



UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN NICOLÁS DE HIDALGO

FACULTAD DE CIENCIAS FÍSICO-MATEMÁTICAS

“Mat. Luis Manuel Rivera Gutiérrez”

División de estudios de posgrado

**Espectrometría de fluorescencia de rayos x por  
reflexión total de iones de importancia biomédica**

TESIS

Para obtener el grado de:  
Maestro en Ciencias en Ingeniería Física

PRESENTA:

Jorge Luis Rodríguez Alejandre

DIRECTOR DE TESIS:

Dra. Nabanita Dasgupta-Schubert

Morelia Michoacán, Septiembre 2019



## **Agradecimientos**

Señor, una vez más tengo la oportunidad de agradecer todo lo que has hecho por mí, por todo lo que me has dado, mi familia: Mi padre Sr. José Martín Rodríguez Díaz, Mi madre Sra. Marta Patricia Alejandre Urbina, mis hermanos y hermanas: José, Josué.

a quienes llevo presentes en todo momento en mi mente y en mi corazón.

También de una forma particular quiero agradecer a CONACYT por la beca otorgada durante el periodo en el que trabaje en este proyecto, igualmente a la División de Estudios de Posgrado de la Facultad de Ciencias Físico Matemáticas de la Universidad Michoacana de San

Nicolás de Hidalgo, por las facilidades prestadas para el desarrollo del mismo.



# Resumen

La espectrometría de fluorescencia de rayos x por reflexión total (TXRF) es una técnica relativamente nueva, con grandes ventajas para el campo de la biomedicina, entre otros. Es una técnica de análisis a los niveles traza (1-100 partes por millón (ppm)) y ultra traza (< 1 ppm) de elementos en fluidos fisiológicos, tejidos o unidades fundamentales como grupos de células, que se puede realizar sin destruir de alguna manera las muestras. Esta ventaja convierte a la TXRF en la técnica ideal para el estudio de diversas rutas metabólicas, la precisión de los medicamentos o la calidad de estos mismos. Las estructuras celulares necesitan de iones para el correcto funcionamiento, de la misma manera las enzimas. Un elemento de reciente interés en el campo de la toxicología es el selenio, el uso de este elemento en suplementos alimenticios, fertilizantes sumado a su abundancia natural, causa una preocupante bioacumulación. Un estudio dirigido por el departamento de epidemiología de la universidad Johns Hopkins encontró cantidades elevadas de selenio en pacientes con diabetes mellitus tipo 2. La traza de selenio en la orina humana nos permitiría saber la función del sistema excretor humano y su capacidad de retención de selenio. En este trabajo se preparó orina humana artificial compuesta de los principales iones y urea. Se prepararon concentraciones de 0.01, 0.1, 1 y 10 mg/l de selenato de sodio en agua tri-distilada y orina. Las cifras de mérito del análisis que se determinaron, fueron la precisión, porcentaje de recuperación y límite mínimo de detección. Los efectos de matriz, el ruido de fondo y la composición química de la muestra son factores que manifiestan en el espectro y que pueden afectar la medición. Con el fin de estudiar estos factores, se midió la proporción señal-ruido (pico-fondo), el desplazamiento químico (“chemical shift”) y se hizo el análisis de forma de línea

espectral (“line shape analysis”) utilizando los parámetros S y W en analogía con la espectrometría por aniquilación de positrones.

## *Abstract*

Total reflection x-ray fluorescence spectrometry (TXRF) is a relatively new technique, with great advantages for the field of biomedicine. It is an analysis technique at trace levels (1-100 parts per million (ppm)) and ultra trace (<1 ppm) of elements in physiological fluids, tissues or fundamental units such as groups of cells, which can be performed without destroying the samples. This advantage makes TXRF the ideal technique for the study of various metabolic pathways, the accuracy of medications or quality. Cellular structures need ions, same for the enzymes. An element of recent interest in toxicology is selenium, use of this element in food supplements, fertilizers added to its natural abundance, causes a worrying bioaccumulation. A study led by the department of epidemiology at Johns Hopkins University found high amounts of selenium in patients with type 2 diabetes mellitus. The trace of selenium in human urine would allow us to know the function of the human excretory system and its ability to retain selenium.

In this work, artificial human urine composed of the main ions and urea was prepared. Concentrations of 0.01, 0.1, 1 and 10 mg /l of sodium selenate in tri-distilled water and urine were prepared. The figures of merit of the analysis that were determined, were the precision, percentage of recovery and minimum limit of detection. Matrix effects, background noise and chemical composition of the sample are factors that manifest in the spectrum and may affect the measurement. In order to study these factors, the signal-to-noise ratio (peak-bottom), the chemical shift was measured and the line shape analysis was performed using the parameters S and W in analogy with positron annihilation spectrometry.

# **Capítulo 1 ..... 10**

<b>Introducción .....</b>	<b>10</b>
1.1 Justificación .....	12
1.2 Hipótesis.....	13
1.3 Objetivos .....	13
1.3.1 Objetivo general.....	13
1.3.2 Objetivos específicos .....	13
1.4 Ventajas y desventajas de la espectrometría TXRF .....	14
1.5 Espectrometría de fluorescencia de rayos x por reflexión total en México .....	15

# **Capítulo 2 ..... 18**

<b>Marco teórico.....</b>	<b>18</b>
2.1 Rayos x .....	18
2.1.1 Radiación continua y característica. ....	19
2.1.2 Atenuación de la radiación .....	21
2.2 Fluorescencia de rayos x.....	25
2.2.1 Fluorescencia de rayos x por reflexión total .....	25
2.3 Cifras de mérito .....	28
2.3.1 Exactitud.....	28
2.3.2 Porcentaje de recuperación .....	29
2.3.3 Precisión.....	29
2.3.4 Límite mínimo de detección.....	30
2.3.5 Sensibilidad .....	30
2.4 Análisis de la forma del pico.....	31
2.4.1 Proporción de señal a ruido y pico a fondo (P/B) .....	32
2.4.2 Ancho completo a la mitad y décima parte del máximo .....	32
2.6 Ensanchamiento del pico .....	33
2.7 Parámetro S y W .....	34
2.8 Concentración .....	35

# **Capítulo 3 ..... 38**

<b>Método experimental.....</b>	<b>38</b>
3.1 Base de orina.....	38
3.1.1 Preparación de orina artificial.....	40
3.2 Preparación de las soluciones de selenato de sodio en agua y orina artificial .....	40
3.3 Preparación de muestras .....	42
3.2.1 Método de estándar interno.....	45
3.2.2 Preparación de la superficie de los discos .....	46
3.2.3 Preparación del analito .....	47
3.3 Selenato de Sodio en orina .....	48
3.3.1 Hidrólisis de la Urea .....	49
3.4 Operación del Espectrometro S2 Picofox .....	52

## **Capítulo 4 ..... 54**

<b>Resultados y Discusión.....</b>	<b>54</b>
4.1.1 Efecto del bombardeo de rayos X .....	56
4.2 Cifras del instrumento .....	57
4.2.1 Ecuación de calibración .....	57
4.2.2 Parámetros del detector .....	57
4.3 Resultados de las concentraciones .....	58
4.4 Cifras de mérito estadístico .....	63
4.5 Efectos de matriz en el espectro de TXRF.....	64
4.5.1 Flujo total de fotones en el detector.....	65
4.6 FWHM, FWTM, parámetro S y parámetro W .....	69
4.7 Desplazamiento del pico por entorno químico .....	78

## **Capítulo 5 ..... 81**

<b>Conclusión.....</b>	<b>81</b>
<b>Bibliografía .....</b>	<b>82</b>

# Capítulo 1

En este capítulo hablaremos acerca del papel que representa el selenio en la vida diaria, la espectrometría por fluorescencia de rayos x y su importancia para la detección de los iones biomédicos, de la misma manera se establecerán el objetivo y la justificación del trabajo finalizando con una breve reseña del estado de la espectrometría de fluorescencia de rayos x por reflexión total en México.

## Introducción

La fluorescencia de rayos x por reflexión total (TXRF por sus siglas en inglés) es una técnica de espectrometría derivada de la técnica de fluorescencia de rayos x de energía dispersada (EDXRF por sus siglas en inglés). La radiación ionizante tiene usos en la vida cotidiana; dentro de la sociedad moderna la importancia de las técnicas de espectrometría ha incrementado de manera considerable. Algunas de las principales aplicaciones de las técnicas de espectrometría son la minería, control de calidad en semiconductores, análisis de aguas, entre otras. Dentro del campo de las ciencias de la salud (con un particular interés en la biomedicina) se han estudiado aplicaciones al área de la toxicología.

El selenio (Se) es un nutriente necesario para el cuerpo humano, se puede encontrar en verduras y carne bovina además de ser importante para el adecuado funcionamiento de la enzima glutatión peroxidasa y algunas selenoproteínas. Las altas cantidades de Se en el cuerpo pueden ser observadas en el plasma sanguíneo. El centro de control de enfermedades de los Estados Unidos de América realizó un estudio liderado por investigadores epidemiólogos de la

universidad Johns Hopkins, examinaron a 917 personas de alrededor de 40 años en 2003 y 2004. Este estudio encontró que una gran parte de ellos tenían niveles altos de selenio pero aquellos que padecían diabetes mellitus tipo 2 presentaron cifras más elevadas que la mayoría (Laclaustra, Navas-Acien, Stranges, Ordovas, & Guallar, 2009).

La selenocisteína es uno de los 21 aminoácidos proteínogénicos que aparece naturalmente en los organismos eucariotas y procariotas, se encuentra en los sitios catalíticos de algunas de las enzimas, así como en la tRNAs. Las enzimas dependientes de selenio catalizan la degradación de los peróxidos o la escisión de los enlaces yodo-carbono de las hormonas tiroideas. Ambos procesos están estrechamente relacionados con otras actividades de metaloenzimas que demuestran la necesidad de una comprensión completa de la interacción enzimática y el papel del elemento traza específico involucrado. Bajos niveles de selenio se han relacionado con el riesgo de cáncer, inmunodeficiencia y enfermedades cardiovasculares. Por otro lado, a concentraciones superiores a 1.4 mg/l en el plasma sanguíneo la persona corre un riesgo muy alto de selenosis. Por lo tanto, la homeostática del Se dentro del cuerpo está estrechamente controlada. El límite diario recomendado por el Instituto Nacional de Salud de los EE. UU es de 55 µg. Algo que no se ha logrado clarificar es el patrón de distribución de Se en los diferentes órganos, así como el umbral de concentración en los fluidos corporales de dicho elemento que podrían esclarecer los límites entre un diabético y un individuo saludable.

La diabetes es una enfermedad crónica degenerativa asintomática en sus primeras etapas, un mal cuidado de esta enfermedad puede desencadenar en graves complicaciones como infarto al miocardio, retinopatías, nefropatía, neuropatía, eventos cerebrovasculares, vasculares periféricos, necrosis en extremidades superiores e inferiores, así como insulinemia (Hernández-Ávila, Gutiérrez, & Reynoso-Noverón, 2013).

Algunos métodos analíticos utilizados para la traza de elementos en muestras biomédicas son espectrometría de masas con plasma acoplado inductivamente, emisión de rayos x inducida por protones y fluorescencia de rayos x por reflexión total. El mayor problema de la traza de un elemento en una muestra biomédica es el daño inducido a la muestra por la preparación necesaria para las diferentes técnicas analíticas. La espectrometría TXRF es una técnica no destructiva y permite a las muestras biológicas conservar la mayor parte de sus propiedades originales además de necesitar una muy pequeña fracción de la muestra tomada (~10 ng). Esta característica particular de la espectrometría TXRF abre un campo de posibilidades para el análisis de diversos tejidos humanos desde células hasta líquido cefalorraquídeo.

## **1.1 Justificación**

La abundancia de Se en el medio ambiente en el estado de Michoacán debido a los suelos volcánicos, uso de fertilizantes base de selenio motiva a investigar la posible conexión entre las elevadas concentraciones de selenio en fluidos fisiológicos humanos como orina y plasma sanguíneo con los altos índices de diabetes mellitus tipo 2 en poblaciones estratégicas en el estado de Michoacán de Ocampo. Para poder llevar a cabo la investigación en poblaciones estratégicas se debe validar la técnica de TXRF para su uso en la traza de selenio en fluidos fisiológicos. El rango de concentración más de 5 órdenes de magnitud permite la espectrometría TXRF detectar concentraciones desde 0.01 mg/l (10 partes por billón (ppb)) a 100 mg/l (100 ppm) sin tener que modificar el equipo o algún paso de preparación de la técnica, hasta la fecha no se han reportado estudios que implementen la espectrometría por fluorescencia de rayos x de reflexión total para la traza de selenio en orina.

En el análisis de elementos existen varias técnicas como la espectrometría de emisión óptica por plasma acoplado inductivamente, este tipo de técnicas emplean las altas temperaturas

para realizar la detección de los elementos. Los compuestos de interés biomédico son altamente volátiles. En particular, el elemento selenio es volátil. La espectrometría TXRF permite el análisis de estos elementos sin modificar la muestra por el uso de tratamientos agresivos, por ejemplo, la digestión química a alta temperatura que se utiliza en la espectrometría de absorción atómica. La muestra puede ser analizada directamente en forma de solución, polvo amorfo o suspensión coloidal, permitiendo realizar múltiples mediciones de la misma muestra para la detección de elementos de importancia fisiológica.

## **1.2 Hipótesis**

La espectrometría por fluorescencia de rayos x de reflexión total es ideal para determinar los niveles de selenio en un fantoma de orina a niveles de traza y ultra traza.

## **1.3 Objetivos**

### ***1.3.1 Objetivo general***

- Validar la técnica de espectrometría por fluorescencia de rayos x de reflexión total como una técnica para la detección de selenio a niveles traza y ultra traza en orina.

### ***1.3.2 Objetivos específicos***

- Preparar orina artificial.
- Preparar soluciones estándares de selenio en forma de selenato de sodio, en agua tri-distilada y en la fantoma de orina que abarcan 5 órdenes de magnitud en concentración en mg/l: 0.01, 0.1, 1.0, 10.0 y 100.

- Usar la espectrometría de fluorescencia de rayos x por reflexión total para analizar las concentraciones de selenio en las soluciones estándares antes mencionadas.
- Establecer el límite de detección mínima para el selenio en las soluciones estándares.
- Estudiar las cifras de mérito del análisis a los niveles traza y ultra traza de las soluciones estándares de selenio en los dos medios acuosos.
- Estudiar el efecto matriz de los componentes del fantoma de orina, así mismo el efecto del sustrato que soporta la muestra.

## 1.4 Ventajas y desventajas de la espectrometría TXRF

En este trabajo se utilizó el espectrómetro S2 Picofox de la empresa alemana Bruker. Las cifras de mérito de un análisis químico son el porcentaje de recuperación, la precisión y la reproducibilidad. Las líneas de emisión del Se  $K_{\alpha 1}$  y  $K_{\alpha 2}$  se encuentran en el rango de energía de 11.18-11.22 keV. Este rango coincide con el de máxima eficiencia de un espectrómetro de fluorescencia de rayos x de reflexión total resultando en una gran sensibilidad para elementos traza < 1 ppm (Fernández- Ruiz, 2014). Las muestras en las fases coloidal (suspensión), sólida (polvo) y líquida pueden analizarse directamente a diferencia de las técnicas de alta sensibilidad de la competencia, espectrometría de plasma acoplado inductivamente por emisión óptica (ICP OES) y espectrometría de masa por plasma acoplado inductivamente (ICP MS). ICP OES y ICP MS requieren de la muestra en forma líquida para su posterior conversión en forma de aerosol. Excepto en el ICP MS donde la muestra solida puede ser convertida directamente en aerosol por ablación, en estas técnicas basadas en plasma las muestras solidas deben ser digeridas a una forma acuosa u orgánica antes de poder ser convertida en aerosol utilizando ácidos demasiado

fuerres. En contraste la preparación de muestras sólidas para la espectrometría de fluorescencia de rayos x de reflexión total involucra una pequeña cantidad de pasos que se llevan a cabo a una temperatura levemente mayor que la del medio ambiente.

La digestión ácida en el caso de la TXRF es solo una opción y no una necesidad absoluta. Muchos, si no la mayoría de los metabolitos del Se en la orina, son compuestos organo-selenio que son bastante volátiles. Esto significa una posibilidad reducida de pérdida del analito. Las características mencionadas de baja temperatura y procesamiento de muestra simple y suave implican que se puede lograr un muy buen análisis de cifras de mérito.

Una de las desventajas de la espectrometría por TXRF comparada con sus competidores (ICP OES y ICP MS) es su inherente baja sensibilidad para los elementos de bajo número atómico. La restricción de los bajos números atómicos yace principalmente en dos factores: el primero es el bajo rendimiento de fluorescencia de rayos x debido a que el rendimiento de electrones Auger es similar al de fluorescencia, la segunda razón es que los fotones fluorescentes de estos elementos son de muy bajas energías y por lo general son absorbidos por la muestra misma impidiendo su llegada al detector. Por fortuna para el caso de las muestras biomédicas los elementos de bajos números atómicos (C, H, O y N) son los elementos más comunes y pocas veces de interés. La espectrometría por TXRF es una técnica prometedora para la traza y ultra traza de elementos de número atómico medio o alto en muestras biomédicas.

## **1.5 Espectrometría de fluorescencia de rayos x por reflexión total en México**

La espectrometría de fluorescencia de rayos x por reflexión total es una técnica poco utilizada en México, hasta el momento de elaboración de este trabajo las únicas instituciones que

cuentan con espectrómetros similares al aquí utilizado son el Instituto de Ciencias Nucleares de la Universidad Nacional Autónoma de México (ICN), Instituto Tecnológico de Estudios Superiores de Monterrey (ITESM), Instituto Nacional de Investigaciones Nucleares (ININ) y la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo (UMSNH). De estos cuatro solo dos han sido utilizados con fines de estudios biomédicos. En el estudio reportado por T. Martínez et. Al. (2004) se realizó la traza de elementos en una población aleatoria del valle de México en el estado de México en busca de Pb. En el laboratorio de radiaciones de la UMSNH se fabricó un fantoma de orina con el fin de conocer las cifras de mérito y los límites mínimo de detección del espectrómetro para validar la traza y ultra traza de selenio en la orina, en la literatura no se ha reportado un trabajo similar.

La difusión e implementación de esta técnica ayudaría a tener una variedad de opciones para el control de calidad del sector ambiental. La norma oficial mexicana NOM-127-SSA1-1994 en su sección 4.3 define los límites permisibles de constituyentes químicos en el agua dentro de estos elementos no se considera el selenio, la vigilancia del selenio en agua potable fue implementada en la norma oficial mexicana NOM-201-SSA1-2002 erogada por el diario oficial de la nación, en esta norma en el apartado 9 subsección 9.1 se especifica que para fines de detección del selenio en agua potable o productos sanitarios se debe seguir el procedimiento marcado por la norma oficial mexicana NOM-117-SSA1-1994 que a su vez especifica se debe hacer uso de la espectrometría con absorción atómica. La norma oficial mexicana NOM-127-SSA1-2015 especifica también el uso de la espectrometría con absorción atómica para el control de calidad del agua potable y productos sanitarios, la complejidad de la preparación de las muestras, así como la destrucción de la muestra misma sitúa a la espectrometría por

fluorescencia de rayos x de reflexión total como una técnica viable para la evolución del control de calidad de los productos sanitarios o el agua potable.

