

J



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

APLICACION DE LA MICROSCOPIA DE FUERZA
ATOMICA DE BARRIDO ELECTRONICO, DE
DISPERSION ELECTRONICA Y DE TRANSMISION EN
LA CARACTERIZACION DE MATERIAL DENTAL
HUMANO.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

F I S I C O

P R E S E N T A :

ALVAREZ ZAUCO EDGAR



FACULTAD DE CIENCIAS
UNAM

DIRECTOR DE TESIS: M. EN C. OCTAVIO ALVAREZ FREGOSO

TESIS CON
FALSA LE ORGEN

2002



FACULTAD DE CIENCIAS
SECCION ESCOLAR



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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.



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

M. EN C. ELENA DE OTEYZA DE OTEYZA

Jefa de la División de Estudios Profesionales de la
Facultad de Ciencias
Presente

Comunico a usted que hemos revisado el trabajo escrito:

"Aplicación de la Microscopía de Fuerza Atómica, de Barrido Electrónico de Dispersión
Electrónica y de Transmisión en la Caracterización de Material Dental Humano"
realizado por ALVAREZ ZAUCO EDGAR

con número de cuenta 09327329-7 , quién cubrió los créditos de la carrera de Física.

Dicho trabajo cuenta con nuestro voto aprobatorio.

Atentamente

Director de Tesis
Propietario

M. EN C. OCTAVIO ALVAREZ FREGOSO

Propietario

BIOL. MARCO ANTONIO ALVAREZ PEREZ

Propietario

DR. RAMIRO GARCIA GARCIA

Suplente

DR. FERMIN CASTILLO MEJIA

Suplente

DR. MAYO VILLAGRAN MUNIZ

Consejo Departamental de Física


DRA. PATRICIA GOLDSTEIN MENACHE
Coordinadora de Licenciatura



FACULTAD DE CIENCIAS
UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

A MARTHA

Gracias por existir

AGRADECIMIENTO Y RECONOCIMIENTO:

A mis Padres pues les debo todo lo que soy y lo que llegaré a ser

A La Banda. (Víctor, Arturo, Yesenia, Eduardo y Carlos). Escribir todo acerca del aprecio que les tengo sería un duro golpe a mi ego.

A Soledad Barcenas del Olmo y sus chaparritas por toda la ayuda, comprensión y por las veces en que me sacaron de apuros.

A Luis A. Briseño, Gerardo Ruiz y Fernando Magaña. Por la oportunidad de desarrollar otro aspecto académico de mi formación.

A Roxana que se ha mantenido como una de mis amigas más cercanas y confiables aun después de 13 años.

A Caro. No obstante la diferencia de carácter y disciplina nos divertimos y trabajamos bien.

A Efraín La amistad va más allá de fronteras académicas.

A todas aquellas personas que de alguna forma tuvieron una relación con mi desarrollo académico y personal.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Nacional Autónoma de México por la educación académica y social que me brindo.

A mi asesor Octavio Alvarez Fregoso por todo el apoyo y dedicación aportado a mi trabajo.

A mis sinodales:

Biol. Marco Antonio Alvarez Pérez
Dr. Ramiro García García
Dr. Fermín Castillo Mejía
Dr. Mayo Villagran Muniz

por el tiempo dedicado en leer este trabajo y sus valiosos comentarios que lo enriquecieron.

A PROBETEL por la beca de apoyo otorgada durante la realización del presente trabajo

A el Instituto de Investigaciones en Materiales por la facilitar los espacios y medios requeridor para la realización de este trabajo además de la beca complementaria que me otorgó.

A José Guzmán Mendoza por el tiempo que me otorgó y ayudi con sus conocimientos y experiencia en microscopia electrónica (TEM y SEM).

A Leticia Baños, Jaime Ortiz, Gabriela Rueda y José Reyes Gasga por su cooperación en el desarrollo de esta tesis.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

ÍNDICE

| | Página |
|--|-----------|
| Índice | 1 |
| Justificación y Planteamiento del Problema | 3 |
| Introducción | 4 |
| Antecedentes Teóricos del Cemento Dental Humano | 6 |
| Desarrollo | 6 |
| Características Generales | 6 |
| Bioquímica | 7 |
| CAPÍTULO I.- TÉCNICAS DE MICROSCOPIA DE ALTA RESOLUCIÓN | 9 |
| Microscopía de Barrido Electrónico | 9 |
| Resolución | 9 |
| Formación de Imágenes | 11 |
| Espectroscopía por Dispersión de Energía | 12 |
| Factores de Corrección | 14 |
| Microscopía Electrónica de Transmisión | 15 |
| Sistema de Iluminación | 18 |
| Sistema de Visualización | 19 |
| Sistema de Vacío | 19 |
| Campo Oscuro | 19 |
| Difracción | 20 |
| Microscopía de Fuerza Atómica | 22 |
| Diseño de un Microscopio de Fuerza Atómica | 22 |
| Detección Superficial | 24 |
| Difracción de rayos X | 26 |
| Difracción de Bragg | 26 |
| Métodos de difracción | 27 |
| CAPÍTULO II.- DESARROLLO EXPERIMENTAL | 29 |
| Microscopía de Barrido Electrónico (SEM) y de Fuerza Atómica (AFM) | 29 |
| Espectrometría por Dispersión de Energía (EDS) | 39 |
| Difracción de rayos X | 45 |
| Microscopía Electrónica de Transmisión (TEM) | 46 |

| | |
|--|----|
| RESULTADOS Y DISCUSIÓN | 50 |
| Microscopía de Barrido Electrónico (SEM) y de Fuerza Atómica (AFM) | 50 |
| Espectrometría por Dispersión de Energía (EDS) | 51 |
| Difracción de rayos X | 51 |
| Microscopía Electrónica de Transmisión (TEM) | 51 |
| CONCLUSIONES | 53 |
| BIBLIOGRAFÍA | 54 |

JUSTIFICACIÓN Y PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La revisión de la literatura nos indica que se han realizado numerosas investigaciones sobre el material dental humano pero básicamente enfocadas a la dentina y al esmalte dental y muy pocas investigaciones que se avocan al estudio del cemento dental humano.

Hasta ahora, en la mayoría de los estudios sobre el cemento dental humano han tratado de dar una primera caracterización en cuanto a su estructura y composición lo cual nos ha permitido un primer acercamiento a sus características. No obstante este desarrollo, se tienen aun grandes dudas acerca de su formación en cuanto a su morfología, composición y estructura. Es por lo anterior que es importante realizar investigaciones que profundicen el conocimiento de estos rubros ya que como consecuencia obtendríamos un mejor entendimiento de este material procurando un beneficio directo a la sociedad.

Con el objetivo de colaborar en la caracterización del cemento dental humano es que enfocamos este trabajo de tesis a un estudio basado en las técnicas actuales de máxima resolución, como son: microscopía de fuerza atómica (AFM), de barrido electrónico (SEM), y de transmisión electrónica (TEM), así como espectroscopía por dispersión de energía electrónica y por rayos X (RX), con el fin de determinar con mayor precisión la morfología, la estructura y la composición del cemento dental humano.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

INTRODUCCIÓN

Las células responsables de la formación del cemento se conocen como cementoblastos o fibroblastos localizados en el ligamento periodontal. Estas células tienen su origen en el folículo dental, sin embargo, los cementoblastos son la primera fuente para la formación del cemento durante el desarrollo dentario y post-erupcional. Estas células se localizan cerca de la superficie de aposición del cemento y poseen la apariencia típica de una célula productora de maíz, muy semejante a los osteoblastos. Los cementocitos son cementoblastos que quedaron atrapados en la matriz que ellos mismos produjeron. Estos, están localizados dentro de la matriz mineralizada de cemento y poseen un menor nivel de síntesis de matriz lo que prácticamente los hace metabólicamente inactivos.

El cemento es el tejido conectivo calcificado que cubre la raíz del diente desde la unión amelo-cementaria hasta el ápice. Este es uno de los más importantes componentes del aparato de unión porque es el sitio en el cual las fibras del ligamento periodontal se insertan en el diente. Histológicamente el cemento es muy parecido al hueso y a la dentina, sin embargo, este cuenta con características únicas que lo hacen diferente.

Este tejido hasta hace algunos años había sido clasificado como cemento primario y cemento secundario, pero actualmente se usa una clasificación más específica basada en la presencia o ausencia de células y en la organización de fibras de colágena. Esta clasificación se divide en cemento acelular afibrilar, acelular con fibras extrínsecas, celular con fibras intrínsecas, acelular con fibras intrínsecas y celular combinado estratificado.

Bioquímicamente el cemento está formado por una matriz inorgánica de la cual aproximadamente el 50% es hidroxiapatita, que puede presentarse tanto como una celda unitaria hexagonal como una celda monoclinica [1], el otro 50% está formada por una matriz orgánica compuesta predominantemente por colágena tipo I y III [2]. De acuerdo a lo reportado por Gross et al. [3], las muestras de hueso tienen una relación Ca/P de 1.5 (porcentaje atómico), mientras que la estequiometría de la hidroxiapatita pura es de 1.67. A su vez S. M. Cool [4] reporta una razón de Ca/P entre 1.69 y 1.71 para el cemento dental humano.

Es en este sentido que se genera de forma natural, y el cual es el objetivo de este trabajo, tratar de precisar en cierta forma la información que se tiene en cuanto a la estructura y composición del cemento dental humano acompañado del estudio de su morfología con el fin de obtener una caracterización de dicho material que nos permita entenderlo en su funcionamiento y promueva el desarrollo de más investigaciones afines a este tema.

El objetivo que perseguimos, por tanto, en este trabajo de tesis es la caracterización del Cemento Dental Humano en una primera instancia con algunas técnicas de microscopía de alta resolución como son Microscopía de Fuerza Atómica, de Barrido Electrónico, y de Transmisión, así como Rayos X y Espectroscopía por Dispersión de Energía. Estas técnicas serán abordadas de forma en que sea sencillo su entendimiento y sin adentrarse demasiado en las bases teóricas ya que no debemos de perder la noción de que estas son técnicas de caracterización, además de procurar que la lectura de este trabajo sea adecuada para diferentes personas en diferentes áreas como son la Física, la Odontología e incluso la Medicina

Con el fin de lograr dicho objetivo este trabajo cuenta con una estructura de desarrollo progresivo en el cual se mezclan algunas técnicas para poder hacer sencilla la comparación de la información que nos proporciona cada una de ellas, por ejemplo, aunque la técnica de EDS es una herramienta complementaria de SEM, inmediatamente después de las imágenes de barrido de SEM se colocan las de AFM con el fin de percibir la calidad complementaria de ambas técnicas, incluso estas imágenes se mezclan con respecto a la zona que se estudie del diente. Después de SEM y AFM se realizó el análisis químico del cemento, este análisis se desarrollo de forma localizada en toda la región que está compuesta por el mismo, Finalmente se concluye con el análisis por TEM en la cual se describe la estructura cristalina de la hidroxiapatita mostrando los patrones de difracción de algunos mono-cristales y poli-cristales los cuales reafirman lo que se conocía de la estructura hexagonal de la hidroxiapatita que fue especificada previamente por un análisis de espectrometría de rayos X, de este análisis también se obtuvieron más datos con respecto a la cristalografía.

ANTECEDENTES TEÓRICOS DEL CEMENTO DENTAL HUMANO

DESARROLLO

Después de la completa formación de la corona, las células del epitelio interno y externo del esmalte forman una bicapa de células conocida como zona epitelial radicular de Hertwig. Las células del epitelio interno del esmalte inducen a las células adyacentes a diferenciarse en odontoblastos y subsecuentemente a introducir la mineralización en la raíz [5]. En el ser humano la zona epitelial de Hertwig es desintegrada y no cubre más que la cara externa de la predentina recién formada. A lo largo de las grietas que sufre la zona epitelial se permite el contacto directo de la dentina recién formada con el tejido conectivo del folículo dental. Las células derivadas de este tejido conectivo son las responsables de la formación del cemento. Estas células primero forman compartimentos con el proceso celular que demarcan las fibras intrínsecas de colágena las cuales son paralelas al eje mayor de la raíz del diente. Las fibras extrínsecas se forman después. Los compartimentos extracelulares regulan la arquitectura de las fibras principales y son también necesarias para la formación de las fibras intrínsecas. Una vez que el cemento es formado, las células retractan sus procesos y forman fibras intrínsecas alrededor de las fibras principales. El cemento se deposita en la superficie de la raíz durante el desarrollo del diente o subsiguiente a la erupción de estos durante su función normal.

Las células responsables de la formación del cemento se conocen como cementoblastos o fibroblastos localizados en el ligamento periodontal. Estas células tienen su origen en el folículo dental, sin embargo, los cementoblastos son la primera fuente para la formación del cemento durante el desarrollo dentario y post-erupcional. Estas células se localizan cerca de la superficie de aposición del cemento y poseen la apariencia típica de una célula productora de maíz, muy semejante a los osteoblastos. Los cementocitos son cementoblastos que quedaron atrapados en la matriz que ellos mismos produjeron. Estos, están localizados dentro de la matriz mineralizada de cemento y poseen un menor nivel de síntesis de matriz lo que prácticamente los hace metabólicamente inactivos. El papel que juegan los fibroblastos en la cementogénesis a la fecha resulta poco claro. Sin embargo, células mesenquimatosas del ligamento periodontal se encuentran formando lagunas de las células que tienen el potencial para diferenciarse tanto en fibroblastos del ligamento periodontal, como en cementoblastos dependientes de su localización y de la exposición a agentes inductores.

CARACTERÍSTICAS GENERALES

El cemento es el tejido conectivo calcificado que cubre la raíz del diente desde la unión amelo-cementaria hasta el ápice. Este es uno de los más importantes componentes del aparato de unión porque es el sitio en el cual las fibras del ligamento periodontal se insertan en el diente. Histológicamente el cemento es muy parecido al hueso y a la dentina, sin embargo, este cuenta con características únicas que lo hacen diferente.

Este tejido hasta hace algunos años había sido clasificado como cemento primario y cemento secundario, pero actualmente se usa una clasificación más específica basada en la presencia o ausencia de células y en la organización de fibras de colágena.

1. **Cemento acelular afibrilar:** Localizado en la unión amelodentinaria, su estructura consiste en una matriz homogénea sin células ni fibras colágenas.
2. **Cemento acelular con fibras extrínsecas:** Localizado desde la porción cervical hasta el tercio medio del diente, es carente de células, pero sí contiene fibras de Sharpey involucradas en el anclaje del diente.
3. **Cemento celular con fibras intrínsecas:** Cubre las superficies apicales e interradiculares, también es encontrado en lagunas de reabsorción y sitios de fractura. Los cementocitos están presentes junto con las fibras colágenas y este cemento parece estar relacionado con la reparación y adaptación.
4. **Cemento acelular con fibras intrínsecas:** Es similar al cemento celular con fibras extrínsecas, pero carece de células. Este cemento ocupa las superficies apicales e interradiculares.
5. **Cemento celular combinado estratificado:** Este cemento posee fibras intrínsecas, extrínsecas, cementocitos, e involucrado en el anclaje y adaptación.

Las fibras intrínsecas y extrínsecas son dos sistemas de fibras con diferentes funciones. Las fibras intrínsecas corren paralelas a la superficie radicular y se cree que tienen la función primaria de reparar componentes producidos por los cementocitos. En contraste las fibras de Sharpey o extrínsecas, se encuentran formando un ángulo recto con la superficie radicular y son las responsables del anclaje del diente.

BIOQUÍMICA

Bioquímicamente el cemento está formado por una matriz inorgánica de la cual aproximadamente 50% es hidroxiapatita y una matriz orgánica compuesta predominantemente por colágena tipo I y III. Esta matriz orgánica también contiene una variedad de proteínas no colágenas, como la sialoproteína ósea, osteopontina, tenascina, fibronectina, osteonectina, osteocalcina, glucosaminoglucanos y proteoglucanos [6]. La sialoproteína ósea contiene la secuencia de aminoácidos RGD que confiere la propiedad de adhesión celular y también es asociada a la mineralización durante la cementogénesis [7], [8]. La osteopontina es otra proteína de adhesión presente en el cemento y esta asociada con el cemento acelular en el desarrollo de los incisivos de ratones [9]. El cemento secuestra muchos factores de crecimiento incluyendo FGFa y FGFb, proteínas morfogenéticas de hueso, TGF- β e IGF-I y receptores para factores de crecimiento [6], [7], encontramos además componentes glucosaminoglucanos como el ácido hialurónico, dermatan sulfato y condroitin sulfato, estos compuestos al parecer participan en la formación de la matriz mineralizada del cemento, sin embargo, hasta ahora, se desconocen las células responsables de la producción de dicha matriz. Las recientes evidencias indican que el sistema de fibras extrínsecas es producido por fibroblastos desde el ligamento periodontal mientras que las fibras intrínsecas son formadas por cementoblastos originados de los espacios endosteales del hueso alveolar [10], [11]. Hasta la fecha el cultivo de cementoblastos y el estudio de sus características ha resultado difícil, debido a que se cree que sus progenitores se encuentran en espacios de ligamento periodontal y en los espacios endosteales del hueso alveolar [10]. Sin embargo cementoblastos putativos

aislados y expandidos en cultivo a partir de un cementoblastoma humano en cultivo, ha podido aislar proteínas específicas del cemento [12]

El cemento radicular ha sido generalmente considerado similar al hueso por tener propiedades parecidas a este ya que los cementoblastos y osteoblastos comparten marcadores biológicos como la fosfatasa alcalina (ALP), osteopontina (OPN), osteocalcina (OCN), sialoproteína ósea (BSP) [10], etc. Sin embargo, las funciones que el cemento radicular desempeña son diferentes a las del hueso alveolar.

