

UNIVERSIDAD NACIONAL DE GENERAL SAN MARTÍN
COMISIÓN NACIONAL DE ENERGÍA ATÓMICA
INSTITUTO DE TECNOLOGÍA
“Prof. Jorge A. Sabato”

**Análisis de trazas de elementos contaminantes o tóxicos en
muestras biológicas empleando la técnica PIXE ^(*)**

por Lic. Fabián U. Naab

Director

Dr. Andrés J. Kreiner

Dr. Mario E. Debray

^(*) Tesis para optar al título de *Doctor en Ciencia y Tecnología, mención Física*

República Argentina

2000

A mis padres

y

hermanos

AGRADECIMIENTOS

A Andrés Kreiner y Mario Debray por guiarme estos años.

Al grupo Espectroscopía Nuclear Discreta, Mabel Ozafrán, Mónica Vázquez, María Ester Caraballo, Héctor Somacal, José María Kesque, Miguel Davidson, Jorge Davidson, María Angélica Cardona, Daniel Hojman y Alejandro Valda.

A mis compañeros tesisistas, Alejandro Burlón, Pablo Stoliar, Gad Levinton, Martín Bulher y Juan Schuff.

A los técnicos e ingenieros del laboratorio Tandár.

Todos contribuyeron para que este trabajo fuese posible.

Analysis of contaminant or toxic trace elements in biological samples using PIXE

Abstract

The Particle Induced X-ray Emission (PIXE) technique with heavy ions has been developed and optimized at the Tandar Laboratory for the analysis of biological samples. The subjects studied were the determination of aluminium concentration in human brain tissue in order to correlate it with the occurrence of Alzheimer's disease, the determination of metal concentrations in different organs of the toad species *Bufo arenarum*, and the determination of aluminium concentration and other elements in sinovial fluid. According to the results obtained, this technique has been proven to be a very useful and powerful tool for the measurement of contaminant or toxic trace elements in biological samples, contributing to the research of the effects they produce in different organisms.

Resumen

La técnica de análisis multielemental PIXE (Particle Induced X-ray Emission) con iones pesados se optimizó para el análisis de muestras de origen biológico. En particular se estudió la concentración de trazas de aluminio en tejido cerebral humano para correlacionarlo con la enfermedad de Alzheimer, la concentración de metales en distintos órganos de la especie de sapo *Bufo arenarum*, y la determinación de concentraciones de aluminio y otros elementos en muestras de líquido sinovial. De acuerdo a los resultados obtenidos, esta técnica muestra ser una herramienta muy útil y poderosa para la medición de trazas de elementos contaminantes o tóxicos en muestras biológicas y permite de esta manera contribuir al estudio de los efectos que éstas producen en los distintos organismos.

ÍNDICE

Capítulo 1

Introducción	1
Referencias	3

Capítulo 2

Fundamentos teóricos en la interacción ion-átomo	5
2.1 Ionización y producción de rayos X característicos con iones	6
2.2 Radiación de fondo	12
2.3 Radiación de frenado de electrones secundarios (SEB)	14
2.4 Radiación de frenado del proyectil	16
2.5 Otras componentes de la radiación de fondo	17
• Radiación de frenado de electrones casi libres (QFEB)	17
• Radiación de frenado atómico (AB)	18
• Radiación de frenado de los átomos unidos (UAB)	19
• Rayos X de orbitales moleculares (MO)	20
• Captura radiativa de electrones (REC)	20
2.6 Sensibilidad en análisis de trazas de elementos	21
Referencias	25

Capítulo 3

Descripción experimental de la técnica PIXE aplicada a muestras biológicas	29
3.1 Arreglo experimental de la cámara de irradiación	30
3.2 Homogeneización de la intensidad transversal del haz	33
3.3 Instalación de un nuevo detector de rayos X con mayor resolución. Nuevo arreglo experimental de la cámara de irradiación	40
3.4 Métodos de preparación de muestras orgánicas	41
3.4.1 Método de digestión con ácido nítrico a presión atmosférica	43
3.4.2 Método de digestión con digestor de microondas	45

3.4.3	Procedimiento para el lavado del instrumental	46
3.5	Cálculo de concentraciones	46
3.6	“Performance” del método PIXE	50
3.6.1	Análisis de soluciones acuosas	51
3.6.2	Análisis de muestras biológicas dopadas con soluciones acuosas	53
3.6.3	Análisis de materiales de referencia de la IAEA	54
3.6.4	Límites de detección en muestras biológicas	57
	Referencias	59

Capítulo 4

	Aplicación de la técnica PIXE a muestras biológicas	61
4.1	Determinación de trazas de aluminio en tejido cerebral humano	61
4.1.1	Introducción	62
4.1.2	Optimización del límite de detección del Al en muestras biológicas	62
4.1.3	Resultados	66
4.1.4	Conclusión	71
4.2	Acumulación de metales en distintos órganos de la especie sapo <i>Bufo arenarum</i>	71
4.2.1	Estudios realizados en condiciones de cautiverio en su hábitat natural	72
4.2.1.1	Introducción	72
4.2.1.2	Descripción del ensayo biológico	72
4.2.1.3	Procedimiento experimental para el análisis de metales	73
4.2.1.4	Resultados y conclusiones	74
4.2.2	Estudios posteriores sobre la incorporación de metales en sapos en cautiverio en condiciones de laboratorio	77
4.2.2.1	Relación entre exposición y efecto	77
4.2.2.2	Relación entre las concentraciones de Zn y Fe en distintos órganos	81
4.2.3	Determinación de concentraciones de Cu y Cd en ovarios de sapo <i>Bufo arenarum</i>	84
4.2.3.1	Mediciones de Cu y Cd utilizando el detector Oxford	85
4.2.3.2	Límites de detección a 98 MeV	85
4.3	Nuevas condiciones para la determinación de trazas de aluminio en tejido cerebral humano	86

4.3.1	Nuevos resultados	89
4.4	Determinación multielemental en muestras de líquido sinovial	92
4.4.1	Preparación de las muestras	92
4.4.2	Condiciones experimentales y desarrollo	92
4.4.3	Resultados y Conclusiones	93
	Referencias	94

Capítulo 5

Resumen y conclusiones	97
-------------------------------	-----------

CAPÍTULO 1

Introducción

Desde hace algunos años, se ha estado aplicando en el Laboratorio TANDAR de la Comisión Nacional de Energía Atómica, la técnica de análisis multielemental PIXE^[1] (Particle Induced X-ray Emission) basada en haces de iones pesados.^[2]

Desde la introducción de esta técnica en 1970,^[3] esta actividad a ido extendiéndose y en la actualidad se la considera como una poderosa herramienta para análisis multielemental.

Tradicionalmente se han empleado haces de protones pero en el Laboratorio TANDAR se ha encontrado^[2,4] que los iones pesados presentan ventajas comparativas importantes.

En particular, en este laboratorio se han realizado análisis para determinar la presencia de trazas de elementos tóxicos o contaminantes en aerosoles atmosféricos,^[2,5-7] aguas^[4,5] y barros^[8] de distinta procedencia, utilizando haces de ^{12}C y ^{16}O entre 30 y 50 MeV de energía, y los elementos observados son aquellos con número atómico mayor o igual al del potasio (K, $Z=19$).

Los límites de detección más bajos se obtienen con la técnica PIXE para matrices constituídas por elementos livianos ($Z<10$), resultando así las muestras de origen biológico un objetivo interesante para ser investigado. Una tarea pertinente para PIXE es entonces medir la concentración de trazas de elementos en muestras de tejido orgánico. En este trabajo se apunta, entre otros objetivos, a correlacionar la presencia y concentración de trazas y su incidencia en determinadas patologías.

Existe una variedad de temas interdisciplinarios que requieren determinar la presencia de

trazas de elementos en muestras biológicas, y en particular elementos con número atómico menor al del potasio. Entre los problemas planteados que motivaron esta tarea se encuentran: la determinación de aluminio en tejido cerebral humano para correlacionarlo con la enfermedad de Alzheimer, y la determinación de elementos tóxicos en ovarios de hembras del sapo *Bufo arenarum*, después de distintos períodos de tiempo de exposición a aguas y fangos contaminados del Río Reconquista.

Poder medir la concentración de elementos con número atómico menor al del potasio hasta el boro ($Z=5$) inclusive, requiere cambios significativos en el arreglo experimental de la línea de irradiación (línea electrones - sala C - Laboratorio TANDAR), y en el método de preparación de las muestras.

Para lograr los objetivos planteados se propuso llevar a cabo las siguientes tareas:

I) Lograr una mejora sustancial en la resolución en energía y eficiencia del sistema de detección de rayos X, instalando en la cámara de irradiación un detector nuevo con ventana ultrafina y alta resolución en energía.

II) Para muestras finas de espesor no uniforme y a los efectos de lograr determinaciones cuantitativas precisas, es necesario irradiarlas con un haz de área transversal bien definida e intensidad transversal constante.

III) Con el fin de disminuir el límite de detección propio de la técnica al irradiar directamente el tejido biológico, se debe implementar un método de preconcentración de los elementos minoritarios y trazas que se encuentran en el mismo, eliminando la mayor parte de la matriz de la muestra (materia orgánica). Para esta finalidad se buscará poner a punto una técnica de digestión (eliminación de la materia orgánica) eficiente, rápida y que evite la pérdida o contaminación en la muestra de los elementos de interés.

IV) Realizar un estudio experimental para determinar, según el ion utilizado, la energía para la cual se obtiene máxima sensibilidad para los elementos de interés en la muestra biológica.

En resumen, el objetivo es poner a punto una facilidad de irradiación y medición de alta "performance" utilizando la técnica de análisis multielemental PIXE, y aplicarla a una serie de problemas de interés biológico-biomédico que involucren la detección de trazas de elementos. Los siguientes capítulos están organizados de la siguiente manera. En el capítulo 2 se presenta un resumen de una extensa investigación bibliográfica acerca de los fenómenos que tienen lugar en la interacción entre un ion incidente y un átomo en reposo de una muestra, y que determinan la sensibilidad de la técnica.

En el capítulo 3 se describe el arreglo experimental de la cámara de irradiación con el que se hicieron las primeras mediciones y como fue modificado, principalmente con la instalación de un nuevo detector de alta resolución. También se describen los métodos de homogeneización del haz, los métodos de la preparación de muestras y un estudio de precisión (repetitividad) y exactitud (valor verdadero) de las concentraciones de elementos con la técnica PIXE.

En el capítulo 4 se presentan los resultados de las distintas aplicaciones realizadas: la determinación de aluminio en tejido cerebral humano para correlacionarlo con la enfermedad de Alzheimer, y la determinación de elementos tóxicos en distintos órganos de la especie sapo *Bufo arenarum*, después de distintos períodos de exposición de los sapos al agua y fango contaminados del Río Reconquista.

En el capítulo 5 se discute el alcance de esta técnica en la comprensión de procesos biológicos y sus posibles desarrollos futuros.

Referencias

- [1] Sven A. E. Johansson and John L. Campbell, "PIXE: A Novel Technique for Elemental Analysis", John Wiley & Sons, 1988.
- [2] A. Caridi, A. J. Kreiner, J. Davidson, M. Davidson, M. Debray, D. Hojman and D. Santos, Atmospheric Environment 23 (1989) 2855.
- [3] T. B. Johansson, K. R. Akselsson and S. A. E. Johansson, Nucl. Instr. and Meth. 84 (1970) 141.
- [4] M. J. Ozafrán, M. E. Vázquez, A. J. Kreiner, M. E. Debray, J. M. Kesque, A. S. M. A. Romo, C. Pomar, H. Somacal, M. Davidson and J. Davidson, Nucl. Instr. and Meth. B74 (1993) 542.
- [5] M. J. Ozafrán, M. E. Vázquez, A. S. M. A. Romo, M. A. Cardona, M. E. Debray, D. Hojman, J. M. Kesque, A. J. Kreiner, J. J. Menendez, H. Somacal, J. Davidson and M. Davidson, Nucl. Instr. and Meth. B99 (1995) 384.
- [6] M. J. Ozafrán, M. E. Vázquez, A. Burlón, M. E. Caraballo, M. A. Cardona, , M. E. Debray, D. Hojman, J. M. Kesque, A. J. Kreiner, G. Levinton, F. Naab, R. Rey, M. F. Salfiti, J. Schuff, P. Stoliar, M. Davidson and J. Davidson, Avances en Técnicas de Rayos X. Vol. X. (En prensa).
- [7] M. J. Ozafrán, M. E. Vázquez, A. Burlón, M. Buhler, M. A. Cardona, , M. E. Debray, D. Hojman, J. M. Kesque, A. J. Kreiner, G. Levinton, J. J. Menendez, F. Naab, P. Stoliar,

M. Davidson and J. Davidson, International Journal of PIXE, Vol. 9, N° 1 y 2 (1999) 21-28.

- [8] M. J. Ozafrán, M. E. Vázquez, A. S. M. A. Romo, C. Magnavacca, M. A. Cardona. J. Davidson, M. Davidson, M. E. Debray, D. L. Hojman, J. M. Kesque, A. J. Kreiner and H. R. Somacal, Avances en Análisis por Técnicas en Rayos X, Vol. VIII (1994) 323.

CAPÍTULO 2

Fundamentos teóricos en la interacción ion-átomo

La técnica PIXE^[1] es un método de análisis multielemental basado en la espectrometría de rayos X. El análisis por emisión de rayos X inducidos por partículas cargadas involucra dos etapas; una primera en la cual un átomo presente en una muestra es excitado y emite posteriormente un rayo X característico, y otra que permite detectar e identificar a los mismos, para poder convertir el número de rayos X detectados en la correspondiente concentración de dicho elemento en la muestra.

En la figura 2.1 se esquematiza el fenómeno en el cual un ion elimina un electrón de la capa más interna del átomo (a).

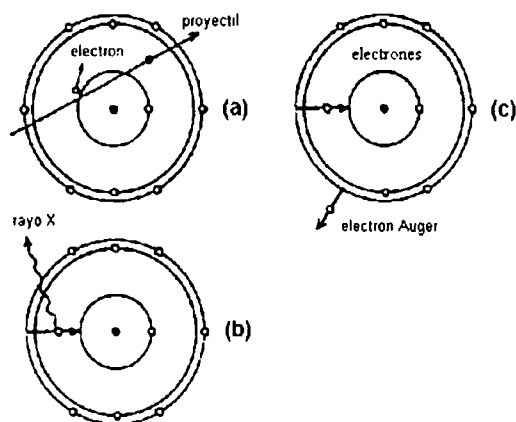


Figura 2.1. Representación esquemática de: a) la creación de una vacancia en una capa interna de un átomo, b) su desexcitación vía la emisión de un rayo X o c) vía la emisión de un electrón Auger.

Cuando el agujero o vacancia resultante es ocupado por un electrón de una capa exterior del átomo se emite un rayo X característico (b), cuya energía identifica al átomo emisor. Las transiciones que se producen hacia la capa más interna del átomo se llaman rayos X K,^[1,2] las que se producen hacia la próxima capa se llaman rayos X L^[1,2] de energía inferior a los anteriores, y así sucesivamente.

Cuando el ion pasa a través de la muestra, además de producir rayos X característicos, ocurren otros fenómenos físicos que dan origen a un espectro continuo de rayos X, denominado radiación de fondo (ver figura 4.3).

No sólo el ion ioniza los átomos de la muestra en su paso por ella, también los electrones y rayos X producto de la interacción ion-átomo pueden producir nuevas ionizaciones (aunque el efecto de éstos frente al del ion primario es despreciable*). En el caso de los rayos X este fenómeno se denomina fluorescencia secundaria; en la referencia [11] se realizó un tratamiento exhaustivo de su importancia.

En las siguientes secciones de este capítulo, se presentan las teorías actuales que dan cuenta del fenómeno de ionización y producción de rayos X característicos con iones, y de los procesos conocidos que generan el espectro continuo de radiación de fondo. La última sección se refiere a la sensibilidad de la técnica PIXE.

2.1 Ionización y producción de rayos X característicos con iones

Al producirse la ionización de un átomo que forma parte de una muestra por un proyectil, en lugar de la emisión de un rayo X característico como se esquematiza en la figura 2.1 (b), puede ocurrir la emisión de un electrón Auger.^[2] Estos dos procesos de desexcitación del átomo compiten entre sí. El fenómeno de desexcitación a través de la emisión de un electrón Auger se ilustra en la figura 2.1 (c), en donde un electrón de una capa superior del átomo, absorbe la energía correspondiente a la transición electromagnética mostrada en (b) para escaparse del átomo. La probabilidad de que se emita un electrón Auger está dada por $(1-\omega_i)$, en donde ω_i ^[12,13] es el rendimiento de fluorescencia o probabilidad de que se emita un rayo X desde la capa atómica considerada.

* El cálculo puede realizarse utilizando la distribución de electrones^[3-5] (rayos X^[6]) en función de la energía de éstos producida por los iones incidentes, el rango de los electrones^[4] (la atenuación de los rayos X^[7-9]) y la sección eficaz de ionización (electrones^[6,10], rayos X^[7]).

La emisión de rayos X característicos puede ser considerada en una buena aproximación como isotrópica. Por lo tanto cuando un haz de proyectiles incide sobre un elemento (Z, A), caracterizado por el número atómico Z y el número másico A, en una muestra fina, dará lugar a un número de rayos X característicos Nx_i que serán detectados. En un detector en el cual la ventana de entrada de la radiación X ocupa un ángulo sólido Ω respecto al área de la muestra, Nx_i está dado por:

$$Nx_i = \sigma_i^{\text{emis}} N_p \frac{\rho t}{AM} \frac{\Omega}{4\pi} \epsilon C_{\text{abs}} \quad (2.1)$$

donde la sección eficaz de emisión de rayos X, σ_i^{emis} , es el producto de la sección eficaz de ionización σ_i^{ion} y ω_i , y el índice i se refiere a la capa ionizada K, L o M. El número de partículas incidentes es N_p , pt el espesor de muestra que atraviesan los iones expresado en masa por unidad de área, y M la unidad de masa atómica ($M = 1,661 \cdot 10^{-24}$ g). La cantidad $\rho t/(AM)$ representa el número de átomos del elemento (Z, A) por unidad de área. La eficiencia intrínseca del detector para la correspondiente energía de los rayos X es ϵ , y C_{abs} expresa la atenuación de los rayos X en su camino desde la muestra hacia el detector pasando a través de distintos absorbentes, incluyendo la posible autoabsorción en la muestra.

Para cada capa, los rayos X característicos están divididos en grupos, por ejemplo las transiciones a la capa K en $K\alpha$ y $K\beta$ y las transiciones a la capa L en $L\alpha$, $L\beta$ y $L\gamma$. Estos grupos corresponden a las distintas transiciones posibles de acuerdo al principio de exclusión de Pauli, entre las distintas subcapas de cada capa atómica.^[1,2] Cuando una medida involucra sólo una de las componentes se debe agregar un factor en la ecuación (2.1), que expresa la probabilidad de observar tal emisión relativa a la emisión total de rayos X correspondiente a esa capa. Inversamente, la sección eficaz de emisión para una cierta capa es la suma de la sección eficaz de emisión obtenida de la ecuación (2.1) para cada una de las componentes de la radiación correspondiente a tal capa, cada una calculada con sus parámetros ϵ y C_{abs} dependientes de la energía de cada transición.

Cualitativamente, la sección eficaz de producción de rayos X de la capa i para un determinado elemento (Z, A) aumenta con la energía del proyectil E_i hasta alcanzar un máximo cerca de la energía $E_i \approx A_1(M/m)U_i(Z)$, en donde la velocidad del proyectil iguala la velocidad media de los electrones de la capa i, cuya energía de ligadura es $U_i(Z)$. La cantidad A_1M es la masa del

proyector y m es la masa del electrón. Para energías superiores la sección eficaz comienza a disminuir suavemente. La expresión para E_i puede obtenerse fácilmente, al escribir la igualdad entre la velocidad del proyectil y la del electrón en la capa i , reemplazando ambas en función de la energía cinética correspondiente a cada partícula, y considerando el teorema del virial que expresa que la energía cinética media del electrón ligado es igual al valor absoluto de su energía de ligadura.

Teniendo en cuenta los resultados de la aproximación de encuentro binario^[2,5] (Binary Encounter Approximation, BEA) o aproximación de Born^[5,14] (Born Approximation, BA), se puede generalizar el resultado de la sección eficaz de ionización de protones σ_p^{ion} , a cualquier otro proyectil con A_1 nucleones, carga nuclear Z_1 y energía E_1 mediante la siguiente ecuación:

$$\sigma_{Z_1 A_1}^{ion}(E_1) = Z_1^2 \sigma_p^{ion} \left(\frac{E_1}{A_1} \right) \quad (2.2)$$

esto significa que la sección eficaz de ionización de un proyectil (Z_1, A_1) es igual a la de un protón con la misma velocidad o energía por nucleón, multiplicada por el cuadrado del número atómico del proyectil. En realidad, para proyectiles con valores grandes de Z_1 ($Z_1 > 2$) la ecuación (2.2) deja de ser una buena aproximación, ya que los proyectiles no pueden ser tratados como cargas puntuales como los protones o partículas alfas, y además originan vacancias múltiples^[13] que producen un corrimiento en la energía de los rayos $X^{[15]}$ y un cambio en los rendimientos de fluorescencia.^[16,17]

D. D. Cohen y M. Harrigan^[18] han calculado y tabulado las secciones eficaces de ionización de la capa K y L para todos los elementos con impacto de protones y partículas alfas en el rango de energía desde 100 keV hasta 10 MeV. En estos cálculos se utiliza la teoría ECPSSR descrita por Brandt y Lapicki,^[19,20] que consiste en una modificación de la aproximación de Born de ondas planas (PWBA) incorporando polarización y efectos de ligadura en la aproximación de estado estacionario perturbado (PSS) y correcciones por efectos relativistas (R), pérdida de energía (E), y deflexión coulombiana (C). Esta teoría describe así, la producción de vacancias en capas internas en una colisión ion-átomo a través de ionización coulombiana directa (DI), que es esencialmente independiente del estado de carga de equilibrio del ion en la muestra. En el caso de impacto con iones livianos (p. d. α) la sección eficaz de la capa K es calculada con una precisión que está dentro del 10 %^[21-9] de los valores

experimentales en la mayor parte del rango de energía desde 100 keV hasta 10 MeV y para casi todos los elementos.

En la referencia [23], se encuentra una extensa recopilación de datos experimentales de secciones eficaces de ionización de la capa K con $Z_1/Z_2 < 0,3$ comparados con la teoría ECPSSR,^[19,20] en donde se han usado los valores de rendimiento de fluorescencia de la capa K de Krause^[11] y estos datos corresponden a los siguientes proyectiles: ^1H , ^2H , ^3He , ^4He , ^6Li , ^7Li , ^{10}B , ^{12}C , ^{14}N , ^{16}O , ^{19}F y ^{35}Cl . Se observa que el cociente entre valores experimentales y teóricos fluctúa dentro de un factor dos, por exceso o defecto para los proyectiles más pesados como el ^{12}C , ^{14}N , ^{16}O , ^{19}F y ^{35}Cl . La diferencia es menor a medida que disminuye el número atómico del proyectil. Para iones más pesados la teoría está lejos de obtener resultados satisfactorios cuando se la compara con los valores experimentales.

En las referencias [24, 25], se desarrolla una extensión de la teoría ECPSSR que relaciona la sección eficaz de ionización con el estado de carga del proyectil. Este efecto es llamado captura de electrones por vacancias del proyectil (EC). En la figura 2.2 se muestra la sección eficaz de producción de rayos X K del aluminio con iones de carbono y energías entre 2 y 12 MeV. Se puede observar que la sección eficaz para estados de carga $q = 2+$, $3+$ y $4+$ (captura de electrones por las capas L, M, etc. del ion de carbono) entre 2 y 8 MeV es casi la misma, indicando que la contribución por captura de electrones por iones de carbono sin vacancias en la capa K es pequeña comparada a aquella para los mismos iones con vacancias en la capa K y estados de carga $5+$ y $6+$ (captura de electrones por las capas K, L, M, etc. del ion de carbono). A 10 MeV, la sección eficaz para el estado de carga $4+$ es ligeramente superior a la correspondiente para el estado de carga $3+$. Esto se atribuye a la formación del estado atómico metaestable $1s2s$ que sucede cuando un ion de carbono “helioide” (ion con sólo dos cargas) pasa a través del “stripper” (lámina delgadas de carbono que se encuentra en el terminal de alta tensión del acelerador que despoja al ion, acelerado y cargado negativamente con un electrón en exceso, de varios electrones quedando cargado positivamente) del acelerador de iones,^[26,27] y al hecho de que una fracción de los iones metaestables tienen un tiempo de vida mayor al tiempo de tránsito del ion a través de la línea de irradiación hasta llegar a la muestra. Los iones de carbono con estado de carga $4+$ metaestable, permitirán captura de electrones similar a los iones de carbono con estado de carga $5+$ durante la colisión, ya que ellos tienen también una vacancia en la capa K. Como resultado, la condición de estado metaestable contribuye a un pequeño aumento en la sección eficaz de producción de rayos X a 10 MeV.

como se ve en la figura 2.2. Para 12 MeV este efecto se espera que sea más importante que a 10 MeV. También se puede observar de la figura 2.2 que para iones de carbono con estados de carga 5+ y 6+, la sección eficaz se incrementa del 35 % al 200 % respecto a la del estado de carga 4+. Como ya se mencionó, DI es esencialmente independiente del estado de carga del ion, por esto el incremento en la sección eficaz para estados de carga 5+ y 6+ se atribuye al efecto de EC.

Otros trabajos sobre la dependencia de la sección eficaz de ionización con el estado de carga del proyectil se encuentran en las referencias [17, 28-32].

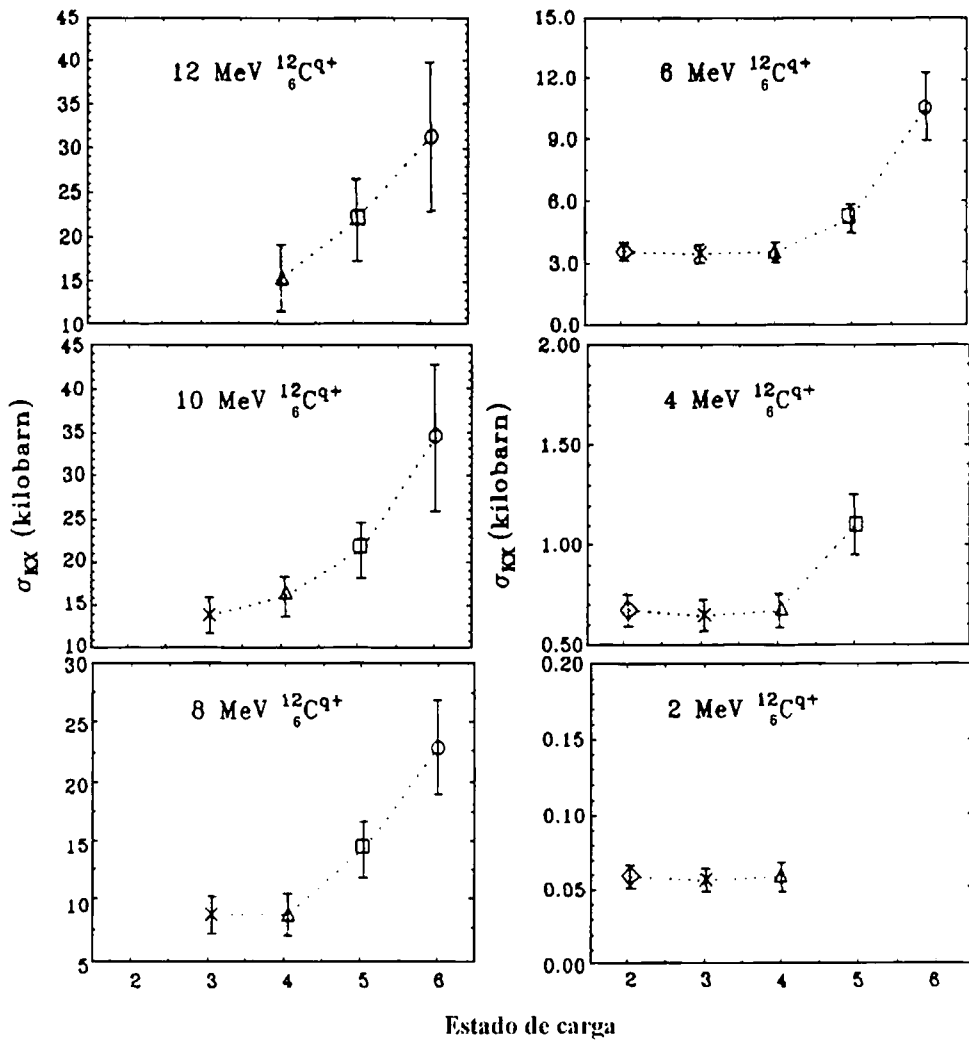


Figura 2.2. Dependencia de la sección eficaz de producción de rayos X K con el estado de carga del proyectil. La muestra es de Al de $0.14 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ y los iones de C de 2-12 MeV. El estado de carga varía de 2+ a 6+.

Extraído de la referencia [31].

En la figura 2.3 se muestran mediciones de la sección eficaz de producción de rayos X K en función de la energía del ion incidente, para una muestra de Al de $0,14 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ de espesor ($\approx 5\text{\AA}$) al igual que en las mediciones mostradas en la figura 2.2. Esta muestra de Al es lo suficientemente fina como para que las colisiones únicas al atravesar la muestra predominen sobre colisiones múltiples en el proceso de ionización.^[33-35] Ésto además se puede observar claramente en la figura 1 de la referencia [31], en donde el régimen de colisión única se alcanza para espesores menores a $0,3 \mu\text{g}/\text{cm}^2$. Las curvas en los gráficos de la figura 2.3 son resultados de la teoría ECPSSR teniendo en cuenta el efecto de captura de electrones por el proyectil^[20,24,25] y usando el valor del rendimiento de fluorescencia para ionización única.

