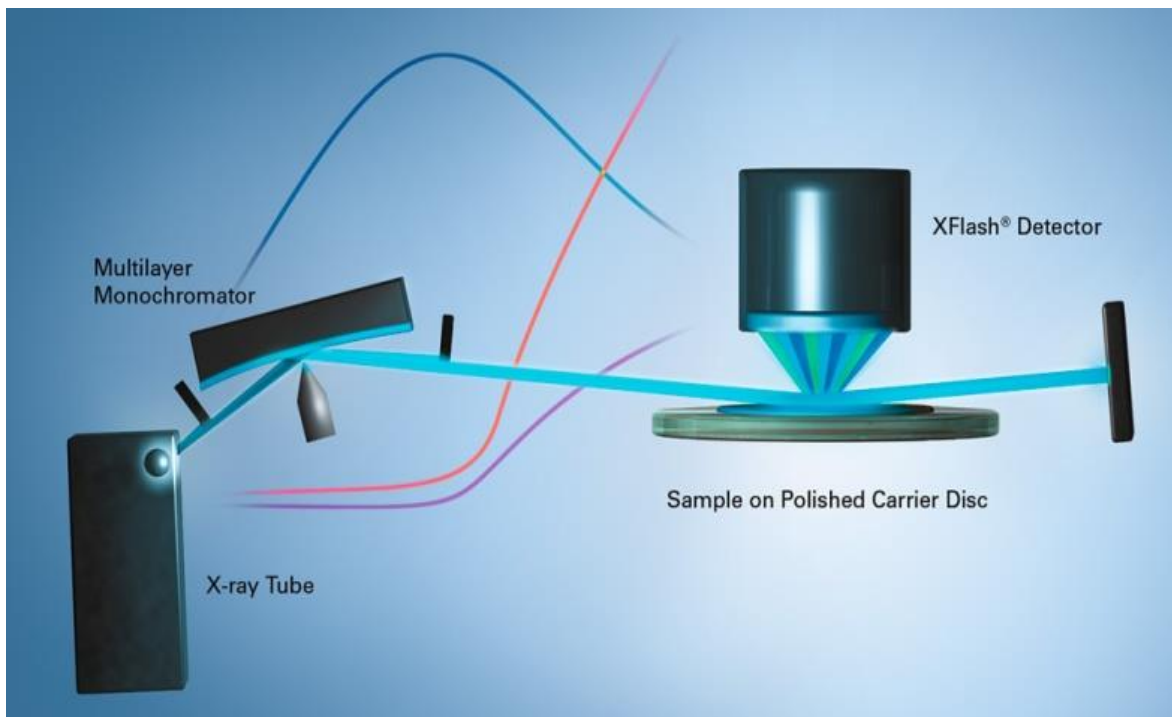


Figura 9. Espectrómetro TXRF (36)

El análisis de sangre, orina, plasma y otros fluidos corporales representan aplicaciones comunes de TXRF.

Las muestras de orina, no son ideales para el análisis por TXRF debido al alto contenido de sales de Na, K, Ca y Cl presentes. De todas maneras se encuentra bibliografía donde se determina la concentración de Platino y la concentración de Gadolinio en orina en el área médica donde pacientes fueron tratados con medicamentos con estos elementos. (32) (33)

El método consiste en medir 500  $\mu\text{L}$  de orina, con Ga como estándar interno directamente en un espectrómetro con tubo de Mo, durante 1000 segundos. El límite de detección estimado para gadolinio en orina es de 100  $\mu\text{g/L}$ , y la precisión de tres mediciones caracterizada por el RSD (desvío estándar relativo) de 1.6%.

TXRF es una alternativa, para análisis de muestras de laboratorios clínicos, con la ventaja de que es más rápida y sencilla, que otras técnicas en el análisis de trazas, como ICP-MS ya que no se necesita una digestión o dilución de las muestras. (23)

Cabe destacar las ventajas analíticas de la TXRF entre las cuales se encuentran:

- Análisis multielemental simultáneo, análisis cualitativo y cuantitativo elemental de elementos comprendidos Na y U.
- Análisis rápido, alrededor de 300 segundos de medición, con mínima preparación de muestra.
- Reproducible.
- Sin efecto memoria.
- Medición de la muestra directa con su matriz, cuando la muestra forma un film delgado no hay efecto matriz ni efecto interelemento.
- Amplio ámbito de concentraciones, análisis de elementos en concentraciones entre  $\mu\text{g/L}$  y  $\text{mg/L}$  simultáneamente.
- Gran capacidad de análisis.
- Mínima cantidad de muestra, entre  $5 \mu\text{l}$  y  $1 \text{ mL}$ .

### 1.2.7 Cuantificación por TXRF

Por lo que se refiere a la cuantificación, TXRF requiere el agregado de un estándar interno a la muestra. Éste debe cumplir ciertas condiciones, entre las cuales se encuentran, no estar presente en la muestra, tener energía de los rayos x característicos preferentemente cercano en energía a la emisión característica del analítico de interés, no debe tener interferencias en la matriz, y la cantidad agregada debe ser en cuentas similar a las del analito a cuantificar.

En TXRF la muestra que se deposita en un reflector de cuarzo forma un film delgado, y no se puede asegurar que la posición del residuo seco en el portamuestra este centrado en la dirección del haz de incidencia. Por lo tanto la sensibilidad absoluta no es utilizada y se adiciona el estándar interno para corregir desviaciones geométricas de la gota depositada en el portamuestra.

Bajo las condiciones de que la muestra forma un film delgado, no existen efectos de matriz ni efectos inter-elementos y la concentración del elemento es proporcional al número de cuentas, según la Ecuación 4, donde:

$C_i$ : concentración del analito.

$N_i$ : Numero de cuentas del analito.

$S_i$ : sensibilidad del analito.

$C_{is}$ : Concentración del estándar interno.

$S_{is}$ : sensibilidad del estándar interno.

$N_{is}$ : número de cuentas del estándar interno.

$$C_i = \frac{N_i C_{IS} S_{IS}}{S_i N_{IS}}$$

Ecuación 4

Se entiende por calibración del espectrómetro la estimación de sensibilidad  $S$  relativa al estándar interno (en el caso de Ga la sensibilidad es igual a 1). Las sensibilidades, dependen del número atómico y varían según la Figura 10 para los elementos de las series K y los elementos de las series L. (23) (31)

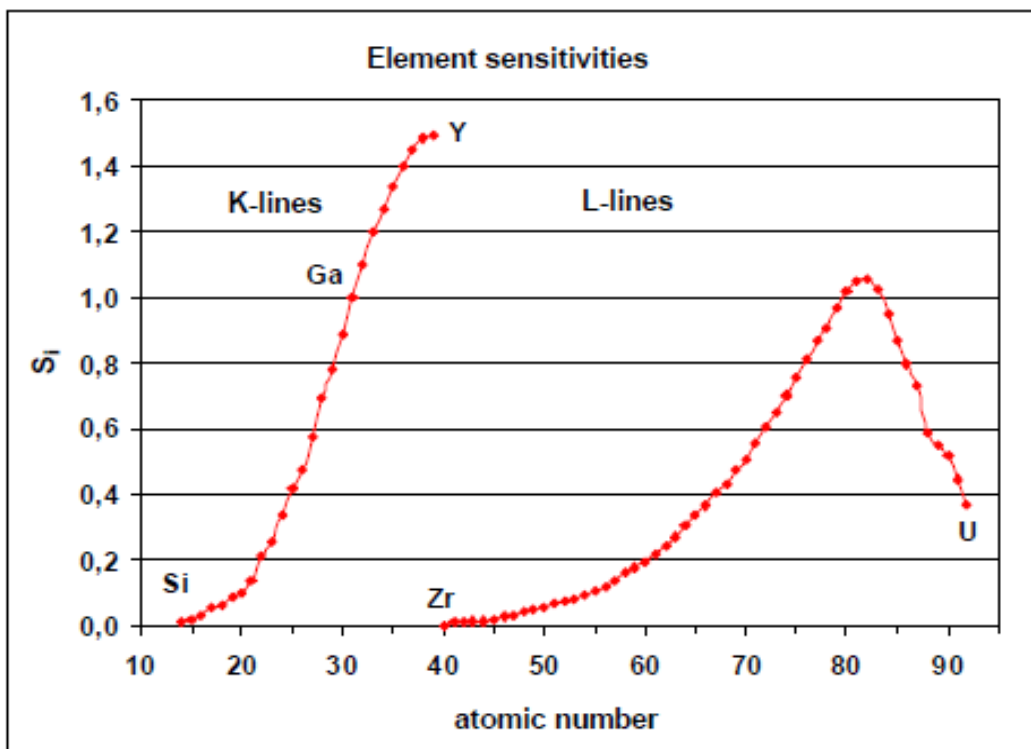


Figura 10. Sensibilidad Experimental (23) (31)

### 1.2.8 Interferencia Espectral. Rb $K\alpha$ (13.396 keV) - U $L\alpha$ (13.614 keV).

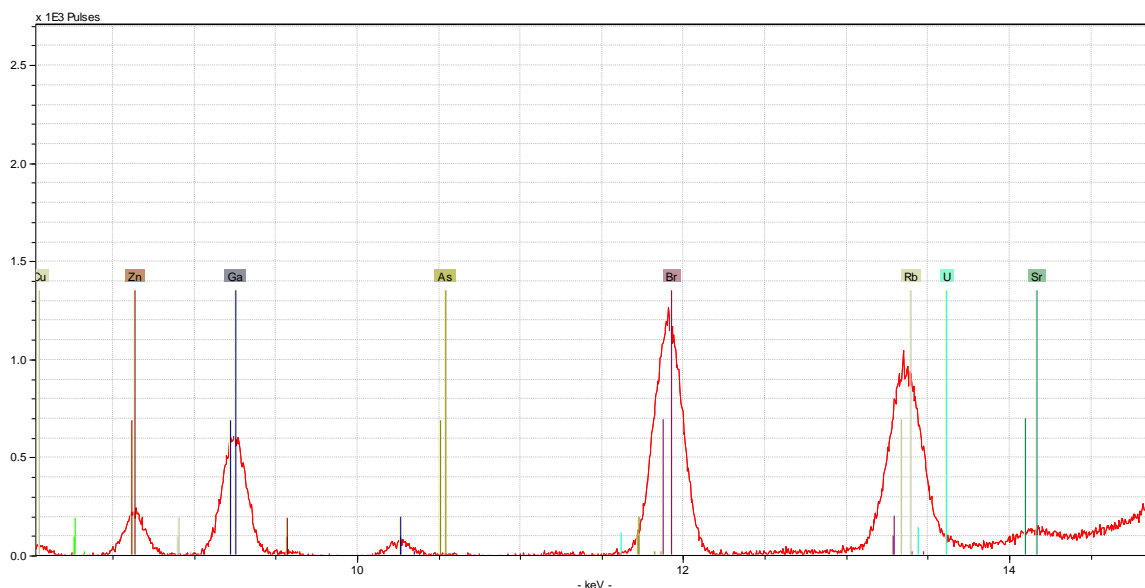
La energía de las líneas obtenidas dependen del número atómico del elemento y se pueden encontrar las líneas de la serie K para elementos comprendidos entre el Na y el Y, líneas K-alfa y K -beta, y las líneas de la serie L para elementos entre el Zr y el U, L-alfa y L-beta.

La energía de emisión de las líneas, es característica para cada elemento, y en el espectro se encuentran pocas interferencias espectrales las cuales son bien conocidas. Estas interferencias se dan entre líneas de elementos de la serie K, y líneas L de elementos pesados, o elementos de la serie L. Por ejemplo As K $\alpha$  (10.54 keV) con Pb L $\alpha$  (10.55 keV), Rb K $\alpha$  (13.396 keV) con U L $\alpha$  (13.614 keV). Además puede darse entre líneas K $\alpha$  y K $\beta$  de diferentes elementos por ejemplo Cr K $\alpha$  (5.41 keV) interfiere con V K $\beta$  (5.43 keV).

En TXRF, debido a que no existe efectos interelemento, ni efecto de matriz, programas convencionalmente utilizados para el análisis de espectros de TXRF, tal como el S2 Picofox, Bruker, permiten la deconvolución de los picos interferentes y la cuantificación de cada uno de los elementos.

No obstante esta deconvolución es óptima para cierta relación de concentraciones de elementos interferentes y la presencia de interferente aumenta el límite de detección.

En orina se encuentra, en promedio, una concentración de Rb de 1.4 mg/L y es interferente en la determinación de U tal como se muestra en el espectro de la Figura 11, obtenido a partir de una muestra de orina con 100  $\mu\text{g/L}$  de U, utilizando como estándar interno una solución certificada de Ga.



**Figura 11. Espectro de medición de 100  $\mu\text{g/L}$  de U en orina por TXRF.**

La interferencia de Rb – U aumenta el límite de detección de U en TXRF y éste depende de la relación de concentraciones que existe entre los elementos.

