

UNIVERSIDADE DE LISBOA
FACULDADE DE CIÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE FÍSICA



**ESTUDO DA DISTRIBUIÇÃO DE ELEMENTOS
VESTIGIAIS EM TECIDOS HUMANOS SAUDÁVEIS E COM
CARCINOMA POR ESPECTROMETRIA DE RAIOS – X**

Tânia Marisa Rego Magalhães de Almeida

DOUTORAMENTO EM BIOFÍSICA

2007

UNIVERSIDADE DE LISBOA
FACULDADE DE CIÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE FÍSICA



**ESTUDO DA DISTRIBUIÇÃO DE ELEMENTOS
VESTIGIAIS EM TECIDOS HUMANOS SAUDÁVEIS E COM
CARCINOMA POR ESPECTROMETRIA DE RAIOS – X**

Tânia Marisa Rego Magalhães de Almeida

DOUTORAMENTO EM BIOFÍSICA

Sob orientação de:

Professora Doutora Maria Luísa Dias de Carvalho de Sousa Leonardo

Departamento de Física

Faculdade de Ciências – Universidade de Lisboa

AGRADECIMENTOS

A todos aqueles que, directa ou indirectamente, contribuíram para a realização deste trabalho. Em particular:

À Prof. Doutora Maria Luísa de Carvalho por tudo o que me ensinou de espectrometria de raios-X, pelo apoio, incentivo, orientação e pelos conselhos amigos e encorajadores que sempre me deu nas alturas mais difíceis que tornaram possível esta investigação.

Ao Prof. Doutor Alex von Bohlen por ter aceite entrar neste projecto. Agradeço, igualmente, alguns ensinamentos fundamentais a esta investigação.

Ao Centro de Física Atómica da Universidade de Lisboa, pela utilização dos laboratórios e materiais necessários.

Ao Instituto de Espectroquímica e Espectroscopia Aplicada, em Dortmund, nomeadamente, à Técnica Maria Becker pela sua disponibilidade e auxílio no laboratório.

Ao Instituto Português de Oncologia em Lisboa, em especial ao Prof. Doutor Jorge Soares e a todos os que colaboraram na recolha das amostras analisadas, nomeadamente a técnica D. Elisete.

Ao Hospital Civil de Dortmund e a todos os que colaboraram na recolha das amostras analisadas.

À Doutora Maria Exaltina Sobral pela ajuda na área da oncologia humana.

Ao Instituto de Biofísica, da Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa, em especial ao Professor Doutor Ducla Soares por me ter incentivado a ingressar no Programa Doutoral de Biofísica e Física Médica.

Aos amigos do Centro de Física Atómica: Alexandra, Ana Cavaco, Ana Guilherme, Diana, Marta, Pedro e Sofia.

Não sei como agradecer à minha grande amiga Vanda Cerejeira que com a sua infinita paciência “tolerou” muitas das minhas incertezas e esclareceu grande parte das minhas dúvidas na área da Estatística.

Ao meu marido, por toda a compreensão e todo o carinho, apesar de ter sido privado de muita da minha disponibilidade

A todos muito obrigada!

RESUMO

O trabalho desenvolvido nesta tese integrou-se num projecto de colaboração bilateral com o Instituto de Espectroquímica e Espectroscopia Aplicada, na Alemanha, e visa o estudo da distribuição de elementos em tecidos humanos: saudáveis e com tumores malignos por técnicas de espectroscopia de raios-X: a fluorescência de raios-X na sua versão simples (EDXRF) e a fluorescência de raios-X por reflexão total (TXRF).

A fluorescência de raios-X é um método de análise elementar qualitativo e quantitativo que se aplica à identificação de praticamente todos os elementos ($Z > 13$). O princípio do método é muito simples. Utiliza-se uma fonte de radiação X para ionizar os níveis internos dos átomos constituintes da amostra. Na reorganização do átomo e regresso ao estado fundamental, estes átomos podem libertar o excesso de energia através da emissão de um fóton X, de energia igual à diferença de energia de ligação dos níveis entre os quais se deu a transição. Esta radiação é característica do elemento. A detecção e análise do espectro emitido permitem a identificação e quantificação simultânea dos elementos constituintes da amostra. A fluorescência de raios-X na sua versão mais simples é não destrutiva e não necessita de qualquer preparação prévia da amostra. Este equipamento existe no Centro de Física Atómica da Universidade de Lisboa.

A aplicação da técnica de fluorescência de raios-X por reflexão total consiste num estudo micro-analítico, na medida em que cada amostra de tecido é cortada em microtomos. Esta técnica requer uma quantidade muito pequena de amostra e tem uma sensibilidade muito superior à primeira técnica, ou seja permite-nos determinar quantidades ínfimas de um dado elemento, da ordem do nanograma por grama de amostra analisada. Este equipamento existe no laboratório Alemão, em Dortmund que esteve envolvido no projecto.

Com os resultados obtidos estabeleceram-se padrões de comportamento na distribuição de concentrações para cada elemento, nos tecidos saudáveis e cancerígenos.

Foram analisados vários tipos de tecidos cancerígenos e saudáveis do mesmo indivíduo e de diferentes indivíduos: mama, intestino, estômago e útero, por serem tumores de grande incidência.

Com esta análise conseguiu-se através de métodos estatísticos:

- Comparar os resultados obtidos pelas técnicas EDXRF e TXRF.
 - Analisar as concentrações de cada elemento químico, para o mesmo tipo de tecido em todas as amostras, comparando as diferentes sub-amostras (saudáveis e com tumor maligno).
-

- Analisar a razão das concentrações de cada elemento químico, para as diferentes sub-amostras (saudáveis e com tumor maligno), num mesmo tipo de tecido.
- Segmentar os indivíduos (amostras) para cada tipo de tecido segundo características comuns tendo em conta as razões das concentrações de cada elemento em tecidos com tumor maligno / saudáveis;
- Segmentar as razões das concentrações de cada elemento químico, para as diferentes sub-amostras (saudáveis e com tumor), num mesmo tipo de tecido.
- Classificar de uma forma supervisionada as concentrações de cada elemento nos tecidos saudáveis e cancerígenos, isto é, obter um protótipo de classificação de dados.

Como objectivo final pretendeu dar-se uma contribuição para a prevenção do desenvolvimento do cancro, isto é, a partir de um melhor conhecimento sobre as concentrações dos elementos em tecidos com tumor maligno e saudáveis ser possível uma actuação precoce a nível do desenvolvimento do cancro.

Palavras chave:

Espectrometria de raios-X; Determinação quantitativa de elementos vestigiais no organismo; Tecidos humanos cancerígenos; Biofísica dos elementos tóxicos no organismo; Biofísica dos elementos essenciais no organismo.

ABSTRACT

The work developed in this thesis joined a project of bilateral collaboration with the Institute of Spectro-chemistry and Applied Spectroscopy in Germany, and aimed at the study of the distribution of elements in healthy and cancerous human tissues by X-ray spectroscopy techniques: simple X-ray spectroscopy (EDXRF) and total reflection fluorescence of X-ray (TXRF).

The X-ray fluorescence is a qualitative and quantitative method of elementary analysis which applies to the identification of practically all the elements ($Z > 13$). The principle of the method is quite simple. A source of X radiation is used to ionize the internal levels of the constituent atoms of the sample. In the reorganization of the atoms and return to the basic state, these atoms can free the excess of energy through the emission of one photon X, of equal energy to the difference of connection energy between the levels where the transition happened. This radiation is characteristic of the element. The detection and analysis of the spectrum allow the simultaneous identification and quantification of the constituent elements of the sample. The X-ray fluorescence in his most simple version is not destructive and does not need any prior preparation of the sample. This equipment exists in the Centre of Atomic Physics of the University of Lisbon.

The application of the total reflection X-ray fluorescence technique consists of a micro-analytical study, as each sample of tissue is cut in microtomes. This technique requires a very small quantity of sample and has much superior sensibility over the first technique, hence allowing the determination of very small quantities of a given element, in the order ng g^{-1} of analysed sample. This equipment exists in the German laboratory, in Dortmund which was involved in the project.

With the obtained results, behaviour standards were established in the distribution of concentrations for each element, in the healthy and carcinogenic tissues.

Several types of carcinogenic and healthy tissues of the same individual and of different individuals were analysed: breast, intestine, stomach and womb, where chosen because of their enormous incidence of tumours.

With this analysis several things were achieved through statistical methods:

- Compare the results obtained by EDXRF and TXRF techniques.
 - Analyse the concentrations of each chemical element, for the same type of tissue in all the samples, comparing the different sub-samples (healthy and with malignant tumour).
-

- Analyse the ratio of the concentrations of each chemical element, for the different sub-samples (healthy and with malignant tumour), in the same type of tissue.
- Group the individuals for each type of tissue (samples) according to common characteristics taking into account the ratios of the concentrations of each element in malignant tumour / healthy tissues;
- Group the ratios of the concentrations of each chemical element, for the different sub-samples (healthy and with tumour), in the same type of tissue.
- Classify in a supervised form, the concentrations of each element in healthy and carcinogenic tissues, in order to obtain a model of classification.

As a final objective, it was intended to give a contribution in cancer development prevention, as from better knowledge of the concentrations of elements in malignant tumour and healthy tissues it may be possible to improve the number and times of malignant cancer detection.

Keywords:

X-ray Spectrometry; Quantitative determination of vestigial elements in the organism; Carcinogenic human tissues; Biophysics of toxic elements in the organism; Biophysics of essential elements in the organism.

ÍNDICE

AGRADECIMENTOS	i
RESUMO	iii
ABSTRACT	v
ÍNDICE	vii

CAPÍTULO I – ELEMENTOS NO ORGANISMO 1

1 Importância de alguns elementos no funcionamento e constituição do organismo	2
1.1 – Elementos essenciais e tóxicos	2
1.2 – Causas da essencialidade	4
1.3 – Elementos Estudados	4
1.3.1 – Fósforo (P)	4
1.3.2 – Enxofre (S)	5
1.3.3 – Potássio (K)	5
1.3.4 – Cálcio (Ca)	6
1.3.5 – Ferro (Fe)	6
1.3.6 – Níquel (Ni)	7
1.3.7 – Cobre (Cu)	8
1.3.8 – Zinco (Zn)	8
1.3.9 – Bromo (Br)	9
1.3.10 – Estrôncio (Sr)	11
1.4 – Elementos tóxicos	11
1.4.1 – Arsénio (As)	11
1.4.2 – Cádmio (Cd)	12
1.4.3 – Mercúrio (Hg)	13
1.4.4 – Chumbo (Pb)	13

CAPÍTULO II – CÉLULAS E TECIDOS 17

2 – Tecidos analisados	18
2.1 – Célula: unidade fundamental da vida	18
2.2 – Células e Tecidos	18
2.3 – Célula	18
2.3.1 – A estrutura da célula	19

2.3.2 – Divisão da célula	21
2.3.3 – Células cancerosas	22
2.3.3.1 – Causas de células danificadas	22
2.3.3.2 – Radicais livres induzem danos nas células	22
2.3.3.3 – Oncogenes e anti-oncogenes	25
2.4 – Tecidos e órgãos	31
2.4.1 – Tumor maligno no tecido da mama	33
2.4.2 – Tumor maligno no tecido do intestino Grosso	34
2.4.3 – Tumor maligno no tecido do estômago	35
2.4.4 – Tumor maligno no tecido do útero	37
2.4.5 – Tumor maligno no tecido do rim	37
2.4.6 – Tumor maligno no tecido do pulmão	38
2.4.7 – Tumor maligno no tecido da tiróide	39
CAPÍTULO III – TÉCNICAS EXPERIMENTAIS	42
3.1 – Fluorescência de raios-X	43
3.1.1 – Produção de raios-X	43
3.1.2 – Processos de intervenção da radiação electromagnética com a matéria	
3.1.2.1 – Efeito fotoeléctrico	48
3.1.2.2 – Difusão de Rayleigh	50
3.1.2.3 – Difusão de Compton	51
3.1.3 – Absorção de radiação X	53
3.2 – Espectroscopia de raios-X de energia dispersiva (EDXRF)	54
3.2.1 – Sistemas de excitação	55
3.2.2 – Sistemas de detecção da radiação característica	55
3.2.2.1 – Detector de Si (Li)	56
3.2.2.2 – Energia de resolução	58
3.2.2.3 – Eficiência de detecção	59
3.2.2.4 – Calibração do detector	60
3.2.2.5 – Limites de detecção	62
3.2.3 – Análise de espectros	63
3.2.3.1 – Espectros	64
3.2.3.2 – Pré-Amplificador, Amplificador e Analisador Multicanal	65

3.2.4 – Análise quantitativa	66
3.2.4.1 – Determinação das concentrações	67
3.3 – Espectroscopia de raios-X de reflexão total (TXRF)	69
3.3.1 – Introdução	69
3.3.2 – Deflexão dos raios-X	71
3.3.2.1 – Reflexão e refração	71
3.3.2.2 – Reflexão total externa	76
3.3.2.2.1 – Reflectividade	79
3.3.2.2.2 – Profundidade de penetração	82
3.3.3 – Características e requisitos da técnica de TXRF	85
3.3.3.1 – Análise química	85
3.3.3.2 – Transferência de energia	87
3.3.3.3 – Limites de detecção	87
3.3.3.4 – Instalação experimental	91
3.3.3.5 – Suporte das amostras	96
3.3.3.6 – Análise espectral	99
3.3.3.7 – Quantificação	100
3.3.3.8 – Método do padrão interno	100
3.4 – Procedimento Experimental	102
3.4.1 – Recolha das amostras	103
3.4.2 – Análise por EDXRF	103
3.4.2.1 – Preparação e análise das amostras por EDXRF	103
3.4.3 – Análise por TXRF	105
3.4.3.1 - Preparação e análise das amostras por TXRF	105
<u>CAPÍTULO IV – APRESENTAÇÃO E TRATAMENTO DE RESULTADOS</u>	109
4 – Apresentação e tratamento de resultados	109
4.1 – Estatística Descritiva	119
4.1.1 – Classificação dos resultados	119
4.1.2 – Comparação das técnicas	119
4.1.3 – Amostras de tecido da mama	123
4.1.3.1 – Análise das concentrações de cada elemento químico comparando as diferentes sub-amostras	123

4.1.3.2 – Análise da razão das concentrações de cada elemento químico, para as diferentes sub-amostras	136
4.1.4 – Amostras de tecido do intestino	141
4.1.4.1 – Análise das concentrações de cada elemento químico comparando as diferentes sub-amostras	141
4.1.4.2 – Análise da razão das concentrações de cada elemento químico, para as diferentes sub-amostras	154
4.1.5 – Amostras de tecido do estômago	158
4.1.5.1 – Análise das concentrações de cada elemento químico comparando as diferentes sub-amostras	158
4.1.5.2 – Análise da razão das concentrações de cada elemento químico, para as diferentes sub-amostras	171
4.1.6 – Amostras de tecido do útero	175
4.1.6.1 – Análise descritiva dos resultados	176
4.2 – Classificação Automática	177
4.2.1 – Análise de Agrupamento Hierárquica	177
4.2.1.1 - Amostras de tecido da mama	179
4.2.1.1.1 – Segmentar as amostras segundo características comuns tendo em conta as razões das concentrações de cada elemento em tecidos com tumor / saudáveis	179
4.2.1.1.2 – Segmentar as razões das concentrações de cada elemento químico, para as diferentes sub-amostras	180
4.2.1.2 – Amostras de tecido do intestino	180
4.2.1.2.1 – Segmentar as amostras segundo características comuns tendo em conta as razões das concentrações de cada elemento em tecidos com tumor / saudáveis	180
4.2.1.2.2 – Segmentar as razões das concentrações de cada elemento químico, para as diferentes sub-amostras	181
4.2.1.3 – Amostras de tecido do estômago	182
4.2.1.3.1 – Segmentar as amostras segundo características comuns tendo em conta as razões das concentrações de cada elemento em tecidos com tumor / saudáveis	182
4.2.1.3.2 – Segmentar as razões das concentrações de cada elemento químico, para as diferentes sub-amostras	183

4.2.2 – Análise de Agrupamento não Hierárquica	184
4.2.2.1 – Amostras de tecido da mama	186
4.2.2.2 – Amostras de tecido do intestino	189
4.2.2.3 – Amostras de tecido do estômago	191
CAPÍTULO V – CONCLUSÃO	193
5.1 – Conclusões	194
5.1.1 - Técnicas utilizadas	194
5.1.2 – Tecido da mama	194
5.1.3 – Tecido do intestino	196
5.1.4 – Tecido do estômago	197
5.1.5 – Tecido do útero	198
5.2 – Investigação Futura	198
BIBLIOGRAFIA	201
ANEXOS	212
Resultados Experimentais	213
Funções das classificações	219
Artigos	224

CAPITULO I

ELEMENTOS NO ORGANISMO

1 A importância de alguns elementos no funcionamento e constituição do organismo

Os efeitos adversos ou tóxicos num sistema biológico não são produzidos por um agente químico, a menos que esse agente ou os seus produtos de degradação metabólica (biotransformação) alcancem os locais apropriados do organismo numa concentração e por um tempo suficientes para produzirem manifestações tóxicas. Para caracterizar plenamente o perigo potencial de um agente químico específico precisamos de saber não só qual o tipo de efeito que ele produz e a dose necessária para induzir esse efeito, mas também informação quanto ao agente, à exposição e à predisposição do indivíduo.

Os metais diferem das outras substâncias tóxicas quanto ao facto de não serem nem criados nem destruídos pelo Homem. Não obstante, a sua utilização pelo homem influencia o seu potencial para os efeitos na saúde em, pelo menos, duas vertentes principais: primeiro, o transporte pelo meio ambiente e, segundo, através da alteração da especificação ou da forma bioquímica do elemento [1].

1.1 Elementos Essenciais e Elementos Tóxicos

Um elemento químico diz-se essencial se, quando fornecido em doses inferiores a um determinado valor, a sua carência afectar o desenvolvimento ou funções metabólicas normais de um determinado organismo, isto é, para que se considere um elemento químico essencial este deve cumprir quatro condições:

- A ingestão insuficiente do elemento provoque deficiências funcionais, reversíveis se o elemento voltar a ficar nas concentrações adequadas;
- Sem o elemento, o organismo não cresce e nem completa o seu ciclo vital;
- O elemento influi directamente no organismo e está envolvido nos seus processos metabólicos;
- O mesmo efeito no organismo não pode ser conseguido por nenhum outro elemento.

Em oposição, um elemento identifica-se como tóxico, quando fornecido a um organismo em doses superiores a um dado valor, impedindo ou prejudicando o desenvolvimento e as funções metabólicas desse organismo. Deste modo pode-se afirmar que todos os elementos químicos são tóxicos, quando em concentrações superiores às necessárias pelo organismo,

incluindo os elementos ditos vitais. Por outro lado, alguns são tóxicos mesmo em concentrações reduzidas, e outros quando ligados a certos elementos, são tóxicos para algumas espécies e inócuos para outras [2].

Podem distinguir-se dois grupos de elementos: os essenciais ao metabolismo celular e que se encontram na maior parte dos tecidos e fluidos, tal como o P, S, Cl, K, Ca, Cr, Mn, Fe, Ni, Cu, Zn, Se, Br, Rb e Sr; e os elementos não essenciais, dos quais alguns têm carácter cumulativo, tal como Co, As, Cd, Hg, Pb e U. São considerados metais não essenciais, visto não se conhecer nenhuma função metabólica, sendo tóxicos mesmo em concentrações baixas [3-5]. Diferem de qualquer outro composto xenobiótico por não poderem ser sintetizados nem destruídos pelo Homem. Este apenas contribui para o aumento da contaminação [6]. Embora essas substâncias existam também naturalmente na biosfera, elas chegam ao ambiente em maiores quantidades como resultado da poluição provocada pelo Homem. Algumas dessas substâncias desaparecem rapidamente por degradação química determinada pelas condições climáticas ou por degradação biológica de organismos vivos [7]. Contudo, algumas podem resistir e persistir no ambiente por um período de tempo considerável, causando problemas graves se forem muito tóxicas. Destes elementos destacar-se-ão apenas alguns pelo facto de terem efeitos tóxicos mais pronunciados ou por as suas propriedades serem menos conhecidas.

As razões principais determinantes da toxicidade dos elementos derivam do facto de que muitos destes podem [3]:

- substituir os metais nos centros activos das enzimas;
 - ligar-se a outros radicais das enzimas e demais moléculas biológicas, alterando a sua conformação e reactividade;
 - substituir determinados grupos ou moléculas biológicas;
 - complexar ou formar precipitados com metais das enzimas ou outros grupos envolvidos no metabolismo;
 - catalisar a decomposição de metabolismos essenciais;
 - combinar-se com membranas, alterando a sua permeabilidade;
 - substituir elementos com funções electroquímicas.
-

1.2 Causas da essencialidade

Existem elementos que estão presentes num organismo, porém não são essenciais. A comprovação e verificação da deficiência de um elemento num organismo são um estudo muito complicado devido às pequenas concentrações que actuam. É possível que o elemento se incorpore ao organismo de maneira inadvertida, e o organismo utilize as reservas que possui. São situações de difícil observação, durante algum tempo.

Normalmente a essencialidade demonstra-se quando se descobre uma função biológica para algum composto do elemento. Acredita-se que estes elementos químicos têm-se convertido em essenciais devido à sua abundância e acessibilidade. Assim, existe uma boa relação entre a essencialidade de um elemento e a sua abundância na crosta terrestre e na água do mar.

Há casos em que o elemento é abundante mas não é essencial. Isto explica-se pela dificuldade que o organismo apresenta em disponibilizá-lo. Por exemplo, o alumínio é um elemento muito abundante na crosta terrestre e não é essencial, seguramente porque forma compostos insolúveis em água e os organismos não podem captá-los facilmente.

As condições têm mudado desde o início da vida e os organismos têm podido adaptar-se às mudanças ocorridas. Por exemplo, o ferro agora é pouco acessível, pois é encontrado principalmente como Fe^{3+} que forma compostos poucos solúveis, sendo necessário os organismos formarem complexos solúveis para captá-lo. Quando a atmosfera era menos oxidante era encontrado principalmente na forma de Fe^{2+} , que forma compostos mais solúveis.

1.3 Elementos estudados

1.3.1 Fósforo

Os compostos de fósforo intervêm em funções vitais para os seres vivos, sendo considerado um elemento químico essencial. O fósforo tem um papel relevante na formação molecular do DNA e do RNA, bem como do ATP, adenosina tri-fosfato. As células utilizam-no para armazenar e transportar a energia na forma de fosfato de adenosina. Além disso, funciona como iões tampões, impedindo a acidificação ou alcalinização do protoplasma [8].

Encontra-se em maior parte nas rochas e dissolve-se com a água da chuva, sendo levado até aos rios e mares. Boa parte do fósforo de que precisamos é ingerida quando nos alimentamos de peixe. Os nossos ossos armazenam cerca de 750 g de fósforo sob a forma de fosfato de cálcio. A falta de fósforo provoca o raquitismo nas crianças e nos adultos tornando seus ossos quebradiços [8].

Com a morte das plantas e animais este fósforo retorna ao solo e é absorvido por novas plantas. Nas rochas fosfáticas é retirado o fosfato, usado em fertilizantes e na fabricação de detergentes. O uso doméstico destes detergentes é a maior causa da poluição dos rios pelo fósforo. Mesmo a água tratada de esgotos, que volta aos rios, pode ainda conter fosfatos [8].

1.3.2 Enxofre

Os aminoácidos cisteína, metionina homocisteína e taurina contêm enxofre, formando as pontes de dissulfeto entre os polipeptídeos, ligação de grande importância para a formação das estruturas espaciais das proteínas. É constituinte de algumas vitaminas, neutraliza os tóxicos e ajuda o fígado na secreção da biliar. É encontrado em legumes como espargos, alhos, cebolas, também em pescados, queijos e gema de ovos; diferentemente do inorgânico, o enxofre dos alimentos não é tóxico e seu excesso é eliminado pela urina. A sua deficiência retarda o crescimento [9]. As plantas absorvem o enxofre do solo como iões sulfato, e algumas bactérias utilizam o sulfeto de hidrogénio da água como doadores de electrões num processo similar a uma fotossíntese primitiva [9].

1.3.3 Potássio

O potássio existe no interior das células regulando a sua pressão osmótica [3,4,10,11]. A sua função no organismo é muito variada: transporte activo, bombas iónicas; activação de enzimas glicolíticas e respiratórias.

A deficiência em potássio está associada a um grande número de sintomas e pode ser resultado de subnutrição ou ingestão de alimentos deficientes em potássio [11].

A absorção de potássio nos alimentos e fluidos é cerca de 3,3 g/dia. A sua excreção é essencialmente pela urina.

1.3.4 Cálcio

A quantidade total de cálcio no corpo é de 1,5 kg, sendo este um dos minerais mais abundantes e mais importantes [11]. Encontra-se em grandes quantidades no esqueleto (99%) e em alguns tecidos [10]. A sua grande importância como elemento essencial advém da responsabilidade na construção e manutenção dos ossos, na coagulação do sangue e contracção dos músculos.

Estudos alimentares verificaram que o cálcio é ingerido à razão de 1,1 g/dia, num adulto [11]. O cálcio é absorvido em 30% dos alimentos, pelo tracto gastrointestinal, e existem muitos factores que aumentam a capacidade de absorção: vitamina D, fosfatos, pH, lactose e algumas proteínas. Por outro lado verifica-se um aumento da concentração de cálcio na urina quando aumenta a sua concentração na dieta alimentar. A excreção de cálcio é também influenciada pelas quantidades de sódio na dieta. Sendo independente da idade, sexo ou peso dos indivíduos. A maior quantidade excretada é pelas fezes e uma parte é perdida na transpiração.

1.3.5 Ferro

O ferro encontra-se presente em todas as células de um organismo vivo e desempenha um papel vital em muitas reacções bioquímicas. A maior parte deste faz parte da constituição da hemoglobina e da mioglobina, existindo também em algumas enzimas. Este tem assim um papel importante no transporte, armazenamento e utilização do oxigénio [10].

O ferro é um elemento muito estudado a nível da absorção alimentar, pois é muito importante na nossa nutrição. É absorvido por via alimentar 14 mg/dia e por via respiratória 0,03 mg/dia em média.

A necessidade de ferro no organismo é cerca de 1-2,8 mg/dia, pelo que a dieta diária deve conter uma média de 5-28 mg para ir de encontro a essa necessidade [11].

A absorção do ferro é muito complexa e está relacionada com diversos factores: quantidade ingerida; necessidade do organismo; forma química; substâncias competitivas. Por outro lado, o organismo tem a capacidade de reciclar o ferro, reutilizando-o onde é necessário. A excreção é essencialmente fecal.

As consequências patológicas do excesso de ferro são similares independentemente das causas que a provocam. As maiores concentrações encontram-se nas células do parênquima do fígado e do pâncreas, tal como nos órgãos endócrinos e no coração. Os efeitos clínicos

podem incluir perturbações na função do fígado, diabetes mellitus e perturbações endócrinas e efeitos cardiovasculares.

Em sistemas biológicos o ferro mostra uma preferência por ligações com o oxigénio e o azoto e é utilizado pelas suas propriedades redox em várias metalo-enzimas e proteínas de respiração. O ferro acumula-se na mucosa intestinal na forma de ferritina, e a sua saturação desempenha um papel importante na regulação da absorção de mais ferro. A ferritina pode encerrar no seu núcleo cerca de 4500 átomos de ferro, como miscelas férricas de hidróxidos e fosfatos.

No plasma, o transporte de ferro faz-se pela “transferina”, uma proteína capaz de se ligar a dois iões Fe^{3+} , e que se liga à superfície das células receptoras, transferindo-o por endocitose [12].

1.3.6 Níquel

O níquel funciona como activador de várias enzimas, estando também associado à actividade da insulina. A deficiência em níquel pode causar alterações na mitocôndria do fígado [11].

A maioria das lesões no homem, provocadas pelo níquel, deve-se à exposição por inalação, sendo responsável pelo cancro na cavidade nasal e nos pulmões e por várias reacções alérgicas. O níquel é tóxico para o sistema imunitário, tornando deficiente a função de macrofase e diminuindo a fagocitose e a capacidade de neutralizar bactérias pelos macrófagos pulmonares.

Dentro das doses aconselhadas, o níquel é um elemento oxi-redutor fundamental contra a obesidade, diabetes e neoplasias. [13].

A dose diária de níquel recomendada é estimada em 35-500 $\mu\text{g}/\text{dia}$, sendo que numa alimentação normal se obtém 150-700 μg .

O níquel metálico combina-se com o monóxido de carbono para formar carboneto de níquel. Este composto é extremamente tóxico. Os sintomas começam com dores de cabeça, náuseas, vómitos e dores no peito, seguidas de tosse, hiperpneia, cianose, sintomas gastrointestinais e fraqueza. Estes sintomas podem ser acompanhados por febre e leucocitose e os casos mais graves progridem para pneumonias, falhas respiratórias, edema cerebral e morte [14].

1.3.7 Cobre

O cobre é provavelmente um constituinte funcional de todas as células, com grande correlação com a actividade celular. Pelo menos 30 proteínas e enzimas contêm cobre, o que lhes confere grande habilidade na utilização directa do oxigénio.

É conhecido que os níveis de cobre no plasma aumentam em várias infecções, o que é acompanhado de um aumento da taxa de sedimentação. O cobre no sangue está distribuído de forma similar no plasma e nas células.

Este é um metal essencial a várias metaloenzimas para manter a sua estrutura e catalizar as reacções redox envolvendo oxigénio como aceitador de electrões. O Cu (II) liga-se fortemente às proteínas, e é um catalizador na peroxidação dos lípidos. O seu excesso é extremamente tóxico, e uma concentração significativa de Cu só é detectada após a ingestão de elevados níveis de cobre.

O cobre é um constituinte do fígado humano, sendo aí armazenado, e excretado em pequenas quantidades por via biliar. As principais causas da sua acumulação podem ser [15]:

- doenças congénitas, incluindo a doença de Wilson, na qual há uma falha na excreção de cobre na biliar;
- exposição pelo ambiente, responsável pela cirrose indiana em crianças;
- obstrução do fluxo da biliar, que ocorre em síndromas de colesterol e cirrose biliar;
- em casos mais graves, taquicardia e hipertensão, podendo ocorrer coma seguido de morte [16].

Mas nas doses diárias aconselhadas pela FAO/OMS (Organização Mundial de Saúde), ou seja inferiores a 0,5 mg/kg, o cobre exerce uma acção anti-inflamatória, anti-infecciosa, anti-anémica e, ainda, potencializadora dos antibióticos.

1.3.8 Zinco

O zinco entra na constituição de várias enzimas e é activador de outras que actuam no crescimento, reprodução e no funcionamento normal do sistema imunológico e de outros processos fisiológicos, sendo por isso recomendada a sua ingestão regular nos períodos de crescimento [10].

A actividade catalítica do zinco, sendo uma componente essencial a mais de 150 enzimas, é dependente da sua propriedade de formar ácidos de Lewis. A sua quantidade no organismo

pode ser alterada por um grande número de factores da dieta alimentar. A absorção é trans-epitelial e é provavelmente um processo único. Primeiro associa-se à albumina, durante o seu transporte, através dos sistemas vasculares do intestino. Quando existe um excesso de zinco na mucosa intestinal e no fígado, o excesso irá acumular-se nos rins. A sua excreção é principalmente fecal.

Em teores considerados essenciais, o zinco tem um papel importante na regulação da hipófise e é indicado no tratamento de perturbações hepáticas, pancreáticas e nervosas [13]. O carácter terapêutico do zinco encontra-se relatado desde o início do século XIX, ao utilizarem-se pomadas contendo óxidos de zinco em tratamentos de pele [17].

A dose diária recomendada é de 6-22 mg de zinco, obtidas numa dieta normal.

Muitos processos neuroquímicos estão dependentes do zinco e podem ser influenciados pela a sua deficiência. Estes podem ser divididos em três categorias [15]:

- enzimas dependentes de Zn (estas estão envolvidas no metabolismo neurotransmissor);

- processos sinápticos dependentes de zinco;

- canais iónicos (os impulsos induzidos através das fibras nervosas são dependentes da corrente de iões através da membrana axonal, envolvendo a bomba de Na^+ , K^+ e Ca^{2+}). No cérebro a enzima (Na^+ , K^+) ATPase é inibida por quantidades micromolares de zinco, tal como a permeabilidade da membrana axonal. Alterações de diminuição da quantidade de zinco no cérebro podem ser devidas a uma redistribuição do zinco a nível celular, pois o cérebro é um órgão muito heterogéneo.

O veneno de zinco mais vulgar tem a forma de vapor de óxido de zinco, e é absorvido por inalação. A ingestão de alimentos, preparados em contentores galvanizados com zinco [3,11], provocam várias enfermidades, e o contacto com a pele provoca o aparecimento de dermatoses.

1.3.9 Bromo

O bromo é um dos elementos da tabela periódica que se encontra em estado líquido à temperatura ambiente. O líquido é avermelhado, instável, denso e volátil. Evapora facilmente a temperaturas e pressões padrões formando um vapor avermelhado (coloração parecida com a do dióxido de azoto) que apresenta um forte e desagradável odor. Este halogéneo parece-se quimicamente ao cloro, porém é menos reactivo (entretanto mais que o iodo). O bromo não é muito solúvel em água e dissolve-se melhor em solventes não polares

como o dissulfureto de carbono, CS₂, ou o tetracloreto de carbono, CCl₄. Reage facilmente com muitos elementos e tem um forte efeito branqueador.

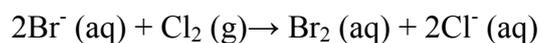
O bromo é altamente reactivo e é um forte agente oxidante em presença de água. Reage vigorosamente com aminas, alcenos e fenóis, assim como com hidrocarbonetos aromáticos e hidrocarbonetos alifáticos, cetonas e ácidos carboxílicos (estes são bromados por adição ou por substituição). Com muito dos metais e outros elementos, o bromo anidro é menos reactivo que o húmido, entretanto, o bromo seco reage vigorosamente com o alumínio, mercúrio, titânio, metais alcalinos e metais alcalino terrosos [18].

O bromo molecular é empregado na fabricação de uma ampla variedade de compostos de bromo, usados na indústria e na agricultura. Tradicionalmente, a maior aplicação do bromo tem sido para a produção de 1,2-dibromoetano, que é usado como aditivo nas gasolinas que têm como antidetonante o tetraetil de chumbo.

O bromo é empregado na fabricação de produtos de pulverização, agentes não inflamáveis, produtos para a purificação de águas, corantes, brometos empregados em fotografia (brometo de prata, AgBr), desinfectantes, insecticidas e outros.

A maior parte do bromo é encontrada no mar na forma de brometo, Br⁻, numa concentração de aproximadamente 65 µg/g [19].

O bromo molecular, Br₂ obtém-se a partir das salmouras, mediante a oxidação do brometo com cloro:



Após obtido é necessário utilizar a destilação para separá-lo do Cl₂. O bromo é encontrado em níveis de traço em humanos. É considerado um elemento químico essencial, entretanto ainda não se conhece exactamente as funções que realiza. Alguns de seus compostos têm-se empregado no tratamento contra a epilepsia e como sedativos. O bromo é altamente tóxico e em pequenas quantidades (10 ppm), tanto por via dérmica como inalado, pode causar problemas imediatos de saúde ou morte. É muito irritante tanto para os olhos como para a garganta; em contacto com a pele ocasiona inflamações dolorosas. O seu manuseamento impróprio pode supor um sério risco à saúde, requer por isso máxima precaução de segurança quando do seu manuseamento [18].

1.3.10 Estrôncio

O estrôncio tem afinidade electroquímica com o cálcio podendo, dentro de certos limites substituí-lo nas ligações químicas [7]. No entanto, se esta for muito apreciável, irão ocorrer alterações nas funções biológicas, dado que estas não são desempenhadas por aquele elemento.

Pensa-se que se ingira na dieta alimentar cerca de 1,9 mg/dia, sendo a sua principal excreção através das fezes mas também ocorre pela transpiração e no cabelo.

As propriedades químicas do cálcio e do estrôncio são um exemplo interessante da semelhança periódica ao longo do grupo. Assim, os iões Sr^{2+} podem substituir os iões Ca^{2+} no nosso organismo, como acontece frequentemente nos ossos (com os isótopos de Sr-89 e Sr-90 o perigo é grande, pois podem danificar a medula óssea e as células sanguíneas com a radiação liberta). Como o seu papel no metabolismo humano é semelhante ao do cálcio, não é considerado um elemento tóxico [15].

1.4 Elementos tóxicos

1.4.1 Arsénio

O arsénio está presente no ambiente em quantidades pequenas, quer nos alimentos, quer como contaminante do ar. Peixes e invertebrados parecem ser grandes fontes deste elemento, sendo bem absorvido pelo organismo, e excretado pela urina. Todos os tecidos humanos têm traços de arsénio, e após uma exposição anormal a este elemento a sua concentração nos tecidos aumenta, em especial na pele, cabelo e unhas (sendo as unhas usadas como indicador do grau e tempo de exposição).

O arsénio natural na atmosfera é, na sua maioria, óxido trivalente de arsénio, mas a sua disposição nas vias aéreas e absorção pelos pulmões está dependente do tamanho das partículas e da forma química. A excreção do arsénio absorvido é feita principalmente pela urina. A semi-vida biológica do arsénio inorgânico ingerido é de aproximadamente 10h, e 50 a 80% são excretados em cerca de 3 dias.

O arsénio tem um tropismo pela pele e é excretado pela descamação da pele e do suor, particularmente durante períodos de sudoração intensa. O arsénio nas unhas produz as linhas de Mee (bandas brancas transversais através das unhas), que aparecem seis semanas após o ataque dos sintomas de toxicidade. O arsénio no cabelo também pode reflectir uma

exposição passada, mas o arsénio intrínseco ou sistematicamente absorvido no cabelo tem de ser distinguido do que é depositado por fontes externas.

O arsénio afecta as enzimas mitocondriais e enfraquece a respiração dos tecidos, podendo a ingestão de grandes doses de arsénio ser fatal (70-180 mg). Os sintomas de doença aguda, que possivelmente conduzirão à morte, consistem em febre, anorexia, hepatomegalia, melanose e arritmia cardíaca. O efeito neurológico mais comum é a perda sensorial no sistema nervoso periférico, aparecendo uma a duas semanas após grandes exposições e que consiste numa degenerescência valeriana dos axónios, uma consequência reversível em caso de suspensão da exposição [14].

A exposição crónica pode levar à toxicidade tanto do sistema nervoso periférico como no central. As lesões no fígado, características de exposições crónicas, manifestam-se inicialmente sob a forma de icterícia e podem progredir para cirroses e ascites. O arsénio é também um carcinogénio.

1.4.2 Cádmi

O Homem está exposto ao cádmio pelo consumo de alimentos contaminados, por inalação directa e através do tabaco [20]. As principais fontes de contaminação dos alimentos por cádmio são a água residual das indústrias e os fertilizantes [11].

O iões cádmio são instantaneamente absorvidos pelas plantas e distribuídos uniformemente pelos seus tecidos [11]. Nos alimentos de origem animal, o cádmio é encontrado em maiores quantidades nos órgãos internos como o fígado e rim [6]. O cádmio é um contaminante vulgarmente encontrado em peixes e crustáceos sendo esta a principal fonte de ingestão alimentar.

A ingestão prolongada de cádmio resulta na sua acumulação no organismo humano, inicialmente no fígado e rins. Um nível de 0,2-0,3 mg de Cd/g rim causa já perturbações [11]. Após a ingestão, o cádmio fixa-se inicialmente no córtex renal, daí resultando lesões graves. Inicialmente provoca sintomas como náuseas, vómitos e dores abdominais [6]. O cádmio é um possível causador de enfisema pulmonar, do cancro dos pulmões e distúrbios cardiovasculares.

No organismo humano, o cádmio compete com o zinco, o cobre e o ferro, podendo inibir a sua absorção [4].

1.4.3 Mercúrio

É uma substância tóxica persistente que pode ocorrer naturalmente (depósitos minerais, vulcões, fogos florestais, desgasificação da crosta terrestre) ou pode ser libertado em consequência de actividades humanas (minas, inflamação de combustíveis fósseis) [21]. Uma vez no meio ambiente, o mercúrio pode ser encontrado na sua forma elementar e em vários compostos orgânicos e inorgânicos [22]. Os sais organometálicos do mercúrio, em particular os compostos metil e etilmercúrio, são considerados como os mais tóxicos [11].

Os compostos orgânicos de mercúrio que entram nos lagos, rios e oceanos são sujeitos a um processo de metilação. O metilmercúrio tem uma elevada afinidade com grupos proteicos, acumulando-se nos organismos ao longo da cadeia alimentar aquática. Sendo assim, os produtos derivados da pesca podem acumular elevadas concentrações de metilmercúrio (especialmente no fígado, rins, cérebro e músculo) constituindo a principal fonte de contaminação da dieta humana, o que pode causar um risco aumentado de efeitos adversos em populações mais expostas e mais sensíveis [22].

A ingestão em excesso deste elemento pode provocar lesões cerebrais graves que podem culminar com a morte. Os compostos de metilmercúrio são lipossolúveis, directamente absorvidos e acumulados nos eritrócitos e no sistema nervoso central [11]. O metilmercúrio tem efeitos neurotóxicos no desenvolvimento do cérebro em humanos, sendo especialmente perigoso em fetos e mulheres grávidas [21].

O nível de mercúrio tolerado por um adulto de 70 kg é de 0,35 mg Hg por semana, do qual um máximo de 0,2 mg pode ser de metilmercúrio.

Há muitos factores que parecem influenciar a bioacumulação de mercúrio nos produtos marinhos. Porém, a posição do animal na cadeia alimentar, tamanho e idade, parecem ser aspectos relevantes. Geralmente as concentrações são mais significativas nas espécies de maiores dimensões e, isto porque, para além de ingerirem o mercúrio da água, acumulam o mercúrio das espécies mais pequenas de que se alimentam. Todavia, na maior parte dos casos não é possível estabelecer relações entre os teores encontrados e as possíveis causas.

1.4.4 Chumbo

O chumbo é um metal não essencial, cuja toxicidade é elevada devido à inibição das enzimas responsáveis pela síntese dos grupos heme e pela competição pelo Ca nas reacções dependentes deste. A semelhança química do chumbo bivalente com os metais alcalino-

-terrosos, especialmente o cálcio, é determinante para a sua acumulação nos vertebrados [23]. Este metal é absorvido por difusão passiva. O chumbo é um contaminante ambiental, que se encontra na preparação e armazenagem de alimentos, nas águas para consumo doméstico, no ar devido à poluição industrial. A absorção média, por via alimentar, é de 0,44 mg/dia e por via respiratória é de 0,01mg/dia. A excreção é essencialmente através da urina e fezes, sendo um metal que se acumula no nosso organismo.

O Homem está exposto ao chumbo pelo consumo de alimentos contaminados e por inalação directa [20].

Os adultos absorvem 5 a 10% do chumbo ingerido e normalmente retêm menos de 5% do que absorvem. Sabe-se que as crianças têm uma absorção de chumbo maior que os adultos [24].

O chumbo é um veneno que se acumula gradualmente, e os sintomas do envenenamento são difíceis de serem distinguidos de outras doenças em estágios iniciais. Longas exposições podem provocar danos no fígado, anemia e distúrbios ao sistema nervoso, incluindo danos no cérebro, podendo levar à morte [13]. A acção do chumbo resulta do facto deste competir com o ferro na hemoglobina, pois enquanto que este último, por oxidação, transporta O₂ para as células, o chumbo não o faz, originando assim a cianose.

Uma intoxicação crónica por este metal pode levar a uma doença denominada saturnismo, que ocorre na maioria das vezes, em trabalhadores expostos frequentemente.

O saturnismo conhecido desde há muito tempo, corresponde a absorções deste elemento muito mais elevadas do que os teores normalmente encontrados nos alimentos e nas bebidas. Esta intoxicação está a maior parte das vezes relacionada com uma poluição accidental. Esta doença chegou a ser designada por doença dos tipógrafos dado que estes faziam constantemente o manuseamento dos tipos de letras que eram feitos de chumbo. O termo saturnismo deriva do Deus romano Saturno, e surgiu durante a mítica “época dourada” antes do declínio do império romano, devido à utilização de chumbo nas suas canalizações.

A intoxicação aguda pelo chumbo é rara. Normalmente ocorre pela ingestão de compostos de chumbo solúvel em ácidos, ou pela inalação de vapores. Esta verifica-se quando o valor crítico é ultrapassado, e apresenta três manifestações [3]:

- elevada afinidade pelos grupos sulfídricos (-SH), inibindo a actividade das enzimas que dependem deste grupo. Duas enzimas relacionadas com a síntese da hemoglobina são inibidas pelo chumbo. Devido a esta afinidade, no fígado o chumbo acumula-se em corpos

de inclusão intranuclear, onde se liga a proteínas. Por outro lado, afecta o sistema imunológico;

- pensa-se que pode afectar o DNA e o RNA, apesar deste facto ainda não estar provado; pode induzir tumores renais, mas não se sabe ao certo se é o principal responsável;

- compete e inibe a acção do cálcio em muitos locais e processos, tal como pela afinidade com o osso, ou durante a sinapse ou na respiração mitocondrial.

As análises sanguíneas revelam anemia moderada, com existência de hemácias com granações basófilas e de uma diminuição da taxa de hemoglobina [15]. Quanto ao sistema nervoso periférico, após muitos anos de exposição, observa-se a denominada “paralisia por chumbo” dos músculos e o chamado “pulso em flexão” (pulso caído devido à paralisia do nervo radial). Pode surgir, nos casos mais graves, sintomas de encefalopatia, epilepsia, coma e posteriormente a morte.

As intoxicações agudas com implicações renais envolvem sintomas de hipertensão. A contracção vascular, provocada pelo excesso de chumbo, é responsável por esta manifestação, que só não é reversível em casos de exposição prolongada com níveis elevados, onde está associada à arteriosclerose sanguínea e renal.

A encefalopatia devida a elevadas exposições ao chumbo pode ocorrer em crianças. Os sintomas de encefalopatia devida ao chumbo começam com letargia, vómitos, irritabilidade, perda de apetite e tonturas, progredindo para ataxia óbvia e um reduzido nível de consciência que pode progredir para coma e morte. As descobertas patológicas na autópsia consistem em graves edemas cerebrais devido ao derramamento dos fluidos dos capilares do cérebro. Este quadro clínico é acompanhado pela perda de neurónios. Linhas de chumbo (linhas de Burton) ou a descoloração azul-púrpura da gengiva são um aspecto característico de toxicidade grave do chumbo em crianças com encefalopatia causada pelo chumbo. Contudo, este sintoma, tal como a presença de linhas de chumbo nas margens epifisiais dos ossos longos observadas nos raios-X de crianças com graves exposições ao chumbo, é hoje raro.

Farmacologicamente, o chumbo funciona interferindo com os mecanismos sinápticos de libertação de transmissores. Pensa-se que o chumbo possa substituir o cálcio e possivelmente o zinco em processos dependentes de iões a nível sináptico e é responsável pelo enfraquecimento de vários sistemas neurotransmissores. As concentrações micromolares de chumbo activam a proteína cinase C nos microvasos do cérebro. Esta cinase cálcio-dependente actua como segundo mensageiro na regulação do metabolismo

celular. O enfraquecimento resulta na quebra da normalmente forte barreira hemato-encefálica.

O chumbo é classificado como carcinogénio 2B. Os tumores encontrados mais vulgarmente são nos sistemas respiratório e digestivo, e não nos rins. Contudo, já tem surgido casos de adenocarcinomas renais em trabalhadores com prolongada exposição profissional [25].

Os compostos de chumbo estimulam a proliferação de células tubulares renais epiteliais. A patogénese dos tumores renais relacionados com o chumbo pode ser um efeito genético directo relacionado com as células tubulares renais, mas também pode ser uma resposta não específica à hiperplasia [14].

CAPITULO II

CÉLULAS E TECIDOS

2 Tecidos analisados

No total foram analisadas 32 amostras (16 pares) de tecido da mama, 30 amostras de tecido do intestino das quais 26 eram pares correspondentes de um mesmo indivíduo e as restantes eram apenas de tecido com tumor maligno de 4 indivíduos, 10 amostras (5 pares) de tecido do estômago, 4 amostras (2 pares) de tecido do útero, 2 amostras de tecido do rim apenas com tumor maligno, 1 amostra de tecido da tireóide apenas com tumor maligno, 1 amostra de tecido da laringe apenas com tumor maligno e 1 amostra de tecido do pulmão apenas com tumor maligno, oriundos dos Hospitais Civis da Alemanha e Portugal.

2.1 Célula: a unidade fundamental da vida

Para compreender os vários tipos de cancro, é necessário ter alguns conhecimentos sobre as células, as suas estruturas e funções.

As células são a unidade básica da estrutura e funcionamento do organismo humano. As células têm a capacidade de se dividir para formarem novas células, mantendo o crescimento do organismo, a substituição das células lesadas, para além de perpetuarem a transmissão da vida.

2.2 Células e tecidos

Os seres humanos, os animais e as plantas são constituídos por unidades microscópicas chamadas células. Num adulto calcula-se que hajam 50 biliões de células. Estas não são todas iguais. Têm formas e estruturas diferentes, de forma a desempenharem funções especiais nos diferentes órgãos do corpo. Entre os diferentes tipos de células figuram as células que formam os ossos, as células dos nervos, as células dos músculos e as células da pele, de vários tipos. Um grupo de células iguais trabalhando em conjunto para desempenhar uma função específica é designado por “tecido”.

2.3 Célula

Pode então dizer-se que as células são a unidade básica da estrutura e funcionamento do organismo humano pois têm a capacidade de se dividir para formarem novas células,

mantendo o crescimento do organismo e a substituição das células lesadas, para além de perpetuarem a transmissão da vida.

2.3.1 A estrutura da célula

As células animais (figura1) são todas compostas por três partes principais, independentemente da sua especialização para desempenhar funções específicas.

Essas partes são:

- a membrana celular (permite que entrem e saiam da célula diversas substâncias);
- o citoplasma (constitui o corpo da célula e contem orgânicos para desempenhar várias funções da célula, tais como as mitocôndrias para a respiração, os ribossomas como lugares para as proteínas se construírem, etc); e
- o núcleo (contém os cromossomas, é a parte mais importante da célula, porque é ele que organiza a sua forma, estrutura e actividades. Ele faz isto por intermédio dos genes, que estão organizados em composições especiais ao longo dos cromossomas).

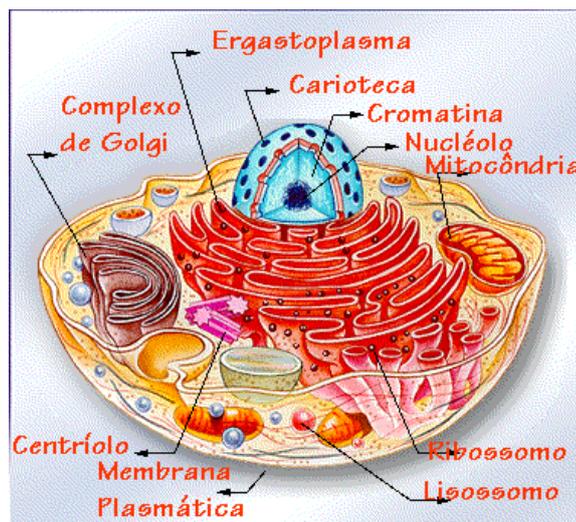


Figura 1 – Estrutura básica de uma célula animal [26].

Membrana Celular

A membrana celular é formada por uma dupla camada de fosfolípidios, bem como por proteínas espaçadas e que podem atravessar de um lado a outro a membrana. Algumas proteínas estão associadas a glicídios, formando as glicoproteínas. Controla a entrada e a saída de substâncias.

Os fosfolipídios são os principais componentes das membranas celulares. A região do fosfato ("cabeça") encontra-se electricamente carregada (região polar) enquanto que as duas cadeias de ácidos gordos (pertencentes aos lipídeos) não apresentam carga eléctrica (região apolar).

As glicoproteínas são a associação de proteínas com glicídios (açúcares) presentes nas células animais em geral. Os glicídios recobrem as células como "pêlos" protegendo-as contra agressões do meio ambiente e retendo substâncias, como nutrientes e enzimas, constituindo o glicocálix.

Citoplasma

O retículo endoplasmático (RE) actua como transportador de substâncias. Há duas formas: O retículo endoplasmático liso, onde há a produção de lipídeos, e o retículo endoplasmático rugoso, onde se encontram agarrados à sua superfície externa os ribossomas, sendo o local da produção de proteínas, que serão transportadas internamente para o Complexo de Golgi.

A mitocôndria é um organelo formado por duas membranas lipoproteicas. Dentro delas realiza-se o processo de extracção de energia dos alimentos que será armazenada em moléculas de ATP (adenosina tri-fosfato). É o ATP que fornece energia necessária para as reacções químicas celulares.

O lisossoma é uma estrutura que apresenta enzimas digestivas capazes de digerir um grande número de produtos orgânicos. Realiza a digestão intracelular. É importante nos glóbulos brancos e de modo geral para a célula, já que digere as partes desta (autofagia) que serão substituídas por outras mais novas, o que ocorre com frequência nas nossas células.

O complexo de Golgi são bolsas membranosas e achatadas, que podem armazenar e transformar substâncias que chegam através do retículo endoplasmático; podem também eliminar substâncias produzidas pela célula, mas que irão actuar fora dela (enzimas por exemplo). Produzem ainda os lisossomas.

Os centríolos são estruturas cilíndricas, geralmente encontradas aos pares. Dão origem a cílios e flagelos (menos os das bactérias), estando também relacionados com a formação do fuso acromático.

Núcleo

Uma das principais características da célula eucarionte é a presença de um núcleo de forma variável, porém bem individualizado e separado da restante célula. Ao microscópio óptico o núcleo tem um contorno nítido, sendo o seu interior preenchido por elementos figurados. Desses elementos distinguem-se o nucléolo e a cromatina.

Quando uma célula se divide, o seu material nuclear (cromatina) perde a aparência relativamente homogênea típica das células que não estão em divisão e condensa-se numa série de organelos em forma de bastão, denominados cromossomas. Nas células somáticas humanas são encontrados 46 cromossomas. Há dois tipos de divisão celular: mitose e meiose. A mitose é a divisão habitual das células somáticas, pela qual o corpo cresce, se diferencia e realiza reparos. A divisão mitótica resulta normalmente em duas células filhas, cada uma com cromossomas e genes idênticos aos da célula mãe. A meiose ocorre somente nas células de linhagem germinativa e apenas uma vez numa geração. Resulta na formação de células reprodutivas (gametas), cada uma das quais tem apenas 23 cromossomas.

2.3.2 Divisão da célula

Todas as plantas e animais, incluindo os seres humanos, começam a vida a partir de uma célula. Esta divide-se e as novas células, conhecidas por células –filhas, dividem-se milhões de vezes, até o crescimento estar completo. Este processo é controlado com muito rigor; se assim não fosse, uma pessoa nunca pararia de crescer. Quando o crescimento acaba, as células continuam-se a dividir-se, mas a um ritmo muito mais lento, de forma a substituírem células que estão gastas ou danificadas. Por exemplo, como as células superficiais da pele se desgastam, as células subjacentes estão continuamente a dividir-se, a ritmo exacto, para as substituírem. No entanto, quando cortamos um dedo, a divisão celular acelera-se até que o corte cicatrize, e depois torna-se de novo mais lenta. Não é apenas a velocidade e a quantidade da divisão que é rigorosamente controlada em situações de normalidade; o mesmo se passa com o tipo de células produzidas. Quando as células da pele se dividem elas originam células da pele; quando as células dos ossos se dividem, originam células dos ossos. As células filhas contêm exactamente os mesmos cromossomas, embora os seus genes estejam programados diferentemente, de modo a orientarem cada célula em relação ao seu aspecto final e à função a desempenhar. A diferenciação é o processo, orientado

pelos cromossomas, através do qual as células simples acabadas de se formar desenvolvem as características de que necessitam para o tecido a que pertencem [27].