# Capítulo 2

En este capítulo estudiaremos el proceso de producción, la fluorescencia de rayos x y la geometría necesaria para la producción de rayos x de reflexión total. También analizaremos las cifras de mérito utilizadas en la espectrometría de fluorescencia de rayos x por reflexión total, el efecto de matriz y su cuantificación mediante el parámetro S y W utilizado en la espectrometría por aniquilación de positrones.

## Marco teórico

Los rayos x son un rango de radiación que puede ser producida por diferentes fenómenos generando un espectro continuo o un espectro característico.

### 2.1 Rayos x

En 1865, James Clerk Maxwell describió la luz como una onda electromagnética compuesta por campo eléctrico y campo magnético perpendicular al eléctrico. Los rayos x fueron descubiertos en 1895 mientras estudiando los rayos catódicos en un tubo de descarga de gas. Einstein y Planck identificaron al haz de luz como un arreglo de cuantos de energía llamados fotones. El fotón fue identificado como una partícula con energía, pero no masa en reposo. El efecto fotoeléctrico fue descrito por Einstein en 1905 como la interacción entre un fotón un electrón libre. Arthur Holly Compton detectó la dispersión incoherente los rayos x en 1923 descubrió también la reflexión total de los rayos x. Encontró que la reflectividad de un objetivo

plano incrementaba fuertemente debajo del ángulo crítico de  $0.1^\circ$  (Klockenkämper & von Bohlen, 2015).

### 2.1.1 Radiación continua y característica.

#### Radiación característica.

El espectro de línea se produce cuando se irradia una muestra mediante partículas o fotones de rayos x. La energía de las partículas o fotones incidentes sobre la muestra deben exceder la energía de enlace de los electrones de orbitales internos (capa K) de la muestra. Estos

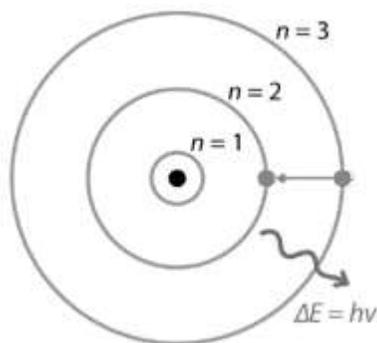


Figura 2.1 Modelo atómico de Bohr. Sharon, Bewick et. Al. (2019). Bohr's Atomic Model.[Figura]. Recuperado de: <https://chem.libretexts.org>

electrones pueden ser visualizados de mejor manera por el modelo atómico de Bohr.

En la Figura 2.1 se observa el modelo de Bohr para el átomo de hidrógeno, así como la transición electrónica entre los orbitales dando como resultado la producción de un fotón fluorescente y el desprendimiento de un electrón (Klockenkämper & von Bohlen, 2015).

$$E_x = E_{ni} - E_{nf} \quad (1)$$

La energía del fotón fluorescente debe ser igual a la diferencia de energía de enlace entre los orbitales electrónicos como se describe en la Ecuación 1. Donde  $E_x$  es la energía del fotón fluorescente,  $E_{ni}$  es el nivel de energía del orbital inicial,  $E_{nf}$  es el nivel de energía del orbital final. Debido a que los niveles energéticos están cuantizados y son característicos de cada elemento podemos identificar diferentes elementos de la tabla periódica. Existen 3 transiciones electrónicas principales, las series K, L y M. Esto sucede cuando la vacancia creada es ocupada en el nivel K, L o M por un electrón. En la Figura 2.3 podemos observar la dinámica de las transiciones.

### Radiación continua.

El espectro de radiación continua es producido por una partícula cargada ligera acelerada cuando es sometida a una colisión inelástica con los núcleos del material bombardeado. Las partículas cargadas que se mueven a una velocidad uniforme tienen un campo magnético y un campo eléctrico asociados, la energía de esta partícula es almacenada en sus campos por tanto no

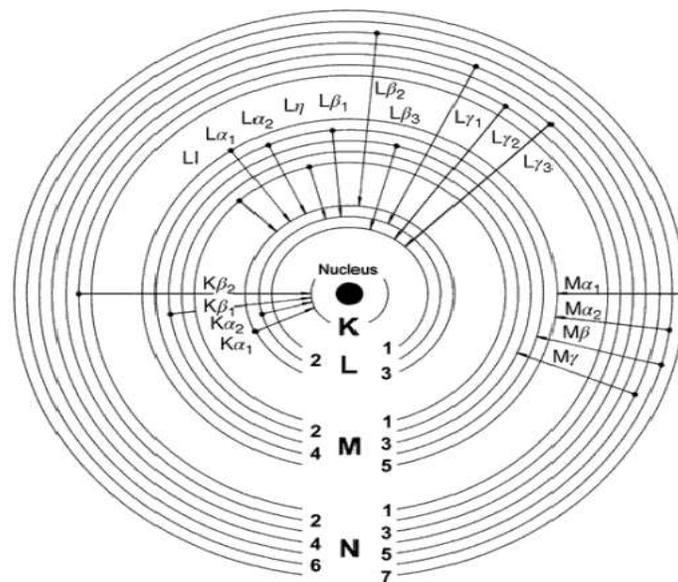


Figura 2.3 Transiciones electrónicas. R. Klockenkämper. (2015). [Figura]. Recuperado de: Total-Reflection X-Ray Fluorescence Analysis and Related Methods.

emiten radiación. En la Figura 2.4 podemos observar un espectro característico y uno continuo de rayos x.

Para una partícula cargada acelerada, los campos eléctricos y magnéticos dinámicos no pueden ajustarse de una manera que sea imposible irradiar energía de la partícula cargada, como resultado, una partícula cargada acelerada o desacelerada emite parte de su energía cinética en forma de fotones. A esta radiación se le llama radiación de frenado o radiación bremsstrahlung. Cuando las partículas cargadas aceleradas interactúan con los núcleos de los átomos del material objetivo experimentan interacciones coulombicas.

### 2.1.2 Atenuación de la radiación

La atenuación de rayos x resulta de diferentes mecanismos de interacción entre la radiación y la materia, algunos de ellos (los más importantes para este estudio) serán discutidos a continuación.

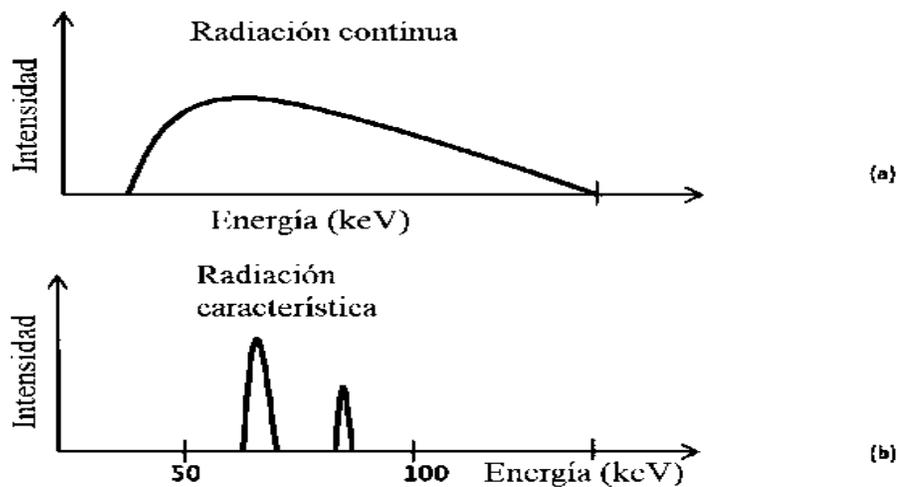


Figura 2.4 Espectros de radiación continua y característica. (a) radiación bremsstrahlung, (b) radiación característica. N Flay, R K Leach. (2012). [Figura]. Recuperado de: *Application of the optical transfer function in X-ray computed tomography*.

## Absorción fotoeléctrica.

El mayor componente de la absorción fotoeléctrica es debido al efecto fotoeléctrico, en donde un electrón de un orbital interno del átomo es expulsado por un fotón de energía suficiente. El fotón incidente es completamente aniquilado mientras se produce un segundo fotón de menor energía durante el proceso de reacomodo de los electrones. A este segundo fotón emitido se le conoce como fotón de fluorescencia o rayos x fluorescentes.

La absorción fotoeléctrica es determinada por el coeficiente de absorción másico  $\left(\frac{\tau}{\rho}\right)$ , este coeficiente puede ser considerado como la suma de todas las posibles expulsiones de los diferentes niveles atómicos (L, M, N, O y P).

$$\left(\frac{\tau}{\rho}\right) = \left(\frac{\tau}{\rho}\right)_L + \left(\frac{\tau}{\rho}\right)_M + \left(\frac{\tau}{\rho}\right)_N + \left(\frac{\tau}{\rho}\right)_O + \left(\frac{\tau}{\rho}\right)_P \quad (2)$$

Todos los elementos de esta serie se aproximan a la ley de bragg-pierce en la Ecuación 3, donde  $k_j$  refiere a los diferentes subniveles, Z al número atómico y E a la energía (Klockenkämper & von Bohlen, 2015).

$$\left(\frac{\tau}{\rho}\right)_j = \frac{k_j Z^3}{E^3} \quad (3)$$

## **Efecto fotoeléctrico.**

La interacción entre un fotón y un electrón orbital fuertemente unido de un átomo del material absorbente es llamado efecto fotoeléctrico. El fotón es absorbido completamente por la interacción y el electrón orbital es expulsado del átomo con una energía cinética. El electrón expulsado es llamado fotoelectrón.

El momento y la energía extra que lleva el fotón es transferida al átomo absorbente. El átomo disipa esa energía mediante un retroceso debido a su masa nuclear relativamente excesiva. La energía cinética del fotoelectrón es considerada igual a la energía del fotón menos la energía de enlace del electrón.

$$E_C = h\nu - E_B \quad (4)$$

La energía impartida al fotoelectrón puede no ser suficiente para expulsarlo del átomo (ionizarlo), pero puede ser suficiente para excitar a ese electrón a otro orbital superior, este proceso es conocido como excitación atómica.

Resultante de la expulsión del fotoelectrón se genera una vacancia que será ocupada por un electrón de orbitales superiores, la energía de transición será emitida como un fotón fluorescente o como un electrón Auger. La probabilidad que gobierna esta dinámica es conocida como rendimiento de fluorescencia.

## Efecto Compton.

La interacción de un fotón de energía  $h\nu$  con un electrón orbital débilmente ligado del material absorbente, esta interacción es llamada efecto Compton. El fotón incidente tiene energía mucho mayor que la energía de enlace del electrón orbital. El fotón pierde parte de su energía con el electrón Compton (electrón dispersado por el choque con el fotón) y es dispersado como un fotón de energía  $h\nu'$  en un ángulo  $\theta$ .

Se asume la naturaleza corpuscular del fotón y la conservación relativista del momento y la energía están implícitas en la ecuación del corrimiento Compton presentada a continuación.

$$\Delta\lambda = \lambda' - \lambda = \lambda_C(1 - \cos\theta) \quad (5)$$

Donde  $\lambda$  es la longitud de onda del fotón incidente,  $\lambda'$  es la longitud de onda del fotón dispersado,  $\Delta\lambda$  es la diferencia de longitud de onda entre el fotón incidente y el fotón dispersado,  $\lambda_C$  es la llamada longitud de onda Compton del electrón definida como:

$$\lambda_C = \frac{h}{m_e c} \quad (6)$$

Donde  $h$  es la constante de Planck y  $m_e$  es la masa del electrón en reposo.

En la Ecuación 5,  $\Delta\lambda$  puede ser calculada usando las relaciones relativistas de conservación total de la energía y el momento de la interacción Compton entre el fotón y el electrón débilmente ligado al átomo (Attix, 2004; Podgorsak B., 2008).

## **Dispersión Rayleigh.**

La dispersión de Rayleigh es una interacción entre un fotón y un átomo del material absorbente, esta interacción es característica por que no ioniza el átomo y tampoco lo excita. El átomo como conjunto conserva el momento, su energía de retrocesos es demasiado pequeña así que el fotón incidente se dispersa con la misma energía inicial.

## **2.2 Fluorescencia de rayos x**

En 1964, Birks, uno de los pioneros de la espectrometría de fluorescencia de rayos x presentó en Japón uno de sus trabajos donde habló acerca de los límites de detección alcanzables en esos tiempos, donde trazó elementos desde el sodio hasta el uranio en el orden de ppm, la precisión analítica obtenida fue de 1% y los errores analíticos posiblemente causados por el efecto matriz. Cuando una muestra es irradiada con rayos x emitidos por un tubo de rayos x o una fuente radiactiva, rayos x fluorescentes son producidos y pueden ser cuantificados para saber los elementos constituyentes de la muestra.

### ***2.2.1 Fluorescencia de rayos x por reflexión total***

La reflexión total de rayos x tiene sus cimientos en el hecho de que un haz incidente en una superficie especular por debajo del ángulo crítico es reflejado totalmente. El rayo incidente es reflejado de la superficie (especular) al mismo ángulo que incidió con casi la misma intensidad, una fracción de este rayo es refractada el objeto usado como reflector, la distancia de penetración alcanza el rango de los nm. Para comprender el fenómeno de la fluorescencia de rayos x por reflexión total debemos estudiar los conceptos de interferencia y ondas estacionarias.

### **Interferencia de rayos x.**

El fenómeno de interferencia es el resultado de una superposición dos o más rayos. En la región de superposición, el campo de ondas resultante muestra un patrón de máximos y mínimos. Estas fluctuaciones serán bastante marcadas si se trata de ondas con la misma longitud de onda y una diferencia de fase fija. Si la diferencia de fases es un múltiplo impar de  $\pi$  las amplitudes son mínimas, este tipo de interferencia es llamada interferencia destructiva, los puntos mínimos son llamados nodos. Si la diferencia de fase entre los rayos es un múltiplo par de  $\pi$  la interferencia es llamada constructiva lo que significa que las amplitudes suman un máximo.

Este comportamiento específico puede ser explicado por la ley de bragg, la interferencia de los rayos x dispersados de manera coherente es llamada difracción de rayos x.

### **Campo de ondas estacionarias de rayos x.**

Como se mencionó anteriormente la interferencia es resultado de dos o más rayos que se propagan en la misma dirección. La interferencia también es posible para rayos de diferentes direcciones. Si la región de superposición es amplia, un campo de ondas será observado. El patrón de ondas resultante se propaga con cierta velocidad y cierta dirección, este fenómeno es llamado campo de ondas estacionarias, puede ser descrito como simples oscilaciones con amplitudes locales.

Debido a que el índice de refracción  $n$  para los rayos x en la materia es menor que la unidad, los rayos x sufren la reflexión total cuando  $\theta$  es menor que el ángulo crítico  $\theta_c$ , para

$$n = 1 - \delta - i\beta \quad (7)$$

Donde  $\delta$  y  $\beta$  son  $\leq 10^{-15}$ ,  $\theta_c = (2\delta)^{\frac{1}{2}}$

En la Figura 2.5 se puede observar con mayor detalle la formación del campo de ondas estacionarias, así como su propagación perpendicular a la superficie en donde  $k_0$  y  $k_r$  son los

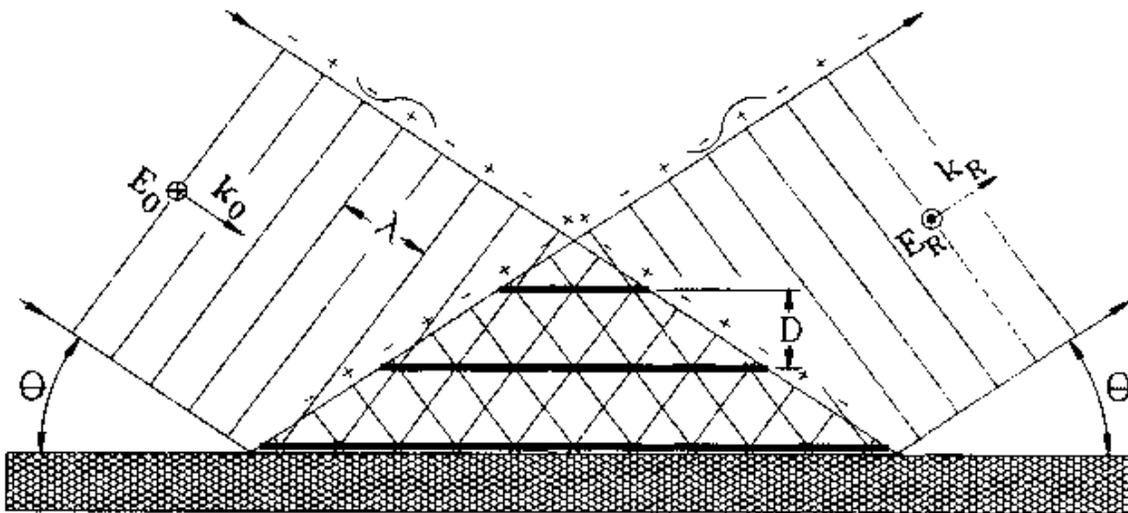


Figura 2.5 Campo de ondas estacionarias de rayos x. La distancia  $D$  representa la amplitud de la onda que se alija del campo estacionario.

vectores de onda, el campo eléctrico incidente  $E_0$  y reflejado  $E_r$ .

### 2.2.2 Arreglo detector-fuente para la reflexión total

El arreglo detector-fuente para generar el fenómeno de reflexión total depende del ángulo crítico ( $0.1^\circ$ ). Cuando un haz de rayos X atraviesa un medio homogéneo, sigue una trayectoria recta. Al igual que la luz visible, si el haz de rayos X encuentra en su camino un nuevo medio, su trayectoria varía respecto a la original.