### 1.3 Métodos separativos de análisis: Cromatografía

La separación del analito de las posibles interferencias suele ser una etapa de vital importancia en los procedimientos analíticos, y la cromatografía es una de las opciones más recomendadas para realizarlo. En las separaciones cromatográficas la muestra se disuelve en una fase móvil (gas, líquido o fluido supercrítico) y se pasa a través de una fase estacionaria fija en una columna o una superficie sólida. Los componentes de la muestra que son retenidos por la fase estacionaria se mueven con más lentitud con el flujo de la fase móvil que los componentes que son fuertemente atraídos por la fase móvil, generándose tiempos de retención diferentes.

Los métodos cromatográficos se clasifican en tres categorías generales, cromatografía de gases (CG), cromatografía de líquidos (CL) y cromatografía de fluidos supercríticos (CFS), donde las fases móviles en las tres técnicas son gases, líquidos y fluidos supercríticos, respectivamente. CG y CL involucran varios métodos cromatográficos específicos. Además los métodos cromatográficos se pueden clasificar en cromatografía en columna y cromatografía en plano.

Dentro de la cromatografía líquida, se encuentran varios tipos de cromatografías que se clasifican de acuerdo con el mecanismo de separación o el tipo de fase estacionaria. Entre estos tipos están 1) cromatografía de reparto; 2) cromatografía de adsorción o cromatografía líquido-sólido; 3) cromatografía de intercambio de iones o cromatografía iónica; 4) cromatografía de exclusión por tamaño; 5) cromatografía por afinidad y 6) cromatografía quiral.

La cromatografía de líquidos es la técnica analítica de separación más ampliamente utilizada. Entre las razones se encuentra su amplia aplicabilidad a sustancias que son importantes en la industria, muchos campos de la ciencia y para la sociedad en general. (28)

En este desarrollo se propone el uso de la cromatografía en columna, con una resina de Sr de Eichrom ® para la eliminación o disminución de la concentración de la interferencia.

#### 1.3.1 Extracción cromatográfica

En los últimos años, este tipo de resinas que involucra un soporte inerte impregnado con un solvente orgánico selectivo, fue ganando aplicaciones en radioquímica por su alta eficiencia de separación, rápidas y de fácil preparación.

En este caso, las resinas de Sr-spect de Eichrom ® contienen 4,4'(5')-di-t-butilciclohexano 18-crown-6 (crown ether) en 1-octanol sobre un soporte polimérico inerte. La densidad de Sr Resin es aproximadamente 0.35 g/mL. (30)

Estas resinas, utilizadas en general para la retención de Sr, son afines a varios iones, y su afinidad depende de la concentración de HNO<sub>3</sub> tal como se muestran en

la Figura 12 y Figura 13. La afinidad de Rb, es máxima a una concentración de  $\text{HNO}_3$  1M y la afinidad de U a esta concentración es menor. Esta diferencia de afinidades hace posible su aplicación en la etapa de purificación de la matriz necesaria para disminuir la presencia de este interferente y facilitar la medición de uranio en orina por TXRF. (37)

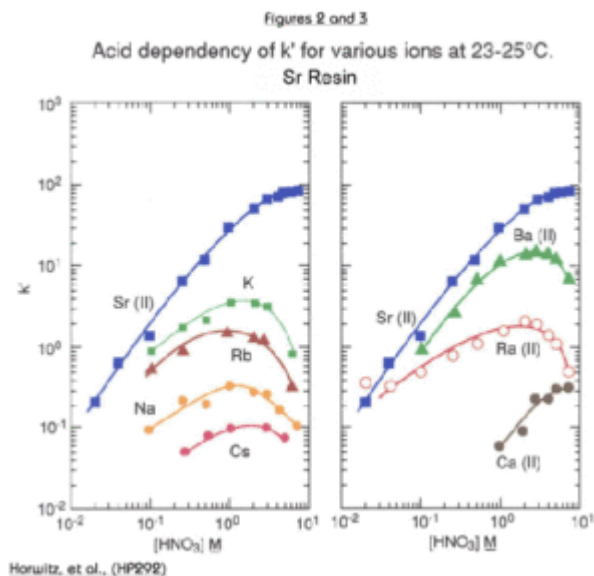


Figura 12. Afinidad de Sr resin Eichrom (30)

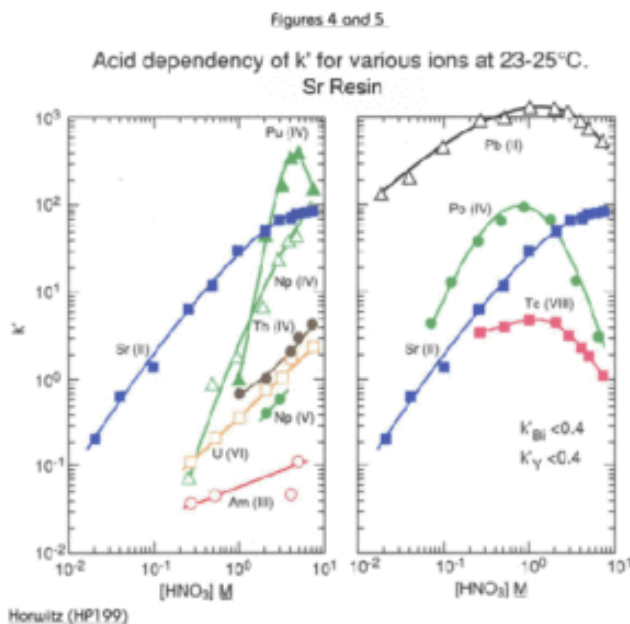


Figura 13 Afinidad de Sr resin Eichrom (30)

## Objetivos

- 1) Proponer una nueva metodología de análisis aplicando la fluorescencia de rayos X por reflexión total en muestras biológicas
- 2) Estudiar las opciones para disminuir la interferencia espectral U-Rb a través de las columnas de extracción cromatográfica
- 3) Optimizar las etapas de preparación de las muestras, de la separación, calibración de los equipos de TXRF, y búsqueda de las condiciones más favorables para la medición de orina directa.
- 4) Estimación de los parámetros analíticos de interés más relevantes como límite de detección, para evaluar la aplicabilidad del método en muestras de rutina o especiales.

# Capítulo 2

## Desarrollo experimental

### 2.1 Instrumentación

La determinación elemental a lo largo de este desarrollo se realiza en el espectrómetro de Fluorescencia de Rayos X por Reflexión Total, S2 Picofox, Bruker nano GmnH, Alemania, Figura 14, de características detalladas en la **¡Error! No se encuentra el origen de la referencia..** Incluye computadora con software validado según certificado del proveedor (Bruker). (31)

Tubo de Rayos X	Mo target, 50 kV, 0.6 mA
Rango de elementos	Na a Zr, Ru a U
Óptica	Multilayer Ni/C, 17.5 keV, 80% reflectivity
Detector	Si drift detector, SDD, 10 mm <sup>2</sup> , < 160 eV resolución @ Mn K $\alpha$
Consumo	150 W

Tabla 1 Características del S2 Picofox (31)

El S2 Picofox es un equipo de mesada, compacto y portátil, independiente de nitrógeno líquido, o de un sistema refrigerante. Cuenta con

- Tubo de rayos X compacto y refrigerado por aire con tecnología de metal-cerámica
- Óptica de rayos X multicapa para enfoque de haz y monocromatización
- El último detector XFlash® de alta resolución enfriado con Peltier (SDD)

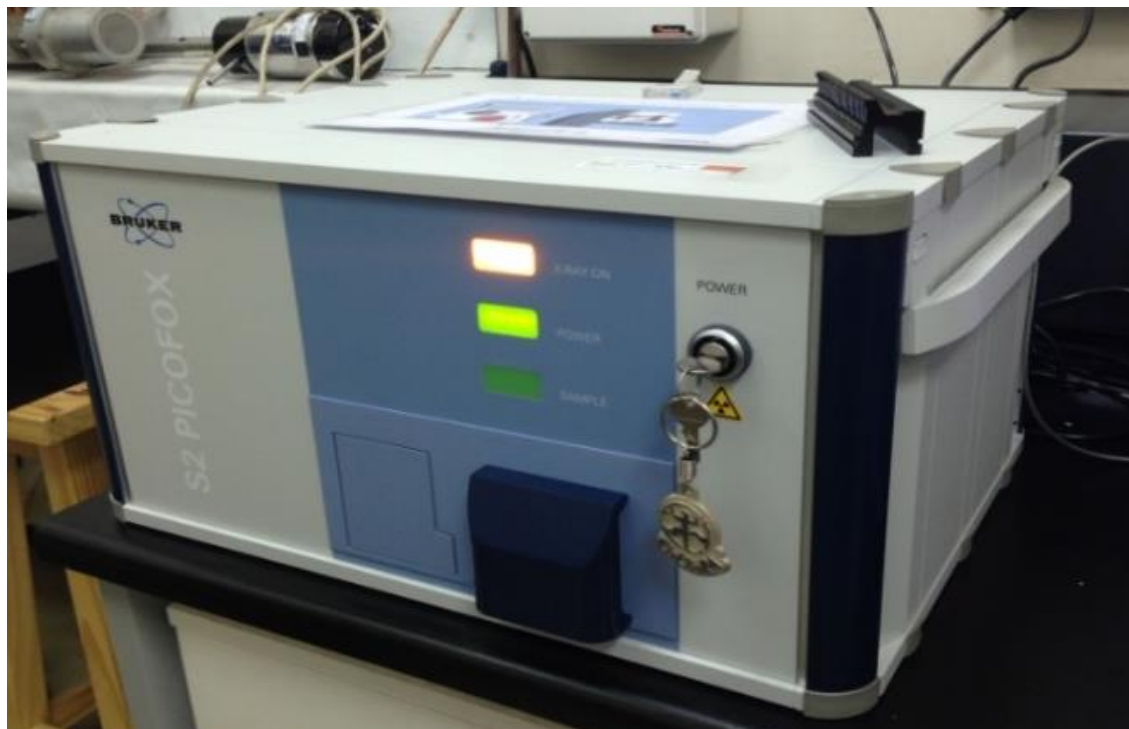


Figura 14. Espectrómetro S2 Picofox, Bruker

## 2.2 Determinación elemental en S2 Picofox

La medición en el espectrómetro S2 Picofox, es rápida, y requiere una mínima preparación de muestra. Se pueden determinar muestras líquidas, tales como agua, efluentes, alimentos (jugo, leches) y biológicas. Además sólidos en polvo realizando una suspensión en un dispersante adecuado. La muestra en general puede determinarse directamente con su matriz, o realizando una destrucción de matriz por un método de digestión.

Entre los materiales necesarios se encuentran reflectores de cuarzo Bruker®, que son los portamuestras, pipetas automáticas de volúmenes variables, tips, agitador automático Techno Kartell TK3S (71379), tubos eppendorf y solución estándar de Galio 1000 µg/mL (Merck, Alemania) el cual es utilizado como estándar interno para la cuantificación.

Los reflectores de cuarzo son reutilizables, y se lavan sumergiéndolos en solución de ácido nítrico 5% durante un periodo de un día, luego son enjuagados con agua y secados con papel suave, por último se miden durante 60 segundos en el espectrómetro, de tal manera de asegurarse su limpieza. Este paso es de

importancia, debido a que asegura la no contaminación de la muestra por el portamuestra.

Para la medición de muestras líquidas la metodología empleada es la siguiente:

- 1) Agregar el estándar interno a la muestra.
- 2) Agitar en agitador automático.
- 3) Tomar 5  $\mu\text{L}$  de muestra, y depositar en un reflector de cuarzo limpio.
- 4) Llevar a sequedad bajo lámpara IR
- 5) Medir en el espectrómetro durante 300 segundos.

La principal incertidumbre del análisis es volumétrico, y el paso más crítico es el agregado del estándar interno. Por este motivo, la determinación se realiza con pipetas automáticas, calibradas y verificadas y conjuntamente como estándar interno se utiliza una solución trazable al NIST de Ga 1000 mg/L (Merck, Alemania).

El espectro obtenido, se integra, correlacionando cada pico observado con el elemento, las energías de fluorescencia están tabuladas y el software cuenta con una base de datos.

Tres señales son observables en todas las mediciones; la señal del Si, debido al reflector de cuarzo, el Ar del aire entre la muestra y el detector, y el Mo debido al tubo de rayos X.

### 2.3 Uso de la columna cromatográfica Sr-Spec

Las columnas cromatográficas Sr-spec, son reutilizables, y deben activarse y lavarse antes y después de eluir la muestra de interés.

Entre los materiales utilizados se encuentran agua nanopure (18.2 M $\Omega$ -cm), ácido nítrico Merck®, con la cual se preparan soluciones de HNO<sub>3</sub> 0.01 M, 0.1 M y 1M, además de la columna Sr-spec, se requiere un soporte adecuado, y recipientes para tomar las alícuotas.

De acuerdo a la bibliografía, la mayor afinidad de la columna con rubidio es en HNO<sub>3</sub> 1M, y teniendo en cuenta que en el manejo de columnas cromatográficas no son deseables los cambios fuertes en pH, la activación requiere la elución de HNO<sub>3</sub> en concentraciones secuencialmente mayores. Es decir, eluir:

- 10 mL de H<sub>2</sub>O
- 10 mL de HNO<sub>3</sub> 0.01 M.
- 10 mL de HNO<sub>3</sub> 0.1 M
- 5 mL HNO<sub>3</sub> 1 M

El volumen de siembra en este desarrollo se seleccionó en 1 mL y la muestra debe estar en medio HNO<sub>3</sub> 1 M para mantener el medio al ingresar a la columna.