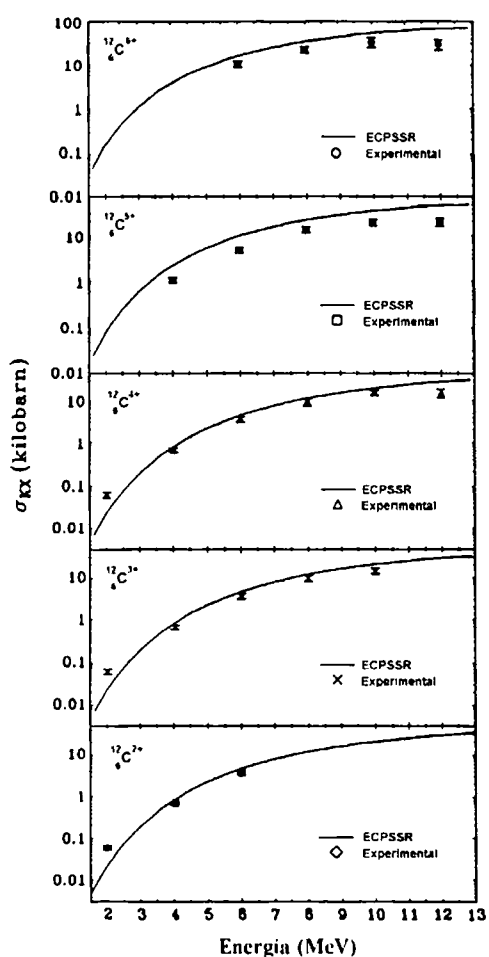


Figura 2.3. Sección eficaz de producción de rayos X del Al con iones de carbono con estados de carga 2+, 3+, 4+, 5+ y 6+. Las curvas son calculadas con la teoría ECPSSR de las referencias [20,24,25].
Extraído de la referencia [31].

Como se puede observar en la figura, la teoría ECPSSR produce un buen ajuste a los datos experimentales con una discrepancia del 20 % al 30 % para DI y EC por las capas L, M, etc. del ion de carbono con estados de carga 2+, 3+ y 4+ a energías entre 4 y 10 MeV (en estos

casos EC es incluido en los cálculos aunque su contribución es muy pequeña comparada a la de DI), mientras que para iones de carbón con vacancias en la capa K (5+ y 6+) la teoría DI y EC por las capas K, L, M, etc., predice valores alrededor del 30 % al 60 % superior a los datos experimentales. Para 2 MeV los valores calculados son inferiores a los experimentales en un factor 2,6. Esta desviación importante aparece a energías bajas en donde los efectos de ionización de orbitales moleculares, que no se tienen en cuenta en el cálculo, pueden llegar a ser importantes.^[36-39]

En un trabajo reciente realizado por Zhinqiang Liu y S. J. Cipolla,^[40] se presenta un programa (en lenguaje C) llamado ISICS (Inner-Shell Ionization Cross Sections), desarrollado para calcular la sección eficaz de ionización y producción de rayos X de las capas K, L y M utilizando la teoría ECPSSR. Los cálculos con este programa pueden realizarse seleccionando cualquier elemento como blanco y como proyectil, y para cualquier rango e incremento de la energía. En esta versión del programa, aún no ha sido incorporado la contribución debido a la captura de electrones por parte del proyectil, que resulta significativa cuando $(Z_1/Z_2) > 0.1$.^[19,20] En particular, para iones de ^{16}O ($Z_1=8$) como proyectiles esta condición se cumple con todos aquellos elementos con número atómico (Z_2) menor a 80. Tampoco se han incluido los efectos de orbitales moleculares que adquieren importancia a energías bajas del proyectil. Además, los valores del rendimiento de fluorescencia utilizados para calcular la producción de rayos X son los medidos y tabulados en la referencia [13] que corresponden al caso de ionización única.

2.2 Radiación de fondo

En los espectros de rayos X inducidos por iones, los fotopicos correspondientes a los rayos X característicos están sobre un fondo continuo de radiación electromagnética que limita la sensibilidad de la técnica (ver sección 2.6).

Considerando el problema en el que un determinado elemento está distribuido en una sustancia (matriz), es importante conocer cual es la mínima concentración del elemento capaz de ser detectada midiendo la señal de rayos X característicos en función de la radiación de fondo. Para esto, es necesario identificar las fuentes de radiación de fondo y tratar de disminuirlas o eliminarlas. Las más importantes son:

- 1) radiación de frenado (en alemán, bremsstrahlung (B)) de electrones secundarios,
- 2) radiación de frenado del proyectil, y

3) dispersión Compton de rayos γ provenientes de estados nucleares excitados.

Otras fuentes que limitan la sensibilidad son:

4) resolución del detector,

5) “cola” de baja energía en los fotopicos de rayos X característicos,

6) velocidad de adquisición del detector,

7) calentamiento de la muestra, y

8) carga electrostática de la muestra.

El primer tipo de radiación mencionado es el más importante y junto con el segundo, se discuten cuidadosamente en las siguientes secciones de este capítulo. Estos dos tipos de radiación están siempre presentes cuando se utilizan iones para la producción de rayos X, y son factores independientes del tipo de detector utilizado para la medición de la radiación.

Los factores (3), (4), (5) y (6), dependen del tipo de detector utilizado.

El tercer tipo de radiación es tan fundamental como los dos primeros, en el sentido que los iones del haz incidente eventualmente producirán estados nucleares excitados, los cuales al decaer producirán radiación γ . La dispersión Compton, que convierte los rayos γ en un espectro continuo de radiación de fondo depende del material del detector y su entorno. La intensidad de la radiación γ proveniente de la muestra disminuye con la energía del proyectil. Para disminuir este efecto es conveniente irradiar a energías del proyectil, en el sistema de referencia del centro de masa, inferiores a las correspondientes barreras coulombianas entre el proyectil y los elementos de la muestra, lo que suprime las reacciones nucleares. Sin embargo, es difícil eliminar completamente el fondo producido por la radiación γ , ya que a energías del proyectil menores a la energía de la barrera coulombiana, los núcleos de la muestra pueden ser igualmente excitados a través de la fuerza coulombiana. Esta fuente depende fuertemente de la concentración en la matriz de elementos especiales que tienen alta sección eficaz de excitación de niveles nucleares de baja energía, tales como ^{19}F y ^{23}Na , y a menudo puede tener importancia similar a la radiación de frenado producida por los proyectiles.

Además de los tipos de radiación indicados, los cinco factores adicionales listados influyen en la sensibilidad de la técnica, pero ellos no son fundamentales ya que pueden ser eliminados realizando las mediciones apropiadamente.

Teniendo en cuenta el factor (4), el ancho de los fotopicos de rayos X más intensos es un problema cuando ellos enmascaran los fotopicos de rayos X característicos provenientes de trazas de algún elemento. Esto sugiere el uso de detectores con mayor resolución.

En particular el factor (5), la “cola” de baja energía en los fotopicos de rayos X característicos que se observa en los detectores de estado sólido, se debe a la colección incompleta de carga.^[41] Esto se produce cuando la radiación incide sobre los bordes de la oblea semiconductora del detector. Este efecto puede ser suprimido absorbiendo la radiación que llega sobre los bordes de la oblea semiconductora, colocando un colimador frente a la ventana del detector.

El factor (6) depende del detector, del amplificador y del sistema de rechazo de apilamiento. El efecto puede ser eliminado colocando absorbentes entre la muestra y el detector, para reducir particularmente los pulsos correspondientes a radiación de baja energía (en el caso que estos no sean de interés) que es usualmente la más intensa.

En el caso del factor (7), el calentamiento de la muestra y su presencia en vacío puede ser un problema si se encuentran elementos volátiles. Esto implica no superar cierta corriente de irradiación o usar soportes para las muestras capaces de disipar el calor.

Muestras con una pobre conducción eléctrica (8), pueden cargarse electrostáticamente durante la irradiación. Así, electrones dispersos en la cámara de irradiación pueden ser acelerados chocando contra la muestra, y la radiación de frenado producida se convierte en la principal fuente de radiación de fondo. Este fenómeno puede ser evitado logrando que halla conducción eléctrica en el área de irradiación o también colocando una fuente de electrones (cañón de electrones) con energías muy bajas y que incidan sobre la muestra para evitar que se cargue.

2.3 Radiación de frenado de electrones secundarios (SEB)

Experimentalmente se encuentra que el fondo de radiación electromagnética es muy intenso a energías bajas, pero disminuye rápidamente cuando la energía es mayor a:

$$T_m = \frac{4 m_e A_1 M}{(A_1 M + m_e)^2} E_1 \approx \frac{4 m_e}{M} \frac{E_1}{A_1} \quad (2.3)$$

donde T_m representa la máxima energía que puede ser transferida por un proyectil con masa $A_1 M$ y energía E_1 , a un electrón libre de masa m_e . A_1 es el número de nucleones del proyectil y M la unidad de masa atómica.

Cuando T_m es mayor que la energía de los rayos X característicos provenientes de las trazas de elementos presentes en la muestra, la radiación de fondo causa una severa limitación en las concentraciones mínimas capaces de ser medidas.

En el proceso SEB^[6,42,43] un electrón es expulsado de un átomo de la muestra por un proyectil. Este electrón viaja a través de la muestra perdiendo energía por los sucesivos choques con otros electrones, y su trayectoria es desviada por el campo coulombiano de los núcleos de la muestra perdiendo nuevamente energía, pero esta vez en forma de radiación electromagnética. Este fenómeno se muestra esquemáticamente en la figura 2.4 (a), y en la figura 2.5 se muestra cualitativamente su espectro de energía junto a dos fenómenos adicionales que se tratan más adelante en este capítulo.

La probabilidad^[6] de que un electrón sea eliminado de un átomo de la muestra, por un proyectil con energía cinética E_δ , y produzca debido a su interacción con los otros átomos de la muestra un fotón con energía entre E_r y E_r+dE_r es:

$$dP(E_\delta, E_r) = \int_{E_r}^{E_\delta} d\sigma_r(E_c, E_r) \frac{dE_c}{S_M(E_c) A_M M} \quad (2.4)$$

en esta ecuación se supone que el electrón no sale de la muestra. La cantidad $d\sigma_r(E_c, E_r)$ es la sección eficaz de producción de rayos X de energía E_r para un electrón de energía cinética E_c . S_M es el poder de frenado del medio para electrones de energía cinética E_c , expresado en energía por unidad de masa por unidad de área. Por lo tanto, $dE_c/[S_M(E_c) A_M M]$ es el número de átomos por unidad de área correspondiente a la pérdida de energía de los electrones dE_c en la matriz de la muestra. A_M es el número másico de los átomos que constituyen la matriz y M es la unidad de masa atómica.

La ecuación (2.4) refleja el balance entre dos fenómenos simultáneos que compiten entre sí. Por un lado, los electrones son acelerados en el campo electrostático de los átomos de la matriz produciéndose la emisión de radiación electromagnética, cuya energía será igual o menor a la energía cinética del electrón. Por otro lado, los electrones van disminuyendo su velocidad debido a las distintas colisiones que sufren.

Entonces, la sección eficaz de producción de radiación de frenado de electrones secundarios de energía E_r , causada en forma indirecta por el proyectil, está dada por:

$$d\sigma^b(E_r) = \int_{E_r}^{\infty} dP(E_\delta, E_r) \frac{d\sigma_e}{dE_e}(E_\delta) dE_\delta \quad (2.5)$$

donde $d\sigma_e(E_e)/dE_e$ es la sección eficaz de producción de electrones secundarios en el intervalo de energía entre E_e y $E_e + dE_e$. Reemplazando la ecuación (2.4) en la (2.5) e intercambiando el orden de integración $dE_e dE_\delta$ se obtiene:

$$\frac{d\sigma^b}{dE_r}(E_r) = \int_{E_r}^{\infty} g(E_e, E_r) \sigma_e(E_e) dE_e \quad (2.6)$$

donde:

$$g(E_e, E_r) = \frac{1}{S_M(E_e) A_M M} \frac{d\sigma_r}{dE_r}(E_e, E_r) \quad (2.7)$$

y además:

$$\sigma_e(E_e) = \int_{E_e}^{\infty} \frac{d\sigma_e}{dE_e}(E_\delta) dE_\delta \quad (2.8)$$

siendo $\sigma_e(E_e)$ la sección eficaz de producción de electrones integrada, que puede ser calculada utilizando la aproximación de Born^[44] o aproximación de encuentro binario.^[2,3,44] En la referencia [45] se encuentra el resultado de la expresión (2.6).

2.4 Radiación de frenado del proyectil

La gran aceleración que ocurre durante una colisión cercana entre el proyectil (Z_1, A_1, E_1) y el núcleo (Z, A) de la matriz, produce radiación de frenado del proyectil la cual llega a ser importante a energías de rayos X mayores a T_m . La sección eficaz de este proceso esta dada por la siguiente ecuación:^[1,6,46]

$$\frac{d\sigma_r^b}{dE_r} = C \frac{A_1 Z_1^2 Z^2}{E_1 E_r} \left(\frac{Z_1}{A_1} - \frac{Z}{A} \right)^2 \quad (2.9)$$

donde E_r es la energía de la radiación emitida y $C^{[6]}$ es:

$$C = 4,3 \cdot 10^{-4} \ln \left(\frac{4 E_i}{Z_i Z E_r} \sqrt{\frac{E_i}{A_i \cdot 100 \text{ keV}}} \right) \text{ barn keV} \quad (2.10)$$

Para muestras cuya matriz está compuesta por elementos livianos el cociente Z/A es aproximadamente 0,5 y entonces para éstas, la radiación de frenado del proyectil para iones con $Z_i/A_i = 0,5$ prácticamente desaparece, como en el caso de ^4He y ^{16}O .

2.5 Otras componentes de la radiación de fondo

Otros tipos de procesos han sido observados y estudiados como nuevas componentes del espectro continuo de rayos X que se originan en colisiones entre el ion incidente y los átomos de la muestra sumándose a las ya descritas. La importancia relativa y la distribución espectral de cada componente depende del proyectil y su energía. La radiación de fondo generalmente se incrementa muy rápidamente con la energía del proyectil. Algunos de los procesos que se describen a continuación son más intensos en colisiones con iones livianos y otros en colisiones con iones pesados.

En particular, en colisiones con iones livianos (protones y partículas alfas), el espectro de radiación de fondo viene descrito por la radiación de frenado de electrones secundarios, dispersión Compton de rayos γ de reacciones nucleares, radiación de frenado de electrones casi libres y radiación de frenado atómico. A continuación se tratan las dos últimas componentes de la radiación de fondo mencionadas.

- **Radiación de frenado de electrones casi libres (QFEB)**

El proceso QFEB^[42,45,47] se muestra esquemáticamente en la figura 2.4 (b), en donde un electrón de un átomo de la muestra es desviado por el campo coulombiano del proyectil y emite radiación electromagnética. Este es un proceso en el sistema de referencia del proyectil. La cantidad característica de esta radiación es $T_r = m_e v_p^2 / 2 = T_m / 4$. T_r se indica en la figura 2.5 y es la energía cinética máxima en el sistema de referencia del proyectil para un electrón que está libre y en reposo en el sistema de referencia del átomo de la muestra. Siendo m_e la masa del electrón y v_p la velocidad del proyectil en el sistema de laboratorio. La sección eficaz llega a ser apreciable cuando la velocidad del proyectil es mucho mayor que la velocidad del electrón en el átomo, de esta manera el electrón puede considerarse libre y en reposo.

Se recuerda que la velocidad de un electrón v , relativa a la velocidad de la luz c , en la capa i de un elemento con número atómico Z puede calcularse aproximadamente de la relación: $v/c =$

$Z/(137 n)$. El valor de n para la capa K es 1, para la capa L es 2, y así sucesivamente.

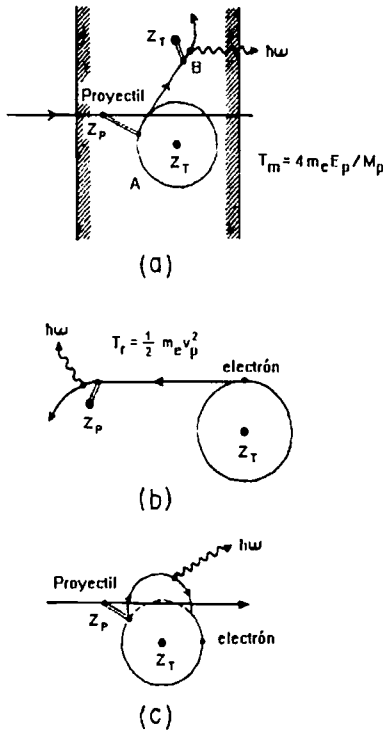


Figura 2.4. Representación esquemática de los procesos SEB (a), QFEB (b) y AB (c).
 Extraído de la referencia [42].

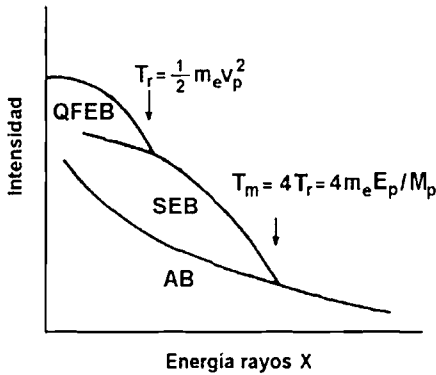


Figura 2.5. Representación esquemática de las contribuciones QFEB, SEB y AB.
 Extraído de la referencia [42].

- **Radiación de frenado atómico (AB)**

El proceso AB^[42,45,48-51] se muestra en la figura 2.4 (c) y 2.6 (a), en donde un electrón ligado a un átomo de la muestra, es excitado a un estado de energía del continuo por el proyectil y vuelve a su estado ligado original emitiendo un fotón. Esto origina un espectro continuo de energía. También puede ocurrir que el estado final sea un estado del continuo, en este caso el

proceso es una ionización acompañada por la emisión de un fotón, y se denomina ionización radiativa (RI).^[47,52] El proceso AB adquiere un rol predominante a energías de rayos X mayores que T_m , mientras que a energías inferiores el rol predominante lo adquiere el proceso SEB. En la figura 2.5 se muestran esquemáticamente las regiones $h\nu < T_r$, $T_r < h\nu < T_m$ y $h\nu > T_m$ y el proceso predominante en cada una de ellas. El límite superior de energía para el proceso AB es:^[53]

$$T_{AB} = \frac{2mc^2\alpha Z_1 v_2 / c}{\left[\frac{Z_2 Z_1 m}{M_2} \left(1 - \frac{M_2 Z_1}{M_1 Z_2} \right) \right]^{1/4}} \quad (2.11)$$

donde m es la masa del electrón, c la velocidad de la luz y α la constante de estructura fina. Para las demás cantidades como el número atómico Z , la masa M y la velocidad v , el subíndice 1 se refiere al átomo en reposo en la muestra y el subíndice 2 a la partícula incidente.

En el caso de colisiones con iones pesados además de los procesos anteriormente mencionados, se originan otras componentes que han sido interpretadas como radiación de frenado de los átomos unidos, rayos X de orbitales moleculares y captura radiativa de electrones.

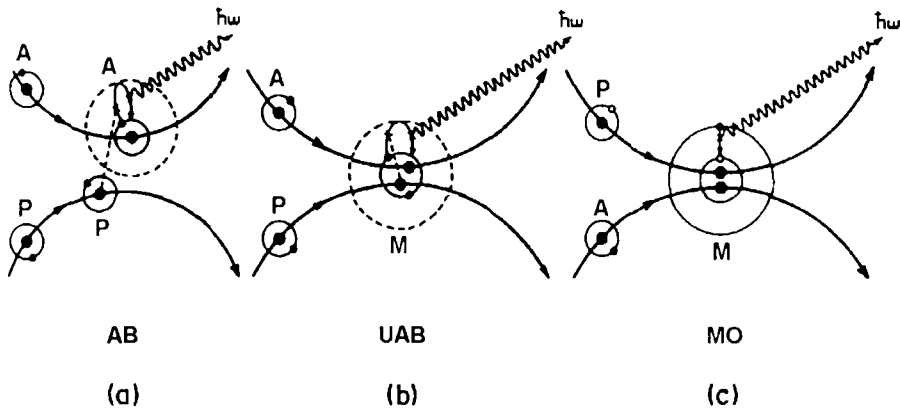


Figura 2.6. Representación esquemática de los procesos: (a) radiación de frenado atómico (AB), (b) radiación de frenado de átomo unido (UAB) y (c) rayos X de orbitales moleculares (MO). Las letras P, A y M se refiere a proyectil, átomo y molécula, respectivamente. Extraído de la referencia [50].

- **Radiación de frenado de los átomos unidos (UAB)**

El proceso UAB^[50,54] es similar al anterior (AB) como se muestra en la figura 2.6, con la diferencia que se produce cuando los átomos que interaccionan están separados una distancia $\Delta x = v_p/v$ (siendo v_p la velocidad del proyectil y v la frecuencia del fotón emitido de energía $h\nu$) menor que el radio de la capa K de los átomos unidos $a_K = a_0/(Z_1+Z_2)$, donde a_0 es el radio de Bohr, Z_1 y Z_2 los números atómicos del proyectil y el átomo de la muestra, respectivamente. En el proceso UAB al igual que en el proceso AB, el proyectil está en la vecindad del átomo en reposo, y las estructuras internas del ion y del átomo son las mismas antes y después de la colisión. En el proceso UAB un electrón ligado al átomo unido es excitado a un estado del continuo o a un estado ligado desocupado obteniendo energía del pseudo-núcleo del átomo unido, en el cual la distribución de carga está cambiando durante la colisión, y retorna a su estado original emitiendo un fotón.

- **Rayos X de orbitales moleculares (MO)^[55-58]**

Este fenómeno ocurre en colisiones ion pesado-átomo, en donde los electrones de las capas más internas con velocidad mayor a la del ion incidente forman orbitales de moléculas diatómicas alrededor del proyectil y del átomo de la muestra. Como ejemplo, los iones de ^{16}O con energía de 50 MeV tienen una velocidad aproximada que es el 8% de la velocidad de la luz. Esto significa que para estos iones, considerando los electrones de la capa K, este fenómeno tendría lugar para aquellos elementos con número atómico mayor al del sodio.

Si existe una vacancia en uno de los orbitales moleculares, el electrón puede decaer en algún instante durante la colisión, y como la distancia internuclear varía durante la colisión se observa un espectro continuo de rayos X. La energía máxima según este modelo ocurre en transiciones a vacancias del orbital inferior $1s\sigma$,^[59] que es igual a la energía de ligadura de la capa K del átomo unido. Sin embargo, se observó que esta componente se extiende más allá mostrando una dependencia con la velocidad del proyectil y el número de cuentas en el espectro.^[60] En la figura 2.6 (c) se ilustra este fenómeno. Una diferencia distintiva entre los procesos AB y UAB respecto al de rayos X de orbitales moleculares, es que los primeros no necesitan que exista una vacancia en el estado inicial para que el proceso pueda ocurrir.

- **Captura radiativa de electrones (REC)^[55,61]**

Un proyectil con una vacancia en una capa interna puede, además de producir rayos X desde orbitales moleculares, capturar electrones de capas externas del átomo originando un fotón cuya energía en el sistema de referencia del proyectil es: $E_{\text{REC}} \approx E_i + m v^2/2$,^[55,62] donde E_i es la

energía de ligadura del electrón en la capa i del proyectil, m es la masa del electrón, y v la velocidad del proyectil. El segundo término representa la energía cinética del electrón, antes de ser capturado, en el sistema de referencia en el que el proyectil se encuentra en reposo. Los procesos REC y MO están relacionados, el primero se refiere a captura radiativa de electrones del átomo de las capas exteriores, y el segundo a captura radiativa de electrones del átomo de las capas interiores. Ambos procesos dependen de la misma manera del número de vacancias de equilibrio en la capa K del proyectil en muestras sólidas, por esta razón REC predomina en colisiones de alta velocidad donde el proyectil es totalmente despojado de sus electrones. El fotopico de rayos X producido por REC tiene un ancho de energía que resulta del movimiento de los electrones en el átomo. Este ancho se puede calcular aproximadamente con: $\Delta E_x = v p_z$, donde p_z es la cantidad de movimiento promedio de los electrones en el átomo de la muestra.

2.6 Sensibilidad en análisis de trazas de elementos

A partir de la comprensión de los procesos de producción de rayos X característicos por trazas de elementos, y de producción de radiación de fondo originada en la matriz de la muestra, se puede dar una estimación cuantitativa de la sensibilidad del método.

Si uno desea detectar un fotopico en el espectro correspondiente a una o varias transiciones características de un elemento Z (por ejemplo los fotopicos $K\alpha$ o $L\alpha$), es necesario que el fotopico sobresalga del fondo de radiación producido por la matriz. El criterio más utilizado para determinar la mínima concentración susceptible de ser medida, es considerar que la cantidad mínima de los rayos X característicos correspondientes $N_{x,min}(Z)$ capaz de ser medida sobre el fondo de radiación es igual a $3(N_B)^{1/2}$, donde N_B es el número de rayos X de radiación de fondo detectados en el intervalo de energía correspondiente a la resolución del detector en la energía del rayo X característico, y centrado respecto de la misma. Según este criterio, la mínima concentración $C_{Z,min}$ o el límite de detección LD_Z para un determinado elemento en una muestra, es el cociente entre la cantidad mínima de masa del elemento $M_{Z,min}$ capaz de ser detectada en el trozo de tejido biológico siendo analizado de masa M , y la masa M . Ésto es:

$$LD_Z = C_{Z,min} = \frac{M_{Z,min}}{M} \quad (2.12)$$

De acuerdo al proceso de preparación de muestras de tejido biológico que se describe en la

sección 3.4 del capítulo 3, la masa M del trozo de tejido analizado se reduce en un factor f debido a la eliminación de elementos mayoritarios que constituyen la matriz del tejido (H, C y O). Finalmente, la masa $m=M/f$ queda disuelta en una solución de volumen V , de la cual se deposita sobre el soporte de la muestra (lámina de espesor menor que el de la muestra, constituida de elementos livianos), un volumen mucho menor v , y así $m_M=(M/f)(v/V)$ es la cantidad de masa que constituye la muestra que es irradiada. Esta masa se distribuye sobre el soporte en un área A_M , llamada área de la muestra. Como se explica en la sección 3.2 del capítulo 3, a estas muestras se las irradia con un haz (que cubre totalmente la muestra) de intensidad transversal uniforme y área transversal A_h algo mayor que A_M . Además, $M_{Z,min}=\rho t_{Z,min}A_M(V/v)$ y $m_M=\rho t_M A_M$, donde $\rho t_{Z,min}$ es la densidad superficial mínima del elemento Z capaz de ser detectada en la muestra irradiada, y ρt_M es la densidad superficial de la muestra sobre el soporte. Con estos conceptos la ecuación (2.12) puede escribirse como:

$$LD_Z = \frac{\rho t_{Z,min}}{\rho t_M} \frac{1}{f} \quad (2.13)$$

Aquí podemos observar que cuanto mayor sea el factor de reducción de la matriz en el proceso de preparación de las muestras, serán menores los límites de detección para cada elemento. Ahora, considerando la ecuación (3.8) para $\rho t_{Z,min}$ se tiene:

$$LD_Z = \frac{3\sqrt{N_B}}{\rho t_M N_p k(Z)} \frac{1}{f} \quad (2.14)$$

donde N_p es el número total de partículas que inciden en la muestra igual a A_M/A_h veces el número total de partículas que atraviesan el área A_h (en el caso que la superficie de la muestra esté colocada perpendicular a la dirección del haz, es decir $\theta=90^\circ$ en la figura 3.1), y $k(Z)$ es el rendimiento de rayos X característicos del elemento. Para una muestra fina, $k(Z)$ está definido de acuerdo a la ecuación (3.6).

Por otro lado, N_B está dado por:

$$N_B = \frac{d\sigma^B}{dE_r} \Delta E \frac{\rho t_M N_{AV}}{PM_M \sin\theta} \epsilon_Z N_p \quad (2.15)$$

siendo $d\sigma^B/dE_r$ la sección eficaz de producción de radiación de fondo por unidad de energía y

ΔE la resolución en energía del detector ambas para la energía del correspondiente rayo X característico, N_{av} el número de Avogadro, PM_M la masa molar de la matriz, ϵ_Z la eficiencia absoluta de detección de los rayos X y θ el ángulo mostrado en la figura 3.1. La cantidad $pt_M/\sin\theta$ representa el espesor de muestra que atraviesan los iones expresado en masa por unidad de área, y $nt_M=pt_M N_{av}/(PM_M \sin\theta)$ es el espesor de muestra que atraviesan los iones expresado en átomos por unidad de área.

Reemplazando N_B y $k(Z)$ respectivamente por los segundos miembros de las ecuaciones (2.15) y (3.6) en la ecuación (2.14), y considerando $\sigma_X=\sigma_Z(E_0)\omega_Z b_Z^\alpha$, donde $\sigma_Z(E_0)$ es la sección eficaz de ionización de la capa K o L del elemento por el proyectil de energía E_0 , ω_Z el rendimiento de fluorescencia de la capa K o L, b_Z^α la fracción de los rayos X K o L que aparecen en la línea $K\alpha$ o $L\alpha$, queda:

$$LD_Z = \sqrt{\frac{d\sigma^B}{dE_r} \Delta E}{\sigma_X} \frac{3}{\sqrt{\sigma_X N_p \epsilon_Z \rho t_M}} \sqrt{\frac{\sin\theta}{N_{av} PM_M}} \frac{PM_Z}{f} \quad (2.15)$$

donde PM_Z es la masa molar del elemento Z. Se puede reescribir la ecuación (2.15) de la siguiente manera:

$$LD_Z = \sqrt{\frac{d\sigma^B}{dE_r} \Delta E}{\sigma_X} \frac{3}{\sqrt{\sigma_X N_p \epsilon_Z nt_M}} \frac{PM_Z}{PM_M} \frac{1}{f} \quad (2.16)$$

Según $d\sigma^B/dE_r$ y σ_X el límite de detección para un determinado elemento depende de la matriz en la que se encuentra, del ion o proyectil utilizado y de su energía. Es importante conocer cual es el proyectil y su energía, que da el menor límite de detección para cada elemento en una determinada matriz. Como se ve de la ecuación (2.16), cuanto menor es ΔE (esto significa mejor resolución en energía del detector) serán menores los límites de detección para cada elemento. Además, cuanto mayor sea la cantidad de iones que inciden sobre la muestra, mayor la eficiencia de detección de los rayos X $K\alpha$ o $L\alpha$, y mayor el número de átomos por unidad de área en la muestra, los límites de detección disminuirán.

Pero nt_M tiene un espesor máximo permitido para que la muestra se considere fina. Al utilizar la técnica PIXE es conveniente trabajar con muestras finas. Esto se debe a varias razones. En primer lugar, la energía del proyectil que atraviesa la muestra está bien definida, lo cual simplifica los cálculos en la obtención de las concentraciones y disminuye los errores en los cálculos de las mismas (ver sección 3.5). En segundo lugar, si la energía del ion es aquella que minimiza los límites de detección, cuando el ion disminuye su energía en una muestra gruesa pierde aquella condición y los límites de detección aumentan. Por último, los resultados obtenidos de muestras gruesas no agregan mayor información.