2.3.3 Células cancerosas

A divisão celular é um processo sujeito a um estreito controlo, por parte dos mecanismos reguladores do organismo. No entanto, algumas células não respondem aos sinais enviados pelo organismo para pararem de se dividir, prosseguindo a sua multiplicação. Estas células “anómalas” designam-se por células cancerosas. Os mecanismos da autodefesa do organismo – sistema imunitário – habitualmente destroem as células cancerosas. No entanto, é possível que algumas escapem e se desenvolvam formando um tumor, ou seja, uma massa de células cancerosas.

Os tumores não são, de forma alguma, todos cancerosos. Na sua maioria são tumores benignos que não infiltram as células vizinhas nem formam metástases ao se espalharem através da corrente sanguínea ou da linfa para formar outros cancros secundários noutras partes do corpo. Os cancros (tumores malignos) espalham-se por infiltração e metastização, atingindo outros tecidos e órgãos, o que dificulta o seu tratamento. [27]

2.3.3.1 Causas de células danificadas

As causas de danos reversíveis em células e a taxa de células mortas podem ter origem na violência física externa como um acidente de automóvel, a causas endógenas internas, tais como uma falta genética de uma enzima vital que prejudica a função metabólica normal. Muitas das influências adversas podem ser agrupadas nas seguintes categorias: falta de oxigénio, agentes físicos, agentes químicos e drogas, agentes infecciosos, reacções imunológicas, desarranjos genéticos e desequilíbrio nutricional [27].

2.3.3.2 Radicais livres induzem danos nas células

Um importante mecanismo de danificação da membrana, é a lesão induzida por radicais livres, particularmente por espécies de oxigénio activadas. Estes radicais livres podem ser produzidos nos mais variados processos como tratamentos químicos e de radiação, oxigénio e outros gases tóxicos, envelhecimento celular, morte microbiana por células fagocíticas, danos inflamatórios, destruição de tumores por macrófagos entre outros.

Os radicais livres são espécies químicas que têm um electrão ímpar na orbital externa, fora do seu nível orbital, gravitando em sentido oposto aos outros electrões. Este electrão livre favorece a recepção de outras moléculas, o que torna os radicais livres extremamente reactivos, inclusive com moléculas orgânicas. Os radicais livres têm vida média de milésimos de segundo, mas eventualmente podem tornar-se estáveis, produzindo reacções biológicas lesivas. A energia em jogo nesta configuração instável é liberta através de reacções com moléculas adjacentes, tais como orgânicas ou inorgânicas – proteínas, lípidos, carboidratos – particularmente com moléculas específicas das membranas e ácidos nucleicos. Além disso, os radicais livres iniciam reacções autocatalíticas por meio de moléculas com as quais eles reagem sendo elas próprias convertidas em radicais livres para propagar a cadeia de destruição.

Os radicais podem ser iniciados dentro das células por:

- Absorção de energia radiante. Por exemplo, a radiação ionizante pode hidrolisar a água originando os seguintes radicais livres $OH\cdot$ e $H\cdot$
- metabolismo enzimático de drogas e químicos exógenos. Por exemplo o tetracloreto de carbono CCl_4 pode degenerar em $CCl_3\cdot$.
- Reacções de oxidação redução que ocorrem durante processos metabólicos. Por exemplo, durante a respiração normal, o oxigénio molecular é reduzido sequencialmente por adição de quatro electrões para produzir água. Neste processo, pequenas quantidades de intermediários tóxicos são produzidos, estes incluem $O_2^{\cdot-}$, H_2O_2 e $OH\cdot$. A rápida produção de superóxido ($O_2^{\cdot-}$) ocorre em leucócitos polimorfonucleares activados durante a inflamação. Isto ocorre por reacções controladas precisamente no plasma da membrana complexo multiproteína que usa o NADPH oxidase para reacções redox. Além disto, algumas oxidases intracelulares originam radicais ($O_2^{\cdot-}$) como consequência das suas actividades.
- Metais de transição como o ferro e o cobre doam ou aceitam electrões livres durante reacções intracelulares formando radicais livres. Por exemplo: $H_2O_2 + Fe^{2+} \rightarrow Fe^{3+} + OH\cdot + OH^-$, porque a maior parte de ferro livre intracelular encontra-se sob a forma Fe^{3+} e deverá ser reduzido a Fe^{2+} para participar na reacção anterior. Esta redução pode ser conseguida por superóxidos, estas fontes de ferro e superóxido são necessárias para oxidação máxima de células danificadas.

- Óxido nítrico (NO), um importante mediador químico originado por células endoteliais, macrófagos, neurónios e outras células, podem actuar como radicais livres e também serem convertidos no anião peroxinitrito ($ONOO^-$) altamente reactivo tal com NO_2 e NO_3^- .

Os efeitos destas espécies reactivas são diversificados mas três reacções são particularmente relevantes para células danificadas.

Peroxidação de lípidos nas membranas. Radicais livres na presença de oxigénio podem causar peroxidação de lípidos dentro do plasma e nas membranas de organelos. Os danos por oxidação são iniciados quando ligações duplas em ácidos gordos insaturados de lípidos nas membranas são atacados por radicais livres derivados de oxigénio, particularmente por OH^\cdot . Das interacções lípidos radicais resultam peróxidos, os quais são instáveis e reactivos, e sucedem reacções catalíticas em cadeia (chamada propagação), as quais podem resultar num dano extensivo da membrana, do organelo e célula. Outras opções mais favoráveis para terminar com a reacção desencadeada podem tomar lugar quando o radical livre é capturado por um ‘inactivador’, tal como a vitamina E embebida na membrana da célula.

Modificação de proteínas por oxidação. Radicais livres promovem oxidação de correntes secundárias de resíduos de aminoácidos, formação de ligações cruzadas proteína-proteína (ex: sulfidril mediado), e oxidação da cadeia principal da proteína resultando na fragmentação da proteína. A modificação de oxidação aumenta a degradação de enzimas críticas pelo complexo ‘proteasome’ multicatalítico, levando a desorientação dentro da célula.

Lesões no DNA. Reacções com a timina no DNA nuclear e mitocondrial produzem quebras únicas na cadeia do DNA. Este DNA danificado estará relacionado com o envelhecimento da célula e transformações malignas nas células [27].

As células desenvolvem múltiplos mecanismos para remover radicais livres e por meio disso minimizar os danos. Os radicais livres são muito instáveis e geralmente decaem espontaneamente. O superóxido por exemplo é instável e decai espontaneamente em oxigénio e peróxido de hidrogénio na presença de água. Existem, contudo, alguns sistemas enzimáticos e monoenzimáticos que contribuem para a inibição de reacções de radicais livres. Estes incluem o seguinte:

- antioxidantes, os quais bloqueiam qualquer iniciação de formação de radicais livres ou inactivam radicais livres e termina a destruição do radical. Exemplos são lípidos solúveis em vitamina A e E como o ácido ascórbico e a glutamina em citosol.

- O ferro e o zinco podem catalizar a formação de espécies reactivas de oxigénio. Os níveis destas formas reactivas são minimizadas por formação de iões para armazenamento e transporte de proteínas, por meio disso minimiza-se a formação de $OH\cdot$ [27].

2.3.3.3 Oncogenes e Anti-oncogenes

Os oncogenes e os anti-oncogenes são genes que participam na formação de tumores. Os anti-oncogenes ou genes supressores de tumores são recessivos, isto é, o efeito cancerígeno só aparece quando eles estão ausentes ou são defeituosos nos dois cromossomas do genoma, ao contrário os oncogenes são dominantes, e esses codificam proteínas e promovem a multiplicação desordenada das células, que se convertem em malignas (figura 2). Basta uma cópia do oncogene no genoma para causar a transformação da célula normal em célula cancerosa. Os principais segmentos de DNA que participam do aparecimento de tumores são os anti-oncogenes e os oncogenes, sendo que os primeiros codificam proteínas que mantêm as células G-zero e, portanto, fora do ciclo celular. Como exemplo podemos citar o gene RD, o p53, p16, BRCA1, BRCA2, APC e VHL. Os oncogenes são derivados de genes normais denominados proto-oncogene, que leva a célula a perder o controle sobre o ciclo mitótico, dividindo-se continuamente. Entre os oncogenes, uns dos mais estudados é o oncogene ras, com as suas variantes H-ras, K-ras e N-ras. Portanto são vários os factores que levam o indivíduo a contrair um cancro, e o diagnóstico prévio da doença e erradicação deve ser feita logo no começo, viabilizando salvar a vida do doente.

No organismo normal o ciclo de proliferação celular é rigorosamente controlado para que as células constituam comunidades organizadas. No entanto, as células cancerígenas não se submetem a esse esquema de cooperação, são células com o DNA danificado e que, por isso, escapam dos mecanismos de controle do ciclo celular. O “cancro” surge de uma única célula que sofreu mutação, multiplicou-se por mitoses e as suas descendentes foram acumulando outras mutações até darem origem a uma célula cancerosa. Os tumores caracterizam-se pela proliferação celular anormal, cuja denominação correcta é neoplasia [28].

Geralmente, existem dois tipos de tumores, os malignos e os benignos, sendo que só o primeiro é considerado cancro, denominação que ocorre pelo facto de que nos tumores benignos as células permanecem localizadas onde se originou o tumor, não invadindo outros tecidos. No tumor maligno as células vão sofrendo divisões e invadindo todos os tecidos do corpo, localmente ou à distância causando as metástases.

Os genes que participam na formação de tumores são, principalmente, os que nas células normais estão envolvidos no controle do ciclo celular, reparação do DNA danificado e apoptose. São os genes supressores de tumores, os anti-oncogenes, e os oncogenes (como referidos anteriormente). O cancro, basicamente, é uma doença do DNA [28].

Numerosos estudos já demonstraram que as anomalias cromossômicas encontradas em neoplasias são consistentes e não ocorrem ao acaso. A observação de defeitos cromossômicos recorrentes em cancros humanos tem por base a ideia de que os arranjos cromossômicos desempenham um papel marcante na carcinogênese. Essas anomalias cromossômicas estruturais geralmente ocorrem envolvendo um número específico de bandas cromossômicas, onde vários oncogenes já foram localizados. Nestas bandas ou perto delas, foram identificados locais frágeis ou hipersensíveis, onde os agentes carcinogênicos podem actuar, determinando quebras ou rearranjos cromossômicos. Se essas mutações determinarem vantagens proliferativas numa determinada célula, ocorre uma proliferação desta. Nas divisões celulares subsequentes, os defeitos cromossômicos secundários serão seleccionados, se representarem mudanças vantajosas para a sobrevivência celular. O processo continua como um círculo vicioso, levando ao desenvolvimento de diversos clones num mesmo tumor, cada um com características genéticas e funcionais diferentes, garantindo o crescimento tumoral, a infiltração de tecidos adjacentes e a capacidade de enviar metástases à distância.

Apesar de agirem inicialmente de forma distinta, todos os agentes oncogênicos têm a mesma via final: transformação de proto-oncogenes em oncogenes e/ou inibição de anti-oncogenes.

Os proto-oncogenes (tabela 1) são genes relacionados com o crescimento, diferenciação e proliferação celular normais. Codificam factores de crescimento, receptores de membrana e proteínas de ligação do DNA. Os oncogenes (tabela 1) são proto-oncogenes activados. A sua activação é desencadeada através de alterações genéticas [30]:

- Translocações e inversões – permitem que um proto-oncogene seja inserido próximo ou fundido a um gene frequentemente transcrito, levando a sua expressão a aumentar e/ou à produção de proteínas aberrantes.
 - Deleções – têm importância oncogénica quando envolvem genes supressores do crescimento celular.
 - Amplificações – levam à expressão exacerbada de proteínas estruturalmente preservadas.
 - Mutações puntiformes – causam produção de proteínas estruturais e funcionalmente aberrantes.
-

• Inserção de DNA viral – inserem oncogenes virais no genoma humano. O produto de tais oncogenes pode estimular ou inibir proto-oncogenes e anti-oncogenes.

Os mecanismos de acção dos oncogenes não estão totalmente elucidados. Alguns oncogenes produzem oncoproteínas, como a bcl-2, IE84 (Citomegalovírus), SV40-T (vírus SV40), E6 (HPV), EBNA-5 (EBV) e HBx (vírus da hepatite B), que se ligam fortemente e inibem as proteínas codificadas por genes supressores do crescimento celular ou indutores da apoptose, como o p53 e o Rb. Estes mecanismos, levam à ausência de repressão da divisão ou inibição da morte celular por apoptose, logo, à "imortalidade" celular. Outros oncogenes agem levando à produção excessiva de receptores de membrana para factores de crescimento, como o c-erb-B-2 (para um homólogo do factor de crescimento epidérmico) e o ret (factor ligante desconhecido). Pode ainda existir uma terceira via, a produção autócrina de factores de crescimento, que é observada, por exemplo, na multiplicação e activação dos proto-oncogenes c-fos e c-sys pelo produto do oncogene viral tax (HTLV-1). Outras formas de promoção do crescimento neoplásico como a activação de proto-oncogenes que estimula a entrada da célula em mitose (ex: c-myc) e a produção de proteínas que simulam a acção dos transdutores de sinal dos receptores de membrana para factores de crescimento (ex: c-ras e c-abl).

Os anti-oncogenes, como já foi referido, (tabela 2) são genes inibidores da proliferação celular normal, logo, também do crescimento tumoral. Eles agem de diversas formas [30]:

• Interação com a matriz extracelular – O anti-oncogene DCC produz uma proteína transmembranar que interage com componentes da matriz extracelular, sendo responsável pela sinalização da inibição do crescimento por contacto entre as células, estando esta interação perdida nas neoplasias.

• Regulação da transdução – O anti-oncogene NF-1 age inactivando a proteína do proto-oncogene ras. Esta proteína é um transdutor, que tem como função levar ao núcleo a informação de que a célula está sendo estimulada por factores de crescimento ligados aos receptores de membrana. Em casos de inactivação do NF-1 por mutação ou deleção, o sinal transdutor não será inibido, gerando estímulo contínuo para a célula entrar em mitose.

• Regulação da transcrição do DNA – Os anti-oncogenes Rb e p53 são o protótipo deste grupo. O gen Rb foi o primeiro anti-oncogene a ser descoberto, durante estudos do retinoblastoma, neoplasia maligna da retina. Ele actua impedindo a célula de sair dos estágios G0/G1 e entrar na fase S do ciclo celular. Quando a célula sofre estímulos mitogénicos, a proteína codificada pelo gen Rb é inactivada, permitindo a progressão do ciclo proliferativo, porém antes da formação das células-filhas, esta volta à sua forma

activa, impedindo que o ciclo continue indefinidamente. Quando este gene é inativado (por ex. pelos vírus HPV e SV40) não há esse bloqueio e a célula atinge a sua "imortalização". O p53 é um dos genes responsáveis pela integridade do genoma, sendo activado pelo surgimento de DNA alterado, através de mecanismos ainda não totalmente esclarecidos. A sua activação produz uma proteína que estimula a síntese de outras proteínas, que vão actuar inibindo a replicação celular através da ligação com o antígeno de proliferação nuclear (PCNA) e estimulando as enzimas de reparo do DNA. Caso a reparação do DNA seja completa, o p53 é inativado e a célula retorna ao estado normal. Caso não haja reparação satisfatória, a célula permanece impedida de replicar e é induzida à apoptose. A apoptose é um tipo de morte celular, desencadeada, entre outros estímulos, por mutações potencialmente lesivas. De referir que os agentes quimioterápicos e a radioterapia agem sobre as células em mitose, causando graves erros no DNA e induzindo a apoptose.

Isto pode levar a duas conclusões: (1) essas formas de tratamento não vão ter efeito satisfatório em tumores com grandes quantidades de células com o p53 inactivo por não conseguirem induzir a apoptose e (2) em neoplasias sensíveis vai haver selecção de clones com p53 deficiente, possivelmente levando à recaída do tumor com características mais agressivas e com menos resposta ao tratamento. Outra forma de actuação do p53 é no envelhecimento celular. Durante este processo, as células vão reduzindo gradualmente a produção de mdm2, um inibidor fisiológico do p53. Com isso, células senescentes e diferenciadas continuam a sua existência, mas perdem a capacidade de se multiplicar, protegendo o organismo contra tumores.

Sabe-se que existe uma relação entre cancro e hereditariedade. Muitas neoplasias malignas têm incidência aumentada dentro de uma mesma família, sugerindo algum padrão de herança genética, como por exemplo o retinoblastoma, o carcinoma de mama, a síndrome de Li Fraumeni (doença autossómica dominante que predispõe a múltiplas formas de cancro, incluindo mama, sarcomas de partes moles, tumor cerebral, osteossarcoma, leucemia e carcinoma da supra-renal) e a síndrome de neoplasias endócrinas múltiplas tipo 2 (NEM 2) – carcinoma medular da tiróide e feocromocitoma, associados a neuromas de mucosa ou hiperplasia das paratiróides. Nesses casos os tumores costumam aparecer em indivíduos mais jovens que nos tumores esporádicos (sem relação familiar) e devem-se à transmissão de um proto-oncogene ou anti-oncogene mutante por um dos pais. No retinoblastoma há herança de um alelo inactivo do anti-oncogene Rb. Na síndrome de Li Fraumeni ocorre o mesmo com o anti-oncogene p53. Na NEM 2 está envolvido o oncogene ret e, no cancro de mama, os genes BRCA 1 e 2. Nenhuma mutação isolada é oncogénica,

mas a existência de mutações congênitas é o primeiro passo para o aparecimento de outras adicionais, antecipando o surgimento de neoplasias nesses indivíduos.

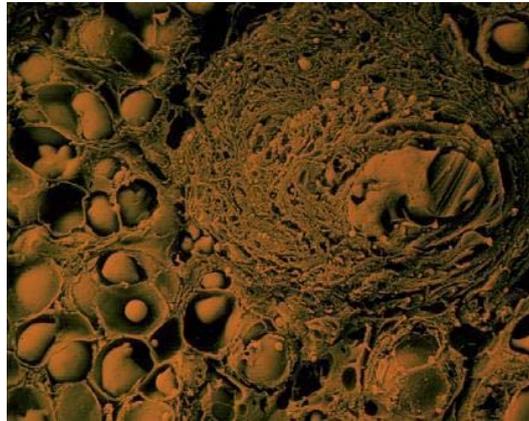


Figura 2 – Células anómalas de um tecido de ovário (cancro) [29].

As células cancerosas são muito diferentes das do tecido do qual procedem. O tumor ilustrado na figura 2, um teratoma de ovário, não tem nenhuma semelhança com o tecido normal do ovário. Os tumores desse tipo podem converter-se em quistos, que contêm osso, pêlo ou tecido cutâneo.

Proto-oncogene	Síntese / Acção	Mecanismo	Neoplasias humanas associadas
Sis	Factor de crescimento derivado de plaquetas (PDGF)	Expressão aumentada	Astrocitoma e osteossarcoma
Hst1	Factor de crescimento fibroblástico (FGF)	Expressão aumentada	Cancro de estômago
erb-B1	Receptor para factor de crescimento epidérmico	Expressão aumentada	Carcinoma de células escamosas do pulmão
erb-B2	Receptor para factor de crescimento epidérmico	Amplificação	Cancro de mama, ovário, estômago e pulmão
erb-B3	Receptor para factor de crescimento epidérmico	Expressão aumentada	Cancro de mama
Fms	Receptor para factor de estimulação de colónias (CSF)	Mutação puntiforme	Leucemia
Ras	Transdutores de sinal	Mutação puntiforme	Diversos, incluindo pulmão, cólon, pâncreas e leucemias
Abl	Transdutores de sinal	Translocação	Leucemia mielóide crónica, leucemia linfoblástica aguda
Myc	Activação da transcrição	Translocação	Linfoma de Burkitt
N-myc	Activação da transcrição	Amplificação	Neuroblastoma e carcinoma de pequenas células do pulmão
L-myc	Activação da transcrição	Amplificação	Carcinoma de pequenas células do pulmão

Tabela 1 – Principais proto-oncogenes e os seus produtos, via de activação e neoplasias humanas associadas [30].

Anti-oncogene	Neoplasias associadas com mutações somáticas	Neoplasias associadas com mutações herdadas
Rb	Retinoblastoma, osteossarcoma, carcinomas de mama, próstata, bexiga e pulmão	Retinoblastoma e osteossarcoma
p53	A maioria dos cancros humanos	Síndrome de Li Fraumeni, carcinomas de mama e córtex supra-renal, sarcomas, leucemias e tumores cerebrais
APC	Carcinomas do cólon, estômago e pâncreas	Polipose cólica familiar, carcinoma de cólon
WT-1	Tumor de Wilms	Tumor de Wilms
DCC	Carcinomas do cólon e estômago	Desconhecido
NF-1	Schwannomas	Neurofibromatose tipo 1, tumores neurais
NF-2	Schwannomas e meningiomas	Neurofibromatose tipo 2, schwannoma central e meningiomas
VHL	Desconhecido	Doença de Von Hippel-Lindau, carcinoma de células renais, hemangioblastomas do cerebelo ou cerebeloso e retiniano, angiomas e quistos em múltiplos órgãos

Tabela 2 – Principais anti-oncogenes e neoplasias humanas associadas de forma esporádica e familiar. [30]

2.4 Tecidos e Órgãos

As substâncias químicas são constituídas por átomos. Alguns deles, como o carbono, o hidrogénio, o oxigénio, o azoto, o cálcio, o potássio e o sódio que são essenciais para a manutenção da vida. Alguns átomos combinam-se para formar moléculas. Exemplos de moléculas são as proteínas, os carboidratos, as gorduras e as vitaminas. As moléculas, por sua vez, combinam-se para formar a organização celular.

As células são as unidades estruturais e funcionais básicas de um organismo. Entre os muitos tipos de células existentes no corpo distinguem-se as células musculares, nervosas e sanguíneas. Cada uma tem uma estrutura diferente e cada uma desenvolve uma função diferente [31]. Os tecidos são agrupamentos de células, com uma estrutura determinada, que realiza uma função especializada, vital para o organismo. Podem-se distinguir quatro tipos básicos de tecidos.

Tecido epitelial, inclui a pele e as membranas que cobrem as superfícies internas do corpo. A principal função do epitélio é proteger das lesões e infecções. Alguns epitélios são formados por células achatadas dispostas em numerosas camadas ou estratos, tomando o nome de epitélio pavimentoso estratificado que forma, por exemplo, a epiderme, isto é, a parte mais superficial da pele. Um epitélio desse tipo tem função essencialmente protectora. Há outros tipos de epitélio, tais como:

- epitélio prismático estratificado, munido de cílios vibráteis, típico da traqueia, no qual os cílios podem mover-se ondulando;
- epitélio prismático simples, típico das paredes intestinais, que tem a função de trocas;
- o tecido epitelial glandular, típico das glândulas, que tem função secretora.

Tecido conjuntivo, é um tecido de sustentação que ocupa todos os intervalos situados entre os órgãos. Forma uma cápsula fibrosa, bastante resistente, em volta dos órgãos e uma rede contínua no Interior dos órgãos. É constituído por 1 amostra de tecido de tiróide apenas com tumor maligno s ou conjuntivas, unidas entre si por prolongamentos do citoplasma e por uma substância intercelular semifluida, transparente e homogénea, que encerra fibras conjuntivas e fibras elásticas. O tecido conjuntivo distingue-se em:

- tecido conjuntivo laxo, que corresponde à descrição feita;
 - tecido fibroso, em que as fibras conjuntivas são numerosas e unidas; este tipo de tecido conjuntivo forma os tendões que ligam os músculos aos ossos;
 - tecido elástico, no qual predominam as fibras elásticas; este tecido forma, por exemplo, a túnica média das grandes artérias;
 - tecido adiposo, representado pela gordura;
 - tecido cartilaginoso, caracterizado pela presença da condrina na substância intercelular: é típico das cartilagens;
 - tecido ósseo, caracterizado pela extrema dureza, devido ao depósito de sais de cálcio: é típico dos ossos.
-

Tecido muscular, tecido que se contrai e relaxa. Deste fazem parte os músculos estriados, lisos e o músculo cardíaco ou do miocárdio.

Tecido nervoso é um complexo grupo de células que transfere informação de uma parte do corpo a outra; deste modo, coordena o funcionamento de um organismo e regula o seu comportamento.

2.4.1 Tumor maligno no tecido da mama

A mama é um órgão glandular, que existe aos pares e que se situa na porção antero-superior do tórax, uma de cada lado do esterno, adiante dos músculos grande e pequeno peitoral e no intervalo compreendido entre a 3^a e 7^a costela. Tem como função a secreção de leite.

A mama, estruturalmente, é constituída por três porções: glândula mamária; revestimento cutâneo e revestimento célula-adiposo.

O Cancro da Mama é um tumor maligno que se desenvolve nas células dos tecidos mamários. O tumor maligno consiste num grupo de células alteradas (neoplásicas) que pode invadir os tecidos vizinhos e disseminar-se (metastizar) para outros órgãos do corpo. É mais frequente nas mulheres mas pode atingir também os homens.

O cancro da mama, muitas vezes, apresenta-se como uma massa dura e irregular que, quando palpada, se diferencia do resto da mama, pela sua consistência.

É importante conhecer alguns dos termos utilizados para descrever os cancros da mama, porque o tratamento e prognóstico variam de doente para doente e em função do tipo de tumor [27].

Adenocarcinoma: quase todos os tumores malignos da mama têm origem nos ductos ou nos lóbulos da mama, que são tecidos glandulares. Os dois tipos mais frequentes são o carcinoma ductal e o carcinoma lobular.

In situ: usa-se o termo para definir o cancro da mama precoce, quando se encontra limitado aos ductos (carcinoma ductal in situ) ou lóbulos (carcinoma lobular in situ), sem invasão dos tecidos mamários vizinhos ou de outros órgãos.

Carcinoma ductal in situ (CDIS): o carcinoma ductal in situ é o tumor da mama não invasivo mais frequente. Praticamente todas as mulheres com CDIS podem ser curadas. A mamografia é o melhor método para diagnosticar o cancro da mama nesta fase precoce.

Carcinoma lobular in situ (CLIS): embora não seja um verdadeiro cancro, o CLIS é por vezes classificado como um cancro da mama não invasivo.

Muitos especialistas pensam que o CLIS não se transforma num carcinoma invasor mas as mulheres com esta neoplasia têm um maior risco de desenvolver cancro da mama invasor.

Carcinoma ductal invasor (CDI): este é o cancro invasor da mama mais frequente. Tem origem nos ductos e invade os tecidos vizinhos. Nesta fase pode disseminar-se através dos vasos linfáticos ou do sangue, atingindo outros órgãos. Cerca de 80% dos cancros da mama invasores são carcinomas ductais.

Carcinoma lobular invasor (CLI): tem origem nas unidades produtoras de leite, ou seja, nos lóbulos. À semelhança do CDI pode disseminar-se (metastizar) para outras partes do corpo. Cerca de 10% dos cancros da mama invasores são carcinomas lobulares.

Carcinoma inflamatório da mama: este é um cancro agressivo menos frequente, correspondendo a cerca de 1% a 3% de todos os cancros da mama.

Outros tipos mais raros de cancro da mama são o Carcinoma Medular, o Carcinoma Mucinoso, o Carcinoma Tubular e o Tumor Filoide Maligno, entre outros.

2.4.2 Tumor maligno no tecido do intestino grosso

O intestino grosso é constituído pelo cólon (cólon ascendente, transverso e descendente) e recto (parte terminal do intestino grosso). O cancro do cólon e do recto é dos mais frequentes.

O conteúdo intestinal é líquido ao chegar ao intestino grosso, mas normalmente é sólido ao atingir o recto, sob a forma de fezes. As muitas bactérias que habitam o intestino grosso podem digerir ainda mais alguns materiais, auxiliando na absorção de nutrientes pelo organismo. As bactérias do intestino grosso também sintetizam algumas substâncias importantes (ex: vitamina k) e são importantes para a função intestinal saudável. Algumas doenças e alguns antibióticos podem provocar um desequilíbrio entre os diferentes tipos de bactérias do intestino grosso. A consequência é irritação que acarreta a secreção de muco e água, causando a diarreia.

Os pólipos no cólon e no recto são tumores geralmente benignos. No entanto, uma vez que alguns são pré-cancerosos, os médicos recomendam extrair todos os pólipos desta porção de

intestino. Um pólipó é um crescimento de tecido da parede intestinal, geralmente não canceroso, que se desenvolve dentro do intestino.

Os pólipos podem crescer com ou sem pedículo e o seu tamanho varia consideravelmente. O mais habitual é que os pólipos se desenvolvam no recto e no segmento inferior do intestino grosso. É raro que o façam mais acima.

Cerca de 25 % das pessoas com cancro do cólon têm também pólipos em qualquer outro lugar do intestino grosso. Há sinais evidentes de que os pólipos adenomatosos são propensos a tornar-se cancerosos se deixar que permaneçam no intestino grosso. Quanto maior for o pólipó, maior é o risco de ser maligno.

O cancro do cólon e do recto (cancro colo-rectal) é a segunda causa mais frequente de cancro e a segunda causa de morte por cancro. A incidência começa a aumentar aos 40 anos e chega ao máximo entre os 60 e os 75 anos. O cancro do intestino grosso (cancro do cólon) é mais frequente em mulheres, enquanto o do recto é mais nos homens. Cerca de 5 % das pessoas com cancro do cólon ou do recto têm mais do que um cancro colo-rectal ao mesmo tempo.

O cancro do cólon começa normalmente como uma inflamação em forma de botão na superfície mucosa intestinal ou num pólipó. Conforme o tumor cresce, começa a invadir a parede intestinal. Também podem ser invadidos os gânglios linfáticos próximos. Dado que o sangue da parede intestinal passa pelo fígado, o cancro do cólon estende-se em geral (faz metástases) precocemente para este órgão, depois de ter invadido primeiro os gânglios linfáticos adjacentes [32].

2.4.3 Tumor maligno no tecido do estômago

O estômago dá continuidade ao esófago e continua-se pelo duodeno. Ele é um saco onde se acumulam os alimentos durante as refeições. Aí eles sofrem uma trituração mecânica e uma primeira digestão por efeito do suco gástrico. É uma ingestão por efeito do suco gástrico. É um órgão receptor, dotado de uma musculatura extremamente potente, susceptível de secretar abundantemente.

O estômago é bastante móvel, variando conforme a idade, o sexo, os hábitos alimentares e a posição do corpo. Os tumores não cancerosos do estômago não costumam causar sintomas ou problemas médicos. Por vezes, no entanto, alguns sangram ou tornam-se malignos.

Em quase 99 % dos casos de câncros do estômago, trata-se de adenocarcinomas (tumor maligno do tecido epitelial). Outros câncros são leiomiossarcomas (tumor maligno do músculo liso) e linfomas.

O cancro gástrico é mais frequente em adultos. Menos de 25 % dos referidos câncros ocorre em pessoas com menos de 50 anos. O cancro do estômago é extremamente frequente no Japão, na China, no Chile e na Islândia, enquanto que nos Estados Unidos, onde este cancro afecta 8 em cada 100 000 pessoas, a sua incidência está a diminuir por razões desconhecidas.

Os pólipos do estômago são uns tumores pouco frequentes, arredondados e não cancerosos que crescem para o interior da cavidade gástrica. Considera-se que são precursores do cancro e, portanto, devem ser extirpados. O cancro é particularmente frequente se existirem determinados tipos de pólipos, se estes tiverem mais de 2 cm ou quando existem vários deles.

Nas etapas iniciais do cancro do estômago, os sintomas são vagos e com frequência passam despercebidos. Quando são mais evidentes, podem inclusivamente ajudar a localizar a parte do estômago em que o tumor se encontra. Por exemplo, uma sensação de saciedade ou um incómodo depois das refeições podem ser sinal de que o tumor se localiza na parte baixa do estômago. A perda de peso ou a debilidade são normalmente o resultado duma dificuldade em comer ou de uma incapacidade para absorver determinadas vitaminas e minerais. A anemia pode ser consequência de uma hemorragia muito gradual, sem que provoque outros sintomas. Em casos excepcionais, a pessoa pode vomitar grandes quantidades de sangue ou evacuar fezes de cor negro-alcitrão. Quando o tumor está numa fase avançada, o médico pode palpar uma massa através da parede abdominal [27].

Até nas etapas iniciais, um tumor pequeno do estômago pode estender-se (fazer metástases) para sítios distantes. A propagação do tumor pode provocar aumento do fígado, icterícia, acumulação de líquido no abdómen (ascite) e nódulos cutâneos cancerosos. A propagação do cancro também pode atingir os ossos, dando lugar a fracturas ósseas.

2.4.4 Tumor maligno no tecido do útero

O útero ocupa a porção média da escavação pélvica, por dentro das trompas uterinas, por cima da vagina e por baixo das ansas intestinais. Tem a forma de um cone truncado achatado, com a base superior e o vértice inferior.

O cancro do útero afecta principalmente dois locais – o cólo do útero e o endométrio (revestimento do útero). Em casos raros, o músculo uterino é afectado por um tipo de cancro conhecido como leiomiossarcoma.

O cancro do endométrio é um dos tipos de cancro mais comuns do sistema reprodutor feminino. Ocorre mais vulgarmente em mulheres que tiveram excesso de estrogénio no seu sistema reprodutor, particularmente se o nível de progesterona for baixo. Os factores que podem elevar o nível de estrogénio incluem obesidade, ausência de ovulação ou administração prolongada de hormonas estrogénicas, não compensada por administração de progestagénicos.

Diferentemente do cancro cervical, que é raro em mulheres que não tenham tido relações sexuais, o cancro do endométrio pode afectar mulheres virgens e é mais comum nas que tenham tido poucos ou nenhuns filhos. A utilização de contraceptivos orais diminui para metade o risco de cancro do endométrio [27].

2.4.5 Tumor maligno no tecido do rim

Os rins são dois órgãos que se situam sobre a parede abdominal posterior, atrás do peritoneu parietal posterior, de cada lado da coluna vertebral na Fossa Lombar.

Têm forma de feijão, alongados de cima para baixo e aplanados de trás para a frente e não se encontram dispostos num plano completamente frontal.

O sangue ao passar pelos rins sofre um processo de filtração onde são separados os componentes celulares (leucócitos, eritrócitos e plaquetas) e a proteína do soro. Os rins têm como função manter o equilíbrio do volume de água do organismo; manter a estabilidade na concentração dos sais e pH do corpo; fazer a excreção de produtos do catabolismo como ureia, ácido úrico, creatinina; fazer a degradação e excreção de hormónios com a insulina, glucagom e o hormónio paratireoideano; participar no metabolismo da vitamina D; regular a pressão arterial sistémica e produzir a eritropoetina que é um factor de crescimento e

actua na medula óssea estimulando a produção de glóbulos vermelhos. O cancro do rim (adenocarcinoma de rim; carcinoma de células renais; hipernefoma) representa cerca de 2 % dos cancros em adultos e afecta uma vez e meia mais os homens do que as mulheres. Os tumores sólidos de rim são, habitualmente, cancerosos, enquanto os quistos do rim (cavidades fechadas, cheias de líquido) geralmente não o são.

O cancro pode desenvolver-se nas células que revestem o bacinete renal (carcinoma das células de transição) e os ureteres. O bacinete renal é a parte do rim que conduz, como um funil, a urina para o interior dos ureteres (uns finos canais que transportam a urina até à bexiga) [33].

2.4.6 Tumor maligno no tecido do pulmão

Os pulmões são os dois maiores órgãos do aparelho respiratório. A sua forma é semelhante a duas grandes esponjas que ocupam a maior parte da cavidade torácica. O pulmão esquerdo é ligeiramente menor que o direito porque partilha o espaço com o coração, no lado esquerdo do tórax. Cada pulmão está dividido em secções (lobos). O pulmão direito é composto por três lobos e o esquerdo por dois.

A maioria das formas de cancro do pulmão tem a sua origem nas células dos pulmões. No entanto, o cancro também pode propagar-se (metástase) ao pulmão a partir de outras partes do organismo.

Mais de 90 % dos cancros do pulmão começam nos brônquios (as grandes vias aéreas que levam o ar aos pulmões). Este cancro, em particular, denomina-se carcinoma brônquico. Os tipos deste cancro são o carcinoma epidermóide, o carcinoma de células pequenas (células em forma de grão de aveia), o carcinoma de células grandes e o adenocarcinoma.

O carcinoma de células alveolares origina-se nos sacos de ar do pulmão (alvéolos). Embora este tipo de cancro possa ser um tumor único, desenvolve-se com frequência em mais de uma zona do pulmão [34].

Os tumores do pulmão menos frequentes são o adenoma brônquico (que pode ser ou não canceroso), o hamartoma condromatoso (não canceroso) e o sarcoma (canceroso). O linfoma é um tipo de cancro linfático e pode começar nos pulmões ou propagar-se aos pulmões.

Propagam-se aos pulmões muitas formas de cancro que têm origem em qualquer parte do organismo. O cancro estende-se aos pulmões (metástases) muito frequentemente a partir da mama, do cólon, da próstata, do rim, da tiróide, do estômago, do colo do útero, dos testículos, dos ossos e da pele [34].

2.4.7 Tumor maligno na tiróide

A tiróide é uma pequena glândula que mede cerca de 5 cm de diâmetro situada no pescoço sob a pele e por baixo da maçã-de-adão. As duas metades (lobos) da glândula estão ligadas na parte central (istmo), de tal maneira que parecem a letra H ou um nó de lacinho. Normalmente a glândula tiróide não se consegue ver e mal se pode palpar. Só no caso de aumentar de volume pode o médico palpá-la facilmente como uma protuberância proeminente (bócio) que aparece por baixo ou aos lados da maçã-de-adão.

A glândula tiróide segrega as hormonas tiróideas, que controlam a velocidade das funções químicas do corpo (velocidade metabólica). As hormonas da tiróide têm dois efeitos sobre o metabolismo: estimular quase todos os tecidos do corpo a produzir proteínas e aumentar a quantidade de oxigénio que as células utilizam. Quando as células trabalham mais intensamente, os órgãos do corpo trabalham mais depressa.

Para produzir hormonas tiróideas, a glândula tiróide precisa de iodo, um elemento que os alimentos e a água contêm. Esta glândula concentra o iodo e processa-o no seu interior. Quando as hormonas tiróideas se consomem, um pouco do iodo contido nas hormonas volta à glândula tiróide e é reciclado para produzir mais hormonas.

Existem quatro tipos de cancro da tiróide, papilar, folicular, anaplástico e medular.

O carcinoma papilar representa 60 % a 70 % do total das formas de cancro da tiróide. As mulheres contraem o cancro papilar duas ou três vezes mais do que os homens. Contudo, dado que os nódulos são mais comuns nas mulheres, um nódulo num homem implica sempre mais suspeitas de cancro. O cancro papilar é mais frequente nas pessoas jovens, mas cresce e estende-se mais rapidamente nos idosos. Os pacientes que receberam no pescoço um tratamento de radioterapia, por algum outro cancro, correm um grande risco de desenvolver um cancro papilar.

A cirurgia é o tratamento que mais se aplica ao cancro papilar. O carcinoma papilar por vezes estende-se aos gânglios linfáticos próximos. Os nódulos mais pequenos de 2 cm de

diâmetro extraem-se juntamente com o tecido tiróideo circundante, embora alguns especialistas recomendem a extracção da glândula inteira. A cirurgia é quase sempre eficaz nestas formas de cancro diminuto [35].

Dado que a hormona estimulante da tiróide actua sobre o cancro papilar, administra-se hormona tiróidea para suprimir a secreção da hormona estimulante e prevenir uma recaída. Se um nódulo for maior, extrai-se a maior parte ou toda a glândula tiróide e ou administra-se iodo radioactivo, com a esperança de que qualquer tecido tiróideo ou cancro remanescente que se tivesse difundido para fora da tiróide seja absorvido e destruído. Em alguns casos, é necessária outra dose de iodo radioactivo para assegurar que o cancro foi completamente eliminado. O cancro papilar quase sempre tem cura.

O cancro folicular é o responsável por cerca de 15 % de todas as formas de cancro da tiróide e é mais frequente nos idosos. O cancro folicular também é mais frequente nas mulheres do que nos homens, mas, como no cancro papilar, um nódulo num homem tem maior probabilidade de ser canceroso. Muito mais maligno do que o cancro papilar, o folicular tende a propagar-se através da corrente sanguínea, difundindo células cancerosas por várias partes do corpo (metástases).

O tratamento do cancro folicular exige a extracção cirúrgica de praticamente toda a glândula tiróide e a destruição com iodo radioactivo de qualquer tecido tiróideo remanescente, incluindo as metástases.

O cancro anaplástico representa menos de 10 % das formas de cancro da tiróide e incide em geral em mulheres idosas. Este cancro cresce muito rapidamente, causando um grande tumor no pescoço. Cerca de 80 % dos doentes com este tipo de cancro morre durante o primeiro ano. O tratamento com iodo radioactivo é inútil porque o cancro anaplástico não o absorve. Contudo, o tratamento com medicamentos anticancerígenos e radioterapia antes e depois da cirurgia dá alguns bons resultados.

No cancro medular, a glândula tiróide produz quantidades excessivas de calcitonina, uma hormona segregada por certas células tiróideas. Dado que também pode produzir outras hormonas, pode causar sintomas pouco habituais. Além disso, tem tendência a difundir-se (metástases) pelo sistema linfático até aos gânglios linfáticos e, através do sangue, ao fígado, pulmões e ossos. Este cancro desenvolve-se juntamente com outros tipos de cancro endócrino no que constitui o denominado síndrome da neoplasia endócrina múltipla.

O tratamento exige a extirpação completa da glândula tiróide. Pode ser necessária cirurgia adicional se o cancro se tiver difundido pelos gânglios linfáticos. Mais de dois terços dos pacientes com um cancro medular da tiróide associado ao síndrome da neoplasia endócrina

múltipla vivem mais de 10 anos a partir do diagnóstico. Quando o cancro medular da tiróide se manifesta de forma isolada, as possibilidades de sobrevivência não são tão boas.

Dado que o cancro medular da tiróide pode ter uma incidência familiar, devem-se examinar os familiares de um doente com este tipo de cancro, procurando uma anomalia genética que seja facilmente detectável nos glóbulos vermelhos. Se o resultado do exame for negativo, é quase certo que os familiares do doente não desenvolverão cancro medular.

Se o resultado do exame for positivo, então há a probabilidade de ter ou vir a desenvolver este cancro, podendo considerar-se a cirurgia da tiróide mesmo antes da manifestação de sintomas e do aumento dos valores de calcitonina no sangue. Um valor elevado de calcitonina ou um aumento excessivo da sua concentração depois de uma prova de estimulação é útil para determinar ou prever o desenvolvimento de cancro medular. Um valor muito elevado exige a extirpação da glândula tiróide, dado que um tratamento precoce tem mais possibilidades de ter sucesso na cura [35].

CAPÍTULO III

TÉCNICAS EXPERIMENTAIS

3.1 Fluorescência de Raios-X

Em 1895, Wilhelm Röntgen descobre acidentalmente os raios-X, como consequência de experiências realizadas com tubos em que se produzia a descarga de gases rarefeitos. Verificou que ao colocar um alvo fluorescente na vizinhança dos referidos tubos, o alvo se tornava luminoso, mesmo após o tubo ter sido tapado com papel preto. Esta fluorescência mantinha-se para grandes distâncias aos tubos.

Röntgen designou os raios, que provinham do tubo, responsáveis por este fenómeno por raios-X uma vez que a sua natureza era desconhecida.

3.1.1 Produção de Raios-X

A produção de raios-X consegue-se, normalmente, fazendo uso de uma ampola (figura 3) formada por um reservatório de vidro, evacuado, contendo dois eléctrodos (cátodo e ânodo). O cátodo é constituído por um fio metálico enrolado em hélice, colocado dentro de uma peça metálica destinada a colimar o feixe electrónico. O ânodo é formado por uma barra metálica, em regra de cobre, tendo fixada na parte voltada para o cátodo, uma pastilha, geralmente de molibdénio ou tungsténio. Para a produção de raios-X na ampola, é necessário aquecer o filamento por meio de uma corrente eléctrica e estabelecer uma diferença de potencial elevada entre o cátodo e o ânodo [36].

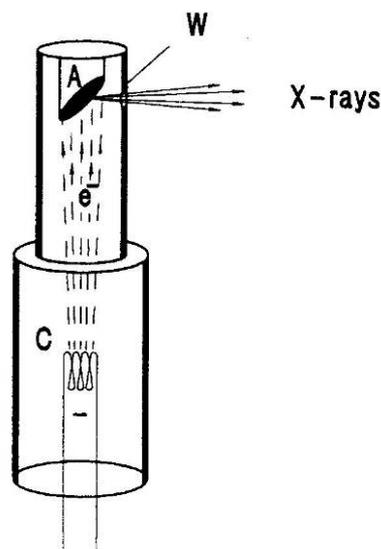


Figura 3 – Tubo de raios-X. A – ânodo; C – cátodo; W – janela [37].

Os electrões emitidos pelo cátodo são acelerados à custa de um campo eléctrico resultante da diferença de potencial, de alguns milhares de volts, aplicada entre este e o ânodo. Em consequência do impacto com o ânodo, o feixe electrónico é rapidamente travado, e uma parte da sua energia cinética é emitida sob a forma de um espectro contínuo de raios-X, que cobre uma larga banda de comprimentos de onda, com um comprimento de onda a que corresponde uma intensidade máxima e anulando-se para um limite definido, do lado dos menores comprimentos de onda (figura 4).

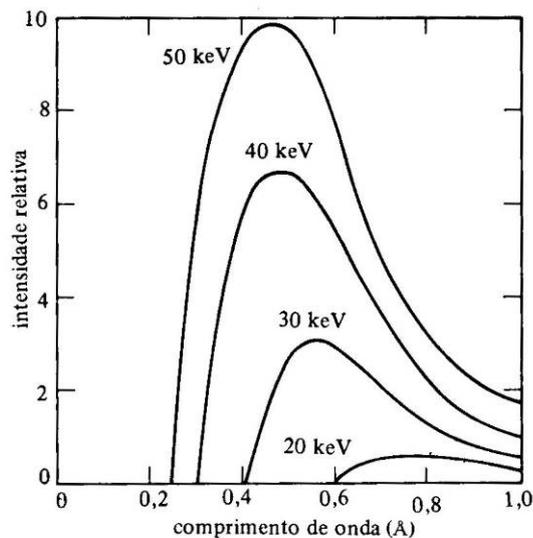


Figura 4 – Relação entre a intensidade e o comprimento de onda [38].

A grande gama de energias dos fótons de raios-X é devida à desaceleração dos electrões incidentes, que podem perder desde um valor máximo correspondente a toda a sua energia cinética até um valor mínimo que pode ser igual a zero [39].

Quando aumenta a tensão aplicada ao tubo, aumenta a energia total emitida e há um deslocamento da distribuição espectral no sentido dos menores comprimentos de onda. O comprimento de onda correspondente à intensidade máxima é cerca de 1,5 vezes superior ao comprimento de onda limite.

A intensidade do espectro aumenta com o número atómico do elemento que constitui o ânodo. Se a quantidade de energia for suficiente, os electrões incidentes no ânodo podem libertar um electrão de uma das camadas internas, e a lacuna será ocupada por outro electrão ainda mais externo. O átomo regressa, assim, ao estado fundamental por uma série de etapas, sendo emitido um fóton de raios-X em cada etapa de energia bem definida: radiação fluorescente.

Estas transições dão origem ao espectro de riscas, características do material que constitui o ânodo, ou da amostra de que está revestido. Sendo produzidas à custa de um tubo de raios-X, estas riscas sobrepõem-se ao espectro contínuo.

Se um elemento é bombardeado com electrões de alta energia, ocorre uma interacção entre os electrões incidentes e os do próprio átomo. Qualquer interacção desta natureza envolve variações de energia para o átomo regressar ao estado fundamental, através da emissão de radiação [40]. Entre os vários tipos de interacção tem-se:

- mudança do nível electrónico, sem remoção de electrões do átomo.
- arrancamento de electrões do átomo, isto é, quando a excitação de um átomo conduz à remoção de um electrão de uma camada interior, o átomo regressa ao seu estado fundamental por transferência de um electrão das camadas exterior para a interior, com emissão de energia sob a forma de raios-X.

Para que ocorra a remoção de um electrão do átomo é necessário que se forneça uma energia de valor superior à da energia de ligação desse electrão. Por sua vez, quando um electrão de nível superior é transferido para a camada vaga ocorre uma perda de energia, sob a forma de radiação electromagnética, equivalente à diferença de energia entre duas camadas: $E_x = E_i - E_f$, onde as energias E_i e E_f são as energias do electrão durante a transição. A emissão desta radiação é designada por “fluorescência” [41].

O fóton emitido apresenta um comportamento duplo: comporta-se como partícula, que pode ser detectada e a sua energia determinada; e comporta-se como onda, que é caracterizada pelo comprimento de onda, λ , sendo

$$E = h \frac{c}{\lambda} \quad (1.3.1)$$

Onde h é a constante de Planck e c a velocidade.

As transições dos electrões entre diferentes níveis de energia de um átomo obedecem às regras de selecção da teoria quântica. As transições mais importantes são ilustradas na figura 3. Estas ocorrem após a criação de uma lacuna de electrões por energia de raios-X. Durante o processo de rearranjo do átomo, em que os electrões decaem das camadas mais externas para as mais internas, ocorre emissão de um fóton de raios-X que por sua vez constitui o espectro de riscas descontínuo [36].

FUNDAMENTALS OF X-RAY FLUORESCENCE

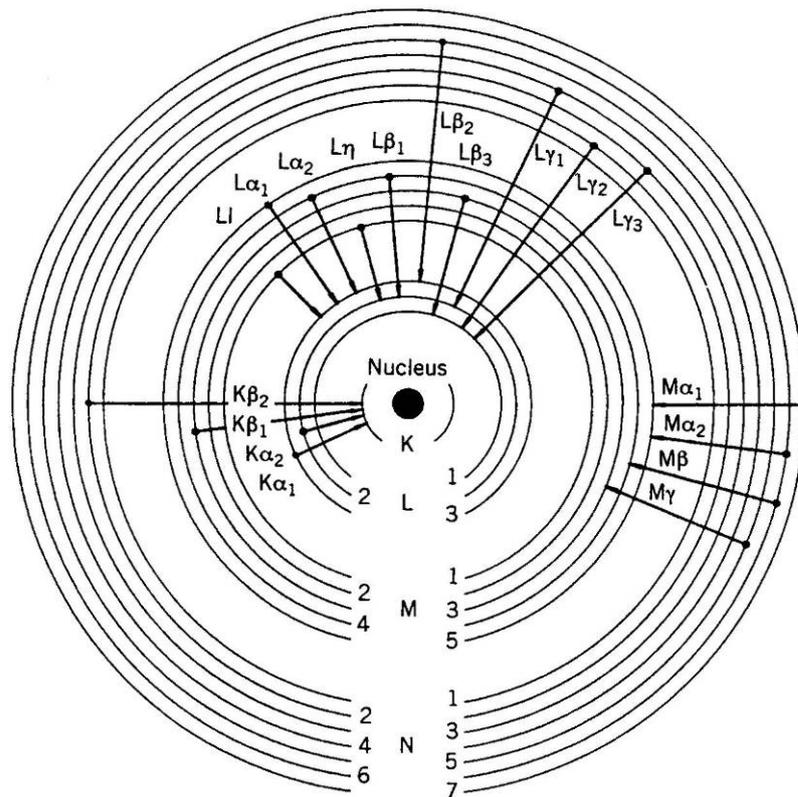


Figura 5 – Transições possíveis dos electrões [37].

Os elementos mais leves com Z até 25 normalmente apresentam riscas K. Os elementos com $25 \leq Z \leq 57$ apresentam ainda riscas L. Os elementos com $Z \geq 57$ não costumam apresentar risca K e mostram em adição às riscas L as M. Normalmente a análise por espectroscopia de raios-X é feita com base nas riscas K e L [37].

O nível de onde é arrancado o electrão determina a série detectada (série K, L, ...). A risca mais forte numa dada série é chamada de α , e as seguintes $\beta, \gamma, \delta, \dots$. Por exemplo, a transição $2p \rightarrow 1s$, pode dar origem a mais do que um “pico”, uma vez que os electrões

$2p$ a serem transferidos têm dois estados de spin. Onde o spin é $-\frac{1}{2}$, o número quântico j

é $+\frac{1}{2}$, uma vez que $l = 1$. Assim a nomenclatura espectroscópica é $2p_{\frac{1}{2}}$. Similarmente se

o spin for $+\frac{1}{2}$, j será $+\frac{3}{2}$ e a nomenclatura será $2p_{\frac{3}{2}}$. Assim surgem as linhas k_{α_1} e k_{α_2} .

Como os números quânticos l e j são usados para definir o estado de cada electrão, é possível construir “níveis” entre os electrões que são transferidos [42]. O número de níveis é $(2n-1)$, pelo que há 1k, 3L, 5M, ... As $K\alpha_1$ e $K\alpha_2$ podem ser explicadas por:

$$K\alpha_1: L_{III} \rightarrow K \text{ ou } 2p_{3/2} \rightarrow 1s$$

$$K\alpha_2: L_{II} \rightarrow K \text{ ou } 2p_{1/2} \rightarrow 1s$$

Na prática, milhões de átomos estão envolvidos na excitação de uma espécie e todas as desexcitações têm de ser tomadas em conta. As transições normais são definidas por três regras simples: $\Delta n \geq 1$; $\Delta l = \pm 1$; $\Delta j = \pm 1$ ou 0 (regras de selecção). Para além destas regras, existem ainda transições proibidas.

Quando um electrão K é removido, o átomo diz-se K^+ , mas se for um electrão L a ser removido já se diz que ficou no estado L^+ . Se dois electrões forem removidos simultaneamente, o átomo diz-se duplamente ionizado, e indica-se KK, KL, LL etc. A remoção do electrão ($1s$) conduz ao estado K^+ e o átomo irá regressar ao estado fundamental como por exemplo a transferência de um electrão do nível L para o K , envolvendo uma troca de K^+ para Li^+ ; e assim sucessivamente até o átomo regressar ao estado fundamental, em que o último electrão a ser transferido é o da camada de valência. No entanto, também pode haver uma única transferência para o nível K , entre outras possíveis.

O átomo pode regressar ao estado fundamental, ainda, por uma transição não radioactiva, pela qual a energia correspondente à transição do electrão do nível exterior para o inicialmente ionizado não é emitida para o exterior, mas vai originar o arrancamento de um outro electrão do mesmo átomo. Este processo é designado por “efeito Auger”. O efeito é, também, designado por “auto-ionização”. Tal como na excitação por fluorescência, o fotoelectrão tem energia igual à diferença de energia dos níveis entre os quais se deu a transição menos a energia de ligação do nível de onde foi arrancado o segundo electrão. Se o nível ionizado for k e se der uma transição de um electrão do nível L com arrancamento de um electrão no nível M a energia M , a energia do fotoelectrão é:

$$E = (E_k - E_L) - E_M \quad (1.3.2)$$

Os rendimentos destes dois processos (fluorescência e efeito de Auger) podem ser comparados, como se pode ver na figura 6. Define-se rendimento de fluorescência para a camada K , (\square), como a razão entre o número de fótons emitidos e o número de lacunas criadas em K [39]; e define-se o rendimento do Efeito de Auger, (----), como a razão entre o número de electrões de Auger emitidos e o número de vagas criadas. Por observação desta mesma figura, verifica-se uma dependência do número atómico Z .