Una vez eluída la muestra con  $\text{HNO}_3$  1 M se debe lavar la columna. El lavado de la columna se realiza con agua, esto se debe a que la afinidad tanto del rubidio como de la mayoría de los iones disminuye cuando disminuye la concentración de  $\text{HNO}_3$ , por lo tanto se realiza el procedimiento inverso descrito anteriormente.

## 2.4 Calibración de la sensibilidad de U

La calibración de la sensibilidad de uranio en el espectrómetro S2 Picofox se realiza en solución acuosa, el efecto matriz en orina se deberá estudiar posteriormente. La curva de calibración se realiza con al menos 5 puntos, y en este caso se calibra para concentraciones bajas de U, con un rango entre 100  $\mu\text{g/mL}$  y 2  $\text{mg/L}$ .

Entre los materiales utilizados se encuentran los referentes a la medición por TXRF descritos anteriormente y una solución estándar de uranio 1000  $\mu\text{g/mL}$  (Merck, Alemania), solución estándar de galio 1000  $\text{mg/L}$  (Merck, Alemania), agua nanopure (18.2  $\text{M}\Omega\text{-cm}$ ), ácido nítrico Merck®, con la cual se preparan los diferentes puntos de la curva. Las diluciones se preparan en matraz Clase A (IVA ®), calibrado y verificado periódicamente.

Para la curva de calibración de sensibilidad se miden por quintuplicado soluciones de 100  $\mu\text{g/mL}$ , 200  $\mu\text{g/mL}$ , 500  $\mu\text{g/mL}$ , 1  $\text{mg/mL}$ , 2  $\text{mg/mL}$  de U con 1  $\text{mg/L}$  de Ga como estándar interno. Por estimación lineal, según la Ecuación 4, se estima la sensibilidad experimental de U con respecto a Ga.

El valor obtenido de sensibilidad experimental, se aplica a todas las muestras independientemente de su concentración. De allí que esta etapa es prioritaria para el empleo de la TXRF.

Posteriormente, el valor de sensibilidad obtenido (calibración TXRF) se verifica con una solución independiente de U 1  $\text{mg/L}$  y U 0.1  $\text{mg/L}$ , analizada al menos 10 veces para estimar el sesgo y el desvío estándar relativo.

El espectrómetro de TXRF se calibra solo una vez, y luego solo debe verificarse. Esto es una ventaja comparado con otras técnicas analíticas, donde debe calibrarse cada vez que se mide.

## 2.5 Relación de uranio y rubidio.

Dentro de los estudios de los interferentes espectrales, debe evaluarse cuál es la mínima concentración de interferente que afecta al resultado.

Para esto, se preparan soluciones variando la concentración de rubidio, en un ámbito entre 2  $\text{mg/L}$  y 0.1  $\text{mg/L}$  y se fija la concentración de uranio en 0.01  $\text{mg/L}$ .

Las soluciones se miden por quintuplicado por TXRF y se utiliza Ga 1 mg/L como estándar interno para la cuantificación.

De esta manera, se busca encontrar cual es la mínima cantidad de rubidio que permite la cuantificación de 0.01 mg/L de uranio.

## 2.6 Perfil de Elución

Durante la etapa de optimización del método cromatográfico, es necesaria la realización de un perfil de elución, de tal manera de estimar experimentalmente los volúmenes necesarios para la recuperación de cada una de las fracciones separadas por la columna. En tal caso, es necesario establecer previamente el tipo de columna (volumen, porosidad, nivel de entrecruzamiento, etc.) y seleccionar las fracciones de interés y las concentraciones de la fase móvil que permitan la correcta separación.

El conocimiento de los perfiles de elución permite encontrar los volúmenes más efectivos para garantizar la máxima recuperación del analito.

El perfil de elución, se realiza con una solución de rubidio de 1.4 mg/L y una solución de 0.1 mg/L de uranio, donde por un lado, se simula la concentración media de rubidio en orina y por el otro, la selección de la concentración de uranio es tal que facilite la medición de las fracciones de los eluidos y lavados de la columna. Las soluciones se siembran por separado y se estudia el tiempo de retención de cada uno de los analitos.

Entre los materiales requeridos, sumados a los referidos a la cuantificación por TXRF en esta etapa, se encuentran, columna Sr-spec Eichrom, solución estándar de uranio 1000 µg/mL (Merck, Alemania), solución estándar de rubidio 1000 µg/mL (Merck, Alemania), y además agua nanopure (18.2 MΩ-cm) y ácido nítrico, con los cuales además de prepararse las solución de rubidio de 1.4 mg/L y de uranio de 0.1 mg/L necesarias, se preparan concentraciones de 1M, 0.1 M y 0.01 M de HNO<sub>3</sub> para activar la columna, eluir los analito, y lavar la columna posteriormente.

El perfil de elución en las columnas Sr-Spec Eichrom conlleva la siembra de 1 mL de una solución que contiene Rb 1.4 mg/L en una primera instancia y 1 mL de U 0.1 mg/L en una segunda instancia, la elución se realiza con HNO<sub>3</sub> 1M, según bibliografía la máxima afinidad de rubidio por la columna es a concentración 1 M, Figura 12.

Se toman alícuotas cada 0.5 mL aproximadamente en tubos eppendorf previamente pesados y cada 0.2 mL en los volúmenes cercanos a la elución del analito, de tal manera de estimar mejor el perfil en esa zona.

Para la cuantificación por TXRF se agrega a cada alícuota 5 µL de Ga 100 mg/L. Se calcula la concentración de Ga en cada muestra y se analiza en el espectrómetro

S2 Picofox. Se registra la concentración de uranio y de rubidio, en cada una de las alícuotas y se grafica en función del volumen eluído.

## 2.7 Metodología experimental propuesta. Utilización de la columna Sr- Spec

En base a los resultados del perfil de elución, se propone un método para la determinación de uranio en orina por TXRF utilizando la columna Sr-spec.

La metodología experimental propuesta se describe a continuación:

- A 10 mL de orina a analizar se le agrega 0.7 mL de HNO<sub>3</sub> sb antes de realizar la determinación, para generar el medio 1M de HNO<sub>3</sub>.
- La columna se activa con lavados sucesivos de 10 mL de HNO<sub>3</sub> 0.01 M, HNO<sub>3</sub> 0.1M y HNO<sub>3</sub> 1M. Se siembra 1 mL de orina, y se eluye de HNO<sub>3</sub> 1 M. Se retoma el eluído de los primeros 3 mL en un recipiente apto para luego llevar a sequedad.
- La columna se lava con HNO<sub>3</sub> 0.1 M, HNO<sub>3</sub> 0.01M y agua.
- La fracción recolectada se lleva a sequedad en plancha (o estufa) y se retoma con 100 µL de solución de Ga 1 mg/L en HNO<sub>3</sub> 8 M, el cual es el estándar interno necesario para la cuantificación por TXRF.
- Se agita en agitador automático.
- Se siembran 5 µL en reflector de cuarzo.
- Se lleva a sequedad en lámpara IR
- Por último se mide en el espectrómetro S2 Picofox durante 300 segundos.

Se debe considerar que este método involucra una concentración en 10 respecto a la medición directa de orina además del aumento de la relación de concentración de U/Rb debido a la disminución de la cantidad de rubidio.

## 2.8 Estimación de parámetros analíticos. Estimación experimental del límite de detección

El Límite de detección es la concentración o masa mínima del analito que puede ser detectada con un nivel de confianza conocido. (28) En todo desarrollo analítico, es de importancia su estimación, y referente a la protección radiológica, le da la aplicabilidad a la técnica de acuerdo a los límites derivados establecidos en el monitoreo por bioensayo.

A fin de estimar experimentalmente el límite de detección de la metodología propuesta, se miden repeticiones de orinas con 0.10, 0.05, 0.02 y 0.01 mg/L de U,

de manera directa por TXRF y utilizando la separación por columna de tal forma de comparar ambos métodos. Luego, con los valores obtenidos para 0.02 mg/L con el método de extracción por columna propuesto se estima el límite de detección de acuerdo a la definición estadística, Ecuación 6 y Ecuación 7.

La estimación del límite de detección, se puede realizar con la medición de blancos o la medición de concentraciones cercanas al límite de detección. En este desarrollo, se decide utilizar las mediciones cercanas al límite de detección, debido a que en blancos es dificultoso la integración del espectro en la región de interés (ROI), debido a la interferencia de rubidio. Además, considerando que el software puede realizar la deconvolución de picos y brinda resultados, aunque no se distinga visualmente el pico.

En la Figura 15 se esquematiza la elución en la columna y la medición por TXRF de las muestras de orina. Se añaden fotografías de partes del proceso.

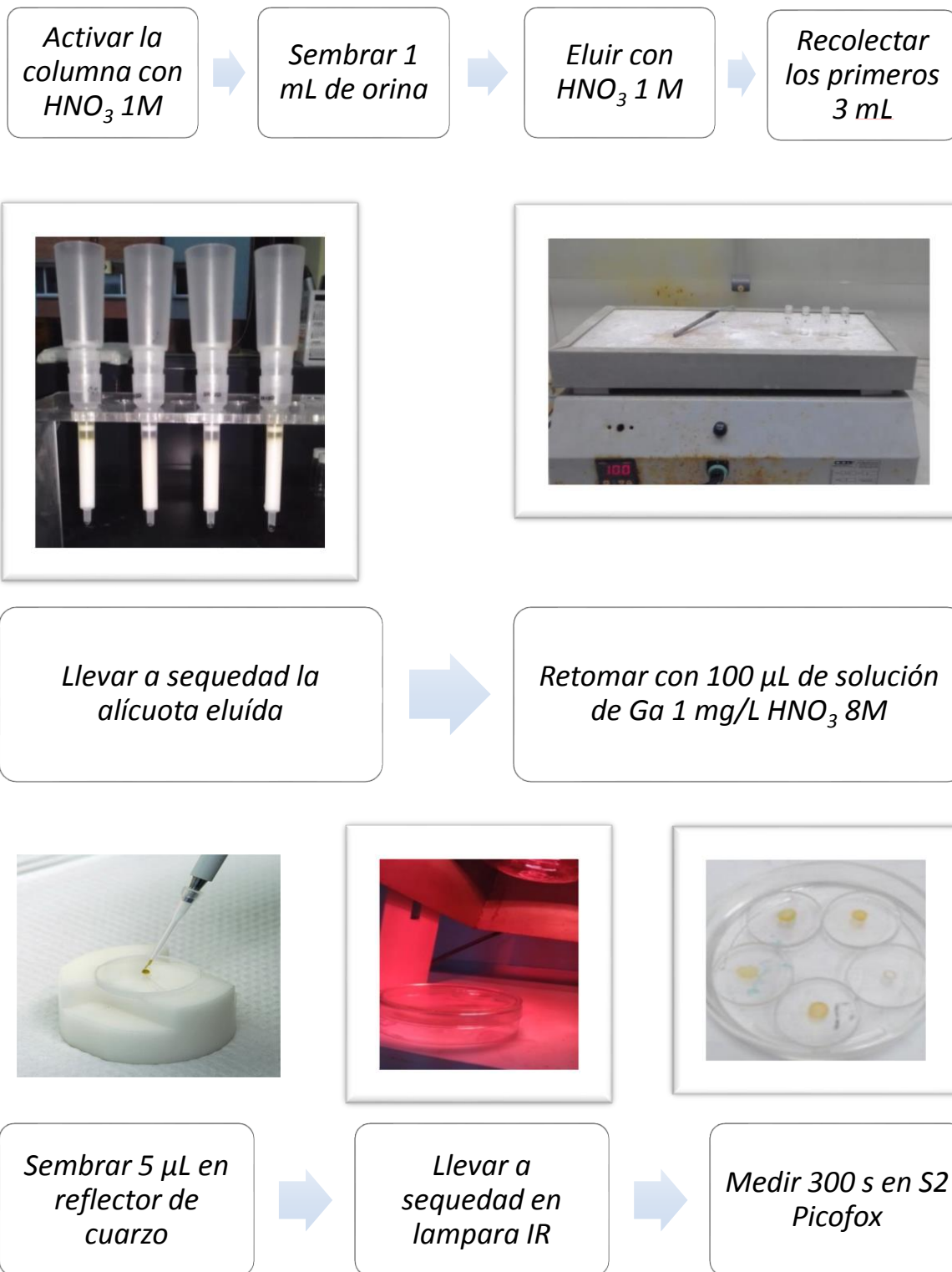


Figura 15. Esquema de la metodología

# Capítulo 3

## Resultados y discusiones

### 3.1 Calibración de U

La calibración del espectrómetro de fluorescencia S2 Picofox (Bruker ®) implica estimar la sensibilidad experimental relativa al estándar interno.

