



FAMAF
Facultad de Matemática,
Astronomía, Física y
Computación



Universidad Nacional de Córdoba

FACULTAD DE MATEMÁTICA, ASTRONOMÍA, FÍSICA Y
COMPUTACIÓN

ANÁLISIS DE CONTENIDO DE FÓSFORO EN CÁNCER MAMARIO POR MICROFLUORESCENCIA DE RAYOS X

Trabajo Especial de Licenciatura en Física

Autora:

Daniela Alejandra Riego

Director:

Roberto Daniel Perez

Febrero 2022

Esta obra está bajo una licencia Creative Commons “Reconocimiento-NoCommercial-SinObraDerivada 4.0 Internacional”.



A mi familia, quien fue, es y será
mi apoyo incondicional en cada
proyecto. Por incentivarme siempre
a seguir mis sueños.

A mis amigas y amigos, que
incluso desde la distancia
han estado siempre presentes.

A Joaquín, mi compañero de vida
desde que emprendí este viaje.
Por ser quien me acompañó en mis
mejores y peores momentos,
tendiéndome la mano para
levantarme las veces necesarias.

A mi director Daniel, por ser
una persona a la que admiro.
Por la paciencia y dedicación,
y por confiar en mí.

Y un agradecimiento especial a mi
profesor de secundaria Pablo Princich,
la persona que desde joven me ayudó
a encontrar mi camino en la ciencia.
Por haberme incentivado
a ser quien soy y quiero ser.
Porque el colegio debería ser un lugar
para sentirse motivado a superarse,
a preguntarse muchas cosas, y sobre todo
un lugar para estar acompañado durante
el difícil camino de pensar en el futuro.
Gracias por ser quien estuvo
en los proyectos que definieron el mío.

A todos, gracias.

Resumen

En el presente trabajo, se ha implementado el Microanálisis por Fluorescencia de Rayos X para el estudio de tejidos neoplásicos. Esta técnica permite un análisis multielemental simultáneo no destructivo, simplificando la tarea laboriosa que implica el análisis elemental tradicional por histoquímica. En particular la micro-XRF permite el monitoreo de fósforo cuya presencia está asociada a microcalcificaciones y al metabolismo tumoral. El fósforo muestra un incremento significativo en tumores malignos por lo que recientemente se lo ha empezado a emplear como posible biomarcador en modelos de prognosis del cáncer de mama. Estudios preliminares llevados a cabo por el grupo de investigación del presente trabajo han mostrado la viabilidad de la metodología propuesta particularmente aplicada en la determinación de fósforo.

Las ventajas de la micro-XRF en el estudio del contenido de metales en tejidos biológicos fueron aprovechadas para el análisis del contenido de fósforo en neoplasias mamarias de un modelo murino. La micro-XRF fue implementada con haz policromático de un tubo de rayos X de cobre eficazmente focalizada en un área de decenas de micrones con óptica de capilares. Para lograr una buena resolución espacial combinada con una precisa cuantificación, las tareas experimentales y tratamiento de datos fueron asistidas mediante la simulación de transporte de radiaciones por técnicas Monte Carlo recurriendo al programa XMI-MSIM de código abierto. En estas tareas, el conocimiento preciso de la modulación sobre el espectro de excitación por la óptica de capilares fue esencial, lo cual se consiguió desarrollando un modelo clásico para el transporte de radiaciones. Además se realizó una cuidadosa evaluación del resto de los parámetros de entrada del programa XMI-MSIM vinculados a la muestra y al sistema de detección. La configuración empleada del programa de simulación fue validada utilizando un material de referencia certificado.

Mediante la precisa cuantificación del fósforo, lograda a partir del eficiente arreglo experimental implementado, se demostró la capacidad de la metodología propuesta para el análisis de fósforo en muestras tumorales.

Abstract

In the present work, X-ray Fluorescence Microanalysis has been implemented for the study of neoplastic tissues. This technique allows a simultaneous non-destructive multi-elemental analysis, simplifying the laborious task that traditional elemental analysis by histochemistry implies. In particular, micro-XRF allows the monitoring of phosphorus, whose presence is associated with microcalcifications and tumor metabolism. The significant increase of phosphorus in malignant tissues recently has begun to be used as a possible biomarker in breast cancer prognosis models. Preliminary studies carried out by the research group of this work have shown the viability of the proposed methodology, particularly applied in the determination of phosphorus.

The advantages of micro-XRF in the study of metal content in biological tissues were used to the follow-up of phosphorus in neoplastic breast tissues of a murine model. Micro-XRF was implemented with a polychromatic X-ray beam from an tube of copper efficiently focused in an area of tens of microns by capillary optics. To achieve a good spatial resolution, combined with precise quantification, the experimental tasks and data processing were assisted by Monte Carlo simulation of radiation transport using the open-source XMI-MSIM program. In these tasks, the precise knowledge of the modulation over the excitation spectrum has been essential which was obtained by the development of a classical model of X-ray transport. In addition, a careful evaluation of the rest of the input parameters of the XMI-MSIM software related to the sample and the detection system was carried out. The employed configuration of the simulation software was validated using a certified reference material.

Through the precise quantification of phosphorus, achieved from the implemented efficient experimental set-up, the capacity of the proposed methodology for the analysis of tumor samples was demonstrated.

Índice general

1. Introducción	3
1.1. Objetivos y alcances de éste trabajo	3
1.2. Metodología empleada	4
1.2.1. Facilidades disponibles	4
1.2.2. Muestras analizadas	5
1.2.3. Análisis de fósforo por micro-XRF	5
2. Conceptos básicos de la interacción de la radiación con la materia	6
2.1. Naturaleza de los rayos X	6
2.2. Modelo del átomo	7
2.3. Bremsstrahlung	7
2.4. Interacción de fotones con la materia	9
2.4.1. Absorción fotoeléctrica	9
2.4.2. Dispersión coherente o Rayleigh	10
2.4.3. Dispersión incoherente o Compton	11
2.4.4. Producción de pares	11
2.5. Atenuación de los rayos X con la materia	12
2.6. Fluorescencia de rayos X	12
2.6.1. Producción de fluorescencia	13
2.6.2. Radiación característica	13
2.7. Espectrometría por XRF	14
2.7.1. Detectores semiconductores	14
2.7.2. Resolución en energía	15
2.7.3. Eficiencia del detector	16
2.7.4. Análisis del solapamiento de intensidades de fluorescencia para líneas de energías próximas	17
2.7.5. Picos de escape en detectores de Si(Li)	17
3. Cálculo analítico de la transmisión en un monocapilar	19
3.1. Introducción	19
3.2. Modelo teórico	20
3.2.1. Principios físicos de lentes para rayos X	20
3.2.2. Transmisión teórica del monocapilar	29
3.3. Metodología y materiales	33
3.4. Resultados y discusiones	34
3.5. Conclusión	39

4. Método para cuantificación elemental por micro-XRF de tejidos biológicos mediante simulaciones Monte Carlo.	40
4.1. Introducción	40
4.2. Materiales y métodos	41
4.2.1. Preparación de muestras	41
4.2.2. Análisis histológico	41
4.2.3. Análisis por micro-XRF	42
4.2.4. Simulación Monte Carlo de la micro-XRF	43
4.2.5. Modelado de muestras tumorales para micro-XRF	44
4.2.6. Cuantificación de P mediante estándares virtuales externos	46
4.2.7. Obtención del límite de detección	46
4.2.8. Aplicación del arreglo experimental en laboratorio convencional	47
4.3. Resultados y discusiones	48
4.3.1. Parámetros de entrada para software de simulación	48
4.3.2. Validación de los parámetros de simulación	49
4.3.3. Validación de la matriz de muestras tumorales para micro-XRF	50
4.3.4. Cuantificación de P mediante estándares virtuales externos	53
4.3.5. Límite de detección	54
4.3.6. Aplicación de la metodología	55
4.4. Conclusión	56
5. Conclusión y perspectivas a futuro	57

Capítulo 1

Introducción

1.1. Objetivos y alcances de éste trabajo

La microfluorescencia de rayos X (micro-XRF) es una técnica analítica no destructiva capaz de cuantificar simultáneamente un gran número de elementos químicos. Se trata de una potente técnica instrumental que en las últimas décadas ha comenzado a ser adoptada gradualmente en múltiples campos de aplicación [1, 2]. Una de las razones de esta amplia difusión son los mínimos requerimientos en la preparación de muestras que proporciona una notable versatilidad a los procedimientos analíticos. Además, la micro-XRF ha comenzado a ser más accesible para laboratorios convencionales gracias a los recientes avances en fuentes, detectores y ópticas en el rango de los rayos X [1, 3]. En este contexto se espera que nuevas aplicaciones surjan especialmente en áreas de medicina y biología donde la técnica es particularmente ventajosa. Efectivamente, la elevada sensibilidad para análisis de trazas en muestras próximas a su estado natural, incluyendo la posibilidad de análisis *in vivo*, resulta muy atractiva en estas áreas [3]. Esto se enfatiza en histoquímica, la ciencia que estudia la composición química de tejidos biológicos.

En el análisis elemental tradicional por histoquímica, los tejidos son marcados con tinturas específicas para cada elemento [4]. Esta es una tarea laboriosa que puede simplificarse considerablemente por la micro-XRF, principalmente porque permite un análisis multielemental simultáneo no destructivo. Varios reportes han mostrado ampliamente el potencial de la micro-XRF en histoquímica [3, 5]. En particular, ha sido empleada para monitorear el incremento del contenido de metales en tejidos neoplásicos mostrando que algunos metales pueden ser usados como biomarcadores en modelos de prognosis del cáncer de mama [6]. Estos resultados convincentes sugieren que nueva información sobre el metabolismo del cáncer de mama puede encontrarse en el estudio de otros elementos. El fósforo es un buen candidato para este propósito puesto que se sabe que juega un rol importante en el metabolismo de las células en general.

En el análisis de muestras de cáncer de mama por micro-XRF, la detección de fósforo ha estado principalmente asociada a la identificación y caracterización de microcalcificaciones en biopsias [7, 8]. Las microcalcificaciones juegan un papel crucial en el diagnóstico de cáncer de mama ya que en mamografías usadas como guía logran revelar *in situ* hasta un 90% de carcinomas ductales. Con el aporte de la micro-XRF asociada a la histología convencional puede también emplearse como un novedoso factor de prognosis en lesiones de mama. El procedimiento analítico consiste en la irradiación directa de los micro-cristales calcificados donde la

distribución espacial de calcio muestra un pico intenso. Una precisa cuantificación de fósforo y calcio permite inferir la variedad de cristal calcificado que principalmente pueden ser oxalatos de calcio o especies de hidroxiapatita. Se ha encontrado que la presencia de hidroxiapatitas está estrictamente relacionada con lesiones malignas mientras que las lesiones benignas son exclusivamente compuestas de oxalatos [7]. La detección de fósforo es crucial en la identificación de estos cristales ya que solo se encuentra presente en hidroxiapatitas y no en oxalatos.

Recientemente el contenido de fósforo también ha sido empleado para monitorear la actividad metabólica de células tumorales puesto que este elemento juega un rol importante en el crecimiento del cáncer. Numerosos investigadores han reportado que la cantidad de fósforo en sangre de pacientes con cáncer se incrementa y que además las células tumorales consumen compuestos fosforados aproximadamente seis veces más de lo normal [9, 10]. Por contrapartida, la reducción de los niveles de fósforo en sangre produce una considerable reducción del tamaño del tumor [11]. Motivados por estos resultados, recientemente algunos autores han propuesto a la concentración de fósforo en el microambiente tumoral como un nuevo marcador del progreso de tumores [12, 13, 14].

En el presente trabajo se propuso como objetivo realizar actividades experimentales y tratamiento de datos que contribuyan al desarrollo de una metodología para el análisis del fósforo en tejidos tumorales por micro-XRF. Dado que para tomar al fósforo como biomarcador se requería una buena resolución espacial combinada con una precisa cuantificación, y ésto representaba un fuerte desafío debido a las complicaciones técnicas involucradas en la detección de la emisión de fluorescencia de rayos X de este elemento en particular, se optó por fortalecer las tareas experimentales y tratamiento de datos con el apoyo de la simulación de transporte de radiaciones por técnicas Monte Carlo recurriendo al programa XMI-MSIM de código abierto [15]. En el capítulo 4 se desarrolla en detalle la cuantificación elemental por micro-XRF utilizando simulación por Monte Carlo.

La descripción precisa del espectro incidente resulta un factor importante al momento de conseguir resultados que se ajusten a las mediciones en el laboratorio. Para lograr esto se desarrolló un modelo teórico que se validó experimentalmente con asistencia de simulación del transporte de rayos X. En el capítulo 3 se describe en detalle dicho modelo.

1.2. Metodología empleada

1.2.1. Facilidades disponibles

Se empleó un tubo de rayos X de alta potencia (1,5kW) marca Philips PW2223/20 con ánodo de Cu. Con este tubo se ha desarrollado un espectrómetro dispersivo en energía para el microanálisis por micro-XRF. En esta geometría el tubo de rayos X se ha acoplado a un monocapilar cónico de vidrio que produce un haz de baja divergencia en un área circular de 0,3mm de diámetro. Dependiendo de la aplicación la lente puede ser intercambiada por una menos aguda de manera de irradiar una mayor área circular que actualmente puede ser de 40, 100, 300 y 500 micrómetros de diámetro. La emisión por Fluorescencia de rayos X (XRF) es registrada por un detector de diodo de Si marca AMPTEK modelo XR100T. El sistema cuenta con un portamuestras con movimientos en las tres direcciones ortogonales controladas manualmente por computadora y con una resolución de 0,6 micrones.

1.2.2. Muestras analizadas

Se analizaron tumores mamarios fijados en parafina similares a las biopsias extraídas para el diagnóstico tradicional de cáncer de mama. Este tipo de preparación de muestra se utiliza rutinariamente en laboratorios de histología para estudiar tejidos blandos a nivel microscópico permitiendo almacenar las muestras para una posible posterior revisión de los resultados. La medición de la distribución espacial de fósforo en este tipo de muestras por micro-XRF permitiría incorporar la técnica a numerosos experimentos en marcha y además realizar estudios retrospectivos en experimentos ya finalizados. Esto se realizó en el marco de proyectos de cooperación vigentes FaMAF-FCM que permitió el acceso al banco de muestras de la FCM.

Estudios preliminares llevados a cabo por el grupo de investigación en el cuál se encuentra inserto éste trabajo, han mostrado la viabilidad de la metodología propuesta particularmente aplicada en la determinación de fósforo [18]. Se utilizaron los estudios histopatológicos y microfotografías obtenidas previamente por especialistas de la FCM para caracterizar los tejidos neoplásicos de manera de seleccionar eficientemente las áreas para el estudio por micro-XRF.

Para reducir el tiempo de cuantificación en el método de Simulación Monte Carlo, se simuló previamente la emisión XRF de fósforo de muestras virtuales con una matriz similar a las muestras incógnitas (estándares virtuales). De esta manera fue posible confeccionar una curva de calibración que vincula precisamente la señal XRF registrada para fósforo con su concentración en la matriz.

1.2.3. Análisis de fósforo por micro-XRF

La emisión XRF no tiene una dependencia lineal con las concentraciones elementales debido a que es afectada por efectos de atenuación y reforzamiento comúnmente llamados efectos de matriz. Este efecto es particularmente notable en la cuantificación de fósforo debido a que la emisión XRF de este elemento es poco penetrante y es reforzada por la matriz. Para corregir estos efectos de matriz se recurrió a simulaciones Monte Carlo que realicen una reconstitución virtual de la matriz. Este procedimiento se ha empleado exitosamente en la certificación de materiales de referencia por XRF caracterizándose por un alto grado de precisión en los resultados [16]. Esto es una consecuencia de la posibilidad de un seguimiento preciso del transporte de partículas en la matriz que brinda la simulación Monte Carlo.

Para llevar adelante las cuantificaciones de fósforo por este método se empleó el software libre XMI-MSIM que permite realizar simulaciones Monte Carlo especialmente orientadas al análisis por XRF [15].

Para aplicar el método de Simulaciones Monte Carlo, resultó esencial el conocimiento preciso del espectro de excitación. En el caso de la micro-XRF en laboratorios convencionales, donde usualmente se emplea un tubo de rayos X combinado con sistemas de focalización, el espectro de excitación no puede ser medido directamente a la salida de la lente porque el flujo de fotones es demasiado alto para detectores dispersivos en energía. En consecuencia, se deben utilizar métodos indirectos para la determinación del espectro de excitación. El grupo de investigación del presente trabajo ha realizado estudios previos sobre las estrategias actualmente empleadas en estos métodos de medición [17]. En esta tesis se ha desarrollado una metodología nueva basada en un modelo clásico del transporte de radiaciones asistida por simulación Monte Carlo que aprovecha trabajos previos en el tema.

Capítulo 2

Conceptos básicos de la interacción de la radiación con la materia

Este capítulo comienza con una breve descripción de los principales tipos de interacción de la radiación con la materia y procede a introducir los conceptos físicos utilizados en el análisis convencional por fluorescencia de rayos X (XRF). Tras describir el formalismo teórico propio de los rayos X y del átomo, se describe el espectro continuo de rayos X producido por *Bremstrahlung*, que forma parte del espectro de los tubos de rayos X comúnmente usados en espectroscopia por fluorescencia de rayos X. Posteriormente se introducen las secciones eficaces de mayor relevancia a la hora de caracterizar los espectros generados por dichos tubos, para luego destacar la sucesión de eventos que dan lugar a la emisión de radiación característica mediante la excitación por rayos X, efecto denominado fluorescencia de rayos X en la jerga espectroscópica. Por último se describe el funcionamiento de los detectores que permiten el procesamiento y estudio de la radiación en cuestión, con su correspondiente resolución en energías y eficiencia.

2.1. Naturaleza de los rayos X

Los rayos X representan la radiación electromagnética generada por emisión radiativa de átomos excitados (radiación característica) o por conversión de energía cinética de partículas cargadas en radiación (*Bremsstrahlung*). Dicha definición sitúa a los rayos X en la escala comprendida entre los rayos γ de corta longitud de onda y el ultravioleta lejano, con valores de longitud de onda entre $0,01\text{\AA}$ y 100\AA . Al igual que todo tipo de radiación electromagnética, los rayos X pueden ser tratados como onda transversal o como partícula.

Esta dualidad onda-partícula se expresa a través de la relación de Einstein:

$$E[\text{keV}] = h\nu = \frac{12,397}{\lambda[\text{\AA}]} \quad (2.1)$$

Aquí E es la energía del fotón, h la constante de Planck, ν la frecuencia de la onda electromagnética y λ su longitud de onda.

una longitud de onda mínima asociada a la energía máxima de los electrones interactuantes:

$$\lambda_{min} = \frac{hc}{eV_0} \quad (2.2)$$

siendo c la velocidad de la luz, e la carga elemental y V_0 la diferencia de potencial aplicada para acelerar los electrones.

Antes de ser parcialmente absorbido en el material excitado, el bremsstrahlung es isotrópico, no polarizado y tiene una distribución espectral lineal con la energía. La fórmula matemática correspondiente, que surge de aplicar los métodos de la mecánica cuántica, se muestra a continuación [20]:

$$I(E)dE = \begin{cases} AZ(E_0 - E) & \text{si } E < E_0 \\ 0 & \text{si } E > E_0 \end{cases} \quad (2.3)$$

siendo A una constante de proporcionalidad, Z el número atómico del blanco y E_0 la energía máxima de los electrones interactuantes. Puesto que la absorción de los rayos X depende de la energía, los fotones generados que emergen del material excitado tienen una distribución espectral diferente a la mostrada anteriormente. En este caso, el espectro tiene un máximo principal y decae considerablemente a medida que aumenta la longitud de onda, según se muestra en la Figura 2.2.

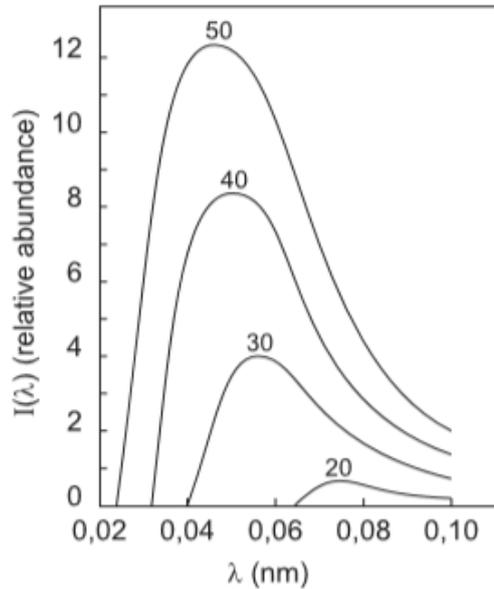


Figura 2.2: Distribución espectral bremsstrahlung para 20, 30, 40 y 50 kV.

Independientemente de la naturaleza del material excitado, el máximo principal ocurre aproximadamente a la energía $\frac{2}{3}E_0$ [21]. Una descripción aproximada del bremsstrahlung es fundamental en las técnicas espectroscópicas por fluorescencia de rayos X. En particular, la distribución espectral del bremsstrahlung generado en tubos de rayos X resulta de gran importancia en el análisis multielemental cuantitativo por XRF. La manera usual de obtener tal

descripción es utilizando funciones empíricas que ajustan adecuadamente el espectro continuo [22].

2.4. Interacción de fotones con la materia

Existen cuatro tipos de interacciones entre un átomo y un fotón que predominan probabilísticamente en el rango de energías de los rayos X, siendo la sección eficaz de cada interacción quien da cuenta de mayor o menor probabilidad de ocurrencia. Estas son el dispersión coherente o Rayleigh, el dispersión incoherente o Compton, la absorción fotoeléctrica y la producción de pares. En el rango de 10 a 100keV, dependiendo de Z , los fotones son absorbidos principalmente por efecto fotoeléctrico, en tanto que para mayores energías hasta los $\sim 10\text{MeV}$ y materiales de Z muy bajo, el dispersión Compton predomina. Para energías mayores a esta la producción de pares es el proceso predominante [23].

En la Figura 2.3 se muestran cualitativamente los cuatro procesos mencionados.

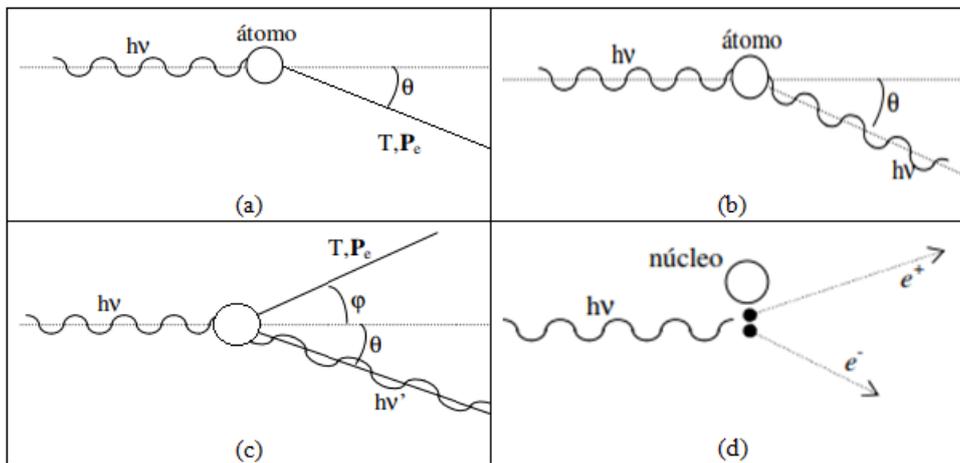


Figura 2.3: (a) Efecto fotoeléctrico, (b) dispersión Rayleigh, (c) efecto Compton y (d) producción de pares.

2.4.1. Absorción fotoeléctrica

En el caso de la radiación electromagnética, la ionización de capas atómicas internas es el resultado del efecto fotoeléctrico, dejando al átomo en un nivel excitado. El electrón expulsado adquiere una energía cinética dada por la diferencia entre la energía del fotón incidente y su energía de ligadura. Puesto que en los análisis por XRF se utiliza predominantemente la radiación característica generada en decaimientos hacia las capas K y L, será descrita la absorción fotoeléctrica solo en torno a estas capas atómicas.

La magnitud τ que cuantifica la probabilidad de ocurrencia de este fenómeno es el coeficiente másico de absorción fotoeléctrico. Una excelente aproximación de esta magnitud, que permite comprender su comportamiento en función de la energía $E[\text{keV}]$ del fotón incidente y de la naturaleza del medio absorbente, se muestra a continuación [24]:

$$\frac{\tau N_A}{A} = \begin{cases} \frac{30,3Z^{3,94}}{AE^3} & \text{si } E > E_K \\ \frac{0,978Z^{4,30}}{AE^3} & \text{si } E_{L1} < E < E_K \\ \frac{0,78Z^{3,94}}{AE^3} & \text{si } E_{M1} < E < E_{L3} \end{cases} \quad (2.4)$$

siendo N_A el número de Avogadro, A el peso atómico del medio absorbente, Z su número atómico y E_X la energía de ligadura de la capa atómica X. Esta expresión tiene una abrupta discontinuidad en $E = E_K$ y es causada porque la energía del fotón incidente comienza a expulsar electrones de la capa K para $E \geq E_K$. Este tipo de discontinuidad es observada a la energía de ligadura de cada una de las restantes capas atómicas y se denominada usualmente **salto de borde**, mientras que en este contexto su energía de ligadura se denomina **borde de absorción**. El salto de borde j_X de una capa atómica X se expresa cuantitativamente a través de la siguiente expresión:

$$j_X = \frac{\tau_{>}}{\tau_{<}} \quad (2.5)$$

siendo $\tau_{<}$ el valor de τ justo por debajo de E_X y $\tau_{>}$ el valor de τ justo por encima de E_X . En términos de j_X es posible obtener la fracción k_X de fotones absorbidos en la capa X mediante la ecuación:

$$k_X = \frac{j_X - 1}{j_X} \quad (2.6)$$

Aquí se ha asumido que k_X es independiente de la energía de los fotones incidentes lo cual es una muy buena aproximación. Esta sencilla expresión permite demostrar que aproximadamente el 80% del proceso de absorción fotoeléctrico tiene lugar en la capa K para cualquier átomo absorbente, siempre y cuando sea $E \geq E_K$ [25].

En consecuencia, la radiación característica asociada a la capa K es la más intensa, lo cual justifica porque es la más utilizada en la espectroscopia por fluorescencia de rayos X. La independencia de k_X con E y el rápido decrecimiento de τ con E, permiten deducir que la mayor eficiencia de ionización de una determinada capa X se consigue cuando la energía del fotón incidente es próxima a la energía de ligadura E_X . Los parámetros presentados anteriormente pueden ser obtenidos de diversas fuentes de la literatura, siendo una de las más destacadas las tablas de McMaster et al., válidas para 87 elementos en el rango energético entre 1keV y 1MeV [26].