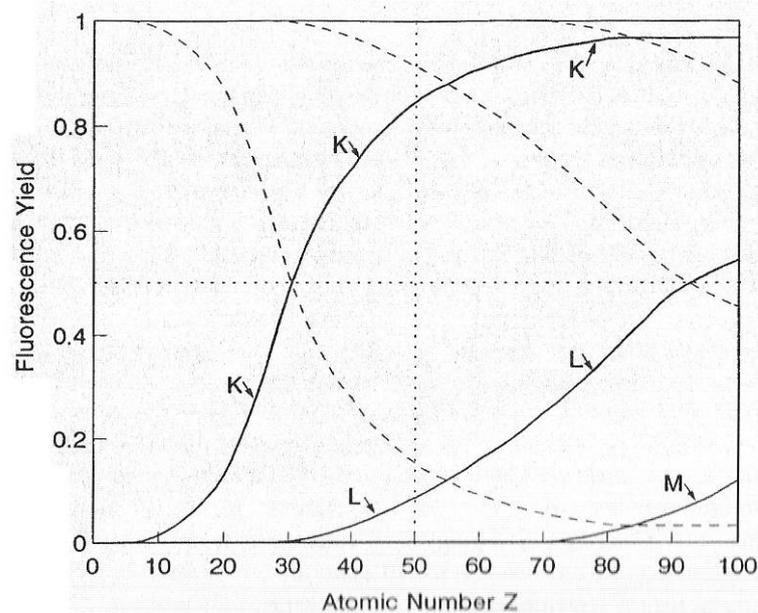


Figura 6 – Rendimento de fluorescência (___) e electrões de Auger (----) em função do número atómico Z do emissor [37].

3.1.2 Processos de Interação da Radiação Electromagnética com a matéria

3.1.2.1 Efeito fotoeléctrico

Foi em 1886 e 1887 que Heinrich Hertz realizou as experiências que pela primeira vez confirmaram a existência de ondas electromagnéticas e a teoria de Maxwell sobre a propagação da luz. Um desses factos paradoxais e fascinantes na história da ciência é que Hertz tenha notado, no decorrer das suas experiências, o efeito que Einstein usou para contradizer outros aspectos da teoria electromagnética clássica. Hertz descobriu que uma descarga eléctrica entre dois eléctrodos ocorre mais facilmente quando se faz incidir sobre um deles luz ultravioleta. Lenard, seguindo alguns experimentos de Hallwachs, mostrou logo em seguida que a luz ultravioleta facilita a descarga ao fazer com que os electrões sejam emitidos da superfície do cátodo. A emissão de electrões de uma superfície, devido à existência de luz sobre essa superfície, chama-se efeito fotoeléctrico.

No processo de absorção fotoelétrica, um fóton X (ou gama) incidente interage com um dos electrões do átomo, transmitindo-lhe toda a sua energia. O electrão (este electrão é usualmente designado por fotoelectrão) é ejectado do átomo, ficando este ionizado. O fotoelectrão tem uma energia igual a:

$$E_{e^-} = h\nu - W_i \quad (1.3.3)$$

Onde:

E_{e^-} : energia cinética do fotoelectrão;

$h\nu$: energia do fóton incidente e

W_i : energia de ligação do electrão ao nível i .

Para que exista a ionização de um dado nível atómico é necessário que o fóton incidente tenha energia superior à energia de ligação do electrão ao núcleo. Tem então que se verificar a seguinte condição $h\nu > W_i$. A probabilidade para que a interacção do fóton com os electrões do átomo se faça por efeito fotoelétrico toma o valor máximo para valores da energia do fóton ligeiramente superiores à energia de ligação: $h\nu \cong W_i$.

A explicação do efeito fotoelétrico deve-se a Einstein e os resultados desta teoria podem resumir-se nas leis seguintes:

- A energia dos electrões emitidos depende apenas da frequência da radiação incidente e da energia W_i , característica do nível do elemento emissor.
- A energia dos electrões emitidos é independente da intensidade da radiação incidente, mas o número de electrões depende dessa intensidade.
- Se a frequência da radiação incidente for inferior a um certo valor, frequência limite, não se produz efeito fotoelétrico.

A figura 7 corresponde à representação gráfica da variação da secção eficaz em função da energia do fóton.

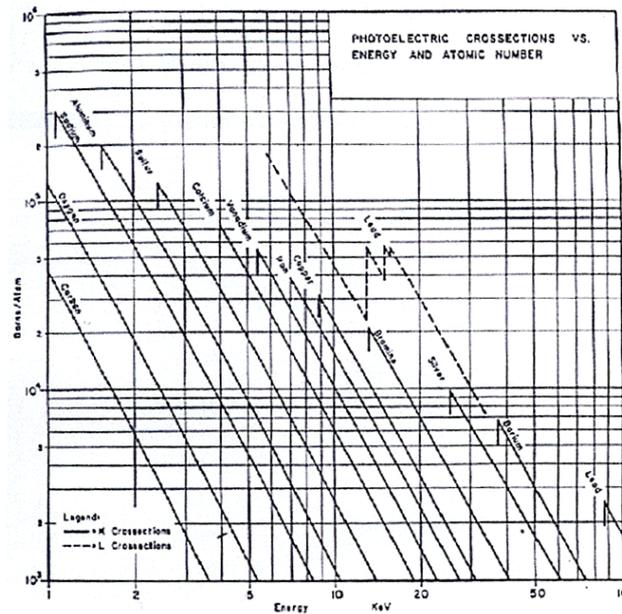


Figura 7 – Secção eficaz do efeito fotoelétrico em função da energia do fóton e do número atômico [41].

Entende-se por secção eficaz a medida da probabilidade de ocorrer absorção de energia. Analisando o gráfico, verifica-se que a secção eficaz do efeito fotoelétrico é máxima quando a energia do fóton é superior à energia de ligação do electrão ao núcleo. Verifica-se, ainda, que a probabilidade diminui rapidamente com o aumento da energia do fóton, e que é nula quando a energia do fóton é menor que a energia de ligação. Além disso, a probabilidade deste efeito é função do número atômico do elemento em estudo, para uma dada energia.

Pode acontecer que a energia libertada não saia do átomo, mas sim, que seja absorvida por este, libertando-se um novo electrão. A este efeito competitivo não radioactivo chama-se efeito de Auger, referido anteriormente.

3.1.2.2. Difusão de Rayleigh, elástica ou coerente

Este efeito é caracterizado por uma difusão elástica, e resulta da interacção entre o fóton incidente e os electrões “ligados” do átomo. É um processo onde os fótons da radiação emitida são difundidos pelos electrões ligados ao átomo e em que nenhuma ionização ou excitação é possível. Como os electrões do átomo não absorvem energia (pois o fóton apenas induz a vibração do sistema electrónico), a radiação é reemitida com a mesma energia [41]. Uma manifestação da difusão elástica é a difracção de raios-X nos cristais. A

radiação é difundida em direcções selectivamente definidas pela lei de Bragg ($n\lambda = 2dsen\theta$).

3.1.2.3 Difusão de Compton, inelástica ou incoerente

Este fenómeno de difusão tem natureza de um choque elástico entre o fotão incidente e um electrão “livre” do átomo (um dos electrões mais fracamente ligados ao átomo). Os fotões colidem com os electrões do átomo, como se fossem electrões livres, sendo emitida radiação de menor energia e normalmente numa direcção diferente da direcção de incidência.

A energia da radiação emitida depende apenas da direcção segundo a qual é emitida, de acordo com a equação seguinte:

$$h\nu' = \frac{h\nu}{1 + \frac{h\nu}{m_0c^2(1 - \cos\theta)}} \quad (1.3.4)$$

onde:

m_0c^2 é a energia do electrão em repouso;

θ é o ângulo entre a direcção da radiação incidente e a direcção da radiação emitida.

A expressão anterior dá-nos a relação entre as energias dos fotões primários, $h\nu$ e difundidos $h\nu'$.

Verifica-se que a energia do fotão difundido depende não só da energia do fotão incidente como também do ângulo θ , que faz a direcção da radiação difundida com a da radiação incidente.

Convém ainda referir que o aparecimento de fotões difundidos não elasticamente no sistema de detecção impõe algumas considerações relacionadas com a excitação, sensibilidade e limites de detecção, que serão explicados posteriormente.

Como se pode ver da figura 8, para ângulos próximos de 90° minimiza-se claramente a radiação difundida por difusão inelástica.

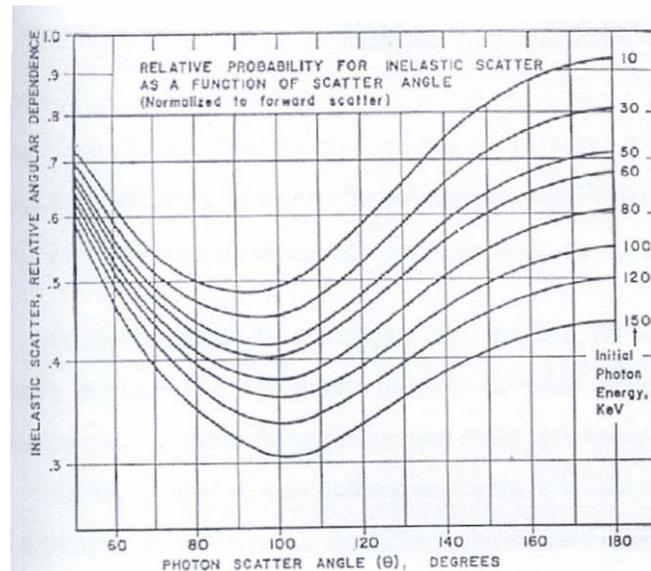


Figura 8 – Probabilidade relativa para dispersão inelástica em função do ângulo de dispersão [41].

Comparando os três principais efeitos pode-se concluir que:

- para o efeito fotoelétrico, as descontinuidades da curva de secção eficaz (figura 9) correspondem à emissão de um electrão, e que a probabilidade máxima ocorre quando a energia do fóton é ligeiramente superior à energia de ligação. A probabilidade deste efeito é função de Z^3 .
- as condições da difusão elástica são favorecidas para fótons de baixas energias (figura 9) e números atômicos elevados, onde os electrões estão mais ligados. Por outro lado, a dependência da difusão elástica de Z^2 .
- as condições de difusão não elástica são beneficiadas para fótons de alta energia (figura 9), sendo a probabilidade desta difusão proporcional a Z (pois está relacionada com o número de electrões “livres”).

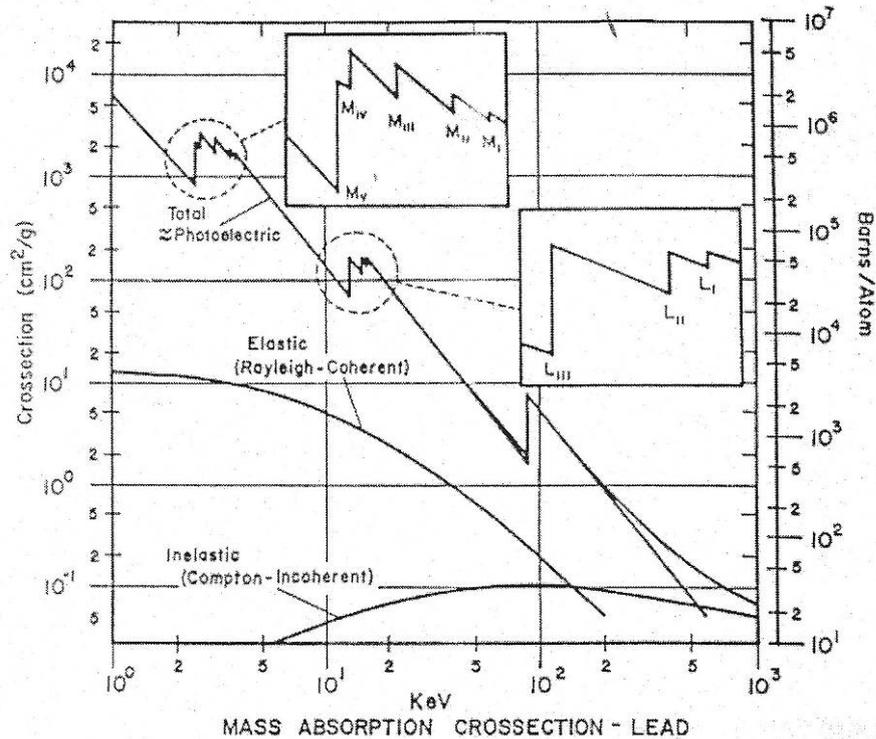


Figura 9 – Secção eficaz – Chumbo [41].

3.1.3 Absorção da radiação X

Quando um feixe de raios-X atravessa um alvo, a intensidade do feixe transmitido I é atenuada logisticamente. De acordo com a equação de absorção clássica, se o feixe incidente, de intensidade I_0 , percorre uma distância x , então o coeficiente de atenuação é

$$\mu = -\left(\frac{1}{x}\right) \ln\left(\frac{I}{I_0}\right) \quad (1.3.5)$$

μ é designado por coeficiente de atenuação linear (ou secção eficaz macroscópica), e representa a atenuação do feixe por unidade de comprimento, sendo a sua unidade o cm^{-1} . Este coeficiente de atenuação depende da energia dos raios-X, do número atómico dos átomos constituintes, e do seu estado de agregação, ou seja, depende da quantidade de átomos por unidade de volume [43]. Assim a sua determinação torna-se mais complicada, sendo mais conveniente usar o coeficiente mássico de atenuação, μ_m , que é independente do estado físico da matéria,

$$\mu_m = \frac{\mu}{\rho} \quad (1.3.6)$$

onde ρ é a densidade da amostra.

Se a atenuação do feixe for devida a vários tipos de interacção, então μ_m é a soma dos coeficientes correspondentes,

$$\mu_m = \frac{\mu}{\rho} = \frac{\mu_f}{\rho} + \frac{\mu_r}{\rho} + \frac{\mu_c}{\rho} \quad (1.3.7)$$

sendo μ_f do efeito fotoeléctrico, μ_r da interacção de Rayleigh, e μ_c da interacção de Compton [40]. E se existir mais do que um elemento, como cada elemento tem o seu coeficiente de atenuação para a mesma radiação,

$$\mu_m = \sum C_i \mu_m \quad (1.3.8)$$

onde C_i é a concentração de cada elemento.

Assim, podemos escrever a intensidade em função do coeficiente mássico de atenuação,

$$I = I_0 e^{-(\mu_f + \mu_r + \mu_c)x} \quad (1.3.9)$$

Os coeficientes de atenuação são funções monótonas do comprimento de onda da radiação incidente, λ , e também do número atómico do meio atenuante, Z (sendo excepção o efeito fotoeléctrico), na ausência de descontinuidades, e assim

$$\mu_m = k\lambda^3 Z^4 \quad (1.3.10)$$

sendo K uma constante [41].

3.2 Espectroscopia de raios-X de energia dispersiva (EDXRF)

É uma análise simples, não destrutiva, o material analisado pode ter formas diversas e estados diferentes, sendo independente da estrutura química; a preparação da amostra é fácil e o sistema está adequado a amostras de várias formas e tamanhos e sem qualquer perigo de contaminações; tem capacidade de analisar vários elementos em simultâneo; permite analisar elementos até uma concentração de 1ppm.

O espectrómetro de raios-X, para análise elementar de uma dada amostra, é composto por duas partes fundamentais: o sistema de produção de raios-X e o sistema de detecção de radiação característica.

3.2.1 Sistemas de Excitação

O sistema de excitação consiste na utilização de um tubo de raios-X. Este tubo é essencialmente um tubo de vácuo, que contém um cátodo aquecido (emissor de electrões) e um ânodo metálico (de cobre, molibdénio, prata, etc.) ou alvo. As paredes do tubo são metálicas ou de vidro com chumbo na sua composição, tem uma entrada de água para arrefecer o ânodo (devido ao choque de electrões, que são partículas com massa), e tem uma “janela” de vidro em chumbo ou de berílio, por onde sai a radiação X (figura 3).

Depois de produzido, o feixe de raios-X passa para o exterior do tubo através de uma fina “janela” de berílio ou de um vidro especial sem chumbo, sendo então colimado para limitar a divergência dos raios-X que incidem sobre a amostra.

3.2.2 Sistemas de detecção da radiação característica

A função de um detector de raios-X é converter as energias dos fotões X em impulsos de tensão, os quais podem então ser contados, determinando-se o fluxo total dos raios-X. Os detectores actualmente utilizados são detectores “proporcionais”, os quais têm a propriedade de que a energia do fotão da radiação X que chega ao detector determina o tamanho do impulso de tensão de saída, o “output”. Assim consegue-se fazer a discriminação da tensão, de que resulta uma gama de impulsos de tensão que passam no circuito [44].

A detecção de partículas com carga e de radiação electromagnética está relacionada com fenómenos que ocorrem durante a interacção da radiação com a matéria. Para a detecção de raios-X os detectores mais usados são:

- contadores proporcionais – são câmaras de ionização que contém uma substância (normalmente um gás), que se ioniza quando partículas carregadas a atravessam. Estes iões são atraídos por um campo eléctrico, existente entre o cátodo e o ânodo do contador. O número total de cargas obtido, resultante da ionização, origina um impulso proporcional à energia da radiação incidente. Se a tensão aumenta ao nível de saturação, os iões iniciais produzem iões secundários por colisão com o gás. Assim, a primeira ionização é multiplicada por um factor que depende da tensão aplicada pela geometria do contador.

- contadores de cintilação – consistem num cristal luminescente (plástico, líquido, orgânico e inorgânico) e num foto-multiplicador. Como resultado da interacção com partículas

carregadas, os átomos do cristal são excitados e aproximadamente durante 10^{-8} s emitem fótons de luz visível e ultravioleta, a qual é transmitida a um foto-multiplicador.

- contador semiconductor – utiliza-se um semiconductor sólido (por exemplo de silício - lítio), cujo funcionamento é idêntico ao do contador proporcional [45].

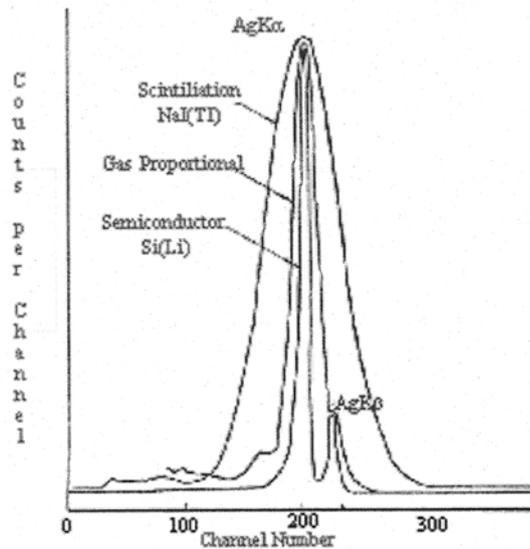


Figura 10 – Capacidade de resolução para os três detectores de raios-X [36].

A figura 10 permite comparar o poder de resolução dos três tipos de detectores. Com um detector de cintilação obtém-se um único pico; com o detector proporcional, a gás, o pico resultante está mais resolvido que o anterior, mas é com um contador de Si (Li) que é possível distinguir k_α de k_β .

3.2.2.1 Detector de Si (Li)

Os detectores de dispersão em energia mais utilizados na espectroscopia de raios-X são os detectores de Si (Li).

A configuração básica destes detectores consiste um cristal de silício (tipo *p*) com contactos de ouro nas suas extremidades. Este cristal é dopado com lítio obtendo-se um bloco semiconductor, com características *p* de um lado (zona do Si com baixa concentração de Li) e *n* do outro (região em que existe Li em excesso).

Polarizando o cristal em sentido inverso (pólo positivo em n e o negativo em p), forma-se na zona central uma região que é essencialmente desprovida de portadores, ou seja, onde o Li e as impurezas tipo p do Si se compensam mutuamente. Um detector deste tipo é chamado de diodo pin (*p type-insulator-n type*). Assim, a corrente que atravessa o circuito é fraca, a não ser que a radiação ionizante atinja a zona de depleção e crie pares electrão-lacuna, que são imediatamente recolhidos devido à tensão aplicada, com a correspondente produção de um impulso de corrente.

No processo acima referido, quando a radiação proveniente da amostra atinge o detector, os fótons actuam sobre a zona sensível provocando ionização, o que origina a criação de pares electrão-lacuna, necessitando cada par de cerca de 3,8 eV para a sua formação. Como esta energia corresponde a cerca de 1/10 da necessária para a libertação de um electrão, por ionização de uma molécula gasosa, a radiação absorvida pelos semicondutores fornecerá cerca de 10 vezes mais cargas mensuráveis, o que melhora o cálculo estatístico do resultado, e uma maior resolução, em função da energia do fóton incidente. Os pares electrão-lacuna têm energia suficiente para vencerem o hiato de energia da banda proibida do semiconductor, sendo promovidos para a banda de condução. Aí os portadores de carga movem-se sob acção do campo eléctrico estabelecido na região activa, sendo posteriormente recolhidos. Como à temperatura ambiente a condutividade da zona de depleção (condutividade intrínseca do Si) é muito elevada, os detectores de Si (Li) têm que ser operados a temperaturas baixas geralmente à temperatura do azoto líquido (77 K). As baixas temperaturas também são essenciais para evitar a difusão do Li da zona de depleção para a zona onde o Li não se chegou a difundir. Em geral, esta difusão só constitui um problema quando existe tensão aplicada ao detector.

Como a energia necessária para produzir um par electrão-lacuna é bem definida, o número total de carga recolhidas é directamente proporcional à energia da radiação X absorvida. No entanto, nas configurações usuais dos detectores de Si (Li) isto nem sempre acontece uma vez que existe uma distorção do campo eléctrico na superfície lateral da região activa que conduz a uma recolha incompleta de carga banda de condução.

Na figura 10, as curvas referem-se à detecção das radiações $K_{\alpha,\beta}$ da prata, empregando cada um dos referidos detectores.

A principal desvantagem dos detectores de semicondutores é a elevada mobilidade do lítio que origina uma deterioração das características do aparelho, sendo necessário mantê-lo, como se referiu anteriormente, à temperatura do azoto líquido.

O detector utilizado é um semicondutor, de Si (Li), de elevada resolução, sendo as suas características: detector Si (Li) de 50 mm² de área de cristal, janela de berílio de 8 µm de espessura com contacto metálico de ouro (≈ 200 Å), camada de silício de 0,1 µm, e resolução de 130 eV para a radiação K α do magnésio (5,9 keV). Este detector dispersivo em energia permite a detecção de radiação X numa grande gama de energias (1 a 100 keV), e tem uma eficiência muito elevada.

3.2.2.2 Energia de resolução

A resolução que descreve a dispersão do impulso de tensão produzido pelo detector em torno do seu valor médio é uma das características mais importantes quando se quer classificar uma técnica de fluorescência de raios-X. Apesar de vir registado o valor da resolução nos manuais do detector, é aconselhável verificar esta propriedade, pois nem sempre coincide com o enunciado pelo fabricante. A resolução do detector é determinada pela largura a meia altura de um pico (*FWHM* – do inglês *Full Width at Half Maximum*), normalmente a linha K mais intensa (K α) do Fe ou do Mn.

Para calcular a FWHM (Figura 11) começa-se por registar o número de contagens máximo do pico em questão. Em seguida divide-se esse valor por dois (para obter a meia altura) e procura-se, à direita e à esquerda do máximo, os valores em energia que correspondem a metade da contagem máxima. A diferença de energia entre esses dois valores é a resolução do detector.

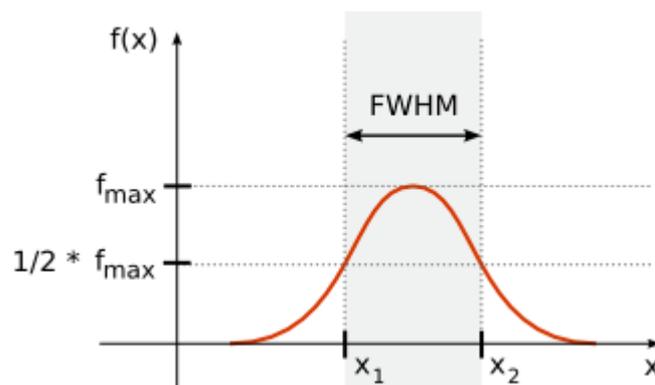


Figura 11 – Ilustração da Largura a Meia Altura.

Quanto maior for a resolução, melhor será o detector, pois significa que menor será a capacidade de separar picos de energia muito próximos.

Os valores obtidos para a resolução (FWHM) relativamente aos seguintes elementos puros são: 140 eV ($K\alpha$ - Fe, 6.413 keV); 150 eV ($K\beta$ - Fe, 7.077 keV); 160 eV ($K\alpha$ - Cu, 8.035 keV) ver figura 12.

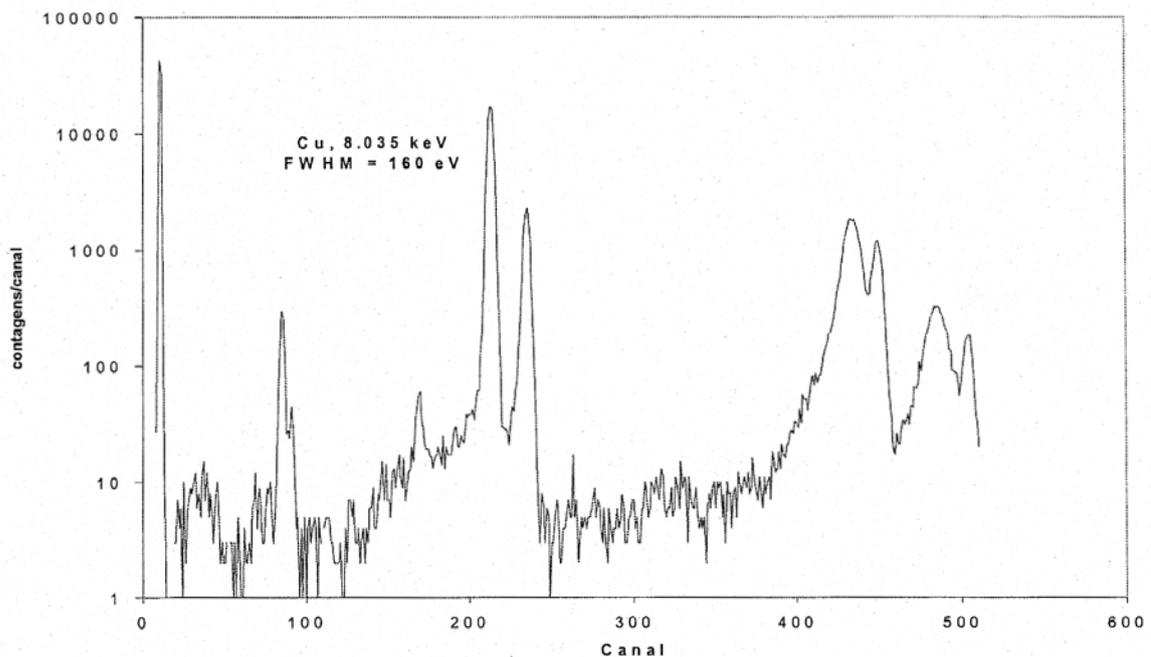


Figura 12 – Espectro obtido para cobre puro.

3.2.2.3 Eficiência de detecção

A eficiência do detector de Si (Li) para um pico de uma dada energia e altura pode ser determinada pelo conhecimento da forma e tamanho do cristal. Na prática, os fabricantes fornecem valores nominais das dimensões, que podem ser incertos devido aos efeitos da captação incompleta das cargas perto da aresta do volume activo. Para além do mais, o detector é normalmente montado dentro de um criostato sob vácuo para permitir o seu arrefecimento às temperaturas do azoto líquido. E o espaço exacto entre a fonte e o detector é por vezes difícil de determinar. Assim, é por vezes necessário determinar experimentalmente a eficiência do detector recorrendo a fontes de calibração. Esta tarefa é complicada pelo facto de existirem poucas fontes standard disponíveis na gama de energia 5 a 50 keV, pelo que é necessário recorrer a métodos alternativos em que se recorre a

radioisótopos. Tal como para outros detectores de estado sólido é conveniente realizar a calibração da eficiência periodicamente, pois esta varia ao longo do tempo.

A eficiência a baixas temperaturas é dependente da espessura dos materiais da janela ou das camadas inertes associadas com o detector e com o criostato (mesmo alguns centímetros de ar entre a fonte e o detector podem provocar atenuações significativas). Os detectores de silício têm uma eficiência relativamente boa na maioria da gama de energias dos raios-X, pelo que os detectores de Si (Li) são muito utilizados nessas regiões energéticas.

3.2.2.4. Calibração do detector

A calibração do detector é realizada com materiais de referência da National Bureau of Standards, tendo-se neste caso utilizado “Orchard leaves” – standard 1571. Este material de referência está certificado e é adequado para a calibração de aparelhos e métodos utilizados na análise de materiais biológicos de elementos de maior ou menor constituição e elementos traço. Os valores são certificados para amostras de aproximadamente 250 mg do material total liofilizado (NBS, 1971).

Por comparação dos valores indicados a tabela 3 pode afirmar-se que o detector utilizado é adequado à investigação de vários elementos traço existentes em espécies biológicas.

Elementos	Concentrações Certificadas NBS ($\mu\text{g/g} \pm \text{SD}$)	Concentrações Obtidas neste trabalho ($\mu\text{g/g} \pm \text{SD}$)
P	2100 \pm 100	2000 \pm 100
S	2300*	2306 \pm 100
K	14,700 \pm 300	15,300 \pm 900
Ca	20,900 \pm 300	21,500 \pm 1000
Mn	91 \pm 4	95 \pm 5
Fe	300 \pm 20	310 \pm 20
Ni	1,3 \pm 0,2	Abaixo do LMD
Cu	12 \pm 1	13 \pm 1
Zn	25 \pm 3	26 \pm 2
As	14 \pm 2	13 \pm 2
Se	0,008 \pm 0,01	Abaixo do LMD
Br	10*	10,6 \pm 0,8
Rb	12 \pm 1	12,5 \pm 0,8
Sr	37*	36 \pm 2
Pb	45 \pm 3	42 \pm 2

Tabela 3 – Comparação das concentrações ($\mu\text{g g}^{-1}$, peso seco) de orchard-leaves standard, SRM 1571 (National Bureau of Standards) obtidas no presente trabalho e os valores certificados com o respectivo desvio padrão (SD). *valor não certificado

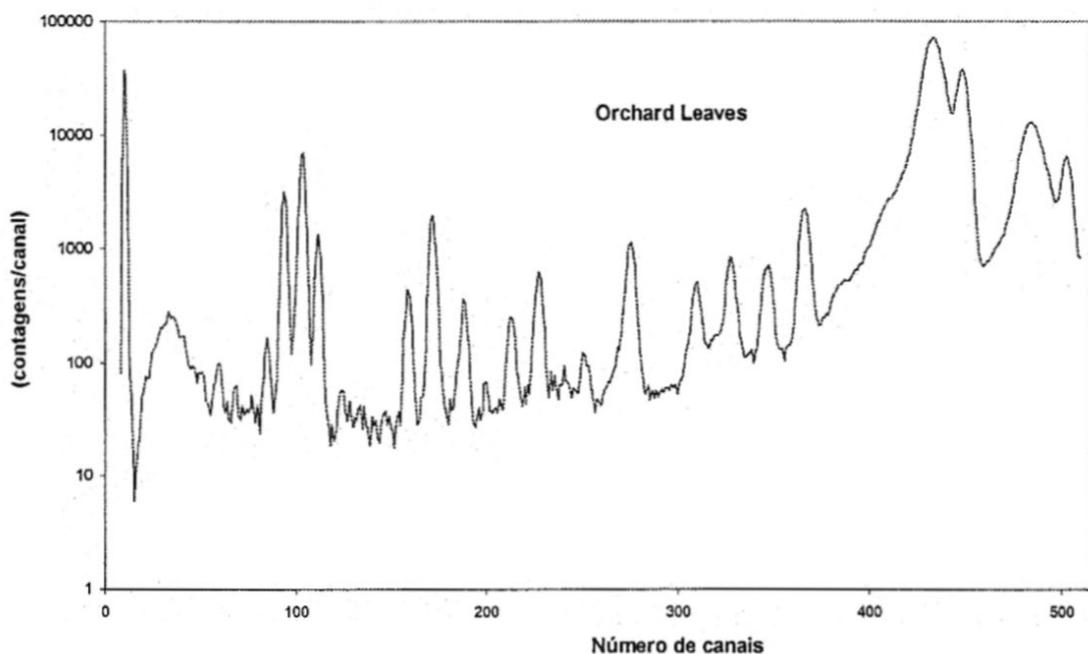


Figura 13 – Espectro obtido neste trabalho para a NBS standart 1571 “orchard leaves”.

O espectro desta amostra (NBS standart 1571 “orchard leaves”; $\approx 30\text{mg/cm}^2$) pode ser observado na figura 13. A razão pico fundo é aproximadamente 21,4 para o pico de Sr(K α) a 14,1keV e aproximadamente 30,9 para o pico Pb(L α) +As(K α) a 10,5keV. Estes valores podem ser comparados com os publicados [46], os quais são: aproximadamente 22 para o pico de Sr(K α) a 14,1keV e aproximadamente 40 para o pico de Pb(L)+As(K α) a 10,5keV. A optimização desta razão pico/fundo é necessária para melhorar os limites mínimos de detecção.

3.2.2.5 Limites de detecção

O limite de detecção de um elemento, para determinada técnica, é a quantidade de massa ou concentração mínima desse elemento que é possível detectar numa amostra.

Em espectroscopia de fluorescência de raios-X dispersiva em energia, o resultado analítico é baseado na intensidade do espectro de raios-X (número de contagens registadas no detector). Este número é calculado a partir do número total de contagens numa dada região, subtraída a intensidade correspondente ao ruído de fundo.

O número total, N , de fótons X, correspondente a uma certa energia, obedece a uma distribuição de Poisson. Nesta distribuição o desvio padrão é dado por:

$$\sigma = \sqrt{N} \quad (1.3.11)$$

Havendo assim uma certa probabilidade de que o verdadeiro resultado N_0 do número de contagens esteja entre $N \pm \sqrt{N}$. O erro relativo é dado por

$$\varepsilon = \frac{\sqrt{N}}{N - \sqrt{N}} \quad (1.3.12)$$

sendo óbvio que o erro diminui quando o número de contagens aumenta.

O número N de contagens engloba as contagens referentes ao pico do elemento, N_p , e ao fundo contínuo que se lhe sobrepõe, N_f

$$N = N_p + N_f \quad (1.3.13)$$

Para determinar o número de contagens correspondentes ao pico é pois necessário fazer a determinação do valor que corresponde ao fundo, sendo necessário realizar duas medições independentes e o desvio padrão é igual à soma das duas contribuições

$$\sigma = (\sigma_p^2 + \sigma_f^2)^{1/2} \quad (1.3.14)$$

o desvio padrão relativo é:

$$\varepsilon = \frac{\sigma_p^2}{N - N_f} \quad (1.3.15)$$

A intensidade de uma risca num espectro de raios-X decresce com a diminuição da concentração do respectivo elemento da amostra, até que desaparece no fundo, para valores de concentração muito baixos.

Considerando que a determinação do número de contagens N é repetido n vezes, no caso de n ser grande a distribuição das medições segue uma distribuição Gaussiana. Das propriedades desta distribuição, para que um certo número de contagens seja significativamente diferente do fundo com 95% de probabilidade, é necessário que a intensidade detectada, ou seja o número de contagens, seja

$$N > N_f + 2\sigma_f \quad (1.3.16)$$

Se exigirmos uma precisão de 99,7% de grau de confiança então deverá ser

$$N > N_f + 3\sigma_f \quad (1.3.17)$$

A intensidade do pico depois de retirado o fundo será $3\sigma_f$ e o limite mínimo de detecção é dado por

$$LMD = C_i \frac{3\sigma_f}{I_p} = C_i \frac{3(N_f)^{1/2}}{N_p} \quad (1.3.18)$$

Onde C_i é a concentração do elemento i .

O Limite Mínimo de Detecção (μgg^{-1}) é o parâmetro mais significativo no que diz respeito à sensibilidade do método.

Desta expressão resulta que o LMD depende inversamente do tempo de contagem e directamente da intensidade da radiação de fundo (se aumentar o tempo ou se diminuir a intensidade, o LMD diminui, sendo uma vantagem para elementos de baixas concentrações na amostra).

3.2.3 Análise de espectros

Numa primeira fase procede-se à escolha estatística dos picos com significado, isto é, tem de se ter o cuidado de não se seleccionar picos falsos, devido à flutuação estatística, para não se perderem picos de baixa intensidade com significado real. Muitos picos aparecem sobrepostos e assim sendo o programa de tratamento deve estar apto a distingui-los.

3.2.3.1 Espectros

A figura 14 mostra um espectro de uma amostra de material biológico, que contém elementos traço. Este tipo de espectro pode dividir-se em três regiões.

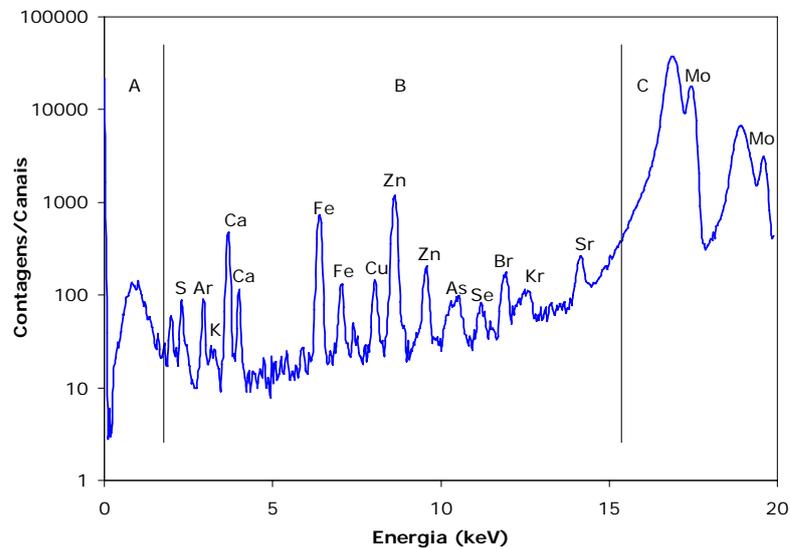


Figura 14 – Espectro obtido neste trabalho com material biológico.

Na gama de baixas energias, correspondendo ao extremo mais à esquerda dos espectros (região A), o pico existente deve-se a efeito de Compton no próprio detector, enquanto que a região intermédia (região B) dos espectros contém os picos de interesse para análise da amostra, sobrepostos com a radiação de fundo.

Na região direita (região C) dos espectros existem quatro picos intensos correspondendo à difusão de radiação do Molibdénio (alvo secundário). A identificação desses picos pode ver-se na figura 14 e corresponde respectivamente à difusão de Compton e à difusão elástica das radiações k_{α} e K_{β} do molibdénio.

Os picos estão identificados em função do respectivo elemento. Esta identificação tem por base as energias de ionização características de cada elemento das transições L e K.

Existem múltiplos processos físicos inerentes a esta técnica, que contribuem para esta radiação de fundo, limitando assim a deteção de elementos vestigiais.

As principais origens para a radiação de fundo são:

- sobreposição dos picos de fluorescência característicos da amostra com a radiação excitadora. Este efeito é particularmente significativo quando a excitação se faz com um tubo de raios-X pois a radiação contínua de frenagem constitui um fundo bastante intenso ao ser difundida na amostra sobretudo por efeito de Compton;

- contaminação com radiação correspondente à excitação dos materiais que constituem o espectrómetro;

A radiação difundida não é utilizada para a fluorescência mas é registada pelo detector, sobrepondo-se aos picos característicos o que limita a sensibilidade do espectrómetro. Este efeito é particularmente significativo quando a radiação excitadora não é absolutamente monocromática, pois as componentes de mais baixa energia não provocam qualquer excitação na amostra sendo somente difundida por esta, este efeito é bastante importante em amostras cuja matriz tenha um número atómico baixo.

A utilização de radiação monocromática juntamente com uma geometria triaxial (figura 15) aumenta significativamente a sensibilidade, o que permite identificar os elementos traço existentes em menor concentração facilitando e oferecendo maior rigor na caracterização quantitativa da amostra.

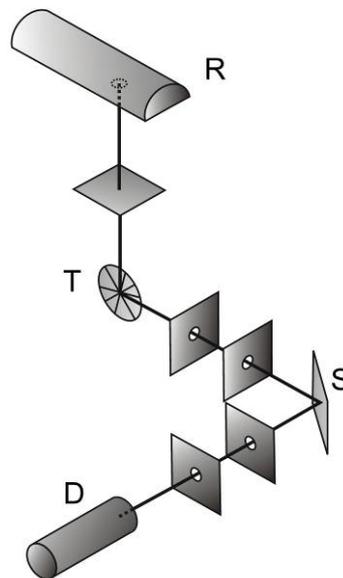


Figura 15 – Esquema de geometria triaxial do espectrómetro de raios X: R – tubo de raios X; T – alvo secundário; S – amostra; D – detector [47].

3.2.3.2 Pré-Amplificador, Amplificador e Analisador de Multicanal

Depois do detector absorver a radiação, a informação é transmitida na forma de um impulso de carga. A corrente produzida por estes electrões é transformada num impulso de tensão

através de um condensador e uma resistência (função de integração), sendo formado por cada fóton incidente um impulso de tensão digital.

Em seguida, os sinais eléctricos provenientes do pré-amplificador são encaminhados para o amplificador onde são amplificados e processados. É essencial que este dispositivo mantenha as características da amplitude do sinal e que elimine o ruído electrónico.

Finalmente, o sinal segue para o analisador multicanal (MCA – do inglês *MultiChannel Analyzer*) que armazena e conta o número de impulsos de tensão, cuja amplitude se situa dentro de cada intervalo discreto correspondente a um canal. A relação intensidade/energia para um feixe de raios-X é registada digitalmente. Desta forma, fótons de energias diferentes dão origem a impulsos de tensão diferentes e, através de um analisador de multicanal, a picos distintos do espectro de raios-X (Figura 16).

É de notar que este analisador deve conseguir manter a definição espectral que se encontra presente no sinal. Assim, variando o sinal com incrementos infinitesimais, o analisador multicanal deve dividir este contínuo num número finito de canais a que corresponde valores de tensão bem determinados. No que respeita à definição, é regra que existam pelo menos cinco canais cobrindo cada pico.

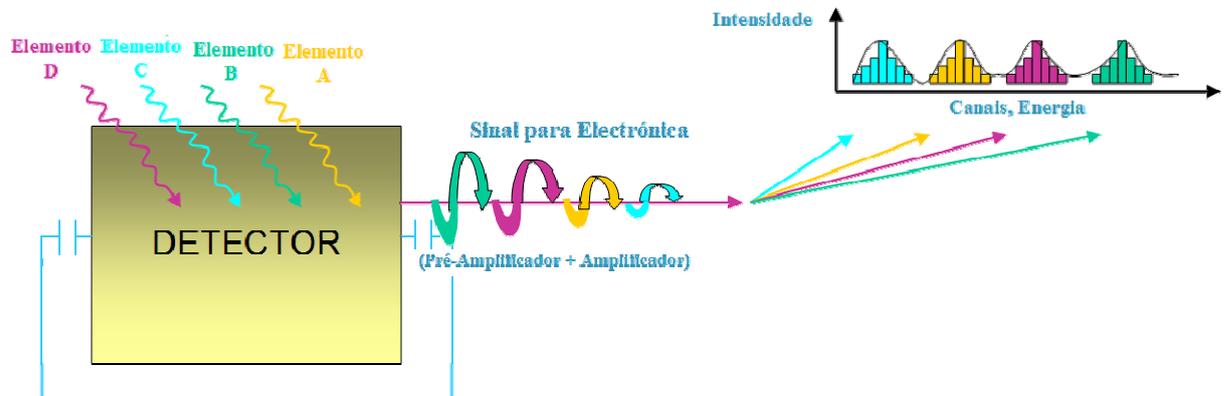


Figura 16 – Esquema da electrónica associada ao Espectrómetro EDXRF.

3.2.4 Análise Quantitativa

A análise quantitativa consiste na determinação dos elementos presentes numa amostra, com a informação da sua quantidade relativa. Uma das grandes virtudes da análise por fluorescência de raios-X consiste na velocidade e facilidade na qual a análise quantitativa pode ser realizada.

3.2.4.1 Determinação das concentrações

Após a obtenção de um espectro do tipo do da figura 14 pode-se em seguida determinar a concentração dos diferentes elementos presentes na amostra. Para tal é preciso anteriormente efectuar os seguintes passos:

- Determinar a energia correspondente a cada pico observado no espectro;
- Identificar cada elemento por comparação da energia dos picos detectados, com as energias tabeladas correspondentes aos diferentes elementos;
- Determinar a intensidade de cada radiação a partir do número total de contagens obtidas por integração da área correspondente a cada pico, subtraída do fundo;
- Determinar a concentração dos elementos tabelados.

A determinação da concentração dos elementos detectados é obtida através da resolução da seguinte expressão:

$$I_i = I_0 K_i A_i m C_i \quad (1.3.19)$$

onde:

I_i é a intensidade de uma radiação X característica do elemento i ;

I_0 é a intensidade inicial da radiação;

K_i é o factor de calibração experimental;

A_i é o factor de atenuação;

m é a massa superficial da amostra (gcm^{-2});

C_i é a concentração do elemento i na amostra (μgg^{-1} ou ppm);

Um feixe de radiação incide na amostra com um ângulo θ_1 , e a fracção fluorescente deixa a amostra com um ângulo θ_2 (ver figura 17). Estes raios percorrem uma distância x , cujo valor é determinado pelo coeficiente de absorção para aquele comprimento de onda. E a radiação fluorescente, de energia E_i tem origem a uma profundidade d , da superfície da amostra dada por $d = x \sin \theta_2$. Durante este percurso, a radiação (incidente e fluorescente) é absorvida pela amostra até chegar à superfície. Estes fenómenos são tidos em conta nos termos C_i e α_i .

$$C_i = (1 - \exp - \alpha_i) / \alpha_i \quad (1.3.20)$$

Sendo:

$$\alpha_i = \sum C_j [\mu(E_{0,j}) / \text{sen} \theta_1 + \mu(E_{i,j}) / \text{sen} \theta_2] m \quad (1.3.21)$$

onde $\mu(E_{0,j})$ é o coeficiente de atenuação para o elemento j, para a energia E_0 do fóton; $\mu(E_{i,j})$ é o coeficiente de atenuação para o elemento j, para a energia E_i do fóton; E_0 é a energia da radiação incidente; E_i é a energia da radiação característica do elemento i; θ_1 é o ângulo da radiação incidente; e θ_2 é o ângulo da radiação emitida pela amostra (figura 17).

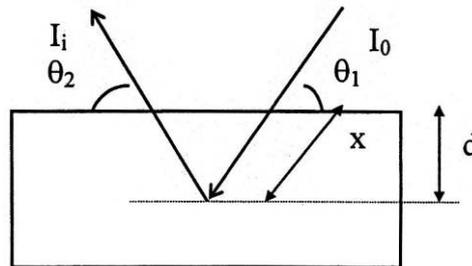


Figura 17 – Esquema de radiação incidente e emitida da amostra.

O termo K_i tem em conta, na sua determinação, os factores:

- parâmetros característicos da montagem experimental: o ângulo sólido do detector, Ω (que é aproximadamente constante para todos os elementos da amostra); a eficiência, ε_i (que não varia muito para a gama das energias estudadas); e absorção da radiação na janela do detector e no trajecto do ar. C_i' é muito elevado para as baixas energias – dos elementos de número atómico menor que 13 mas muito mais baixo para valores de número atómico superior a 20);
- o rendimento de fluorescência, ω_i (é também muito baixo para elementos de baixo número atómico, e próximo de 1 para elementos de elevado número atómico);
- a secção eficaz de ionização, σ_i (depende apenas da relação entre a energia de radiação incidente e energia de ionização do nível a ionizar, tendo valores máximos para valores mínimos desta diferença);
- a probabilidade de transição do nível n par m, do elemento i, P_{n-m} (a qual tem uma variação pouco significativa com o número atómico).

$$K_i = \Omega \varepsilon_i C_i' \omega_i \sigma_i P_{n-m} \quad (1.3.22)$$

É pela variação destes parâmetros que este método não é indicado para a determinação quantitativa de elementos de número atômico inferior a 13.

Neste trabalho o cálculo das concentrações a partir das áreas dos picos é baseado no designado método dos parâmetros fundamentais. Neste método as funções e os parâmetros utilizados, que relacionam as intensidades dos picos com as concentrações elementares, têm significado físico. Isto significa que os cálculos podem ser executados com uma única calibração válida para todas as amostras. Se elementos leves, não detectáveis, estiverem em abundância, algumas das estimativas das quantidades desses elementos têm de ser fornecidas [48].

3.3 Espectroscopia de raios X de Reflexão Total (TXRF)

3.3.1 Introdução

A fluorescência de raios-X dispersiva em energia, EDXRF, tem sido amplamente usada, desde o aparecimento dos detectores de estado sólido (Ge (Li) e Si (Li)), devido à sua versatilidade no que respeita ao carácter multielementar, rapidez e baixo custo por análise. No entanto, quando se torna necessário aumentar a sensibilidade da análise por forma a detectar valores inferiores ao nanograma, para determinados elementos, há que garantir que o sinal de fluorescência obtido desses elementos, se distinga inequivocamente do fundo no espectro de raios-X. Para além da ionização dos átomos da amostra, outros tipos de interações da radiação primária com a amostra e o seu suporte ocorrem (referido anteriormente), com os processos de difusão elástica e inelástica, os quais são responsáveis pelo elevado fluxo de fótons difundidos, e conseqüentemente elevadas taxas de contagens, que não só limitam a resposta do sistema de detecção como produzem radiação de fundo elevada. Assim, a redução do fundo nos espectros é o principal objectivo de qualquer melhoramento neste tipo de técnicas, originando a evolução das mesmas.

A fluorescência de raios-X de reflexão total, TXRF é uma variante da fluorescência de raios-X dispersiva em energia cuja diferença essencial reside na reflexão total do feixe de radiação X primária na superfície opticamente plana e reflectora do suporte da amostra em forma de alvo fino (ver figura 18). O ângulo de incidência do feixe de radiação excitadora, considerando que é o ângulo formado pelo feixe e pelo plano do suporte da amostra, para uma instalação convencional de EDXRF é cerca de 45° enquanto que para TXRF é de poucos minutos de arco, para ser inferior ao ângulo crítico a que ocorre a reflexão total. Em

1971 Yoneda e Horiuch [37] de um modo não tradicional direccionaram um feixe de raios-X primário, num suporte de vidro de quartzo polido, que serviu como suporte da amostra, no qual os ângulos de incidência foram tão pequenos que ocorreu o fenómeno de reflexão total. A amostra a ser analisada tinha sido depositada na superfície de um suporte. Assim, quantidades abaixo dos 10^{-9} g tornaram-se detectáveis pela primeira vez usando o sistema de detector de raios-X de energia dispersiva. Assim sugeriram, pela primeira vez, que o fundo poderia ser reduzido fazendo da reflexão total dos raios-X incidentes numa amostra convenientemente preparada e colocada num suporte reflector de radiação X. Mais tarde, Aiginger e Wobrauschek [37], retomaram este princípio desenvolvendo a técnica e investigando os seus fundamentos físicos, conseguindo desde o início resultados de limites de detecção na ordem do nanograma. Inspirados por publicações, Knoth e Schwenke no final dos anos 70, desenharam um módulo de reflexão total compacto estável e facilmente ajustável e foram capazes de aumentar a performance da técnica TXRF até limites de detecção inferiores a 5 pg (10^{-12}) para alguns metais. Isto foi decisivo para a introdução do método, na prática de análise de elementos em concentrações ultra traço.

Na técnica de TXRF o efeito da reflexão total dos raios-X é explorado de modo a evitar a penetração da radiação primária na superfície do suporte da amostra. Os fotões que não são absorvidos na amostra são totalmente reflectidos no suporte do reflector, não ocorrendo virtualmente, interacção do feixe incidente com o suporte da amostra. Assim, a difusão da radiação é drasticamente reduzida, conduzindo a valores da razão de contagens pico/fundo muito elevadas, relativamente aos obtidos por EDXRF. Os equipamentos de TXRF disponíveis no mercado, permitem atingir limites de detecção absolutos na ordem do picograma.

O fenómeno de reflexão total da radiação X dá origem a duas utilizações distintas da técnica de TXRF: análise elementar de amostras finas colocadas sobre suportes reflectores, fazendo uso da reflectividade elevada do suporte da amostra e análise de superfícies baseada na baixa profundidade de penetração dos raios-X em incidência rasante.

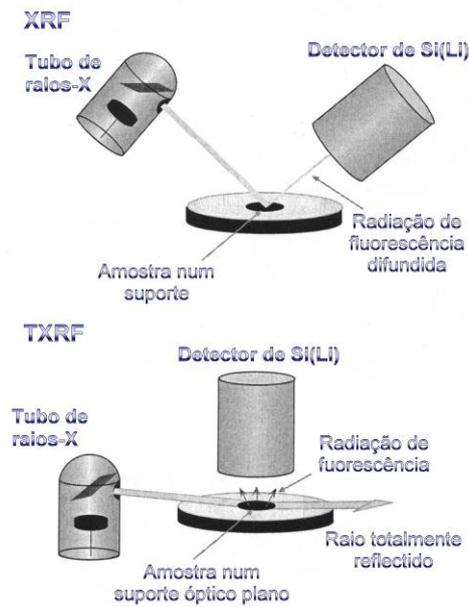


Figura 18 – Comparação da geometria do raio de excitação/detecção para XRF clássico e para TXRF [37].

3.3.2 Deflexão dos Raios-X

Num meio homogéneo um raio de raios-X apenas se comporta como um raio de Luz se seguir um caminho a direito no qual os fotões viajam. Mas se o raio atingir o limite da superfície de um meio secundário, o raio X incidente irá ser desviado da direcção inicial, isto é, o raio é parcialmente reflectido no meio inicial e refractado no segundo meio.

3.3.2.1 Reflexão e Refracção

De acordo com a figura 19, as seguintes regras são válidas:

O raio incidente, reflectido e refractado formam o plano;

Os ângulos do raio incidente e do raio reflectido são iguais:

$$\alpha_1 = \alpha_1^* \quad (1.3.23)$$

Os ângulos do raio incidente e do raio refractado seguem a Lei de Snell:

$$v_1 \cos \alpha_1 = v_2 \cos \alpha_2 \quad (1.3.24)$$

onde v_1 e v_2 são as velocidades fase do raio no meio 1 e 2, respectivamente. A velocidade fase é a velocidade à qual os planos de fase constante se propagam dentro de um meio. É dependente do comprimento de onda λ e do próprio meio. No vácuo, a velocidade fase tem um valor c (velocidade da luz) independente do comprimento de onda λ .

A divisão da equação (1.3.23) pela velocidade da luz c resulta:

$$n_1 \cos \alpha_1 = n_2 \cos \alpha_2 \quad (1.3.25)$$

Onde n_1 e n_2 são índices de refração absolutos do meio 1 e 2, respectivamente, os quais são definidos por:

$$n_{1,2} = c/v_{1,2} \quad (1.3.26)$$

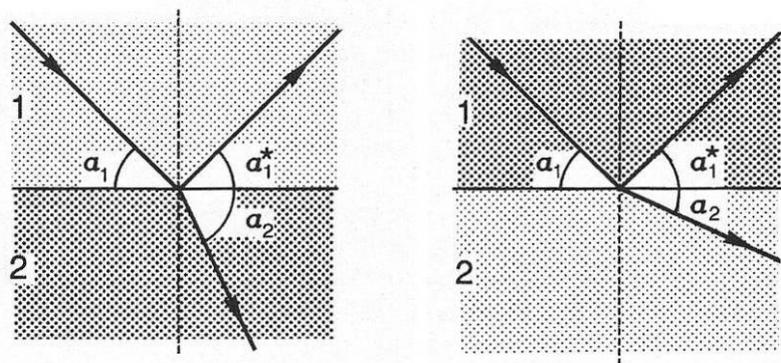


Figura 19 – O raio incidente, reflectido e refractado na interface do meio 1 e 2. No esquema da esquerda, o meio 2 é opticamente mais denso que o meio 1 ($n_2 > n_1$); no esquema da direita acontece o “inverso” ($n_2 < n_1$) [37].

