

00362



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS FÍSICAS  
INSTITUTO DE FÍSICA

**USO DE TÉCNICAS FÍSICAS PARA EL  
ANÁLISIS DE TEJIDO ÓSEO.**  
*EL CASO DE: OSTEOIDE Y COLÁGENA HIALINIZADA*

**T E S I S**

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE  
MAESTRO EN CIENCIAS (FÍSICA MÉDICA)

**P R E S E N T A :**

**ALEJANDRO ACOSTA ROMERO**

DIRECTOR DE TESIS:  
DR. LAURO BUCIO GALINDO



posgrado en ciencias físicas  
unam

MEXICO, D.F.

2002

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

## Agradecimientos

Le agradezco a mi mamá por su paciencia y comprensión.

Espero que Jorge Contreras y Santiago Ruiz entiendan que me supero para darles ejemplo y para darles lo mejor que yo les pueda dar porque los quiero muchísimo y aprovecho para agradecerles lo feliz que me han hecho.

Tengo que agradecer al Posgrado en Ciencias Físicas, al proyecto PAPIIT IN-113199 e IN-120801, a la DEGEP, al PAEP 2002, al Pelletron (proyecto Conacyt G0010-E).

También me agradezco por todo lo que trabajé durante 20 años para poder pagar impuestos y así poder acceder a todo lo que obtuve de la UNAM.

Agradezco a Ignacio Ramírez y a Ignacio Felix por su amistad y apoyo.

Le agradezco a Alejandro Heredia, Erick Juarez, Luis Lozano, Eduardo Villarreal, Ivonne Rosales, Miguel A. Peña, Irma Belío y a Lucia Diaz Barriga por las ricas discusiones y por la amistad que encontré en ellos.

También le agradezco mucho a la Dra. María Ester Brandan por haberme dado mis nalgadas cuando las necesitaba y por motivarme con su ejemplo.

Le agradezco a mis maestros por todo lo que aprendí de ellos.

Agradezco la colaboración de Victor H. Lara, Miguel A. Canseco, Carlos Magaña y José L. Ruvalcaba, Edilberto Hernandez, Pedro Mexia, Gilberto Mondragón, Armando Lara, Karim López y al Dr. Abisaid Alcatara.

A la señora Irma Orozco, por su gentileza.

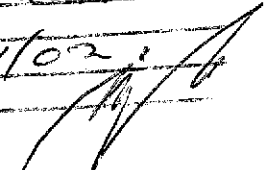
Agradezco al Dr. Pedro Bosch por impulsarme a estudiar más y por enseñarme SAXS y el concepto de fractalidad (arrugandome la hoja en donde me explicó)

Le agradezco a la Dra. Cristina Piña por su amabilidad y por sus correcciones, al Dr. Jorge Rikards por sus comentarios y al Dr. Rodolfo Diaz Perches por su apoyo.

También le agradezco a Fabian Telles que me comprendió y me ayudó.

Pero en especial quiero agradecer y dedicar este trabajo al maestro, al hermano, al amigo que ha sido para mi el DR. LAURO BUCIO GALINDO.

Lauro, muchísimas gracias !

la Dirección General de Bibliotecas  
se a difundir en formato electrónico e impre  
contenido de mi trabajo recepcional  
NOMBRE: Alejandro Acesta Romero  
FECHA: 2/11/02  
Firma: 

## Indice

1. Introducción, 4
2. Generalidades sobre el tejido óseo, 6
  - 2.1 Composición del hueso, 6
  - 2.2 Tipos celulares propios del hueso, 8
  - 2.3 Colágena hialinizada, 8
  - 2.4 Osteoide, 9
  - 2.5 Patologías del hueso, 10
  - 2.6 Antecedentes del estudio, 15
  - 2.7 Hipótesis, 15
  - 2.8 Justificación de las técnicas a emplear para el estudio, 16
    - 2.8.1 Difracción de rayos X (DRX), 16
    - 2.8.2 Dispersión de rayos X a bajo ángulo (SAXS), 16
    - 2.8.3 Espectroscopía infrarroja (IR), 17
    - 2.8.4 Calorimetría diferencial de barrido (DSC), 17
    - 2.8.5 Microscopía electrónica de barrido de bajo vacío (LVSEM), 18
    - 2.8.6 Espectroscopía PIXE, 18
3. Aspectos teóricos de los métodos experimentales, 19
  - 3.1 Aspectos termodinámicos, 19
  - 3.2 Calorimetría diferencial de barrido (DSC), 20
  - 3.3 Espectroscopía infrarroja (IR), 24
  - 3.4 Espectroscopía PIXE, 28
  - 3.5 Difracción de rayos X (DRX), 30
  - 3.6 Microscopía electrónica de barrido de bajo vacío (LVSEM), 32
  - 3.7 Dispersión de rayos X a bajo ángulo (SAXS), 33
4. Metodología experimental, 46
  - 4.1 Obtención de las muestras, 46
  - 4.2 Calorimetría diferencial de barrido (DSC), 48
  - 4.3 Espectroscopía infrarroja (IR), 49
  - 4.4 Espectroscopía PIXE, 49
  - 4.5 Microscopía electrónica de barrido de bajo vacío (LVSEM), 49
  - 4.6 Difracción de rayos X (DRX), 50
  - 4.7 Dispersión de rayos X a bajo ángulo (SAXS), 50
  - 4.8 Microscopía óptica, 51

5.	Resultados, 52
5.1	Microscopía Óptica, 52
5.2	Difracción de Rayos X, 56
5.3	Análisis elemental por PIXE, 61
5.4	Microscopía Electrónica de Barrido de Bajo Vacío (LVESM), 63
5.5	Espectroscopía Infrarroja (IR), 70
5.6	Calorimetría Diferencial de Barrido (DSC), 73
5.7	Análisis por SAXS, 77
6.	Discusión y Conclusiones, 81
Apéndice A: Artículo, 85	
Apéndice B: Ecuación de Debye, 92	
Apéndice C: Ficha PDF-ICDD de la hidroxiapatita, 96	
Apéndice D: Principios de dispersión a bajo ángulo, 97	
Referencias, 100	

## 1 INTRODUCCIÓN

Uno de los objetivos de este trabajo es obtener conocimiento básico del tejido óseo afectado por sarcoma osteogénico, llevando a cabo un estudio comparativo del tejido óseo sano y tejido tumoral (sarcoma osteogénico). Esto se realizará mediante técnicas físicas que proporcionen información sobre cómo se ven afectados tanto el grado de mineralización como la microestructura del tejido óseo por la formación del tumor.

Para ello se propone analizar la estructura y el estado de agregación tanto del tejido óseo sano como del tejido que presenta osteosarcoma (sarcoma osteogénico) en el ser humano. En el estudio se ha incluido también el análisis de osteoide y colágena hialinizada, debido a que, al presentarse el tumor se genera sustancia osteoide (proteína colagénica con incipiente mineralización) difícil de ser diferenciada de la colágena hialinizada (la cual no está necesariamente asociada a la presencia del sarcoma osteogénico).

Aplicando las técnicas de dispersión de rayos X a bajo ángulo (SAXS), difracción de rayos X (DRX), calorimetría diferencial de barrido (DSC), microscopía electrónica de barrido de bajo vacío (LVSEM), espectroscopía infrarroja (FTIR), y análisis elemental por bombardeo nuclear (PIXE), se pretende analizar las diferencias estructurales y los estados de agregación de los tejidos que aquí se estudian, para poder así obtener una adecuada descripción.

En la literatura se han descrito algunas variedades de osteosarcomas, (Etchart, 1996), algunas apenas forman osteoide, y cuando este osteoide se observa al microscopio óptico, se puede confundir fácilmente con colágena de aspecto hialino, propia de un cuadro inflamatorio. Es imperativo por lo tanto poder distinguir esta patología en estados tempranos.

En el siguiente capítulo (capítulo 2), se mencionan las generalidades del tejido óseo y algunas de sus patologías y se subrayan las particularidades del tejido de interés para el presente estudio. Al final se expone el planteamiento

del problema de la investigación y la justificación para el uso de las distintas técnicas experimentales propuestas para el análisis.

En el capítulo 3 se hace un breve resumen de las técnicas involucradas y algunos de sus aspectos teóricos.

En el capítulo 4 se explica la metodología empleada y se dan las características de cada uno de los aparatos usados.

En el capítulo 5 se presentan y discuten los resultados encontrados.

Y finalmente en el capítulo 6 se dan las conclusiones a las que se llegó.

## 2 GENERALIDADES SOBRE EL TEJIDO ÓSEO

### 2.1 Composición del hueso

El hueso es un tejido mineralizado cuya función primaria es la de soportar cargas, aunque también lleva a cabo otras funciones. El hueso cortical húmedo está compuesto de un 22% en peso de materia orgánica (de la cual el 90 al 96% del peso es colágena tipo I y 4 a 10% es osteonectina, osteocalcina, proteína morfogénica del hueso, proteoglicano óseo y sialoproteína ósea); 69% es mineral; y 9% del peso es agua (Park, 1984). La fase mineral está constituida por hidroxiapatita,  $\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3\text{OH}$ .

#### *Fase orgánica: Colágena tipo I*

La colágena presente en el tejido óseo, es una proteína fabricada dentro de las células llamadas osteoblastos (Alberts et al, 1994) y secretada al exterior; siendo uno de los mayores componentes de la matriz extracelular, donde cumple funciones como elemento estructural del tejido. Se sabe que la colágena tipo I es el principal componente orgánico del tejido óseo, llegando a constituir alrededor del 22% en peso del mismo. La colágena existe en diferentes tipos funcionales, los cuales tienen diferentes estructuras primarias. Las más abundantes en tejido conectivo son las colágenas fibrosas (por ejemplo las tipo I, II, III, V, XI), las cuales se autoensamblan en fibrillas estriadas entrelazadas, formando largas estructuras fibrilares, que producen excelentes datos de difracción de rayos X (Schonermark et al, 1997). La colágena tipo I presente en el tejido óseo, está formada por una triple hélice en una secuencia de aminoácidos dada por glicina-X-Y (donde X es por lo común prolina y Y es por lo común hidroxiprolina). Son tres hélices izquierdas, dos paralelas  $\alpha 1$  y una antiparalela  $\alpha 2$  (amino N - carboxilo C). Estas tres hélices se tuercen dando en conjunto una triple hélice derecha.

#### *Fase mineral: Hidroxiapatita*

La fase mineral más importante consiste de cristales nanométricos de hidroxiapatita de estructura cristalina con simetría hexagonal. Los cristales de apatita están formados por delgadas placas de  $20 \times 40 \text{ nm}^2$  de área y con



entre 1.5 y 3 nm en espesor, embebidas en una matriz de fibras de colágena. Estas fibrillas que contienen el material están arregladas en hojas laminares (3-7  $\mu\text{m}$ ) que corren helicoidalmente y concéntricamente a lo largo del canal de Havers formando la osteona (figura 2.1). La osteona se compone de entre 4 a 20 lamelas que se arreglan en anillos concéntricos alrededor del canal de Havers. El diámetro de la osteona es típicamente de 150 a 250  $\mu\text{m}$ . Entre las osteonas los sistemas intersticiales están tajantemente divididos por la línea cementada.

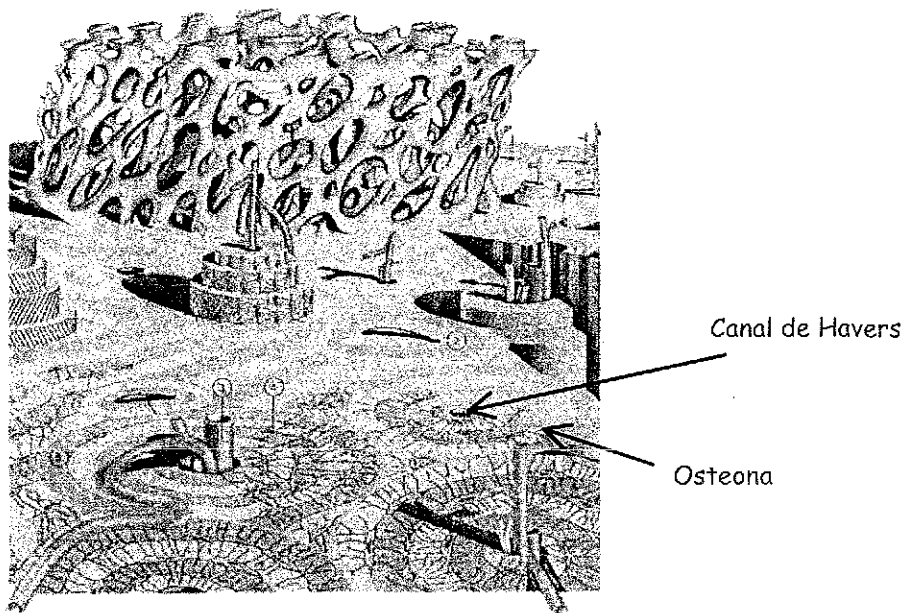


Figura 2.1 Osteona y canales de Havers.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

### *Osificación y estructura normal del hueso*

Hay dos tipos de osificación: la membranosa (o desmal) y la endocondral. La membranosa se observa en la calota y parte del maxilar inferior. Consiste en una transformación directa del tejido fibroso en tejido óseo: así se forma tejido óseo esponjoso central (díploe) delimitado por tejido óseo denso en las superficies (tablas). La osificación endocondral, en cambio, se efectúa sobre un substrato cartilaginoso, mediante procesos de calcificación relativamente complejos.

Estructuralmente, el tejido óseo consta de una matriz glicoproteica (condroide cuando predominan los proteoglicanos y osteoide cuando predomina el componente proteico). El osteoide tiene la notable capacidad de adsorber (no absorber) calcio, es decir, de adherirlo sin combinarlo, lo que facilita su rápida movilización. El calcio se encuentra en forma de carbonato de hidroxapatita en forma cristalina, en moléculas combinadas con agua.

El tejido óseo es trabecular: columnas más o menos anastomosadas, hechas de láminas concéntricas y que siguen líneas de fuerza estructurales. Entre las trabéculas se ubica el tejido mielorrreticular (hematopoyético) y vasos.

## 2.2 Tipos celulares propios del hueso

### *Osteoblasto*

Es la célula formadora del tejido; es de tamaño mediano, poliédrica, con núcleo ovoideo, citoplasma vasófilo y se la observa adosada a las trabéculas. Su actividad se demuestra por la presencia de fosfatasa alcalina.

### *Osteocito*

Es un osteoblasto que ha quedado incluido en el espesor de una trabécula; se ubica en una "laguna" y está encargado probablemente de la nutrición de la trabécula; posee prolongaciones citoplasmáticas que lo conectan con otros osteocitos.

### *Osteoclastos*

Es una célula gigante, multinucleada, adosada a la trabécula, en un nicho o laguna de Howship; mide 30 a 50 micrones, posee 3 a 6 núcleos ovoideos y está encargada de la remoción del tejido óseo como tal, no del calcio iónico.

## 2.3 Colágena hialinizada

Es una colágena en la que (al microscopio óptico) no se observan las fibras individualizadas, es decir que no se ven células. El término hialino significa cualquier cambio en tejido o en células que permanezcan rojas cuando

son teñidas con eosina, parece homogéneo, y frecuentemente muestran una marcada refracción a la luz (incremento del índice de refracción). El término "hialino" representa un término comúnmente usado en la microscopía óptica de la histología, de acuerdo a los principios antes mencionados.

#### 2.4 Osteoide

Es el primer signo de formación de un centro de osificación (figura 2.2). Se presenta como una pequeña masa densa homogénea eosinófila rodeada por osteoblastos y aún no calcificada, está compuesta por proteoglicanos (proteínas pegadas a azúcares) y fibras de colágeno, sin el contenido de sales minerales (Geneser, 1999).

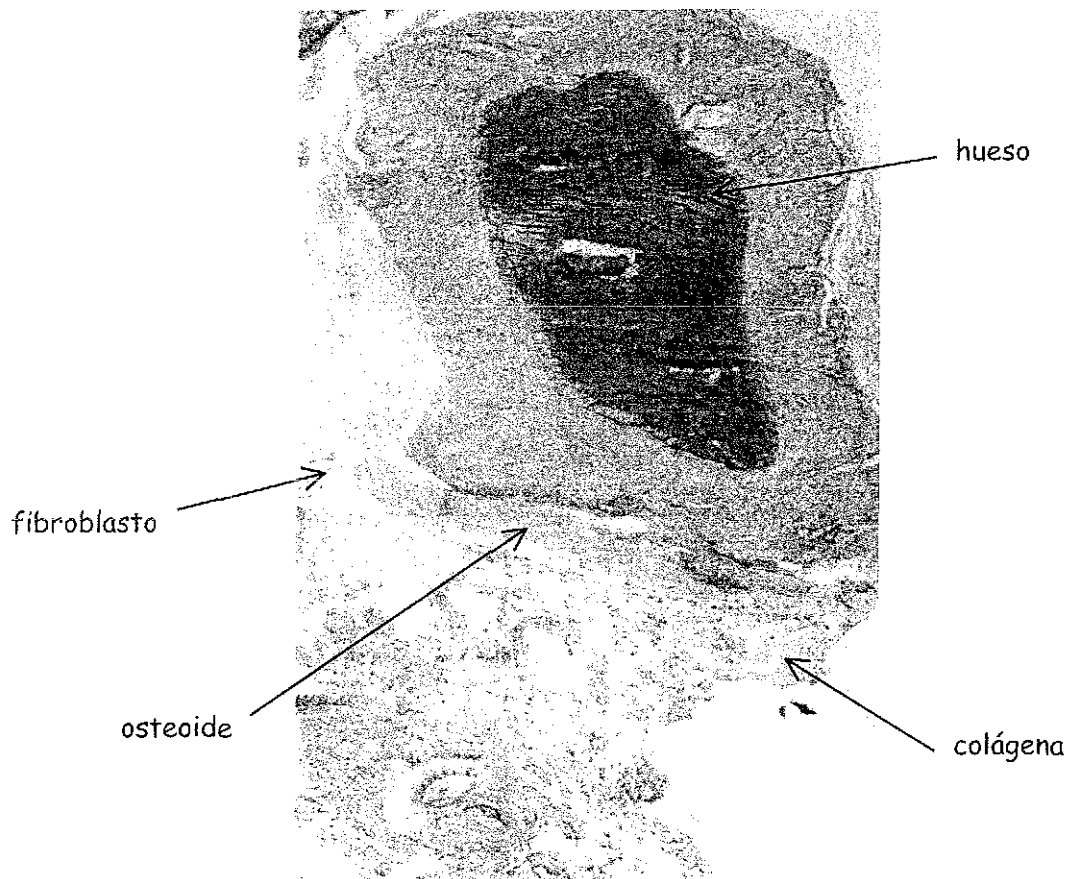


Figura 2.2 Corte histológico mostrando hueso, colágena, fibroblastos y osteoide (cortesía, Dr. Abisaid Alcántara, Departamento de Patología, Hospital General, México D.F.).

## 2.5 Patologías del hueso

Entre las patologías del hueso se encuentran las siguientes:

### *Alteraciones congénitas*

El esqueleto es sitio muy frecuente de manifestación de anomalías cromosómicas, infecciones virales, efectos de radiación y otras noxas que afectan el desarrollo normal del embrión y que quedan en evidencia en el momento del nacimiento. Algunas de las más frecuentes, de tipo genético, son: osteogénesis imperfecta, acondroplasia, osteopetrosis y displasia fibrosa.

### *Enfermedades metabólicas*

Entre éstas se encuentran: osteoporosis senil, raquitismo, hiperparatiroidismo y osteodistrofia renal (urémica).

### *Inflamaciones*

El tejido óseo puede ser asiento de procesos inflamatorios. La mayoría de los casos son producidos por gérmenes piógenos y entre nosotros, una escasa proporción es debida al bacilo de la tuberculosis. Entre esos se encuentran: la ostiomielitis piógena y la tuberculosis ósea.

### *Lesiones pseudotumorales*

Existen varias lesiones del esqueleto que pueden confundirse clínica, radiológica o anatomopatológicamente con neoplasias. Las principales son: quiste óseo simple, quiste óseo aneurismático, histiocitosis de Langerhans, miositis (periostosis) osificante, defecto fibroso metafisiario y enfermedad de Paget de los huesos.

### *Tumores*

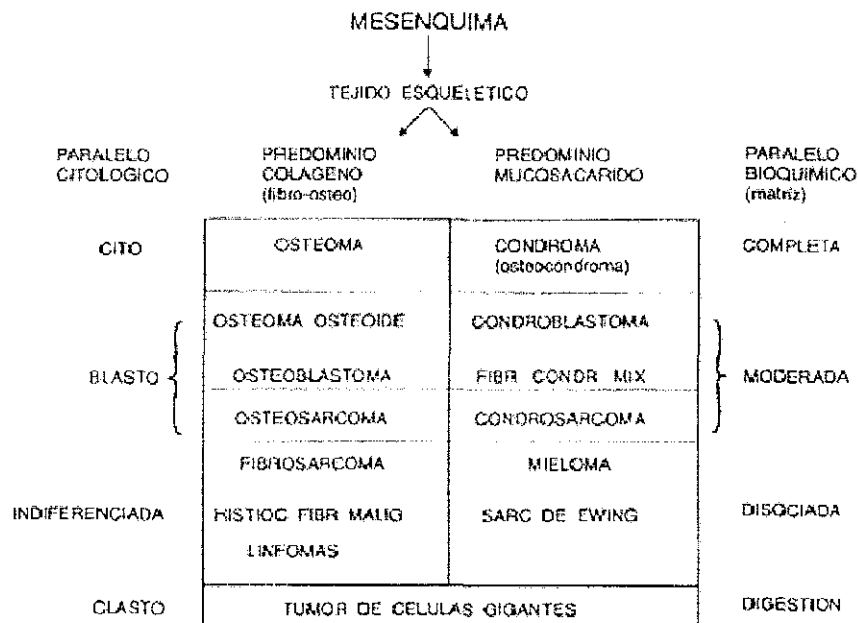
Los tumores óseos son relativamente poco frecuentes, siendo los benignos dos veces más frecuentes que los malignos. La mayoría se presentan en los huesos que más crecen (fémur, tibia, húmero), en los sitios que más

crecen (metáfisis), y a la edad en que más se crece (14 a 20 años). En estas condiciones, los tumores adoptan sus características típicas.

La nomenclatura de las distintas entidades se basa en el parecido morfológico de las células que proliferan o de las sustancias producidas con los elementos normales. También puede observarse que los distintos tipos celulares tienen sus sitios predilectos de actividad; en estos mismos sitios es donde se manifiestan las neoplasias correspondientes.

A su vez, puede notarse que el grado de actividad de cada célula es variable según la topografía: así, hay más actividad en las metáfisis, menos en las epífisis y menos aún en las diáfisis. Los osteoblastos metafisarios son mucho más activos que los similares dependientes del periostio. También es mayor la actividad en las zonas de reparación o remodelación ósea persistentes, tales como bordes de infarto, enfermedad de Paget, irradiación endógena o exógena previas, etc.

A medida que la célula neoplásica se hace más indiferenciada, va perdiendo su capacidad para formar la sustancia que la caracteriza, tanto en cantidad como en calidad, pero aumenta en agresividad (Fig 2.3).



**Figura 2.3**  
Esquema del paralelo citológico y bioquímico de los tumores óseos (según Johnson LC (1953) A General Theory of Bone Tumors. NY Acad Med 29: 164-171. Modificado)

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

Algunos tipos tumorales tienen preferencia por ciertas edades: condroblastoma, mieloma, tumor de células gigantes, etc. El esqueleto es frecuentemente el sitio de metástasis originadas en tiroides, riñón, próstata, mama, etc., posibilidad que debe considerarse en pacientes mayores de 40 años (ver tablas 2.1 y 2.2).

Tabla 2.1

CARACTERÍSTICAS ESQUEMÁTICAS HABITUALES DE LOS TUMORES OSEOS				
TUMOR	EDAD	MAYOR FRECUENCIA	TOPOGRAFIA	OBSERVACIONES
<u>Condroma</u>	10-30	Manos y pies	Diáfisis	Puede ser múltiple
<u>Osteocondroma</u>	< 30	Rodilla, húmero	Metáfisis	Puede ser múltiple
<u>Condroblastoma</u>	< 20	Húmero, fémur, tibia	Epífisis	Frecuencia mayor en varones
<u>Fibroma condromixoide</u>	< 20	Tibia, fémur, tarso	Metáfisis	Puede recidivar
<u>Condrosarcoma</u>	> 35	Huesos axiales, fémur	Diáfisis	Puede ser secundario a osteocondroma
<u>Osteoma</u>	< 25	Huesos faciales, calota	Senos paranasales	No en otros huesos
<u>Osteoma osteoide</u>	< 30	Huesos largos, vértebras	Intracortical	
<u>Osteoblastoma</u>	< 30	Vértebras, huesos largos	Metáfisis	
<u>Osteosarcomas</u>				
	<u>Genuino</u> < 25	Rodilla, húmero	Metáfisis	
	<u>Paraostal</u> > 25	Fémur, húmero	Metáfisis	Rx típico
	<u>Posradiación</u> Muy variable	Sitio de radiación	Sitio de radiación	> 3 años > 3000 r
<u>Sarcoma de Ewing</u>	3-20	Fémur, tibia, pelvis	Diáfisis	A veces múltiple
<u>Linfomas</u>	20-45	Cualquiera	Diáfisis	
<u>Mieloma</u>	> 40	Cualquiera	Múltiples	
<u>Tumor de células gigantes</u>	> 20	Rodilla, extremo inferior del radio	Epífisis	Recidiva. Frecuencia mayor en mujeres
<u>Fibroma</u>	20-40	Huesos largos	Metáfisis	
<u>Histiocitoma fibroso maligno</u>	> 20	Huesos largos, pelvis	Metáfisis	Hay dos cúspides en edad
<u>Hemangioma</u>	Muy variable	Calota, vértebras		Rx. Típica
<u>Cordoma</u>				
	jóvenes < 20	Región cervical	Intervertebral	
	adultos > 40	Región sacrococcígea	Intervertebral	

Tabla 2.2

CARACTERISTICAS ESQUEMATICAS HABITUALES DE LAS LESIONES PSEUDOTUMORALES				
LESION	EDAD	MAYOR FRECUENCIA	TOPOGRAFIA	OBSERVACIONES
Defecto fibroso	< 15	Fémur, húmero, tibia	Metáfisis	Involución espontánea
Quiste óseo solitario	< 20	Húmero, fémur	Metáfisis	Recidiva frecuente en menores de 10 años
Quiste óseo aneurismático	< 25	Cualquiera	Cualquiera	Hay secundarios a otra lesión esquelética
Histiocitosis de Langerhans	< 25	Cualquiera	Cualquiera	Puede ser múltiple
Displasia fibrosa	< 20	Cualquiera	Diáfisis, metáfisis	Puede ser múltiple

De todas estas patologías, las que son de interés para el presente estudio son los osteosarcomas.

#### *Osteosarcomas (sarcomas osteogénicos)*

Son tumores malignos en los que la célula neoplásica genera directamente sustancia osteoide. Es muy agresivo y es el más frecuente de los tumores malignos primitivos del esqueleto. Tiene alguna predilección por los varones, se origina en la médula de la metáfisis de un hueso largo, preferentemente la inferior del fémur, superior de la tibia y superior del húmero, pero puede afectarse cualquier hueso. Su mayor frecuencia se observa en la segunda mitad de la segunda década de la vida (entre los 15 y 20 años). Si aparece más tardíamente casi con seguridad puede decirse que es secundario o debido a otra lesión, i.e. radiación, enfermedad de Paget, infarto, etc. Se han descrito casos multifocales en niños.

Dependiendo del grado de calcificación del osteoide neoformado, el radiólogo describe formas líticas y escleróticas. El patólogo observa habitualmente compromiso de toda la metáfisis, extensión hacia la diáfisis por el canal medular, permeación del tejido óseo, del periostio e invasión de partes blandas, generalmente dando lugar a una gran masa tumoral que puede comprometer hasta la piel. Es muy poco frecuente la invasión del cartílago metafisiario. En el microscopio se observa la proliferación de células muy atípicas que generan cantidades variables de osteoide mayor o menormente

calcificado; frecuentemente hay una proporción variable de células cartilaginosas y fibroblásticas atípicas.

Las células neoplásicas pueden ser muy pleomorfas. Se han descrito variedades de osteosarcomas: telangectásico (con vasos y espacios sanguíneos muy prominentes, es poco calcificado y de conducta muy agresiva); de células pequeñas (muy agresivo, apenas forma osteoide; puede confundirse con un cuadro inflamatorio); bien diferenciado; condroblástico; fibroblástico, periosteal, etc.

#### *Osteosarcoma paraostal o yuxtacortical*

Es relativamente frecuente y se presenta en pacientes mayores de 30 años, de preferencia en relación con la cara posterior de la metafisis inferior del fémur (huevo poplíteo); se desarrolla a partir del periostio y es de lento crecimiento; envuelve al hueso y después de algún tiempo invade la corteza y médula; está muy bien diferenciado, por lo que a veces se le ha confundido con una miositis osificante antigua o un osteocondroma madurado. Es de relativo buen pronóstico mientras no haya compromiso del canal medular.

#### *Osteosarcomas postradiación*

Se denominan así a los que aparecen después de 3 años de la radioterapia, con dosis de 3000 rads o más, en sitios previamente sanos o con lesión benigna comprobada. Se han descrito casos de sarcomas por radiación interna (ingestión o inoculación). Son clínicamente muy agresivos. También se han observado fibrosarcomas e histiocitomas fibrosos malignos postradiación.

#### *Metástasis tumorales esqueléticas*

Deben sospecharse en cualquier lesión ósea en personas mayores de 40 años, especialmente si son múltiples. Se ubican de preferencia en los huesos axiales y en las raíces de los miembros. Son generalmente osteoblásticas las originadas en carcinomas de próstata, escirro mamario, linitis plástica gástrica, carcinoides, es decir, lesiones cuyos tumores primitivos son desmoplásticos. Las metástasis osteolíticas generalmente se originan en carcinomas de mama, riñón, estómago, tiroides, pulmón, etc. En niños menores de 3 años debe pensarse en un neuroblastoma (Etchart, 1996).



## 2.6 Antecedentes del Estudio

Se ha observado que muchas enfermedades en sus diversos estados, están asociadas a cambios en la bioquímica celular, implicando a su vez, cambios en la estructura del tejido. De aquí que sea razonable suponer que la presencia y el tipo de problema médico puedan ser adecuadamente estudiados mediante el análisis de propiedades físicas y químicas relacionadas con la microestructura y grado de mineralización del tejido en consideración.

La colágena es uno de los mayores componentes de la matriz extracelular. La degradación y penetración de ésta, se sabe que involucra procesos de importancia significativa en la morbilidad y mortalidad por cáncer (Schonemark et al., 1997). El papel exacto que desempeña la matriz extracelular en el proceso del cáncer no se conoce muy bien a pesar del considerable número de investigaciones. No obstante, se ha demostrado que su estructura es seriamente dañada en lesiones de mama malignas (Lewis et al., 2000). Los trabajos realizados por Schor y colaboradores (Schor et al., 1994) han sugerido que el tejido normal adyacente al tumor maligno, tiene fibroblastos "fetoidales" funcionalmente anómalos. También se ha demostrado que la expansión invasiva de tumor de carcinomas de mama, se caracteriza por cambios drásticos en el arreglo estructural de la colágena (Lewis et al., 2000).

La colágena es uno de los mayores componentes del tejido óseo, y ha sido extensivamente estudiada por varias técnicas (Elshemey et al., 1999; Kidane et al., 1999; Royle et al., 1991; Elshemey et al., 2001; Evans et al., 1991; Swanpalmer et al., 1998; Royle et al., 1995). Por lo tanto, resulta de interés el estudio de los posibles cambios que pudieran tener lugar en su estructura, microestructura y grado de mineralización durante el proceso de formación del tumor.

## 2.7 Hipótesis

Las diferencias microestructurales y estados de agregación de estos tejidos se pueden diferenciar por medio de las técnicas de dispersión de rayos X a bajo ángulo (SAXS), calorimetría diferencial de barrido (DSC), difracción de rayos X (DRX), microscopía electrónica de barrido de bajo vacío (LVSEM), espectroscopía infrarroja (IR) y análisis elemental por (PIXE).

## 2.8 Justificación de las técnicas a emplear para el estudio

Dado que el objetivo del presente trabajo es establecer y conocer de manera básica las diferencias entre los tejidos tejido de hueso sano, de tumor, con colágena hialinizada y con osteoide, se usarán muestras de estos tejidos para llevar a cabo experimentos de dispersión de rayos X a ángulos pequeños (SAXS) (para el análisis de inhomogeneidades en la estructura), espectroscopía infrarroja (para el análisis de grupos funcionales), calorimetría diferencial de barrido (para el análisis del estado de agregación), microscopía electrónica de bajo vacío (para analizar microestructura y mapeo químico) y análisis elemental por PIXE. Adicionalmente, el trabajo se completará con observaciones de los diferentes tejidos en el microscopio óptico.