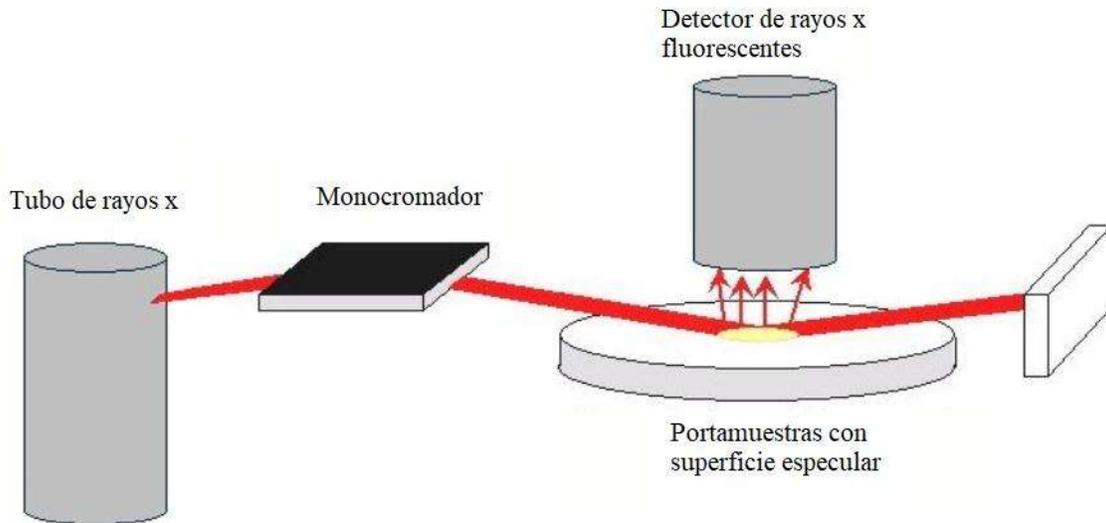


Figura 2.6 Geometría de un espectrómetro de fluorescencia de rayos x por reflexión total.

Esto se traduce en que parte del haz de rayos X se reflejan del primer medio y el restante se refracta dentro del segundo medio.

## 2.3 Cifras de mérito

La calidad de la espectrometría de fluorescencia de rayos x por reflexión total es evaluada por las cifras de mérito estadístico. Las cifras de mérito son definidas por la IUPAC (Internationa Union of Pure and Applied Chemistry).

### 2.3.1 Exactitud

El valor nominal es la concentración del elemento del analito en un material estándar de referencia que viene determinado por un laboratorio certificado por organizaciones internacionales por ejemplo la agencia internacional de energía atómica, instituto internacional

de tecnología y estándares. Se llega a este valor mediante una serie de mediciones por diferentes laboratorios internacionales usando una variedad de métodos. Para el método de fluorescencia de rayos x por reflexión total, el análisis mencionado anteriormente se realiza en una serie de materiales estándares de referencia produciría el porcentaje de precisión del método.

$$\text{Exactitud } \% = \left( \frac{\text{Valor teórico}}{\text{Valor experimental}} \right) \times 100 \quad (8)$$

Si el material estándar de referencia (MER) se encuentra en forma de polvo y se utiliza el método de medición de polvo, entonces el MER certifica la precisión para el método de medición en polvo, lo mismo para las muestras digeridas en líquidos. Como se vio en lo anterior, es de vital importancia que el MER contenga la misma matriz que el analito en las muestras a analizar. Muy a menudo esto no se puede. Simplemente se puede citar el valor verdadero determinado para el MER que más se acerca a la matriz de la muestra desconocida, con el aviso de que este valor puede no aplicarse estrictamente a la muestra analizada por el método y el instrumento utilizado.

### ***2.3.2 Porcentaje de recuperación***

$$\text{Recuperación } \% = \left( \frac{\text{Valor experimental}}{\text{Valor nominal}} \right) \times 100 \quad (9)$$

El valor nominal es el valor determinado por la concentración calculada del estándar, la concentración que se espera que tenga el estándar es un poco diferente a la real debido a las ligeras variaciones en volúmenes y masas medidas en la preparación de los estándares.

### ***2.3.3 Precisión***

La precisión del método está dada por el porcentaje del coeficiente de variación del análisis del material estándar de referencia.

$$\text{Precisión \%} = 100 \% - \text{Coeficiente de variación} \quad (10)$$

El coeficiente de variación también es llamado desviación estándar relativa.

$$CV = \left( \frac{\text{Desviación estándar de la medición}}{\text{Valor medio de la medición}} \right) \times 100 \quad (11)$$

La media y la desviación estándar son obtenidas de la repetición de las mediciones de la muestra. La repetición de las mediciones es realizada por el software de adquisición del S2 Picofox.

### 2.3.4 Límite mínimo de detección

El límite mínimo de detección define la mínima capacidad del instrumento para detectar el analito.

$$LLD(i) = 3 \left( \frac{\sqrt{N_{Bi}} C_i}{N_i} \right) \quad (12)$$

Para cada muestra en su respectivo nivel de concentración obtendremos el límite de detección mínimo de selenio en esa muestra. En la Ecuación 12,  $C_i$  representa el valor medio de la concentración del analito,  $N_i$  es el área neta del pico en la región de interés (entenderemos como región de interés para este trabajo como la región del espectro dónde se ubica el pico de selenio),  $N_{Bi}$  es el conteo del ruido de fondo en la región de interés.

### 2.3.5 Sensibilidad

La sensibilidad define la capacidad del instrumento para distinguir la señal del analito del fondo. Depende tanto del tipo de átomos de analito como de las propiedades de la matriz.

$$S_i = \frac{N_i F_i}{L T I C_i} \quad (13)$$

Donde  $S_i$  es la sensibilidad del  $i$ -ésimo elemento,  $F_i$  es el factor de absorción del  $i$ -ésimo elemento,  $LT$  es el tiempo vivo del detector en la adquisición del espectro,  $I$  es la corriente del tubo de rayos x,  $C_i$  es la concentración del  $i$ -ésimo elemento.

Para elementos más pesados que el silicio el factor de absorción es aproximadamente 1. Esto indica que la auto-absorción de los rayos X fluorescentes dentro de la muestra no es un problema para un espectrómetro XRF.

El factor de absorción está definido de la siguiente manera

$$F_i = \frac{\mu(E_i) \rho}{[1 - e^{-\mu(E_i) \rho}]} \quad (14)$$

Donde  $\mu(E_i)$  es el coeficiente de atenuación másica de la muestra a la energía  $E_i$  de los rayos x fluorescentes en el  $i$ -ésimo elemento,  $\rho$  es la densidad de la muestra.

$$\mu(E_i) = \sum_i W_i \mu_i \quad (15)$$

Donde  $W_i$  es la fracción de peso del  $i$ -ésimo elemento y  $\mu_i$  es el coeficiente de atenuación másica a la energía  $E_i$  del rayo fluorescente.

Los valores  $\mu_i$  pueden obtenerse de la literatura y  $W_i$  a partir del conocimiento de la composición de la muestra.

## 2.4 Análisis de la forma del pico

El análisis de la forma del pico se realiza para entender como el efecto matriz altera el pico de Se. El efecto matriz debido a la dispersión o la absorción cambiará el ruido de fondo en magnitud y forma. En nuestro caso los efectos de matriz serán por dispersión por la composición de elementos ligeros en la matriz. El pico característico está situado por arriba del ruido de fondo

por lo que la proporción de señal a ruido (S/N) y la forma del pico también cambiaran como consecuencia del ruido de fondo cambiante. Los indicadores a analizar serán: el conteo de ruido de fondo debajo de la región de interés, la proporción de señal a ruido, ancho completo a la mitad del máximo y el ancho completo a la décima del máximo.

#### **2.4.1 Proporción de señal a ruido y pico a fondo (P/B)**

Esta proporción nos dice como el incremento del ruido de fondo afecta la habilidad del equipo para detectar la señal del analito, la proporción de señal a ruido complementa la sensibilidad. S/N es la sensibilidad electrónica del equipo.

$$\frac{S}{N} = \frac{\text{Conteo máximo del pico de interés}}{\text{conteo mínimo a la izquierda y derecha del pico}} \quad (16)$$

La proporción P/B está definida como la sensibilidad de la técnica donde la intensidad de los conteos sobre el fondo es dividida por la intensidad del fondo dentro de la misma región de interés del pico.

$$P/B = \frac{\text{Intensidad de conteos en el pico}}{\text{Intensidad de conteos de fondo}} \quad (17)$$

#### **2.4.2 Ancho completo a la mitad y décima parte del máximo**

Los picos de rayos X fluorescentes sigue una distribución gaussiana. Estos parámetros están relacionados con el ajuste de la distribución  $\sigma$ . El análisis de la forma del pico generalmente se refiere a la ampliación de la línea espectral.

$$FWHM = 2\sqrt{2\ln 2} \sigma \quad (18)$$

$$FWTM = 2\sqrt{2\ln 10} \sigma \quad (19)$$

Usando  $\sigma$  conoceremos los valores de FWHM y FWTM.

## 2.5 Desplazamiento del pico por entorno químico

Es bien conocido que el entorno químico de un elemento afecta o modifica varias características del espectro de emisión de rayos x, algunos reportes indican que estos efectos químicos están relacionados con la emisión de rayos x tras el proceso de captura electrónica o parcialmente después de la fotoionización (Porikli & Kurucu, 2012).

Por la polarización del orbital molecular de la especie molecular donde se encuentra el átomo fluorescente. La polarización por campo magnético o campo eléctrico afecta la función de onda del orbital molecular que a su vez afecta las funciones de onda de los electrones internos del átomo del analito. Este efecto es muy pequeño porque es un efecto secundario. Este efecto puede ser más evidente en las fluorescencias realizadas con fuentes de excitación con mayor luminosidad por ejemplo la de sincrotrón. Este efecto se ha buscado en equipos de laboratorio durante un tiempo. Estas investigaciones con equipos de laboratorio se han realizado con las técnicas de fluorescencia de rayos x por longitud de onda dispersiva (por sus siglas en inglés WDXRF) y fluorescencia de rayos x de energía dispersa (por sus siglas en inglés EDXRF), se ha investigado el efecto del tipo de enlace de la misma molécula (Kaur & Mittal, 2014). No existe demasiada evidencia sobre la investigación del efecto de la vecindad química de la molécula usando desplazamiento de pico y ensanchamiento del pico.

## 2.6 Ensanchamiento del pico

Cada nivel cuántico tiene una vida promedio  $\Delta\tau$ , la incertidumbre de la energía por la ley de Heisenberg es:

$$\Delta\tau\Delta E \leq \hbar \quad (20)$$

Cuando  $\Delta\tau$  es muy pequeño la energía incrementa, esta contribución al ensanchamiento de poco es inevitable.

Otro de los factores que interviene en el ensanchamiento de pico es la capacidad del detector para coleccionar los pares electrón-hoyo causados por la absorción del fotón fluorescente dentro del material del detector, si la velocidad de recolección es baja el ancho del pico es mayor. Con una longitud de onda fija este factor es fijo.

La vida  $\tau$  del nivel cuántico disminuye con la contribución termal por lo que  $\Delta E$  incrementa causando un ensanchamiento de pico.

## 2.7 Parámetro S y W

Para el análisis del pico en la fluorescencia de rayos x normalmente es utilizada la proporción entre pico y ruido de fondo con frecuentes fallas en la cuantificación. En el análisis de pico en la espectrometría por aniquilación de positrones ha desarrollado una manera de cuantificar introduciendo los parámetros S y W los cuales son definidos de la siguiente manera.

$$S = \frac{\text{Área envuelta por el FWHM}}{\text{Área total del pico}} \quad (21)$$

$$W = \frac{\text{Área envuelta por las alas de FWTM}}{\text{Área total del pico}} \quad (22)$$

En la Figura 2.7 podemos observar las regiones S y W utilizadas en la espectrometría de aniquilación de positrones.

## 2.8 Concentración

La radiación característica es monocromática, esta caracterización es descrita por la ley de Moseley:

$$E = h k_1^2 (Z - k_2)^2 \quad (23)$$

Donde E es la energía característica del fotón, h es la constante de planck,  $k_1$  y  $k_2$  son constantes que dependen del tipo de fotón y Z es el número atómico del elemento. La forma de cuantificar el elemento fluorescente es mediante la intensidad o el flujo de fotones emitidos. La

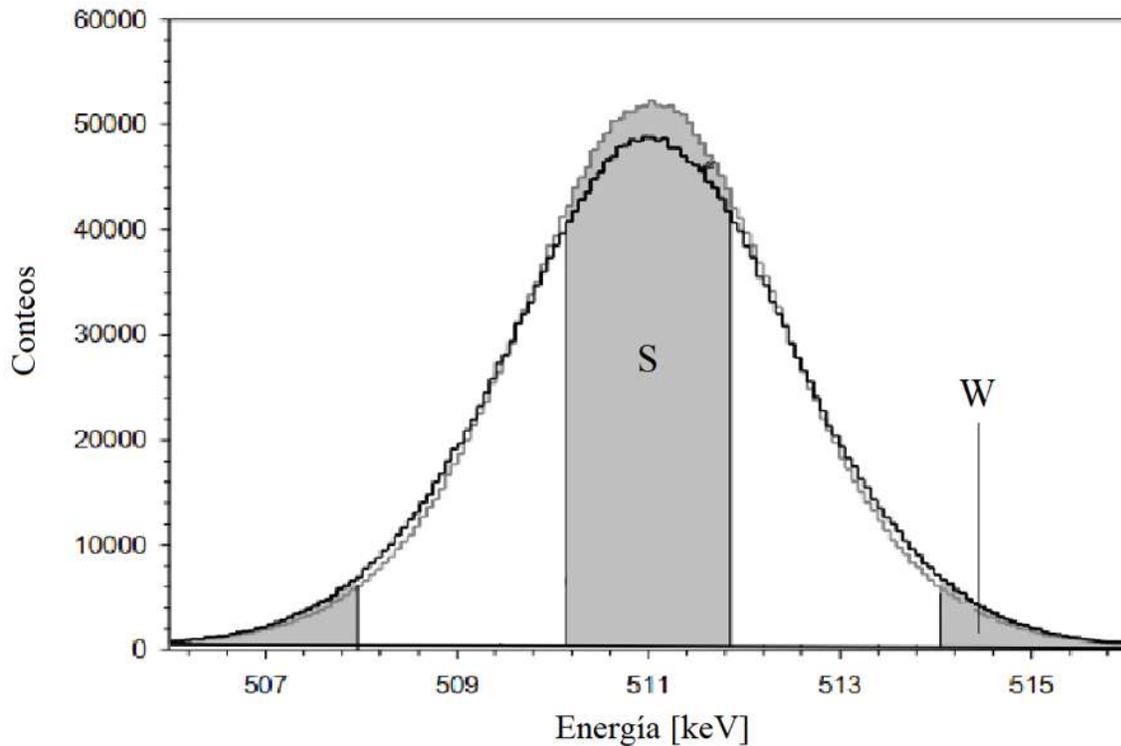


Figura 2.7 Parámetros S y W. P. Horodek. (2014). [Figura]. Recuperado de: Positron annihilation spectroscopy at LEPTA facility-

concentración es directamente proporcional a la densidad de átomos del elemento que se busca en la muestra.

La intensidad de rayos característicos medida  $I'$  depende de la concentración del analito, efecto matriz, tamaño de la muestra y radiación de fondo. Un protocolo de validación y preparación de muestras. Entonces para un instrumento determinado y una muestra dada:

$$C = K I' CF(RL) CF(AT) \quad (24)$$

$$CF(AT) = M S \quad (25)$$

$K$  es la constante de calibración del instrumento determinada a través de medición de estándares,  $CF(RL)$  es el factor de corrección para pérdidas relacionadas con la tasa de conteo de fotones en el detector,  $CF(AT)$  es el factor de corrección relacionado a la atenuación por el efecto de espécimen  $S$  y de matriz  $M$ .

Una vez definidas las sensibilidades relativas de un determinado instrumento de TXRF, estas permanecen invariantes durante años y solo es necesaria su modificación cuando se cambia el sistema de detección o se varía la geometría. En estas condiciones la TXRF muestra toda su potencialidad a la hora del análisis químico, debido sobre todo a su simplicidad. La cuantificación mediante TXRF viene dada por la relación lineal (Fernández Ruiz, 2010). En el método del TXRF una cantidad de estándar interno debe ser añadido, este elemento debe ser uno que no se encuentre en la muestra y que esté cercano al analito en la tabla periódica.

$$C_A = \frac{(N_A/S_A)}{(N_{IS}/S_{IS})} C_{IS} \quad (26)$$

Donde  $C_A$  es la concentración del analito  $N_A$  y  $N_{IS}$ ,  $S_A$   $S_{IS}$  son el área neta y la sensibilidad del analito y el estándar interno respectivamente.

# Capítulo 3

En este capítulo se detallan los pasos seguidos en el experimento, las herramientas necesarias y los cálculos necesarios para poder obtener los valores obtenidos.

## Método experimental

Los componentes para la fabricación de orina artificial simulando una persona en buen estado de salud es 91%-96% agua, solutos orgánicos e inorgánicos. El pH de la orina normal debe oscilar entre 5.5 y 7. El soluto principal de la orina es la urea con una concentración de 9.3 g/l – 23.3 g/l. Los iones inorgánicos son sodio, potasio, cloro y fosfato. Se usó la formulación de la “base de orina” propuesta por Khan et al (2017).

Toda la cristalería y reactivos utilizados en este trabajo fueron de marca Pyrex® y de grado de pureza ACS / USP. Todas las micropipetas utilizadas fueron de la marca Brand® y Witeg®.

### 3.1 Base de orina

Cloruro de potasio, KCl (0.2 g/l), Cloruro de sodio NaCl (8 g/l), fosfato de sodio mono-hidrogeno  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  (1.14 g/l), fosfato de potasio di-hidrogeno  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (0.2g/l), colorante amarillo (200  $\mu\text{l}$  /l), agua tri-distilada 1 litro, ácido clorhídrico HCl(ac) 1M e hidróxido de potasio KOH (ac) 1M. Se usaron HCl(ac) y KOH(ac) para ajustar el pH de la solución final.

Usando como base lo propuesto por L. B. Khan et al (2017) excepto el colorante amarillo, se fijó el volumen de orina artificial a preparar en 250 ml. Los reactivos en cada caso cuentan con cierto grado de pureza, por esta razón se debe hacer un ajuste en las cantidades a añadir.

$$\text{KCl: } (0.2 \text{ g/l})(0.250 \text{ l})\left(\frac{85}{100}\right) = 0.0425 \text{ g}$$

$$\text{NaCl: } (8 \text{ g/l})(0.250 \text{ l})\left(\frac{99}{100}\right) = 1.98 \text{ g}$$

$$\text{Na}_2\text{HPO}_4: (1.14 \text{ g/l})(0.250 \text{ l})\left(\frac{99}{100}\right) = 0.2822 \text{ g}$$

$$\text{KH}_2\text{PO}_4: (0.2 \text{ g/l})(0.250 \text{ l})\left(\frac{99}{100}\right) = 0.0495 \text{ g}$$

$$\text{Urea: } (9.3 \text{ g/l})(0.250 \text{ l})\left(\frac{99}{100}\right) = 2.3018 \text{ g}$$

### ***3.1.1 Preparación de orina artificial***

En un vaso de precipitado de 500 ml se añadieron las cantidades pesadas de NaCl, KCl y Urea. Se vertió 50 ml de agua tri-distilada. Con un agitador magnético se movió la mezcla hasta la disolución de todas las sales. Se aforó con agua destilada el vaso de precipitado hasta alcanzar los 250 ml. Después de agitarlo se cubrió con un vidrio de reloj.

## **3.2 Preparación de las soluciones de selenato de sodio en agua y orina artificial**

Las concentraciones deseadas son 100, 10, 1, 0.1 y 0.01 mg/l de selenio. Utilizando la solución de estándar de selenato de sodio a 1000 mg/l se preparó la solución de 100 mg/l.