Os dois casos podem ser diferenciados, como é mostrado na figura 19. Se $n_2 > n_1$, isto é, se o meio 2 é opticamente mais denso que o meio 1, o raio refractado no meio 2 irá aproximar-se da normal. Se $n_2 < n_1$, isto é se o meio 2 é opticamente menos denso que o meio 1, o raio refractado no meio 2 irá aproximar-se da separação dos dois meios.

O índice de refração n é uma quantidade decisiva e pode ser derivada da teoria de Lorentz assumindo que as ligações quase elásticas dos electrões que constituem os átomos são forçadas a oscilações por radiação primária. Como resultado a oscilação dos electrões radiam com diferente fase. Por sobreposição de ambas as radiações a primária é alterada na velocidade fase. Esta alteração torna-se aparente para um índice refractivo modificado, desviando-se do valor no vácuo $n_{vac} = 1$ por uma quantidade δ .

Se a absorção não pode ser negligenciada mas tem de ser tida em conta, o índice refractivo n tem de ser escrito como uma quantidade complexa. Convencionalmente, n tem de ser escrito por:

$$n = 1 - \delta - i\beta \quad (1.3.27)$$

Onde i é o número imaginário ou a raiz quadrada de -1. A parte real do índice refractivo correspondente é $n' = 1 - \delta$.

A componente imaginária β é uma medida de atenuação. Pode ser expressa por:

$$\beta = \frac{\lambda}{4\pi} \left(\frac{\mu}{\rho} \right) \rho \quad (1.3.28)$$

A componente real δ , chamado o decremento, mede o desvio da parte real n' do índice refractivo por unidade; δ determina a velocidade fase v de acordo com $v \approx c/(1 - \delta)$, o qual pode ser maior que a velocidade da luz (para os raios-X com valores δ positivos, a velocidade de fase v excede a velocidade de luz c). Da teoria vem que δ pode ser escrito como [49]:

$$\delta = \frac{N_A}{2\pi} r_e \rho \frac{1}{A} [f_0 + f(\lambda)] \lambda^2 \quad (1.3.29)$$

Onde N_A = número de Avogrado = $6,022 \times 10^{23}$ átomos/mol; r_e = raio clássico do electrão = $2,818 \times 10^{-13}$ cm; ρ = densidade (em g/cm³) do respectivo elemento; A = massa atómica (em g/mol); λ = comprimento de onda do raio primário; f_0 é quantidade para que o raios-X é igual ao número atómico Z ; e $f(\lambda)$ é o termo de correlação [50] que é decisivo ($E \leq E_j$, ou $\lambda \geq \lambda_j$) e é geralmente negativo. Consequentemente, δ inclui algumas constantes de matéria e mais do que isso depende fortemente do λ . Esta dependência é conhecida como a dispersão e é demonstrado na figura 20 para os elementos Cu e Au.

Para raios-X primários mais pequenos em comprimento de onda que o limite de absorção, os valores f desaparecem e a equação anterior pode ser simplificada:

$$\delta = \frac{N_A}{2\pi} r_e \rho \frac{Z}{A} \lambda^2 \quad (1.3.30)$$

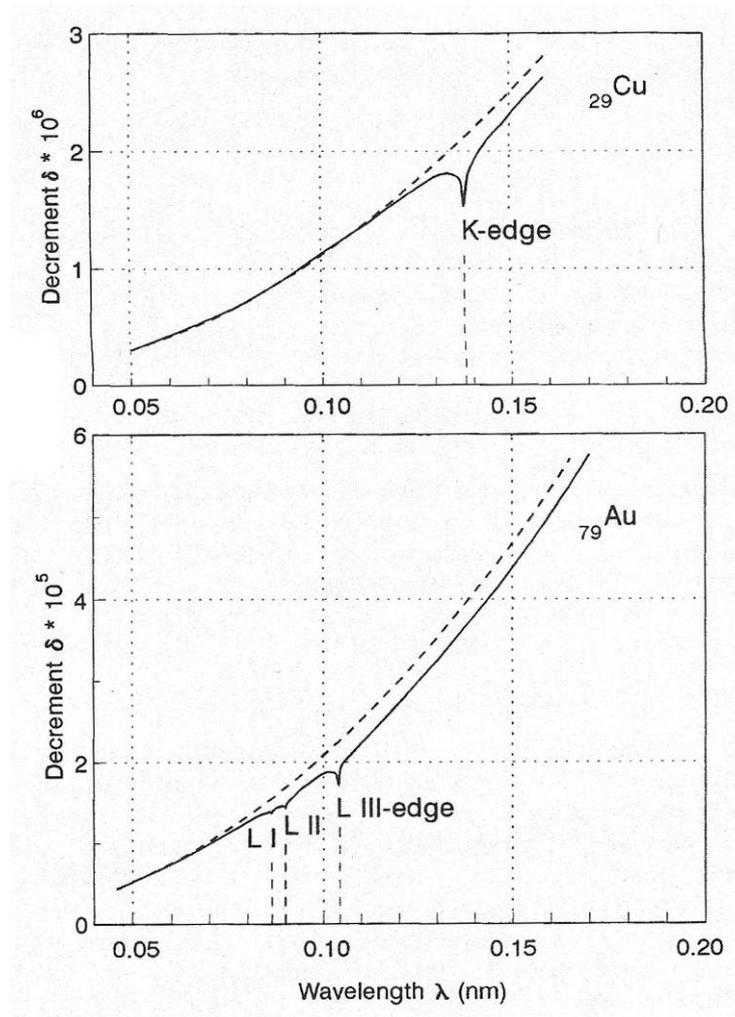


Figura 20 – Dependência do decremento δ no comprimento de onda λ para os elementos Cu e Au. A teoria é baseada em oscilações forçadas dos electrões que constituem os átomos (devido à radiação electromagnética de raios-X). No comprimento de onda da ressonância ou no limite de absorvância, o decremento mostra uma grande variação. Uma aproximação assintótica para os comprimentos de onda pequenos é ilustrada pela linha a tracejado [50].

Para os raios-X, a quantidade δ é maioritariamente na ordem dos 10^{-6} e a parte real $1 - \delta$ do índice refractivo é de algum modo mais pequeno que 1. O sinal menos em $1 - \delta$ reflecte o facto das ligações dos electrões seguirem os fotões excitantes devagar, isto é, com oposição de fase. A pequena quantidade de δ é devida às pequenas amplitudes das oscilações dos electrões. Porque a frequências elevadas dos fotões

correspondem pequenos comprimentos de onda de raios-X, apenas pequenas amplitudes podem existir.

3.3.2.2. Reflexão Total Externa

Para os raios-X, qualquer meio é opticamente menos denso que o vácuo ($n' < n_{vac} = 1$) e qualquer sólido é opticamente menos denso que o ar ($n' < n_{ar} \approx 1$). Isto resulta normalmente num raio refractado que é deflectido em direcção à separação dos dois meios (figura 19 da direita). Se o respectivo ângulo α_2 for zero, o raio refractado emerge tangencialmente para superfície de separação dos meios. Consequentemente, existe um ângulo mínimo crítico $\alpha_1 = \alpha_{crit}$ para o qual a refacção é possível. De acordo com a equação (1.3.25), o ângulo de incidência é determinado por:

$$\cos \alpha_{crit} = n_2 \quad (1.3.31)$$

Para ângulos α_1 ainda mais baixos que α_{crit} , a equação (1.3.25), dá um valor não real para ângulos de refacção α_2 , uma vez que o co-seno não pode ser maior do que 1. Nestes casos nenhum dos raios penetra no segundo meio, eles são completamente reflectidos para o meio de onde vieram como se a separação dos meios fosse um espelho ideal. O fenómeno é chamado de reflexão total.

O ângulo crítico da reflexão total pode ser facilmente calculado a partir da equação (1.3.31). Uma vez que α_{crit} é pequeno, o co-seno também pode ser aproximado por:

$$\cos \alpha_{crit} \approx 1 - \frac{\alpha_{crit}^2}{2} \quad (1.3.32)$$

A combinação da equação (1.3.27) leva à seguinte relação:

$$\alpha_{crit} \approx \sqrt{2\delta} \quad (1.3.33)$$

A aplicação da equação (1.3.30) dá a seguinte aproximação:

$$\alpha_{crit} \approx \frac{1,65}{E} \sqrt{\frac{Z}{A}} \rho \quad \text{graus} \quad (1.3.34)$$

Onde E tem de vir em KeV e ρ em g/cm^3 para que o α_{crit} venha em graus. Como já mencionado para a equação (1.3.30), esta aproximação é exactamente válida para energias de fóton E acima do limite da absorção decisiva do material.

Na origem da reflexão total, cálculos extensivos têm sido feitos tendo em conta a refração complexa dos ângulos α_2 com a parte real e imaginária. No entanto, é possível tornar esta tarefa mais fácil, uma vez que uma aproximação simples pode ser aplicada para pequenos ângulos considerados na óptica de raios-X.

De acordo com a figura 19 (esquema da direita), os raios-X são assumidos para percorrer através do vácuo e atingir o meio num ângulo α_1 . Neste caso, o ângulo α_2 do raio refractado tem de ser considerado complexo. Da Lei de Snell (1.3.25) têm-se:

$$\alpha_2 \approx \sqrt{\alpha_1^2 - 2\delta - 2i\beta} \quad (1.3.35)$$

Onde δ e β são propriedade do índice refractivo complexo n do meio. Os componentes real e imaginário destes ângulos, α_2' e α_2'' , respectivamente, podem ser escritos como:

$$\alpha_2'^2 = \frac{1}{2} \left[\sqrt{(\alpha_1^2 - 2\delta)^2 + (2\beta)^2} + (\alpha_1^2 - 2\delta) \right] \quad (1.3.36)$$

$$\alpha_2''^2 = \frac{1}{2} \left[\sqrt{(\alpha_1^2 - 2\delta)^2 + (2\beta)^2} - (\alpha_1^2 - 2\delta) \right] \quad (1.3.37)$$

Ambos os componentes são representados na figura 21 para raios-X $Mo - K\alpha$ atingindo uma superfície de silicone lisa. A componente real α_2' é dominante na distância acima do ângulo crítico α_{crit} e é assintoticamente igual a α_1 para ângulos grandes. A componente imaginária α_2'' é decisiva para ângulos abaixo do α_{crit} para pequenos ângulos. Ambos os componentes tornam-se iguais no ângulo crítico e correspondem

$\sqrt{\beta}$, a qual é extremamente pequena. Ainda mais, o produto de ambos os componentes é sempre igual a β independente do ângulo de incidência sobre o vidro α_1 :

$$\alpha_2' \cdot \alpha_2'' = \beta \quad (1.3.38)$$

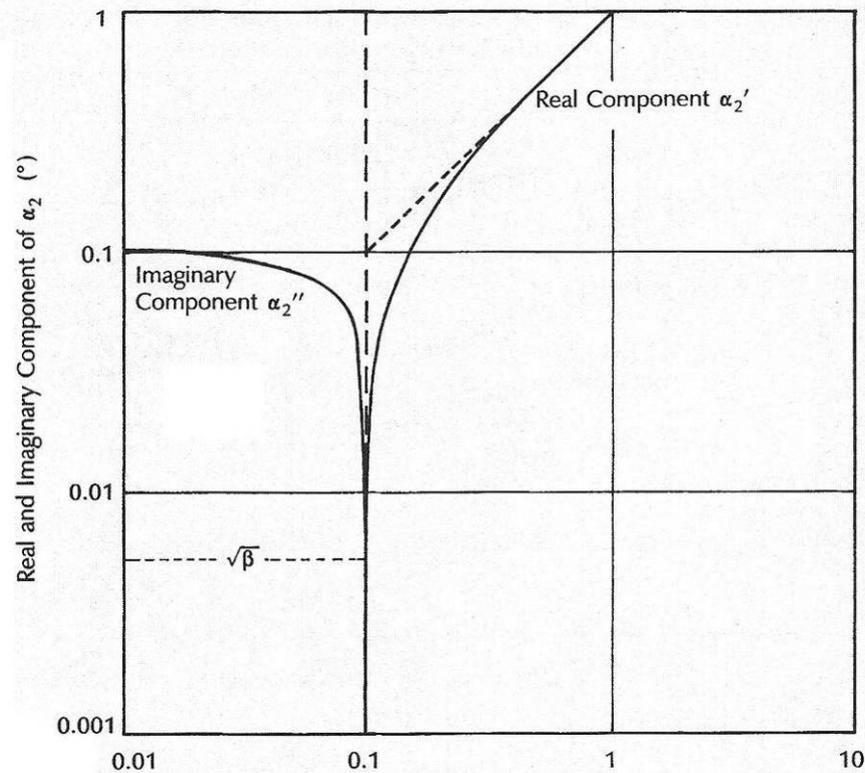


Figura 21 – Componente real e imaginária num traçado logarítmico duplo, determinando o ângulo α_2 do feixe de raios-X refractado dependente do ângulo α_1 do feixe incidente. Cálculo para raios-X, Mo- $K\alpha$ atingindo uma superfície achatada de silicone acima e abaixo do ângulo crítico da reflexão total que aumenta até $0,1^\circ$ [37].

Esta relação pode ser facilmente verificada multiplicando as equações (1.3.36) e (1.3.37). É importante não esquecer duas importantes quantidades que caracterizam a reflexão total:

- a reflectividade R , a qual é aumentada para 100% abaixo do ângulo α_{crit} ;
- a profundidade de penetração Zn , a qual é reduzida a poucos nanómetros neste caso.

Ambas as quantidades podem ser calculadas a partir da teoria da onda electromagnética harmónica e plana.

3.3.2.2.1 Reflectividade

A reflectividade R é definida como a razão entre a intensidade do feixe reflectido e a do incidente. A determinação desta grandeza é importante porque permite avaliar as condições de reflexão total, uma vez que está intimamente relacionada com o ângulo rasante do feixe incidente e pode ser derivada das fórmulas de Fresnel. Estas fórmulas bem conhecidas relacionam os vectores do campo electromagnético do raio reflectido e transmitido com os do raio incidente [51]. Para ângulos incidentes considerados aqui, as amplitudes E_1 , E_1^* e E_2 dos vectores do campo eléctrico são expressas pelas seguintes fórmulas:

$$\frac{E_1^*}{E_1} = \frac{\alpha_1 - \alpha_2}{\alpha_1 + \alpha_2} \quad (1.3.39)$$

$$\frac{E_2}{E_1} = \frac{2\alpha_1}{\alpha_1 + \alpha_2}$$

Estas fórmulas são válidas independentemente da polarização do raio incidente devido aos ângulos pequenos α_1 e α_2 assumidos. A reflectividade e transmissividade surgem depois da magnitude absoluta ao quadrado. A reflectividade R é dada por:

$$R = \left| \frac{\alpha_1 - \alpha_2}{\alpha_1 + \alpha_2} \right|^2 \quad (1.3.40)$$

Com a ajuda dos componentes α_2' e α_2'' o ângulo complexo α_2 , da reflectividade pode ser calculado:

$$R = \frac{(\alpha_1 - \alpha_2')^2 + \alpha_2''^2}{(\alpha_1 + \alpha_2')^2 + \alpha_2''^2} \quad (1.3.41)$$

Resultam três aproximações muito úteis:

$$\begin{aligned} \alpha_1 \ll \alpha_{crit} : \quad R &\approx 1 - \sqrt{\frac{2}{\delta}} \frac{\beta}{\delta} \alpha_1 \\ \alpha_1 = \alpha_{crit} : \quad R &\approx \frac{\delta + \beta - \sqrt{(2\beta\delta)}}{\delta + \beta + \sqrt{(2\beta\delta)}} \\ \alpha_1 \gg \alpha_{crit} : \quad R &= \frac{\delta^2}{4\alpha_1^4} \end{aligned} \quad (1.3.42)$$

A dependência da reflectividade R no ângulo α_1 é demonstrada na figura 22. O efeito da reflexão total é mostrado para três elementos diferentes. Para ângulos de 1° ou mais, a reflectividade é abaixo de 0,1%, independente da absorção, e geralmente pode ser omitida. Perto do ângulo α_{crit} , a reflectividade sobe para valores altos. Contudo a subida para os 100% é mais gradual, depende da absorção ou atenuação quantitativa de β . O ângulo α_{crit} determina a inflexão da curva. Para meios pouco absorventes como a silicone, a reflectividade mostra uma transição diferente maior. Por esta razão a silicone e o vidro de quartzo e Plexiglas são utilizados como suportes de amostras em TXRF.

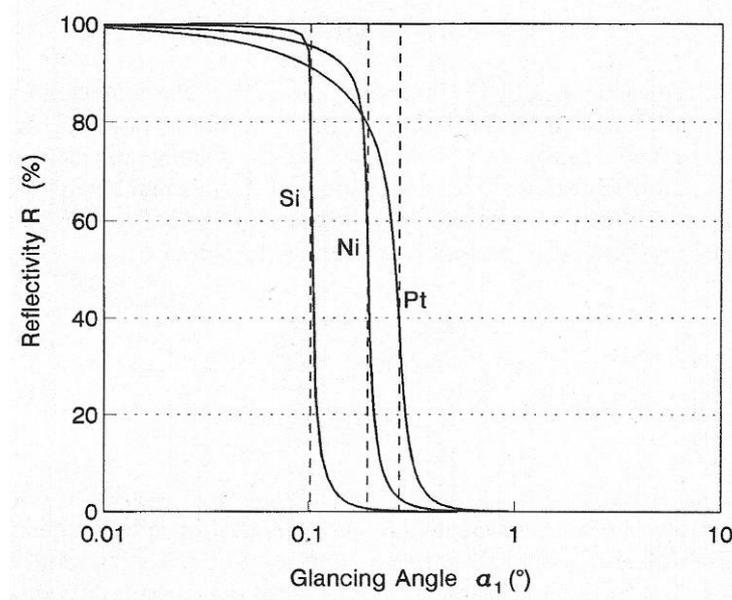


Figura 22 – A reflectividade R de três meios diferentes para o ângulo α_1 de raios X. As curvas foram calculadas para raios-X de $Mo - K\alpha$. Reflexão abaixo do ângulo crítico α_{crit} é chamada de reflexão total. Estes ângulos são determinados pelo ponto de inflexão das curvas e estão marcados a tracejado [37].

As curvas da figura 22 foram calculadas para raios-X de $Mo - K\alpha$ com uma energia de fóton de 17,44 keV. Para energias elevadas, os valores α_{crit} são diminuídos para $1,65 / E$ de acordo com o termo da equação (1.3.34) e conseqüentemente as curvas são empurradas para a esquerda. Para baixas energias, elas são empurradas para a direita (ver a figura 23).

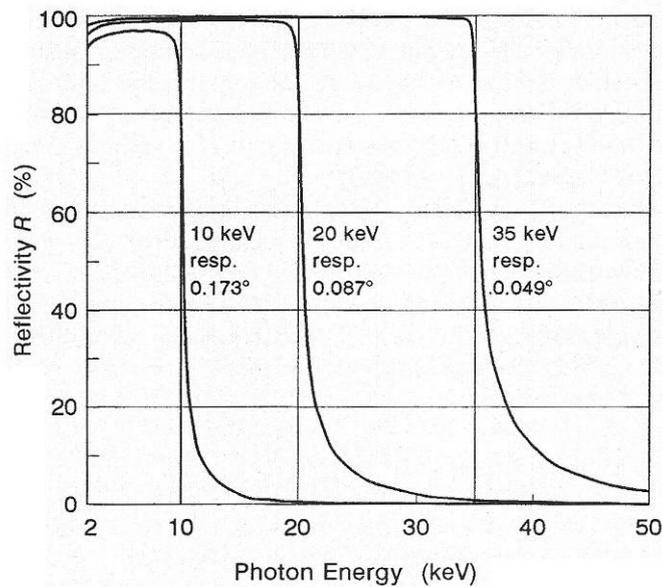


Figura 23 – Reflectividade R do vidro de quartzo actuando como um filtro de passo baixo. Três diferentes situações de energia e do ângulo estão representadas [37].

3.3.2.2 Profundidade de Penetração

A profundidade de penetração da radiação no material reflector é uma das características mais importantes em espectrometria de raios-X por reflexão total, no que respeita à redução do fundo nos espectros devido aos fenómenos de difusão no referido material. É definida pela profundidade que um feixe pode penetrar num meio homogéneo enquanto que a sua intensidade é reduzida para $\frac{1}{e}$, ou 37 % do valor inicial. Esta profundidade Z_n , a qual é normal na fronteira do meio, segue a seguinte equação:

$$Z_n \approx \frac{\lambda}{4\pi} \frac{1}{\alpha_2''} \quad (1.3.43)$$

Novamente três aproximações podem acontecer:

$$\alpha_1 \ll \alpha_{crit} : \quad Z_n \approx \frac{\lambda}{4\pi} \frac{1}{\sqrt{2\delta}}$$

$$\alpha_1 = \alpha_{crit} : \quad Z_n \approx \frac{\lambda}{4\pi} \frac{1}{\sqrt{\beta}} \quad (1.3.44)$$

$$\alpha_1 \gg \alpha_{crit} : \quad Z_n \approx \frac{\lambda}{4\pi} \frac{\alpha_1}{\beta}$$

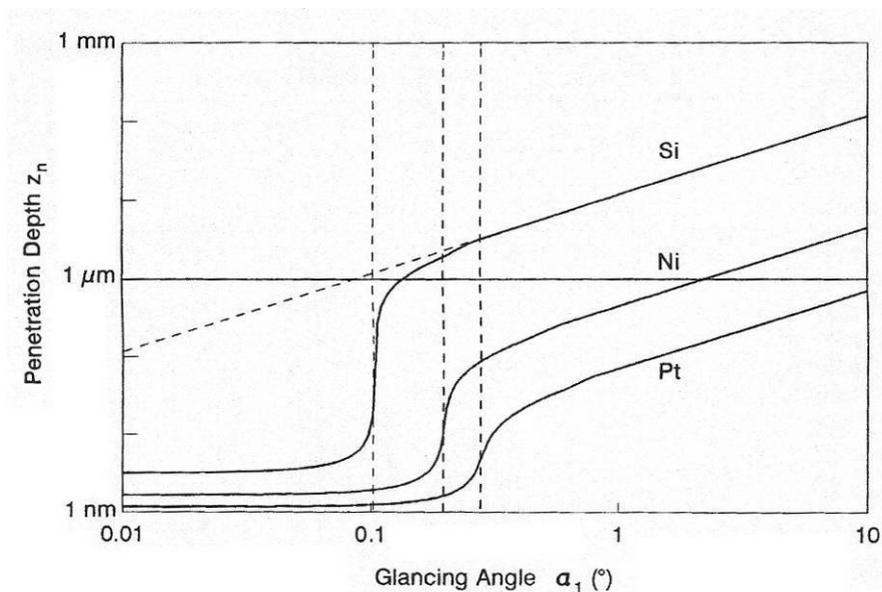


Figura 24 – Profundidade de penetração Z_n de raios-X atingem três diferentes meios a ângulos variáveis α_1 . As curvas foram calculadas para raios-X de Mo- $K\alpha$ com energia de fóton de 17,44 KeV. Os ângulos críticos estão marcados por linhas verticais a tracejado. A linha oblíqua a tracejado representa a profundidade de penetração numa superfície rugosa de Si para a qual a reflexão total desaparece [37].

A figura 24 mostra uma apresentação logarítmica dupla de profundidade de penetração dependente do ângulo α_1 para três elementos já considerados na figura 22 para ângulos acima de $0,5^\circ$, a profundidade de penetração diminui linearmente com o ângulo e os valores da profundidade são da ordem de $0,1$ - $10 \mu m$. No ângulo crítico α_{crit} , a profundidade de penetração diminui drasticamente especialmente para o meio não

absorvente como a silicone. Abaixo deste ângulo crítico, a profundidade de penetração atinge um nível constante de apenas poucos nanômetros.

O efeito da reflexão total apenas é conseguido quando o meio (suporte da amostra) é liso e achatado. Para superfícies rugosas, a reflexão total desaparece. A profundidade de penetração diminui linearmente mesmo com um ângulo abaixo do ângulo crítico como mostra a figura 24 para a silicone.

As curvas da figura 24 foram calculadas para uma energia do fóton de radiação escolhida de Mo- $K\alpha$. A figura 25 mostra a influência de diferentes energias de fóton na profundidade de penetração, em silicone. Os pontos de inflexão alteram-se para ângulos críticos mais baixos com o aumento da energia do fóton. Além disso as curvas são esticadas para valores maiores de profundidade para reflexão normal, enquanto que os valores de profundidade para reflexão total permanecem constantes em

$$Z_0 \approx 3,424 \sqrt{\frac{A}{Z \rho}} \quad (1.3.45)$$

Onde ρ tem de vir em g/cm^3 para obter Z_0 em nm.

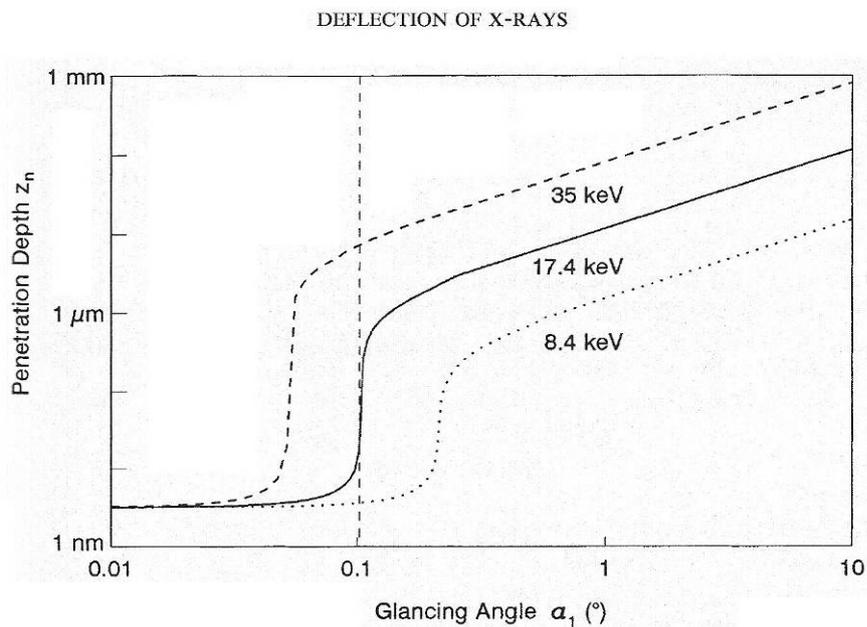


Figura 25 – Profundidade de penetração Z_n de raios-X atingindo silicone num ângulo α_1 variável. As curvas foram calculadas para três diferentes energias de fóton. A linha vertical a tracejado significa o ângulo crítico respectivo [37].

3.3.3 Características e requisitos da técnica de TXRF

3.3.3.1 Análise química

A técnica de TXRF começou por ser utilizada em amostras aquosas sendo, actualmente, maioritariamente aplicada na análise directa de amostras líquidas, soluções ou suspensões, das quais alíquotas de 2-50 μ l são pipetadas e secas, no centro de suportes reflectores. A técnica também é expedita para a quantificação elementar em sólidos, contando que estes sejam sujeitos previamente a uma preparação de amostra, geralmente à digestão ácida das mesmas. A aplicação de TXRF é ainda possível quando a quantidade de amostra é diminuta, sendo adequada à micro-análise. Pós muito finos podem ser analisados directamente ou preparados como suspensões, bem como é executável a análise qualitativa ou semi-quantitativa tanto de metais ou ligas, bastando para tal friccioná-los nos suportes reflectores, como de pinturas de objectos de arte, para identificação de pigmentos e ligantes, recorrendo ao processo não destrutivo de remoção de algumas partículas, esfregando muito suavemente com uma ponta de algodão na pintura, e transferindo-as para o suporte. Existe outro tipo de amostras para o qual a técnica de TXRF é bastante adequada que são os micrótomos de tecidos biológicos (tipo de amostras utilizadas neste estudo). Estas pequenas secções de tecidos com aproximadamente 10 μ m de espessura e 8mm de diâmetro são colocados nos suportes permitindo obter resultados de grande interesse em Medicina Ocupacional e em Patologia.

Em estudos recentes, a maior parte de materiais como os fluidos do corpo tais como sangue, soro, plasma e urina ou amostras de tecidos de biopsias de órgãos, tais como: ossos, cabelos ou unhas têm sido investigados por TXRF. A técnica mostrou ser especialmente adequada para análises traço de: sangue, soro de sangue e fluido amniótico e para micro-análises de: tecidos de órgãos, cabelos e placas dentais. Técnicas simples de preparação de amostras são utilizadas (referidas posteriormente), por exemplo, digestão micro-onda com ácido nítrico, ou congelamento e corte por um micrótomo. Limites de detecção como 20 ng/ml foram reportados para fluidos corporais e até 100 ng/g para tecidos de amostras. A certeza das determinações foi confirmada com a ajuda de materiais de referência certificados cujos resultados foram satisfatórios. Em adição às vantagens de determinação de multi-elementos reais, investigadores enfatizaram a facilidade da quantificação e do pequeno volume de amostra necessário. Esta última característica é especialmente importante para biopsias.

As áreas bem como o tipo de amostras onde a técnica de TXRF tem sido aplicada para análise química são apresentadas na tabela abaixo (tabela 4).

Área	Tipo de amostra
Ambiente	Águas – consumo humano, rios, mar, chuvas, residuais; particulado (matéria em suspensão); sedimentos; solos; aerossóis
Medicina	Tecidos; fluidos orgânicos
Biologia	Plantas; vegetais; alimentos
Industria Química	Reagentes; água ultrapura; metais
Mineralogia / Geologia	Microcristais; minerais
Arqueologia	Cerâmicas; moedas
Arte	Pinturas de objectos de arte
Estudos Forenses	Resíduos; partículas de tecidos; impressões digitais

Tabela 4 – Exemplos de áreas de aplicação da técnica de TXRF e respectivos tipos de amostras.

Todos os exemplos dados, de aplicação da técnica de TXRF, têm em comum a forma como se colocam as amostras sobre o suporte. Estas têm, obrigatoriamente, de formar depósitos finos sobre os reflectores de modo a que o critério de amostra fina seja verificado. Pois só assim podem ser desprezados os efeitos de matriz e se garante que a própria amostra não contribua de forma substancial para a difusão da radiação primária e conseqüente aumento do fundo espectral.

Como se referiu, a técnica de TXRF permite obter espectros de raios-X característicos para um grande número de elementos com elevadas razões pico/fundo relativamente aos obtidos pela técnica convencional de EDXRF. Existe por isso uma relação directa entre o fundo e os limites de detecção. É possível aferir a radiação de fundo, provocada pela difusão no suporte da amostra, a partir da fracção da radiação primária que é aí absorvida. É esta fracção disponível para o fundo que interessa quantificar.

3.3.3.2 Transferência de energia

O fundo num espectro de raios-X é causado pelas múltiplas interações do feixe primário com o suporte e a amostra, das quais se destacam as difusões elástica ou de Rayleigh e a inelástica ou de Compton, bem como pela retrodifusão de Compton dos fótons de alta energia no cristal do detector (referido anteriormente), a qual produz electrões de recuo causadores de fundo na região das baixas energias.

Consideremos então a radiação de fundo devido à difusão da radiação primária incidente num suporte reflector e representemos a intensidade por B . Podemos, então, descrever

$$B = CI_0 \text{sen}\phi(1 - R) \quad (1.3.46)$$

Onde C é a constante, $I_0 \text{sen}\phi$ é a componente da intensidade incidente (correspondente à energia transportada por unidade de tempo e por unidade de área) normal à superfície e R é a reflectividade definida na equação (1.3.41). O termo $(1-R)$ corresponde à fracção da radiação primária que não é reflectida e que por isso, está disponível para os processos de difusão no suporte. Desta forma, o termo $\text{sen}\phi(1 - R)$ representa a transferência de energia para o material constituinte do suporte [52].

A equação (1.3.46) contém a dependência angular da radiação de fundo, ou seja, quando o ângulo de incidência rasante se encontra abaixo do ângulo crítico, B tende para valores muito pequenos devido ao facto de R se aproximar de 1. Na realidade, quanto menor for o ângulo de incidência menor é a radiação de fundo. No entanto, ângulos inferiores a 2 minutos de arco não são conseguidos na prática, razão pela qual na maior parte dos sistemas de TXRF os ângulos rasantes tenham valores entre 3 a 4 minutos.

Uma das consequências mais importantes da transferência de energia reduzida e consequente diminuição brusca da radiação de fundo, abaixo do ângulo crítico de reflexão total, é a obtenção de limites de detecção extremamente baixos na técnica de TXRF.

3.3.3.3 Limites de detecção

Em espectroscopia de fluorescência de raios-X os limites de detecção C_L (anteriormente referido como LMD) para cada elemento dependem de dois factores, da sensibilidade S , para esse elemento, obtida na calibração do sistema ($S = \text{área do pico em contagens} / \text{concentração}$, onde a concentração desse elemento é conhecida à priori, garantida pela

utilização de padrões ou referências) e do fundo B. De acordo com a IUPAC (Internacional Union of Pure and Applied Chemistry) [53], são definidos pela relação

$$C_L = \frac{1}{S} 3\sqrt{B} \quad (1.3.47)$$

Como foi referido, no regime de reflexão total do feixe de raios-X primário, a fracção de energia disponível para processos de difusão é mínima sendo por isso o fundo drasticamente reduzido. Quando se compara a fluorescência de raios-X (EDXRF), usando amostras finas para evitar o fundo elevado devido aos processos de interacção com o suporte, com TXRF, e considerando que as condições de excitação e detecção são equivalentes, verifica-se que a intensidade de fundo é cerca de 500 vezes inferior para TXRF, chegando a obter-se valores de fundo cerca de 6 ordens de grandeza inferiores em TXRF quando se compara com EDXRF convencional de amostra espessa.

Por outro lado, a intensidade da radiação que efectivamente excita a amostra na técnica de TXRF é dada por:

$$I_0(1 + R) \quad (1.3.48)$$

A expressão traduz o facto da amostra ser irradiada não só pelo feixe primário incidente como pelo reflectido (figura 26). Ora como R é aproximadamente 1, a intensidade efectiva da radiação primária é cerca de duas vezes maior para TXRF, sendo a sensibilidade S aumentada, do mesmo modo, por um factor de 2, o que implica que os C_L decresçam por igual factor. Assim, a melhoria na razão de pico/fundo que TXRF permite obter, pode resultar em limites de detecção cerca de três ordens de grandeza inferiores aos da técnica de EDXRF [37, 54].

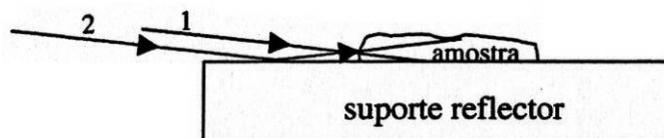


Figura 26 – Esquema de excitação em TXRF, adaptação [37].

(1 – excitação pelo feixe incidente; 2 – excitação pelo feixe reflectido)

Nas condições da reflexão total, de toda a superfície do reflector onde não existe amostra o feixe primário é totalmente reflectido, com um mínimo de difusão, como se viu. Do mesmo modo, a radiação característica do material constituinte do reflector só é induzida na camada fina correspondente à profundidade de penetração nestas condições (algumas dezenas de nanómetros), causando por isso um pico relativamente pouco intenso quando comparado com o resultante de outro tipo de condição de incidência do feixe excitador.

Como contributo para os baixos limites de detecção está ainda a geometria de detecção usada em TXRF. Nesta técnica o detector de estado sólido é colocado de tal modo que o seu eixo é perpendicular à superfície do suporte das amostras e muito próximo deste, uma vez que os ângulos rasantes formados pelos feixes de incidência e de reflexão com o suporte assim o permitem (figura 27). Esta geometria tem a dupla vantagem de aumentar o ângulo sólido de detecção, e consequentemente a eficiência de detecção da radiação proveniente da amostra, e de se obter um mínimo de contribuição nos espectros de fótons difundidos de Compton, visto que a secção eficaz de emissão de fótons a 90° , produzidos por efeito de Compton, tem um mínimo [55].

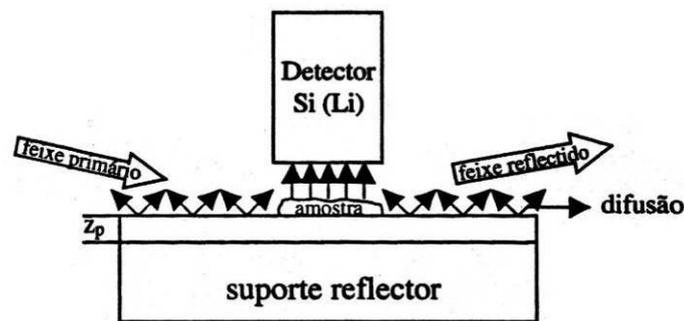


Figura 27 – Esquema das condições de excitação e detecção na geometria da reflexão total. Z_p representa a profundidade de penetração definida anteriormente, adaptação [37].

As propriedades e capacidades da técnica de TXRF, entre as quais se destacam os baixos limites de detecção, podem ser entendidas à luz das interferências geradas sobre a superfície do suporte da amostra, entre o feixe incidente e o refletido [56]. A sobreposição das ondas planas electromagnéticas resulta na formação de ondas estacionárias acima da superfície, as quais apresentam um padrão de intensidades que varia com a distância à superfície entre zero e quatro vezes a intensidade primária consoante a distância coincida com um nodo ou um anti-nodo, respectivamente. Os sucessivos nodos ou anti-nodos situam-se periodicamente a distâncias $d = (\lambda/2)/\text{sen}\phi$, entre si, onde λ é o comprimento de onda da radiação primária e ϕ é o ângulo de incidência rasante (d é também referido como o período da onda estacionária). Uma vez que a intensidade de fluorescência é proporcional à intensidade do feixe excitador e que este pode variar entre zero e quatro vezes o valor da intensidade do feixe incidente, a espessura da amostra pode influenciar consideravelmente os resultados da análise [37, 52,54,57]. Para que tal não aconteça é necessário que essa espessura seja superior a alguns períodos da onda estacionária. Desta forma, o efeito das

ondas estacionárias já não é sentido, tendo como resultado da integração da intensidade excitadora, ao longo da perpendicular à superfície, a simples duplicação da intensidade do feixe incidente, indicando, como já foi referido, que tanto o feixe incidente como o reflectido excitam a amostra.

Por outro lado, é sabido que a espessura da amostra pode igualmente influenciar a intensidade de fluorescência, devido aos fenómenos de absorção na mesma. Apenas as amostras finas cujos resíduos tenham uma dimensão adequada, não contribuem de modo significativo para a difusão da radiação primária. Assim, de acordo com o material constituinte da amostra, devem ser consideradas não só as condições de espessura máxima para produzir um depósito fino em termos da absorção, como os requisitos de espessura mínima para que as interferências devidas às ondas estacionárias formadas não influenciem a intensidade de fluorescência em TXRF, uma vez que desta dependem, como é obvio, não só os limites de detecção, como todos os resultados analíticos [37, 57, 58]. Os critérios de espessura máxima, ou seja de amostra fina, em TXRF são tais que esta não deve exceder $12\ \mu\text{m}$, $0,7\ \mu\text{m}$ e $0,01\ \mu\text{m}$ consoante seja um tecido orgânico, um pó mineral ou um esfregaço metálico respectivamente [37, 57, 59]. Assumindo que os efeitos de absorção na matriz do analito e do padrão interno, necessário para a quantificação como adiante se descreve, não diferem significativamente, estes valores de espessuras máximas podem ser aumentados uma a duas ordens de grandeza.

Os limites de detecção que se atingem com equipamentos comerciais de TXRF variam entre 1 a 10 pg para elementos desde o potássio até ao urânio e entre 10 e 100 pg para os elementos entre o alumínio e o cloro. Para elementos mais leves a detecção é muito difícil, não só pelo baixo rendimento de fluorescência como pelas limitações próprias dos sistemas de espectrometria de raios-X dispersivos e energia, no que respeita à má resolução dos picos e à absorção dos raios-X característicos de baixa energia no percurso até ao detector (geralmente no ar). Os limites referem-se a valores absolutos de massa e não a concentrações como muitas vezes são indicados (e tal como na equação (1.3.47)), por ser a forma mais clara de ilustrar a capacidade da técnica de detectar estas quantidades presentes nos suportes reflectores. Tal como em qualquer sistema de EDXRF, os limites de detecção dependem consideravelmente das propriedades da amostra, isto é, da sua matriz. Estes aumentam com o aumento da matriz, visto que os átomos que a constituem não só produzem radiação de fundo, como também, por serem maioritários na amostra, são os responsáveis pela quase totalidade da elevada taxa de contagens no detector, tornando-se mais difícil a detecção dos raios-X característicos dos elementos vestigiais.

Em TXRF existe uma relação linear entre a concentração da matriz e os limites de detecção. O exemplo mais frequente desta dependência é o da análise de níquel em água salina [52, 60]. A figura 28 ilustra como os limites de detecção para o níquel são uma função linear da concentração do cloreto de sódio numa gama de valores superior a mais de cinco ordens de grandeza. Para concentrações de NaCl acima de 1%, os limites de detecção de TXRF atingem os valores de EDXRF, ao passo que para amostras livres de matriz salina, a técnica de TXRF apresenta limites de detecção inferiores à de EDXRF mais do que duas ordens de grandeza.

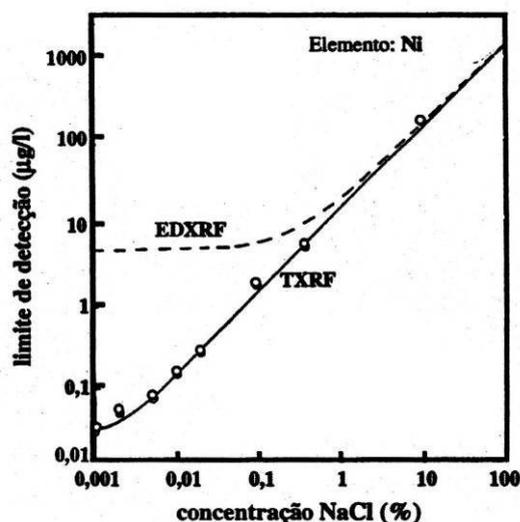


Figura 28 – Influência da matriz de cloreto de sódio na determinação dos limites de detecção do níquel. Comparação entre TXRF e EDXRF convencional, adaptação [60].

O que se disse deve-se ao facto de em EDXRF a difusão devida ao suporte da amostra e à instalação experimental provocar radiação de fundo que se sobrepõe aos efeitos da matriz, até valores elevados da concentração desta. Em TXRF aquelas contribuições para a radiação de fundo são praticamente eliminadas permitindo atingir limites de detecção muito baixos em amostras de matriz muito reduzida. Desta forma, para a análise de elementos vestigiais e ultra-vestigiais em amostras com matriz de elevada concentração, a separação química desta, prévia à análise, é imprescindível.

3.3.3.4 Instalação Experimental

Numa instalação experimental de TXRF é necessário ter em consideração não só as condições para a obtenção da reflexão total do feixe incidente, como reduzir a radiação de

fundo, como também as que levam à maximização da intensidade de fluorescência dos elementos que se pretendem analisar. Conjugando estas duas condições, diversos investigadores montaram e desenvolveram instalações experimentais de TXRF. O primeiro grupo a publicar resultados com uma instalação de reflexão total foi o do Atominstitut de Viena com o trabalho de Wobrauschek e Aiginger [61-63] tendo, posteriormente, os investigadores alemães Knoth e Schwenke iniciado trabalhos de desenvolvimento de um módulo experimental, do qual resultou o primeiro equipamento comercial que surgiu em 1980 [3, 4, 11, 64].

As fontes de radiação X primária geralmente usadas em instalações de TXRF são ampolas de difracção de raios de alta tensão, com ânodos de molibdénio ou de tungsténio, e de potência eléctrica de 2 kW [37]. É utilizado um foco de radiação fino ($0,4 \times 8 \text{ mm}^2$), em conjugação com um sistema de anteparos ajustados com precisão, de forma a produzir um feixe estreito, em forma de faixa, cuja divergência vertical seja inferior a 0,6 minutos de arco, isto é, inferior aos ângulos críticos envolvidos. Por outro lado, é necessário que este feixe tenha intensidade elevada na região espectral de interesse, o que é conseguido com ampolas de alta potência como as de difracção de raios-X. Os geradores de alta tensão que as alimentam são os usuais em sistemas de fluorescência ou de difracção de raios-X, por serem bastante estáveis e fornecerem alta tensão rectificada entre 5 e 60 KV e corrente directa de 2 a 80 mA em incrementos de 1kV e 1mA, respectivamente [37].

O espectro de raios-X emitido pela ampola de raios-X consiste nas riscas características do material constituinte do ânodo sobrepostas no contínuo da radiação de travagem (bremsstrahlung). Esta radiação deve ser alterada de forma a garantir que o feixe primário tenha determinada gama de energias. Filtros absorventes, constituídos por folhas metálicas de 10 a 200 μm , colocados logo após a janela da ampola de raios-X, permitem eliminar as energias mais baixas, funcionando como filtros passo-alto. Porém, o feixe obtido ainda não deve ser utilizado como o excitador em TXRF porque os raios-X de energia mais elevada do contínuo não seriam sujeitos a reflexão total. De facto, a equação (1.3.34), que ilustra a dependência do ângulo crítico da energia, permite verificar que à medida que a energia aumenta diminui o ângulo crítico, e que se a radiação policromática proveniente de uma ampola incidir no suporte segundo o ângulo crítico para uma determinada energia (por exemplo, uma energia ligeiramente superior à da risca característica principal do elemento constituinte de ânodo) só será totalmente reflectida a que tiver energia inferior àquele valor, sofrendo a restante refração no suporte. Isto resulta num aumento substancial da difusão e consequentemente da radiação de fundo nos espectros. Torna-se, assim, fundamental inserir

no percurso do feixe de raios-X primário um componente que corte a radiação de energia superior, ou seja um filtro passo-baixo. Tal componente pode ser simplesmente um reflector de quartzo no qual se aplica a reflexão total do feixe primário. Neste caso, a equação (1.3.34) pode ser escrita (usando os valores apropriados para o quartzo $\rho = 2,5g/cm^3$, $Z=30$ e $A=60,085$ u.m.a. [65]) da seguinte forma

$$\phi_c = \frac{110,7}{E_{corte} (keV)} \text{ minutos de arco} \quad (1.3.49)$$

Indicando que, por exemplo, para um ângulo de 5,5 minutos de arco a energia de corte E_{corte} é 20 keV, ou seja, se o referido reflector for interposto no percurso do feixe de radiação X proveniente de uma ampola de ânodo de molibdénio, à qual foi aplicada a tensão de 50 kV, de forma a que este feixe incida segundo o ângulo referido, somente os fotões de energia inferior a 20 keV são totalmente reflectidos. A radiação do contínuo, com energia entre 20 e 50keV, é absorvida no reflector. Este componente designa-se por filtro de corte de altas energias (usualmente referido com filtro cut-off) e a sua aplicação resulta não só na eliminação das interacções da radiação de energia mais elevada com o suporte, como reduz o fundo na região das baixas energias provocado pela difusão de Compton no cristal do detector. Com efeito, fotões de energia entre 20 e 50 keV que interajam na superfície do cristal detector por efeito de Compton, podem originar fotões retrodifundidos que, se escaparem do volume do cristal, resultam na detecção dos correspondentes electrões de recuo ou seja, resultam no aparecimento de fundo na região espectral de cerca de 2 a 7 keV (consoante o ângulo de dispersão do fotão de Compton e a energia do fotão inicial) [66-67]. O efeito do filtro de corte de altas energias é representado na figura 29.

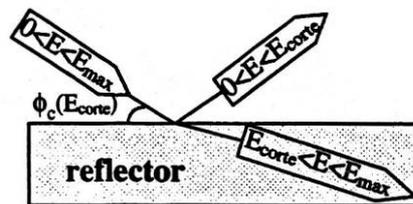


Figura 29 – Esquema do efeito do filtro de corte de altas energias inserido no percurso de um feixe policromático de raios-X, adaptação [37].

Em resumo do que se acabou de expor, uma instalação experimental equipada com um filtro de corte de altas energias interposto no percurso do feixe primário, sob as condições

de reflexão total, permite aplicar à ampola de raios-X a tensão máxima, por forma a emitir a radiação característica com a maior intensidade, sem a contribuição do contínuo da radiação de travagem, no feixe de radiação excitadora. Assim, este componente permite satisfazer as condições prioritárias para análise elementar vestigial, que são a máxima intensidade da radiação excitadora e o mínimo de radiação de fundo nas zonas de energia de interesse nos espectros.

No desenvolvimento de instalações de TXRF diversos tipos de dispositivos têm sido utilizados para modelar o feixe de radiação excitadora, não só na selecção de energias como também na sua geometria. Para análise química por TXRF, o filtro de corte de altas energias e o filtro metálico colocado à saída da ampola de raios-X constituem uma combinação frequentemente usada, pois é mais importante a intensidade do feixe excitador do que a sua pureza espectral. Porém, para análise de superfície esta última é condição fundamental, o que levou à utilização de monocromadores em TXRF. Dois tipos de monocromadores são usados em geral: cristais naturais e monocromadores de multicamadas. Os primeiros permitem uma elevada resolução em energia, mas baixa reflectividade, ao passo que os segundos são mais eficientes do ponto de vista da intensidade do feixe reflectido, apesar de não apresentarem tão elevada selectividade de energias. Os monocromadores de multicamadas são constituídos por camadas mais finas alternadas de dois materiais diferentes, um de alta densidade (ex: tungsténio) e outro de baixa densidade (ex: carbono). Permitem a selecção de uma banda pequena de energias por escolha do ângulo de incidência da radiação primária. Os monocromadores podem ser, também, vantajosos em análise química vestigial para certos elementos, como por exemplo para o cádmio e para os que têm número atómico próximo deste. Nos equipamentos mais recentes de TXRF para análise química são utilizadas combinações de monocromadores de multicamadas e filtros de corte de quartzo ou monocromadores de multicamadas duplos.

O equipamento utilizado neste trabalho é o modelo EXTRA II da marca SEIFERT. As suas características operacionais serão descritas pormenorizadamente mais à frente. No entanto, deve ser aqui referido este espectrómetro cujo esquema se apresenta a seguir (figura 30).

O funcionamento da técnica de TXRF consiste num feixe gerado por uma fonte de raios-X, contendo um ânodo de Mo, W ou Mo e W (os mais modernos). O feixe é formado como uma tira de papel por meio de uma fenda de precisão alinhada. A divergência vertical do feixe é ajustada para menos de $0,001^\circ$. O feixe incidente tem de ser monocromatizado, normalmente é monocromatizado por cristais de vidro de quartzo multi-camadas, isto é, constituídos por camadas artificiais finas alternadas de materiais de grande densidade

(exemplo: tungstênio) e baixa densidade (exemplo: carbono). Usando estes monocromadores uma pequena banda de energia pode ser seleccionada (exemplo: linha $K\alpha$ e $L\beta$ do espectro de W por afinação do ângulo de incidência). A nova geração de espectrómetros TXRF são equipados com um duplo sistema multi-camadas. Os dois cristais multi-camadas estão postos paralelamente a uma distância, mas “solidários” um com o outro. A variação do ângulo de incidência e conseqüentemente a selecção da energia de excitação é simplesmente determinada por rotação dos cristais multi-camadas sobre um eixo comum. Nesta configuração TXRF as condições óptimas para reflexão total são atingidas pela mudança da altura do tubo de raios-X e do monocromador em concordância com o suporte da amostra. A radiação de fluorescência é recolhida usualmente por um detector de Si (Li) e registado por um multi-canal analista (cada energia aparece num canal) como acontece na espectroscopia normal em energia dispersiva (explicada anteriormente). O detector é montado directamente sobre a amostra perpendicularmente à sua superfície, a uma distância inferior a 1mm para aumentar o ângulo de recepção e maximizar a intensidade da radiação de fluorescência detectada (para não existir nenhuma absorção no ar). Uma parte ainda mais essencial da instrumentação é o suporte da amostra. Vários materiais possíveis de serem suportes de amostra têm sido investigados e utilizados por TXRF. Estes têm de ser altamente reflectivos, inertes quimicamente, livres de impurezas, fáceis de limpar e não devem dar origem a picos de fluorescência no intervalo de energia utilizado nas medições. As medições são efectuadas no ar, na maioria dos equipamentos de TXRF, podendo também, ocorrerem em vazio em certas instalações dedicadas à detecção e análise de elementos de baixo número atómico.

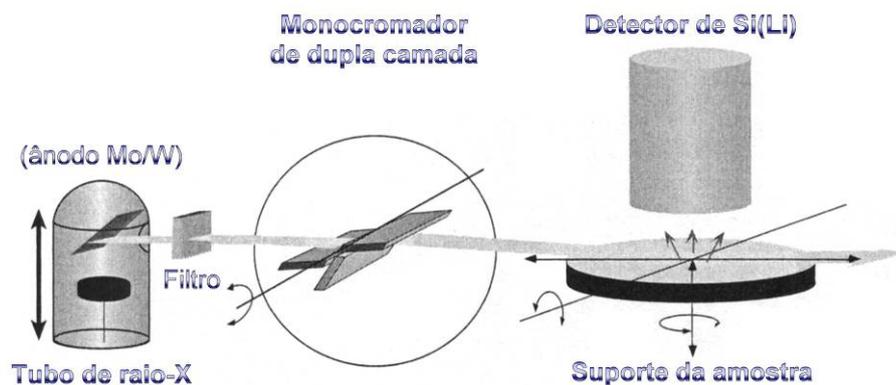


Figura 30 – Representação esquemática dos materiais que constituem o TXRF [37].

3.3.3.5 Suporte das amostras

As amostras a analisar por TXRF, sejam elas um pequeno volume de uma solução ou suspensão ou um pó fino, devem ser colocados na forma de depósitos finos sobre suportes específicos. Diversos materiais têm sido testados e utilizados com sucesso, tendo todos como requisitos fundamentais o facto de serem opticamente planos e reflectores para assegurar a reflexão total do feixe incidente. É, também, importante que possuam um grau de pureza elevado, de modo a não contribuírem para o aparecimento de picos indesejáveis nos espectros e que sejam resistentes a ácidos e solventes. Finalmente, os suportes devem ser limpos e descontaminados de forma a poder reutilizá-los.

Como anteriormente referido, a técnica de TXRF é uma técnica de micro análises que se aplica directamente quando apenas uma pequena quantidade de amostra está disponível ou quando apenas uma pequena parte de uma grande quantidade de amostra é recolhida para análise. Esta parte é geralmente designada por exemplar e a quantidade total é designada de amostra.

Para obter um resultado representativo por meio de um exemplar, a amostra tem de ser homogénea de início ou homogeneizada completamente antes da sua utilização. Ao mesmo tempo, o principal constituinte ou matriz da amostra deverá ser removida se possível para que o analito esteja enriquecido e presente essencialmente no exemplar. Finalmente este exemplar é colocado no suporte plano para análise. Todos estes passos de preparação têm de ser realizados com algum cuidado. Apenas recipientes (por exemplo: gobelés) limpos ou especialmente limpos, instrumentos e é claro suportes deverão ser utilizados. Em geral, apenas reagentes puros analiticamente ou super puros podem ser usados. Os ácidos devem ser purificados, a água deverá ser preparada por uma dupla desionização ou dupla destilação.

Os ácidos altamente puros necessários para a preparação de amostras podem ter contudo, algumas impurezas residuais na ordem dos ng/ml. Especialmente elementos como Mg, Al, Fe, Cu, Zn e Pb podem mostrar altos valores em branco. O mesmo problema acontece para a água mesmo sendo desionizada ou bidistilada. Os elementos Cl, K, Ca, Br e Sr são alguns dos elementos problema. A purificação destes líquidos aqui é contudo possível por destilação sub-ebulição. O líquido é vaporizado por aquecimento abaixo do ponto de ebulição. O vapor é condensado e o condensado purificado é recolhido num pequeno frasco. As impurezas estão significativamente abaixo de 1ng/ml.