Como se puede inferir el estudio del cemento se ha desarrollado de una forma en la que se puede conocer una gran cantidad de información de este, pero se sigue manteniendo la tendencia principal a tratar al cemento dental humano como un hueso, no obstante se han encontrado algunas características que lo diferencian del mismo. Estas características las podemos analizar, aplicando las técnicas modernas de caracterización micro estructural, de composición química, de morfología superficial y estructura cristalográfica, por medio de microscopia de alta resolución, en particular en este trabajo aprovecharemos las técnicas de microscopia de fuerza atómica (AFM) de barrido electrónico (SEM), microanálisis químico (EDS), de transmisión electrónica (TEM) y difracción de rayos X, las cuales serán explicadas de una forma descriptiva a continuación.

CAPITULO I

TECNICAS DE MICROSCOPIA DE ALTA RESOLUCIÓN

MICROSCOPIA DE BARRIDO ELECTRONICO

El microscopio electrónico de barrido (SEM), es un instrumento diseñado principalmente para estudiar la superficie de los sólidos sobre grandes ampliaciones por lo cual desde este punto de vista el SEM puede ser comparado con el microscopio óptico. Las ventajas que presenta el SEM son no solo una mayor resolución y profundidad de campo sino también beneficios adicionales en la formación de imágenes. Esto es debido a que la interacción de los electrones con los sólidos es más diversa que la interacción de los fotones.

Las imágenes en el SEM se forman por un mecanismo muy distinto al que se utiliza en el microscopio óptico. Las imágenes son construidas punto por punto, de una forma similar a la usada en una pantalla de televisión. En esta técnica un haz muy fino de electrones de alta energía es enfocado en un punto sobre la muestra, esto ocasiona la emisión de electrones (en un gran rango de energía) desde ese punto de la superficie de la muestra, estos electrones emitidos son colectados para generar una señal eléctrica que es amplificada, si esta señal es usada para modular la intensidad de un haz de electrones en la pantalla del tubo de rayos catódicos (TRC) se puede formar un punto de la imagen sobre la pantalla del TRC; para construir la imagen de la muestra, el haz de electrones del SEM barre un área de la superficie de la misma, mientras que el haz de la pantalla del TRC barre un patrón geométrico similar, en resumen, la imagen de la pantalla del TRC es entonces un mapa de las intensidades electrónicas provenientes de la superficie de la muestra.

RESOLUCIÓN

La resolución es la cualidad más importante para cualquier microscopio, y con una muestra ideal es a lo más igual al diámetro del haz electrónico en el lugar en donde incide sobre la superficie de la muestra, en el mejor de los casos, el diámetro del haz puede ser de 5 nm que es mucho mayor que la resolución de 300 nm del microscopio óptico. Sin embargo, la resolución en el SEM depende en mucho de la naturaleza de la muestra y del modo de operación del instrumento por lo que normalmente se tiene una resolución de 15 nm aproximadamente. La ampliación esta dada simplemente por la razón de las longitudes de los lados de la pantalla a los del patrón geométrico del barrido, la cual es variable desde los $20\times$ hasta valores superiores a $10^4\times$. Una de las ventajas con las que cuenta el SEM es la sencillez de la preparación de las muestras para su observación, especialmente para materiales conductores, aunque para materiales aislantes se pueden tener un poco de dificultades pues en ellos se puede generar una acumulación de carga proveniente del haz de electrones primario. Esta carga acumulada desvía tanto el haz incidente como la trayectoria de los electrones colectados, dando lugar a imágenes distorsionadas, en estos casos las muestras pueden examinarse a un voltaje de aceleración reducido, donde la emisión de electrones desde la superficie de la muestra puede balancear la rapidez de arribo de electrones en el haz, o bien, cubriendo a la muestra con una capa delgada de material conductor.

La siguiente figura muestra un diagrama esquemático de un SEM típico cuyos componentes esenciales son:

1. Un cañón electrónico, para producir un haz estrecho de electrones acelerados a través de una diferencia de potencial de hasta 50kV.
2. Dos o tres lentes para enfocar el haz electrónico tan finamente como sea posible.
3. Un sistema para desviar el haz sobre el patrón geométrico de la muestra.
4. Un sujetador de muestras que permita movimiento, inclinación y rotación de la muestra.
5. Un método para coleccionar y amplificar los electrones emitidos.
6. Tubos de rayos catódicos para desplegar la imagen.
7. Circuitos electrónicos que suministren y controlen el cañón electrónico, el voltaje de aceleración, la corriente en las lentes, el generador de barrido y la amplificación de la señal.
8. Un sistema de vacío de alta capacidad para mantener una presión por debajo de 10^5 Torr y permita una rápida evacuación después de cambiar la muestra.

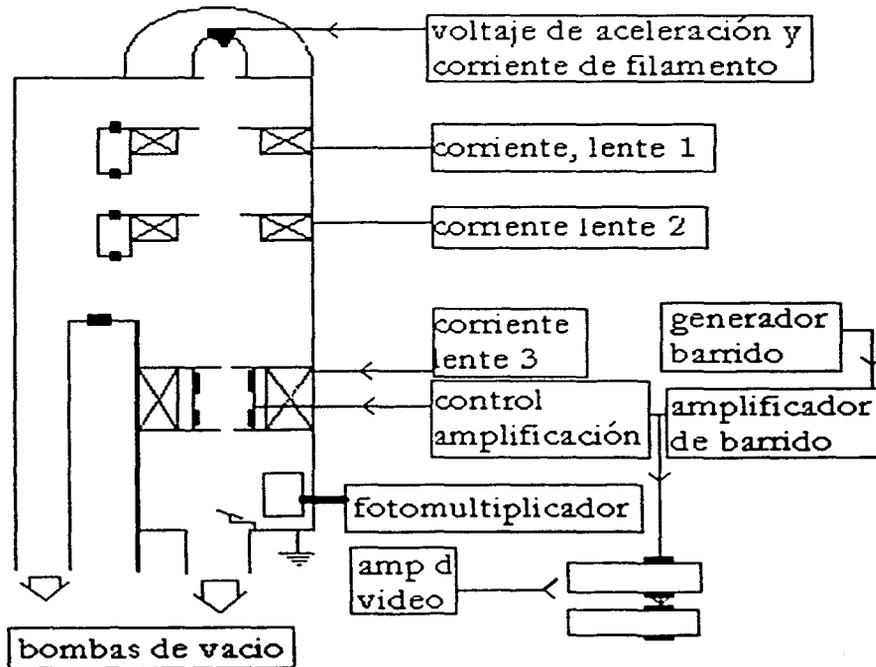


Figura 1.1 Diagrama esquemático del Microscopio de Barrido Electrónico (SEM)

FORMACIÓN DE IMÁGENES

El contraste de las imágenes obtenidas en el SEM puede ser explicado por medio de la emisión de electrones y de fotones debido al bombardeo electrónico. La dispersión del haz electrónico dentro de la muestra es causada por las múltiples colisiones sufridas por el haz de electrones primario mientras pierde su energía, cada colisión de suficiente energía puede en principio, resultar en la emisión de un electrón de la muestra. Como se puede ver en la siguiente figura (1.1) que muestra la distribución de energías entre los electrones emitidos.

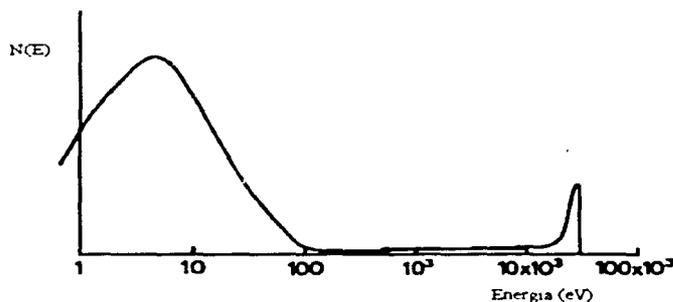


Figura 1.1.- Distribución de energía de los electrones emitidos

Algunas de las colisiones son elásticas y en tales casos el haz de electrones primario puede abandonar a la muestra sin pérdida significativa de energía, sin embargo la mayoría de las colisiones son inelásticas por lo cual existe un pico pronunciado en la distribución de electrones emitidos a energías entre 0 y 50 eV. La forma del espectro de electrones secundarios varía poco de material a material, el pico se corre a energías más altas con funciones de trabajo más bajas, sin embargo, la emisión secundaria total es mayor para materiales con funciones de trabajo más altas, por lo que se puede esperar un contraste poco perceptible que resulta de las diferencias en la función de trabajo en diferentes regiones de la muestra. La cantidad de emisión en la región de los 100 eV a la energía primaria se incrementa linealmente y de manera muy rápida con el número atómico hasta un valor alrededor de $Z=45$, después más lentamente para los elementos de número atómico más alto. Si los electrones secundarios son excluidos polarizando la rejilla del colector negativamente se puede obtener suficiente contraste debido a variaciones en el número atómico incluso para muestras muy planas, gracias a este contraste y en condiciones óptimas se pueden distinguir elementos con números atómicos adyacentes de hasta $Z \approx 20$.

Si la superficie de la muestra no es muy suave, el contraste debido al relieve superficial (contraste topográfico) es probable que sobrepase al contraste por número atómico. Esto es debido a que la eficiencia de electrones primarios y secundarios es dependiente tanto del ángulo de incidencia del haz electrónico como del ángulo de colección de los electrones emitidos.

La curva de distribución de energía de la figura 1.1 contiene una estructura fina muy útil. Cuando un electrón en una capa interna de un átomo en la muestra es expulsado por un electrón de alta energía (proveniente del haz primario), el átomo puede regresar a su estado base o a algún estado de menor energía de dos maneras. En cada caso un electrón de una capa externa cae hacia la vacancia de la capa interna y se libera energía lo que trae como consecuencia la emisión de un fotón y en otro caso la expulsión de otro electrón de capa externa, la emisión del fotón lleva a un espectro de rayos X característicos mientras que la emisión del electrón es conocida como efecto Auger; Estos efectos son importantes en el análisis microestructural, ya que las energías de los electrones o de los fotones que son emitidos son características de los elementos de los cuales provienen por lo que la medición de estas energías provee un análisis químico cualitativo mientras que la medición de la intensidad proporciona un análisis cuantitativo.

La emisión de luz visible por el bombardeo electrónico es conocida como cátodo luminiscencia que es un efecto menos general que la emisión electrónica ya que la intensidad y la longitud de onda que son emitidos dependen del material, un análisis químico cualitativo se puede llevar a cabo midiendo los parámetros de la emisión de la luz.

Los rayos X característicos pueden ser utilizados también para llevar a cabo la determinación de la composición química de un material, pues las líneas K_{α} , K_{β} , L_{α} etc. de los rayos X característicos son producidos cuando el haz electrónico expulsa electrones de las capas atómicas K, L, etc. de los elementos que componen la muestra y esos niveles son llenados por electrones de una capa atómica de mayor energía. Esta diferencia de energía de un electrón cayendo hacia un nivel más bajo provoca la emisión de un fotón de frecuencia ν definida y que es característica del elemento en cuestión y que es expresada por la ley de Moseley:

$$\nu \propto Z - C, \quad (1)$$

en donde Z es el número atómico del elemento y C es una constante para cada tipo de línea característica. Mediciones de la longitud de onda así como la intensidad del fotón emitido proporcionan un análisis químico cualitativo o al menos semicuantitativo, en el SEM este análisis puede ser llevado a una escala muy pequeña, pues el haz de electrones se mantiene estacionario sobre un punto de interés siendo analizados los rayos X emitidos, si el haz es barrido como es usual y la intensidad de emisión de rayos X, que es característica de un elemento particular, es usada para modular una pantalla del TRC, se puede obtener una fotografía de la distribución de ese elemento sobre la muestra.

ESPECTROSCOPIA POR DISPERSIÓN DE ENERGÍA

Los microscopios de barrido convencionales no están equipados con detectores de rayos X, pero se cuenta con dos tipos diferentes como si fuesen accesorios, en uno de ellos se utiliza un cristal de distancia interplanar conocida d , la longitud de onda λ de los rayos X es medida por la difracción provocada por los planos cristalinos usando la ley de Bragg, este haz difractado es medido por un contador; Este método es conocido como método dispersivo o de longitud de onda dispersa WDS (Wavelength Dispersive X-ray Spectroscopy), en el que una sola longitud de onda es medida a la vez por lo que es usual tener 8 o 9 cristales intercambiables para cubrir el rango de longitudes de onda. En el método de energía

dispersiva EDS (Energy Dispersive X-ray Spectroscopy) el rango completo de longitudes de onda es medido y desplegado simultáneamente como un espectro de intensidad contra longitud de onda o energía, esto se logra mediante un detector de estado sólido, que produce un pulso de voltaje proporcional a la energía de cada fotón incidente. Estos pulsos son clasificados, medidos y contados para generar el espectro final, la señal de los picos espectrales puede usarse para modular la imagen, dando así una gráfica de la distribución de cada elemento.

En el análisis químico usando rayos-X existe una dificultad técnica en la detección de elementos ligeros, cuya radiación se caracteriza por tener una longitud de onda larga, por ejemplo para el carbón K_{α} (4.5nm), esto es debido a que estos rayos X son fácilmente absorbidos y difíciles de difractar por cristales ordinarios disponibles, además de encontrarse fuera del rango de detección de algunos detectores de estado sólido. A este respecto en el análisis de rayos X de elementos ligeros, el método de longitud de onda dispersiva WDS, es muy superior comparado con el de onda dispersiva EDS, además que para los rayos X de los demás elementos el método de EDS es muy exacto y tiene mayor resolución. Sin embargo estas ventajas no son conclusivas cuando un espectrómetro es usado como accesorio de un SEM, el microanálisis por rayos X puede ser únicamente semicuantitativo en este instrumento, ya que se imponen constricciones especiales en la óptica electrónica y de los rayos X y en la muestra si se requiere hacer un análisis exacto. El método de energía dispersiva posee una mayor rapidez de análisis, unido con un funcionamiento adecuado para muchas aplicaciones. Lo anterior, son las razones por las cuales el espectrómetro de EDS es más utilizado en el SEM.

Se dispone de varias técnicas que nos pueden proporcionar análisis químicos cualitativos y cuantitativos de una amplia variación de elementos a escala microscópica. El análisis por microsonda electrónica es la más desarrollada y utilizada. Otras técnicas de análisis de composición son: la espectroscopia electrónica Auger, el análisis de emisión de iones secundarios y análisis de microprueba-láser. A continuación se describe la primera de las técnicas.

La óptica electrónica de la microsonda (o microanalizador) es generalmente similar a la del microscopio electrónico de barrido, pero existen un número de diferencias menores entre el diseño de la microsonda y el del microscopio electrónico de barrido; por ejemplo, una microsonda requiere de una mayor corriente en el haz y de un voltaje de aceleración más alto para obtener una suficiente intensidad de rayos X para medidas exactas y para las líneas de energías de rayos X de altas energías. En la microsonda uno es capaz de ver la muestra con un microscopio óptico durante el análisis, la geometría de los rayos X y la posición de la muestra deben de ser diseñadas cuidadosamente para asegurar un buen funcionamiento del espectrómetro.

La precisión en microsonda electrónica esta limitada por el ruido estadístico. Este es debido a la naturaleza aleatoria de la emisión de electrones desde el cañón y por lo tanto a la emisión de rayos X desde la muestra, ocasionando ruido en el microanálisis de rayos X. El procedimiento normal en microanálisis es comparar la rapidez de conteo para un elemento dado, primero del área sobre la muestra bajo análisis luego por un estándar del elemento puro o de una aleación cuya composición sea conocida de manera exacta. La razón de las intensidades del material desconocido al estándar, k , es la medida básica. En la práctica se

encuentra que una precisión en k menor al 0.5% se obtiene en instrumentos modernos con tiempos de conteo de 100 segundos cuando $k > 0.1$, implicando una concentración del soluto por arriba del 10%; los errores estadísticos en k para un tiempo dado de conteo se incrementan rápidamente por debajo de este valor, de modo que se requieren tiempos largos de medición a medida que el análisis se aproxime a los límites de confiabilidad. Para obtener una exactitud general con esta precisión, debe tenerse mucho cuidado para excluir fuentes de error: corrimiento e incertidumbre en el voltaje de aceleración, corrimientos en la posición de la muestra, etc. El problema es ahora convertir k en valores para la composición química, sin pérdida de exactitud. La primera aproximación es tomar a k mismo como la composición química de la muestra (expresada como una fracción en peso), pero esto puede ser muy inexacto, una mayor exactitud puede ser alcanzada comparando la muestra desconocida con estándares que son muy similares en composición en vez de hacerlo con elementos puros. Sin embargo esto frustra el objetivo principal del método analítico, el cual es llevar un análisis cuantitativo sobre una muestra completamente desconocida ya que se tiene la labor adicional de preparar una serie de aleaciones estándar, cada una conteniendo quizá muchos elementos. De esto se desprende que es necesario entender el proceso involucrado en la emisión de rayos X cuando el sólido es bombardeado de electrones. La diferencia en la emisión de rayos X por un elemento cuando está rodeado por el mismo tipo de elementos que cuando está rodeado por cualquier combinación de elementos puede ser expresada como un factor de corrección el cual es aplicado a los valores experimentales de k .

FACTORES DE CORRECCIÓN

A continuación se presentan cinco correcciones debidas a procesos físicos que son generalmente aplicadas:

1. *Corrección por electrones retrodispersados (\approx)*. Una cierta fracción de los electrones incidentes son retrodispersados por la superficie, de modo que no pueden producir rayos X en la muestra. Esta fracción se incrementa con el número atómico de la muestra y es por lo tanto una función de la composición media.
2. *Corrección por poder de frenado (Z)*. Esta relacionada con la eficiencia de producción de rayos X y de nuevo con el número atómico de la muestra. En un elemento ligero la región media en la que se extienden los electrones será más grande, pero la energía de ionización por unidad de masa es también más alta y la generación global de rayos X es más baja. Debido a que esta y la anterior corrección (las cuales tienden a cancelarse) son ambas controladas por el número atómico, ellas son consideradas juntas como la corrección por número atómico.
3. *Corrección por absorción (ρt)*. Los rayos X son generados a varias profundidades dentro del volumen de interacción lo que provoca que la intensidad que escapa de la muestra sea dependiente de la cantidad de absorción que de los rayos X experimentan durante su recorrido a la superficie. Esto dependerá del tamaño del volumen de interacción, de la absorción del material y de la longitud de onda de los rayos X que es examinado. La longitud de trayectoria de absorción dependerá también del Angulo de salida de los rayos X, de allí la necesidad de conocer los ángulos de salida correctamente, esta es usualmente la corrección más importante.
4. *Corrección por fluorescencia característica (F)*. Los rayos X pueden ser producidos por otros rayos X así como por electrones. La emisión de cualquier línea característica será causada por el haz primario y por cualquier otra de las líneas características de los

demás elementos en la muestra que tengan una energía suficientemente alta. De nuevo la magnitud de este efecto dependerá de la composición de la muestra.