Tabla 3.1 Cálculo de volumen para soluciones. El agua utilizada para estas soluciones es agua ultra pura.

$C_i V_i = C_f V_f$						
Vialito	Concentración	Ci	Vi	Cf	Vf	Cantidades
1	100 mg/l	1000 mg/l	2.5 ml	100 mg/l	25 ml	2.5 ml (Na <sub>2</sub> SeO <sub>4</sub> ) + 22.5 ml (H <sub>2</sub> O)
2	10 mg/l	100 mg/l	0.5 ml	10 mg/l	5 ml	0.5 ml (Na <sub>2</sub> SeO <sub>4</sub> ) + 4.5 ml (H <sub>2</sub> O)
3	1 mg/l	100 mg/l	0.05 ml	1 mg/l	5 ml	0.05 ml (Na <sub>2</sub> SeO <sub>4</sub> ) + 4.95 ml (H <sub>2</sub> O)
4	0.1 mg/l	100 mg/l	0.005 ml	0.1 mg/l	5 ml	0.005 ml (Na <sub>2</sub> SeO <sub>4</sub> ) + 4.995 ml (H <sub>2</sub> O)
5	0.01 mg/l	10 mg/l	0.005 ml	0.01 mg/l	5 ml	0.005 ml (Na <sub>2</sub> SeO <sub>4</sub> ) + 4.995 ml (H <sub>2</sub> O)

En la Tabla 3.1, Vi representa el volumen inicial de la solución de selenato de sodio a añadir, Ci representa la concentración inicial de la solución a añadir, Cf es la concentración final de la solución a preparar y Vf es el volumen final de la solución a preparar.

Vialito 1 (Na<sub>2</sub>SeO<sub>4</sub> 100 mg/l): En un frasco volumétrico de 25 ml se agregaron 2.5 ml del estándar de selenato de sodio, usando un embudo se añadió agua tri-destilada hasta la aparente mitad, Después de agitar gentilmente se aforó hasta los 25 ml.

Vialito 2 ( $\text{Na}_2\text{SeO}_4$  10 mg/l): Acuerdo a los volúmenes marcados en la Tabla x. Usando la micropipeta de 1000  $\mu\text{l}$  se extrajeron 0.5 ml del vialito 1, aforando con 4.5 ml de agua tri-destilada.

Vialito 3 ( $\text{Na}_2\text{SeO}_4$  1 mg/l): Se usó la solución de 100 mg/l para extraer 0.05 ml (50  $\mu\text{l}$ ) con la micropipeta de 2-200  $\mu\text{l}$  para la extracción. Se añadieron 4.95 ml de agua tri-destilada usando la pipeta de 1000  $\mu\text{l}$ .

Vialito 4 ( $\text{Na}_2\text{SeO}_4$  0.1 mg/l): De la solución de 100 mg/l se extrajeron 0.005 ml (5  $\mu\text{l}$ ) usando la micropipeta de 1-10  $\mu\text{l}$ , se aforaron 4.995 ml de agua tri-destilada usando la micropipeta de 1000  $\mu\text{l}$ .

Vialito 5 ( $\text{Na}_2\text{SeO}_4$  0.01 mg/l): En este caso se usó la solución de 10 mg/l para la disolución. Después de extraer 0.005 ml (5  $\mu\text{l}$ ) con la micropipeta 1-10  $\mu\text{l}$  se aforará 4.995 ml de agua tridestilada usando la micropipeta de 1000  $\mu\text{l}$ .

No es recomendable operar las micropipetas en los límites de su capacidad, se recomienda usar en un rango medio de la micropipeta. Una vez preparadas las soluciones almacenarlas en un lugar fresco y oscuro.

### **3.3 Preparación de muestras**

Para el protocolo de preparación de los discos se siguió el protocolo propuesto por la compañía Bruker GmbH fabricante del instrumento utilizado (S2 Picofox).

Las muestras para estos espectrómetros sin importar que sean líquidas, polvo o películas delgadas siempre son analizadas como una capa seca en la superficie óptica especular de un disco de 30 mm de diámetro que funciona como portamuestras. Estos portamuestras son

fabricados de diferentes materiales como zafiro, cuarzo o acrílico. La interacción entre la radiación y el material del portamuestras aporta una señal significativa en el espectro de la técnica, a este espectro se le denomina ruido de fondo. El ruido de fondo producido por la interacción de la radiación con el portamuestra es menor en el caso del zafiro y el cuarzo. Para el acrílico el ruido de fondo no es de gran importancia en muestras con concentraciones  $\geq 10$  ppm. Este trabajo se llevó a cabo usando discos de acrílico y discos de cuarzo para bajas concentraciones con el fin de obtener resultados con un alto grado de precisión. Cabe mencionar que en la técnica de TXRF utilizando el espectrómetro S2 Picofox (Bruker GmbH), generalmente se cubre la superficie del portamuestra con una capa delgada de silicón; en consecuencia, el ruido total del fondo es la combinación del ruido contribuido por el material del portamuestra y el silicón (ver la Figura 3.1 y 3.2).

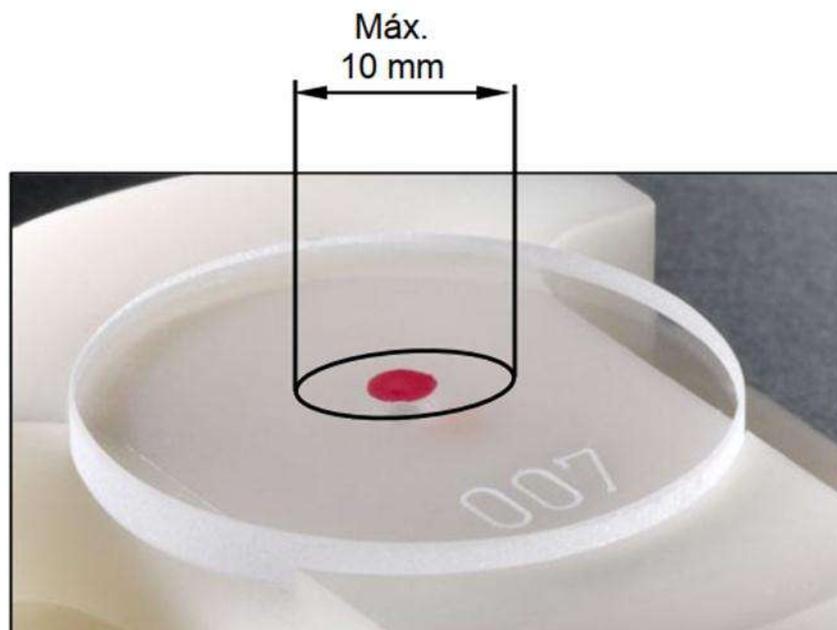


Figura 3.1 Región de posicionamiento del analito

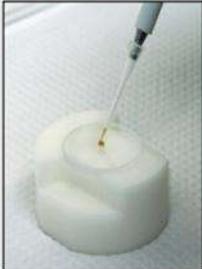
<p><b>Separación de una parte de la muestra</b></p> <p>Utilizando una pipeta, se transfiere una parte de la muestra original de 500 a 1.000 <math>\mu\text{l}</math> a un recipiente de plástico.</p>	
<p><b>Adición del estándar interno</b></p> <p>Para la estandarización interna, se agrega una determinada cantidad de un estándar líquido monoelemental. Esta mezcla debe homogeneizarse lo más posible; para ello se recomienda emplear un agitador automático de muestras.</p> <p>La elección del elemento dependerá de la composición elemental de la muestra. Debe escogerse un elemento que no se encuentre ya en la muestra que se va a analizar. Asimismo, debería tratarse de evitar que las líneas de fluorescencia del elemento escogido como estándar interno se superpongan a las de los elementos importantes de la muestra. La concentración del elemento escogido como estándar interno debería encontrarse en el rango medio de la de los elementos presentes en la muestra analizada.</p>	
<p>La preparación de muestras orgánicas ligeramente volátiles para el análisis TXRF es difícil y, en muchos casos, imposible.</p> <p>Es importante que el estándar interno que se agregue esté basado en un vehículo orgánico. A una cantidad de muestra de 1 ml se le añade una cantidad determinada de estándar interno (rango de los <math>\mu\text{l}</math>). Durante este proceso hay que procurar reducir la pérdida de material de la muestra por evaporación al mínimo posible.</p> <p>Tras una exhaustiva homogeneización, se colocan 10 <math>\mu\text{l}</math> de muestra sobre un portamuestras. La solución de la muestra se extenderá por una amplia zona del portamuestras y se secará rápidamente. Con el objeto de garantizar que en el área de medición hay suficiente material de muestra, es preciso repetir este proceso varias veces. El número de repeticiones necesario depende del tipo de muestra.</p>	
<p><b>Transferencia de la muestra al portamuestras</b></p> <p>Utilizando una pipeta, se transfieren 10 <math>\mu\text{l}</math> de la muestra original a un portamuestras.</p>	
<p><b>Secado de la muestra</b></p> <p>La muestra que se encuentra en el portamuestras debe secarse. Esto puede hacerse bien mediante vacío en un desecador o calentándola con una lámpara de infrarrojos o una placa calefactora.</p>	

Figura 3.2 Procedimiento de preparación de muestras.

### 3.2.1 Método de estándar interno

En la espectrometría por TXRF un cierto volumen de un estándar interno (EI) es añadido a la muestra. Este estándar debe ser un elemento que la muestra no pueda contener ni siquiera por contaminación. Se debe elegir como EI un elemento que sea cercano al elemento a buscar para este trabajo seleccionamos el galio (Ga) por su cercanía al Se ya que la eficiencia del detector y la calibración de ganancia (variantes con la energía) son similares para estos dos elementos Se y Ga. Como se detalla en la sección teórica de esta tesis, la expresión matemática utilizada en el análisis para obtener la concentración del analito, contiene la concentración del EI. Por eso, es necesario usar una estándar de referencia como el EI, es decir, una estándar con concentración certificada. En este trabajo se usó el estándar certificado de Ga ( $1000 \pm 2$ ) mg/l de la marca Sigma-Aldrich®. Esta concentración es demasiado alta así que se procedió a diluir en concentraciones de 100 mg/l y 10 mg/l.

Preparación de los estándares secundarios

Ga 100 mg/l

El volumen final deseado son 10 ml, la concentración del estándar de Ga es 1000 mg/l, la concentración final deseada es de 100 mg/l.

$$V_i = \frac{(10 \text{ ml})(100 \text{ mg/l})}{1000 \text{ mg/l}} = 1 \text{ ml} \quad (27)$$

En un vialito verter 1 ml del estándar de Ga a 1000 mg/l y 9 ml de agua tri-distilada. Etiquetar y almacenar en un lugar frío.

Ga 10 mg/l

El volumen final deseado son 10 ml, se usará la solución de 100 mg/l para esta disolución, la concentración final deseada es de 10 mg/l.

$$V_i = \frac{(10 \text{ ml})(10 \text{ mg/l})}{100 \text{ mg/l}} = 1 \text{ ml} \quad (28)$$

En un vialito verter 1 ml del estándar de Ga a 100 mg/l y 9 ml de agua tri-distilada. Etiquetar y almacenar en un lugar frío.

### **3.2.2 Preparación de la superficie de los discos**

La naturaleza de las muestras líquidas al momento de ser colocadas en el disco porta muestra las obligaría a esparcirse sobre la superficie del disco y de esta manera los átomos también se dispersarían sobre la superficie, reduciendo así la densidad superficial atómica del analito que el haz de rayos X primario encontraría durante el análisis. Causa de esto se debe crear una superficie hidrofóbica, para lograr que la superficie sea hidrofóbica se utiliza un silicón líquido que se adhiere a la superficie de tal manera que no permite que la muestra se disperse por el disco.

Este líquido es llamado Serva™, a diferencia de lo sugerido por Sofia Riaño et al (2016) en su texto *Practical guidelines for best practice on Total Reflection X-Ray Fluorescence Spectroscopy: Analysis of aqueous solutions* donde se utiliza un volumen de 30 µl de silicona para volver hidrofóbica la superficie del portamuestras, para este trabajo se tomaron 10 µl y fueron colocados en el centro de la superficie del disco (se debe colocar la gota con ayuda del dispositivo auxiliar brindado por bruker). La razón de tomar una mínima cantidad del silicón líquido es para reducir la contribución de ruido del fondo en el espectro, causado por el silicón.

Después de ser colocado el silicón fue secado a 45°C durante 30 minutos para que el silicón seque y se fije sobre la superficie del disco.

### 3.2.3 Preparación del analito

En dos tubos de eppendorf rotulados uno de 100 mg/l de Na<sub>2</sub>SeO<sub>4</sub> y de 10 mg/l de Na<sub>2</sub>SeO<sub>4</sub> se añadió 1 ml de Na<sub>2</sub>SeO<sub>4</sub> con agua tri-destilada (a 100 y 10 mg/l) con la micropipeta de 1000 µl respectivamente, después se añadieron 10 µl del estándar de Ga a 1000 mg/l por lo que el volumen en los tubos de eppendorf ahora es de 1010 µl entonces la concentración final del EI es

$$C_f = \frac{(1000 \text{ mg/l})(0.010 \text{ ml})}{1.010 \text{ ml}} = 10 \text{ mg/l} \quad (29)$$

El volumen de los tubos eppendorf de diferentes concentraciones ahora es la muestra a analizar. Con la micropipeta de 1-10 µl se extrajeron 10 µl y se colocaron en el centro de los discos con la superficie hidrofóbica previamente preparados (con ayuda del dispositivo brindado por la compañía Bruker véase la Figura 3.1).

Una vez preparados los discos con la muestra en el centro del porta muestras son secados a 40 °C durante 2 horas.

En dos tubos de eppendorf rotulados uno de 0.1 mg/l de Na<sub>2</sub>SeO<sub>4</sub> y de 0.01 mg/l de Na<sub>2</sub>SeO<sub>4</sub> se añadió 1 ml de Na<sub>2</sub>SeO<sub>4</sub> con agua tri-destilada (a 0.1 y 0.01 mg/l) con la micropipeta de 1000 µl respectivamente, después se añadieron 10 µl del estándar de Ga a 100 mg/l por lo que el volumen en los tubos de eppendorf ahora es de 1010 µl entonces la concentración final del EI es

$$C_f = \frac{(100 \text{ mg/l})(0.010 \text{ ml})}{1.010 \text{ ml}} = 0.1 \text{ mg/l} \quad (30)$$

El volumen de los tubos eppendorf de diferentes concentraciones ahora es la muestra a analizar. Con la micropipeta de 1-10  $\mu\text{l}$  se extrajeron 10  $\mu\text{l}$  y se colocaron en el centro de los discos con la superficie hidrofóbica previamente preparados (con ayuda del dispositivo brindado por la compañía Bruker; ver Figura 3.1). El mismo procedimiento se llevó a cabo para el  $\text{Na}_2\text{SeO}_4$  con la orina como medio.

Entonces en esta técnica la masa del analito analizado cubrió el rango de  $10^{-10}$  g (100 pg) –  $10^{-6}$  g (1  $\mu\text{g}$ ), que significa 4 órdenes de magnitud de masa.

### 3.3 Selenato de Sodio en orina

Durante la preparación de las muestras se observó una peculiaridad con el selenato de sodio en combinación con la orina. Después de secar los discos porta muestras durante 2 horas a 45 °C existía una aparente buena condición del analito justo como se esperaba (un lamina delgada y seca), al pasar 10 minutos los discos con mayor concentración de selenato de sodio comenzaron a hidratarse volviendo a su forma líquida de nuevo. Se regresó el analito al secado durante 1 hora más a 45 °C logrando obtener otra vez la forma de lámina seca del analito. Al pasar 15 minutos sucedió lo mismo, la muestra regresaba a su forma líquida impidiendo así analizarlo en el espectrómetro (Figura 3.3).

Recordando uno de los componentes principales de la orina es la urea la cual se encuentra en mayor proporción. Una de las propiedades de la urea es su alta capacidad higroscópica. Esta alta capacidad higroscópica se atribuye al grupo funcional amina dentro de la estructura de la urea.

### ***3.3.1 Hidrolisis de la Urea***

Sun Dae Yim et al (2004) reportó un proceso para la hidrolisis de la urea descomponiéndola en ácido isocianico y amoniaco que permanecen en la fase acuosa como especies disueltas. Se tomaron 100 ml de orina artificial y se colocaron en un vaso de precipitado de 200 ml, se colocó el vaso de precipitado a 100 °C durante 10 minutos en una parrilla termomagnética. Se aumentó la temperatura a 200 °C alcanzando el punto de ebullición a los 25 minutos de ser puesto al calor. Una vez que la mitad del volumen de orina artificial fue evaporado se retiró de la parrilla hasta que bajara su temperatura a temperatura ambiente y se estabilizara. El volumen perdido fue recuperado con agua tri-distilada hasta alcanzar el volumen inicial. Es importante recordar que la FRX es un análisis de átomos, no de moléculas. Entonces, aunque

la

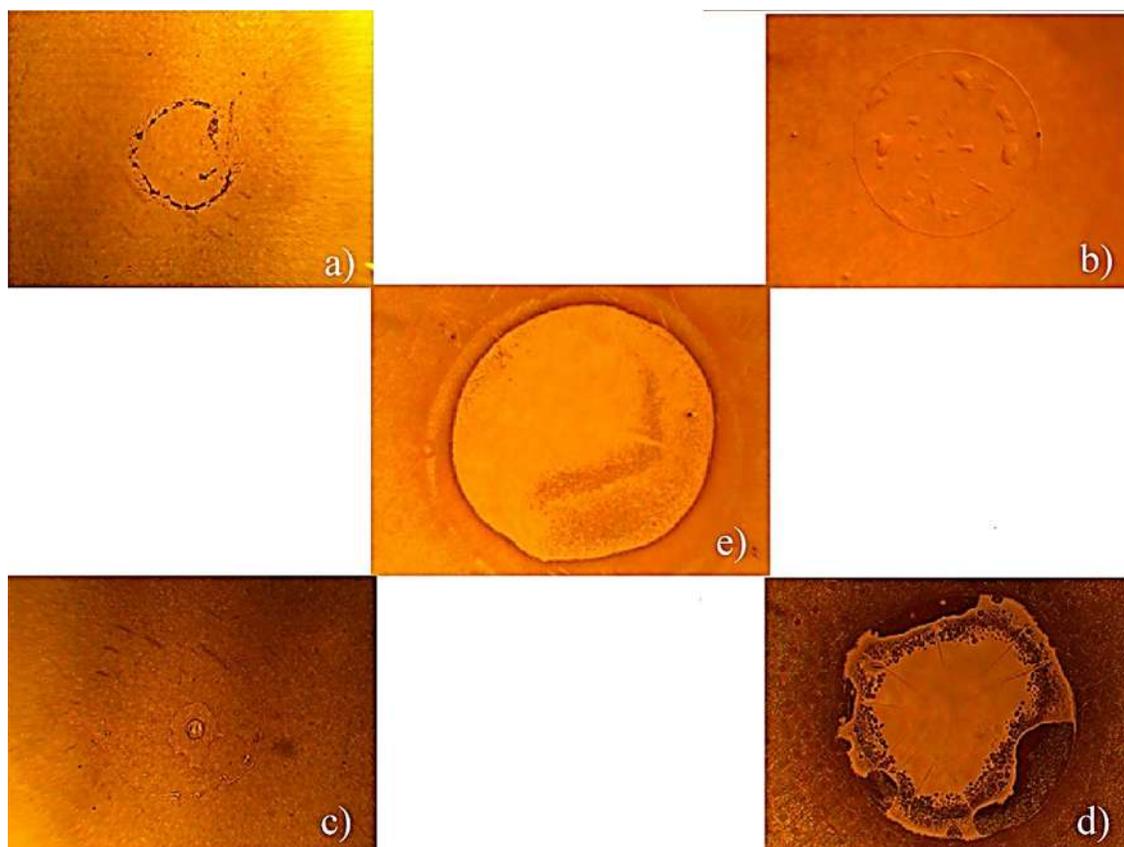


*Figura 3.3 Selenato de sodio en orina artificial a una concentración de 100 mg/l. En la figura se puede observar que la muestra expuesta al aire después de ser sometida a un proceso de secado aparece como un “cristal líquido”.*

hidrólisis realizada había roto los enlaces de un número sustancial de moléculas de urea, la densidad del número de átomos se mantuvo igual que antes.