### 2.8.1. Difracción de rayos X (DRX)

Con esta técnica es posible identificar las fases minerales presentes en el tejido bajo estudio, así como el grado en que éste se encuentra mineralizado. Dado que el tejido óseo está compuesto de hidroxiapatita,  $\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3\text{OH}$ , y colágena tipo I,  $\text{C}_{328}\text{H}_{678}\text{O}_{203}\text{N}$  (Peña-Rico, 2002) la principal contribución a la dispersión (por tener átomos con mayor densidad electrónica) será la hidroxiapatita. Por lo tanto con esta técnica, es posible analizar cambios en la estructura y microestructura de la fase mineral del tejido.

### 2.8.2. Dispersión de rayos X a bajo ángulo (SAXS, Small Angle X-Ray Scattering)

Se trata de una técnica que permite analizar objetos de una escala mayor a la típica observada en los parámetros atómicos de red cristalinos, esto se logra utilizando un ángulo pequeño. ya que como se puede apreciar de la ley de Bragg:

$$\text{sen } \theta = \frac{n\lambda}{2d}$$

donde  $\theta$  es el semi-ángulo entre el haz incidente y el dispersado,  $\lambda$  la longitud de onda de los rayos X incidentes y ( $d$ ) la distancia entre planos en que se ubican los centros dispersores.

Si el ángulo es pequeño (con  $\lambda$  fija) implica distancias ( $d$ ) grandes. Así la forma de la curva de dispersión de rayos X a ángulos pequeños se debe a la

diferencia de densidad electrónica entre las partículas (o poros) del material analizado y el medio en el que se encuentra. El SAXS no es una técnica de resolución atómica (las partículas suelen ser de 8 a 500 Å). Por ejemplo, si se estudia con esta técnica una solución de suero y hemoglobina, serán los eritrocitos los causantes de la dispersión de los rayos X a ángulos pequeños (ya que los eritrocitos son las entidades más densas) y por lo tanto se determinará su tamaño pero no se podrá obtener información de su composición o estructura. Otro ejemplo es el caso de la sílice donde las esferas de óxido de silicio, son las que originan la dispersión de los rayos X (Bosch y Lara, 2001). En el caso de tejido óseo mineralizado, la diferencia de densidad electrónica será entre la fase mineral (carbonato de hidroxapatita) y la matriz colagénica; en este caso hay que tener en cuenta que los cristales de la fase mineral son de dimensión nanométrica y por los átomos que contienen son los principales causantes de la dispersión de los rayos X.

### 2.8.3. Espectroscopía infrarroja (IR, Infrared Spectroscopy)

La espectroscopía infrarroja proporciona información importante sobre los modos vibracionales moleculares y por lo tanto de las estructuras de las moléculas. Esta técnica es ampliamente utilizada por los estudios de química inorgánica porque es posible examinar con relativa facilidad toda clase de muestras (gases, líquidos puros, soluciones y sólidos) en un amplio intervalo de temperaturas y presiones. A través de esta técnica se determinarán los cambios en los grupos funcionales presentes tanto en la fase mineral, como en la fase orgánica colagénica de acuerdo a la metodología de trabajos realizados recientemente (Lozano, 2002; Lozano et al., 2002; Peña-Rico, 2002).

### 2.8.4. Calorimetría diferencial de barrido (DSC, Differential Scanning Calorimetry)

Con esta técnica se pretende estudiar el estado de agregación del tejido óseo, asumiendo la hipótesis de que diferentes estados de agregación debido a la presencia (o no) de un tumor canceroso, ofrecen distintos esquemas de degradación para la componente orgánica en un experimento de calorimetría diferencial de barrido (DSC). Este tipo de estudio se ha realizado para estudiar el grado de preservación de colágena en restos arqueológicos y paleontológicos (Heredia, 2000; Lozano, 2002; Lozano et al., 2002), los cambios que sufre la interacción colágena-hidroxapatita en tejido óseo

humano en función de la edad (Peña-Rico, 2002) y la estabilidad térmica de tejido colagénico en dentina humana (Belío et al., 2002).

#### 2.8.5. Microscopía electrónica de barrido de bajo vacío (LVSEM, Low Vacuum Scanning Electron Microscopy)

El microscopio electrónico de barrido es un instrumento que permite la observación y caracterización de materiales inorgánicos y orgánicos por el estudio de superficies. En la modalidad de bajo vacío es posible observar tejidos de origen biológico. A partir de él se producen distintos tipos de señal que se generan desde la muestra y se utilizan para examinar muchas de sus características microestructurales en forma de imagen. En el analizador por dispersión de energía de rayos X la radiación utilizada son los rayos X característicos que emite la muestra como resultado del bombardeo del haz de electrones. El análisis de esta radiación proporciona una información analítica sobre la composición elemental del total o de cada una de las zonas de la muestra, pudiéndose analizar zonas tan pequeñas de hasta unas cuantas micras de diámetro (Peña-Rico, 2002)

#### 2.8.6. Espectroscopía PIXE (Particle Induced X-Ray Emission)

En la espectroscopía PIXE, se lleva a cabo un proceso que involucra la emisión de rayos X como consecuencia de la desexcitación de electrones en las capas más interiores de los átomos, cuando éstos son ionizados por la interacción con partículas pesadas (protones moderadamente energéticos, 2-3 MeV), así penetran los orbitales electrónicos externos, excitando o ionizando los electrones de las capas K y L.

El empleo de la espectroscopía PIXE permite realizar un análisis multielemental muy fino de la composición de un material. La espectroscopía PIXE es capaz de detectar los elementos con número atómico Z mayor a 11, i.e., elementos más pesados que sodio, y su sensibilidad en la detección alcanza las partes por millón del elemento (Ruvalcaba, 1993). El conocimiento de la composición química es un punto muy importante a analizar, ya que ciertos elementos químicos tienen un grado probado de carcinogenicidad en humanos suficiente para los casos de arsénico y cromo; y limitado para berilio, cadmio y níquel entre otros (Cortinas, 1990).

### 3 ASPECTOS TEÓRICOS DE LOS MÉTODOS EXPERIMENTALES

#### 3.1 Aspectos Termodinámicos

La termodinámica permite utilizar métodos generales para el estudio y comprensión de los fenómenos físicos complejos. Los únicos conceptos y magnitudes que intervienen en termodinámica son las propiedades macroscópicas de la materia que se pueden medir experimentalmente, de modo que se pueden conocer y relacionar estas propiedades. Dentro de estas magnitudes se encuentran, entre otras, la presión,  $P$ , el volumen,  $V$ ; la temperatura,  $T$ ; la energía,  $E$ ; las cuales se emplean para especificar el estado de un sistema termodinámico, por lo cual, se denominan como variables o funciones de estado, ya que sus valores dependen solamente del estado del sistema termodinámico. Un aspecto importante de las funciones de estado, es que cuando se altera el estado de un sistema, la variación que experimenta cualquier función de estado depende solamente de los estados inicial y final del sistema.

La primera ley de la termodinámica enuncia que cualquier cambio de la energía interna de un sistema es la suma del calor,  $Q$ , comunicado al sistema menos el trabajo,  $w$ , realizado por el sistema:

$$\Delta E = Q - w \quad (3.1)$$

El hecho de que la energía interna sea una función de estado, tiene una utilidad inmediata en el estudio de procesos químicos. El valor del cambio de energía,  $\Delta E$ , para una reacción química realizada a temperatura constante es una medida cuantitativa de los valores relativos de las fuerzas de enlace y de las fuerzas intermoleculares de los reactivos y productos. Teniendo en cuenta la ecuación (3.1) y utilizando la expresión del trabajo mediante presión y volumen, se puede hallar el valor de  $\Delta E$  para una reacción química puesto que:

$$dE = dQ - PdV \quad (3.2)$$

En condiciones de volumen constante, la variación de la energía interna es igual al calor absorbido por el sistema. En condiciones de presión constante, que es la forma más frecuente en la que se realizan las reacciones químicas, el

cambio en la energía interna no es igual al calor absorbido por el sistema. Para poder caracterizar las reacciones químicas a presión constante, se emplea entonces el concepto de entalpía,  $H$ , el cual es otra función de estado y se define por la ecuación:

$$H \equiv E + PV \quad (3.3)$$

Algunas de las propiedades de la entalpía se pueden deducir hallando su diferencial  $dH$  a partir de la ecuación (3.3):

$$\begin{aligned} dH &= dE + d(PV) \\ dH &= dE + P dV + V dP \end{aligned} \quad (3.4)$$

Puesto que se están considerando procesos bajo presión constante, el término  $V dP = 0$ , quedando la ecuación de la siguiente forma:

$$dH = dE + P dV \quad (3.5)$$

Sustituyendo la ecuación (3.2) en la ecuación anterior, se obtiene:

$$dH = dQ - PdV + P dV$$

Y finalmente:

$$dH = dQ \quad (3.6)$$

Esto nos lleva al hecho de que la variación de la entalpía es igual al calor absorbido en procesos donde la presión se mantiene constante. Para cualquier proceso a presión constante en que el sistema desprende calor, el valor de  $\Delta H$  es un número negativo, lo cual indica que el estado final del sistema tiene una entalpía menor que el estado inicial, y se llama proceso exotérmico. Por otra parte, si un sistema absorbe calor, el valor del  $\Delta H$  es positivo y el proceso se dice que es endotérmico.

### 3.2 Calorimetría de Barrido Diferencial (DSC)

La calorimetría de barrido diferencial es un método que permite la medición directa y precisa de distintos parámetros termodinámicos, como la entalpía, la capacidad calorífica, temperaturas de transición térmicas, transformaciones de fase, temperaturas de transición vítrea, etc.

Adicionalmente se puede obtener información referente a mecanismos de transiciones dependientes de la temperatura.

Existen dos tipos de calorímetros de barrido diferencial, el de compensación de potencia y el de flujo de energía. El principio de operación para el caso de la calorimetría de compensación de potencia es el siguiente: en el instrumento se encuentran dos celdas idénticas, en la primera se sitúa un crisol de aluminio, en el cual, se introduce la muestra bajo investigación, mientras que la segunda celda sirve de referencia, por lo que se coloca un crisol de aluminio vacío. Ambas celdas se calientan mediante flujos de calor similares y constantes, si las dos muestras presentan propiedades termodinámicas idénticas, la temperatura dentro de las celdas cambiará idénticamente, lo que da origen a la señal conocida como línea base que en condiciones ideales, a lo largo de todo el intervalo de temperatura del tratamiento, se presentará como una línea recta. Por otro lado, si las dos muestras difieren en dichas propiedades, una diferencia de temperatura entre ambas surgirá. En ese instante, un sistema electrónico cambia el régimen de calentamiento de las celdas de forma que las temperaturas entre éstas se igualen. El valor del flujo de calor adicional requerido para esta compensación de temperatura, se transforma mediante un juego de termopares en una señal eléctrica, que se mide en el calorímetro en mW y se grafica contra la temperatura para obtener así una curva termoanalítica, que refleja la diferencia de las propiedades entre la muestra bajo investigación y la de referencia. Esto significa que existe un cambio de la energía interna de la muestra durante el intervalo de temperatura en el que se aprecia dicho proceso (Lozano, 2002).

En el caso de la calorimetría de barrido diferencial mediante flujo de calor, sólo existe una sola celda de calentamiento, en la cual se introducen ambos crisoles. El instrumento tiene instalado un programa de computo, que convierte la diferencia de potencial obtenida a partir del termopar, que anteriormente había sido amplificada, en energía por unidad de tiempo, en este caso miliwatts (mW), que se grafica contra la temperatura hasta la cual se realizó el análisis. Esta técnica fue la empleada en el presente trabajo teniendo el instrumento una sensibilidad de 10  $\mu$ W.

Existen dos tipos de curvas termoanalíticas, exotérmicas y endotérmicas, ambos procesos se representan como picos en el termograma

con una temperatura máxima de la transición que están caracterizando. Así mismo, existen también otras propiedades termodinámicas que no se presentan como picos, éstas originan un cambio de la línea base o un cambio de pendiente. Así es posible caracterizar transiciones vítreas y la capacidad calorífica de un compuesto.

El calorímetro permite obtener distintos parámetros termodinámicos experimentalmente, como la capacidad calorífica y la entalpía. A continuación se presenta una ecuación para obtener la constante de celda del instrumento, a partir de la cual, uno puede obtener una ecuación para la obtención de la entalpía de un compuesto. La ecuación para obtener la constante de celda del Manual de Operación del Calorímetro es la siguiente (Du Pont, 1987):

$$E = \frac{\Delta H' \cdot m}{60 \cdot A} \quad (3.7)$$

donde E es la constante de celda,  $\Delta H'$  es la entalpía por unidad de masa (J/g), m es la masa de la muestra (en mg) y A es el área bajo la curva del termograma de flujo de calor versus tiempo (en mW  $\times$  min), como se muestra en la fig. 3.1).

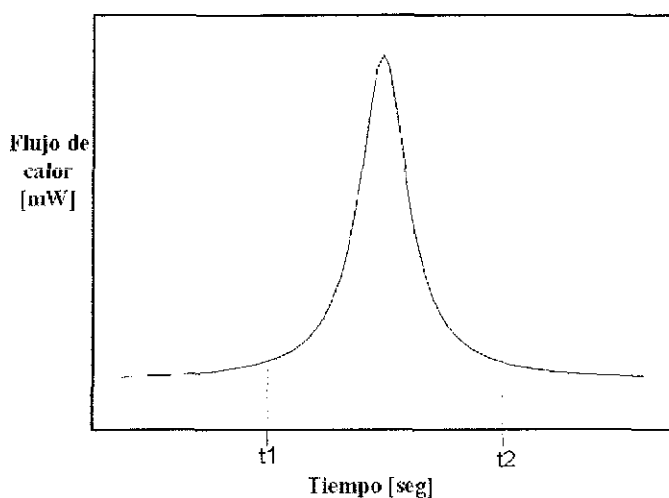


Fig. 3.1 Gráfica donde se muestra un proceso térmico del calor liberado con respecto a la temperatura.



El flujo de calor se mide como calor  $\Delta q$  por unidad de tiempo  $\Delta t$ , es decir:

$$q' = \frac{\Delta q}{\Delta t} \quad [mW] \quad (3.8)$$

de ahí que la entalpía pueda ser medida a partir de la siguiente integral,

$$\Delta H = \int_{t_1}^{t_2} q' dt \quad (3.9)$$

Cuando se realiza un análisis de calorimetría de barrido diferencial la muestra se somete a una velocidad de calentamiento específica  $v$ , que se especifica en [ $^{\circ}C / min$ ],

$$v = \frac{\Delta T}{\Delta t} = \frac{dT}{dt} \quad [^{\circ}C / min] \quad (3.10)$$

por lo tanto:

$$dt = \frac{1}{v} dT [min] = \frac{60}{v} dT [seg] \quad (3.11)$$

sustituyendo (3.11) en (3.9) se llega a,

$$\Delta H = \frac{60}{v} \int_{T_1}^{T_2} q' dT \quad (3.12)$$

ahora los límites de integración son  $T_1 = T(t_1)$  y  $T_2 = T(t_2)$  y el término dentro de la integral corresponde a [ $mW \times ^{\circ}C$ ] que es igual al área [ $a$ ] bajo la curva en un termograma de flujo de calor versus temperatura, dando como resultado,

$$\Delta H = \frac{60a}{v} \quad (3.13)$$

la constante de celda "E" es la constante de proporcionalidad entre el cambio en la entalpía por unidad de masa de la ecuación 3.13 obtenida experimentalmente ( $\Delta H/m$ ), y el valor reportado en la literatura para la muestra estudiada ( $\Delta H^{tablas}$ ), su valor se calcula haciendo un experimento con una muestra estándar (indio metálico puro), de la siguiente manera:

$$E = \frac{\Delta H^{tablas}}{\Delta H} \quad (3.14)$$

Conocido el valor de  $E$ , la entalpía se corrige así:

$$\Delta H = \frac{60a}{v} \cdot E \quad (3.15)$$

Comúnmente lo que se reporta es la entalpía por unidad de masa ( $\Delta H' = \Delta H/m$ ):

$$\Delta H' = \frac{60a}{mv} E \quad [J/g] \quad (3.16)$$

donde el área ( $a$ ) está dada en [ $mW \times ^\circ C$ ], la masa en [ $mg$ ] y la velocidad de calentamiento en [ $^\circ C/min$ ].

### 3.3 Espectroscopía Infrarroja (IR)

Las moléculas diatómicas proporcionan el mejor punto de partida para estudiar las vibraciones de las moléculas poliatómicas porque estas vibraciones se asocian a menudo y casi exclusivamente a las vibraciones de pares de átomos enlazados, por ejemplo, los movimientos de estiramiento de los grupos C-H, C-C, N-H, C=O etc. en la molécula de colágena; P-O (del grupo PO<sub>4</sub>), P-OH, etc., en hidroxiapatita; que son los principales constituyentes del tejido óseo (Lozano, 2002; Peña-Rico, 2002). Un excelente ejemplo de una molécula diatómica consiste en dos partículas puntuales con masas  $m_1$  y  $m_2$  unidas por un resorte sin peso que tiene una resistencia al estiramiento dada por una constante de fuerza  $k$  (figura 3.2).

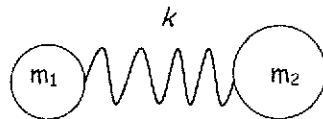


Fig 3.2 Dos masas puntuales unidas por un resorte.

Al estirar un poco el resorte y luego liberarlo, éste vibra con una frecuencia  $\nu$ . Las oscilaciones del resorte son armónicas simples y la frecuencia de su movimiento está dada por:

$$\nu = \frac{1}{2\pi} \sqrt{\frac{k}{\mu}} \quad (3.17)$$

donde la frecuencia  $\nu$  está dada en ciclos por segundo [hertz], la constante de fuerza  $k$  en  $[\text{Nm}^{-1}]$  y la masa reducida  $\mu$  en kilogramos [kg]:

$$\mu = \frac{m_1 m_2}{m_1 + m_2} \quad (3.18)$$

En un experimento de espectroscopía infrarroja, a la muestra se le hace incidir un haz de luz infrarroja (número de onda entre 4000 y 30  $\text{cm}^{-1}$ ) que es absorbida por la muestra cuando la frecuencia de la radiación incidente corresponde a una de las energías de transición vibracionales de la molécula o grupos de átomos enlazados. Clásicamente, la radiación IR del campo eléctrico oscilante de la onda electromagnética incidente se absorberá siempre que la molécula tenga un dipolo oscilante con una frecuencia que corresponda exactamente a la del campo eléctrico aplicado. Debido a que todas las moléculas (excepto las especies diatómicas homonucleares como  $\text{O}_2$  y  $\text{Br}_2$ ) tienen algunas vibraciones que provocan cambios del momento de dipolo, cada molécula tendrá un espectro IR característico.

El número de onda de la radiación infrarroja que se absorbe está dado entonces por:

$$\bar{\nu} = \frac{1}{\lambda} = \frac{\nu}{c}$$

$$\bar{\nu} = \frac{1}{2\pi c} \sqrt{\frac{k}{\mu}} \quad [\text{cm}^{-1}] \quad (3.19)$$

donde ( $c$ ) es la velocidad de la luz.

La cantidad de energía IR absorbida por un modo vibracional y la intensidad de la banda en el espectro de IR resultante dependen de la probabilidad de la transición vibracional, que a su vez depende del cambio en el momento de dipolo asociado con la transición.

La onda de radiación IR es una perturbación espacial y temporal (pero en un espacio recíproco espacial y temporal, con  $\lambda \nu = c$ ), cuando la onda atraviesa al material, toma la información espacial y temporal "x" y "t" (del espacio real) de la muestra y la traduce como un patrón de difracción, el cual tiene ésta información pero en el espacio recíproco (de energías y momentos).

La observación más importante acerca de la espectroscopía IR es que muchos grupos químicos comunes (en particular las agrupaciones diatómicas

como C-H, C=O, C-N y C-C, presentes en la molécula de colágena) absorben siempre la radiación IR en aproximadamente las mismas energías, sin importar las moléculas en que se encuentran. Esta observación ha conducido al concepto de frecuencias de grupo, que es la base de la espectroscopía IR como técnica analítica importante en la identificación cualitativa rápida de los compuestos químicos. El origen de las frecuencias de grupo reside en el hecho de que la ecuación 3.19 es válida para las vibraciones de fragmentos diatómicos en moléculas poliatómicas (como la colágena) ya que las constantes de fuerza ( $k$ ) y las masas reducidas ( $\mu$ ) permanecen virtualmente sin cambio al pasar de molécula a molécula. En la tabla 3.1 se muestran las regiones en que se registran bandas de absorción en el espectro infrarrojo de diferentes estructuras secundarias de moléculas orgánicas, entre ellas, la colágena.

Tabla 3.1.

Asignación de las bandas de absorción de la región de la Amida I para diferentes estructuras secundarias.

ESTRUCTURA SECUNDARIA	NÚMERO DE ONDA (cm <sup>-1</sup> )
$\alpha$ Hélices	1650-1658 1630-1640 (posiblemente)
Hélices $3_{10}$	~1640 (posiblemente)
Hélices izquierdas	1660-1670 (poli- $\beta$ -benzil-aspartato)
Hélices Poli (L-Pro)	~1630 1630,1644,1660 (colágena)
Hoja $\beta$	1670-1680 1620-1640 (varios componentes)
Vueltas	1680-1700 (varios componentes)
Giros y Regiones desordenadas	1645-1655 (¿varios componentes?)

El planteamiento de un oscilador armónico simple es una aproximación. La mecánica cuántica proporciona una relación más rigurosa dada por la ecuación 3.20:

$$E_n = \left(n + \frac{1}{2}\right) \frac{h}{2\pi} \sqrt{\frac{k}{\mu}} \quad n = 0, 1, 2 \dots \quad (3.20)$$

esta ecuación suele abreviarse así:

$$E_n = \left(n + \frac{1}{2}\right) h\nu \quad n = 0, 1, 2 \dots \quad (3.21)$$

En la expresión anterior, la energía de la transición fundamental ( $n=0 \rightarrow n=1$ ) corresponde a  $E = h\nu = hc\bar{\nu}$ , la cual está en congruencia con la ecuación 3.19 para el oscilador armónico simple. Desde el punto de vista cuántico, la energía de transición ( $E$ ) entre el estado base vibracional ( $n=0$ ) de una molécula y su primer nivel vibracional excitado ( $n=1$ ) está cuantizada ( $E = h\nu = hc\bar{\nu}$ ), y a la transición vibracional correspondiente se le llama *fundamental*.

La diferencia entre los modelos de la mecánica cuántica y del oscilador armónico simple clásico es que cuando  $\nu=0$  en la ecuación 3.17, la molécula tiene aún alguna energía, que se conoce como energía del punto cero:

$$E_0 = \frac{1}{2} h\nu \quad (3.22)$$

Los movimientos vibracionales de todas las moléculas, aún los de las diatómicas, no son estrictamente armónicos. En el caso del modelo de la mecánica cuántica, esta situación resulta en espaciamientos entre los niveles ( $n=0 \rightarrow n=1$ ,  $n=1 \rightarrow n=2$ , etc.) desiguales (como lo son en el oscilador armónico simple), y los niveles superiores se aproximan más y más a los valores en aumento del número cuántico vibracional  $n$ .

Las anarmonías de las vibraciones moleculares van desde alrededor de  $+1 \text{ cm}^{-1}$ , para vibraciones en las que intervienen átomos pesados, hasta más de  $+100 \text{ cm}^{-1}$ , en vibraciones relacionadas con átomos de H (por ejemplo,  $\text{H}_2$ ,  $+234 \text{ cm}^{-1}$ ;  $\text{HCL}$ ,  $+104 \text{ cm}^{-1}$ ). Se han registrado anarmonías de hasta  $+30 \text{ cm}^{-1}$  en las vibraciones de estiramiento del C-O en complejos metálicos de carbonilos. Después de agregar los factores de corrección a las posiciones de las vibraciones fundamentales del C-O observadas, se encuentra que las constantes de fuerza del C-O aumentan en  $+0.5 \text{ Nm}^{-1}$  aproximadamente.

En resumen, la espectroscopía IR es el resultado de la *absorción* de la radiación IR por las moléculas en vibración y tiene que ver con las transiciones fundamentales, esto es, aquellas que comprenden cambios desde el estado base ( $n=0$ ) hasta el nivel ( $n=1$ ). La *regla de selección* rigurosa para las actividades IR se expresa matemáticamente como  $\Delta n = \pm 1$ , donde  $+1$  significa absorción y  $-1$  significa emisión. Sin embargo, debido a que muchas vibraciones son anarmónicas, esta regla de selección estricta deja de cumplirse y se detectan también otras características más débiles (principalmente sobretonos y combinaciones) en los espectros (Butler y Harrod, 1992).

### 3.4 Espectroscopía PIXE

En los átomos, los elementos se encuentran distribuidos en capas o niveles discretos de energía. Por tradición histórica, a esas capas o niveles de energía se les ha denominado K, L, M, N, etc. A los electrones contenidos en la capa K les corresponde la menor energía, aumentando para las siguientes capas. A los niveles de energía se les ha asignado el número cuántico,  $n$ , de tal manera que al nivel K le corresponde  $n = 1$ , al L,  $n = 2$ , al M,  $n = 3$ , y así sucesivamente.

Todas las capas, con excepción del nivel K, constan a su vez de subniveles de energía. El número de subniveles de energía del nivel  $n$ -ésimo está determinado por:  $l = 2n - 1$ , donde  $l$  es el número cuántico orbital. Así el nivel L, con  $n = 2$ , está dividido en  $l = 3$  subniveles. Los subniveles se denotan agregando subíndices al símbolo de la capa, de tal manera que los tres subniveles de la capa L se designan como  $L_1$ ,  $L_2$ , y  $L_3$ .

Además de los números cuánticos  $n$  y  $l$ , existen el número cuántico magnético,  $m$ , y el número cuántico de spin,  $s$ . El número cuántico magnético cumple con la condición:  $-l \leq m \leq l$ , y existen  $(2l + 1)$  valores posibles para  $m$ . Los valores posibles del número cuántico de spin son  $\pm \frac{1}{2}$ .

En un átomo en estado base o de mínima energía, todos los electrones están distribuidos de tal manera que cumplen el Principio de Exclusión de Pauli, i.e., que los electrones del átomo se encuentran en estados tales que ninguno de ellos tiene sus cuatro números cuánticos iguales.

Cuando un electrón recibe energía, es posible que escape del átomo, dejándolo ionizado y excitado. Entonces, algún electrón de las capas superiores tiende a ocupar el estado vacante, efectuando una transición, y emitiendo la energía excedente en forma de un fotón. La energía del fotón emitido depende del átomo que se trate, y es precisamente igual a la diferencia de energía de los subniveles de energía del átomo entre los cuales se efectúa la transición. Es importante aclarar que no todas las transiciones son posibles, ya que existen transiciones prohibidas. Otra alternativa por medio de la cual el átomo puede regresar a su estado base, es la emisión de un electrón secundario. A este fenómeno se le denomina Efecto Auger.

Puesto que las energías de los rayos X emitidos al efectuarse una transición son características de cada átomo, a partir del conjunto de energías de los rayos X que se observan es posible obtener información de los elementos y su proporción en la composición de un material.

Los rayos X son fotones con longitudes de onda que se encuentran entre  $10^{-8}$  y  $10^{-11}$  m, y sus energías corresponden con las energías de los fotones emitidos en las transiciones debidas a vacancias en las capas K y L de los átomos. Los fotones o rayos X emitidos en una transición se agrupan en relación con la capa hacia la cual se efectúa la transición y el subnivel desde el cual se produce. De esta manera, el grupo de rayos X debidos a una vacante en la capa K, se denominan rayos X K, y se pueden tener rayos X  $K_{\alpha 1}$ , X  $K_{\alpha 2}$ , X  $K_{\beta 1}$ , y X  $K_{\beta 2}$ , donde  $\alpha 1$ ,  $\alpha 2$ ,  $\beta 1$ , y  $\beta 2$ , corresponden a las transiciones que ocurren de  $L_3$  a K, de  $L_2$  a K, de  $M_3$  a K y de  $M_2$  a K.

La emisión de los rayos X K es isotrópica, en intensidad y dirección debido a que la forma del orbital de la capa K es esférica, mientras que para los rayos X L no lo es, debido a las simetrías propias de los orbitales de esta capa. La intensidad de los rayos X L disminuye en la dirección del haz de partículas que incide en el material.

La ionización y excitación de los átomos puede producirse mediante radiación electromagnética, como luz ultravioleta, rayos X o rayos Gamma, o bien por la interacción con partículas, como por ejemplo electrones o iones. De ambas formas se les proporciona energía a los electrones ligados a las capas atómicas.

La ionización de un átomo depende de la sección eficaz de ionización, que no es más que la probabilidad que existe de ionizar un átomo.

El espectro PIXE consiste de una serie de picos correspondientes a los rayos X característicos elementales emitidos en las transiciones K, L y M, superpuestos a la radiación de fondo (la disminución en la intensidad de los rayos X, resulta de la atenuación debida a interacción entre los rayos X y los átomos del mismo material, esta atenuación se da por efecto fotoeléctrico, efecto Compton y fluorescencia a bajas energías; esto aunado a la radiación de frenado "bremsstrahlung" y a la emisión de rayos gamma, los cuales producen efecto Compton en el detector y contribuyen a la radiación de fondo).

En el espectro PIXE la posición de los picos es propia de las transiciones que dan lugar a la emisión de rayos X característicos del elemento, por lo cual su posición en el espectro es la misma independientemente de la profundidad a la cual se hallen los elementos. La cantidad de fotones o rayos X producidos es proporcional a la concentración del elemento (Ruvalcaba, 1993).

### 3.5 Difracción de rayos X (DRX)

#### Ley de Bragg

En 1912 W. L. Bragg dio la primera interpretación matemática de las posiciones de los puntos en un patrón de difracción de rayos X de un cristal. Para obtener la ley de difracción de Bragg, al cristal lo podemos representar por una familia de planos perpendiculares a su distancia interplanar  $d$  y paralelos entre sí. En este modelo, un haz de rayos X (con longitud de onda  $\lambda$ ) incide sobre los planos de reflexión en un ángulo  $\theta$ . El haz es dispersado por reflexión de los planos con un mismo ángulo  $\theta$  y da lugar a máximos de difracción por la interferencia constructiva de las ondas dispersadas por los planos. Se asume que la distancia del punto de observación a la muestra es muy grande en comparación con  $d$ , así el camino del haz dispersado es esencialmente paralelo. Y como se tiene un gran número de planos, únicamente se observa la interferencia constructiva cuando las ondas reflejadas están perfectamente en fase (máximos alineados con máximos, nodos con nodos, y valles con valles), ver fig. 3.3.

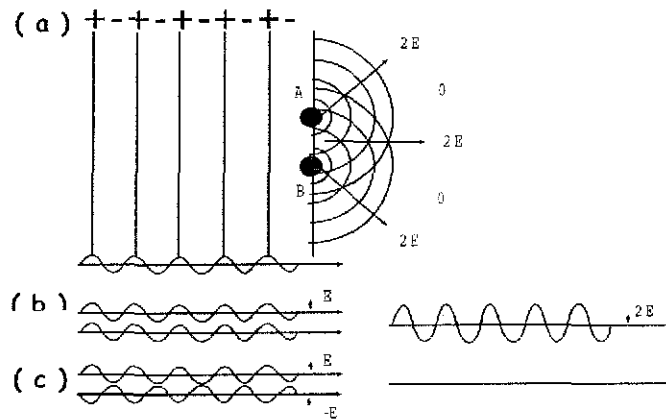


Fig. 3.3 (a) Dos puntos colocados en el camino de un frente de onda actúan como centros dispersores. (b) Las amplitudes  $E$  de las ondas dispersadas se suman para dar una nueva onda cuya amplitud es  $2E$ . (c) Las que están fuera de fase interfieren destructivamente dando como resultado una con amplitud igual a cero (Esquema tomado de Van Holde, Johnson and Ho, 1998).