5. *Corrección por fluorescencia continua (I^2)*. Esta es similar en principio a la corrección previa, pero surge por el continuo en vez de surgir por otra radiación característica presente, normalmente se separa de la corrección por fluorescencia característica ya que se calcula de manera diferente. Esta corrección es muy pequeña y frecuentemente ignorada.

La derivación detallada de estos factores involucra cierta complejidad matemática y física [13], el resultado es que la corrección global es

$$C_i = (\bar{Z} AF)_i k_i \quad (2)$$

En donde C_i es la fracción en peso del elemento i de interés y k_i es la correspondiente razón de intensidades. La aplicación de la corrección ZAF es difícil de hacer, ya que muchas interacciones son usualmente necesarias. Las correcciones son dependientes de la composición de la aleación de modo que su valor de prueba debe de ser asumido (este sería las razones experimentales de intensidades obtenida de la muestra y del estándar) y los cálculos son repetidos hasta que se encuentre una convergencia de los resultados. Esta es en general una tarea para la computadora que se encuentre preferentemente en línea con el microanalizador. Con buenas muestras e instrumentos modernos operados correctamente y con los mejores procedimientos de corrección, la exactitud del análisis puede ser de $\pm 1\%$ en el mejor de los casos (cuando todas las correcciones son pequeñas) y del 5% en casos generales. Los errores pueden ser de este orden en casos favorables cuando se cuenta con un espectrómetro de energía dispersiva. Los errores se incrementan sustancialmente en caso de elementos ligeros ($Z < 21$) y para elementos que estén presentes en bajas concentraciones. La masa total del material analizado por microsonda es de alrededor de 10^{11} - 10^{12} gramos ordinariamente, pero el límite puede ser tan bajo como 10^{-16} gramos.

MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE TRANSMISIÓN

La operación del microscopio electrónico de transmisión (TEM), depende principalmente de la deflexión de los electrones por campos magnéticos, de modo que estos pueden ser enfocados; en principio estos pueden ser utilizados del mismo modo en que la luz es utilizada para formar la imagen ampliada de un objetivo, pero con la posibilidad de que, debido a que las longitudes de onda que representan a los electrones son tan pequeñas (por ejemplo a 100 KeV es de $.0037\text{\AA}$), la resolución es mucho más alta de la que posee un microscopio óptico. La operación depende del hecho adicional de que es posible preparar muestras suficientemente delgadas para transmitir el haz de electrones sin una gran pérdida de intensidad. El espesor máximo depende del número atómico del material en cuestión, pero es típicamente 500 nm, o más para muestras compuestas de elementos ligeros, decreciendo a menos de la mitad para materiales con número atómico alto. Mientras más alta sea la energía de los electrones mejor es la transmisión a través de la película, de esta manera los microscopios se construyen generalmente para operar al más alto voltaje de aceleración, alrededor de 100 kV en los instrumentos convencionales y ahora en los instrumentos comerciales pueden operarse a energías de 1 MeV.

A medida que los electrones pasan a través de la película delgada usada como objeto, las ondas que representan a estos electrones interactúan con la estructura interior y pueden sufrir cambios en su amplitud y en la fase. Mediante la operación correcta del microscopio, estos cambios pueden hacerse visibles como contraste en las imágenes resultantes, al saber como son modificadas las ondas de los electrones transmitidos debido a diferentes estructuras. Estos cambios se pueden interpretar para obtener información acerca de la microestructura del objeto.

Los componentes principales de un microscopio electrónico típico se muestran en la figura 1.2. El eje óptico del instrumento es usualmente vertical, en lo alto de la columna la cual esta en vacío, se encuentra en primer lugar el cañón, que produce el haz de electrones. Este haz es enfocado por una o más lentes condensadoras sobre la muestra, la cual esta montada sobre el porta muestras. Las lentes que se encuentran por abajo del objeto amplifican la imagen formada por los electrones transmitidos a través del objeto, la imagen final se enfoca sobre una pantalla fluorescente en la parte baja de la columna. Por debajo de la pantalla se encuentra una cámara fotográfica y un porta placas para permitir que la imagen sea fotografiada después de que la pantalla es levantada.

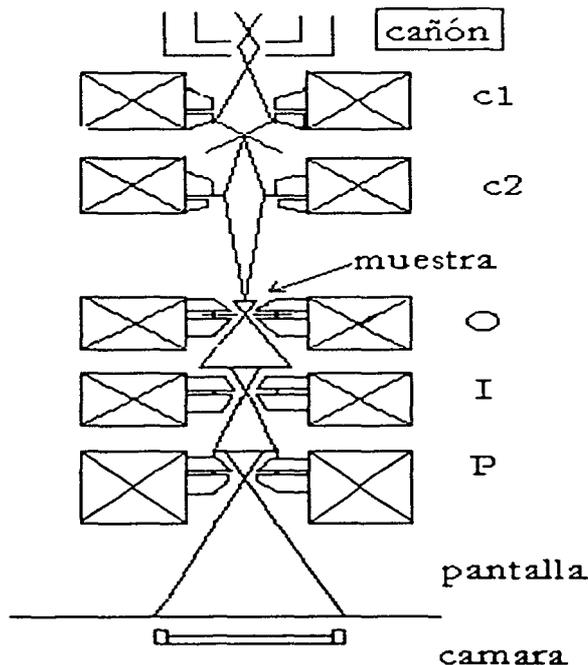


Figura 1.2. Representación esquemática de los componentes principales de un microscopio electrónico típico. El cañón electrónico se encuentra en lo alto de la columna. C1 y C2 son las dos lentes condensadoras. La muestra se encuentra en un sujetador entre la segunda lente condensadora y la lente objetiva (O). Esta lente tiene una abertura variable, existe otra abertura variable en el plano del objeto de la lente intermedia I. La lente protectora P forma la imagen final sobre la pantalla fluorescente. Una cámara fotográfica se encuentra debajo de la pantalla registrando la imagen.

El sistema de imagen consiste normalmente en tres lentes; la primera (lente objetiva) tiene una longitud focal corta y cuenta con una abertura en el plano focal posterior de la lente (A en figura 1.3). Otra abertura esta localizada en el plano de la imagen normal de la lente (en B). Otras dos lentes, intermedia y protectora, amplifican sucesivamente la imagen para dar una amplificación final, la cual puede encontrarse en el rango de 10^3 a 10^5 aumentos. Estos sistemas son enunciados a continuación.

El microscopio de transmisión de electrones consiste de una serie de sistemas que están orientados para cubrir las necesidades de orientación y visualización de muestras extremadamente delgadas como son las siguientes [14]. El sistema de iluminación es cañón de electrones y de lentes condensadoras que dan un mayor control sobre la cantidad de radiación que incide sobre la muestra. Un sistema de manejo de la muestra compuesto de un porta muestras, un sujetador de las mismas y piezas relacionadas con la orientación de la muestra dentro y fuera del microscopio. El sistema de visualización incluye el objetivo, intermedio y protector de los lentes que están involucrados en la formación, enfoque y amplificación de la imagen que se forma en la pantalla y que se utiliza como grabadora de imágenes. Además de lo anterior, también se necesita un sistema de vacío para remover todas las moléculas de aire que puedan interferir dentro de la columna del microscopio de electrones.

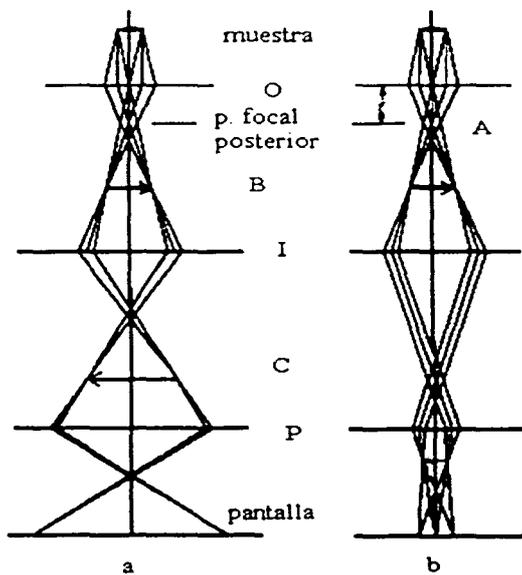


Figura 1.3.- Sistema de formación de la imagen

SISTEMA DE ILUMINACIÓN

El sistema está situado en la parte superior de la columna del microscopio y consiste de un cañón de electrones (compuesto del filamento, protector y ánodo) y las lentes condensadoras.

Cañón de electrones. Dentro de este se encuentra un filamento que funciona como fuente de electrones. Los filamentos comunes o cátodos están compuestos de un filamento de tungsteno en forma de V de aproximadamente 0.1 mm de diámetro (comparado con el grosor de un cabello humano). Siendo un metal, el tungsteno contiene iones positivos y electrones libres que son fuertemente atraídos a los iones positivos. Afortunadamente es posible atraer de los orbitales externos, o de valencia, electrones fuera del tungsteno, por medio de la aplicación de alto voltaje al filamento y calentando el metal por una pequeña corriente de electrones de DC a través del mismo mientras se encuentra operando en vacío, en otras palabras cierta cantidad de energía debe de ser agregada al sistema para causar que los electrones dejen el filamento. Esta cantidad de energía que es necesaria para provocar que los electrones dejen el metal se le conoce como *función de trabajo* del metal. Aunque el tungsteno tiene una función de trabajo relativamente alta tiene una excelente producción de electrones, justo por debajo de su más alto punto de fusión que es de 3,653 K. En términos prácticos, a una primera aplicación de alto voltaje negativo (comúnmente 50, 75, 100 kV) se incrementa lentamente la cantidad de corriente directa que fluye a través del filamento; calentándolo y permitiendo la emisión de electrones (emisión termoiónica). Cuando se le aplica más voltaje al filamento, el campo de electrones se incrementa hasta que el filamento comienza a derretirse y evaporarse en el alto vacío del microscopio. En algunos voltajes de operación se logran temperaturas óptimas, en consecuencia el cañón alcanza una buena emisión de electrones (tan buena como lo acepta la vida del filamento) denominada *punto de saturación* para el cual se tiene una temperatura permitida alrededor de los 2600°K, en la cual el filamento tiene una vida media de 100 horas. Una sobresaturación del filamento se puede dar a 200°K por encima de los 2600°K lo que ocasiona un alto descenso en la vida del filamento de aproximadamente 25 horas suponiendo que se tiene un buen sistema de vacío y un escrupuloso mantenimiento de las áreas del cañón.

Lentes condensadores. Es la segunda parte en importancia del sistema de iluminación. En general los TEM tienen dos lentes condensadores. El primer lente condensador (C1) es una lente no amplificadora que decrece el tamaño de 50 μm del haz cañón que atraviesa para generar zonas de un rango aproximado de 20 μm . Debajo de 1 μm , el segundo lente condensador (C2) amplía las zonas determinadas por C1. El efecto resultante de ambos lentes es un control preciso de la cantidad de irradiación de electrones o mecanismo de iluminación de la muestra. El principio de operación de usar C1 y C2 es generar una mancha sobre el espécimen del tamaño propio para irradiar el área que es examinada.

Sistema de control de muestras.

La base de las muestras es un microcontrolador de los movimientos de la muestra en las direcciones X y Y en incrementos tan pequeños como 10nm, dependiendo del sujetador y de la base de la muestra, puede ser posible inclinar o rotar la muestra dentro de la columna del microscopio.

SISTEMA DE VISUALIZACIÓN.

Este sistema incluye el objetivo intermedio y lentes protectores, estos están relacionados con la generación de la imagen y la amplificación y proyección de la imagen final.

Lentes objetivos

Por mucho, este es el componente de lentes más importante en el microscopio de transmisión de electrones, ya que forma la imagen inicial que es amplificada después por los siguientes lentes de visualización. Con el fin de alcanzar una mayor resolución, los lentes deben de tener una alta energía para obtener la menor longitud focal posible. Los lentes deben estar libres de astigmatismo y tener mínimas aberraciones. Esto significa que las piezas polares deben de ser construidas de un metal mezclado homogéneamente y ser tan simétricos como sea posible. Los lentes objetivos son usados para enfocar y amplificar inicialmente la imagen, no obstante otras lentes se usan para amplificar esta imagen aun más, lo que significa que estos lentes, utilizados también en la amplificación, pueden mantener una longitud focal muy pequeña, necesaria para la alta resolución. Debido a fluctuaciones en la corriente de las lentes o en el alto voltaje se podría afectar el enfoque de los lentes objetivo, por lo que ambos deben de ser extremadamente estables. Como la contaminación puede introducir astigmatismo en el sistema de lentes, se necesita algún mecanismo con el fin de minimizar esta contaminación.

Apertura de los lentes objetivos: La función de la abertura de los lentes objetivos es principalmente la de realzar el contraste atrapando más de los electrones deflectados en la periferia, para esto se pueden tener aberturas de varios tamaños controlando la banda múltiple que se encuentra justo debajo de la muestra. Acomodándolo de una forma similar a los lentes condensadores, estas aberturas pueden ser muy pequeñas en tamaño como son 70, 50, 30 y 20 μm pero esto también provoca que se incremente la sensibilidad a la contaminación.

SISTEMA DE VACÍO

El sistema de vacío es un ensamble de varias bombas, contactos y válvulas que están relacionadas con la tarea de formar vacío en las áreas más importantes del microscopio como son las del espécimen, cámara, cañón de electrones y la columna del haz de electrones.

El vacío en los microscopios electrónicos es necesario para incrementar el camino libre medio de los electrones, ayudando además para evitar descargas de alto voltaje entre el filamento y el ánodo. Tales descargas son unas de las mayores causas del desgaste del filamento ya que estos son demasiado sensibles a la oxidación. Además el vacío es necesario para remover todos los gases contaminantes (como pueden ser el vapor de agua y orgánico presente en los laboratorios) que son disociados por el bombardeo de electrones de alta energía y generan radicales corrosivos que combinados con la muestra pueden destruir la estructura fina.

CAMPO OSCURO

En el modo normal de operación del microscopio de transmisión de electrones, los rayos no dispersados del haz se combinan con algunos de los electrones deflectados para formar la imagen de campo oscuro [15]. A medida que los electrones deflectados o

dispersados se eliminan por medio de los objetivos de las aberturas de las lentes el contraste se incrementa al mover la abertura del objetivo fuera del eje hacia el lado izquierdo, como se muestra en la figura 1.4 (a)

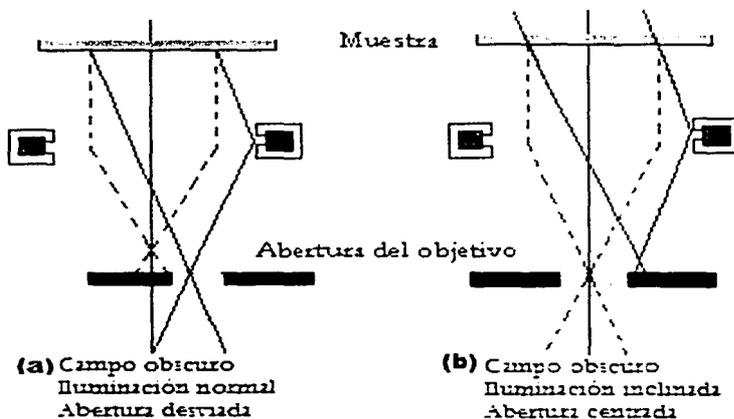


Figura 1.4 Formación de imágenes de campo oscuro

Se permite que los electrones no dispersados sean eliminados, mientras que simultáneamente más de los dispersados entran a la abertura, generando una imagen de menor calidad. Para obtener una mayor resolución en el campo oscuro se inclina el sistema de iluminación para que el haz que incide sobre la muestra a un cierto ángulo y capte únicamente los electrones dispersados que se encuentran sobre el eje, lo que provoca que la imagen formada tenga una mayor calidad

DIFRACCIÓN

En muestras que contienen cristales de composición desconocida, la técnica de difracción puede aplicarse para medir la distancia entre los átomos que componen la red cristalina y determinar la composición del cristal, ya que estos tienen distancias interplanares únicas. *El fenómeno de difracción está basado en la reflexión o difracción del haz de electrones en ciertos ángulos por una red cristalina.* Como la red cristalina refleja los electrones de la fuente para formar manchas brillantes sobre la pantalla, la imagen consistirá en una mancha central rodeada por arillos para muestras policristalinas los cuales pertenecerán a las reflexiones. La distancia de estos arillos al central es inversamente proporcional al espaciamiento de la red cristalina; un cristal con distancias interplanares pequeñas difractará el haz central a grandes ángulos provocando arillos muy espaciados del punto central.

Si la muestra es cristalina, entonces todos los conjuntos de planos orientados apropiadamente dispersarán electrones en haces difractados. Si la corriente en la segunda lente condensadora es reducida suficientemente, una iluminación paralela caerá sobre la muestra de modo que los electrones en cualquier haz difractado dado se encontrarán viajando de manera

paralela, conforme ellos son llevados a foco en el plano focal posterior de la lente objetiva, un fino patrón de difracción de puntos será formado. Reduciendo suficientemente la corriente de la lente intermedia, este plano puede ser enfocado por el plano objetivo de la lente proyectora teniendo como resultado una imagen agrandada del patrón de difracción de puntos sobre la pantalla. El diagrama de rayos correspondiente a esta situación se muestra en la figura 1.4-B.