Para a preparação de amostras, só recipientes feitos em vidro de quartzo (suprasil ou synsil), PTFE (polytetrafluorethyleness, exemplo: teflon), ou PP (polypropyleness) devem ser usados. Devido à sua elevada pureza, a contaminação destes materiais é fortemente reduzida. Também, recipientes feitos de PFA (perfluoroalkoxy polymers) podem ser recomendados porque as suas paredes são especialmente lisas. Todos eles apresentam vantagens para determinadas aplicações, mas todos têm de garantir uma rugosidade inferior a 5nm numa área de cerca de 1mm^2 , correspondendo a $\lambda/100$, em que λ é o comprimento de onda médio do visível, e uma curvatura inferior a $0,001^\circ$ numa área de cerca de 1cm^2 [37]. A maioria dos suportes apresentam-se como discos de 30 mm de diâmetro e de 2 a 3 mm de espessura. Antes dos recipientes serem usados, eles devem ser limpos por ebulição e vaporização. A figura 31 representa um dos dispositivos de vaporização que é usualmente empregue. O ácido nítrico puro e a água pura são recomendados como agentes de limpeza e devem ser usados sucessivamente. Os líquidos são vaporizados, e o respectivo vapor extremamente limpo é condensado nos vasos de arrefecimento na câmara de vapor. O condensado tira as impurezas e move-as para a fase líquida. Este processo é constituído por um período até doze horas.

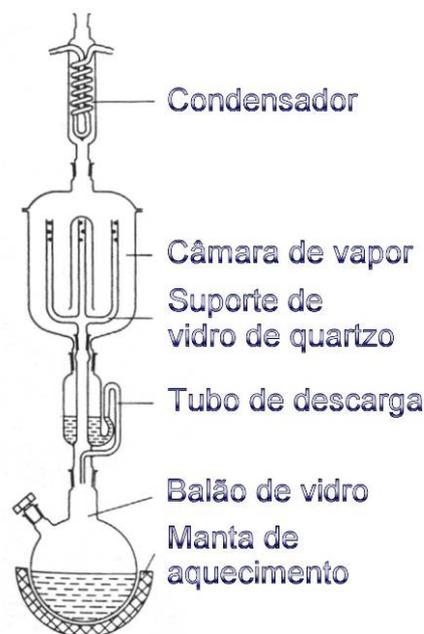


Figura 31 – Esquema de um dispositivo de vaporização para a limpeza final de instrumentos e recipientes de vidro [37].

O exemplar deve ser colocado em suportes altamente limpos. Os suportes de plexiglas podem ser aplicados sem serem limpos. Estes suportes baratos são usada uma só vez. Todos

os outros mais caros são usados frequentemente para poupar e devem ser limpos mesmo antes da sua primeira utilização pois não são entregues em condições suficientemente limpas.

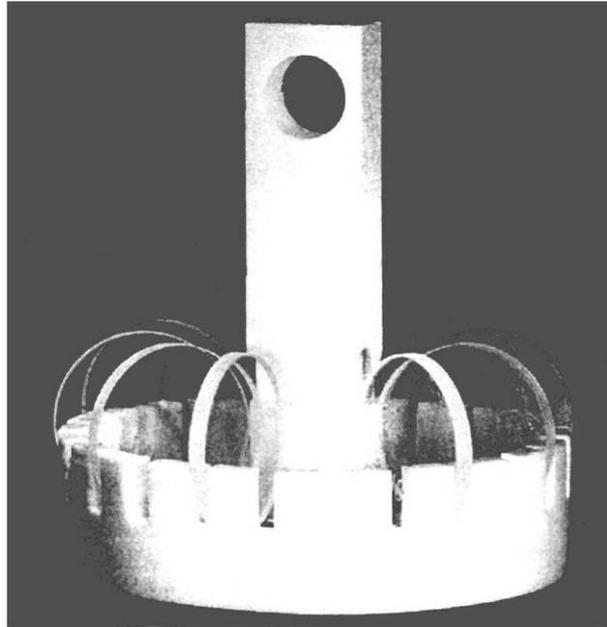


Figura 32 – Suporte dos suportes de amostras usado no processo de limpeza [37].

Um processo de limpeza simples levado a cabo preferencialmente para um conjunto total de vários portadores pode ser utilizado. A figura 32 mostra um suporte feito de PTFE, desenhado para levar vinte e quatro suportes diferentes com diâmetro de 30mm. Estes suportes são emersos em grandes gobelés de 800ml de capacidade. Numa primeira etapa um desses gobelés é metade cheio com um agente de limpeza e depois levado à ebulição e posterior arrefecimento. O suporte com os suportes da amostra é levantado com água destilada e colocado dentro de um segundo gobelé com água Milli-Q. Esta água é fervida e arrefecida até cerca de 40°C, depois todos os suportes são secos com toalhetes de precisão (Kimwipes, Kimberly-Clark corp., Northop. UK). Depois disto, o suporte com os suportes das amostras é colocado num terceiro gobelé com ácido nítrico concentrado (p.a., E. Merck, Darmstadt, Germany), fervido durante uma hora, arrefecido e colocado num outro gobelé com água fresca ultra pura. É arrefecido até cerca de 60°C durante uma hora. Cada banho deve ser sempre novo e os gobelés têm de ser cobertos apropriadamente. A ebulição deve tomar lugar numa hotte livre de fumos apenas usada para tal propósito, para prevenir qualquer tipo de contaminação. Os suportes não devem ser tocados com as mãos. Depois do último arrefecimento para 40°C numa câmara de fluxo laminar, o suporte é levantado e as

últimas pingas são limpas. Os suportes secos são postos em caixas de pétri limpas cobertas e guardados numa gaveta até serem necessários para análise. O processo total leva cerca de quatro horas. Os suportes limpos podem ser usados para depósito de amostras sólidas sem restrições.

Para a deposição de amostras líquidas eles tem de ser hidrofóbicos caso contrário, as gotas escorregam. Silicone, carbono vidrado e plexiglas são hidrofóbicos por natureza, o que não acontece com o vidro de quartzo. O vidro de quartzo quando usado deve por isso ser coberto com um filme hidrofóbico, assim 2 μ l de uma solução de silicone é usualmente pipetada para um suporte de vidro de quartzo. A silicone é espalhada sobre uma área de 1cm² e o suporte é seco num forno de laboratório a 100°C durante uma hora. Este forno deverá ser exclusivamente para este tipo de situação.

O resultado da limpeza dos suportes pode ser verificado pela própria técnica de TXRF. Caso os suportes evidenciem contaminações devem ser novamente sujeitos a todo o processo de limpeza para uma análise cuidada de ultra traço.

3.3.3.6 Análise Espectral

A medição propriamente dita consiste num registo de um espectro (figura 33). Os suportes, dos suportes das amostras, de plástico ou são fixados directamente na posição de medição ou são primeiro colocados num trocador de amostras e só depois colocados na posição de medição automaticamente um depois do outro.

O tubo de raios-X, o filtro, o monocromador e o suporte devem apresentar uma combinação e geometria recomendada para a análise. A voltagem do tubo, corrente do tubo, e o tempo de aquisição, tem de ser apropriadamente seleccionados, de acordo com regras definidas. Depois destas preparações o espectro é registado e armazenado.

A interpretação subsequente das análises qualitativas é baseada na detecção de picos individuais, identificação destes picos, e finalmente a determinação de elementos inferidos nestes picos com valores tabelados de energias de emissão de raios-X.

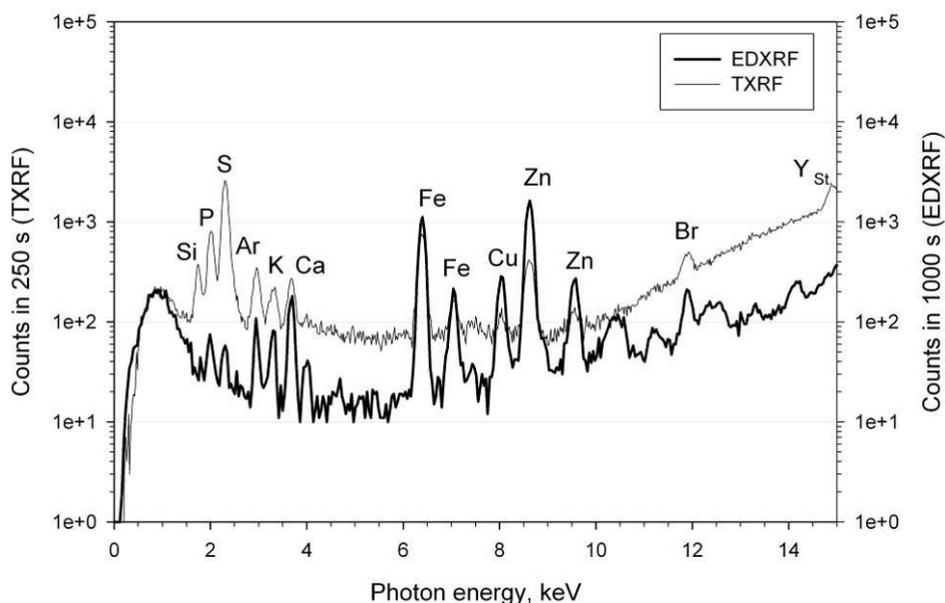


Figura 33 – Espectro obtido, por EDXRF e TXRF de amostra de tecido, no presente trabalho.

3.3.3.7 Quantificação

Outra grande vantagem da técnica de TXRF, para além dos baixos limites de detecção, é a quantificação simples e fiável. Como as amostras são colocadas na forma de depósitos finos, os efeitos de matriz são desprezáveis, podendo a calibração ser baseada em ajustes lineares. O declive das rectas de calibração dá a sensibilidade característica de cada elemento. A calibração é efectuada pelo método do padrão interno, para cada modo de excitação, aquando da instalação do equipamento, e mantém-se estável contando que nenhum componente do mesmo seja substituído. No entanto, as verificações da calibração devem ser frequentemente realizadas.

3.3.3.8 Método do Padrão Interno (Calibração)

Uma vez obtido o espectro de raios-X, o objectivo é calcular as áreas dos picos, ou seja, as intensidades da radiação característica dos elementos que interessam analisar e convertê-las em concentrações. É possível obter as concentrações em função de intensidades de radiação X, mas, é necessário conhecer todos os parâmetros nelas intervenientes com precisão satisfatória o que nem sempre é possível. Para ultrapassar estes problemas é frequente o uso

de elementos padrão que se misturam nas amostras de modo homogéneo e em quantidades bem conhecidas. Em amostras líquidas ou amostras sólidas cuja digestão ácida permite obter uma solução, que é possível misturar um elemento com uma massa bem conhecida que irá funcionar como padrão interno.

No caso da técnica TXRF a quantificação faz-se com o uso da seguinte expressão:

$$C_j = \frac{S_i N_j}{S_j N_i} C_i \quad (1.3.50)$$

Onde i é o elemento padrão interno adequado; j é o elemento que se pretende determinar; C é a concentração ou fracção do elemento; N é a intensidade do pico no espectro; S é a sensibilidade (menor quantidade de substância que se consegue detectar numa dada amostra de um dado elemento, ou seja, limite de detecção mínimo). Para se chegar à sensibilidade de cada elemento, são utilizadas soluções aquosas padrão com multi-elementos diferentes de concentrações conhecidas (C_j). Gotas de microlitros são pipetadas para um suporte de vidro de quartzo, posteriormente seco por infra vermelhos e os filmes residuais são analisados por TXRF. Aplicando a equação (1.3.50) mas em ordem a S_j consegue-se construir uma curva de calibração de sensibilidades que é conhecida para cada aparelho (figura 34).

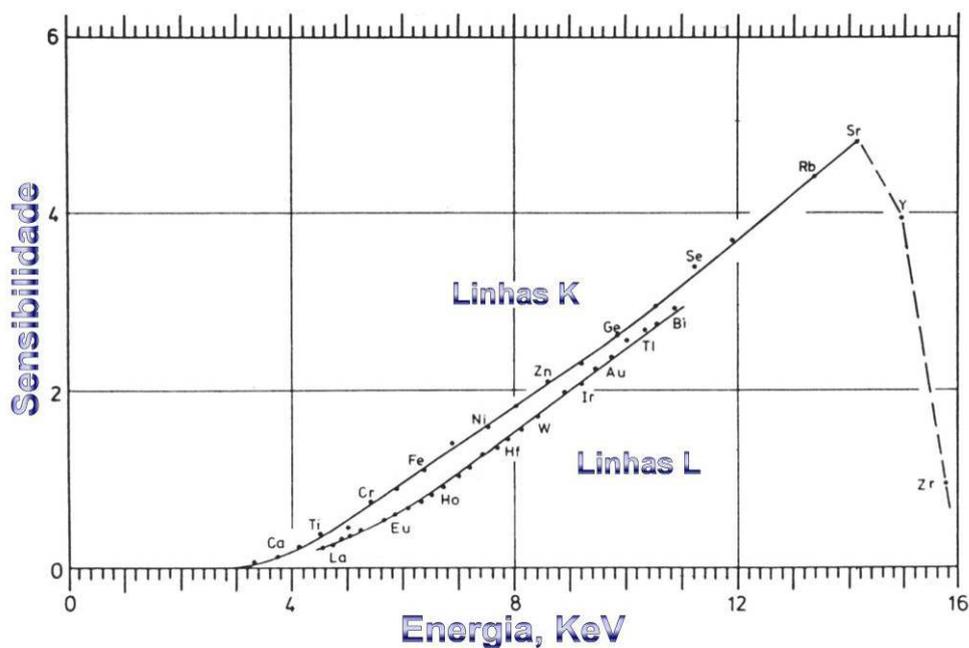


Figura 34 – Exemplo de uma curva de calibração de sensibilidades, adaptação [68].

A escolha do padrão interno exige cuidado pois tem de se garantir pelo menos dois aspectos: que este elemento não exista na amostra a analisar, de modo a que a sua concentração seja conhecida à priori; e que a sua radiação característica principal se encontre numa zona do espectro livre de fundo intenso e suficientemente longe de outros picos, para que não haja sobreposições e se possa determinar, sem dificuldades e sem grandes erros, a intensidade dessa radiação.

3.4 Procedimento Experimental

De seguida é explicado todo o procedimento experimental, isto é, todos os passos desde da recolha das amostras à sua utilização e preparação para análise nas duas técnicas descritas anteriormente.

3.4.1 Recolha das amostras

A recolha das amostras “in vivo” foi feita no Instituto Português de Oncologia em Lisboa e no Hospital Civil de Dortmund, tendo sido previamente estabelecido um acordo de colaboração.

Os tecidos foram submetidos a processos de fixação para que as suas estruturas morfológicas se mantivessem preservadas, desde da recolha até serem analisadas. Vários processos degenerativos de autólise celular ocorrem logo após a morte dos tecidos. O conjunto recebe o nome de degeneração post-mortem. Para evitar essa autólise que se inicia após a morte dos tecidos e a própria digestão do material por bactérias decompositoras, devem-se empregar substâncias que, ao se ligar aos principais componentes estruturais do tecido (geralmente proteínas), mantenham a estrutura do material a ser estudado. Esse processo de preservação dos componentes estruturais dos tecidos denomina-se fixação. As substâncias que executam o processo de fixação são chamadas fixadoras. O mecanismo de acção dos fixadores é pouco conhecido e todos possuem vantagens e desvantagens. Os cientistas desenvolveram misturas empíricas de fixadores para compensar as suas principais desvantagens. Os principais fixadores são: formol, líquido de Bouin, líquido de Helly, aldeído glutárico e tetróxido de ósmio. Neste estudo após a recolha das amostras estas foram devidamente guardadas em formol, a uma temperatura adequada até à sua análise.

3.4.2 Análise por EDXRF

3.4.2.1 Preparação e análise das amostras por EDXRF

Antes da análise cada tecido foi liofilizado durante 48h, a -45°C e a 1atm (figura 35) e reduzido a pó (figura 36). Este foi comprimido em pastilhas de 2 cm de diâmetro com o auxílio dos utensílios da figura 37 e com a prensa (figura 38), sem qualquer tratamento químico prévio. Para cada tecido foram feitas três pastilhas. Cada pastilha é colocada num suporte de 50x50 mm, colada a uma película *Mylar*, que é posicionada diante do feixe de raios-X para a determinação dos elementos.



Figura 35 – Liofilizador.



Figura 36 – Moinho.



Figura 37 – Utensílios de preparação da amostra



Figura 38 – Prensa.



Figura 39 – Posicionamento da amostra.



Figura 40 – Análise por EDXRF.

O espectrómetro de EDXRF utilizado neste trabalho consiste num tubo de raios-X equipado com um alvo secundário de Mo. A radiação característica dos elementos foi detectada com um detector de Si (Li) com uma janela de berílio de 8 μm e área de 30 mm^2 . A resolução é de 135 eV para 5.9 keV e o sistema de aquisição é Nucleus PCA instalado num computador. O gerador de raios-X funcionou a 50 kV e 20 mA e o tempo de aquisição foi de 1000 s.

3.4.3 Análise por TXRF

3.4.3.1 Preparação e análise das amostras por TXRF

As amostras foram congeladas e cortadas (figura 41) em pequenas secções de espessura aproximadamente 8 μm com ajuda de um microtomo (nota: a temperatura de congelamento varia entre os 15 e 25°C dependendo do tipo de tecido). Depois foram colocadas em suportes de vidro de quartzo de TXRF (figura 42) e os respectivos espectros observados. Após a análise destes, um padrão foi escolhido e preparado (nota: este tipo de procedimento é feito para as amostras de diferentes tecidos). Depois de escolhido, este é colocado em cada uma das amostras (figura 43), sendo estas depois sujeitas a uma secagem aproximadamente de 15 min (figura 44). Depois foram analisadas por TXRF e posteriormente secas. Seguidamente procedeu-se à pesagem dos suportes com e sem amostra (figura 46) para cada suporte o que nos permite chegar ao valor da concentração do padrão interno para posterior ser feito o cálculo dos valores da concentração de cada um dos elementos presentes em cada amostra.

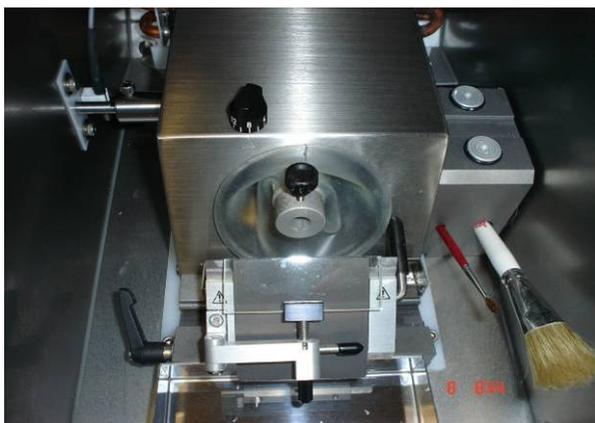


Figura 41 – Congelamento e Corte.
(micrótomo)



Figura 42 – Posicionamento da amostra.



Figura 43 – Adição do padrão interno.



Figura 44 – Secagem.



Figura 45 – Análise por TXRF.



Figura 46 – Pesagem.

Para determinar as concentrações dos elementos nas amostras de tecidos, foi usado um espectrômetro de TXRF do ISAS em Dortmund (figura 45). Para a excitação foi usado um

tubo de raios-X com um ânodo de Mo, operado a 50kV e 20mA, uma folha de Mo de 50 μ m e um ângulo rasante de 0,09° (energia 20keV). O feixe incidente é monocromatizado por cristais de quartzo. A radiação é detectada por detector de Si (Li), que se encontra aproximadamente 1mm da amostra. O tempo de aquisição foi de 100s.

CAPITULO IV

APRESENTAÇÃO E TRATAMENTO DE RESULTADOS

4 Apresentação e tratamento de resultados

Numa primeira fase desta investigação, foram disponibilizadas 7 amostras de tecidos saudáveis e com tumor maligno de indivíduos alemães e 9 amostras de tecido cancerígeno de indivíduos portugueses. Face aos primeiros valores experimentais obtidos, começou-se por estudar a distribuição de alguns elementos em tecidos saudáveis e cancerígenos dos indivíduos alemães. Dispúnhamos de amostras de tecido do cólon, mama e útero. Praticamente todas estas amostras foram analisadas por TXRF e EDXRF. As 9 amostras de tecidos de indivíduos portugueses, que consistiam em tecidos de recto, sigmóide, tiróide, rim, pulmão e laringe, foram também analisadas por ambas as técnicas.

Quando se compararam os resultados obtidos por ambas as técnicas, as conclusões foram semelhantes apesar de alguns dos resultados não serem coincidentes para todas as amostras. A observação da figura 33 (capítulo III), que exemplifica a sobreposição de dois espectros obtidos por ambas as técnicas nesta fase do estudo, levou-nos a concluir que a técnica de TXRF tem maior sensibilidade para elementos de baixo número atómico, enquanto que a técnica de EDXRF apresentou vantagens para elementos como o Cu, Zn, Se, Br, Rb e Sr.

Em relação ao tempo de aquisição dos espectros, é mais longo em EDXRF do que em TXRF (referido no capítulo III), no entanto, no que se refere à radiação de fundo, a técnica de EDXRF apresenta algumas vantagens em certas gamas de números atómicos. Isto pode ser explicado pela utilização da geometria triaxial que produz radiação polarizada, e que em conjunto com o pequeno ângulo sólido do detector contribui para uma redução da radiação difundida. Por outro lado, a matriz orgânica, é preferencialmente representada por elementos leves (H, C, O) que contribuem para uma difusão da radiação primária na técnica de TXRF.

Na tabela 6 apresentam-se os resultados obtidos pelas duas técnicas para as amostras com tumor de cidadãos portugueses. Foram observadas diferenças entre os resultados obtidos por ambas. O desvio padrão foi elevado tendo em conta que, no caso da técnica de TXRF analisam-se fatias (micrótomos), no máximo 8-10 μ m de espessura e no caso de EDXRF analisam-se pastilhas, o que contribui para uma heterogeneidade na análise das amostras por cada uma das técnicas. Por outro lado, a amostra de tecido analisado pelas duas técnicas não é exactamente a mesma, apesar de pertencer ao mesmo tecido.

Elements Tissues	Cancerous Portuguese Samples							
	P	S	K	Ca	Fe	Cu	Zn	Sr
<i>Sigmoid</i>								
TXRF	4460±600	3890±710	53±14	860±180	125±13	4±1	104±5	9±1
EDXRF		3590±540	51±13	725±40	111±4	9±3	77±4	8±1
<i>Rectum</i>								
TXRF	3070±310	2260±300	81±6	181±22	40±2	3±1	29±4	3±1
EDXRF		2550±800	74±19	272±12	90±10	5±2	64±1	4±1
<i>Rectum</i>								
TXRF	1000±200	1380±390	98±20	570±700	33±10	1.0±0.5	19±7	2±1
EDXRF		1720±100	194±27	578±57	88±9	4±2	71±9	3±1
<i>Kidney</i>								
TXRF	1500±740	1880±700	196±100	158±95	1550±570	2.0±0.5	18±9	
EDXRF		1160±120	183±20	568±60	635±70	3±1	23±5	
<i>Kidney</i>								
TXRF	1490±210	2100±420	75±16	169±36	1210±350	2.0±0.5	30±8	2.0±0.5
EDXRF		1460±20	78±1	246±70	635±40	4±2	38±1	4.0±0.5
<i>Lung</i>								
TXRF	2970±810	3030±1080	64±13	660±270	316±140	2±1	21±7	2±1
EDXRF		2920±540	117±25	836±50	416±83	4±2	48±2	4±1
<i>Larynx</i>								
TXRF	3480±60	2440±85	213±24	300±30	71±4	2.0±0.5	29±7	
EDXRF		2290±110	406±22	1120±57	158±16	6±3	58±7	
<i>Thyroid</i>								
TXRF	1590±40	2160±220	273±31	175±16	33±4	2.0±0.5	18±2	
EDXRF		2490±740	910±250	420±100	122±16	5±3	71±5	

Tabela 5 – Comparação das concentrações dos elementos ($\mu\text{g g}^{-1}$) nos tecidos com tumor dos indivíduos Portugueses, obtidas por TXRF e EDXRF [47].

O Fe é o elemento cujos valores de concentração apresentam maior dispersão seguido do Zn, Ca e K. Isto pode ser explicado pela quantidade de sangue que cada amostra de tecido podia conter. Em relação ao K e Ca, as diferenças nas concentrações obtidas pelas duas técnicas podem ter sido devidas à diferente quantidade de tecido gordo existente durante a preparação da amostra. Além disso há que considerar que nas amostras onde existiam as diferenças mais significativas, no caso do TXRF a secção microtoma de tecido, provavelmente não teria sido colocada propriamente no centro do suporte de vidro de quartzo e/ou a área da amostra pudesse ter sido superior ao campo da visão do detector.

No que se refere aos resultados das amostras de tecido saudável e cancerígeno pertencentes ao mesmo indivíduo, a conclusão mais importante desta fase do estudo, foi o comportamento das concentrações de alguns elementos. Em todas as amostras estudadas aumentavam ou mantinham-se os níveis de P, S, K, Ca, Fe e Cu, e diminuíam os níveis de Zn e Br nos tecidos cancerígenos relativamente aos valores obtidos para os respectivos

tecidos saudáveis. Contudo existiam exceções no comportamento de alguns elementos, dependendo do tecido analisado.

Para o cólon os níveis de Ca, Zn e Sr foram semelhantes tanto para o tecido saudável como para o cancerígeno, contrariamente os elementos P, K, Cu e Ni mostravam uma tendência para aumentar no tecido com tumor, o I e Br foram os únicos elementos nos quais as concentrações foram reduzidas nas amostras cancerígenas analisadas. O alto teor em iodo poderá ser explicado por alguma incorporação recente de um agente de contraste à base de iodo para a examinação radiográfica de raios-X.

Os resultados para o tecido do útero com tumor e saudável, apresentados na Figura 47, obtidos respectivamente por TXRF e EDXRF, mostram um comportamento semelhante no que se refere à elevada concentração de K na amostra com cancro. Por outro lado, o Ca, Sr e Br apresentam concentrações mais baixas na amostra com tumor e o Fe, Cu e Zn permanecem constantes. Este comportamento foi claramente confirmado nos resultados obtidos com ambas as técnicas.

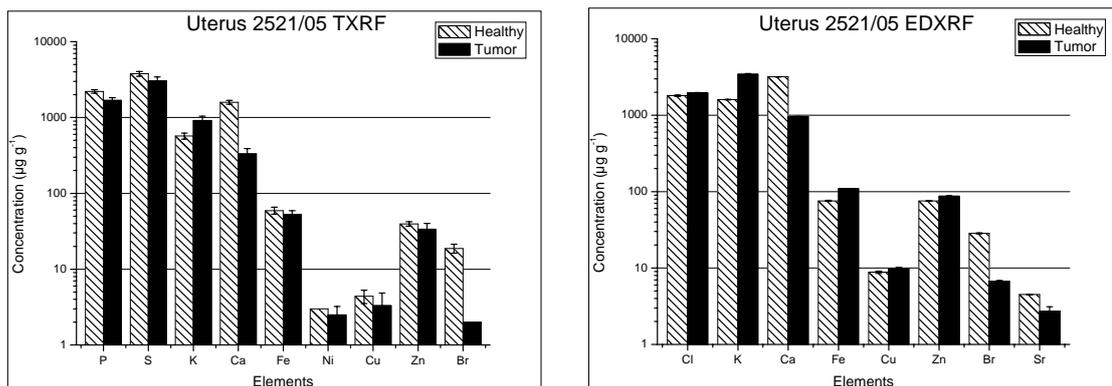


Figura 47 – Comparação da concentração dos elementos ($\mu\text{g g}^{-1}$), obtida por TXRF e EDXRF para amostras de tecido do útero saudável e com tumor [47].

O tecido da mama apresentava um comportamento completamente dissimilar dos outros tecidos estudados no que se refere ao Br. Em todas as amostras de tecidos cancerígenos a concentração deste elemento era inferior à do tecido saudável, no entanto nos tecidos da mama a situação era contrária, o Br aumentava. Este comportamento era consistente nos resultados obtidos pelas duas técnicas.

Uma vez que a quantidade de amostras não era significativa para concluir se este comportamento seria aplicável a todos os tecidos de mama, atribuiu-se este comportamento diferente ao facto de se tratar de material gordo, muito difícil de cortar e difícil de aplicar o

padrão interno (no caso da técnica de TXRF). Por outro lado a preparação da amostra para EDXRF foi também difícil, porque o tecido gordo mesmo congelado com o azoto líquido produz uma espécie de massa colante difícil de colocar na película.

Na figura 48 e na figura 49 comparam-se as concentrações elementares de várias secções microtomadas do tecido da mama saudável e com tumor e do tecido do cólon. Quando comparadas as concentrações obtidas para as várias fatias do mesmo tecido, tanto para as amostras saudáveis como cancerígenas, apresentam um comportamento semelhante tanto no que diz respeito aos elementos presentes como na sua quantificação. Esta conclusão foi comum para todos os outros tecidos analisados.

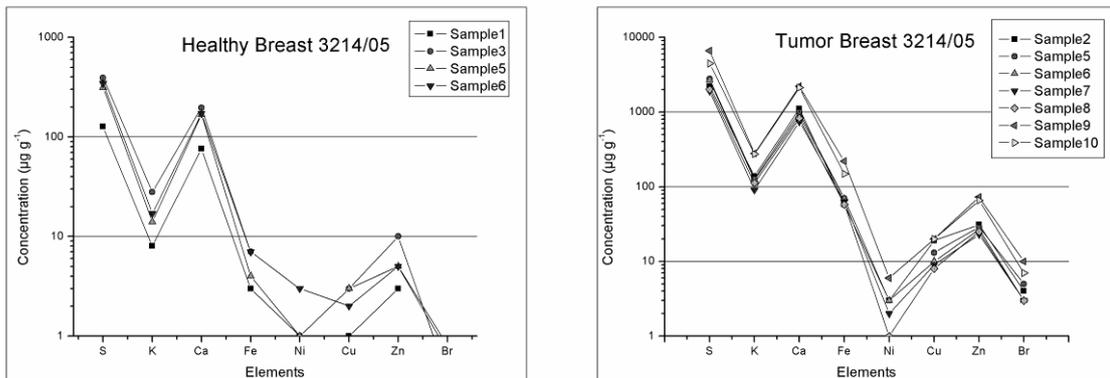


Figura 48 – Comparação das concentrações dos elementos ($\mu\text{g g}^{-1}$) obtidas por TXRF para as várias fatias de amostra saudável e com tumor do mesmo tecido da mama [47].

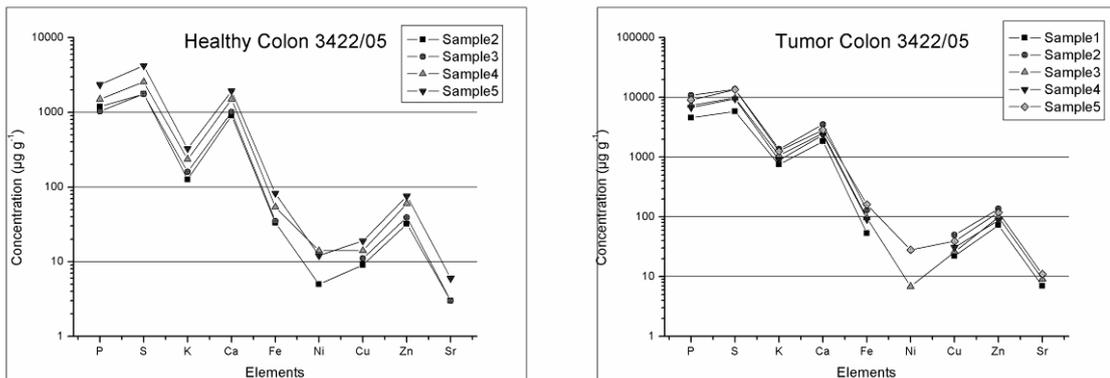


Figura 49 – Comparação das concentrações dos elementos ($\mu\text{g g}^{-1}$) obtidas por TXRF para as várias fatias de amostra saudável e com tumor do tecido do cólon [47].

Assim deste trabalho preliminar concluiu-se que ambas as técnicas eram fiáveis para a análise elementar de tecidos humanos. Podendo considerá-las complementares, pois por um lado a técnica de TXRF é mais sensível para elementos leves e a de EDXRF, face à geometria triaxial, é melhor para a obtenção de elementos mais pesados.

Na preparação da amostra, o congelamento é mais fácil (TXRF) do que a moagem da amostra e elaboração de uma pastilha (EDXRF). Contudo a medição da massa, no final do procedimento em TXRF é muito demorada devido à alta sensibilidade da microbalança (0.1 µg) e a alta sensibilidade desta para com a humidade.

A quantidade de amostra necessária à análise é outro factor a ser tomado em conta, especialmente em situações onde uma quantidade grande de amostra é difícil ou até impossível de ser obtida. No caso da técnica de TXRF, não existe problema o mesmo já não acontece para a técnica de EDXRF.

Em relação aos resultados obtidos para as amostras saudáveis e com tumor de tecido de um mesmo indivíduo, foi observado um comportamento semelhante. O Br de um modo geral à excepção do tecido da mama aparecia sempre em menor concentração nas amostras com tumor, o Zn mostrava uma tendência para diminuir ou permanecer constante, o Fe e Cu mostravam uma tendência de aumento na concentração nesse mesmo tipo de amostras (amostras com tumor maligno).

A diminuição da concentração de Zn em tecidos cancerosos está de acordo com os níveis baixos de Zn encontrados noutras patologias, como por exemplo aterosclerose, tumores malignos do fígado e cirroses. A deficiência deste elemento parece estar associada à inibição de funções de elementos essenciais, alteração de metabolismo e à modificação da função proteica no transporte e manutenção de certo número de elementos essenciais.

Por outro lado o aumento de certos metais em tecidos cancerosos poderá associar-se a mecanismos de toxicidade sempre que esses elementos estejam em excesso. Os metais, em associação com enzimas e moléculas biológicas, podem modificar a sua reactividade, podem originar complexos ou precipitados com metais implicados no metabolismo, podendo estes actuar como catalizadores em reacções químicas originando a decomposição de metabolismos essenciais.

Os resultados completos deste trabalho estão apresentados na publicação [47], apresentada em anexo.

Posteriormente, após a recolha de mais amostras de tecido da mama (nesta fase existiam 10 amostras de tecido), aprofundou-se o comportamento das concentrações dos diferentes elementos, nomeadamente o bromo que, tinha suscitado alguma curiosidade, face ao

comportamento apresentado no tecido da mama com tumor, ser diferente do observado nos outros tecidos.

Como referido anteriormente o tecido da mama é completamente diferente dos outros tecidos estudados pois é um material basicamente gordo tornando-se por isso difícil de trabalhar. Contudo, os resultados obtidos mostravam um comportamento semelhante para todas as amostras de tecido analisadas. Os níveis de P, S, K, Ca, Fe, Cu, Zn e Br estão na maioria aumentados nas amostras com tumor quando comparadas com as saudáveis correspondentes (figura 50).

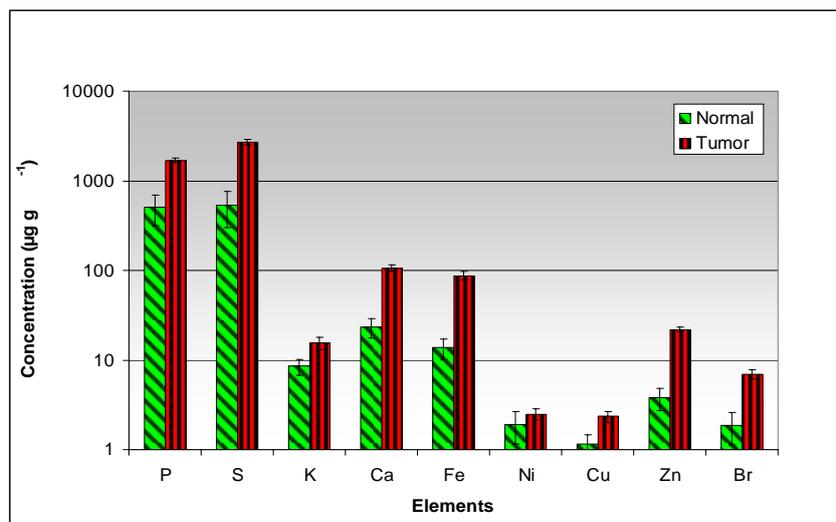


Figura 50 – Concentrações dos elementos ($\mu\text{g g}^{-1}$) e desvio padrão para amostras saudáveis e com tumor de tecido da mama.

Os níveis de ferro no tecido da mama mostravam estar mais elevados em amostras com tumor. Embora o ferro seja encontrado em quase todos os seres vivos e cumpra numerosas funções biológicas, quando em excesso o Fe no organismo tem um efeito tóxico. O ferro reage com o peróxido de hidrogénio que produz radicais livres, um processo que é controlado por mecanismos antioxidantes quando o ferro se encontra nos níveis normais. Por outro lado, o ferro é essencial para as funções fisiológicas normais em seres humanos, ele é parte integrante de muitas proteínas e enzimas. Ele desempenha um papel vital na regulação do crescimento da célula e na sua diferenciação.

A concentração de cobre também mostrava ser mais elevada nas amostras com tumor. Tanto o cobre como o ferro contribuem para a formação de glóbulos vermelhos, manutenção do sistema imunológico e formação de massa óssea. O cobre encontra-se em algumas enzimas. O cobre é transportado na maior parte das vezes por uma proteína através

do fluxo de sangue. Quando é absorvido no intestino é transportado por uma outra proteína (albumina) ao fígado. O cobre é encontrado em todas as células vivas. Embora seja essencial para uma larga variedade de processos bioquímicos, ele é também uma substância potencialmente tóxica.

Devido à sua capacidade de se modificar entre os seus dois estados de oxidação, Cu^+ e Cu^{2+} , ele pode causar efeitos nocivos no funcionamento da célula pela produção de espécies de oxigénio altamente reactivas, que produzem radicais que adversamente modificam proteínas, lípidos e ácidos nucleicos. Os níveis em excesso de cobre observado nas amostras de tecido com tumor estão possivelmente relacionados com danos oxidativos do DNA. Estes níveis elevados de cobre estão de acordo com os resultados de estudos na área do cancro da mama. O zinco apresentava também concentrações mais elevadas nas amostras cancerígenas. O zinco é um elemento essencial. Ele estimula a actividade de mais de 100 enzimas, colabora na função do sistema imunológico e é necessário à cicatrização de danos nos tecidos.

Os níveis de zinco têm de estar equilibrados para o bom funcionamento do sistema imunológico pois a deficiência ou excesso de zinco origina perturbação na função imune. As alterações na função imune aumentam o risco de várias doenças inclusive o cancro.

A concentração elevada de zinco possivelmente leva ao desenvolvimento do cancro da mama uma vez que o zinco é utilizado na proliferação da célula e posterior crescimento de tumor.

Em relação ao bromo, este continuava a apresentar concentrações mais elevadas nas amostras com tumor. O bromo é encontrado em níveis traço nos seres humanos apesar de ser considerado um elemento essencial. Contudo as funções que ele desempenha não estão ainda bem definidas. O bromo é utilizado na produção de aerossóis, de agentes não inflamáveis e outros produtos como os de purificação de água.

Nesta fase do estudo fez-se um agrupamento hierárquico a duas dimensões (Figura 51) que mostrou que as concentrações elevadas de Bromo eram quase exclusivamente pertencentes aos tecidos cancerígenos. Adicionalmente, vários subgrupos puderam ser observados.

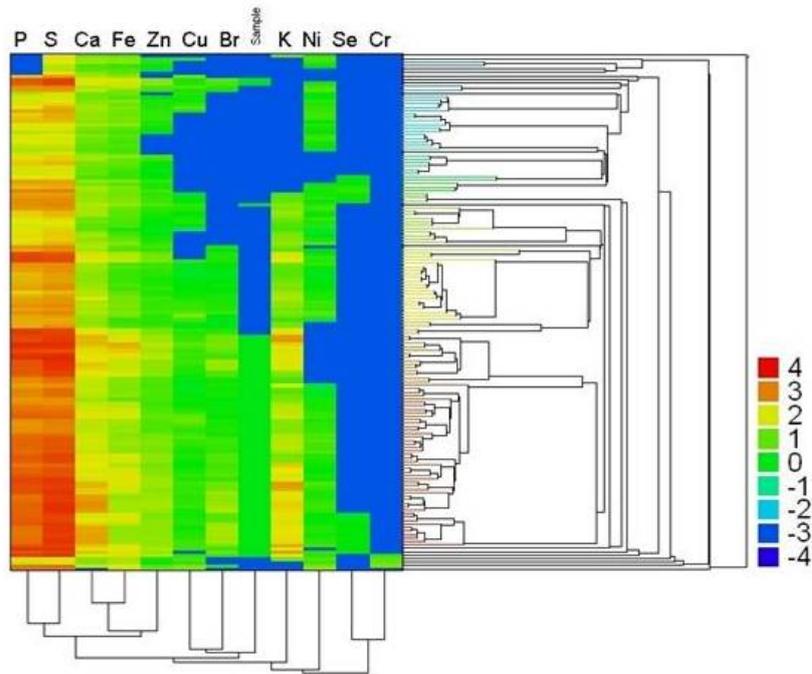


Figura 51 – Matriz de dados que contém todas as amostras. O procedimento de agrupamento hierárquico mostra uma correlação entre o tecido de cancro e Br. Nesta representação gráfica as cores são destinadas aos valores de \log_{10} da concentração. A cor azul representa o tecido saudável e o verde o tecido de cancro [96].

Uma vez que este tipo de tecido apresenta grandes quantidades de lípidos, pareceu de facto mais fiável comparar sempre as amostras correspondentes do mesmo indivíduo, para que a influência dessa quantidade fosse mais ou menos igual para ambas as amostras.

Verificava-se que quase todos os elementos identificados eram encontrados com níveis superiores nas amostras cancerígenas quando comparadas com as amostras saudáveis de tecidos da mama. Quanto ao seu papel na iniciação ou na promoção do cancro da mama, uma interpretação possível é que os níveis elevados de Cu, Fe e Zn possam levar à formação de radicais livres ou outras espécies reactivas de oxigénio que afectam adversamente o DNA contribuindo para o cancro da mama. Uma outra conclusão dos resultados obtidos nesta fase do estudo consistia na ideia de que o bromo podia estar relacionado com o desenvolvimento do cancro da mama.

Adicionalmente, o cancro da mama é principalmente atribuído a anomalias genéticas. Além disso, uma vez que o Cu e o Fe são necessários para angiogénese, as concentrações elevadas desses elementos provavelmente promoverão o cancro da mama aumentando a provisão de sangue do crescimento de tumor.

Os tumores, caracterizados por uma multiplicação não regulada das células, aumentam a exigência de nutrientes essenciais, inclusive elementos traço relacionados com actividades celulares. Isto pode provavelmente resultar num aumento concentrações elementares em tecidos com tumores. Os resultados deste estudo irão originar uma publicação [96], que se encontra em anexo, assim como todos os resultados experimentais obtidos (tabelas 99-103). O efeito tóxico de alguns elementos tinha sido já observado por nós, num estudo realizado em células de plantas. Neste trabalho fez-se um estudo de células de *Acer pseudoplatanus* L. quando submetidas à acção de uma certa dose de cádmio [97]. O comportamento destas células foi comparado com o de células de controlo. Os resultados obtidos permitiram-nos concluir que o excesso de Cd induz vários tipos de danos nas células tais como uma forma esférica mais acentuada e um aumento do volume da célula, como consequência do aumento do volume dos vacúolos e uma diminuição na função reprodutora das células. O volume das células tratadas com cádmio era duas vezes superior ao das células de controlo (Figura 52 (A, B) e as células de controle apresentavam-se subdividas, como um processo de reprodução normal, enquanto que as tratadas com cádmio não apresentavam qualquer subdivisão (Figura 52 (C, D)).

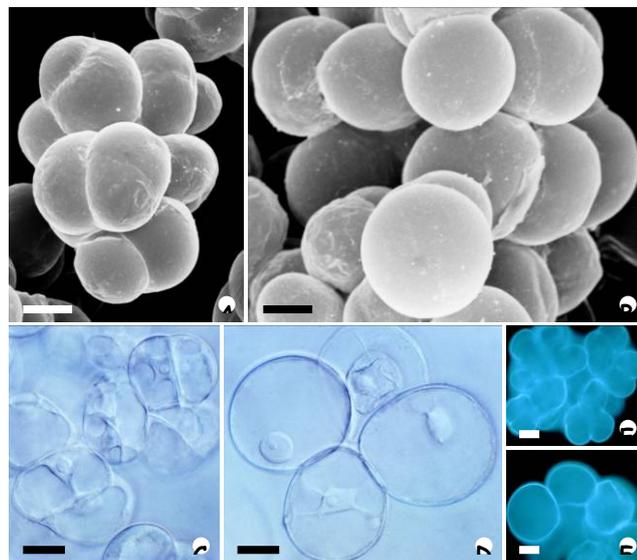


Figura 52 – Células de controlo de *Acer pseudoplatanus* L. (A, C, E) e células tratadas com cádmio (B, D, F). As imagens (A, B) foram obtidas por microscópio electrónico de varrimento (SEM) e as imagens (C, D) foram obtidas por espectroscopia Nomarski. As imagens (E, F) foram obtidas com microscopia de fluorescência. Barra = 25 μm [97].

A adição de Cd, 20 μM de sulfato de cádmio (CdSO_4), ao meio de cultura afectou o conteúdo não só da quantidade de Cd mas também a quantidade de todos os elementos essenciais na célula (figura 53). Uma diminuição na concentração K e um aumento nas concentrações de Ca, Mn, Fe, Cu e Zn foram observadas.

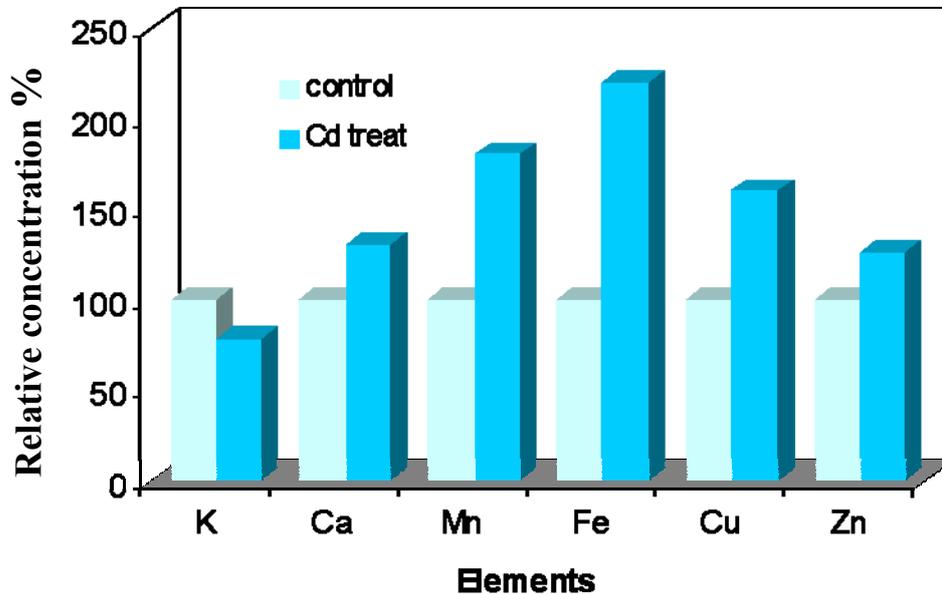


Figura 53 – Concentração relativa dos elementos essenciais nas células após a adição de Cd.

Os resultados a que se chegou mostravam que o excesso de um elemento tóxico pode alterar as concentrações de elementos essenciais em organismos biológicos. Os resultados obtidos ainda sugeriram que o vacúolo deve ser o compartimento de célula da acumulação de cationes, ideia que foi apoiada pela observação das imagens por microscopia.

Note-se que nas células animais os vacúolos são raros. Contudo, as células do tecido adiposo (os adipócitos) possuem vacúolos repletos de gordura, que servem como reserva energética. Os resultados completos deste trabalho estão apresentados na publicação [97], apresentada em anexo.

4.1 Estatística Descritiva

4.1.1 Classificação dos resultados

Os resultados experimentais (apresentados nas tabelas 99-103 em anexo) foram inseridos no software SPSS (Statistical Package for the Social Sciences) versão 13, onde foram tratados, através da utilização de estatística descritiva que consiste numa forma compreensível de representar a informação contida nos dados e de estatística multivariada. Recorreu-se também ao software Excel.

Os dados baseiam-se essencialmente em valores de concentrações, estando definidos numa escala numérica. Note-se que existe uma grande discrepância entre valores, tendo-se adoptado por isso uma escala logarítmica na elaboração dos gráficos.

Foi atribuído o valor de concentração $0,001 \mu\text{g} / \text{g}$ para os elementos que se encontravam abaixo do limite de detecção.

O número de amostras recolhidas no Hospital Civil de Dortmund e no Instituto Português de Oncologia em Lisboa, não foi tão elevado como inicialmente se esperava por limitações dos Hospitais.

No total foram analisadas (como referido no capítulo II) 32 amostras (16 pares) de tecido da mama, 30 amostras de tecido do intestino das quais 26 eram pares correspondentes de um mesmo indivíduo e as restantes eram apenas de tecido com tumor maligno de 4 indivíduos, 10 amostras (5 pares) de tecido do estômago, 4 amostras (2 pares) de tecido do útero, 2 amostras de tecido do rim apenas com tumor maligno, 1 amostra de tecido da tiróide apenas com tumor maligno, 1 amostra de tecido da laringe apenas com tumor maligno e 1 amostra de tecido do pulmão apenas com tumor maligno.

As amostras foram sempre analisadas por TXRF na Alemanha e só depois por EDXRF em Lisboa, isto como consequência da quantidade de amostra necessária por cada uma das técnicas e do procedimento de preparação da amostra. Assim existem amostras que não puderam ser analisadas por EDXRF.

4.1.2 Comparação das técnicas

Inicialmente pensou-se em fazer um estudo comparativo para cada tipo de tecido, fazendo sempre uso dos resultados das duas técnicas. Uma vez que a quantidade de amostra fornecida pelos Hospitais foi insuficiente para obter resultados das duas, optou-se pela

utilização da técnica de TXRF, por ser aquela que requer menor quantidade de amostra a analisar (descrito na preparação da mostra por TXRF) e por ser uma técnica de maior sensibilidade. No entanto, a primeira recolha de amostras, conseguida em Lisboa, foi muito diversificada e apenas de tecidos com tumor (laringe, tiróide, rim, pulmão, intestino, mama e útero). Face à existência de resultados para catorze amostras de diferentes tecidos com tumor, para ambas as técnicas considerou-se interessante compará-las. Assim, utilizaram-se correlações para cada elemento.

É de referir que os elementos fósforo (P) e Níquel (Ni) não foram incluídos neste estudo uma vez que praticamente não foram detectado por EDXRF. Aplicou-se assim, o coeficiente de correlação de Pearson, que mede a intensidade e a direcção da associação de tipo linear entre duas variáveis quantitativas.

Obtiveram-se os resultados que se apresentam nas tabelas seguintes (tabelas 6-12).

Correlations

		SMauTXRF	SMauEDXRF
SMauTXRF	Pearson Correlation	1	-,055
	Sig. (2-tailed)		,851
	N	14	14
SMauEDXRF	Pearson Correlation	-,055	1
	Sig. (2-tailed)	,851	
	N	14	14

Tabela 6 – Correlação entre as concentrações do elemento S nos tecidos com tumor maligno, obtida por EDXRF e TXRF.

Correlations

		KMauTXRF	KMauEDXRF
KMauTXRF	Pearson Correlation	1	,923**
	Sig. (2-tailed)		,000
	N	14	14
KMauEDXRF	Pearson Correlation	,923**	1
	Sig. (2-tailed)	,000	
	N	14	14

** Correlation is significant at the 0.01 level (2-tailed).

Tabela 7 – Correlação entre as concentrações do elemento K nos tecidos com tumor maligno, obtida por EDXRF e TXRF.

Correlations

		CaMauTXRF	CaMau EDXRF
CaMauTXRF	Pearson Correlation	1	,686**
	Sig. (2-tailed)		,007
	N	14	14
CaMauEDXRF	Pearson Correlation	,686**	1
	Sig. (2-tailed)	,007	
	N	14	14

** . Correlation is significant at the 0.01 level (2-tailed).

Tabela 8 – Correlação entre as concentrações do elemento Ca nos tecidos com tumor maligno, obtida por EDXRF e TXRF.

Correlations

		FeMauTXRF	FeMauEDXRF
FeMauTXRF	Pearson Correlation	1	,945**
	Sig. (2-tailed)		,000
	N	14	14
FeMauEDXRF	Pearson Correlation	,945**	1
	Sig. (2-tailed)	,000	
	N	14	14

** . Correlation is significant at the 0.01 level (2-tailed).

Tabela 9 – Correlação entre as concentrações do elemento Fe nos tecidos com tumor maligno, obtida por EDXRF e TXRF.

Correlations

		CuMauTXRF	CuMau EDXRF
CuMauTXRF	Pearson Correlation	1	,927**
	Sig. (2-tailed)		,000
	N	14	14
CuMauEDXRF	Pearson Correlation	,927**	1
	Sig. (2-tailed)	,000	
	N	14	14

** . Correlation is significant at the 0.01 level (2-tailed).

Tabela 10 – Correlação entre as concentrações do elemento Cu nos tecidos com tumor maligno, obtida por EDXRF e TXRF.

Correlations

		ZnMauTXRF	ZnMauEDXRF
ZnMauTXRF	Pearson Correlation	1	,427
	Sig. (2-tailed)		,128
	N	14	14
ZnMauEDXRF	Pearson Correlation	,427	1
	Sig. (2-tailed)	,128	
	N	14	14

Tabela 11 – Correlação entre as concentrações do elemento Zn nos tecidos com tumor maligno, obtida por EDXRF e TXRF.

Correlations

		BrMauTXRF	BrMauEDXRF
BrMauTXRF	Pearson Correlation	1	,807**
	Sig. (2-tailed)		,000
	N	14	14
BrMauEDXRF	Pearson Correlation	,807**	1
	Sig. (2-tailed)	,000	
	N	14	14

** . Correlation is significant at the 0.01 level (2-tailed).

Tabela 12 – Correlação entre as concentrações do elemento Br nos tecidos com tumor maligno, obtida por EDXRF e TXRF.

Após observação das tabelas, pode concluir-se que na maioria dos elementos se verifica uma correlação elevada entre os resultados obtidos pelas duas técnicas. Saliente-se o facto de apenas o elemento enxofre (S) apresentar um valor de correlação muito baixo, isto é os resultados obtidos para este elemento foram diferentes. Deste modo, com base nestes resultados e no fundamento teórico das técnicas (descrito no capítulo III), os estudos posteriores apresentados apenas baseados em resultados obtidos por TXRF, podem ser considerados representativos para ambas as técnicas.

4.1.3 Amostras de Tecido da mama

Foram analisadas 32 amostras da mama, isto é, 16 amostras de tecido saudável e outras 16 com tumor maligno, correspondentes a 16 indivíduos.

4.1.3.1 Análise das concentrações de cada elemento químico, em todas as amostras, comparando as diferentes sub-amostras (saudáveis e com tumor).

Recorreu-se inicialmente a uma análise descritiva dos dados (resultados experimentais), através de gráficos de barras e teste de hipóteses, de forma a ter um melhor conhecimento da informação contida na base de dados.