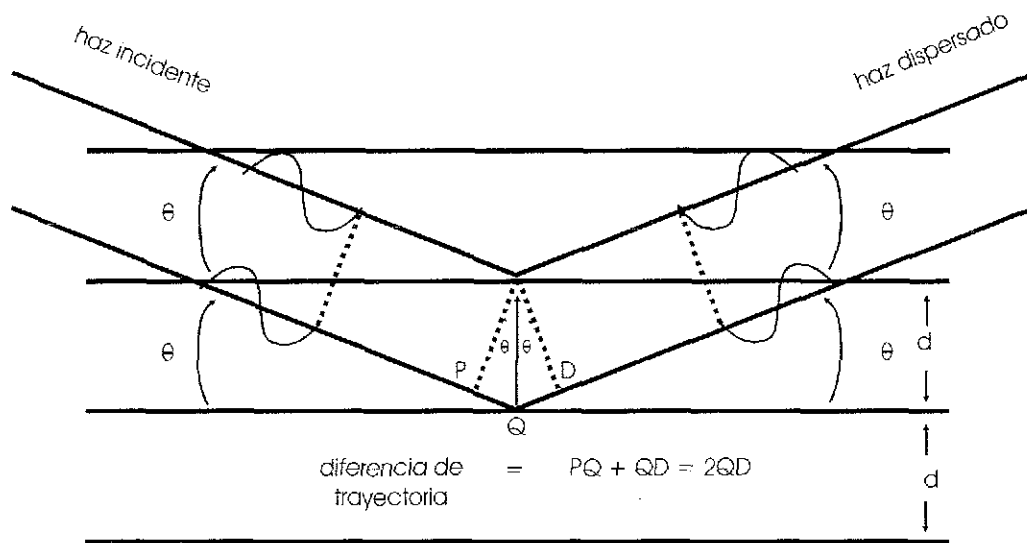


Fig. 3.4 Ley de Bragg (Esquema tomado de Van Holde, Johnson and Ho, 1998)

Esto sólo ocurre cuando la diferencia entre la longitud de trayectoria del haz incidente y la del haz reflejado de cada plano,  $PQ + QD$ , es igual a un múltiplo entero  $n$  de la longitud de onda de los rayos X incidentes (ver figura 3.4).

$$PQ + QD = 2QD = n\lambda \quad (3.23)$$

dado que  $PQ = QD$ .

Por simple relación de trigonometría, podemos relacionar la diferencia de trayectoria con la distancia interplanar  $d$  (fig. 3.4),

$$QD = d \sin \theta \quad (3.24)$$

Sustituyendo la ecuación 3.24 en la ecuación 3.23, obtenemos la Ley de difracción de Bragg.

$$2d \sin \theta = n\lambda \quad (3.25)$$

o bien:

$$2 d_{hkl} \sin \theta = \lambda \quad (3.26)$$

haciendo  $d_{hkl} = d/n$ , donde  $d_{hkl}$  es en general un submúltiplo entero de la distancia entre planos  $d$ . Los índices  $hkl$  son una notación para indicar la orientación de los planos en el espacio y se conocen como índices de Miller. La expresión 3.26 permite conocer la "distancia"  $d_{hkl}$  de la familia de planos, como función del ángulo de difracción  $\theta$  (que comúnmente es lo que se mide experimentalmente) y la longitud de onda  $\lambda$ .

De acuerdo con el arreglo cristalino de un material dado satisfaciendo la ley de Bragg en un experimento con rayos X, se puede obtener un conjunto de "distancias"  $d_{hkl}$  e intensidades  $I_{hkl}$  que lo caracterizan. Por ejemplo la calcita y la aragonita, ambos son minerales con la misma fórmula química ( $\text{CaCO}_3$ ), pero tienen arreglos cristalinos diferentes, en consecuencia diferente forma de satisfacer la ley de Bragg, y por lo tanto diferentes conjuntos de "distancias"  $d_{hkl}$  e intensidades  $I_{hkl}$  característicos. Estos conjuntos de "distancias" e intensidades se han colectado para miles de compuestos cristalinos orgánicos e inorgánicos en el banco de datos ICDD (International Centre for Diffraction Data). Así, cada ficha ICDD correspondiente a un arreglo específico de átomos en un sólido cristalino, es útil para llevar a cabo su identificación, de la misma manera que una huella digital identifica a una persona.

### 3.6 Microscopía electrónica de barrido de bajo vacío (LVSEM)

Para obtener una imagen por microscopía electrónica, la muestra sólida es barrida según un modelo raster con un haz de electrones muy fino que viaja a lo largo de una columna donde se ha practicado un alto vacío. Un raster es un modelo de barrido similar al utilizado en un tubo de rayos catódicos, en el que un haz de electrones barre la superficie en línea recta, vuelve a la posición inicial y es desplazado hacia abajo una distancia establecida. Este proceso se repite hasta que el área deseada de la superficie ha sido barrida. Al barrer la superficie con una pistola de electrones de energía elevada se producen diversos tipos de señales. Estas señales incluyen electrones retrodispersados, secundarios y Auger, rayos X característicos, además, fluorescencia de rayos X y otros fotones de diversas energías. Todas estas señales se han utilizado en estudios de superficies, pero las más usuales son las que corresponden a electrones retrodispersados y secundarios, que sirven como base a la

microscopía de barrido de electrones. La señal de rayos X característicos se utiliza para llevar al cabo análisis de composición elemental.

La microscopía de bajo vacío sigue el mismo principio que la microscopía electrónica de barrido convencional, sin embargo presenta algunas variantes. Se ejerce un bajo vacío en la vecindad de la muestra analizada, los electrones incidentes y el aire (oxígeno, nitrógeno, etc.) en la vecindad de la muestra chocan unas con otras, ionizando las moléculas de aire y neutralizando los electrones recolectados sobre la muestra. De esta manera, la microscopía por la técnica de LVSEM permite observar muestras no conductoras, lo que la hace ideal para observar material biológico sin tratamiento alguno (como es el caso del tejido óseo).

### 3.7 Dispersión de rayos X a bajo ángulo (SAXS)

Principio de la dispersión a bajo ángulo

De la ley de Bragg es fácil ver que a menores ángulos, mayor será la distancia  $d$  observada (con  $\lambda$  fija). De modo que para ángulos grandes (de  $5^\circ$ - $90^\circ$ ) las distancias características serán de  $1 - 10 \text{ \AA}$  (estructuras cristalinas), mientras que con ángulos pequeños (menores a  $5^\circ$ ), las distancias serán de  $10 - 1000 \text{ \AA}$  (distribuciones atómicas como tamaño de granos, espacios vacíos, polímeros, membranas celulares, coloide, sistemas biológicos, etc.)

La señal que resulta con ángulos grandes es la llamada dispersión de Bragg y el análisis de estos datos consiste en determinar las posiciones de los picos y sus intensidades. En tanto que para ángulos pequeños, la señal que se analiza es una dispersión difusa que consiste de un solo pico muy ancho o de un decrecimiento monotónico, y el análisis de datos está dado sólo por los perfiles de estas señales.

La dispersión de rayos X a bajo ángulo trata a los materiales como un medio continuo y se caracteriza porque es una técnica que se basa en analizar la variación de la intensidad de un haz de rayos X dispersado por un material a un ángulo muy pequeño con respecto a la dirección en que incidió. Los electrones que componen el material son los principales responsables del fenómeno de dispersión. Cuando se tiene una partícula, todos los electrones que la forman dispersan los rayos X produciendo ondas esféricas que

interfieren dando una intensidad dispersada que decrece al aumentar el ángulo de dispersión. La intensidad dispersada tiene su máximo para un ángulo de dispersión igual a cero, y en este caso es proporcional al número de electrones en la partícula (fig. 3.5). De esta manera, si se tiene una pequeña partícula de tejido colagénico y otra de tejido con alto contenido mineral (hidroxiapatita), ésta última dispersará los rayos X dando una señal de mayor intensidad, ya que los átomos que la componen poseen en conjunto un mayor número de electrones. La diferencia de fase entre los haces dispersados de rayos X (con longitud de onda  $\lambda$ ) es muy prominente cuando el seno del ángulo de dispersión aumenta dentro del intervalo  $(0, \lambda/2D)$  siendo  $D$  el diámetro de la partícula. De esta manera, para la radiación  $\text{Cu K}\alpha$  ( $\lambda = 1.54056 \text{ \AA}$ ) y partículas de  $300 \text{ \AA}$  el ángulo límite resulta ser  $0.147^\circ$  aproximadamente (Kajiwara e Hiragi, 1996).

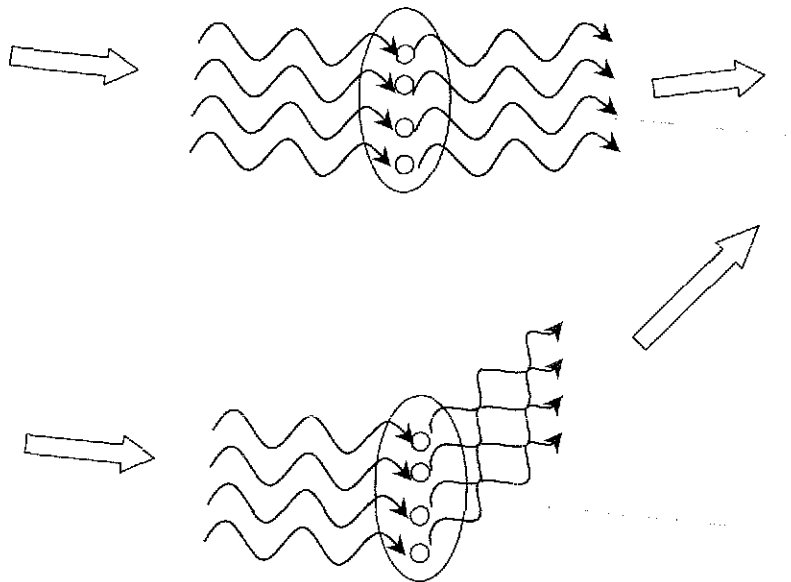


Figura 3.5: Dibujo esquemático que muestra que la amplitud  $A$  de la radiación dispersada es proporcional al número de electrones  $n_e$  (centros dispersores) para ángulos de dispersión pequeños (interferencia constructiva), mientras que para ángulos grandes los efectos de interferencia se ven pronunciados y la amplitud de la onda dispersada decae.

Los haces dispersados por los electrones son coherentes y la intensidad dispersada es igual al cuadrado de la amplitud que resulta de sumar todas las amplitudes dispersadas por cada electrón. La fase de estas amplitudes

depende de la posición de cada electrón en el espacio, de modo que la amplitud del haz dispersado es:

$$F(q) = \int_0^{\infty} \rho(\vec{r}) e^{-i\vec{q}\cdot\vec{r}} d\vec{r} \quad (3.27)$$

donde  $\rho(\vec{r})$  es la densidad electrónica,  $\vec{r}$  el vector de posición y

$$\vec{q} = \Delta K = K_f - K_i \quad (3.28)$$

que es la diferencia entre los vectores de propagación del haz dispersado y el haz incidente. La magnitud del vector  $\vec{q}$  está dada por

$$q = \frac{4\pi \sin \theta}{\lambda} \quad (3.29)$$

La intensidad dispersada está dada por el cuadrado de la amplitud

$$I(\vec{q}) = \int_0^{\infty} \int_0^{\infty} \rho(\vec{r}_2) \rho(\vec{r}_1) e^{-i\vec{q}\cdot(\vec{r}_2 - \vec{r}_1)} d\vec{r}_2 d\vec{r}_1 \quad (3.30)$$

donde  $\rho(\vec{r}_1)\rho(\vec{r}_2) = V\gamma(\vec{r}_2 - \vec{r}_1)$  es la densidad de pares de electrones en el volumen  $V$  con una separación  $r = r_2 - r_1$  y  $\gamma(r)$  es la llamada función de correlación de pares. En todos los casos, los elementos que dispersan se encuentran distribuidos al azar, ya que si estuviesen ordenados no se podría observar dispersión de rayos X a ángulos pequeños (ya que no se registrarían mayores cambios de densidad). En ese caso se tiene la ecuación de Debye (ver apéndice B)

$$I(\vec{q}) = \int_0^{\infty} \int_0^{\infty} \rho(\vec{r}_2) \rho(\vec{r}_1) \frac{\text{sen}(qr)}{qr} d\vec{r}_2 d\vec{r}_1 \quad (3.31)$$

### *Aproximación de Guinier*

Partiendo de la ecuación de Debye (ver apéndice B), se puede escribir haciendo el desarrollo en serie de McLaurin de

$$\frac{\text{sen}(qr)}{qr} = 1 - \frac{1}{6} q^2 r^2 + \dots \quad (3.32)$$

sustituyendo en la ecuación de Debye solamente los dos primeros términos de la serie (que es la aproximación de ángulos pequeños) se tiene

$$\begin{aligned}
 I(q) &= \iint \rho(\vec{r}_2) \rho(\vec{r}_1) d\vec{r}_2 d\vec{r}_1 - \frac{q^2}{6} \iint \rho(\vec{r}_2) \rho(\vec{r}_1) |\vec{r}_2 - \vec{r}_1|^2 d\vec{r}_2 d\vec{r}_1 \\
 &= \iint \rho(\vec{r}_2) \rho(\vec{r}_1) d\vec{r}_2 d\vec{r}_1 \left( 1 - \frac{q^2}{6} \frac{\iint \rho(\vec{r}_2) \rho(\vec{r}_1) |\vec{r}_2 - \vec{r}_1|^2 d\vec{r}_2 d\vec{r}_1}{\iint \rho(\vec{r}_2) \rho(\vec{r}_1) d\vec{r}_2 d\vec{r}_1} \right) \quad (3.33)
 \end{aligned}$$

si se pone el origen de coordenadas en el centro de masa de la partícula

$$I(q) = \left( \int \rho(\vec{r}) dr \right)^2 \left( 1 - \frac{q^2}{3} \frac{\int \rho(\vec{r}) r^2 dr}{\int \rho(\vec{r}) dr} \right) = I(0) \left( 1 - \frac{q^2}{3} R_G^2 \right) \quad (3.34)$$

Esta última ecuación puede interpretarse como los dos primeros términos de la serie de McLaurin de una función exponencial, que es la curva de  $I(q)$  contra  $q$  para ángulos pequeños (ley de Guinier)

$$I(q) = I_e n^2 e^{-\frac{R_G^2 q^2}{3}} \quad (3.35)$$

donde  $I_e$  es la intensidad dispersada por un electrón,  $n$  el número de electrones en la partícula, ya que  $I(0) = \left( \int \rho(\vec{r}) dr \right)^2 = I_e n^2$ .  $R_G$  es el radio de giro (o radio de Guinier) de la partícula.

La curva de Guinier tiene la característica de que la pendiente de la gráfica  $\log I(q)$  vs  $q^2$  es proporcional al radio de giro al cuadrado.

$R_G$  es un parámetro auxiliar para definir tamaño independientemente de la forma, de modo que si  $I_x$  es el momento de inercia con respecto al eje  $x$  y  $m$  es la masa, entonces  $R_G$  se interpreta como una distancia de inercia.

El radio de giro está relacionado con el momento de inercia de la siguiente manera

$$R_G = \sqrt{\frac{I_x}{m}} \quad (3.36)$$

El radio de giro depende de las dimensiones y de la forma de la partícula. A continuación se pueden comparar las ecuaciones entre los radios de giro de algunos cuerpos homogéneos y sus dimensiones:

Esfera de radio $R$	$R_G^2 = \frac{3}{5} R^2$
Cascarón esférico con radios $R_1 > R_2$	$R_G^2 = \frac{3}{5} \frac{R_1^5 - R_2^5}{R_1^3 - R_2^3}$
Elipse con semiejes $a$ y $b$	$R_G^2 = \frac{a^2 + b^2}{4}$
Elipsoide con semiejes $a, b, c$	$R_G^2 = \frac{a^2 + b^2 + c^2}{5}$
Pirámide triangular con orillas $A, B, C$	$R_G^2 = \frac{A^2 + B^2 + C^2}{12}$
Cilindro de base elíptica con semiejes $a$ y $b$ , y con altura $h$	$R_G^2 = \frac{a^2 + b^2}{4} + \frac{h^2}{12}$
Cilindro hueco con radios $R_1 < R_2$ y altura $h$	$R_G^2 = \frac{R_1^2 + R_2^2}{2} + \frac{h^2}{12}$

*Partículas no isométricas. Curvas de Kratky*

Partícula cilíndrica de radio  $R_c$  y altura  $L$

$$I(q) = \frac{\pi N v^2}{q V L} \rho_0^2 e^{-\frac{R_c^2 q^2}{4}} \quad \left( \frac{2\pi}{L} < q < \frac{1}{R_c} \right)$$

De aquí se obtiene lo que se llama la primera gráfica de Kratky:  $\log\{q I(q)\}$  vs  $q^2$ , fig. 3.6.

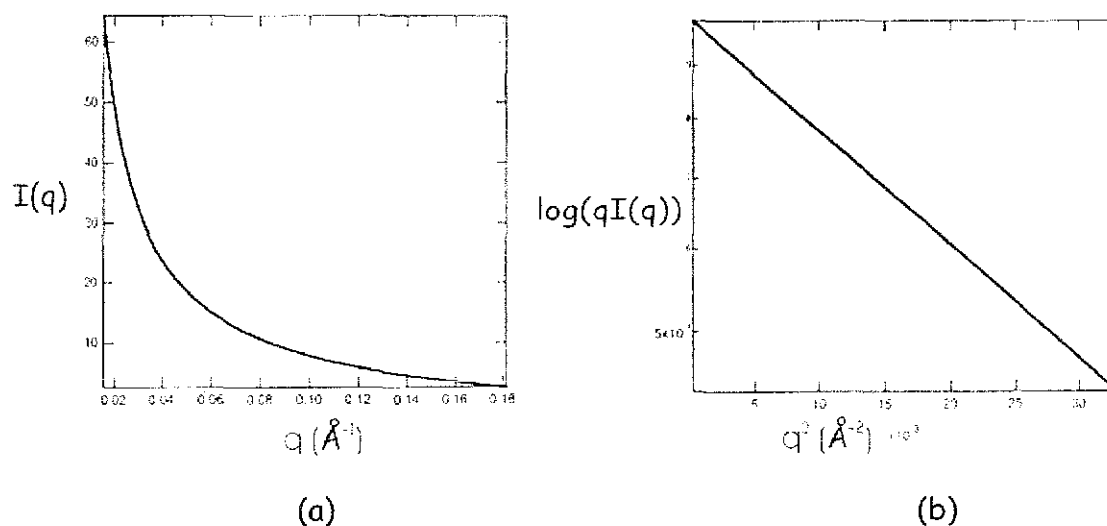


Figura 3.6 Partícula cilíndrica. (a) muestra la gráfica de dispersión (b) muestra la primera gráfica de Kratky.

Partículas planas de área  $A$  y espesor  $t$

$$I(q) = \frac{2\pi N v^2}{q^2 V A} \rho_0^2 e^{-\frac{t^2 q^2}{12}} \quad \left( \frac{2\pi}{\sqrt{A}} \leq q \leq \frac{1}{t} \right)$$

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN



De aquí se obtiene la que se llama la segunda gráfica de Kratky:  $\log\{q^2I(q)\}$  vs  $q^2$ , fig. 3.7.

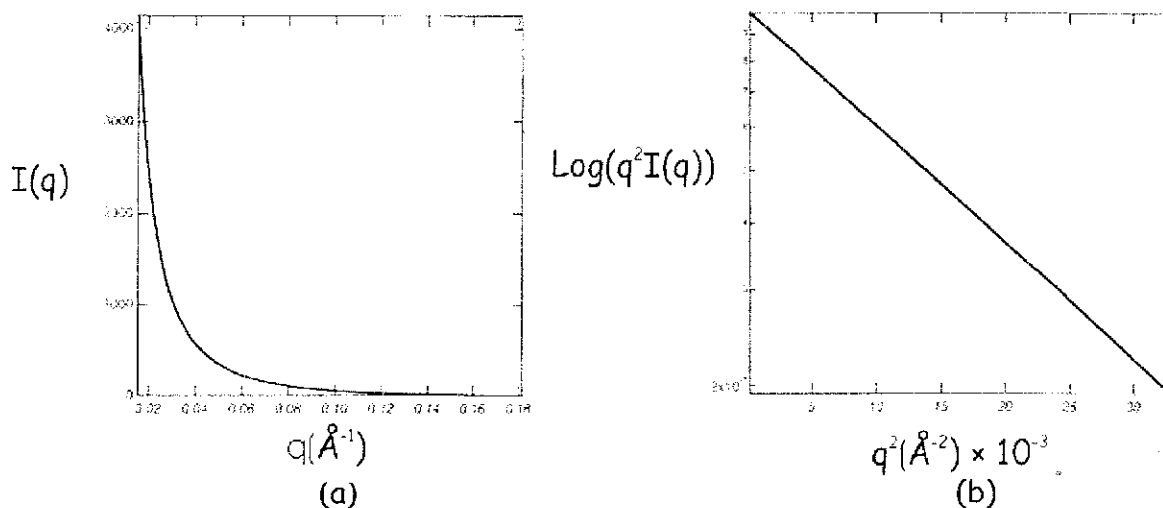


Figura 3.7 Partícula plana. (a) muestra la gráfica de dispersión (b) muestra la segunda gráfica de Kratky.

La gráfica de Kratky, correspondiente a esferas muestra un pico, como se observa en la figura 3.8. Así, la curva de dispersión para una proteína globular plegada y más o menos esférica debería dar un pico similar en una gráfica de Kratky.

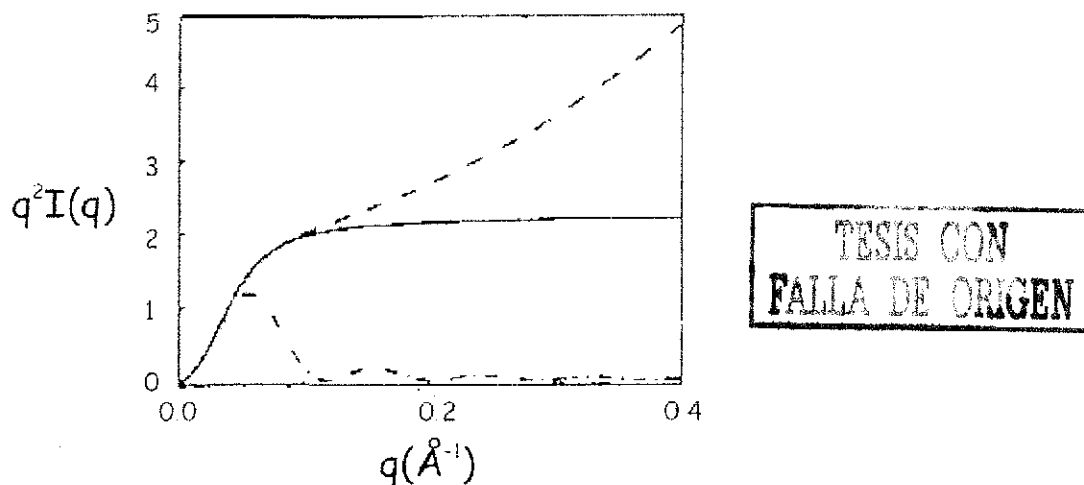


Figura 3.8: Gráficas de Kratky  $I(q)q^2$  vs  $q$ , calculadas de funciones modelo de SAXS derivadas analíticamente. Para: esfera (gráfica inferior con máximos), cuerda rígida Gaussiana (gráfica intermedia con meseta casi constante), y cuerda con estructura continua (gráfica superior, creciente). Todas tienen el mismo peso molecular y un  $R_g$  de 60 Å.

La posición del pico dependerá del  $R_G$  de la partícula; para valores crecientes de  $R_G$  la posición del pico se recorrerá a valores pequeños de  $q$ . De este análisis podemos concluir que un pico en la gráfica Kratky indica una estructura globular compacta, mientras que la ausencia del pico indica una estructura más parecida a una cuerda (Kataoka et al., 1993a, b)

### *Ley de Porod*

Para la región final de la curva (zona de ángulos un poco mayores), Porod propuso un polinomio del tipo siguiente

$$I(q) = \frac{2\pi\rho S}{q^4} + B \quad (3.37)$$

En donde  $\rho$  es la densidad,  $S$  es la superficie específica y  $B$  es el "fondo" debido a la electrónica del aparato (ruido). Nótese que no se hace ninguna hipótesis sobre la forma de las entidades que dispersan los rayos X.

De la ecuación 3.37 se puede observar que

$$q^4 I(q) = 2\pi\rho S + Bq^4 \quad (3.38)$$

Por lo tanto, de la ordenada al origen de la gráfica de  $q^4 I(q)$  vs  $q^4$  se puede determinar  $S$  (la superficie específica).

Si se toma en cuenta la curva completa, entonces

$$I(q) = \int V\rho^2 y(r) \frac{\text{sen}(qr)}{qr} 4\pi r^2 dr \quad (3.39)$$

en donde  $y(r)$  es la función característica y por lo tanto está relacionada con las funciones de distribución de tamaños de las partículas (poros o heterogeneidades) dispersantes. Mediante una aproximación con funciones matemáticas conocidas como splines, se logra obtener dicha distribución de tamaños y el perfil de densidad electrónica que la origina. Mediante este método de deconvolución se reducen las oscilaciones debidas a las transformadas de Fourier (Glatter, 1982).

Gracias al SAXS, es posible medir la superficie específica, el radio de giro, la distribución de tamaños de partículas (poros o heterogeneidades), el perfil de densidades electrónicas y la dimensión fractal de las superficies; entre otras cosas.

### Dimensión Fractal

Recientemente se ha logrado establecer una correspondencia entre la pendiente de la curva  $\log I(q)$  vs  $\log(q)$  y la dimensión fractal que explica las desviaciones a la ley de Porod observadas en materiales fractales. Esta correlación se expresa mediante la siguiente ecuación:  $\log I(q) \propto (-df) \log(q)$  ó  $I(q) \propto q^{-df}$ ; donde  $df$  es la dimensión del objeto. La figura 3.9 ilustra los aspectos de la estructura que se pueden estudiar en las diferentes regiones de  $q$ .

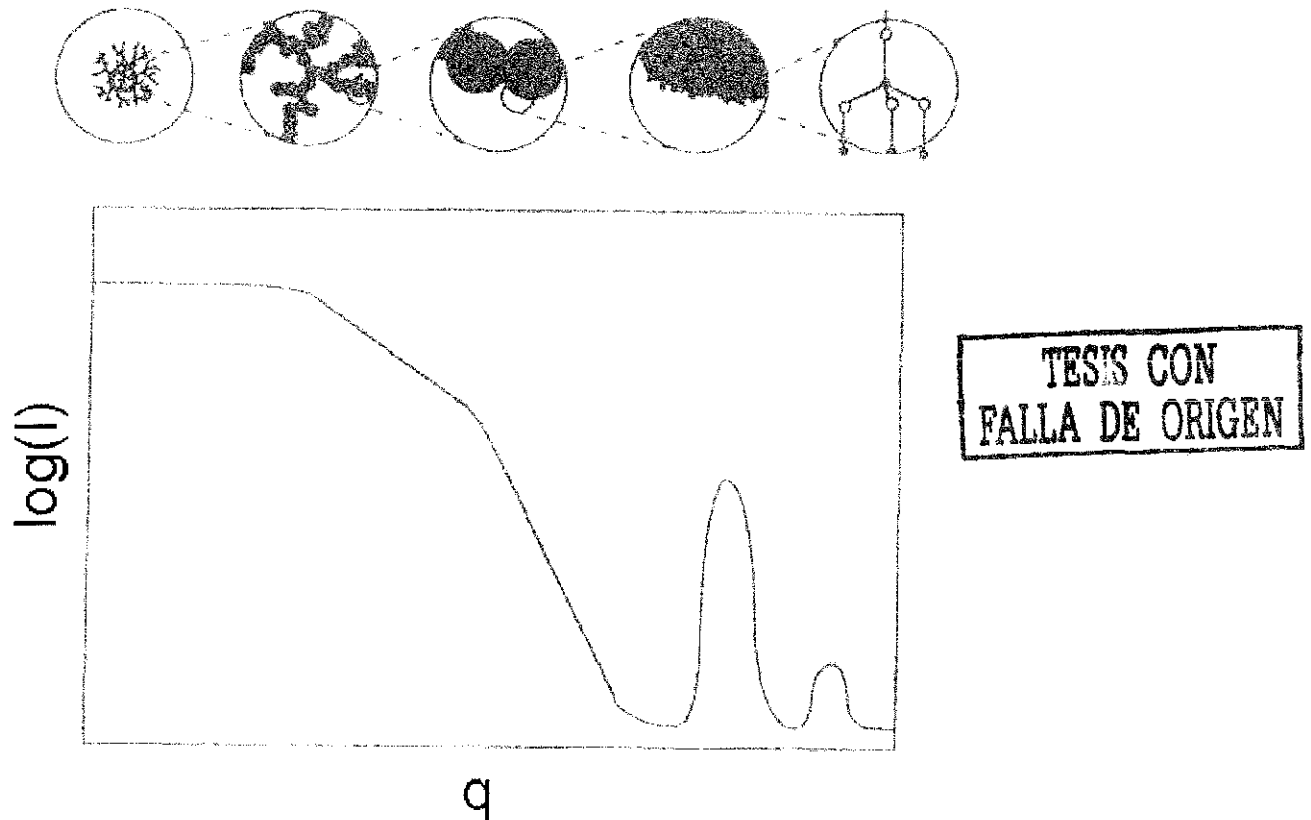


Figura 3.9: Ilustración esquemática que muestra la dispersión en función de  $q$  y los aspectos de la estructura que se pueden estudiar en las diferentes regiones de  $q$  (Harrison, 1995).

La dimensión fractal está íntimamente relacionada con la conectividad del arreglo de la estructura de un objeto.

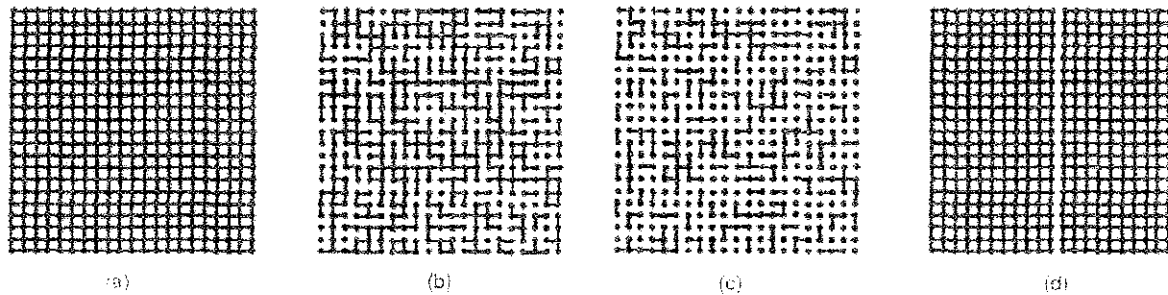


Figura 3.10: (a) rejilla con gran conectividad, comparada con (b) la cual tiene menor conectividad y con (c) que es la de menor conectividad. (d) dos rejillas que aunque tienen casi la misma conectividad que (a), al estar seccionadas no hay conectividad entre ellas.

La Figura 3.10, muestra una secuencia de rejillas con diferente conectividad. A mayor dimensión fractal, mayor conectividad.

## Estructura fractal

### *Leyes de dispersión dimensional*

Las partículas pueden describirse en términos de su dimensión, así una línea (como una cuerda), tiene dimensión 1; una superficie (como un disco), tendrá dimensión 2 y un volumen (como una esfera), tendrá dimensión 3. Tal descripción dimensional implica que la carga del objeto al estar distribuida sobre una línea, una superficie, un volumen, etc., es proporcional a una potencia de la escala (tamaño) de observación "r" con que se mide el objeto. Si la escala "r" representa un elemento de longitud, superficie, volumen, etc. con un elemento de carga  $\Delta q$  (centro dispersor), entonces la densidad de carga se puede escribir como una potencia de "r". Por ejemplo, para el caso de una distribución volumétrica se tiene  $\rho = \frac{\Delta q}{V}$ , de modo que  $\Delta q \propto \rho r^3$ . Como la distribución de carga contenida en el objeto va a dispersar la radiación incidente, es natural esperar que exista una ley de dispersión que dependa de una potencia de "r".

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

Considérese la dispersión de una cuerda de longitud,  $L$ , y diámetro,  $D$ , vista a una escala de observación  $r$ , con  $r \propto 1/q$  (ya que "r" es equivalente a la "d" de la ley de Bragg). Entonces el número de elementos dispersores en la cuerda es  $L/r$  o proporcional a  $Lq$ . Y el número de electrones, por elemento dispersor, es proporcional al volumen irradiado, o sea a  $rD^2$  ó  $D^2/q$ .

Usando (ver fig. 3.5):

$$I(q) \propto N_p n_e^2 \quad (3.40)$$

donde

$I(q)$  = intensidad dispersada

$N_p(q^{-1})$  = número de elementos dispersores en el volumen irradiado y

$n_e^2(q^{-1})$  = cuadrado del número de electrones en el elemento dispersor

se tiene:  $I(q) \propto LD^4/q$  o sea un decaimiento en intensidad dispersada que va como  $q^{-1}$  para un objeto dimensión 1.