En ausencia de aberturas en el sistema, toda el área iluminada sobre la muestra contribuye al patrón de difracción, sin embargo, una imagen ampliada de la muestra se produce sobre la pantalla y usando la apertura de área selecta se obtiene como resultado que la pantalla aparecerá oscura excepto en la parte correspondiente a la imagen ampliada de la apertura, dentro de la cual, parte de la imagen de la muestra será visible. Si el microscopio es ahora ajustado para mostrar el patrón de difracción, entonces este patrón está constituido solo por aquellos electrones que pasan a través de la apertura en posición [16]. La indexación de un patrón de difracción de electrones de orientación desconocida es muy complicada, pero de un material conocido es simple, la única información que se necesita es, además de tener un patrón de difracción bien calibrado, una tabla de distancias interplanares apropiadas.

En un método más de imagen, el haz primario transmitido y uno o más de los haces difractados se hacen recombinar, preservando así tanto amplitud como fase. Esta es la técnica que permite observar las redes de alta resolución, permitiendo que los planos de difracción y los arreglos de los átomos individuales sean distinguidos [17]. La más alta resolución alcanzada en un microscopio óptico esta normalmente limitada por la apertura angular de la lente objetiva (semiángulo α) y la longitud de onda λ de la luz utilizada; dos puntos luminosos pueden ser distinguidos a una separación δ dada por:

$$\delta = 0.61 \lambda / \text{sen } \alpha \quad (3)$$

Así δ es típicamente del orden de λ . Esta ecuación muestra que si se pudieran diseñar lentes con una gran apertura para el microscopio electrónico, se podría alcanzar una resolución de hasta 5×10^{-12} m con un voltaje de aceleración de 100kV. En la práctica, la resolución es al menos dos órdenes menor a ésta, debido básicamente a que las lentes magnéticas sufren de manera inherente las aberraciones.

De manera ideal debería de ser posible interpretar cualquier fotografía adquirida en el microscopio de transmisión sin ninguna ambigüedad en términos de la correspondiente microestructura de la muestra, sin embargo, el contraste en las imágenes puede ser producido por diferentes mecanismos y puede depender críticamente de las condiciones de operación del microscopio, tal como la orientación precisa de la muestra o la cantidad de desenfoque de la lente objetiva. De esta manera una interpretación completa puede ser difícil, a pesar de todo, en la práctica el problema es usualmente simplificado por el hecho de que el solo mecanismo de contraste es importante. Para saber como se determina el contraste de una imagen se tiene que conocer como interacciona un haz de electrones con la muestra, ya que la dispersión elástica e inelástica de los electrones la afectan de formas diferentes [17].

MICROSCOPIA DE FUERZA ATÓMICA

A principio de los años ochenta aparecieron los microscopios de prueba (punta) por barrido SPM. Hoy en día estos microscopios se utilizan en una gran variedad de disciplinas; en la ciencia de superficies, en el análisis de rutina de la rugosidad superficial y para adquirir imágenes tridimensionales, del orden de micras sobre la superficie de una célula o bien hasta átomos en muestras sólidas de mayor dureza. El SPM es un instrumento con una multitud de capacidades, es una herramienta de caracterización que expande los campos de aplicación de los microscopios ópticos y electrónico, proporcionando imágenes tridimensionales. Dentro de estos microscopios de barrido se encuentra el microscopio de fuerza atómica AFM.

DISEÑO DE UN MICROSCOPIO DE FUERZA ATÓMICA

El microscopio de fuerza atómica AFM, es una herramienta de rutina en la caracterización de la superficie de sólidos. Cualquiera que sea el origen, todos los microscopios de fuerza atómica cuentan con los siguientes componentes como se ve en la figura 1.5:

1. Una punta muy aguda montada sobre un cantilever (o lámina) de constante de resorte pequeña.
2. Una manera de medir la deflexión de la lámina.
3. Un sistema de retroalimentación para monitorear y controlar la deflexión (y por lo tanto la fuerza de interacción).
4. Un sistema mecánico de barrido (usualmente un piezoeléctrico), que mueve la punta sobre la muestra o a la inversa, la muestra respecto a la punta y
5. Un sistema de despliegue visual, que convierta los datos medidos en una imagen.

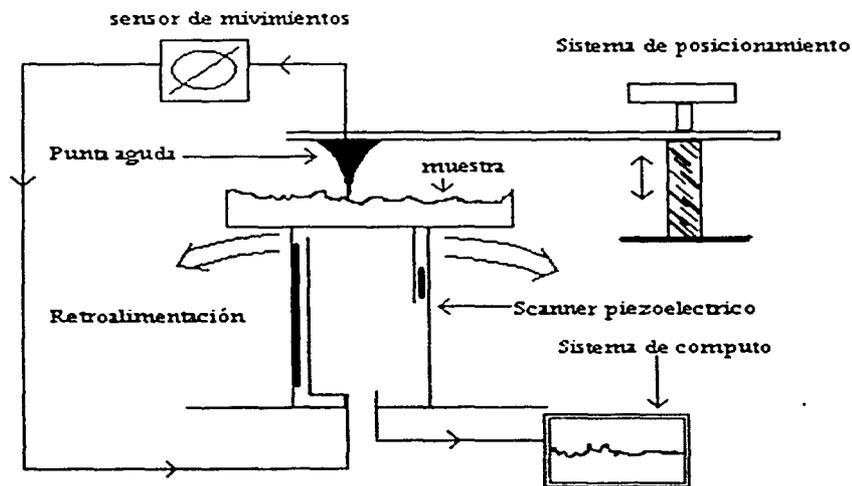


Figura 1.5 esquema del microscopio de prueba SPM

Los microscopios de fuerza atómica analizan la superficie de la muestra con una punta muy aguda, de un par de micras de largo y menor a 10nm de diámetro, esta punta está localizada en el extremo de un cantilever de 100 a 200 micras de largo. Las fuerzas entre la superficie de la muestra y la punta ocasionan que el cantilever se doble o deflecte, un detector mide esta deflexión a medida que la punta se barre sobre la muestra. De las deflexiones medidas del cantilever y mediante el uso de una computadora, se genera un mapa de la topografía superficial.

Normalmente en el AFM muchas fuerzas contribuyen a la deflexión del cantilever, la comúnmente asociada es la fuerza interatómica, denominada fuerza de Van Der Waals. La dependencia de esta con la distancia entre la punta y la muestra esta dada en la siguiente figura (1.6), en la cual pueden apreciarse dos modos de operación, en el modo contacto, también conocido como modo repulsivo, la punta del AFM hace un contacto físico suave con la muestra. La punta esta ensamblada al extremo de un cantilever con una constante de resorte pequeña, más baja que la constante de resorte efectiva que sujeta a los átomos de la muestra, a medida que el scanner mueve suavemente a la punta a través de la muestra (o a la muestra a través de la punta), la fuerza de contacto ocasiona que el cantilever se doble para acomodarse a los cambios de la topografía.

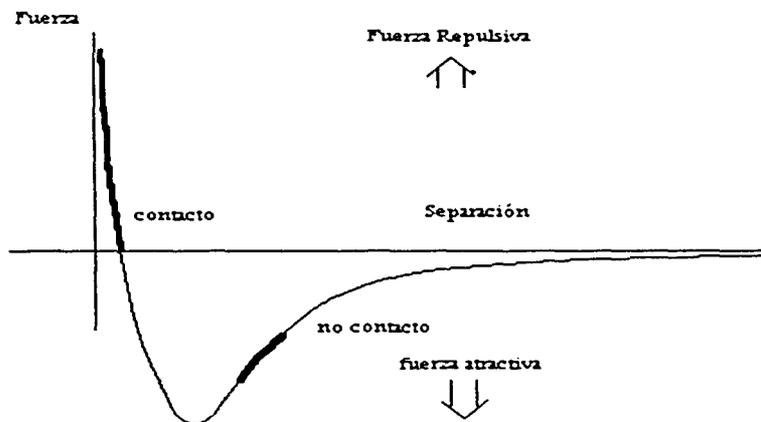


Figura 1.6.- Dependencia de la fuerza con respecto a la distancia

Para examinar esto con más detalle se puede considerar la figura anterior de la fuerza de Van Der Waals. En la parte derecha de la curva los átomos están separados por una gran distancia; conforme los átomos se acercan, se atraerán débilmente unos a otros, esta atracción se incrementa hasta que los átomos están tan juntos que sus nubes electrónicas comienzan a repelerse entre sí electrostáticamente, esta repulsión debilita progresivamente la fuerza atractiva a medida que la separación continúa disminuyendo. La fuerza va a cero cuando la distancia

entre los átomos alcanza un par de ángstroms y cuando la fuerza total de Van Der Waals se vuelve positiva, los átomos están en contacto.

La pendiente de la curva de la fuerza de Van Der Waals es muy pronunciada en el modo repulsivo o en la región de contacto, como resultado, la fuerza repulsiva de Van Der Waals equilibrará casi cualquier fuerza que intente acercar más a los átomos. En el AFM, esto quiere decir que cuando el cantilever empuja a la punta contra la muestra el cantilever se doblará en vez de forzar a que los átomos de la punta se encuentren más cerca de los átomos de la muestra. Además de la fuerza repulsiva de Van Der Waals, existen generalmente otras dos fuerzas durante la operación del modo de contacto del AFM, una fuerza del tipo capilar ejercida por una capa delgada de agua usualmente presente en el medio ambiente y la fuerza ejercida por el cantilever mismo. La fuerza total que la punta ejerce sobre la muestra es la suma de la fuerza capilar y la del cantilever y deben de ser balanceadas por la fuerza repulsiva de Van Der Waals, la magnitud de la fuerza total ejercida sobre la muestra varía de 10^8 N al rango de operación típico de $10^7 - 10^6$ N.

DETECCIÓN SUPERFICIAL

Un componente crítico en el AFM es el sensor que detecta la deflexión del cantilever. Esta detección puede hacerse ópticamente por rebote del haz. En un microscopio de fuerza atómica, la luz de un láser es reflejada especularmente por la superficie posterior del cantilever pulido a espejo. El haz de luz reflejado es registrado por un fotodetector (fotocelda de dos elementos) sensible a la posición, a medida que el cantilever se dobla, la posición del haz del láser sobre el fotodetector se corre, el fotodetector puede medir desplazamientos muy ligeros de hasta 1nm. El cociente de la longitud de la trayectoria entre el cantilever y el detector a la longitud del cantilever mismo produce una amplificación mecánica, como resultado el sistema puede detectar movimientos verticales de subángstroms de la punta del cantilever, esta técnica óptica se puede ver en la figura 1.7

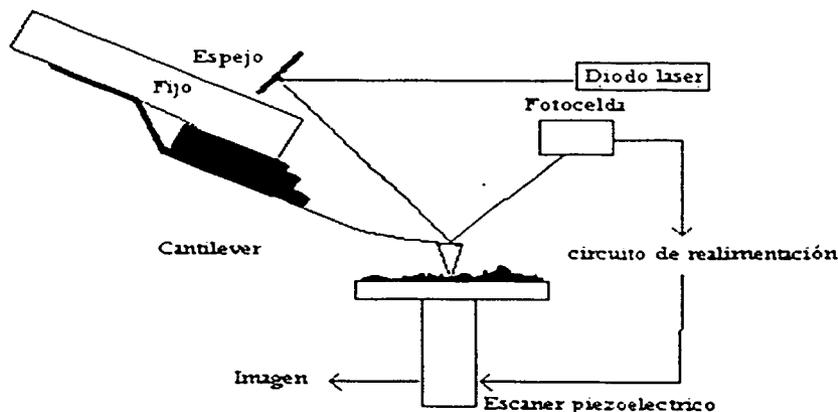


Figura 1.7.-Esquema de la técnica de deflexión óptica para registrar la deflexión del cantilever, este método se conoce también por "detección de reflexión de haz"

Una vez que el AFM ha detectado la deflexión del cantilever, puede generar el conjunto de datos topográficos de dos formas, pues la variación espacial de la deflexión del cantilever puede usarse directamente para generar el conjunto de datos topográficos o bien, la deflexión puede ser usada como entrada a un circuito de retroalimentación que mueva el sistema de barrido hacia arriba o hacia abajo en la dirección z , respondiendo a la topografía a modo de mantener la deflexión del cantilever constante. El primer método es llamado de altura constante porque la altura del scanner es fija durante el barrido. La siguiente figura (1.8) muestra el movimiento del scanner durante la adquisición de datos.

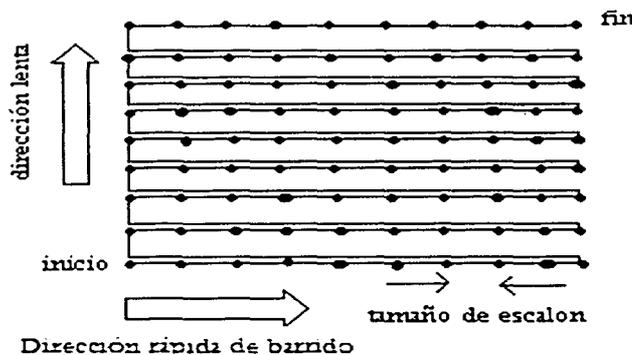


Figura 1.8.-Movimiento del scanner durante la adquisición de datos.

La resolución lateral de una imagen de AFM está determinada por dos factores: el tamaño del escalón de la imagen (como se ve en la figura anterior) y el mínimo radio de curvatura de la punta, normalmente el más grande conjunto de datos con que se dispone en los microscopios comerciales es de 512 por 512 datos puntuales; De modo que en un barrido de una micra por una micra se tendrá un tamaño de escalón y resolución lateral aproximadamente de 2nm.

Las puntas más agudas con las que se dispone comercialmente están especificadas con un radio de curvatura mínimo de alrededor de 5nm, debido a que el área de interacción entre la punta y la muestra es una fracción del radio de la punta, estas puntas proporcionan normalmente una resolución lateral de 1 a 2 nm, de esta forma la resolución de las imágenes de AFM mayores a una por una micra viene determinada no por la punta sino por el escalón de la imagen, la mejor resolución de un AFM depende, sin embargo, de cómo esta se define.

El cálculo de la rugosidad (raíz cuadrática media) R_{rms} , se calcula a través de la desviación estándar de todos los valores de las alturas en el área barrida en la imagen y se determina usando la definición convencional.

$$R_{rms} = \frac{\sum_{n=1}^N (z_n - \bar{z})^2}{N-1} \quad (4)$$

En donde \bar{z} es la altura media z_n es la altura en el n-ésimo punto y N es el número de datos puntuales incluidos en el área barrida [18].

DIFRACCIÓN DE RAYOS X

La difracción de rayos X es una técnica muy importante que se usa en la determinación de la estructura cristalina y fases de los sólidos; incluyendo geometría y constantes de red, identificación de materiales desconocidos, orientación de monocristales, orientaciones preferenciales de policristales y diferentes fases cristalinas.

La región de los rayos X dentro del espectro electromagnético es normalmente considerada en la región de 0.1 a 100 Å. La producción de estos ocurre cuando un haz altamente energético de electrones choca con un blanco metálico. Para la realización de la difracción todos los tubos de rayos X deben de contar con:

1. Una fuente de electrones.
2. Un voltaje de aceleración.
3. Un blanco metálico.

Todos los tubos de rayos X contienen dos electrodos, un ánodo (blanco metálico), el cual es normalmente aterrizado y un cátodo, mantenido a un potencial negativo alto, del orden de 30 a 50 kV. Los tubos de rayos X pueden ser también a base de filamento, el cual es la fuente de electrones cuando este se calienta.

Dentro de las propiedades de los rayos X se encuentran la radiación y la dispersión, la cual se provoca por la interacción entre los electrones de los átomos de la materia y la radiación X al igual que con los otros tipos de radiación electromagnética. Cuando los rayos X son dispersados por el entorno ordenado de un cristal, tienen lugar interferencias entre los rayos dispersados, ya que las distancias entre los centros de dispersión son del mismo orden de magnitud que la longitud de onda de la radiación, lo que ocasiona la difracción. Para que ocurra la difracción de rayos X es necesario que el espaciamiento de las capas atómicas sea aproximadamente del mismo orden que la longitud de onda de la radiación (1 - 10 Å) y que los centros de dispersión estén distribuidos en el espacio de manera regular.

DIFRACCIÓN DE BRAGG

W.L. Bragg estudio la difracción de rayos X por cristales. En la siguiente figura (1.9) se muestra un haz que incide sobre la superficie de un cristal con un ángulo θ . La dispersión es

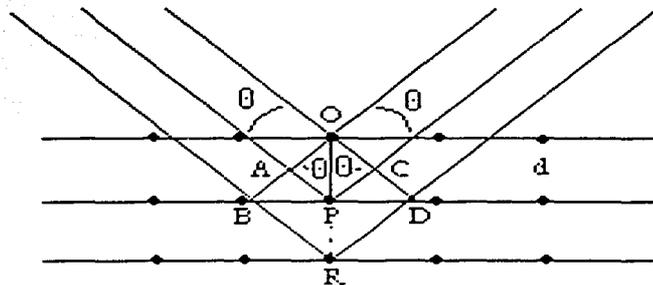


Figura 1.9.- Modelo de difracción de Bragg

consecuencia de la interacción de la radiación con los átomos localizados en O, P, y R. Si la distancia $AP + PC$ es igual a $n\lambda$ en donde n es entero y λ es la longitud de onda de la radiación, la radiación de onda estará en fase en OCD teniendo una interferencia constructiva por lo que el cristal parecerá reflejar la radiación X . De la figura anterior también se puede deducir la ecuación de interferencia de Bragg, en donde (d) es la distancia interplanar y la condición de interferencia constructiva del haz con un ángulo de incidencia θ es:

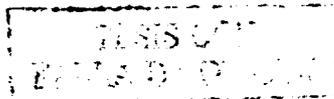
$$n\lambda = 2d \sin \theta \quad (5)$$

Así la difracción puede ocurrir siempre que se satisfaga la ecuación de Bragg, la cual pone condiciones muy rigurosas en λ y θ para cualquier cristal. Con radiación monocromática, cualquier colocación arbitraria de un monocristal en un haz de rayos X no producirá en general algún haz difractado.