Con el fin de hacer una comparación aproximada entre los límites de detección para iones pesados (caracterizados por el número atómico Z_1 y el número másico A_1) y protones (p), se considera válida la ecuación (2.2) para la sección eficaz de producción de rayos X característicos (σ_X), y otra similar para la sección eficaz de producción de radiación de fondo^[42,45] (σ_{rf}) involucrando todas las componentes, ésto es:

$$\sigma_{X,(Z_1,A_1)}(E_1) = Z_1^2 \sigma_{X,p}\left(\frac{E_1}{A_1}\right) \quad (2.17)$$

$$\sigma_{rf,(Z_1,A_1)}(E_1) = Z_1^2 \sigma_{rf,p}\left(\frac{E_1}{A_1}\right) \quad (2.18)$$

donde E_1 es la energía del ion pesado y E_1/A_1 la energía del protón. Reemplazando las ecuaciones (2.17) y (2.18) en la (2.16), y suponiendo que dos muestras de la misma composición (pero no del mismo espesor), son irradiadas con el mismo número de proyectiles (iones pesados en una y protones en la otra), y en el mismo arreglo experimental en la cámara de irradiación, el límite de detección para iones pesados relativo al de los protones es:

$$\frac{LD_{Z,(Z_1,A_1)}}{LD_{Z,p}} = \frac{1}{Z_1} \sqrt{\frac{nt_{M,p}}{nt_{M,(Z_1,A_1)}}} \quad (2.19)$$

Para muestras del mismo espesor la ecuación (2.19) nos dice, que el límite de detección para los iones pesados es Z_1 veces menor al de los protones. Recordando que las muestras tienen un espesor máximo permitido compatible con la condición de muestra fina, el cual es mayor para el caso de los protones (debido a que tienen mayor poder de penetración en la muestra),

el factor Z_1 en favor de los iones pesados disminuye.

En la referencia [6] se presenta un estudio de maximización de la sensibilidad para cada elemento en matrices de C y Al en función de la energía de iones de ^1H , teniendo en cuenta la producción de rayos X K y rayos X L.

En la referencia [63] se presenta un estudio de intercomparación de la sensibilidad de seis elementos entre Cu y Pb en distintas matrices constituidas de C, Al y V, para iones de ^1H , ^4He y ^{16}O con energías de 3 y 5 MeV/uma. En este trabajo se encuentra que no es conveniente utilizar velocidades del proyectil altas, que correspondan a energías mayores a 3 MeV/uma, y que el uso de iones más pesados que los protones no ofrece ventajas en cuanto a la sensibilidad. Sin embargo, se señala que es posible que el uso de iones pesados sea comparable o aún mejor que el de protones en otras matrices, a otras energías inferiores a las estudiadas o para elementos con número atómico menor al Cu.

La sensibilidad para otros tipos de iones y energías: ^7Li (8-18 MeV), ^{12}C (10-26 MeV), ^{16}O (12-32 MeV), ^{28}Si (16-28 MeV) y ^{80}Se (24 MeV) ha sido intercomparada junto a la de protones de 3 MeV, en muestras gruesas en forma de pastillas comprimidas de diferentes patrones certificados, suministrados por IAEA (International Atomic Energy Agency), en un trabajo realizado por U. Tapper and J. Räisänen.^[64] De las figuras 1 a 4 de la anterior referencia se puede concluir que iones de ^{12}C con energía entre 2 y 2,5 MeV/uma producen mejor sensibilidad para un gran rango de elementos en diferentes tipos de matrices.

En la referencia [65] se da un método experimental para maximizar la sensibilidad en función del proyectil y su energía. Se basa en un incremento de la producción de rayos X característicos cuando la energía de ligadura de la capa K o L del proyectil, aproximadamente iguala la energía de ligadura de la capa K o L del electrón en el átomo de la muestra con número atómico Z. Esto da como resultado que para un elemento (Z, A) la máxima sensibilidad se logra con proyectiles con número atómico Z_1 , tal que: $Z_1 = Z + (1 \text{ a } 5)$. Este efecto es de gran utilidad en análisis de elementos livianos en matrices compuestas de elementos pesados.

Referencias

- [1] Sven A. E. Johansson and John L. Campbell, "PIXE: A Novel Technique for Elemental Analysis", John Wiley & Sons, 1988.
- [2] J. D. Garcia, R. J. Fortner and T. M. Kavanagh, Rev. Mod. Phys. 45 (April 1973) 111.

- [3] J. D. Garcia, Phys. Rev. 177 (5 January 1969) 223.
- [4] E. J. Kobetich and R. Katz, Phys. Rev. 170 (10 June 1968) 391.
- [5] M. E. Rudd, D. Gregoire and J. B. Crooks, Phys. Rev. A3 (May 1971) 1635.
- [6] F. Folkmann, C. Gaarde, T. Huus and K. Kemp, Nucl. Instr. and Meth. 116 (1974) 487.
- [7] W. H. McMaster, N. Kerr Del Grande, J. H. Mallett and J. H. Hubbell, "Compilation of X-ray cross sections", Lawrence Livermore National Laboratory, University of California.
- [8] J. W. Mayer and E. Rimini (eds.), "Ion Beam Handbook of Materials Analysis", Academic Press, N. Y. (1977) 454.
- [9] D. D. Cohen, Nucl. Instr. and Meth. B49 (1990) 1.
- [10] M. Gryzinski, Phys. Rev. 138 (1965) 336.
- [11] J. L. Campbell, J. X. Wang, J. A. Maxwell and W. J. Teesdale, Nucl. Instr. and Meth. B43 (1989) 539.
- [12] W. Bambynek, B. Crasemann, R. W. Fink, H. U. Freund, H. Mark, C. D. Swift, R. E. Price and P. V. Rao, Rev. Mod. Phys. 44 (1972) 716.
- [13] M. O. Krause, J. Phys. Chem. Ref. Data 8 (1979) 307.
- [14] E. Merzbacher and H. W. Lewis, Handbuch der Physik 34, ed. S. Flügge (Springer Verlag, Berlin, 1958) 167.
- [15] M. J. Ozafrán, M. E. Vázquez, M. A. Cardona, M. E. Debray, D. Hojman, A. J. Kreiner, J. J. Menendez, A. S. Romo, H. Somacal, M. Davidson and J. Davidson, Avances en Análisis por Técnicas de Rayos X, Vol. IX (1996) 195.
- [16] O. Benka, Nucl. Instr. and Meth. B4 (1984) 279.
- [17] S. Fazinic, T. Tadic, I. Bogdanovic, M. Jaksic, I. Orlic and V. Valkovic, Nucl. Instr. and Meth. B114 (1996) 232.
- [18] D. D. Cohen and M. Harrigan, Atom. Data and Nucl. Data Tables 34 (1986) 393.
- [19] W. Brandt and G. Lapicki, Phys. Rev. A20 (August 1979) 465.
- [20] W. Brandt and G. Lapicki, Phys. Rev. A23 (1981) 1717.
- [21] D. D. Cohen and M. Harrigan, Atom. Data and Nucl. Data Tables 33 (1985) 255.
- [22] H. Paul and J. Sacher, Atom. Data and Nucl. Data Tables 42 (1989) 105.
- [23] H. Paul and J. Muhr, Phys. Rep. 135 (1986) 47.
- [24] G. Lapicki and W. Losonsky, Phys. Rev. A15 (March 1977) 896.
- [25] G. Lapicki and F. D. McDaniell, Phys. Rev. A22 (1980) 1896; 23 (1981) 975(E).

- [26] I. Sellin, *Adv. At. Mol. Phys.* 12 (1977) 215.
- [27] C. D. Lin, W. R. Johnson and A. Dalgarno, *Phys. Rev. A* 15 (January 1977) 154.
- [28] F. D. McDaniel, J. L. Duggan, G. Basbas, P. D. Miller and G. Lapicki, *Phys. Rev. A* 16 (October 1977) 1375.
- [29] F. D. McDaniel, J. L. Duggan, G. Lapicki and P. D. Miller, *Nucl. Instr. and Meth.* B42 (1989) 485.
- [30] F. D. McDaniel, D. K. Marble, J. L. Duggan, M. R. McNeir, Y. C. Yu, Z. Y. Zhao, D. L. Weathers, P. S. Elliott, R. M. Wheeler, R. P. Chaturvedi and G. Lapicki, *Nucl. Instr. and Meth.* B53 (1991) 531.
- [31] H. L. Sun, Y. C. Yu, E. K. Lin, C. W. Wang, J. L. Duggan, A. R. Azordegan, F. D. McDaniel and G. Lapicki, *Phys. Rev. A* 53 (June 1996) 4190.
- [32] L. C. Tribedi, K. G. Prasad and P. N. Tandon, *Phys. Rev. A* 47 (May 1993) 3739.
- [33] J. R. Macdonald, L. Winters, M. D. Brown, T. Chiao and L. D. Ellsworth, *Phys. Rev. Lett.* 29 (6 November 1972) 1291.
- [34] J. R. Mowat, I. A. Sellin, P. M. Griffin, D. J. Pegg and R. S. Peterson, *Phys. Rev. A* 9 (February 1974) 644.
- [35] S. J. Czuchlewski, J. R. Macdonald and L. D. Ellsworth, *Phys. Rev. A* 11 (March 1975) 1108.
- [36] M. Vigilante, P. Cuzzocrea, N. De-Cesare, F. Murolo, E. Perillo and G. Spadaccini, *Nucl. Instr. and Meth.* B51 (1990) 232.
- [37] M. Geretschläger, Z. Smit and O. Benka, *Phys. Rev. A* 41 (1990) 123.
- [38] M. Geretschläger, Z. Smit, and E. Steinbauer, *Phys. Rev. A* 45 (1 March 1992) 2842.
- [39] C. W. Wang, E. K. Lin and Y. C. Yu, *Nucl. Instr. and Meth.* B79 (1993) 190.
- [40] Zhiqiang Liu and S. J. Cipolla, *Computer Physics Communications* 97 (1996) 315.
- [41] G. F. Knoll, "Radiation detection and measurement", John Wiley & Sons, 1979.
- [42] K. Ishii and S. Morita, *Nucl. Instr. and Meth.* B22 (1987) 68.
- [43] K. Ishii, S. Morita and H. Tawara, *Phys. Rev. A* 13 (January 1976) 131.
- [44] E. Gerjuoy, *Phys. Rev.* 148 (5 August 1966) 54.
- [45] K. Ishii and S. Morita, *Int. J. PIXE* 1 (1990) 1.
- [46] K. Alder et al., *Rev. Mod. Phys.* 28 (1956) 1557.
- [47] T. C. Chu, K. Ishii, A. Yamadera, M. Sebata and S. Morita, *Phys. Rev. A* 24 (October 1981) 1720.

- [48] K. Ishii and S. Morita, Phys. Rev. A30 (November 1984) 2278.
- [49] K. Ishii and S. Morita, Phys. Rev. A31 (February 1985) 1168.
- [50] K. Ishii, K. Macda, M. Takami, Y. Sasa, M. Uda and S. Morita, Nucl. Instr. and Meth. B75 (1993) 73.
- [51] K. Ozawa, J. H. Chang, Y. Yamamoto, S. Morita and K. Ishii, Phys. Rev. A33 (May 1986) 3018.
- [52] R. Anholt and T. K. Saylor, Phys. Lett. 56A (3 May 1976) 455.
- [53] K. Ishii, Nucl. Instr. and Meth. B99 (1995) 163.
- [54] R. Anholt and A. Salin, Phys. Rev. A16 (August 1977) 799.
- [55] R. Anholt, Rev. Mod. Phys. 57 (1985) 995.
- [56] W. E. Meyerhof, T. K. Saylor, S. M. Lazarus, A. Little, B. B. Triplett, L. F. Chase and R. Anholt, Phys. Rev. Lett. 32 (10 June 1974) 1279.
- [57] R. Anholt, Z. Physik A288 (1978) 257.
- [58] R. Anholt, Z. Physik A289 (1978) 41.
- [59] E. Cartmell and G. W. A. Fowles, "Valencia y Estructura Molecular", Reverté S. A., 1970.
- [60] J. S. Greenberg, C. K. Davis and P. Vincent, Phys. Rev. Lett. 33 (19 August 1974) 473.
- [61] H. W. Schnopper, J. P. Delvaille, K. Kalata, A. R. Sohval, M. Abdulwahab, K. W. Jones and H. E. Wegner, Phys. Lett. 47A (25 February 1974) 61.
- [62] P. Kienle, M. Klever, B. Povh, R. M. Diamond, F. S. Stephens, E. Grosse, M. R. Maier and D. Proetel, Phys. Rev. Lett. 31 (29 October 1973) 1099.
- [63] F. Folkmann, J. Borggreen and A. Kjeldgaard, Nucl. Instr. and Meth. 119 (1974) 117.
- [64] U. Tapper and J. Räisänen, Nucl. Instr. and Meth. B71 (1992) 214.
- [65] J. B. Cross, R. Zeisler and E. A. Schweikert, Nucl. Instr. and Meth. 142 (1977) 111.

CAPÍTULO 3

Descripción experimental de la técnica PIXE aplicada a muestras biológicas

La técnica PIXE encuentra un terreno propicio para su aplicación en diversos problemas de biología y medicina por varias razones. Examinemos el caso de los tejidos que componen el cuerpo humano. Hay más de noventa elementos en la naturaleza y alrededor de sesenta de ellos están presentes en el cuerpo humano como elementos mayoritarios o elementos trazas. La regularidad de las propiedades físicas y químicas de los elementos y sus compuestos se reflejan en la tabla periódica, pero la relación entre las propiedades biológicas de los elementos y sus posiciones en la tabla periódica todavía no ha sido comprendida completamente. En la referencia [1] se muestra un resumen de la regularidad entre la acción biológica de diferentes elementos y sus posiciones en la tabla periódica, y se destaca que todos ellos, incluyendo los llamados esenciales, son tóxicos a altas concentraciones, mientras que su carencia en un organismo vivo causará enfermedades y probablemente la muerte. Hoy en día se reconoce que las trazas de elementos juegan un rol nutricional importante. Sus funciones son variadas y dependen de su forma química o de su localización en los tejidos o fluidos del cuerpo.

Las características principales que hacen al método PIXE una poderosa técnica de análisis de muestras, y en particular muestras de origen biológico, son: su carácter multielemental (todos los elementos desde el boro al uranio en principio pueden ser medidos), el bajo límite de

detección ($\sim 1 \mu\text{g/g}$), la variación suave del límite de detección con el número atómico de los elementos y la posibilidad de analizar muestras muy pequeñas ($\sim 10 \text{ mg}$).

En la sección 3.1 de este capítulo se describe el arreglo experimental de la cámara de irradiación que se utilizó en los primeros trabajos realizados con muestras biológicas, los cuales a su vez se discuten en las secciones 4.1 y 4.2 del capítulo 4. En la sección 3.2 se discuten los dos métodos de homogeneización de la intensidad transversal del haz implementados. En la siguiente sección se describe el nuevo arreglo experimental de la cámara de irradiación que se utiliza actualmente, cuyos principales cambios son la instalación de un nuevo detector de rayos X con mayor resolución y mayor eficiencia a bajas energías, capaz de medir los rayos X K del boro; y la ubicación de éste y el antiguo detector en posiciones donde la radiación de fondo es menor, lo cual a su vez permite ubicar la muestra en forma perpendicular a la dirección del haz. En la sección 3.4 se discute el anterior y actual método de preparación de muestras biológicas para ser irradiadas empleando el acelerador del laboratorio Tandem. En la sección 3.5 se expone como se obtiene la curva de rendimiento en función del número atómico, para luego determinar la concentración y el límite de detección de los elementos en la muestra. Finalmente se presenta un estudio de precisión y exactitud en la medición de concentraciones de elementos en muestras biológicas.

3.1 Arreglo experimental de la cámara de irradiación

Como se ilustra en la figura 2.1, el método de detección de los elementos presentes en una muestra se basa en la ionización de los átomos por medio de un haz de iones, para medir la emisión de rayos X característicos de los mismos.

El haz de iones es suministrado por el acelerador Tandem Van der Graaff “Tandar” de 20 MV, de la Comisión Nacional de Energía Atómica. En éste, después que los iones han pasado a través del imán analizador, el cuál selecciona un estado de carga del ión y su energía, son focalizados por una lente triple cuadrupolar magnética en el centro geométrico de la cámara de irradiación, lugar en el que se colocan las muestras a ser analizadas.

La cámara es cilíndrica de 30 cm de diámetro y 20 cm de alto, y está construida en acero inoxidable (estequiometría típica: $\text{Cr}_8\text{Fe}_{74}\text{Ni}_{18}$) con la tapa superior y algunas bridas laterales de lucite ($\text{H}_8\text{C}_5\text{O}_2$) o vidrio de sosa y cal ($\text{O}_{60}\text{Si}_{25}\text{Na}_{10}\text{Ca}_3\text{Mg}_1\text{Al}_1$).

Todos los sectores internos de acero de la cámara, que están expuestos a la radiación secundaria producida por el haz al incidir en la muestra y al propio haz dispersado en la

muestra y bordes del colimador, se cubren con una lámina de aluminio de 1 mm de espesor, para evitar que los rayos X característicos de los elementos que componen el acero sean detectados. A su vez, con el mismo objetivo, la lámina de aluminio se cubre con otra de lucite de 1 mm de espesor. De esta manera, la probable producción de rayos X característicos de los elementos que constituyen el acero son absorbidos en la lámina de aluminio, al igual que los rayos X característicos del aluminio se absorben en la lámina de lucite. Así, sólo podrían llegar al detector rayos X característicos producidos por radiación dispersa, provenientes de los elementos mayoritarios que constituyen el lucite (H, C y O), pero éstos son absorbidos en la ventana de salida de la cámara de irradiación.

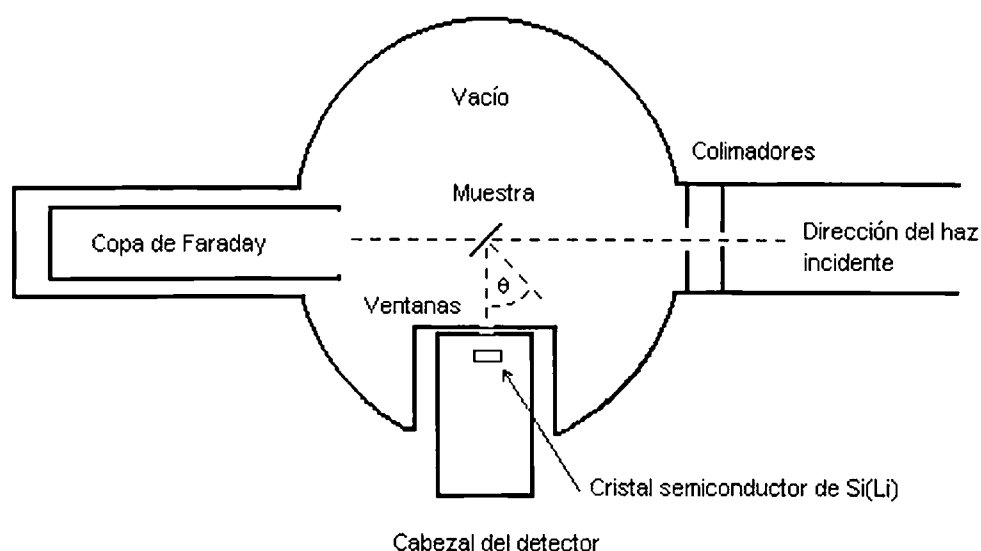


Figura 3.1. Arreglo experimental de la cámara de irradiación con un detector de Si(Li) de ORTEC colocado a 90° respecto a la dirección del haz. Vista desde arriba.

Debido a que el haz se frena en el interior de la copa de Faraday construida mayoritariamente de cobre y con contactos en su parte posterior interna de plomo y oro, para evitar que los rayos X característicos de estos elementos sean detectados, se coloca un colimador de plomo en frente de la ventana del detector y del lado externo de la cámara. En estas condiciones se obtuvieron espectros de rayos X sin colocar una muestra frente al haz, y no se observaron rayos X característicos para valores de carga integrada en la copa de Faraday mayores que el de las muestras.

Para la detección de los espectros de rayos X emitidos por las muestras se usa un detector de estado sólido de Si dopado con Li marca ORTEC, que tiene un cristal semiconductor cilíndrico de 5,27 mm de espesor y 10 mm de diámetro, con una resolución aproximada de 190 eV a 5,9 keV y una ventana de berilio de 0,5 milésimas de pulgada de espesor. Como se muestra en la figura 3.1, la ventana de entrada de radiación del detector está enfrentada a la ventana de salida de radiación de la cámara; y el detector está ubicado de manera que la dirección de los rayos X emitidos por la muestra que llegan al cristal semiconductor, forman un ángulo de 90° con la dirección del haz en el plano horizontal. La distancia mínima de acercamiento del cristal del detector a la muestra es de aproximadamente 6 cm.

Las ventanas se construyen con láminas de elementos livianos para evitar que se produzcan en ellas rayos X característicos que interfieren con aquellos provenientes de la muestra, y deben ser suficientemente finas para tener una buena transmisión de los rayos X característicos de los elementos de la muestra que se quiere conocer su concentración. Para medir rayos X con la energía de la transición $K\alpha$ del potasio y mayores, se utiliza una lámina de berilio de 1 mm de espesor. Para permitir la transmisión de los rayos X K del aluminio (1,49 keV) desde la muestra hasta el cristal del detector en este arreglo experimental, se utiliza una lámina de Mylar[®] ($H_8C_{10}O_4$) de 1,5 μm de espesor, que a su vez mantiene el vacío dentro de la cámara de irradiación que es del orden de 10^{-6} Torr.

Las muestras para ser irradiadas se colocan sobre un carrusel circular que se mueve con la ayuda de un motor, posicionando una muestra por vez frente al haz. Otro motor mueve al primero y permite posicionar la muestra a la altura requerida. Es decir, cada muestra puede moverse en dos direcciones perpendiculares a la dirección del haz. En este dispositivo se pueden colocar hasta doce muestras. En la figura 3.1 la muestra está orientada de manera que la normal a la superficie de la muestra sobre la que incide el haz forma un ángulo θ con la normal a la ventana del detector. La elección del valor de θ determina el espesor efectivo de la muestra para los iones incidentes y la pérdida de energía de los mismos, y también el espesor promedio de la muestra y la atenuación en ella de los rayos X característicos emitidos hacia el detector.

Detrás de la muestra, como ya se mencionó, se coloca una copa de Faraday para medir la corriente integrada del haz durante el tiempo de adquisición del espectro de rayos X. Este es un método adecuado para medir la carga integrada en el caso de muestras finas.

Como resultado de nuestro método de preparación de las muestras, como se explicará en la sección 3.4, éstas resultan ser finas, de espesor no uniforme e inhomogéneas (los elementos no estan distribuidos de la misma manera en el área de la muestra), por lo tanto, es necesario irradiarlas con un haz cuya intensidad transversal o corriente por unidad de área sea uniforme. Un haz con intensidad transversal uniforme permite determinar la densidad superficial promedio de cada elemento sobre el área del haz, lo cual se muestra matemáticamente a continuación.

Se considera un área A dividida en N celdas infinitesimales de área A/N , siendo N un número entero muy grande. En cada una de estas celdas (i) hay una masa $m_{i,Z}$ del elemento Z , de modo que la suma de estas cantidades sobre todas las celdas es la masa total M_Z del elemento Z en el área A . Ésto es:

$$M_Z = \sum_{i=1}^N m_{i,Z} \quad (3.1)$$

Como $m_{i,Z}$ es el producto de la densidad superficial de masa $\rho_{i,Z}$ del elemento Z en cada celda y el área de la celda, se obtiene:

$$\rho_{i,Z} = \frac{M_Z}{A} = \sum_{i=1}^N \frac{\rho_{i,Z}}{N} \quad (3.2)$$

donde $\rho_{i,Z}$ es la densidad superficial de masa promedio en el área A , que a su vez es el cociente entre la masa total del elemento en el área A y el área A .

Para medir toda la masa de cada elemento en una muestra, el área de la muestra debe estar incluída totalmente en el área transversal del haz. De acuerdo a la expresión anterior, A es el área del haz.

3.2 Homogeneización de la intensidad transversal del haz

La intensidad transversal o corriente por unidad de área del haz cuando se focaliza sobre la cámara de irradiación en la posición de una muestra a ser irradiada, responde a una función que es aproximadamente gaussiana en ambas direcciones transversales: horizontal y vertical. El perfil de intensidad del haz focalizado sobre la posición de la muestra se obtuvo desplazando una muestra de cobre de $200 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ de $0,3 \text{ mm}$ de diámetro sobre la dirección

transversal horizontal. En la figura 3.2 se muestra este perfil de intensidad para un haz de iones de ^{16}O de 50 MeV (círculos). En el eje x del gráfico se indica la posición del centro de la muestra de cobre respecto del máximo medido de intensidad del haz. La intensidad del haz se calcula aquí como el cociente entre el número de rayos X $K\alpha$ de Cu detectados por unidad de carga medida en la copa de Faraday.

Hemos empleado dos maneras distintas para uniformar la corriente por unidad de área del haz, teniendo en cuenta las opciones presentadas en la referencia [1] del capítulo 2.

Una de ellas es dispersar los iones con una lámina fina y luego recortar la parte externa del haz con colimadores. La lámina es de oro y el espesor de ésta para obtener un haz de intensidad transversal uniforme a través del colimador para distintas energías del ion de ^{16}O se estimó haciendo simulaciones con el programa Trim.^[2]

A la distribución de iones dispersados por la lámina en función del ángulo, resultado de las simulaciones; se le ajustó una función gaussiana y con ésta se realizó la integral de convolución con otra función gaussiana describiendo el perfil del haz incidente sobre ella, de acuerdo al mostrado en la figura 3.2. El criterio para determinar el espesor de la lámina, fue el de tener una corriente por unidad de área sobre el borde del colimador del 10 % del valor máximo en el centro del mismo. Para cumplir con esta condición, la corriente del haz dispersado pasando a través del colimador, colocado a una cierta distancia de la lámina dispersora, debe ser del 10 % del valor de la corriente incidente sobre la lámina.

En el caso de iones de ^{16}O de 50 MeV este efecto se muestra también en la figura 3.2 (cuadrados), en donde al haz focalizado sobre la muestra se le interpone una lámina de oro de $380\text{ }\mu\text{g}/\text{cm}^2$ de espesor ubicada a una distancia de 1,7 m del colimador. El colimador es circular, de 4 mm de diámetro, y está colocado a 20 cm de la muestra. Las líneas punteadas en la figura 3.2, muestran un perfil de intensidad del haz circular de 4 mm de diámetro, que corresponde al caso ideal de un haz de iones viajando en forma paralela entre ellos, incidiendo en forma normal sobre el colimador, y pasando a través de éste sin sufrir dispersión en sus bordes.

En éste y en los demás gráficos los valores de intensidad transversal del haz son el promedio medido sobre el área de la muestra de cobre de 0,3 mm de diámetro, y están corregidos por diferencias de ángulo sólido entre las distintas posiciones y el detector.

Los cuadrados correspondientes a las posiciones -2,1 mm y 2,1 mm; no están a la misma altura de aquellos que se encuentran sobre la línea punteada horizontal, debido a que la muestra de

cobre utilizada estaba parcialmente irradiada con la zona de máxima intensidad del haz.

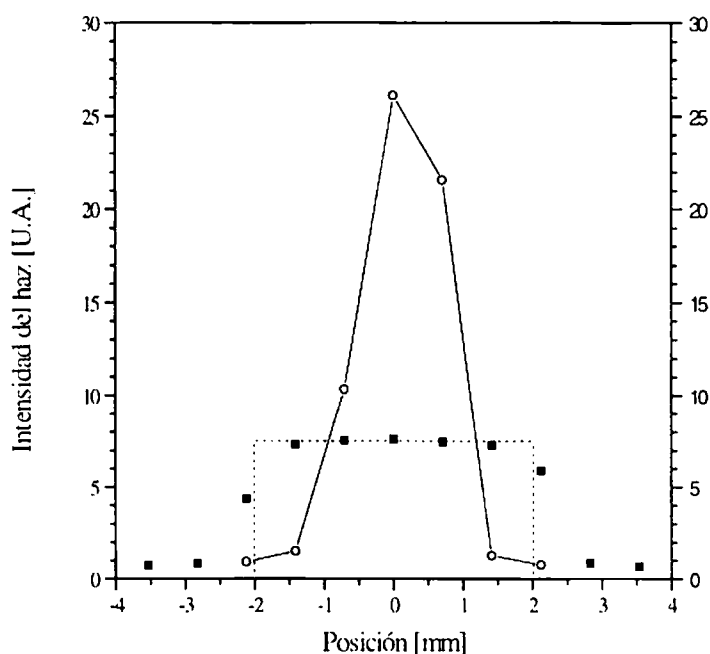


Figura 3.2. Intensidad transversal de un haz de iones de ^{16}O de 50 MeV. Los círculos se refieren al haz focalizado en la posición donde se colocan las muestras y los cuadrados corresponden al mismo haz después de pasar a través de una lámina de oro de $380\text{ }\mu\text{g}/\text{cm}^2$. En éste y en los demás gráficos de este tipo las barras de error para ambas variables son del tamaño de los símbolos. U.A.: unidades arbitrarias.

Un segundo colimador circular de mayor diámetro (7 u 8 mm) se coloca a 17 cm de la muestra, como se puede observar en la figura 3.1, con el fin de disminuir el número de iones dispersados y la radiación secundaria, producida en los bordes del primer colimador, que entran a la cámara de irradiación y pueden llegar al detector. Los colimadores se hicieron de elementos pesados como plomo y plata, ya que por ser la barrera coulombiana suficientemente alta, disminuye la radiación de fondo de origen nuclear. Se usan unos u otros, para evitar posibles interferencias de rayos X característicos provenientes de la muestra y de los colimadores.

En la figura 3.3 se muestra el mismo efecto logrado con una lámina de oro de $400\text{ }\mu\text{g}/\text{cm}^2$.

En la figura 3.4 se muestra el perfil en las direcciones vertical y horizontal, de un haz de iones de ^{16}O de 25 MeV dispersados en una lámina de $230\text{ }\mu\text{g}/\text{cm}^2$.

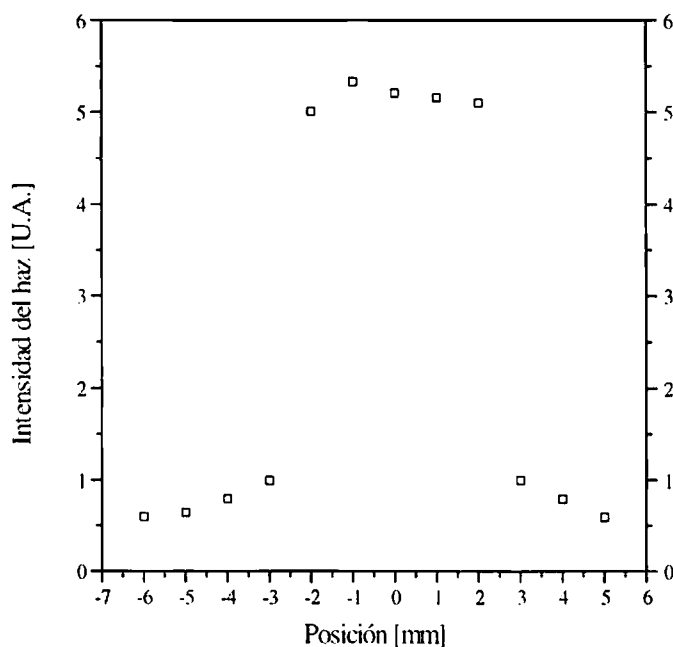


Figura 3.3. Gráfico de la intensidad transversal de un haz de iones de ^{16}O de 50 MeV al atravesar una lámina de oro de $400\text{ }\mu\text{g}/\text{cm}^2$, utilizando un colimador de 4 mm de diámetro. Previamente el haz se focalizó sobre la posición de la muestra y en esa condición se interpuso en su camino la lámina de oro.