Se tomaron las imágenes por una cámara CCD montada en un microscopio óptico

Se realizó de la misma manera el procedimiento descrito anteriormente para la



*Figura 3.4 Selenato de sodio en agua tri-destilada a una concentración de 100 mg/l. Las concentraciones aumentan de menor a mayor en las muestras de las figuras. a) 0.01 mg/l, b) 0.1 mg/l, c) 1 mg/l, d) 10 mg/l, e) 100 mg/l.*

preparación de las muestras. Los resultados obtenidos fueron favorables en las concentraciones de 0.01 mg/l, 0.1 mg/l, 1 mg/l, 10 mg/l. La muestra 100 mg/l en orina mantenía propiedades lo cual nos llevó a teorizar una interacción entre el selenio y la urea en el medio acuoso que lleva a una formación de 'cristal líquido'.

Se optó por dejar fuera la muestra de 100 mg/l debido al alto riesgo que corría el detector al ser la altura del analito de más de 100  $\mu\text{m}$ . En la Figura 3.4 podemos observar como conforme la concentración aumenta el diámetro y consistencia de la muestra aumentan de la misma manera. En la muestra b) existe una formación circular del analito aunque carece de grosor, en la muestra e) es evidente la misma formación circular con mayor grosor, esto nos permite ver que la distribución de la muestra es aparentemente uniforme asegurando así que el área sobre la cual incidirá el haz de radiación es homogénea. Es importante recordar que la altura máxima que puede tener el analito de la muestra es de 100  $\mu\text{m}$  por lo que es importante calcular la altura aproximando el volumen de la muestra a un cilindro o media esfera, se debe tomar la pérdida de volumen debido a la evaporación del agua durante la fijación del analito al portamuestra, la pérdida aproximada de este volumen se estima a un 96%.

En la Figura 3.5 podemos observar la forma del analito en cada concentración, en la muestra c) es evidente la formación de cristales, la muestra d) cuenta con una forma irregular lo que puede ser atribuido a la concentración de selenato de sodio (10 mg/l). Las muestras a) y b) cuentan con una aparente forma circular que permite realizar el cálculo de área de una forma más precisa.

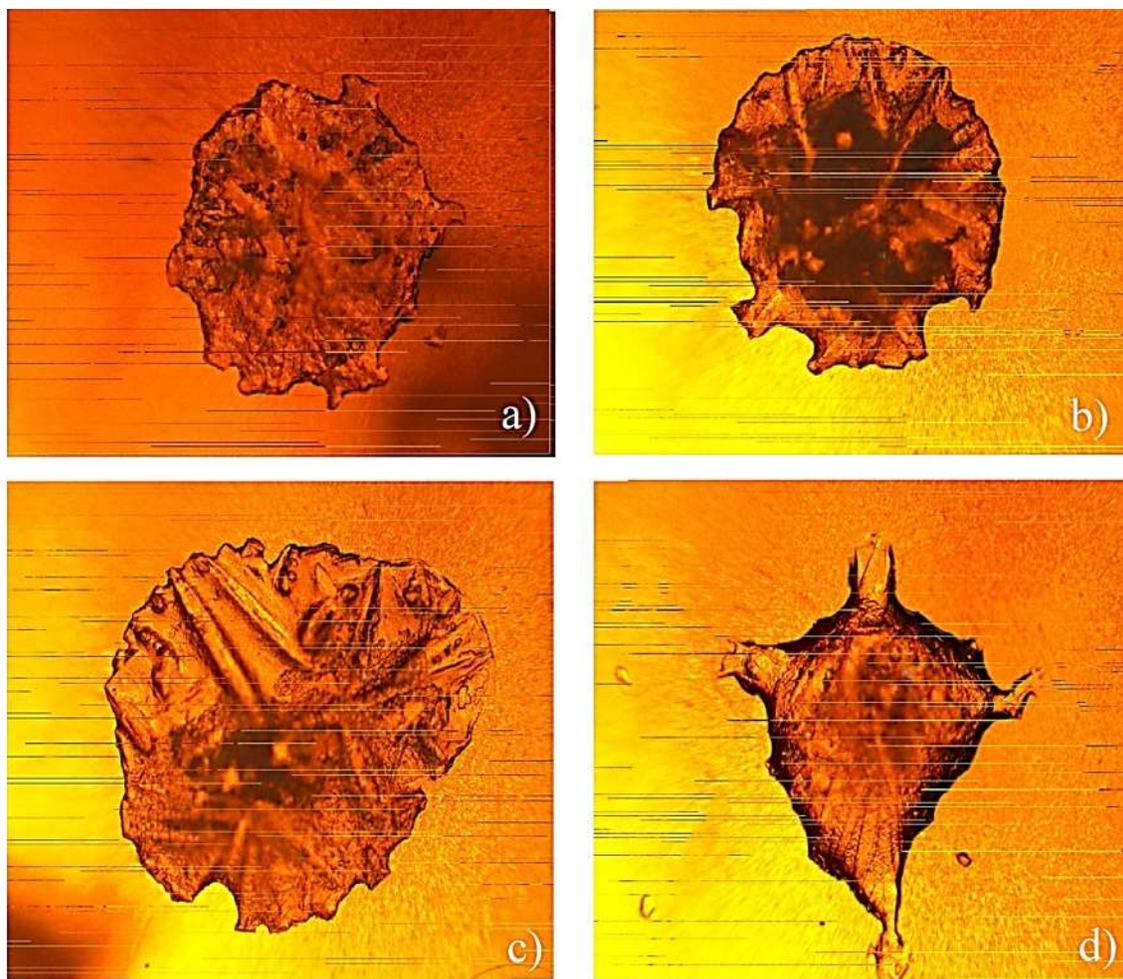


Figura 3.5 Selenato de sodio en orina artificial antes de la irradiación. En las figuras podemos observar los analitos a diferentes concentraciones a) 0.01 mg/l, b) 0.1 mg/l, c) 1 mg/l, d) 10 mg/l.

### 3.4 Operación del Espectrometro S2 Picofox

Antes de ejecutar el análisis, el espectrómetro se calibró para ganancia (disco As), resolución, sensibilidad, y reproducibilidad analítica mediante discos de estándares certificados suministrados por Bruker (GmbH). Se realizaron dos corridos experimentales separados y consecutivos, primero de selenato en agua y segundo de selenato en orina artificial. Con cada corrido, se realizó la calibración de ganancia espectral, así como los “blancos” del análisis. Se analizó también un portamuestras de cuarzo puro, sin Serva o muestra. Todos las portamuestras

eran discos acrílicos, excepto que para la concentración más baja de 0.01 mg / l de Se, también se utilizaron portamuestras de cuarzo. Los blancos fueron medios puros (agua u orina artificial) sin el estándar interno de Ga, y los blancos método fueron los medios enriquecidos con 0.1 mg /l de Ga. Para las concentraciones de 0.01 y 0.1 mg/l se usó un tiempo vivo de 1000s y para el resto, el valor de 500s. Se repitió la medición de la muestra de 0.01 mg/l de Se en el portamuestras de cuarzo con un tiempo de 1500s.

# Capítulo 4

## Resultados y Discusión

### 4.1 Dimensiones del analito

Las dimensiones del analito son un parámetro que se debe de tomar en cuenta para realizar la espectrometría debido a que una altura mayor a 100  $\mu\text{m}$  puede dañar la ventana de berilio del detector y acortar de manera considerable la vida útil del equipo.

$$\pi \left(\frac{d}{2}\right)^2 h = v(0.01)$$

(31) n la

Ecu

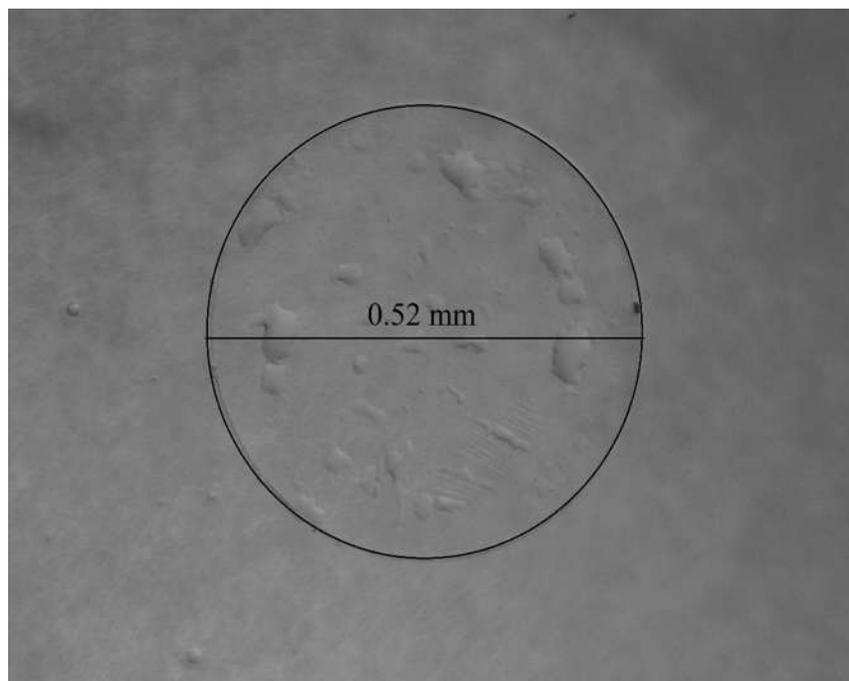


Figura 4.1 Muestra de selenato de sodio en agua tri-distilada con concentración de 0.01 mg/l .

ación 31, h representa la altura, v el volumen del analito antes de realizar el proceso de fijación al disco a 40°C durante 2 horas y d el diámetro del analito después de la fijación. En la figura 4.1 podemos observar la geometría de la muestra b), por su gentil forma será utilizada para ilustrar el procedimiento de medición de las dimensiones del analito.

Entonces para medir la altura del analito en el portamuestras despejamos h en la Ecuación 31 obteniendo:

$$h = \frac{v(0.01)}{\pi \left(\frac{d}{2}\right)^2} \quad (32)$$

Sustituyendo los valores en la Ecuación 32.

$$h = \frac{(1 \text{ mm}^3)(0.01)}{\pi \left(\frac{0.52 \text{ mm}}{2}\right)^2} = 47 \text{ } \mu\text{m} \quad (33)$$

Realizando el mismo procedimiento para todas las muestras obtenemos los siguientes resultados

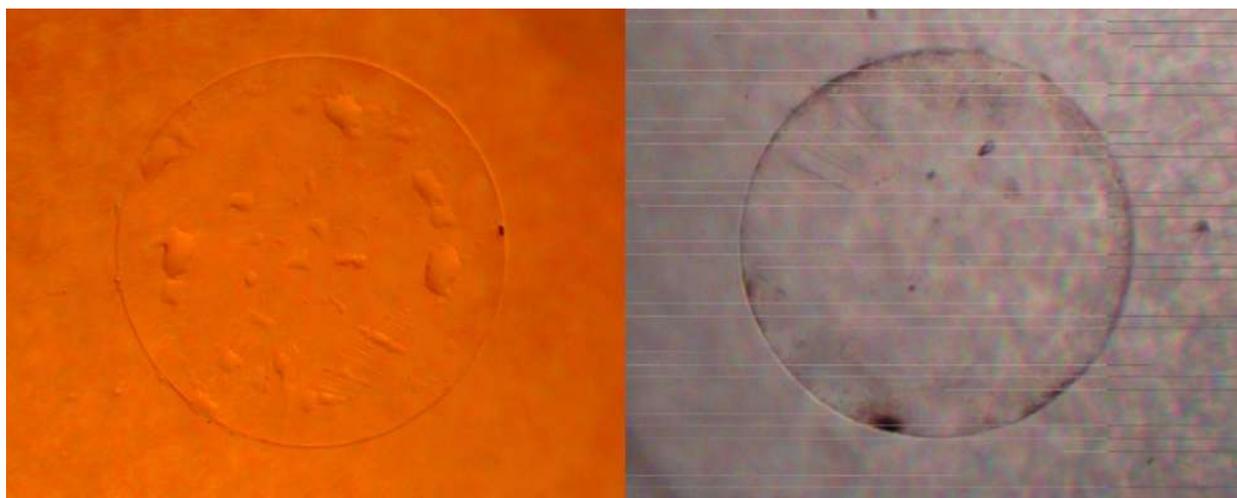
*Tabla 2 Altura del analito de selenato de sodio en agua tri-distilada, en la tabla H<sub>2</sub>O hace referencia a la muestra de selenato de sodio en agua tri-distilada, de la misma manera OA hace referencia a la muestra de selenato de sodio en orina artificial.*

Muestra	Diámetro (mm)		Altura (μm)		Volumen (mm <sup>3</sup> )	
	H <sub>2</sub> O	OA	H <sub>2</sub> O	OA	H <sub>2</sub> O	OA
0.01 mg/l	0.47	0.44	55	65	1	1
0.1 mg/l	0.52	0.48	47	55	1	1
1 mg/l	1.07	0.54	11	43	1	1
10 mg/l	0.66	0.43	29	68	1	1
100 mg/l	0.69	---	26	---	1	--

Como podemos observar en la Tabla 2 todos los analitos cumplen con el requisito de medir menos de 100  $\mu\text{m}$ .

#### ***4.1.1 Efecto del bombardeo de rayos X***

Durante la medición la muestra recibe un bombardeo constante de 1  $\mu\text{A}$  de fotones de energía de 20 keV, para un tiempo que supera un poco el tiempo vivo por el Tiempo Muerto (Dead Time) del detector. Una posible preocupación surge sobre la prolongación del tiempo de medición debido a un posible daño a la muestra inducido por la radiación. Como muestra la figura 7, no hubo evidencia de daño a las muestras. Además, incluso si se dispersó una pequeña cantidad de muestra, el método de Estándar Interna (Internal Standard Method) garantiza una normalización in situ. Esto significa que en la espectrometría TXRF, uno puede repetir o prolongar las mediciones en una muestra dada, lo cual no es posible en otras técnicas, donde la muestra original se destruye. Este hecho se utilizó para mejorar las estadísticas de la muestra de 0.01 mg / l de Se en orina artificial en porta muestra de cuarzo, repitiendo la medición en el Tiempo Vivo aumentado a 1500s.



*Figura 4.2 La muestra de 0.1 mg/l de Se sobre una porta muestra acrílica, antes (lado izquierdo) y después (lado derecho) del bombardeo por rayos X.*

## 4.2 Cifras del instrumento

### 4.2.1 Ecuación de calibración

La ecuación de calibración de energía nos permite ver la proporcionalidad entre los canales del detector y la energía en keV como se puede observar en la Ecuación 34, donde E representa la energía en keV, m representa la energía lineal en keV/canal, C representa el número de canal, b representa la energía absoluta en keV.

$$E = mC + b \quad (34)$$

### 4.2.2 Parámetros del detector

Los parámetros del detector nos hablan de las condiciones en las que está operando durante la medición y la calidad de ejecución de la espectrometría, los parámetros que deben ser observados con atención son la energía absoluta, la energía lineal, el ancho a la mitad de la altura máxima (FWHM por sus siglas en inglés) y el factor Fano.

Tabla 3 Parámetros del detector

	Na <sub>2</sub> SeO <sub>4</sub> + H <sub>2</sub> O	Na <sub>2</sub> SeO <sub>4</sub> + Orina artificial
Energía absoluta	-0.4883 keV	-0.4883 keV
Energía lineal	0.005004 keV/ch	0.005004 keV/ch
FWHM	138.53 eV	138.53 eV
Factor fano	0.11	0.11



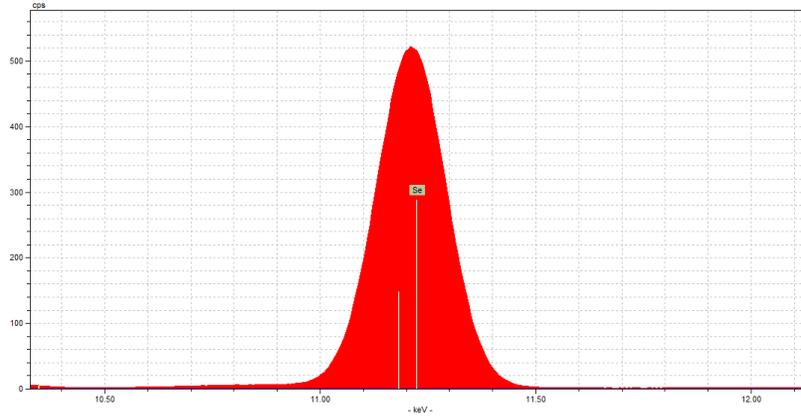


Figura 4.3 Pico de Se Ka a 100 mg/l.

Abajo se observan dos tablas con las concentraciones obtenidas en la medición.

Tabla 4 Concentraciones de selenato de sodio en agua tri-destilada.

	Selenato de sodio en agua tri-destilada	Selenato de sodio en orina artificial
Concentración nominal	Concentración experimental	
0.01 mg/l	0.038 ± 0.001 mg/l	0.007 ± 0.006 mg/l
0.1 mg/l	0.063 ± 0.001 mg/l	0.117 ± 0.011 mg/l
1 mg/l	0.881 ± 0.004 mg/l	1.57 0± 0.027 mg/l
10 mg/l	8.960 ± 0.013 mg/l	10.490 ± 0.072 mg/l
100 mg/l	96.876 ± 0.144 mg/l	-----

El software que se utilizó para el análisis es Spectra, este software selecciona la región de interés alrededor del pico del elemento a analizar y traza una línea de fondo de radiación, a concentraciones pequeñas este ajuste puede provocar pequeñas variaciones en los resultados, por esta razón para las concentraciones de 0.01 mg/l de agua y orina artificial se realizará el ajuste de la región de interés.