MÉTODOS DE DIFRACCIÓN

Para encontrar una forma de satisfacer la ley se deben de variar continuamente λ ó θ durante el experimento, por lo que al variarlas se pueden distinguir tres modos de difracción principales:

1. **Método de Laue.** En este método un haz de radiación se hace incidir sobre un cristal fijo. El ángulo de Bragg es por lo tanto fijo para cada conjunto de planos en el cristal y cada conjunto selecciona y difracta esa longitud de onda particular que satisface la ley de Bragg para los valores particulares de d y θ , por lo cual cada haz difractado tiene una longitud de onda diferente.
2. **Método del cristal rotante.** En este método un cristal se coloca con uno de sus ejes normal al haz de rayos X monocromático, alrededor de él se coloca una película cilíndrica y el cristal se rota alrededor de su eje fijo. A medida que esto pasa un conjunto particular de planos de la red tendrán, por un instante, el ángulo indicado por la ley de Bragg para la reflexión del haz incidente. Los haces difractados se encuentran sobre conos cuyos ejes coinciden con el de rotación, dando como resultado que los puntos sobre la película se encontrarán sobre líneas imaginarias horizontales.
3. **Método de polvos.** En este método el cristal a ser examinado es reducido a un polvo muy fino y expuesto a un haz monocromático de rayos X , en donde cada



partícula de polvo es un pequeño cristal orientado de forma aleatoria con respecto al haz incidente, de tal forma que solo algunos cristales están orientados correctamente por lo que sus planos (1,0,0) por ejemplo pueden difractar el haz incidente, mientras otros cristales están orientados en la dirección (1,1,0), y así sucesivamente, por lo anterior se entiende que cada conjunto de planos será capaz de producir la difracción.

En un espectro de rayos X, la curva de intensidad dispersadas contra 2θ para un sólido cristalino es casi cero en todos lados excepto en los ángulos en que se generó la difracción de Bragg, en materiales amorfos la curva de intensidad contra 2θ se caracteriza por tener uno o dos máximos muy anchos [19].

CAPITULO II

DESARROLLO EXPERIMENTAL

Se colectaron dientes extraídos en la unidad de Posgrado de la Facultad de Odontología de la UNAM. Los dientes se esterilizaron por incubarse en una solución de antibióticos y por sonicación se desprendieron todos los restos de tejidos blandos del ligamento periodontal que se encuentran unidos a la raíz, esto con la finalidad de tener la superficie del cemento lo más limpia posible. Parte de los dientes se sometieron a criofractura para obtener la parte interna del cemento sin ninguna modificación que podría ser resultante de cortar el diente con un disco de diamante.

MICROSCOPIA DE BARRIDO ELECTRÓNICO Y DE FUERZA ATÓMICA

Para caracterizar los diferentes tipos de cemento radicular (celular y acelular) del diente tanto en la parte externa así como en la interna se utilizaron las técnicas de microscopia de barrido electrónico así como de fuerza atómica, debido a que estas técnicas no son destructivas [20], las muestras se analizaron, en su parte externa así como en la parte interna como se puede apreciar en la imagen de la figura 2.1, en la cual se marcaron con unos puntos los lugares por donde se guió el análisis por microscopia, es importante mencionar que las muestras no tenían recubrimiento de oro o carbón, con el fin de obtener la mayor naturalidad en las imágenes que se muestran a continuación, las cuales se presentan primero por SEM de la figura 2.2 hasta la figura 2.9 de las cuales desde la 2.2 hasta la 2.5 son imágenes correspondientes a la parte externa y de la 2.6 hasta la 2.9 a la parte interna. Estas imágenes fueron examinadas a 20keV por microscopia de barrido electrónico a diferentes ampliaciones en un equipo Stereoscan 440 de Oxford Instruments perteneciente al departamento de Metálicos Cerámicos del Instituto de Investigaciones en Materiales (IIM)



Figura 2.1.-Superficies analizadas

La figura 2.2 muestra una imagen por SEM en la cual se aprecia la unión esmalte-cemento con el esmalte E en la parte incisal en donde se ve claramente el inicio del cemento acelular afibrilar que cubre el primer tercio de la raíz del diente además de mostrar claramente el predominio de las secciones mineralizadas.

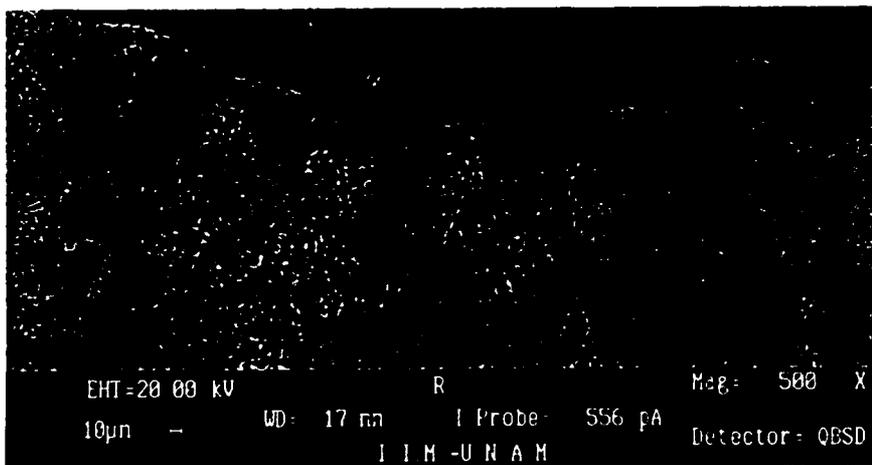


Figura 2.2. Unión Esmalte-Cemento acelular

En la figura 2.3 se tiene un acercamiento del cemento celular en el cual se observa la formación de glóbulos mineralizados mezclados con un fondo de secciones orgánicas.

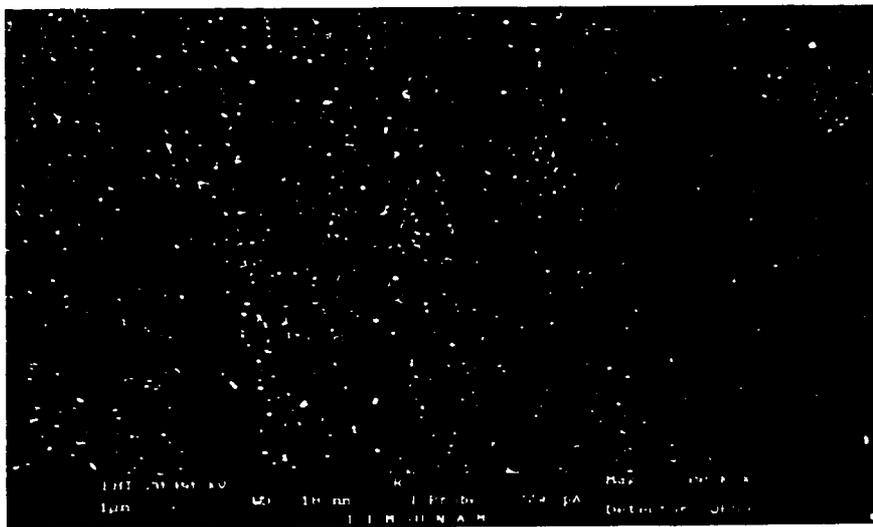


Figura 2.3. Cemento celular

Hasta ahora las imágenes mostradas del la parte externa del diente nos muestran una distribución del material en donde en la zona amelocementaria es predominantemente mineral mientras que en la zona apical la densidad superficial el material orgánico es mayor. Aunado a esto, en las imágenes anteriores sí se observa una distinción en la topografía de las distintas capas de material que conforma el cemento [4]

Ahora como se mencionó arriba, continuaremos con el análisis de la parte interna del cemento, esto se realizó por la parte interna de un diente seccionado por la mitad como se muestra en la figura 2.1b tomando imágenes en la zona punteada.

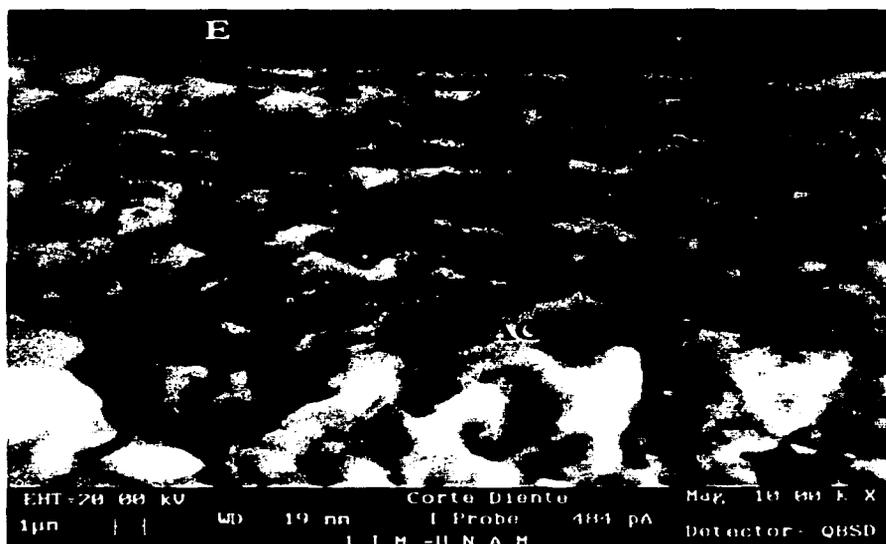


Figura 2.6 Interfase esmalte-cemento

La imagen anterior (figura 2.6) pertenece a la parte interna del diente en donde se observa la unión cemento acelular (AC) con el esmalte (E). El borde de la unión demarca al cemento acelular corroborando la diferencia de topografía mostrada en la figura 2.2 entre el cemento y el esmalte en adición a esto en la imagen anterior se ponen de manifiesto las líneas incrementales de crecimiento que son transversales a la dirección de mineralización.

En la siguiente figura (2.7) se tiene la parte interna de la raíz del diente en donde se observa al cemento celular (CC) fibrilar en unión con los túbulos dentinarios (D), destacando que dicha interfase mineral no está bien definida. Cabe mencionar que dichos túbulos dentinarios son transversales a la superficie del diente ya que esta imagen es de la parte interna del diente.

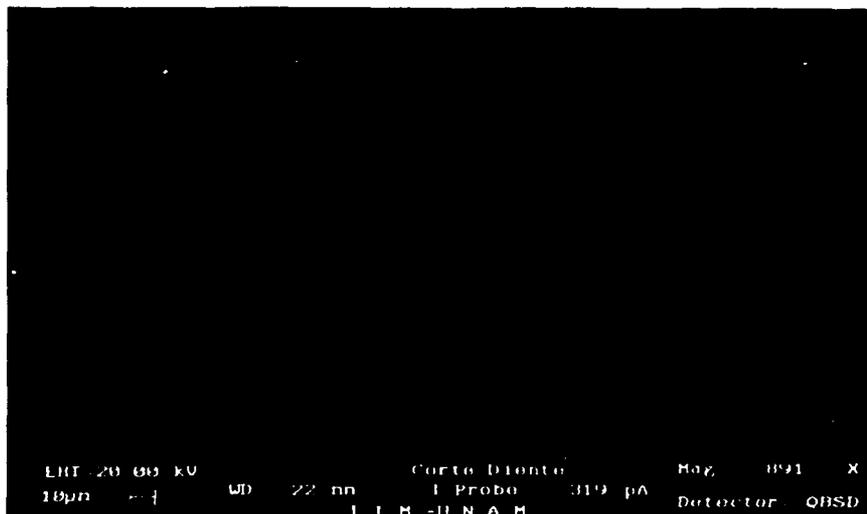


Figura 2.7.- Interfase Cemento-Dentina

Acercamiento (figura 2.8) a la matriz mineralizada del cemento celular en donde se aprecian las lagunas de los cementocitos (Ce).



Figura 2.8.- Matriz mineralizada del cemento

Como una examinación final para la colágena se analizaron las diferentes capas adyacentes por microscopia de barrido. Esto muestra que el cemento, que esta en estrecha unión a la matriz mineralizada del cemento celular fibrilar, se compone también de una distribución transversal de las fibras extrínsecas de colágena o fibras de Sharpey (Figura 2.9).

Estas fibras de Sharpey mantienen una orientación perpendicular a la superficie del cemento y según S. M. Cool [4] estas fibras salen y continúan en el ligamento periodontal.

En consecuencia, del conjunto de imágenes de la parte interna y externa del cemento dental, podemos indicar que el cemento dental es un tejido mineralizado en el cual, la parte inorgánica se observa como gránulos y cúmulos aglomerados. Su morfología es irregular mostrando las lagunas de los cementocitos como poros y pequeños conos tipo volcánico. En la parte interna el esmalte muestra una superficie tersa sin gránulos ni poros, mientras que el cemento es granular con conos volcánicos con un poro al centro (figura 2.6). Aglomerados minerales en forma irregular caracterizan esta zona. Sin embargo, es claro que tienen un orden horizontal y continuo y la separación entre poros es prácticamente constante de aproximadamente 0.5 a 1.2 μm . Las fibras de colágena están entrelazadas logrando una estructura fibrilar de alta resistencia con una gran cantidad de poros que permiten el intercambio de componentes orgánicos

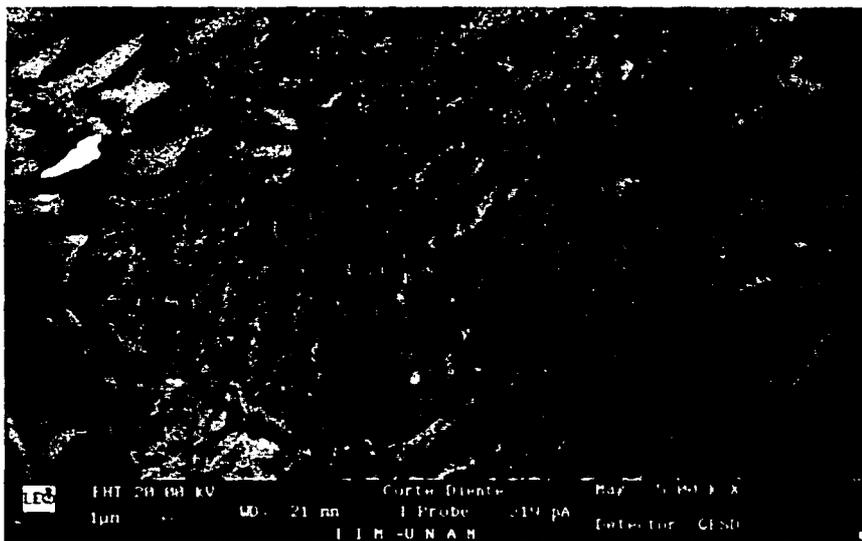


Figura 2.9 Fibras de colágena mejor conocidas como fibras de Sharpey

A continuación se presenta la topografía del cemento dental humano por microscopía de fuerza atómica realizadas en un equipo Jeol Mod. 4210 instalado en el Instituto de Investigaciones en Materiales en el departamento de Metálicos Cerámicos. Para este análisis las muestras se prepararon de la misma forma que en el análisis de barrido ya que una de las ventajas de este método de análisis para la investigación dental es la mínima preparación de las muestras. El método que se usó y el más común en investigación dental es el de Contact-Mode para AFM, en donde la punta está en permanente contacto con la superficie de la muestra y la imagen resultante es un mapa topográfico de la muestra. Para algunos casos el movimiento de barrido de la punta de prueba, aunado a las fuerzas de adhesión entre la punta

y la superficie de la muestra pueden causar daño a ambas la punta y la muestra y crear errores en la imagen obtenida.

En la figura 2.10 se muestra la topografía de la parte externa de la porción incisal (a) y parte media (b) de la raíz del diente en donde se observa el patrón globular de mineralización del cemento, concordando con la imagen obtenida por SEM (figura 2.3) en donde se puede apreciar nuevamente el dominio de material mineral con algunos rastros de material orgánico. Para el cual el tamaño de grano globular es de aproximadamente $1.6 \pm 0.3 \mu\text{m}$ con aglomerados del orden de 15 a 20 μm .