2.4.2. Dispersión coherente o Rayleigh

El átomo permanece en el estado original y el fotón desvía su trayectoria en un ángulo diferente sin pérdida de energía. Aquí la sección eficaz diferencial atómica se escribe en términos de la sección eficaz diferencial de un átomo aislado (dispersión Thompson), la cual, para radiación electromagnética no polarizada es:

$$\frac{d\sigma_T}{d\Omega} = \frac{1 + \cos(\theta)^2}{2} r_0^2 \quad (2.7)$$

Aquí θ es el ángulo que describe el cambio de la dirección original del fotón.

Para tener en cuenta la dispersión de Z electrones, la dispersión Rayleigh se puede escribir:

$$\frac{d\sigma}{d\Omega} = \frac{d\sigma_T}{d\Omega} F(q)^2 \quad (2.8)$$

Aquí $F(q)$ es el factor de forma atómico para la dispersión en un ángulo θ (entre trayectoria original y la dispersada), y q el momento transferido. Los valores de $F(q)$ se computan en varias tablas para diferentes modelos de densidad electrónica [27, 28].

2.4.3. Dispersión incoherente o Compton

En este tipo de interacción un electrón es eyectado produciendo la ionización del átomo, y un nuevo fotón con energía menor a la del incidente es emitido. Bajo el estudio de la cinemática de la dispersión de un electrón libre con fotones no polarizados se puede obtener el corrimiento en longitud de onda del fotón incidente:

$$\lambda' - \lambda_0 = \lambda_C(1 - \cos(\theta)) \quad (2.9)$$

donde $\lambda_C \equiv \frac{h}{mc} = 2,426 \times 10^{-10} \text{cm}$ es la longitud de onda Compton del electrón. Observar que el corrimiento Compton sólo depende del ángulo de dispersión del fotón, y no de la energía del fotón incidente.

De igual manera, para fotones incidentes de una dada energía $h\nu_0$ se obtiene la sección eficaz diferencial Compton para un electrón libre, conocida como fórmula de Klein-Nishina, cuya expresión para un haz no polarizado es:

$$\frac{d\sigma_{KN}}{d\Omega} = \frac{r_0^2}{2} \frac{\nu'^2}{\nu_0^2} \left[\frac{\nu}{\nu'} + \frac{\nu'}{\nu_0} - \sin^2(\theta) \right] \quad (2.10)$$

Con las consideraciones anteriores se puede dar una expresión para la sección eficaz diferencial Compton para los electrones de un átomo a partir de la de un electrón libre:

$$\frac{d\sigma_{atom}}{d\Omega} = \frac{d\sigma_{KN}}{d\Omega} S(q, Z) \quad (2.11)$$

donde $S(q, Z)$ es la función de dispersión incoherente para dicho átomo que describe los efectos de las energías de ligadura de electrones en diferentes capas atómicas. Al igual que en la sección 2.4.2 para $F(q)$, hay tablas completas para $S(q, Z)$ [27, 28].

2.4.4. Producción de pares

En este proceso el fotón incidente interactúa con el campo eléctrico del núcleo creando un par electrón-positrón (producción de pares nuclear), o lo hace con un electrón atómico (producción de pares electrónica, llamada también producción de triplete). El fotón pierde toda su energía. La sección eficaz total de producción de pares nuclear y atómica se hayan en la mayoría de los libros introductorios a la interacción de la radiación con la materia [23].

2.5. Atenuación de los rayos X con la materia

Para un haz de fotones delgado, paralelo y monocromático, la atenuación en un medio material homogéneo es descripta por la ley exponencial [25]:

$$I = I_0 e^{\mu^* t} \quad (2.12)$$

donde I_0 es la intensidad del haz incidente, I la intensidad transmitida, t el espesor del absorbente y μ^* su coeficiente de atenuación lineal. En la espectroscopia por fluorescencia de rayos X es válido asumir que el coeficiente de atenuación lineal se compone de un término de absorción fotoeléctrica y de un término de dispersión [24]:

$$\mu^* = \tau^* + \sigma^* \quad (2.13)$$

siendo τ^* el coeficiente lineal de absorción fotoeléctrica, analizado anteriormente, y σ^* el coeficiente lineal de dispersión.

Los coeficientes máscicos μ , τ y σ se obtienen de sus correspondientes coeficientes lineales μ^* , τ^* y σ^* dividiendo estos últimos por la densidad del medio absorbente. Los valores de μ , τ y σ para 87 elementos de la tabla periódica se encuentran tabulados en la referencia [26].

A diferencia de los coeficientes lineales, los coeficientes máscicos son independientes de las fluctuaciones en densidad de los elementos, por lo que son preferentemente tabulados en la literatura.

Si el absorbente es un compuesto químico o una mezcla, su coeficiente de atenuación máscico μ puede evaluarse aproximadamente utilizando los coeficientes máscicos μ_i de los elementos constituyentes según la fórmula del promedio pesado [29]:

$$\mu = \sum_{i=1}^n W_i \mu_i \quad (2.14)$$

donde W_i es la fracción en peso del i -ésimo elemento y n el número total de elementos en el absorbente.

2.6. Fluorescencia de rayos X

Una vez ocurrida la absorción fotoeléctrica, se genera una vacancia en la capa correspondiente al electrón eyectado, la cuál puede llenarse por un electrón de una capa más alta, mediante la caída de un electrón proveniente de esta última. En dicho proceso un fotón es emitido, cuya energía es igual a la diferencia de energía entre las dos capas. A dichos fotones se los denomina rayos X característicos, porque su energía es característica de los niveles atómicos de energía en cuestión. Al proceso de emisión de fotones característicos luego de una fotoabsorción se lo denomina fluorescencia de rayos X (XRF). Con dicha definición, se procede a realizar una descripción más detallada de este proceso, el cual involucra el estudio de los métodos de ionización en capas atómicas internas ya descrito, y los detalles de las transiciones electrónicas de un átomo. A continuación se presenta un resumen de los conceptos más relevantes.

2.6.1. Producción de fluorescencia

Las vacancias en capas atómicas internas se llenan con electrones atómicos que entregan energía durante el proceso. Como ya fue mencionado, esta energía se manifiesta como radiación característica, pero también existe la posibilidad de que sea invertida para liberar otro electrón atómico. El primer proceso se conoce como transición radiativa, mientras que el segundo se conoce como transición no radiativa, siendo estas últimas subdivididas a su vez en transiciones Auger y transiciones Coster-Kronig. En una transición Auger, el electrón que llena la vacancia pertenece a una capa atómica menos ligada que la capa atómica vacante. En cambio, en una transición Coster-Kronig, el electrón que llena la vacancia pertenece a la misma capa atómica vacante, pero a una subcapa menos ligada. Este tipo de transiciones no ocurre en la capa K, ya que ésta no se subdivide en subcapas componentes, pero sí se manifiesta en las capas atómicas restantes. Las transiciones no radiativas son dominantes para los elementos livianos, por lo que la sensibilidad del análisis por XRF disminuye para tales elementos. La probabilidad de ocurrencia de transiciones radiativas en una determinada capa atómica x se denomina producción de fluorescencia ω_X y se define como:

$$\omega_X = \frac{I_X}{n_X} \quad (2.15)$$

siendo I_X el número total de fotones característicos emitidos por decaimientos a X y n_X el número de vacancias electrónicas creadas en X. La presencia de transiciones no radiativas restringe los valores de ω_X entre 0 y 1, siendo para elementos livianos próximos a 0. Existe en la literatura una gran cantidad de resultados teóricos y experimentales sobre las producciones de fluorescencia, dentro de los que destacan los resultados teóricos de Puri et al. [30] y la recopilación de Bambynek et al.[19].

2.6.2. Radiación característica

La energía E de un fotón característico producido en una transición radiativa desde la capa X_2 hacia la capa más ligada X_1 está dada por la relación:

$$E = (E_{X_1} - E_{X_2}) \quad (2.16)$$

siendo E_{X_i} la energía de ligadura de la capa atómica X_i . La teoría del espectro de rayos X revela la existencia de un número limitado de transiciones permitidas. Las de mayor intensidad son las transiciones dipolares eléctricas gobernadas por las siguientes reglas de selección [31]:

$$\Delta l = \pm 1 \quad \Delta j = 0, \pm 1 \quad (2.17)$$

Las transiciones radiativas que están prohibidas como dipolares eléctricas pueden aparecer como transiciones radiativas multipolares. Las más intensas son las transiciones dipolares magnéticas y las cuadrupolares eléctricas [31], pero debido a su baja intensidad en comparación con las dipolares eléctricas son poco usadas en el análisis por XRF. A cada línea generada en decaimientos hacia una capa X le corresponde una fracción de la intensidad radiativa total producida en tales decaimientos. Estas fracciones de línea pueden obtenerse en varias tabulaciones de la literatura entre las que destaca la de Khan y Karimi [32]. Las líneas más intensas son las $K_{\alpha 1}$, $K_{\alpha 2}$, $L_{\alpha 1}$ y $L_{\alpha 2}$ por lo que son predominantemente utilizadas en espectroscopia de rayos X.

2.7. Espectrometría por XRF

En espectrometría por XRF existen dos configuraciones posibles: dispersiva en energía (EDXRF) y dispersiva en longitud de ondas (WDXRF). La EDXRF se caracteriza por utilizar detectores de estado sólido que miden directamente la energía e intensidad de los rayos X mediante la ionización producida en un material semiconductor adecuado. Entre sus principales características se encuentra la simultaneidad de medición en un amplio rango de energías.

La WDXRF utiliza un cristal analizador para seleccionar la longitud de onda de los rayos X incidentes mediante reflexión de Bragg. En esta configuración el espectro incidente se obtiene de manera secuencial barriendo el rango de longitudes de onda de interés. Las principales diferencias entre las configuraciones EDXRF y WDXRF son el tiempo de adquisición y la resolución en energías. Mientras que la EDXRF ofrece un bajo tiempo de adquisición debido al procesamiento simultáneo del espectro incidente, la WDXRF permite resoluciones espectrales de decenas de electronvolts superando por un orden de magnitud a la alcanzada por la EDXRF, pero para lo cual se necesita un mayor tiempo de medición [24].

2.7.1. Detectores semiconductores

En este tipo de detectores, la ionización producida por cada fotón que entra al detector es convertida a una señal de voltaje con amplitud proporcional a la energía incidente. Se emplean procesos electrónicos que pre amplifican y procesan la señal para mantener y aumentar la proporcionalidad entre la señal del voltaje y el pulso de carga original. Un conversor analógico-digital acumula el espectro de la secuencia de eventos en una memoria de histograma (multicanal). Cabe destacar que el análisis de energías no depende de la difracción o el enfoque de los rayos X por el detector, así la geometría del sistema es relativamente insensible al desplazamiento del detector con respecto a la muestra, pudiendo acercarlo y alejarlo con cierta libertad de esta para lograr mayor eficiencia. Así, la principal ventaja de EDXRF deriva de su capacidad de detecciones simultáneas con alta eficiencia geométrica.

La detección dispersiva en energía aprovecha algunas de las propiedades de los diodos semiconductores. La Figura 2.4 muestra el esquema particular de un detector de Si(Li) cuya estructura es representativa de los detectores de estado sólido más comunes. Dicho dispositivo ha sido fabricado sobre un material semiconductor de alta calidad con contactos rectificadores p o n en superficies opuestas. El volumen del material se caracteriza por una concentración de portadores de carga libres muy baja minimizada por el enfriamiento termoeléctrico del cristal.

En la geometría dispuesta en la Figura 2.4, la región dopada con litio actúa como un contacto n y la superficie de oro sirve como el contacto p rectificador. Cuando el diodo se polariza inversamente todos los portadores libres son barridos fuera del volumen del cristal creando una región de agotamiento activa por donde no hay corriente eléctrica. Entonces, cuando un fotón de rayos X es totalmente absorbido en el volumen activo del diodo creará una vacante (hueco) junto con un fotoelectrón energético. Este fotoelectrón interactuará con los átomos en la red cristalina del semiconductor produciendo múltiples eventos de ionización de baja energía. Este proceso continuará hasta que el electrón se detenga al final de su recorrido total, que es corto en comparación con las dimensiones del cristal.

El resultado de este proceso de ionización múltiple es la producción esencialmente instantánea de un gran número de pares de electrones-huecos libres en el volumen activo del diodo. Estos portadores de carga son movidos por el voltaje inverso del diodo formando un pulso de

corriente eléctrica. En el ejemplo de la Figura 2.4, el contacto eléctrico del detector frontal predispuesto a 500 V atrae al hueco y repele los electrones creando un pulso de corriente que es colectado por el circuito amplificador.

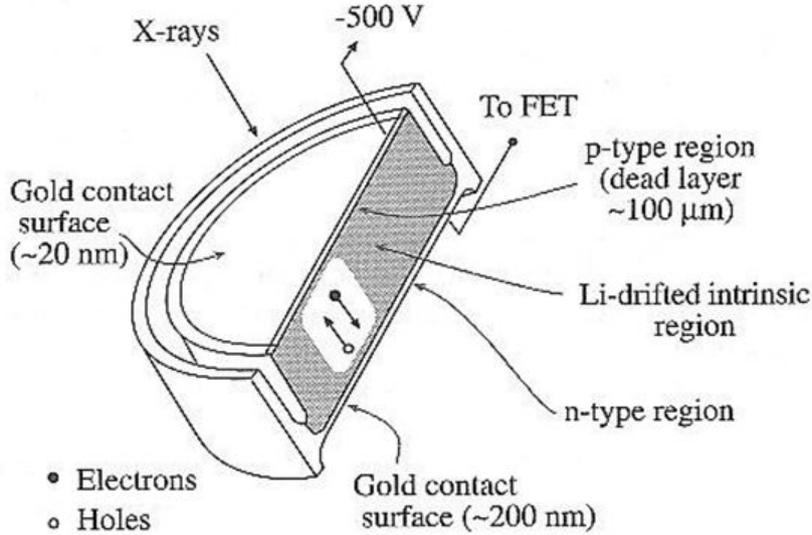


Figura 2.4: Sección transversal típica de un detector Si(Li) que muestra superficie de contacto y volumen activo.

El número de portadores de carga producidos es directamente proporcional a la energía del fotón de rayos X incidente en el detector. Por lo tanto, el número de cargas recogidas da como resultado un pulso de corriente cuya magnitud es, a su vez, directamente proporcional a la energía del fotón detectado.

2.7.2. Resolución en energía

La resolución de la energía de un detector semiconductor determina la habilidad de este para resolver rayos X característicos para muestras multielementales. Es común definir el ancho total a la mitad del máximo (FWHM en inglés) de la distribución de la altura del pulso medida para un fotón monocromático a una energía específica. Por convención, la resolución de un detector se especifica para la línea K_{α} del manganeso ponderada a 5,895 keV debido a que dichas líneas son de energía lo suficientemente pequeña como para que la contribución del FWHM del doblete $K_{\alpha 1} + K_{\alpha 2}$ (5,898 y 5,887 keV, respectivamente) y el ancho intrínseco de las líneas de emisión puedan ser despreciadas. Esta línea de emisión está fácilmente disponible a partir de las fuentes de radioisótopos de ^{55}Fe (ver Figura 2.5).

El FWHM de la línea de rayos X medido, o ΔE_{total} , es la suma en cuadratura, de la contribución debida solamente al proceso del detector ΔE_{Det} , y la asociada con el sistema de procesamiento del pulso ΔE_{Elec} (ruido electrónico):

$$FWHM = \Delta E_{total} = \sqrt{\Delta E_{Det}^2 + \Delta E_{Elec}^2} \quad (2.18)$$

La componente ΔE_{Det} es determinada por la estadística asociada al proceso de producción de cargas libres ocurridas en el volumen agotado del diodo. El número promedio de pares

electrón-hueco producido por un fotón incidente puede ser calculado como la energía total del fotón dividida por la energía media requerida para producir un solo par electrón-hueco. Si la energía media para la creación de un par electrón-hueco es ϵ (3,8eV), el número de pares electrón-hueco generado en la detección de un fotón con energía E es en realidad una variable aleatoria cuyo valor medio es $\frac{E}{\epsilon}$.

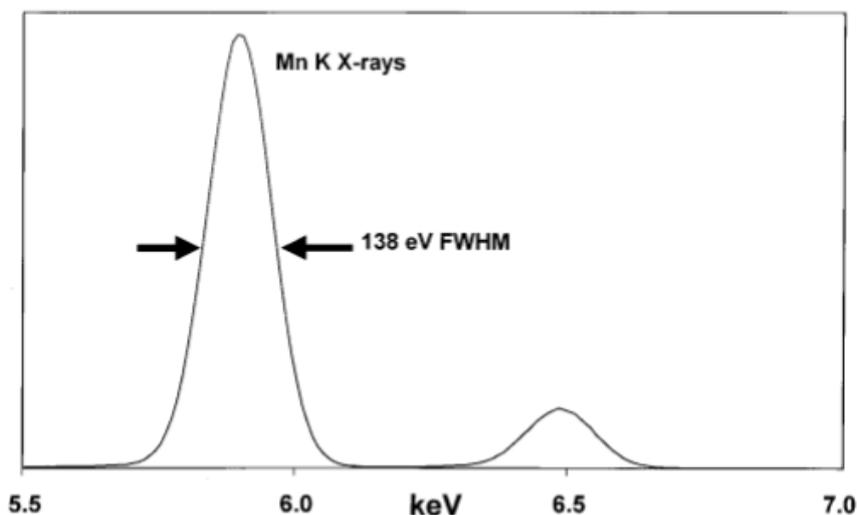


Figure 12 Pulse–height spectrum of MnK x-rays taken with a 30-mm² Si(Li) detector.

Figura 2.5: Altura del pulso espectral de rayos X de Mn K_α tomado con un detector Si(Li) de 30 mm².

Debido a que el proceso de producción de pares electrón-hueco no es exactamente estocástico (aleatorio) su distribución estadística se aparta de la de Poisson, ésto se corrige introduciendo el factor de Fano F (el cuál mide éste apartamiento). Así obtenemos una desviación cuadrática media σ para la variable estocástica debida a la estadística cuya forma es:

$$\sigma = \sqrt{\frac{FE}{\epsilon}} \quad (2.19)$$

El error cuadrático medio para la energía se obtiene multiplicando este error por ϵ ; sin embargo, la incertidumbre en la energía ΔE_{Det} suele caracterizarse mediante el FWHM correspondiente:

$$\Delta E_{Det} = FWHM_{Det} = 2,355\sigma_{Det} = 2,355\sqrt{FE\epsilon} \quad (2.20)$$

Un valor razonable para un detector de silicio es ~ 170 eV; los detectores más modernos pueden alcanzar un valor ~ 130 eV.

2.7.3. Eficiencia del detector

La eficiencia intrínseca de un detector semiconductor puede ser aproximada por un modelo simple en donde la probabilidad de detectar un haz de rayos X incidente en el detector se asume como la probabilidad de absorción fotoeléctrica con el volumen activo. Esta puede ser expresada como:

$$\epsilon(E) = e^{-\mu t}(1 - e^{-\sigma d}) \quad (2.21)$$

donde $\epsilon(E)$ es la eficiencia intrínseca del detector dependiente de la energía, t es el espesor de la ventana del detector, $\mu = \mu(E)$ es el coeficiente lineal de atenuación de la ventana del detector, d es el espesor del volumen activo del detector y σ es el coeficiente lineal de absorción fotoeléctrico del cristal semiconductor. Se puede observar de 2.21 que la eficiencia disminuye a bajas energías, lo cual está determinado por la ventana de entrada del detector (usualmente Berilio).

2.7.4. Análisis del solapamiento de intensidades de fluorescencia para líneas de energías próximas

Teniendo presente lo desarrollado en la sección 2.7.2, se analizó el caso en el que la resolución en energías del detector no es suficiente para separar dos picos de intensidades de un mismo elemento pero correspondientes a líneas de emisión distintas (como ser la $K_{\alpha 1}$ y la $K_{\alpha 2}$), las cuáles se encuentran a energías muy próximas una de otra; observándose por dicho motivo un único pico espectral.

Para conseguir tratar por separado cada pico y determinar el ancho a media altura (FWHM) como su correspondiente desviación cuadrática media σ , se expresa el pico de interés como la suma de dos intensidades: una intensidad I_1 para la línea de emisión $K_{\alpha 1}$ con un valor máximo de intensidad A_1 y una energía E_1 , y otra intensidad I_2 para la línea $K_{\alpha 2}$ con una intensidad máxima A_2 y una energía E_2 . Ambas intensidades escritas en su forma gaussiana:

$$I_1 = \frac{A_1}{\sqrt{2\pi}\sigma} e^{-\frac{(E-E_1)^2}{2\sigma^2}} \quad I_2 = \frac{A_2}{\sqrt{2\pi}\sigma} e^{-\frac{(E-(E_1+\delta))^2}{2\sigma^2}} \quad (2.22)$$

donde $\delta = E_2 - E_1$.

Por lo tanto la expresión general que se obtiene para un pico en el que intervienen ambas intensidades es de la forma:

$$I = I_1 + I_2 = \frac{A_1}{\sqrt{2\pi}\sigma} \left(e^{-\frac{(E-E_1)^2}{2\sigma^2}} + A_c e^{-\frac{(E-(E_1+\delta))^2}{2\sigma^2}} \right) \quad (2.23)$$

con $A_c = \frac{A_2}{A_1}$. Las intensidades máximas A_1 y A_2 se calculan como las fracciones de línea para cada energía por el área total integrada bajo el pico de intensidad I .

2.7.5. Picos de escape en detectores de Si(Li)

El fenómeno del pico de escape en los detectores de Si(Li) es un proceso familiar en el que el fotón entrante de energía E ioniza la capa K de un átomo de Si y, posteriormente, los fotones K_{α} del átomo de Si escapan por la superficie del detector. Esta situación hace que la energía depositada en el detector sea $E - E_{K_{\alpha}}$, en lugar de E , resultando en una generación de cargas correspondiente a un fotón de menor energía. Para el átomo de Si, la línea $E_{K_{\alpha}}$ de rayos X es de 1,74 keV, por lo tanto los picos de escape aparecen en 1,74 keV menos que el pico original, mientras que su intensidad relativa depende de la tasa de fotones incidente.

Teniendo en cuenta éste fenómeno, es importante analizar para éste trabajo, la presencia del pico de escape de la línea K_{α} del Ca, dado que su energía se encuentra en los 1,95 keV y la

resolución en energías del detector no es suficiente para separarlo de la señal del pico K_{α} de P, resultando en único pico que suma ambas intensidades.

Capítulo 3

Cálculo analítico de la transmisión en un monocapilar

3.1. Introducción

En esta sección la evaluación de la propagación de rayos X incidente sobre una superficie reflectora plana con un haz de rayos X a incidencia rasante se desarrollará en detalle. En particular en el presente trabajo resultó de gran interés la aplicación de dicha teoría para la optimización de la resolución espacial del experimento (que en principio solo se logra mediante fuentes de sincrotrón), necesaria para una eficiente cuantificación de elementos en tumores mamarios por micro-XRF. Pese a que muchos investigadores han demostrado la capacidad de la radiación de sincrotrón para abordar la micro-XRF con una excelente resolución no reproducible en laboratorios convencionales, la continua evolución de la óptica de rayos X y de las fuentes de rayos X permiten hoy en día obtener haces focalizados con una tasa de fotones útil incluso en dispositivos convencionales.

A mediados del siglo pasado experimentos pioneros mostraron la posibilidad de transportar haces de rayos X mediante capilares de vidrio [50, 51]. Gradualmente la descripción teórica de este efecto fue desarrollada junto con las primeras aplicaciones de capilares de vidrio en técnicas analíticas [52, 53]. A fines del siglo pasado la creación de los primeros policapilares de vidrio condujeron a una intensa actividad teórica y experimental mostrando el enorme potencial de la óptica de policapilares [54]. En estos dispositivos ópticos la transmisión de los fotones de rayos X se realiza por reflexión total en la superficie interna de los capilares. De esta forma los haces de rayos X pueden cambiar su dirección con baja pérdida en intensidad. Las aplicaciones de la óptica de policapilares en rayos X son diversas destacándose el desarrollo de nuevas técnicas analíticas, desarrollo de la astronomía en el rango de rayos X y aplicaciones en física médica [55].

La tecnología actual para la fabricación de capilares de vidrio es capaz de llegar a dimensiones en el orden de decenas de nanómetros, permitiendo la producción de lentes con tamaño de foco en el mismo orden [56]. Esto hace que la óptica de capilares de vidrio tenga múltiples aplicaciones en nanotecnología despertando un marcado interés en la comunidad científica internacional. La óptica de capilares de vidrio es por tanto un tema de investigación abierto que se encuentra en continua evolución y con excelentes perspectivas a futuro.

La óptica de capilares ha alcanzado un notable desarrollo para la focalización de la emisión

de tubos de rayos X [57]. Por este motivo representa una excelente opción para el desarrollo del microanálisis por rayos X orientado a aplicaciones en laboratorios convencionales. Una de las potenciales aplicaciones donde mejor se aprovechan las ventajas comparativas de esta técnica es en el estudio de la composición y estructura de tejidos biológicos. Resoluciones espaciales en el orden de los micrones son accesibles gracias a la incorporación de óptica de capilares [58]. Estas técnicas representan herramientas valiosas para estudiar el metabolismo de tejidos sanos y enfermos, contribuyendo a la prevención, diagnóstico, seguimiento y tratamiento de enfermedades como el cáncer o de los efectos de contaminantes ambientales como el arsénico [59]. Además la combinación de la óptica de policapilares con radiación de sincrotrón permite desarrollar novedosas aplicaciones dentro de las cuales destaca el microanálisis por rayos X tridimensional [60].

En resumen se puede afirmar que el estudio de la propagación de rayos X en guías de haces es un tema de sumo interés en la física actual que demanda un intenso trabajo tanto teórico como experimental.

3.2. Modelo teórico

3.2.1. Principios físicos de lentes para rayos X

Propagación de rayos X a incidencia rasante

Un haz de rayos X de frecuencia ω incidente en forma rasante desde el vacío sobre un medio material de superficie bien definida tiene asociado un campo eléctrico \mathbf{E} y un campo magnético \mathbf{H} que cumplen las ecuaciones de Maxwell:

$$\nabla \times \mathbf{E} = -\mu \frac{\partial \mathbf{H}}{\partial t} \quad (3.1)$$

$$\nabla \times \mathbf{H} = \epsilon \frac{\partial \mathbf{E}}{\partial t} \quad (3.2)$$

$$\nabla \cdot \mathbf{E} = 0 \quad (3.3)$$

$$\nabla \cdot \mathbf{H} = 0 \quad (3.4)$$

A partir de 3.1 y 3.2 se obtiene:

$$\nabla \times \nabla \times \mathbf{E} = -\frac{\epsilon_r}{c^2} \frac{\partial^2 \mathbf{E}}{\partial t^2} \quad (3.5)$$

donde ϵ_r es la constante dieléctrica de un medio material y varía de un punto a otro debido a la variación en la densidad de la carga electrónica. Asumiendo que $\epsilon_r = 1 - \gamma$ y eliminando la dependencia temporal dada por el factor $e^{-i\omega t}$, la ecuación que satisface \mathbf{E} se transforma en:

$$\nabla \times \nabla \times \mathbf{E} + k^2 \mathbf{E} = \gamma k^2 \mathbf{E} \quad (3.6)$$

siendo $k = \omega/c$ el número de ondas del haz incidente de rayos X.