Es necesario emplear las soluciones estándares certificadas de uranio y de galio como estándar interno. El análisis por quintuplicado de cada una de las soluciones de uranio, brinda una gran cantidad de puntos para realizar una estimación lineal y estimar la sensibilidad mediante una regresión lineal según la ecuación 4.

A continuación se presentan los resultados de la estimación realizada con el programa Statistix.

PREDICTOR VARIABLES	COEFFICIENT	STD ERROR	STUDENT'S T	P
CONSTANT	83.9335	196.537	0.43	0.6730
S	0.56496	0.01043	54.15	0.0000
R-SQUARED	0.9915	RESID. MEAN SQUARE (MSE)		443410
ADJUSTED R-SQUARED	0.9912	STANDARD DEVIATION		665.890

SOURCE	DF	SS	MS	F	P
REGRESSION	1	1.300E+09	1.300E+09	2932.22	0.0000
RESIDUAL	25	1.108E+07	443410		
TOTAL	26	1.311E+09			

CASES INCLUDED 27 MISSING CASES 0

El parámetro de sensibilidad para uranio resulta  $S = 0.56$  con un R cuadrado aceptable mayor a 0.99.

Se muestra el valor de sensibilidad y de constante, Sus p-valores, presentados en la columna P, permiten testear si los coeficientes son significativamente distintos de cero. En este caso para la sensibilidad p-valor (0.0000) menores que 0.01 y decimos que el coeficiente es significativamente distinto de cero, en cambio para la ordenada al origen el p-valor (0.67) mayor a 0.01, por lo tanto no es significativamente distinto de cero.

El estadístico F es una medida global de la bondad de la regresión y su correspondiente valor-p = 0.0000, por lo tanto se concluye que la regresión es altamente significativa.

Los modelos lineales se basan en una serie de supuestos, los cuales se deben comprobar. Entre ellos se encuentran:

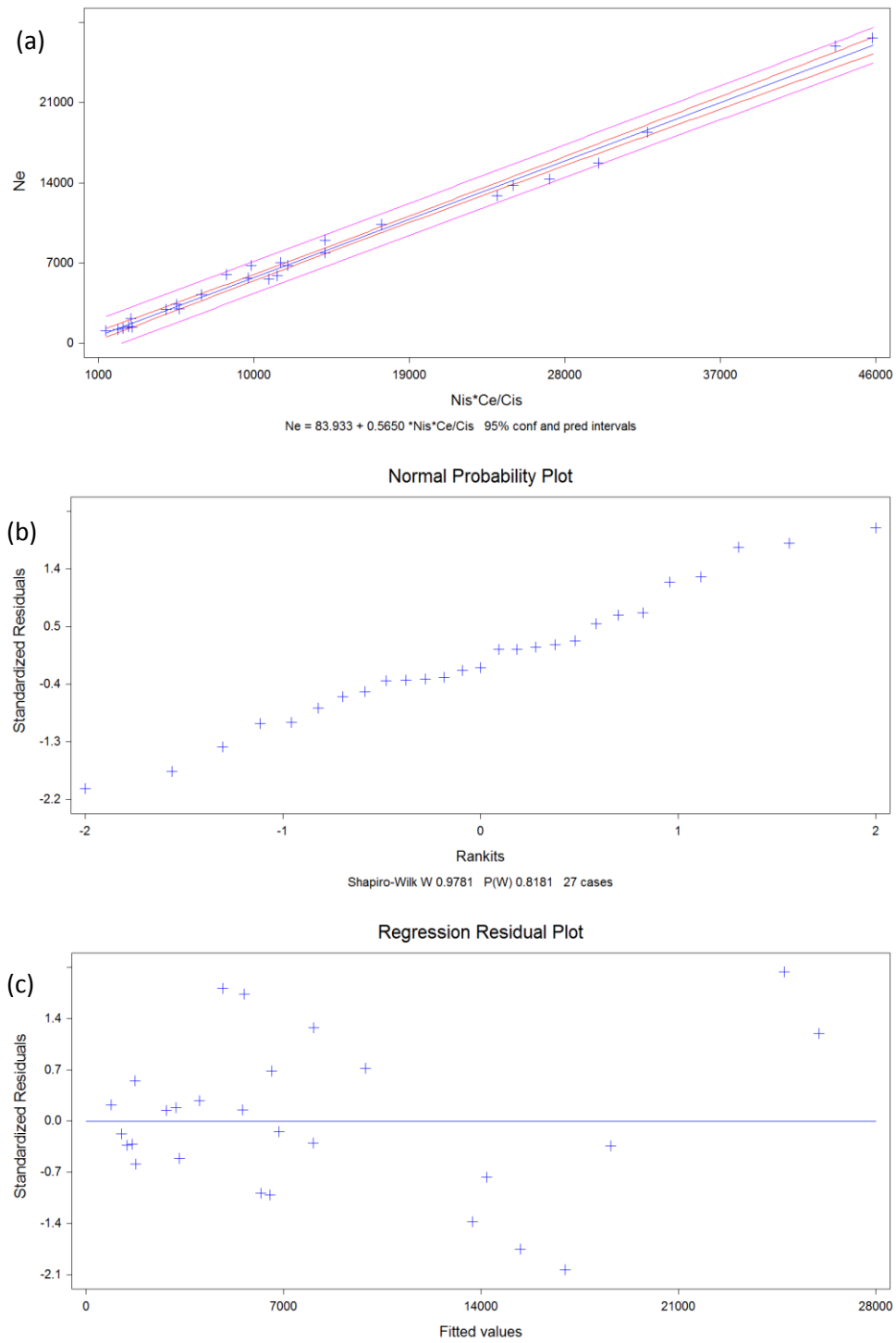
- Independencia. Los sujetos maestres y por tanto, los residuos del modelo, son independientes entre sí.
- Linealidad. La respuesta de Y frente a X es lineal.
- Normalidad. Los residuos del modelo son normales, es decir, siguen una distribución de tipo gaussiana (campana de Gauss).
- Homocedasticidad. La varianza residual tiene que ser constante.

La validación de los supuestos se realiza en base a los datos y a los residuos de los mismos respecto de la recta ajustada. El diagrama de dispersión de los datos permite obtener una impresión sobre el supuesto de linealidad y homoscedasticidad. El análisis de residuos permite confirmar la impresión inicial y validar los supuestos de normalidad e independencia.

En la Figura 16 (a) se presenta la curva para estimar la sensibilidad de uranio con Ga como estándar interno, al graficar Ne en función de  $Nis \cdot Ce / Cis$ . El gráfico incluye los valores y los intervalos de confianza al 95% y el de predicción. Se observa la linealidad esperada y que todos los puntos se encuentran dentro del intervalo de predicción.

La Figura 16 (b) presenta la curva de probabilidad Normal, la cual indica que estos tienen una distribución normal. El valor del estadístico de Shapiro-Wilk es 0.97 y su valor-p= 0.81, evidenciando la normalidad de la distribución de los datos.

En la Figura 16 (c) se muestra el diagrama de dispersión de los residuos estandarizados. No se observa una tendencia marcada en los residuos, se encuentran tantos positivos y negativos.



**Figura 16** Calibración de uranio. (a) curva de calibración. (b) Curva de probabilidad normal. (c) residuos estandarizados

La calibración se verifica realizando un test T de los resultados obtenidos de diez mediciones independientes de soluciones de concentración 0.1 mg/L y 1 mg/L. Las muestras se cuentan en la región optimizada para el uranio y para el galio, dando un valor numérico en cuentas por segundo en forma neta, se establece la sensibilidad en valor 1 para el estándar y de 0.56 para el uranio. De tal manera, que se pueden comparar los valores obtenidos a partir de las soluciones de dos concentraciones estándares. En la Tabla 2 se presentan los resultados de las mediciones del TXRF, el promedio, el desvío estándar (S) y el desvío estándar relativo (RSD).

<b>Xv</b>	0.100 mg/L	<b>Xv</b>	1.000 mg/L
<b>U</b>	0.003 mg/L	<b>U</b>	0.003 mg/L
	<b>Resultado mg/L</b>		<b>Resultado mg/L</b>
1	0.091	1	
2	0.095	2	1.013
3	0.093	3	0.994
4	0.094	4	1.127
5	0.111	5	1.135
6	0.094	6	1.040
7	0.101	7	0.988
8	0.102	8	1.117
9	0.103	9	1.104
10	0.096		
11	0.103		
<b>Promedio</b>	0.098	<b>Promedio</b>	1.065
<b>S</b>	0.006	<b>S</b>	0.062
<b>RSD =</b>	0.06	<b>RSD =</b>	0.06

Tabla 2. Verificación de la calibración de U

Para la conclusión, se compara el  $t_{cal}$  con el valor de  $t$  de tabla para una alfa = 0.05.

El  $t_{cal}$  se calcula como la diferencia entre el valor promedio y el valor verdadero, sobre la raíz de sus desvíos estándar al cuadrado según la **¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.**, donde  $N$  es el número de réplicas. Si  $t$  es mayor a  $t_{cal}$ , se concluye que esta sesgado.

$$t_{cal} = \frac{Xv - \bar{X}}{\sqrt{U^2 + \left(\frac{s}{\sqrt{N}}\right)^2}}$$

Ecuación 5

Los resultados del test T (Statistix) para la verificación en 0.1 mg/L se presentan a continuación

ONE-SAMPLE T TEST FOR 0.1 mg/L

NULL HYPOTHESIS: MU = 0.1  
ALTERNATIVE HYP: MU <> 0.1

MEAN	0.0985
STD ERROR	1.81E-03
MEAN - H0	-1.54E-03
LO 95% CI	-5.58E-03
UP 95% CI	2.49E-03
T	-0.85
DF	10
P	0.4134

CASES INCLUDED 11 MISSING CASES 0

Se obtiene un p-valor > 0.05 por lo que se acepta la hipótesis nula, y se concluye que el espectrómetro no está sesgado.

Los resultados del test T (Statistix) para la verificación en 1 mg/L se presentan a continuación

ONE-SAMPLE T TEST FOR 1 mg/L

NULL HYPOTHESIS: MU = 1  
ALTERNATIVE HYP: MU <> 1

MEAN	1.0647
STD ERROR	0.0221
MEAN - H0	0.0647
LO 95% CI	0.0126
UP 95% CI	0.1169
T	2.93
DF	7
P	0.0219

CASES INCLUDED 8 MISSING CASES 0

Se obtiene un p-valor <0.05 por lo que no se acepta la hipótesis nula, y se concluye que el espectrómetro está sesgado.

El sesgo se calcula como la diferencia porcentual entre el valor promedio de las mediciones y el valor verdadero.

Los resultados muestran, que para este espectrómetro, hay un sesgo del 6% en la determinación de 1 mg/L y no está sesgado en 0.1 mg/L. Estos valores son aceptables dentro de este desarrollo. Asimismo, los datos reflejan que no hay variaciones en el nivel de precisión durante el rango establecido de concentraciones. Por cuanto, se considera el valor de sensibilidad de uranio con galio como estándar interno en 0.56 para todo el ámbito de concentración del equipo.

### 3.2 Relación Rb U

Los resultados que se muestran en la Tabla 3 obtenidos a partir del análisis de muestras con concentraciones variables de rubidio (2 mg/L – 0.1 mg/L) y una concentración fija de uranio (0.01 mg/L) permiten seleccionar experimentalmente la cantidad de interferente a partir del cual afecta la medición de uranio, y que se debe tener en cuenta para la evaluación del método de separación propuesto.

Rb mg/L	U mg/L	Rb mg/L determinada	U mg/L determinada
2	0,01	2,023	no det
2	0,01	2,425	no det
2	0,01	2,741	no det
2	0,01	2,264	no det
2	0,01	2,331	no det
1	0,01	0,994	no det
1	0,01	1,300	no det
1	0,01	0,756	no det
1	0,01	1,021	no det
0,5	0,01	0,518	no det *
0,5	0,01	0,567	0,005
0,5	0,01	0,536	0,01
0,5	0,01	0,623	0,007
0,5	0,01	0,525	0,011
0,3	0,01	0,18	0,014
0,3	0,01	0,173	0,008
0,3	0,01	0,221	0,017
0,3	0,01	0,207	0,009
0,1	0,01	0,033	0,007
0,1	0,01	0,035	0,008
0,1	0,01	0,029	0,006
0,1	0,01	0,034	0,007

Tabla 3. Determinación de U 0.01 mg/L en presencia de Rb

Se observa que 10 µg/L de U se detectan para concentraciones menores a 500 µg/L de Rb, aunque en estas concentraciones se obtiene un falso negativo marcado con < \* > en la tabla. Se observa así, que el rubidio, interferente espectral, aumenta el límite de detección del uranio, tomando como referencia en la matriz agua el límite de detección es de 2 µg/L.

### 3.3 Perfil de Elución

El perfil de elución permite decidir el volumen de alícuota a tomar en la elución por la columna de extracción cromatográfica de tal manera de lograr la separación de la interferencia y obtener la mayor recuperación del analito.

Para su obtención se realiza la elución de una solución de uranio 100  $\mu\text{g/L}$ , tomándose alícuotas entre 0.2 y 0.5 mL.