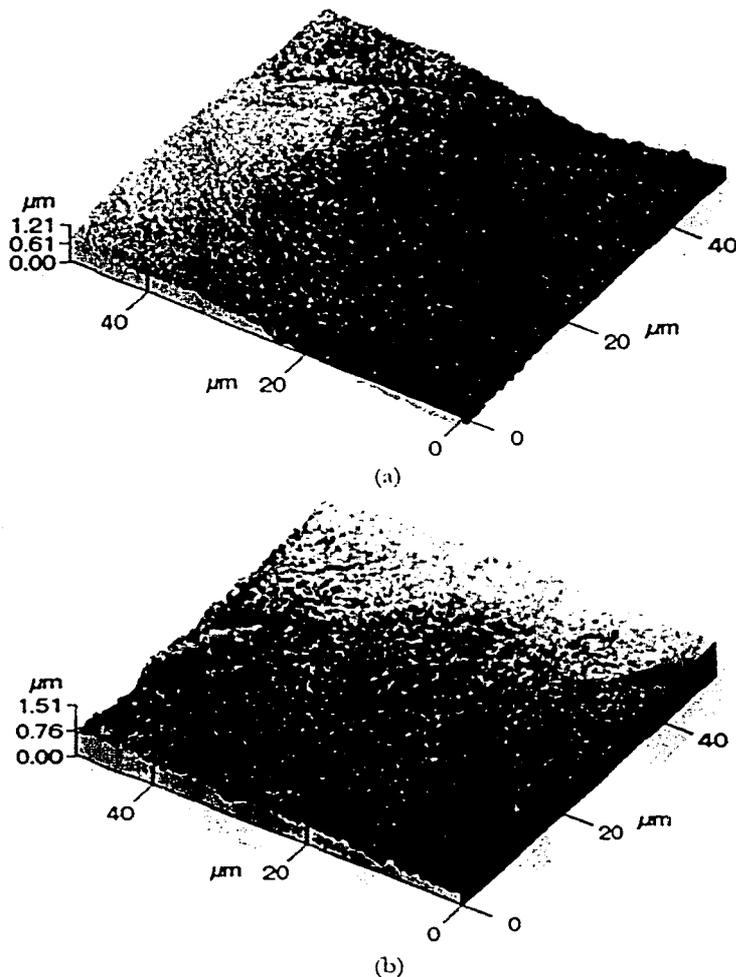


Figura 2.10.- Morfología de la parte externa del cemento por AFM

En la figura 2.11 se presenta la parte externa media (a) y apical (b) de la raíz del diente en donde se observan los espacios de inserción de las fibras de colágena que sirven de soporte al órgano dentario. En esta sección se disminuye la cantidad de material mineralizado y se incrementa el material orgánico como se pudo notar también por SEM, además de tener una medida transversal de las fibras de colágena que corresponde a la reportada por la literatura [21], distribuidas en su forma natural, en la imagen (a) la depresión oval corresponde a un cementocito, relacionado con la formación del cemento, estas depresiones se encuentran rodeadas por estructuras anulares que posiblemente alberguen las finas prolongaciones del cementocito, los poros dispersos alrededor de la depresión contienen probablemente fibras de Sharpey en su estado natural [22]. Estas depresiones tipo cono volcánico tienen un tamaño de 2 a 4 μm .

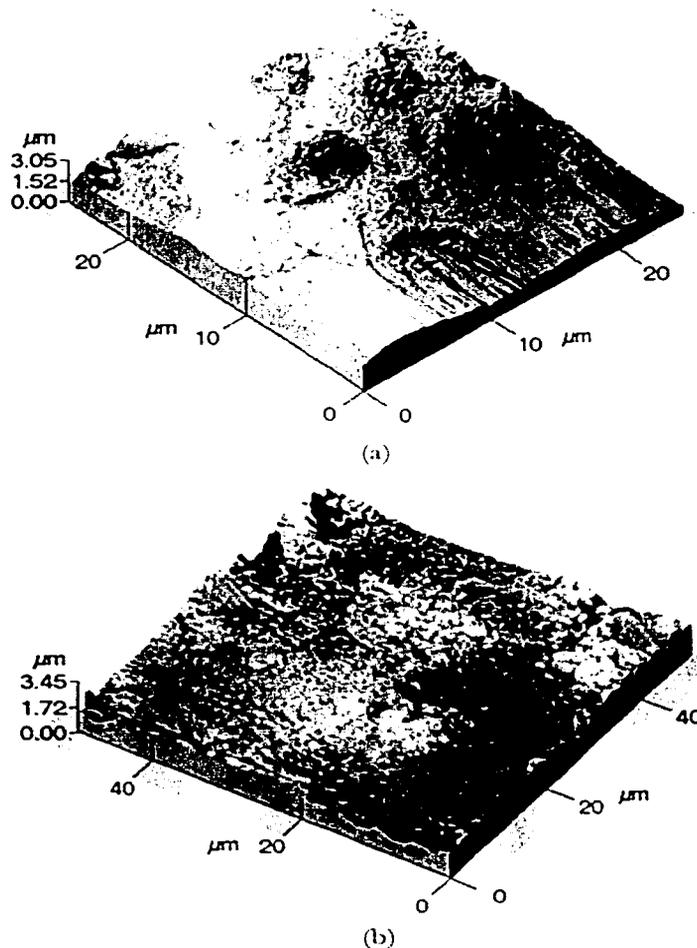


Figura 2.11.- Parte externa media y apical del cemento dental

A partir de la figura 2.12 se presenta la topografía de la parte interna de la raíz del diente. En esta primer imagen se muestra la matriz globular mineralizada del cemento (a) y las líneas de crecimiento del cemento (b) como además se pueden observar en la figura 2.6 de barrido por SEM. El tamaño de los aglomerados es de $1.6 \pm 0.3 \mu\text{m}$ y están ordenados en la dirección de las líneas de crecimiento como se observa en (b).

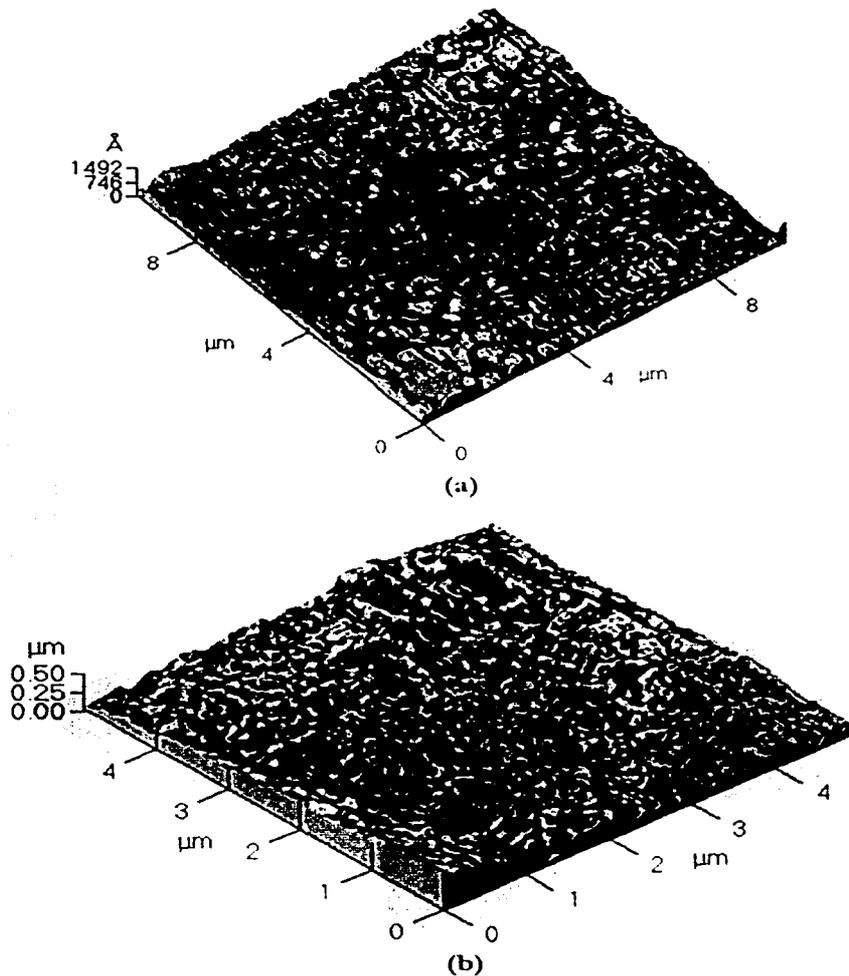


Figura 2.12.- a) Matriz mineral globularizada, b) Líneas de crecimiento del cemento

En esta figura de fuerza atómica se presentan las fibras de colágena o de Sharpey (a) como en la figura 2.9 de Barrido por SEM y (b) en la matriz mineralizada del cemento celular fibrilar que sirven de soporte interno a la estructura general del diente. Como puede verse las fibras están cubiertas de mineral (hidroxiapatita), por lo que la mineralización del calcio sigue la morfología de las fibras logrando una unión del material orgánico con el inorgánico de alta resistencia cuya composición podemos determinar por EDS.

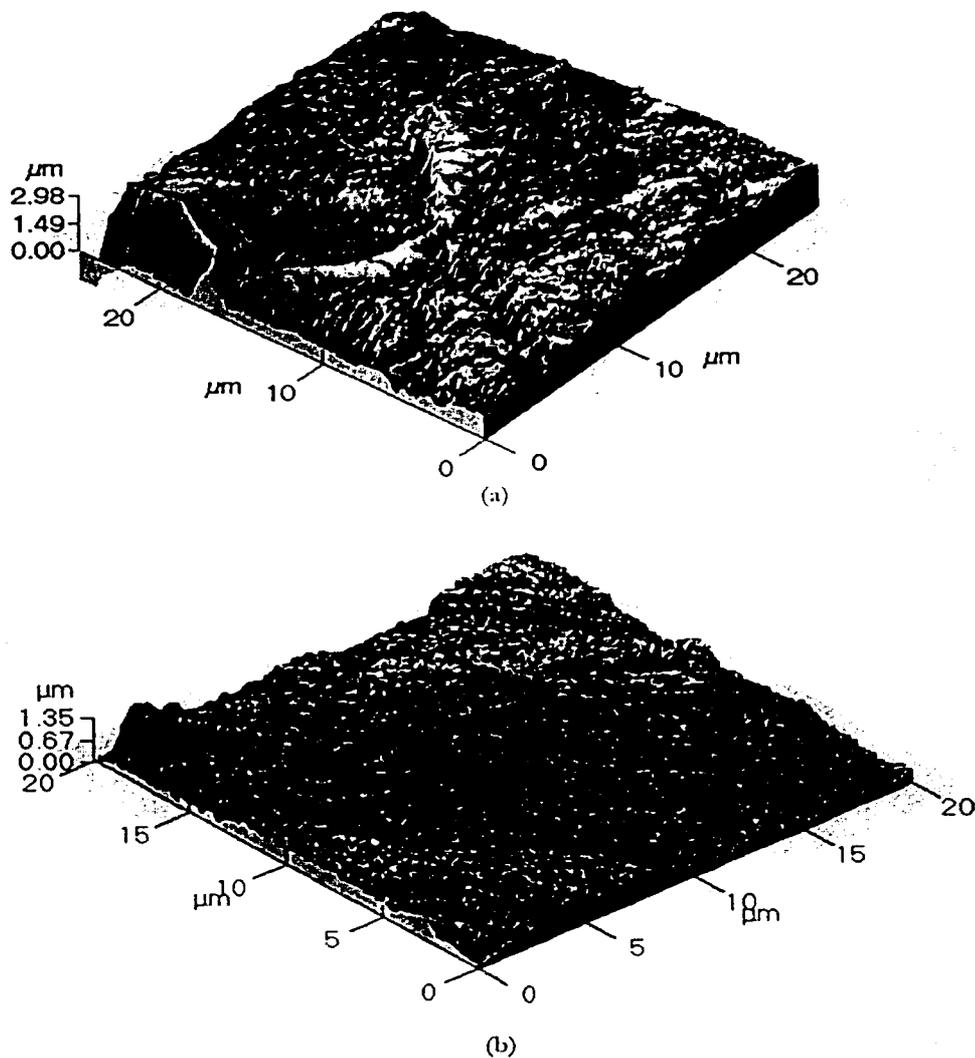


Figura 2.13.- Fibras de colágena

ESPECTROMETRÍA POR DISPERSIÓN DE ENERGÍA (EDS)

La espectrometría se realizó sobre las mismas piezas en que se realizó la microscopía de barrido electrónico en el Microscopio de Barrido Electrónico Stereoscan 440 de Oxford Instruments perteneciente al departamento de Materiales Metálicos y Cerámicos del Instituto de Investigaciones en Materiales (IIM). Como se menciona al principio de este desarrollo las muestras no fueron recubiertas con ninguna capa ya sea de oro o de carbón ya que estos materiales provocan una interferencia con el fósforo lo cual generaría una modificación en los datos que se obtengan, pues lo que se busca en este análisis es una distribución de dicho elemento a lo largo del cemento. En la figura 2.14 se muestra el espectro de composición química del cual se obtuvo la composición porcentual, del cemento dental humano. Observamos que hay diferentes elementos, como calcio, magnesio, fósforo, potasio, cloro, etc. De los cuales, como se menciona arriba, sólo nos enfocaremos en los porcentajes del calcio (Ca), magnesio (Mg) y fósforo (P), por ser estos unos de los principales componentes de la hidroxiapatita y están relacionados con la mineralización. Además de comprobar y en su caso determinar la distribución de estos elementos a lo largo del cemento.

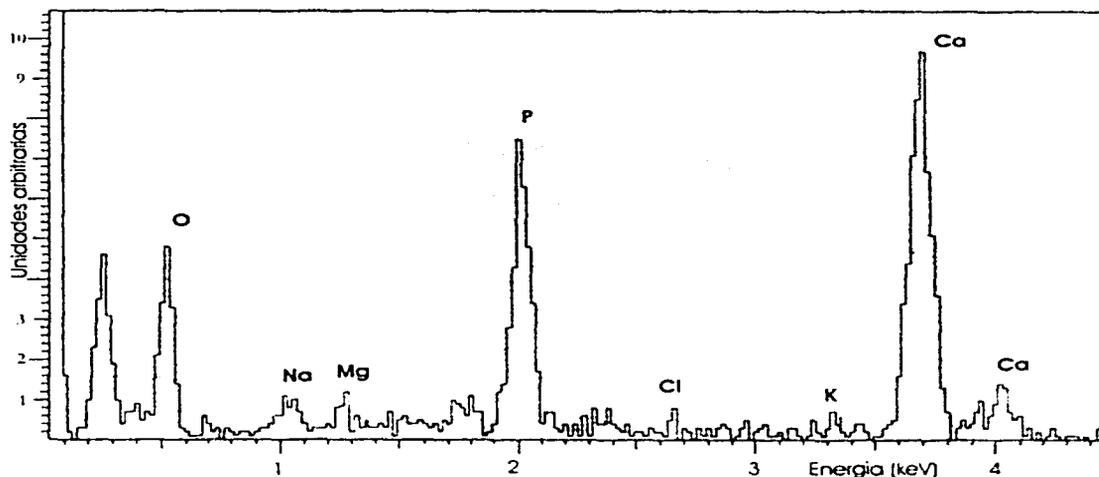


Imagen 2.14.- Espectro típico de EDS típico del cemento dental

En las siguientes gráficas se muestran los resultados que se obtuvieron por espectroscopia por dispersión de energía electrónica en la cual nos enfocamos primordialmente a las razones porcentuales entre el calcio y fósforo (Ca/P) y magnesio y calcio (Mg/Ca) en las áreas interna y externa del cemento dental. En primera instancia nos referimos al Ca/P y hacemos un análisis diferenciando las tres zonas que presentan un comportamiento estable.

Para el primer bloque se tiene el análisis en el cemento externo.

En la figura 2.15 se muestran los resultados de la razón Ca/P contra la distancia a lo largo del cemento desde la región amelocementaria hasta el ápice.

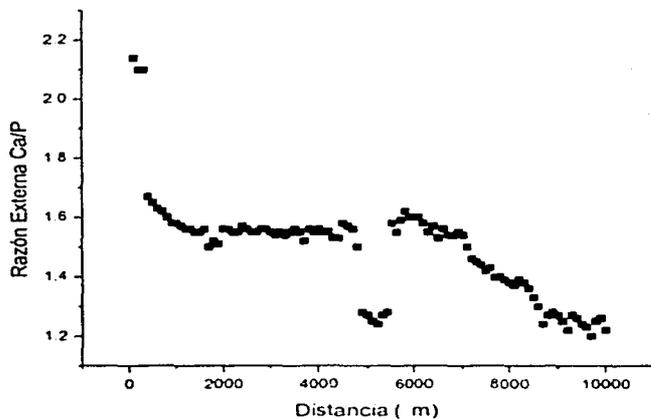


Figura 2.15.- distribución de la razón Ca:P a lo largo del cemento dental

Es claro que el comportamiento de Ca/P no es lineal por lo cual se analizan los datos por regiones. En la figura 2.16 se muestra la regresión más adecuada a la primera región (amelocementaria) siendo esta un decaimiento exponencial como se puede apreciar en el recuadro.

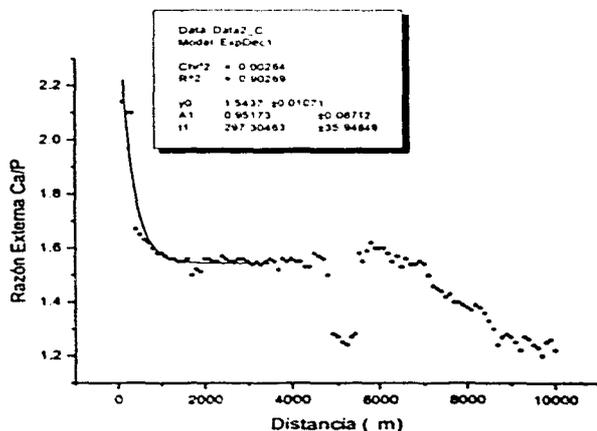


Figura 2.16.- Análisis de la razón Ca:P en la zona amelocementaria

Por lo que se tiene el comportamiento de esta razón a partir de la representación analítica de la regresión que se presenta a continuación

$$\frac{Ca}{P} = \left(\frac{Ca}{P}\right)_0 + 0.9517e^{-\frac{D}{297.304}} \quad (6)$$

en donde $\left(\frac{Ca}{P}\right)_0$ tiene un valor de 1.5437 el cual nos indica el valor asintótico al cual se aproxima la razón Ca:P.

En la figura 2.17 se realizó una regresión gaussiana invertida en la zona central cuyos parámetros están explicados en los recuadros además del esquema en el cual se aprecia el significado de cada uno de estos parámetros.