Foi aplicado um teste não paramétrico (não exige à partida o conhecimento da distribuição das variáveis sob estudo) para comparar a distribuição das concentrações nas sub-amostras com tumor e saudáveis. O teste utilizado foi o de Wilcoxon, uma vez que é violado o pressuposto da normalidade necessário para a aplicação do teste t-Student. O teste de Wilcoxon, permite formular as seguintes hipóteses:

- H_0 : Não existem diferenças significativas entre as concentrações dos elementos químicos presentes nas sub-amostras saudáveis e com tumor;
- H_1 : Existem diferenças significativas entre as concentrações dos elementos químicos presentes nas sub-amostras saudáveis e com tumor;

Considerou-se o teste como sendo bilateral com nível de significância de 5%.

A seguir apresentam-se os gráficos de barras e tabelas resultantes da aplicação do teste para cada um dos elementos (figuras 54-62; tabelas 13-39).

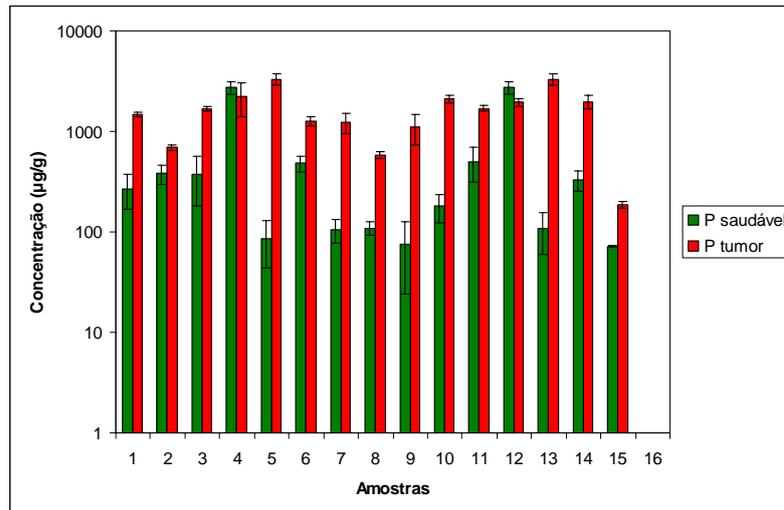


Figura 54 – Gráfico relativo às concentrações do elemento P, no tecido da mama saudável e com tumor para todas as amostras.

Descriptive Statistics

	N	Mean	Std. Deviation	Minimum	Maximum	Percentiles		
						25th	50th (Median)	75th
PSaudávelTXRF	16	533,53756	872,071941	,001	2732,000	90,97500	224,85000	56,50000
PTumorTXRF	16	1546,819	951,782906	,001	3307,000	95,20000	1584,35000	2062,800

Tabela 13 – Estatística descritiva (medidas de localização e dispersão) das variáveis do elemento P, no tecido da mama saudável e com tumor para todas as amostras.

Ranks

		N	Mean Rank	Sum of Ranks
PTumorTXRF -	Negative Ranks	2 ^a	5,00	10,00
PSaudávelTXRF	Positive Ranks	13 ^b	8,46	110,00
	Ties	1 ^c		
	Total	16		

- a. PTumorTXRF < PSaudávelTXRF
- b. PTumorTXRF > PSaudávelTXRF
- c. PTumorTXRF = PSaudávelTXRF

Tabela 14 – “Ranking” dos indivíduos do elemento P, no tecido da mama saudável e com tumor para todas as amostras.

Test Statistics^b

	PTumorTXRF - PSaudávelTXRF
Z	-2,840 ^a
Asymp. Sig. (2-tailed)	,005

a. Based on negative ranks.

b. Wilcoxon Signed Ranks Test

Tabela 15 – Resultado da estatística do teste para o elemento P.

Observa-se através do gráfico da figura 54 que a concentração do elemento P nas sub-amostras com tumor é superior à concentração nas sub-amostras saudáveis, com exceção das amostras 4 e 12.

Na tabela 13, aparece a estatística descritiva para as duas variáveis sendo de salientar que o valor da mediana para a variável do tecido da mama com tumor é superior à variável do tecido da mama saudável. Na tabela 14, verifica-se que existem treze amostras com um valor de concentração de fósforo, nos tecidos com tumor, superior à concentração nos tecidos saudáveis. Na tabela 15, apresenta-se a estatística Z e o p-value calculado a partir desta estatística para o teste bilateral. Neste caso o valor do p-value é de 0,005 (<0,05) pelo que H_0 é rejeitada, ou seja, pode concluir-se que existem diferenças significativas entre as concentrações do elemento P presentes nas sub-amostras saudáveis e com tumor;

Este tipo de interpretação foi realizado para os restantes elementos, tendo-se verificado da mesma forma que a concentração dos elementos nas sub-amostras com tumor é superior à concentração nas sub-amostras saudáveis, existindo sempre algumas exceções em determinadas amostras. Os resultados do teste permitem concluir que existem diferenças significativas entre as concentrações dos elementos químicos presentes nas sub-amostras saudáveis e com tumor, uma vez que para todos os elementos químicos o valor do p-value é inferior a 0,05 (rejeitando-se, por isso a hipótese H_0) à exceção do elemento Ni.

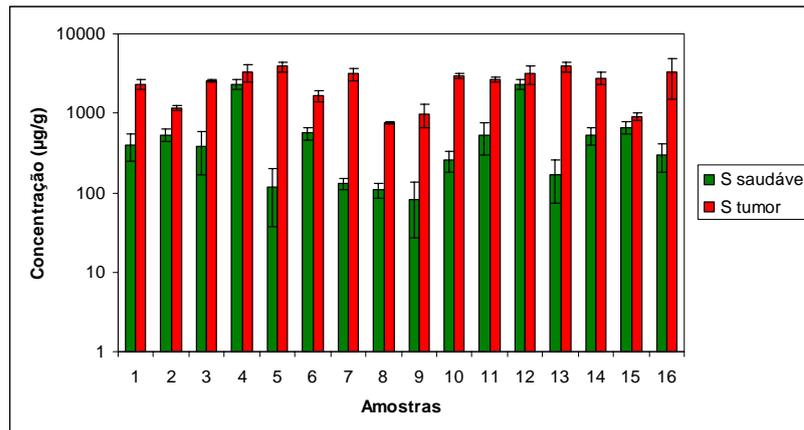


Figura 55 – Gráfico relativo às concentrações do elemento S, no tecido da mama saudável e com tumor para todas as amostras.

Descriptive Statistics

	N	Mean	Std. Deviation	Minimum	Maximum	Percentiles		
						25th	50th (Median)	75th
SSaudávelTXRF	16	586,93125	701,498780	80,800	2319,400	38,70000	390,30000	557,42500
STumorTXRF	16	2461,813	1050,871817	746,200	3904,400	1294,825	2728,50000	3214,450

Tabela 16 – Estatística descritiva (medidas de localização e dispersão) das variáveis do elemento S, no tecido da mama saudável e com tumor para todas as amostras.

Ranks

		N	Mean Rank	Sum of Ranks
STumorTXRF - SSaudávelTXRF	Negative Ranks	0 ^a	,00	,00
	Positive Ranks	16 ^b	8,50	136,00
	Ties	0 ^c		
	Total	16		

- a. STumorTXRF < SSaudávelTXRF
- b. STumorTXRF > SSaudávelTXRF
- c. STumorTXRF = SSaudávelTXRF

Tabela 17 – “Ranking” dos indivíduos do elemento S, no tecido da mama saudável e com tumor para todas as amostras.

Test Statistics^b

	STumor TXRF - SSaudável TXRF
Z	-3,516 ^a
Asymp. Sig. (2-tailed)	,000

a. Based on negative ranks.

b. Wilcoxon Signed Ranks Test

Tabela 18 – Resultado da estatística do teste para o elemento S.

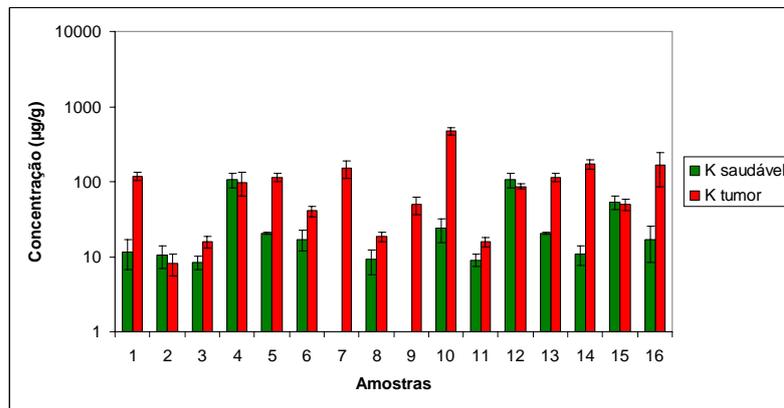


Figura 56 – Gráfico relativo às concentrações do elemento K, no tecido da mama saudável e com tumor para todas as amostras.

Descriptive Statistics

	N	Mean	Std. Deviation	Minimum	Maximum	Percentiles		
						25th	50th (Median)	75th
KSaudávelTXR	16	26,30013	33,021987	,001	105,100	9,02500	14,25000	22,92500
KTumorTXRF	16	05,20000	112,010511	8,100	471,900	23,95000	91,95000	41,62500

Tabela 19 – Estatística descritiva (medidas de localização e dispersão) das variáveis do elemento K, no tecido da mama saudável e com tumor para todas as amostras.

Ranks

		N	Mean Rank	Sum of Ranks
KTumorTXRF - KSaudávelTXRF	Negative Ranks	4 ^a	3,50	14,00
	Positive Ranks	12 ^b	10,17	122,00
	Ties	0 ^c		
	Total	16		

- a. KTumorTXRF < KSaudávelTXRF
- b. KTumorTXRF > KSaudávelTXRF
- c. KTumorTXRF = KSaudávelTXRF

Tabela 20 –“Ranking” dos indivíduos do elemento K, no tecido da mama saudável e com tumor para todas as amostras.

Test Statistics^b

	KTumorTXRF - KSaudávelTXRF
Z	-2,793 ^a
Asymp. Sig. (2-tailed)	,005

- a. Based on negative ranks.
- b. Wilcoxon Signed Ranks Test

Tabela 21 – Resultado da estatística do teste para o elemento K.

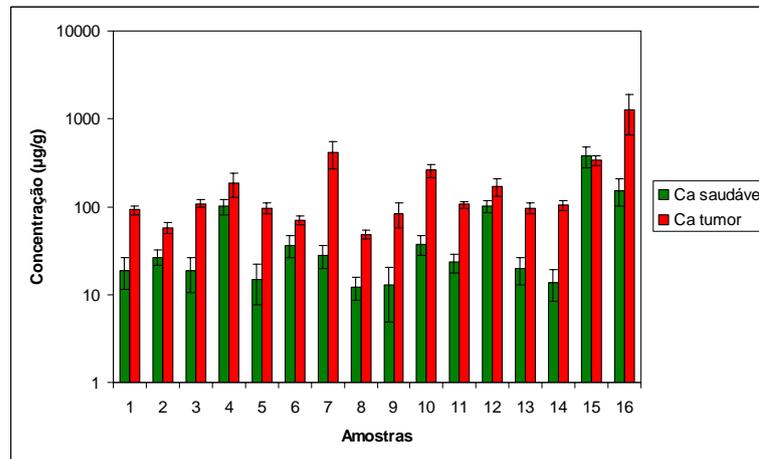


Figura 57 – Gráfico relativo às concentrações do elemento Ca, no tecido da mama saudável e com tumor para todas as amostras.

Descriptive Statistics

	N	Mean	Std. Deviation	Minimum	Maximum	Percentiles		
						25th	50th (Median)	75th
CaSaudávelTXRF	16	62,25625	93,855499	12,100	379,000	15,72500	24,90000	85,00000
CaTumorTXRF	16	218,83125	299,776865	48,800	1273,600	85,87500	104,50000	241,35000

Tabela 22 – Estatística descritiva (medidas de localização e dispersão) das variáveis do elemento Ca, no tecido da mama saudável e com tumor para todas as amostras.

Ranks

		N	Mean Rank	Sum of Ranks
CaTumor	Negative Ranks	1 ^a	4,00	4,00
TXRF -	Positive Ranks	15 ^b	8,80	132,00
CaSaudável	Ties	0 ^c		
TXRF	Total	16		

a. CaTumorTXRF < CaSaudávelTXRF

b. CaTumorTXRF > CaSaudávelTXRF

c. CaTumorTXRF = CaSaudávelTXRF

Tabela 23 – “Ranking” dos indivíduos do elemento Ca, no tecido da mama saudável e com tumor para todas as amostras.

Test Statistics^b

	CaTumorTXRF - CaSaudávelTXRF
Z	-3,309 ^a
Asymp. Sig. (2-tailed)	,001

a. Based on negative ranks.

b. Wilcoxon Signed Ranks Test

Tabela 24 – Resultado da estatística do teste para o elemento Ca.

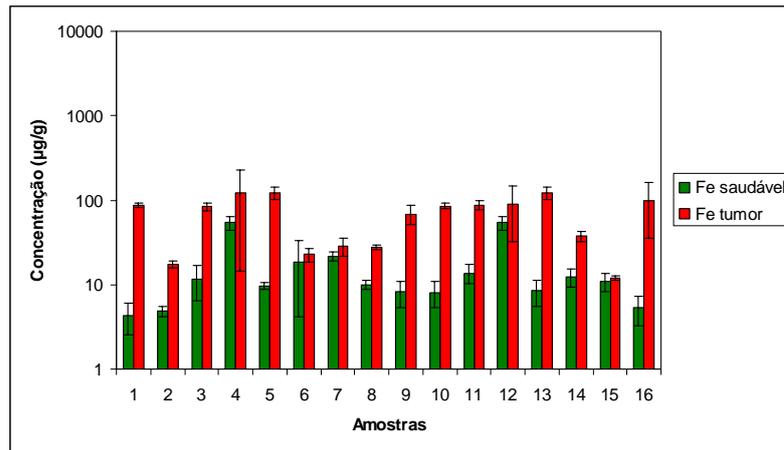


Figura 58 – Gráfico relativo às concentrações do elemento Fe, no tecido da mama saudável e com tumor para todas as amostras.

Descriptive Statistics

	N	Mean	Std. Deviation	Minimum	Maximum	Percentiles		
						25th	50th (Median)	75th
FeSaudávelTXRF	16	15,97500	15,611897	4,300	54,200	8,12500	10,45000	17,30000
FeTumorTXRF	16	69,41875	39,278989	11,900	121,900	27,90000	84,80000	95,97500

Tabela 25 – Estatística descritiva (medidas de localização e dispersão) das variáveis do elemento Fe, no tecido da mama saudável e com tumor para todas as amostras.

Ranks

		N	Mean Rank	Sum of Ranks
FeTumor	Negative Ranks	0 ^a	,00	,00
TXRF -	Positive Ranks	16 ^b	8,50	136,00
FeSaudável	Ties	0 ^c		
TXRF	Total	16		

- a. FeTumorTXRF < FeSaudávelTXRF
- b. FeTumorTXRF > FeSaudávelTXRF
- c. FeTumorTXRF = FeSaudávelTXRF

Tabela 26 – “Ranking” dos indivíduos do elemento Fe, no tecido da mama saudável e com tumor para todas as amostras.

Test Statistics^b

	FeTumorTXRF - FeSaudávelTXRF
Z	-3,516 ^a
Asymp. Sig. (2-tailed)	,000

a. Based on negative ranks.

b. Wilcoxon Signed Ranks Test

Tabela 27 – Resultado da estatística do teste para o elemento Fe.

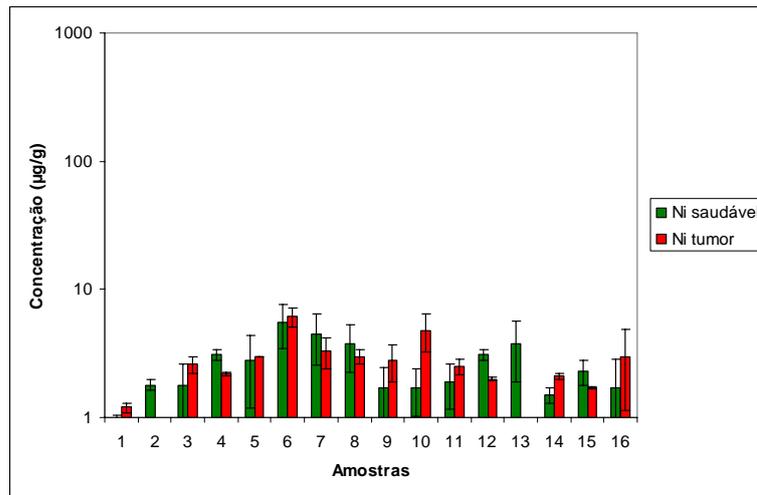


Figura 59 – Gráfico relativo às concentrações do elemento Ni, no tecido da mama saudável e com tumor para todas as amostras.

Descriptive Statistics

	N	Mean	Std. Deviation	Minimum	Maximum	Percentiles		
						25th	50th (Median)	75th
NiSaudávelTXRF	16	2,62500	1,251399	1,000	5,500	1,70000	2,10000	3,62500
NiTumorTXRF	16	2,56881	1,452107	,001	6,100	1,77500	2,55000	3,00000

Tabela 28 – Estatística descritiva (medidas de localização e dispersão) das variáveis do elemento Ni, no tecido da mama saudável e com tumor para todas as amostras.

Ranks

		N	Mean Rank	Sum of Ranks
NiTumor	Negative Ranks	7 ^a	10,21	71,50
TXRF -	Positive Ranks	9 ^b	7,17	64,50
NiSaudável	Ties	0 ^c		
TXRF	Total	16		

- a. NiTumorTXRF < NiSaudávelTXRF
- b. NiTumorTXRF > NiSaudávelTXRF
- c. NiTumorTXRF = NiSaudávelTXRF

Tabela 29 – “Ranking” dos indivíduos do elemento Ni, no tecido da mama saudável e com tumor para todas as amostras.

Test Statistics^b

	NiTumorTXRF - NiSaudávelTXRF
Z	-,181 ^a
Asymp. Sig. (2-tailed)	,856

- a. Based on positive ranks.
- b. Wilcoxon Signed Ranks Test

Tabela 30 – Resultado da estatística do teste para o elemento Ni.

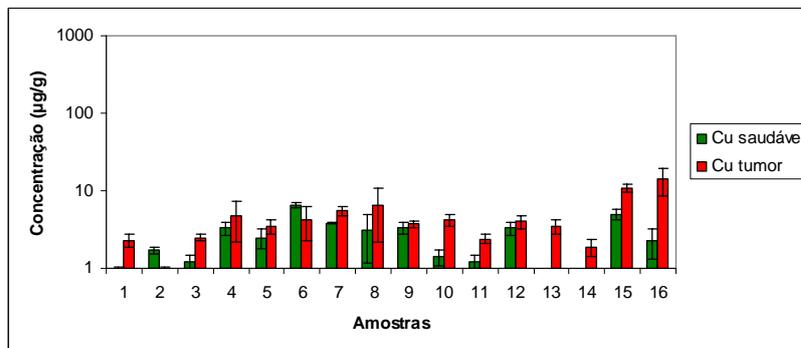


Figura 60 – Gráfico relativo às concentrações do elemento Cu, no tecido da mama saudável e com tumor para todas as amostras.

Descriptive Statistics

	N	Mean	Std. Deviation	Minimum	Maximum	Percentiles		
						25th	50th (Median)	75th
CuSaudávelTXRF	16	2,48138	1,770771	,001	6,600	1,20000	2,40000	3,30000
CuTumorTXRF	16	4,68750	3,408005	1,000	14,100	2,42500	3,85000	5,30000

Tabela 31 – Estatística descritiva (medidas de localização e dispersão) das variáveis do elemento Cu, no tecido da mama saudável e com tumor para todas as amostras.

Ranks

	N	Mean Rank	Sum of Ranks
CuTumorTXRF - Negative Ranks	2 ^a	6,75	13,50
CuSaudável TXRF Positive Ranks	14 ^b	8,75	122,50
Ties	0 ^c		
Total	16		

a. CuTumorTXRF < CuSaudávelTXRF

b. CuTumorTXRF > CuSaudávelTXRF

c. CuTumorTXRF = CuSaudávelTXRF

Tabela 32 – “Ranking” dos indivíduos do elemento Cu, no tecido da mama saudável e com tumor para todas as amostras.

Test Statistics^b

	CuTumorTXRF - CuSaudávelTXRF
Z	-2,819 ^a
Asymp. Sig. (2-tailed)	,005

a. Based on negative ranks.

b. Wilcoxon Signed Ranks Test

Tabela 33 – Resultado da estatística do teste para o elemento Cu.

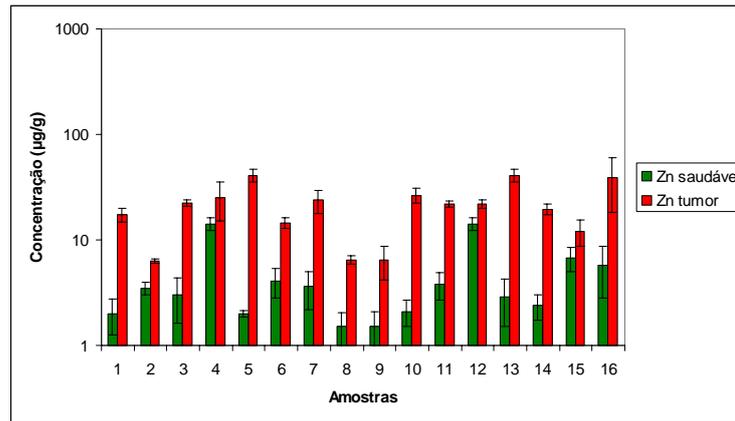


Figura 61 – Gráfico relativo às concentrações do elemento Zn, no tecido da mama saudável e com tumor para todas as amostras.

Descriptive Statistics

	N	Mean	Std. Deviation	Minimum	Maximum	Percentiles		
						25th	50th (Median)	75th
ZnSaudávelTXRF	16	4,58750	4,024736	1,500	14,200	2,02500	3,25000	5,37500
ZnTumorTXRF	16	21,61875	11,427582	6,300	41,000	12,72500	21,95000	26,27500

Tabela 34 – Estatística descritiva (medidas de localização e dispersão) das variáveis do elemento Zn, no tecido da mama saudável e com tumor para todas as amostras.

Ranks

		N	Mean Rank	Sum of Ranks
ZnTumor	Negative Ranks	0 ^a	,00	,00
TXRF -	Positive Ranks	16 ^b	8,50	136,00
ZnSaudável	Ties	0 ^c		
TXRF	Total	16		

- a. ZnTumorTXRF < ZnSaudávelTXRF
- b. ZnTumorTXRF > ZnSaudávelTXRF
- c. ZnTumorTXRF = ZnSaudávelTXRF

Tabela 35 – “Ranking” dos indivíduos do elemento Zn, no tecido da mama saudável e com tumor para todas as amostras.

Test Statistics^b

	ZnTumorTXRF - ZnSaudávelTXRF
Z	-3,516 ^a
Asymp. Sig. (2-tailed)	,000

a. Based on negative ranks.

b. Wilcoxon Signed Ranks Test

Tabela 36 – Resultado da estatística do teste para o elemento Zn.

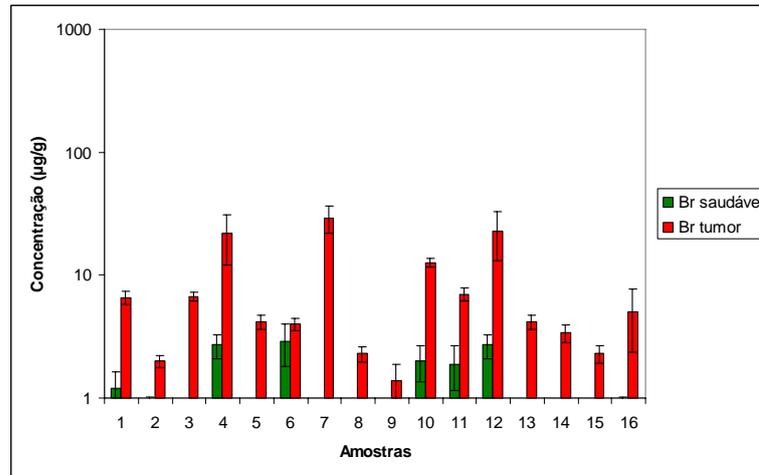


Figura 62 – Gráfico relativo às concentrações do elemento Br, no tecido da mama saudável e com tumor para todas as amostras.

Descriptive Statistics

	N	Mean	Std. Deviation	Minimum	Maximum	Percentiles		
						25th	50th (Median)	75th
BrSaudávelTXR	16	,96300	1,131433	,001	2,900	,00100	,50050	1,97500
BrTumorTXRF	16	8,47500	8,565862	1,400	29,100	2,57500	4,60000	11,27500

Tabela 37 – Estatística descritiva (medidas de localização e dispersão) das variáveis do elemento Br, no tecido da mama saudável e com tumor para todas as amostras.

		N	Mean Rank	Sum of Ranks
BrTumor	Negative Ranks	0 ^a	,00	,00
TXRF -	Positive Ranks	16 ^b	8,50	136,00
BrSaudável	Ties	0 ^c		
TXRF	Total	16		

- a. BrTumorTXRF < BrSaudávelTXRF
 b. BrTumorTXRF > BrSaudávelTXRF
 c. BrTumorTXRF = BrSaudávelTXRF

Tabela 38 – “Ranking” dos indivíduos do elemento Br, no tecido da mama saudável e com tumor para todas as amostras.

Test Statistics ^b	
	BrTumorTXRF - BrSaudávelTXRF
Z	-3,517 ^a
Asymp. Sig. (2-tailed)	,000

- a. Based on negative ranks.
 b. Wilcoxon Signed Ranks Test

Tabela 39 – Resultado da estatística do teste para o elemento Br.

4.1.3.2 Análise da razão das concentrações de cada elemento químico, para as diferentes sub-amostras (saudáveis e com tumor)

Dado que se pretende comparar as concentrações de cada elemento nas sub-amostras com tumor e saudáveis, definiram-se 9 variáveis que representam as razões dessas mesmas concentrações de modo a facilitar a interpretação e análise dos resultados. Na base de dados inicial (constituída pelos valores das concentrações de cada elemento químico) apenas era possível comparar as concentrações dos elementos das sub-amostras saudáveis entre si, bem como as concentrações dos elementos das sub-amostras com tumor o que limitaria as conclusões.

Nos gráficos seguintes (figuras 63-71) observam-se os valores das razões das concentrações de cada elemento, constatando-se novamente, de um modo geral, a presença de uma maior concentração nas sub-amostras com tumor em relação às saudáveis (valores superiores à unidade).

Nos gráficos em que não aparece o número da amostra, no eixo das abcissas, significa que nessa mesma amostra apenas foi detectado o elemento químico em causa, no tecido com tumor. Caso contrário, a razão apresentaria um valor muito elevado quando comparada com as outras.

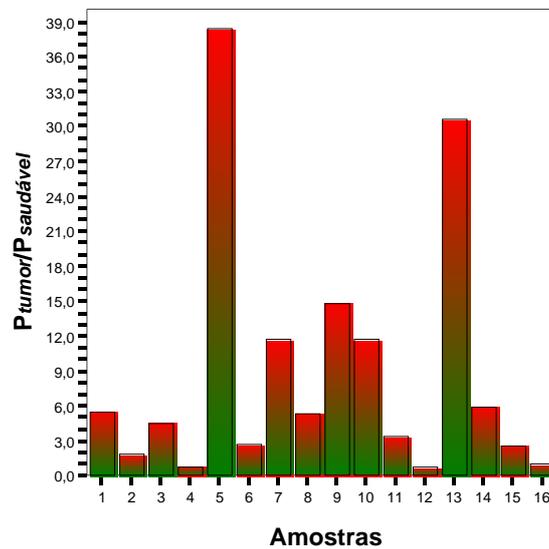


Figura 63 – Gráfico relativo à razão das concentrações do elemento P, nas duas sub-amostras de tecido da mama.

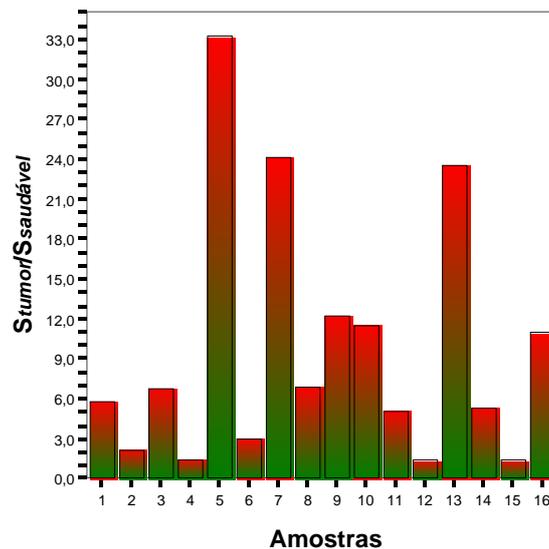


Figura 64 – Gráfico relativo à razão das concentrações do elemento S, nas duas sub-amostras de tecido da mama.

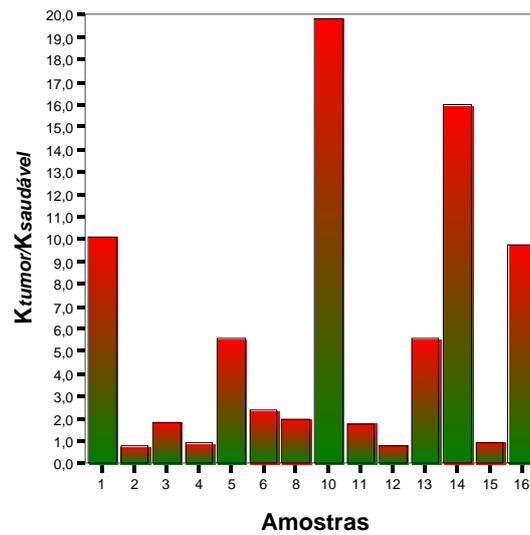


Figura 65 – Gráfico relativo à razão das concentrações do elemento K, nas duas sub-amostras de tecido da mama.

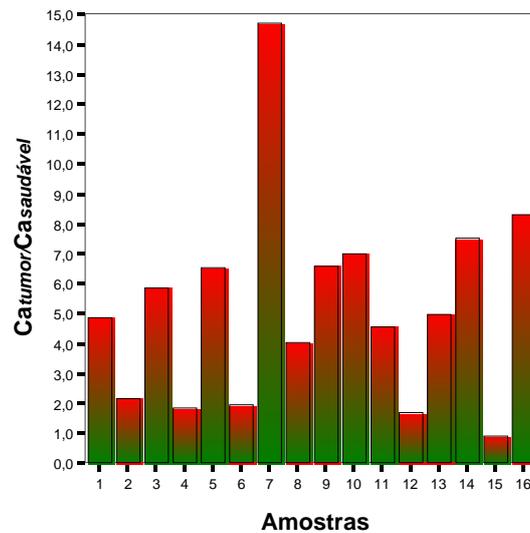


Figura 66 – Gráfico relativo à razão das concentrações do elemento Ca, nas duas sub-amostras de tecido da mama.

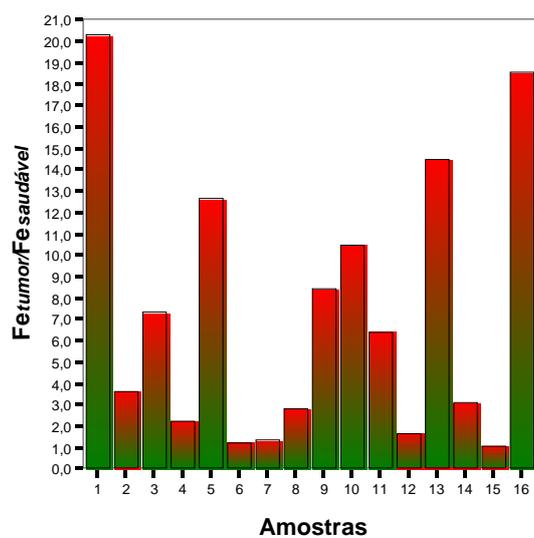


Figura 67 – Gráfico relativo à razão das concentrações do elemento Fe, nas duas sub-amostras de tecido da mama.

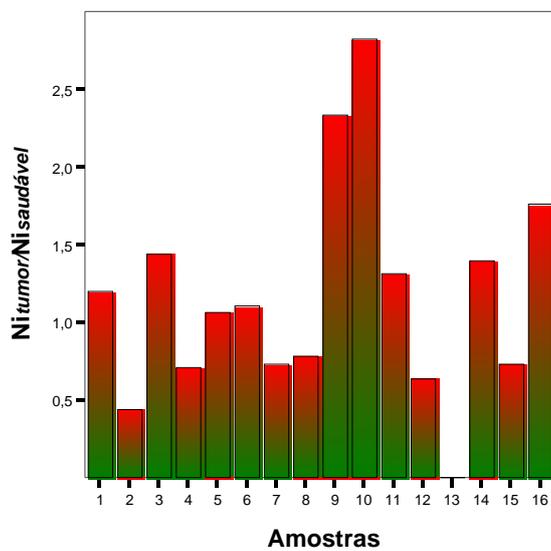


Figura 68 – Gráfico relativo à razão das concentrações do elemento Ni, nas duas sub-amostras de tecido da mama.

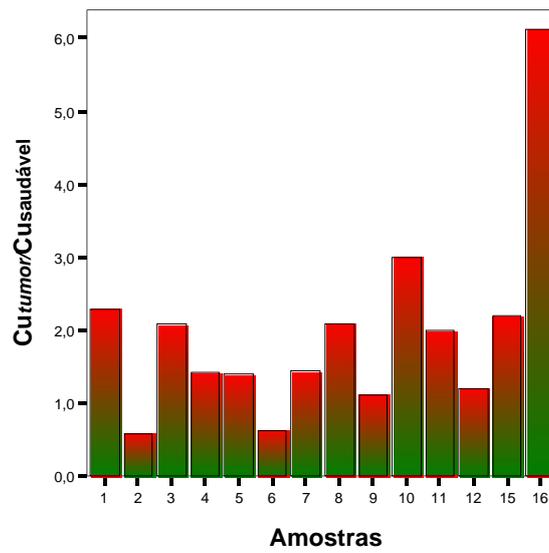


Figura 69 – Gráfico relativo à razão das concentrações do elemento Cu, nas duas sub-amostras de tecido da mama.

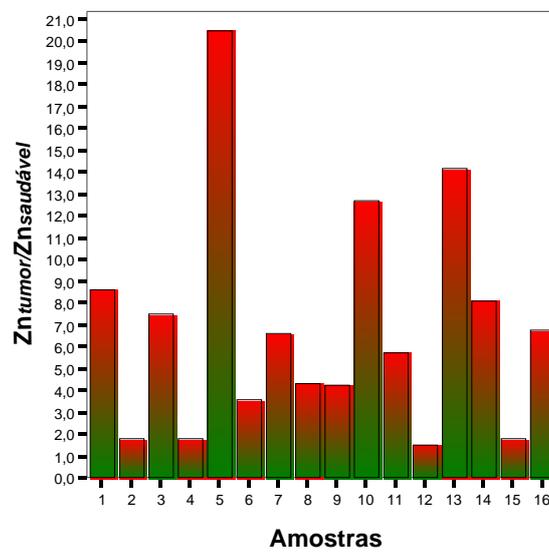


Figura 70 – Gráfico relativo à razão das concentrações do elemento Zn, nas duas sub-amostras de tecido da mama.

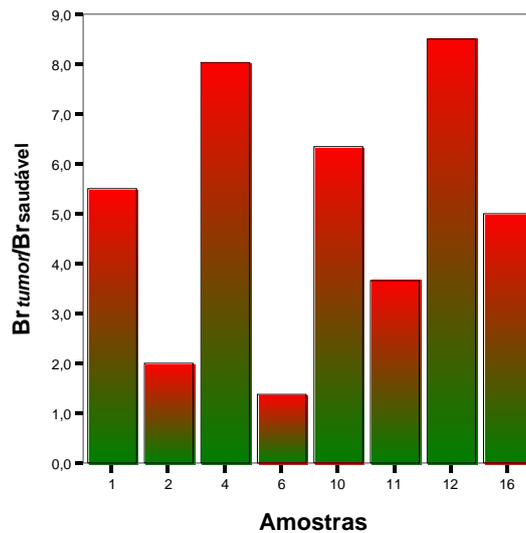


Figura 71 – Gráfico relativo à razão das concentrações do elemento Br, nas duas sub-amostras de tecido da mama.

4.1.4 Amostras de Tecido do intestino

Foram analisadas 26 amostras do intestino, isto é, 13 amostras de tecido saudável e outras 13 com tumor, correspondentes a 13 indivíduos.

4.1.4.1 Análise das concentrações de cada elemento químico, em todas as amostras, comparando as diferentes sub-amostras (saudáveis e com tumor)

A seguir apresentam-se os gráficos de barras e tabelas resultantes da aplicação do teste de hipóteses para cada um dos elementos, nas amostras de intestino (figuras 72-80; tabelas 40-66).

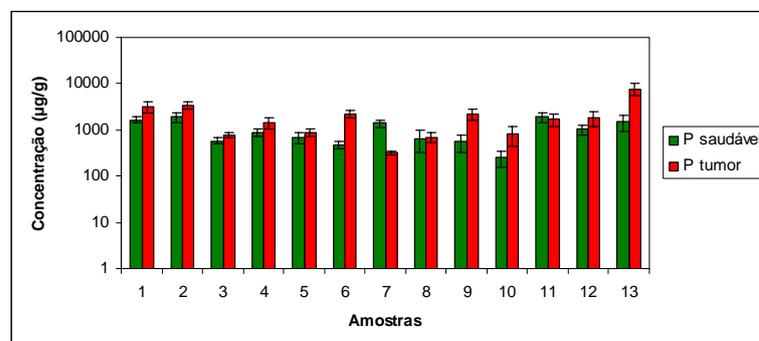


Figura 72 – Gráfico relativo às concentrações do elemento P, no tecido do intestino saudável e com tumor para todas as amostras.

Descriptive Statistics

	N	Mean	Std. Deviation	Minimum	Maximum	Percentiles		
						25th	50th (Median)	75th
PSaudávelTXRF	13	1038,108	570,073573	256,700	1931,000	71,00000	878,80000	1578,650
PMauTXRF	13	2097,777	1942,269469	321,700	7730,400	00,50000	1716,00000	2712,600

Tabela 40 – Estatística descritiva (medidas de localização e dispersão) das variáveis do elemento P, no tecido do intestino saudável e com tumor para todas as amostras.

Ranks

		N	Mean Rank	Sum of Ranks
PMauTXRF -	Negative Ranks	2 ^a	5,00	10,00
PSaudávelTXRF	Positive Ranks	11 ^b	7,36	81,00
	Ties	0 ^c		
	Total	13		

- a. PTumorTXRF < PSaudávelTXRF
 b. PTumorTXRF > PSaudávelTXRF
 c. PTumorTXRF = PSaudávelTXRF

Tabela 41 – “Ranking” dos indivíduos do elemento P, no tecido do intestino saudável e com tumor para todas as amostras.

Test Statistics^b

	PTumorTXRF - PSaudávelTXRF
Z	-2,481 ^a
Asymp. Sig. (2-tailed)	,013

- a. Based on negative ranks.
 b. Wilcoxon Signed Ranks Test

Tabela 42 – Resultado da estatística do teste para o elemento P.

Observa-se através do gráfico da figura 72 que a concentração do elemento P nas sub-amostras com tumor é superior à concentração nas sub-amostras saudáveis, com exceção das amostras 7 e 11.

Neste caso o valor do p-value é de 0,013 (<0,05) pelo que H_0 é rejeitada, ou seja, pode concluir-se que existem diferenças significativas entre as concentrações do elemento P presentes nas sub-amostras saudáveis e com tumor.

Este tipo de interpretação foi realizado para os restantes elementos, tendo-se verificado que a concentração dos elementos nas sub-amostras com tumor é superior à concentração nas sub-amostras saudáveis na maioria dos casos apesar dessa superioridade não ser muito significativa. Os resultados do teste permitem concluir que não existem diferenças significativas entre as concentrações dos elementos químicos presentes nas sub-amostras saudáveis e com tumor, uma vez que para todos os outros elementos químicos o valor do p-value é superior a 0,05 (rejeitando-se, por isso a hipótese H_1) à exceção do elemento P.

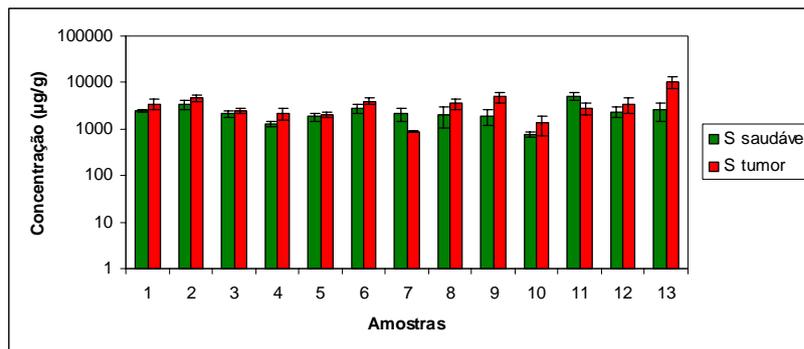


Figura 73 – Gráfico relativo às concentrações do elemento S, no tecido do intestino saudável e com tumor para todas as amostras.

Descriptive Statistics

	N	Mean	Std. Deviation	Minimum	Maximum	Percentiles		
						25th	50th (Median)	75th
SSaudávelTXRF	13	2372,777	1053,380519	767,300	5109,000	1889,750	2109,00000	2666,450
STumorTXRF	13	3546,485	2397,141759	874,300	10469,600	2129,500	3384,60000	4304,700

Tabela 43 – Estatística descritiva (medidas de localização e dispersão) das variáveis do elemento S, no tecido do intestino saudável e com tumor para todas as amostras.

Ranks

		N	Mean Rank	Sum of Ranks
STumorTXRF -	Negative Ranks	2 ^a	10,00	20,00
SSaudávelTXRF	Positive Ranks	11 ^b	6,45	71,00
	Ties	0 ^c		
	Total	13		

- a. STumorTXRF < SSaudávelTXRF
- b. STumorTXRF > SSaudávelTXRF
- c. STumorTXRF = SSaudávelTXRF

Tabela 44 – “Ranking” dos indivíduos do elemento S, no tecido do intestino saudável e com tumor para todas as amostras.

Test Statistics^b

	STumorTXRF - SSaudávelTXRF
Z	-1,782 ^a
Asymp. Sig. (2-tailed)	,075

- a. Based on negative ranks.
- b. Wilcoxon Signed Ranks Test

Tabela 45 – Resultado da estatística do teste para o elemento S.

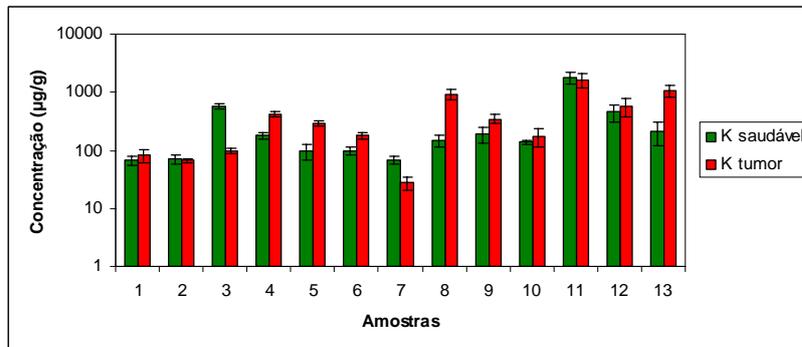


Figura 74 – Gráfico relativo às concentrações do elemento K, no tecido do intestino saudável e com tumor para todas as amostras.

Descriptive Statistics

	N	Mean	Std. Deviation	Minimum	Maximum	Percentiles		
						25th	50th (Median)	75th
KSaudávelTXR	13	17,00000	478,991569	68,200	1828,000	83,35000	146,60000	33,00000
KTumorTXRF	13	54,23538	481,630384	27,300	1624,700	89,25000	298,00000	55,40000

Tabela 46 – Estatística descritiva (medidas de localização e dispersão) das variáveis do elemento K, no tecido do intestino saudável e com tumor para todas as amostras.

Ranks

		N	Mean Rank	Sum of Ranks
KTumorTXRF -	Negative Ranks	4 ^a	6,25	25,00
KSaudávelTXRF	Positive Ranks	9 ^b	7,33	66,00
	Ties	0 ^c		
	Total	13		

a. KTumorTXRF < KSaudávelTXRF

b. KTumorTXRF > KSaudávelTXRF

c. KTumorTXRF = KSaudávelTXRF

Tabela 47 – “Ranking” dos indivíduos do elemento K, no tecido do intestino saudável e com tumor para todas as amostras.

Test Statistics^b

	KTumorTXRF - KSaudávelTXRF
Z	-1,433 ^a
Asymp. Sig. (2-tailed)	,152

a. Based on negative ranks.

b. Wilcoxon Signed Ranks Test

Tabela 48 – Resultado da estatística do teste para o elemento K.

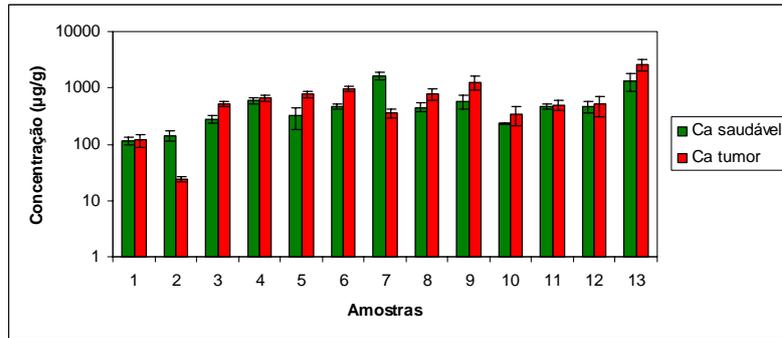


Figura 75 – Gráfico relativo às concentrações do elemento Ca, no tecido do intestino saudável e com tumor para todas as amostras.

Descriptive Statistics

	N	Mean	Std. Deviation	Minimum	Maximum	Percentiles		
						25th	50th (Median)	75th
CaSaudávelTXRF	13	543,26154	446,985668	113,700	1628,000	258,60000	463,80000	580,50000
CaTumorTXRF	13	725,06231	660,062764	23,810	2622,600	348,35000	522,00000	875,10000

Tabela 49 – Estatística descritiva (medidas de localização e dispersão) das variáveis do elemento Ca, no tecido do intestino saudável e com tumor para todas as amostras.

Ranks

	N	Mean Rank	Sum of Ranks
CaTumor	Negative Ranks	2 ^a	18,00
TXRF -	Positive Ranks	11 ^b	73,00
CaSaudável	Ties	0 ^c	
TXRF	Total	13	

a. CaTumorTXRF < CaSaudávelTXRF

b. CaTumorTXRF > CaSaudávelTXRF

c. CaTumorTXRF = CaSaudávelTXRF

Tabela 50 – “Ranking” dos indivíduos do elemento Ca, no tecido do intestino saudável e com tumor para todas as amostras.

Test Statistics^b

	CaTumorTXRF - CaSaudávelTXRF
Z	-1,922 ^a
Asymp. Sig. (2-tailed)	,055

a. Based on negative ranks.

b. Wilcoxon Signed Ranks Test

Tabela 51 – Resultado da estatística do teste para o elemento Ca.

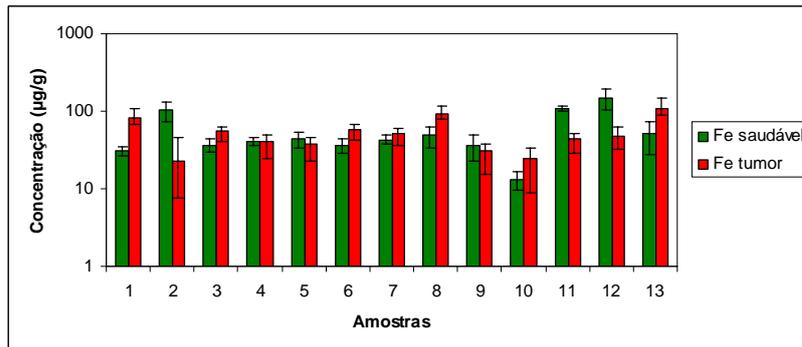


Figura 76 – Gráfico relativo às concentrações do elemento Fe, no tecido do intestino saudável e com tumor para todas as amostras.

Descriptive Statistics

	N	Mean	Std. Deviation	Minimum	Maximum	Percentiles		
						25th	50th (Median)	75th
FeSaudávelTXRF	13	57,12308	38,807262	13,300	150,200	36,20000	43,00000	77,00000
FeTumorTXRF	13	53,50846	26,117876	23,110	106,200	34,30000	47,60000	70,50000

Tabela 52 – Estatística descritiva (medidas de localização e dispersão) das variáveis do elemento Fe, no tecido do intestino saudável e com tumor para todas as amostras.

Ranks

		N	Mean Rank	Sum of Ranks
FeTumor	Negative Ranks	6 ^a	7,00	42,00
TXRF -	Positive Ranks	7 ^b	7,00	49,00
FeSaudável	Ties	0 ^c		
TXRF	Total	13		

- a. FeTumorTXRF < FeSaudávelTXRF
- b. FeTumorTXRF > FeSaudávelTXRF
- c. FeTumorTXRF = FeSaudávelTXRF

Tabela 53 – “Ranking” dos indivíduos do elemento Fe, no tecido do intestino saudável e com tumor para todas as amostras.

Test Statistics^b

	FeTumorTXRF - FeSaudávelTXRF
Z	-,245 ^a
Asymp. Sig. (2-tailed)	,807

- a. Based on negative ranks.
- b. Wilcoxon Signed Ranks Test

Tabela 54 – Resultado da estatística do teste para o elemento Fe.

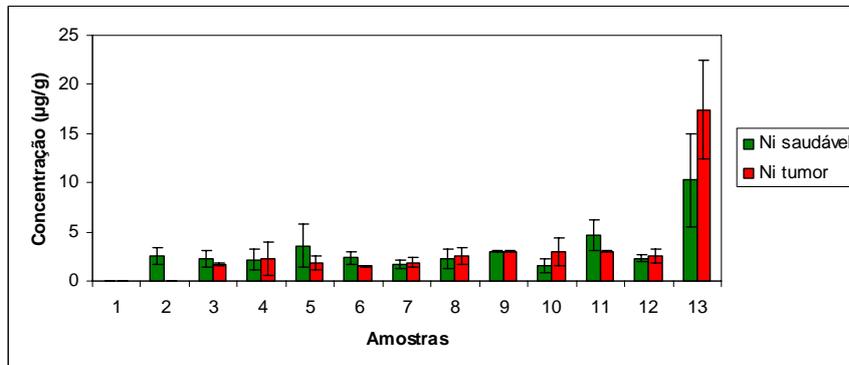


Figura 77 – Gráfico relativo às concentrações do elemento Ni, no tecido do intestino saudável e com tumor para todas as amostras.

Descriptive Statistics

	N	Mean	Std. Deviation	Minimum	Maximum	Percentiles		
						25th	50th (Median)	75th
NiSaudávelTXRF	13	2,98585	2,453189	,001	10,300	1,93750	2,30000	3,30000
NiTumorTXRF	13	3,12323	4,404454	,001	17,400	1,60000	2,20000	3,00000

Tabela 55 – Estatística descritiva (medidas de localização e dispersão) das variáveis do elemento Ni, no tecido do intestino saudável e com tumor para todas as amostras.

Ranks

	N	Mean Rank	Sum of Ranks
NiTumor Negative Ranks	5 ^a	7,60	38,00
TXRF - NiSaudável Positive Ranks	6 ^b	4,67	28,00
TXRF Ties	2 ^c		
Total	13		

- a. NiTumorTXRF < NiSaudávelTXRF
 b. NiTumorTXRF > NiSaudávelTXRF
 c. NiTumorTXRF = NiSaudávelTXRF

Tabela 56 – “Ranking” dos indivíduos do elemento Ni, no tecido do intestino saudável e com tumor para todas as amostras.

Test Statistics^b

	NiTumorTXRF - NiSaudávelTXRF
Z	-,445 ^a
Asymp. Sig. (2-tailed)	,656

- a. Based on positive ranks.
 b. Wilcoxon Signed Ranks Test

Tabela 57 – Resultado da estatística do teste para o elemento Ni.

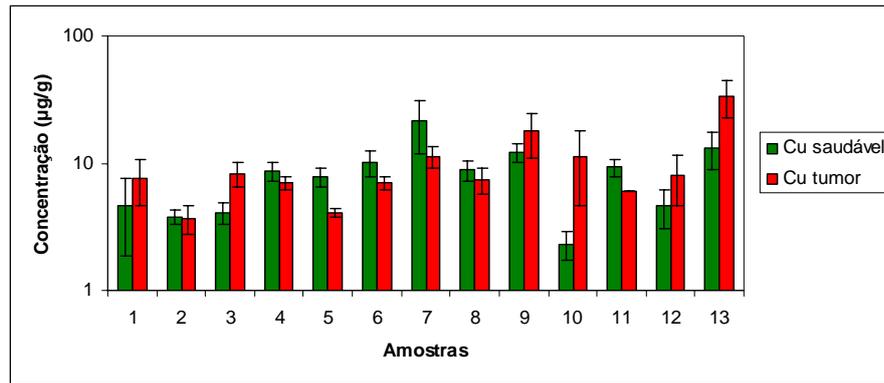


Figura 78 – Gráfico relativo às concentrações do elemento Cu, no tecido do intestino saudável e com tumor para todas as amostras.

Descriptive Statistics

	N	Mean	Std. Deviation	Minimum	Maximum	Percentiles		
						25th	50th (Median)	75th
CuSaudávelTXRF	13	8,53692	5,119966	2,300	21,300	4,35000	8,60000	11,19000
CuTumorTXRF	13	10,23846	7,896997	3,700	33,600	6,50000	7,60000	11,30000

Tabela 58 – Estatística descritiva (medidas de localização e dispersão) das variáveis do elemento Cu, no tecido do intestino saudável e com tumor para todas as amostras.

Ranks

		N	Mean Rank	Sum of Ranks
CuTumor	Negative Ranks	7 ^a	5,29	37,00
TXRF -	Positive Ranks	6 ^b	9,00	54,00
CuSaudável	Ties	0 ^c		
TXRF	Total	13		

- a. CuTumorTXRF < CuSaudávelTXRF
- b. CuTumorTXRF > CuSaudávelTXRF
- c. CuTumorTXRF = CuSaudávelTXRF

Tabela 59 – “Ranking” dos indivíduos do elemento Cu, no tecido do intestino saudável e com tumor para todas as amostras.

Test Statistics^b

	CuTumorTXRF - CuSaudávelTXRF
Z	-,594 ^a
Asymp. Sig. (2-tailed)	,552

a. Based on negative ranks.

b. Wilcoxon Signed Ranks Test

Tabela 60 – Resultado da estatística do teste para o elemento Cu.

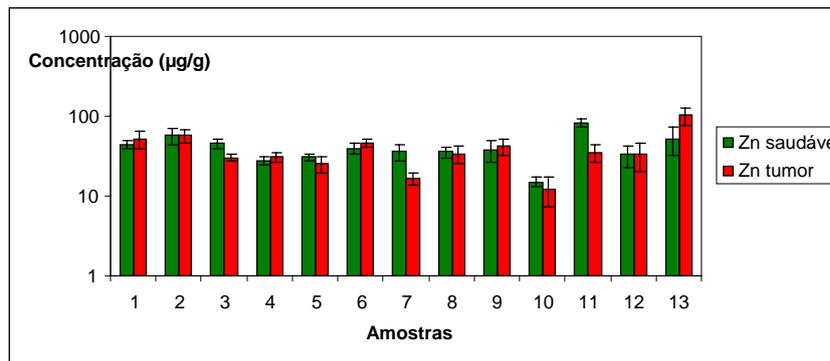


Figura 79 – Gráfico relativo às concentrações do elemento Zn, no tecido do intestino saudável e com tumor para todas as amostras.