La otra forma empleada para uniformar el haz es simplemente desenfoándolo. El perfil de intensidad del haz en este caso se muestra en la figura 3.5. Para esto, se enfoca un haz de determinada corriente sobre la posición de la muestra, y luego se desenfoca aumentando la distancia focal hasta quedarnos con una corriente a través de los colimadores del 10 % del valor inicial. En la práctica éste efecto se logró desenfocando el haz solamente en la dirección transversal x, desde el panel de control de la lente triple cuadrupolar magnética de la línea de irradiación.

La ventaja del segundo método respecto del primero es que experimentalmente no requiere equipamiento sobre la línea de irradiación. Con el primer método, una vez que se cuenta con el equipamiento sobre la línea de irradiación, resulta más fácil interponer en la trayectoria del haz la lámina dispersora que desenfocarlo adecuadamente. Además el segundo método no es repetitivo como el primero.

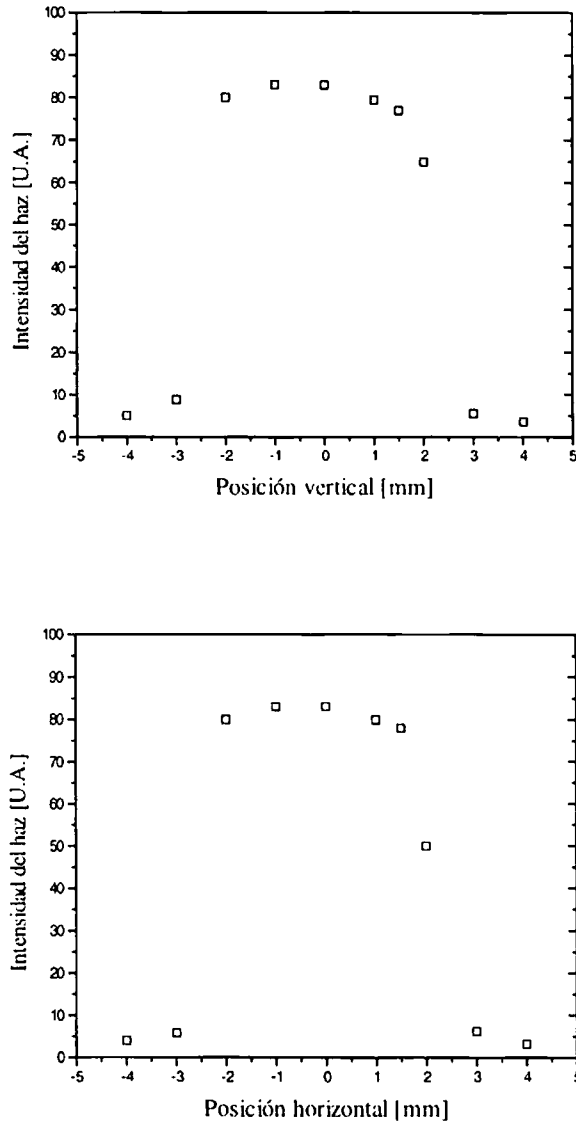


Figura 3.4. Gráficos de la intensidad transversal de un haz de iones de ^{16}O de 25 MeV al atravesar una lámina de oro de $230 \mu\text{g}/\text{cm}^2$. El de arriba corresponde al perfil a lo largo de la línea del diámetro vertical y el de abajo a lo largo del diámetro horizontal. El motivo por el cual los cuadrados en las posiciones vertical +2 y horizontal +2 están por debajo del máximo de intensidad del haz es el mismo que el explicado para aquellos de la figura 3.2.

Otro inconveniente que presenta el desenfocar el haz, es que el ion entra a la muestra con un estado de carga distinto al estado de carga de equilibrio correspondiente a su energía, y mientras lo alcanza se produce una variación de la sección eficaz de ionización (ver figuras 2.2 y 2.3), y en definitiva del rendimiento (ver expresiones (3.4) y (3.5)) de cada elemento, lo

cual introduce un error sistemático en las concentraciones.

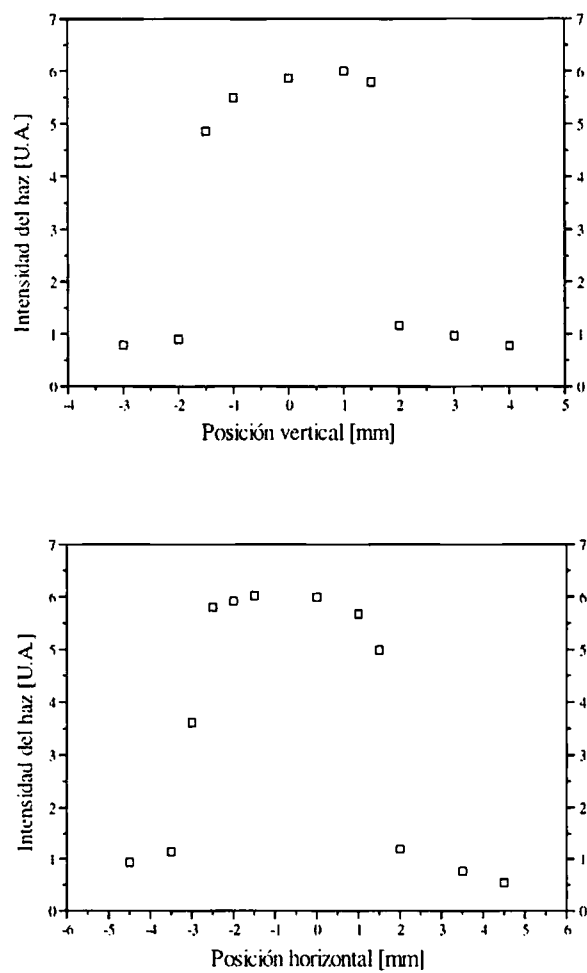


Figura 3.5. Intensidad del haz desfocalizado. El de arriba corresponde al perfil a lo largo de la línea del diámetro vertical y el de abajo a lo largo del diámetro horizontal.

Pero este error, es completamente despreciable. El acelerador suministra el haz de iones de ^{16}O de 50 MeV con máxima transmisión de corriente para el estado de carga +5. El estado de carga de equilibrio de cualquier ion a cualquier energía es prácticamente independiente del número atómico de la lámina sobre la que inciden los iones, y para iones de ^{16}O de 50 MeV es de aproximadamente +7,5.^[3] El estado de carga de equilibrio es alcanzado con láminas de más de 7 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ de espesor (figura 1, referencia [31] del capítulo 2). Estos resultados se han

comprobado midiendo $7,3 \pm 0,2$ para el estado de carga de ^{16}O de 50 MeV sobre una lámina de carbón de $15 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ y otra de cobre de $150 \mu\text{g}/\text{cm}^2$.

Como se muestra en la tabla 3.1, los valores del rendimiento (evaluados con la ecuación 3.7) en función del número atómico, para el caso en el que los iones inciden sobre el patrón con estado de carga +5 ó estado de carga de equilibrio, coinciden dentro de los errores experimentales. Más aún, se observa que para el estado de carga de equilibrio los valores del rendimiento son levemente menores que los del estado de carga +5, mientras que de acuerdo a los gráficos de la figura 2.2, esperaríamos que fuesen mayores. Ésto se explica considerando que los iones alcanzaron su estado de carga de equilibrio, atravesando una lámina de oro de $400 \mu\text{g}/\text{cm}^2$, su energía disminuyó a 49 MeV y también disminuyó la sección eficaz de producción de rayos X, lo cual está en concordancia con los valores de la sección eficaz de producción de rayos X de la referencia [5] del capítulo 1.

Z	k(Z, +5) [U.A.]	k(Z, +7,3) [U.A.]
25	$1,701 \pm 0,085$	$1,602 \pm 0,080$
29	$0,691 \pm 0,035$	$0,654 \pm 0,033$
32	$0,267 \pm 0,013$	$0,264 \pm 0,013$

Tabla 3.1. Rendimientos k(Z) de los rayos X K α para distintos elementos con iones de ^{16}O de 50 MeV para estados de carga +5 y +7,3.

El área del haz es una cantidad que debe ser conocida para calcular la concentración de los elementos en la muestra y se mide de dos maneras distintas.

Una de ellas es colocar una lámina de Nuclepore[®] frente al haz uniforme, la cual toma un color marrón sobre la zona de incidencia del haz después de unos minutos de irradiación con una corriente de 1 nA. Con la utilización de un calibre para la medición del diámetro de la zona coloreada se obtiene un error de 0,25 mm. Con la utilización de una lupa binocular Nikon SMZ-10 y una reglilla graduada se obtiene un error de 0,07 mm.

La otra forma es irradiar una lámina de Makrofol^{®[4]} con una corriente sobre ella de 0,1 nA por no más de 1 seg. Luego la lámina se coloca en una solución PEW (15 g KOH + 40 g C₂H₅OH + 45 g H₂O) a 70 °C durante 1 minuto aproximadamente. Así las trazas de los iones quedan

grabadas en la lámina, pudiéndose observar con un microscopio para medir el diámetro del haz. Utilizando una reglilla graduada y un aumento de 10x el error en la medida del diámetro es de 0,10 mm.

3.3 Instalación de un nuevo detector de rayos X con mayor resolución. Nuevo arreglo experimental de la cámara de irradiación

En la figura 3.6 se muestra esquemáticamente el arreglo experimental actual de la cámara de irradiación. Ambos detectores están ubicados de manera que la normal a la ventana de entrada de radiación de cada detector forma un ángulo de 38° respecto de la dirección del haz. De esta manera se reduce la intensidad de radiación de fondo registrada por los detectores respecto de la posición del detector mostrada en la figura 3.1 (referencia [45] del capítulo 2). Debido a que la sección eficaz de producción de rayos X característicos es isotrópica, lo anterior implica disminuir el límite de detección de los elementos presentes.

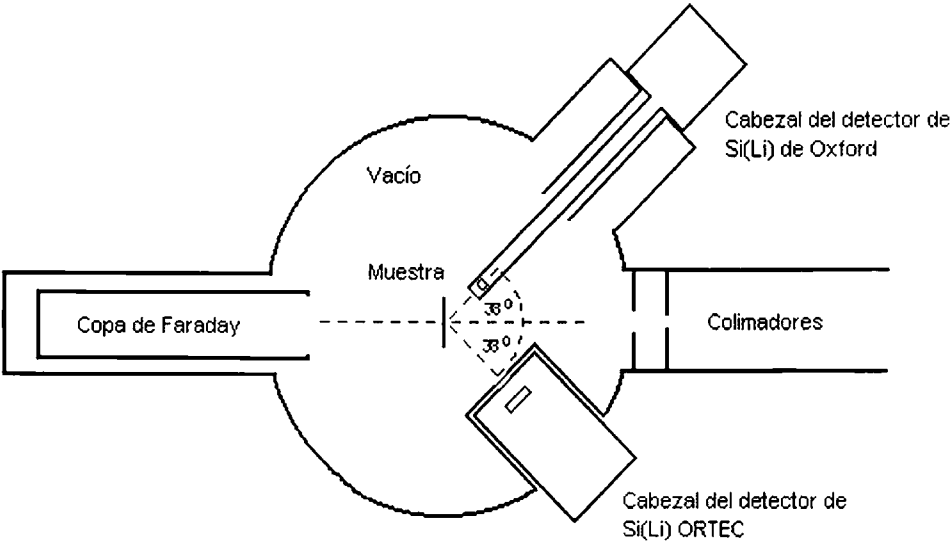


Figura 3.6. Esquema del nuevo arreglo experimental sobre la cámara de irradiación. Aquí la muestra está colocada en forma perpendicular a la dirección del haz. Debido a que los detectores tienen distinta eficiencia en función de la energía de los rayos X, puede resultar conveniente adquirir los espectros con ambos simultáneamente.

Vista desde arriba.

Otra ventaja que tiene esta nueva disposición es que permite colocar las muestras en forma

perpendicular a la dirección del haz, lo cual implica poder colocar mayor cantidad de material bajo la condición de muestra fina.

Además como se observa en la figura 3.6, el detector de Si(Li) Oxford de alta resolución y ventana ultrafina está en vacío dentro de la cámara de irradiación, y se puede acercar a la muestra lo necesario para aumentar el ángulo sólido y el número de rayos X detectados. Debido a estas características del detector es posible observar hasta los rayos X K del boro (0,183 keV) y disminuir los límites de detección de los elementos que pueden ser detectados con el detector de Si(Li) ORTEC.

Todas estas ventajas comentadas hasta aquí producen una disminución en los tiempos de irradiación.

Para evitar que lleguen a los detectores rayos X característicos que no provienen de la muestra y disminuir la radiación de fondo, al igual que en el arreglo experimental anterior se recubre la cámara con las mismas láminas, de aluminio y lucite; y en el caso del detector ORTEC se coloca también un colimador de plomo en frente de su ventana. Los espectros obtenidos con ambos detectores en estas condiciones, pero sin interponer la muestra frente al haz, muestran únicamente en el caso del detector Oxford una cantidad totalmente despreciable de rayos X K del carbono de 0,277 keV (alrededor de 30 rayos X K del C para valores de corriente y tiempo de irradiación comparables a los de las muestras).

3.4 Métodos de preparación de muestras orgánicas

Las muestras destinadas para el análisis PIXE se presentan en diversas formas. Soluciones acuosas, líquidos no acuosos, sólidas, pastosas, carbonatadas, orgánicas, inorgánicas, silicatadas, homogéneas, inhomogéneas, voluminosas y diminutas son términos que describen algunas muestras. Cada tipo de muestra requiere un método diferente de preparación para poder ser irradiada.

Como se mencionó en la última sección del capítulo anterior, es conveniente preparar muestras finas. Una muestra es considerada fina para un determinado elemento, cuando es válido considerar la ecuación (3.5) en lugar de la ecuación (3.4). Como se explica en la sección 3.5, esto significa que el ion pierde una cantidad de energía despreciable después de atravesar la muestra, y la sección eficaz de producción de rayos X característicos de los elementos de interés varía en una cantidad relativamente pequeña (menos del 5 %). Además, los rayos X característicos de los mismos elementos generados en cualquier lugar de la

muestra, se atenúen en la propia muestra en su camino hacia el detector en una cantidad pequeña (no más del 5 %). Estas condiciones permiten desprestigiar los efectos de matriz de la muestra, y entonces resulta válida la expresión (3.5).

En el caso de muestras orgánicas y durante la preparación de las mismas es ventajoso reducir la masa de la matriz, eliminando los elementos mayoritarios del tejido biológico, debido a que así se disminuirá la radiación de fondo y, por lo tanto, el límite de detección.

Distintos métodos de preparación de muestras y reducción de la matriz han sido implementados. Algunos de ellos son: realización de pastillas a partir de material orgánico disecado, llevar a polvo las muestras biológicas disecadas en frío por medio de la técnica de fractura por fragilización (en inglés: brittle-fracture technique), llevar a cenizas con altas o bajas temperaturas, y digestión húmeda en recipientes de Teflon® abiertos o cerrados. Estos métodos mencionados pueden consultarse en las referencias [5-12]. El método de preparación de muestras basado en la digestión con ácidos es generalmente más rápido e involucra una menor manipulación de la muestra, y es en consecuencia más conveniente.

La ebullición y digestión de la muestra solamente en ácido nítrico deja a menudo material orgánico o carbonoso sin digerir y sin disolver. Por esta razón han sido desarrollados nuevos métodos^[13,14] que requieren mezclas de ácido nítrico y agua oxigenada, con ácido sulfúrico y ácido perclórico. Sin embargo, se observó que los dos últimos ácidos mencionados no pueden ser usados en la preparación de muestras debido a que las soluciones que se forman no se secan, y además el ácido perclórico sobre láminas orgánicas resulta explosivo cuando es irradiado con iones.^[13]

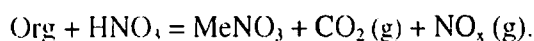
En las referencias [13] y [15] se describe el método de oxidación húmeda utilizando sólo ácido nítrico, desarrollado por Schachter y Boyer. Aquí, en el Laboratorio TANDAR, se comenzó trabajando con muestras de tejido biológico empleando una variante más simplificada, la cual se describe en la siguiente sección.

El avance tecnológico nos permite hoy en día, utilizar digestores de microondas especialmente diseñados para digerir distintos tipos de muestras, utilizando diferentes ácidos a temperatura y presión altas. En la sección 3.4.2 se hace referencia a este método de preparación de muestras más detalladamente, y es el que actualmente se emplea en el Laboratorio TANDAR para la preparación de muestras biológicas.

3.4.1 Método de digestión con ácido nítrico a presión atmosférica

El método de digestión por medio de ácido nítrico ha sido utilizado para preparar muestras para análisis multielemental empleando la técnica PIXE. Consiste en ciclos de calentamiento de la muestra disuelta en ácido nítrico de alta pureza hasta obtener una solución clara. El ácido nítrico utilizado es el denominado INSTRA-ANALYZED For Trace Metal Analysis de la empresa J. T. Baker.

La digestión consiste básicamente en la reacción química entre la materia orgánica (Org) y el ácido nítrico (HNO_3), que produce nitratos (MeNO_3) con los metales (Me) presentes en la muestra que quedan disueltos en la solución, y gases (g) como el dióxido de carbono (CO_2) y óxidos de nitrógeno (NO_x); obteniéndose así la reducción de la matriz. Simbólicamente:



El recipiente en el cual se realiza la digestión es un matraz de 25 ml de borosilicato que se coloca sobre una plancha a una temperatura entre 120 °C y 200 °C. Debido a su forma, estos recipientes permiten la condensación y el reflujo de los vapores a la solución.

La porción de tejido biológico a ser analizado, típicamente entre 50 y 200 mg, se disuelve en 5 ml de ácido nítrico, luego esta solución se coloca dentro del matraz y se pone sobre una plancha metálica a una temperatura que esté unos grados por debajo de la temperatura de ebullición de la solución. A medida que se va produciendo la reacción química el ácido se evapora, y si la solución no está lo suficientemente clara cuando se reduce a aproximadamente 500 μl se agrega nuevamente ácido en el matraz. Cuando finalmente se obtiene una solución clara, se reduce a un volumen aproximado de 100 μl y se lleva al volumen deseado utilizando agua de alta pureza denominada ULTREX II de la empresa J. T. Baker. El volumen final al que se lleva la solución depende de la masa por unidad de área que queda depositada sobre el soporte de la muestra por unidad de volumen de la solución, después de ser secada con una lámpara infrarroja o en vacío. La solución debe estar lo suficientemente diluida, de manera que, colocando algunas gotas de la solución sobre el soporte de la muestra con una micropipeta de 5 μl , la muestra a irradiar se pueda considerar fina. La masa que finalmente queda depositada sobre la lámina de carbón, después de ser secada la solución, y el área sobre la que está extendida determinan el espesor promedio de la muestra.

El soporte de la muestra es una lámina de carbón de alta pureza (99,997 %) de aproximadamente 70 nm de espesor ($\sim 15 \mu\text{g}/\text{cm}^2$) montada sobre un marco de lucite. El tipo de carbón utilizado es el denominado C 007940 de la empresa Goodfellow.

Algunos elementos volátiles como el mercurio y el arsénico deben convertirse en compuestos químicos más estables antes de secar la solución, agregando en la microgota depositada sobre el soporte de la muestra, otra de algún agente químico acomplejante.^[16] En muchos casos se suele utilizar 1-pirrolidinditiocarbamato de amonio (APDC).

Otro tipo de soportes utilizados son los de la empresa Moxtek. Un polímero $(C_{22}H_{10}N_2O_5)_n$ ultrafino de aproximadamente 150 nm de espesor ($\sim 20 \mu\text{g}/\text{cm}^2$) montado sobre una arandela plástica de 18 mm de diámetro externo, 9 mm de diámetro interno y 0,4 mm de espesor. Si bien estos soportes son un poco más gruesos que los de carbón, lo que implica una mayor producción de radiación de fondo, los espectros de rayos X muestran un número de elementos detectados y cantidad de cada uno de ellos menor que en los soportes de carbón. De todos modos, estas cantidades son mucho menores a las que habitualmente se encuentran en las muestras biológicas que sobre ellos se depositan.

El espesor de la muestra sobre el soporte no resulta ser uniforme. Si irradiáramos la muestra con un haz que no tiene una corriente por unidad de área uniforme, podemos cometer errores muy groseros en el cálculo de las concentraciones de los distintos elementos presentes en la muestra. Esto se puede ver fácilmente, suponiendo que se irradia una muestra con un haz enfocado con un perfil como el graficado por los círculos en la figura 3.2. Si por ejemplo, los elementos en la muestra estuvieran distribuidos sobre el soporte en forma de arandela y el máximo de intensidad del haz incidiera en su parte central, las concentraciones medidas resultarían muy inferiores comparadas con aquellas obtenidas en el caso en el que la distribución de elementos fuera la inversa (los elementos distribuidos en el círculo antes vacío); y en realidad ninguna de estas concentraciones medidas será la correcta. Por este motivo, es necesario irradiar este tipo de muestras con haces de intensidad por unidad de área uniforme.

Con este método de preparación de muestras se obtiene una buena reducción de la matriz, eliminándola entre el 80 y 95 %, que es equivalente a decir que la muestra se reduce en un factor f entre 5 y 20, respectivamente. Sin embargo por el tipo de recipiente utilizado para hacer la digestión y por la forma en que ésta se realiza, el método presenta varias desventajas, como lo son: el prolongado tiempo de digestión de cada muestra, el cual fluctúa según la muestra entre 3 y 9 días, por lo cual se aumentan los riesgos de contaminación y pérdida de elementos de la muestra; y la gran cantidad de ácido que se utiliza debido a la evaporación del mismo, que varía entre 50 y 200 ml.

3.4.2 Método de digestión con digestor de microondas

Considerables esfuerzos se realizan continuamente para optimizar cada una de las etapas de la técnica PIXE, para realizar los análisis en tiempos cada vez menores. Desde los comienzos de esta técnica se le prestó particular atención a la preparación de las muestras y se han evaluado las ventajas y desventajas de cada método.^[8-13,15,17]

La preparación de la muestra para su análisis multielemental es un paso crítico y el lapso de tiempo que esta etapa insume es el más prolongado. Es una necesidad de ésta y de todas las técnicas de análisis multielemental, poder preparar un gran número de muestras en tiempos cada vez más cortos y con menores riesgos de contaminación o pérdida de elementos.

La mejor alternativa con que se cuenta en el presente, es la utilización de un sistema de digestión que suministra calor a la muestra a través de energía electromagnética en el rango de las microondas.^[18] La muestra se coloca en un recipiente cerrado de Teflon® PFA que soporta temperaturas elevadas de hasta 250 °C y presión hasta 25 bar. La velocidad de la reacción y la eficiencia de la descomposición ácida se incrementa drásticamente con la temperatura y la digestión de cada muestra se realiza en un tiempo de 30 minutos. La descomposición de la materia orgánica realizada a temperatura y presión altas, requiere considerablemente menos tiempo que si se realiza a una temperatura limitada por el punto de ebullición de la solución ácida a presión atmosférica; y la eliminación de la masa de la matriz alcanza mejores valores variando entre el 85 % y 97 % según el tipo de tejido, lo que equivale a decir que el factor *f* varía entre 7 y 33, respectivamente. Además, otras sustancias distintas a la orgánica no se descomponen con ciertos ácidos a sus temperaturas de ebullición a presión atmosférica, pero reaccionan con los mismos ácidos a temperatura y presión elevadas.^[19]

Realizar la digestión en recipientes cerrados de Teflon® PFA disminuye los riesgos de contaminación y pérdida de elementos de la muestra durante la digestión.^[20] Por un lado, la cantidad de ácido necesaria es mucho menor que en el método anterior y varía entre 2,5 y 3 ml. Por otro lado, la muestra queda aislada de la atmósfera y la superficie interna de estos recipientes es extremadamente suave, sin poros, hidrofílica, antiadhesiva y puede ser limpiada fácilmente de acuerdo al procedimiento de lavado que se detalla en la siguiente sección.

En este trabajo se ha implementado el sistema de digestión con microondas, utilizando un equipo de la empresa MILESTONE® modelo MLS-I200 MEGA. Este equipo tiene una central de control electrónica que regula la potencia suministrada a la muestra en función del tiempo.

En el manual de operación del mismo, se encuentran los programas adecuados para los diferentes tipos de muestras.

3.4.3 Procedimiento para el lavado del instrumental

Todos los elementos del laboratorio (como los tubos con tapas de 4 ml, pinzas, recipientes para la digestión de las muestras del digestor, etc.) que se utilizan en la preparación de las muestras se lavan antes y después de ser utilizados.

Las pinzas que se utilizan en la toma de muestras de tejido biológico, se limpian sumergiéndolas completamente en un baño de solución de Extran al 2 % a temperatura ambiente, o de 50 °C para acelerar el proceso de limpieza, durante 2 a 24 horas. Después de un uso prolongado del baño, debido a la suciedad eliminada del material, su poder de limpieza va disminuyendo. Entonces, se recomienda primero realizar un baño de 2 horas como mínimo, después del cual se cepilla suavemente el material y se enjuaga con agua corriente.

Después del segundo baño se realizan varios enjuagues del material, los primeros pueden hacerse con agua corriente y los últimos con agua desionizada o bidestilada. Finalmente se seca el material al aire y/o en una estufa de desecación.

En el primer baño puede utilizarse agua corriente para la preparación de la solución Extran, pero en el segundo baño conviene utilizar agua desionizada porque aumenta la acción del detergente.

Los recipientes en los que se realiza la digestión de la muestra y aquellos en los que se almacena la solución final, se lavan con solución de Extran al 2 %, luego se enjuagan varias veces con agua corriente y por último con agua bidestilada o desionizada. Finalmente se secan al aire.

3.5 Cálculo de concentraciones

Utilizando la técnica PIXE, la base para un análisis cuantitativo es la relación que existe entre el número de rayos X característicos K o L de un elemento que aparecen en el espectro $N_x(Z)$, y la concentración C_z del elemento en la muestra. Usando cualquier tipo de ion como proyectil, esta relación está dada por:

$$N_x(Z) = \frac{N_{Av} \omega_z b_z^a \epsilon_z N_p C_z}{PM_z} I(Z, M) \quad (3.3)$$

siendo N_{av} el número de Avogadro, PM_Z la masa molar del elemento, ω_Z el rendimiento de fluorescencia K o L, b_Z^α la fracción de los rayos X K o L que aparecen en la línea $K\alpha$ o $L\alpha$, ϵ_Z la eficiencia absoluta de detección de rayos X en la energía en cuestión y N_p el número de proyectiles incidentes sobre la muestra. $I(Z,M)$ es una integral que toma en cuenta los efectos producidos por la matriz M de la muestra, es decir, el cambio en la sección eficaz de ionización del elemento Z debido a la pérdida de energía del proyectil cuando penetra en la muestra, y la atenuación de los rayos X característicos en la muestra. En el caso general, $I(Z,M)$ está dado por:

$$I(Z,M) = \int_{E_0}^{E_1} \frac{\sigma_Z(E) T_Z(E)}{S(E)} dE \quad (3.4)$$

donde E_0 y E_1 son respectivamente la energía del proyectil antes y después de pasar por la muestra ($E_1 = 0$ para una muestra de espesor infinito), $\sigma_Z(E)$ es la sección eficaz de ionización del proyectil con energía E, $T_Z(E)$ la transmisión de los rayos X característicos en la muestra emitidos en la dirección del detector desde la posición del proyectil en la que tiene la energía E, y $S(E)$ el poder de frenado de la matriz sobre el proyectil.

Para una muestra fina, los efectos de matriz pueden ser despreciados. Cuando el ion no pierde energía al atravesar la muestra y no hay absorción en la muestra de la rayos X característicos, la ecuación 3.4 puede escribirse como:

$$I_0 = \frac{\sigma_Z(E_0) \rho t}{\sin(\theta)} \quad (3.5)$$

siendo ρ la densidad volumétrica de masa de la muestra, t el espesor de la muestra y θ el ángulo formado por la dirección del haz y la superficie de la muestra, que resulta ser igual al mostrado en la figura 3.1.

Para obtener la concentración de un elemento a partir del número de rayos X detectados al irradiar la muestra pueden ser empleados dos métodos. Uno de ellos es conocido como: método absoluto o de parámetros fundamentales y el otro como método relativo, y ambos se basan en la expresión (3.3) para calcular C_Z .

El primero utiliza los valores de ω_Z , b_Z^α , $\sigma_Z(E)$, $T_Z(E)$ y $S(E)$ ^[2] calculados a través de modelos que reproducen lo mejor posible el conjunto de datos experimentales. ϵ_Z puede ser medido o

calculado^[21-23] y depende del arreglo experimental en la cámara de irradiación. Por supuesto, es necesario conocer con poco error cada una de estas cantidades físicas que intervienen para calcular C_Z . Este método ha sido desarrollado e implementado en varios laboratorios del mundo a través del programa PIXAN,^[24,25] para haces de protones, resultando más práctico que el método relativo. Hoy en día, cuando se utilizan haces de iones pesados es conveniente utilizar el método relativo, debido a que existe demasiada incerteza en las cantidades que se utilizan en el método absoluto, sobre todo en ω_Z y $\sigma_Z(E)$.

En el método relativo se utilizan patrones finos certificados. En nuestro laboratorio éstos son provistos por la empresa Micromatter Co. con un error porcentual en el espesor (expresado en masa por unidad de superficie) del 5 %. Estos se utilizan cada vez que se cambia la disposición del arreglo experimental en la cámara de irradiación, el proyectil o su energía, para evaluar el rendimiento $k(Z)$ de rayos X característicos de un elemento Z para muestras finas, que combina varias cantidades físicas de las expresiones (3.3) y (3.5) de la siguiente forma:

$$k(Z) = \frac{N_{Av} \sigma_Z(E_0) \omega_Z b_Z^\alpha \varepsilon_Z}{A_Z \sin(\theta)} \quad (3.6)$$

Por otro lado, de las mismas ecuaciones se tiene:

$$k(Z) = \frac{N_X(Z)}{N_p \rho t C_Z} \quad (3.7)$$

Con esta última ecuación se calcula $k(Z)$, utilizando los distintos patrones de los elementos cuyas concentraciones en la muestra se desean conocer. Obteniendo la suficiente estadística para el número de rayos X característicos en el espectro al irradiar los patrones, el error de $k(Z)$ es sólo el 5 % proveniente de la incerteza en el espesor de los mismos.