De la misma manera se realiza con una solución de rubidio 1.4 mg/L.

El perfil de elución se presenta en la Figura 17 (a) donde se grafica la concentración de uranio y de rubidio en cada alícuota en relación con la concentración de la solución original en función del volumen de alícuota.

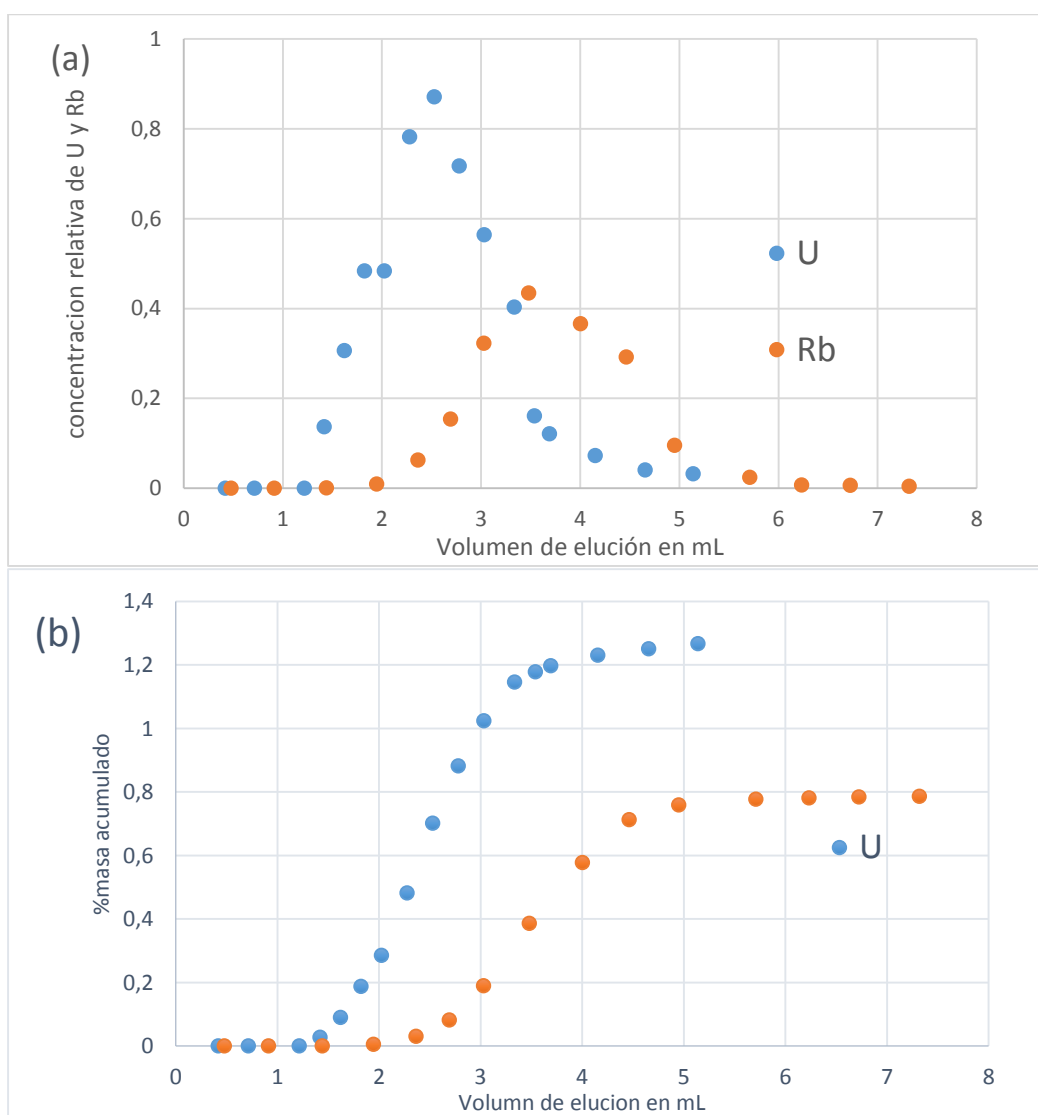


Figura 17. Perfil de Elución. (a) Concentración relativa a la concentración inicial en función del volumen (b) masa acumulada de analito relativa a la masa inicial en función del volumen

Se observa un perfil gaussiano para ambos analitos y existe una separación parcial entre los picos de uranio y rubidio con suficiente resolución como para permitir la obtención de una fracción enriquecida en uranio.

En base a esto, como metodología para la eliminación del interferente, se propone sembrar 1 mL de orina y recolectar una alícuota hasta un volumen de 3 mL de eluyente.

En la Figura 17 (b) se grafica la recuperación de los analitos en función del volumen de elución. Se observa, que en el volumen seleccionado de 3 mL, la recuperación del rubidio es baja, cercana al 20 %.

Agregando a lo anterior, se realiza la elución de una muestra de orina con 100 µg/L de uranio, en la columna de Sr spec tomándose alícuotas cada 0.5 mL, las cuales se miden de manera cualitativa por TXRF. Los espectros obtenidos se muestran desde la Figura 18 a la Figura 25 en la zona espectral de las líneas de uranio y del rubidio: U L $\alpha$  (13.614 keV) - Rb K $\alpha$  (13.396 keV). Se observa en las primeras alícuotas la señal de U hasta los 3 mL, y luego de este volumen el aumento de la señal de Rb. No es posible, tomar alícuotas posteriores a 3 mL, ya que la concentración de rubidio aumenta considerablemente.

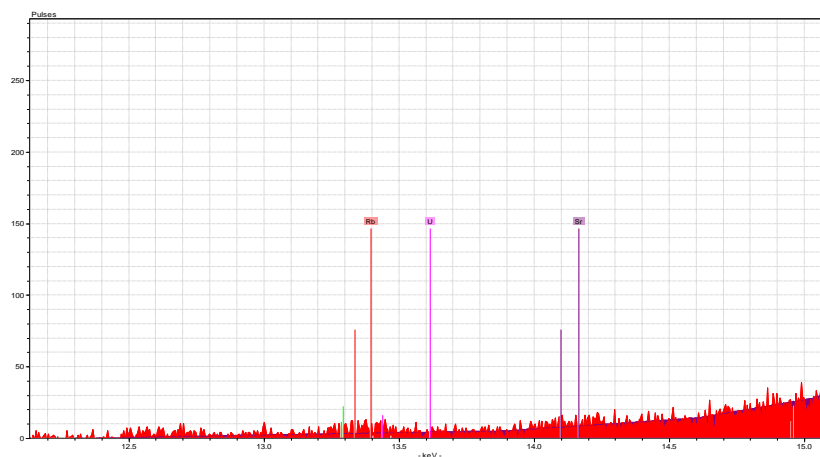
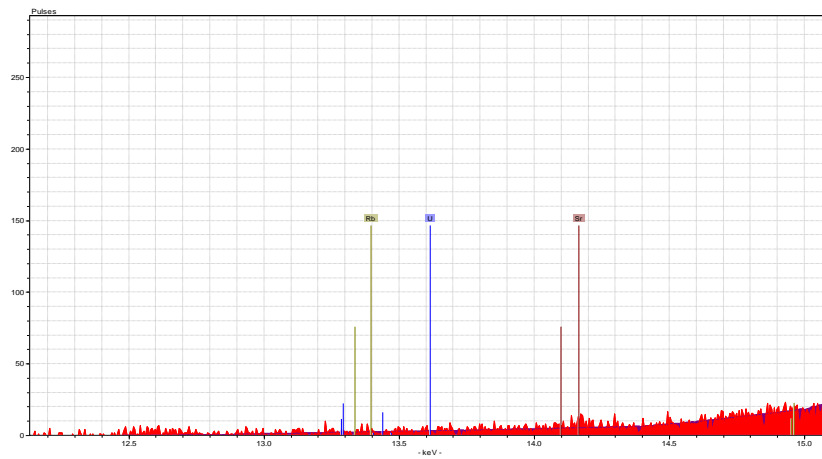
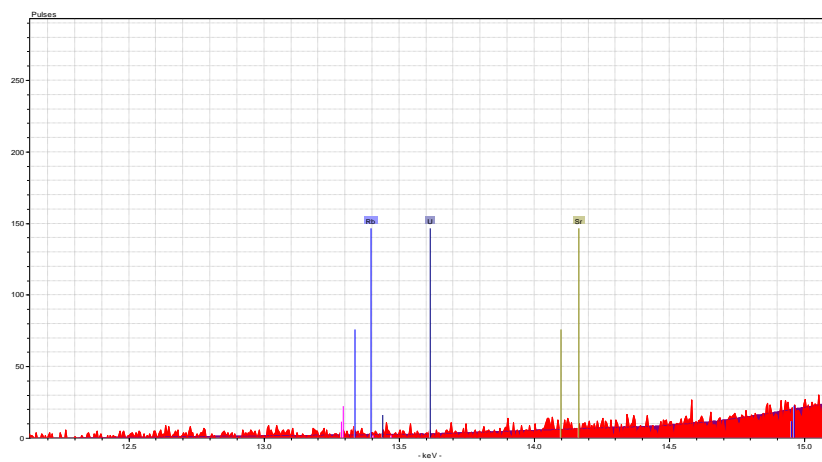