Para discos de diámetro,  $D$ , y espesor,  $t$ , en el orden de observación de,  $r \propto 1/q$ , el número de dominios dispersores es igual al área del disco,  $D^2$ , dividida entre el tamaño de dominio dispersor,  $r^2$  (tamaño superficial de observación), esto es:  $N_p = D^2/r^2 \propto D^2q^2$ . El número de electrones por dominio dispersor es proporcional al volumen de un dominio  $r^2t \propto t/q^2$ . Ahora la ecuación 3.40 se puede escribir como  $I(q) \propto D^2t^2/q^2$ , o  $I(q) \propto 1/q^2 = q^{-2}$ . Y de nuevo la dispersión es proporcional a  $q^{-df}$  donde  $df$  es la dimensión del objeto.

Análogamente al caso anterior del disco, para un objeto de masa fractal como un polímero enrollado (de manera que forme casi una superficie), la masa será proporcional a una potencia del tamaño de observación (donde el exponente es la dimensión), i.e. para un polímero largo enrollado (formando casi una superficie), de manera que la masa,  $m \propto R^2$ , o sea que la distancia de extremo a extremo  $R$  está dada por  $m^{1/2}$ . En este sentido un polímero Gaussiano enrollado es un objeto de dimensión 2. Si tal objeto es subdividido en elementos dispersores de tamaño  $r$ , el número de tales subdivisiones estará dado por  $R^2/r^2 = R^2q^2$  y como el objeto total es casi superficial (sin espesor), el número de electrones en un elemento es  $n_e \propto r^2 \propto 1/q^2$ . Entonces la ecuación (3.40) se convierte en  $I(q) \propto R^2/q^2$ , o  $I(q) \propto 1/q^{df}$  o  $I(q) \propto q^{-df}$ .

Partiendo de la ecuación (3.30) y considerando que para ángulos muy pequeños, al hacer la aproximación de Guinier,  $I(q) \propto q^2$  (ec. 3.34). Por otro lado, para ángulos más grandes (Ley de Porod, ec. 3.37),  $I(q) \propto q^{-4}$ . Por lo tanto, cercana a la región de Porod, es posible obtener la dimensión fractal de la muestra, ya que para estas escalas de partículas, la dimensión fractal, está dada simplemente por fluctuaciones en la densidad electrónica.

Así se llega a que, para una masa fractal (Schmidt, 1991):

$$M(R) \propto R^{df} \quad (3.41)$$

o bien

$$I(q) \approx q^{-df} \quad (\text{en la región intermedia de } q) \quad (3.42)$$

Para una superficie fractal (Harrison, 1995)

$$I(q) \approx q^{(df-6)} \quad (3.43)$$

En la siguiente tabla se resumen las posibilidades de la técnica de dispersión de rayos X a bajo ángulo.

Con SAXS se pueden obtener	Con SAXS no se obtiene
Radio de giro	Identificación de compuestos
Dimensión fractal	Parámetros de red
Perfiles de densidad electrónica	Distancias interatómicas
Tamaño promedio y distribución de tamaños de partícula	Tamaño promedio de cristal

La medida de la curva de SAXS se hace por transmisión es decir que un haz de rayos X atraviesa la muestra y se mide el ensanchamiento del haz ya sea con una placa fotográfica, un contador convencional (de barrido por pasos) o con un contador proporcional de posición. La monocromatización se logra mediante filtros o con un monocromador.

El aparato más utilizado es la cámara de Kratky. Hoy en día, las medidas de SAXS se suelen llevar a cabo usando una de las fuentes de rayos X de los sincrotrones ya que la intensidad es mucho mayor. En los laboratorios se usan generadores de rayos X convencionales.

De lo anterior se concluye que la técnica de SAXS es un método de caracterización no destructivo que permite estudiar las heterogeneidades presentes en un medio. Los resultados representan al promedio de la muestra y se deben comparar con técnicas como la microscopía electrónica, la difracción de rayos X a ángulos grandes o con la granulometría magnética. Cada técnica de caracterización debido a los principios en que se funda permite obtener parámetros diferentes pero complementarios y así se logra una mejor descripción del objeto estudiado.

## 4 METODOLOGÍA EXPERIMENTAL

### 4.1 Obtención de las muestras

Las muestras fueron obtenidas del Departamento de Patología del Hospital General de México a través de su Director, el Dr. Abisaid Alcántara.

Las muestras de tejido se proporcionaron estando éstas desmineralizadas y fijadas en bloques de parafina de 2 cm × 2 cm × 2 cm aproximadamente (figura 4.1).

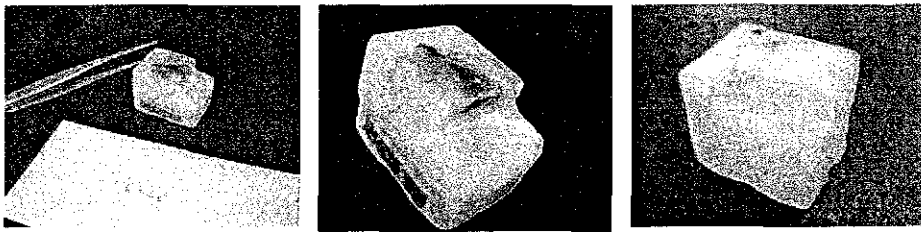


Figura 4.1: bloques de parafina conteniendo muestras de tejido óseo.

La muestra de colágena hialina de piel también se suministró fijada en parafina en dos rebanadas de 0.5 cm de radio y 2 mm de espesor aproximadamente. Las muestras de tejido óseo contenían osteoide, hueso sano o tumor (sarcoma osteogénico) de acuerdo a como se indica en la siguiente tabla (tabla 4.1). Todas las muestras se marcaron en las zonas en donde se encontraba el tejido de interés.

Tabla 4.1: cuadro de muestras

Clave del espécimen fijado en parafina	Regiones contenidas	Etiqueta de la muestra
01-5039.P	Hueso sano (fémur) Tumor (fémur)	A-hueso A-posible tumor
01-5319-E	Hueso sano (fémur) Tumor con osteoide (fémur)	B-hueso sano B-osteoide
Sin clave	Colágena hialinizada	Colágena hialinizada
muestra testigo	Hueso sano sin tratar	HS-16



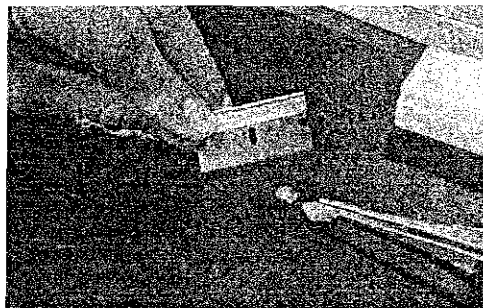
Las muestras óseas fueron rebanadas con un microtomo, para extraer los volúmenes de tejido requeridos para los análisis. Posteriormente se dejaron reposando durante 3 días en xileno, con el fin de disolver la cubierta de parafina embebida (figura 4.2). Después de retirar las muestras del xileno, se lavaron con agua destilada.



Figura 4 2: muestra de tejido cubierta con parafina disolviéndose en Xileno.

Las muestras de colágena hialinizada fueron cortadas con un corta cartón para extraerles el centro (0.4 cm de radio) en el cual estaba contenida la colágena; éstas también se dejaron reposando en xileno, para disolver la parafina. Después de retirar las muestras del xileno, para disolver la parafina, también se lavaron con agua destilada.

Posteriormente las muestras de hueso y colágena fueron despedazadas con un corta cartón en trozos de 0.2 mg cada uno aproximadamente.



TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

Figura 4 3: muestra en trozo de colágena hialinizada

La información proporcionada por el Departamento de Patología del Hospital General indicó que la parafina usada para fijar los tejidos, contiene miel de abeja y un plástico (no se especificó el tipo de plástico ni las proporciones).

Por último, la muestra etiquetada como HS-16 (hueso sano sin tratar) fue una muestra analizada y estudiada previamente por Peña-Rico (2002) cuyos datos han sido incluidos en el presente trabajo con el fin de llevar a cabo una comparación (muestra testigo).

#### 4.2 Calorimetría diferencial de barrido (DSC)

Los experimentos de calorimetría fueron realizados en un Sistema de Análisis Térmico 9900, Du Pont 910 Module DSC, que se encuentra en el Laboratorio de Metalurgia del Instituto de Física de la UNAM. Para los experimentos con el calorímetro, se pesaron los trozos de muestra en una balanza analítica, seleccionando los trozos con unas pinzas, hasta acumular 2 mg. Posteriormente se colocaron en un crisol de aluminio especial para el análisis en el calorímetro. Para que los pequeños trozos de muestra no saltaran al ser calentados, el crisol portador de la muestra fue cubierto con otro crisol, el cual sólo se sobrepuso sobre el primero, a este segundo crisol se le hicieron varias perforaciones pequeñas con el fin de permitir la libre salida de gases, producto de la combustión del material orgánico en el tejido (fig. 4.4).

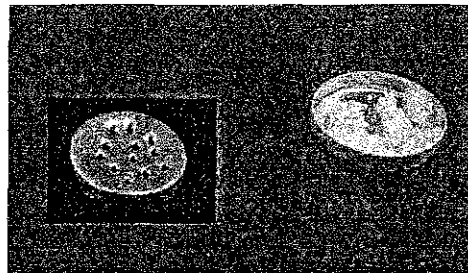


Fig 4 4. Muestra de tejido colocado en un portamuestras de aluminio para un experimento de calorimetría diferencial de barrido.

La rapidez de calentamiento fue en todos los casos de  $10^{\circ}\text{C}/\text{min}$  en aire atmosférico, cubriendo el intervalo de temperaturas desde temperatura ambiente hasta  $600^{\circ}\text{C}$ .

### 4.3 Espectroscopía infrarroja (IR)

Estos experimentos se llevaron a cabo en un equipo Nicolet 680, el cual se encuentra en el Instituto de Investigaciones en Materiales de la UNAM.

Las muestras fueron mezcladas con KBr (Merck 60090, 80% de pureza) en una proporción de 100:1. Con esta proporción se obtuvieron pastillas lo suficientemente delgadas y transparentes para que el haz infrarrojo pudiera atravesar la muestra y ser registrado en el detector. Los espectros de transmitancia fueron registrados dentro del intervalo de 400 hasta 4000  $\text{cm}^{-1}$  en el número de onda.

### 4.4 Espectrometría de PIXE

Las muestras fueron irradiadas con un haz de protones en un acelerador Pelletron NEC del Instituto de Física de la UNAM, alcanzando una energía de 3MeV en la superficie de la muestra. Los espectros de rayos X característicos correspondientes fueron colectados usando un colimador de tántalo (0.3 mm de diámetro) para elementos principales y ligeros registrados en un detector de Si; mientras que un absorbedor de Al de 38 micrómetros fue usado en el detector LEGe para recibir convenientemente las señales de rayos X característicos (de los que se habla casi al final de la sección 3.4) de los elementos traza y la de los elementos pesados. El ángulo de detección en ambos detectores fue de 45°.

Para los experimentos, un pequeño trozo de muestra obtenido de acuerdo a como se mencionó en el apartado 4.1 de este capítulo, se fijó a una cinta de carbón para posteriormente ser colocada en la cámara donde se le hizo incidir el haz de protones.

### 4.5 Microscopía electrónica de barrido de bajo vacío (LVSEM)

Los experimentos se realizaron en dos microscopios electrónicos de barrido de bajo vacío: el primero, JEOL LV6000 ubicado en el Instituto Nacional de Investigaciones Nucleares (ININ), y el segundo, JEOL JSM-5600LV ubicado en los laboratorios de microscopía electrónica del Instituto de Física de la UNAM. El bajo vacío se alcanzó en un intervalo de 1- 250 Pa (0.01-2 torr) y las condiciones usadas de voltaje fueron 5-20 kV. Adicionalmente se realizó un mapeo químico por análisis de espectro EDS. Las muestras en forma de un pequeño trozo obtenido de acuerdo a como se mencionó en el apartado 4.1 de este capítulo, se fijó a una cinta de carbón para

posteriormente ser colocado en el portamuestras dentro de la cámara en el interior del microscopio.

#### 4.6 Difracción de rayos X (DRX)

Se usó un difractómetro SIEMENS D-500 ubicado en el Departamento de Química de la Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa. El difractómetro tiene acoplado un tubo de rayos X con ánodo de cobre. Al ser difractado el haz de rayos X por la muestra, éste pasa por un monocromador que selecciona la radiación  $K\alpha$  promedio (una radiación con longitud de onda  $\lambda = \frac{1}{3}(2\lambda_{K\alpha 1} + \lambda_{K\alpha 2}) = 1.5417 \text{ \AA}$ , donde  $\lambda_{K\alpha 1} = 1.5406 \text{ \AA}$  y  $\lambda_{K\alpha 2} = 1.544 \text{ \AA}$ ). La intensidad difractada se detecta mediante un contador de centelleo. Los difractogramas fueron obtenidos colocando la muestra de forma que se encontrase en el plano de medición cubriendo un intervalo angular  $2\theta$  desde  $4$  hasta  $70^\circ$  a razón de  $0.03^\circ$  cada  $0.9\text{s}$  a temperatura ambiente.

#### 4.7 Dispersión de rayos X a bajo ángulo (SAXS)

El aparato SAXS que se usó es marca Anton Paar y se encuentra en la Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa (UAM). El experimento se realizó usando una cámara Kratky acoplada a un tubo de rayos X con ánodo de cobre, cuya radiación fue seleccionada con un filtro de níquel. El haz de rayos X colimado fue lineal y correspondía a un haz "infinitamente largo". Los datos del SAXS fueron recabados con un contador lineal proporcional y fueron procesados con el programa ITP (Glatter, 1982). Al final las curvas de intensidad dispersada fueron graficadas como función del parámetro angular  $q$  (en  $\text{\AA}^{-1}$ ) definido por

$$q = \frac{4\pi \sin \theta}{\lambda} \quad (4.1)$$

donde  $\theta$  y  $\lambda$  son respectivamente el ángulo de dispersión y la longitud de onda de los rayos X.

Algunas características notables del SAXS empleado son las siguientes:

Se asume la hipótesis de un haz infinitamente largo

Distancia muestra - detector:	24 cm
Tiempo de exposición:	10 min - 6 horas (9 min, en nuestro caso)
Longitud de onda:	1.54 $\text{\AA}$
Intervalo de observación:	$1 \times 10^{-2} \leq q \leq 5 \times 10^{-1} \text{ \AA}^{-1}$

Para el análisis de las muestras por SAXS, cada muestra fue despedazada con un corta cartón y con la ayuda de unas pinzas, de modo que se obtuvieron pequeños trozos que pudieran ser introducidos en el interior de un capilar con la ayuda de una aguja.

Cada muestra dentro del tubo capilar cuya temperatura (25°C) fue controlada con la ayuda de un baño de agua circulante (porta muestras Anton Paar), fue medida empleando un tiempo de 9 minutos, para obtener estadísticas de buena calidad.

#### 4.8 Microscopía óptica

Cada pequeño trozo de muestra fue observado en dos microscopios Zeiss MC80DX y Stemi 2000-C respectivamente, los cuales se encuentran en el laboratorio de microscopía electrónica del Instituto de Física de la UNAM.

Las muestras observadas estaban desparafinadas y se observaron diferentes cortes de ellas, notándose que al cortar la de tumor estaba más suave que las demás. En el siguiente capítulo se presentan las fotografías obtenidas a una amplificación de 25x en todos los casos.

## 5 RESULTADOS

### 5.1 Microscopía Óptica

A continuación se muestran las fotos tomadas con el microscopio óptico:



Fig. 5.1 A-Hueso Sano. 25x.



Fig. 5.2 B-Hueso Sano. 25x.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN



Fig. 5.3 A-Hueso 25x.

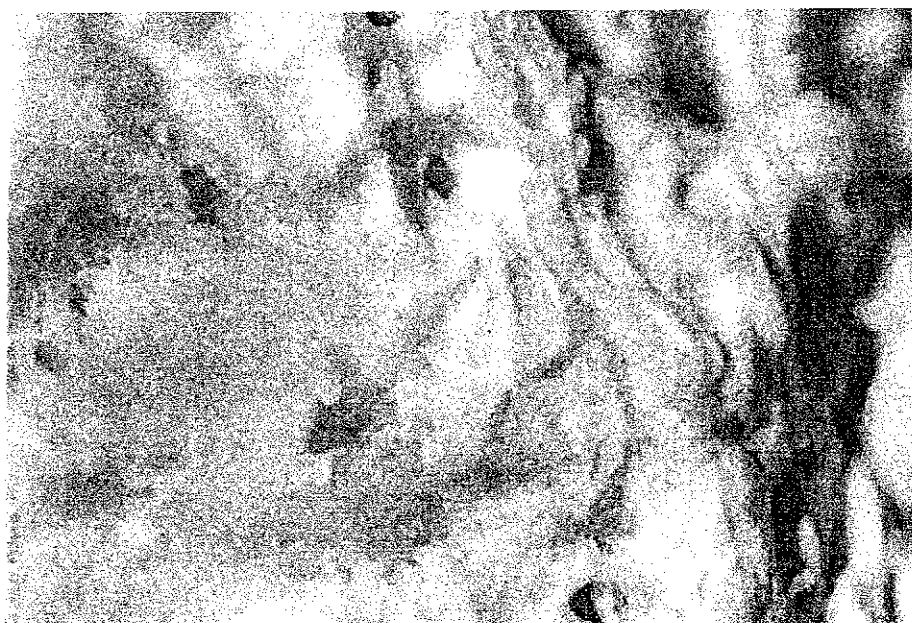


Fig. 5.4 A-posible tumor. 25x.



Fig. 5.5 B-osteoid. 25x

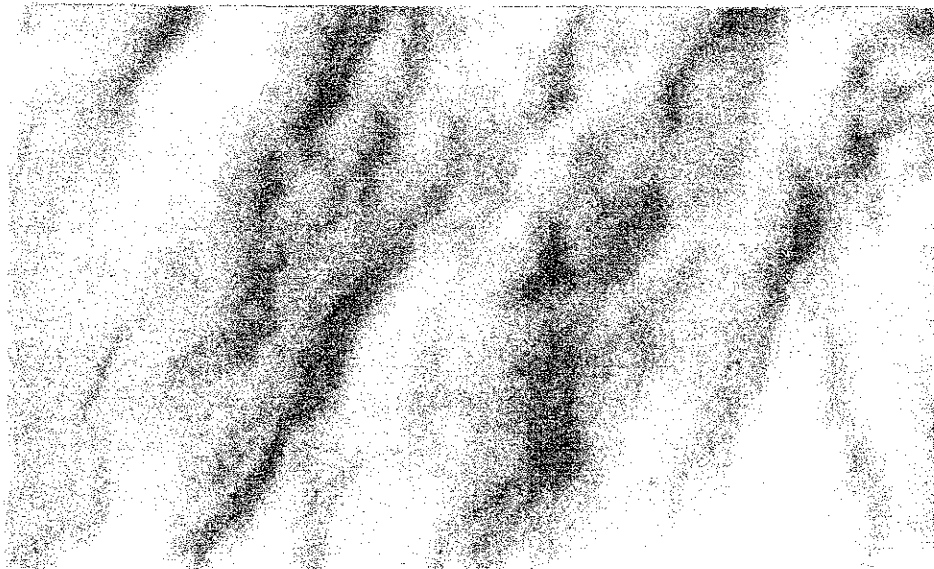


Fig. 5.6 B-osteoid. 25x

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN



El contenido de la muestra etiquetada como A (ver tabla 4.1), corresponde a tumor con hueso sano, mientras que la muestra etiquetada como B, corresponde a un tumor con osteoide y hueso sano.

De las figuras 5.1 a 5.6 se desprenden las siguientes observaciones: las figuras 5.2, 5.5 y 5.6 tienen un aspecto muy similar, es decir que se aprecia una textura parecida a algodón, la muestra se ve porosa, opaca, con plegamientos y color similar. Ya que las muestras 5.5 y 5.6 provienen de la región que el médico marcó como osteoide, entonces la conclusión es que (a juzgar por el aspecto) la muestra de la figura 5.2 también es osteoide aparentemente (aunque fue extraída de la zona que se pensó era hueso en la muestra B, la cual también contiene tumor).

Por otro lado, las figuras 5.1 y 5.3 que son hueso, se aprecian lisas, poco porosas, brillantes y con un color amarillento, mientras que la foto de la figura 5.4, la cual es tumor, se nota con mezclas de tejido liso y plegado, muy porosa (como el osteoide), en zonas se aprecia opaca y en otras brillante y el color es también una mezcla del que muestra el osteoide y el de hueso sano; esto es, la figura 5.4 muestra características de hueso sano y de osteoide, lo cual es bastante consistente con la teoría de que las células del tumor generan directamente sustancia osteoide.

## 5.2 Difracción de Rayos X

Los resultados obtenidos de los experimentos de difracción de rayos X se muestran en las figuras 5.7 a 5.11.

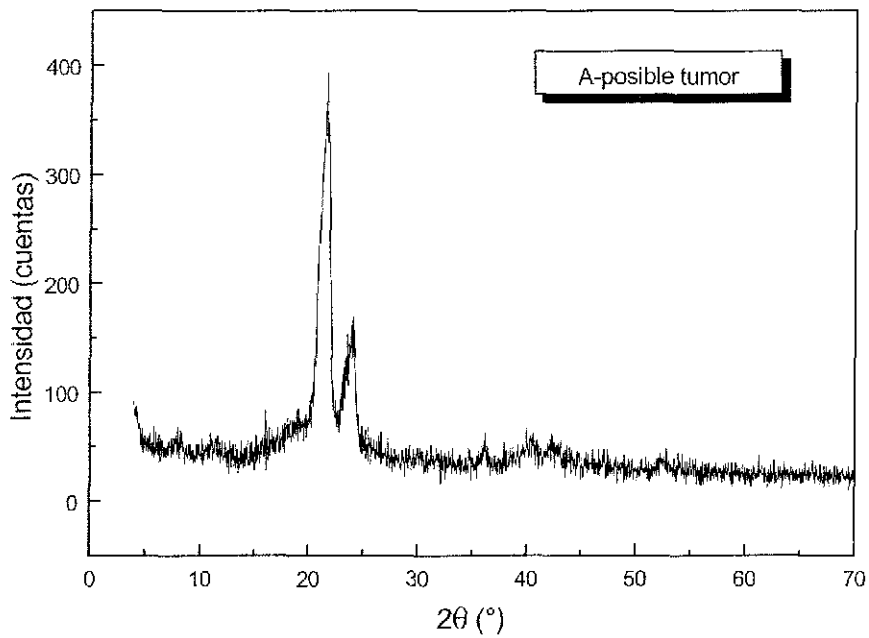


Fig. 5.7 Difractograma de rayos X de la muestra A-posible tumor.

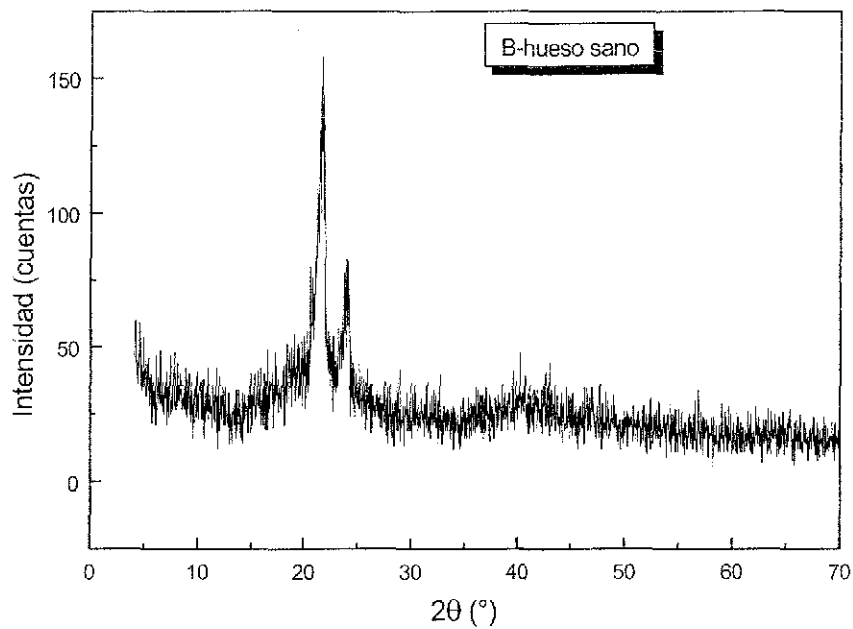


Fig 5.8 Difractograma de rayos X de la muestra B-hueso sano

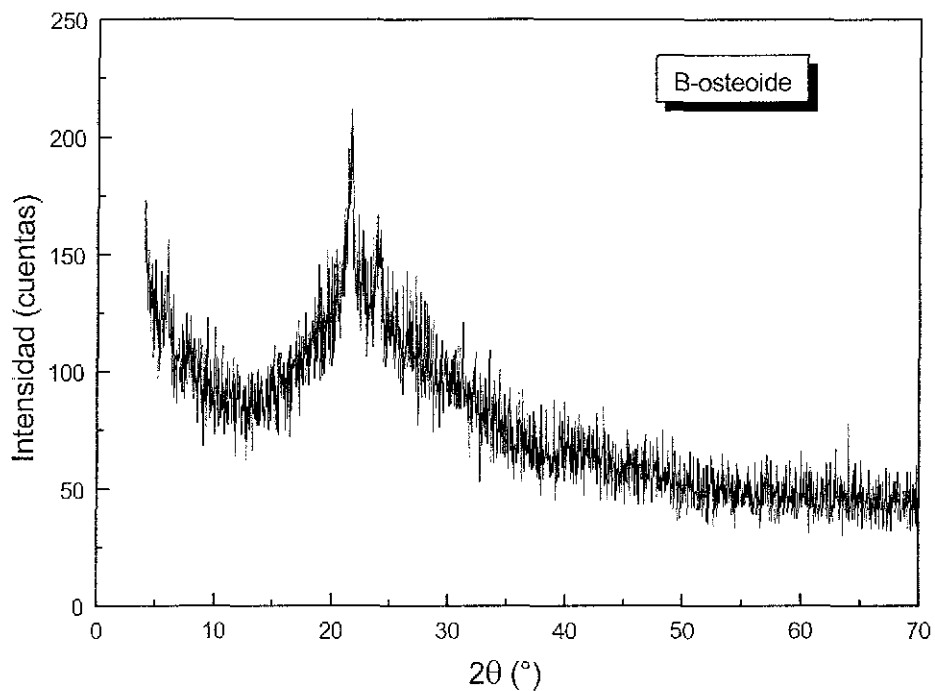


Fig. 5.9 Difractograma de rayos X de la muestra B-osteoides

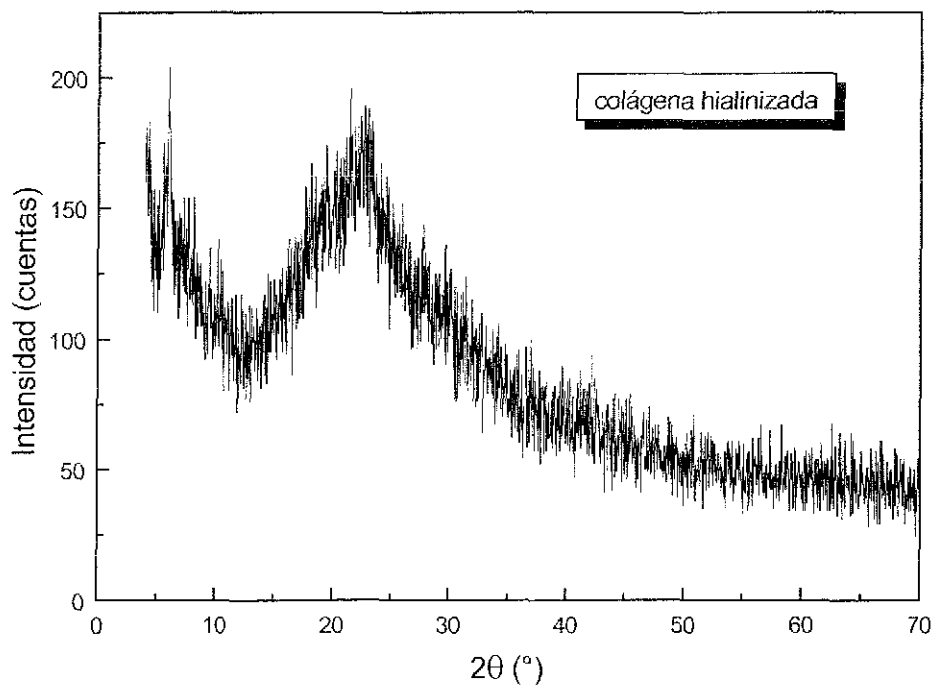


Fig. 5.10 Difractograma de rayos X de la muestra colágena hialinizada.

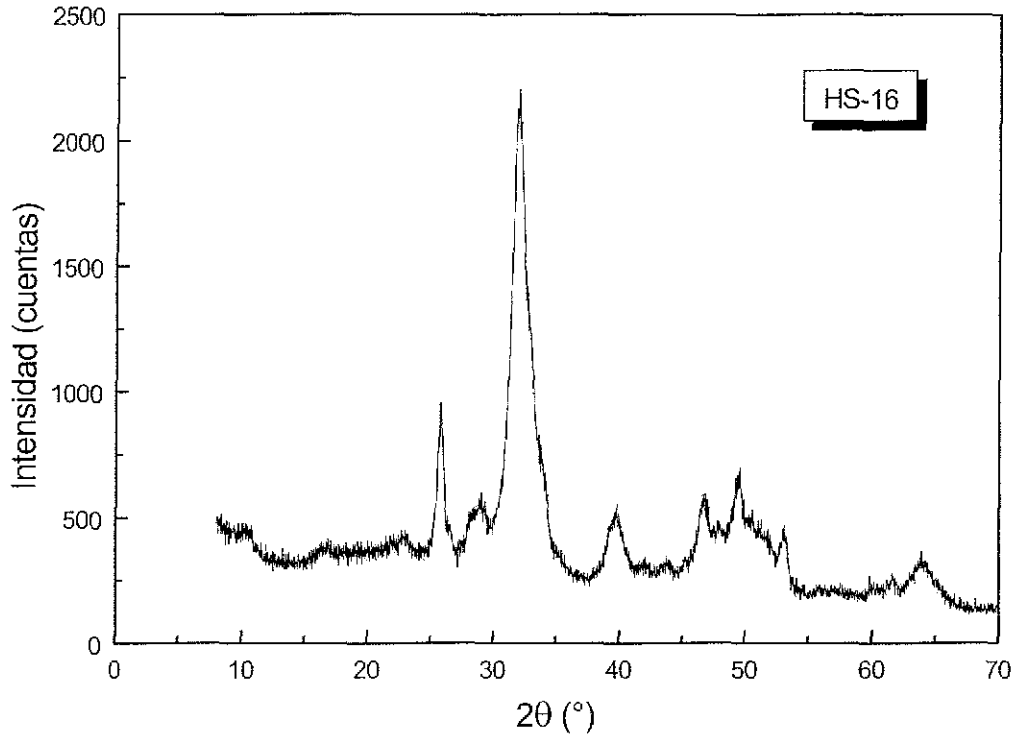


Fig. 5.11 Difractograma de rayos X de la muestra HS-16

Se observa que las muestras A-posible tumor (fig. 5.7) y B-hueso sano (fig. 5.8) poseen una fase cristalina, en contraste con la muy pobre cristalinidad en el caso de la muestra de B-osteoide (fig. 5.9). Ésta fase cristalina no se observa en la muestra de colágena hialinizada (fig. 5.10). Las reflexiones de Bragg correspondientes a la fase cristalina citada, se enlistan en la tabla 5.1.

Tabla 5.1. Reflexiones de Bragg correspondientes a la fase cristalina detectada en las muestras A-posible tumor, B-hueso sano y B-osteoide (figs 5.7, 5.8 y 5.9 respectivamente).

2θ (°)	d (Å)	I (%)
8.16	10.826	Traza
11.16	7.921	Traza
21.69	4.094	100
23.94	3.714	30
35.97	2.495	Traza
40.15	2.244	Traza
42.41	2.129	Traza
52.18	1.751	Traza

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

Esta fase cristalina no corresponde a la fase mineral del tejido óseo (hidroxiapatita, ver apéndice C), como se puede corroborar observando el difractograma correspondiente a un tejido óseo completamente sano y mineralizado (muestra HS-16, fig. 5.11). Al cotejar con la base de datos ICDD- PDF ficha: 43-0224 se encontró que corresponde apreciablemente bien a la siguiente fase cristalina:  $\text{Ca}_2\text{P}_6\text{O}_{17}$  (ultrafosfato de calcio). Se trata de una estructura con simetría monoclinica (grupo espacial  $P2_1/c$ , No. 14) con parámetros de red:

a: 5.753 Å

b: 18.265 Å

c: 7.625 Å

$\beta$ : 111.12 ° Ficha 300215, ICSD, Stachel, D. et al., Z. Krist., 202, 117 (1992).