Descriptive Statistics

	N	Mean	Std. Deviation	Minimum	Maximum	Percentiles		
						25th	50th (Median)	75th
ZnSaudávelTXRF	13	41,43846	16,580990	15,000	83,000	31,80000	38,00000	48,70000
ZnTumorTXRF	13	39,81538	22,882885	12,300	103,000	27,80000	34,00000	48,70000

Tabela 61 – Estatística descritiva (medidas de localização e dispersão) das variáveis do elemento Zn, no tecido do intestino saudável e com tumor para todas as amostras.

Ranks

		N	Mean Rank	Sum of Ranks
ZnTumor	Negative Ranks	7 ^a	7,00	49,00
TXRF -	Positive Ranks	6 ^b	7,00	42,00
ZnSaudável	Ties	0 ^c		
TXRF	Total	13		

- a. ZnTumorTXRF < ZnSaudávelTXRF
- b. ZnTumorTXRF > ZnSaudávelTXRF
- c. ZnTumorTXRF = ZnSaudávelTXRF

Tabela 62 – “Ranking” dos indivíduos do elemento Zn, no tecido do intestino saudável e com tumor para todas as amostras.

Test Statistics^b

	ZnTumorTXRF - ZnSaudávelTXRF
Z	-,245 ^a
Asymp. Sig. (2-tailed)	,807

- a. Based on positive ranks.
- b. Wilcoxon Signed Ranks Test

Tabela 63 – Resultado da estatística do teste para o elemento Zn.

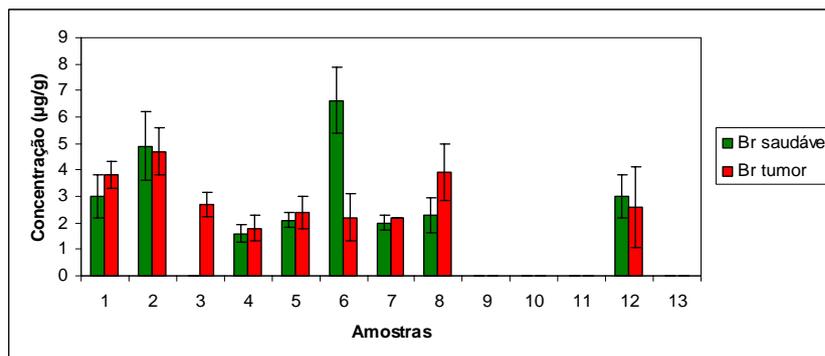


Figura 80 – Gráfico relativo às concentrações do elemento Br, no tecido do intestino saudável e com tumor para todas as amostras.

Descriptive Statistics

	N	Mean	Std. Deviation	Minimum	Maximum	Percentiles		
						25th	50th (Median)	75th
BrSaudávelTXRF	13	1,96346	2,081207	,001	6,620	,00100	2,00000	3,00000
BrTumorTXRF	13	2,02338	1,613663	,001	4,700	,00100	2,20000	3,25000

Tabela 64 – Estatística descritiva (medidas de localização e dispersão) das variáveis do elemento Br, no tecido do intestino saudável e com tumor para todas as amostras.

Ranks

	N	Mean Rank	Sum of Ranks
BrTumor TXRF - BrSaudável TXRF	Negative Ranks Positive Ranks Ties Total	3 ^a 6 ^b 4 ^c 13	5,33 4,83 16,00 29,00

- a. BrTumorTXRF < BrSaudávelTXRF
 b. BrTumorTXRF > BrSaudávelTXRF
 c. BrTumorTXRF = BrSaudávelTXRF

Tabela 65 – “Ranking” dos indivíduos do elemento Br, no tecido do intestino saudável e com tumor para todas as amostras.

Test Statistics^b

	BrTumorTXRF - BrSaudávelTXRF
Z	-,773 ^a
Asymp. Sig. (2-tailed)	,440

- a. Based on negative ranks.
 b. Wilcoxon Signed Ranks Test

Tabela 66 – Resultado da estatística do teste para o elemento Br.

4.1.4.2 - Análise da razão das concentrações de cada elemento químico, para as diferentes sub-amostras (saudáveis e com tumor)

Nos gráficos seguintes (figuras 81-89) observam-se os valores das razões das concentrações de cada elemento. A presença de uma maior ou igual concentração nas sub-amostras com tumor em relação às saudáveis (valores superiores à unidade) verifica-se, mas não é muito significativa.

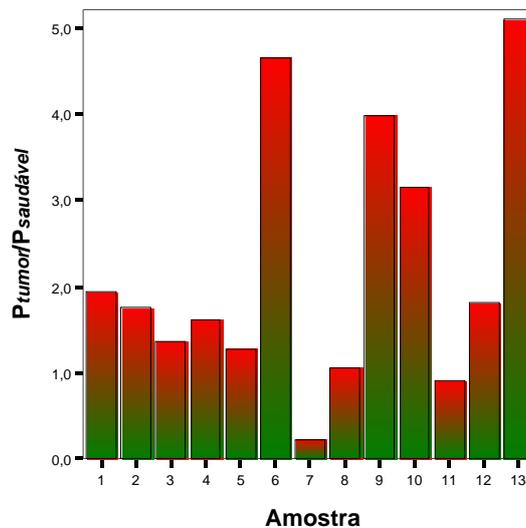


Figura 81 – Gráfico relativo à razão das concentrações do elemento P, nas duas sub-amostras de tecido do intestino.

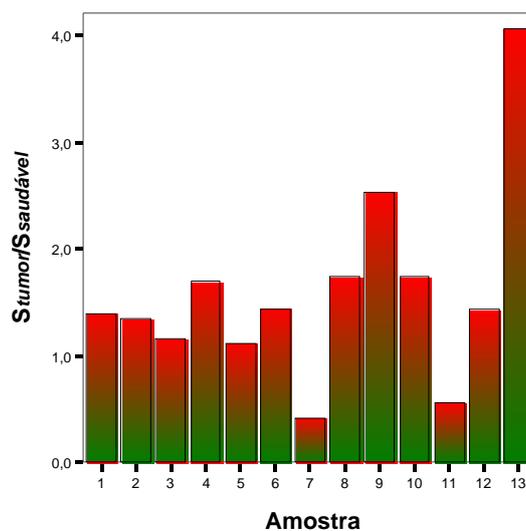


Figura 82 – Gráfico relativo à razão das concentrações do elemento S, nas duas sub-amostras de tecido do intestino.

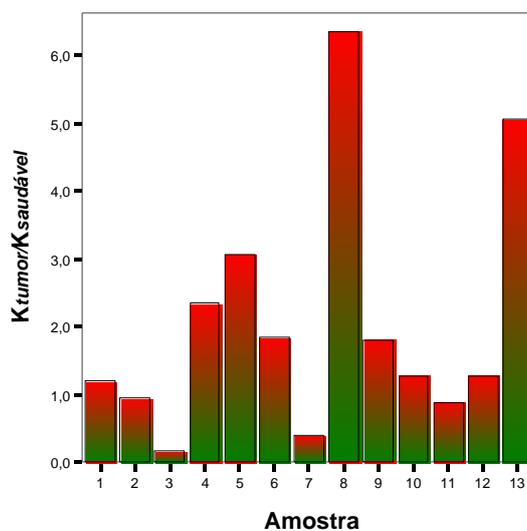


Figura 83 – Gráfico relativo à razão das concentrações do elemento K, nas duas sub-amostras de tecido do intestino.

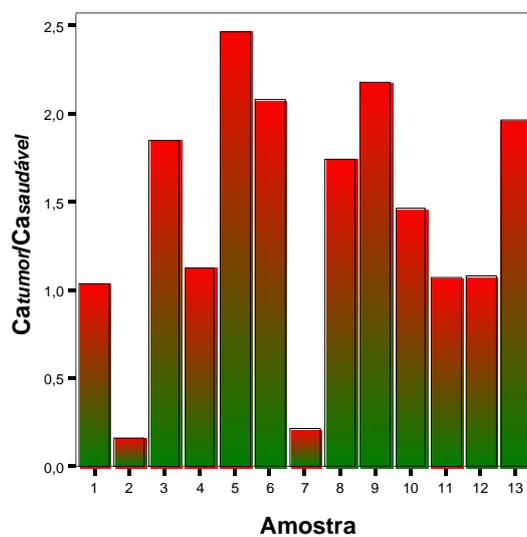


Figura 84 – Gráfico relativo à razão das concentrações do elemento Ca, nas duas sub-amostras de tecido do intestino.

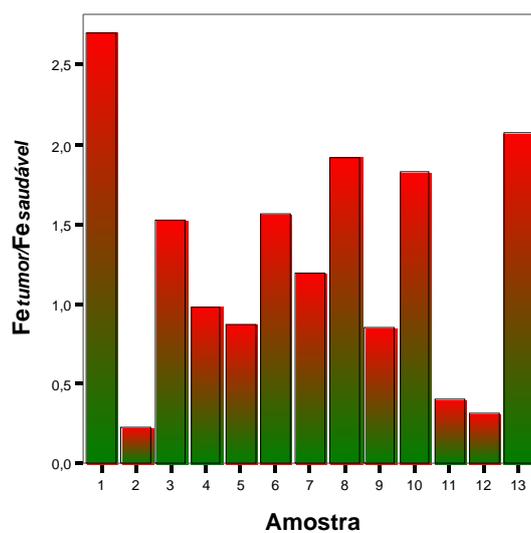


Figura 85 – Gráfico relativo à razão das concentrações do elemento Fe, nas duas sub-amostras de tecido do intestino.

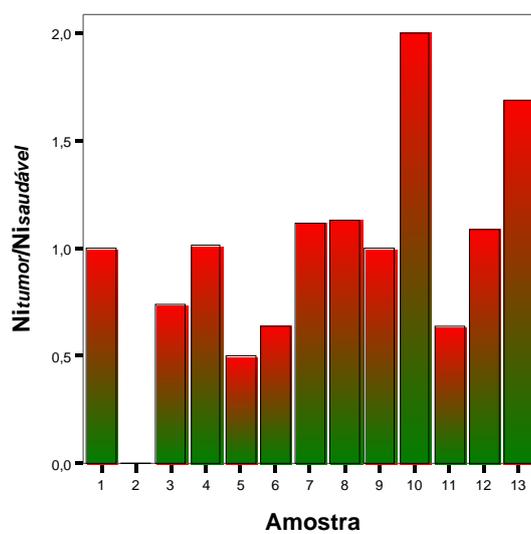


Figura 86 – Gráfico relativo à razão das concentrações do elemento Ni, nas duas sub-amostras de tecido do intestino.

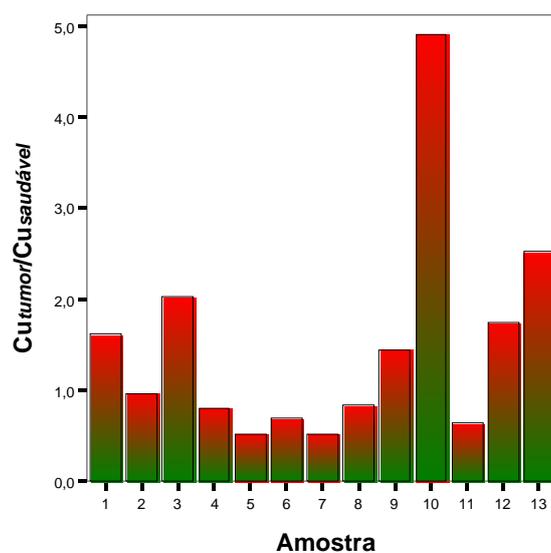


Figura 87 – Gráfico relativo à razão das concentrações do elemento Cu, nas duas sub-amostras de tecido do intestino.

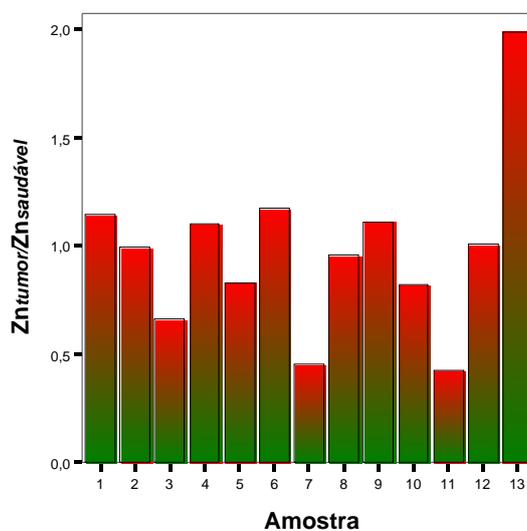


Figura 88 – Gráfico relativo à razão das concentrações do elemento Zn, nas duas sub-amostras de tecido do intestino.

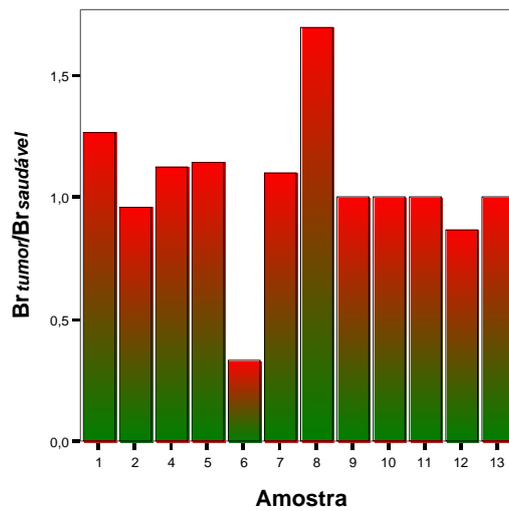


Figura 89 – Gráfico relativo à razão das concentrações do elemento Br, nas duas sub-amostras de tecido do intestino.

4.1.5 Amostras de Tecido do estômago

Foram analisadas 10 amostras de estômago, isto é, 5 amostras de tecido saudável e outras 5 com tumor, correspondentes a 5 indivíduos.

4.1.5.1 Análise das concentrações de cada elemento químico, em todas as amostras, comparando as diferentes sub-amostras (saudáveis e com tumor)

De seguida são apresentados os gráficos de barras e os resultados do teste de Wilcoxon resultantes da análise das amostras de tecido do estômago (figuras 90-98; tabelas 67-98).

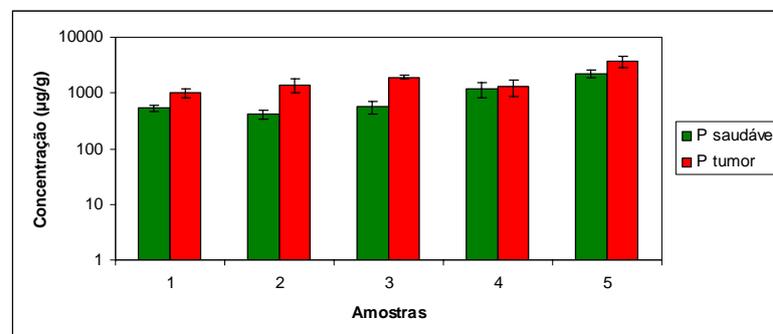


Figura 90 – Gráfico relativo às concentrações do elemento P, no tecido do estômago saudável e com tumor para todas as amostras.

Descriptive Statistics

	N	Mean	Std. Deviation	Minimum	Maximum	Percentiles		
						25th	50th (Median)	75th
PseudávelTXRF	5	995,71000	765,436982	422,250	2256,000	481,17500	570,20000	1723,000
PtumorTXRF	5	1873,600	1101,979346	994,600	3751,000	1139,800	1414,00000	2837,200

Tabela 67 – Estatística descritiva (medidas de localização e dispersão) das variáveis do elemento P, no tecido do estômago saudável e com tumor para todas as amostras.

Ranks

		N	Mean Rank	Sum of Ranks
PtumorTXRF -	Negative Ranks	0 ^a	,00	,00
PseudávelTXRF	Positive Ranks	5 ^b	3,00	15,00
	Ties	0 ^c		
	Total	5		

- a. PtumorTXRF < PseudávelTXRF
 b. PtumorTXRF > PseudávelTXRF
 c. PtumorTXRF = PseudávelTXRF

Tabela 68 – “Ranking” dos indivíduos do elemento P, no tecido do estômago saudável e com tumor para todas as amostras.

Test Statistics^b

	PtumorTXRF - Pseudável TXRF
Z	-2,023 ^a
Asymp. Sig. (2-tailed)	,043

- a. Based on negative ranks.
 b. Wilcoxon Signed Ranks Test

Tabela 69 – Resultado da estatística do teste para o elemento P.

Observa-se através do gráfico da figura 90 que a concentração do elemento P nas sub-amostras com tumor é superior à concentração nas sub-amostras saudáveis.

Neste caso o valor do p-value é de 0,043 (<0,05) pelo que H_0 é rejeitada, ou seja, pode concluir-se que existem diferenças significativas entre as concentrações do elemento P presentes nas sub-amostras saudáveis e com tumor;

Este tipo de interpretação foi realizado para os restantes elementos, tendo-se verificado que a concentração do elemento Fe nas sub-amostras com tumor é superior à concentração nas sub-amostras saudáveis, no entanto na maioria dos casos essa superioridade não foi muito significativa. Os resultados do teste permitem concluir que apenas existem diferenças significativas entre as concentrações dos elementos químicos Fe e P presentes nas sub-amostras saudáveis e com tumor. O contrário verifica-se para o resto dos elementos, uma vez que para todos os outros elementos químicos o valor do p-value é superior a 0,05 (rejeitando-se, por isso a hipótese H_1).

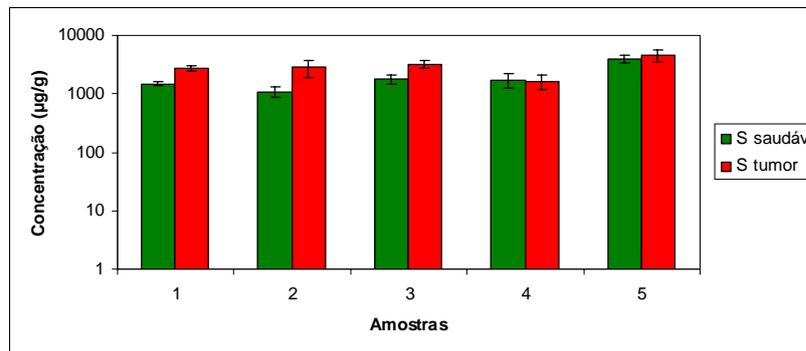


Figura 91 – Gráfico relativo às concentrações do elemento S, no tecido do estômago saudável e com tumor para todas as amostras.

Descriptive Statistics

	N	Mean	Std. Deviation	Minimum	Maximum	Percentiles		
						25th	50th (Median)	75th
Ssaudável TXRF	5	2000,100	1095,021027	1090,500	3896,000	1292,250	1721,00000	2847,500
Stumor TXRF	5	2982,600	1052,112570	1638,000	4563,000	2184,400	2819,40000	3862,400

Tabela 70 – Estatística descritiva (medidas de localização e dispersão) das variáveis do elemento S, no tecido do estômago saudável e com tumor para todas as amostras.

Ranks

		N	Mean Rank	Sum of Ranks
StumorTXRF - SsaudávelTXRF	Negative Ranks	1 ^a	1,00	1,00
	Positive Ranks	4 ^b	3,50	14,00
	Ties	0 ^c		
	Total	5		

- a. StumorTXRF < SsaudávelTXRF
- b. StumorTXRF > SsaudávelTXRF
- c. StumorTXRF = SsaudávelTXRF

Tabela 71 – “Ranking” dos indivíduos do elemento S, no tecido do estômago saudável e com tumor para todas as amostras.

Test Statistics^b

		StumorTXRF - Ssaudável TXRF
Z		-1,753 ^a
Asymp. Sig. (2-tailed)		,080

- a. Based on negative ranks.
- b. Wilcoxon Signed Ranks Test

Tabela 72 – Resultado da estatística do teste para o elemento S.

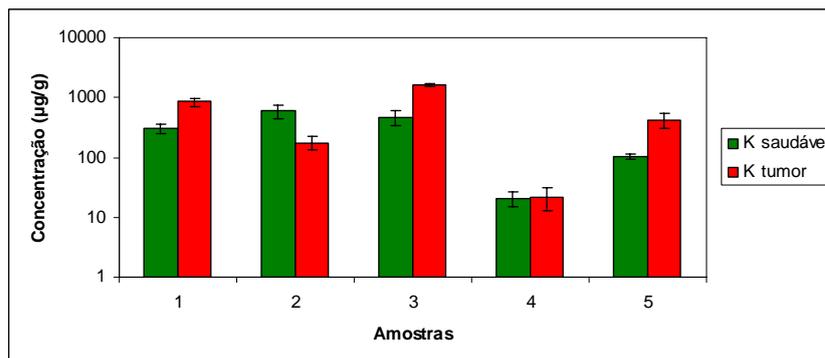


Figura 92 – Gráfico relativo às concentrações do elemento K, no tecido do estômago saudável e com tumor para todas as amostras.

Descriptive Statistics

	N	Mean	Std. Deviation	Minimum	Maximum	Percentiles		
						25th	50th (Median)	75th
Ksaudável TXRF	5	295,56000	239,039564	20,400	587,500	60,70000	300,90000	527,75000
Ktumor TXRF	5	615,68000	634,572622	21,600	1602,200	98,80000	427,00000	1226,900

Tabela 73 – Estatística descritiva (medidas de localização e dispersão) das variáveis do elemento K, no tecido do estômago saudável e com tumor para todas as amostras.

Ranks

		N	Mean Rank	Sum of Ranks
KtumorTXRF -	Negative Ranks	1 ^a	3,00	3,00
KsaudávelTXRF	Positive Ranks	4 ^b	3,00	12,00
	Ties	0 ^c		
	Total	5		

a. KtumorTXRF < KsaudávelTXRF

b. KtumorTXRF > KsaudávelTXRF

c. KtumorTXRF = KsaudávelTXRF

Tabela 74 – “Ranking” dos indivíduos do elemento K, no tecido do estômago saudável e com tumor para todas as amostras.

Test Statistics^b

	KtumorTXRF - Ksaudável TXRF
Z	-1,214 ^a
Asymp. Sig. (2-tailed)	,225

a. Based on negative ranks.

b. Wilcoxon Signed Ranks Test

Tabela 75 – Resultado da estatística do teste para o elemento K.

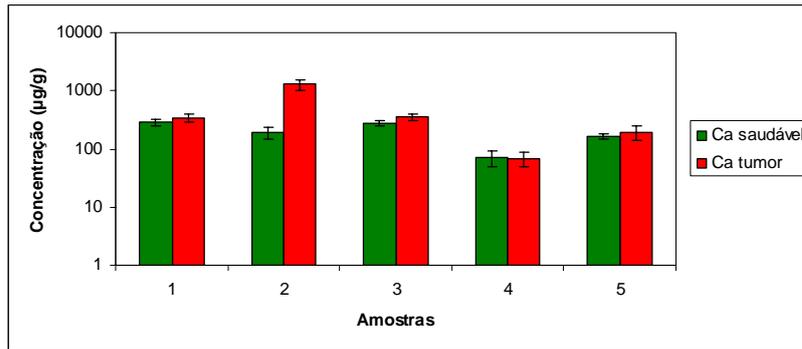


Figura 93 – Gráfico relativo às concentrações do elemento Ca, no tecido do estômago saudável e com tumor para todas as amostras.

Descriptive Statistics

	N	Mean	Std. Deviation	Minimum	Maximum	Percentiles		
						25th	50th (Median)	75th
Casaudável TXRF	5	198,78000	88,538816	70,600	285,900	117,80000	195,00000	281,65000
Catumor TXRF	5	451,78000	483,656967	69,300	1290,200	131,15000	348,00000	824,30000

Tabela 76 – Estatística descritiva (medidas de localização e dispersão) das variáveis do elemento Ca, no tecido do estômago saudável e com tumor para todas as amostras.

Ranks

	N	Mean Rank	Sum of Ranks
Catumor TXRF - Negative Ranks	1 ^a	1,00	1,00
Casaudável TXRF - Positive Ranks	4 ^b	3,50	14,00
Ties	0 ^c		
Total	5		

- a. CatumorTXRF < CasaudávelTXRF
- b. CatumorTXRF > CasaudávelTXRF
- c. CatumorTXRF = CasaudávelTXRF

Tabela 77 – “Ranking” dos indivíduos do elemento Ca, no tecido do estômago saudável e com tumor para todas as amostras.

Test Statistics^b

	CatumorTXRF - Casaudável TXRF
Z	-1,753 ^a
Asymp. Sig. (2-tailed)	,080

a. Based on negative ranks.

b. Wilcoxon Signed Ranks Test

Tabela 78 – Resultado da estatística do teste para o elemento Ca.

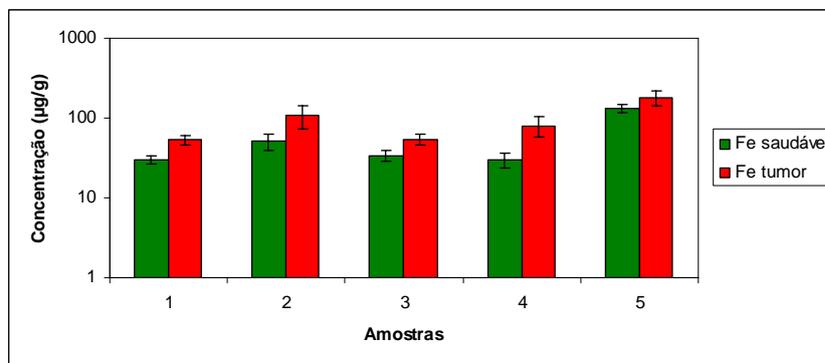


Figura 94 – Gráfico relativo às concentrações do elemento Fe, no tecido do estômago saudável e com tumor para todas as amostras.

Descriptive Statistics

	N	Mean	Std. Deviation	Minimum	Maximum	Percentiles		
						25th	50th (Median)	75th
Fesaudável TXRF	5	54,99000	42,897121	30,100	130,100	30,10000	33,40000	90,67500
Fetumor TXRF	5	95,06000	52,764837	53,200	180,300	53,40000	80,00000	144,25000

Tabela 79 – Estatística descritiva (medidas de localização e dispersão) das variáveis do elemento Fe, no tecido do estômago saudável e com tumor para todas as amostras.

Ranks

		N	Mean Rank	Sum of Ranks
FetumorTXRF	Negative Ranks	0 ^a	,00	,00
-	Positive Ranks	5 ^b	3,00	15,00
Fesaudável	Ties	0 ^c		
TXRF	Total	5		

- a. FetumorTXRF < FesaudávelTXRF
- b. FetumorTXRF > FesaudávelTXRF
- c. FetumorTXRF = FesaudávelTXRF

Tabela 80 – “Ranking” dos indivíduos do elemento Ca, no tecido do estômago saudável e com tumor para todas as amostras.

Test Statistics^b

	FetumorTXRF - Fesaudável TXRF
Z	-2,023 ^a
Asymp. Sig. (2-tailed)	,043

- a. Based on negative ranks.
- b. Wilcoxon Signed Ranks Test

Tabela 81 – Resultado da estatística do teste para o elemento Fe.

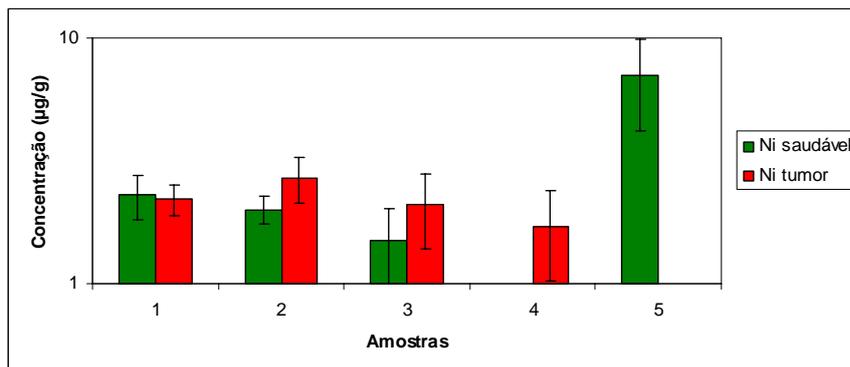


Figura 95 – Gráfico relativo às concentrações do elemento Ni, no tecido do estômago saudável e com tumor para todas as amostras.

Descriptive Statistics

	N	Mean	Std. Deviation	Minimum	Maximum	Percentiles		
						25th	50th (Median)	75th
Nisaudável TXRF	5	2,56020	2,634714	,001	7,000	,75050	2,00000	4,65000
Nitumor TXRF	5	1,74020	1,035437	,001	2,700	,85050	2,10000	2,45000

Tabela 87 – Estatística descritiva (medidas de localização e dispersão) das variáveis do elemento Ni, no tecido do estômago saudável e com tumor para todas as amostras.

Ranks

		N	Mean Rank	Sum of Ranks
NitumorTXRF	Negative Ranks	2 ^a	3,00	6,00
-	Positive Ranks	3 ^b	3,00	9,00
Nisaudável TXRF	Ties	0 ^c		
	Total	5		

a. NitumorTXRF < NisaudávelTXRF

b. NitumorTXRF > NisaudávelTXRF

c. NitumorTXRF = NisaudávelTXRF

Tabela 88 – “Ranking” dos indivíduos do elemento Ni, no tecido do estômago saudável e com tumor para todas as amostras.

Test Statistics^b

	Nitumor TXRF - Nisaudável TXRF
Z	-,405 ^a
Asymp. Sig. (2-tailed)	,686

a. Based on negative ranks.

b. Wilcoxon Signed Ranks Test

Tabela 89 – Resultado da estatística do teste para o elemento Ni.

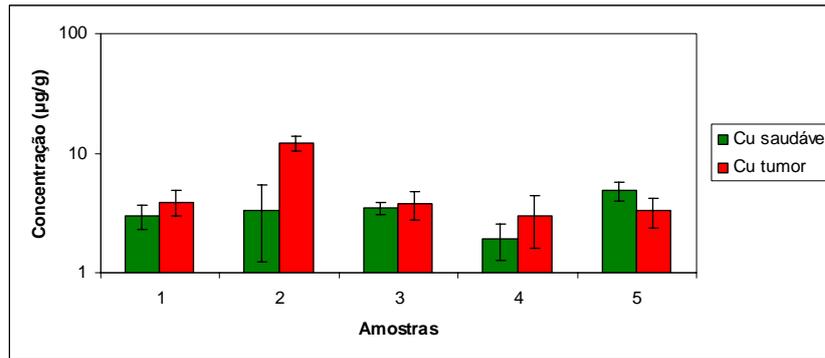


Figura 96 – Gráfico relativo às concentrações do elemento Cu, no tecido do estômago saudável e com tumor para todas as amostras.

Descriptive Statistics

	N	Mean	Std. Deviation	Minimum	Maximum	Percentiles		
						25th	50th (Median)	75th
Cusaudável TXRF	5	3,32200	1,076531	1,900	4,900	2,45000	3,35000	4,18000
Cutumor TXRF	5	5,21200	3,867263	3,000	12,100	3,15000	3,76000	8,00000

Tabela 90 – Estatística descritiva (medidas de localização e dispersão) das variáveis do elemento Cu, no tecido do estômago saudável e com tumor para todas as amostras.

Ranks

		N	Mean Rank	Sum of Ranks
Cutumor	Negative Ranks	1 ^a	4,00	4,00
TXRF -	Positive Ranks	4 ^b	2,75	11,00
Cusaudável	Ties	0 ^c		
TXRF	Total	5		

- a. CutumorTXRF < CusaudávelTXRF
- b. CutumorTXRF > CusaudávelTXRF
- c. CutumorTXRF = CusaudávelTXRF

Tabela 91 – “Ranking” dos indivíduos do elemento Cu, no tecido do estômago saudável e com tumor para todas as amostras.

Test Statistics^b

	CutumorTXRF - Cusaudável TXRF
Z	-,944 ^a
Asymp. Sig. (2-tailed)	,345

a. Based on negative ranks.

b. Wilcoxon Signed Ranks Test

Tabela 92 – Resultado da estatística do teste para o elemento Cu.

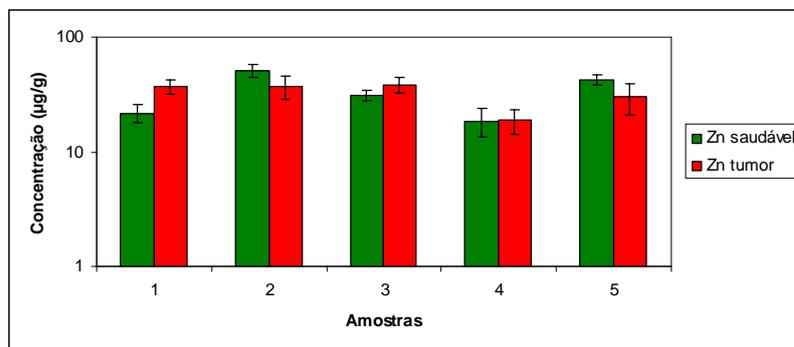


Figura 97 – Gráfico relativo às concentrações do elemento Zn, no tecido do estômago saudável e com tumor para todas as amostras.

Descriptive Statistics

	N	Mean	Std. Deviation	Minimum	Maximum	Percentiles		
						25th	50th (Median)	75th
Cusaudável TXRF	5	3,32200	1,076531	1,900	4,900	2,45000	3,35000	4,18000
Cutumor TXRF	5	5,21200	3,867263	3,000	12,100	3,15000	3,76000	8,00000

Tabela 93 – Estatística descritiva (medidas de localização e dispersão) das variáveis do elemento Zn, no tecido do estômago saudável e com tumor para todas as amostras.

Ranks

		N	Mean Rank	Sum of Ranks
ZntumorTXRF	Negative Ranks	2 ^a	3,50	7,00
-	Positive Ranks	3 ^b	2,67	8,00
Znsaudável	Ties	0 ^c		
TXRF	Total	5		

- a. ZntumorTXRF < ZnsaudávelTXRF
- b. ZntumorTXRF > ZnsaudávelTXRF
- c. ZntumorTXRF = ZnsaudávelTXRF

Tabela 94 – “Ranking” dos indivíduos do elemento Zn, no tecido do estômago saudável e com tumor para todas as amostras.

Test Statistics^b

	ZntumorTXRF - Znsaudável TXRF
Z	-,135 ^a
Asymp. Sig. (2-tailed)	,893

- a. Based on negative ranks.
- b. Wilcoxon Signed Ranks Test

Tabela 95 – Resultado da estatística do teste para o elemento Zn.

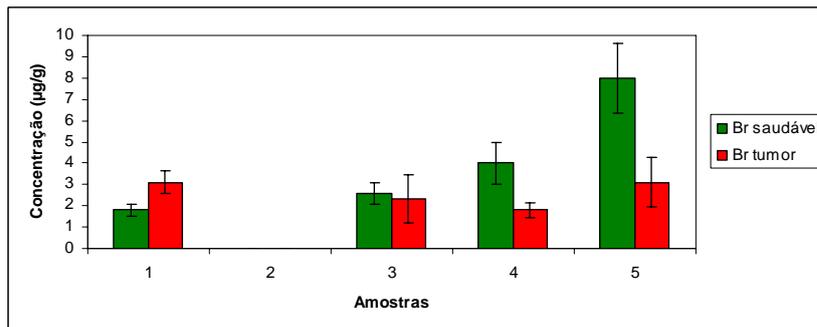


Figura 98 – Gráfico relativo às concentrações do elemento Br, no tecido do estômago saudável e com tumor para todas as amostras.

Descriptive Statistics

	N	Mean	Std. Deviation	Minimum	Maximum	Percentiles		
						25th	50th (Median)	75th
Brsaudável TXRF	5	3,27620	3,009525	,001	8,000	,90050	2,58000	6,00000
Brtumor TXRF	5	2,06820	1,279487	,001	3,100	,90050	2,34000	3,10000

Tabela 96 – Estatística descritiva (medidas de localização e dispersão) das variáveis do elemento Br, no tecido do estômago saudável e com tumor para todas as amostras.

Ranks

		N	Mean Rank	Sum of Ranks
BrtumorTXRF	Negative Ranks	3 ^a	2,67	8,00
-	Positive Ranks	1 ^b	2,00	2,00
Brsaudável	Ties	1 ^c		
TXRF	Total	5		

- a. BrtumorTXRF < BrsaudávelTXRF
 b. BrtumorTXRF > BrsaudávelTXRF
 c. BrtumorTXRF = BrsaudávelTXRF

Tabela 97 – “Ranking” dos indivíduos do elemento Br, no tecido do estômago saudável e com tumor para todas as amostras.

Test Statistics ^b

	Brtumor TXRF - Brsaudável TXRF
Z	-1,095 ^a
Asymp. Sig. (2-tailed)	,273

- a. Based on positive ranks.
 b. Wilcoxon Signed Ranks Test

Tabela 98 – Resultado da estatística do teste para o elemento Br.

4.1.5.2 Análise da razão das concentrações de cada elemento químico, para as diferentes sub-amostras (saudáveis e com tumor)

Nos gráficos seguintes (figuras 99-107) observam-se os valores das razões das concentrações de cada elemento. A presença de uma maior ou igual concentração nas sub-amostras com tumor em relação às saudáveis (valores superiores à unidade) verifica-se, mas não é muito significativa.

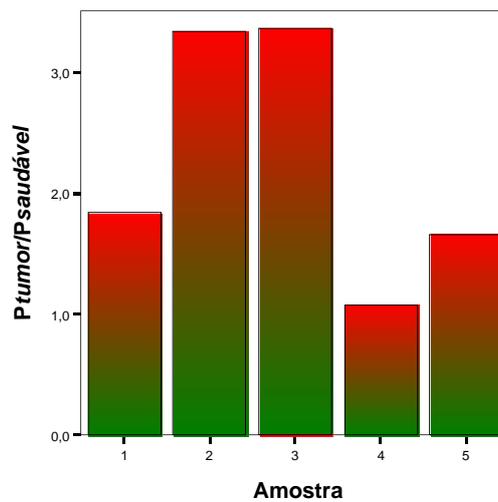


Figura 99 – Gráfico relativo à razão das concentrações do elemento P, nas duas sub-amostras de tecido do estômago.

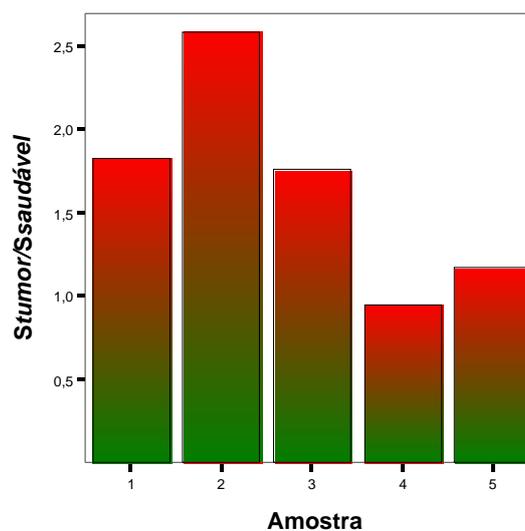


Figura 100 – Gráfico relativo à razão das concentrações do elemento S, nas duas sub-amostras de tecido do estômago.

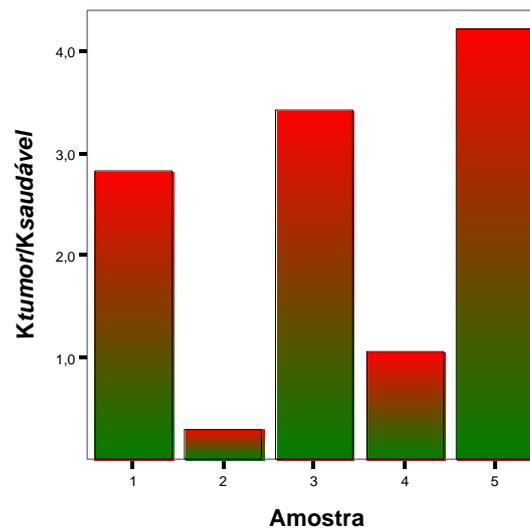


Figura 101 – Gráfico relativo à razão das concentrações do elemento K, nas duas sub-amostras de tecido do estômago.

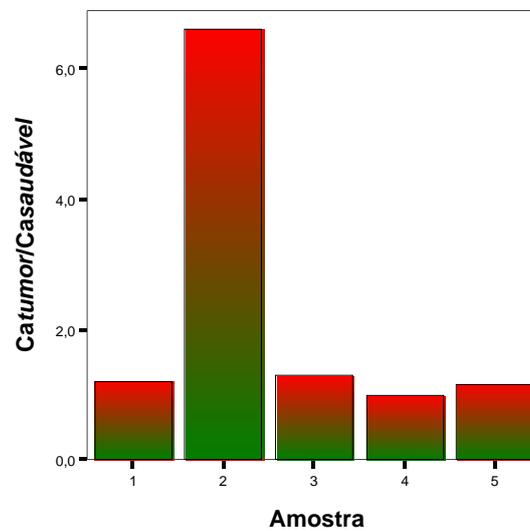


Figura 102 – Gráfico relativo à razão das concentrações do elemento Ca, nas duas sub-amostras de tecido do estômago.

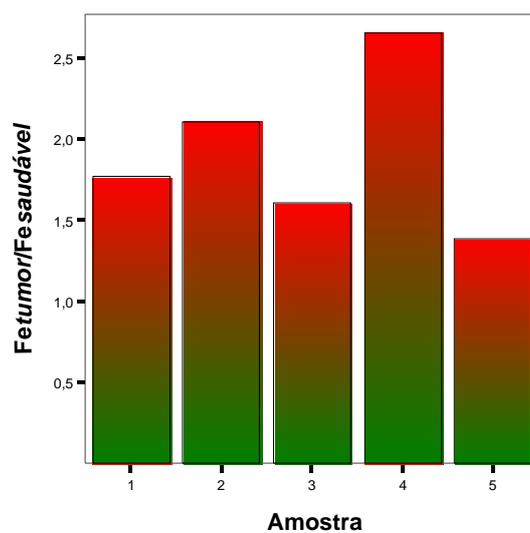


Figura 103 – Gráfico relativo à razão das concentrações do elemento Fe, nas duas sub-amostras de tecido do estômago.

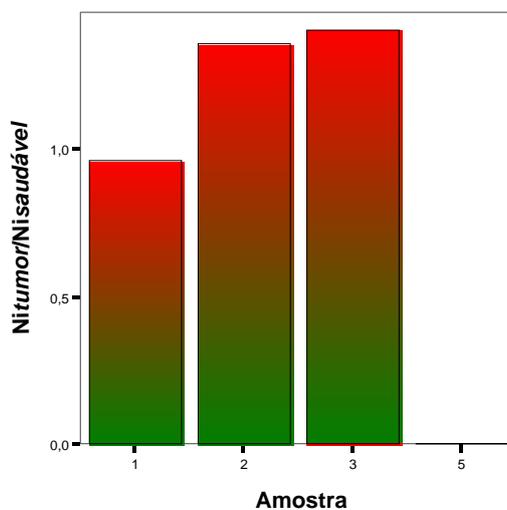


Figura 104 – Gráfico relativo à razão das concentrações do elemento Ni, nas duas sub-amostras de tecido do estômago.

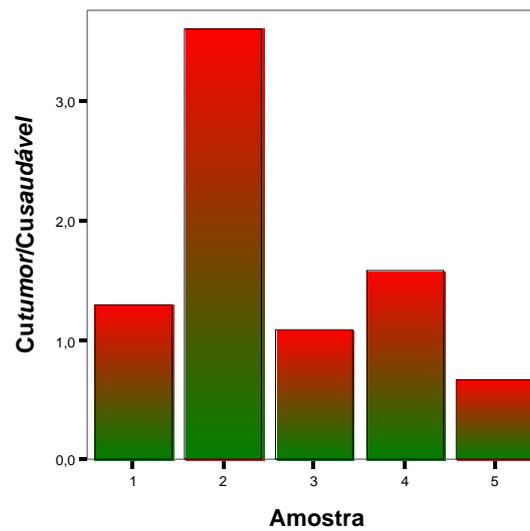


Figura 105 – Gráfico relativo à razão das concentrações do elemento Cu, nas duas sub-amostras de tecido do estômago.

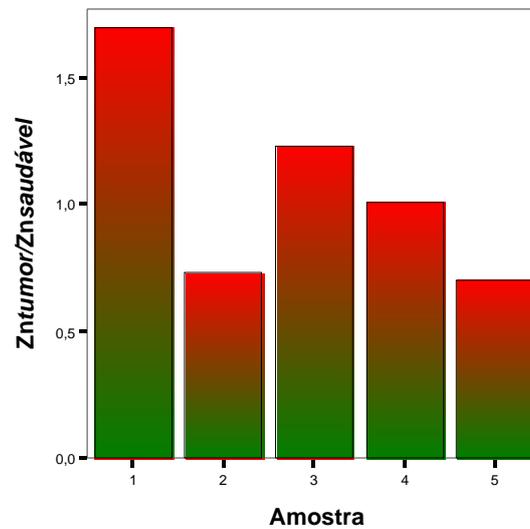


Figura 106 – Gráfico relativo à razão das concentrações do elemento Zn, nas duas sub-amostras de tecido do estômago.

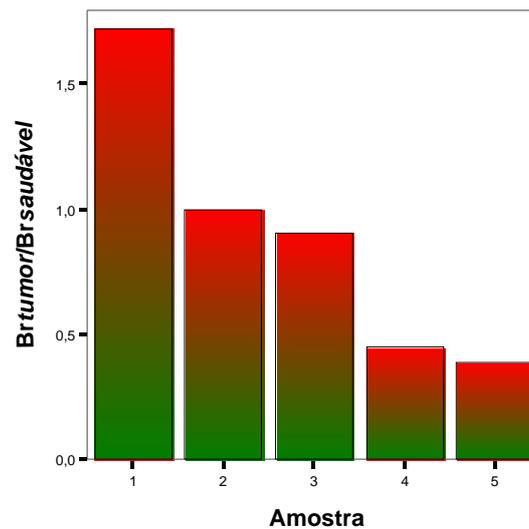


Figura 107 – Gráfico relativo à razão das concentrações do elemento Br, nas duas sub-amostras de tecido do estômago.

4.1.6 Amostras de Tecido do útero

Foram analisadas 4 amostras de útero, isto é, 2 amostras de tecido saudável e outras 2 com tumor, correspondentes a 2 indivíduos.

Os dois indivíduos tinham diferentes origens, isto é, um era de Dortmund e outro de Lisboa. Uma vez que a quantidade de amostra não é suficiente para um tratamento estatístico como tem sido feito para os outros tecidos, aplicou-se uma estatística descritiva baseada no software Excel.

4.1.6.1 Análise descritiva dos resultados

A seguir apresentam-se alguns gráficos (figuras 108-110) resultantes da análise das amostras de tecido do útero.

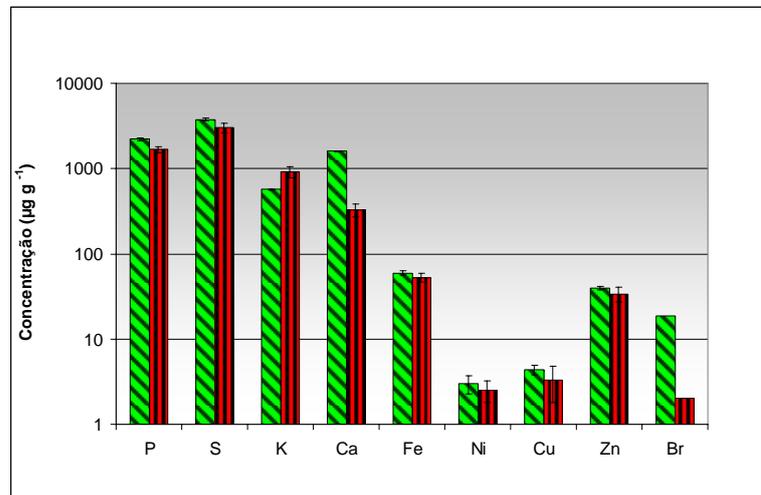


Figura 108 – Gráfico relativo às concentrações dos elementos, identificados numa das amostras do tecido do útero saudável (verde) e com tumor (vermelho).

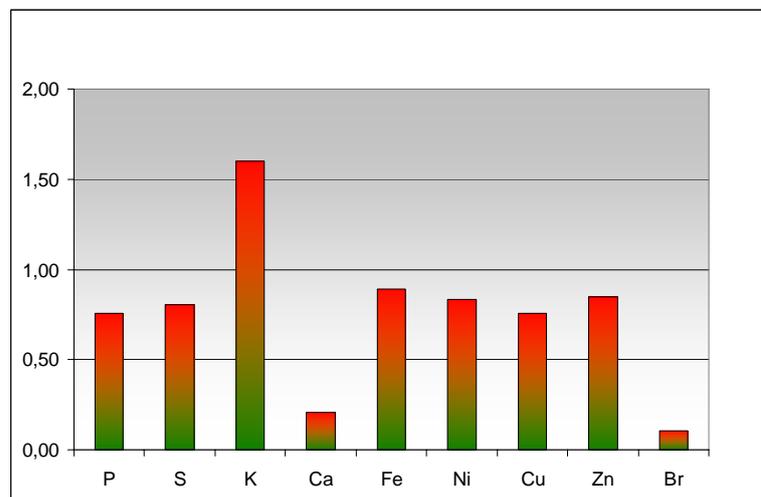


Figura 109 – Gráfico relativo às razões das concentrações dos elementos, identificados numa das amostras do tecido do intestino saudável e com tumor.

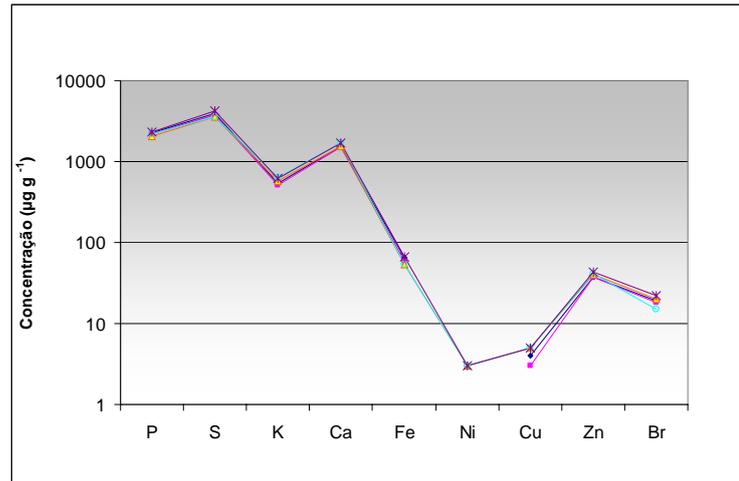


Figura 110 – Identificação dos elementos nas cinco “fatias” de uma das amostras de útero com tumor.

O gráfico da figura 108, mostra o comportamento dos elementos identificados e quantificados no tecido do útero, isto é, de um modo geral as concentrações destes são mais elevadas nos tecidos saudáveis. O gráfico da figura 109 serve para mostrar de uma outra forma a existência, de um modo geral, da diminuição da concentração dos elementos nos tecidos com tumor. O gráfico da figura 110 mostra-nos que as secções microtomadas da amostra de tecido em causa são bastante semelhantes no que diz respeito à identificação e quantificação dos elementos, o que torna mais credível o valor médio das concentrações utilizadas. (Note-se que este tipo de gráfico não foi apresentado para os outros tecidos, mas a aparência dos mesmos era idêntica).

4.2 Classificação Automática

4.2.1 Análise de Agrupamento Hierárquico

Uma vez que existiam amostras de origens diferentes (Dortmund e Lisboa), mas cujas quantidades não foram suficientes para fazer um estudo paralelo que inicialmente se pensava fazer, achou-se no entanto relevante verificar a partir de um agrupamento de dados a formação ou não de dois grupos distintos de amostras de acordo com a origem.

Por outro lado pretendeu-se criar grupos homogêneos tendo em conta as razões das concentrações dos elementos no tecido em causa. Este objectivo surgiu pelo facto de suspeitarmos que embora cada pessoa por si só seja diferente de todas as outras no seu

metabolismo celular, a razão das concentrações para cada elemento face à existência de um tumor têm um comportamento semelhante.

No sentido de segmentar as amostras e a razão da concentração dos elementos utilizou-se uma técnica de agrupamento hierárquico.

Este tipo de análise consiste numa técnica exploratória de análise multivariada que permite agrupar indivíduos (ou variáveis) em grupos homogêneos relativamente a uma ou mais características comuns (neste caso a razão das concentrações).

A técnica de agrupamento hierárquico não necessita que se fixe à partida o número de grupos e por isso foi utilizada.

As técnicas hierárquicas recorrem a passos sucessivos de agregação dos indivíduos (ou variáveis), considerados individualmente, isto é, cada indivíduo (ou variável) é um grupo, e depois estes vão sendo agrupados de acordo com as suas proximidades (método aglomerativo). Uma vez que no primeiro passo do algoritmo, o primeiro grupo é formado por dois ou mais indivíduos (ou variáveis), torna-se necessário encontrar um modo de definir as distâncias entre o grupo com mais de um objecto (indivíduo ou variável) e os restantes objectos. Neste caso o método utilizado foi o de Ward em que os grupos são formados de modo a minimizar a soma dos quadrados dos erros. Em cada um dos passos do algoritmo, os grupos retidos são aqueles, de todos os possíveis, com menor soma do quadrado dos erros. Contudo, os resultados obtidos por aplicação de outros métodos testados, mas não apresentados, foram semelhantes.

Efectuaram-se dois agrupamentos hierárquicos, um para os indivíduos (amostras) e outro para as variáveis (as razões da concentrações dos elementos). Os resultados destes agrupamentos são apresentados através de dendrogramas.

Existem razões com uma ordem de grandeza muito elevada, quando comparadas com as restantes. Esta elevada ordem de grandeza é resultado do facto das concentrações de determinados elementos se encontrarem abaixo do limite de detecção. Assim os valores das razões das concentrações dos elementos foram estandardizados numa escala de 0 a 1.

4.2.1.1 Amostras de tecido da mama

4.2.1.1.1 Segmentar os indivíduos (amostras) segundo características comuns tendo em conta as razões das concentrações de cada elemento em tecidos com tumor / saudáveis

Por observação do dendrograma (figura 111) verifica-se que se formaram dois grupos naturais (isto é não foi necessário impor um número de grupos à partida) um constituído pelas amostras 6, 10, 2, 11, 1 e 16 e outro pelas restantes amostras, o que não vai ao encontro da origem das amostras (Portugal e Alemanha), isto é, as amostras de origem diferente ficaram a pertencer a um mesmo grupo, o que levou a concluir que o possível estudo paralelo das amostras com diferentes origens inicialmente pensado, não iria levar a resultados distintos. Note-se que apenas as amostras 15 e 16 eram de origem Alemã.

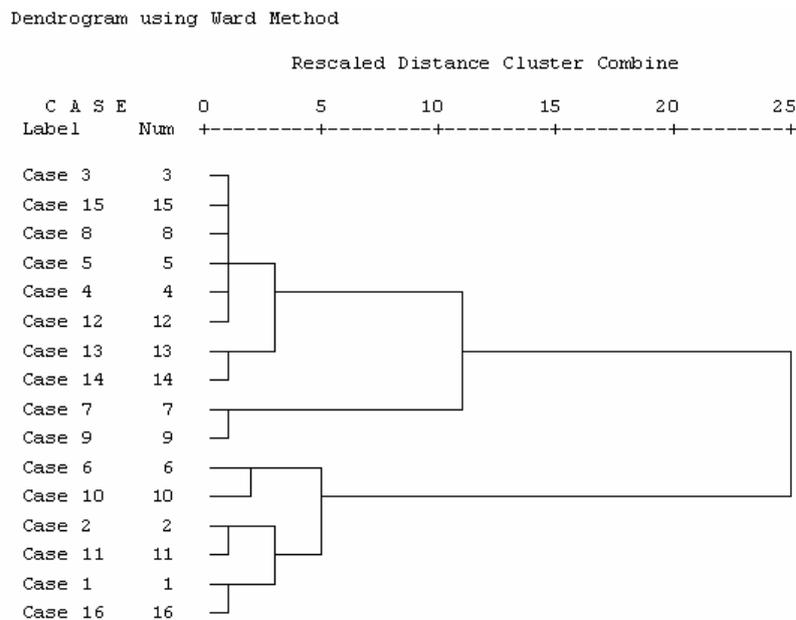


Figura 111 – Dendrograma representativo da aplicação de uma técnica de agrupamento hierárquico sobre os indivíduos (as 16 amostras).