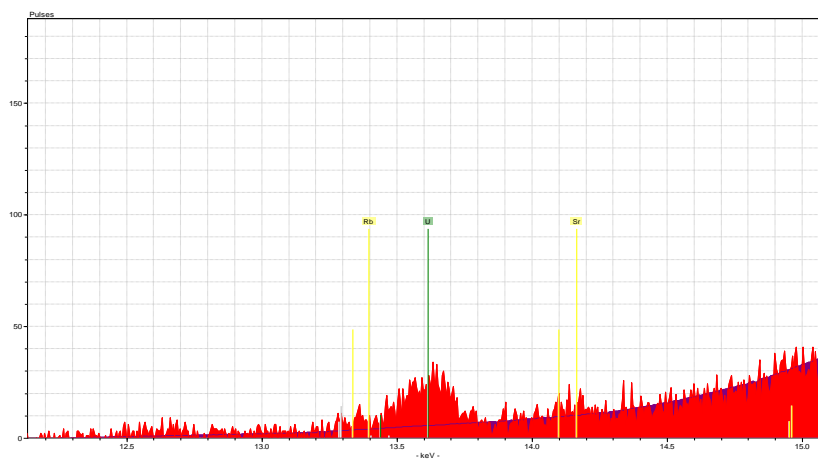
Figura 18. Perfil de elución 0.5 mL



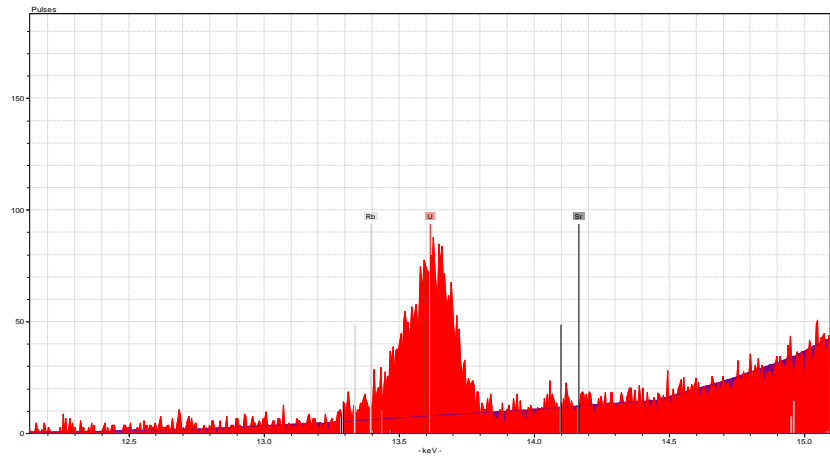
**Figura 19. Perfil de elución 1 mL**



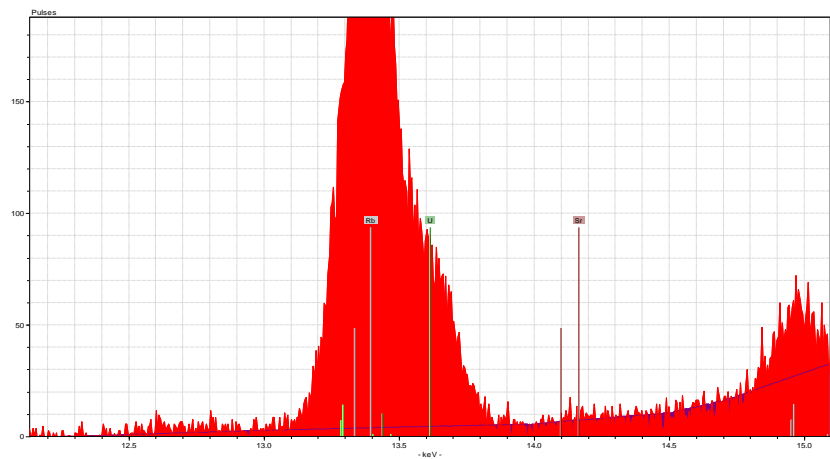
**Figura 20. Perfil de elucio 1.5 mL**



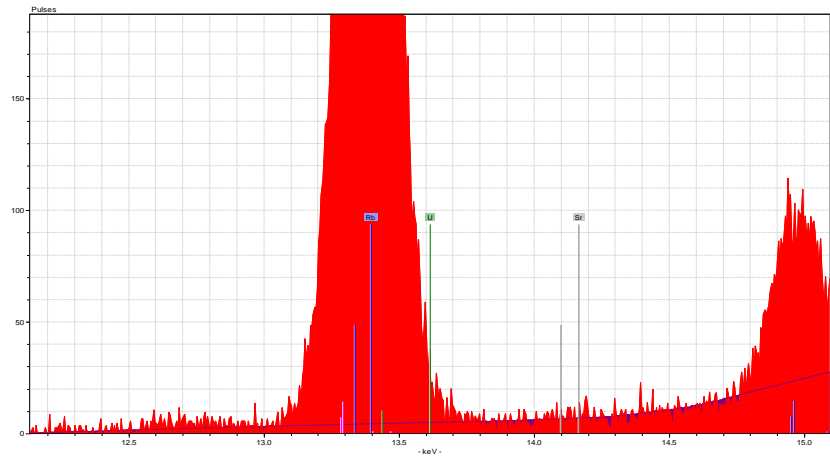
**Figura 21. Perfil de elución 2 mL**



**Figura 22. Perfil de elución. 2.5 mL**



**Figura 23. Perfil de elución. 3 mL**



**Figura 24. Perfil de elución 3.5 mL**

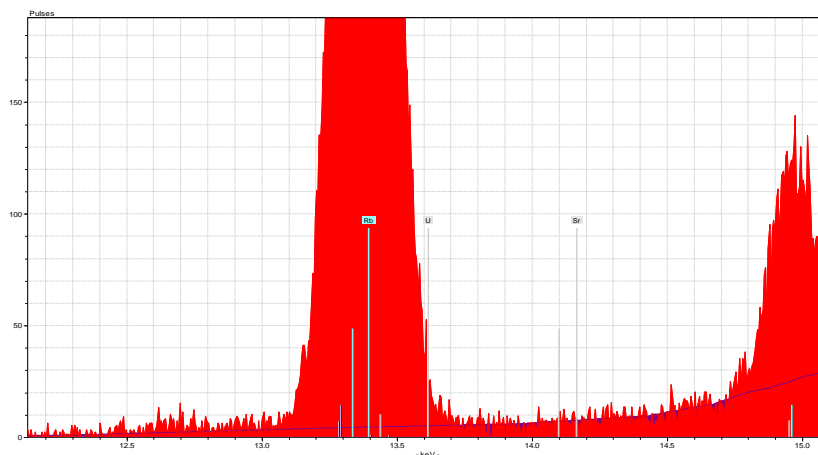


Figura 25. Perfil de elución. 4 mL

### 3.4 Determinación de U en orina

A partir de la optimización de la separación de la interferencia, se miden muestras de orinas con diversas concentraciones de uranio de tal manera de estimar experimentalmente el límite de detección.

Las Tabla 4, Tabla 5 y Tabla 6 muestran los resultados obtenidos al medir orina con 100 µg/L, 50 µg/L y 20 µg/L de U en forma directa y utilizando la metodología. Las tablas presentan una columna donde se muestra el resultado obtenido en TXRF y una columna de medición directa, que se refiere al resultado obtenido al medir orina directamente en el espectrómetro S2 Picofox. La medición directa involucra un paso previo que es el agregado del estándar interno, Ga. Los valores marcados < \* > se consideran outliers. Se presentan los datos crudos extraídos del espectrómetro sin la incertidumbre total del método puesto que en esta etapa de optimización no son valores que aportan a la toma de decisiones.

orina U 100 µg/L			
Extracción en resina de Sr		Determinación directa	
	U Conc./(mg/l)		U Conc./(mg/l)
1	0,079	1	0,069
2	0,075	2	0,102
3	0,073	3	0,091
4	0,072	4	0,092
5	0,119*	5	0,090
		6	0,077
<b>Promedio (mg/L)</b>	0.075	<b>Promedio (mg/L)</b>	0,087
<b>desvío</b>	0,003	<b>desvío</b>	0,01
<b>desvío relativo</b>	5%	<b>desvío relativo</b>	14%

Tabla 4. Determinación de uranio 100 µg/L

orina U 50 µg/L			
Extracción en resina de Sr		Determinación directa	
	U Conc./(mg/l)		U Conc./(mg/l)
1	0,052	1	0,056
2	0,066	2	no det
3	0,037	3	no det
4	0,036	4	0,034
5	0,033	5	0,074
6	0,038	6	0,034
		7	0,033
		8	0,030
		9	0,028
		10	no det
		11	0,049
		12	0,117*
		13	0,062
		14	no det
<b>Promedio (mg/L)</b>	0,048	<b>Promedio (mg/L)</b>	0,052
<b>desvío</b>	0,014	<b>desvío</b>	0,028
<b>desvío relativo</b>	30%	<b>desvío relativo</b>	54%

Tabla 5. Determinación de uranio 50 µg/L

orina U 20 µg/L				
Extracción en resina de Sr			Determinación directa	
	U Conc. (mg/L)			U
1	0.007	Detectado	1	No detectado
2	0.010	Detectado	2	No detectado
3	0.012	Detectado	3	No detectado
4	0.014	Detectado	4	No detectado
5	0.009	Detectado	5	No detectado
6	0.011	Detectado	6	No detectado
7	0.006	Detectado	7	No detectado
8	0.005	Detectado	8	No detectado
9	0.005	Detectado	9	No detectado
10	-	No detectado	10	No detectado

Tabla 6. Determinación de uranio 20 µg/L

En el caso de la medición de orina con U 100  $\mu\text{g/L}$ , en ambos casos el promedio obtenido de las mediciones es similar, y se observa que al eliminar la matriz, utilizando el pretratamiento, el desvío de los resultados disminuye.

Al realizar la comparación para orina con U 50  $\mu\text{g/L}$ , se obtienen resultados más importantes. La medición directa da resultados falsos negativos, el uranio no es detectado en 4 mediciones de 15. Además el desvío de los resultados es del 54 %, es decir la medición directa no da resultados confiables en la determinación de uranio en concentraciones cercanas a 50  $\mu\text{g/L}$ . La obtención de falsos negativos en este tipo de determinación, es el error más importante que debe evitarse.

Al realizar la separación cromatográfica en la columna de la orina, no se obtienen resultados falsos negativos de 7 mediciones independientes y se obtuvo un desvío del 30 %. Puede observarse que la variación en los resultados es acompañada con el cambio de orina. Nuevamente al eliminar o disminuir la matriz, el desvío estándar de los resultados es menor.

No se detecta uranio al medir orina con U 20  $\mu\text{g/L}$  en forma directa, pero si al realizar la extracción en la resina de Sr. A estos niveles de concentración, es crítico el uso de la columna. Los valores obtenidos, tienen un alto coeficiente de variación, esperable por estar en niveles cerca del límite de detección.

Del mismo modo, se realiza la determinación de orinas con U 10  $\mu\text{g/L}$ , se encuentran resultados positivos en la determinación con la extracción con resina de Sr, no así en la determinación directa.

### 3.5 Retención de Rb y Br

Con los espectros obtenidos al medir la orina con 20 µg/L de uranio, se estudia el porcentaje de retención del Rb y el Bromo, estos se presentan en la Tabla 7. Se observa que en las diez determinaciones se encuentra un alto porcentaje de eliminación de las interferencias. Además de rubidio se analiza bromo el cual también es un interferente espectral, su línea Kβ interfiere con la cuantificación del uranio.

Retención Br %	Retención Rb %
98%	97%
95%	95%
96%	95%
94%	93%
92%	65%
93%	73%
95%	59%
94%	41%
85%	41%
86%	70%

Tabla 7. Retención de Bromo y rubidio

La columna cromatográfica Sr- spec permite la disminución de la concentración de Rb, disminuyendo el límite de detección de uranio en la matriz. Cabe destacar que esta disminución de Rb, es no cuantitativa. Interesa retener el Rb en la columna, de tal manera de eliminarlo de la matriz, o disminuir su concentración, y no retenerlo cuantitativamente, aplicación más general de estas columnas cromatográfica.

### 3.6 Estimación estadística del límite de detección.

La definición del límite de detección (LOD) se basa en una observación estadística del área del pico y del fondo espectral. Partiendo de la base de que el elemento se considera identificado cuando el pico es tres veces mayor que la estadística de recuento del fondo, según el criterio 3 Sigma, se estima como el LOD según la Ecuación 6.

$$LOD = \frac{3 * C_i * \sqrt{N_{BG}}}{N_i}$$

Ecuación 6

Donde:

$C_i$  es la concentración del analito.

$N_{BG}$  : las cuentas del fondo (background).

$N_i$ : las cuentas del pico de fluorescencia.

El LOD puede estimarse con un mínimo de 6 mediciones de un blanco de matriz, o un valor de concentración muy cercano al límite. En este caso se utilizan las mediciones realizadas con 20  $\mu\text{g/L}$  de uranio, mencionadas anteriormente, y que se muestran en la Tabla 8. Se calcula el LOD para cada una de las mediciones, en promedio se estima un LOD de 9  $\mu\text{g/L}$ . Se observa una clara tendencia de que el límite de detección aumenta con el uso de las columnas, considerado que las mediciones se realizaron con 4 columnas en simultáneo y estas columnas fueron reutilizadas.

	<b><math>C_i</math> <math>\mu\text{g/L}</math></b>	<b><math>N_i</math></b>	<b><math>N_{BG}</math></b>	<b>LOD</b>
1	20	390	1645	6
2	20	595	1819	4
3	20	703	1970	4
4	20	630	2213	4
6	20	474	2786	7
7	20	310	3587	12
8	20	237	4788	18
9	20	217	4341	18

Tabla 8. Estimación del LOD.

Otra manera de estimar el LOD es mediante la Ecuación 7. Donde  $S_0$  es el desvío estándar de por lo menos seis mediciones de un blanco de matriz, o de una concentración muy cercana al límite de detección. Del mismo modo que anteriormente, se estima con las mediciones de las muestras con uranio 20  $\mu\text{g/L}$ , pero en este caso se utilizaron los valores de concentración y no las cuentas, los valores se presentan en la Tabla 9.

$$LOD = 3.29 * S_0$$

Ecuación 7

	Concentración de U mg/L
1	0.007
2	0.010
3	0.012
4	0.014
6	0.011
7	0.006
8	0.005
9	0.005
5	0.009
<b>S<sub>0</sub></b>	<b>0.003</b>
<b>LOD</b>	<b>0.011</b>
<b>LQ</b>	<b>0.032</b>

Tabla 9. Estimación del LOD y LQ

EL LOD se estima en 11  $\mu\text{g/L}$  en este caso, y el LQ se estima en 32  $\mu\text{g/L}$ , como 10 veces la desviación  $S_0$ .

En lo que respecta monitoreo ocupacional, el límite de detección junto con la frecuencia de monitoreo, le establecen la aplicabilidad a la técnica propuesta. Como se nombró en la Introducción en el caso de la medición de concentración de uranio en orina, el límite de investigación se encuentra 10  $\mu\text{g/L}$  y el nivel de acciones inmediatas en 33  $\mu\text{g/L}$ . En caso de incorporación accidental, con este LOD estimado, se logra ubicar a la persona en un caso de niveles de investigación o en un caso de acciones inmediatas ante una eventual incorporación de uranio.

Este método permite colocar a la persona involucrada rápidamente en uno de los dos niveles, en consecuencia permite que las decisiones, las acciones y medidas a tomar, sean rápidas. En media jornada laboral se obtiene un resultado confiable de la cantidad de uranio presente en la orina del trabajador eventualmente expuesto.

Cabe destacar también, que dada la posibilidad de realizar el análisis de varias muestras simultáneamente, en media jornada laboral, se podría obtener resultados de varias personas eventualmente expuestas a una incorporación de uranio. El número de muestras que resulta posible analizar, depende de la experiencia y performance del operador, y la cantidad de columnas cromatográfica disponibles, ya que la elución, se logra en menos de 30 minutos, y la medición por TXRF en 5 minutos. Los pasos más lentos del proceso son el lavado de la columna, y reflectores, y el llevado a sequedad de la muestra eluídas.

# Capítulo 4

## Conclusiones

El monitoreo ocupacional es una de las herramienta más importantes con la cual se alcanzan los objetivos de la protección radiológica. Se realiza a través de mediciones directas y de mediciones indirectas o por una combinación de estas.

La selección del tipo de monitoreo depende de la naturaleza del radionucleido (emisión, energía, periodo de semidesintegración), el tiempo de vida medio biológico, el compuesto químico, las propiedades físicas, etc. Por cuanto, es necesario la armonización de los métodos aplicados, y de allí que la Comisión Internacional de Protección Radiológica facilita las guías aplicables estableciendo los límites de dosis para cada uno de los radionucleidos junto con los modelos biocinéticos que facilitan la interpretación de los datos obtenidos.