Luego al irradiar las muestras, cubriéndolas totalmente con un haz de intensidad por unidad de área uniforme, se determina la densidad superficial de cada elemento ρt_Z con la misma ecuación (3.7), de la siguiente manera:

$$\rho t_Z = \frac{N_X(Z)}{N_p k(Z)} \quad (3.8)$$

donde ahora $N_x(Z)$ es el número de rayos X característicos del elemento Z detectados al irradiar la muestra, y N_p es el número total de partículas o iones que pasan a través del colimador y que se miden en la copa de Faraday (ver figuras 3.1 y 3.6).

De acuerdo a la ecuación (3.2); en el caso de muestras finas de espesor no uniforme, que se irradian con haces de intensidad por unidad de área uniforme y área transversal A_h en la posición de la muestra, la masa m_z del elemento Z presente en la misma es el producto de pt_z y A_h .

La masa total M_z del elemento en la solución final resultante del método de preparación de muestras, o lo que es lo mismo la masa del elemento en el trozo de tejido biológico analizado es $m_z V/v$, siendo V el volumen de la solución final y v el volumen de la solución final depositado sobre el soporte de la muestra para ser irradiada. Finalmente, la concentración del elemento Z es:

$$C_z = \frac{M_z}{M} = \frac{N_x(Z) A_h V}{N_p k(Z) v M} \quad (3.9)$$

donde M es la masa del trozo de tejido biológico analizado.

Como la copa de Faraday da el valor de la corriente del haz integrada en el tiempo, es necesario conocer el estado de carga de equilibrio de los iones al atravesar las muestras y los patrones, para obtener el número de iones incidentes. Como ya ha sido mencionado; una vez que el proyectil entra en la muestra alcanza un estado de carga de equilibrio (que depende de la energía del proyectil en la muestra) en un espesor algo mayor a $7 \mu\text{g}/\text{cm}^2$. El espesor aproximado de los patrones es de $50 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ soportado por una lámina de Mylar® de $1,5 \mu\text{m}$ ($\sim 200 \mu\text{g}/\text{cm}^2$), y el de las muestras está generalmente comprendido entre $200 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ y $500 \mu\text{g}/\text{cm}^2$. Debido a que el estado de carga de equilibrio varía muy suavemente con la energía de los iones, éstos salen prácticamente con el mismo estado de carga de equilibrio después de atravesar los patrones o las muestras, y considerar la carga medida por la copa de Faraday en lugar de N_p en el cálculo de $k(Z)$ (ecuación 3.7) y pt_z (ecuación 3.8) no introduce un error significativo.

El rendimiento de producción de rayos X de muestras finas puede ser utilizado en el análisis de muestras finas, intermedias y gruesas, pero para las dos últimas deben realizarse correcciones por efecto de matriz. El factor de corrección $F(Z)$ por efecto de matriz es:

$$F(Z) = \frac{I_0(Z, M)}{I(Z, M)} \quad (3.10)$$

donde $I_0(Z, M)$ es calculado a través de la ecuación (3.5), utilizando el espesor t de la muestra. Así definido, $F(Z)$ representa el factor por el cual el número de rayos X detectados para una muestra debe ser multiplicado para obtener el número de rayos X que hubieran sido observados en ausencia del efecto de matriz, para luego calcular C_z con la expresión (3.9) utilizando el rendimiento de rayos X característicos de muestras finas.

La evaluación de $F(Z)$ no requiere conocer el valor absoluto de la sección eficaz de producción de rayos X en función de la energía del proyectil, sino sólo su dependencia relativa respecto de la sección eficaz de producción de rayos X para la energía del ion antes de entrar en la muestra.

La incerteza en la composición de la matriz, el espesor de la muestra, y en los datos tabulados que se utilizan, se propagan al valor de $F(Z)$ y a la concentración del correspondiente elemento.

En el análisis de muestras gruesas, a menudo se usa el rendimiento de los rayos X característicos de los elementos en muestras gruesas, que se obtienen utilizando patrones con matriz igual o parecida al de las muestras que se analizan.^[26]

3.6 “Performance” del método PIXE

Una vez optimizado el arreglo experimental en la cámara de irradiación y el método de preparación de muestras, es importante demostrar que se pueden obtener resultados precisos y exactos. Las distintas fuentes de errores en el procedimiento completo del análisis PIXE pueden ser evaluadas. Para ésto, pueden realizarse soluciones acuosas conocidas de distintos elementos, dopar muestras biológicas con dichas soluciones y analizar material de referencia certificado con el fin de comprobar sus concentraciones.

3.6.1 Análisis de soluciones acuosas

Debido a que los problemas en muestras biológicas, que se exponen en el próximo capítulo, involucran principalmente la medición de concentraciones de aluminio en tejido cerebral humano y zinc en distintos órganos de sapos, se decidió verificar las concentraciones en soluciones acuosas de estos elementos.

Para el zinc, se preparó una solución de 2000 mg/l disolviendo ZnO en agua desionizada. Se realizaron tres muestras diferentes tomando para cada una 5 µl de la solución, depositándolos sobre láminas de carbono.

Las muestras se irradiaron con iones de ^{16}O a 50 MeV. Una lámina de oro de 400 µg/cm² se utilizó para homogeneizar el haz como se describe en la sección 3.2, y los espectros se midieron con el detector de Si(Li) de ORTEC en la posición mostrada en la figura 3.6.

El rendimiento de los rayos X característicos del Zn, se obtuvo interpolando linealmente entre los valores medidos para los patrones de Cu y Ge.

Para determinar el área del haz se colocó una lámina de Nuclepore[®] frente al haz uniforme para medir su diámetro, como se describe en la sección 3.2, el cual se estimó en (4,30±0,25) mm.

Las concentraciones de Zn medidas para la solución de 2000 ppm en las distintas muestras son los valores indicados en la tabla 3.2, siendo el promedio 1951 ppm. En este caso el error en las concentraciones está determinado por el error del área del haz (10 %) y del rendimiento de los rayos X característicos del Zn (5 %). Los errores de las demás cantidades que intervienen en el cálculo de las concentraciones son mucho menores.

Muestra	Concentración de Zn [ppm]
1	1808±226 [1856]
2	1994±249 [2047]
3	2051±256 [2105]

Tabla 3.2. Concentraciones medidas para una solución acuosa de Zn de 2000 ppm.

Si consideramos el diámetro del haz igual a 4,33 mm, cada uno de los valores de la tabla 3.2 cambia al indicado entre corchetes y el promedio de ellos resulta ser 2000 ppm.

En las mismas condiciones experimentales, pero utilizando el detector Oxford y los soportes para muestras de la empresa Moxtek, se midieron las concentraciones de 4 soluciones de aluminio. De cada una de estas soluciones se depositaron 5 µl sobre los soportes. En la tabla 3.3 se muestran las concentraciones de las soluciones preparadas (C_p), las masas medidas de aluminio sobre cada soporte (M_{Al}) y las correspondientes concentraciones medidas de aluminio (C_m).

C_p [ppb]	M_{Al} (ng)	C_m [ppb]
125	0,602	120 ± 33
250	1,12	224 ± 41
375	1,88	377 ± 61
500	2,57	513 ± 70

Tabla 3.3. Análisis de soluciones de aluminio.

Como se observa de la tabla 3.3, los valores C_m concuerdan muy bien con los valores C_p .

Solución de $Cr_2K_2O_7$		
Elemento	Cantidad	Valores medidos
Cr	100 ng	(106 ± 10) ng
K	75 ng	(79 ± 7) ng

Tabla 3.4. Análisis de una solución de $Cr_2K_2O_7$.

Se analizó también una solución de dicromato de potasio ($K_2Cr_2O_7$) que contenía 20 ppm de Cr. Se colocaron 5 μ l de la solución sobre una lámina de carbono y se irradiaron con iones de ^{16}O a 30 MeV, utilizando el detector Oxford para obtener los espectros de rayos X. De acuerdo a la preparación de la muestra irradiada, en ésta había 100 ng de Cr y 75 ng de K. Los valores medidos se presentan en la tabla 3.4.

3.6.2 Análisis de muestras biológicas dopadas con soluciones acuosas

Para verificar una determinada cantidad de Zn al irradiar una muestra biológica, se dopó una muestra de hígado de una hembra de sapo que no tenía Zn por encima del límite de detección. De la solución resultante de la muestra de hígado, producto de la digestión de la misma, se colocaron 5 μ l sobre el soporte de la muestra, y posteriormente otros 5 μ l de la solución acuosa de Zn.

Varias muestras se realizaron dopando con soluciones de Zn de 2000 ppm y 20 ppm. Éstas fueron irradiadas en las mismas condiciones que las soluciones acuosas de Zn mencionadas en la sección anterior.

La masa de Zn colocada en las muestras a irradiar dopadas con la solución de 2000 ppm y 20 ppm fue de 10 µg y 100 ng, respectivamente. Estas masas representan concentraciones respecto a la masa de tejido biológico irradiado de 2,72 % y 272 ppm, respectivamente.

Los valores obtenidos se muestran en la tabla 3.4.

Muestra	Masa de Zn	Concentración de Zn
1 ^[a]	(9,3±0,6) µg	(2,5±0,2) %
2 ^[a]	(10,4±0,7) µg	(2,8±0,2) %
3 ^[b]	(75±5) ng	(204±14) ppm
4 ^[b]	(109±7) ng	(296±20) ppm

Tabla 3.4. Concentraciones de Zn en una muestra biológica dopada con una cantidad conocida

[a] Muestra dopada con solución de 2000 ppm. Masa promedio: 9,85 µg. Concentración promedio: 2,65 %.

[b] Muestra dopada con solución de 20 ppm. Masa promedio: 92 ng. Concentración promedio: 250 %.

En estas muestras, el promedio concuerda mejor para aquellas dopadas con la solución de 2000 ppm.

Puede notarse de los resultados correspondientes a mediciones de Zn en muestras preparadas con las mismas concentraciones, en esta sección y en la anterior, que generalmente la mayor concentración medida es la que más se acerca al valor a medir. Ésto puede explicarse por el hecho que las muestras estaban bastante extendidas y en algunos casos no fue cubierta completamente por el área del haz. En estos casos conviene utilizar colimadores más grandes. Los resultados correspondientes a muestras de cerebro dopadas con concentraciones conocidas de Al, se presentan en la sección 4.3 del capítulo 4.

Así mismo, se dopó una muestra biológica con la solución de $\text{Cr}_2\text{K}_2\text{O}_7$, y se irradió en las mismas condiciones que la solución (ver sección anterior). En este caso sólo se cuantificó el Cr, cuyo resultado se muestra en la tabla 3.5. El K no se cuantificó porque la muestra dopada contenía este elemento en una cantidad mucho mayor.

Muestra biológica dopada con solución de $\text{Cr}_2\text{K}_2\text{O}_7$		
Elemento	Cantidad a medir	Valor medido
Cr	100 ng	(113±11) ng

Tabla 3.5. Análisis del Cr en muestra biológica dopada. La muestra irradiada contenía 100 ng de Cr.

3.6.3 Análisis de materiales de referencia de la IAEA

Se analizaron materiales de referencia certificados entregados por el Servicio de Control de Calidad Analítica de la IAEA (International Atomic Energy Agency), a aquellos laboratorios que emplean técnicas analíticas nucleares de elementos mayoritarios, minoritarios y trazas, para verificar la calidad de sus trabajos.

Los materiales de referencia utilizados fueron sangre animal, celulosa de algodón y leche en polvo cuyos números de catálogo son A-13, V-9 y A-11 respectivamente. Las concentraciones de los elementos especificadas por la IAEA y medidas por la técnica PIXE, por encima del límite de detección, se muestran en la tabla 3.6, 3.7 y 3.8. En estas tablas las concentraciones certificadas por la IAEA para cada elemento, son la mediana de los valores promedios notificados por cada uno de los laboratorios de intercomparación que actuaron. Los límites de confianza indicados entre corchetes están dados para un nivel de significación $\alpha=0.05$.

Para cada uno de los materiales de referencia utilizados se tomaron 2 ó 3 porciones de 50 mg para ser digeridas en el digestor de microondas por separado, y de cada una de estas soluciones se preparó una muestra para ser irradiada.

Z	Elemento	Concentraciones especificadas [ppm]	Concentraciones medidas [ppm]			Promedio [ppm]
			muestra 1	muestra 2	muestra 3	
26	Fe	2400 [2200-2500]	2390±160	2450±160	2550±170	2465
30	Zn	13 [12-14]	13,1±3,3	14,0±3,5	13,5±3,4	13,5

Tabla 3.6. Concentraciones especificadas en el material de referencia sangre animal. Se midió con el detector ORTEC y se cuantificaron aquellos elementos con $Z>20$. De los 6 elementos con concentraciones certificadas con $Z>20$, el Fe y Zn estaban por encima del límite de detección. Las concentraciones medidas concuerdan muy bien con los valores especificados. La carga integrada para las muestra 1; 2 y 3 de la tabla 3.6 son:

12,5 μC ; 8,9 μC y 10,9 μC respectivamente.

Para el análisis de todos los espectros de rayos X de este trabajo se utilizó el programa QXAS (Quantitative X-ray Analysis System) suministrado por la IAEA. Este programa le ajusta a cada fotopico una función gaussiana y el área debajo de esta curva sobre el fondo de radiación, representa el número de rayos X detectados correspondientes a una o varias transiciones.

Z	Elemento	Concentraciones especificadas [ppm]	Concentraciones medidas [ppm]		Promedio [ppm]
			muestra 1	muestra 2	
11	Na	56 [49-64]	20±4	21±4	20,5
12	Mg	53 [46-67]	22±4	23±4	22,5
13	Al	44 [13-53]	28±4	27±4	27,5
16	S	54 [50-57]	51±6	52±4	51,5
17	Cl	600 [490-640]	21±3	22±3	21,5
20	Ca	240[220-260]	155±21	153±12	154
26	Fe	11 [7-15]	9,2±1,4	9,6±0,9	9,4
29	Cu	0,59 [0,47-0,94]	0,58±0,09	0,59±0,08	0,585

Tabla 3.7. Concentraciones especificadas en el material de referencia celulosa de algodón. Se midió con el detector Oxford. De los 28 elementos especificados (certificados y no certificados), 8 están por encima del límite de detección, de los cuales 5 se pudieron cuantificar bajo la hipótesis de muestra fina (aquellos con Z>13). Las concentraciones de 3 de ellos (S, Fe y Cu) concuerdan muy bien con los valores especificados.

Sin embargo, en el caso en que los fotopicos no tienen su forma gaussiana bien definida, debido a que la concentración del elemento correspondiente es un poco mayor que su límite de detección, es conveniente contar directamente el número de rayos X detectados correspondientes al fotopico sobre el fondo de radiación. Para esto se utiliza el propio código de adquisición de espectros MAESTRO. Este fue el caso, por ejemplo, en la determinación de la concentración de Zn de la tabla 3.6, que como se puede ver de la figura 3.7 su límite de detección en muestras biológicas es de aproximadamente 4 ppm.

En la determinación del error de cada concentración se consideran principalmente el error del rendimiento de rayos X, el del área del haz y el del número de rayos X detectados en el correspondiente fotopico. Cuando la concentración de un elemento está cerca del límite de detección del mismo, su error relativo es mayor porque aumenta el error en la determinación

del número de rayos X característicos detectados debido a las fluctuaciones estadísticas en la detección de los mismos. Ésto se puede observar comparando los valores de concentración del Fe y el Zn en la tabla 3.6. El error porcentual para cada medición de Zn es del 25 %, mientras que el error porcentual de Fe es del 7 %. En ambos casos las concentraciones medidas concuerdan muy bien con los valores especificados.

Z	Elemento	Concentraciones especificadas [ppm]	Concentraciones medidas [ppm]		Promedio [ppm]
			muestra 1	muestra 2	
15	P	9100 [8080-10100]	9017±750	7690±900	8353
17	Cl	9080 [7340-10820]	421±33	307±40	365
19	K	17200 [16200-18200]	14430±1200	15900±2000	15165
20	Ca	12900 [12100-13700]	14000±1200	13300±1500	13650
26	Fe	3,65 [2,89-4,41]	4,4±1,0	7,5±1,2	5,95
30	Zn	38,9 [36,6-41,2]	39±4	34±5	36,5

Tabla 3.8. Concentraciones especificadas en el material de referencia leche en polvo. Se midió con el detector Oxford. De los 20 elementos especificados (valores recomendados), 7 están por encima del límite de detección, de los cuales 6 se pudieron cuantificar bajo la hipótesis de muestra fina (aquellos con Z>13). Las concentraciones de 3 de ellos (P, Ca y Zn) concuerdan muy bien con los valores especificados.

En la muestra 2 de la tabla 3.8, vemos que el valor del Fe supera en un factor 2 al especificado. Esto se debe a que el Fe es uno de los elementos más abundantes en el polvo atmosférico, y si no existe un sistema de control de aire en todas las etapas de preparación de las muestras, es posible que se produzca una contaminación externa. En estos casos se puede estimar el nivel de contaminación previamente, y hacer la resta correspondiente para conocer la concentración propia del elemento en la muestra aunque con una incerteza algo mayor. En la muestra A-13, si bien el Br se encuentra en una concentración especificada de (22±3) ppm, no se observó por encima del límite de detección, el cual para los valores de carga especificados al pie de la tabla 3.6 resulta ser de 15 ppm.

Observando los valores de las concentraciones medidas en los materiales de referencia, se observa una buena concordancia con los valores especificados, excepto en el caso del Cl que se evapora durante el proceso de digestión de las muestras. Las concentraciones del Na, Mg y

Al en la tabla 3.7 son menores a los valores especificados, debido a que se obtuvieron las concentraciones suponiendo que las muestras eran finas. Al secar los 5 μl de la solución final de la muestra sobre el soporte, la masa no queda uniformemente distribuida sobre el área de contacto entre la gota y el soporte, sino que queda aglomerada en un área menor. Para los elementos con transiciones de energía de 1,5 keV y menores, los efectos de autoabsorción resultan importantes. En la sección 4.3 del capítulo 4 se muestra como obtener los valores reales de las concentraciones.

3.6.4 Límites de detección en muestras biológicas

En la figura 3.7 se muestran los límites de detección en muestras de tejido biológico para las transiciones $K\alpha$ de los elementos con número atómico entre 22 y 49. Se utilizó en este caso para detectarlos el detector ORTEC.

Es importante hacer notar aquí que las secciones eficaces de producción de rayos X para transiciones de la misma energía de distintos elementos, son del mismo orden de magnitud sin importar si son transiciones K, L o M. Por ejemplo, este es el caso del azufre ($Z=16$), niobio ($Z=41$) y oro ($Z=79$) considerando las transiciones K, L y M respectivamente. Así, el límite de detección de estos elementos para estas transiciones será del mismo orden de magnitud. Por lo tanto, de la figura 3.7 ó 3.8 se pueden estimar los límites de detección de otros elementos considerando la transición correspondiente.

En la figura 3.8 se presentan los gráficos correspondientes a los límites de detección medidos con el detector Oxford, con iones de ^{16}O a 30 MeV.

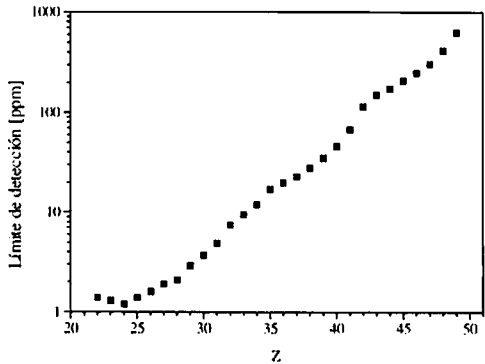


Figura 3.7. Límites de detección en una muestra de cerebro humano para las transiciones $K\alpha$, utilizando el detector ORTEC. Se irradió con iones de ^{16}O a 50 MeV. En este caso la carga total fue de 1,2 μC integrada en un tiempo de irradiación de 10 minutos, la cantidad de materia en la muestra irradiada era de aproximadamente 35 μg .

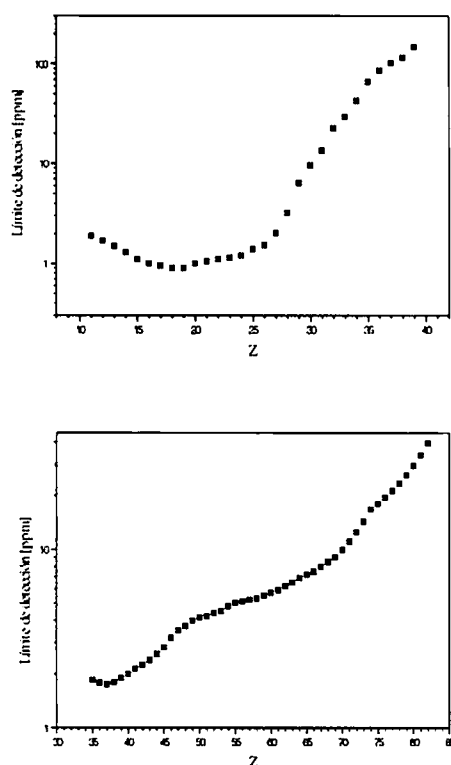


Figura 3.8. Límites de detección en una muestra de cerebro para las transiciones $K\alpha$ (arriba) y $L\alpha$ (abajo), utilizando el detector Oxford. Se irradió con iones de ^{16}O a 30 MeV. En este caso la carga total fue de $1.07\ \mu\text{C}$ integrada en un tiempo de irradiación de 20 minutos; la cantidad de materia en la muestra irradiada era de aproximadamente $14\ \mu\text{g}$.

En los gráficos de las figuras 3.7 y 3.8, debido a la variación del factor de reducción de la matriz en la digestión para distintos tipos de muestras orgánicas (ver sección 3.4.1 y 3.4.2), el límite de detección para cada elemento puede variar alrededor de un factor 2, aumentando o disminuyendo.

Referencias

- [1] Tang Ren-Huan, Int. J. PIXE 6 (1996) 19.
- [2] J. F. Ziegler, J. P. Biersack and U. Littmark, "The Stopping and Range of Ions in Solids", Pergamon Press, New York, 1985.
- [3] K. Shima and T. Mikumo, Atom. Data and Nucl. Data Tables 34 (1986) 357.
- [4] O. A. Bernaola, R. Mazzei, G. Massera, B. Molinari De Rey and D. M. A. Guerin, Nucl. Tracks 7 (1983) 179.

- [5] N. F. Mangelson, M. W. Hill, K. K. Nielson and J. F. Ryder, Nucl. Instr. and Meth. 142 (1977) 133.
- [6] W. Maenhaut, L. De Reu, H. A. Van Rinsvelt, J. Cafmeyer and P. Van Espen, Nucl. Instr. and Meth. 168 (1980) 557.
- [7] J. Pallon and K. G. Malmqvist, Nucl. Instr. and Meth. 181 (1981) 71.
- [8] W. Maenhaut, L. De Reu and J. Vandenhaute, Nucl. Instr. and Meth. B3 (1984) 135.
- [9] J. Galuszka, L. Jarczyk, E. Rokita, A. Strzalkowski and M. Sych, Nucl. Instr. and Meth. B3 (1984) 141.
- [10] E. Clayton, Nucl. Instr. and Meth. B22 (1987) 145.
- [11] W. Maenhaut, J. Vandenhaute and H. Duflou, Fresenius Z. Anal. Chem. 326 (1987) 736.
- [12] H. Duflou, W. Maenhaut and J. De Reuck, Biol. Trace Elem. Res. 13 (1987) 1.
- [13] N. W. Lytle, M. W. Hill, N. F. Mangelson and S. S. W. Kwak, Nucl. Instr. and Meth. B22 (1987) 104.
- [14] M. Stoepler, K. P. Müller and F. Backhaus, Fresenius Z. Anal. Chem. 297 (1979) 107.
- [15] M. M. Schachter and K. W. Boyer, Anal. Chem. 52 (1980) 360.
- [16] M. Dargie, A. Markowicz, A. Tajani and V. Valkovic, Fresenius J. Anal. Chem. 357 (1997) 589.
- [17] W. Maenhaut, J. Vandenhaute, H. Duflou and J. De Reuck, Nucl. Instr. and Meth. B22 (1987) 138.
- [18] H. M. Kingston and L. B. Jassie, Anal. Chem. 58 (1986) 2534.
- [19] F. W. Crow et al., Anal. Biochem. 139 (1984) 243.
- [20] W. Maenhaut, Scanning Microscopy 4 (1990) 43.
- [21] E. C. Montenegro, A. Oliver and F. Aldape, Nucl. Instr. and Meth. B12 (1985) 453.
- [22] D. L. Weathers, J. L. Duggan, M. R. McNeir, Y. C. Yu and F. D. McDaniel, Nucl. Instr. and Meth. B56/57 (1991) 964.
- [23] L. Moens, J. De Donder, Lin Xi-lei, F. De Corte, A. De Wispelaere and A. Simonits, Nucl. Instr. and Meth. 187 (1981) 451.
- [24] E. Clayton, P. Duerden and D. D. Cohen, Nucl. Instr. and Meth. B22 (1987) 64.
- [25] D. D. Cohen and E. Clayton, Nucl. Instr. and Meth. B22 (1987) 59.
- [26] E. Clayton, Nucl. Instr. and Meth. B22 (1987) 145.

CAPÍTULO 4

Aplicación de la técnica PIXE a muestras biológicas

En este capítulo se presentan las distintas aplicaciones realizadas en el laboratorio TANDAR, utilizando la técnica PIXE para la medición de concentraciones de elementos traza en tejido biológico, con el objetivo de hacer una contribución para dilucidar las causas y efectos de la presencia o incorporación de los mismos.

En la sección 4.1 se presenta el primer estudio sobre la presencia de aluminio en distintas zonas del cerebro humano. En la sección 4.2 se exponen los resultados de un extenso estudio sobre la incorporación de metales en distintos órganos de la especie sapo *Bufo arenarum*. Finalmente en la secciones 4.3 y 4.4, se retoma el tema de la determinación de concentraciones de aluminio en muestras biológicas en mejores condiciones experimentales.

4.1 Determinación de trazas de aluminio en tejido cerebral humano

La técnica analítica PIXE con un haz de iones de ^{16}O de 18 MeV, se aplicó para estudiar la composición elemental en diferentes regiones del cerebro de pacientes con diagnóstico confirmado post-mortem de enfermedad de Alzheimer, y en la de otros que no padecían esta enfermedad (pacientes control). Los resultados obtenidos muestran correlación entre la ocurrencia de la enfermedad de Alzheimer, y la presencia y elevada concentración de aluminio.

4.1.1 Introducción

La enfermedad de Alzheimer (EA) es una dolencia degenerativa y progresiva del cerebro considerada como la principal causa de demencia. Esta enfermedad afecta alrededor del 10 % de la población mayor de sesenta años. La causa de la EA es desconocida y puede ser solamente diagnosticada con certeza a través de un estudio histopatológico post-mortem.^[1,2] La relación entre el aluminio (Al) y la EA tiene una larga historia, sin embargo, las evidencias directas de elevadas concentraciones de Al en muestras de tejido cerebral con la EA son contradictorias y no concluyentes.^[1,2]

Ultimamente se han realizado estudios de análisis de Al relacionándolo con la EA utilizando microhaces,^[1-5] pero ellos han fallado en resolver la controversia alrededor de este tema. Específicamente un estudio^[2] usando un microhaz de protones que se llevo a cabo en 1992, reportó la ausencia de un incremento de Al en el núcleo de las placas neuríticas de pacientes con la EA. Estas muestras no fueron tratados por la técnica usual de teñido químico, y en consecuencia sugirieron que las primeras evidencias de Al podrían vincularse a reactivos contaminados. En este capítulo se presentan los resultados de un trabajo que se realizó en el laboratorio TANDAR, conjuntamente con miembros de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad Nacional de Buenos Aires y del Hospital Santojanni, en donde se estudiaron muestras macroscópicas (~100 mg) tomadas de distintas regiones del cerebro de pacientes con la EA y sin ella.

Paralelamente a este trabajo, se realizó otro usando microhaces de iones pesados (Si^{2+} de 5 MeV) y protones (2 MeV) con muestras (hipocampo) de pacientes con la EA^[6] que determinó la presencia de Al en el núcleo de las células del cerebro.

4.1.2 Optimización del límite de detección del Al en muestras biológicas

De acuerdo a todo lo expuesto en el capítulo 2 y en particular en la última sección, no todos los iones dan el mismo límite de detección. La bibliografía indica que los experimentos de PIXE se realizan habitualmente con energías del proyectil entre 1 y 3 MeV por nucleón, para optimizar los límites de detección de acuerdo al tipo de muestra y elementos de mayor interés. Debido a las características del acelerador TANDAR es imposible trabajar con protones de tal energía. En el laboratorio TANDAR tradicionalmente se trabajó con iones de ^{16}O (referencias [2,4-8] del capítulo 1). Un haz de iones de ^{16}O es fácil de obtener; y los iones cumplen con la condición $Z/A=0,5$ que minimiza una de las componentes de la radiación de fondo: la

radiación de frenado del proyectil. Además, los iones son suficientemente livianos como para que sus rayos X característicos no interfieran con los rayos X característicos de los elementos presentes en la muestra.

Un punto importante del experimento, es encontrar la energía del proyectil en donde el límite de detección es mínimo o suficientemente bajo, para los elementos de mayor interés en medir sus concentraciones. Para determinar las concentraciones de Al en muestras de origen biológico se optimizó la energía de los iones de ^{16}O en el rango de 18 a 50 MeV, midiendo el rendimiento de producción de rayos X K del Al y la producción de radiación de fondo. No es posible trabajar con iones de menor energía debido a que la corriente que suministra el acelerador es demasiado pequeña, lo que implica tiempos de irradiación por muestra extremadamente largos (varias horas).