Considerando una distorsión de la celda de las siguientes características (figura 5.12) se obtuvieron los siguientes parámetros:

a: 5.782 Å

b: 18.082 Å

c: 7.563 Å

$\beta$ : 110.7 °

Se observa un aumento del parámetro *a*. Todos los demás parámetros decrecen. Esto puede deberse a la incorporación de moléculas de agua en los planos *bc* (ver fig. 13).

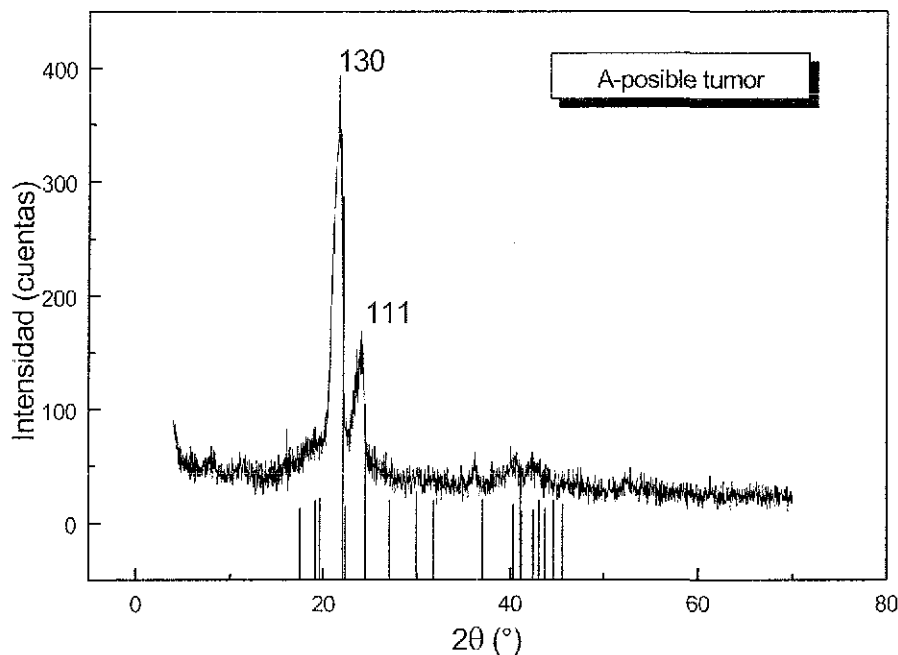


Figura 5.12 Se muestra el patrón de difracción de A-possible tumor. En líneas verticales se muestran las reflexiones de Bragg del ultrafosfato de calcio,  $\text{Ca}_2\text{P}_6\text{O}_{17}$  (ICDD-PDF 43-224).

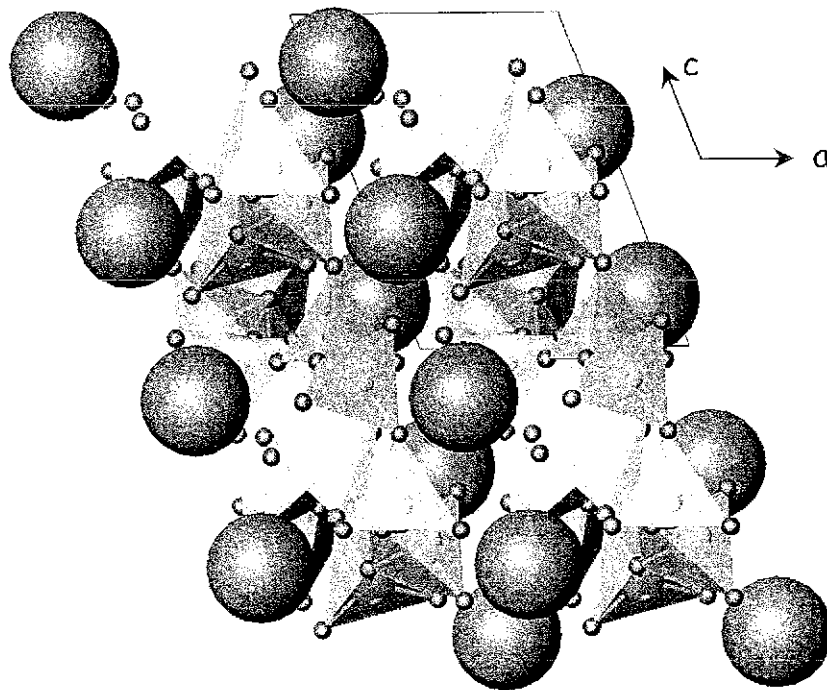
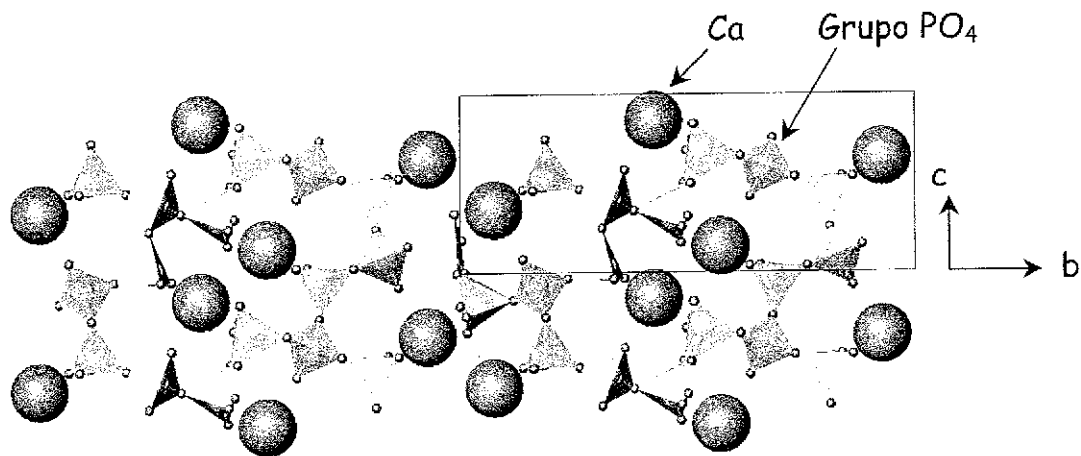


Figura 5.13 Estructura cristalina del ultrafosfato de calcio,  $\text{Ca}_2\text{P}_6\text{O}_{17}$ . En la parte superior se muestra una proyección  $bc$  de la estructura, y en la parte inferior una proyección  $ac$ .

### 5.3 Análisis elemental por PIXE

El análisis de espectroscopía PIXE se muestra en la siguiente gráfica de barras (figura 5.14)

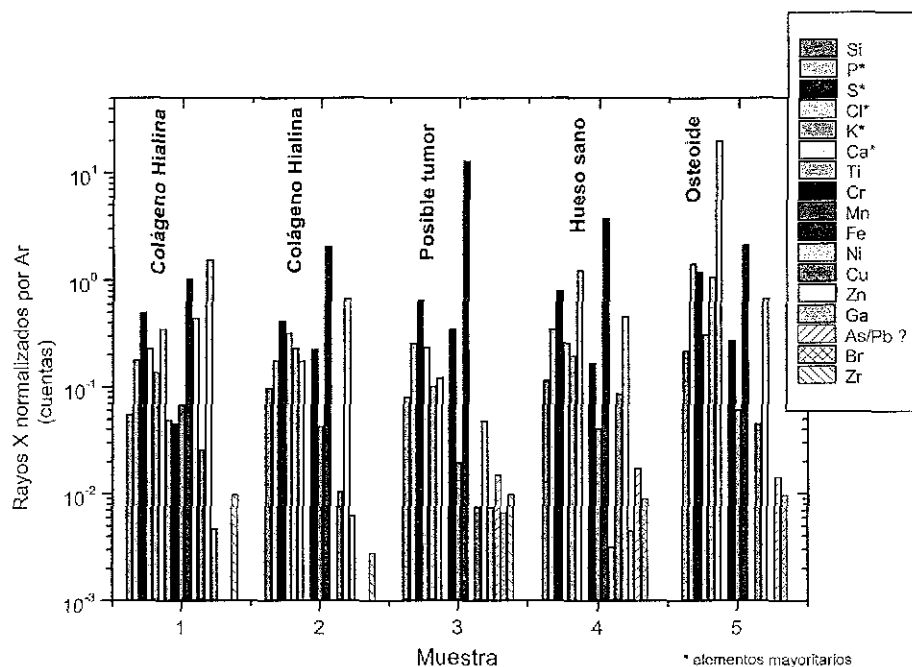


Figura 5.14 Gráfica de barras mostrando el análisis elemental por PIXE de las diferentes muestras (Se analizaron dos regiones de la muestra de colágena hialina)

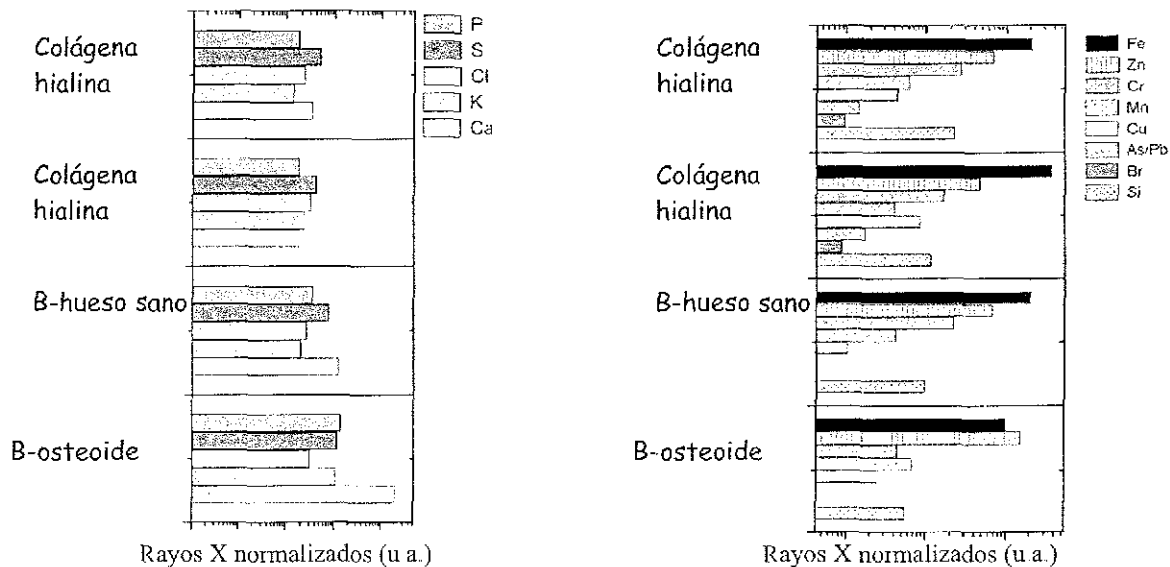


Figura 5.15 Análisis químico obtenido por PIXE: elementos principales (izquierda), elementos traza (derecha)



En la figura 5.14, se observa la predominancia del P, S, Cl, K y Ca en el osteoide en comparación con la colágena hialina. Los elementos traza también aparecen representados en la figura 5.15, sobresaliendo Fe, Zn, Cr, Mn, Cu y Si. Br se encontró sólo presente en la muestra de colágena hialinizada.

Por otro lado, se detectaron Pb, As, y Br sólo en colágena hialinizada. Tampoco está claro cuál es el papel de los dos últimos elementos en el proceso de mineralización, pero en el primer caso, es bien sabido que cuando se ingiere plomo, éste sigue en gran medida la ruta del calcio (Bronner, 1986). Dowd et al. (1994) han reportado que concentraciones submicromolares de plomo libre compiten con  $\text{Ca}^{2+}$  adquiriendo carácter de osteocalcina y ya que el  $\text{Pb}^{2+}$  inhibe la osteocalcina dando lugar a hidroxapatita, esto puede llevar a una importante inactivación de osteocalcina, afectando en última instancia a la dinámica mineralizadora del hueso (Hambidge, 1974). Esto posiblemente explica el bajo grado de mineralización encontrado en las muestras de colágena.

El elemento cromo, cuya cantidad es ligeramente menor en el tejido osteoide, se cree que probablemente podría ser un micronutriente esencial, estando asociado con intolerancia a la glucosa, cuando existen bajas dosis en la senectud (Hambidge, 1974). No está claro el papel de este elemento en el proceso de mineralización y aparentemente, de los resultados expuestos, no hay correlación entre la incipiente mineralización en osteoide y su bajo contenido de cromo.

También se puede observar que el tejido osteoide tiene mayor contenido de zinc en comparación con las otras muestras analizadas. Este hecho puede explicarse sabiendo que el zinc es un elemento traza esencial que tiene efectos estimulatorios en la formación de hueso in vitro y en vivo. En concentraciones de 100 mM, aumenta el contenido de proteína en hueso y el contenido de calcio. El zinc es un selectivo y altamente potente inhibidor de reabsorción osteoclástica en hueso "in vitro" (Emsley, 1991).



## 5.4 Microscopía Electrónica de Barrido de Bajo Vacío (LVESM)

### *Imágenes de Hueso sano*

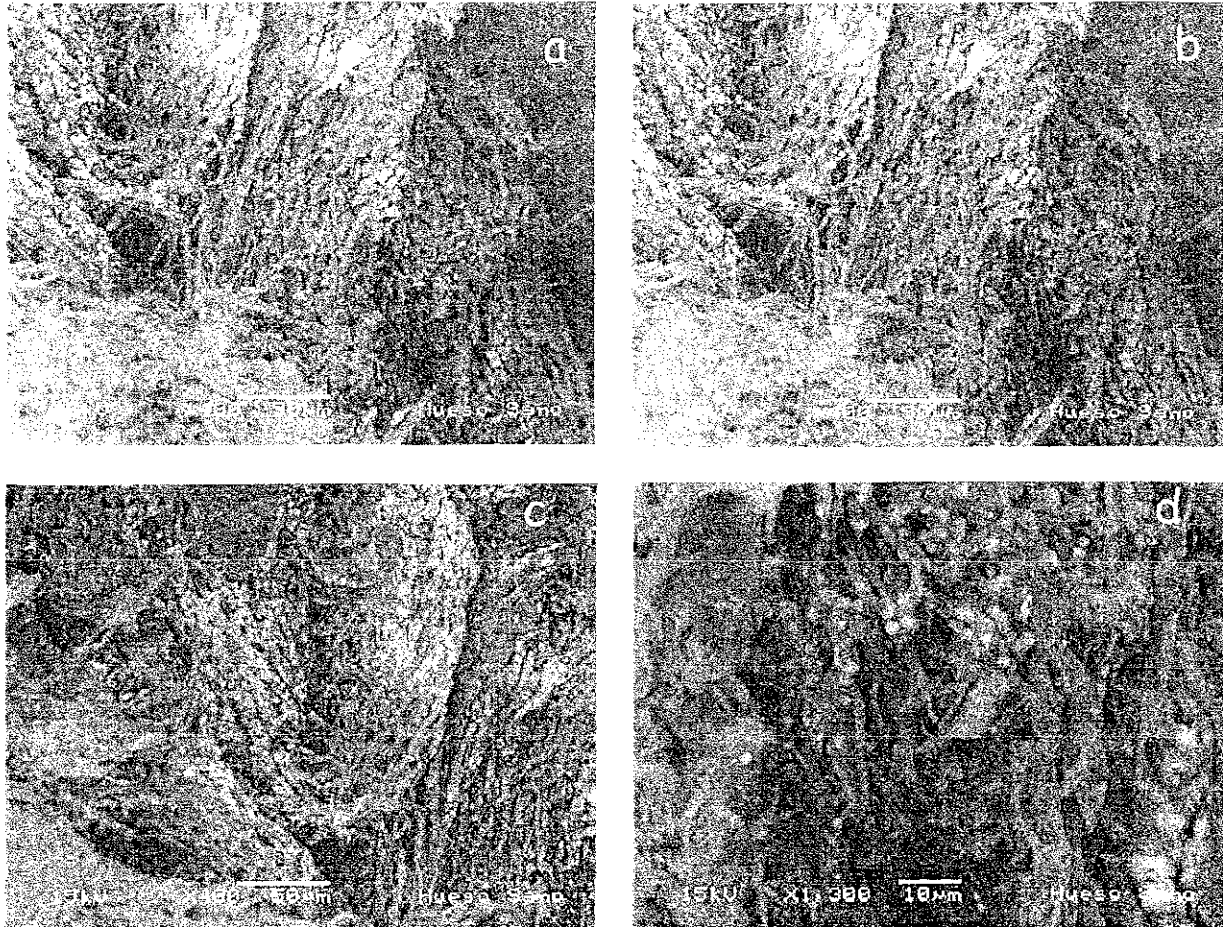


Figura 5.16 Imágenes de hueso sano tomadas a 400x (a, b, c) y 1,300x (d). Nótese la gran cantidad de esferulitas alojadas en el tejido colagénico. Cada esferulita tiene un diámetro del orden de 1 micra o más. Las fibras tienen una forma suavemente ondulada.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

*Imágenes de tumor*

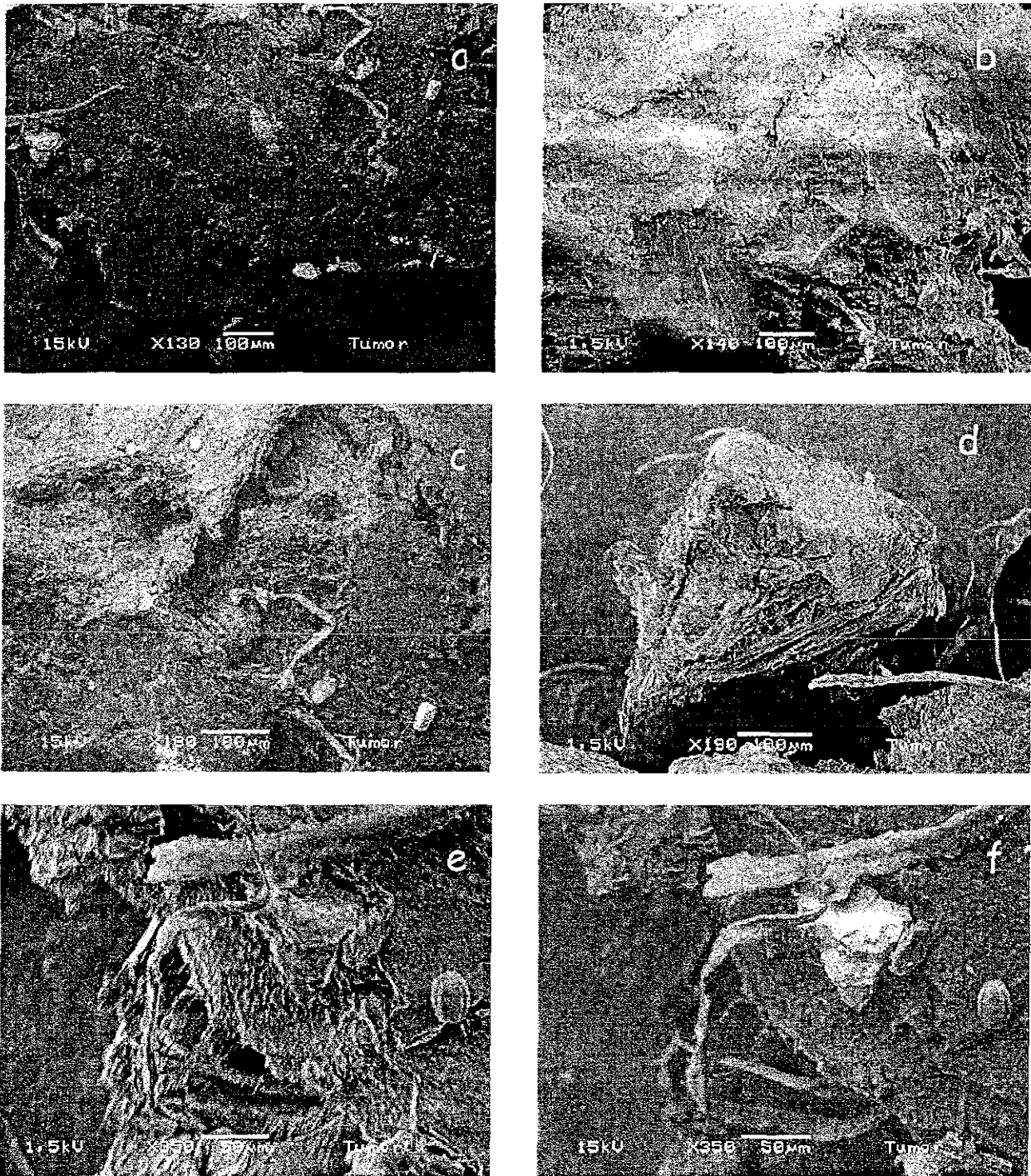


Figura 5.17 Imágenes de tumor tomadas a (a) 130x, (b) 140x, (c) 180x, (d) 190x y (e, f) 350x. Nótese que casi no se pueden apreciar hebras en el tejido fibroso. La foto (e) fue tomada en modo convencional (no bajo vacío) y la foto (f) es la misma imagen anterior en modo de bajo vacío como todas las demás fotos.

*Imágenes de osteoide*

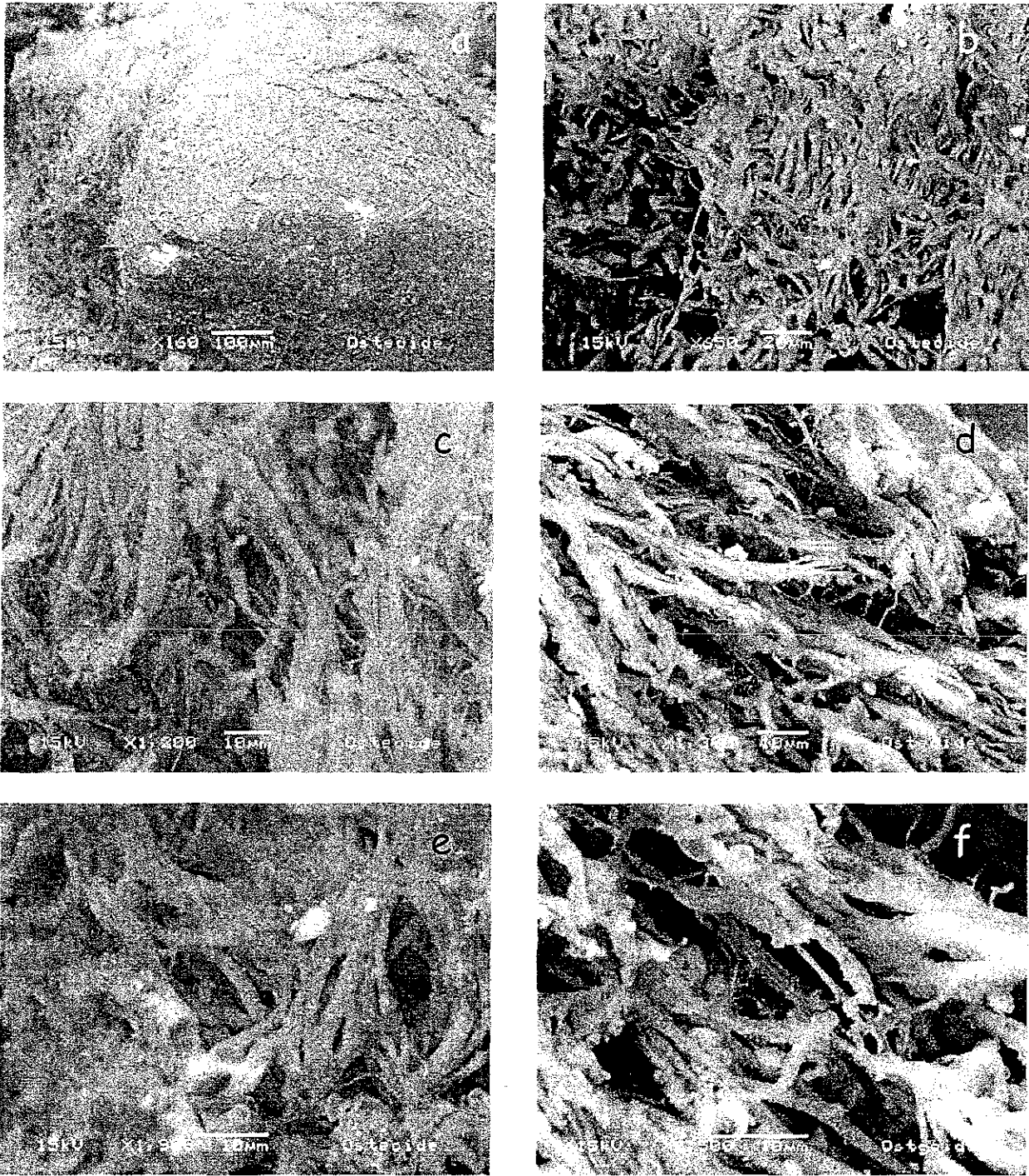


Figura 5.18 Imágenes de osteoide tomadas a (a) 160x, (b) 650x, (c) 1,200x, (d) 1,300x, (e) 1,900x y (f) 2,500x. En estas imágenes se pueden apreciar hebras en el tejido fibroso.



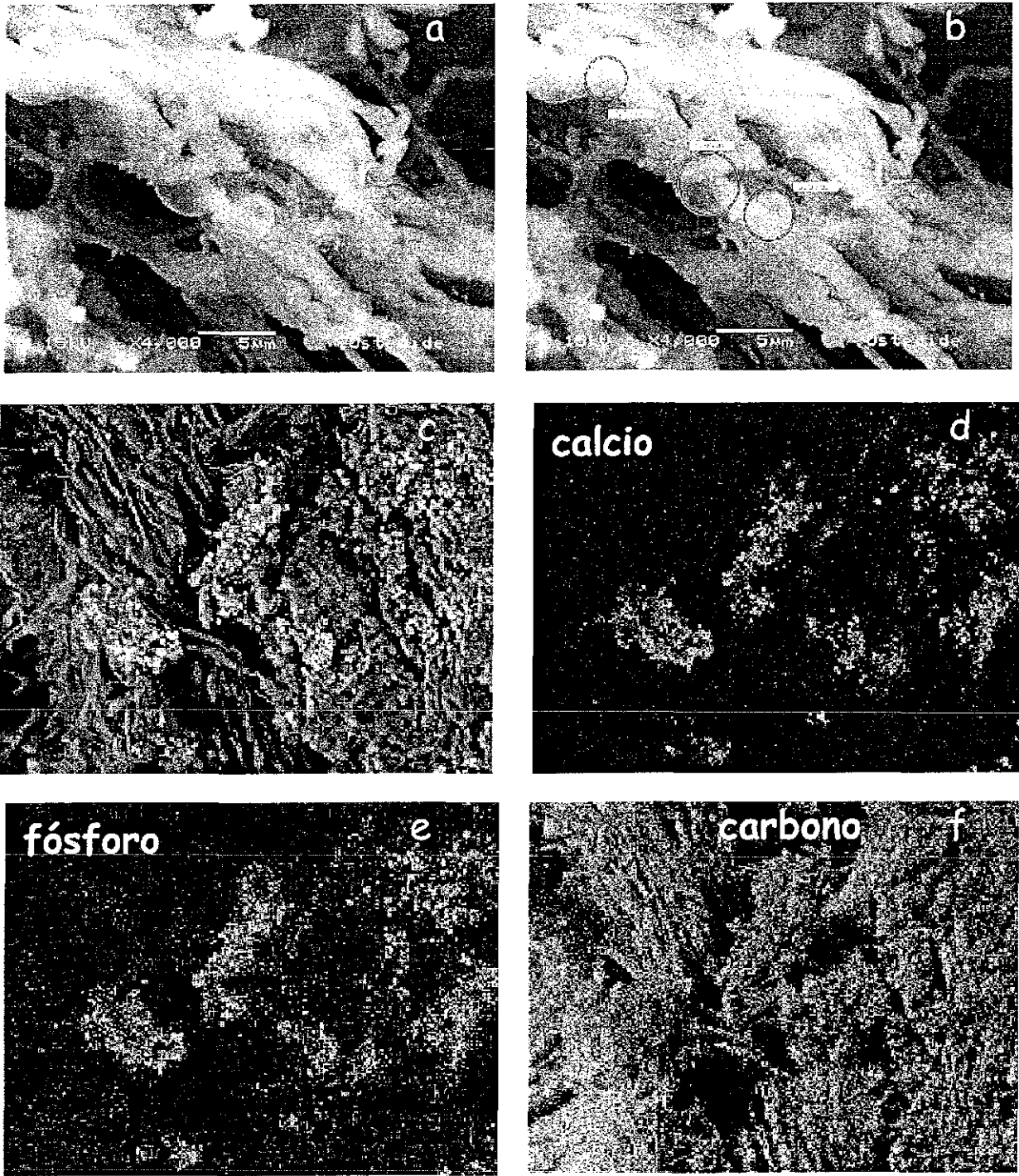


Figura 5.19 Imágenes de osteoide tomadas a (a, b) 4,000x, (c) 500x. Las imágenes mostradas en (d), (e) y (f) corresponden a mapeos químicos de calcio, fósforo y carbono respectivamente, de la imagen mostrada en (c). Se puede apreciar en las imágenes (a) y (b) la formación de esferulitas de aproximadamente 2 micras de diámetro. De acuerdo con el mapeo químico, tales esferulitas contienen calcio y fósforo.

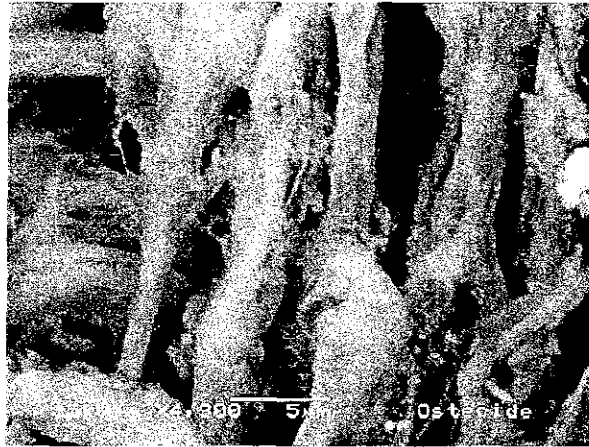


Figura 5.20 Imágen de osteoide tomada a 4,300x.

*Imágenes de colágena hialinizada*

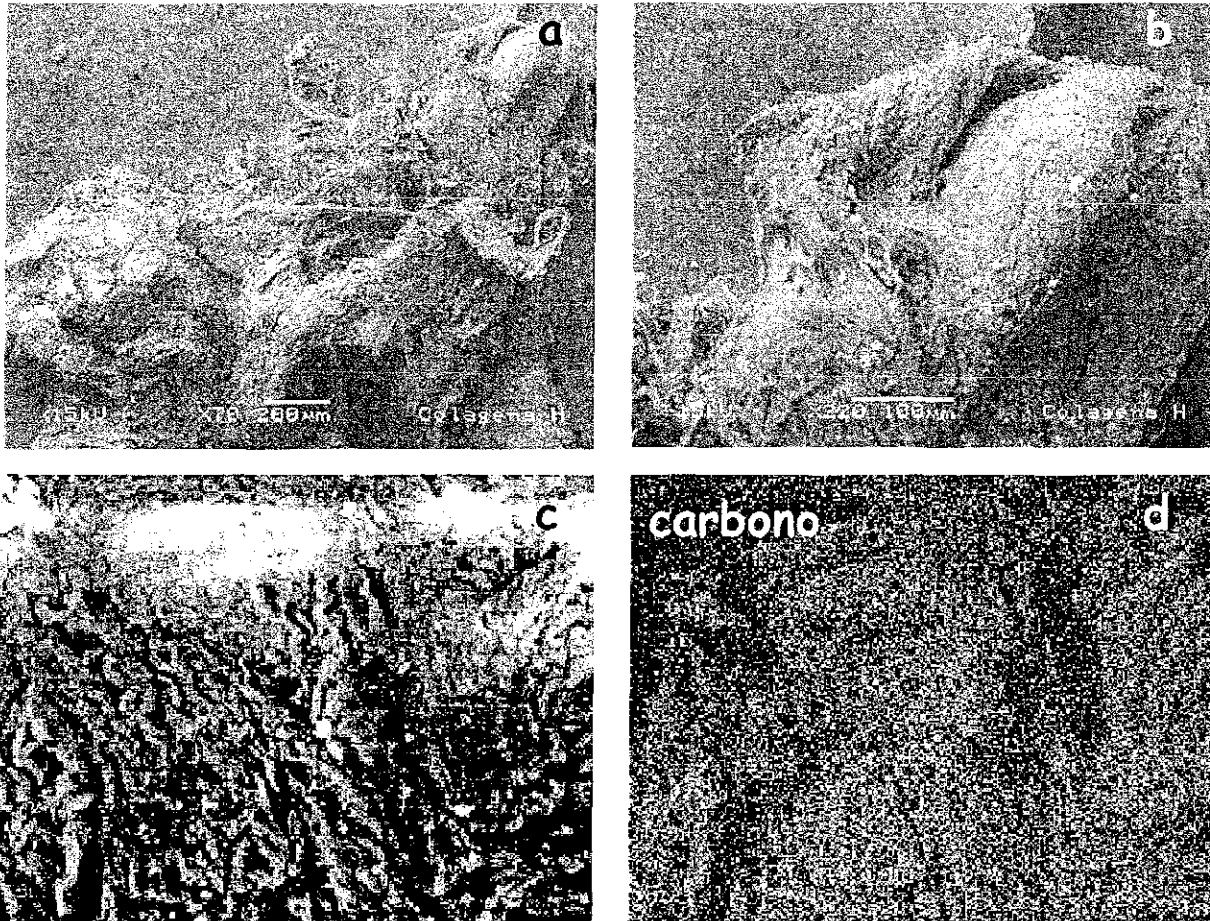


Figura 5.21 Imagen de colágena tomada a (a) 70x, (b) 220x, y (c) 500x. En (d) se muestra el mapeo químico de carbono de la imagen (c). Nótese el rizado de las fibras de colágena. carbono.