La función de Green $G_k(\mathbf{r}, \mathbf{r}')$ para la ecuación de Helmholtz anterior es bien conocida [33] y basta recordar que cumple la ecuación:

$$\nabla \times \nabla \times G_k(\mathbf{r}, \mathbf{r}') + k^2 G_k(\mathbf{r}, \mathbf{r}') = \delta(\mathbf{r} - \mathbf{r}') \quad (3.7)$$

Utilizando la función $G_k(\mathbf{r}, \mathbf{r}')$ es posible transformar a la ecuación 3.6 en la siguiente ecuación integral:

$$\mathbf{E}(\mathbf{r}) = \mathbf{E}_0(\mathbf{r}) + \int d^3 r' G_k(\mathbf{r}, \mathbf{r}') \gamma(\mathbf{r}') \mathbf{E}(\mathbf{r}') \quad (3.8)$$

donde $\mathbf{E}_0(\mathbf{r})$ satisface la ecuación homogénea:

$$\nabla \times \nabla \times \mathbf{E}_0 + k^2 \mathbf{E}_0 = 0 \quad (3.9)$$

La resolución iterativa de la ecuación integral 3.8 partiendo de la hipótesis de que inicialmente $\mathbf{E} = \mathbf{E}_0$ se conoce como aproximación de Born y resulta un método óptimo para resolver un gran número de problemas de dispersión [34]. Sin embargo, en el problema de la propagación de un haz de rayos X a incidencia rasante la aproximación de Born resulta inadecuada. Esto se debe a que en tal caso la propagación es el producto de múltiples dispersiones, por lo que se necesita un alto número de iteraciones antes de alcanzar aproximaciones satisfactorias.

En lugar de utilizar la aproximación de Born, aquí resulta de mayor efectividad el empleo de la aproximación de onda distorsionada [35]. Este método de resolución se basa en la propagación sobre medios homogéneos como primera aproximación, lo cual permite describir en pocas iteraciones lo esencial de la dispersión, simplificando considerablemente el cálculo numérico. En el procedimiento usual de la aproximación de onda distorsionada, la constante dieléctrica se divide en dos partes:

$$\epsilon = \epsilon_1 + \epsilon_2 \quad (3.10)$$

donde ϵ_1 representa la constante dieléctrica promedio mientras que ϵ_2 contiene la información de la estructura a escala atómica de ϵ . La estrategia entonces es resolver el problema de propagación usando ϵ_1 en lugar de ϵ en la ecuación 3.6, y luego evaluar la dispersión producida por ϵ_2 en el campo eléctrico resultante. El formalismo teórico se obtiene reescribiendo la ecuación 3.8 utilizando los parámetros γ_1 y γ_2 correspondientes a ϵ_1 y ϵ_2 respectivamente:

$$\mathbf{E}(\mathbf{r}) = \mathbf{E}_0(\mathbf{r}) + \int d^3 r' G_k(\mathbf{r}, \mathbf{r}') \gamma_1(\mathbf{r}') \mathbf{E}(\mathbf{r}') + \int d^3 r' G_k(\mathbf{r}, \mathbf{r}') \gamma_2(\mathbf{r}') \mathbf{E}(\mathbf{r}') \quad (3.11)$$

La aproximación ahora consiste en reemplazar \mathbf{E} en el lado derecho de esta expresión por \mathbf{E}_1 , siendo \mathbf{E}_1 la onda distorsionada obtenida por la resolución de la propagación en un medio homogéneo:

$$\mathbf{E}_1(\mathbf{r}) = \mathbf{E}_0(\mathbf{r}) + \int d^3 r' G_k(\mathbf{r}, \mathbf{r}') \gamma_1(\mathbf{r}') \mathbf{E}_1(\mathbf{r}') \quad (3.12)$$

Finalmente:

$$\mathbf{E}(\mathbf{r}) = \mathbf{E}_1(\mathbf{r}) + \int d^3 r' G_k(\mathbf{r}, \mathbf{r}') \gamma_2(\mathbf{r}') \mathbf{E}_1(\mathbf{r}') \quad (3.13)$$

En las aplicaciones de la espectroscopía por fluorescencia de rayos X, es suficiente utilizar la expresión 3.12 para evaluar el campo eléctrico ignorando la corrección dada por 3.13. Esto se debe a que 3.13 representa una corrección de segundo orden cuyo valor es despreciable, debido a que el volumen donde \mathbf{E}_1 no se anula, definido por la profundidad de penetración del haz

incidente, es muy pequeño. Sin embargo, la corrección es sumamente importante en estudios superficiales por difracción de rayos X, donde los efectos producidos por la dispersión de rayos X son preferentemente analizados[35].

Índice de refracción para rayos X

El tratamiento teórico del problema de propagación de haces de rayos X bajo ángulos de incidencia rasante desarrollado en la sección precedente, concluye que se puede obtener una muy buena aproximación a la solución considerando a los medios de propagación como continuos. En consecuencia, aplicando en la resolución de este problema el tratamiento clásico de la propagación de ondas electromagnéticas se pueden obtener resultados satisfactorios. En estos cálculos es fundamental el conocimiento del índice de refracción del medio de propagación en el régimen de los rayos X, por lo que una descripción de tal parámetro será presentada a continuación.

Primeramente se obtiene la constante dieléctrica siguiendo el desarrollo de Landau (página 267 [38]) para frecuencias muy altas en un medio homogéneo compuesto por un único tipo de átomos. Supondremos que la frecuencia de rotación del electrón atómico es mucho menor que la frecuencia del haz de rayos X incidente. Entonces se puede pensar que el electrón atómico está fijo y que debido a la acción del campo oscilatorio del haz incidente comienza a oscilar. Si \mathbf{r}_p es la posición del movimiento oscilatorio perturbativo inducido por el campo eléctrico entonces se tiene:

$$\frac{d^2\mathbf{r}_p}{dt^2} = -\frac{e}{m}\mathbf{E}e^{-i\omega t} \quad (3.14)$$

$$\mathbf{r}_p = \frac{e}{m\omega^2}\mathbf{E}e^{-i\omega t} \quad (3.15)$$

Esto significa que el vector polarización es:

$$\mathbf{P}(\mathbf{r}) = \frac{e^2\rho(\mathbf{r})}{m\omega^2}\mathbf{E}(\mathbf{r}) \quad (3.16)$$

siendo $\rho(\mathbf{r})$ la densidad volumétrica de electrones en el material. Puesto que las interacciones atómicas se producen a frecuencias mucho menores que ω la probabilidad de intercambio de energía interatómica (resonancia) es muy baja y puede despreciarse (ver [38] página 267). La interacción interatómica entre los mismos átomos por radiación es un efecto de segundo orden de acuerdo a resultados experimentales. Esto significa que es posible representar a cualquier material por un grupo de átomos aislados no ligados químicamente. Entonces se puede escribir a ρ como la densidad electrónica total ρ_A en el átomo:

$$\rho(\mathbf{r}) = \rho_A(\mathbf{r}_e) \quad (3.17)$$

donde ahora $\mathbf{r} = (\mathbf{r}_A + \mathbf{r}_e)$ con \mathbf{r}_A la posición de cada átomo y \mathbf{r}_e la posición de los electrones atómicos referida al centro del átomo. Luego ρ_A se puede escribir en términos de las densidades electrónicas por orbital:

$$\rho_A(\mathbf{r}) = \left(\sum_j \rho_j(\mathbf{r}_e)\right) \quad (3.18)$$

Finalmente la constante dieléctrica será:

$$\epsilon(\omega) = 1 - \frac{e^2 \rho(\mathbf{r})}{m\omega^2} \quad (3.19)$$

Siguiendo el modelo de onda distorsionada, se promedia en el espacio:

$$\bar{\epsilon}(\omega) = 1 - \frac{n_A e^2}{m\omega^2} \int_0^\infty 4\pi r^2 \rho_A(\mathbf{r}) dr = 1 - \frac{4\pi n_A e^2 f(0)}{m\omega^2} \quad (3.20)$$

donde n_A es el número de átomos por unidad de volumen y $f(0)$ es el factor de forma atómica en la dirección de incidencia [37, 39]. Recordando que el radio clásico del electrón es $r_0 = e^2/(mc^2)$ entonces se tiene:

$$\bar{\epsilon}(\omega) = 1 - \frac{4\pi r_0 c^2 f(0) n_A}{\omega^2} = 1 - \frac{r_0 c^2 f(0) n_A}{\pi \nu^2} = 1 - \frac{r_0 c^2 h^2 f(0) n_A}{\pi E^2} \quad (3.21)$$

Finalmente el índice de refracción será:

$$n = \sqrt{\bar{\epsilon}} = 1 - \frac{r_0 c^2 h^2 f(0) n_A}{2\pi E^2} \quad (3.22)$$

Si se tiene en cuenta la absorción en el medio, entonces el índice de refracción toma la forma [36, 37] :

$$n = 1 - \delta - i\beta \quad (3.23)$$

donde:

$$\delta = \frac{r_0 c^2 h^2 N_a \rho f(0)}{2\pi E^2 A} \quad (3.24)$$

$$\beta = \frac{\rho \mu(E)}{2k} \quad (3.25)$$

siendo r_0 el radio clásico del electrón, h la constante de Planck, N_a el número de Avogadro, $\mu(E)$ el coeficiente de atenuación másico del material a la energía E , k el número de ondas del haz incidente y $f(0)$ el valor del factor de dispersión atómica en la dirección de la onda incidente. Existe un gran número de tablas con datos teóricos y experimentales desde donde es posible tomar el valor de $f(0)$ para todos los elementos de la tabla periódica [37, 39, 40]. Si la energía E de los rayos X está suficientemente lejos de la energía de los bordes de absorción atómica del material, entonces es posible reemplazar en la ecuación anterior $f(0)$ por el número atómico Z del material. Para una sustancia no homogénea compuesta por r clases de átomos, los parámetros δ y β adoptan la forma [36, 37]:

$$\delta = \frac{r_0 c^2 h^2 N_a \rho}{2\pi E^2} \sum_{\alpha=1}^r \left(\frac{W_\alpha f(0)_\alpha}{A_\alpha} \right) \quad (3.26)$$

$$\beta = \frac{\rho}{2k} \sum_{\alpha=1}^r (W_\alpha \mu_\alpha(E)) \quad (3.27)$$

donde se tiene que para los átomos de la especie α -ésima: A_α es el peso atómico, W_α es la fracción en peso, $\mu_\alpha(E)$ es el coeficiente de absorción másico a la energía E y $f(0)_\alpha$ es el valor del factor de dispersión atómica en la dirección de la onda incidente.

Los parámetros δ y β en general son positivos y con valores muy pequeños en el orden de 10^{-6} y 10^{-8} respectivamente [41, 42]. Esta característica del índice de refracción da lugar al fenómeno de reflexión total externa cuyo ángulo crítico θ_c se puede obtener aplicando la ley de Snell [36]:

$$\theta_c = \sqrt{2\delta} \quad (3.28)$$

Coefficientes de Fresnel

Una onda electromagnética plana general puede descomponerse en dos ondas polarizadas linealmente con planos de polarización ortogonales. Cuando la onda electromagnética incide sobre una interfase plana entre dos medios arbitrarios, uno de estos planos usualmente se escoge coincidente con el plano de incidencia [43]. La onda electromagnética con su vector campo eléctrico perpendicular al plano de incidencia se denomina *transversal eléctrica* (TE) y, similarmente, la onda electromagnética con su vector campo magnético perpendicular al plano de incidencia se denomina *transversal magnética* (TM). La descomposición de una onda electromagnética de polarización arbitraria en ondas TE y TM, reduce el problema de la propagación de ondas electromagnéticas a la propagación de ondas TE y TM. Estas ondas tienen un comportamiento diferente en una interfase plana por lo que en principio deben ser consideradas por separado. A continuación, se presentan las fórmulas básicas de propagación comenzando por el modo TE y asumiendo una frecuencia bien definida ω para la onda electromagnética incidente.

Sea una interfase plana que separa dos medios arbitrarios 0 y 1 cuyas constantes dieléctricas y permeabilidades magnéticas son respectivamente ϵ_0, μ_0 y ϵ_1, μ_1 . Una onda plana TE incidente sobre la interfase desde el medio 0 genera una onda reflejada y una onda transmitida. Sea A la amplitud de la onda eléctrica incidente, R la amplitud de la onda eléctrica reflejada y T la amplitud de la onda eléctrica transmitida. Utilizando los parámetros que caracterizan a cada medio se definen los siguientes nuevos parámetros:

$$P_\alpha = \sqrt{\epsilon_\alpha \mu_\alpha} \text{sen}(\theta_\alpha) \quad \text{para } \alpha = 0, 1 \quad (3.29)$$

siendo θ_0 el ángulo de propagación de la onda incidente y θ_1 el ángulo de propagación de la onda transmitida, ambos medidos desde la interfase. Los coeficientes de reflexión y transmisión para la onda eléctrica incidente están dados respectivamente por [43, 44, 45] :

$$r_0 = \frac{R}{A} = \frac{(P_0 - P_1)}{(P_0 + P_1)} \quad (3.30)$$

$$t_0 = \frac{T}{A} = \frac{2P_0}{(P_0 + P_1)} \quad (3.31)$$

Las dos últimas ecuaciones son conocidas como coeficientes de Fresnel para una onda eléctrica TE incidente sobre una interfase plana.

Manteniendo las mismas definiciones, considérese ahora una onda plana TM incidente sobre la interfase desde el medio 0. Sea A la amplitud de la onda magnética incidente, R la amplitud de la onda magnética reflejada y T la amplitud de la onda magnética transmitida. En este caso, se definen los siguientes nuevos parámetros:

$$Q_\alpha = \sqrt{\left(\frac{\mu_\alpha}{\epsilon_\alpha}\right) \text{sen}(\theta_\alpha)} \quad \text{para } \alpha = 0, 1 \quad (3.32)$$

Los coeficientes de reflexión y transmisión para la onda magnética incidente están dados respectivamente por [43, 44, 45]:

$$r_0 = \frac{R}{A} = \frac{(Q_0 - Q_1)}{(Q_0 + Q_1)} \quad (3.33)$$

$$t_0 = \frac{T}{A} = \frac{2Q_0}{(Q_0 + Q_1)} \quad (3.34)$$

Las dos últimas ecuaciones son conocidas como coeficientes de Fresnel para una onda magnética TM incidente sobre una interfase plana. Una vez obtenido el campo magnético \mathbf{H} en el modo TM, puede obtenerse el campo eléctrico \mathbf{E} haciendo uso de la ecuación elemental:

$$\mathbf{E} = \frac{w}{v} \mathbf{k} \times \mathbf{H} \quad (3.35)$$

Debido a que en el rango de los rayos X el índice de refracción es siempre muy próximo a la unidad, los parámetros P de cada medio pueden aproximarse con la siguiente expresión:

$$P_\alpha = (\theta - 2\delta_\alpha - 2i\beta_\alpha)^{\frac{1}{2}} \quad \text{para } \alpha = 0, 1 \quad (3.36)$$

Esta última expresión es válida para aproximar también a los parámetros Q en el modo TM cuando el ángulo de incidencia del haz de rayos X se encuentra en el orden de los miliradianes. En consecuencia, los coeficientes de Fresnel a primer orden son iguales en los modos TE y TM, lo cual implica que la propagación de haces de rayos X bajo incidencia rasante a primer orden es independiente de la polarización. Aproximaciones de P y Q se calculan en el Apéndice 6.

Medios homogéneos

La aplicación más sencilla y a la vez más utilizada en lentes para rayos X, es la incidencia rasante de rayos X sobre medios homogéneos con superficie plana y pulida. A continuación, se presenta una descripción del comportamiento de la intensidad de rayos X en esta situación para radiación monocromática, utilizando los coeficientes de Fresnel definidos anteriormente. El medio de incidencia usualmente es el aire o vacío de modo que es una buena aproximación considerar su índice de refracción igual a 1. Esto implica que el parámetro P_0 es igual al ángulo de incidencia θ . El parámetro P_1 del medio homogéneo puede aproximarse despreciando β_1 , puesto que β_1 en general es dos órdenes de magnitud menor que δ_1 :

$$P_1 = \begin{cases} i(\theta_{c1}^2 - \theta^2)^{\frac{1}{2}} & \text{si } \theta < \theta_{c1} \\ (\theta^2 - \theta_{c1}^2)^{\frac{1}{2}} & \text{si } \theta > \theta_{c1} \end{cases} \quad (3.37)$$

siendo θ_{c1} el ángulo crítico de reflexión total en la interfase del medio homogéneo.

Fracción de intensidad reflejada

Utilizando la fórmula aproximada de P_1 y el coeficiente de Fresnel de la reflexión r_1 , es posible demostrar que la reflectividad de la superficie está dada aproximadamente por la expresión:

$$\mathcal{R}_1 = |r_1|^2 = \begin{cases} 1 & \text{si } \theta < \theta_{c1} \\ \frac{\theta - (\theta^2 - \theta_{c1}^2)^{\frac{1}{2}}}{\theta + (\theta^2 - \theta_{c1}^2)^{\frac{1}{2}}} & \text{si } \theta > \theta_{c1} \end{cases} \quad (3.38)$$

Esta expresión implica que para $\theta < \theta_{c1}$ la energía es totalmente reflejada, aunque es preciso notar que en el resultado exacto una pequeña parte de la energía es transmitida. Para $\theta > \theta_{c1}$ la reflectividad R_1 tiende rápidamente a 0, por lo que la energía es mayormente transmitida. En la Figura 3.1 se muestra el comportamiento descrito para la reflectividad de una haz de rayos X de 10 keV incidente sobre una interfase aire-Cr, donde el ángulo crítico de reflexión total es 5,248 mrad.

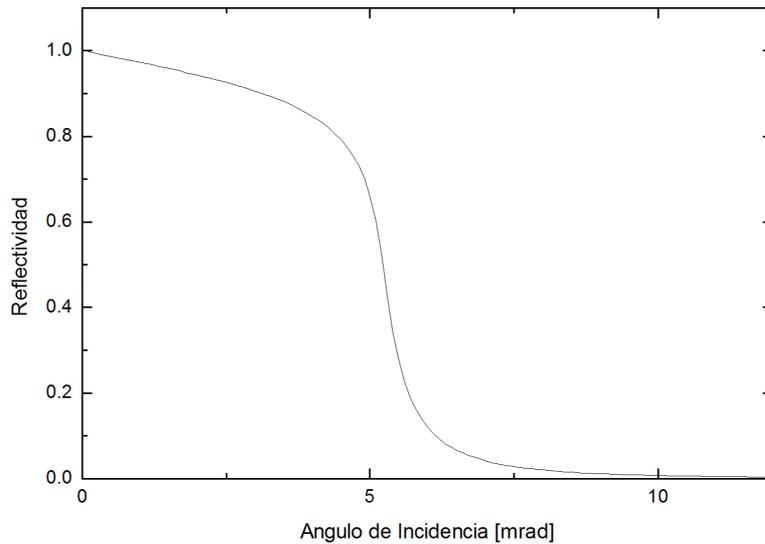


Figura 3.1: Curva de reflectividad del Cr para un haz de rayos X de 10 keV.

Fracción de intensidad transmitida

Utilizando la fórmula aproximada de P_1 y el coeficiente de Fresnel t_1 para la transmisión, es posible demostrar que la fracción de intensidad transmitida en la superficie está dada aproximadamente por la expresión:

$$\mathcal{T}_1 = |t_1|^2 = \begin{cases} \frac{4\theta^2}{\theta_{c1}^2} & \text{si } \theta < \theta_{c1} \\ \frac{2\theta^2}{\theta + (\theta^2 - \theta_{c1}^2)^{\frac{1}{2}}} & \text{si } \theta > \theta_{c1} \end{cases} \quad (3.39)$$

Para $\theta < \theta_{c1}$ se observa un crecimiento de \mathcal{T}_1 en forma cuadrática con θ . Para $\theta > \theta_{c1}$ se cumple que \mathcal{T}_1 tiende rápidamente a 1, lo que indica que la energía es principalmente transmitida. El comportamiento descrito se encuentra ilustrado en la Figura 3.2, donde se muestra la fracción de intensidad transmitida para un haz de rayos X de 10 keV incidente sobre una interfase aire-Cr.

Por otro lado, resulta útil determinar la relación entre los factores \mathcal{R}_1 y \mathcal{T}_1 , pues facilita la interpretación física de resultados teóricos en base al principio de conservación de la energía. Teniendo en cuenta el cambio en la densidad de líneas de flujo entre el haz incidente y el haz refractado y considerando que $(1 - \mathcal{R}_1)$ representa la fracción de fotones transmitidos hacia el medio homogéneo, se puede demostrar que [46]:

$$\mathcal{T}_1 = K(\theta)(1 - \mathcal{R}_1) \quad (3.40)$$

donde el factor de compresión $K(\theta)$ se define como:

$$K(\theta) = \frac{b}{b'} \quad (3.41)$$

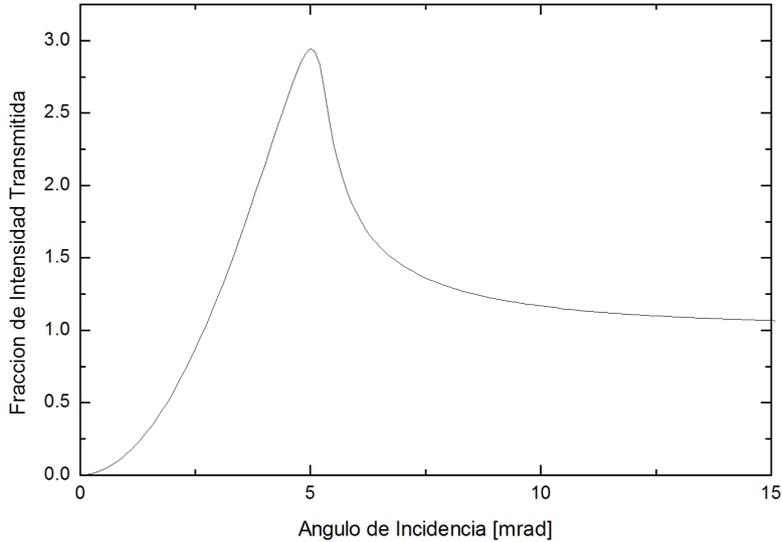


Figura 3.2: Fracción de intensidad transmitida para un haz de rayos X de 10 keV incidente sobre Cr.

siendo b la sección transversal del haz incidente atravesada por el mismo número de líneas de flujo que la sección transversal b' en el haz refractado. Mediante cálculos analíticos se puede demostrar que para cualquier ángulo de incidencia θ es:

$$K(\theta) = \frac{\theta}{Re(P_1)} \quad (3.42)$$

Profundidad de penetración

Si I_0 es la intensidad de los rayos X incidente, entonces la intensidad del haz de rayos X refractado a una distancia z de la superficie del medio está dada por:

$$I(z) = \mathcal{T}_1 I_0 \exp(-Im(k_{1z})z) \quad (3.43)$$

siendo $Im(k_{1z})$ la parte imaginaria de la componente normal del vector de ondas \mathbf{k} dentro del medio. Usando la definición del parámetro P_1 resulta que $k_{1z} = kn_1 \sin(\theta_1)$, de modo que $Im(k_{1z}) = kIm(P_1)$. La profundidad de penetración $D(\theta)$, definida como el valor de z donde la intensidad refractada disminuye a $1/e$ de su valor original, adopta la forma:

$$D(\theta) = \frac{1}{kIm(P_1)} \quad (3.44)$$

El valor de $D(\theta)$ en el rango $\theta < \theta_{c1}$ está comprendido entre 10\AA y 100\AA , siendo 10\AA en elementos pesados como platino y 100\AA en elementos livianos como sodio [47]. Para $\theta > \theta_{c1}$ se aproxima rápidamente a la relación lineal θ/μ que puede alcanzar valores en el orden del micrómetro. La dependencia angular para $D(\theta)$ correspondiente a un haz de rayos X de 10 keV incidente sobre una interfase aire-Cr se muestra en la Figura 3.3.

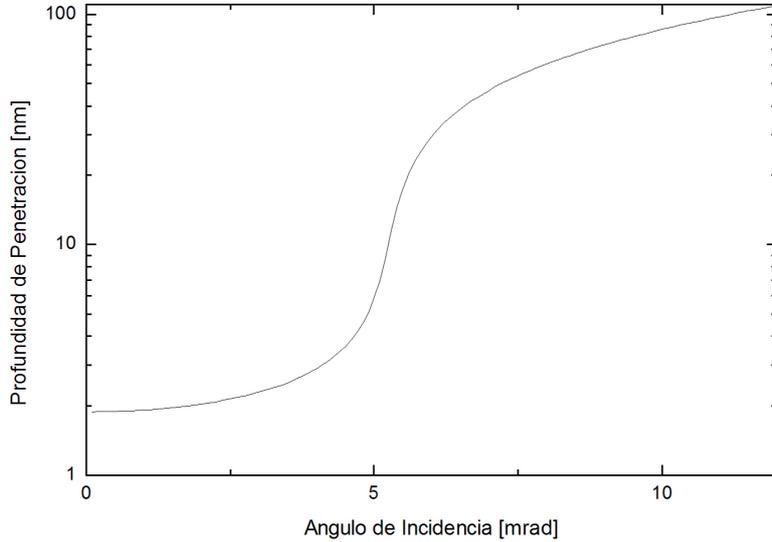


Figura 3.3: Profundidad de penetración para un haz de rayos X de 10 keV en Cr.

Cálculo del ángulo de reflexión total para vidrio de borosilicato (DURAN) empleado en la lente.

Para calcular el parámetro δ mencionado anteriormente en la ecuación 3.26 es necesario conocer las fracciones de peso en peso del compuesto utilizado. Conociendo la composición química del vidrio borosilicatado [61] :



donde en porcentajes se tiene 81 % de SiO_2 , 13 % de B_2O_3 , 4 % de Na_2O y un 2 % de $K_2OAl_2O_3$.

Se calcularon entonces las correspondiente fracciones de peso en peso W_α (ver Apéndice 7).

Para las energías de los haces empleados en este trabajo es posible reemplazar el factor de dispersión $f(0)$ de los elementos principales por su número atómico Z . Por lo tanto utilizando la densidad del compuesto brindada por el fabricante $\rho = 2,23g/cm^3$ se obtuvo:

$$\delta E^2 = (9,3 \times 10^{-4} \pm 0,7 \times 10^{-4})keV^2 \quad (3.46)$$

Así, el ángulo de reflexión total será:

$$\theta_c[mrad] = \sqrt{2\delta} = \frac{(30 \pm 1)}{E[keV]} \quad (3.47)$$

donde el mayor aporte al error está dado por la densidad y el término correspondiente a la sumatoria.

Para energías representativas, los valores para el ángulo crítico se muestran en la Tabla 3.1:

E [keV]	θ_c [mrad]
2	15,0 \pm 0,5
5	6,1 \pm 0,2
8	3,8 \pm 0,1
10	3,0 \pm 0,1
15	2,00 \pm 0,07
20	1,50 \pm 0,05

Tabla 3.1: Ángulo crítico de reflexión total externa en función de la energía incidente.