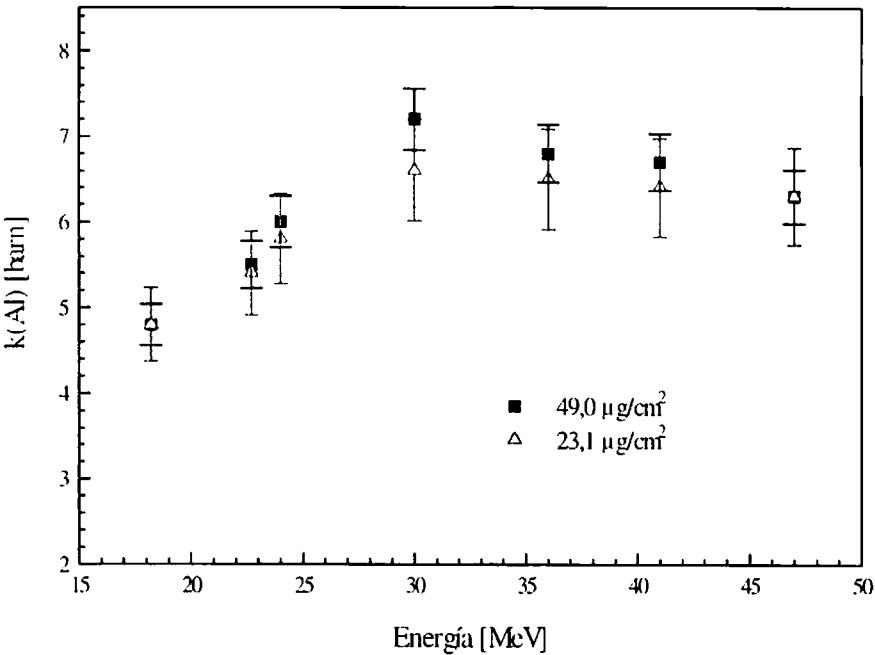


Figura 4.1. Rendimiento de producción de rayos X K del Al en función de la energía de los iones de ^{16}O en el sistema de laboratorio. Para estas mediciones los patrones de Al se hicieron en el laboratorio TANDAR. $k(\text{Al})$ se midió para dos patrones de distintos espesores: $49.0 \mu\text{g}/\text{cm}^2 (\pm 5 \%)$ y $23.1 \mu\text{g}/\text{cm}^2 (\pm 9 \%)$.

En la figura 4.1, se grafican los valores del rendimiento de producción de rayos X K del Al $k(\text{Al})$. Aunque el máximo de $k(\text{Al})$ medido se encuentra en 30 MeV, las mediciones para

analizar las muestras se realizaron a 18 MeV en donde $k(Al)$ es algo menor, para minimizar la radiación de fondo principalmente, la de origen nuclear y la producida por el frenado de los electrones secundarios. A esta energía se está por debajo de la barrera coulombiana entre el proyectil y cada uno de los elementos mayoritarios (H, C y O) que componen la matriz de las muestras irradiadas. En la figura 4.2 se grafica la energía de la barrera coulombiana en el sistema de laboratorio V_c^{Lab} , para iones de ^{16}O y protones con la misma energía por nucleón (1,125 MeV/nucleón) para los quince elementos más livianos.

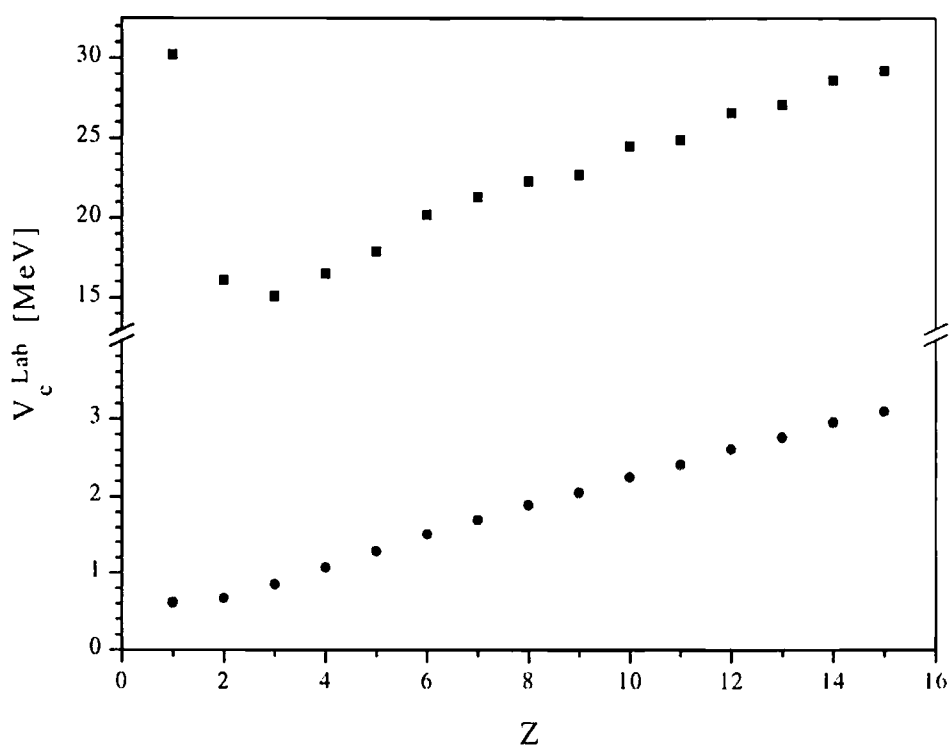


Figura 4.2. Energía de la barrera coulombiana^[7] en el sistema de laboratorio de ^{16}O (cuadrados) y protones (círculos) para los quince elementos más livianos.

En la figura 4.3 se muestra el espectro correspondiente a una folia de carbón de 30 $\mu g/cm^2$ que se utiliza como soporte de las muestras a irradiar. El espectro se interpreta como la suma de dos tipos de radiación: una continua y otra discreta.

La componente continua es directamente proporcional al rendimiento de producción de radiación de fondo, que es a la vez proporcional al producto de la sección eficaz de producción de radiación de fondo y la eficiencia de detección de la radiación. El máximo

número de rayos X detectados para esta componente, corresponde al canal cuya energía es 1,35 keV. Debajo de esta energía la absorción de la radiación es muy grande, y el número de rayos X detectados en cada canal disminuye abruptamente. De acuerdo a la figura 2.5 de la sección 2.5, el proceso SEB es la componente principal de la radiación de fondo para energías inferiores a $T_m \approx 2,45$ keV, ya que el proceso QFEB es importante para la radiación de fondo con energía inferior a $T_r \approx 0,61$ keV que es absorbida. Para energías mayores a 2,45 keV, las componentes de la radiación de fondo son: de origen nuclear, de frenado del proyectil, AB, UAB, MO y REC.

La componente discreta corresponde a los fotopicos de los rayos X característicos del Si, S, Cl, Ca y Fe. Estos elementos se incorporan a la lámina de carbón durante su proceso de fabricación.^[8]

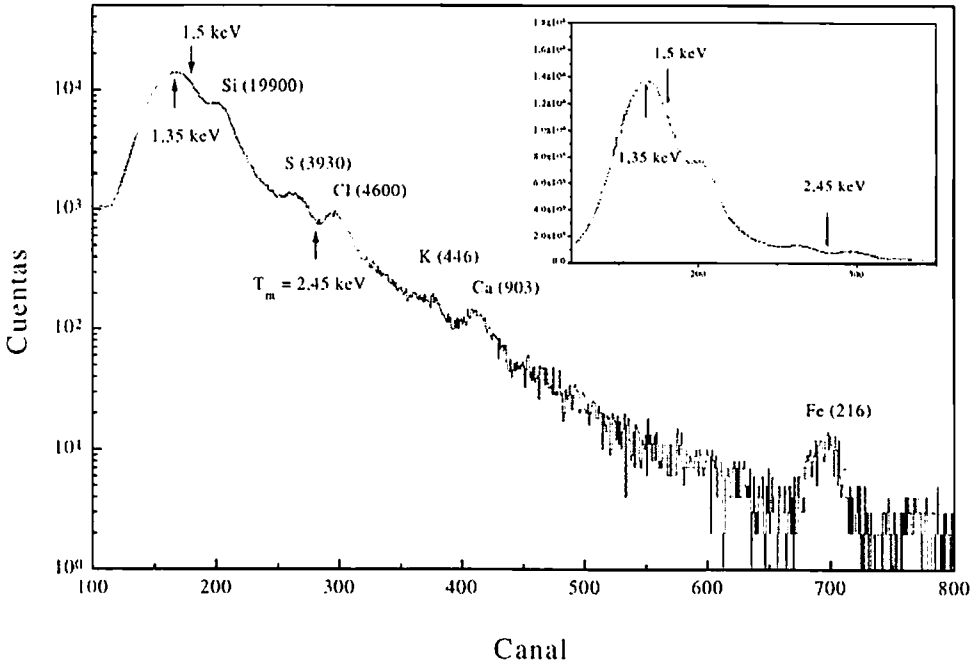


Figura 4.3. Espectro de rayos X de una folia de carbón de $30 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ producido por iones de ^{16}O de 18 MeV. La carga integrada correspondiente es $16.5 \mu\text{C}$. Entre paréntesis está indicado el número de rayos X característicos de los elementos detectados.

También en la figura 4.3 se indica la energía 1,5 keV sobre el espectro, que corresponde a los rayos X K del Al que en este caso están ausentes.

Todavía no es bueno el acuerdo entre los valores de los límites de detección calculados teóricamente y medidos experimentalmente, en función de la energía de distintos proyectiles sobre distintos tipos de muestras. Por lo tanto, el único camino para determinar el proyectil y su energía para obtener el menor límite de detección en una dada matriz para un determinado elemento, es medirlo experimentalmente. Esta tarea es muy ardua e información sobre estudios de intercomparación de distintos iones se presenta en la sección 2.6, de donde se puede concluir que los iones de ^{16}O son una muy buena elección para el análisis de muestras biológicas.

El arreglo experimental utilizado en la cámara de irradiación es similar al descrito en la sección 3.1, en donde se colocó una lámina de Mylar[®] en la ventana de salida de radiación de la cámara, para permitir la transmisión de los rayos X K del aluminio hacia el detector. En este experimento la normalización de carga incidente sobre cada muestra, es realizada integrando la corriente del haz en la copa de Faraday y midiendo los rayos X L del oro con un detector planar de germanio, los cuales se producen en una lámina de Au de $300\text{ }\mu\text{g}/\text{cm}^2$ colocada en el camino del haz después de los colimadores y a 15 cm delante de la muestra.

4.1.3 Resultados

Se tomaron muestras de tejido cerebral provenientes de diferentes regiones del cerebro humano (ver tabla 4.1) de cinco pacientes con la EA y de cinco pacientes control. Los cerebros pertenecían a pacientes fallecidos algunos años atrás y se encontraban conservados en sus respectivos recipientes con formol. Todas las muestras recibieron el mismo tratamiento para su preparación, el que se describe en la sección 3.3.1. En este caso, según el número de gotas evaporadas sobre la lámina de carbón las muestras resultaron ser de un espesor aproximado de $1\text{ mg}/\text{cm}^2$, es decir de espesor intermedio.

En la figura 4.4 se grafica el factor de corrección por efecto de matriz, definido según la expresión 3.10, en función del espesor de la muestra para un haz de iones de ^{16}O de 18 MeV. En estos cálculos se consideró la curva de sección eficaz de producción de rayos X K del Al para iones de ^{16}O mostrada en la figura 3.24 de la referencia [2] del capítulo 2, los valores del poder de frenado de los iones de ^{16}O en una matriz de carbón obtenidos del programa Trim (referencia [5] del capítulo 3), y el coeficiente de atenuación de los rayos X K del aluminio en una matriz de carbón de la referencia [7] del capítulo 2. Además los cálculos se realizaron considerando el arreglo experimental esquematizado en la figura 3.1, en el cual la muestra se

coloca formando un ángulo de 45° respecto a la dirección del haz, y los rayos X emitidos por la muestra hacia el detector forman un ángulo de 90° respecto a la dirección antes mencionada.

Al colocarse las muestras formando un ángulo de 45° respecto de la dirección del haz, el espesor de éstas que deben atravesar los iones es de $1,4 \text{ mg/cm}^2$ aproximadamente.

En esta sección, todos los valores de concentración y límite de detección del aluminio que se presentan más adelante, se han calculado suponiendo que las muestras son finas, es decir, no han sido corregidas por el factor F.^[9] Si suponemos todas las muestras del mismo espesor, el factor de corrección es igual para todas ellas y el significado estadístico de los datos es el mismo.

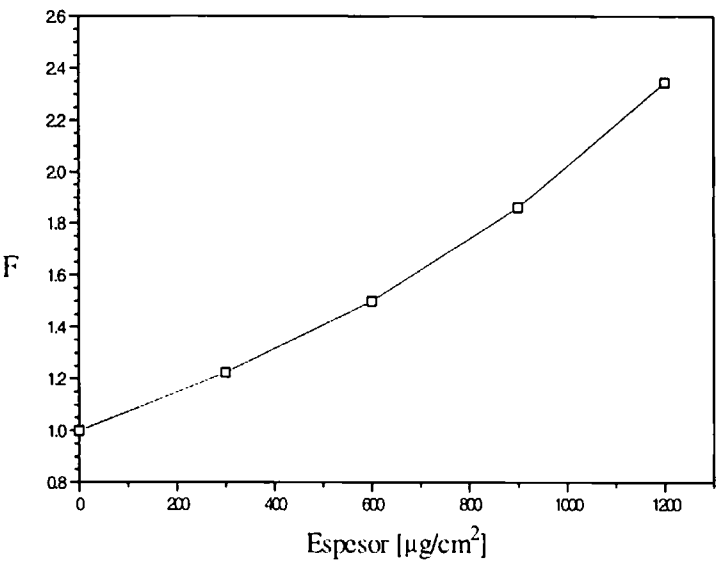


Figura 4.4. Gráfico de la variación del factor F en función del espesor de la muestra para iones de ^{16}O de 18 MeV. Se grafica hasta un espesor de $1,2 \text{ mg/cm}^2$ debido a que el mínimo valor de sección eficaz de producción de rayos X K del aluminio, en la referencia mencionada, corresponde a una energía de 7 MeV.

También se produjeron muestras blanco, que se realizan siguiendo el mismo procedimiento de preparación de muestras de tejido biológico, con el mismo tipo de recipientes y reactivos, pero sin la muestra de tejido biológico. Las muestras blanco no mostraron Al por encima del límite de detección.

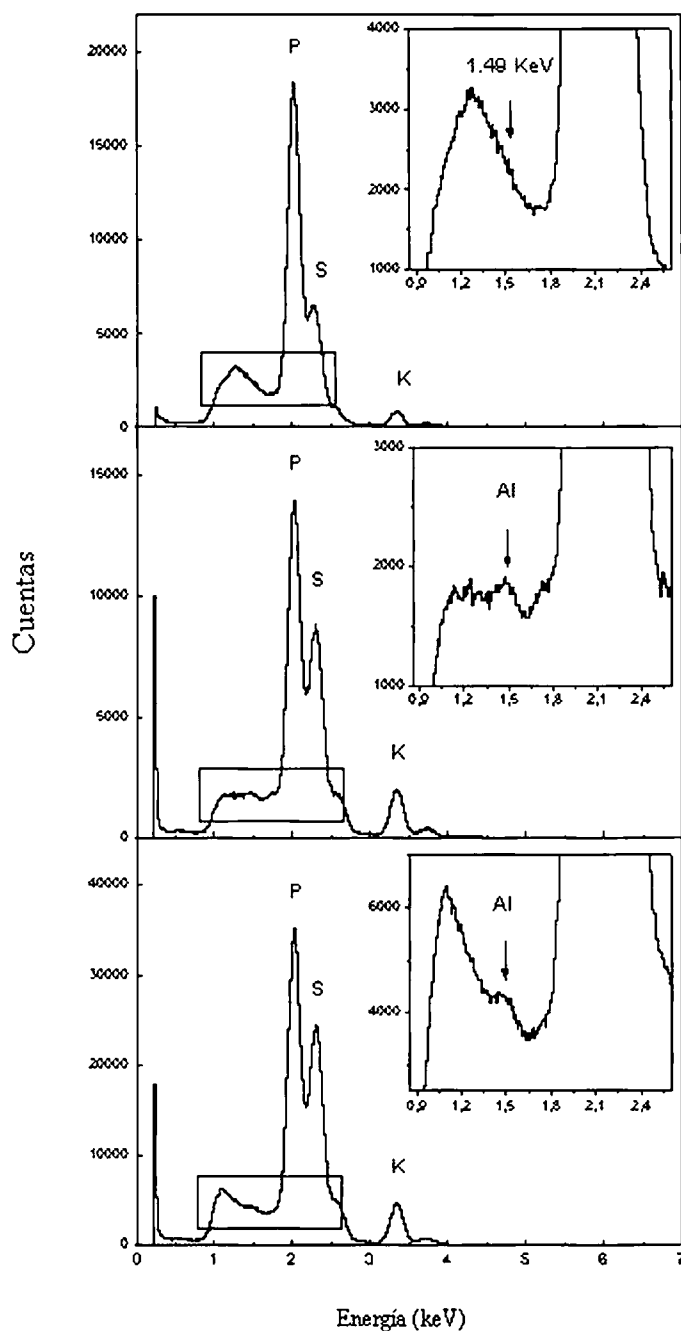


Figura 4.5. Espectro de rayos X mostrando la ausencia (arriba) y presencia (medio y abajo) de aluminio Al. También se observan los fotopicos del azufre (S), fósforo (P) y potasio (K).

En la figura 4.5 se muestran tres espectros de rayos X inducidos por iones de ^{16}O . El superior corresponde a una muestra de un paciente control que no contiene aluminio por encima del límite de detección. El del medio corresponde a una muestra de espesor intermedio de un

paciente con la EA, donde el fotopico correspondiente al Al se observa claramente. Este espectro en particular corresponde a una muestra de sustancia blanca temporal y contiene una concentración de 12 ppm (ó 12 µg/g), lo cual se traduce en 15 ng de Al en 1,2 mg de sustancia original depositada sobre la lámina de carbón para ser irradiada.

Descripción de la muestra	Control [F.O.]	Al ^{a)} [µg/g]	EA [F.O.]	Al ^{a)} [µg/g]
Sustancia blanca temporal	1/6 ^{b)}	1,8±1,2	2/4	11,7±3,5
Corteza frontal	0/1	---	2/3	3,6±1,4
Sustancia blanca temporal	0/1	---	2/2	11,5±2,5
Corteza y subcorteza frontal	0/4	---	---	---
Corteza y subcorteza frontoparietal	---	---	1/1	3,5±1,4
Corteza y subcorteza parietal	1/1	2,7±0,9	1/1	5,8±1,8
Corteza y subcorteza uncus izquierdo	---	---	0/1	---
Corteza parietal	1/1	1,2±0,7	1/1	6,2±2,0
Sustancia blanca parietal	0/1	---	1/1	3,4±1,1
Sustancia blanca frontoparietal	---	---	1/1	c)
Sustancia blanca temporal y corteza	---	---	1/1	9,2±2,8
Corteza temporal	0/1	---	---	---
Casos positivos ^{d)}	3/16 19 %	1,9±0,4	12/16 75 %	6,9±1,2

- a) La concentración de Al se calculó sólo para las muestras de espesor intermedio.
b) Paciente fallecido de úlcera perforada.
c) Al en muestra gruesa. No estuvo disponible la muestra fina.
d) Casos positivos se refiere a las concentraciones mayores al límite de detección.

Tabla 4.1. Frecuencia de ocurrencia (F.O.) y concentración promedio de Al en las distintas zonas del cerebro de pacientes con la enfermedad de Alzheimer y sin ella (control). En la última fila (casos positivos) se indica el porcentaje y promedio de las mediciones por encima del límite de detección para cada grupo de pacientes; y el error es el error estándar del promedio de las concentraciones promedios para cada zona.

El límite de detección para el Al en el espectro del medio corresponde a 3 ng, es decir 2,4 ppm. La contribución de radiación de fondo de la lámina de carbón para la determinación del límite de detección del Al, es despreciable por ser de un espesor mucho menor al de las

muestras, por lo que pueden considerarse como un buen soporte. El espectro inferior corresponde a la muestra gruesa del mismo material, para la cual no se realizaron análisis cuantitativos.

La tabla 4.1 muestra las concentraciones de aluminio medidas en 32 muestras de tejido cerebral de pacientes control y con la EA caracterizados histopatológicamente post-mortem. Estas concentraciones están clasificadas por la localización de la muestra en el cerebro. Estos datos muestran claramente, dentro del alcance de este conjunto limitado de muestras, que la presencia del Al tanto en frecuencia y concentración es muy superior en pacientes con la EA (75 % y 6,9 ppm), en comparación con los pacientes control (19 % y 1,9 ppm). Debe ser mencionado que uno de los pacientes control que muestra la presencia de Al (región sustancia blanca temporal, tabla 4.1) murió de úlcera estomacal habiendo sido tratado con drogas con contenido de Al. Otra tendencia interesante es que la concentración de Al es superior en muestras de sustancia blanca.

La medición de muestras de casos bien caracterizados de EA, contradicen resultados previos indicando la presencia simultánea de Al y Si en forma de aluminosilicato, ya que no se encontró correlación entre ellos en los espectros observados.

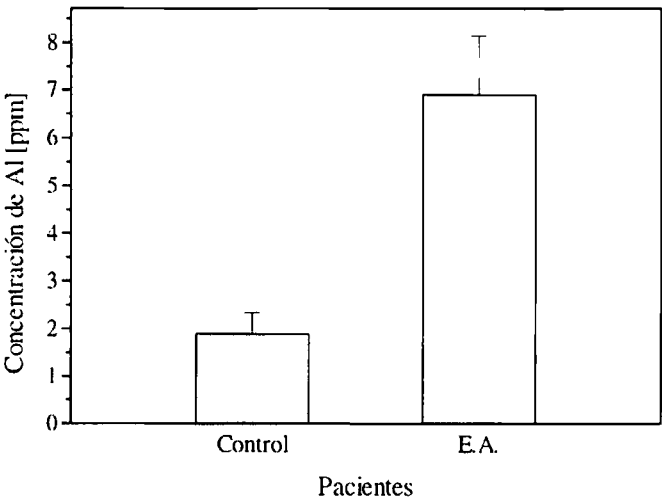


Figura 4.6. Concentración de Al promedio con su error estándar (ver tabla 4.1) para ambos grupos de pacientes.
ANOVA (análisis de varianza): $p<0,043$.

4.1.4 Conclusión

Según el restringido conjunto de datos presentados en la tabla 4.1 es evidente una clara

correlación entre la presencia de Al (en frecuencia y concentración) y la existencia de EA. En la figura 4.6, se muestra un gráfico de barras con las concentraciones promedio de cada grupo de pacientes y sus errores. El análisis estadístico indica que los dos promedios son significativamente diferentes ($p < 0,043$).

Como se mencionó antes, los iones atraviesan un espesor de muestra de aproximadamente $1,4 \text{ mg/cm}^2$. Pero no todas tienen el mismo espesor, debido a que el número de gotas depositadas sobre el soporte de la muestra se calcula, en base a los valores promedios del factor de reducción de matriz en el proceso de digestión y del área sobre el que la masa queda extendida en el soporte, para que la cantidad de masa irradiada de cada muestra sea la misma. La variación de estos valores, produce una variación del espesor de las muestras y del factor de corrección por efecto de matriz, de acuerdo a la figura 4.4. Como se puede ver la variación del factor de corrección es aproximadamente lineal con la variación del espesor. Una variación estimada del 30 % del espesor produce una variación en el mismo porcentaje en el factor de corrección.

Si bien, introducir el factor de corrección por efecto de matriz aumentaría la dispersión de valores de concentración para cada uno de los grupos de pacientes, es de esperar que el valor relativo entre los promedios de cada grupo no cambie. El aumento en la dispersión produciría resultados menos significativos.

Los resultados presentados en este trabajo son los primeros de un estudio más completo cuya meta es construir un mapa de la concentración de Al en el cerebro. Sin embargo, para retomar las mediciones se consideró necesario realizar una serie de cambios en el arreglo experimental en la cámara de irradiación; y en el proceso de obtención, manipulación y preparación de las muestras. Las nuevas condiciones en las que se retomaron las mediciones, junto a un conjunto de nuevos resultados, se exponen en la sección 4.3.

4.2 Acumulación de metales en distintos órganos de la especie sapo *Bufo arenarum*

Utilizando la técnica PIXE, se realizaron una serie de estudios en conjunto entre miembros del grupo Espectroscopía Nuclear Discreta del laboratorio TANDAR y de la Escuela de Ciencia y Tecnología de la Universidad Nacional de General San Martín.

El primer estudio se diseñó para determinar la incorporación de metales en ovarios de hembras de sapo *Bufo arenarum*, al ser expuestas en su hábitat natural a aguas del Río Reconquista.

Posteriormente, en base a estos resultados, se realizaron otros estudios similares pero en condiciones de laboratorio.

4.2.1 Estudios realizados en condiciones de cautiverio en su hábitat natural

Este estudio mostró que la exposición de hembras de sapo *Bufo arenarum* a aguas del Río Reconquista (Provincia de Buenos Aires), produce la acumulación de Zn en sus ovarios en función del tiempo de exposición. Paralelamente, se realizaron una serie de ensayos biológicos para determinar los efectos y los mecanismos de la incorporación del Zn.

4.2.1.1 Introducción

La concentración de ciertos metales en aguas de río contaminadas no siempre puede ser medida en una muestra, ya que las descargas de los efluentes de las industrias no son un proceso continuo. Por lo tanto, es necesario tomar varias muestras diarias durante al menos un año, para demostrar la presencia o ausencia de contaminantes en fuentes de agua rodeadas por un gran número de industrias.

Los ensayos biológicos son diseñados para evaluar toxicidad de aguas naturales o sedimentos, el mecanismo de acción de una sustancia xenobiótica, o la concentración a la cual un producto químico es tóxico. En este caso se diseñó un primer ensayo biológico para determinar: el nivel de contaminación de metales en la rivera del Río Reconquista en una zona industrializada a la altura del Partido de General San Martín, la incorporación de metales por una determinada especie (sapo *Bufo arenarum*), y los efectos producidos sobre el desarrollo de embriones de esta especie.

4.2.1.2 Descripción del ensayo biológico

Hembras de la especie sapo *Bufo arenarum* fueron mantenidas durante diferentes tiempos (0, 7, 14, 21, 39 y 60 días) en un jaulón cerca de la rivera del Río Reconquista. En cada tiempo una hembra fue sacada del jaulón, y se tomaron muestras de agua y tierra del lugar en donde se encontraban. Una muestra de cada ovario fue obtenida por cirugía utilizando material quirúrgico recubierto con teflón, pesada y preparada para el análisis de trazas de metales a través de la técnica PIXE. El último grupo (60 días) y un grupo control (hembras mantenidas en laboratorios de la Universidad Nacional de General San Martín durante el mismo tiempo). fueron inyectadas con macerado de hipófisis homóloga para inducir la ovulación.

Aproximadamente 16 horas después, cuando las hembras comenzaban a deponer los ovocitos, los mismos se extrajeron por cirugía desde el ovisaco. Los ovocitos fueron inseminados en cajas de Petri conteniendo aproximadamente 100 cada una, mediante agregado de suspensión de espermatozoides fresca, preparada en solución Ringer. Al cabo de 45 minutos posteriores a la inseminación se agregaron 40 ml de solución Ringer a cada caja. Se contó bajo lupa estereoscópica el número total de ovocitos inseminados, y el número de embriones correspondientes en cada caja en los estadios de gástrula y respuesta muscular.^[10] El medio de incubación (solución Ringer) fue renovado y los embriones muertos fueron retirados cada 48 horas. Se calculó el porcentaje de sobrevivencia considerando el número de embriones vivos en un estadio y el número de ovocitos inseminados o embriones en el estadio anterior (figuras 4.7 y 4.8).

4.2.1.3 Procedimiento experimental para el análisis de metales

El arreglo experimental en la cámara de irradiación utilizado es el descrito en la sección 3.1. En la ventana de salida de radiación de la cámara se utilizó una lámina de berilio (espesor: 1,05 mm) y otra de lucite (espesor: 0,4 mm) para atenuar los rayos X con energías inferiores a los rayos X K del vanadio, debido a que no eran de interés.

La carga se midió directamente con la copa de Faraday sin utilizar lámina normalizadora de carga delante de la muestra.

Las muestras se irradiaron con iones de ^{16}O de 50 MeV. En la figura 3.7, se pueden observar los límites de detección en muestras biológicas para los iones mencionados, utilizando los fotopicos $K\alpha$ que caracterizan a cada elemento. Para elementos con número atómico mayor a 50 los límites de detección continúan aumentando, pero se tienen límites de detección varios órdenes de magnitud inferior, utilizando las transiciones $L\alpha$ de los mismos (si no existen interferencias con fotopicos K de elementos más livianos, o fotopicos M de elementos más pesados). El haz se uniformizó con una lámina de oro de $380 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ en las condiciones mencionadas en la sección 3.2.

En cuanto al método de digestión de las muestras biológicas se siguió el procedimiento descrito en la sección 3.4.1. El espesor de las muestras sobre el soporte para ser irradiadas no superaba los $500 \mu\text{g}/\text{cm}^2$. Las muestras se colocaron en la cámara de irradiación formando un ángulo θ de 60° (ver figura 3.1).

Para el cálculo de concentraciones en el caso particular del hierro y el zinc las muestras pueden considerarse finas, debido a que el factor de corrección por efecto de matriz es muy próximo a la unidad ($F \approx 1$). Ésto se puede explicar muy brevemente. Por un lado, la absorción de los rayos X característicos de estos elementos en la propia muestra es despreciable, ya que es aproximadamente el 0,5 % para el Fe y el 0,2 % para el Zn. Por otro lado, el poder de frenado para estos iones por una matriz de carbono es de $5,7 \text{ MeV}/(\text{mg}/\text{cm}^2)$, lo cual implica una variación en la energía del ion al atravesar la muestra de 3,3 MeV. Con los datos de secciones eficaces de producción de rayos X de la referencia [6] del capítulo 1, se puede estimar la sección eficaz promedio del ion de ^{16}O de 50 MeV al atravesar la muestra para cada elemento. Ésta resulta ser aproximadamente, el 92 % para el caso del Fe y el 95 % para el Zn del valor correspondiente de la sección eficaz de cada uno de estos elementos para los iones incidentes de 50 MeV, lo que da factores de corrección de 1,09 y 1,05; respectivamente.

Las muestras finas de agua se prepararon depositando microgotas sobre las láminas de carbón hasta totalizar un volumen de agua de 25 μl .

Con las muestras de tierra del río se hicieron muestras finas preparadas de acuerdo al método descrito en la referencia [11].

4.2.1.4 Resultados y conclusiones

Cuando los metales son incorporados en un organismo, son transferidos hacia tejidos en los que se acumulan. El almacenamiento ocurre en tejidos particularmente ricos en ligandos que unen metales (metalotioneínas), o capaces de sintetizarlos, por ejemplo hepatopáncreas, hígado y riñón.^[12,13] Debido a las características de incorporación, acumulación y eliminación de diferentes especies, la concentración de metales en organismos acuáticos varía en un amplio rango, observándose acumulación aún en ausencia de contaminación del medio acuático.^[14]

La figura 4.7 muestra la curva de incorporación de Zn en los ovarios de las hembras de sapo expuestas.