En la figura 5.16 del hueso sano, se puede ir apreciando la presencia de esferulitas, conforme crecen los aumentos. En la figura 5.17 del tumor, casi no se aprecian hebras en el tejido fibroso. En la figura 5.18 del osteoide, conforme crecen los aumentos, se puede apreciar la presencia de esferulitas más pequeñas que las vistas en hueso sano; esto se ve claramente en la figura 5.19 a y b. En la misma figura 5.19 c se ven esferulitas en el tejido a una ampliación de 500x y en d y e se muestra el mapeo químico correspondiente a la imagen 5.19 c, el cual revela la presencia de calcio y fósforo, sólo en la región que contiene esferulitas, mientras que en 5.19 f se ve el mapeo de carbono el cual se muestra presente en todo el tejido fibroso que corresponde al tejido fibroso de colágena; de esto se deduce que las esferulitas son los centros de mineralización que existen en el osteoide. Y finalmente en la figura 5.21 c se puede apreciar como las fibras de colágena se ven más rizadas que las de osteoide.

Las imágenes de microscopía electrónica de barrido de bajo vacío, en tejido de osteoide, a 300 aumentos, revelan fibras de colágena con nódulos que son señales de incipiente mineralización (figuras 5.18-5.19). La matriz de colágena puede claramente identificarse en la fotografía de mapeo de carbono (figura 5.19 f). En el caso de la colágena hialinizada, no se detectaron niveles apreciables de calcio o fósforo en el mapeo químico. En las imágenes de colágena hialinizada (figuras 5.21 c) se puede observar un mayor grado de enmarañado en las fibras de colágena, esto está relacionado probablemente con cambios estructurales en el arreglo de las fibrillas de colágena. Siendo este el caso, se podría esperar una mayor estabilidad térmica en la colágena hialinizada, comparada con el tejido osteoide, ya que entrecruzamientos adicionales estarían participando en la estabilidad de la estructura colagénica, esto se aprecia claramente en las figuras 5.19 c y 5.21 c, en donde el tejido osteoide se aprecia lacio y en cambio el de colágena hialina se ve rizado, esto es el posible efecto de la existencia de más entrecruzamientos en la colágena. Esta posibilidad está de acuerdo con los resultados obtenidos del análisis calorimétrico (DSC) que se exponen.

#### Resultados del análisis elemental de LVSEM.

En la figura 5.22 se expone un espectro ilustrativo, similar a los obtenidos para cada muestra. Y además se da otra figura donde se resume la información cualitativa de los elementos presentes en cada una de las muestras.

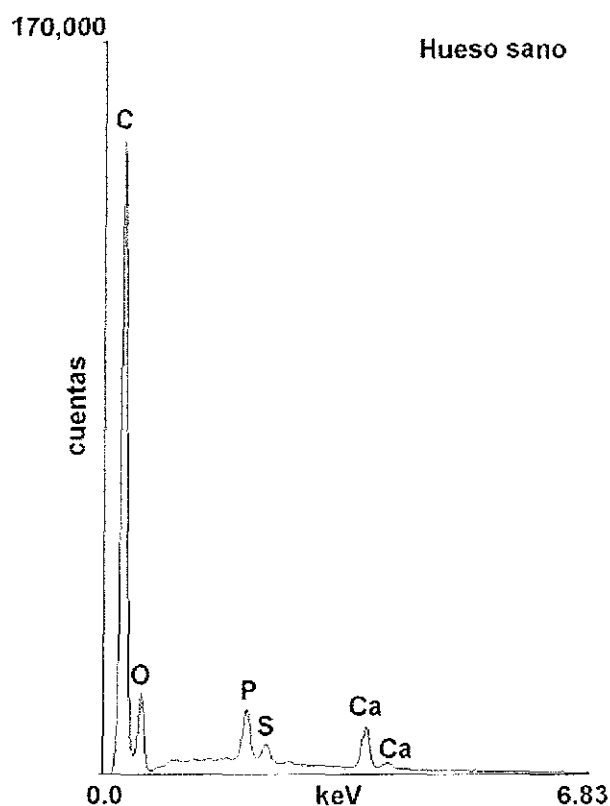


Figura 5.22 Espectro EDS (energy dispersive spectrum) de hueso sano.

Tabla 5.2 Resumen del análisis cualitativo de elementos químicos.

Elemento	Hueso sano	Tumor	Osteoide	Colágena hialina
C	A.C.	A.C.	A.C.	A.C.
O	M.C.	M.C.	M.C.	M.C.
Si	-	T	T.	T.
P	M.C.	-	M.C.	T.
S	B.C.	-	B.C.	T.
Ca	M.C.	-	B.C.	B.C.
Cl	-	-	-	T.
Cu	T	-	B.C.	T.
Na	-	-	-	T.

A.C.= alto contenido, M.C. = medio contenido, B.C. = bajo contenido, T. = traza

## 5.5 Espectroscopía Infrarroja (IR)

Los espectros de FTIR correspondientes a muestras de colágena hialinizada y a osteoide tienen diferencias principalmente en el rango de los 1600-400  $\text{cm}^{-1}$  dada la baja presencia de fase mineral en la colágena hialinizada. En ambas muestras existen señales correspondientes a colágena, esto es: amida I a los 1650  $\text{cm}^{-1}$  (relacionada con el estiramiento C=O), amida II a los 1550  $\text{cm}^{-1}$  y amida III a los 1230-1240  $\text{cm}^{-1}$  (ambas relacionadas con el estiramiento C-N y las vibraciones N-H del C-N-H en los modos de doblamiento planos). También hay muchas bandas inorgánicas en la muestra de osteoide, provenientes de la fase mineral,  $\text{Ca}_2\text{P}_6\text{O}_{17}$  (ultrafosfato de calcio), esto es: para P-O a los 560 y 1030  $\text{cm}^{-1}$  (estiramiento P-O del grupo  $\text{PO}_4$ , ver tabla 5.3 más adelante). Para la muestra de tumor, se identificaron dos zonas, una de tumor claro y otra de tumor oscuro (tumor claro 2 y oscuro).

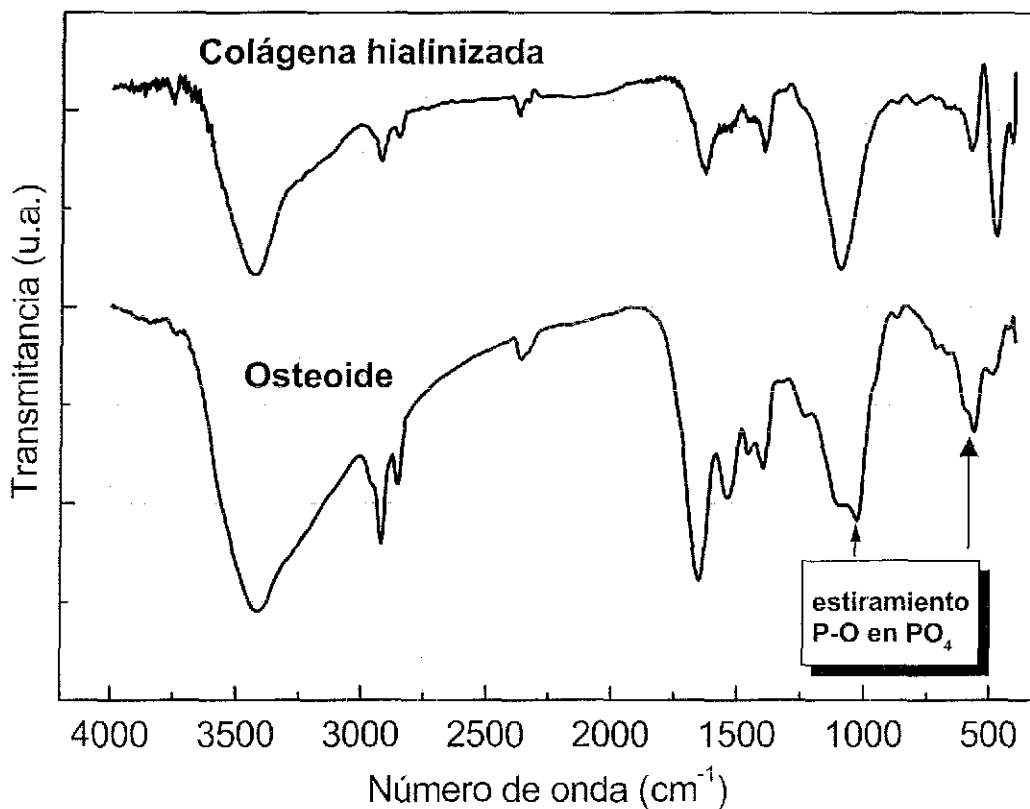


Figura 5.23 Espectros de infrarrojo de colágena hialinizada y B-osteoide.



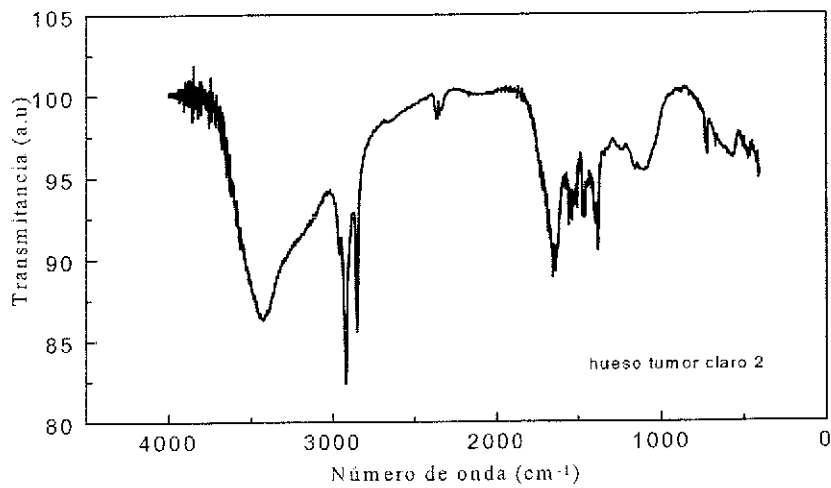


Figura 5.24 Espectro de infrarrojo de A-possible tumor (zona clara).

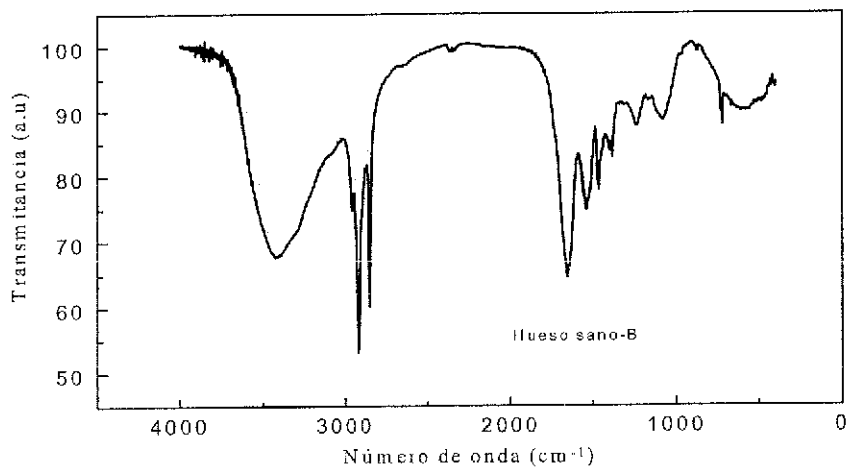


Figura 5.25 Espectro de infrarrojo de hueso sano - B.

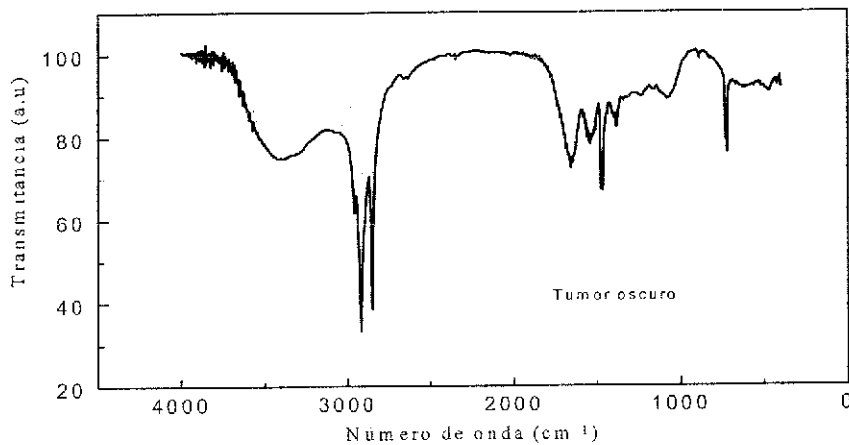


Figura 5.26 Espectro de infrarrojo de A-possible tumor (zona oscura).

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

Tabla 5.3 Números de onda del espectro infrarrojo de cada muestra contra el grupo funcional que le corresponde. En el primer renglón de cada casilla se dan los datos de los números de onda de los picos significativos y en el segundo renglón se dan sus respectivas profundidades.

	Colágena Hialinizada	B-osteóide	Tumor oscuro	Tumor claro	B-hueso sano
Lípidos Y cadenas C-H	2900, 2850 2.17, 0.68	2900, 2850 4.84, 2.59	2950, 2800 51.6, 47.6	2950, 2800 12.47, 10	2900, 2800 34.84, 29
	2400 1.13	2360 1.2	2600, 2350 1.35, 0.58	2400, 2600 1.7, 0.9	2360, 2600 0.9, 0.3
Amida I	1650 4.54	1660 12.4	1600 21.8	1655 8.69	1662 30
Amida II	1560 2.26	1538 7.72	1540 12.8	1559 4.53	
Carbonatos	1460, 1400 1.94, 3.53	1470, 1400 5.14, 5.26	1500, 1450 25.8, 6.1	1520, 1450, 1386 3.4, 3.76, 6.05	1531, 1470, 1386 21.3, 15.4, 11.84
Deformación P-OH		1250 2.29	1228 1.96	1241 0.76	1241 6.36
Estiramiento P-O	1100 8.94	1100, 1020 7.25, 8.59	1082 6.01	1096 3.4	1075 5.45
Aminas primarias			700 16.9	700 2.12	710 5.0
Torsión $PO_4^{3-}$	572 2.97	600 5.74	613 1.2	565 1.67	
Torsión O-P-O	480 8.74	496 2.85	468 2.72	468 1.14	

Por su parte el tumor y el hueso sano, como se aprecia en la tabla 5.3, muestran marcadas similitudes en la profundidad de los picos localizados alrededor de 2800 y 2950  $\text{cm}^{-1}$ , lo que indica una gran presencia de modos vibracionales de fragmentos C-H en cadenas indicando un diferente estado de agregación (se descarta la presencia de lípidos).

Un resultado interesante se encuentra en el intervalo de las aminas primarias de la tabla 5.3. A diferencia de las muestras de colágena y osteoide, las muestras de tumores y hueso sano presentan picos en esta región, lo que indica la presencia de estos grupos funcionales (anillos  $\text{NH}_2$ ). Esto puede deberse a rupturas en la larga cadena de la proteína (colágena), de manera que en los extremos de cada ruptura tendría un grupo de amina primaria; en estos sitios de ruptura pueden estarse formando cristales. Es de notarse que la profundidad del pico en el tumor oscuro es casi 4 veces mayor que la del hueso sano (normalidad).

Finalmente, cabe resaltar que la muestra de hueso sano no presenta señal en la región de las torsiones de  $\text{PO}_4^{3-}$  y O-P-O como se ve en la tabla 5.3. Esto hace pensar que la relación de estos grupos en la colágena de hueso sano es diferente a los demás casos.

Los picos comprendidos entre 1100 y 1700  $\text{cm}^{-1}$  son prácticamente los mismos para todas las muestras, la diferencia en profundidades se debe a una diferencia en cantidad del correspondiente grupo funcional y para la correspondiente muestra. Cabe destacar que la señal correspondiente al grupo carbonato (1400  $\text{cm}^{-1}$ ) sobresale en las muestras de tumor en comparación con hueso sano.

## 5.6 Calorimetría Diferencial de Barrido (DSC)

De los termogramas mostrados se puede apreciar un pico exotérmico alrededor de 350°C en todos los casos, correspondiendo el pico más alto a la muestra de hueso sano, seguido del correspondiente a osteoide y el más bajo a la muestra de colágena hialinizada, A 530°C aproximadamente se observa un segundo pico exotérmico siendo el más alto y ancho el que corresponde a la colágena hialinizada seguido del correspondiente a la muestra de osteoide y siendo nulo el de la muestra de hueso sano (sólo se detecta un pequeño hombro para hueso sano alrededor de 430°C). En todos los casos los picos exotérmicos representan un proceso de combustión-degradación de los componentes orgánicos de la muestra (de la colágena tipo I).

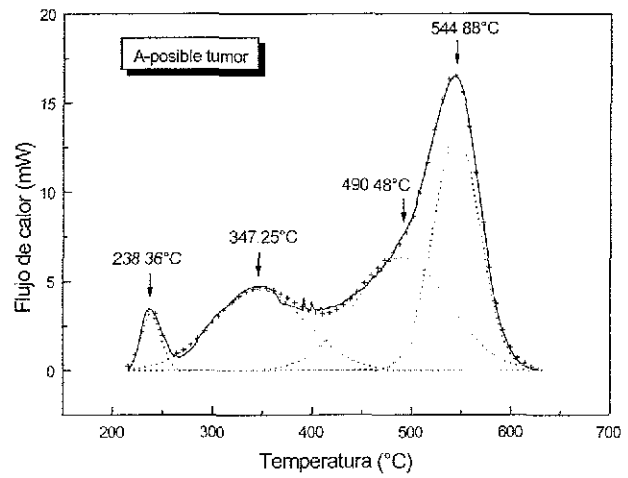
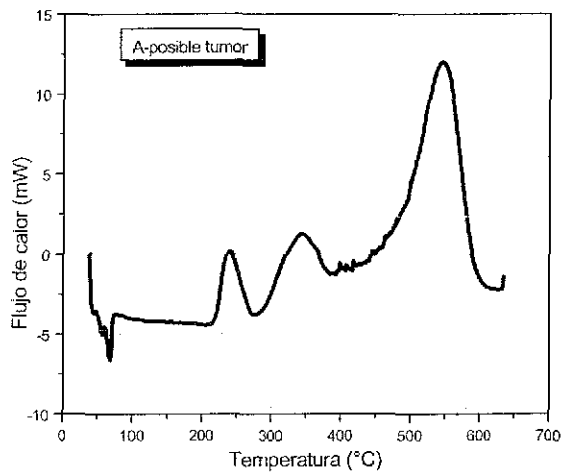


Figura 5.27 Termograma de A-possible tumor y su correspondiente ajuste (derecha) con curvas gaussianas para cada pico.

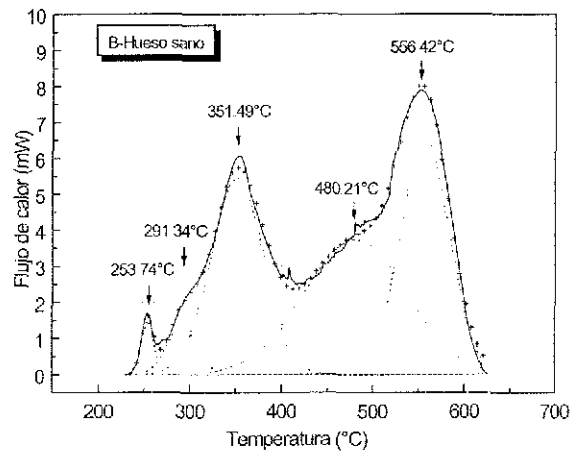
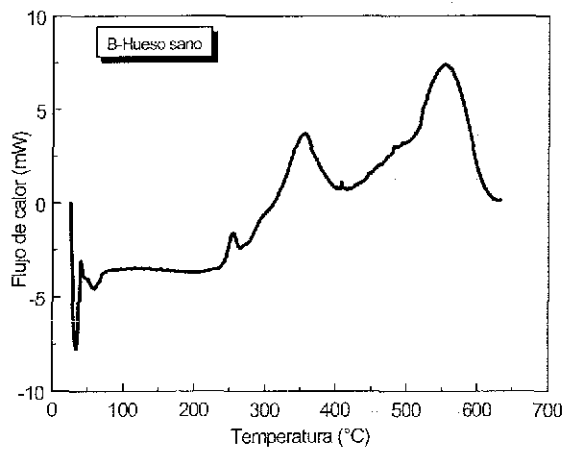


Figura 5.28 Termograma de B-hueso sano y su correspondiente ajuste (derecha) con curvas gaussianas para cada pico.

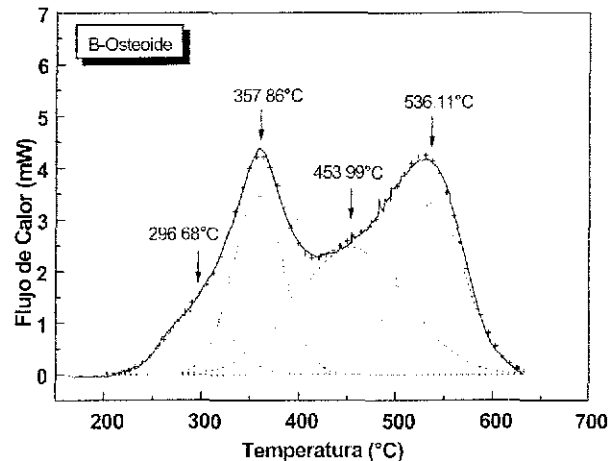
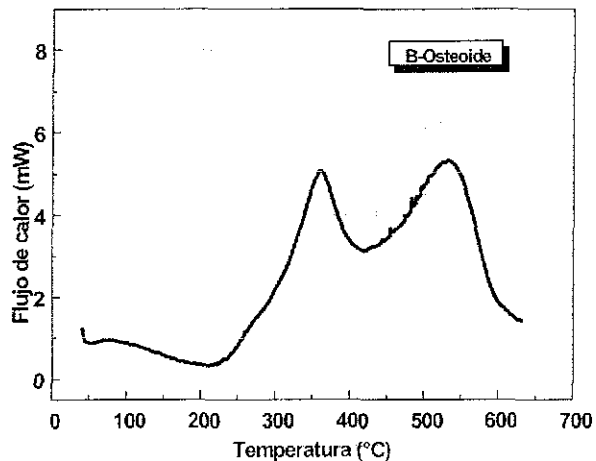


Figura 5.29 Termograma de B-osteoide y su correspondiente ajuste (derecha) con curvas gaussianas para cada pico.

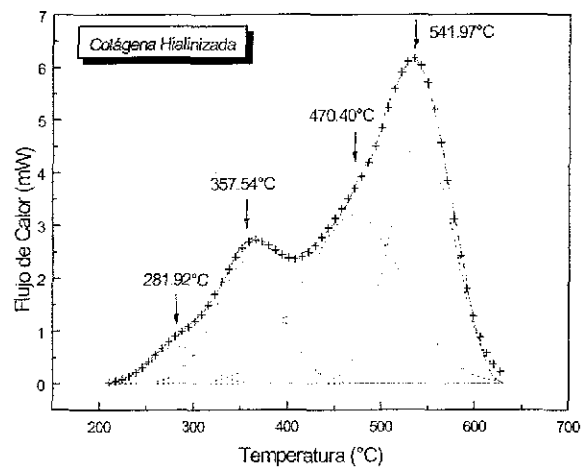
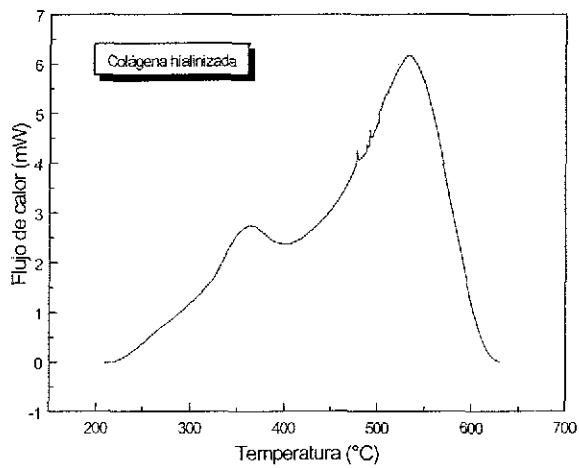


Figura 5.30 Termograma de colágena hialinizada y su correspondiente ajuste (derecha) con curvas gaussianas para cada pico.

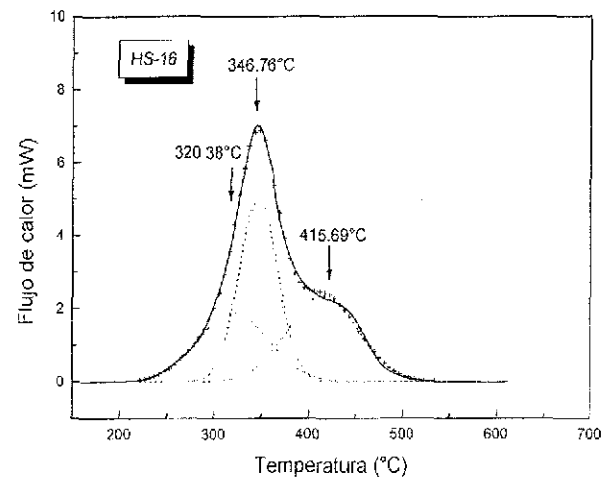
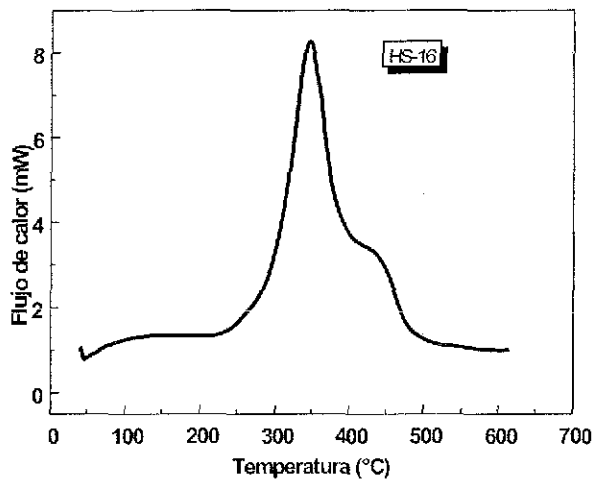


Figura 5.31 Termograma de HS-16 y su correspondiente ajuste (derecha) con curvas gaussianas para cada pico.

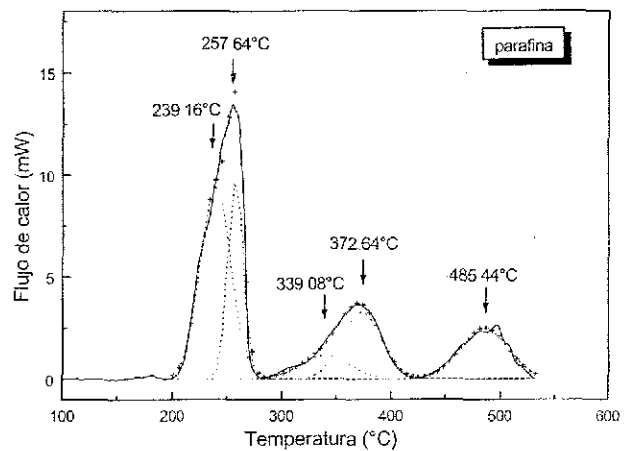
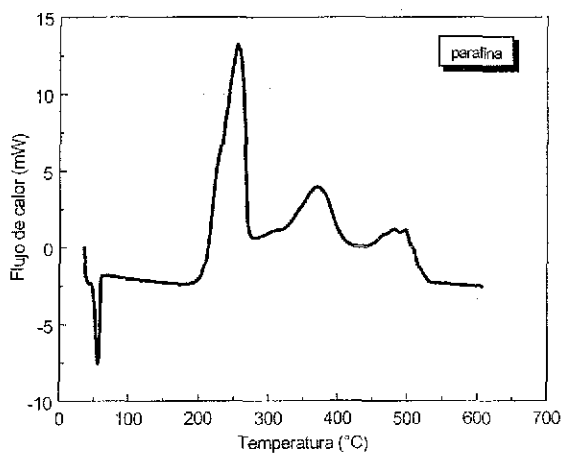


Figura 5.32 Termograma de parafina y su correspondiente ajuste (derecha) con curvas gaussianas para cada pico.

Tabla 5.4 Para cada muestra se dan las temperaturas de los picos sobresalientes, debajo aparecen las áreas que resultan del ajuste de cada pico, con sus porcentajes proporcionales

Muestra	T <sub>1</sub>	T <sub>2</sub>	T <sub>3</sub>	T <sub>4</sub>	T <sub>5</sub>	T <sub>6</sub>	T <sub>7</sub>	T <sub>8</sub>	T <sub>9</sub>	T <sub>10</sub>
<b>A-posible Tumor</b>	238.36 77.168 99%					347.25 523.35 66.9%			490.48 734.63 93.9%	544.88 782.17 100%
<b>B-hueso sano</b>		253.74 24.989 4.8%	291.34 54.424 10.4%			351.49 390.87 74.7%			480.21 523.49 100%	556.42 436.68 83.4%
<b>B-osteoides</b>			296.68 100.18 29.1%			357.86 229.07 66.7%			453.99 343.68 100%	536.11 280.97 81.8%
<b>Colágena Hialinizada</b>			281.92 49.666 11.8%			357.54 200.41 47.6%			470.40 420.78 100%	541.97 396.35 94.2%
<b>HS-16</b>				320.38 175.08 68.1%		346.76 256.92 100%		415.69 217.56 84.7%		
<b>Parafina</b>	239.16 330.20 100%	257.64 174.16 52.7%			339.08 65.007 19.7%		372 147.9 44.8%		485.44 135.23 41%	

Se obtuvieron las proporciones porcentuales relativas con respecto al pico de mayor entalpía (el cual se tomó como el 100%) para compararlas diferentes transiciones y así poder determinar la estabilidad térmica. Consideramos que un material tiene más estabilidad térmica que otro, cuando teniendo ambos la misma masa, se requiere o mayor temperatura o mayor cantidad de calor para llevar a cabo el proceso de desestabilización (combustión en el caso del tejido colagénico).

De lo anterior se ve que el grado de mineralización (determinado por DXR) da lugar a una menor estabilidad térmica, como se aprecia de los datos de la tabla 5.4. Esto se puede ver en la muestra de colágena hialinizada, la cual muestra mayor estabilidad que el osteoide. En el posible tumor hay una mayor estabilidad térmica, sin embargo en este caso los resultados del difractograma

indicaron la presencia de una fase cristalina, por lo cual se deduce que la interacción entre la fase cristalina y la matriz orgánica es muy pequeña.

### 5.7 Análisis por SAXS

En el análisis de SAXS, el radio de giro  $R_G$  se obtuvo de la pendiente de la curva  $\text{Log } I(q)$  vs  $q^2$ , gráfica de Guinier. De la gráfica de Kratky (figura 5.33) y de la figura 3.8, se determinó la forma de las partículas, *i.e.*  $q^2 I(q)$  vs  $q$ . Ya que si la curva de Kratky presenta un pico grueso, la partícula dispersora debe presentar muy probablemente una conformación globular, mientras que si la curva se aproxima a un aplanamiento, la partícula muy probablemente será un objeto fibriforme (Kataoka et al., 1993a).