Para el caso de uranio en particular, y la exposición de los trabajadores a su potencial incorporación, el método referido para el control ocupacional es a través de bioensayos, con el análisis de orina y/o heces de tal manera de estimar la incorporación a través de la eliminación del elemento en cuestión.

Los valores de los límites establecidos en la determinación de uranio se basan en el límite que sea más restrictivo, el límite radiológico o el límite toxicológico. En este sentido, dado que el límite toxicológico se basa en la carga de uranio en el riñón y el límite radiológico en la dosis efectiva comprometida en un año establecida en 20 mSv, se traduce mediante modelos biocinéticos a niveles secundarios medibles y en el caso de la determinación de concentración de uranio en orina, el límite del nivel de investigación se encuentra 10 µg/L y el nivel de acciones inmediatas en 33 µg/L. Estos niveles, se establecen en la situación más desfavorable para el trabajador, siendo un compuesto desconocido de uranio, material tipo F y U-234.

En este desarrollo se propone una nueva metodología de análisis aplicando la fluorescencia de rayos X por reflexión total (TXRF) en muestras biológicas. La TXRF, es una de las técnicas más nuevas de la fluorescencia de rayos X, y avanza continuamente junto a las nuevas tecnologías de detectores, los equipos comerciales compactos, reproducibles y de bajo fondo. TXRF es una técnica muy versátil, que permite el análisis multielemental en diversas matrices, con grandes ventajas frente a otras técnicas analíticas como bajo costo de operación, rapidez de análisis, bajo consumo de reactivos y generación de residuos, con mínima preparación y mínimo volumen de muestra, logrando parámetros analíticos que

garantizan la aplicabilidad en muestras biológicas y ambientales como bajos límites de detección, alta precisión y exactitud.

El principal inconveniente que se encuentra en el análisis de uranio en orina por TXRF es la alta concentración de rubidio, el cual es interferencia espectral del uranio y aumenta su límite de detección de manera considerable. Durante el diseño del método analítico, se propone el uso de las columnas de extracción cromatográficas de Sr-spec (Eichrom®), utilizadas habitualmente en la concentración y separación de diversos radionucleidos.

La selección de columnas empacadas de 2 mL resulta beneficioso para tratar mínimos volúmenes de muestras y continúa con los lineamientos de la TXRF, anteriormente detallados como la rapidez y la posibilidad de realizar alto número de muestras con una baja generación de residuos.

Durante la etapa de optimización del método, se realiza la calibración y verificación del espectrómetro de TXRF, mediante el empleo de soluciones estándares de uranio independientes, se estima la sensibilidad siendo el parámetro aplicado a los cálculos experimentales de las muestras de uranio. Los ámbitos de calibración son amplios, siendo una de las ventajas de la TXRF ya que facilita la medición de muestras en la etapa de optimización por la variabilidad de concentraciones obtenidas ( $\mu\text{g/L}$ - $\text{mg/L}$ ).

Los datos obtenidos durante la puesta a punto de la extracción cromatográfica, incluyen el perfil de elución que permite establecer los óptimos volúmenes de elución y lavado de tal manera de efectivizar la separación de uranio de la principal interferencia espectral como el rubidio y el bromo. Los resultados muestran la correcta selección de la columna de Sr resin para la retención de rubidio, y una clara diferencia en los tiempos de elución con respecto al uranio. La evaluación de las fracciones de elución demuestra que a 3 mL la fracción uranio se extrae completamente y donde es máxima la reducción del rubidio ( $> 50\%$  de la concentración inicial).

Por lo tanto una vez fijado el método desarrollado se verifica experimentalmente el límite de detección con muestras dopadas (spike samples) con soluciones estándares en niveles de  $100 \mu\text{g/L}$ ,  $50 \mu\text{g/L}$ ,  $20 \mu\text{g/L}$  y  $10 \mu\text{g/L}$  y se estima el estadísticamente

Los resultados extraídos de las mediciones de muestras reales dopadas con uranio en concentraciones de  $50 \mu\text{g/L}$ ,  $20 \mu\text{g/L}$  y  $10 \mu\text{g/L}$  medidos en forma directa por la técnica de TXRF y comparados con los resultados obtenidos después del pasaje por columna, demuestra que es necesario un paso previo de disminución de las interferencias si se quiere aplicar para muestras de análisis rutinario y que la selección de la cromatografía es adecuada. Las diferencias más importantes se encuentran en los niveles más bajos de concentraciones de uranio, como en el caso de uranio  $50 \mu\text{g/L}$  donde la medición directa, presenta resultados falsos negativos,

que contextualizándolos a la aplicabilidad en protección radiológica, son resultados fuertemente indeseados. Por otro lado, en concentraciones de uranio de 20 µg/L resulta crítico el uso de la columna y la disminución de la concentración de rubidio, siendo que en 10 repeticiones no se detecta el uranio en la medición directa, pero sí en la medición por la columna de extracción.

La determinación de orinas con uranio en 10 µg/L mediante la extracción con la resina de Sr presenta resultados positivos, no así en la determinación directa.

Asimismo, se evidencia la efectiva selección de la columna de extracción para la disminución de rubidio en un rango de 40-80 % de la concentración. El uso de las columnas de 2 mL es sencillo y fácil de operar, como así también el mínimo volumen de lavado empleado. Además estas columnas pueden re-utilizarse si se lavan y acondicionan de manera adecuada.

Estadísticamente, se estima el límite de detección en 10 µg/L y un límite de cuantificación en 30 µg/L. Los límites de detección se encuentran por encima de las técnicas habitualmente utilizadas en la determinación de uranio en orina, de todas maneras, todas las ventajas analíticas de la TXRF, con la previa separación de rubidio mediante la columna de extracción Sr-spec permiten un análisis rápido, con mínimo volumen de muestra, de características necesarias para implementarse en control ocupacional.

Uno de los parámetros analíticos más importantes es el límite de detección porque su estimación establece la aplicabilidad del método diseñado. Sin embargo, en cuanto a los métodos donde se deben tomar decisiones en función del resultado vinculado particularmente a la salud de los trabajadores, la rapidez del ensayo y la capacidad de analizar varias muestras en corto tiempo, juegan un rol importante, y estos parámetros son no cuantificables pero de alta significancia.

Para finalizar, teniendo en cuenta que el monitoreo ocupacional incluye tanto el monitoreo del personal como el de área y los resultados del monitoreo de área son indicadores de una eventual incorporación, frente a esta situación, o en la eventual incorporación incidental la TXRF permite el monitoreo individual, y por consiguiente la obtención de un resultado que permite colocar al trabajador dentro de un nivel de investigación o de un nivel de acciones inmediatas de manera rápida y principalmente permite la toma de decisiones en un periodo corto posterior al eventual incidente de incorporación.

Dentro de las perspectivas a futuro, se plantea la caracterización completa del método, incluyendo la validación del mismo donde se identifique los puntos críticos y de mayor aporte a la incertidumbre general, y la aplicabilidad en muestras reales en las instalaciones que así lo requieran.

## Bibliografía

- 1 ICRP, 2007. The 2007 Recommendations of the International Commission on Radiological Protection. ICRP Publication 103. Ann. ICRP 37 (2-4).
- 2 ICRP, 1994. Human Respiratory Tract Model for Radiological Protection. ICRP Publication 66. Ann. ICRP 24 (1-3)
- 3 ICRP, 1994. Dose Coefficients for Intakes of Radionuclides by Workers. ICRP Publication 68. Ann. ICRP 24 (4).
- 4 ICRP, 1997. Individual Monitoring for Internal Exposure of Workers (preface and glossary missing). ICRP Publication 78. Ann. ICRP 27 (3-4).
- 5 ICRP, 1995. Age-dependent Doses to the Members of the Public from Intake of Radionuclides - Part 5 Compilation of Ingestion and Inhalation Coefficients. ICRP Publication 72. Ann. ICRP 26 (1).
- 6 ICRP, 2002. Basic Anatomical and Physiological Data for Use in Radiological Protection Reference Values. ICRP Publication 89. Ann. ICRP 32 (3-4).
- 7 INTERNATIONAL ATOMIC ENERGY AGENCY, Methods for Assessing Occupational Radiation Doses due to Intakes of Radionuclides, Safety Reports Series No. 37, IAEA, Vienna (2004).
- 8 <http://www.nirs.qst.go.jp/db/anzendb/RPD/gazou.php>
- 9 CNSC, Canadian Nuclear Safety Commission, GD-150: Designing and Implementing a Bioassay Program. (Mayo 2010).
- 10 Leggett, Richard Wayne, Eckerman, Keith F, McGinn, Wilson, and Meck, Dr. Robert A. Controlling intake of uranium in the workplace: Applications of biokinetic modeling and occupational monitoring data. United States: N. p., 2012. Web. doi:10.2172/1034382.
- 11 DOE-STD-1136-2017. Good Practices for Occupational Radiological Protection in Uranium Facilities. U.S. Department of Energy Washington DC, 20585 (Marzo 2017).
- 12 Starościak, E. & Rosiak, L. J Radioanal Nucl Chem (2015) 304: 75. <https://doi.org/10.1007/s10967-014-3787-5>
- 13 Keith S, Faroon O, Roney N, et al. Toxicological Profile for Uranium. Atlanta (GA): Agency for Toxic Substances and Disease Registry (US); 2013 Feb.
- 14 Bouvier-Capely, Céline & Baglan, Nicolas & Montègue, A & Ritt, J & Cossonnet, C. (2003). Validation of uranium determination in urine by ICP-MS. Health physics. 85. 216-9. 10.1097/00004032-200308000-00011.

- 15 Hernández-Mendoza, Héctor, Conde, Estefanía, Fernández, Marta, & Yllera, Abel. (2013). Quantification of the uranium concentration in human urine by inductively coupled plasma-sector field mass spectrometry (ICP-SFMS). *Química Nova*, 36(6), 865-869. <https://dx.doi.org/10.1590/S0100-40422013000600021>
- 16 Thermo Fisher Scientific Inc (2016) Uranium in Urine: Quantification and Isotope Ratio Determination Application. Application Note 30008
- 17 Beeslaar, Frederik Johannes Lou (2013). Review and development of an uranium internal dosimetry and monitoring programme at an uranium plant. URI: <http://hdl.handle.net/10539/12710>
- 18 Sahu, S.K., Maity, Sukanta, Bhangare, R.C., Pandit, G.G., & Sharma, D.N. (2014). Determination of uranium in ground water using different analytical techniques (BARC--2014/E/011). India
- 19 T. Anttonen, B.N.Noller and D.A.Woods(1988) Interlaboratory cinopraision of the measurement of uranium in urine. Australian Government Publishing Service. ISSN0810-9535 ISBN 0644089147.
- 20 Croatto, Paul & W. Frank, I & D. Johnson, K & B. Mason, P & M. Smith, M. (2019). Evaluation of kinetic phosphorescence analysis for the determination of uranium. 10.2172/335168.
- 21 NEUMAN WF, FLEMING RW, et al. The fluorophotometric determination of uranium in biological material. *J Biol Chem*. 1948 Mar;173(1):41-52. PubMed PMID: 18902369.
- 22 Franklin Butt Barker, J.O. Johnson, K.W. Edwards, and B.P. Robinson Determination of uranium in natural waters <https://doi.org/10.3133/wsp1696C>
- 23 Reinhold Klockenkämper, Alex Von Bohlen, Total Reflection X-ray Fluorescence Analysis and Related Methods, second edition
- 24 Fernández Ruiz, Ramón. (2014). TXRF Spectrometry as a Powerful Tool for the Study of Metallic Traces in Biological Systems. *Developments in Analytical Chemistry*. 1. 1-14.
- 25 De La Calle, N. Cabaleiro, V. Romero, I. Lavilla, C. Bendicho (2013). Sample pretreatment strategies for total reflection X-ray fluorescence analysis: A tutorial review. *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy*, Volume 90. ISSN 0584-8547. <https://doi.org/10.1016/j.sab.2013.10.001>.
- 26 Eugene P. Bertin, 1975, Principles and Practice of X-Ray Spectrometric Analysis, second edition, Princeton New Jersey, Plenum Press.
- 27 P. Wobrauschek, Total reflection x-ray fluorescence analysis—a review, *X-Ray Spectrom*. 36 (2007) 289–300.
- 28 Química Analítica. D.A. Skoog, D.M. West y F.J. Holler 6ª Ed. Mc Graw Hill, 1995.