El Zn se acumuló en forma dependiente del tiempo de permanencia en cautiverio de las hembras a orillas del río. A partir de los 20 días de exposición la concentración de Zn alcanzó una meseta en 270 ng/mg que se mantuvo a tiempos superiores. La concentración de Zn en ovarios de hembras control fue siempre inferior a 100 ng/mg. Durante la permanencia de los animales en el jaulón, estuvieron en contacto con sedimento en ausencia de columna de agua

(hacia la parte más externa del jaulón) y sedimento con agua hacia la porción que se internaba en el lecho del río. Durante lluvias abundantes la totalidad del lugar quedaba cubierto con agua durante períodos cortos (horas). La concentración de Zn en diversas muestras de agua tomadas en el lugar fue siempre inferior al límite de detección (20 ppb = 20 ng/ml). Los resultados de las concentraciones de metales en las distintas muestras de sedimento refleja una situación distinta, y en la tabla 4.2 se muestran los elementos detectados, así como las concentraciones mínimas y máximas medidas.

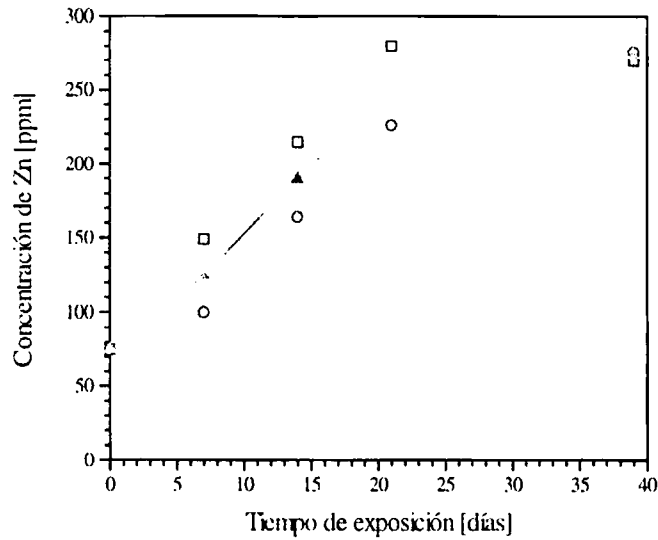


Figura 4.7. Curva de concentración de Zn en función del tiempo. Los triángulos llenos representan la concentración promedio entre los valores medidos para el ovario izquierdo (cuadrados) y derecho (círculos) de cada hembra. El error en cada medición de la concentración de zinc es del 12 %.

Este estudio se realizó durante los meses de invierno, cuando los ovarios de las hembras de esta especie aumentan notablemente de tamaño e incrementan su composición porcentual de ovocitos de estadio V (dimensiones y pigmentación semejantes a los hallados en ovocitos ovulados). Durante este período el metabolismo del ovario es muy activo, y es seguramente responsable de la acumulación de Zn encontrada.

Las hembras trasladadas al laboratorio e inyectadas con macerado de hipófisis ovularon de manera aparentemente normal, sus ovocitos fueron capaces de ser fecundados y los embriones desarrollaron de manera similar a los obtenidos a partir de hembras controles, hasta alcanzar el

estadio de gástrula (24 horas después de la inseminación). En el estadio de respuesta muscular (5 días después de la inseminación), se observó en cambio una disminución significativa en el porcentaje de sobrevivencia para los embriones provenientes de hembras que acumularon Zn en sus ovarios, como se muestra en la figura 4.8.

Elemento	Rango de concentración [ppm]
Ti	700-1600
Cr	1600-3600
Mn	280-560
Fe	15000-30000
Cu	70-140
Zn	615-1270

Tabla 4.2. Rango de las concentraciones de los elementos detectados en las muestras de sedimento del río.

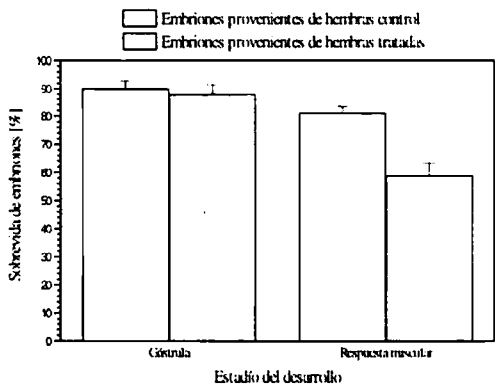


Figura 4.8. Desarrollo embrionario temprano de ovocitos de hembras control y expuestas, inseminados y desarrollados en el laboratorio. Los resultados son los promedios y sus desviaciones estándar de muestras por triplicado para duplicado de animales. ANOVA: $p < 0,015$; correspondiente a la diferencia entre tratamientos en el estadio de respuesta muscular.

4.2.2 Estudios posteriores sobre la incorporación de metales en sapos en cautiverio en condiciones de laboratorio

Con el objeto de evaluar la incorporación de Zn en forma de catión bivalente, en ovarios de hembras expuestas, así como el probable efecto de la exposición a este metal sobre el desarrollo embrionario temprano y posibles alteraciones sobre la vía de las pentosas y el metabolismo del glutatión, se realizó otro ensayo biológico pero esta vez en el laboratorio.

Para este ensayo grupos de 5 ó 10 hembras, colocando 5 hembras por caja, fueron expuestas a solución Ringer con contenido de $\text{ZnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (con una concentración de Zn de 4 $\mu\text{g/l}$). Las hembras se mantuvieron en condiciones de cautiverio durante 28 días (tiempo en el cual la curva de la figura 4.7 muestra saturación), con recambio del medio cada tres días. Hembras control fueron sujetas a igual tratamiento en solución Ringer, en ausencia de $\text{ZnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$. Este diseño experimental se llevó a cabo en 3 oportunidades, durante los meses de invierno.

4.2.2.1 Relación entre exposición y efecto

Muestras de ambos ovarios de cuatro hembras por caja, cuyos pesos oscilaban entre 0,18 y 0,50 g, fueron extraídas con instrumentos de cirugía recubiertos con teflon y digeridas utilizando un horno microondas como se describe en la sección 3.4.2, para determinar la concentración de Zn con el método PIXE. El arreglo experimental en la cámara de irradiación usando el detector ORTEC es el mostrado en la figura 3.6. Las muestras se hicieron nuevamente de 500 $\mu\text{g/cm}^2$ y se colocaron en forma perpendicular a la dirección del haz. De esta manera, el factor de corrección por efecto de matriz resulta algo menor, para el Fe y el Zn, que los valores estimados en la sección 4.2.1.3.

La hembra restante de cada caja (para ambos grupos control y expuesto) fue inyectada con macerado de hipófisis homóloga, con el objeto de inducir la ovulación. Al cabo de 16 horas aproximadamente cuando los ovocitos comenzaban a ser depuestos, fueron extraídos quirúrgicamente e inseminados por triplicado *in vitro*, con suspensión de espermatozoides fresca. Los embriones así obtenidos fueron observados bajo lupa estereoscópica. El porcentaje de sobrevivencia se evaluó en los estadios de gástrula y circulación branquial (5 días después de la inseminación).

Las concentraciones de Zn medidas en los ovarios de las hembras no inyectadas se muestran en la tabla 4.3.

Concentración de Zn [ppm]			
Hembras control		Hembras expuestas	
Ovario derecho	Ovario izquierdo	Ovario derecho	Ovario izquierdo
129	103	70	98
104	134	144	143
187	170	106	64
132	114	98	142
163	153	147	161
74	68	107	103
191	233	71	80
138	213	37	30
133	132	188	12
202	212	15	123
promedio: 149,2 desviación estándar: 46,4		promedio: 96,9 desviación estándar: 49,7	

Tabla 4.3. Concentración de Zn en ovarios de hembras controles y hembras expuestas durante 28 días en solución de $\text{ZnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (4 $\mu\text{g/l}$ de Zn en solución Ringer). ANOVA: $p < 0,0014$. Cada una de las mediciones tienen un error porcentual del 12 %. Alguno ovarios no pudieron ser incluidos en este estudio porque correspondían a hembras juveniles: no poseían ovocitos en estadio V.

Las diferencias halladas en las concentraciones de Zn en ovarios de hembras control entre los distintos experimentos (ver secciones 4.2.1 y 4.2.2) podrían obedecer a la procedencia de las hembras utilizadas. Ya que estos animales no pueden criarse en cautiverio, habitualmente se compran a un proveedor local que los recoje de un ambiente natural no contaminado. En ambos ensayos se utilizaron lotes adquiridos a distintos proveedores.

De este conjunto de datos, puede observarse que la exposición de hembras de sapo *Bufo arenarum* adultas, a Zn en forma de catión bivalente a través de la solución mencionada, no provocó bioacumulación del metal en los ovarios, resultado que está de acuerdo a los obtenidos en las referencias [15,16]. Por el contrario, la concentración hallada fue significativamente menor en las hembras expuestas respecto a las hembras control.

Sin embargo, la exposición citada fue capaz de inhibir el desarrollo embrionario temprano según lo muestra la figura 4.9.

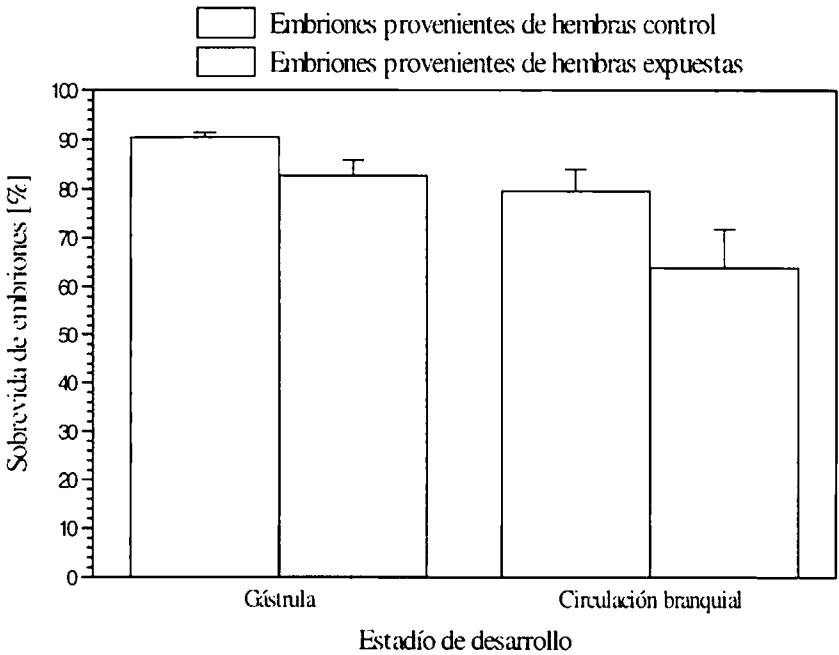


Figura 4.9. Desarrollo embrionario temprano de ovocitos obtenidos a partir de hembras control y hembras expuestas durante 28 días a una solución de $\text{ZnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ e inseminados in vitro. Los porcentajes de sobrevivencia son el promedio con su desviación estándar de muestras procesadas por triplicado o quintuplicado. ANOVA: $p < 0.034$; correspondiente a la diferencia entre tratamientos incluyendo ambos estadios.

Este efecto podría estar relacionado con una disminución observada en la actividad de la enzima clave de la vía de las pentosas^[17] (glucosa-6-fosfato deshidrogenasa). La misma podría probablemente causar una disminución en la síntesis de cofactores e intermediarios necesarios para los procesos de biosíntesis reductiva, que tienen lugar durante estas etapas del desarrollo. Además se observó un aumento en la concentración de glutatión endógeno (referencia [17] y datos aún no publicados) que podría relacionarse con mecanismos de detoxificación que pondrían en marcha un aumento en la excreción del Zn de los ovarios.

Estos resultados demuestran que no es necesaria la acumulación de Zn en los ovarios para producir efectos tóxicos. La exposición a este metal aún en condiciones en las que no puede observarse acumulación, es capaz de producir inhibición en el desarrollo embrionario así

como las alteraciones bioquímicas descriptas. Una diferencia en la especiación (formación de complejos) del Zn explicaría la diferente respuesta en la acumulación respecto al diseño experimental anterior.

El zinc es un micronutriente esencial (nutrientes que son necesarios en concentraciones muy bajas), no obstante la exposición de diferentes organismos a elevadas concentraciones o prolongados períodos a este metal frecuentemente produce efectos tóxicos. La incorporación y acumulación de Zn o de otros metales pueden verse favorecidas por la formación de complejos entre diversos ligandos, presentes a menudo en el medio acuático contaminado. A su vez distintos ligandos intracelulares determinan la esencialidad, toxicidad y acumulación de los metales. Bajo condiciones normales, los procesos homeostáticos aseguran una apropiada utilización de metales esenciales para los requerimientos de metaloenzimas y minimizan las uniones no específicas a ligandos que determinan toxicidad y/o acumulación; pero a menudo los efectos adversos ocurren cuando ciertos mecanismos de compensación/ detoxificación imponen efectos secundarios.

El glutatión intracelular ejerce un efecto citoprotector mediado por distintos mecanismos: participa de procesos de óxido-reducción y actúa como ligando de metales favoreciendo así su excreción. En diversos tipos celulares se ha observado una relación inversa entre la concentración de glutatión endógeno reducido y el estrés oxidativo, mientras que en otros se demostró un aumento en su concentración por exposición a diversos metales.^[18,19] La vía de las pentosas promueve la síntesis de glutatión a través de la producción de NADPH, cofactor indispensable para la reducción de glutatión oxidado.^[20-23] A su vez se ha demostrado que esta vía promueve la maduración meiótica en ovocitos de ratón. Ésto muestra que resulta importante; estudiar la capacidad de los ovocitos de ser fecundados relacionándola con la actividad de la vía de las pentosas y el efecto protector del glutatión, cuando el ovario es sometido a sustancias tóxicas que pudieran causar estrés oxidativo.

4.2.2.2 Relación entre concentraciones de Zn y Fe en distintos órganos

La acumulación de metales en diferentes órganos se estudia habitualmente en distintas especies acuáticas. Hogstrand et al.^[24] demostraron que las hembras de la familia Holocentridae acumulan grandes cantidades de Zn mientras que los machos no lo hacen. Los autores hallaron que los ovarios son los únicos órganos que concentran este metal, además del hígado.

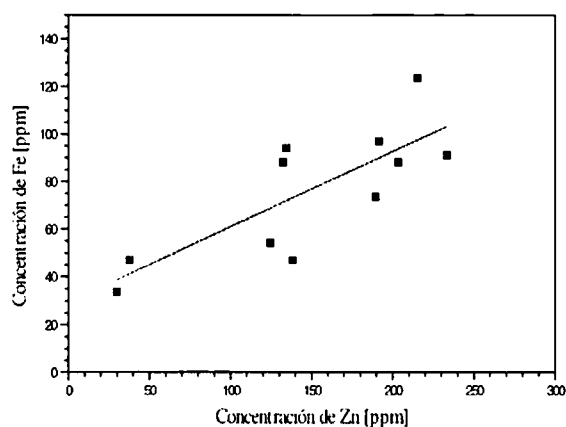


Figura 4.10. Correlación positiva entre las concentraciones de Fe y Zn en el ovario. Regresión lineal: $r^2=0,615$.

Utilizando la técnica PIXE se determinó la concentración de Fe y Zn en muestras de ovario e hígado de las hembras de sapo tratadas según se explicó en la sección 4.2.2. El gráfico de la figura 4.10 muestra que existe una correlación positiva entre las concentraciones de ambos metales en el ovario, a través de un ajuste de los datos a un modelo de regresión lineal. En hígado, en cambio, los resultados obtenidos permiten evidenciar una correlación negativa y a través de un modelo no lineal para las concentraciones de ambos metales, como se puede observar de la figura 4.11. Estos resultados concuerdan con los publicados en otras especies. Sures et al.^[25] hallaron concentraciones de Fe y Zn similares entre sí en algunos órganos (músculo e intestino) de truchas (*Perca fluviatilis*); a la vez que en el hígado el Fe presentaba elevadas concentraciones mientras que el Zn se mantenía en bajos niveles. Bouglé et al.^[26] estudiaron los efectos a largo plazo de las interacciones Fe-Zn sobre el crecimiento de ratas, encontrando una correlación positiva entre la absorción de Fe y la concentración de Zn en el músculo, y una negativa comparando los mismos elementos en el hígado de dichos mamíferos. La acumulación de metales en diferentes tejidos de distintos organismos depende de los mecanismos de incorporación y excreción de los mismos, así como de las distintas estrategias que los diversos tipos de organismos o células ponen en marcha para impedir su toxicidad. Muchos organismos controlan la incorporación de metales a través de la secreción al medio de modificadores químicos, que aumentan o disminuyen su biodisponibilidad mediante cambios en la especiación de los mismos. Algunos organismos procariotas (algas verdes) resisten altísimas concentraciones de metales acumulándolos en sus membranas celulares externas;

mientras que algunos invertebrados marinos de la región ártica retardarían la incorporación de metales a través de alteraciones en el contenido lipídico de sus membranas.^[27]

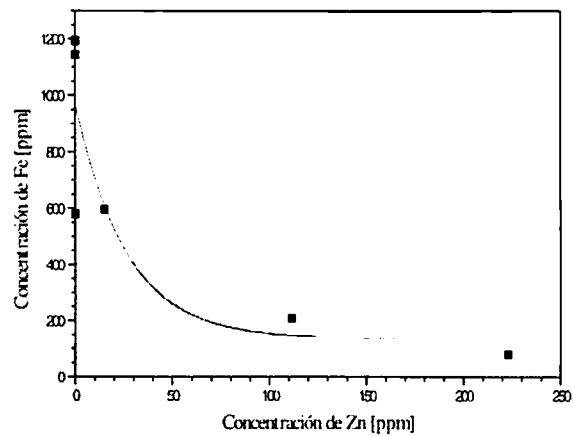


Figura 4.11. Correlación negativa entre las concentraciones de Fe y Zn en el hígado. El ajuste exponencial (línea continua) tiene el fin de mostrar cualitativamente este comportamiento.

Los procesos de incorporación y excreción de los diferentes elementos en la célula obedecen a distintos mecanismos para los diferentes grupos de metales. En el caso particular de la incorporación de Fe, estudios realizados en *Mytilus edulis* demostraron que este metal es incorporado a través de un proceso de pinocitosis, ya sea en forma de hidróxido o formando parte de ferritina o transferrina. El Zn en cambio se incorporaría en diferentes tipos celulares a través de un mecanismo de transporte facilitado.^[28] La excreción de metales de clase A y algunos de características intermedias entre los de clase A^[27] y los de clase B^[27] (el Zn por ejemplo), se lleva a cabo usualmente a través de permeasas y Na⁺/K⁺ ATPasas o Ca²⁺ ATPasas. Tanto el Zn como el Fe se excretan a menudo a través de complejos formados con diferentes ligandos.^[27]

Las metalotioneínas (MT) son proteínas de bajo peso molecular (6-7 KD) citosólicas, ampliamente distribuidas en diferentes órganos de distintas especies, cuya principal función consistiría en su participación en la homeóstasis de metales esenciales como Cu y Zn. Debido a su capacidad para secuestrar otros metales y así disminuir su disponibilidad para otros ligandos intracelulares, también son responsables de un efecto protector de la célula contra metales tóxicos como Cd, Ag y Hg. Los metales pesados son toxicológicamente inaccesibles cuando se encuentran unidos a MT. Cuando declina la concentración de MT es posible

observar un aumento en la excreción de metales como el Cd.^[29] Los metales presentan diferentes constantes de afinidad para los grupos tiol presentes en estas proteínas globulares, de acuerdo al siguiente orden:^[15] Hg(II) >> Cu(I), Ag (I), Bi (III) >> Cd (II) > Pb (II) > Zn (II) > Co (II) > Fe (II). El hígado es el órgano que concentra mayor cantidad de metalotioneínas en diferentes especies.^[24,29] Por otra parte Olsson et al.^[30] demostraron que los niveles de mRNA de MT así como los de Zn unido a MT, disminuyen durante el desarrollo del ovario de truchas arcoiris (*Salmo gairdneri*) a la vez que el Zn se une a proteínas de alto peso molecular. En el momento de la ovulación la mayor cantidad de Zn presente en el ovario se encuentra unido a la fracción de la membrana plasmática.

De acuerdo a esta información, nuestros resultados indican que la regulación de la concentración del Zn en hígado y ovario de la especie *Bufo arenarum*, obedecería a diferentes mecanismos. En hígado podría encontrarse ligada a las MT, que en presencia de altas concentraciones de este metal unirían mayor cantidad de este elemento que de Fe, debido a las diferentes afinidades que poseen por ambos. A bajas concentraciones de Zn, el Fe podría retenerse en mayor cantidad unido a MT en este órgano, lo que explicaría los datos de la figura 4.11. En ovario en cambio habría un probable bajo contenido de MT motivo por el cual las concentraciones de ambos metales se regularían a través de otros mecanismos. Los mismos comprenderían procesos de incorporación y excreción mediados por ATPasas y permeasas, característicos de metales del grupo intermedio,^[27] al que pertenecen tanto el Zn como el Fe. La regulación del Zn por las MT reduciría su toxicidad en el hígado. Esto explicaría además la ausencia de inhibición de la actividad de la enzima glucosa-6-fosfato deshidrogenasa, así como la falta del incremento de los niveles de glutatión en este órgano, respecto del ovario de las hembras expuestas a este metal (resultados de nuestro grupo aún no publicados).

4.2.3 Determinación de concentraciones de Cu y Cd en ovarios de sapo *Bufo arenarum*

Con el objeto de evaluar la incorporación de Cu y Cd (en forma de catión bivalente), en ovarios de hembras expuestas, se realizó otro ensayo biológico en el laboratorio.

Para cada elemento, el ensayo biológico fue el mismo. Dos grupos de 4 hembras, colocando 4 hembras por caja, fueron expuestas a solución Ringer con contenido de CuSO₄·5H₂O/ CdCl₂·2½H₂O, con una concentración de Cu/Cd de 4 µg/l y 100 µg/l en cada caja. Las hembras se mantuvieron en condiciones de cautiverio durante 60 días, con recambio del medio dos veces por semana. Hembras control fueron sujetas a igual tratamiento en solución Ringer,

en ausencia de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}/\text{CdCl}_2 \cdot 2\frac{1}{2}\text{H}_2\text{O}$. En cada caja se colocó 300 ml de solución por cada hembra. Para el análisis PIXE después de sacrificarse los animales, se tomó una muestra de aproximadamente 200 mg de cada orario.

Para la preparación de estas muestras se empleó el método de digestión con digestor de microondas, y se utilizaron como soportes de las muestras a irradiar láminas de carbono sostenidas por un soporte de acero inoxidable recubierto con lucite.

El arreglo experimental en la cámara de irradiación es el esquematizado en la figura 3.6, y se utilizaron iones de ^{16}O a 50 MeV. El haz fue homogeneizado con una lámina de Au de $400 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ como en los casos anteriores.

El límite de detección del Cd para la transición $K\alpha$ mostrados en las figuras 3.7 y 3.8, es mucho más grande que para la transición $L\alpha$. La detección de la línea $L\alpha$ (3,13 keV) tiene el inconveniente que está muy próxima a la transición $K\alpha$ del K (3,31 keV), y además, este último se encuentra en concentraciones del orden de varias partes por mil en la muestra, es decir, 3 órdenes de magnitud por encima de las concentraciones esperadas para el Cd. Por estas razones, se decidió realizar en primer lugar el experimento de medición de trazas utilizando el detector Oxford que tiene mejor resolución de energía.

4.2.3.1 Mediciones de Cu y Cd utilizando el detector Oxford

En primer lugar se verificaron las concentraciones de las soluciones originales de Cu y Cd de 100 mg/l, que se utilizaron para preparar las soluciones de 4 $\mu\text{g}/\text{l}$ y 100 $\mu\text{g}/\text{l}$ a las cuales se expusieron las hembras. Los resultados obtenidos fueron: (102 ± 7) mg/l y (99 ± 7) mg/l, respectivamente. En las muestras correspondientes a las hembras tratadas con solución de Cu, no se observó dicho elemento por encima del límite de detección, que fue de 3,5 ppm.

En el caso del Cd tampoco se observó por encima del límite de detección. En este caso el límite de detección sin interferencia es de 3 ppm, pero debido a la presencia del fotopico del K en el espectro, el límite de detección resultante en estas muestras es de alrededor 30 ppm.

Las muestras biológicas fueron irradiadas durante tiempos aproximados de 1 hora, con una carga integrada de $\sim 10 \mu\text{C}$.

4.2.3.2 Límites de detección a 98 MeV

La sección eficaz de producción de rayos X K de Cd aumenta para energías superiores a 50 MeV. Teniendo en cuenta esto y para disminuir el límite de detección del Cd a través de la

transición $K\alpha$ mostrado en la figura 3.7, se estudió la variación de dicha cantidad en el rango de energía entre 50 MeV y 98 MeV para los iones de ^{16}O . El límite superior de energía está limitado por las condiciones de funcionamiento del acelerador Tandar.

En la tabla 4.4 se comparan los límites de detección de Cr, Cu, Br y Cd en muestras de ovario de sapo a 50 MeV y 98 MeV.

Límites de detección [ppm]			
Elemento	Z	a 50 MeV	a 98 MeV
Cr	24	0,7	1,0
Cu	29	0,7	1,0
Br	35	2,8	1,6
Cd	48	80	13*

Tabla 4.4. Límites de detección en muestras de ovario de sapo a 50 MeV y 98 MeV. La carga integrada a 50 MeV es de $\sim 10 \mu\text{C}$, y a 98 MeV $\sim 8 \mu\text{C}$ excepto en el caso del Cd* que es de $\sim 20 \mu\text{C}$.

Los valores para el Cr y el Cu aumentan levemente, mientras que en el caso del Br y el Cd disminuyen, sobre todo en el segundo.

De estas mediciones se concluye que para estas muestras, el menor límite de detección para el Cu se obtiene irradiando a 50 MeV, y en el caso del Cd irradiando a 98 MeV. en ambos casos utilizando el detector Ortec para medir el correspondiente fotopico $K\alpha$.

Sólo se irradiaron 3 muestras de ovario de hembras que estuvieron expuestas a la solución de Cd de $100 \mu\text{g/l}$. En ninguna se observó acumulación de Cd por encima del límite detección (13 ppm).

4.3 Nuevas condiciones para la determinación de trazas de aluminio en tejido cerebral humano

Para retomar las mediciones de concentración de aluminio en tejido cerebral se realizaron modificaciones en el arreglo experimental sobre la cámara de irradiación, los tiempos y forma de extracción de las muestras del cerebro, y el procesamiento del tejido hasta obtener la muestra para ser irradiada.

Como se menciona en el capítulo 1 y se describe con detalle en la sección 3.3, el nuevo arreglo experimental consiste básicamente en la instalación de un nuevo detector con mejor resolución y mayor eficiencia a bajas energías, ubicado mirando la muestra en un ángulo mayor a 90° respecto del sentido en el que inciden los iones sobre la muestra, precisamente a 142° .

Para la extracción de muestras,^[31-33] la autopsia se realizó en la morgue del Hospital Eva Perón (Partido de General San Martín) dentro de las 24 horas después del fallecimiento. El cerebro se colocó en un recipiente de plástico, y se usó un bisturí de acero inoxidable para cada una de las zonas de las que se extrajeron muestras. Las muestras de alrededor de 100 mg se colocaron en frascos de polietileno de alta densidad de 4 ml. A los pocos minutos a estas muestras se les agregó 0,5 ml de ácido nítrico INSTRA-ANALYZED For Trace Metal Analysis de la empresa J. T. Baker. Luego se comenzó con la digestión de las muestras en un horno microondas según se describe en la sección 3.4.2. Todos los recipientes y demás instrumentos utilizados en las distintas etapas del proceso de preparación de muestras se lavaron de acuerdo al procedimiento descrito en la sección 3.4.3.

En la figura 4.12 se muestra la variación del factor de corrección por efecto de matriz definido en la expresión 3.10, en función del espesor de la muestra para diferentes energías del ion incidente de ^{16}O . En estos cálculos se consideraron las mismas fuentes de datos, que en el caso de aquellos mostrados en la figura 4.4, pero se realizaron suponiendo el arreglo experimental en la cámara de irradiación esquematizado en la figura 3.6 (en el que la muestra está colocada en forma perpendicular a la dirección del haz, y los rayos X emitidos por la muestra llegan al detector formando un ángulo de 38° con la dirección del haz). En esta figura se puede observar que para obtener muestras finas ($F \approx 1$) colocando la mayor cantidad de masa posible, es conveniente irradiar a 40 MeV con muestras de espesor no mayor a $400 \mu\text{g}/\text{cm}^2$.

La diferencia entre las distintas curvas graficadas se debe únicamente a la forma de la sección eficaz de producción de rayos X en función de la energía del ion mientras atraviesa la muestra. Los iones incidentes de 25 MeV al entrar en la muestra pierden energía y su sección eficaz de producción de rayos X disminuye, mientras que los iones incidentes de 40 MeV pierden energía de la misma manera, pero su sección eficaz de producción de rayos X aumenta. Lo mismo ocurre con iones de mayor energía.

Teniendo en cuenta lo anterior, se realizó nuevamente un estudio de la variación del límite de detección de aluminio en función de la energía del ion de ^{16}O . Los resultados se muestran en la

tabla 4.5.

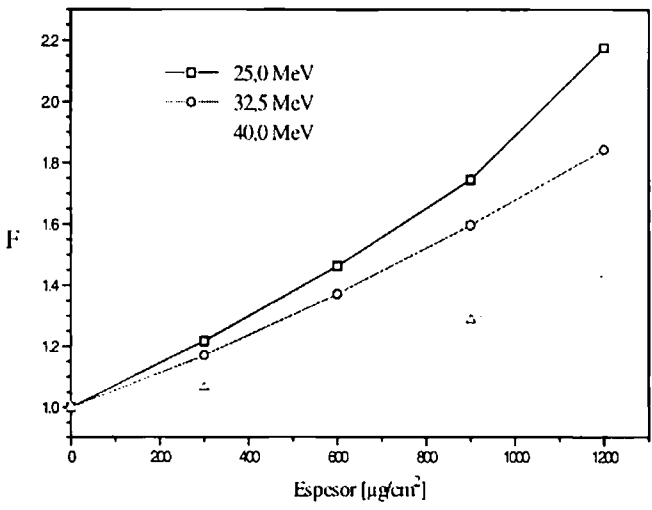


Figura 4.12. Variación del factor F en función del espesor de la muestra para distintas energías del ion incidente de ^{16}O . Para hacer estos cálculos se supuso el arreglo experimental de la figura 3.6.

El límite de detección permanece prácticamente constante en el rango de energía entre 30 y 50 MeV. Por lo tanto, es conveniente irradiar a una energía mayor a 40 MeV debido a que el acelerador Tandem tiene una mejor transmisión de corriente.

Energía [MeV]	Límite de detección [ppm]
30	1,4
35	1,4
40	1,2
50	1,4

Tabla 4.5. Límites de detección de Al en muestras de cerebro humano en función de la energía del ion de ^{16}O . Carga integrada: 7,5 μC . Masa de la muestra irradiada: $\sim 5\mu\text{g}$, que representan $\sim 50\mu\text{g}$ del tejido original.