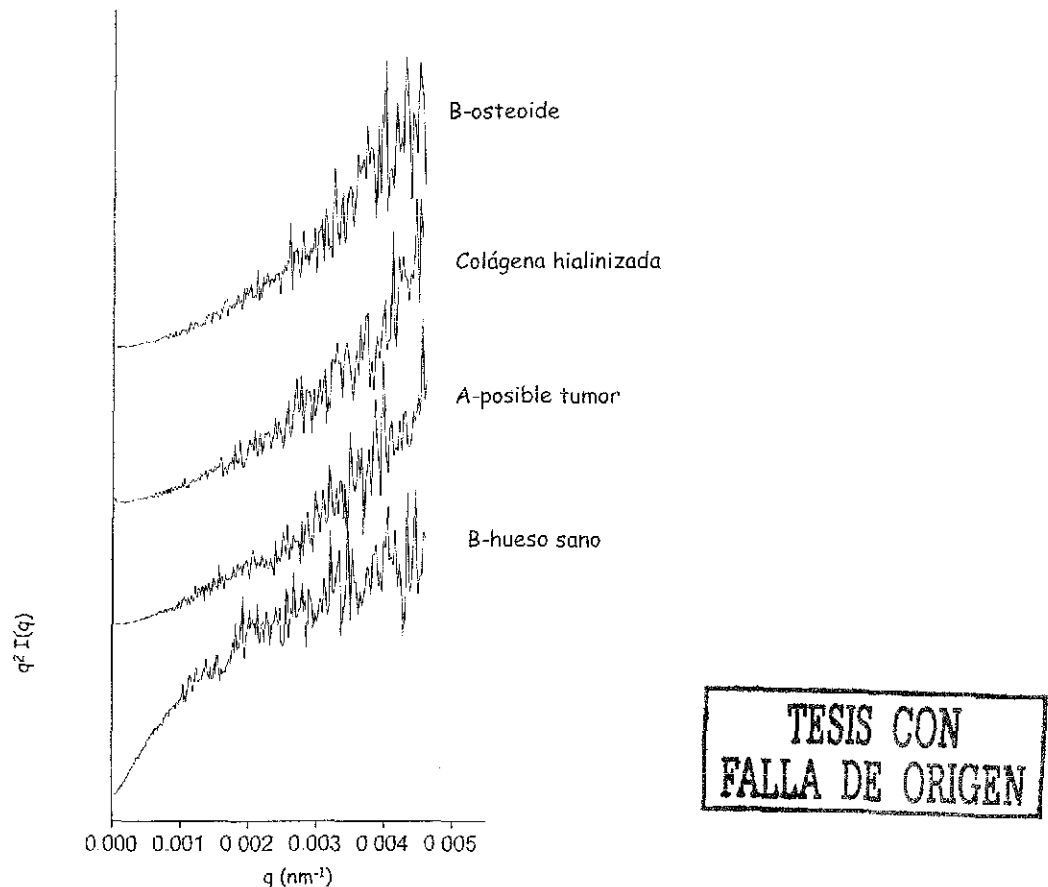


Figura 5.33 Graficas de Kratky de las muestras que se indican.

Así, de las gráficas de la figura 5.33, para el osteoide, la colágena y el tumor, se observa una forma fibrilar, como una cuerda con estructura constante; mientras que para el hueso sano también se observa una forma fibrilar, pero como una cuerda rígida. Ninguna de las muestras presentó una forma globular.

Si se conoce la forma, es posible calcular la función de distribución de distancia (Glatter, 1982). Como las partículas no tienen una forma bien definida, la dimensión fractal es un número útil para diferenciar el estado de agregación. En el análisis por SAXS, la gráfica de  $\text{Log}I(q)$  vs  $\text{Log} q$  proporciona la dimensión fractal (Harrison, 1995). Para este estudio, se corrigió la intensidad de fondo, usando la curva de Porod.

En la figura 5.33, se compara la gráfica de Kratky de las muestras. Para la de colágena hialinizada y la de osteoide se puede ver que en ambos casos la forma de la curva es la misma y no es posible establecer diferencias entre ellas, ambas están constituidas por objetos dispersores de forma fibrilar. Esta observación puede utilizarse para calcular la distribución de tamaños mostrados en la figura 5.34. La colágena hialinizada muestra una distribución bimodal, donde el primer máximo, correspondiente a la mayoría de los objetos dispersores, se encuentra para un radio de alrededor a  $15\text{Å}$ , el segundo pico para  $r = 40\text{Å}$  es menor. La curva correspondiente a la muestra de osteoide tiene el mismo primer pico a  $15\text{Å}$ , pero un grueso y nuevo hombro aparece pobremente resuelto en  $r = 25\text{Å}$ , así mismo el pico encontrado en la curva anterior en  $40\text{Å}$ , no aparece, sin embargo se presenta uno a  $30\text{Å}$ . Por último se encuentra un pico ancho a  $60\text{Å}$ . El tamaño de las heterogeneidades dispersoras puede usarse para distinguir estas dos muestras, la colágena hialinizada es de hecho el tejido más homogéneo (sólo dos tamaños  $r = 10$  y  $r = 40\text{Å}$  contribuyen a la dispersión SAXS), mientras que el osteoide comprende heterogeneidades de  $10, 25, 30$  y  $60\text{Å}$ . La muestra de tumor, también presenta distribución bimodal a  $15\text{Å}$  y  $40\text{Å}$ . En cambio la muestra de hueso sano sólo presenta una predominante distribución monomodal en  $120\text{Å}$ .

El radio de giro obtenido de la gráfica de Guinier fue de  $22.7, 64, 82.6$  y  $182\text{Å}$  para las muestras de colágena, osteoide, tumor y hueso sano respectivamente. Estos valores reproducen las diferencias encontradas en las curvas de distribución, las heterogeneidades en el osteoide son mayores que las de la colágena, las del tumor son mayores que las del osteoide y las de hueso sano aún más grandes que las del tumor. Si se asume una forma cilíndrica, la



ecuación que correlaciona al radio de giro  $R_G$  con el diámetro,  $D$ , del cilindro es:

$$R_G = \frac{D}{\sqrt{8}} .$$

De modo que los valores obtenidos corresponden al diámetro promedio de las fibras, aunque sabemos que son heterogéneas.

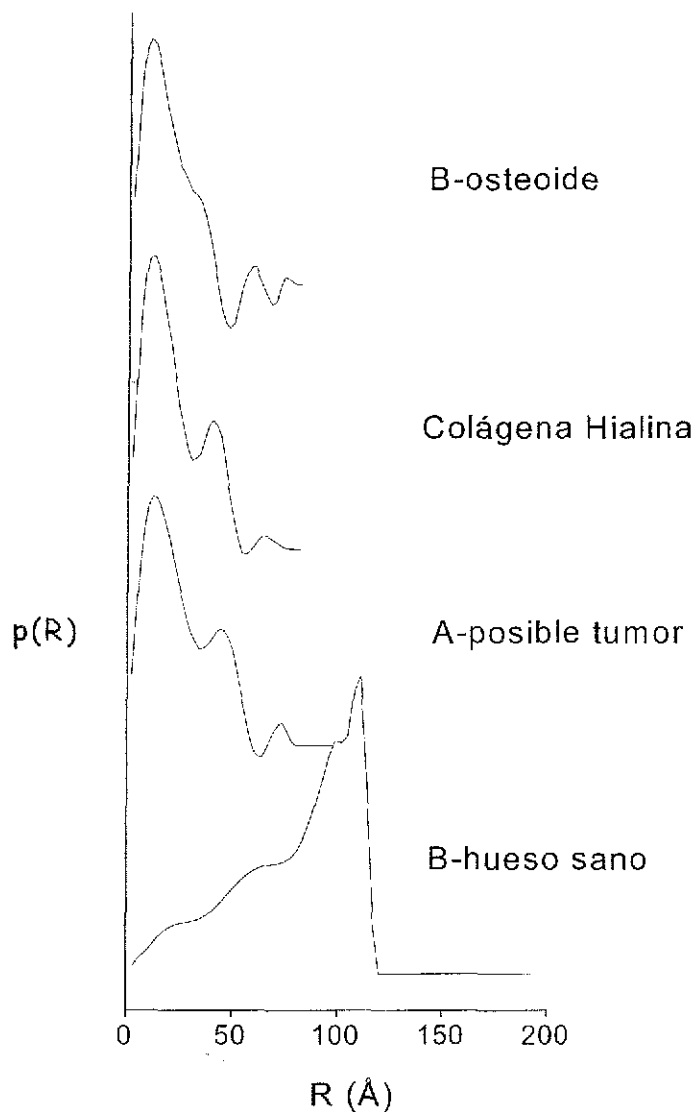


Figura 5.34 Gráficas de distribución de tamaños de las muestras que se indican.

Los huesos son objetos fractales cuya dimensión fractal puede variar entre el tejido de colágena y el de osteoide, si es que el mecanismo de crecimiento es diferente. La dimensión fractal puede obtenerse de la pendiente de las gráficas de  $\text{Log } I(q)$  vs  $\text{Log } (q)$ . Las muestras tienen una dimensión fractal de 1.34, 1.34, 2.3 y 2.6 para colágena hialina, osteoide, tumor y hueso sano respectivamente. Este valor concuerda dentro del margen de error, con el valor reportado. El grado de conectividad en colágena y osteoide es el mismo en ambas muestras ya que muestran la misma dimensión fractal.

En la figura 5.35 se muestran las distribuciones del perfil de densidad electrónica de cada muestra. Tanto osteoide, colágena como tumor, muestran un perfil similar con una alta densidad al centro, una densidad decreciente en el medio y una ligera recuperación de densidad hacia las orillas. Para el caso del hueso sano se tiene una notoria densidad en la orilla, en comparación con el medio y el centro.

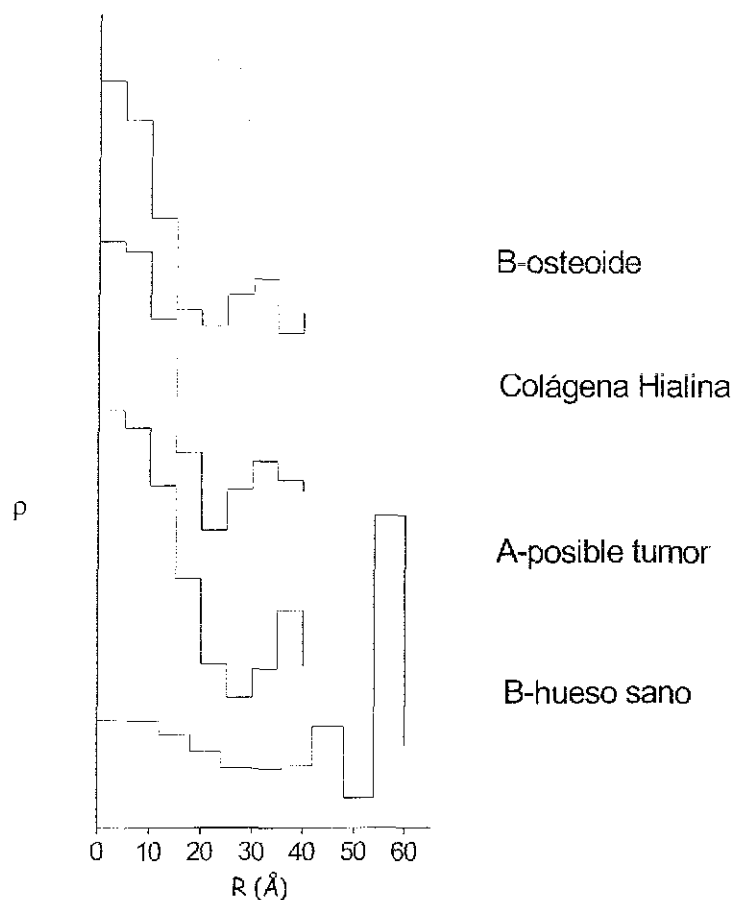


Figura 5.35 Gráfica del perfil de densidad electrónica

## 6 DISCUSION Y CONCLUSIONES

En la tabla 6.1 se enlistan los resultados más importantes obtenidos por cada una de las técnicas utilizadas en este trabajo.

Tabla 6.1

Técnica	Hueso sano	tumor	osteoide	Colágena hialinizada
<b>Microscopía óptica</b>	Liso, poco poroso, pocos plegamientos	Características combinadas de hueso sano y osteoide	Opaco, poroso, plegamientos	No se analizó
<b>Difracción de rayos X (DRX)</b>	Presencia de ultrafosfato de calcio ( $Ca_2P_6O_{17}$ ) medianamente cristalino + Amorfo	Presencia de ultrafosfato de calcio ( $Ca_2P_6O_{17}$ ) bastante cristalino + Amorfo	Amorfo + ultrafosfato de calcio ( $Ca_2P_6O_{17}$ ) pobremente cristalino	Solo componente amorfa
<b>PIXE</b>	Elementos mayoritarios: Ca, P, S, Cl, K. Elementos Traza: Fe, Zn, Cr, Mn, Cu, Br, Si	Elementos mayoritarios: Ca, P, S, Cl, K. Predominancia de Fe como elemento traza, además de Zr, Br, Ni, Mn, Cr	Elementos mayoritarios: P, S, Cl, K y Ca. Elementos traza: Fe, Zn, Cr, Mn, Cu y Si	Elementos mayoritarios: P, S, Cl, K, Ca. Trazas de As, Pb, Br
<b>Microscopía electrónica de barrido bajo vacío (LVSEM)</b>	Presencia de nódulos en las fibras calcificadas de mayor tamaño y muy numerosos. Presencia de C, O, Ca, P y S. Trazas de Cu	No se aprecia bien la forma de las fibras. Presencia de C, O, Si	Presencia de nódulos calcificados nanométricos en las fibras. Presencia de C, O, P, S, Ca y Cu. Trazas de Si	Fibras muy rizadas sin nódulos. Presencia de C, O, Ca. Trazas de Si, P, S, Cl, Cu y Na
<b>Infrarrojo (IR)</b>	Grupos funcionales: Cadenas C-H, amida I, carbonatos, Aminas primarias, deformación P-OH, No se aprecian todos los modos vibracionales del grupo $PO_4$	Grupos funcionales: Cadenas C-H, amida I, amida II, carbonatos, Aminas primarias y todos los modos vibracionales del grupo $PO_4$	Grupos funcionales: Cadenas C-H, amida I, amida II, carbonatos y todos los modos vibracionales del grupo $PO_4$	Grupos funcionales: Cadenas C-H, amida I, amida II, carbonatos. No se aprecian todos los modos vibracionales del grupo $PO_4$
<b>Calorimetría diferencial de barrido (DSC)</b>	Tres transiciones principales a 351, 480 y 556°C con áreas porcentuales respectivas de 75, 100 y 83%	Tres transiciones principales a 347, 490 y 545°C con áreas porcentuales respectivas de 66, 94 y 100%	Cuatro transiciones principales a 297, 358, 454 y 536°C con áreas porcentuales respectivas de 29, 67, 100 y 82%	Cuatro transiciones principales a 282, 358, 470 y 542°C con áreas porcentuales respectivas de 12, 48, 100 y 94%
<b>Dispersión de rayos X de bajo ángulo (SAXS)</b>	$R_g = 182 \text{ \AA}$ (radio de giro) Cuerda rígida en zig-zag  $df = 2.6$ (dimensión fractal)  Distribución de tamaño de partícula casi monomodal (120 Å) Densidad electrónica con un máximo para $R = 60 \text{ \AA}$	$R_g = 82.6 \text{ \AA}$ Filamento con doblamiento específico  $df = 2.3$  Distribución de tamaño de partícula bimodal (15, 40 Å) Densidad electrónica que decae con R, con un pequeño máximo para $R = 38 \text{ \AA}$	$R_g = 64 \text{ \AA}$ Filamento con doblamiento específico  $df = 1.34$  Distribución de tamaño de partícula bimodal (15, 60 Å) Densidad electrónica que decae con R, con un pequeño máximo para $R = 32 \text{ \AA}$ .	$R_g = 22.7 \text{ \AA}$ Filamento con doblamiento específico  $df = 1.34$  Distribución de tamaño de partícula bimodal (15, 40 Å) Densidad electrónica que decae con R, con un pequeño máximo para $R = 32 \text{ \AA}$ .

En la tabla se aprecia que el hueso sano, se ve liso, poco poroso, y con escasos plegamientos; se observó presencia de ultrafosfato de calcio ( $\text{Ca}_2\text{P}_6\text{O}_{17}$ ), lo cual es congruente con los elementos detectados con los análisis elementales de esta muestra. Se registraron modos vibracionales en la región de las aminas primarias ( $\text{NH}_2$ ), lo cual sugiere que en este tejido, las fibras de colágena se encuentran muy fragmentadas. Se observaron tres etapas de combustión térmica, quedando la mayor a una temperatura de  $480^\circ$ . Esta muestra está formada por elementos unidos, cada uno de los cuales es rígido y con una cierta longitud, formando cadenas en zig-zag. Las partículas prácticamente son de un solo tamaño ( $120 \text{ \AA}$ ), con una dimensión fractal de 2.6 (alta conectividad, indicando que el material con alta densidad electrónica tiende a ser un objeto tridimensional) y una prominente densidad electrónica en la periferia ( $R=60 \text{ \AA}$ ) de las partículas dispersoras.

El osteoide, al microscopio óptico se ve poroso y con plegamientos, también se encontró ultrafosfato de calcio ( $\text{Ca}_2\text{P}_6\text{O}_{17}$ ) lo cual también es congruente con los elementos detectados en el osteoide. En él se detectaron todos los modos vibracionales del  $\text{PO}_4$  y ninguno para el grupo de las aminas primarias, lo cual sugiere poca fragmentación de las fibras colagénicas, o un alto entrecruzamiento de estas en sus extremos terminales. Esta muestra tiene cuatro transiciones térmicas predominantes quedando la mayor en  $454^\circ$ . Las partículas que lo componen son filamentos con torsión uniforme, el osteoide tiene dimensión fractal de 1.34 (baja conectividad, indicando que el material con alta densidad electrónica tienden a ser unidimensional) y está formado principalmente por dos tamaños de partículas ( $15$  y  $60 \text{ \AA}$ ). Estas partículas también tienen una alta densidad electrónica en su centro, la cual decae al alejarse y recupera una ligera densidad en la periferia ( $R=32 \text{ \AA}$ ).

Para el caso del tumor, bajo el microscopio óptico, presenta características combinadas de las muestras de osteoide y de hueso sano; también se encontró ultrafosfato de calcio ( $\text{Ca}_2\text{P}_6\text{O}_{17}$ ), lo cual también es congruente con los elementos detectados en esta muestra. Se detectó la presencia de modos vibracionales en la región de las aminas primarias ( $\text{NH}_2$ ), lo cual, sugiere también en este caso, una fuerte fragmentación del tejido colagénico. También tiene tres etapas de transición térmica, estando la mayor a  $545^\circ$ . Las partículas que componen al tumor son filamentos con torsión constante; la muestra tiene dimensión fractal de 2.3 (conectividad intermedia, indicando que el sólido con alta densidad electrónica tiende a ser

bidimensional) y principalmente está formada por dos tamaños de partículas (15 y 40 Å). Estas partículas tienen una alta densidad electrónica al centro la cual decae al alejarse y recupera una ligera densidad en la periferia (R=38 Å).

Por último, para la muestra de colágena, no se encontró ultrafosfato de calcio, y los elementos detectados, resultaron muy similares a los de las otras muestras analizadas. No se registraron todos los modos vibracionales del PO<sub>4</sub> y tampoco se aprecia ninguno para el grupo de las aminas primarias. Aquí también se detectaron cuatro transiciones térmicas, presentándose la mayor a 470°. En este caso, las partículas que la componen son también filamentos con torsión constante, tiene una dimensión fractal de 1.34 y también esta formada por dos tamaños de partículas principalmente (15 y 40 Å). Estas partículas tienen también una alta densidad electrónica al centro la cual decae al alejarse de él, y recupera una ligera densidad en la periferia (R=32 Å).

De lo anterior se desprende el siguiente modelo: se puede ver que el hueso sano y el tumor, presentaron vibraciones en la región de las amidas primarias (grupos NH<sub>2</sub>). Estos grupos se encuentran en los extremos de las fibras de colágena y en estos extremos se pueden formar los primeros centros de cristalización, que dan lugar a la fase mineral. Esto explicaría la presencia de partículas conformando al hueso sano en unidades rígidas unidas en zig-zag. Así mismo, se observa que al tener, el hueso sano, mayor densidad en la periferia de sus partículas y ser la muestra que está conformada por las partículas más grandes, esto le proporciona mayor rigidez a sus estructuras.

La proporción de Ca/P para el ultra fosfato y para la hidroxiapatita es de 0.33 y 1.67 respectivamente, esto quiere decir que inicialmente se tiene fósforo y calcio y posteriormente aumenta el suministro de calcio, ya que la hidroxiapatita es la fase mineral final.

Las esferulitas observadas pueden ser los primeros centros de mineralización y la explicación de que sean esféricos, es que termodinámicamente, la esfera es la figura con menor tensión superficial y por lo tanto es la que requiere de menor energía para su formación. Esto, no quiere decir que se estén formando cristales esféricos, pero sí en una conformación de agrupamiento esférico.

Al adquirir, los pequeños cristales, energía cinética, por efecto del calor suministrado, al vibrar funcionan como centros de fractura que logran el rompimiento de las fibras de colágena y esto explica por que la colágena pura es estable a más alta temperatura.

Tabla 6.2

	Hueso sano	Tumor	Osteoide	Colágena hialinizada
Grado de mineralización	Alto	alto	Incipiente	nulo
Fragmentación de fibras colagénicas	Alta	alta	-	-
conectividad	Alta	regular	Baja	baja

De la tabla 6.2 se puede ver que existe una correlación entre el grado de mineralización, la conectividad y la fragmentación que se da en los centros de nucleación. Así, para hueso sano y tumor se tiene alta fragmentación y alta mineralización, mientras que lo contrario ocurre para osteoide y colágena hialinizada.

Finalmente, se puede decir que se cumplieron los objetivos planteados, en el sentido de que se adquirió mayor conocimiento de los tejidos estudiados, y se puede afirmar que sí fue posible distinguir al osteoide de la colágena hialinizada. La calorimetría, la dispersión de rayos X a bajo ángulo y la espectroscopía infrarroja resultaron ser poderosas técnicas para el estudio de tejido óseo y tejidos similares, en especial si se desea estudiar el proceso de mineralización o desmineralización.

## Comparative Analysis of Healthy and Tumoral Human Bone Tissues by Spectrometric and Calorimetric Techniques

A. Acosta-Romero, M. A. Peña-Rico, A. Heredia, L. F. Lozano, J. L. Ruvalcaba, L. Bucio, I. A. Belío-Reyes<sup>1</sup> and G. Mondragón-Galicia<sup>2</sup>

*Instituto de Física, Universidad Nacional Autónoma de México. Apartado Postal 20-364, 01000 México D.F. México*

<sup>1</sup>*Escuela de Odontología, Universidad Autónoma de Sinaloa, Campus Culiacán, Blvd. Universitarios y Av. Las Américas, C.P. 80010, Culiacán, Sinaloa, México*

<sup>2</sup>*Departamento de Síntesis y Caracterización de Materiales, Instituto Nacional de Investigaciones Nucleares, Km 36 5 Carretera México-Toluca, Ocoyoacac, Estado de México, C.P. 52045, México*

**Abstract.** Hyaline collagen can be present in bone tissue in such a manner that no fibroblast cells are able to be seen. Hystologically, hyaline collagen is difficult to distinguish from osteoid. The osteoid in the mineralization process (the accumulating hydroxyapatite carbonate, HAP, crystals) is made by the osteoblasts, and its looking is much like hyaline collagen. There are illnesses that could be useful to distinguish microscopically between hyaline collagen and osteoid. From the scope of the mineralization process, here we present the physical and chemical features that characterize hyaline collagen and osteoid employing differential scanning calorimetry, low vacuum scanning electron microscopy, FT Infrared spectroscopy and chemical analysis by Proton induced X-ray emission, PIXE. The results show that hyaline collagen has more thermal stability than osteoid tissue. The last could be explained considering the presence of nanometric apatite crystallites (acting as fracture centres) in the osteoid tissue having those apatite crystallites the effect in turn of diminish the thermal stability.

### INTRODUCTION

Bone tissue is made of an organic matrix constituted mainly by type I collagen, with mineralized hydroxyapatite carbonate,  $\text{Ca}_5(\text{PO}_4, \text{CO}_3)_3\text{OH}$ . Average compact bone contains by weight approximately 30% matrix and 70% apatite crystals [1]. Osteoblasts synthesize and secrete collagen molecules, which aggregate into fibrils. The particular alignment and gaps zones [2] resulting from this specific arrangement allow the nucleation of hydroxyapatite carbonate crystals and the formation of intermolecular and interfibrillar cross-linking [3]. Covalent cross-links are almost immediately formed within and between the collagen molecules, stabilizing the fibril structure. These cross links, which are formed from specific lysyl and hydroxylysyl residues, are essential in providing the tensile strength and mechanical stability of the collagen fibrils [4]. Later on, trivalent cross-links are formed and can be found in two forms: hidroxylysyl-pyridinoline and lysyl-pyridinoline. The mechanical strength of

bone is due to the collagen fibers, while the inorganic crystalline component gives bone its rigidity. In fibrils, molecules of collagen are parallel to each other, overlapping each other by multiples of 67 nm, each molecule being 300 nm long. Also, there is a 40 nm gap between the end of a molecule and the beginning of the other. In bone, hydroxyapatite crystals grow and lie in the gaps between collagen molecules [5]. The calcification begins a few days after the deposition of organic bone substance, also called osteoid, which can be described as precalcified bone matrix composed mostly of type I collagen. Osteoid is the first sign of an ossification center formation. The osteoid in the mineralization process (the accumulating hydroxyapatite carbonate crystals) is made by the osteoblasts, and its looking is much like hyaline collagen. On the other hand, Osteogenic sarcoma is a malignant bone tumor where malignant cells are capable to produce osteoid and or bone. Diagnosis can be difficult, because the disease is easily confused with other pathologies. Therefore this work was devoted to study hyaline collagen and osteoid.

## METHODOLOGY

Bone tissue samples were provided by the Pathology Department, General Hospital, Mexico City, and by the Anthropological Research Institute at National Autonomous University of Mexico. Conserved and fixed osteoid and hyaline collagen samples in paraffin blocks 2×2×1 cm size were cut in sections with a microtome. After that, paraffin was removed using xylol, keeping the samples 72 hours in xylol. Once dry, the samples were cut into pieces of approximately 0.2 mg each one. A bone piece from adult human radius was used as control sample (healthy bone) and no visible signs of illness could be appreciated. This piece was cut and then washed by softly shaking with distillate water in an agate mill for 1 hour. Dirty water was extracted and substituted for ethanol and put to shake again for 5 days. During this procedure, the ethanol solution was substituted each 3 hours. This method was useful to remove impurities and lipids from the collagen matrix. After washing, the sample was dried and powdered in an agate mill and sieved through a 325 mesh. The particle size obtained were less than 44  $\mu\text{m}$ . The calorimetric experiments were performed in a Thermal Analysis System 9900, Du Pont 910 Module DSC. In these measurements powder (or small fragments) of 2 mg weight approximately were used. The experiments were repeated twice in order to check its reproducibility. The heating rate was constant and equal to 10°C/min in air atmosphere covering the range from room temperature to 600°C. The sample amount used for all DSC experiments were approximately 2 mg. The initial and final values of the sample weight before and after a DSC measurement were registered in order to know the quantity of sample lost by the thermal treatment. The FT-IR analyses were carried out using a Nicolet 680 equipment. The samples were mixed with KBr powder (100:1 ratio) and then compressed into pellets. Particle Induced X-ray Emission (PIXE) was used to study the elemental composition. The samples were irradiated in a Pelletron NEC accelerator with proton beam reaching 3 MeV at the sample surface. The corresponding X-rays spectra were collected employing a tantalum collimator (0.3 mm diameter) for main and light elements registered at a Si detector; while an aluminum



absorber of 38 micrometers was used at the LFGc detector to receive suitably the trace elements and heavy elements signals. The detection angle in both detectors was 45°. A low vacuum scanning electron microscope JEOL LV6000 was used for microstructure analysis. No specific sample preparation was employed for the observations. Simply the small piece of sample was fixed by the use of carbon ribbon. The low vacuum reached was between 1-250 Pa (0.01-2 torr) and the voltage conditions used were 5-20 kV. Additionally chemical mapping were performed by analyzing the EDS spectra.

## RESULTS

From the DSC thermograms shown in fig. 1, it could be seen an exothermic peak around 350°C in all cases being the highest in healthy bone and the lowest in hyaline collagen. At 530°C approximately, a second prominent exothermic peak was observed being the highest (and wide) for hyaline collagen and wide for osteoid, while for healthy bone, only a shoulder around 430°C could be appreciated. In all cases, the exothermic peaks represent the combustion-degradation process of the organic component in the samples.

The FTIR spectra corresponding to hyaline collagen and osteoid samples have differences principally at the 1600-400  $\text{cm}^{-1}$  range, because of the low presence of

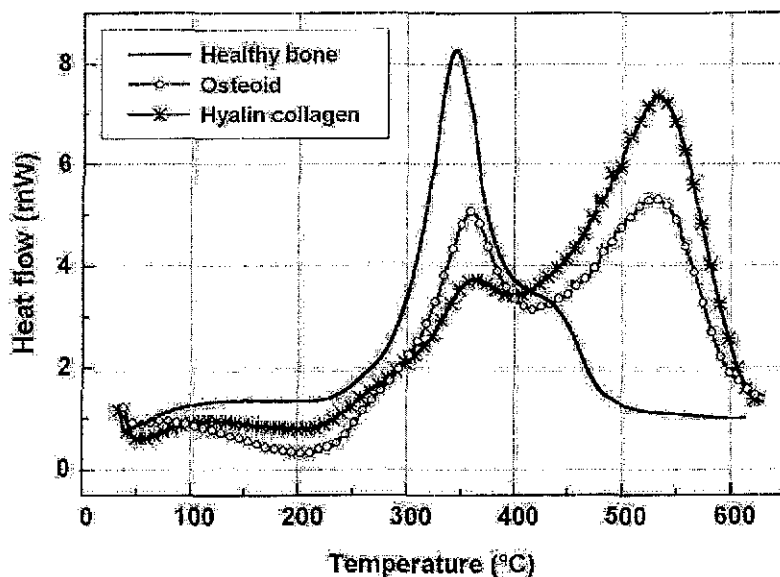


FIGURE 1. DSC thermograms of healthy bone, osteoid and hyaline collagen.

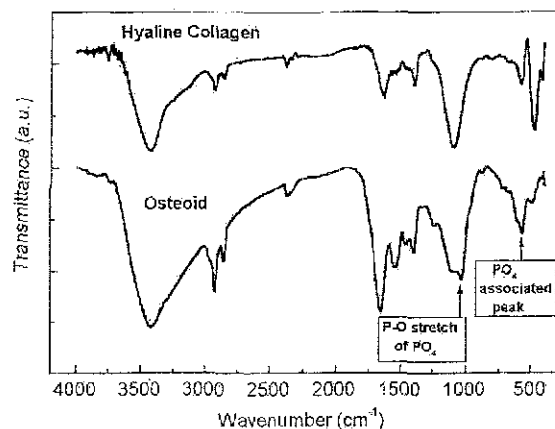


FIGURE 2. IR Spectra of hyaline collagen and osteoid.

mineral phase in hyaline collagen (figs. 2). In both samples there are signals corresponding to collagen: amide I at  $1650\text{ cm}^{-1}$  (related with the C=O stretch), amide II at  $1550\text{ cm}^{-1}$  and amide III at  $1230\text{-}1240\text{ cm}^{-1}$  (both related with C-N stretch, and N-H vibration of C-N-H in plane bending modes). There are also many inorganic bands from hydroxyapatite carbonate in osteoid sample: for P-O at  $560$  and  $1030\text{ cm}^{-1}$  (P-O stretch of  $\text{PO}_4$ ), and for carbonate group at  $890$ ,  $1100$ ,  $1370$ ,  $1420$  and  $1470\text{ cm}^{-1}$ . The PIXE analysis shows predominance of P, S, Cl, K, and Ca in osteoid in comparison with hyaline collagen (fig. 3). The trace elements are also represented in fig. 3 (right), standing out Fe, Zn, Cr, Mn, Cu and Si. Br is only present in hyaline collagen.