3.2.2. Transmisión teórica del monocapilar

Actualmente, la herramienta más eficiente para el cálculo de la transmisión de rayos X en una lente es el programa de diseño capilar de Rong Huang, empleada para diseñar y simular ópticas monocapilares de rebote único. En las referencias [62, 63] se dan todas las ecuaciones utilizadas para diseñarlo. Dicho código de simulación numérica, a diferencia de las simulaciones de trazado de rayos (la cual se rige por la teoría de guías de ondas), se basa únicamente en la óptica geométrica para rayos X, permitiendo calcular la intensidad de la imagen y el perfil espacial de la intensidad directamente a partir de las ecuaciones de la imagen.

Para este programa de diseño, hay tres conjuntos de configuración de entrada: fuente, óptica capilar y salida. Todas las longitudes de entrada están en unidades de milímetros y todos los

ángulos de entrada están en unidades de mrad. Una vez que se han ingresado las entradas, hay dos opciones para las salidas: el perfil de diámetro interno (ID) capilar y el perfil de imagen. El perfil de ID capilar da la forma que coincide con los parámetros de entrada, y el perfil de imagen da la distribución de la ganancia en función de la posición en el foco.

Se observa en el trabajo de R. Huang et al. [62] que los resultados numéricos de un capilar diseñado para la cristalografía de proteínas concuerdan con las mediciones experimentales. Se debe destacar además que, pese a que dichos cálculos se realizaron para un monocapilar de vidrio con sección elíptica de una sola reflexión, es posible aplicar éste mismo método para capilares con reflexiones de órdenes superiores.

Los programas de trazado de rayos, nombrado anteriormente, pueden modelar más de cerca los efectos de los errores de pendiente en la superficie capilar, las fuentes no gaussianas y los perfiles de haz que no están en el plano focal sin embargo son mucho más difíciles de configurar y requieren mucha más información, como una forma de perfil real.

Modelo

Establecemos un sistema de coordenadas cilíndrico con origen en la punta del monocapilar y con el eje z coincidiendo con el eje óptico del sistema. La fuente se encuentra en el plano xy a una distancia H del origen y tiene un área extensa S . Si el capilar tiene un radio de entrada ρ_i y la distancia de la entrada a la fuente es D entonces el número de fotones N_0 que ingresa al capilar es:

$$N_0 = F_0 \frac{S\pi\rho_i^2}{4\pi D^2} \quad (3.48)$$

Aquí F_0 es el número de fotones de energía E emitidos por unidad de área y por unidad de tiempo. El número de fotones N_T que emergen del capilar se compone de dos términos:

$$N_T = N_{Td} + N_{Tr} \quad (3.49)$$

Aquí N_{Td} es el número de fotones que pasa directo sin interactuar con las paredes del capilar y N_{Tr} es el número de fotones que son reflejados en las paredes y logran salir del capilar. Para evaluar N_{Td} procedemos como antes:

$$N_{Td} = F_0 \frac{S\pi\rho_0^2}{4\pi H^2} \quad (3.50)$$

Aquí ρ_0 es el radio de salida del capilar.

Luego, la transmisión de la lente o intensidad transmitida relativa se puede obtener desde:

$$T = \frac{N_T}{N_0} \quad (3.51)$$

Para evaluar N_{Tr} descompondremos a la fuente de área S en elementos diferenciales de área dS . Para simplificar tomamos uno de estos elementos ubicado en la posición de coordenadas $(0, r_S; H)$. Contaremos primero el número de fotones emitidos por este elemento que son reflejados por un elemento de superficie del capilar ubicado en la posición con coordenadas cilíndricas $((\rho_0 + \alpha z_1), \phi_1, z_1)$. Este número está dado por:

$$d^4 N_{Tr} = F_0 dS \alpha d\phi_1 \frac{(\rho_0 + \alpha z_1) dz_1}{4\pi(H - z_1)^2} \mathcal{R}(\theta_1) \quad (3.52)$$

Aquí θ_1 es el ángulo de incidencia de los fotones provenientes desde dS y $\mathcal{R}(\theta_1)$ es la reflectividad de la interfase aire-vidrio.

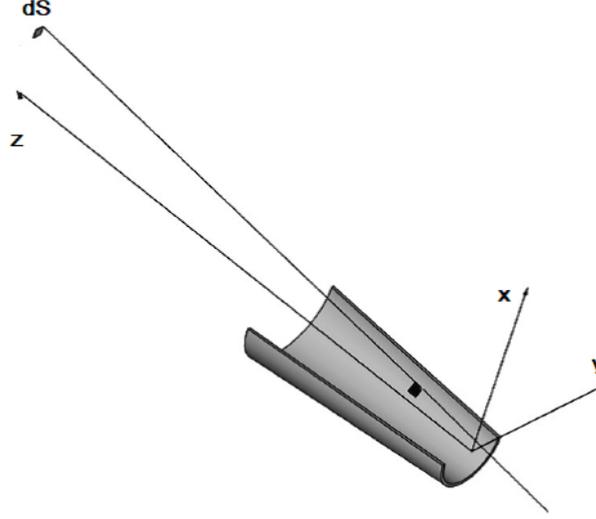


Figura 3.4: Reflexión de un rayo emitido por el elemento de fuente dS en el elemento de superficie de un capilar cónico.

La ecuación 3.52 es válida si todos los fotones reflejados en la primera interacción logran escapar del capilar. Sin embargo aquellos que tienen un ángulo de reflexión mayor que un ángulo límite θ_{L1} sufrirán una segunda reflexión. Si estos rayos logran emerger del capilar entonces tendremos que:

$$d^4 N_{Tr} = F_0 dS \alpha d\phi_1 \frac{(\rho_0 + \alpha z_1) dz_1}{4\pi(H - z_1)^2} \mathcal{R}(\theta_1) \mathcal{R}(\theta_2) \quad (3.53)$$

Aquí θ_2 es el ángulo de incidencia de los fotones en la segunda reflexión. Nuevamente, esta ecuación será válida si el ángulo de reflexión θ_2 es menor que un ángulo límite θ_{L2} . Procediendo iterativamente se pueden calcular los valores θ_i y θ_{Li} correspondientes a la i -ésima reflexión en el capilar de manera de evaluar precisamente al término $d^4 N_{Tr}$ contemplando todas las posibles reflexiones. Si el número de posibles reflexiones es N entonces:

$$d^4 N_{Tr} = F_0 dS \alpha d\phi_1 \frac{(\rho_0 + \alpha z_1) dz_1}{4\pi(H - z_1)^2} \prod_{i=1}^N \mathcal{R}(\theta_i) \quad (3.54)$$

Debido a la complejidad de la función $\mathcal{R}(\theta)$ las 4 integrales asociadas a $d^4 N_{Tr}$ no pueden ser resueltas analíticamente. A continuación se describe un procedimiento iterativo para poder calcular θ_i y θ_{Li} de manera de tener en cuenta las primeras reflexiones en el capilar.

Primera reflexión

Como se muestra en el Apéndice 1 el ángulo θ_1 está dado por:

$$\theta_1 = \frac{(\rho_0 + \alpha H - r_S \cos(\phi_1))}{H - z_1} \quad (3.55)$$

En el Apéndice 2 se han desarrollado los cálculos necesarios para mostrar que a primer orden el ángulo límite θ_{L1} está dado por:

$$\theta_{L1} = 2\sqrt{\left(\frac{\rho_0}{z_1}\right)^2 - \gamma_1^2} \quad (3.56)$$

Aquí γ_1 es el ángulo de inclinación del plano de incidencia de la primera reflexión respecto del plano de simetría de la lente ubicado en la posición angular ϕ_1 . Este ángulo está dado por:

$$\gamma_1 \approx \text{sen}(\gamma_1) = \frac{r_S \text{sen}(\phi_1)}{(H - z_1)} \quad (3.57)$$

Segunda reflexión

Conociendo la inclinación del plano de incidencia de la primera reflexión mediante γ_1 es posible determinar el punto de impacto de la segunda reflexión (Ver Apéndice 3). Si $\theta_1 > \theta_{L1}$ entonces ocurrirá una segunda reflexión en un punto con las siguientes coordenadas cilíndricas:

$$\begin{aligned} z_2 &= \frac{[z_1 \sqrt{\frac{\theta_1^2}{4} + \gamma_1^2} - \rho_0]}{[\alpha + \sqrt{\frac{\theta_1^2}{4} + \gamma_1^2}]} \\ \rho_2 &= \rho_0 + \alpha z_2 \\ \phi_2 &= \phi_1 + \pi - \phi'_1 \\ \text{sen}\phi'_1 &= \frac{d_1}{\rho_2} = \frac{\gamma_1}{\sqrt{\frac{\theta_1^2}{4} + \gamma_1^2}} \\ \text{cos}\phi'_1 &= \frac{\theta_1}{2\sqrt{\frac{\theta_1^2}{4} + \gamma_1^2}} \end{aligned}$$

Aquí ϕ'_1 es un ángulo auxiliar. Utilizando estas coordenadas es posible demostrar (ver Apéndice 4 y 5) que el ángulo de incidencia de la segunda reflexión y el ángulo límite son:

$$\begin{aligned} \theta_2 &= \text{cos}(\phi'_1)\theta_1 + (1 + \text{cos}\phi'_1)\alpha + \gamma_1 \text{sen}\phi'_1 \\ \theta_{L2} &= 2\sqrt{\left(\frac{\rho_0}{z_2}\right)^2 - \gamma_2^2} \\ \gamma_2 &= \frac{\rho_1 \text{sen}\phi'_1}{(z_1 - z_2)} \end{aligned}$$

Tercera reflexión

Cuando se cumpla $\theta_2 > \theta_{L2}$ habrá una tercera reflexión. Procediendo como en el Apéndice 3 tendremos que las coordenadas del punto de la tercera reflexión son:

$$z_3 = \frac{[z_2 \sqrt{\frac{\theta_2^2}{4} + \gamma_2^2} - \rho_0]}{[\alpha + \sqrt{\frac{\theta_2^2}{4} + \gamma_2^2}]}$$

$$\rho_3 = \rho_0 + \alpha z_3$$

$$\phi_3 = \phi_2 + \pi - \phi'_2$$

$$\text{sen}\phi'_2 = \frac{\gamma_2}{\sqrt{\frac{\theta_2^2}{4} + \gamma_2^2}}$$

$$\text{cos}\phi'_2 = \frac{\theta_2}{2\sqrt{\frac{\theta_2^2}{4} + \gamma_2^2}}$$

Utilizando estas coordenadas es posible demostrar (ver Apéndice 4 y 5) que el ángulo de incidencia de la tercera reflexión y el ángulo límite son:

$$\theta_3 = 2\text{cos}(\phi'_2)\theta_2 - \text{cos}(\phi'_1 + \phi'_2)\theta_1 + (1 - \text{cos}(\phi'_1 + \phi'_2))\alpha + \gamma_1 \text{sen}(\phi'_1 + \phi'_2)$$

$$\theta_{L3} = 2\sqrt{\left(\frac{\rho_0}{z_3}\right)^2 - \gamma_3^2}$$

$$\gamma_3 = \frac{\rho_2 \text{sen}\phi'_2}{(z_2 - z_3)}$$

3.3. Metodología y materiales

La transmisión del haz fue modelada para una lente de vidrio borosilicatado cónica actualmente en uso, con parámetros:

$$\rho_i = 0,4\text{mm}$$

$$\rho_0 = 0,15\text{mm}$$

$$D = 50\text{mm}$$

$$L = 130\text{mm}$$

donde ρ_i corresponde al radio inicial del capilar, ρ_0 al radio de salida del capilar, D a la distancia entre el plano donde se encuentra el elemento diferencial de fuente y el orificio de entrada del capilar, y la distancia L al largo del capilar.

En el cálculo de la transmisión de rayos X en una lente cónica, un fotón de rayos X puede sufrir múltiples reflexiones antes de salir de la lente. Para decidir qué número de reflexiones sucesivas son relevantes para el cálculo de la transmisión se deben realizar cálculos preliminares. Empleando entonces el software de acceso libre GNU Octave y a partir del modelo teórico explicado en la sección 3.2.2, cuyos cálculos se encuentran detallados en los Apéndices 1 al 5, se desarrolló un programa con el propósito de obtener las posibles reflexiones dentro del capilar.

En una primera instancia y para corroborar los órdenes de reflexión que debían ser tenidos en cuenta en la transmisión, se calcularon los ángulos de incidencia para tres reflexiones consecutivas (θ_1 , θ_2 y θ_3) y los ángulos límites de transmisión asociados a cada uno (θ_{L1} , θ_{L2} y θ_{L3}). Dado que el valor de estos ángulos depende de la posición relativa entre la fuente puntual y el punto de reflexión en la lente, se escogieron condiciones particulares que se describen a continuación:

- La distancia de la fuente puntual hasta el eje óptico r_S tomó los valores de 0 mm, 0,1 mm, 0,3 mm y 0,5 mm.
- La coordenada axial del punto de la primera reflexión z_1 adoptó valores entre 10 y 130 mm con pasos de 10 mm.
- La coordenada azimutal del punto para las tres reflexiones ϕ_1 , ϕ_2 y ϕ_3 adoptaron los valores 0° , 90° y 180° .

De esta manera, se obtuvo una descripción del rango de variación de los ángulos de incidencia en las primeras tres reflexiones para puntos representativos de la fuente. La comparación de este rango con el rango de reflexión total fue posteriormente utilizada para calificar la relevancia de cada reflexión.

Se calculó luego, conociendo los órdenes de reflexión que intervienen, las intensidades relativas transmitidas que finalmente divergen de la lente y hacen al espectro incidente de rayos X.

Los gráficos obtenidos para ambas partes se discuten en la sección siguiente.

3.4. Resultados y discusiones

Una vez ejecutados los programas con los parámetros iniciales de la lente, se obtuvieron los archivos de datos de extensión *.txt* con las correspondientes tablas para los valores de los ángulos mencionados anteriormente. Posteriormente se graficaron las tablas, buscando la forma más adecuada de combinar variables para mostrar los resultados y que sean comprensibles para el lector.

Para cada gráfico solo se consideraron los valores de z_1 en los que había una única reflexión total externa (sin órdenes mayores de reflexión), es decir $\theta_i < \theta_{L_i}$. Conociendo entonces los valores que adopta el ángulo crítico de reflexión total en la tabla 3.1, y observando el comportamiento del ángulo de incidencia para cada reflexión según la distancia z_1 y la orientación azimutal ϕ , se comprobó que:

- Para $r_S = 0\text{mm}$, se observa en las figuras 3.5 que los ángulos de incidencia para las tres reflexiones consecutivas son siempre crecientes respecto a la distancia z_1 ; sin embargo fijando valores para z_1 se observó un comportamiento constante para los ángulos en función de la rotación azimutal del punto de reflexión ϕ . Se ve también que para reflexiones de tercer orden los valores que adoptan los ángulos incidentes son muy cercanos al valor del ángulo crítico para energías de 2 keV, es decir, pese a que los valores angulares son muy grandes aún refleja un porcentaje pequeño de energías muy bajas.

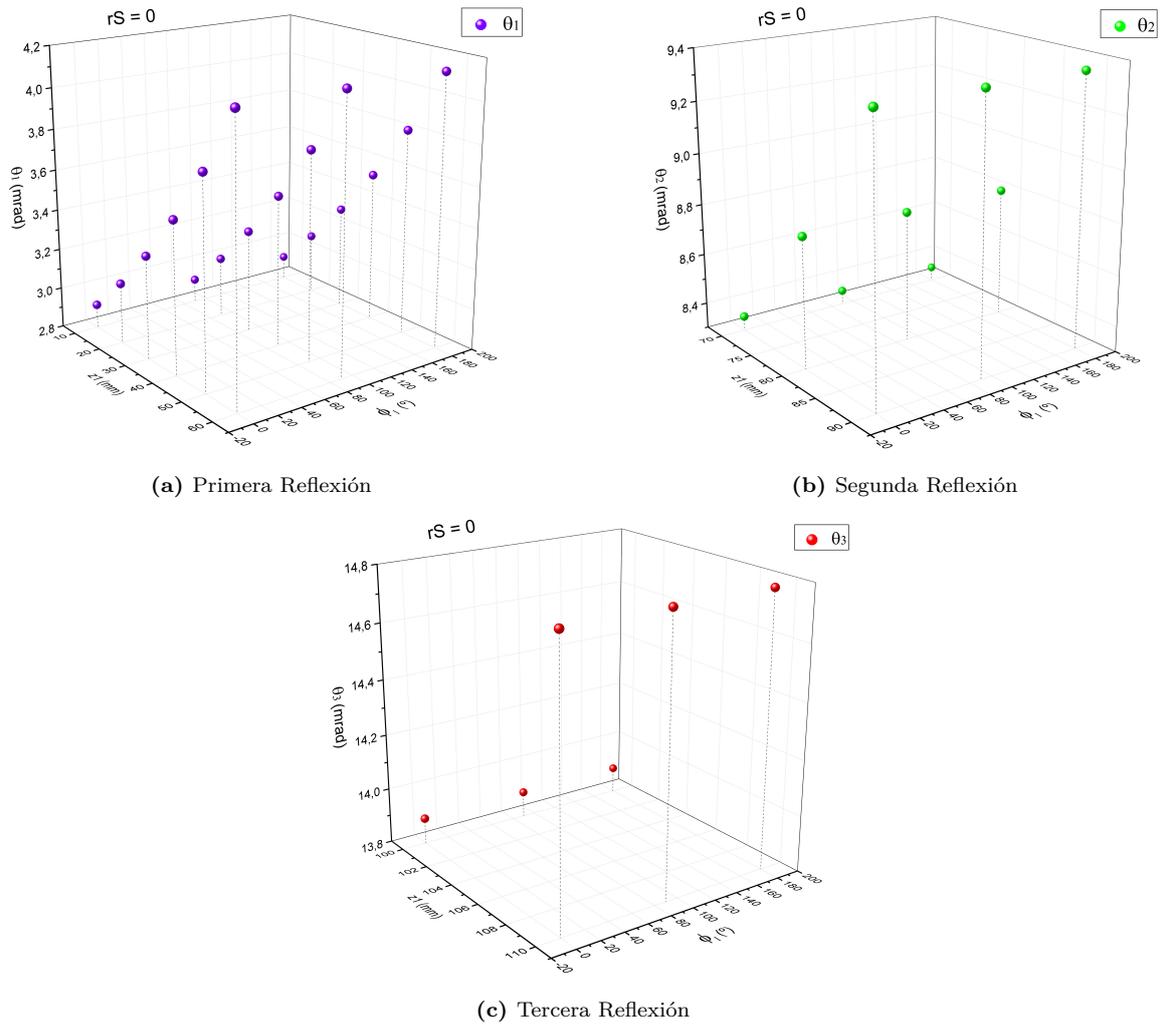
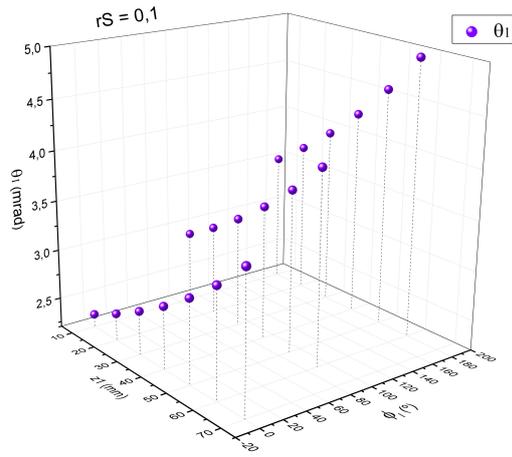


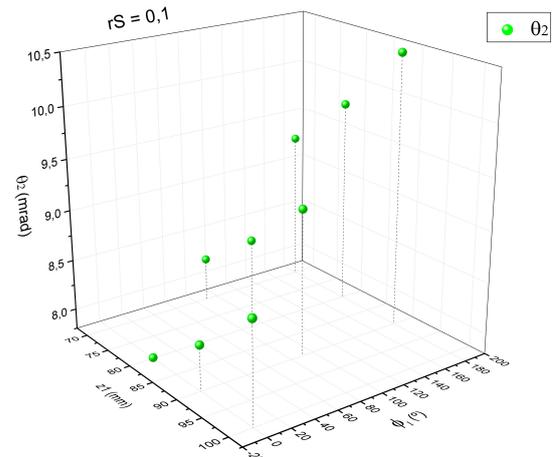
Figura 3.5: Valores adoptados por el ángulo incidente θ para cada reflexión, en función de la distancia al origen del punto reflector z_1 y del ángulo azimutal para el plano de incidencia ϕ_1 . El elemento diferencial de la fuente se encuentra a una distancia $r_S = 0$ mm sobre el eje x (para éste caso, justo sobre el eje óptico de la lente).

- Para $r_S = 0,1$ mm, se observa en las figuras 3.6 que al igual que para el caso anterior los ángulos de incidencia son crecientes respecto a z_1 , la diferencia está en que ésta tendencia creciente de los ángulos se mantiene también fijando valores de z_1 y aumentando el valor azimutal ϕ . Se debe notar además, que para la reflexión de tercer orden solamente dos valores angulares para la incidencia quedan por debajo del ángulo crítico máximo considerado (a 2 keV), que se corresponden al ángulo azimutal $\phi = 0$ y por lo tanto para el restante de ángulos incidentes no habrá reflexión total (no se transmite a través la lente).

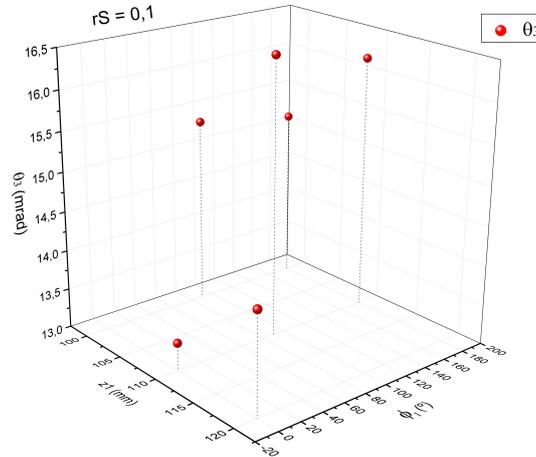
- Para $r_S = 0,3$ mm, se observa en las figuras 3.7 que los ángulos de incidencia para las tres reflexiones continúan con una tendencia creciente respecto a la variable z_1 , sin embargo al observar el comportamiento respecto al ángulo azimutal ϕ la tendencia creciente del ángulo incidente solo se cumple para las primeras dos reflexiones. La reflexión de tercer orden muestra un comportamiento decreciente respecto a ϕ . Se ve que para ésta geometría experimental, todos los ángulos de incidencia de la tercera reflexión toman valores por encima del ángulo crítico sin



(a) Primera Reflexión



(b) Segunda Reflexión



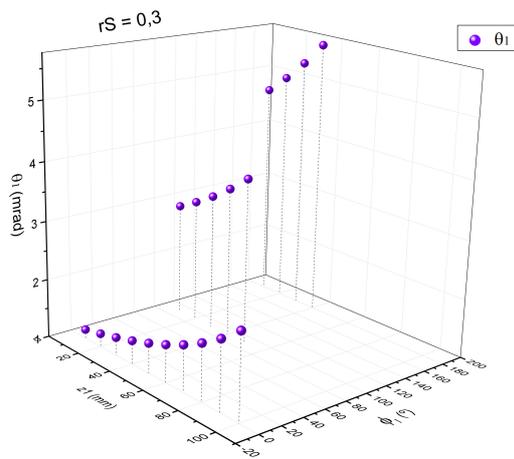
(c) Tercera Reflexión

Figura 3.6: Valores adoptados por el ángulo incidente θ para cada reflexión, en función de la distancia al origen del punto reflector z_1 y del ángulo azimutal para el plano de incidencia ϕ_1 . El elemento diferencial de la fuente se encuentra a una distancia $r_S = 0,1$ mm sobre el eje x.

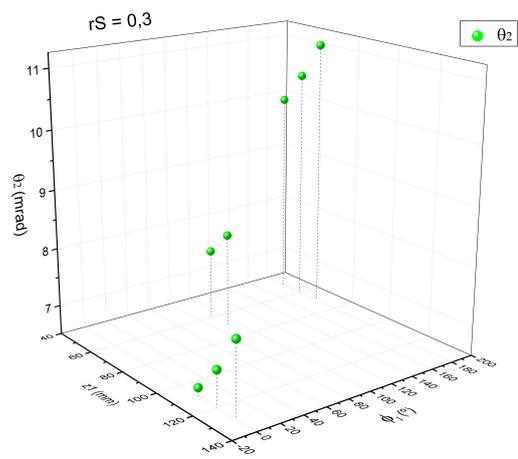
excepciones, por lo tanto la tercer reflexión no aportaría a la intensidad transmitida calculada para la lente.

- Para $r_S = 0,5$ mm, se observa en las figuras 3.8 que, al igual que para el caso anterior, los ángulos incidentes siguen con la tendencia creciente según la variable z_1 y éste comportamiento solo se repite en las primeras dos reflexiones respecto al ángulo azimutal ϕ , siendo en la tercera reflexión decreciente para con ésta variable. Dado que los valores para los ángulo de incidencia en la tercera reflexión son del mismo orden que para el caso anteriormente mencionado, es posible descartar la contribución de dicha reflexión a la intensidad total transmitida al final de la lente.

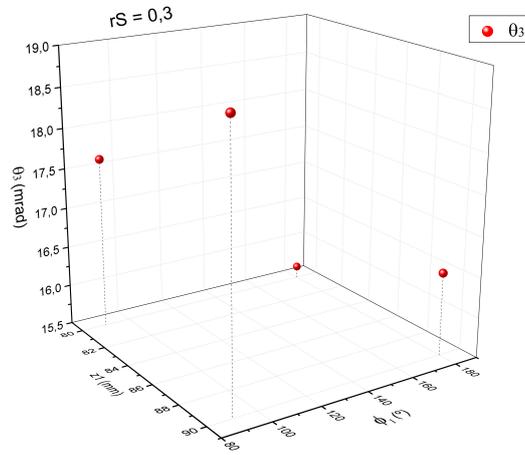
Sabiendo entonces que para todos los casos una tercer reflexión no aporta significativamente a la intensidad final transmitida, se omitieron en el modelo reflexiones de orden mayor a 2. Se obtuvo así, al igual que los casos anteriores, un archivo de extensión *.txt* con los valores para la intensidad relativa transmitida del haz incidente en función de la energía de los fotones que



(a) Primera Reflexión



(b) Segunda Reflexión

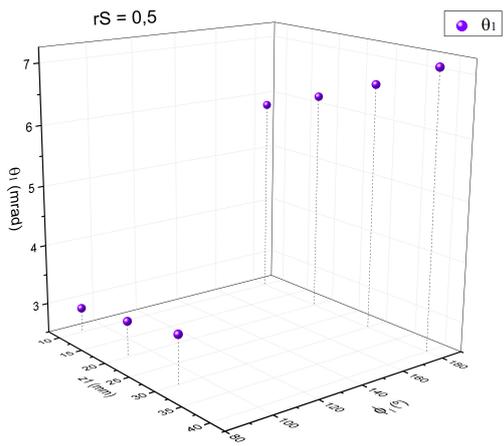


(c) Tercera Reflexión

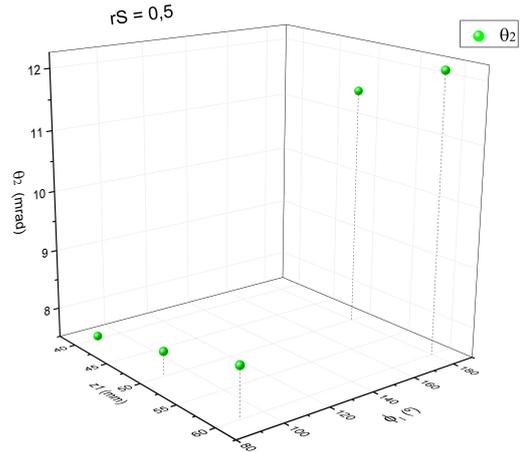
Figura 3.7: Valores adoptados por el ángulo incidente θ para cada reflexión, en función de la distancia al origen del punto reflector z_1 y del ángulo azimutal para el plano de incidencia ϕ_1 . El elemento diferencial de la fuente se encuentra a una distancia $r_S = 0,3\text{mm}$ sobre el eje x.

atraviesan la lente.