Además, es muy importante colocar absorbentes delante de la ventana de entrada de radiación del detector Oxford, para atenuar los rayos X de energías menores o igual a la transición $K\alpha$ del Na, ya que estos constituyen el 90 % del conteo del detector por unidad de tiempo.

Experimentalmente se observó que colocando 3 láminas de Mylar® de 1,5 µm de espesor, se logra un buen efecto y la transmisión del Al se afecta en menos del 20 %.

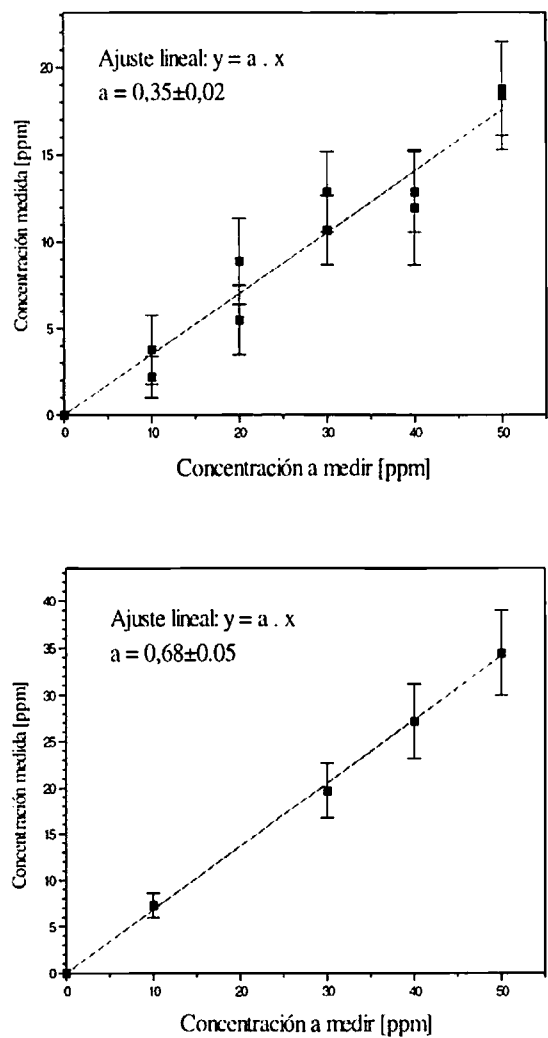


Figura 4.13. Curvas de calibración de concentración de Al medida en función de la concentración a medir en el tejido. Arriba: E=30 MeV, sin absorbente delante del detector. Abajo: E=50 MeV, con un absorbente de 4.5 µm de Mylar® delante del detector.

Esto permite no sólo aumentar la corriente en un factor 3, y por lo tanto, el conteo de rayos X de Al por unidad de tiempo; sino obtener fotopicos de menor intensidad en la región de menor energía cercana al Al, con lo cual se puede realizar un mejor ajuste por cuadrados mínimos del área del Al, lo que se ve reflejado en el valor de la pendiente (a) de los gráficos de la figura 4.13 y en la alineación de los puntos.

En el gráfico inferior el valor de la pendiente no es 1 (uno), debido a los efectos de autoabsorción. El factor de corrección por efecto de matriz para el Al es la inversa del valor de la pendiente y vale: $F=1,47\pm0,11$. La curva de variación del factor F en función del espesor de la muestra para una energía del ion incidente de 50 MeV, es muy próxima a la curva correspondiente a 40 MeV mostrada en la figura 4.12. (Esto sugiere que el espesor medio de las muestras es de aproximadamente de $1,2 \text{ mg/cm}^2$. Utilizando una lupa binocular Nikon SMZ-10 y una reglilla graduada, se realizó una estimación del área de la muestra para estimar su espesor, el cual resultó muy aproximado al valor antes mencionado).

Utilizando el valor obtenido del factor F del Al, para corregir la concentración promedio del Al (27,5 ppm) en el material de referencia celulosa de algodón en la tabla 3.7 del capítulo anterior, el valor resultante (40 ppm) difiere sólo un 10 % del valor especificado.

4.3.1 Nuevos resultados

Se tomaron muestras de una persona femenina fallecida el 21 de octubre de 1999 de 77 años de edad y número de historia clínica: 6994, que no padecía la enfermedad de Alzheimer. Se tomó una muestra del hemisferio derecho y otra del izquierdo, de las mismas doce zonas del cerebro que se presentan en la tabla 4.1.

Las mediciones se realizaron utilizando iones de ^{16}O de 40 MeV. Los límites de detección para el aluminio fueron de alrededor de 1,2 ppm.

De las 24 muestras analizadas solamente en una muestra se observó aluminio por encima del límite de detección, y el espectro correspondiente está graficado en la figura 4.14. La muestra corresponde a la zona sustancia blanca frontal del hemisferio derecho, y la concentración medida es de $(2,9\pm1,0)$ ppm.

Para mostrar la resolución en energía del fotopico de Al, en los gráficos de la figura 4.14 se presenta un espectro de una muestra de hígado de sapo dopada con 100 ng de Al en la muestra irradiada. Además se puede observar que el Na, Mg y Al se encuentran en la muestra en cantidades comparables, y los fotopicos correspondientes están muy bien resueltos.

La concentración de Mg y los elementos con energías inferiores no se cuantificaron. Se observa una correlación entre las concentraciones de P, S y K, que se encuentran graficadas en la figura 4.15. La pendiente de cada recta representa la relación másica entre los elementos. En cada gráfico se indica el coeficiente de correlación (R), entre las concentraciones de los correspondientes elementos.

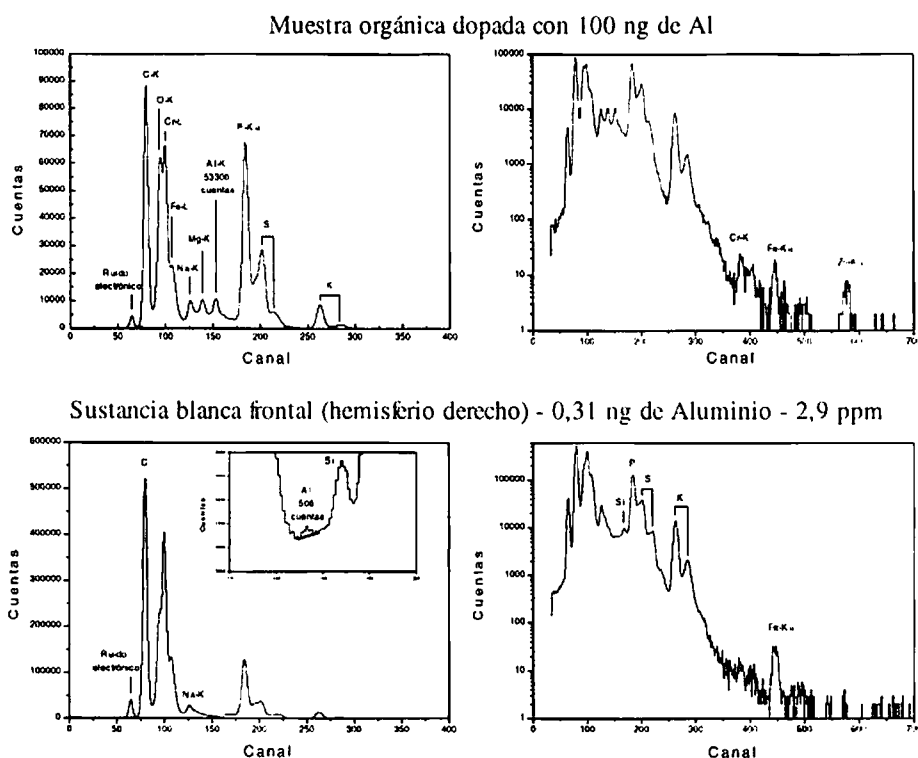


Figura 4.14. Arriba: espectro correspondiente al una muestra de hígado de sapo dopada con 100 ng de Al, en escala lineal (izquierda) y en escala logarítmica (derecha). Abajo: espectro de una muestra de sustancia blanca frontal con 0,31 ng de Al en la muestra irradiada, en escala lineal (izquierda) y en escala logarítmica (derecha).

Las concentraciones de Si, Cl y Ca no se cuantificaron, porque aparecen en las mismas cantidades que en los blancos que se realizan para determinar el nivel de contaminación de cada elemento.

De los resultados obtenidos para el Al se puede concluir que:

- El límite de detección del Al logrado (~1,2 ppm) en estas condiciones es alrededor de 6 veces menor, comparado con el obtenido en la sección 4.1.3 (~7 ppm).
- Se refuerza la hipótesis de bajas concentraciones de Al en pacientes que no sufren la enfermedad de Alzheimer.

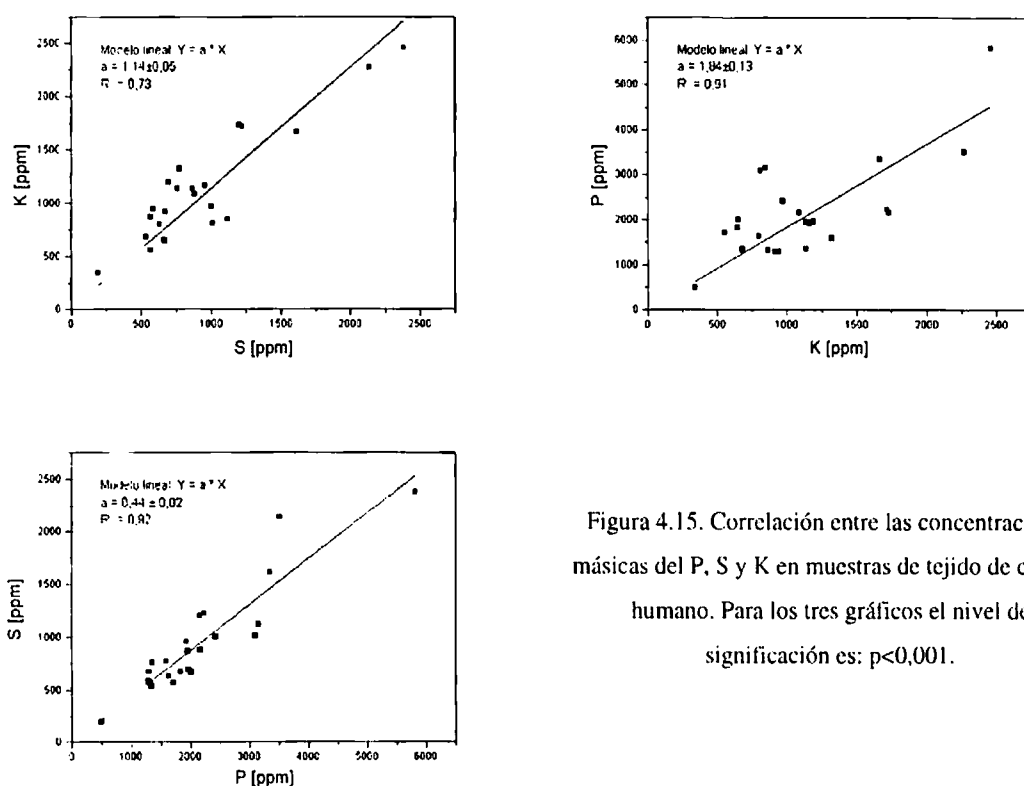


Figura 4.15. Correlación entre las concentraciones másicas del P, S y K en muestras de tejido de cerebro humano. Para los tres gráficos el nivel de significación es: $p < 0,001$.

4.4 Determinación multielemental en muestras de líquido sinovial

La detección de aluminio en líquido sinovial de una paciente gastrectomizada con síntomas reumáticos, generó el interés en determinar si este elemento es una constante en la composición del líquido sinovial de ese tipo de pacientes o si se trata de un caso puntual. Con este fin, se estudió la posibilidad de utilizar el método PIXE para la determinación de Al en este tipo de muestras. En este trabajo se desarrolló un nuevo método de preparación de las muestras, y se lo comparó con el método de digestión con el digestor a microondas. Se determinó también la presencia y concentración de otros elementos en las muestras: Na, P, S, Cl, K y Ca.

4.4.1 Preparación de las muestras

Para la digestión de las muestras se utilizaron dos procedimientos. En el primero, a 500 μ l de muestra se le agregaron 2 ml de HNO_3 y 0,5 ml de H_2O_2 . Estas soluciones fueron procesadas en un digestor a microondas.

Sin embargo, este método no pudo ser utilizado con todas las muestras de líquido sinovial debido a que en algunos casos se contaba con muy poco material (~50 µl por muestra). Para estos casos se desarrolló un método alternativo: se colocaron 50 µl de líquido sinovial, 50 µl de ácido nítrico y 400 µl de agua de alta pureza en un recipiente con tapa a rosca de 5 ml; los que se sometieron a baño María y agitación con ultrasonido hasta que las muestras se observaron homogéneas. De cada una de estas soluciones se tomaron 50 µl y se las diluyó utilizando agua de alta pureza. La disolución debía ser tal que al depositar una gota de 5 µl sobre un soporte y secarla, el depósito resultante cumpliera con las condiciones de “muestra fina”. Los soportes utilizados fueron los provistos por la empresa Moxtek.

4.4.2 Condiciones experimentales y desarrollo

Las mediciones se realizaron irradiando las muestras con iones de ^{16}O de 50 MeV, y el haz fue homogeneizado utilizando una folia de Au de 400 µg/cm² como se describe en la sección 3.2. El área del haz se midió utilizando la lámina de Nuclepore[®]. Para estas mediciones se utilizó el detector de Si(Li) Oxford.

El experimento se realizó en dos etapas: durante la primera se desarrollaron y compararon los dos procedimientos de preparación de las muestras, y durante la segunda se aplicó el procedimiento elegido a un grupo de muestras.

Primera etapa: de 4 muestras se tomaron varias submuestras, y se aplicó a cada una, uno de los 2 procedimientos de digestión descriptos (con digestor a microondas o ultrasonido combinado con calor). La diferencia, tanto en concentraciones como en límites de detección entre las muestras sometidas a cada uno de los procedimientos de digestión no superaban el 10 %. Segunda etapa: se analizaron 10 muestras, las cuales se prepararon siguiendo el procedimiento de digestión con calor y ultrasonido. Para obtener “muestras finas”, las soluciones obtenidas se diluyeron mezclando una parte con 9 de agua. De una de las muestras, se tomaron 6 submuestras, y luego de digeridas, se doparon con una solución de Al, para simular muestras con concentraciones de 2,5 ppm, 3,75 ppm, 6,25 ppm, 8,75 ppm, 12,5 ppm y 15 ppm.

4.4.3 Resultados y Conclusiones

Las muestras dopadas se analizaron considerándolas “muestras finas” y se calcularon las cantidades de Al presentes en cada una.

Los resultados obtenidos presentaban errores de hasta el 50 %. Comparándolos con las

cantidades de Al agregadas, no diferían en más del 30 % por defecto. Los errores experimentales para la determinación de las concentraciones de cada elemento, fueron fundamentalmente los errores en el área de los fotopicos, el rendimiento de cada elemento (5 %) y el área del haz (5 %).

Las 10 muestras de la segunda etapa se analizaron de la misma manera. En el caso del Al las concentraciones fueron corregidas por el efecto de matriz. Los valores de las concentraciones de cada uno de los elementos detectados en estas muestras, se presentan en la Tabla 4.6. El límite de detección del aluminio fue de 2 ng/μl.

De esta manera se mostró que el método PIXE, siguiendo los procedimientos descriptos, es adecuado para el estudio de la presencia de Al en líquido sinovial, dentro de los márgenes de error y límites de detección dados.

Muestra	Al	P	S	Cl	K	Ca
1	3,3±1,2	138±13	623±62	571±53	113±12	288±28
2	6,4±2,8	37±4	524±52	714±66	165±16	148±14
3	7,4±1,6	59±6	604±60	766±71	102±11	128±13
4	2,3±1,1	65±6	823±80	726±67	127±13	78±8
5		34±3	473±48	416±38	155±16	47±6
6		33±3	706±69	550±51	137±14	48±6
7	2,5±1,4	52±5	527±53	555±51	111±11	45±5
8		46±5	388±39	45±4	69±7	35±4
9	2,9±1,2	87±8	755±77	65±6	135±14	62±7
10		88±8	1199±110	70±7	113±12	55±6

Tabla 4.6. Concentraciones de los elementos detectados en las muestras de líquido sinovial. Todos los valores están expresados en ng/μl. También se determinó la presencia de Na en concentraciones alrededor de 2000 ng/μl. Para los elementos P y Ca existe correlación significativa con $p < 0.05$.

Referencias

- [1] W. R. Markesbery and W. D. "Ehmann, Brain trace elements in Alzheimer's Disease" en "Alzheimer Disease", R. D. Terry, R. Katzman and K. L. Bick eds., Raven Press, New York. (1994) 353-369.
- [2] J. P. Landsberg, B. McDonald and F. Watt, *Nature* 360 (1992) 65-68.
- [3] J. P. Landsberg, B. McDonald, J. M Roberts, G. W. Grime and F. Watt, *Nucl. Instr. and Meth. B54* (1991) 180-185.
- [4] T. Pinheiro, U. S. A. S. Taper, K. Sturesson and A. Brun, *Nucl. Instr. and Meth. B54* (1991) 186-190.
- [5] F. Watt and G. W. Grime, en "Particle Induced X-ray Emission Spectrometry", S. A. E. Johansson, J. L. Campbell and K. G. Malmquist eds., *Chemical Analysis* 133, J. Wiley (1995) 135.
- [6] S. Yumoto, Y. Horino, Y. Mokuno, S. Kakimi and K. Fujii, *Nucl. Instr. and Meth. B109/110* (1996) 362-367.
- [7] Emilio Segrè, "Nuclei and Particles" (Second Edition), The Benjamin/Cummings Publishing Company, 1977.
- [8] D. L. Weathers, J. L. Duggan, R. B. Escue and F. D. McDaniel, *Nucl. Instr. and Meth. A303* (1991) 69-78.
- [9] M. E. Debray, A. J. Kreiner, M. Buhler, M. A. Cardona, D. Hojman, J. M. Kesque, G. Levinton, J. J. Menéndez, F. Naab, M. J. Ozafrán, H. Somacal, M. E. Vázquez. H. Grahmann, M. Davidson, J. Davidson, M. E. Levin, C. A. Mangone, R. L. Caccuri. A. Tokuda, A. A. Eurnekian, D. González, C. López and O.E. Roses. CP392, Application of Accelerators in Research and Industry, American Institute of Physics Press. New York (1997) 567-570.
- [10] E. del Conte y J.L. Sirley, *Acta Zoológica Lilloana* XII (1951) 495-504.
- [11] J. R. Morales, M. I. Dinator, F. Llona, J. Saavedra and F. Falabella, *J. Radioanal. Nucl. Chem., Letters* 187 (1994) 79-89.
- [12] V. Guixé, A. Preller, E. Kessi and T. Ureta, *Arch. Biochem. Biophys.* 348 (1997) 75-81.
- [13] G. Roesijadi, *Aquat. Toxicol.* 22 (1992) 81-87.
- [14] W. J. Langston and S. K. Spence, "Biological Factors Involved in Metal Concentrations Observed in Aquatic Organisms", en "Metal Speciation and Bioavailability in Aquatic

- Sistems", A. Tessier y D. R. Turner eds., John Wiley & Sons, New York (1995), capítulo 9 (407-467).
- [15] M. Baudrimont, S. Andrès, J. Metivaud, Y. Lapaquellerie, F. Ribeyre, N. Maillet, C. Latouche and A. Boudou, *Environ. Toxicol. Chem.* 18 (1999) 2472-2477.
 - [16] S. Andrès, M. Baudrimont, Yvon Lapaquellerie, F. Ribeyre, N. Maillet, C. Latouche and A. Boudou, *Environ. Toxicol. Chem.* 18 (1999) 2462-2471.
 - [17] M. Fonovich de Schroeder, A. F. Preller, F. U. Naab, M. E. Caraballo, A. Burlón, M. A. Cardona, M. Debray, D. Hojman, M. J. Ozafrán, M. E. Vázquez y A. M. Pechén de D'Angelo. *Brasilian Journal of Toxicology*, Vol. 13, N° 1 (2000).
 - [18] A. Mishima, C. Yamamoto, Y. Fujiwara and T. Kaji, *Toxicology* 118 (1997) 85-92.
 - [19] P. J. Dierickx, *ATLA* 24 (1996) 399-403.
 - [20] A. Preller, V. Guixé and T. Ureta, *FEBS Letters* 446 (1999) 149-152.
 - [21] E. Przybttkowski and D. A. Averill-Bates, *Arch. Biochem. Biophys.* 325 (1996) 91-98.
 - [22] S. M. Downs, P. G. Humpherson and H. J. Leese, *Biol. Reprod.* 58 (1998) 1084-1094.
 - [23] I. Fabregat, J. Vitorica, J. Satrustegui and A. Machado, *Arch. Biochem. Biophys.* 236 (1985) 110-118.
 - [24] C. Hogstrand, N. J. Gassman, B. Popova, C. M. Wood and P. J. Walsh, *J. Exp. Biol.* 199 (1996) 2543.
 - [25] B. Sures, W. Steiner, M. Rydlo and H. Taraschewski, *Environ. Toxicol. Chem.* 18 (1999) 2574-2579.
 - [26] D. Bouglé, A. Isfaoun, F. Bureau, D. Neuville, P. Jauzac and P. Arthan, *Biol. Trace Elem. Res.* 67 (1999) 37-48.
 - [27] A. Z. Mason and K. D. Jenkins, "Metal detoxification in aquatic organisms" en "Metal Speciation and Bioavailability in Aquatic Sistems", A. Tessier y D. R. Turner eds., John Wiley & Sons, New York (1995), capítulo 10 (479-608).
 - [28] K. Simkiss and M. G. Taylor, "Transport of metals across membranes" en "Metal Speciation and Bioavailability in Aquatic Sistems", A. Tessier y D. R. Turner eds., John Wiley & Sons, New York (1995), capítulo 1 (1-44).
 - [29] S. W. Teigen, R. A. Andersen, H. L. Daac and J. U. Skaare, *Environ. Toxicol. Chem.* 18 (1999) 2364-2369.
 - [30] P. E. Olsson, M. Zafarullah, R. Foster, T. Hamor and L. Gedamu *Eur. J. Biochem.* 193 (1990) 229-235.

- [31] W. D. Ehmann, W. R. Markesbery, M. Alauddin, T. I. M. Hossain and E. H. Brubaker, *Neuro Toxicology* 7 (1986) 197-206.
- [32] H. Duflou, W. Maenhaut and J. De Reuck, *Biological trace element Research* 13 (1987) 1-17.
- [33] W. Maenhaut, G. Hebbrecht and J. De Reuck, *Nucl. Instr. and Meth.* B75 (1993) 180-187.

CAPÍTULO 5

Resumen y conclusiones

Como hemos visto a lo largo de este trabajo, la técnica de análisis multielemental PIXE consiste de varias etapas. Éstas incluyen la preparación de las muestras, la irradiación de las mismas, el procesamiento y análisis de los espectros de rayos X, y la cuantificación de las concentraciones y corrección por efecto de matriz cuando corresponde.

En el capítulo 1 se plantearon una serie de metas, con el objetivo de optimizar la “performance” de la técnica PIXE con iones pesados para aplicarla a muestras biológicas. La concreción de dichas metas se ve reflejada a través de lo expuesto en cada uno de los capítulos anteriores.

En el capítulo 2, se resume el estado actual de las teorías de los procesos considerados en el cálculo de las secciones eficaces de producción de rayos X característicos, y de producción de radiación de fondo. También se hace una recopilación de publicaciones acerca de datos experimentales, sobre límites de detección para distintos iones incidiendo en distintos tipos de muestras. En particular, resulta interesante mencionar el hecho que la sensibilidad se maximiza para un determinado elemento Z, mediante el uso de proyectiles con número atómico $Z_1=Z+(1 \text{ a } 5)$. Un ejemplo de esto, se muestra en el trabajo realizado en la referencia [1], en donde se utiliza un microhaz de iones pesados de Si, para la determinación de concentraciones de Al en el núcleo de una célula aislada en un paciente con la enfermedad de Alzheimer.

En el capítulo 3 se muestra la disposición del nuevo arreglo experimental, que se logró instalando un nuevo detector de rayos X de muy alta resolución y eficiencia a bajas energías. Este y otro detector convencional se ubican “mirando” la muestra desde ángulos traseros respecto del sentido del haz incidente, lo que permite disminuir los límites de detección. Se implementó un sistema repetitivo y confiable de homogeneización del haz a través de una lámina dispersora de Au, y un nuevo método muy eficiente de digestión de las muestras a través de un digestor a microondas. En las últimas secciones del capítulo 3 se comprobó la precisión y exactitud del método, irradiando soluciones acuosas, muestras dopadas y materiales de referencia de la IAEA.

En el capítulo 4 se presentan las distintas aplicaciones realizadas hasta el momento con muestras biológicas. En relación a la determinación de Al en tejido cerebral humano, como ya se mencionó, se encuentra una correlación significativa entre los valores promedios de las concentraciones de Al, en las muestras correspondientes a los pacientes control y los pacientes con la enfermedad de Alzheimer. Con el nuevo conjunto de muestras analizadas pertenecientes a una paciente control, cuyos datos se exponen en la sección 4.3, se refuerza la hipótesis de bajas concentraciones de Al en estos pacientes. También se estudia la presencia de Al y otros elementos en muestras de líquido sinovial. En las distintas mediciones realizadas correspondientes a varios ensayos biológicos con muestras de distintos órganos de la especie sapo *bufo arenarum*, se aprecia la utilidad de la técnica en la determinación de las concentraciones de varios metales, que junto con los demás resultados del ensayo (mediciones de sobrevida, de la actividad de las enzimas, de la concentración de glutatión endógeno, etc.), permiten comprender los efectos de toxicidad debido a la acumulación o no de los mismos.

Concluyendo, se optimizó la técnica PIXE en el laboratorio Tandar usando iones de ^{16}O , para el análisis de muestras biológicas. Esta técnica es capaz de detectar cantidades de elementos trazas en concentraciones del orden de 1 ppm, en muestras cuya masa original varía habitualmente entre 10 mg y 500 mg.

En cuanto a los futuros trabajos empleando esta facilidad en el laboratorio Tandar, resulta interesante el estudio de plantas, ya que estas reflejan la composición de los suelos, y representan una de las principales vías que introducen trazas de elementos no deseados en el hombre y en los animales. Otro tema interesante es la caracterización multielemental de elementos mayoritarios y trazas, en distintos tipos de tumores. Por otro lado, resulta

extremadamente tentadora la posibilidad de analizar células individuales con una facilidad de micro-PIXE, para la determinación de la distribución espacial de los elementos.

Referencias

- [1] Yumoto, Y. Horino, Y. Mokumo, K. Fujii, S. Kakimi, T. Mizutani, H. Matsushima and A. Ishikawa, Int. J. PIXE 6 (1996) 193-204.

Publicaciones en las que figura como co-autor el Lic. Fabián U. Naab.

- "Evidence for Enhanced Aluminium Concentration in Brain Tissue from Alzheimer's Disease Patients using heavy ion PIXE".

M.E.Debray, A.J.Kreiner, M.Bühler, M.A.Cardona, D.Hojman, J.M.Kesque, G.Levinton, J.J.Menéndez, F.Naab, M.J.Ozafrán, M.E.Vázquez, H.Somacal, H.Grahmann, J.Davidson, M.Davidson, M.E.Levin, C.Mangone, R.Caccuri, A.Tokuda, A.A.Eurnekian, D.González, C.López and O.E.Roses - CP392, "Application of Accelerators in Research and Industry", American Institute of Physics Press, New York (1997) 567-570.

- "Detección de ^{10}B en muestras biológicas utilizando la técnica PIGE (Particle Induced Gamma Ray Emission)".

M.F.Salfity, A.B.Burlón, A.J.Kreiner, M.E.Debray, M.E.Caraballo, D.Hojman, M.A.Cardona, J.M.Kesque, P.Stoliar, F.U.Naab, M.J.Ozafrán, M.E.Vázquez, R.Rey, G.Levinton, J.A.Schuff, M.Davidson, J.Davidson, M.Buhler, L.Policastro, G.Beraldi, L.Bocanera, H.Durán, S. Chimeno, A.Dagrosa, E.Kreimann, M.Pisarev, A.Schwint. Anales AFA. Volumen 10. Publicación de la Asociación Física Argentina, La Plata (1998). 357-360.

- "PIXE Analysis of Atmospheric Aerosols in the City of Buenos Aires".

M.J.Ozafrán, M.E.Vázquez, A.Burlón, M.Buhler, M.A.Cardona, M.E.Debray, D.Hojman, J.M.Kesque, A.J.Kreiner, G.Levinton, F.Naab, P.Stoliar, M.Davidson y J.Davidson. International Journal of PIXE. Volumen 9. Números 1&2 (1999) 21-28.

- "Análisis de Aerosoles Atmosféricos en Dos Sitios de la Ciudad de Buenos Aires".

M. Ozafrán, M.E.Vázquez, A.Burlón, M.Buhler, M.A.Cardona, M.E.Debray, D.Hojman, J.M.Kesque, A.J.Kreiner, G.Levinton, J.J.Menéndez, F.Naab, P.Stoliar, M.Davidson and J.Davidson. Avances en Análisis por Técnicas de rayos X. SARX '98. Volumen X. (2000). 258-261.

- "Acumulación de cinc (Zn) en ovarios de sapo *Bufo arenarum*. Efecto sobre el metabolismo de carbohidratos".

T.M.Fonovich de Schroeder, A.F.Preller, F.U.Naab, M.E.Caraballo, A.Burlón, M.A.Cardona, M. Debray, D.Hojman, M.J.Ozafrán, M.E.Vázquez y A.M.Pechén de D'Angelo. Brazilian Journal of Toxicology, Vol. 13, N° 1 (2000).

- "Coupling modes in doubly odd nuclei: The case of ^{172}Ta ".

D. Hojman, M. A. Cardona, M. Davidson, M. E. Debray, A. J. Kreiner, F. Le Blanc, A. Burlon, J. Davidson, G. Levinton, H. Somacal, J. M. Kesque, F. Naab, M. Ozafrán, P. Stoliar, M. Vázquez, D. R. Napoli, D. Bazzacco, N. Blasi, S. M. Lenzi, G. Lo Bianco, and C. Rossi Alvarez. Physical Review C C61 (2000) 064322 - 1 a 21.

Enviada:

- "Metabolic alterations without metal accumulation in the ovary of adult *Bufo arenarum* females, observed after chronic exposure to Zn^{2+} , followed by toxicity to embryos"

F. Naab, M. Volcomirsky, A. Burlón, M. E. Caraballo, M. E. Debray, J. M. Kesque, A. J. Kreiner, M. Ozafrán, J. A. Schuff, P. Stoliar, M. E. Vázquez, J. Davidson, M. Davidson, and T. M. Fonovich de Schroeder.

Archives of Environmental Contamination and Toxicology (2000).