La concentración es proporcional al conteo neto registrado por el detector, todos los datos de conteo deben ser previamente normalizados por el número de segundos que la muestra fue expuesta a la radiación, de esta manera con los demás parámetros constantes se respeta la siguiente proporción.

$$\frac{N_A^S}{N_A^M} = \frac{C_A^S}{C_A^M} \quad (35)$$

Dónde  $N_A^S$  representa el conteo neto del analito estimado por el software,  $N_A^M$  es el conteo neto estimado manualmente,  $C_A^S$  representa la concentración estimada por el software,  $C_A^M$  representa la concentración estimada manualmente. Despejando la concentración manual de la Ecuación 35 obtenemos:

$$C_A^M = \left( \frac{N_A^M}{N_A^S} \right) (C_A^S) \quad (36)$$

Entonces las nuevas concentraciones serán

Tabla 4 Cálculo de concentraciones manual

$C_A^M = \left( \frac{N_A^M}{N_A^S} \right) (C_A^S)$				
	$N_A^M$	$N_A^S$	$C_A^S$	$C_A^M$
$\text{Na}_2\text{SeO}_4 + \text{H}_2\text{O}$	74484	77940	0.041 mg/l	0.039 mg/l
$\text{Na}_2\text{SeO}_4 + \text{Orina}$	7559	32077	0.084 mg/l	0.019 mg/l

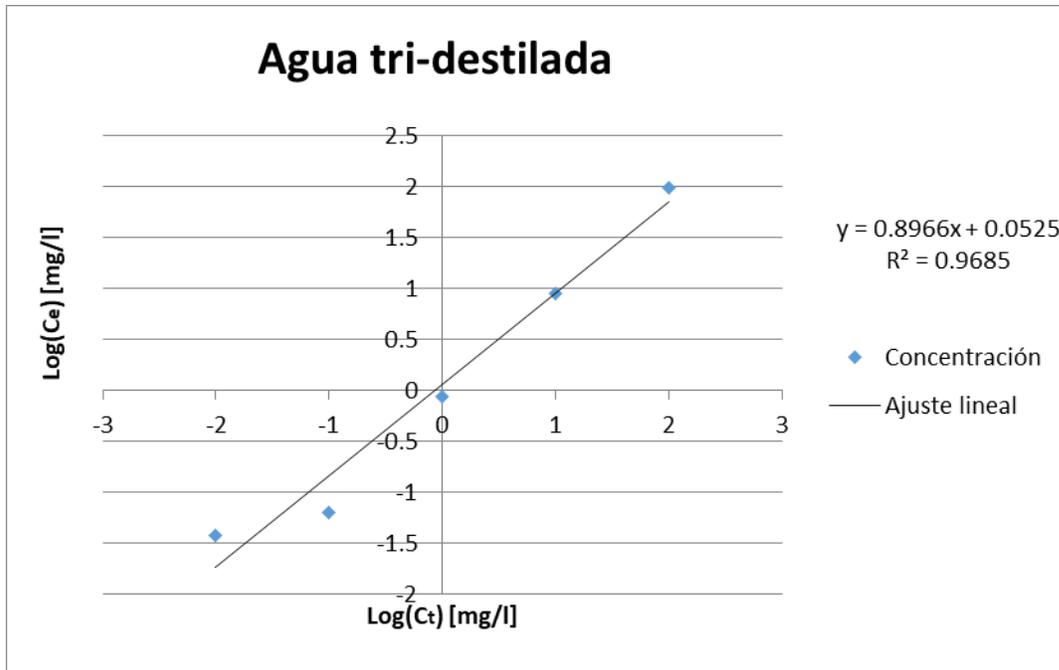


Figura 4.5 Concentraciones de Se en agua tri-destilada como medio.

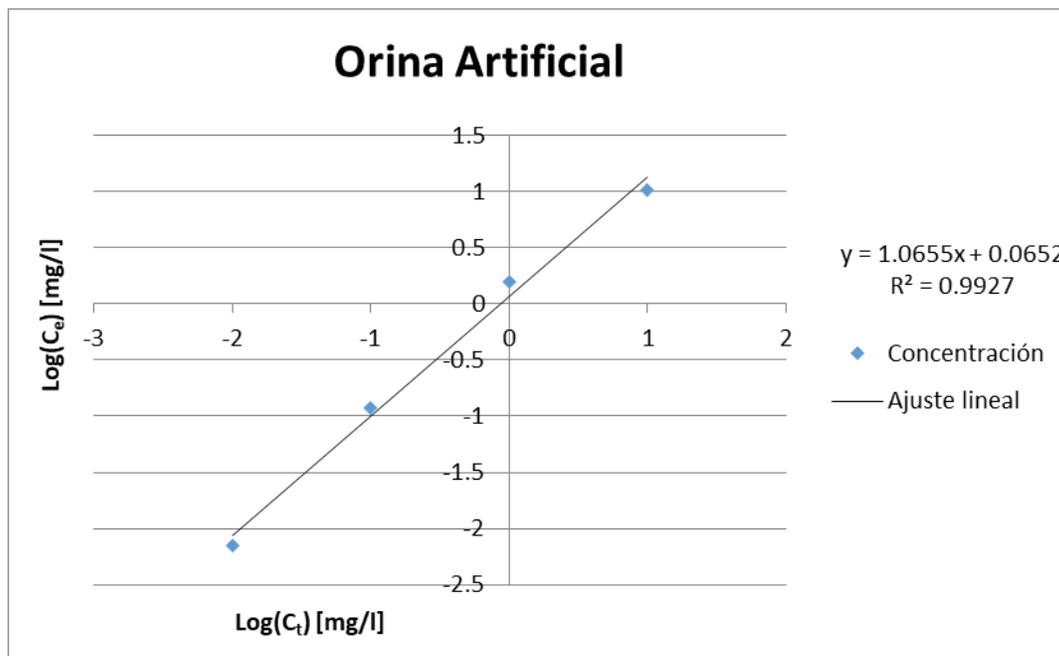


Figura 4.6 Concentraciones de Se en orina artificial como medio.

Los resultados de concentración están expresados graficamente en términos de logaritmo para los casos experimental y teórico de Se en agua tri-distilada u orina artificial como medio esto se muestra en la Figura 4.5 y 4.6. Los siguientes hechos son deducidos del análisis de las gráficas:

1. Los coeficientes de correlación  $R^2$  son muy cercanos a 1, demostrando la excelente linealidad. El valor del intercepto es casi 0 indicando que la gráfica pasa a través de 0 como debería. Esto nos indica que el análisis mantiene una respuesta lineal a través de un rango dinámico que cubre 5 órdenes de magnitud.
2. La ecuación entre la concentración teórica ( $C_t$ ) y la concentración experimental ( $C_e$ ) es:

$$\log(C_e) = m \log(C_t) + c = m \log(C_t) + \log(C')$$

Donde  $m$  y  $c$  son la pendiente y el intercepto respectivamente del ajuste lineal. Para las muestras de agua y orina artificial ( $m, c$ ) resultaron los valores (0.90, 0.052) y (1.07, 0.065), que produce los valores de  $C'$  como 1.12 y 1.16. Entonces.

$$\frac{C_e}{(C_t)^m} = C' \Rightarrow \frac{C_e}{C_t} \approx C' \text{ debido a que } m \approx 1$$

Dado esto  $C'$  es muy cercana a 1 en ambos casos y esa proporción es definida como el porcentaje de recuperación. El resultado antes mencionado implica que el promedio del % recuperación es muy cercano a 100 para el rango dinámico de 5 órdenes de magnitud.

## 4.4 Cifras de mérito estadístico

Las cifras de mérito nos hablan de la confiabilidad de las mediciones realizadas, estas cifras de mérito son índice de exactitud, precisión, límite de detección mínima.

Porcentaje de recuperación, se define de la siguiente manera:

$$\%Recuperación = \left(\frac{VCE}{VCT}\right)(100) \quad (37)$$

En la Ecuación 37, VCE se refiere a el valor de concentración experimental, en otras palabras, el valor medido por el espectrómetro. VCN es el valor de concentración nominal, el valor que según los cálculos realizados debe estar en el analito.

La precisión es definida de la siguiente manera

$$P = 100 - RSD \% \quad (38)$$

En la Ecuación 38, P representa la precisión, RSD% es la desviación estándar relativa en porcentaje, la desviación estándar relativa está definida como la desviación estándar entre la media aritmética.

Tabla 5 Cifras de mérito del selenato de sodio en agua

Selenato de sodio en agua tri-destilada				
	Valor experimental	% Recuperación	% Precisión	LLD
0.01 mg/l	0.039 ± 0.001	390 ± 10	98.50	0.001
0.1 mg/l	0.063 ± 0.001	63 ± 1	99.00	0.001
1 mg/l	0.881 ± 0.004	88.1 ± 0.4	99.60	0.02
10 mg/l	8.960 ± 0.013	89.6 ± 0.13	99.90	0.02
100 mg/l	96.876 ± 0.144	96.876 ± 0.144	99.99	0.012

Tabla 6 Cifras de mérito del selenato de sodio en orina

Selenato de sodio en orina artificial				
	Valor experimental	% Recuperación	% Precisión	LLD
0.01 mg/l	0.007 ± 0.006	70 ± 0.6	98.30	0.001
0.1 mg/l	0.117 ± 0.011	117 ± 11	97.10	0.001
1 mg/l	1.57 0± 0.027	157 ± 2.7	98.70	0.02
10 mg/l	10.490 ± 0.072	104.90 ± 0.72	99.60	0.02

## 4.5 Efectos de matriz en el espectro de TXRF

A pesar de que el pico de fluorescencia surge exclusivamente del átomo en cuestión, para este estudio el Se, los efectos de matriz pueden afectar el fondo debajo del pico así como la forma del pico. Ambos efectos pueden afectar el área de pico, que a su vez afecta la concentración derivada del área neta del pico. También la posición del pico se ve afectada aunque en un grado extremadamente pequeño, por el tipo de enlace del átomo del analito además de los campos eléctricos y magnéticos que lo rodean de los átomos en su vecindad inmediata, este efecto es llamado desplazamiento de pico y normalmente es investigado por fuentes de rayos X de alta intensidad como la de un sincrotrón. Por otro lado, el análisis de la forma del pico, la proporción pico-fondo (peak to background (P/B)) y el desplazamiento de pico pueden revelarnos valiosa información de la identidad de la matriz, el tipo de enlace y la interacción interatómica por los átomos del analito.

La matriz está formada por otros elementos así como por el analito. Cada uno de estos elementos van a interactuar con la radiación primaria y de fluorescencia a través de procesos como la dispersión elástica (Rayleigh), inelástica (Compton) y absorción fotoeléctrica, por absorción sin radiación. Las interacciones con átomos de bajo Z son casi completamente gobernadas por el proceso de dispersión, particularmente dispersión de Compton, mientras que la

absorción fotoeléctrica es el efecto dominante en elementos de alto Z. El coeficiente de absorción másica incrementa con el número atómico. Los elementos pesados rinden una mayor fluorescencia de rayos X. Entonces así esperamos una diferencia en las contribuciones por la matriz en el caso del Se analizado en 2 diferentes matrices (agua tri-destilada y orina artificial) que se usaron en este trabajo. El haz de rayos X primario también penetra en la ca de Serva con un muy pequeño alcance y mucho menor alcance en el caso del portamuestras. Por lo tanto, estos objetos contribuirán al flujo total de fotones en el detector y en el fondo debajo del pico. Además, es esperado que la interacción del Se con los diferentes iones en la orina artificial, mostrarán diferencias entre los parámetros de la forma del pico y un posible desplazamiento del pico cuando se hace una comparación entre el pico de 2 espectros a una concentración fija de Se (10 mg/l).

#### ***4.5.1 Flujo total de fotones en el detector.***

Para cada espectro el flujo total de fotones en el detector fue obtenido como se muestra en la Figura 12. Los símbolos A a J son respectivamente, A: Blanco (cuarzo); B: Blanco (agua); C: Blanco (orina artificial); D: Blanco método (agua); E: Blanco método (orina artificial, cuarzo); F: Blanco método (orina artificial); G: Se 0.01 mg/l; H: Se 0.01 mg/l (agua, cuarzo); I: Se 0.01 mg/l (orina artificial); J: Se 0.01 mg/l (orina artificial, cuarzo)

Todos los discos que no son etiquetados como cuarzo son de acrílico. Todos los discos contienen una capa de Serva excepto el disco A que fue cuarzo puro.

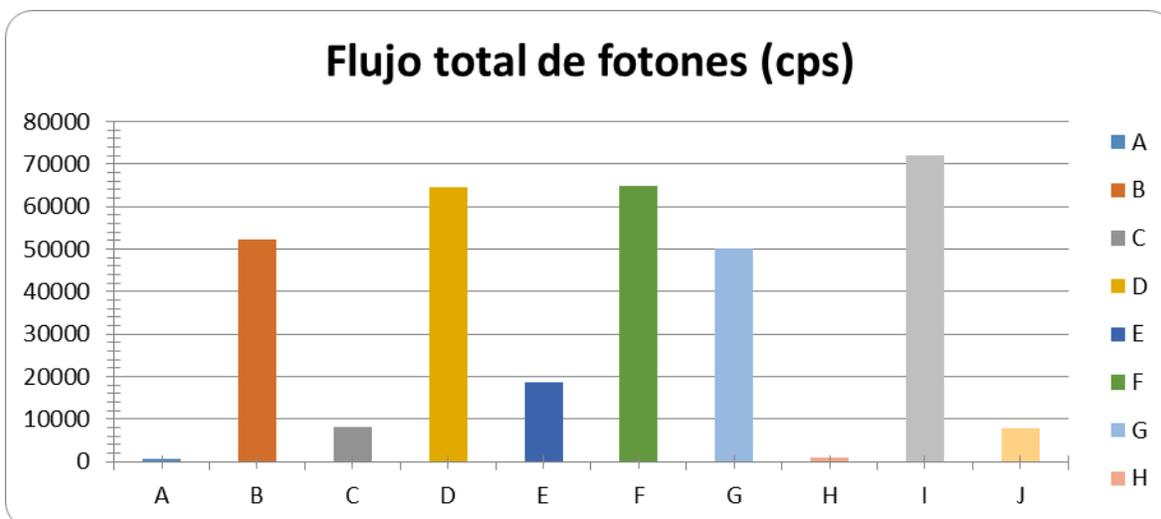


Figura 4.7 Flujo total de fotones registrado por el detector. El flujo total de fotones varía de acuerdo a la naturaleza del portamuestras (acrílico o cuarzo), el medio (agua u orina artificial) con o sin el estándar interno (Ga) y con una cantidad del analito (Se) a nivel ultra traza.

De inmediato podemos observar que el disco de acrílico genera un mayor flujo de fotones que el de cuarzo (discos A y B). Esto es debido a la gran flujo de la dispersión Compton de rayos X primarios así como rayos X fluorescentes de los elementos ligeros (comúnmente C, O y H) del disco y el Serva, mientras los discos de cuarzo están compuestos en su mayoría por silicio producen menos flujo disperso. La introducción de elementos pesados como por ejemplo los iones de la orina artificial, incrementan la absorción llevando a un bajo flujo de fotones (B vs C). La introducción de solo Ga a niveles de ultra traza lleva a un incremento en el flujo de fotones debido a los rayos X fluorescentes del Ga y aumenta la sensibilidad del espectrometro en este rango de energía (B vs D) mientras añadiendo cantidades ultra traza de elementos pesados en este experimento, Se, lleva a la reducción de la intensidad total de fotones debido al gran coeficiente de absorción másica del Se (D vs G).

Es claro que el espectro de TXRF es sensible a la composición cuantitativa y cualitativa de la muestra y el sustrato. Esto significa que el sustrato tienen que ser elegidos cuidadosamente

y que las muestra deben ser preparadas cuidadosamente para evitar la contaminación y mantener la uniformidad de esta.

Proporción pico-fondo (P/B)

La proporción P/B fue calculada como el conteo total del pico de Se  $K_{\alpha}$  a su conteo de ruido de fondo. Los resultados se muestran en la Figura 4.9.

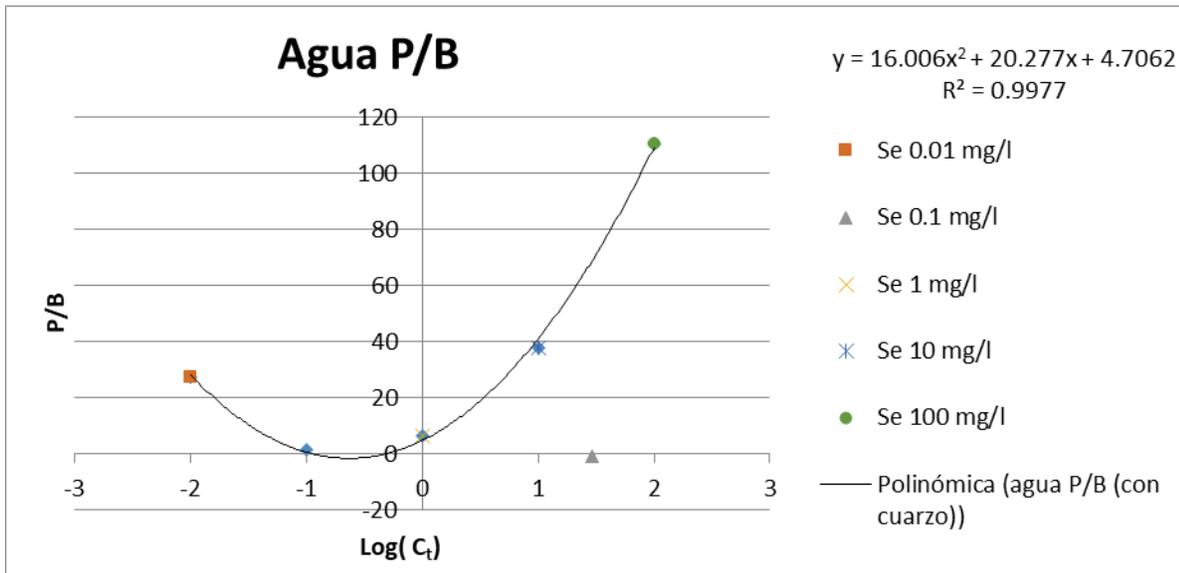


Figura 4.8 Gráfica P/B. La variación de P/B con el logaritmo de la concentración teórica de Se en agua tri-distilada.

En la Figura 4.8 y 4.9 podemos observar la variación de P/B con el logaritmo de la concentración teórica en agua tri-distilada y orina artificial.