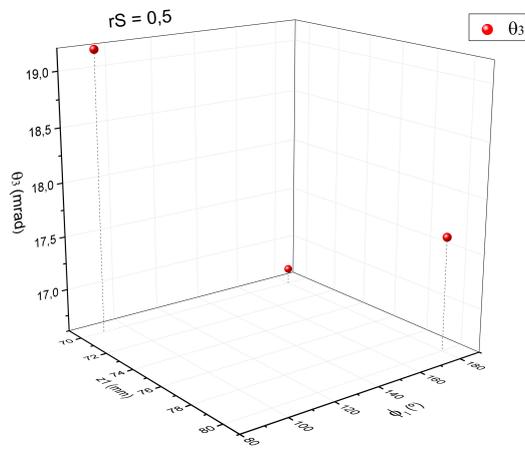
En la figura 3.9 se graficaron éstos puntos de intensidad vs energía, y se puede observar que el comportamiento de la intensidad que logra transmitirse a lo largo de la lente decae exponencialmente con la energía. Comportamiento esperable dado que como se mostró en resultados anteriores el ángulo crítico de reflexión total es inversamente proporcional a la energía incidente.



(a) Primera Reflexión



(b) Segunda Reflexión



(c) Tercera Reflexión

Figura 3.8: Valores adoptados por el ángulo incidente θ para cada reflexión, en función de la distancia al origen del punto reflector z_1 y del ángulo azimutal para el plano de incidencia ϕ_1 . El elemento diferencial de la fuente se encuentra a una distancia $r_S = 0,5$ mm sobre el eje x.

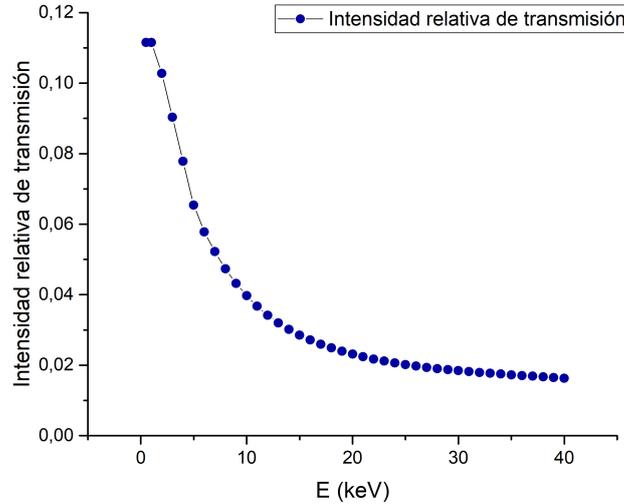


Figura 3.9: Intensidad relativa transmitida a lo largo de la lente en función de la energía del haz incidente.

3.5. Conclusión

Finalmente y hablando en términos generales, se observó la existencia de configuraciones experimentales en las que se cumple que $\theta_\alpha > \theta_{L\alpha}$, lo que daría lugar a reflexiones de orden $(\alpha + 1)$. Sin embargo resultó innegable que las reflexiones de alto orden y en particular la de tercer orden en la lente bajo estudio, tienen ángulos de incidencia bastante mayores al ángulo de reflexión total de la energía más baja del espectro del tubo de rayos X en uso. Se concluye entonces que las correcciones en el cálculo de la transmisión de la lente derivadas de considerar reflexiones de orden mayor a 2 no son significativas para el perfil del monocapilar actualmente en uso. Sin embargo el modelo teórico desarrollado permite evaluar numéricamente reflexiones de alto orden que podría adaptarse para una mejor evaluación de la transmisión en monocapilares de otros perfiles.

En cuanto al archivo final de transmisión obtenido, la validación del mismo se realizó indirectamente mediante su incorporación en la simulación Monte Carlo de espectros XRF registrados en condiciones controladas para materiales de referencia de la cuál se habla en los próximos capítulos. Una correcta simulación implica un espectro incidente modelado que se ajusta precisamente al espectro real.

Gracias a la gran capacidad de cómputo a la que se puede acceder en la actualidad, se concluye que el método propuesto para la obtención de la transmisión de la lente, fundamentado en un modelo teórico clásico y una validación por simulación Monte Carlo de la emisión XRF, representa una muy buena alternativa a métodos experimentales tradicionales por deconvolución [64].

Al no ser posible la medición directa del conteo al final de la lente por cuestiones de la geometría experimental, se consideró éste modelado teórico o “medición indirecta” como el método más conveniente para la obtención del espectro incidente a utilizar.

Capítulo 4

Método para cuantificación elemental por micro-XRF de tejidos biológicos mediante simulaciones Monte Carlo.

4.1. Introducción

Como se ha expresado anteriormente, el principal objetivo de éste trabajo subyace en la aplicación de la micro-XRF para cuantificar P en muestras de tumores mamarios, en una escala de laboratorio, a diferentes concentraciones de estos elementos. Hoy en día, gracias al gran crecimiento de la capacidad de cálculo de las computadoras modernas, los datos pueden ser analizados muy detalladamente por medio de la simulación del transporte de radiaciones.

Es por ésta razón que en el presente capítulo se describe la aplicación del software XMI-MSIM [65] para el procesamiento de los espectros resultantes de la emisión de XRF. Este software, de uso libre, abierto y gratuito, facilita la simulación Monte Carlo del transporte de la radiaciones a partir de los datos de configuración del tubo de rayos X, de la caracterización del capilar y del detector así como de la geometría del arreglo experimental, que incluye también información de la composición de la atmósfera de análisis. La metodología permite tener en cuenta las variaciones en las intensidades XRF debidas a irregularidades del área de irradiación de la muestra durante cada análisis por micro-XRF *in vivo*.

Se emplearon estándares fabricados con un amplio rango de elementos, entre los que se encontraban los elementos particulares de interés, para validar la configuración del código de simulación y de los parámetros descriptivos del arreglo experimental. Para optimizar la metodología de cuantificación de P se aplicó el método de simulación inversa de Monte Carlo, que proporciona una curva de calibración entre las intensidades micro-XRF medidas y las concentraciones elementales de la muestra incógnita [66]. Esta curva de calibración se creó utilizando un conjunto de estándares virtuales externos con una composición elemental cercana al tejido tumoral en estudio.

4.2. Materiales y métodos

4.2.1. Preparación de muestras

Las muestras fueron preparadas por alumnos de la FCM-UNC como parte de un proyecto de cooperación con la FaMAF en vigencia. Se utilizaron 20 ratones albinos BALB/C que fueron alimentados durante un período de 3 meses con una dieta estándar de alimentos balanceados (Cargill Argentina S.A.). Los animales se mantuvieron en una habitación con luz y temperatura controlada y de acuerdo con las Pautas Institucionales para el Cuidado de Animales (Comité de Cuidado de Animales de la Universidad Nacional de Córdoba, Argentina).

Se aplicó luego un modelo experimental sobre los ratones que consistió en la inoculación de células de adenocarcinoma de glándula mamaria transplantable con capacidad metastásica moderada por vía subcutánea. Los animales fueron sacrificados a los 45-50 días luego de haber sido inoculados y se les extrajeron los tumores que posteriormente fueron fijados en formol e incluidos en parafina (ver Figura 4.1).

A cada muestra conservada, se le realizaron dos cortes adyacentes con un micrótomomo de deslizamiento Reichert, uno de 2 micrómetros para análisis convencional histológico y el otro de 30 micrómetros para el análisis por micro-XRF.

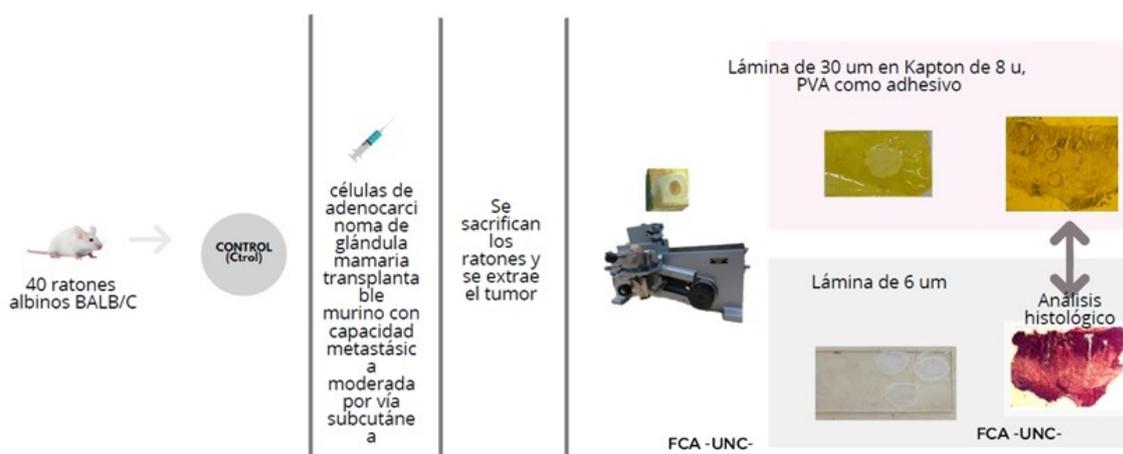


Figura 4.1: Proceso para obtención de muestras de tumores mamarios en murinos.

4.2.2. Análisis histológico

Para lograr contraste y discriminación entre diferentes estructuras biológicas se aplican diferentes tipos de tinciones. La más empleada es la hematoxilina eosina (HE) para la identificación de estructuras nucleares y citoplasmáticas y sus características morfológicas. A partir del primer corte de 2 micrómetros se efectuó dicha coloración la cuál se llevó a cabo en el Laboratorio de Microscopia de la Facultad de Ciencias Agropecuarias de la Universidad Nacional de Córdoba.

Como se observa en la figura 4.2 el análisis de las muestras de tinción por microscopía óptica permite identificar diferentes tipos de tejidos en las muestras de tumores mamarios, como tejido graso (FT), tejido conectivo (CT), células tumorales activas (AT) y región necrótica (N),

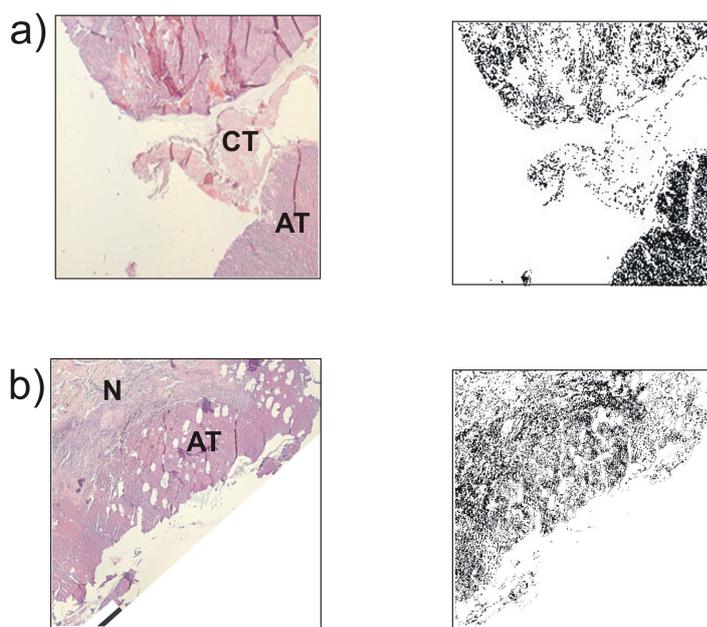


Figura 4.2: Resultados del análisis de adenocarcinoma de mama por tinción HE y por sincrotrón micro-XRF. En la columna de la izquierda se muestra la vista del microscopio óptico de los cortes de 2 micras teñidos con HE. En la columna derecha, las mismas vistas de las columnas de la izquierda que muestran en negro solo los píxeles de color azul púrpura teñidos con hematoxilina.

entre otros. En un trabajo preliminar se comprobó que las zonas de células tumorales activas (AT) muestran concentraciones detectables de fósforo (por encima del límite de detección) [67]. En este trabajo se utilizó este resultado para seleccionar los puntos de las muestras con concentraciones de fósforo detectables por micro-XRF.

4.2.3. Análisis por micro-XRF

Con respecto al segundo corte de 30 micrones, fue colocado en un film especial Kapton de 8 micrones para la medición con micro-XRF. Se utilizó polivinilalcohol (PVA) como adhesivo ya que no genera ruido en el espectro a la hora del análisis. Las mediciones por micro-XRF se realizaron en el Laboratorio de Técnicas No Convencionales por Rayos X (LTFNC) de la FaMAF-UNC.

Para el análisis cuantitativo de P y Ca en muestras biológicas, la fuente de rayos X empleada fue un tubo de rayos X de ánodo de Mo modelo Philips PW2275 / 20 con una dimensión de foco de 0,4 mm × 12 mm y eje de simetría en la dirección vertical. Se seleccionó el foco puntual, con un área de emisión efectiva de 0,4 mm × 1,26 mm apuntando 6° hacia abajo con respecto al plano horizontal. Las mediciones se realizaron con el tubo de rayos X ajustado a 20 kV-10 mA. La zona dentro de la cual se irradiaron las muestras estaba cerrada y blindada mediante una caja de 1,5 m × 1 m × 1 m con atmósfera de aire limitada por paredes de plomo de 1mm de espesor.

Se empleó como lente el monocapilar cónico de vidrio descrita en el Capítulo anterior. Esta lente se montó en una platina de cuatro ejes de precisión (arriba-abajo, izquierda-derecha, rotación horizontal-vertical) controlada manualmente a través de un gimbal Newport modelo

Cat.LP-05A. Permite alta precisión al posicionar la muestra, con una resolución de 0,6 micrones en los movimientos lineales y una resolución angular de 1 mrad en las rotaciones.

El portamuestras estaba motorizado y controlado por una computadora, para facilitar la reproducibilidad de las mediciones. Las traslaciones se comandaron mediante tornillos de bolas recirculantes Rexroth que aseguraron una resolución espacial de 13 micrones para las tres direcciones ortogonales. La emisión XRF se recogió utilizando un detector Si-PIN Amptek XR100T (180 eV de resolución para la línea K_{α} del Mn) colocado a 84° del haz de excitación a lo largo del plano vertical y perpendicular a la muestra. Las muestras se mantuvieron en un marco de diapositivas, usado como portaobjeto. La distancia desde la ventana de entrada del detector hasta la superficie de la muestra se fijó en 9 mm.

4.2.4. Simulación Monte Carlo de la micro-XRF

Hoy en día, el continuo progreso en la tecnología informática facilita cálculos exhaustivos de transporte de radiación dando lugar a enfoques de cuantificación que siguen los modelos teóricos de interacción de la radiación con la materia y cuentan con bibliotecas de secciones eficaces y coeficientes de atenuación para radiación de primero, segundo, tercero y hasta cuarto orden. Para ejecutar las simulaciones, el software XMI-MSIM requiere parámetros de entrada que coincidan estrechamente con los tres componentes principales del espectrómetro: la fuente de rayos X, el detector y la muestra.

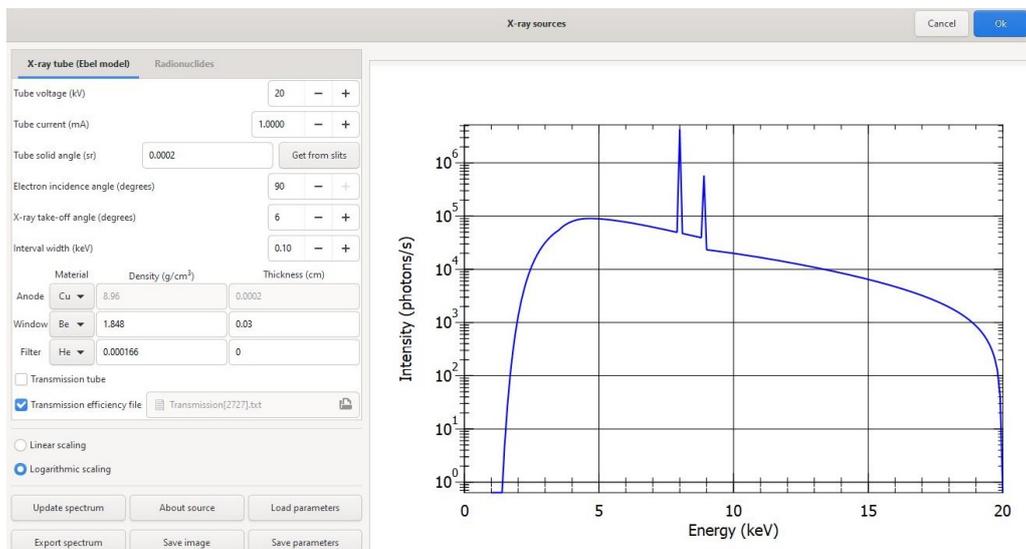


Figura 4.3: Pestaña correspondiente a la configuración para el tubo de rayos X y espectro incidente del programa XMI-MSIM, los parámetros ya ingresados corresponden a los actualmente utilizados en éste trabajo.

Para la fuente de rayos X, la divergencia del haz y el espectro de rayos X se midieron siguiendo una metodología previamente propuesta que considera la modulación de la lente [64], incorporándose el archivo de la transmisión en el capilar que se obtuvo del capítulo anterior (ver figura 4.3). Se configuró el tubo de rayos X a 20 kV y 10 mA, siendo además 6° el ángulo de salida del haz respecto al ánodo.

La mayoría de los parámetros del detector fueron proporcionados por el fabricante en el manual de especificaciones, excepto la calibración de energía, Factor de Fano y el ruido elec-

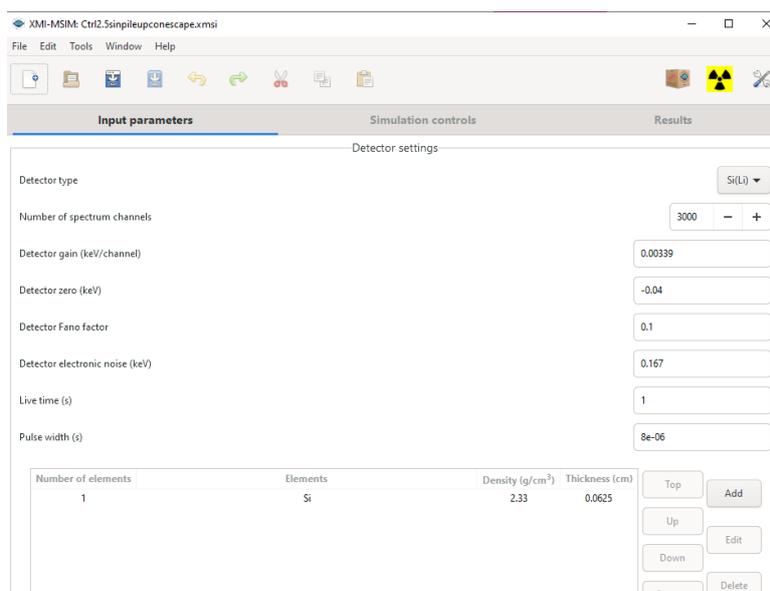


Figura 4.4: Pestaña correspondiente a la configuración para el detector.

trónico, los cuáles se establecieron mediante la medición de las energías de emisión XRF de un bloque estándar con distintos elementos puros (Ca, P, Se, Sc, Ni, Cr, entre otros). En particular para el cálculo del factor de Fano y el ruido electrónico se siguieron los siguientes pasos: Primeramente se registraron espectros XRF de elementos puros con líneas de emisión en el rango de rayos X del espectrómetro micro-XRF. Se utilizaron los elementos puros contenidos en el bloque certificado de la firma *Microanalysis Consultants Ltd.* especialmente diseñado para el microanálisis en general. A partir de los espectros XRF y utilizando la ec. 2.23 para ajustar los picos (correspondientes a líneas de emisión $K_{\alpha 1}$ y $K_{\alpha 2}$) se obtuvo el valor para la desviación media cuadrática σ la cuál se inicializó a partir de un ajuste simple en Origin. Luego conociendo la ec. 2.20 se calculó el valor para el $FWHM$ de cada pico y se graficó $FWHM^2$ en función de la energía de emisión para cada elemento. Con los valores de la pendiente y ordenada de dicha gráfica y combinando además las ec. 2.18 y 2.20 se calculó finalmente el valor para el factor de Fano y el ruido electrónico (ver figura 4.4).

En cuanto a la posición y orientación de la muestra fueron cuidadosamente determinadas por mediciones de distancias con calibre, mientras que los vectores posición del arreglo experimental se calcularon en base al ángulo de incidencia sobre la muestra y teniendo en cuenta los ejes propuestos por el programa de simulación como se observa en la figura 4.5.

Para probar la capacidad del software para simular espectros de micro-XRF y además validar los parámetros de entrada antes determinados, se utilizó una muestra de vidrio certificada BAM S005A (BAM-Federal Institute for Materials Research and Testing - Alemania).

4.2.5. Modelado de muestras tumorales para micro-XRF

Para calcular el transporte de rayos x en las muestras tumorales es necesario conocer la composición química de su matriz. Para matrices orgánicas no es posible obtener esta información en forma directa mediante el análisis por micro-XRF de los elementos componentes de la matriz porque su emisión XRF es muy difícil de detectar. Esto es particularmente cierto

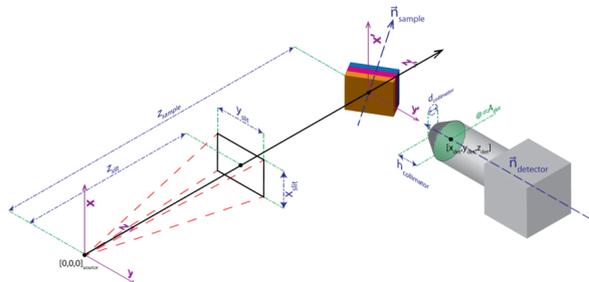
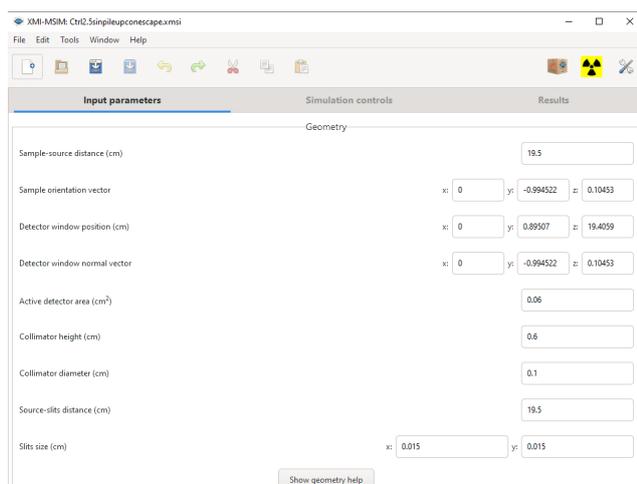


Figura 4.5: A la izquierda se observa la pestaña correspondiente a la configuración para la posición y orientación muestra/detector, a la derecha el bosquejo de la geometría experimental brindada por el programa que permite calcular las posiciones y orientaciones según los ejes coordenados allí propuestos.

para H, C, N y O que son los elementos mayoritarios encontrados en muestras tumorales. En estos casos el procedimiento usual consiste en proponer una composición química para la matriz orgánica, emplearla en la simulación del espectro micro-XRF de una muestra de prueba y luego comparar con el correspondiente espectro micro-XRF real. Aquella matriz que logre la mayor coincidencia entre ambos espectros micro-XRF será la matriz validada. En esta comparación no solo los picos XRF deberán coincidir sino también el fondo espectral. Esto último es muy importante porque el fondo espectral es causado principalmente por la dispersión de rayos x en la matriz.

El análisis de tejidos biológicos blandos incluidos en parafina mediante microscopio óptico, muestra que los tejidos deshidratados se encuentran impregnados en parafina. Así, una forma de modelar a la matriz de las muestras tumorales para micro-XRF es utilizando una mezcla de parafina con el tejido deshidratado. Para obtener entonces el coeficiente de atenuación correspondiente a neoplasias mamarias malignas deshidratadas se substrajo la contribución del agua a los valores reportados en el trabajo de *Poletti et al.* [69] para la muestra de tumor de tipo II, agregándose posteriormente el porcentaje de parafina en reemplazo del agua y los elementos traza que constituyen al tumor. El contenido medio de agua en los adenocarcinomas disponibles se estimó suponiendo que el volumen medio que ocupa el agua es igual al volumen medio ocupado por la parafina que corresponde a un 30% de la muestra. Mientras que los elementos traza se incorporaron en concentraciones que se estimaron a partir del trabajo de *Silva et al.* [70] y de la composición para un tejido mamario obtenida de tabla [71].

Para darle validez a la matriz calculada se utilizó una de las muestras tumorales para micro-XRF denominada Ctrl2 que pertenecía al conjunto de muestras disponibles descritas en la subsección 4.2.1. En una prueba preliminar, los espectros micro-XRF simulados no coincidieron completamente con los experimentales, sin importar cuán precisos fueran los parámetros de entrada. Un análisis cuidadoso de los espectros medidos permitió identificar las contribuciones de rayos X procedentes del blindaje del espectrómetro, del soporte de muestra y de los colimadores que no se habían tenido en cuenta al cargar el modelo de simulación. Para conocer estas contribuciones secundarias de rayos X se midió un espectro sin muestra pero manteniendo todos los componentes del espectrómetro en su lugar, incluyendo el portamuestra. Se lo dejó

registrando la radiación de fondo durante una hora. Al final, esta contribución fue eliminada de todos los espectros micro-XRF restándose las tasas de conteo canal por canal mediante la siguiente ecuación:

$$N_{corr} = N - N_B \quad (4.1)$$

donde N es la tasa de conteo de la muestra en un canal dado y N_B es la tasa de conteo del espectrómetro sin la muestra en el mismo canal.