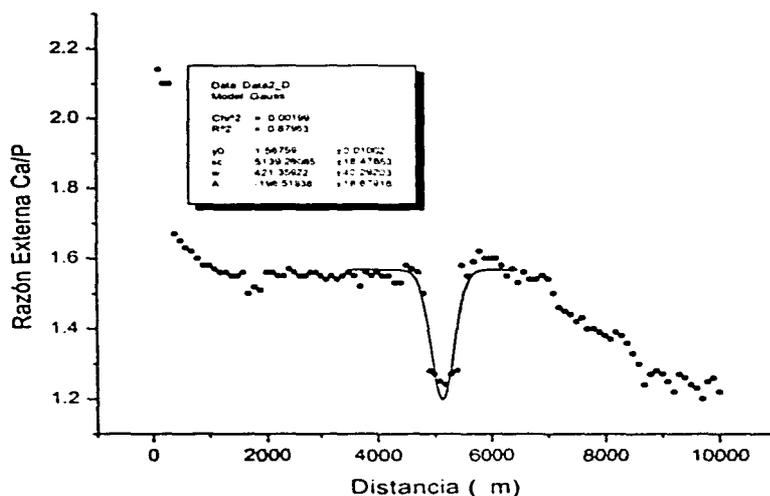


Figura 2.17.- Análisis de la razón Ca:P en la zona media

Para esta región que comprende la zona media del diente tenemos que la regresión gaussiana nos dice que el comportamiento de la razón Ca:P tiene la siguiente forma:

$$\frac{Ca}{P} = \left(\frac{Ca}{P}\right)_0 + \frac{-196.52}{421.35 \cdot \sqrt{\pi/2}} e^{-2 \left(\frac{D-5134}{421.35}\right)^2} \quad (7)$$

en donde tenemos nuevamente que la razón media de concentración de la razón tiene el valor de: $\left(\frac{Ca}{P}\right)_0 = 1.56759$ el cual es prácticamente el mismo valor asintótico en la región amelo-cementaria y que se encuentra en el rango de lo reportado en los últimos trabajos referentes al tema [4], lo que de alguna forma se entiende, ya que en las medidas que reportan se consideran regiones de $100\mu\text{m}$ en las cuales la variación Ca/P es mínima. No obstante en el análisis anterior se determina una región específica, que se encuentra en la zona media, en la cual se tiene un comportamiento claramente gaussiano con un ancho medio de $421\mu\text{m}$ a $5134\mu\text{m}$ de la frontera esmalte-cemento, en donde la concentración del calcio disminuye de forma significativa.

De esta forma en la figura 2.18 se continúa analizando los datos obtenidos de dicha razón en la región del ápice, los cuales, se ajustan a una regresión lineal cuyos parámetros se presentan en el recuadro.

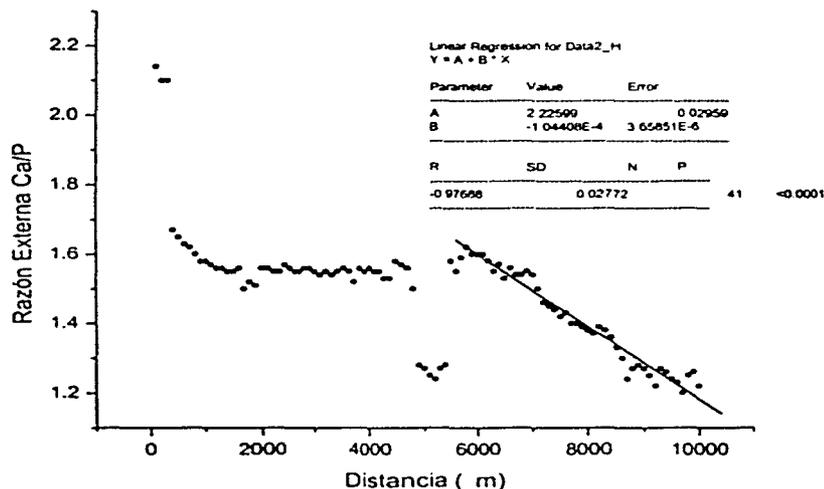


Figura 2.18.- Análisis de la razón Ca:P en la zona del ápice

De este análisis podemos decir que la razón se comporta de la siguiente manera:

$$\frac{Ca}{P} = 2.2259 - (1.044 * 10^{-4})D$$

lo que nos dice que esta razón se comporta de forma lineal y en la misma proporción con la distancia.

Finalmente en la figura 2.19 se ilustra el comportamiento global de las diferentes curvas en una superposición con los datos obtenidos.

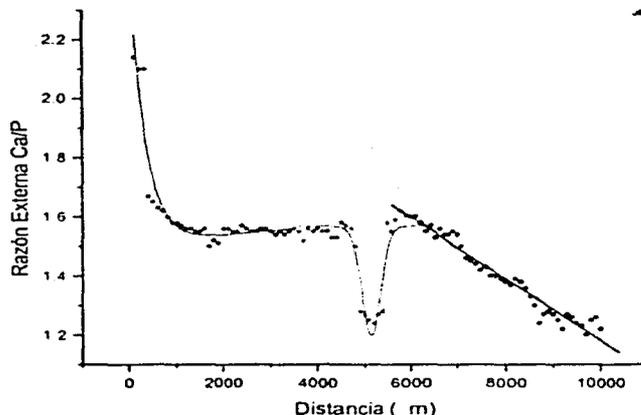


Figura 2.19.- datos de la razón Ca:P con sus aproximaciones analíticas

En las siguientes figuras 2.20 y 2.21 se presenta la razón magnesio calcio en la razón interna así como en la externa respectivamente, teniendo en análisis de regresión gaussiana para los cuales sus respectivos parámetros se encuentran en el recuadro

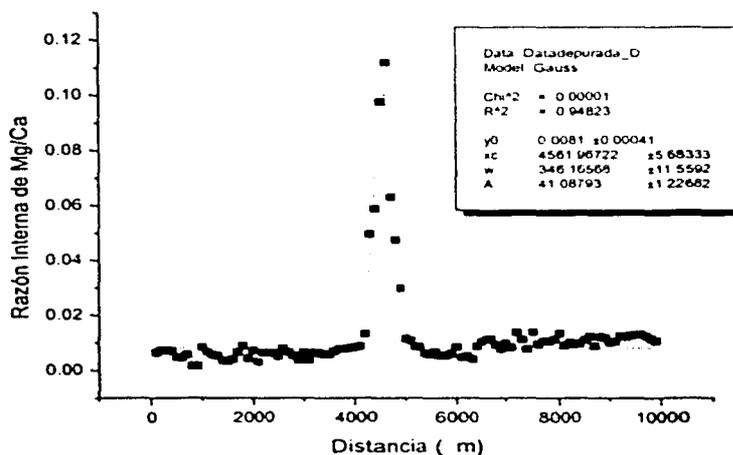


Figura 2.20.- Razón interna de Mg:Ca

con este análisis se obtiene el comportamiento de la razón Mg/Ca que nuevamente es de la forma siguiente

$$\frac{Mg}{Ca} = \left(\frac{Mg}{Ca}\right)_0 + \frac{41.087}{346.16 \cdot \pi \cdot 2} e^{-2\left(\frac{D-4561.97}{346.16}\right)^2} \quad (9)$$

en donde $\left(\frac{Mg}{Ca}\right)_0 = 0.0081$ que es el valor entorno al cual la mayoría de los datos se encuentran pudiendo considerarlos constantes y obteniendo una región, en donde el ensanchamiento es de $346\mu\text{m}$ a una distancia aproximada de $4561\mu\text{m}$ de la frontera esmalte-cemento con un máximo relativo Mg/Ca de aproximadamente 0.13.

De la misma forma se analiza la región externa (figura 2.21)

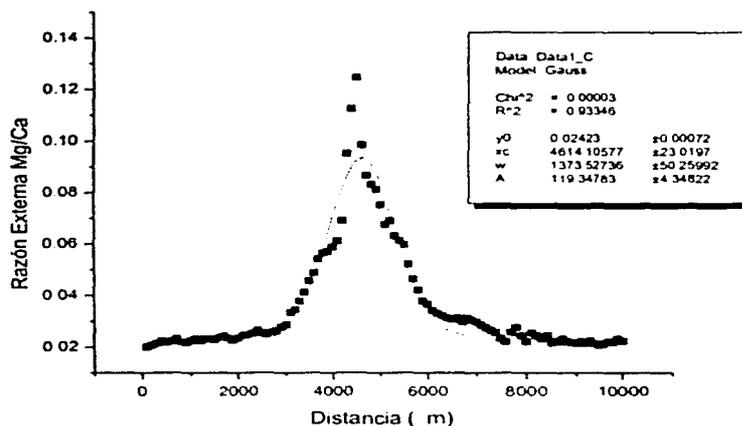


Figura 2.21.- Razón externa de Mg:Ca

Obteniendo el siguiente modelo para este comportamiento

$$\frac{Mg}{Ca} = \left(\frac{Mg}{Ca}\right)_0 + \frac{119.3478}{1373.52 \cdot \pi \cdot 2} e^{-2\left(\frac{D-4614}{1373.52}\right)^2} \quad (10)$$

en donde $\left(\frac{Mg}{Ca}\right)_0 = 0.02423$ que una vez más es el valor promedio en torno al cual se encuentran la mayoría de los datos, junto con esto tenemos una región en donde no se presenta este comportamiento que tiene un ancho medio de $1373\mu\text{m}$ centrada aproximadamente a $4614\mu\text{m}$ de la frontera amelocementaria y con un máximo relativo Mg/Ca de 0.13 que coincide con la parte interna.

RAYOS X

La composición cristalográfica del cemento dental humano fue obtenida por difracción de rayos X por el método de polvos, para esto se colectaron cerca de 20 muestras dentales las cuales fueron limpiadas por sonicación, una vez limpias se separó el cemento para ser molido en un mortero a nivel de polvo fino y poderlo colocar en el difractómetro obteniendo el espectro siguiente (figura 2.22), el cual fue analizado en un Difractómetro SIEMENS D-5000.

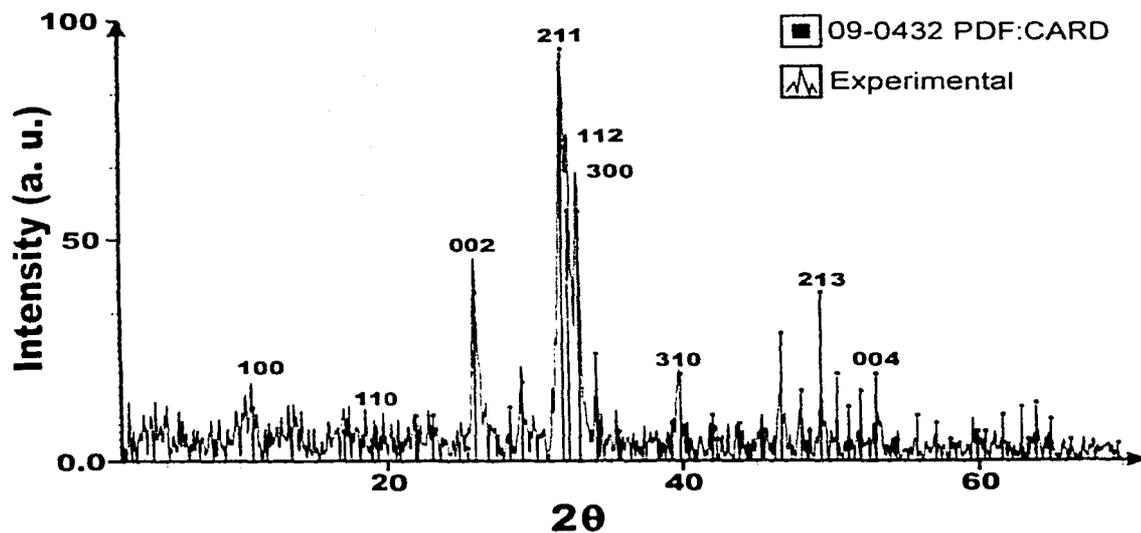


Figura 2.22.- Espectro de difracción del cemento dental

En donde se observa que el espectro de rayos X experimental del cemento coincide con el espectro de rayos X teórico que pertenece a la hidroxiapatita. Esta comparación nos lleva con seguridad a la búsqueda y caracterización de dicho material mediante una técnica de mayor resolución como es la microscopia de transmisión electrónica como se muestra a continuación.

MICROSCOPIA DE TRANSMISIÓN ELECTRÓNICA

Se utilizó la técnica a de microscopia de transmisión electrónica para la obtención de la estructura cristalográfica de la parte inorgánica del diente. Para esto se prepararon las muestras en rejillas de cobre, las muestras se clivaron hasta obtener una muestra rectangular la cual fue desbastada con un Dimpler para así poder meterla en el microscopio de transmisión con lo que se obtuvieron varias imágenes de las cuales la más representativa es la siguiente (figura 2.23), en donde se aprecia la muestra de cemento preparado para dicha microscopia en una imagen de campo claro, en el inserto se muestra la región que difracta en campo oscuro.

Después de esto, se continuó clivando la muestra hasta obtener unos pequeños trozos que contuvieran cristales, por lo que podemos obtener varios patrones de difracción de muestras poli-cristalinas y mono-cristalinas.



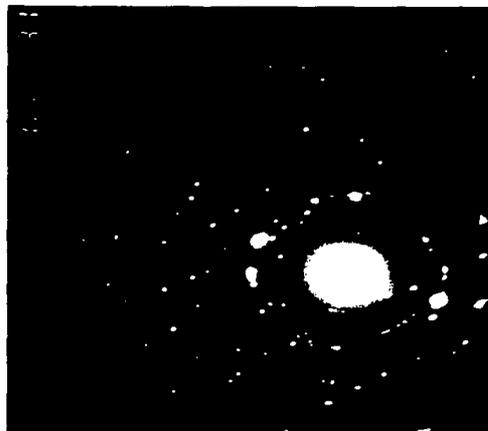
Figura 2.23.- Cemento en campo claro y campo oscuro

Para las policristalinas (figura 2.24 a y b) se ven claramente los anillos y puntos de la difracción debido a que los cristales del tejido mineral del cemento son grandes en estas imágenes se aprecian las distancias a las que se encuentran los anillos de difracción.

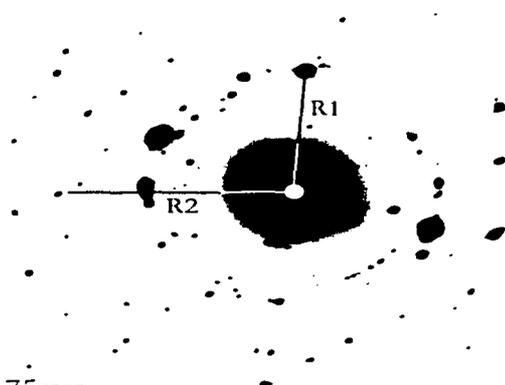
En la figura 2.24 tenemos la difracción provocada por los policristales de hidroxiapatita, en esta imagen se presentan dos difracciones de anillos de un par para cada una de ellas, en las cuales los radios (d) siguen la relación:

$$Rd_{hkl} = \lambda L = C$$

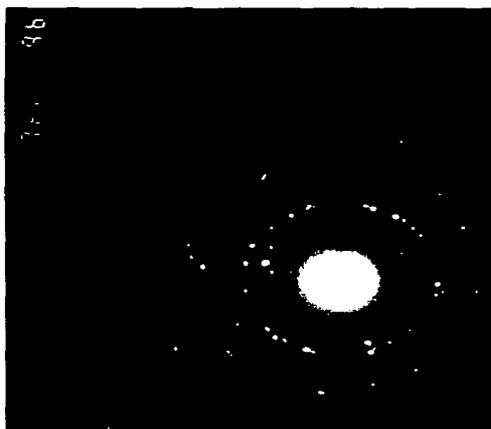
en donde C es la constante de cámara que tiene un valor de $C = 84\text{mm}\text{\AA}$



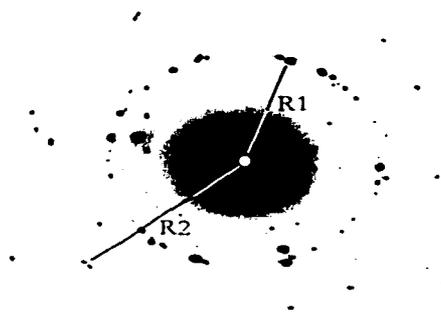
(a)



R1 9.75mm
R2 16mm



(b)



R1 10.5mm
R2 16mm

Figura 2.24.- Difracción del cemento dental de carácter policristalino

En consecuencia, los planos de difracción para el valor de R_1 nos da 8.2\AA que corresponde al plano (1,0,0) de acuerdo a la tarjeta 09-0432 de difracción hexagonal. el valor de dicha tarjeta es $d_{1,0,0} = 8.17\text{\AA}$ por lo cual, la diferencia tiene un valor de 0.03\AA que cae dentro del error debido al equipo utilizado.

El valor de R_2 nos indica una $d_{hkl} = 5.25\text{\AA}$ que corresponde al plano (1,0,1) cuyo valor reportado es $d_{1,0,1} = 5.26\text{\AA}$.

Para el patrón de difracción de la figura 2.24 (b) sus valores correspondientes son: $d_{hkl}=8.0\text{\AA}$ por lo cual se tienen los planos de difracción (1,0,0) con 0.2 \AA de error mientras que el segundo anillo coincide con el anillo de la figura 2.24 (a) es decir, los planos (1,0,1) con un error despreciable de 0.01 \AA .

Estas muestras policristalinas se clivaron con una navaja de un solo filo hasta obtener muestras muy pequeñas que contenían pequeños cristales que pueden ser considerados como monocristales y en consecuencia su patrón de difracción consistirá de puntos claros con algunos anillos de fondo (figura 2.25) o de un patrón de difracción completamente definido (figura 2.26) en el cual se aprecia claramente el mono-cristal de hidroxiapatita, en ambos tipos de difracción se tiene la estructura hexagonal, que reporta la literatura correspondiente a la hidroxiapatita.