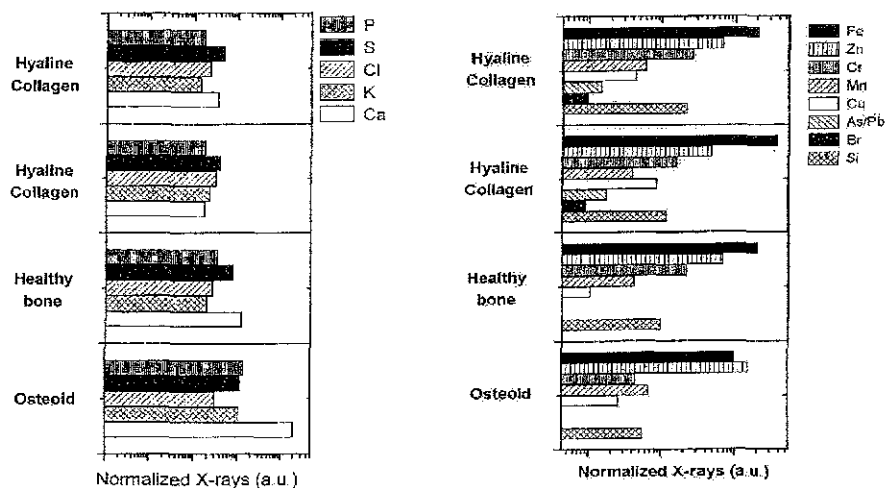
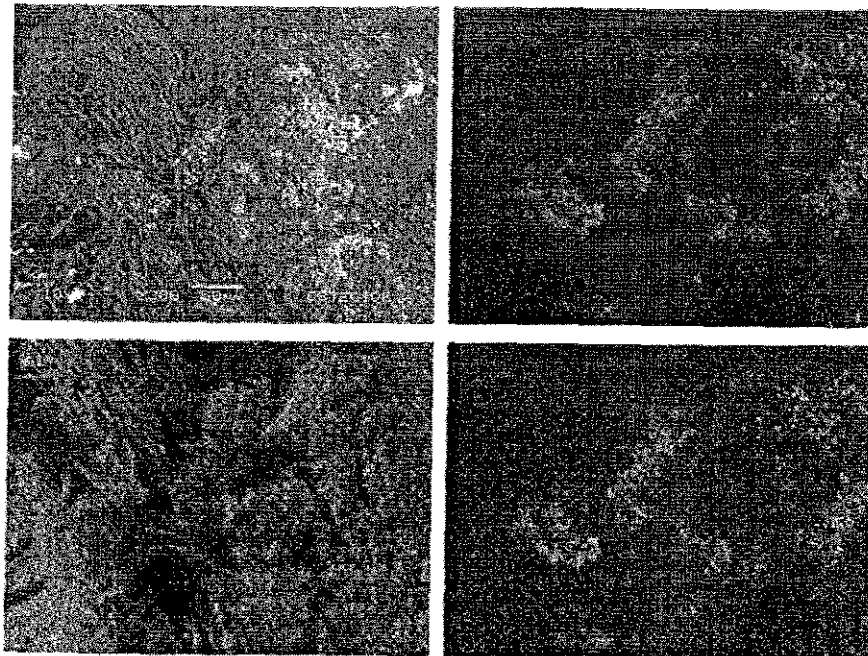
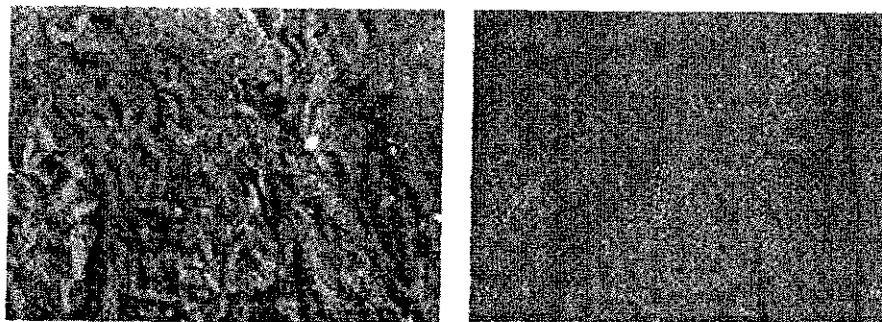


FIGURE 3. Chemical analysis obtained by PIXE: main elements (left), trace elements (right)



**FIGURE 4.** LVSEM image ( $\times 300$ ) of osteoid tissue (left above), and the corresponding chemical mappings: calcium (right above), carbon (left below) and phosphorous (right below).

The LVSEM images at  $\times 300$  magnification, show a collagen fibers with mineralized zones in the case of osteoid tissue (fig. 4 left above), corroborated by the corresponding high levels of calcium and phosphorous in the chemical mappings (fig. 4 right above and right below). The collagen matrix can be clearly identified in the carbon-mapping photograph (fig. 4, left below). In the case of hyaline collagen, no appreciable levels of calcium or phosphorous could be detected in the chemical mappings.



**FIGURE 5.** LVSEM image ( $\times 300$ ) of hyaline collagen tissue (right) and the corresponding carbon mapping (left)

In the LVSEM images from hyaline collagen (fig. 5) a higher tangled degree in the collagen fibers could be observed. It is related probably by changes in the collagen quaternary structure. Being the case, it can be expected major thermal stability in the hyaline collagen than in the case of osteoid tissue because additional crosslinks are participating in the stability of the collagen structure. This possibility is in agreement with the results obtained from calorimetric (DSC) measurements. The element chromium, which quantity is slightly lower in osteoid tissue, is thought to be an essential micronutrient, being associated with glucose intolerance when there are low intakes in the elderly [6]. It is not clear the rule of this element in the mineralization process and it seems, from the results exposed in fig. 3 (on the right), that there is no correlation between the incipient mineralization in osteoid and its low content of chromium. It can be also observed that osteoid tissue has higher content of zinc in comparison to the other samples analyzed. This fact can be explained knowing that zinc is an essential trace element having stimulatory effects on bone formation in vitro and in vivo. At a concentration of 100 mM, increases bone protein and calcium content. Zinc is a highly potent and selective inhibitor of osteoclastic bone resorption in vitro. Zinc may also be considered as carcinogenic [7]. On the other hand, Pb, As and Br were only detected in hyaline collagen. It is not clear what is the rule of the two last chemical elements in the mineralization process, but in the first case, it is well known that when lead is ingested, it largely follows the routes of calcium [8]. Dowd *et al.* [9] have reported that submicromolar concentrations of free lead compete with  $\text{Ca}^{2+}$  binding to osteocalcin and, since  $\text{Pb}^{2+}$  inhibits osteocalcin binding to hydroxyapatite, this may lead to significant osteocalcin inactivation and ultimately might affect bone mineral dynamics [8]. This explains possibly the low mineralization degree found in hyaline samples.

## CONCLUSION

Hyaline collagen has more thermal stability than osteoid tissue. The last could be explained considering the presence of nanometric apatite crystallites (acting as fracture centres) in the osteoid tissue, having those apatite crystallites the effect in turn of diminish the thermal stability. Major stability of hyaline collagen also could be explained by differences of quaternary structure that is exclusively responsible from the microstructural arrangement of fibers observed by LVSEM. The PLXE analysis shows predominance of metal elements that, taking into account the known findings of their rules in the mineralization process, are in agreement to the higher mineralization degree found in the osteoid tissue. Finally, it is clear the enhanced differences found between healthy bone, hyaline collagen and osteoid in the calorimetric measurements. Then, we propose that calorimetry is a powerful technique which might be seriously considered to complete clinic diagnosis.

## ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by DGAPA-UNAM projects PAPIIT IN-113199 and IN-120801. The authors are grateful to Drs. Abisaïd Alcántara, C. Piña and P. Bosch for

valuable discussions, Miguel Angel Canseco for technical support with FTIR and María de los Angeles Martínez for the graphical design.

## REFERENCES

1. Ozin, G.A., Varaksa, N., Coombs, N., Davies, J.E., Perovic, D.D., and Ziliox, M., *J. Mater Chem* **7**, 1601-1607 (1997).
2. Berthet-Colominas, C., Miller, A., and White, S.W., *J. Mol Biol* **134**, 431-446 (1979).
3. Bailey, A.J., Light, N.D., and Atkins, E.D.T., *Nature* **288**, 408-410 (1980).
4. Bailey, A.J., Paul, R.G., and Knott, L., *Mechan Ageing Develop.* **106**, 1-56 (1998).
5. Rossert, J., and de Crombrughe, B., "Type I Collagen: Structure, Synthesis and Regulation", in *Principles of Bone Biology*, edited by J. Bilezikian, L.G. Raisz and G.A. Rodan, 1<sup>st</sup> ed., USA, Academic Press, 1996, pp. 127-142.
6. Hambidge, K.M., *Am. J. Clin. Nutr.* **27**, 505-514 (1974).
7. Emsley, J., *The Elements*, publisher, Clarendon Press Oxford, 1991, pp. 1-253.
8. Bronner, F., "Metals in Bone: Aluminum, Boron, Cadmium, Chromium, Lead, Silicon, and Strontium", in *Principles of Bone Biology*, edited by J. Bilezikian, L.G. Raisz and G.A. Rodan, 1<sup>st</sup> ed., USA, Academic Press, 1996, pp. 295-303.
9. Dowd, T.L., Rosen, J.F., Grundberg, C.M., and Gupta, R.K., *Biochim Biophys Acta* **1226**, 131-137 (1994).

## APENDICE B

### Ecuación de Debye

Esta ecuación proporciona las intensidades de rayos X, dispersadas por un sólido en el que se asumen las siguientes características:

- no es cristalino (no hay orden a largo alcance)
- es isotrópico ( las propiedades no dependen de la orientación )
- es estadísticamente homogéneo (existen propiedades promedio)
- se tiene una colección de N grupos idénticos de átomos con geometría conocida con posición y orientación aleatoria.

La ecuación es la siguiente:

$$I = N \sum_{j=1}^p \sum_{l=1}^p f_j(Q) f_l(Q) \frac{\sin Qr_{jl}}{Qr_{jl}}$$

Donde:

I representa la intensidad dispersada por el material amorfo.

N representa el número de grupos idénticos de átomos con geometría conocida con posición y orientación aleatoria.

$j, l$  representan a los átomos en las posiciones  $\vec{r}_j$  y  $\vec{r}_l$ .

p representa al número de átomos en un grupo.

$r_{jl}$  representa la distancia de separación entre los átomos.

f representa los factores de dispersión de las parejas de átomos j, l respectivamente.

Q es una magnitud en el espacio recíproco con valor  $Q=(4\pi \text{sen}\theta)/\lambda$ , donde  $\theta$  es el ángulo de Bragg y  $\lambda$  la longitud de onda de los rayos X.

Dedución:

Partiremos del factor de estructura del grupo n-ésimo, ya que representa la superposición de las ondas que son dispersadas por las densidades electrónicas de los átomos, este factor esta dado por:

$$F_n = \sum_{j=1}^p f_j(\vec{r}^*) e^{2\pi i \vec{r}^* \cdot \vec{r}_j}$$

Se trata de una suma de ondas en forma compleja en donde  $f_j(\vec{r}^*)$  representa la amplitud y cada lado del grupo, esta definido por el factor de dispersión de cada uno de los p átomos y se tendrá un polígono de p+1 lados y la fase es  $\delta_j = 2\pi \vec{r}^* \cdot \vec{r}_j$ , en donde  $\vec{r}^*$  es el vector en el espacio reciproco y  $\vec{r}_j$  es el vector de posición del átomo j.

Las  $\vec{r}$  en la ecuación anterior son vectores, por lo tanto se trata de una ecuación vectorial, de manera que ahora se usaran algunas definiciones para sustituirlas en esa ecuación y transformarla en una ecuación escalar a fin de no usar cálculo vectorial para su integración:

Sea  $\vec{K}$  el vector que representa al haz dispersado,  $\vec{K}_0$  el vector que representa al haz incidente y  $\Delta\vec{K} = \vec{K} - \vec{K}_0 = 2\pi\vec{r}^*$

De la figura se puede ver que

$$\left| \frac{\Delta\vec{K}}{2} \right| = K \sin\theta \quad \text{ó} \quad |\Delta\vec{K}| = 2K \sin\theta \quad \text{pero} \quad K = \frac{2\pi}{\lambda}$$

$$\therefore |\Delta\vec{K}| = \frac{4\pi}{\lambda} \sin\theta = Q = 2\pi r^*$$

$$\text{y} \therefore \delta_j = \Delta\vec{K} \cdot \vec{r}_j = 2\pi \vec{r}^* \cdot \vec{r}_j = Q r_j \cos\varphi_j$$

en donde  $\varphi_j$  es el ángulo entre los vectores  $\Delta\vec{K}$  y  $\vec{r}_j$   
sustituyendo:

$$F_n = \sum_{j=1}^p f_j(Q) e^{i Q r_j \cos\varphi_j}$$

La cual ya es una ecuación escalar fácil de integrar.

El factor de estructura de los N grupos de átomos será:

$$F(Q) = \sum_{n=1}^N F_n(Q)$$

y

$$|F(Q)|^2 = \sum_{n=1}^N \sum_{m=1}^N F_n(Q) F_m^*(Q) = \sum_{n=1}^N \langle |F_n|^2 \rangle$$

en donde  $F_n(Q)$  es el factor de estructura del grupo n-ésimo y  $F_m^*(Q)$  es el conjugado del factor de estructura del grupo m-ésimo y:

$$\langle |F_n|^2 \rangle = \sum_{j=1}^p \sum_{l=1}^p f_j(Q) f_l(Q) e^{iQr_j \cos \varphi_j} e^{-iQr_l \cos \varphi_l}$$

debe de ser un promedio sobre todas las orientaciones posibles del grupo n-ésimo, puesto que su orientación es aleatoria.

$$\langle |F_n(Q)|^2 \rangle = \sum_{j=1}^p \sum_{l=1}^p f_j(Q) f_l(Q) \langle e^{iQ(r_j \cos \varphi_j - r_l \cos \varphi_l)} \rangle$$

en donde  $r_j \cos \varphi_j = \bar{r}_j \cdot \hat{p}^*$  y  $r_l \cos \varphi_l = \bar{r}_l \cdot \hat{p}^* \therefore$

$$\langle |F_n(Q)|^2 \rangle = \sum_{j=1}^p \sum_{l=1}^p f_j(Q) f_l(Q) \langle e^{iQ(\bar{r}_j - \bar{r}_l) \cdot \hat{p}^*} \rangle$$

$$\therefore \langle |F_n(Q)|^2 \rangle = \sum_{j=1}^p \sum_{l=1}^p f_j(Q) f_l(Q) \langle e^{iQ\bar{r}_{jl} \cdot \hat{p}^*} \rangle$$

donde  $\bar{r}_{jl} = \bar{r}_j - \bar{r}_l$

$$\therefore \langle |F_n(Q)|^2 \rangle = \sum_{j=1}^p \sum_{l=1}^p f_j(Q) f_l(Q) \langle e^{iQ\bar{r}_{jl} \cos \varphi_{jl}} \rangle$$

El promedio es sobre todas las orientaciones posibles de  $\hat{p}_{jl} = \bar{r}_j - \bar{r}_l$ , dadas por  $\cos \varphi_{jl}$ . El promedio de  $e^{iQ\bar{r}_{jl} \cos \varphi_{jl}}$  se puede calcular colocando el origen



de coordenadas en el átomo  $l$  y orientando el vector  $\hat{r}^*$  en dirección del eje  $z$  de modo que

$$r_{jl} = r \quad \text{y} \quad \cos\varphi_{jl} = \cos\varphi$$

Así:

$$\begin{aligned} \langle e^{iQr_{jl} \cos\varphi_{jl}} \rangle &= \langle e^{iQr \cos\varphi} \rangle = \frac{1}{4\pi} \int_0^\pi \int_0^{2\pi} e^{iQr \cos\varphi} d\Omega = \frac{2\pi}{4\pi} \int_0^\pi \text{sen}\varphi e^{iQr \cos\varphi} d\varphi = \frac{1}{2} \int_0^\pi \frac{1}{-iQr} e^{iQr \cos\varphi} d(iQr \cos\varphi) = \\ &= \frac{1}{2} \frac{e^{iQr \cos\varphi}}{-iQr} \Big|_0^\pi = -\frac{1}{2} \frac{e^{-iQr} - e^{iQr}}{iQr} = \left( \frac{1}{Qr} \right) \frac{e^{iQr} - e^{-iQr}}{2i} = \frac{\text{sen } Qr}{Qr} \end{aligned}$$

donde:

$$d\Omega = \text{sen}\varphi d\theta d\varphi$$

y

$$d(iQr \cos\varphi) = -iQr \text{sen}\varphi d\varphi$$

$$\therefore \langle e^{iQr_{jl} \cos\varphi_{jl}} \rangle = \frac{\text{sen } Qr_{jl}}{Qr_{jl}}$$

y

$$\therefore \langle |F_n(Q)|^2 \rangle = \sum_{j=1}^p \sum_{l=1}^p f_j(Q) f_l(Q) \left( \frac{\text{sen } Qr_{jl}}{Qr_{jl}} \right)$$

así:

$$I = \sum_{n=1}^N \langle |F_n(Q)|^2 \rangle = \sum_{n=1}^N \left[ \sum_{j=1}^p \sum_{l=1}^p f_j(Q) f_l(Q) \left( \frac{\text{sen } Qr_{jl}}{Qr_{jl}} \right) \right]$$

ó

$$I = N \sum_{j=1}^p \sum_{l=1}^p f_j(Q) f_l(Q) \frac{\text{sen } Qr_{jl}}{Qr_{jl}}$$

La cual, es la ecuación de Debye. (Giacovazzo, et al., 1992)

Esta ecuación es importante, para entender la teoría de la dispersión a bajo ángulo (SAS) por sus siglas en inglés Small Angle Scattering.

APENDICE C

Ficha PDF de la hidroxiapatita, tarjeta No. 9-432 (2000 Powder Diffraction File: Inorganic Phases, ICDD International Centre for Diffraction Data, USA, 2000).

9-432

d	2.81	2.78	2.72	8.17	$Ca_5(PO_4)_3(OH)$ $\frac{1}{2} [Ca(OH)_2 \cdot 3Ca_3(PO_4)_2]$ ★ CALCIUM HYDROXIDE ORTHOPHOSPHATE (HYDROXYAPATITE)					
I/I <sub>1</sub>	100	60	60	11	dÅ	I/I <sub>1</sub>	hkl	dÅ	I/I <sub>1</sub>	hkl
Rad. CaK $\alpha_1$ , $\lambda$ 1.5405 Filter Dia. 114.6mm Cut off 50 Vt. PHOTOMETER* (GUINIER CAMERA) Ref. DEWOLFF, TECH. PHYS. DIENST, HOLLAND					8.17	12	100	2.040	2	400
Sys. HEXAGONAL SG P6 <sub>3</sub> M <sub>1</sub> (176) a <sub>1</sub> 9.418 b <sub>1</sub> c <sub>1</sub> 6.884 A C 0.7309 $\alpha$ $\beta$ $\gamma$ $\delta$ $\epsilon$ $\zeta$ $\eta$ $\theta$ $\iota$ $\kappa$ $\lambda$ $\mu$ $\nu$ $\xi$ $\omicron$ $\pi$ $\rho$ $\sigma$ $\tau$ $\upsilon$ $\phi$ $\chi$ $\psi$ $\omega$ Ref. Iso					5.26	6	101	2.000	6	203
					4.72	4	110	1.943	30	222
8 $\alpha$ n $\omega$ $\beta$ >1.77 $\delta$ $\gamma$ Sign 2V D 3 08 mp Color Ref.					4.07	10	200	1.990	16	312
					3.88	10	111	1.871	6	320
*I/I <sub>1</sub> ARE PEAK VALUES FROM A PATTERN WHICH SHOWS SLIGHT BROADENING OF PRISM REFLECTIONS SAMPLE OBTAINED FOLLOWING THE PROCEDURE INDICATED BY HODGE C.S. IND. ENG. CHEM. ANAL. ED. 1Q 156 (1938).					3.51	2	201	1.841	40	213
					3.44	40	002	1.806	20	321
PLUS ADDITIONAL LINES					3.17	12	102	1.780	12	410
					3.08	18	210	1.754	16	402,303
2.814 100 211 1.722 20 004,411					2.778	60	112	1.684	4	104
					2.720	6	300	1.644	10	322,223
2.631 25 202 1.611 8 313					2.628	6	301	1.587	4	501,204
					2.296	8	212	1.542	6	420
2.262 20 310 1.530 6 331					2.228	2	221	1.503	10	214,421
					2.148	10	311	1.474	12	502
2.134 4 302 1.465 4 510					2.065	8	113			

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

## APENDICE D

### Principios de Dispersión a Bajo Ángulo

$$\rho(\vec{r}) = \frac{1}{V} \sum_{i \in v} b_i \delta(\vec{r} - \vec{r}_i) \quad \text{Densidad del material dispersor}$$

con  $v$ : volumen unidad (mayor que el volumen atómico)

$b_i$ : longitud de dispersión.

La función de auto - correlación de  $\rho(\vec{r})$  está dada por:

$$P(\vec{r}) = \frac{1}{V} \int \rho(\vec{r}') \rho(\vec{r}' + \vec{r}) d\vec{r}' \equiv \langle \rho(0) \rho(\vec{r}) \rangle \quad \text{Función de Patterson}$$

La intensidad de dispersión se obtiene por la transformada de Fourier de  $P(\vec{r})$

$$I(\vec{q}) = \frac{1}{V} \left| \sum_i b_i e^{i\vec{q} \cdot \vec{r}_i} \right|^2 = \int P(\vec{r}) e^{i\vec{q} \cdot \vec{r}} d\vec{r}$$

donde el factor de forma esta definido por

$$A(\vec{q}) = \sum_i b_i e^{i\vec{q} \cdot \vec{r}_i} = \int \rho_i(\vec{r}) e^{i\vec{q} \cdot \vec{r}} d\vec{r}$$

entonces

$$I(\vec{q}) \propto |A(\vec{q})|^2$$

Partícula aislada

Para una función uniforme de  $P(\vec{r})$ ,

$$I(q) = \int P(r) \cos(\vec{r} \cdot \vec{q}) d\vec{r}$$

La intensidad del SAS se obtiene promediando  $I(q)$  sobre el ángulo sólido en el espacio recíproco,

$$I(q) = \frac{1}{4\pi} \int_{\Omega} I(q) d\Omega = \frac{1}{4\pi} \int_0^{\infty} \int_0^{4\pi} r^2 dr d\omega \int_0^{4\pi} d\Omega P(r) \cos(q \cdot r) = \int_0^{\infty} r^2 dr \int_0^{4\pi} P(r) d\omega \frac{1}{4\pi} \int_0^{4\pi} \cos(q \cdot r) d\Omega$$

Aquí,

$$\langle \cos(q \cdot r) \rangle = \int_0^{\pi} \cos(qr \cos\phi) \frac{\sin\phi}{2} d\phi = \frac{\sin qr}{qr}$$

es tomado en cuenta,

$$I(q) = 4\pi \int_0^{\infty} \gamma(r) \frac{\sin qr}{qr} r^2 dr$$

donde

$$\gamma(r) = \frac{1}{4\pi} \int_0^{4\pi} P(r) d\omega \quad \gamma(r) \text{ es la función de correlación de } \rho(r) * \rho(-r)$$

Si  $D$  es la dimensión más larga en una partícula,

$$I(q) = 4\pi \int_0^D \gamma(r) \frac{\sin(qr)}{qr} r^2 dr$$

Partícula esférica con radio  $R$

$$A(q) = 4\pi \int_0^{\infty} \rho(r) \frac{\sin(qr)}{qr} r^2 dr$$

$$\rho(r) = \{ \rho_0 \text{ si } r \leq R \text{ y } 0 \text{ si } R < r \}$$

$$A(q) = 4\pi\rho_0 \int_0^R \frac{\sin(qr)}{qr} r^2 dr = 4\pi\rho_0 \int_0^{qR} \frac{\sin x}{x} \frac{x^2}{q^2} \frac{dx}{q} \quad (qr \equiv x)$$

$$\begin{aligned}
&= \frac{4\pi\rho_0}{q^3} \int_0^{qR} x \operatorname{sen} x dx = \frac{4\pi\rho_0}{q^3} \left\{ -x \cos x \Big|_0^{qR} + \int_0^{qR} \cos x dx \right\} = \frac{4\pi\rho_0}{q^3} \{-qR \cos qR + \operatorname{sen} qR\} = \\
&= \frac{4}{3}\pi R^3 \rho_0 \left\{ 3 \frac{\operatorname{sen} qR - qR \cos qR}{(qR)^3} \right\} \\
I(q) &= |A(q)|^2 \\
&= \rho_0^2 v^2 \left\{ 3 \frac{\operatorname{sen} qR - qR \cos qR}{(qR)^3} \right\}^2
\end{aligned}$$

donde

$v = \frac{4}{3}\pi R^3$ : es el volumen de la partícula.

## REFERENCIAS

(Alberts et al., 1994) B. Alberts, D. Bray, J. Lewis, M. Raff, K. Roberts y J.D. Watson. *Molecular Biology of the Cell*. Garland, N.Y. (1994) 1182-1183.

(Belío et al., 2002) I.A. Belío-Reyes, L. Lozano, A. Heredia y L. Bucio. Microhardness and Thermal Stability of Human Dentin From Rural Communities of Sinaloa State, Mexico. Stefan B. Sigurdsson (ed.). *Proceedings of the International Federation for Medical and Biological Engineering Vol. 2* (2002) 62-63.

(Bosch y Lara, 2001) Pedro Bosch y Victor Hugo Lara. El SAXS en la caracterización de la zeolitas. *Memorias del 2º congreso mexicano de zeolitas* (2001).

(Bronner, 1986) F. Bronner, D. Pansu y W. D. Stein. An Analysis of Intestinal Calcium Transport Across the Rat Intestin. *Am. J. Physiol.* 250, *Gastrointest. Liver Physiol.* 13, (1986) G561-G569.

(Butler y Harrod, 1992) Butler y Harrod. *Química inorgánica. Principios y aplicaciones*. Ed. Addison-Wesley Iberoamericana, México (1992).

(Cortinas, 1990) Cristina Cortinas. *Cáncer: Herencia y Ambiente*. Colección La Ciencia para todos 96, Fondo de Cultura Económica, México (1990) pp. 63-64.

(Dowd et al., 1994) T. L. Dowd, J. F. Rosen, C. M. Grundberg y R. K. Gupta. The Displacement of Calcium from Osteocalcin at Submicromolar Concentrations of Free Lead. *Biochim. Biophys. Acta* 1226 (1994) 131-137.

(Du Pont, 1987) *Operator's Manual. 910 Differential Scanning Calorimeter*. Du Pont Company, Instrument Systems. Concord Plaza - Quillen Building Wilmington, DE 19898 (1987) pp. 62-74.

(Elshemey et al., 1999) Wael M. Elshemey, Anwar A. Elsayed y Ali El-Lakkani. Characteristics of low-angle x-ray scattering from some biological samples. *Phys. Med. Biol.* 44 (1999) 2907-2915.

(Elshemey et al., 2001) Wael M. Elshemey, Omar S. Desouky y Ahmed H. Ashour. Low-angle X-ray scattering from lyophilized blood constituents. *Phys. Med. Biol.* 46 (2001) 531-539.

(Emsley, 1991) John Emsley. *The Elements*. Clarendon Press. Oxford (1991).

(Etchart, 1996) M. Etchart. *Lecciones De Anatomía Patológica, Capítulo 12. Anatomía Patológica Osteoarticular*. Benedicto Chuaqui J. (Editor), Escuela de Medicina, Universidad Católica de Chile (1996).

(Evans et al., 1991) S. H. Evans, D. A. Bradley, D. R. Dance, J. E. Bateman y C. H. Jones. Measurement of small-angle photon scattering for some breast tissues and tissue substitute materials. *Phys. Med. Biol.* (1991) Vol. 36, No 1, 7-18.

(Geneser, 1999) Finn Geneser. *Histología, Panamericana, 3a ed.* (1999).

(Giacovazzo, et al., 1992 ) C. Giacovazzo, H. L. Monaco, D. Viterbo, F. Scordari, G. Gilli, G. Zanotti, M. Catti, 1992 *Fundamentals of Crystallography* ed. IUCr.

(Glatter, 1982) O. Glatter. *Small Angle X-Ray Scattering*. O. Glatter, O. Kratky (Eds.) Academic Press, London (1982) pp 119-165.

(Hambidge, 1974) K. M. Hambidge. Chromium nutrition in man. *Am. J. Clin. Nutr.* 27 (1974) 505-514.

(Harrison, 1995) A. Harrison. *Fractals in Chemistry*, Oxford Science Publications (1995).

(Heredia, 2000) Alejandro Heredia Barbero. *Estudio de Huesos Antiguos y Modernos: Morfología, Estructura y Aportaciones al Estudio de Biomateriales*. Tesis de licenciatura en Biología, Facultad de Ciencias, UNAM (2000).

(Kajiwara e Hiragi, 1996) Kanji Kajiwara y Yuzuru Hiragi. *Structure Analysis by Small-angle X-ray Scattering*. En: *Applications of Synchrotron Radiation to Materials Analysis*, Capítulo 6. Ed. Elsevier (1996) pp. 353-404.

(Kataoka et al., 1993a) M. Kataoka, J. M., Flanagan y D. M. Engelman. Synchrotron Radiation in Life Science (Sturman, H. B., et al., Eds.) Oxford University Press, London (1993).

(Kataoka et al., 1993b) M. Kataoka, Y. Hagihara, K. Mihara e Y. Goto. J Mol. Biol. (1993).

(Kidane et al., 1999) G Kidane, R. D. Speller, G. J. Royle y A. M. Hanby. X-ray scatter signatures for normal and neoplastic breast tissues. Phys. Med. Biol. 44 (1999) 1791-1802.

(Lewis et al., 2000) R. A. Lewis, K. D. Rogers, C. J. Hall, E. Towns-Andrews, S. Slawson, A. Evans, S. E. Pinder, I. O. Ellis, C. R. M. Boggis, A. P. Hufton y D. R. Dance. Breast cancer diagnosis using scattered X- rays. J Synchrotron Rad. (2000) 7, 348-352.

(Lozano, 2002) Luis Fernando Lozano Aguirre Beltrán. Estudio calorimétrico de colágena tipo I presente en hueso y su aplicación como técnica de análisis de restos óseos de interés arqueológico y paleontológico. Tesis de licenciatura en Biología, Facultad de Ciencias, UNAM (2002).

(Lozano et al., 2002) L.F. Lozano, M.A. Peña Rico, A. Heredia, A. Villareal, J. Ocotlán-Flores, A.L. Gómez-Cortés, E. Orozco and L. Bucio. Thermal Properties of Mineralized and non Mineralized Type I Collagen in Bone. Mat. Res. Soc. Symp. Proc. Vol. 724 (2002) N7.6.1- N7.6.6.

(Park, 1984) Joon Bu Park. Biomaterials Science and Engineering, Plenum Press, New York (1984).

(Peña-Rico, 2002) Miguel Angel Peña Rico. Estudio de colágena amorfa en huesos con interés médico por difracción de rayos X (método de polvos). Tesis de licenciatura en Química Farmacéutico Biológica, Facultad de Química, UNAM (2002).

(Royle et al., 1991) G. J. Royle y R. D. Speller. Low angle X-ray scattering for bone analysis. Phys. Med. Biol., (1991), Vol. 36, No 3, 383-389.



(Royle et al., 1995) G. J. Royle y R. D. Speller. Quantitative X-ray diffraction analysis of bone and marrow volumes in excised femoral head samples. *Phys. Med Biol.* 40 (1995) 1487-1498.

(Ruvalcaba, 1993) José Luis Ruvalcaba Sil. Análisis elemental cuantitativo mediante técnicas nucleares de piezas arqueológicas. Tesis de licenciatura en Física, Facultad de Ciencias, UNAM (1993).

(Schmidt, 1991) P. W. Schmidt. Small Angle Scattering Studies of Disorderd, Porous and Fractal Systems. *J. Appl. Cryst.* 24 (1991) 414-435.

(Schonermark et al., 1997) M.P. Schonermark, O. Bock, A. Buchner, R. Steinmeier, U. Benbow y T. Lenarz. *Nature Med.* (1997) 3 (10) 1167-1171.

(Schor et al., 1994) A. Schor, G. Rushton, J.E. Ferguson, A. Howell, J. Redford y S.L. Schor. *Int. J. Cancer* 59 (1994) 25-32.

(Swanpalmer et al., 1998) Janos Swanpalmer, Ragnar Kullenberg y Tommy Hansson. Measurement of bone mineral using multiple-energy X-ray absorptiometry. *Phys. Med. Biol.* 43 (1998) 379-387.

(Van Holde, Johnson and Ho, 1998) K. E. Van Holde, W. Curtis Johnson y Pui Shing Ho. *Principles of Physical Biochemistry*, Prentice-Hall, USA (1998).