4.2.6. Cuantificación de P mediante estándares virtuales externos

El software XMI-MSIM cuenta con dos métodos de cuantificación: el método de cuantificación iterativo y el método de cuantificación mediante estándares virtuales. Para éste trabajo se ha empleado únicamente el segundo método el cuál también utiliza la simulación del transporte de radiación, pero de forma indirecta. Se basa en la comparación de las muestras desconocidas con muestras estándar virtuales externas mediante una curva de calibración que relaciona las intensidades netas XRF con la composición elemental [66, 16, 72].

Dado que el pico de escape de las líneas K_α del Ca interfiere con el pico de fluorescencia de P (elemento de interés) es necesario realizar una cuantificación de ambos elementos, por lo que el procedimiento consiste en simular estándares con distintas concentraciones de P y Ca que cubren el rango esperado para las muestras desconocidas manteniendo fijos el resto de parámetros.

Para el análisis *in situ*, este enfoque tiene como ventaja más valiosa el ser considerablemente más rápido que el enfoque iterativo. En este trabajo, este método se implementó para muestras estándares virtuales externas con concentraciones de Ca que tomaron los valores de 3000, 4000, 5650, 6500 y 8300 ppm p/p, mientras que P varía de 250 a 1500 ppm p/p en pasos de 250 ppm p/p. Para cada valor de Ca fijado, la concentración de P se varió en el rango mencionado, se simularon entonces un total de 30 espectros de aproximadamente 20 minutos cada uno.

Las intensidades netas de XRF para el Ca y P se obtuvieron ajustando los espectros micro-XRF mediante el uso del software libre PyMca [73]. Finalmente se aplicó una superficie de calibración para la concentración de fósforo en la muestra en función de las intensidades de Ca y P utilizando el ajuste de mínimos cuadrados mediante el software para análisis de datos Origin.

4.2.7. Obtención del límite de detección

A partir de los 30 espectros simulados fijando los valores de Ca y variando las concentraciones de P en los estándares virtuales, se calculó el límite de detección para P. La expresión usualmente citada en la literatura resulta:

$$LD = \frac{3S}{M} \quad (4.2)$$

donde S es lo que se llama error de fondo y se calcula como \sqrt{B} donde B es el fondo del espectro bajo el pico de interés, y M la inversa de la pendiente de la recta de calibración de concentración de P en función de sus intensidades. Como se trabajaron con 5 concentraciones distintas de Ca (5 rectas de calibración distintas), se obtienen por lo tanto 5 valores correspondientes a los límites de detección.

El procedimiento para el cálculo del fondo B para cada espectro consistió en tomar un intervalo de energías alrededor de los picos K_α y K_β para P. La certeza fue de 4σ (94 %) para cada intervalo, sumando luego sobre todas las cuentas para el fondo. Para poder definir σ se utilizó el valor del $FWHM$ brindado por el ajuste avanzado que ofrece el software PyMCA para espectros de micro-XRF. Usando que:

$$\sigma = \frac{FWHM}{2,355} \quad (4.3)$$

Se calcularon los extremos del intervalo de energías como:

$$E_{min} = (E_{PK_\alpha} - 2\sigma_{K_\alpha}) \quad E_{max} = (E_{PK_\beta} - 2\sigma_{K_\beta}) \quad (4.4)$$

donde E_{PK_i} es la energía para la línea K_i correspondiente.

Finalmente para cada valor de Ca se tomó un promedio para \bar{B} dado que se obtuvo un fondo B para cada espectro, es decir seis valores, uno para cada variación de la concentración de P. Aprovechando la metodología desarrollada para el cálculo del límite de detección, se repitió el procedimiento para nuevos ángulos de incidencia, intentando siempre que se mantuvieran en un intervalo factible para su implementación experimental. Los ángulos de incidencia evaluados fueron 6° , 15° , 20° y 25° . El objetivo fue mostrar que mediante simulación Monte Carlo es posible analizar el rendimiento de distintos arreglos experimentales sin su implementación física, lo que redundaría en una optimización del trabajo en laboratorio. En este caso el objetivo fue encontrar un punto medio entre un buen límite de detección para P y una buena resolución espacial. Se tomó luego la muestra con concentración de Ca correspondiente al límite de detección medio, repitiéndose el cálculo del límite de detección para todos los ángulos de incidencia seleccionados.

4.2.8. Aplicación del arreglo experimental en laboratorio convencional

Una vez encontrada la configuración experimental con la que se consiguió simular un espectro de tejido tumoral mamario muy cercano al real y además se optimizó la observación de P, principal objetivo de éste trabajo, se prosiguió con la aplicación experimental. Como se ha mencionado anteriormente las mediciones por micro-XRF se realizaron en LTFNC de la FAMAFA y la posición del portamuestras se controló manualmente mediante una computadora en cada paso.

Para la medición se seleccionó una muestra tumoral nombrada Ctrl6b la cuál, se comprobó con anterioridad mediante el análisis histológico, poseía una gran variabilidad de zonas en el tejido, es decir la presencia de P no resultaría prácticamente homogénea en toda la muestra y sería posible cuantificar con mejor precisión la presencia de dicho elemento. Se realizaron entonces dos mediciones en dos orientaciones, ésta diferencia de orientación implicó una rotación en 90° de la muestra. Con un tiempo de adquisición de 2 minutos para ambas mediciones, el primer transecto, en un principio se midió con pasos de a 200 micrones en la dirección X (ver figura 4.6), sin embargo se observó muy poca variación en la intensidad de P por lo que se aumentó a pasos de 600 micrones. Para el segundo transecto, con la muestra rotada en un ángulo de 90° , se tomaron pasos de 400 micrones en la misma dirección de principio a fin.

Durante el primer transecto se realizaron 14 mediciones, mientras que para el segundo se realizaron unas 28 mediciones. Se controló en cada cada adquisición que la tasa de conteo fuese

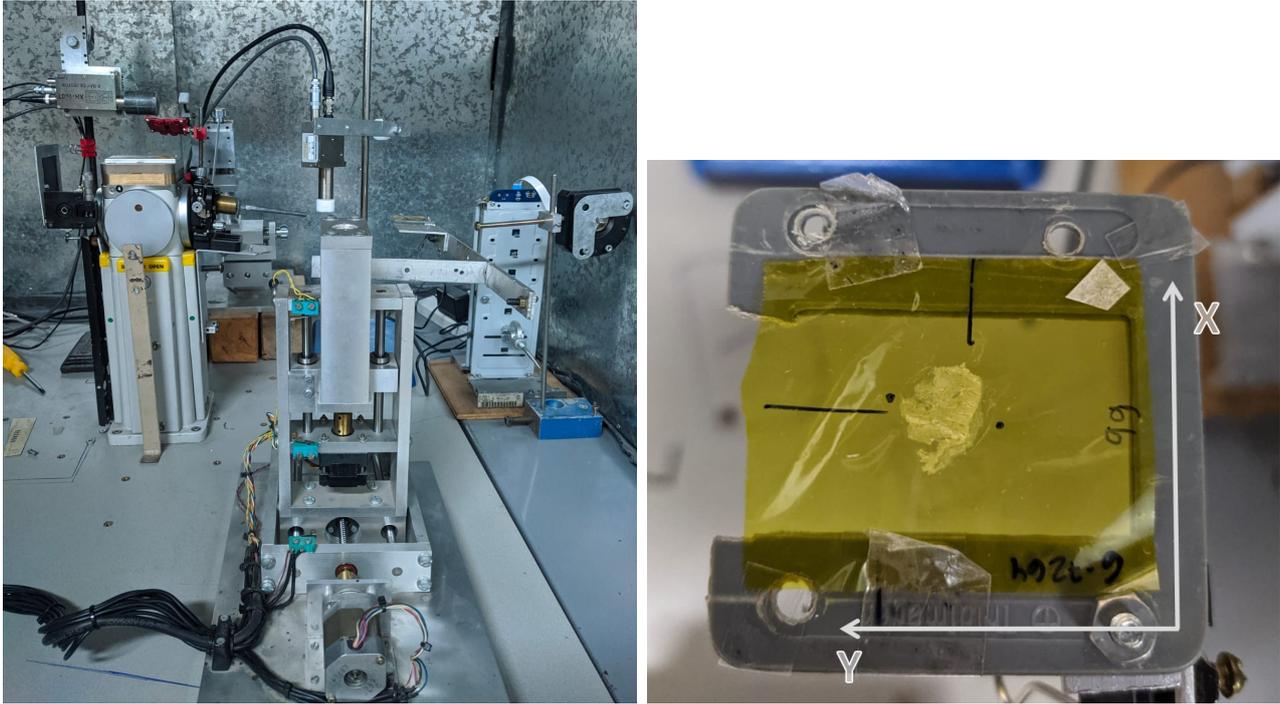


Figura 4.6: A la izquierda se observa el arreglo experimental para una medición por micro-XRF en el laboratorio convencional, a la derecha la muestra Ctrl6b marcada con los ejes que permitían su desplazamiento controlado por computadora.

la más alta, corrigiendo la altura en Z en caso contrario.

4.3. Resultados y discusiones

4.3.1. Parámetros de entrada para software de simulación

A partir de los espectros para cada elemento medido del bloque y mediante la utilización del programa Origin para el análisis de dichos espectros, se obtuvo el valor del canal donde se encontraba el máximo de cada pico de intensidad K_α . Conociéndose entonces el valor del canal para cada elemento y su energía de emisión, se trazó la siguiente recta de calibración:

$$E[\text{keV}] = (0,00339 \pm 0,00008) \times \text{Canal} - (0,04 \pm 0,02) \quad (4.5)$$

donde la pendiente corresponde al parámetro de la Ganancia del detector y la ordenada al cero del detector (ver figura 4.4).

Para el cálculo del Factor de Fano y el ruido electrónico, como se mencionó en secciones anteriores, se obtuvo el ancho total a la mitad del máximo $FWHM$ para cada pico K_α correspondiente a cada elemento medido. Teniendo éstos valores y conociéndose además su relación lineal con los parámetros de interés, se realizó el ajuste de su cuadrado en función de la energía como se observa en la figura 4.7.

Siendo los valores de pendiente S y ordenada I :

$$S = (0,0021 \pm 0,0002) \text{ keV} \quad I = (0,028 \pm 0,001) \text{ keV}^2 \quad (4.6)$$

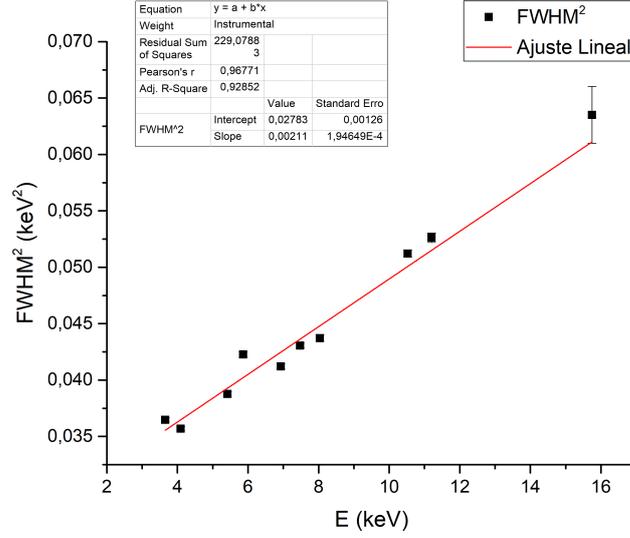


Figura 4.7: Ajuste lineal para los valores de $FWHM^2$ en función de las energías para las líneas K_α .

Se calcularon finalmente los parámetros:

$$F = (0, 10 \pm 0, 01) \quad \Delta E_{Elec} = (0, 167 \pm 0, 006) \text{ keV} \quad (4.7)$$

donde F es el Factor de Fano y ΔE_{Elec} es el ruido electrónico.

Tomando como referencia los ejes de la figura 4.5, considerando un ángulo de incidencia sobre la muestra de 6° y una distancia Muestra-Fuente de 19,5cm, se obtuvieron además los siguientes vectores:

- **Vector unitario normal a la muestra:** $\hat{n}_s = -0,99452\text{cm } \hat{y} + 0,10453\text{cm } \hat{z}$
- **Posición del detector:** $\vec{P}_D = 0,89507\text{cm } \hat{y} + 19,40592\text{cm } \hat{z}$

4.3.2. Validación de los parámetros de simulación

Una vez que todos los parámetros de entrada generales del programa de simulación fueron cargados se procedió a simular el espectro micro-XRF de la muestra de referencia BAM S005A. Para los valores característicos, como composición y densidad de la muestra, se utilizaron los valores certificados por el fabricante sin ningún cálculo previo.

Dado que el tiempo de simulación depende, en gran medida, de la cantidad de elementos que componen a la muestra, inicialmente se simuló el espectro con un número bajo de elementos y se fueron agregando conforme la simulación se ajustaba al espectro real medido para equilibrar siempre el tiempo de simulación y que no se extendiese más de lo necesario.

Cómo se observa en la figura 4.8 se lograron simular espectros que se ajustaron muy bien al real. Se concluyó entonces que los parámetros de entrada calculados con anterioridad supieron imitar al arreglo experimental llevado a cabo en el laboratorio convencional.

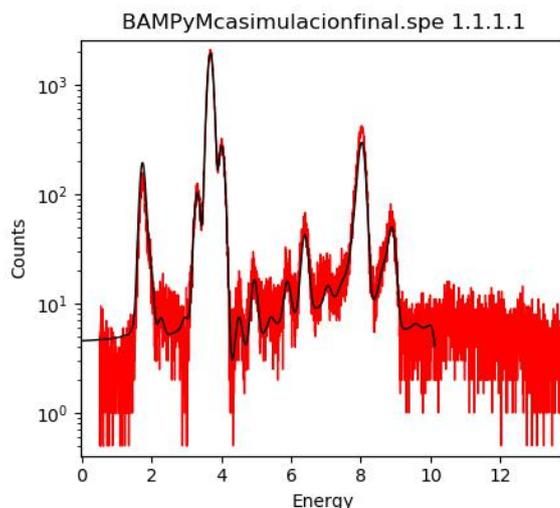


Figura 4.8: En rojo se observa el espectro para la muestra BAM medido en laboratorio convencional y en negro el espectro simulado.

4.3.3. Validación de la matriz de muestras tumorales para micro-XRF

Como se explicó anteriormente en la subsección 4.2.5, el modelado de una matriz cuyo coeficiente de atenuación se aproxime al de un tejido tumoral mamario real fue la primer dificultad del trabajo. Finalmente (después de que se probaran otros elementos equivalentes que no resultaron) se decidió utilizar la composición química reportada en la publicación de Poletti [69] para un tumor de tipo II en el modelado de la matriz. Una primera verificación numérica consistió en comparar algunos valores calculados con valores experimentales aceptados en la literatura científica (Ver tabla 4.1). Para éste cálculo se extrajeron de la tabla [74] los coeficientes de atenuación másicos μ/ρ de cada elemento componente para las distintas energías. Se obtuvo luego el coeficiente másico total del compuesto el cuál se multiplicó por la densidad promedio del tejido tumoral deshidratado $\rho = 1,1gr/cm^3$ para conseguir el coeficiente de atenuación lineal. Ésta densidad se extrajo de valores ya calculados por estudiantes de la facultad de medicina en el marco del proyecto del cuál se obtuvieron las muestras tumorales de murinos. Los resultados con sus respectivos errores se comparan en la misma tabla con los reportados por el trabajo de Tomal [68].

E [keV]	μ [1/cm]	μ Tomal <i>et al.</i> [1/cm]
8	$10,1 \pm 0,9$	$11,0 \pm 0,7$
15	$1,6 \pm 0,1$	$1,7 \pm 0,1$
20	$0,81 \pm 0,07$	$0,86 \pm 0,05$
30	$0,39 \pm 0,04$	$0,40 \pm 0,03$

Tabla 4.1: En la segunda columna se observan los coeficientes de atenuación lineal calculados para el compuesto en función de las energías, mientras que en la tercer columna se encuentran los valores de referencia.

Se comprobó el solapamiento entre intervalos para ambos valores de μ lo cual respaldó la

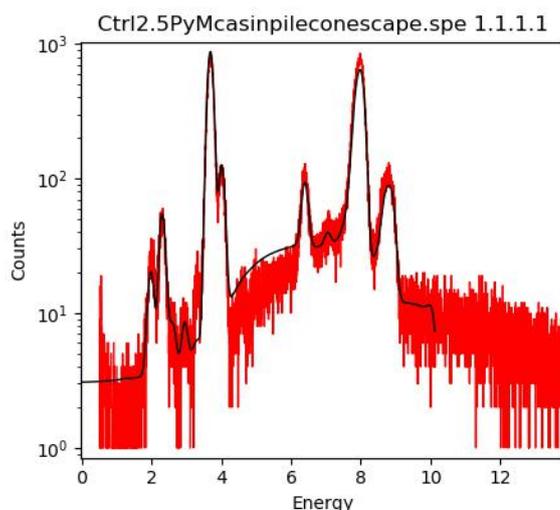


Figura 4.9: En rojo el espectro medido para la muestra tumoral Ctrl2, en negro el espectro simulado a partir del estándar virtual.

composición química seleccionada para la matriz de los tumores mamarios. En un siguiente paso, y para completar la composición esta matriz, se agregaron los elementos traza (elementos de interés).

Para obtener la matriz completa de las muestras tumorales para micro-XRF, se calcularon las modificaciones en las proporciones de cada elemento componente causadas por la fijación del tumor en parafina (CH_2). Para conseguir la composición final se simulaban los espectros de varias matrices, variando en cada caso (variaciones pequeñas) la proporción de los elementos detectados hasta conseguir que se ajustara al medido. El compuesto final obtenido con sus elementos y concentraciones se observa en la tabla 4.2.

Elemento	Fracción de peso [%]
H	11,0021
C	36,8457
N	3,9698
O	47,3175
P	0,1106
S	0,2212
Cl	0,0100
K	0,0009
Ca	0,5084
Fe	0,0122
Cu	0,0002
Zn	0,0014

Tabla 4.2: Elementos presentes en el estándar virtual para el tumor mamario y sus correspondientes fracciones de peso.

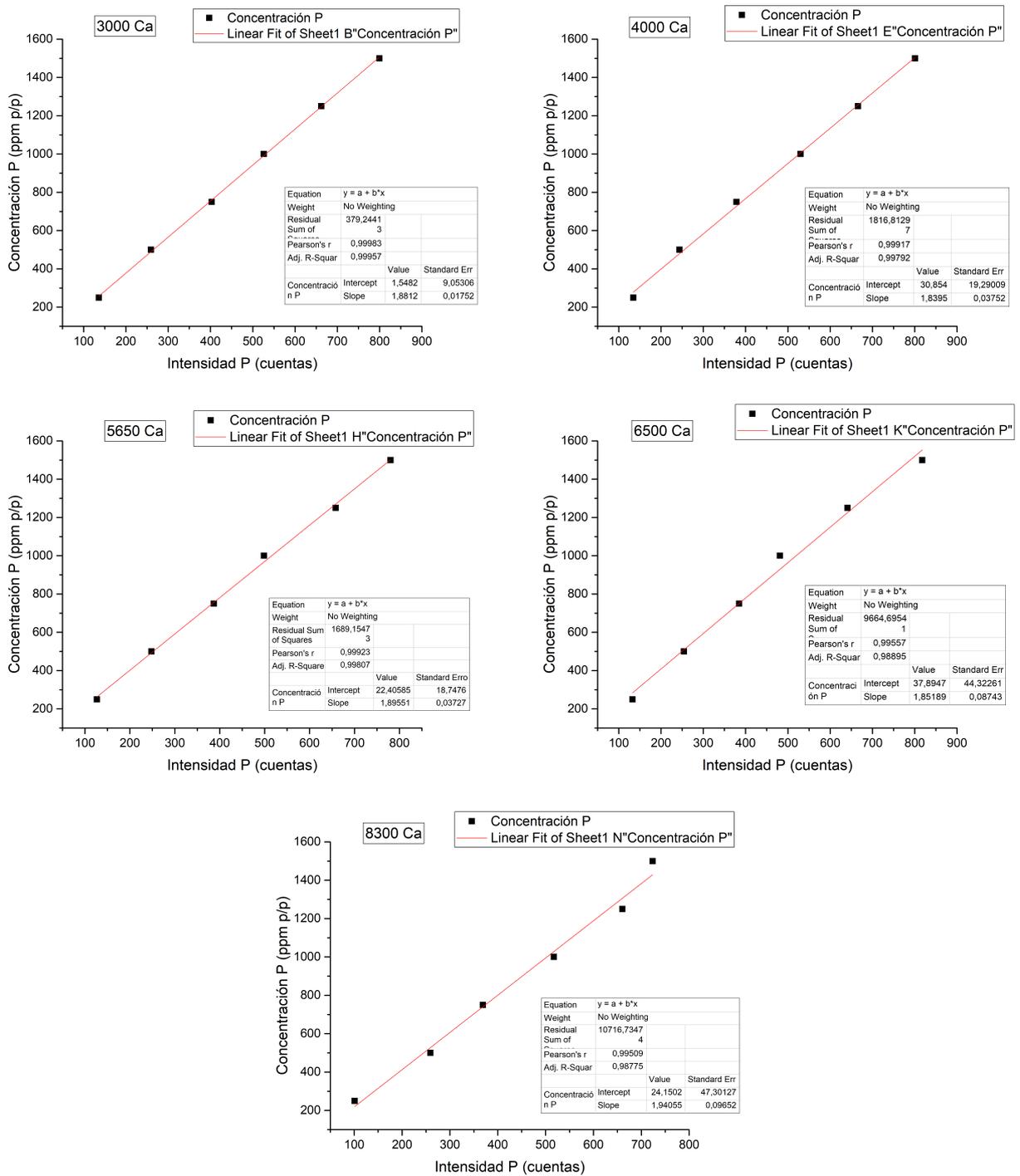


Figura 4.10: Rectas de calibración para la concentración de P en función de su intensidad, cada recta corresponde a una concentración de Ca distinta.

Finalmente, como se observa en la figura 4.9, el espectro simulado se ajustó correctamente al espectro medido para la muestra tumoral indicando una correcta asignación de concentraciones para los elementos presentes en el estándar fabricado y validándose una vez más los parámetros de entrada del programa. Es importante aclarar que pese a que se observan algunas zonas donde

la simulación no se ajusta exactamente a la medición se despreciaron las diferencias dado que los gráficos se encuentran en escala logarítmica, por lo que los detalles están magnificados.

4.3.4. Cuantificación de P mediante estándares virtuales externos

A partir de las intensidades que se obtuvieron del ajuste de los espectros simulados para los 30 estándares virtuales de P se realizaron cinco rectas de calibración, relacionando la concentración de P en con la intensidad de P en el estándar simulado. Cada recta, por lo tanto, correspondió a un valor fijo para Ca variándose únicamente la concentración de P.

La obtención de rectas de calibración con igual pendiente y ordenada para cada valor de Ca demostraría una no influencia del pico de escape para el Ca en el pico de interés de P.

Sin embargo y como se observa en la figura 4.10 las rectas resultaron distintas, con fluctuaciones tanto en la pendiente como en la ordenada. La fluctuación de la pendiente, no obstante, no se puede asociar a la influencia directa del Ca en el pico de P, sino más bien a la atenuación del haz en la muestra, dado que al variar las concentraciones de los elementos el coeficiente de atenuación también varía afectando inevitablemente a la medición de la intensidad de P. La fluctuación de la ordenada es causada por variaciones en el pico de escape de la línea K_α del Ca, dado que este pico tiene la misma energía que la línea K_α del P. Entonces la ordenada de la curva de calibración representa la intensidad para concentración cero de P y depende directamente del nivel de Ca en la matriz.

Dado que se comprobó la relevancia del Ca en la medición de P, en el siguiente paso se graficaron los puntos de concentración de P en función de la Intensidad de P (IP) y de la intensidad de Ca (ICa) (como se observa en la primer imagen de la figura 4.11) y mediante el soporte del programa Origin se realizó un ajuste de mínimos cuadrados para conseguir la superficie de ajuste (como se observa en la segunda imagen de la figura 4.11).

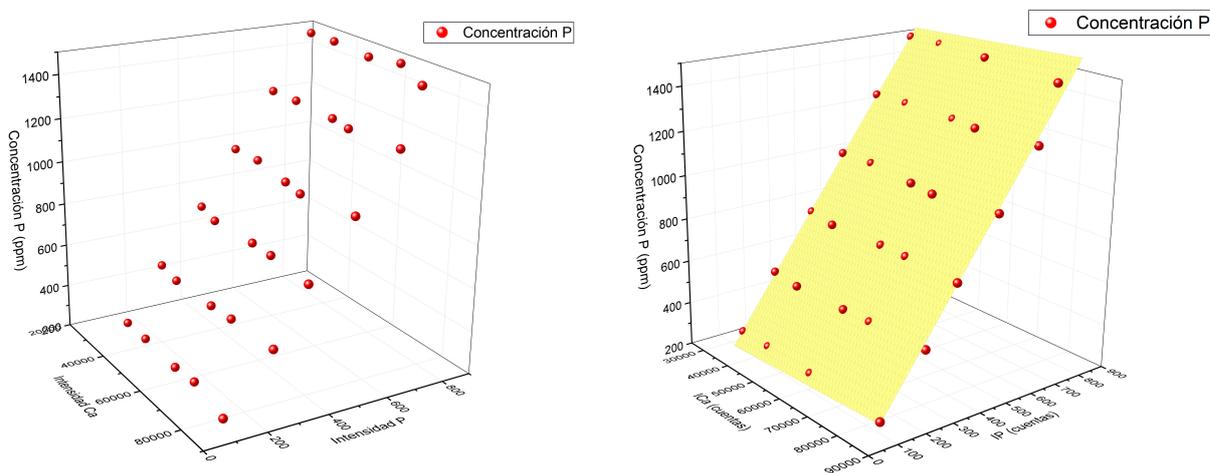


Figura 4.11: Superficie de ajuste para la concentración de Fósforo en el tejido tumoral.

El resultado final del ajuste de mínimos cuadrados arrojó una superficie de calibración la cuál depende de las intensidades XRF tanto del P como del Ca de la forma:

$$C_P = a_0 + a_1ICa + a_2IP \quad (4.8)$$

donde C_P es la concentración de P en la muestra y los a_i son los coeficientes del ajuste con valores:

$$a_0 = (-24 \pm 20) \text{ppm} \quad a_1 = (9E-4 \pm 3E-4) \text{ppm/cuentas} \quad a_2 = (1,88 \pm 0,03) \text{ppm/cuentas} \quad (4.9)$$

Se observa entonces un comportamiento lineal respecto a ambas variables en el rango de concentraciones típicas de las muestras tumorales para micro-XRF.

4.3.5. Límite de detección

Los 5 valores para el límite de detección que resultaron de los cálculos mencionados en la sección anterior se muestran en la Tabla 4.3. La comparación con un trabajo previo con radiación de sincrotrón [67] donde se obtuvo un valor mayor (240 ppm p/p), muestra que una reducción de la distancia muestra-detector y el aumento del tiempo de detección es suficiente para reducir significativamente el límite de detección.