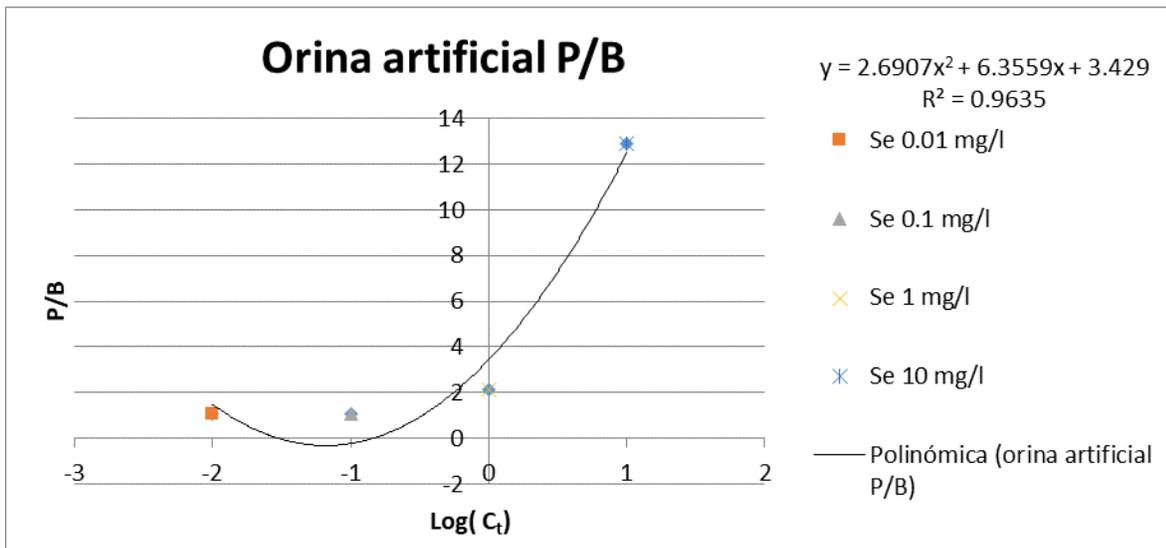


Figura 4.9 Gráfica P/B. La variación de P/B con el logaritmo de la concentración teórica de Se en orina artificial.

Los datos ajustan con una tendencia parabólica por el valor de  $R^2$ , con las muestras de agua se muestra un mejor ajuste. Uno hubiera esperado una disminución monotónicamente lineal con una reducción de la concentración de Se, debido a una reducción de la intensidad de la fluorescencia de rayos X de Se  $K\alpha$  de energía 11.22 keV.

El paso a través de un mínimo por una función monotónica implica que hay dos efectos opuestos que contribuyen a la función. En el presente caso, El aumento de la concentración de Se aumenta el flujo de rayos X de 11.22 keV, pero al mismo tiempo aumenta la autoabsorción de estos fotones. El fondo debajo de el pico de 11.22 keV resulta solo de la dispersión Compton de los rayos X primarios por todos los elementos en la matriz pero es dominado por los elementos ligeros en la matriz. Ya que su concentración es constante, el fondo será algo cercano a constante, haciendo que la relación P / B dependa esencialmente de factores que afectan a P. La absorción de los fotones de 11.22 keV por los elementos ligeros será menor que la autoabsorción por el Se

pero se volverá importante solo a bajas concentraciones de Se. A medida que la concentración disminuye los efectos de fluorescencia y autoabsorción decrementaran de forma no lineal, con la absorción disminuyendo mas que la fluorescencia. El resultado es que al niveles ultra traza la proporción P/B incrementa, resultando en una variación parabólica como se muestra en la Figura 4.8.

La parabolicidad es algo irregular a concentraciones de Se más bajas para el medio de orina artificial porque a estas concentraciones la contribución a la absorción de fotones de 11.22 keV por los elementos más ligeros de orina artificial comienza a competir con la autoabsorción de Se, mientras que a las concentraciones de Se más altas, esta última domina. La composición elemental de la orina artificial utilizada imita la composición de la orina real, de hecho de fluidos fisiológicos y tejidos en general, porque en estos materiales también el Se es el elemento de importancia fisiológica más importante presente. El sorprendente resultado de una proporción P / B más alta y, por lo tanto, una mayor sensibilidad para Se en la región de ultra traza abre la posibilidad de que el TXRF analice Se de fluidos citológicos o incluso de grupos de células porque la masa más baja de Se analizada en este trabajo fue 100 pg.

#### **4.6 FWHM, FWTM, parámetro S y parámetro W**

El pico de rayos X fluorescentes sigue una distribución gaussiana. En el presente trabajo, el espectro se le hizo una deconvolución utilizando estadísticas bayesianas optimizadas incluidas en el software de análisis de espectro, que se ajusta a los picos gaussianos. De este modo, se pueden obtener los factores FWHM y FWTM descritos matemáticamente en la sección teórica de esta tesis. Ambos parámetros se relacionan con la forma del pico, cuyo análisis se denomina forma del pico.

El análisis de la forma del pico generalmente se refiere a la cuantificación de la ampliación de la línea espectral. La línea espectral tiene un ancho intrínseco determinado por el principio de incertidumbre de Heisenberg debido a la vida finita del estado excitado involucrado en la transición. Sin embargo, la línea se amplía por la temperatura y el efecto Döppler, así como por campos eléctricos, magnéticos externos, por enlaces químicos y la proximidad química inmediata del átomo. Los primeros dos efectos son prominentes a altas temperaturas y para gases, condiciones que no se aplican al presente experimento.

La temperatura dentro del espectrómetro fue de  $\sim 20^\circ \text{C}$  y las muestras están en estado sólido. Tampoco se utilizaron campos externos. Por lo tanto, la ampliación de línea en este trabajo es únicamente un efecto químico. Además, el enlace molecular del átomo de Se mantuvo constante utilizando solo 1 tipo de compuesto de Se:  $\text{Na}_2\text{SeO}_4$ . Por lo tanto, si se observan efectos químicos relativos, se deberían exclusivamente a la naturaleza variable de la vecindad química inmediata del átomo de Se en las 2 matrices utilizadas.

La proximidad química de un átomo se ve alterada por la ionicidad de los átomos circundantes. La atracción electrostática causa la polarización de las funciones de onda orbitales atómicos, principalmente de los orbitales de valencia, pero también afectan en menor medida a los orbitales centrales, que están involucrados en las transiciones K de la fluorescencia de rayos X. Esto afecta la vida útil de los estados involucrados, lo que lleva a un cambio en el ancho de la línea espectral. La forma más común de caracterizar el ancho de la línea espectral de rayos X es mediante la determinación de FWHM, FWTM y la asimetría del pico.

Sin embargo, la mayor cantidad de trabajo en el análisis de forma de pico y la de naturaleza más cuantitativa se ha realizado en la línea de aniquilación de positrones 511 keV en

la técnica de espectrometría de aniquilación de positrones de ampliación Döppler (DBPAS). Dado que el espectro gamma y el análisis del espectro de rayos X son casi idénticos, este trabajo utiliza los mismos parámetros utilizados en DBPAS para caracterizar la forma de la línea espectral, es decir, los parámetros S y W que se describen en detalle a continuación.

Los parámetros S y W corresponden a la aniquilación de positrones por los electrones de valencia y los electrones centrales de los átomos que el positrón encuentra en el material. En este momento es difícil definir el significado físico de los parámetros S y W en relación con la fluorescencia de rayos X, pero un estudio comparativo y una correlación con varias propiedades de electrones atómicos aclararía su significado físico. Esta es la primera vez que los parámetros S y W se han ampliado a la espectrometría XRF.

Para poder analizar los diversos efectos del ruido de fondo, las complejas matrices dentro de la solución o el efecto de los enlaces del selenio dentro de su molécula debemos analizar el ancho completo a la mitad del máximo, el ancho completo a la décima parte del máximo, el parámetro S y el parámetro W.

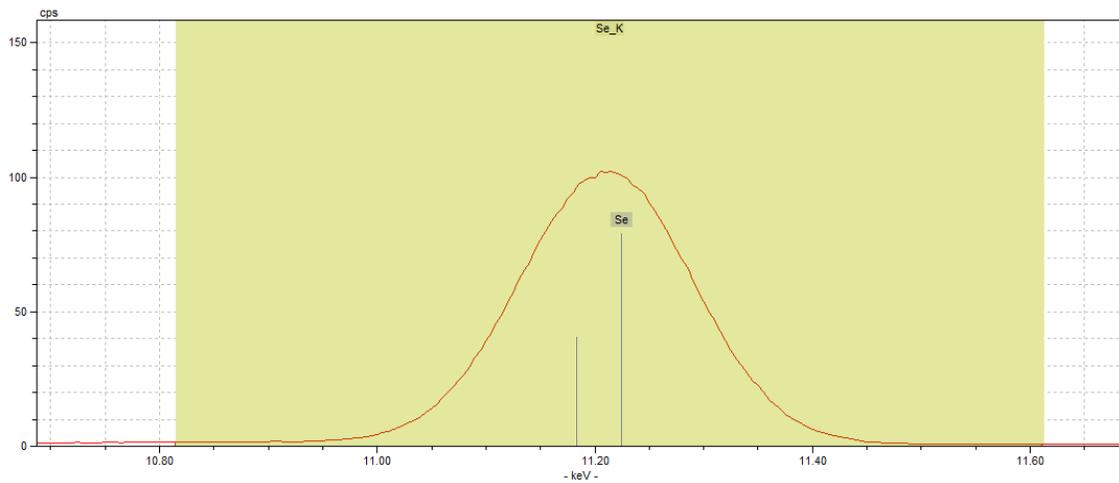
Con fin de ilustrar los parámetros antes mencionados utilizaremos las muestras de 10 mg/l de selenio en orina artificial y agua tri-destilada.

Comenzaremos definiendo la región de interés tomando en cuenta el ruido de fondo mínimo observable en la región de interés del selenio (oscilando 11.22 keV).

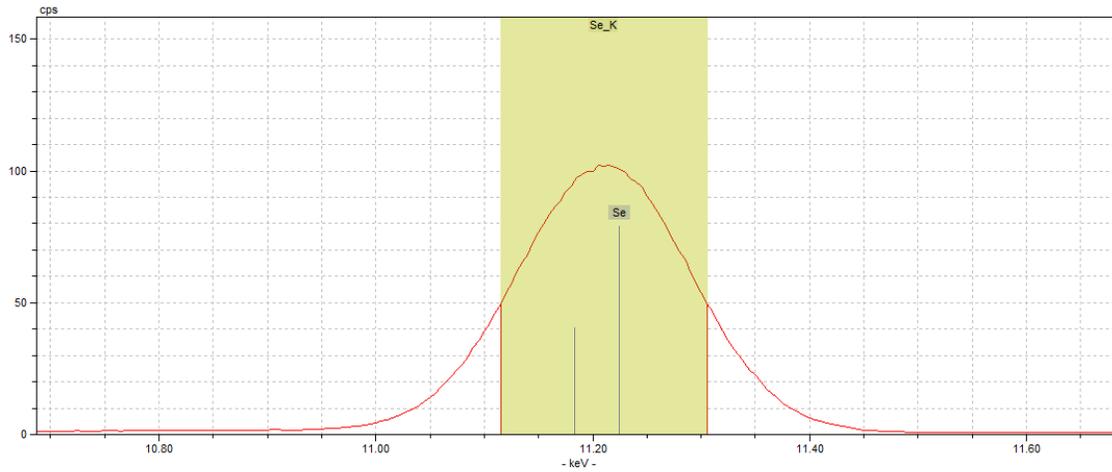
En la Figura 4.10 se puede observar la región de interés del pico de selenio en agua tri destilada a 10 mg/l, el conteo total de esta región de interés nos servirá para encontrar el parámetro W y el parámetro S.

El ancho completo a la altura máxima del pico es obtenido mediante el software de espectrometría, la región que comprende el ancho completo a la altura máxima se muestra en la Figura 4.11.

El ancho completo a la décima parte comprende una región mayor que la del FWHM, como se puede observar en la Figura 4.12.



*Figura 4.10 Región de interés del pico de selenio en agua tri-distilada.*



*Figura 4.11 FWHM del pico de selenio en agua tri-distilada a 10 mg/l.*

Los parámetros W y S son parámetros utilizados únicamente en la espectrometría por aniquilación de positrones, en este trabajo la aplicaremos para la espectrometría de fluorescencia de rayos x por reflexión total con el fin de analizar los efectos de matriz en la muestra desarrollada.

Entonces los parámetros de estas dos muestras nos pueden dar más datos de la interacción entre la radiación y el material

En la siguiente tabla se muestran los datos calculados para agua tri-distilada y orina artificial

Tabla 8 FWHM, FWTM, parámetros S y W.

Concentración de selenio	Medio	FWHM	FWTM	Parámetro S	Parámetro W
10 mg/l	Agua	0.187	0.3407	0.7599	0.0507
10 mg/l	Orina artificial	0.190	0.3459	0.7428	0.0807

El parámetro S es el área comprendida entre el límite definido y el FWHM, para el

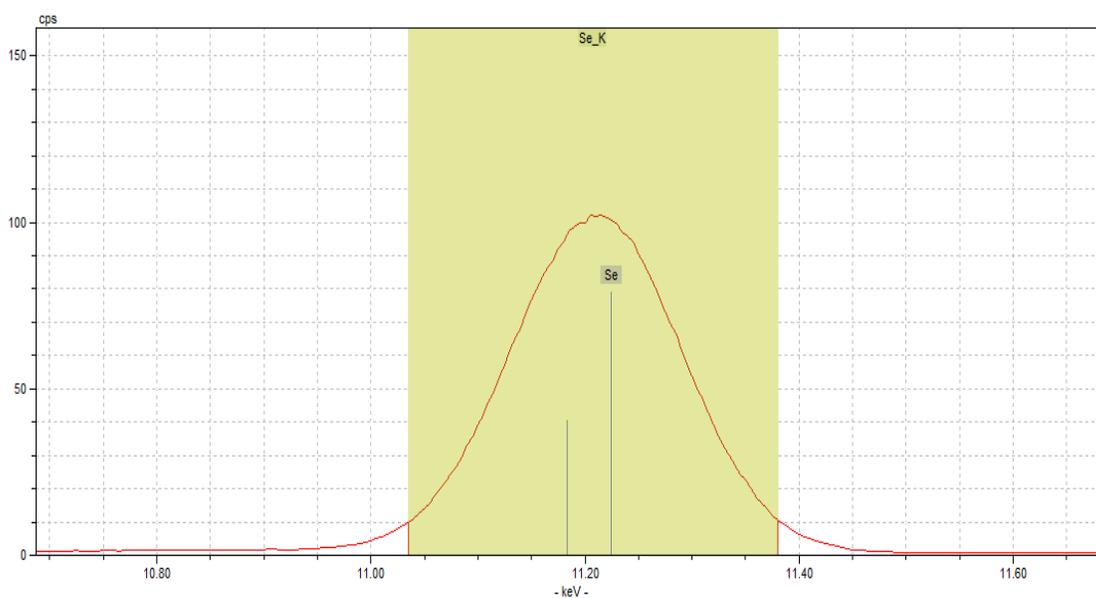


Figura 4.12 FWTM del pico de selenio en agua tri-distilada a 10 mg/l.

parámetro  $W$  se utiliza el límite definido y el FWTM. En la Figura 4.13 y 4.14 se pueden observar dichas áreas.



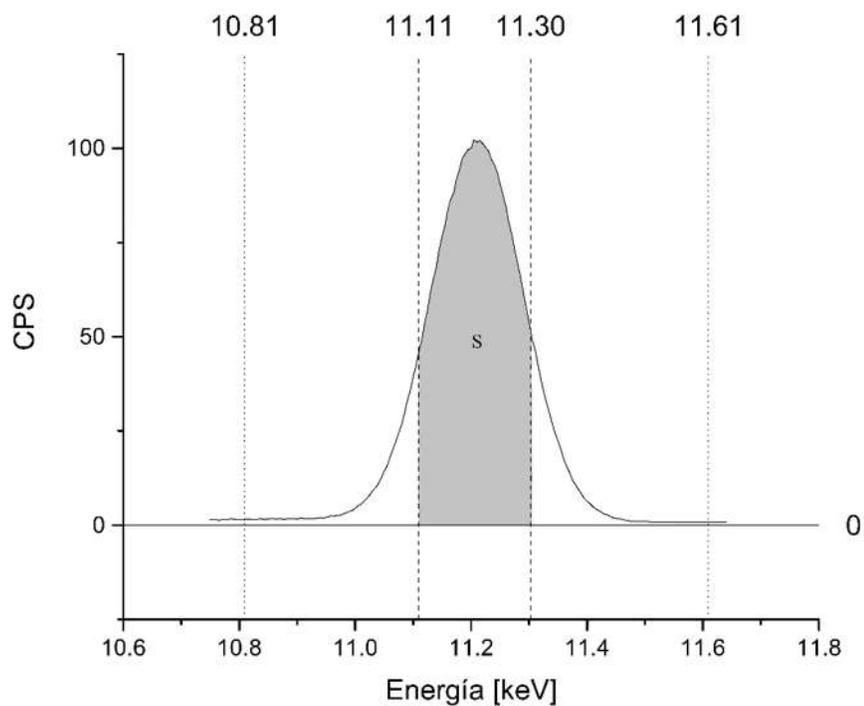


Figura 4.13 Parámetro S en la región del pico de selenio en agua tri-distilada.

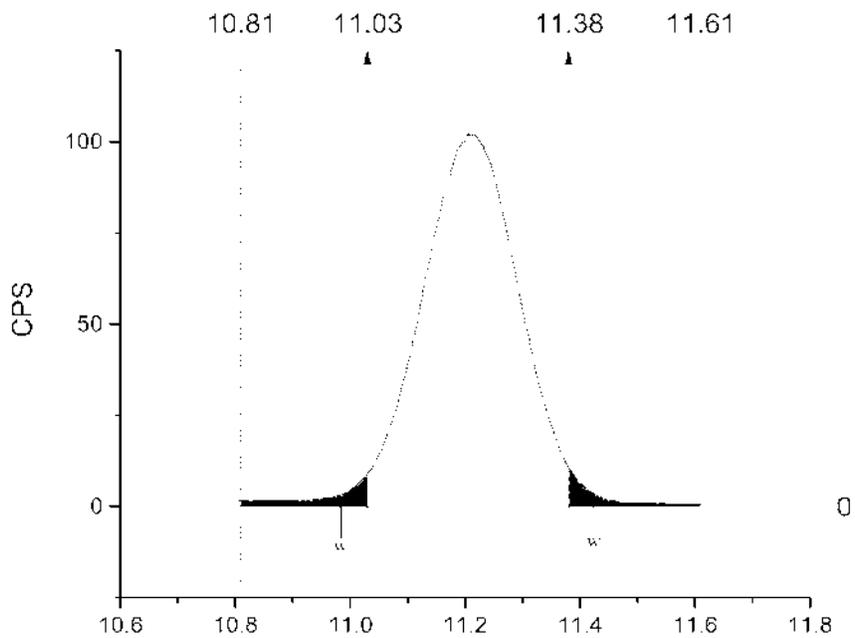


Figura 4.14 Parámetro W en la región del pico de selenio en agua tri-distilada.