- 29 <https://www.argentina.gob.ar/arn>
- 30 [http://www.eichrom.com/products/info/sr\\_resin.aspx](http://www.eichrom.com/products/info/sr_resin.aspx) ; Horwitz, et al., (HP292)
- 31 S2 Picofox, Bruker, manual de usuario.
- 32 Greaves, E.D., Marco-Parra, L.M., Rojas, A., and Sajo-Bohus, L. (2000). Determination of platinum levels in serum and urine samples from pediatric cancer patients by TXRF. *X-Ray Spectrom*, 29, 349–353
- 33 Telgmann, L., Holtkamp, M., Künemeyer, J., Gelhard, C., Hartmann, M., Klose, A., Sperling, M., and Karst, U. (2011). Simple and rapid quantification of gadolinium in urine and blood plasma samples by means of total reflection X-ray fluorescence (TXRF). *Metallomics*, 3, 1035–1040
- 34 Cerchietti, M.L. (2003). Optimización y validación de método para la determinación de actínidos en muestras ambientales y biológicas. (Tesis de Magister en Radioquímica). Universidad Tecnológica Nacional, Comisión Nacional de Energía Atómica, Instituto de estudios nucleares.
- 35 Tallería Narváez, C. A. (2014). Análisis de aleantes e impurezas en zircaloy utilizando fluorescencia de rayos X con geometría de reflexión total (TXRF). (Trabajo Final Curso de especialización en Aplicaciones tecnológicas de la energía nuclear). Instituto Balseiro. Comisión Nacional de energía Atómica, Universidad nacional de Cuyo.
- 36 <https://www.bruker.com/>
- 37 De Muynck, David & Huelga-Suarez, Gonzalo & Van Heghe, Lana & Degryse, Patrick & Vanhaecke, Frank. (2009). Systematic evaluation of a strontium-specific extraction chromatographic resin for obtaining a purified Sr fraction with quantitative recovery from complex and Ca-rich matrices. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry - J ANAL ATOM SPECTROM*. 24. 10.1039/b908645e.
- 38 Lloyd A. Currie. Limits for qualitative detection and quantitative determination. Application to radiochemistry *Analytical Chemistry* 1968 40 (3), 586-593. DOI: 10.1021/ac60259a007

## Anexo A

Time after exposure <sup>d</sup> (d)	Concentration ratio Kidney U (µg/g) : Urinary U (µg/mL)		
	Type F <sup>b</sup>	Type M	Type S
1	16	10	5.7
2	28	22	22
3	29	22	23
4	29	22	23
5	29	22	23
6	30	22	23
7	30	22	23
8	30	21	22
9	30	21	22
10	30	21	22
15	29	19	20
20	28	17	17
30	24	14	14
40	20	12	12
50	17	11	11
60	16	10	10
70	16	10	10
80	17	10	10
90	18	10	10
100	c	10	10
110	c	11	10
120	c	11	10
130	c	11	10
140	c	11	10
150	c	11	10
175	c	12	10
200	c	12	10
225	c	13	10
250	c	13	11
275	c	14	11
300	c	15	11
325	c	16	11
365	c	18	11

**Tabla 10. Predicción de la relación de concentración de riñón y orina en función del tiempo luego de una inhalación aguda de uranio por un trabajador. Partícula = 5 µm AMAD.**

Día 1 se refiere a la relación a 24 horas luego de la exposición, día 2 a 48 hs, etc.

El modelo, en caso de incorporación aguda, a partir del día 3 presenta un error importante, debido a que la concentración de orina decae varios ordenes de magnitud.

<b>Time after exposure<sup>a</sup> (d)</b>	<b>Concentration ratio<sup>b</sup> Kidney U (µg/g) : Urinary U (µg/mL)</b>
1	0.8
2	1.6
3	2.3
4	2.9
5	3.5
6	4.0
7	4.4
8	4.8
9	5.2
10	5.5
15	6.6
20	7.2
30	7.9
40	8.2
50	8.4
70	8.5
100	8.6
200	9.0
300	9.3
400	9.6
500	9.9
700	10
1000	11
2000	13
3000	14
4000	15
5000	16
7000	17
10000	17

**Tabla 11. Predicción de la relación de concentración de riñón y orina en función del tiempo desde el inicio de una incorporación continua de uranio por inhalación. Partícula = 5 µm AMAD.**

**Día 1 se refiere a la relación a 24 horas desde el inicio de la exposición, día 2 a 48 hs, etc.**

## Anexo B

### ECUACIÓN FUNDAMENTAL

Para excitación mono-energética, como las obtenidas con tubos de rayos X (con irradiación directa y utilizando filtros) y fuentes radioactivas, hay una relación simple entre la intensidad de una línea característica ( $K\alpha$  y  $L\alpha$ ) y la concentración de un elemento en la muestra.

Asumiendo una muestra homogénea con espesura uniforme  $D$  y despreciando los efectos de refuerzo (*enhancement*), la intensidad de la línea  $K\alpha$  de un elemento de interés producida en una capa  $dx$  a una profundidad  $x$  es producto de tres probabilidades:

1. La probabilidad  $P_1$  de la radiación de excitación de llegar a la capa  $dx$  a una profundidad  $x$ :

$$P_1 = e^{-\mu_0 \cdot \rho_0 \cdot x / \sin \theta_0}$$

Ecuación 8

Donde:

$\mu_0$  = coeficiente de absorción de masa de la matriz ( $\text{cm}^2 \cdot \text{g}^{-1}$ ) en la energía de los fotones incidentes,

$\rho_0$  = densidad de la matriz ( $\text{g} \cdot \text{cm}^{-3}$ )

$\theta_0$  = ángulo de incidencia (entre la dirección del haz incidente y la superficie de la muestra).

El valor de  $\mu_0$  puede ser calculado como la sumatoria de los productos de los coeficientes de absorción de masa por la fracción en masa de todos los elementos presentes en la muestra.

2. La probabilidad  $P_2$  de la radiación de excitación producir una vacancia en los átomos de un elemento de interés contenidos en la capa  $dx$ , con consecuente producción de rayos X característicos:

$$P_2 = \tau \cdot \left(1 - \frac{1}{j}\right) \cdot w \cdot f \cdot \rho \cdot dx$$

Ecuación 9

Donde:

$\tau$  = coeficiente de absorción de masa para efecto foto-eléctrico del elemento de interés ( $\text{cm}^2 \cdot \text{g}^{-1}$ ) en la energía de excitación,

$j$  = razón de salto (jump ratio)  $K \rightarrow L$ ,

$w$  = rendimiento de fluorescencia de la capa  $K$ ,

$f$  = fracción de fotones  $K$  emitidos como rayos  $K\alpha$  característicos

$\rho$  = "densidad" ( $\text{g}\cdot\text{cm}^{-3}$ ) o concentración del elemento de interés en base de volumen en la capa  $dx$ .

La razón de salto o jump ratio indica la probabilidad de poder retirar electrones de todas las capas en relación a la probabilidad de las capas L, M, etc. Por otro lado, el termino  $(1-1/j)$  representa la probabilidad de ionizar la capa K en relación con todas las capas K, L, M, etc., y así el término  $\tau(1-1/j)$  representa el número de ionizaciones ocurridas en la capa K

Los parámetros fundamentales  $\tau$ ,  $j$ ,  $w$  y  $f$  para un dado elemento depende únicamente de la energía de excitación y pueden ser agrupados en un único término K, Ecuación 11, denominado de constante de los parámetros fundamentales, y así la Ecuación 9 puede ser rescrita como:

$$P_2 = K \cdot \rho \cdot dx$$

Ecuación 10

$$K = \tau \cdot \left(1 - \frac{1}{j}\right) \cdot w \cdot f$$

Ecuación 11

3. La probabilidad  $P_3$  del rayo X  $K\alpha$  característico producido en la capa  $dx$  de no ser absorbido en la espesura  $x$  y llegar al detector, produciendo un pulso electrónico (o una cuenta), es dado por:

$$P_3 = e^{-\mu \cdot \rho_0 \cdot x / \text{sen}\theta} \cdot \varepsilon$$

Ecuación 12 Donde:

$\mu$  = coeficiente de absorción de masa de la matriz ( $\text{cm}^2 \cdot \text{g}^{-1}$ ),

$\varepsilon$  = eficiencia del detector en la energía de los fotones característicos

$\theta$  = ángulo de emergencia (entre la superficie de la muestra y la dirección del haz emergente).

Así, la intensidad fluorescente  $dI$  (o tasa de conteo) producida por el elemento de interés contenido en la capa  $dx$  puede entonces ser escrita como:

$$dI = G \cdot e^{-\mu_0 \cdot \rho_0 \cdot x / \text{sen}\theta_0} \cdot \tau \cdot \left(1 - \frac{1}{j}\right) \cdot w \cdot f \cdot \rho \cdot dx \cdot e^{-\mu \cdot \rho_0 \cdot x / \text{sen}\theta} \cdot \varepsilon$$

Ecuación 13

Donde la variable  $G$ , denominada de factor de geometría, es una constante de proporcionalidad y depende de la geometría del sistema de excitación-detección, de la corriente del tubo o de la actividad de la fuente, etc., pero no del propio elemento de interés.

Esta última ecuación puede ser reescrita como

$$dI = G \cdot e^{-(\mu_0 / \text{sen} \theta + \mu / \text{sen} \theta_0) \cdot \rho_0 \cdot x} \cdot \tau \cdot \left(1 - \frac{1}{j}\right) \cdot w \cdot f \cdot \rho_0 \cdot \varepsilon \cdot dx$$

**Ecuación 14**

Definiéndose el coeficiente de absorción de masa total  $\chi$  como:

$$\chi = \mu_0 / \text{sen} \theta_0 + \mu / \text{sen} \theta$$

**Ecuación 15**

Se puede describir Ecuación 14 utilizando la expresión Ecuación 15, de la siguiente forma:

$$dI = G \cdot \varepsilon \cdot K \cdot e^{-\chi \cdot \rho_0 \cdot x} \cdot \rho \cdot dx$$

**Ecuación 16**

Integrando la ecuación de arriba sobre la espesura total D de la muestra, se obtiene la intensidad fluorescente I (conteos.s<sup>-1</sup>) para un dado elemento de interés:

$$I = G \cdot \varepsilon \cdot K \cdot \rho \cdot \frac{1 - e^{-\chi \cdot \rho_0 \cdot D}}{\chi \cdot \rho_0}$$

**Ecuación 17**

La razón  $\rho/\rho_0$  representa la “densidad” del elemento de interés (gramo del elemento.cm<sup>-3</sup> de la muestra) en relación a la densidad de la matriz (gramo de la muestra.cm<sup>-3</sup> de la muestra), y por tanto, es la propia concentración C del elemento de interés en la muestra (gramo del elemento/gramo de la muestra), o sea, la fracción de concentración del elemento en base a la masa. Siendo así:

$$I = G \cdot \varepsilon \cdot K \cdot C \cdot \frac{1 - e^{-\chi \cdot \rho_0 \cdot D}}{\chi}$$

**Ecuación 18**

Tomándose:

$$S = G \cdot \varepsilon \cdot K$$

**Ecuación 19**

Donde S representa la sensibilidad del espectrómetro de rayos X para el elemento de interés, la Ecuación 18 puede ser escrita como:

$$I = S \cdot C \cdot \frac{1 - e^{-\chi \cdot \rho_0 \cdot D}}{\chi}$$

**Ecuación 20**

En algunos casos, en vez de referirse a la concentración C del elemento en base a masa (gramo del elemento/gramo de muestra), se prefiere referir a la densidad

superficial  $c$  del elemento en la muestra (gramo del elemento en la muestra. $\text{cm}^{-2}$ ), o sea:

$$c = C \cdot \rho_o \cdot D$$

**Ecuación 21**

y por tanto la Ecuación 20 puede ser reescrita en la forma:

$$I = S.c. \frac{1 - e^{-\chi \cdot \rho_o \cdot D}}{\chi \cdot \rho_o \cdot D}$$

**Ecuación 22**

La razón presentada en la Ecuación 22 es denominada de factor de absorción para el elemento de interés:

$$A = \frac{1 - e^{-\chi \cdot \rho_o \cdot D}}{\chi \cdot \rho_o \cdot D}$$

**Ecuación 23**

y de ese modo la Ecuación 22 puede ser rescrita en la forma:

$$I = S.c.A$$

**Ecuación 24**

Debe ser resaltado que para muestras consideradas finas, el término  $\chi \cdot \rho_o \cdot D$  tiende a cero, o sea  $\chi \cdot \rho_o \cdot D \rightarrow 0$ , y el término  $e^{-\chi \cdot \rho_o \cdot D} \rightarrow 1 - \chi \cdot \rho_o \cdot D$ . En estas condiciones el factor de absorción tiene valor unitario:

$$A = 1$$

**Ecuación 25**

En el caso extremo, o sea, para muestras consideradas espesas, el término  $\chi \cdot \rho_o \cdot D$  tiende a infinito, o sea,  $\chi \cdot \rho_o \cdot D \rightarrow \infty$ , y el término  $e^{-\chi \cdot \rho_o \cdot D} \rightarrow 0$ . En estas condiciones, el factor de absorción asume el valor:

$$A = \frac{1}{\chi \cdot \rho_o \cdot D}$$

**Ecuación 26**

Por otro lado, la sensibilidad elemental  $S$  es relacionada a los parámetros fundamentales  $K$  y a la eficiencia de detección  $\varepsilon$  a través de una constante elemental independiente, llamada de factor de geometría  $G$ , como muestra la Ecuación 19, que puede ser reescrita en la forma:

$$G = \frac{S}{\varepsilon \cdot K}$$

**Ecuación 27**

Este factor de geometría debe permanecer constante para todas las energías y de ese modo se puede obtener un factor de geometría medio, a ser utilizado posteriormente en el análisis cuantitativo.