Ca [ppm p/p]	Límite de detección de P [ppm p/p]
3000	100,798 ± 0,006
4000	105,33 ± 0,01
5650	118,99 ± 0,01
6500	120,70 ± 0,03
8300	136,88 ± 0,03

Tabla 4.3: Límite de detección para P calculado para las distintas concentraciones de Ca en la matriz.

Una vez calculados los límites de detección para la configuración inicial del espectrómetro, se estudió su dependencia con el ángulo de incidencia de la radiación de excitación. Para esto se fijó la concentración de Ca de la matriz en la mitad del rango observado en las muestras, es decir, 5650 ppm p/p. Con ésta matriz y para tres ángulos de incidencia (15°, 20° y 25°) se simularon tres nuevos espectros tomándose únicamente tres valores distintos para la concentración de P (250, 1000 y 1500 ppm p/p). Las tres nuevas rectas de calibración se encuentran en la figura 4.12.

Ángulo de incidencia [°]	Límite de detección de P [ppm p/p]
15	155,130 ± 0,003
20	179,981 ± 0,002
25	194,033 ± 0,001

Tabla 4.4: Límite de detección para P calculado a partir del estándar con 5650 ppm p/p de Ca para tres ángulos distintos de incidencia.

Se realizaron nuevamente los cálculos para la obtención del límite de detección en los nuevos espectros, siendo los resultados los exhibidos en la Tabla 4.4.

Se concluye finalmente que tanto un aumento de la concentración de Ca como un aumento en el ángulo de incidencia, provocan un incremento en el límite de detección para P. Esto último

sugirió que el ángulo de incidencia de 6° con el que se realizaron las primeras mediciones resultó ser la mejor opción para optimizar la detección de P.

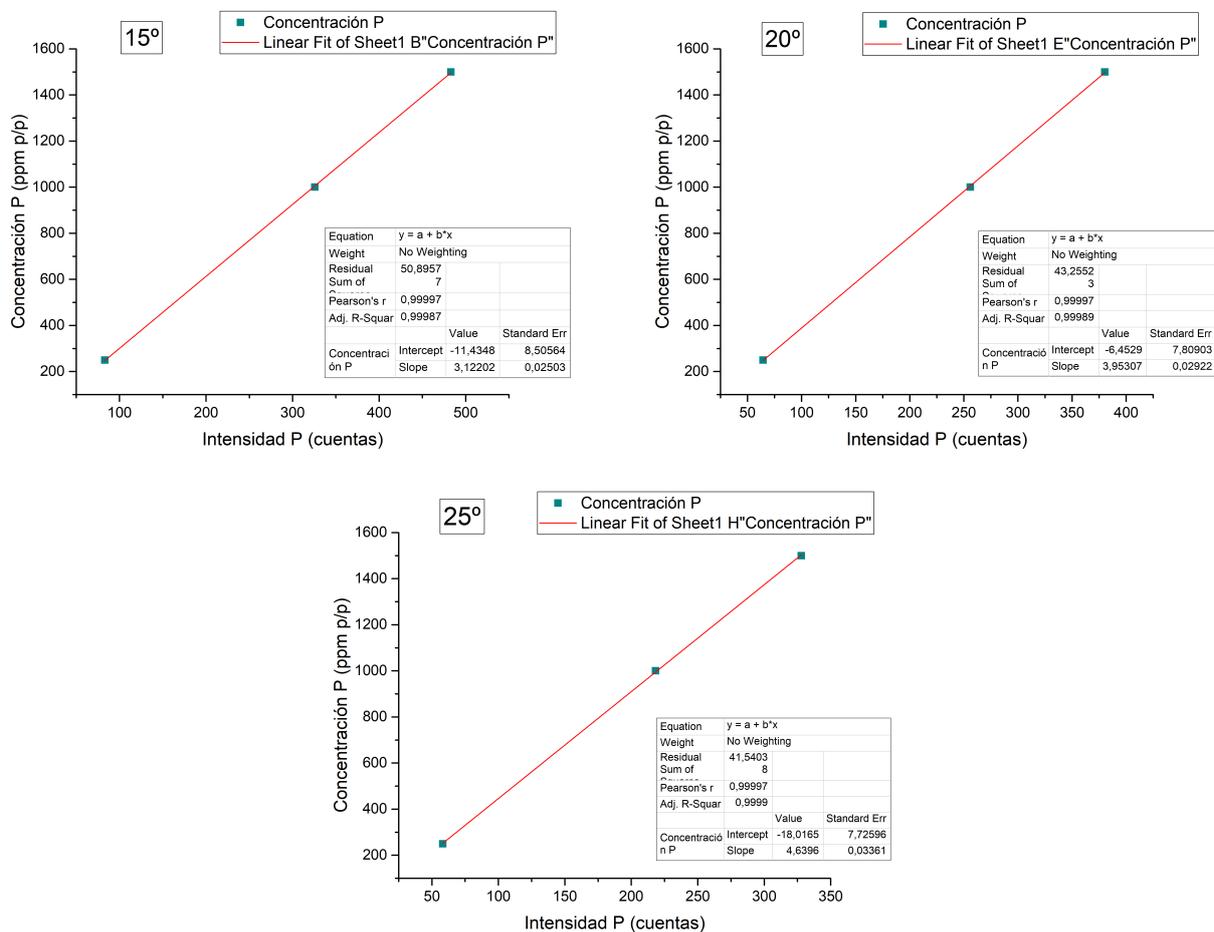


Figura 4.12: Rectas de calibración para la concentración de P en función de su intensidad, cada recta corresponde a un ángulo de incidencia distinto y a un valor fijo de Ca en 5650 ppm p/p.

4.3.6. Aplicación de la metodología

Como se explicó en la sección 4.2.8 se realizaron dos transectos perpendiculares en la muestra de prueba Ctrl16b. Los espectros de micro-XRF registrados en cada punto de los transectos se ajustaron mediante el programa PyMCA en un rango que abarcaba los picos de P y Ca para obtener sus intensidades. En estos ajustes se incluyó el pico de escape para la línea K_{α} de Ca.

A partir de la expresión para la superficie de ajuste de P 4.8 y utilizando los valores de intensidad de P y Ca ajustados, se calcularon los valores para la concentración de P como se muestra en la figura 4.13.

Se puede decir finalmente que, tal y como se esperaba, los puntos de concentración para P varían notablemente según la zona del tumor irradiado, lo que indicaría la presencia de zonas de tumor activo y zonas donde la actividad celular fue menor.

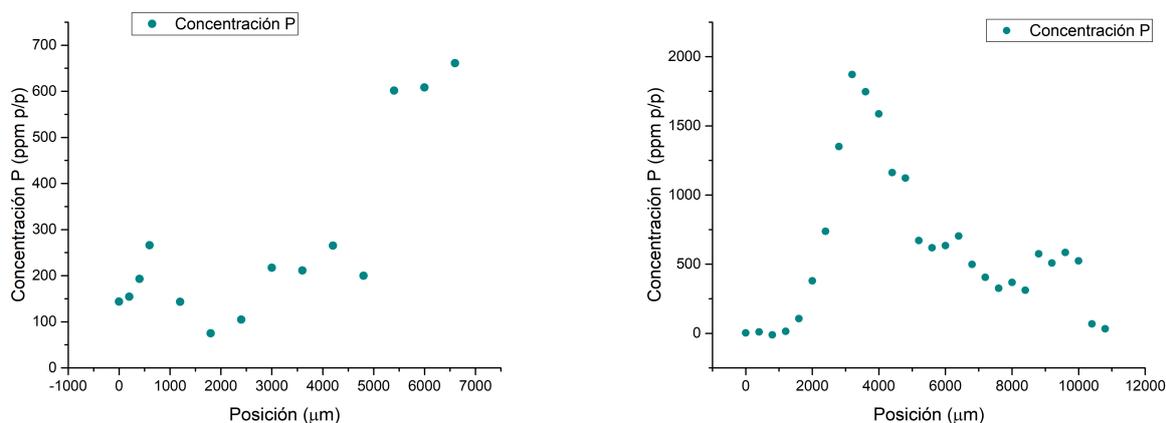


Figura 4.13: Concentración de P en la muestra tumoral (Ctrl6b) medida en función de su posición a partir de una configuración experimental verificada a través de las simulaciones. La figura de la derecha corresponde a la misma muestra pero rotada un ángulo de 90° .

4.4. Conclusión

El método de simulación Monte Carlo mediante estándares virtuales, proporcionó concentraciones de P de forma sencilla y rápida mediante el ajuste usual de las intensidades netas de XRF combinadas con su evaluación en una superficie de calibración preestablecida. Pese a que el tiempo utilizado para simular los estándares virtuales resultó ser mayor de lo esperado, aún así fue una tarea mucho menos laboriosa que la preparación física de estándares reales. Además estas simulaciones se realizaron por una única vez durante la calibración del espectrómetro, mientras que para la cuantificación de P solo se usaron sus resultados. Por lo tanto la aplicación del procedimiento analítico desarrollado es considerablemente más sencilla que métodos tradicionales sin perder por ello precisión en los resultados [16]. Si bien los límites de detección que se obtienen para el P se encuentran dentro del orden esperado, se pudo corroborar virtualmente que una eficiente geometría experimental puede disminuir su valor significativamente.

Mediante la implementación del programa de simulación se identificó también la influencia del Ca en el análisis de P que permitió una efectiva cuantificación. Aunque no fue el objetivo de este trabajo, los datos disponibles podrían ser utilizados para igualmente realizar una cuantificación de Ca, proporcionando concentraciones simultáneas de ambos elementos lo cual sería muy útil para identificar microcalcificaciones tumorales.

Los resultados obtenidos en éste capítulo reflejan una lograda cuantificación local y precisa del contenido de Fósforo en muestras de adenocarcinomas mamarios, lo que proporciona una eficaz herramienta para la detección de células tumorales activas y el monitoreo de la progresión tumoral en el tejido.

Capítulo 5

Conclusión y perspectivas a futuro

Se logró desarrollar un modelo teórico de transporte de rayos x en la lente disponible que proporciona un método eficiente para la obtención de la transmisión gracias a la asistencia de la simulación Monte Carlo. A diferencia de métodos tradicionales, se basa en la medición experimental por micro-XRF de una única conveniente muestra de referencia que es evaluada precisamente considerando todos los procesos relevantes de interacción de los rayos x. Esta metodología es un pilar importante en la cuantificación de P en tejidos tumorales basada en simulaciones Monte Carlo ya que proporciona el espectro de rayos x de excitación con buena precisión.

Posteriormente se logró definir y validar los parámetros de entrada del software XMI-MSIM para simulación de transporte de rayos x en el espectrómetro disponible de micro-XRF. Luego se implementó el método de cuantificación de P en muestras tumorales por estándares virtuales y se aplicó sobre dos muestras de prueba. Los resultados obtenidos demuestran que la metodología propuesta es capaz de proporcionar un indicador eficiente de la presencia de células tumorales activas y su distribución espacial en el tejido. Esta metodología tiene además el potencial de ser aplicada en los mismos centros de salud debido a la creciente disponibilidad de espectrómetros de micro-XRF portátiles basados en tubos de rayos X de alto brillo y combinados con óptica de enfoque eficiente. Ésta técnica no reemplazaría el estudio histopatológico convencional pero sería un gran respaldo para el diagnóstico rápido, mejorando así la tecnología de detección.

La facilidad para un análisis multielemental simultáneo no destructivo y la elevada sensibilidad para el análisis de trazas en muestras próximas a su estado natural colocan a la micro-XRF como una técnica factible y eficaz para el estudio de tejidos biológicos, en particular el estudio de muestras tumorales.

Como trabajo a futuro se propone contrastar los transectos medidos con las muestras estudiadas mediante el análisis histológico convencional, verificando así que las zonas irradiadas del tumor que presentan las intensidades más altas de P se corresponden a zonas activas del tumor.

En muestras con presencia de calcificaciones, se espera también poder inferir la variedad de cristal calcificado a partir de la cuantificación de P y Ca como se habló en un inicio. Ésta caracterización del tumor permitiría distinguir el tipo de lesión puesto que la presencia de hidroxiapatitas (fósforo) está relacionada con lesiones malignas, mientras que oxalatos de calcio se asocian con lesiones benignas. La metodología desarrollada puede llevarse a cabo en un espectrómetro portátil basado en componentes compactos, ensamblados con asistencia de impresoras 3D. Este equipo podría ser llevado directamente a los centros de salud para hacer muestreos

in situ e *in vivo* de biopsias. Con datos concretos, se podrían tomar mejores decisiones y más rápidas vinculadas con el tratamiento a seguir según el tipo de tumor detectado y la progresión del mismo.

Bibliografía

- [1] Tsuji, K., Matsuno, T., Takimoto, Y., Yamanashi, M., Kometani, M., Sasaki, Y., Hasegawa, T., Kato, S., Yamada, T., Shoji, T., Kawahara, N., 2015. New developments of x-ray fluorescence imaging techniques in laboratory. *Spectrochim. Acta Part B* 113:43-53.
- [2] Beckhoff, B., Kanngießer, B., Langhoff, N., Wedell, R., Wolff, H., (Eds.). *Handbook of practical x-ray fluorescence analysis. Chapters 2,3 and 4.* Springer-Verlag, Berlin, 2006.
- [3] Paunesku, T., Vogt, S., Maser, J., Lai, B., Woloschak, G., 2006. X-Ray Fluorescence Microprobe Imaging in Biology and Medicine. *Review. J. Cell. Biochem.* 99:1489–1502.
- [4] Martínez Rodríguez, R., Gragera Martínez, R.R., eds., 2008. *Fundamentos teóricos y prácticos de la histoquímica.* Consejo Sup. de Inv. Científicas., Madrid.
- [5] Pushie, M.J., Pickering, I.J., Korbas, M., Hackett, M.J., George, G.N., 2014. Elemental and chemical specific x-ray fluorescence imaging of biological systems. *Chem. Revs.* 114:8499-8541.
- [6] Silva, M.P., Soave, D.F., Ribeiro-Silva, A., Poletti, M.E., 2009. Trace elements as tumor biomarkers and prognostic factors in breast cancer: a study through energy dispersive x-ray fluorescence. *BMC Research Notes* 2012, 5:194-205.
- [7] Bonfiglio, R., Scimeca, M., Toschi, N., Pistolese, C.A., Giannini, E., Antonacci, C., Ciuffa, S., Tancredi, V., Tarantino, U., Albonici, L., Bonanno, E., 2018. Radiological, histological and chemical analysis of breast microcalcifications: diagnostical value and biological significance. *J. of Mammary Gland Biology and Neoplasia* 23:89-99.
- [8] Vidavsky, N., Kunitake, J., Chiou, A.E., Northrup, P.A., Porri, T.J., Ling, L., Fischbach, C., Estroff, L.A., 2018. Studying biomineralization pathway in a 3D culture model of breast cancer microcalcifications. *Biomaterials* 179:71-82.
- [9] de Carvalho, C., Caramujo, M.J., 2012. Tumor metastasis as an adaptation of tumor cells to fulfill their phosphorus requirements. *Med Hypotheses*;78:654-7.
- [10] Kenney, J.M., Marinelli, L.D., Woodard, H., 1941. Tracer studies with radioactive phosphorus in malignant neoplastic disease. *Radiology*;37:683-7.
- [11] Kuang, Y., Nagy, J., Elser, J., 2004. Biological stoichiometry of tumor dynamics mathematical models and analysis. *Discrete and Continuous Dynamical Systems Series B*; 4:221-40.

- [12] Bobko, A., Eubank, T.D., Driesschaert, B., Dhimitruka, I., Evans, J., Mohammad, R., Tchekneva, E.E., Dikov, M.M., Khramtsov, V.V., 2017.. Interstitial Inorganic Phosphate as a Tumor Microenvironment Marker for Tumor Progression. *Sci. Rep.*;7:41233.
- [13] Kouloulias, V., Papaloucas, C., Papaloucas, A., 2019. Is phosphorous the key of cancer? *JBUON*; 24:859-861.
- [14] Falchini, G.E., Poletti, M.E., Soria, E., Pasqualini, M., Perez, R.D., 2021. Analysis of phosphorous content in cancer tissue by synchrotron micro-XRF. *Radiation Physics and Chemistry* 179:109157. Disponible on-line.
- [15] Schoonjans, T., Solé, V. A., Vincze, L., Sanchez del Rio, M., Appel, K., Ferrero, C., 2013. A general Monte Carlo simulation of energy-dispersive X-ray fluorescence spectrometers — Part 6. Quantification through iterative simulations. *Spectrochimica Acta Part B*; 82: 36-41.
- [16] Radtke, M., Vincze, L., Görner, W., 2010. Quantification of energy dispersive SRXRF for the certification of reference materials at BAMline. *J. Anal. At. Spectrom.* 25:631-634.
- [17] Perez, R.D., Sosa, C., Sbarato, V., Leani, J., Sánchez, H., 2016. Determination of x-ray excitation spectra in micro-XRF spectrometry with capillary optics. *Spectrochimica Acta Part B*; 117: 23-28.
- [18] Perez, R.D., Falchini, G.E., L., Poletti, M.E., Leani, J.J., Perez, C.A., Sánchez, H.J., 2018. Study of anti-tumorigenic actions of Omega-3 fatty acid in a murine mammary gland adenocarcinoma by micro-XRF analysis. Technical report LNLS proyecto 20170158.
- [19] W. Bambynek, B. Crasemann, R. Fink, H. Freund, H. Mark, C. Swift, R. Price y P. Venugopala Rao, *Rev. Mod. Phys.* 44, 716 (1972).
- [20] F. H. Attix, *Introduction to Radiological Physics and Radiation Dosimetry*, (John Wiley & Sons, New York, E. U. A., 1986).
- [21] I. Adler, *X-Ray Emission Spectrography in Geology*, (Elsevier Publishing Company, Amsterdam, The Netherlands, 1966).
- [22] M. G. Brunetto y J. A. Riveros, *X-Ray Spectrom.* 13, 60 (1984).
- [23] N.J Carron, *An Introduction to the Passage of Energetic Particles through Matter*, (Taylor & Francis, New York, E. U. A., 2007).
- [24] *Handbook of X-Ray Spectrometry: Methods and Techniques*, editado por R. E. Van Grieken y A. A. Markowicz, (Marcel Dekker, New York, E. U. A., 1993).
- [25] R. D. Evans, *The Atomic Nucleus*, (McGraw-Hill, New York, E. U. A., 1955).
- [26] W. H. McMaster, N. Kerr del Grande, J. H. Mallet y J. H. Hubell, *Compilation of X-Ray Cross Sections*, (Lawrence Livermore Radiation Laboratory Report UCRL-50174, Sec. II, 1969).
- [27] C.T. Chantler, *J. Phys. & Chem. Ref. Data* 24, 71 (1995).

- [28] C.T. Chantler, *J. Phys. & Chem. Ref. Data* **29**, 597 (2000).
- [29] D. W. Anderson, *Absorption of Ionizing Radiation*, (University Park Press, Baltimore, E. U. A., 1984).
- [30] S. Puri, D. Metha, B. Chand, N. Singh y P. Trehan, *X-Ray Spectrom.* **22**, 358 (1993).
- [31] W. Heitler, *The Quantum Theory of Radiation*, (Clarendon Press, Oxford, England, 3era ed., 1954).
- [32] M. R. Khan y M. Karimi, *X Ray Spectrom.* **9**, 32 (1980).
- [33] P. M. Morse y H. Feshbach, *Methods of Theoretical Physics*, (McGraw-Hill, New York, E. U. A., 1953).
- [34] E. Merzbacher, *Quantum Mechanics*, (Jhon Wiley & Sons, New York, E. U. A., 2da ed., 1970).
- [35] G. H. Vineyard, *Physical Review B* **26**, 4146 (1982).
- [36] R. W. James, *The Optical Principles of the Diffraction of X-Rays*, (Ox Bow Press, Connecticut, E. U. A., 1982).
- [37] C. T. Chantler, *J. Phys. Chem. Ref. Data* **29**, 597 (2000).
- [38] L. D. Landau and E. M. Lifschitz, *Electrodynamics of Continuous Media*, (Pergamon, Oxford, England, 1981).
- [39] *International Tables for X-Ray Crystallography* **3**, (The Kynoch Press, Birmingham, England, 1968).
- [40] <https://www.nist.gov/pml/x-ray-form-factor-attenuation-and-scattering-tables>.
- [41] D. K. G. Boer y W. W. Hoogenhof, *Spectrochimica Acta* **46B**, 1323 (1991).
- [42] J. M. Bloch, M. Sansone, F. Rondelez, D. G. Peiffer, P. Pincus, M. W. Kin, y P. M. Eisenberger, *Physical Review Letters* **54**, 1039 (1985).
- [43] M. Born y E. Wolf, *Principles of Optics*, (Pergamon, New York, E. A. U., 1980).
- [44] J. D. Jackson, *Classical Electrodynamics*, (John Wiley & Sons, New York, E. U. A., 1975).
- [45] E. Hetch y A. Zajac, *Optics*, (Addison-Wesley Publishing Company of Reading, Massachusetts, E. U. A., 1974).
- [46] *Handbook of X-Ray Spectrometry: Methods and Techniques*, editado por R. E. Van Grieken y A. A. Markowicz, (Marcel Dekker, New York, E. U. A., 1993)
- [47] W. B. Yun y J. M. Bloch, *J. Appl. Phys.* **68**, 1421 (1900).
- [48] Reprint of IUPAC document, *Spectrochim. Acta* **33**, 241 (1978).

- [49] E. P. Bertin, Principles and Practice of X-Ray Spectrometric Analysis, (Plenum Press, New York, E. U. A., 1975).
- [50] Hirsch, P.B., Kellar, J., 1959. Proc. Phys. Soc. London Ser. B 64:369.
- [51] Pound, E., Rebka, C., 1959. Phys. Rev. Lett. 3:439.
- [52] Pantell, R.H., Chung, P.S., 1978. Transmission of x-rays through curved waveguides. IEEE J. of Quantum Electronics. QE-14:694-697.
- [53] Kumakhov, M.A., 1986. Radiation of channeled particles in crystals, Energoatomizdat, Moscow.
- [54] Kumakhov, M.A., 2000. Capillary optics and their use in x-ray analysis. X-Ray Spectrom., 29: 343-348.
- [55] MacDonald, C.A., 1996. Application and measurements of polycapillary x-ray optics. J. X-Ray Sci. Technol. 6:32-47.
- [56] Book of abstract. 17th International Congress on X-ray Optics and Microanalysis, Sept.22–26, Chamonix, France 2003.
- [57] Hoffman, S.A., Thiel, D.J., Bilderback, D.H., 1994. Developments in tapered monocapillary and polycapillary glass X-ray concentrators. Nucl. Inst. And Meth. A347:384-389.
- [58] Engström, P., Larsson, S., Rindby, A., 1989. A 200 μm X-ray microbeam spectrometer. Nucl. Instr. and Meth. B36:222-226.
- [59] Paunesku, T., Vogt, S., Maser, J., Lai, B., Woloschak, G., 2006. X-Ray Fluorescence Microprobe Imaging in Biology and Medicine. Review. J. Cell. Biochem. 99:1489–1502.
- [60] Sosa C., Sánchez H.J., Pérez C.A. y Perez R.D., 2014, Structural and elemental X-ray microanalysis with synchrotron radiation in confocal geometry. Nucl. Instr. and Meth. B, Vol. B319:171–176.
- [61] DURAN Group. Duran properties (2016). <http://www.duran-group.com/en/about-duran/duran-properties.html>
- [62] R. Huang and D. H. Bilderback, "Simulation of microfocused image size from a one-bounce glass capillary," Nucl Instrum Meth A 467, 978-981 (2001).
- [63] R. Huang and D. H. Bilderback, "Single-bounce monocapillaries for focusing synchrotron radiation: modeling, measurements and theoretical limits," J Synchrotron Radiat 13, 74-84 (2006).
- [64] R.D.Perez, C.Sosa, V.Sbarato, J.Leani, H.J.Sánchez, Determination of X-ray excitation spectra in micro X-ray fluorescence spectrometry with capillary optics, Spectrochimica Acta Part B 117 (2016) 23–28.
- [65] T. Schoonjans, V. A. Solé, L. Vincze, M. Sanchez del Rio, K. Appel and C. Ferrero. Spectrochim. Acta Part B, 2013, 82, 36-41. Doi: 10.1016/j.sab.2012.12.011.

- [66] M.W. Mickael, Nucl. Instr. and Meth A, 1991, 301, 523-542.
- [67] Falchini, G.E., Malezan, A., Poletti, M.E., Soria, E., Pasqualini, M., Perez, R.D., Analysis of phosphorous content in cancer tissue by synchrotron micro-XRF (2020).
- [68] Tomal A, Mazarro I, Kakuno E, Measurements MP-R, 2010 U. Experimental determination of linear attenuation coefficient of normal, benign and malignant breast tissues. Radiat Meas. 2010; 45:1055–9. doi: <https://doi.org/10.1016/j.radmeas.2010.08.008>.
- [69] M. E. Poletti, O. D. Goncalves and I. Mazzaro, Coherent and incoherent scattering of 17.44 and 6.93 keV x-ray photons scattered from biological and biological-equivalent samples: characterization of tissues, X-Ray Spectrom. 2002; 31: 57–61.
- [70] Silva MP, Tomal A, Pérez CA, Ribeiro-Silva A, Poletti ME. Determination of Ca, Fe, Cu and Zn and their correlations in breast cancer and normal adjacent tissues. X-Ray Spectrom. 2009; 38:103–11. doi: 10.1002/xrs.1126.
- [71] X-Ray Mass Attenuation Coefficients by compounds, <https://physics.nist.gov/PhysRefData/XrayMassCoef/tab2.html>
- [72] F.L. Melquiades , S.V. Santos, F. Lopes, J. Villanueva , J.L. Ticona and C. R. Appoloni, X-Ray Spectrom., 2021, 50, 53-67.
- [73] V.A. Solé, E. Papillon, M. Cotte, Ph. Walter and J. Susini, Spectrochim. Acta part B, 2017, 62, 63-68.
- [74] X-Ray Mass Attenuation Coefficients by elements, <https://physics.nist.gov/PhysRefData/XrayMassCoef/tab3.html>

Apéndice 1

Llamándose \mathbf{r}_f al vector que va desde la posición de elemento de fuente dS hasta el elemento reflector ubicado en $((\rho_0 + \alpha z_1), \phi_1, z_1)$ con vector posición $(\rho_0 + \alpha z_1)\hat{e}_\rho + z_1\hat{k} = \rho_1 + z_1\hat{k}$. Entonces:

$$\mathbf{r}_f = \rho_1 - \mathbf{r}_S - (H - z_1)\hat{k} \quad (5.1)$$

Aquí \mathbf{r}_S es el vector desde el eje óptico hasta dS que en la configuración está dado por $\mathbf{r}_S = r_S\hat{i}$.