## 4.7 Desplazamiento del pico por entorno químico

Es bien conocido que el entorno químico de un elemento afecta o modifica varias características del espectro de emisión de rayos x, algunos reportes indican que estos efectos químicos están relacionados con la emisión de rayos x tras el proceso de captura electrónica o parcialmente después de la fotoionización (Porikli & Kurucu, 2012).

Por la polarización del orbital molecular de la especie molecular donde se encuentra el átomo fluorescente. La polarización por campo magnético o campo eléctrico afecta la función de onda del orbital molecular que a su vez afecta las funciones de onda de los electrones internos del átomo del analito. Este efecto es muy pequeño porque es un efecto secundario. Este efecto puede ser más evidente en las fluorescencias realizadas con fuentes de excitación con mayor luminosidad por ejemplo la de sincrotrón. Este efecto se ha buscado en equipos de laboratorio durante un tiempo. Estas investigaciones con equipos de laboratorio se han realizado con las técnicas de fluorescencia de rayos x por longitud de onda dispersiva (por sus siglas en inglés WDXRF) y fluorescencia de rayos x de energía dispersa (por sus siglas en inglés EDXRF), se ha investigado el efecto del tipo de enlace de la misma molécula (Kaur & Mittal, 2014). No existe demasiada evidencia sobre la investigación del efecto de la vecindad química de la molécula usando desplazamiento de pico y ensanchamiento del pico.

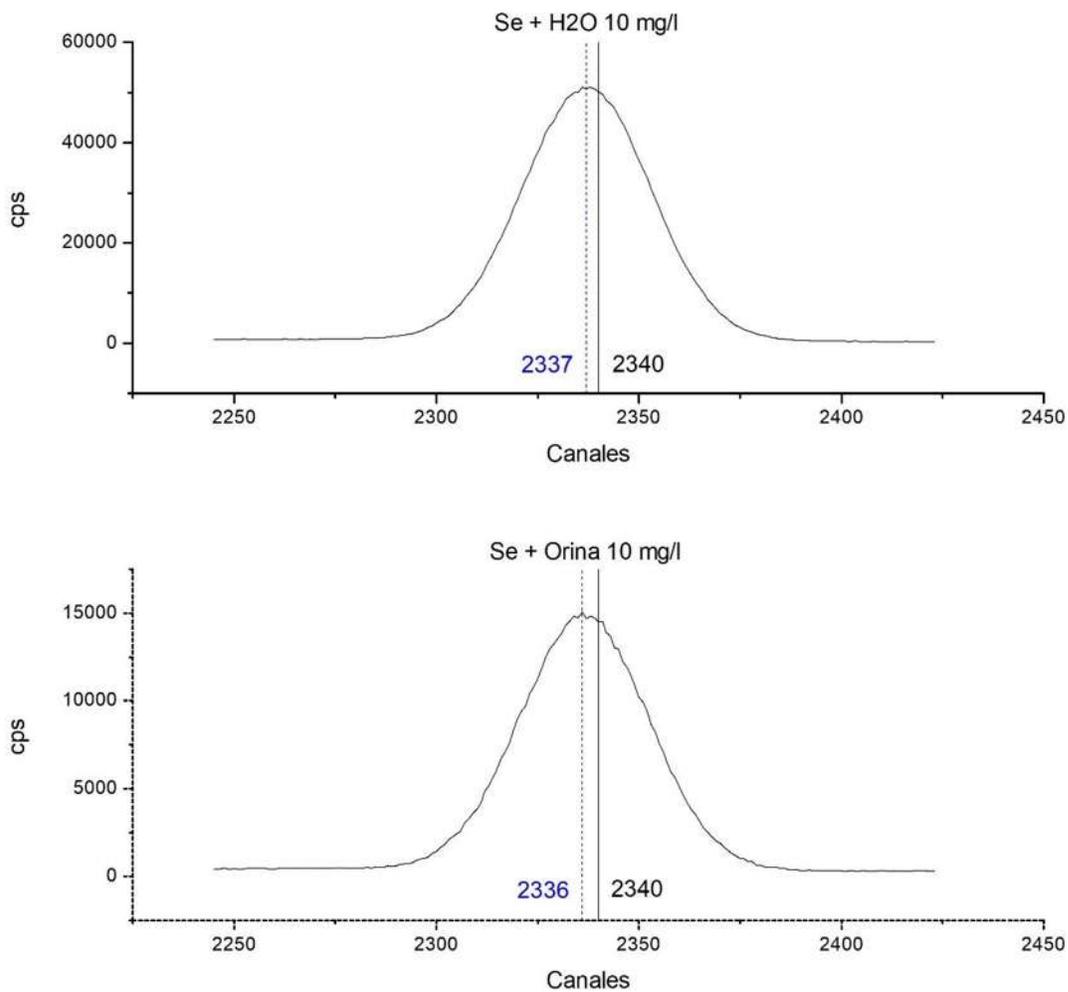


Figura 4.15 Movimiento del pico de Selenio, arriba se puede observar como el pico de selenio se desplaza hacia la izquierda.

En la Figura 4.15 podemos observar el valor teórico junto al valor experimental del pico de selenio en agua tri-distilada y en orina artificial como medios. El valor teórico del pico de selenio es 2340 canales lo que equivale a 11.22506 keV, los valores obtenidos para el pico de selenio en los dos medios son:

Tabla 9 Valores teóricos y experimentales del pico de selenio a 10 mg/l

	Canales	Energía (keV)
Agua	2337	11.210048
Orina	2336	11.205044
Valor teórico	2340	11.22506

En la Tabla 9 podemos observar el corrimiento del pico de selenio por el entorno químico, en un medio sin matrices de alta complejidad como el agua el valor es aproximado al teórico, en cambio en un medio con mayor complejidad como la orina el valor del pico de selenio se aleja del teórico. Este corrimiento puede ser explicado por los factores explicados anteriormente.

Las mediciones de los parámetros S y W del desplazamiento de pico en las soluciones de Se de concentración 10 mg/l en los dos medios de agua y orina artificial claramente muestra la influencia de los iones de la matriz de orina artificial alrededor del Se, cambian el valor de pico y posición en comparación con los valores de esos parámetros para la matriz de agua tri-distilada. La espectrometría TXRF es capaz de distinguir los efectos de la matriz usando una fuente de rayos X de baja luminosidad, el tubo de rayos X. Esto podría abrir un campo de investigación en el área de la espectrometría que antes solo era único para fuentes de luz de alta luminosidad como la radiación de sincrotrón.

# Capítulo 5

## Conclusión

Este trabajo es una validación integral de la técnica de espectrometría TXRF para el análisis de Se en solución acuosa con orina simulada. No existe ningún trabajo previo de esta naturaleza. Bruker (GmbH) ha realizado el análisis de Se y otros elementos traza en orina pero no de manera tan extensa como en el trabajo aquí presentado. Las cifras de mérito (% recuperación y % precisión), la demostración de linealidad sobre el rango de concentración estudiado y los efectos de matriz que fueron determinados.

Los aspectos remarcables son:

1. Excelentes cifras de mérito.
2. Linealidad en un rango de 5 órdenes de magnitud de concentración de Se y cercano a un % recuperación promedio del 100% sobre este rango.
3. La proporción P/B con la concentración es parabólica por naturaleza, la sensibilidad muestra una ligera mejora, independientemente de la complejidad de la matriz, a niveles ultratrazas de Se.
4. La cuantificación del efecto de la matriz por los parámetros S, W y el cambio químico muestra que la espectrometría TXRF en laboratorio es sensible al entorno químico del átomo de analito y podría usarse para investigar interesante aspecto.

5. La espectrometría TXRF tiene el potencial de convertirse en una herramienta analítica importante para el ensayo biomédico. Específicamente, podría usarse para monitorear el estado de Se en poblaciones objetivo para estudiar la conexión de Se con diabetes mellitus 2 y toxicología de Se.

## Bibliografía

1. Pashkova, G. V., & Revenko, A. G. (2015). A review of application of total reflection X-Ray fluorescence spectrometry to water analysis. *Applied Spectroscopy Reviews*, 50(6), 443–472. <https://doi.org/10.1080/05704928.2015.1010205>
2. Tugulan, L. C., Gradinaru, J., & Duliu, O. G. (2016). An EDXRF and WDXRF intercomparison case study: Major elements content of dobrogea loess. *Romanian Journal of Physics*, 61(9–10), 1626–1634.
3. Çümen, H., Hatipoğullari, M. M., Akkuş, T., & Durdağı, S. P. (2019). *Analysis of Magnetic Field Effects on  $K\alpha$  And  $K\beta$  XRF Spectra of Selenide Compounds*. (Nsp 2018), 52–58.
4. Flay, N., & Leach, R. K. (2012). Application of the optical transfer function in X-ray computed tomography – a review. *National Physical Laboratory*, 41(November), 26.
5. Cone, B. M. (n.d.). *Are Selenium Levels Linked to Diabetes ?*
6. Khan, L. B., Read, H. M., Ritchie, S. R., & Proft, T. (2017). Artificial Urine for Teaching Urinalysis Concepts and Diagnosis of Urinary Tract Infection in the Medical Microbiology Laboratory †. *Journal of Microbiology & Biology Education*, 18(2), 1–6. <https://doi.org/10.1128/jmbe.v18i2.1325>
7. Life, P., & Sciences, A. (2004). *Concepts-of-ICP-OES-Booklet*. <https://doi.org/005446B>
8. Rodríguez Bolaños, R. de L. Á., Reynales Shigematsu, L. M., Jiménez Ruíz, J. A., Juárez Márquez, S. A., & Hernández Ávila, M. (2010). [Direct costs of medical care for patients with type 2 diabetes mellitus in Mexico micro-costing analysis]. *Revista Panamericana de Salud Publica = Pan American Journal of Public Health*, 28(6), 412–420. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21308167>
9. Yim, S. D., Kim, S. J., Baik, J. H., Nam, I., Mok, Y. S., Lee, J.-H., ... Oh, S. H. (2004). Decomposition of Urea into NH<sub>3</sub> for the SCR Process . *Industrial & Engineering Chemistry Research*, 43(16), 4856–4863. <https://doi.org/10.1021/ie034052j>
10. Porikli, S., & Kurucu, Y. (2012). Determination of Chemical State and External Magnetic Field Effect on the Energy Shifts and X-Ray Intensity Ratios of Yttrium and Its Compounds. *Radioisotopes - Applications in Physical Sciences*. <https://doi.org/10.5772/20757>
11. Chandrasekaran, K., Ranjit, M., & Arunachalam, J. (2009). Determination of inorganic selenium species [Se(IV) and Se(VI)] in tube well water samples in Punjab, India. *Chemical Speciation and Bioavailability*, 21(1), 15–22. <https://doi.org/10.3184/095422909X416405>

12. Greaves, E. D., Marcó Parra, L. M., Rojas, A., & Sajo-Bohus, L. (2000). Determination of platinum levels in serum and urine samples from pediatric cancer patients by TXRF. *X-Ray Spectrometry*, 29(5), 349–353. [https://doi.org/10.1002/1097-4539\(200009/10\)29:5<349::AID-XRS434>3.0.CO;2-8](https://doi.org/10.1002/1097-4539(200009/10)29:5<349::AID-XRS434>3.0.CO;2-8)
13. Determination of trace elements in blood samples by TXRF analysis. (2004). *Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry*, 259(3), 511–514. <https://doi.org/10.1023/B:JRNC.0000020928.45385.5f>
14. Hernández-ávila, M. (2013). Diabetes Mellitus en Mexico. El estado actual de la epidemia. *Salud Pública de México*, 55(2), 129–136.
15. Ayala, R. E., Alvarez, E. M., & Wobruschek, P. (1991). Direct determination of lead in whole human blood by total reflection X-ray fluorescence spectrometry. *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy*, 46(10), 1429–1432. [https://doi.org/10.1016/0584-8547\(91\)80193-7](https://doi.org/10.1016/0584-8547(91)80193-7)
16. Leitão, R. G., Palumbo, A., Souza, P. A. V. R., Pereira, G. R., Canellas, C. G. L., Anjos, M. J., ... Lopes, R. T. (2014). Elemental concentration analysis in prostate tissues using total reflection X-ray fluorescence. *Radiation Physics and Chemistry*, 95, 62–64. <https://doi.org/10.1016/j.radphyschem.2012.12.044>
17. Redus, R., & Huber, A. (2012). Figure of merit for spectrometers for EDXRF. *X-Ray Spectrometry*, 41(6), 401–409. <https://doi.org/10.1002/xrs.2420>
18. Fernández Ruiz, R. (2010). Fluorescencia de Rayos X por Reflexión Total (TXRF): una gran desconocida. *Anales de La Real Sociedad Española de Química*, (1), 5–12.
19. Wolff, N. L. R. W. H. (2006). *Handbook of Practical X-Ray Fluorescence Analysis*. <https://doi.org/10.1007/978-3-540-36722-2>
20. Gonzalez, M., Tapia, L., Alvarado, J., Tornero, J. D., & Fernandez, R. (1999). intracellular determination of elements in mammalian cultured cells by TXRF. *J. Anal. At. Spectrom.*, 14, 885.
21. Abraham, J. A., Sánchez, H. J., Valentinuzzi, M. C., & Grenón, M. S. (2010). Influence of smoking on the elemental composition of oral fluids: A TXRF approach. *X-Ray Spectrometry*, 39(6), 372–375. <https://doi.org/10.1002/xrs.1278>
22. Stockman, M. I. (2015). Nanoplasmonic sensing and detection. *Science*, 348(6232), 287–288. <https://doi.org/10.1126/science.aaa6805>
23. Kaur, K., & Mittal, R. (2014). Measurement of shift in K X-ray peak energies of potassium and calcium in different compounds using EDXRF. *The European Physical Journal Applied Physics*, 68(3), 30701. <https://doi.org/10.1051/epjap/2014140235>
24. Khuder, A., Issa, H., Bakir, M. A., Habil, K., Mohammad, A., & Solaiman, A. (2012). Major, minor, and trace elements in whole blood of patients with different leukemia patterns. *Nukleonika*, 57(3), 389–399.
25. Martínez, A. G., Puebla, R. A. Á., & Marzán, L. M. L. (2011). Nanoplasmónica basada en Química Coloidal. *Anales de Química*, 107(3), 221–228.
26. Stockman, M. I. (2011). Nanoplasmonics: The physics behind the applications. *Physics Today*, 64(2), 39–44. <https://doi.org/10.1063/1.3554315>
27. Peak energy shift with fertilization in mint plants: EDXRF measurements with synchrotron photon source. (2012). *Archives of Applied Science Research*, 4(5), 2152–2160. <https://doi.org/10.13140/2.1.1735.7446>

28. Santos, J. R., Gois, A. M., Mendonça, D. M. F., & Freire, M. A. M. (2014). Nutritional status, oxidative stress and dementia: The role of selenium in Alzheimer's disease. *Frontiers in Aging Neuroscience*, 6(AUG), 1–4. <https://doi.org/10.3389/fnagi.2014.00206>
29. Ru, E., Limits, L., & Lld, T. (2007). Lab Report XRF 426 S2 PICOFOX Total Reflection X-ray Fluorescence Spectroscopy - Working Principles. *Spectroscopy*.
30. Kobets, A. G., Nas, R. T., Meshkov, I. N., Orlov, O. S., & Jinr, A. A. S. (n.d.). *POSITRON ANNIHILATION SPECTROSCOPY AT LEPTA FACILITY P . Horodek , Institute of Nuclear Physics PAN , Krakow , Poland DOPPLER BROADENING OF ANNIHILATION GAMMA LINE. 2215–2217. https://doi.org/10.18429/JACoW-IPAC2014-WEPRO107*
31. Riaño, S., Regadío, M., Binnemans, K., & Vander Hoogerstraete, T. (2016). Practical guidelines for best practice on Total Reflection X-ray Fluorescence spectroscopy: Analysis of aqueous solutions. *Spectrochimica Acta - Part B Atomic Spectroscopy*, 124, 109–115. <https://doi.org/10.1016/j.sab.2016.09.001>
32. Strelci, C. (2006). Recent advances in TXRF. *Applied Spectroscopy Reviews*, 41(5), 473–489. <https://doi.org/10.1080/10543400600809318>
33. Ogawa-Wong, A. N., Berry, M. J., & Seale, L. A. (2016). Selenium and metabolic disorders: An emphasis on type 2 diabetes risk. *Nutrients*, 8(2). <https://doi.org/10.3390/nu8020080>
34. Laclaustra, M., Navas-Acien, A., Stranges, S., Ordovas, J. M., & Guallar, E. (2009). Serum selenium concentrations and diabetes in U.S. adults: National health and nutrition examination survey (NHANES) 2003-2004. *Environmental Health Perspectives*, 117(9), 1409–1413. <https://doi.org/10.1289/ehp.0900704>
35. Wei, J., Zeng, C., Gong, Q. yi, Yang, H. bin, Li, X. xiao, Lei, G. hua, & Yang, T. bao. (2015). The association between dietary selenium intake and diabetes: a cross-sectional study among middle-aged and older adults. *Nutrition Journal*, 14, 18. <https://doi.org/10.1186/s12937-015-0007-2>
36. Arthur, H. (1923). *The Ibtal Reflexion of X-Rays. Bg. 45(270)*, 1121–1131.
37. Manzanilla, L., Melgar, E., & Cruz, R. L. S. (2008). *PIXE and ionoluminescence for Mesoamerican jadeite. (May 2007)*, 96–99. <https://doi.org/10.1002/xrs>
38. Korir, K. A. (1998). *TRACE ELEMENT ANALYSIS OF ENVIRONMENTAL AND BIOLOGICAL SAMPLES USING TOTAL REFLECTION X-RAY Declaration :*
39. Carvalho, M. L., Magalhães, T., Becker, M., & von Bohlen, A. (2007). Trace elements in human cancerous and healthy tissues: A comparative study by EDXRF, TXRF, synchrotron radiation and PIXE. *Spectrochimica Acta - Part B Atomic Spectroscopy*, 62(9), 1004–1011. <https://doi.org/10.1016/j.sab.2007.03.030>
40. Fernández- Ruiz, R. (2014). TXRF Spectrometry as a Powerful Tool for the Study of Metallic Traces in Biological Systems. *Development in Analytical Chemistry*, 1, 1–14. Retrieved from [www.seipub.org/dac](http://www.seipub.org/dac)
41. Janssens, K., Vittiglio, G., Deraedt, I., Aerts, A., Vekemans, B., Vincze, L., ... Snigirev, A. (2000). Use of Microscopic XRF for Non-destructive Analysis in Art and Archaeometry. *X-Ray Spectrometry*, 29(1), 73–91. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-4539\(200001/02\)29:1<73::AID-XRS416>3.0.CO;2-M](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-4539(200001/02)29:1<73::AID-XRS416>3.0.CO;2-M)
42. Bedzyk, M. J., Bommarito, G. M., & Schildkraut, J. S. (1989). X-ray standing waves at a reflecting mirror surface. *Physical Review Letters*, 62(12), 1376–1379. <https://doi.org/10.1103/PhysRevLett.62.1376>