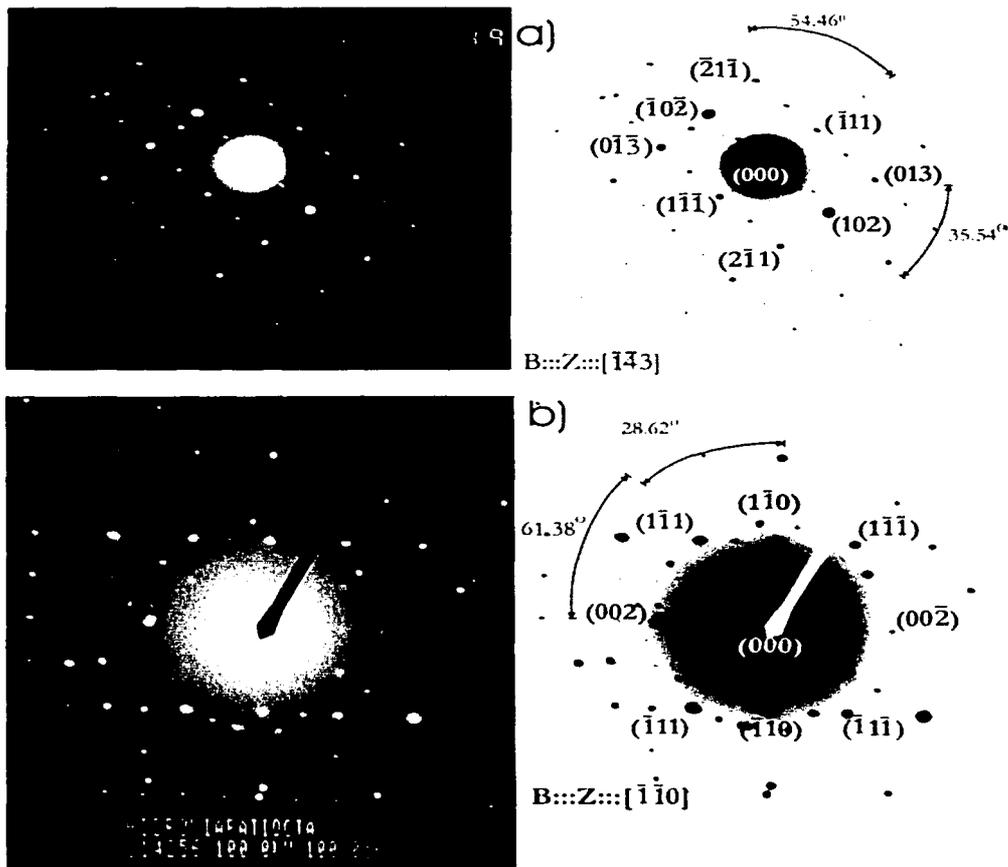


Figura 2.25.- Patrón de difracción correspondiente a pequeños cristales de hidroxiapatita del cemento dental.

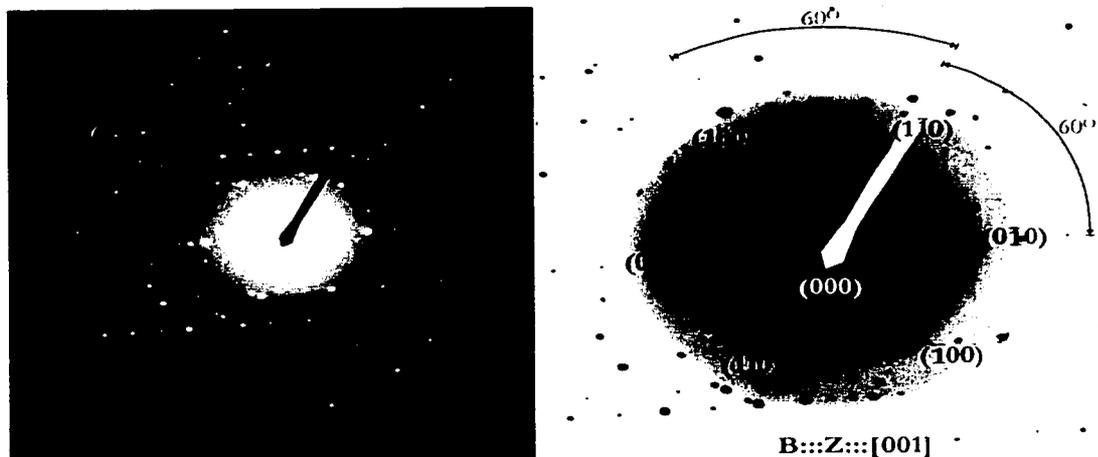


Figura 2.26.-Patrón de difracción de cristales de cemento dental

Los valores de Z representan la dirección en que incidió el haz, observando que los patrones de difracción determinados por los índices de la difracción corresponden a una estructura cristalina hexagonal, la cual se comparó con la tabla teórica [25] obteniendo los índices y los ángulos presentados, confirmando la estructura hexagonal de la hidroxiapatita.

Es claro que existen puntos satélites, los cuales son debidos a doble difracción entre pequeños cristales de cemento dental, sin embargo el indexado principal coincide con el correspondiente a un cristal hexagonal con parámetros de red:

$$a=9.42\text{Å} \quad c=6.89\text{Å}$$

que prácticamente coinciden con los reportados para la hidroxiapatita, esto es:

$$a_1=9.418\text{Å} \quad c = 6.884\text{Å}$$

TESIS CON
FALLA DE ORIENTACIÓN

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

MICROSCOPIA DE BARRIDO ELECTRÓNICO Y DE FUERZA ATÓMICA

Estas dos técnicas de caracterización se utilizaron principalmente para reforzar las definiciones acerca de las diferentes características del cemento dental humano [23]. En la figura 2.2 de SEM así como en la 2.10a de AFM se puede apreciar el **cemento acelular afibrilar** que se compone de una morfología homogénea sin células ni fibras de colágena junto con este se tiene el mismo cemento en la región interna (figura 2.6). Para la región del tercio medio del diente se tiene el **cemento acelular con fibras extrínsecas** mostrado en la figuras 2.3 y 2.4 de SEM y 2.10 de AFM en las cuales se distinguen la formación de glóbulos mineralizados así como la presencia de los espacios correspondientes a las fibras de Sharpey. Continuando con este análisis llegamos a la zona apical en donde se encuentran el **cemento celular con fibras intrínsecas** cuya característica principal es la presencia de cementocitos junto con las fibras de colágena (figura 2.11b) además de tenerlo en la parte interna de una forma más clara en la imagen 2.7, muy similar a este tenemos el **cemento acelular con fibras intrínsecas** que se presenta en la figura 2.5 de SEM en donde quedan claramente marcadas las zonas de en donde se encontraban las fibras de colágena en tono oscuro y 2.11a en donde tenemos una depresión correspondiente a un cementocito [22] relacionado con la formación del cemento, junto con esto se tiene el **cemento celular combinado estratificado** que posee fibras intrínsecas extrínsecas y cementocitos, para el cual se presentan diferentes imágenes, como en la figura 2.11b en donde se observan los espacios de inserción de las fibras de colágena las que también se pueden ver en la imagen 2.9 de SEM correspondiente a la parte interna, que al mineralizarse genera la consistencia y resistencia del diente en el proceso masticatorio.

Además de esta caracterización las técnicas de AFM y SEM arrojan varios resultados en diferentes aspectos. En cuanto a la frontera del cemento con la dentina se observa (figura 2.7) que dicha interfase mineral no esta bien definida pero si presenta una morfología suave al pasar del cemento a los túbulos dentinarios. Por otro lado se tienen las dimensiones de los principales componentes como son las fibras de colágena que se reportan de dimensiones de décimas de micra para algunos casos así como de 1 a 3 μ de grosor [21], las cuales podemos corroborar en la imagen 2.9 así como con una mayor claridad en la imagen 2.13a de AFM en donde se tiene una fibra de colágena de la parte interna del diente cuyas dimensiones se encuentran del orden de 2 μ en su parte más gruesa y de 20 μ de longitud aproximadamente, aunado a esto también se tienen las dimensiones aproximadas de los cementocitos que en la parte media interna tienen dimensiones de 0.5 μ (figura 2.8 SEM) aproximadamente mientras que en la parte media externa (figura 2.11a AFM) el espacio dejado por un cementocito es de 5 μ aproximadamente

Un resultado que también se concluye al realizar este análisis es el dominio de material mineral en la región amelocementaria (figura 2.2 y 2.10a) con poco, por no decir que nula la presencia de material orgánico que, por el contrario se presenta en la región del ápice ya que en este predomina el material orgánico (figura 2.5 y 2.13b) que está estrechamente ligado con el anclaje y adaptación de las piezas dentales.

ESPECTOMETRÍA POR DISPERSIÓN DE ENERGÍA (EDS)

Para este tipo de análisis se obtuvo una clara distribución de las razones de calcio fósforo y de magnesio calcio las cuales presentan un comportamiento diferente a lo reportado en la literatura ya que S. M. Cool (2002) [3] publica una distribución para el Ca:P promediada entre 1.69 y 1.71 que reduce el valor dado por A. H. Melchor (1969) de 2.08 [21] y 2.04 de H. E. Schroeder [23], pues en este trabajo se reporta como resultado un comportamiento de esta razón que varía entre 1.7 cerca de la unión amelocementaria hasta 1.2 en la zona apical, ya que no se consideran los primeros datos al ser estos pertenecientes a la zona del esmalte, pero más específicamente manejamos una variación muy pequeña que se encuentra en entorno al valor 1.56 para los dos primeros tercios del cemento, sin embargo se detecta una región de aproximadamente $421\mu\text{m}$ de ancho en la cual esta razón se aleja del promedio con un comportamiento gaussiano en la parte media (figura 2.17) a $5134\mu\text{m}$ de la frontera amelocementaria, para el último tercio (zona apical, figura 2.18) se presenta un comportamiento lineal, junto con esto se tienen las diferencias en el comportamiento del Mg:Ca que se reportan dentro de los valores: 0.0375 a 0.0389 [21], y en promedio de 0.0356 [23] ya que en este trabajo obtenemos valores que van desde 0.02 hasta 0.12 de los cuales en una descripción más específica tenemos que la gran mayoría de los datos están entorno al 0.024 que es un valor muy cercano al reportado por la literatura pero menor, además se presenta un comportamiento gausseano con un ancho aproximado de $346\mu\text{m}$ para la zona externa y de $1373\mu\text{m}$ para la interna ubicados aproximadamente a $4561\mu\text{m}$ y $4614\mu\text{m}$ respectivamente de la frontera amelocementaria.

Cabe destacar que la zona media en donde la razón alcanza su valor máximo entorno al 0.12, la zona en donde se presenta este comportamiento coincide en la parte interna así como en la externa del cemento y que esta zona se traslapa con aquella en que la razón Ca:P tiene una disminución considerable por lo que podemos deducir que esta disminución no es debida al aumento de fósforo sino a la disminución del calcio ya que suponemos que el magnesio es absorbido por la hidroxiapatita desplazando al calcio y deformando la red cristalina

DIFRACCIÓN DE RAYOS X

La similitud que presentan los espectros teórico y experimental pone de manifiesto la presencia de hidroxiapatita ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$) en el cemento dental humano lo que nos da pie a realizar un análisis con mayor profundidad para caracterizar la estructura cristalográfica de las muestras. El espectro teórico de la hidroxiapatita se obtuvo de la 09-0432 PDF:CARD

MICROSCOPIA DE TRANSMISIÓN ELECTRÓNICA

A partir de la información que nos da el análisis por rayos X se llegó a confirmar la estructura policristalina formada por la hidroxiapatita para lo cual los espectros que se tienen

aportan la información suficiente de las dimensiones de la estructura del material, con lo que se puede deducir que los diámetros medidos para los anillos son:

Para 2.24a de:

| d | Teórico (Å) | Experimental (Å) | Plano |
|-------|-------------|------------------|-------|
| d_1 | 8.17 | 8.2 ± 0.1 | (100) |
| d_2 | 5.26 | 5.25 ± 0.05 | (101) |

Para 2.24b de:

| d | Teórico (Å) | Experimental (Å) | Plano |
|-------|-------------|------------------|-------|
| d_1 | 8.17 | 8.0 ± 0.2 | (100) |
| d_2 | 5.26 | 5.25 ± 0.05 | (101) |

En las imágenes 2.25 y 2.26 se presentan las difracciones correspondientes a muestras monocristalinas las cuales corresponden a una estructura hexagonal de la hidroxiapatita que tiene como grupo espacial $P6_3/m$ (176) [24], en donde el haz incide en la dirección:

$$Z = \bar{1}\bar{4}3 \quad 2.15a$$

$$Z = \bar{1}\bar{1}0 \quad 2.15b$$

$$Z = 001 \quad 2.16$$

y los vecinos cercanos tienen los índices descritos en las imágenes los cuales fueron cotejados con las tablas teóricas de las posibles difracciones hexagonales [25], comprobando de esta manera la estructura hexagonal de la hidroxiapatita.

CONCLUSIONES

De los resultados obtenidos se tienen las siguientes conclusiones

- La microscopía de barrido electrónico así como la de fuerza atómica nos ayudan a determinar y especificar las características del cemento dental humano dadas con anterioridad así como la localización de las regiones en las cuales estas se encuentran.
- La espectrometría por dispersión de energía EDS nos da un nuevo enfoque de la distribución del calcio (Ca), del fósforo (P) y del magnesio (Mg) en donde la razón Ca:P tiene un comportamiento gaussiano en la región media así como la razón Mg:Ca con lo que se tiene una disminución substancial del calcio en esta región dada por la integración del magnesio al sustituir al calcio en la estructura de la hidroxiapatita ya que este se encuentra en constante regeneración por ser un material orgánico, provocando un cambio en la estructura hexagonal de la misma cambiando sus propiedades cristalinas como la compresión o la resistencia a esfuerzos de corte. Es decir esta zona actúa como una región de amortiguamiento de los esfuerzos y tensiones generadas por el proceso masticativo que evita que la raíz dental sufra alguna fractura.
- A partir de la microscopía de transmisión electrónica se reafirma la estructura hexagonal de la hidroxiapatita con las distancias interplanares y los espectros de difracción correspondientes a los teóricos de una estructura hexagonal correspondiendo a su grupo espacial. Sin embargo es necesario tratar de obtener un microanálisis de la región del cemento rico en magnesio para obtener experimentalmente sus correspondientes parámetros de red. En su caso para una posterior investigación, elaborar hidroxiapatita sintética con diferentes cantidades de magnesio y simular así, el comportamiento de la composición química encontrada en el presente trabajo.

BIBLIOGRAFÍA

1. **Le Geros R.Z.**, Calcium Phosphates in Oral Biology and Medicine, Howard M Myers, San Francisco California, 1991.
2. **Birkedal-Hansel H., Butler WT., Taylor RE.**, Proteins of the periodontium. Characterization of the insoluble collagens of bovine dental cementum. *Calc. Tissue Res.* 1977 23:39
3. **Gross J. K., Mehmel M. J.**, *Zeits Krizt*, 75, 1930, 323.
4. **S. M. Cool, M. R. Forwood, P. Campbell and M. B. Bennett**, Comparisons between bone and cementum compositions and the possible basis for their layered appearances, *J. Bone*, vol. 30, No 2, 2002, 386-392
5. **Bosshardt DD, Shroeder HE.**, Initial formation of cellular extrinsic fiber cementum in developing human teeth. *Cell Tissue Res* 1991: 267:321-335.
6. **Mac Neil RL and Somerman MJ.** Factors regulating development and regeneration of cementum. *J Periodont. Res.* 1993
7. **Bronkers ALJJ, Farach-Carson MC, Van Waveren E, Butler WT.** Immunolocalization of osteopontin, osteocalcin, and dentin sialoprotein during dental root formation and early cementogenesis in rat, *J. Bone Miner Res*: 9:1994
8. **Mckee MD., Zalzal S., Nancy A.**, Extracellular matrix in root cementum and mantle dentist, *Anat. Rec.*, 1996
9. **Somerman MJ., Archer SY., Shteyer A., Foster RA.**, Protein production by human gingival fibroblast is enhanced by guanidine extracts from cementum, *J Periodont Res* 22: 75-77 1987.
10. **Pitaru S., McCullog CAG., Naranayan AS.**, Cellular origins and differentiation control mechanism during periodontal development and wound healing. *J Periodont Res* 29:81-94:1994.
11. **Schroeder HE.**, Biological problems of regenerative cementogenesis: Synthesis and attachment of collagenous matrices on growing and established root surfaces. In: Jean, Friedman eds. *Int rev of Cytology*, vol 142.
12. **Arsate H., Alvarez-Perez MA., Aguilar Mendoza ME., Alvarez-Fregoso O.** Human cementum tumor cells have different features from human osteoblastic cells in vitro, *J Periodont Res.* 33:249-258: 1998.
13. **J. Tsujide, S. Nakanuma and Y. Iyushima** *J. Electrochem. Soc.* 117(1970)703.
14. **Bozzola John J., Russell Lonnie D.**, Electron Microscopy, Principles and Techniques for Biologists, Jones and Bartlett Publishers Sudbury, 1997.
15. **Earl J Kirkland**, Advanced Computing in Electron Microscopy, Plenum Press-New York, Chapter 2, 1986
16. **D.K. Bowen and C.R. Hall** *Microscopy of Materials* John Wiley & Sons, Inc., 1975
17. **M. Ohring**, The Materials Science of Thin Films Academic Press, Inc. New York, 1992
18. **How to buy a scanning probe microscope**, key features to look for when purchasing an SPM Park Scientific Instruments.
19. **D.B. Cullity**, Elements of X-ray diffraction second edition Addison-Wesley Publishing Company, Inc. 1978.

20. **N. Silikas, A. R. Lennie , K. England and D. C. Watts**, AFM as a tool in Dental Research, The Americas Microscopy and Analysis, March 2001, 19-21.
21. **A. H. Melcher, W. H. Bowen**, Biology of the Periodontium, Academic Press Inc. London (LTD) 1969, 220-226.
22. **Fujita T., Tokunaga J., and Inove H.**, Atlas de Microscopia electrónica en Medicina, Ed. Espaxs-Barcelona, 1972.
23. **H. E. Schroeder**, The Periodontium, Springer-Verlag, Berlin Heidelberg 1986
24. **Reyes Reyes Marisol**, Estudio cristalográfico del esmalte dental humano por microscopia electrónica, difracción electrónica y de haz convergente, Tesis de maestría, México Junio 2000
25. **J. W. Edington**, Electron Diffraction in the Electron Microscope, Tomo 2