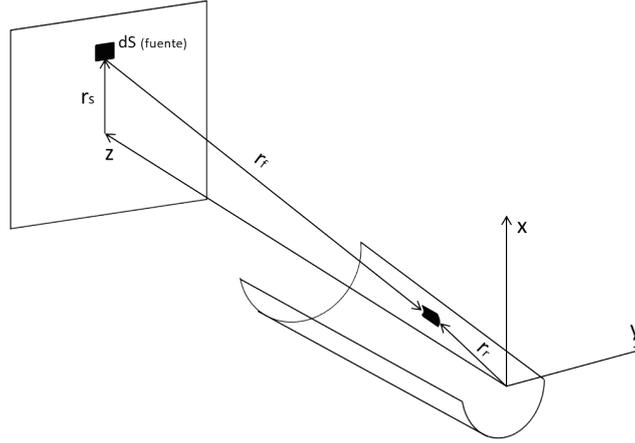


Figura 5.1: Vectores de la geometría fuente-elemento reflector.

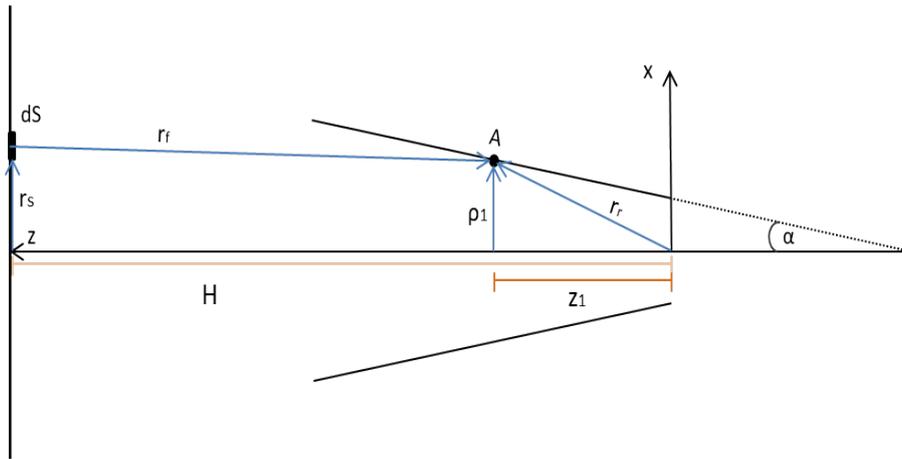


Figura 5.2: Geometría fuente-elemento reflector vista desde un corte sobre un plano de simetría de la lente.

El vector \mathbf{r}_f tiene la dirección de propagación de los fotones de dS que se dirigen hacia el elemento reflector. El vector de propagación de los fotones tiene la forma:

$$\hat{\mathbf{k}}_1 = \frac{1}{\sqrt{(H - z_1)^2 + \rho_1^2 + r_S^2 - 2\rho_1 r_S \cos\phi_1}} [\rho_1 - \mathbf{r}_S - (H - z_1)\hat{k}] \quad (5.2)$$

Debido a que $(H - z_1) \gg \rho_1$ y $(H - z_1) \ll r_S$ entonces a primer orden:

$$\hat{\mathbf{k}}_1 = \frac{1}{(H - z_1)} [\rho_1 - \mathbf{r}_S - (H - z_1)\hat{k}] \quad (5.3)$$

La normal a este elemento reflector a primer orden es:

$$\hat{\mu}_1 = \frac{1}{\rho_1} [\rho_1 - \rho_1 \alpha \hat{k}] \quad (5.4)$$

Y por lo tanto el ángulo de incidencia θ_1 medido desde el elemento reflector respecto a la superficie de la lente es:

$$\begin{aligned} \theta_1 \cong \text{sen} \theta_1 = \hat{k}_1 \cdot \hat{\mu}_1 &= \frac{1}{(H - z_1) \rho_1} [\rho_1^2 - \mathbf{r}_S \cdot \rho_1 + (H - z_1) \rho_1 \alpha] \\ \theta_1 &= \frac{1}{(H - z_1)} [\rho_1 - r_S \cos \phi_1 + (H - z_1) \alpha] \\ \theta_1 &= \frac{\rho_0 - r_S \cos \phi_1 + H \alpha}{(H - z_1)} \end{aligned} \quad (5.5)$$

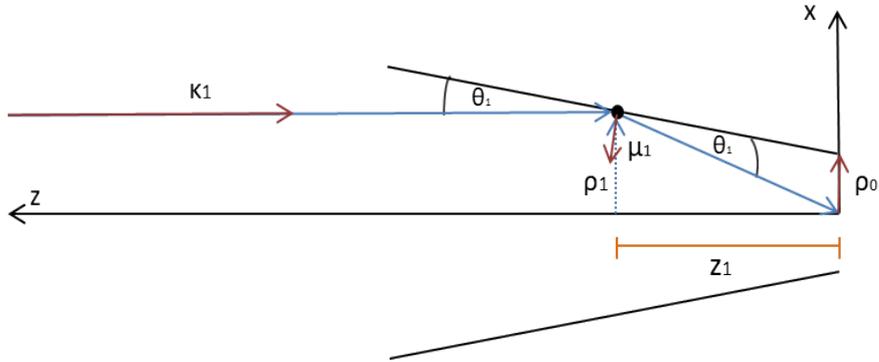


Figura 5.3: Geometría de la primera reflexión vista desde un corte sobre un plano de simetría de la lente.

Apéndice 2

Para estudiar la inclinación del plano de incidencia se obtuvo el vector perpendicular a éste, dado por:

$$\begin{aligned}
\hat{\kappa}_1 \times \hat{\mu}_1 &= \frac{1}{\rho_1(H - z_1)} [-\alpha\rho_1^2\hat{e}_\rho \times \hat{k} - r_S\rho_1\hat{i} \times \hat{e}_\rho + r_S\rho_1\alpha\hat{i} \times \hat{k} - (H - z_1)\rho_1\hat{k} \times \hat{e}_\rho] \\
&= \frac{1}{\rho_1(H - z_1)} [\alpha\rho_1^2\hat{e}_\phi - r_S\rho_1\text{sen}\phi_1\hat{i} \times \hat{j} - r_S\rho_1\alpha\hat{j} - (H - z_1)\rho_1\hat{e}_\phi] \\
&= \frac{1}{\rho_1(H - z_1)} [-r_S\rho_1\text{sen}\phi_1\hat{k} - r_S\rho_1\alpha\hat{j} - ((H - z_1)\rho_1 - \alpha\rho_1^2)\hat{e}_\phi] \\
&= \frac{(-1)}{(H - z_1)} [r_S\text{sen}\phi_1\hat{k} + r_S\alpha\hat{j} + ((H - z_1) - \alpha\rho_1)\hat{e}_\phi]
\end{aligned} \tag{5.6}$$

Para calcular el ángulo límite θ_{L1} se obtuvo primero la intersección del plano de incidencia y el plano de salida dado por los puntos (x', y', z') con $z' = 0$. Para describir el plano de incidencia se utilizó el vector unitario antes calculado $\mathbf{v}_1 = \hat{\kappa}_1 \times \hat{\mu}_1$:

$$(\hat{\kappa}_1 \times \hat{\mu}_1) \cdot (\mathbf{r} - \mathbf{r}_r) = 0 \tag{5.7}$$

ésta ecuación corresponde al plano de incidencia, donde $\mathbf{r}_r = \mathbf{r}_1 + z_1\hat{k}$. Si ahora solo se considera para \mathbf{r} puntos del plano $z' = 0$, la intersección queda:

$$\begin{aligned}
((H - z_1) - \alpha\rho_1)(\hat{e}_\phi \cdot \hat{i})x' + r_S\alpha y' + ((H - z_1) - \alpha\rho_1)(\hat{e}_\phi \cdot \hat{j})y' + \rho_1 r_S \alpha (\hat{j} \cdot \hat{e}_\rho) + z_1 r_S \text{sen}\phi_1 &= 0 \\
-((H - z_1) - \alpha\rho_1)\text{sen}\phi_1 x' + [r_S\alpha + ((H - z_1) - \alpha\rho_1)\text{cos}\phi_1]y' + \rho_1 r_S \alpha \text{sen}\phi_1 + z_1 r_S \text{sen}\phi_1 &= 0
\end{aligned} \tag{5.8}$$

considerando además que α es un ángulo muy pequeño (del orden de los mrad) se tiene:

$$-[(H - z_1)\text{sen}\phi_1]x' + [(H - z_1)\text{cos}\phi_1]y' + z_1 r_S \text{sen}\phi_1 = 0 \tag{5.9}$$

Finalmente despejando las coordenadas primadas se obtiene:

$$y' = \text{tg}\phi_1 x' - \frac{z_1 r_S \text{tg}\phi_1}{(H - z_1)} \tag{5.10}$$

Los puntos donde esta recta intercepta al círculo de radio ρ_0 delimita la zona donde los fotones reflejados pueden emerger sin reflexión de ordenes superiores. Para encontrar su distancia se necesitó primero encontrar la distancia d_1 entre el origen en el eje óptico de la lente y el punto medio de esta línea. Dado que el ángulo entre esta zona lineal y el eje $x+$ es ϕ_1 , a partir de relaciones trigonométricas es fácil obtener:

$$\text{cos}(90 - \phi_1) = \text{sen}\phi_1 = \frac{d_1}{\frac{z_1 r_S}{(H - z_1)}} \tag{5.11}$$

despejando la distancia d_1 se obtiene:

$$d_1 = \frac{z_1 r_S \text{sen}\phi_1}{(H - z_1)} \tag{5.12}$$

Por Pitágoras se tiene que $\rho_0^2 = d_1^2 + (\frac{l}{2})^2$, por lo tanto el largo de la zona lineal es:

$$l = 2\sqrt{\rho_0^2 - \left(\frac{z_1 r_s \text{sen} \phi_1}{(H - z_1)}\right)^2} \quad (5.13)$$

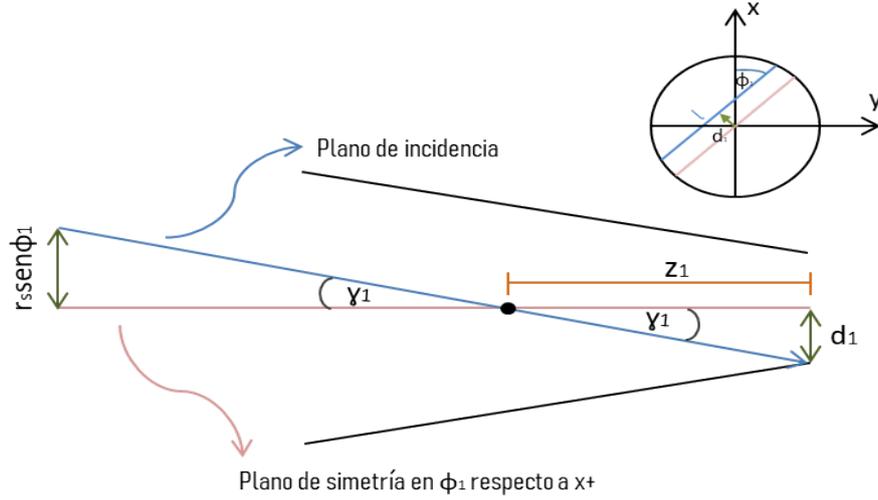


Figura 5.4: Geometría de la primer reflexión vista desde un corte perpendicular al plano de simetría rotado ϕ_1 respecto de x .

Para calcular el ángulo θ_{L1} se nota primero que la intersección de la interfase con el plano de incidencia de la primera reflexión forma un ángulo α' con el eje óptico dado por:

$$\alpha' = \frac{(\rho_1 - l/2)}{z_1} \quad (5.14)$$

esta expresión es correcta únicamente considerando que el ángulo γ_1 que corresponde a la inclinación del plano de incidencia de la primera reflexión respecto al plano de simetría (rotado también un ángulo ϕ_1 al igual que el de incidencia) es muy pequeño, de manera tal que los ángulos aquí definidos se pueden pensar sobre un mismo plano.

Finalmente el ángulo límite θ_{L1} está dado por:

$$\begin{aligned} \theta_{L1} + \alpha' &= \frac{(l/2 + \rho_1)}{z_1} \\ \theta_{L1} &= \frac{[(l/2 + \rho_1) - (\rho_1 - l/2)]}{z_1} = \frac{l}{z_1} \\ \theta_{L1} &= 2\sqrt{\left(\frac{\rho_0}{z_1}\right)^2 - \left(\frac{r_s \text{sen} \phi_1}{(H - z_1)}\right)^2} \end{aligned} \quad (5.15)$$

Llamándose θ_{01} a la divergencia de salida en z_1 :

$$\frac{\theta_{L1}}{2} = \sqrt{\theta_{01}^2 - \gamma_1^2} \quad (5.16)$$

Despejando se tiene:

$$\rho_2 = (z_1 - z_2) \sqrt{\frac{\theta_1^2}{4} + \gamma_1^2} = \rho_0 + \alpha z_2 \quad (5.20)$$

Entonces la distancia sobre el eje óptico a la que se produce una segunda reflexión es:

$$\begin{aligned} z_2 [\alpha + \sqrt{\frac{\theta_1^2}{4} + \gamma_1^2}] &= z_1 \sqrt{\frac{\theta_1^2}{4} + \gamma_1^2} - \rho_0 \\ z_2 &= \frac{[z_1 \sqrt{\frac{\theta_1^2}{4} + \gamma_1^2} - \rho_0]}{[\alpha + \sqrt{\frac{\theta_1^2}{4} + \gamma_1^2}]} \end{aligned} \quad (5.21)$$

A su vez se tiene que el ángulo azimutal ϕ_2 del punto de impacto es:

$$\phi_2 = \phi_1 + \pi - \phi'_1 \quad (5.22)$$

$$\text{sen} \phi'_1 = \frac{d_1}{\rho_2} = \frac{\gamma_1}{\sqrt{\frac{\theta_1^2}{4} + \gamma_1^2}}$$

$$\text{cos} \phi'_1 = \frac{\theta_1}{2\sqrt{\frac{\theta_1^2}{4} + \gamma_1^2}} \quad (5.23)$$

$$\text{tg} \phi'_1 = \frac{2\gamma_1}{\theta_1}$$

Apéndice 4

Para la segunda reflexión el vector de propagación está dado por:

$$\hat{\kappa}_2 = \hat{\kappa}_1 - 2(\hat{\kappa}_1 \cdot \hat{\mu}_1)\hat{\mu}_1 = \hat{\kappa}_1 - 2\theta_1\hat{\mu}_1 \quad (5.24)$$

donde:

$$2\theta_1\hat{\mu}_1 = \frac{2\theta_1}{\rho_1}\rho_1 - 2\theta_1\alpha\hat{k} \cong \frac{2\theta_1}{\rho_1}\rho_1 \quad (5.25)$$

por lo tanto:

$$\hat{\kappa}_2 = \hat{\kappa}_1 - \frac{2\theta_1}{\rho_1}\rho_1 \quad (5.26)$$

En general se tiene que:

$$\hat{\kappa}_{(n+1)} = \hat{\kappa}_n - \frac{2\theta_n}{\rho_n}\rho_n \quad (5.27)$$

Al igual que en el Apéndice 1 se observa que la normal al segundo elemento reflector a primer orden tiene la forma:

$$\hat{\mu}_2 = \frac{1}{\rho_2}[\rho_2 - \rho_2\alpha\hat{k}] \quad (5.28)$$

Y el ángulo de incidencia θ_2 medido desde el elemento reflector es:

$$\begin{aligned} \theta_2 &\cong \text{sen}\theta_2 = \hat{\kappa}_2 \cdot \hat{\mu}_2 = \hat{\kappa}_1 \cdot \hat{\mu}_2 - 2\theta_1\hat{\mu}_1 \cdot \hat{\mu}_2 \\ \theta_2 &= \hat{\kappa}_1 \cdot \hat{\mu}_2 - \frac{2\theta_1}{\rho_1\rho_2}(\rho_1 - \alpha\rho_1\hat{k})(\rho_2 - \alpha\rho_2\hat{k}) \\ \theta_2 &= \frac{1}{(H - z_1)\rho_2}[\rho_1 \cdot \rho_2 - \mathbf{r}_S \cdot \rho_2 + (H - z_1)\rho_2\alpha] - \frac{2\theta_1}{\rho_1\rho_2}\rho_1 \cdot \rho_2 \\ \theta_2 &= \frac{1}{(H - z_1)\rho_2}[\rho_1\rho_2\cos(\phi_1 - \phi_2) - r_S\rho_2\cos\phi_2 + (H - z_1)\rho_2\alpha] - 2\theta_1\cos(\phi_1 - \phi_2) \\ \theta_2 &= \frac{1}{(H - z_1)}[-\rho_1\cos\phi'_1 + r_S\cos(\phi_1 - \phi'_1) + (H - z_1)\alpha] + 2\theta_1\cos\phi'_1 \\ \theta_2 &= \frac{1}{(H - z_1)}[-\rho_1\cos\phi'_1 + r_S\cos\phi_1\cos\phi'_1 + r_S\text{sen}\phi_1\text{sen}\phi'_1 + (H - z_1)\alpha] + 2\theta_1\cos\phi'_1 \\ \theta_2 &= \frac{1}{(H - z_1)}[-\theta_1(H - z_1)\cos\phi'_1 + (H - z_1)\alpha\cos\phi'_1 + r_S\text{sen}\phi_1\text{sen}\phi'_1 + (H - z_1)\alpha] + 2\theta_1\cos\phi'_1 \\ \theta_2 &= \cos\phi'_1\theta_1 + (1 + \cos\phi'_1)\alpha + \gamma_1\text{sen}\phi'_1 \end{aligned} \quad (5.29)$$

Si además se quiere calcular el ángulo de incidencia para la tercera reflexión se tiene:

$$\theta_3 \cong \text{sen}\theta_3 = \hat{\kappa}_3 \cdot \hat{\mu}_3 = \hat{\kappa}_2 \cdot \hat{\mu}_3 - \frac{2\theta_2}{\rho_2} \rho_2 \cdot \hat{\mu}_3 = \hat{\kappa}_1 \cdot \hat{\mu}_3 - \frac{2\theta_1}{\rho_1} \rho_1 \cdot \hat{\mu}_3 - \frac{2\theta_2}{\rho_2} \rho_2 \cdot \hat{\mu}_3$$

$$\theta_3 = \frac{1}{(H - z_1)} [\rho_1 \cos(\phi_1 - \phi_3) - r_S \cos\phi_3 + (H - z_1)\alpha] - 2\theta_1 \cos(\phi_1 - \phi_3) - 2\theta_2 \cos(\phi_2 - \phi_3)$$

Notar que:

$$\phi_3 = \phi_2 - \phi'_2 + \pi = \phi_1 - \phi'_1 - \phi'_2 + 2\pi \quad (5.30)$$

Entonces se sigue:

$$\theta_3 = \frac{1}{(H - z_1)} [\rho_1 \cos(\phi'_1 + \phi'_2) - r_S \cos(\phi_1 - (\phi'_1 + \phi'_2)) + (H - z_1)\alpha]$$

$$- 2\theta_1 \cos(\phi'_1 + \phi'_2) + 2\theta_2 \cos\phi'_2$$

$$\theta_3 = \frac{1}{(H - z_1)} [\theta_1 (H - z_1) \cos(\phi'_1 + \phi'_2) - (H - z_1)\alpha \cos(\phi'_1 + \phi'_2) + r_S \text{sen}\phi_1 \text{sen}(\phi'_1 + \phi'_2)$$

$$+ (H - z_1)\alpha] - 2\theta_1 \cos(\phi'_1 + \phi'_2) + 2\theta_2 \cos\phi'_2$$

$$\theta_3 = -\cos(\phi'_1 + \phi'_2)\theta_1 + (1 - \cos(\phi'_1 + \phi'_2))\alpha + \gamma_1 \text{sen}(\phi'_1 + \phi'_2) + 2\theta_2 \cos\phi'_2$$

Apéndice 5

Razonando como en el Apéndice 2 se tiene que el ángulo formado entre el plano de incidencia de la segunda reflexión y el plano de simetría de la lente a ϕ_2 es:

$$\gamma = \frac{\rho_1 \text{sen}\phi'_1}{(z_1 - z_2)} \quad (5.31)$$

Y la distancia entre el plano de incidencia de la segunda reflexión y el plano de simetría es:

$$d_2 \cong (z_2 - z_3)tg\gamma_2 \cong (z_2 - z_3)\gamma_2 = \frac{(z_2 - z_3)\rho_1 \text{sen}\phi'_1}{(z_1 - z_2)} \quad (5.32)$$

Entonces el largo de la zona lineal formada por la intersección entre el plano $z = 0$ y el plano de incidencia de la segunda reflexión ubicado en ϕ_2 (suponiendo solo una reflexión de hasta segundo orden) es:

$$l = 2\sqrt{\rho_0^2 - (z_2\gamma_2)^2} \quad (5.33)$$

Procediendo como en el Apéndice 2 se tiene finalmente que el ángulo límite para la segunda reflexión es:

$$\theta_{L2} = 2\sqrt{\left(\frac{\rho_0}{z_2}\right)^2 - \gamma_2^2} \quad (5.34)$$

Apéndice 6

Para obtener las aproximaciones de P y Q se considera $\mathbf{k} = (k_x, 0, k_z)$ como el vector número de ondas del haz de rayos X incidente y \mathbf{K}_α el vector número de ondas del haz transmitido en el material reflector. El módulo de este vector está dado por $n_\alpha k$ donde k es el módulo de \mathbf{k} , de modo que se tiene que:

$$\mathbf{k}_\alpha = (n_\alpha k \cos(\theta_\alpha), 0, n_\alpha k \sin(\theta_\alpha)) \quad (5.35)$$

Recurriendo a la ley de Snell y a la definición del parámetro P_α la expresión anterior puede escribirse como:

$$\mathbf{k}_\alpha = (k_x, 0, k P_\alpha) \quad (5.36)$$

Tomando módulo de este vector surge:

$$k^2 P_\alpha^2 = (n_\alpha k)^2 - k_x^2 = \left[\left(\frac{n_\alpha}{\cos(\theta)} \right)^2 - 1 \right] k_x^2 \quad (5.37)$$

Teniendo en cuenta que el ángulo de incidencia θ es del orden de los miliradianes, entonces es posible aplicar el desarrollo de Taylor a primer orden en la función coseno:

$$k^2 P_\alpha^2 = [n_\alpha^2 (1 + \theta^2) - 1] k_x^2 \quad (5.38)$$

Utilizando la expresión deducida para el índice de refracción n_α y despreciando términos de orden superior surge:

$$P_\alpha = (\theta^2 - 2\delta_\alpha - 2i\beta_\alpha)^{\frac{1}{2}} \quad (5.39)$$

El parámetro Q_α puede obtenerse desde P_α a través de la siguiente expresión:

$$Q_\alpha = \frac{1}{n_\alpha} \sin(\theta_\alpha) = \frac{P_\alpha}{n_\alpha^2} \quad (5.40)$$

En consecuencia, despreciando términos de orden superior resulta que Q_α cumple la misma expresión P_α :

$$Q_\alpha = (\theta^2 - 2\delta_\alpha - 2i\beta_\alpha)^{\frac{1}{2}} \quad (5.41)$$

Las partes real e imaginaria de P_α son:

$$Re(P_\alpha) = \left\{ \frac{[(\theta^2 - 2\delta_\alpha)^2 + 4\beta_\alpha^2]^{\frac{1}{2}} + (\theta^2 - 2\delta_\alpha)}{2} \right\}^{\frac{1}{2}} \quad (5.42)$$

$$Im(P_\alpha) = - \left\{ \frac{[(\theta^2 - 2\delta_\alpha)^2 + 4\beta_\alpha^2]^{\frac{1}{2}} - (\theta^2 - 2\delta_\alpha)}{2} \right\}^{\frac{1}{2}} \quad (5.43)$$

Apéndice 7

Para calcular la fracción peso en peso W de cada elemento en el compuesto (Vidrio borosilicatado) se calculó primero la fracción de cada elemento en el óxido. Sabiendo que:

$$W_{\alpha}[\%] = \frac{m_{\alpha}}{m_T} \cdot 100 \quad (5.44)$$

donde α representa al elemento en particular y m_T es la masa atómica total de cada óxido, se calculó lo siguiente:

$$\bullet SiO_2 \rightarrow \text{masa atómica} \left\{ \begin{array}{l} Si = 28,085 \pm 0,001 \\ O_2 = 31,9986 \pm 0,0004 \end{array} \right\} m_{SiO_2} = 60,084 \pm 0,001$$

$$W_{Si} = (46,743 \pm 0,002) \% \quad W_O = (53,25644 \pm 0,00001) \%$$

$$\bullet B_2O_3 \rightarrow \text{masa atómica} \left\{ \begin{array}{l} B_2 = 21,63 \pm 0,01 \\ O_3 = 47,9979 \pm 0,0005 \end{array} \right\} m_{B_2O_3} = 69,63 \pm 0,01$$

$$W_B = (31,0642 \pm 0,0001) \% \quad W_O = (68,9328 \pm 0,0001) \%$$

$$\bullet Na_2O \rightarrow \text{masa atómica} \left\{ \begin{array}{l} Na_2 = 22,98977 \pm 0,00001 \\ O = 15,9993 \pm 0,0003 \end{array} \right\} m_{Na_2O} = 61,9788 \pm 0,0003$$

$$W_{Na} = (74,185915 \pm 0,000004) \% \quad W_O = (25,814149 \pm 0,000005) \%$$

$$\bullet K_2O \rightarrow \text{masa atómica} \left\{ \begin{array}{l} K_2 = 78,1966 \pm 0,0001 \\ O = 15,9993 \pm 0,0003 \end{array} \right\} m_{K_2O} = 94,1959 \pm 0,0003$$

$$\bullet Al_2O_3 \rightarrow \text{masa atómica} \left\{ \begin{array}{l} Al_2 = 53,9630770 \pm 0,0000001 \\ O = 47,9979 \pm 0,0005 \end{array} \right\} m_{Al_2O_3} = 101,9610 \pm 0,0005$$

$$W_K = (39,864313 \pm 0,000001) \% \quad W_O = (32,625516 \pm 0,000003) \%$$

$$W_{Al} = (27,510160 \pm 0,000008) \%$$

Por lo tanto conociendo las fracciones de peso en peso de cada óxido sobre el compuesto total se calculó:

$$W_{Si} = (37,9 \pm 0,5) \% \quad W_B = (4,0 \pm 0,3) \% \quad W_{Na} = (3,0 \pm 0,6) \%$$

$$W_K = (0,8 \pm 0,4) \% \quad W_{Al} = (0,6 \pm 0,3) \% \quad W_O = (54 \pm 1) \%$$

Nota: Los valores para el número atómico Z y el número másico A se obtuvieron de tablas y por lo tanto el error asignado corresponde a la última cifra significativa. Mientras que para los valores de las masas atómicas de cada elemento, dado que podían variar según la tabla de referencia, se decidió tomar el valor medio del intervalo correspondiente a los dos valores comparados, con un error que abarcara los valores extremos de dicho intervalo.

Los abajo firmantes, miembros del Tribunal de evaluación de tesis, damos fe que el presente ejemplar impreso se corresponde con el aprobado por este Tribunal.