4.2.1.1.2 Segmentar as razões das concentrações de cada elemento químico, para as diferentes sub-amostras (saudáveis e com tumor)

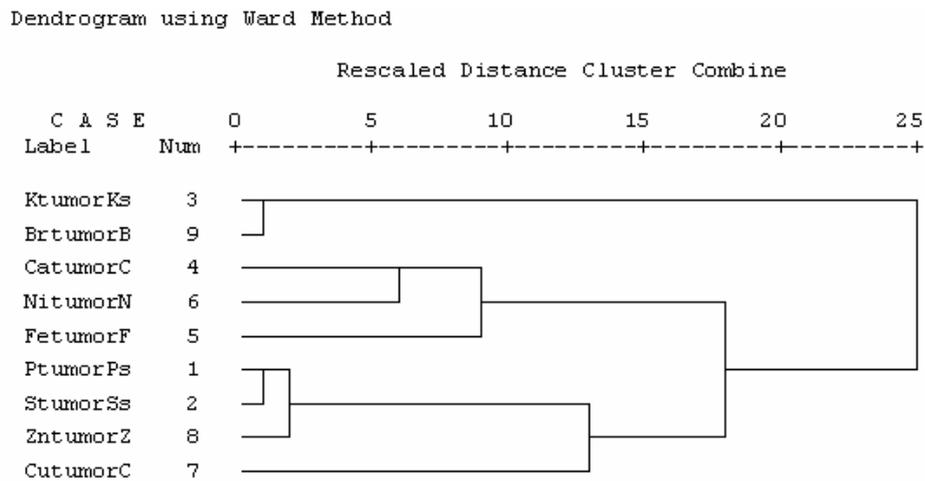


Figura 112 – Dendrograma representativo da aplicação de uma técnica de agrupamento hierárquico sobre as variáveis (as razões das concentrações dos elementos).

Por observação do dendrograma (figura 112) verifica-se que se formaram três grupos naturais, um constituído pela razão das concentrações dos elementos K e Br, outro constituído pela razão das concentrações dos elementos Ca, Ni e Fe e outro pelas restantes razões das concentrações (P, S, Zn e Cu).

4.2.1.2 Amostras de tecido do intestino

4.2.1.2.1 Segmentar os indivíduos (amostras) segundo características comuns tendo em conta as razões das concentrações de cada elemento em tecidos com tumor / saudáveis

Por observação do dendrograma da figura 113 verifica-se que se formaram três grupos naturais, um constituído pelas amostras 7 e 3; outro grupo pelas amostras 11, 5, 8 e 4; e outro pelas restantes amostras. Neste caso as amostras 1 e 2 de origem portuguesa ficaram a pertencer a um mesmo grupo, embora não constituam um grupo isolado.

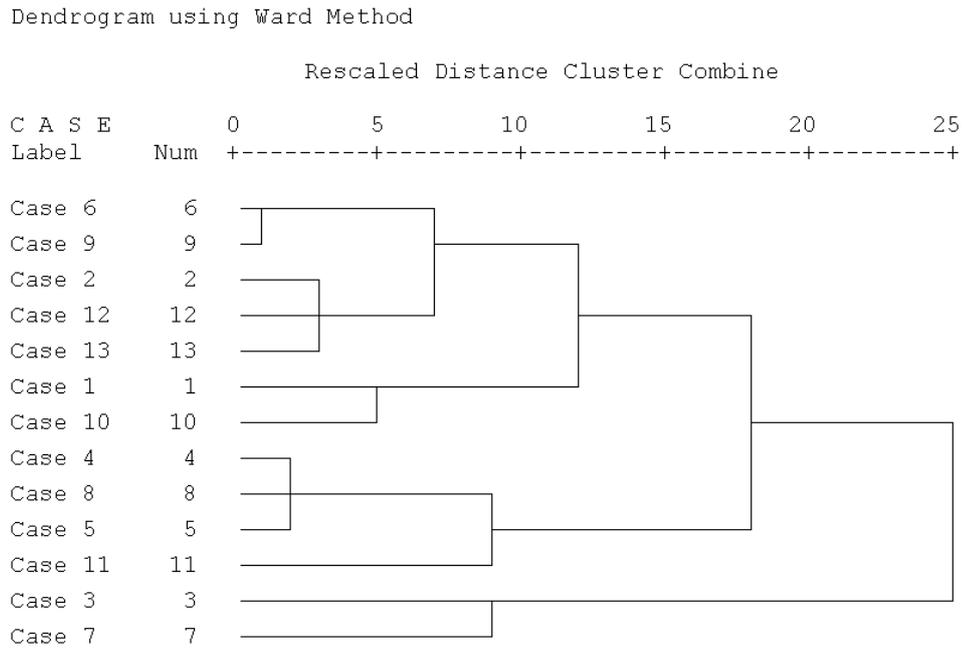


Figura 113 – Dendrograma representativo da aplicação de uma técnica de agrupamento hierárquico sobre os indivíduos (as 13 amostras).

4.2.1.2.2 Segmentar as razões das concentrações de cada elemento químico, para as diferentes sub-amostras (saudáveis e com tumor)

Por observação do dendrograma da figura 114 verifica-se que se formaram dois grupos naturais, um constituído pela razão das concentrações do elemento Br e outro pelas restantes razões das concentrações. No entanto é de salientar a formação de um subgrupo constituído pelas razões das concentrações dos elementos Cu, Ni e Fe e outro constituído pelas razões das concentrações dos elementos S, Zn, P, K e Ca.

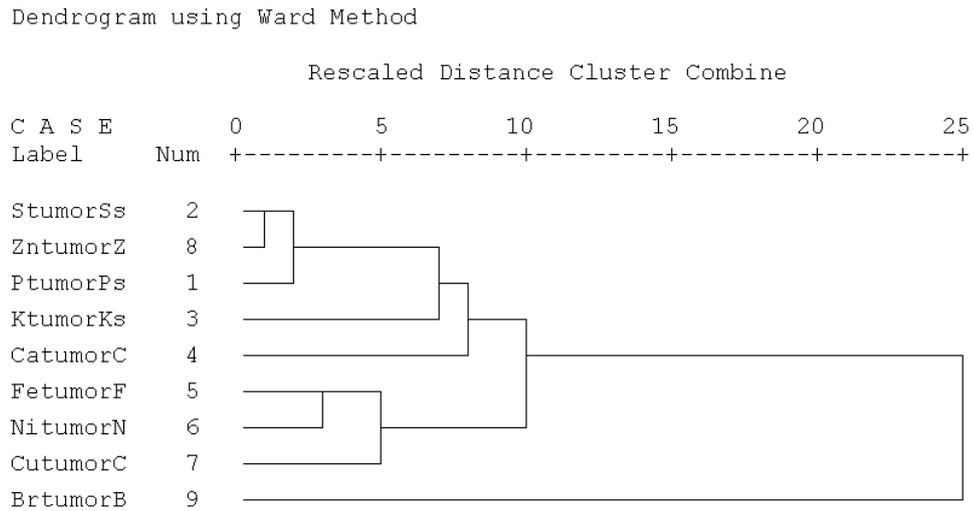


Figura 114 – Dendrograma representativo da aplicação de uma técnica de agrupamento hierárquico sobre as variáveis (as razões da concentrações dos elementos).

4.2.1.3 Amostras de tecido do estômago

4.2.1.3.1 Segmentar os indivíduos (amostras) segundo características comuns tendo em conta as razões das concentrações de cada elemento em tecidos com tumor / saudáveis

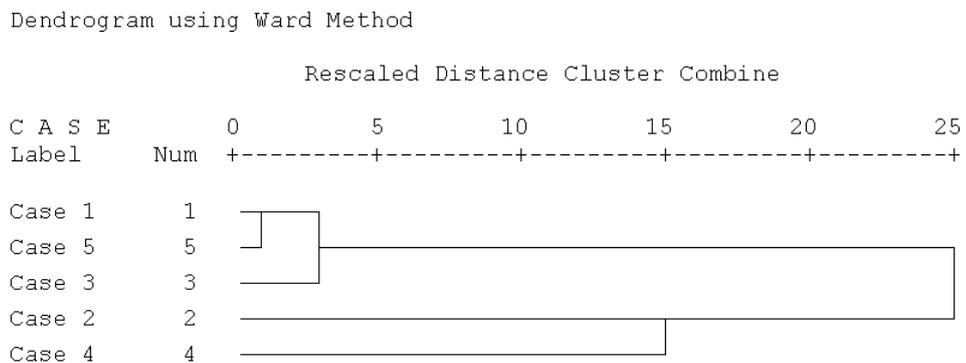


Figura 115 – Dendrograma representativo da aplicação de uma técnica de agrupamento hierárquico sobre os indivíduos (as 5 amostras).

Por observação do dendrograma da figura 115 verifica-se que se formaram três grupos naturais, um constituído pelas amostras 1, 5 e 3; outro grupo apenas pela amostra 2 e outro pela 4. Neste caso as amostras 4 e 5 de origem portuguesa ficaram a pertencer a grupos diferentes.

4.2.1.3.2 Segmentar as razões das concentrações de cada elemento químico, para as diferentes sub-amostras (saudáveis e com tumor)

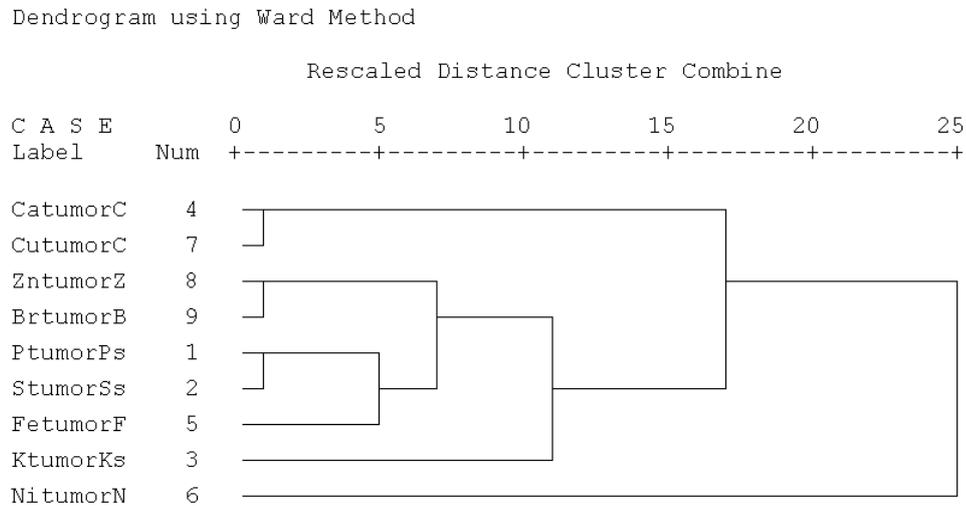


Figura 116 – Dendrograma representativo da aplicação de uma técnica de agrupamento hierárquico sobre as variáveis (as razões das concentrações dos elementos).

Por observação do dendrograma da figura 116 verifica-se que se formaram três grupos naturais, um constituído pela razão das concentrações do elemento Ni, outro constituído pela razão das concentrações dos elementos K, Fe, S, P, Br e Zn e outro pelas razões das concentrações Cu e Ca.

4.2.2 Análise de Agrupamento não Hierárquico

Após a aplicação da técnica de agrupamento hierárquico, que não obriga *à priori* a utilização de informação sobre os dados, considerou-se interessante fazer uma outra abordagem ao problema. A base de dados continha uma informação relevante: o valor das concentrações dos vários elementos químicos em tecidos com tumor e saudáveis, e por isso pensou-se em criar dois grupos (a classe dos tecidos saudáveis e a classe dos tecidos com tumor) e utilizar uma técnica de agrupamento não hierárquico.

As técnicas de agrupamento não hierárquico destinam-se a agrupar indivíduos ou variáveis em classes cujo número é definido à partida. Esta técnica permite reagrupar indivíduos ou variáveis numa classe diferente daquela em que estes foram inicialmente incluídos. A probabilidade de classificação errada é menor neste tipo de técnica de agrupamento.

Recorreu-se para isso à utilização do MATLAB. O MATLAB (MATrix LABoratory) é um software interactivo de alta performance voltado para o cálculo numérico. O MATLAB integra análise numérica, cálculo com matrizes, processamento de sinais e construção de gráficos em ambiente fácil de usar onde problemas e soluções são expressos somente como eles são escritos matematicamente, ao contrário da programação tradicional. O MATLAB é um sistema interactivo cujo elemento básico de informação é uma matriz que não requer dimensionamento. Esse sistema permite a resolução de muitos problemas numéricos em apenas uma fracção do tempo que se gastaria para escrever um programa semelhante em linguagem Fortran, Basic ou C, por exemplo.

Em resumo a técnica utilizada tem em conta várias etapas: extracção de características, formação do conjunto de treino, aplicação de testes de classificação. A extracção de características foi conseguida através de técnicas analíticas de multi-elementos, de fluorescência de raios-X, que identificam e quantificam os elementos presentes nas amostras analisadas. O conjunto de treino é formado por todos os indivíduos que estão à partida classificados, ou seja, todos os indivíduos que assumimos conhecer a classe a que pertencem (figura 117). O conjunto de teste é formado apenas por um indivíduo (classificador) que à partida assumimos não conhecer a classe a que pertence. Para testar o classificador foi aplicado o método leave-one out. Admitindo que existem n amostras (saudáveis e com tumor) das quais se conhece as concentrações dos elementos químicos, o método utiliza $n-1$ amostras e sucessivamente testa a amostra restante.

1	$S_{\text{saudável}}$ $P_{\text{saudável}}$ $Zn_{\text{saudável}}$ $Cu_{\text{saudável}}$
-	-
-	-
	...
$\frac{n}{2} + 1$	S_{tumor} P_{tumor} Zn_{tumor} Cu_{tumor}
-	-
...	-
n	...

Figura 117 – Exemplificação de uma matriz indivíduos versus variáveis.

O treino do classificador foi feito através de um método não paramétrico, uma vez que não existe informação sobre a sua distribuição de probabilidade. O método utilizado foi o método dos k-vizinhos mais próximos (figura 118). Este método consiste em classificar um indivíduo com base nos votos maioritários dos seus k-vizinhos e colocá-lo na classe que obteve maior número de votos. O k é um número inteiro positivo normalmente pequeno. Para identificar vizinhos, os indivíduos são representados por vectores de posição num espaço multidimensional. A distância utilizada foi a euclidiana.

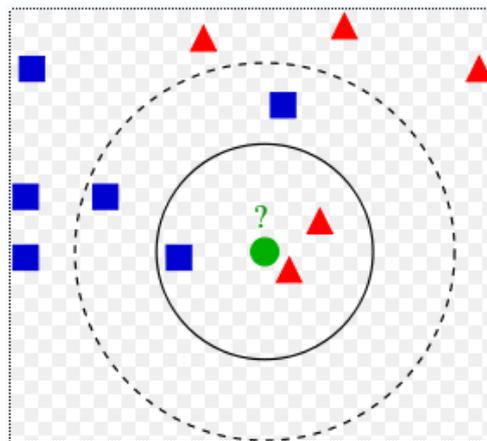


Figura 118 – Ilustração do método dos k-vizinhos mais próximos

A figura 118 é representativa de um exemplo da utilização do método dos k-vizinhos mais próximos. A amostra de teste (círculo verde) deverá ser classificada na classe de quadrados azuis ou na classe de triângulos vermelhos. Se k for igual a 3 o círculo verde é classificado na classe de triângulos vermelhos, porque há 2 triângulos e só 1 quadrado dentro do círculo

interior. Se k for igual a 5 é classificado na classe dos quadrados azuis uma vez que existem 3 quadrados e 2 triângulos dentro do círculo exterior.

Após a conclusão dos testes, realizados para cada um dos indivíduos, o método leave-one out confronta as classes a que efectivamente os indivíduos pertencem com as classes que foram estimadas e é calculada a probabilidade de erro ($P(E) = P(w = A_1 / \hat{w} = A_2) \times P(A_2) + P(w = A_2 / \hat{w} = A_1) \times P(A_1)$, sendo A_1 e A_2 as duas classes e w e \hat{w} os indivíduos (real e estimado, respectivamente)).

4.2.2.1 Amostras de tecido da mama

De seguida é apresentada a matriz que consiste numa representação bidimensional (figura 119) de todas as variáveis entre si e serão explicados e discutidos os resultados da classificação dos indivíduos (grupo de elementos considerados na classificação). No anexo encontra-se a função aplicada aos dados e os resultados dos testes das classificações.

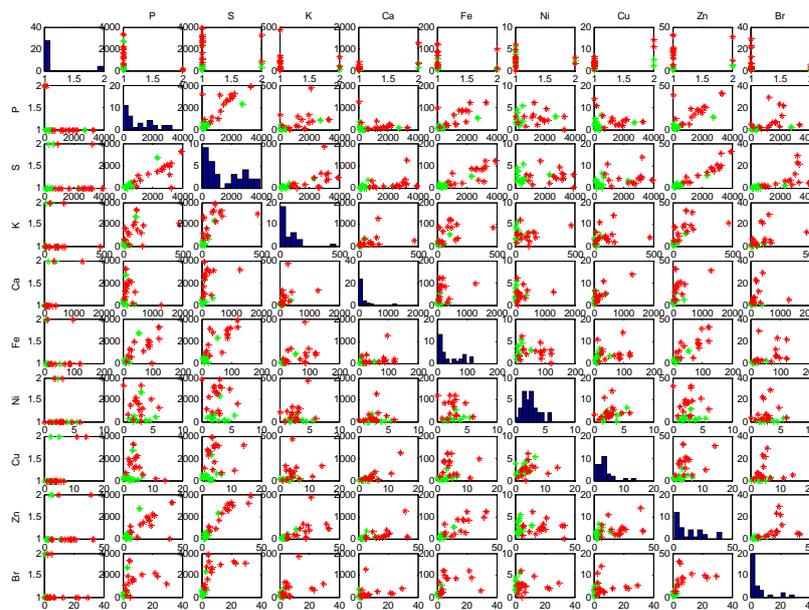


Figura 119 – Representação bidimensional de todas as variáveis entre si nas sub-amostras de tecido da mama.

Cada um dos gráficos visíveis na matriz mostra os valores das concentrações dos respectivos elementos nas sub-amostras saudáveis (pontos verdes) e nas sub-amostras com tumor (pontos vermelhos), o que permite ter uma perspectiva geral sobre os dados.

Metade da matriz é transposta da outra metade, a diagonal representa os histogramas de cada elemento. Cada ponto corresponde a um par ordenado, no eixo das abcissas estão as concentrações do elemento i , $i = \{ \text{origem, P, S, K, Ca, Fe, Ni, Cu, Zn, Br} \}$ e no eixo das ordenadas as concentrações do elemento $j = \{ \text{origem, P, S, K, Ca, Fe, Ni, Cu, Zn, Br} \}$.

O facto de se suspeitar que os elementos S, P, Zn e Cu, tinham um comportamento idêntico nas sub-amostras com tumor e saudáveis, contribui para a escolha destes 4 elementos para realizar a classificação pretendida. Criou-se uma matriz de 32 linhas: as primeiras 16 têm os valores das concentrações dos 4 elementos nas sub-amostras saudáveis e as últimas 16 têm os valores das concentrações nas sub-amostras com tumor, tal como se exemplifica na figura 120.

1	$S_{\text{saudável}}$	$P_{\text{saudável}}$	$Zn_{\text{saudável}}$	$Cu_{\text{saudável}}$
-			-	
-			-	
16			...	
17	S_{tumor}	P_{tumor}	Zn_{tumor}	Cu_{tumor}
-			-	
-			-	
32			...	

Figura 120 – Exemplificação da matriz indivíduos versus variáveis.

Constatou-se que dos 16 indivíduos que representam as concentrações em sub-amostras saudáveis foram todos colocados na mesma classe (classe dos indivíduos saudáveis) e os dos 16 indivíduos com concentrações em sub-amostras com tumor, 2 foram colocados na classe dos indivíduos saudáveis mas os restantes 14 na classe dos indivíduos com tumor. A probabilidade de erro calculada foi de 6%.

Pode considerar-se que a classificação reconhece de uma forma satisfatória os elementos considerados em amostras com tumor e saudáveis.

Ainda no tecido da mama aplicou-se esta classificação aos elementos Ca, Ni e Fe, pela a mesma razão anterior (suspeitar a existência de semelhanças entre si nas sub-amostras com tumor e saudáveis). Constatou-se que dos 16 indivíduos que representam as concentrações em sub-amostras saudáveis apenas 1 não foi colocado na mesma classe (classe dos

indivíduos saudáveis) e dos dos16 indivíduos com concentrações em sub-amostras com tumor, 6 foram colocados na classe dos indivíduos saudáveis mas os restantes 10 na classe dos indivíduos com tumor. A probabilidade de erro calculada foi de 22%. Outros indivíduos (grupos de elementos) foram testados mas as probabilidades de erro resultantes do teste foram muito elevadas.

4.2.2.2 Amostras de tecido do intestino

A seguir é apresentada a matriz que consiste na representação bidimensional (figura 121) de todas as variáveis entre si e irão ser explicados e discutidos os resultados da classificação dos indivíduos (grupo de elementos considerados na classificação). No anexo encontra-se a função aplicada aos dados e os resultados dos testes das classificações.

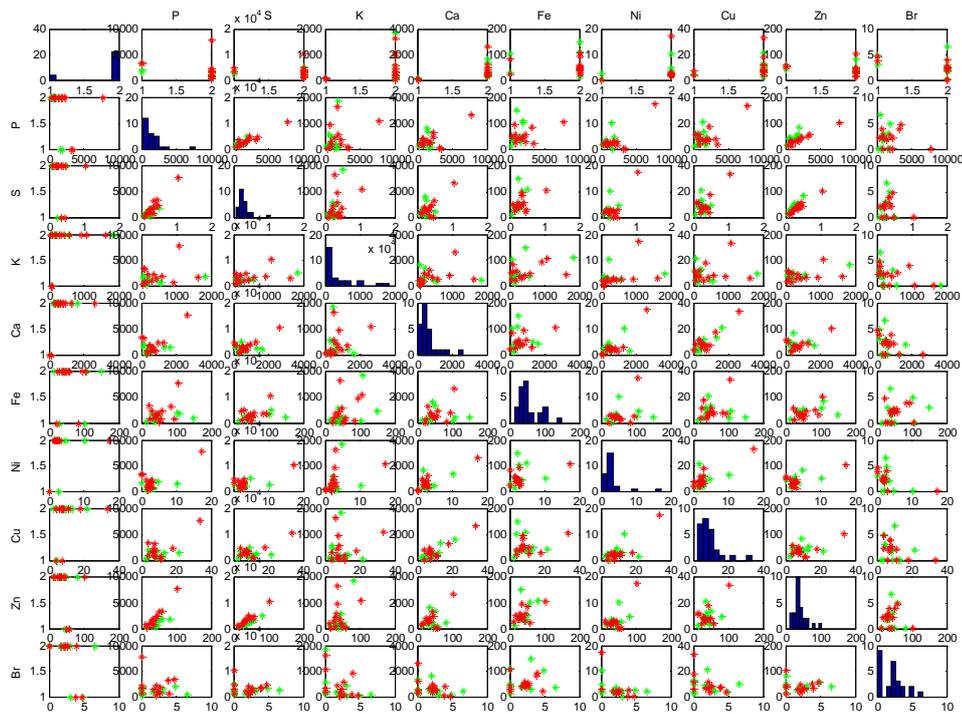


Figura 121 – Representação bidimensional de todas as variáveis entre si nas sub-amostras de tecido do intestino.

O facto de se suspeitar que os elementos Fe, Ni e Cu tinham um comportamento idêntico nas sub-amostras com tumor e saudáveis, contribui para a escolha destes 3 elementos para realizar a classificação pretendida. Criou-se uma matriz de 26 linhas: as primeiras 13 têm os valores das concentrações dos 3 elementos nas sub-amostras saudáveis e as últimas 13 têm os valores das concentrações nas sub-amostras com tumor, tal como se exemplifica na figura 122.

1	$Ni_{\text{saudável}}$	$Fe_{\text{saudável}}$	$Cu_{\text{saudável}}$
-		-	
-		-	
13		...	
14	Ni_{tumor}	Fe_{tumor}	Cu_{tumor}
-		-	
-		-	
26		...	

Figura 122 – Exemplificação da matriz indivíduos versus variáveis.

Constatou-se que dos 13 indivíduos que representam as concentrações em sub-amostras saudáveis 4 foram colocados na mesma classe (classe dos indivíduos saudáveis) e dos 13 indivíduos com concentrações em sub-amostras com tumor, 7 foram colocados na classe dos indivíduos saudáveis e os restantes 6 na classe dos indivíduos com tumor. A probabilidade de erro calculada foi de 62%.

Por outro lado consideraram-se os elementos P e S, pela mesma razão anterior, e verificou-se que dos 13 indivíduos que representam as concentrações em sub-amostras saudáveis 7 foram colocados na mesma classe (classe dos indivíduos saudáveis) e os dos 13 indivíduos com concentrações em sub-amostras com tumor, 5 foram colocados na classe dos indivíduos saudáveis e os restantes 8 na classe dos indivíduos com tumor. A probabilidade de erro calculada foi de 42%.

Face às probabilidades de erro obtidas da classificação destes indivíduos (grupo de elementos escolhidos) pode considerar-se que a classificação reconhece de uma forma aceitável os elementos considerados em tecidos com tumor e saudáveis. No entanto algumas classificações de elementos com tumor não foram conseguidas e neste tipo de classificação é preciso ter cuidado com os falsos resultados na identificação de tecidos com tumor.

4.2.2.3 Amostras de tecido do estômago

De seguida é apresentada a matriz que consiste na representação bidimensional (figura 123) de todas as variáveis entre si e serão explicados e discutidos os resultados da classificação dos indivíduos (grupo de elementos considerados na classificação). No anexo encontra-se a função aplicada aos dados e os resultados dos testes das classificações.

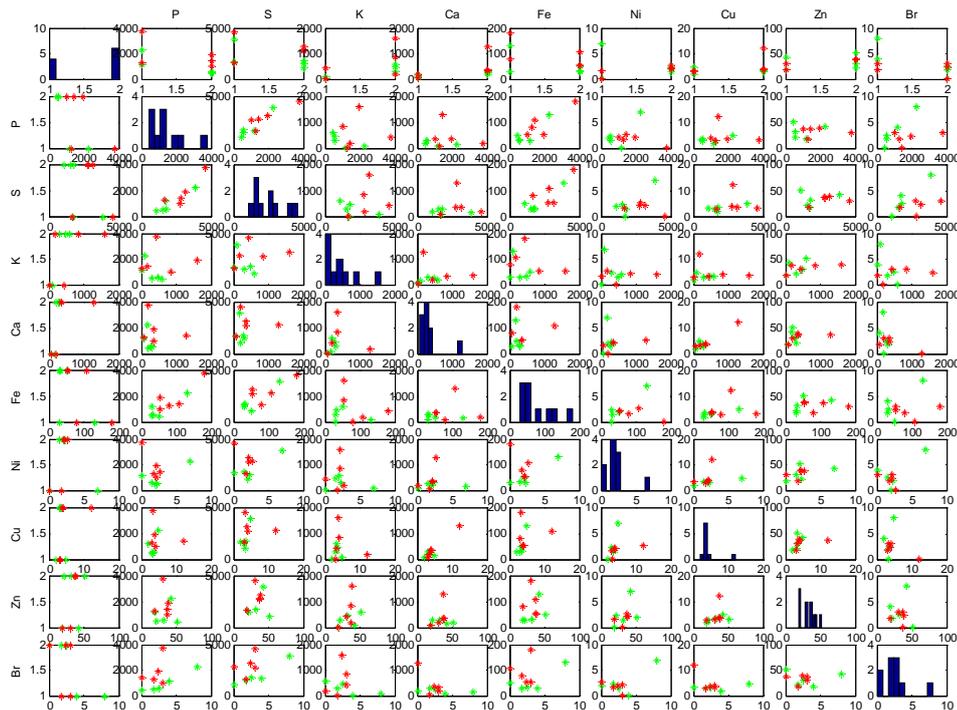


Figura 123 – Representação bidimensional de todas as variáveis entre si nas sub-amostras de tecido do estômago.

Neste caso as amostras de tecido de estômago eram apenas 10, apesar de se suspeitar que alguns dos elementos tinham um comportamento idêntico nas sub-amostras com tumor e saudáveis, após algumas tentativas de classificação de indivíduos apenas se escolheram os elementos P e Fe para realizar a classificação pretendida. Criou-se uma matriz de 10 linhas: as primeiras 5 têm os valores das concentrações dos 2 elementos nas sub-amostras saudáveis e as últimas 5 têm os valores das concentrações nas sub-amostras com tumor, tal como se exemplifica na figura 124.

1	$P_{\text{saudável}}$	$F_{e\text{saudável}}$
-		-
-		-
5		...
6	P_{tumor}	$F_{e\text{tumor}}$
-		-
-		-
10		...

Figura 124 – Exemplificação da matriz indivíduos versus variáveis.

Constatou-se que dos 5 indivíduos que representam as concentrações em sub-amostras saudáveis foram colocados 3 na mesma classe (classe dos indivíduos saudáveis) e os dos 5 indivíduos com concentrações em sub-amostras com tumor foram todos colocados na classe dos indivíduos com tumor. A probabilidade de erro calculada foi de 20%.

Como foi referido, no caso das amostras de tecido de estômago é de salientar a pequena quantidade de amostras disponíveis para fazer esta classificação. Contudo pode considerar-se que a classificação reconhece de uma forma satisfatória os elementos considerados em amostras com tumor e saudáveis.

CAPITULO V

CONCLUSÃO

5.1 Conclusões

5.1.1 Técnicas utilizadas

Este estudo necessitou de técnicas analíticas de multi-elementos apropriadas dado o número de amostras e de medições. As técnicas de fluorescência de raios-X têm-se tornado cada vez mais representativas no campo de análises de multi-elementos nos últimos anos. Neste estudo foram então utilizadas duas técnicas: EDXRF e TXRF (citadas e descritas anteriormente). A técnica de TXRF tem mostrado ser adequada especialmente para ultra-microanálises de elementos em amostras biológicas [68-73] e a técnica de EDXRF apesar de ter uma menor sensibilidade que a técnica de TXRF, tem mostrado também ser muito eficiente e de fácil utilização para amostras biológicas [74,75].

Com base na nossa análise estatística os resultados obtidos pelas técnicas mostram ser concordantes e por isso podem ser considerados representativos para ambas.

5.1.2 Tecido da mama

O estudo da concentração de elementos em relação a doenças com tumor, incluindo o tumor maligno em tecido da mama, tem sido uma área de pesquisa já a algum tempo.

O envolvimento de alguns elementos traço no desenvolvimento do cancro da mama parece estar relacionado com as suas funções como co-factores em processos enzimáticos. Em particular o cobre e o zinco por pertencerem ao grupo de metais antioxidantes, participando na actividade de enzimas antioxidantes. O ferro também pode estar envolvido pelas suas funções de factor regulador para angiogeneses.

Distinto destes mecanismos sugeridos, a exigência da provisão de sangue aumentada de um tumor crescente fornece uma base de acumulação de muitos outros elementos, inclusive electrólitos como potássio.

Os resultados [78-81] confirmam que os elementos potássio, cálcio, cobre e zinco são indicadores valiosos, a serem considerados como investigadores da identificação de desordens patológicas em tecidos da mama. As concentrações de potássio, cálcio, cobre e zinco são significativamente mais altos em tecidos da mama com neoplasias em comparação com normais. O estudo [81] revelou concentrações superiores de potássio, ferro e zinco em tecidos com tumor. Isto é revelado pela diferença significativa dos valores médios das concentrações dos elementos.

Um outro estudo [82] indica níveis elevados de ferro, cobre e zinco em tecidos de tumor. O efeito é mais proeminente para cobre e zinco.

As concentrações [83-84] dos elementos fósforo, enxofre, potássio, cálcio, ferro, níquel, selênio, e rubídio foram estatisticamente diferentes em tecidos sãos e cancerosos em várias amostras de tecido, sendo estas superiores em tecidos cancerosos.

Os nossos resultados vão ao encontro de estudos já realizados. No entanto nos resultados deste nosso estudo, no tecido da mama foi evidente um aumento significativo de bromo em tecidos com tumor, o que leva a pensar que este estará relacionado com o desenvolvimento do cancro, que até então ainda não tinha sido sugerido em estudos deste tipo. Contudo o papel do bromo na temática cancro já começa a ser relacionada.

O bromo é encontrado a níveis de traço em seres humanos mas é um elemento essencial, embora as funções que ele cumpre sejam ainda um pouco desconhecidas. O bromo é usado na produção de produtos aerossóis e outros como produtos de purificação de água. Os trihalometanos são compostos que são formados, durante o tratamento de águas, como subprodutos dessa desinfecção. A reacção ocorre entre o cloro usado para desinfecção e a matéria orgânica na água em tratamento. As substâncias formadas posteriormente vão ser as mais variadas clorofórmio (CHCl_3), bromodichlorometano (BrCHCl_2), clorodibromometano (ClCHBr_2) e bromofórmio (CHBr_3). Segundo a International Agency of Research on Cancer [85], existe uma evidência na carcinogénese para os compostos CHCl_3 e BrCHCl_2 em animais irracionalmente mas não em seres humanos, assim ambos fazem parte do grupo 2B (riscos prováveis em seres humanos).

Para além desta diferença conseguiu-se também neste estudo agrupar os elementos: potássio e bromo; cálcio, níquel e ferro; fósforo, enxofre, zinco e cobre. Este agrupamento pode tornar-se bastante útil se pensarmos que estes elementos têm um comportamento idêntico entre si, no que se refere às razões das concentrações, neste tipo de tecido no desenvolvimento do cancro.

Ainda neste estudo criou-se uma classificação automática de elementos no que diz respeito às concentrações de determinados elementos como S, P, Zn e Cu neste tipo de tecido.

5.1.3 Tecido do intestino

Estudos epidemiológicos diferentes acerca do cancro do intestino indicam uma correlação com o sistema de nutrição. Devido à comida mais rica em gordura, a tarifa de incidência do cancro no intestino nos países desenvolvidos é 20 vezes maior do que em subdesenvolvidos. Ao nível de prevenção, as recomendações gerais incentivam as pessoas a consumir menos gorduras e muito mais fibras.

Alguns estudos tratam a correlação entre cancro e comida específica [86], mas ninguém trata, os conteúdos elementares da comida e a sua relação com a doença.

O estudo [87] indica um nível baixo de concentração de selénio em doentes com cancro de intestino e refere também que essa alteração de concentração é um resultado da doença e não a razão do desenvolvimento de malignidade. Um outro estudo [88] indicou que doentes com a doença gastrointestinal estão especialmente em perigo de desenvolver a deficiência de selénio e que por isso devem ser controlados por determinações repetidas das concentrações de selénio no soro. Outro estudo [89] forneceu a evidência da importância da relação entre nutrição e níveis de selénio em casos de doentes com cancro. Eles mostraram que os níveis de selénio não foram só mais baixos em casos de doentes de cancro estáveis mas também foram substancialmente reduzidos por carga de tumor aumentada.

Elevadas concentrações de cobre e zinco em células cancerosas em comparação com normais foram verificadas nos estudos [90-92]. As interações entre esses elementos mostram ser relações antagónicas, embora não haja nenhum dado conclusivo.

Resultados [93] com tumores espontâneos em ratos manifestaram que os montantes sub tóxicos de zinco preveniram a toxicidade de selénio e aceleraram o crescimento de tumor.

Em consequência dos estudos [94,95], os resultados revelam que os elementos fósforo, enxofre, potássio, selénio e rubídio mostram uma tendência para acumulação no tecido com tumor.

Pode-se então dizer que os nossos resultados vão ao encontro dos estudos anteriormente descritos, uma vez que a concentração de determinados elementos é superior em tecidos com tumor, nomeadamente o elemento fósforo. As conclusões foram comprovadas, agora, por uma análise estatística mais aprofundada.

Avançou-se também com o agrupamento dos elementos: cobre, níquel e ferro; fósforo, enxofre, zinco e cálcio, distinguindo-se o bromo num grupo único. Este agrupamento foi feito tendo em conta semelhanças entre as razões das concentrações, o que pode ajudar a interpretar a presença de elementos em função de outros, neste tipo de tecido no

desenvolvimento do cancro. Ainda neste estudo criou-se um a classificação automática de dados, no que diz respeito às concentrações de determinados elementos como P e Zn neste tipo de tecido.

5.1.4 Tecido do estômago

Um estudo [95] revela que existem elementos que parecem ter tendência para que a sua concentração no tecido do estômago com tumor seja mais elevada, como: potássio, rubídio, fósforo, enxofre e selénio.

Um outro estudo [98] já revela que os elementos cloro, cálcio, cobre, arsénio, selénio e bromo tem uma concentração estável, isto é, mantêm-se as concentrações dos elementos quando comparadas, as amostras de tecido com tumor e saudável. Para além disso, refere que os tecidos malignos do estômago mostram uma redução significativa nos elementos crómio e o níquel e uma diminuição questionável nas concentrações de manganésio e zinco. Um estudo sobre os níveis de insulina no sangue de doentes com tumor no estômago [99] refere que a insulina parece estar em maior quantidade em doentes com tumor. As ações da insulina no metabolismo humano como um todo incluem: o controle da quantidade de certas substâncias que entram nas células, principalmente glicose nos tecidos muscular e adiposo (que são aproximadamente 2/3 das células do organismo); o aumento da replicação do DNA e da síntese de proteínas que visa o controle de fornecimento de aminoácidos e a modificação da actividade de inúmeras enzimas. As ações nas células incluem por exemplo o aumento do consumo de potássio que induz as células a absorver potássio plasmático, a falta de insulina inibe a absorção.

Os nossos resultados revelam o fósforo e possivelmente o ferro como elementos de elevada concentração em tecidos do estômago com tumor. O potássio parece ser também um possível candidato, contudo uma das amostras teve um comportamento diferente que pode ter afectado o resultado final (teste de Wilcoxon) no entanto dado ao pequeno número de amostras não se desprezou nenhuma delas.

Conseguiu-se também neste estudo, agrupar os elementos: potássio, ferro, enxofre, fósforo, bromo e zinco; cobre e cálcio. Estes agrupamentos podem tornar-se úteis se pensarmos que estes elementos têm um comportamento idêntico entre si neste tipo de tecido no desenvolvimento do cancro. Também se criou, neste estudo, uma classificação automática de elementos, no que se refere apenas às concentrações dos elementos fósforo e ferro neste tipo de tecido.

5.1.5 Tecido do útero

Um estudo [100] refere que amostras do tecido do endométrio (mucosa que reveste a parede uterina) com tumor apresentam elementos como potássio, cálcio, ferro e zinco com baixa concentração em relação ao tecido saudável. O mesmo estudo revela que uma elevada concentração de crómio, níquel e cádmio em tecidos saudáveis do endométrio pode estar relacionado com a carcinogenese no organismo humano.

De facto os nossos resultados são insuficientes para se poder tirar conclusões fiáveis em relação a uma amostragem significativa. Contudo os resultados, tendo em conta os elementos identificados e a sua quantificação vão ao encontro de bibliografia já existente.

5.2 Investigação Futura

Continuam a ser recolhidas amostras, mas agora com o cuidado de que a quantidade de tecido para cada uma seja mais significativo, isto porque para além do estudo das várias "fatias" analisadas por TXRF, pretende-se fazer um mapeamento da distribuição dos elementos, com uma micro-sonda de fotões, com radiação sincrotrão. Este equipamento existe também no Laboratório de Dortmund (figuras 125 e 126).

O sincrotrão é um acelerador de partículas que é usado não só para acelerar partículas a alta energia para realizar experiências no domínio da física das partículas elementares, mas também para outros fins, em particular para usar a "radiação de sincrotrão" em experiências de física da matéria condensada, e noutros campos, como por exemplo para fins médicos. Trata-se de radiação electromagnética produzida por cargas eléctricas aceleradas a velocidades próximas da luz. Na realidade, a teoria electromagnética clássica já prevê que qualquer partícula eléctrica carregada em movimento acelerado irradia energia sob a forma de radiação electromagnética. No caso de a velocidade da partícula ser próxima da velocidade da luz (partícula relativista) esta radiação adquire algumas características especiais. Assim, para velocidades baixas a radiação é emitida isotropicamente em todas as direcções, mas quando a velocidade se aproxima da luz a radiação é emitida num feixe muito estreito na direcção da velocidade da partícula. Estes feixes de radiação são muitos "brilhantes" porque os fotões são emitidos num cone muito estreito (feixe muito colimado). Quando um feixe de electrões percorre uma trajectória circular, será emitida radiação de sincrotrão, uma vez que os electrões têm uma aceleração (centrípeta). Esta radiação

corresponde a uma perda de energia e, para manter os electrões em órbita, é necessário repor essa energia. Para o efeito utiliza-se um campo electromagnético de alta-frequência que vai repondo a energia dos electrões que vai sendo emitida sob a forma de radiação. Um problema, porém, é que é preciso sincronizar esses "piparotes" que o campo magnético vai dar aos electrões com o período de revolução dos electrões na sua órbita circular, e este período não é independente da velocidade dos electrões. De facto, são usados magnetes potentes para deflectir os electrões – a força centrípeta é a força de Lorentz gerada por esses magnetes. Para um campo magnético perpendicular à velocidade, o raio da trajectória, a velocidade da partícula e o campo magnético estão relacionados desde que a velocidade da partícula seja muito inferior à da luz.

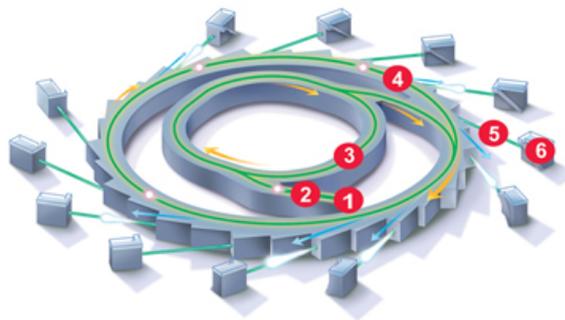


Figura 125 – Esquema típico de um sincrotrão moderno.



Figura 126 – Saída para uma linha de trabalho no sincrotrão em Dortmund.

Um feixe de electrões é produzido num canhão electrónico semelhante ao dos tubos de raios catódicos em (1). Estes electrões são acelerados por um campo eléctrico intenso num acelerador linear (2) que é conhecido na gíria por LINAC – LINear ACcelerator).

A tensão de aceleração é da ordem de 250 milhões de Volts, pelo que a energia dos electrões à saída do LINAC é da ordem de 250 MeV. Segue-se uma aceleração até alguns GeV num pequeno acelerador circular (3) conhecido por Booster. De seguida os electrões são ejectados do pequeno anel para o anel principal (4) conhecido por anel de armazenamento. Este anel é, na realidade, um polígono constituído por uma série de segmentos lineares em que nos ângulos existem magnetes potentes que deflectem os electrões de segmento linear para segmento linear. É nesta deflexão que ocorre a aceleração e, portanto, é emitida a radiação de sincrotrão que é depois utilizada nas linhas de trabalho onde se fazem as experiências (5 e 6, na figura 125).

Por outro lado, pretende-se aumentar a base de dados (número de amostras para cada tipo de tecido) para criar um modelo com base nas classificações automáticas (técnicas de agrupamento não hierárquico) dos dados, já iniciadas neste estudo. Este modelo, poderá ter uma possível aplicação na área da medicina, nomeadamente em Institutos de Oncologia, pois consistirá na possibilidade de prever a partir das concentrações dos elementos nos tecidos se a pessoa em causa tem cancro ou não.

BIBLIOGRAFIA

-
- [1] Alberts, B., Watson, J.D., Molecular biology of the cell (3rd Ed).New York: Garland Publishing, Inc. (1994).
- [2] Mertz, W., The essential trace elements. Science, 213, (1982) 1332-1340.
- [3] Fraústo da Silva, J.J.R. Introdução à Química da Vida. Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa. (1985)
- [4] Pigott, G. M. & Tucker, B. W., Seafood: effects of technology on nutrition. Marcel Dekker, Inc. New York. (1990).
- [5] Navarro-Pedreño, J., Gómez, I. & Mataix, J., Ciclos biogeoquímicos de oligoelementos metálicos. In: Metales en sistemas biológicos. A. Mas & J.M. Azcue (Eds) PPU, S.A. Barcelona. (1993).
- [6] Casarett & Doull's., Toxicology: the basic science of poisons. 5th(Ed).McGraw-Hill. New York. (1996).
- [7] Ruiter, A. Contaminants in fish., In: Fish and fishery products composition, nutritive properties and stability. (Eds.) Ruiter, A. Cab International. UK (1996).
- [8] Lide,R.D. and others., Handbook of Chemistry & Physics. 8th(Ed). New York. (2007).
- [9] Greenwood, N.,Earnshaw, A., Chemistry of Elements. 2th(Ed). Leeds, UK Burtterworth Heinemann. (1998).
- [10] Lall, S. P., Macro and Trace Elements in fish and shellfish. In: Fish and fishery products composition, nutritive properties and stability. (Eds.)Ruiter, A. Cab International. Wallingford. (1995).
- [11] Belitz, H. D. & Grosh, W., Food Chemistry.2ndEd., Springer (Ed) Germany. (1999).
-

-
- [12] Seiler, H. G., Siegel, A., Siegel, H., Handbook of metals in clinical and analytical chemistry. New York: Marcel Dekker. (1994).
- [13] IC, Pescado, estudo comparativo. O consumidor. Instituto do consumidor, Lisboa, nº 85, (1999) 26-32.
- [14] Klaassen, C., Watkins III, J. B., Toxicologia, a ciência básica dos tóxicos (5^a Ed). Lisboa McGraw-Hill de Portugal. (2001).
- [15] Guyton, Hll., Textbook of medical physiology (9th Ed). U.S.A.: Saunders Company. (1996).
- [16] Stults, V. J., Nutricional Hazards. Food Safety. John Wiley & Sons, Inc. USA. (1981).
- [17] Mas, A., Elementos essenciais. In: Metales en sistemas biológicos. A. Mas & J. M. Azcue (Eds), PPU, S.A. Barcelona. (1993).
- [18] Housecroft, C., Constable, E., Chemistry: An Introduction to Orgnic and Physical Chemistry. 3th(Ed).Switzerland. (2005).
- [19] Stwertka, A., A Guide to the Elements. 2th(Ed). Oxford.
- [20] Fan, A. M., An introduction to monitoring and environmental and human risk assessment of metals. Toxicology of metals. CRC Press Inc. Boca Raton, Florida. (1996).
- [21] Renzoni, A., Zino, F. & Franchi, E., Mercury Levels along the Food chain and Risk for Exposed Populations. Environmental Research. (1998).
- [22] CTEM, Toxicological Effects of Methylmercury. Committee on the toxicological effects of Methylmercury. National Academy Press. Washington DC. (2000).
- [23] Peraza, A. M., Ayala – Fierro, F., Barber, D.S., Casarez, E. & Rael, L., Effects of micronutrients on metal toxicology. Environmental health perspectivas. Supl.1, (1998) 1-27.
-

-
- [24] Jacob, Francone, Lossow, Anatomia e Fisiologia Humana (5ªEd). Brasil: Editora Guanabara. (1990).
- [25] Heard, M.J., Chamberlain, A.C. Uptake of Pb by Human Skeleton and comparative metabolismo f Pb and alkaline earth elements. Health Physics, .47, (1984) 857-865.
- [26] www.herbario.com.br/cie/universi/teoria/1025celu.htm
- [27] Ramzi Cotran, Vinay Kumar, Tucker Collins, Robbins Pathologic Basis of Diseases.6th Edition, W. B. Saunders Company. (1999).
- [28] Giordano A., Bovicelli A., Kurman R. J.,Molecular Pathology of Gynecologic Cancer. (2007).
- [29] Microsoft Encarta Encyclopedia Deluxe 2002, Microsoft Corporation. (2001).
- [30] Robbins, S.L. et al. Pathologic basis of disease. 5th Ed. Philadelphia, WB Saunders Co.. (1994).
- [31] Junqueira, L. C., Carneiro, J., Biologia celular e molecular. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 7ª Ed. (2000).
- [32] Griffin-Sobel, J., Gastrointestinal Cancers. (2007).
- [33] Baert, A.L., Sartor K., Imaging of Kidney Cancer. Springer. (2005).
- [34] Brady, L.W., Heilmann, H.P., Molls, M., Advances in Radiation Oncology in Lung Câncer. Springer. (2005).
- [35] Rosenthal, M. S., The thyroid cancer. 2th(Ed). (2006).
-

[36] Salgueiro, L., Ferreira, J. G., Introdução à Física Atômica e nuclear. Lisboa: Tipografia Matemática. (1975).

[37] R. Klockenkamper, Total-Reflection X-Ray Fluorescence Analysis. Canada. (1997).

[38] Eisberg R., Resnick R., Física Quântica. CAMPUS 11º reimpressão, Rio de Janeiro. (1979).

[39] Klug, H., Alexander, L. X-Ray diffraction procedures (2nd Ed). New York: John Wiley & Sons. (1978).

[40] Azároff, L., X-Ray spectroscopy. New York: Mc Graw-Hill. (1974).

[41] Wittkopp, R., Da Gravano, V. L., Fundamentals of x-ray fluorescence (1stEd). California: Kevex Corporation. (1973).

[42] Vandecasteele, C., Block, C.B., Modern Methods for Trace Element Determination. New York: Mc Graw-Hill. (1992).

[43] Aiginger, H., Historial development and principles of total refletion X-ray fluorescence analysis:TXRF. Spectrochimica acta, 10, (1991) 1313-1321.

[44] Vandecasteele, C., Block, C. B., Modern Methods for Trace Element Determination. New York: Mc Graw-Hill. (1992).

[45] Valkovic, V., Analysis of Biological Material for Trace Elements Using X-ray Spectroscopy. Florida. CRC Press, Inc. (1990).

[46] Standzenikes, P., Selin, E., Background Reduction of X-ray Fluorescence Spectra in a Secondary Target Energy Dispersive Spectrometer. Nuclear Instruments and Methods, 165, (1979) 63-65.

-
- [47] T. Magalhães, A. von Bohlen, M.L. Carvalho and M. Becker, Trace elements in human cancerous and healthy tissues from the same individual: a comparative study by TXRF and EDXRF, *Spectrochimica Acta Part B* 61, (2006) 1185 – 1193.
- [48] Rindby, A., Software for Energy-Dispersive X-ray Fluorescence. *X-ray Spectrometry*, 18, (1989) 113-118.
- [49] James, R.W., *The Optical Principles of the diffraction of X-Rays*. Cornell University Press, Ithaca, N.Y. (1967).
- [50] Stanglemeier, F. Forschungszentrum Julich. Rep. N. 2346 (Dissertation, Technische Hochschule, Aachen). (1990).
- [51] Born, M., and Wolf, E., *Principles of optics*. Pergamon Press, london; 6th ed., reprinted (1993).
- [52] H. Schwenke, J.Knoth, Total Reflection XRF, in: *Handbook of X-ray Spectrometry*, eds: R.E. Van Grieken, A.A. Markowicz, Marcel Dekker, New York. (1993).
- [53] IUPAC, Nomenclature, symbols, units and their usage in spectrochemical analysis – II, *Spectrochim. Acta* 33, (1978) 241.
- [54] R. Klockenkämper, J. Knoth, A. Prange, H. Schwenke, Total-Reflection X-ray Fluorescence Spectroscopy, *Anal. Chem.* 64, (1992) 1115A.
- [55] P.Wobrauschek, H. Aiginger, Analytical application of total-reflection and polarized X-rays, *Fresenius Z.Anal.Chem.*324, (1986) 865.
- [56] M. J. Bedzyk, G. M. Bommarito, J. S. Schildkraut, X-ray standing waves at reflecting mirror surface, *Phys. Rev.Lett.* 62, (1989) 1376.
- [57] P. Kregsamer, C. Strelj, P. Wobrauschek, Total –Reflection X-ray Fluorescence, in: *handbook of X-ray Spectrometry*, Second Edition, Revised and Expanded, eds: R.E. Van Grieken, A. A. Markowicz, Marcel Dekker, New York. (2002).
-

[58] D. K. de Boer, Glancing-incidence X-ray fluorescence of layered materials, *Phy. Rev. B* 44, (1991) 498.

[59] R. Klockenkamper, A. von Bohlen, Determination of the critical thickness and the sensitivity for thin-film analysis by total reflection X-ray fluorescence spectrometry, *Spectrochim. Acta* 44B, (1989) 461.

[60] A. Prange, H. Schwenke, Sample Treatment for TXRF – Requirements and Prospects, *Adv. X-ray Anal.* 32, (1989) 209.

[61] H. Aiginger, P. Wobrauschek, A method for quantitative X-ray fluorescence analysis in the nanogram region, *Nucl. Instr. Methods* 114, (1974) 157.

[62] P. Wobrauschek, H. Aiginger, Total-Reflection X-ray Fluorescence Spectrometric Determination of Elements in Nanogram Amounts, *Anal. Chem.* 47, (1975) 852.

[63] H. Aiginger, P. Wobrauschek, Total reflectance X-ray spectrometry, *Adv. X-ray Anal.* 28, (1985) 12.

[64] E.D.Greaves, L.M.Marcó Parra, A.Rojas, L.Sajo-Bohus, *X-Ray Spectrometry*.29, (2000) 349-353.

[65] B. K. Agarwal, *X-ray spectroscopy - An introduction*, Springer – Verlag, Berlin. (1979).

[66] G. F. Knoll, *Radiation Detection and Measurement*, Second Edition, John Wiley & Sons New York. (1989).

[67] C. Strelj, H. Aiginger, P. Wobrauschek, Total reflection X-ray fluorescence analysis of low – Z elements, *Spectrochim. Acta* 44B, (1989) 491.

-
- [68] R. Klockenkämper, A. von Bohlen, B. Wiecken, Quantification in total reflection X-ray fluorescence analysis of microtome sections, *Spectrochim. Acta Part B* 44, (1989) 511–517.
- [69] A. von Bohlen, R. Klockenkämper, G. Tolg, B. Wiecken, Qualitative survey analysis of thin layers of tissue samples — heavy metal traces in human lung tissue, *Int. Arch. Occup. Environ. Health* 59, (1987) 403–411.
- [70] A. von Bohlen, R. Klockenkämper, G. Tolg, B. Wiecken, Microtome sections of biomaterials for trace analyses by TXRF, *Fresenius Z. Anal. Chem.* 331 (1988) 454–458.
- [71] A. von Bohlen, R. Klockenkämper, P. Rechmann, J. Tourmann, Ultramicro analysis of dental plaque films by total reflection X-ray fluorescence, *J. Trace Elem. Electrolytes Health Dis.* 8, (1994) 37–42.
- [72] L. Marcó, E. Greaves, J. Alvarado, Analysis of human blood serum and human brain samples by total reflection X-ray fluorescence spectrometry applying Compton peak standardization, *Spectrochim. Acta Part B* 54, (1999) 1469–1480.
- [73] A. Prange, H. Böddeker, W. Michaelis, Multielement determination of trace elements in whole blood and blood serum by TXRF, *Fresenius Z. Anal. Chem.* 335, (1989) 914–918.
- [74] M.L. Carvalho, J. Brito, M.A. Barreiros, Study of trace element concentrations in human tissues by EDXRF spectrometry, *X-Ray Spectrom.* 27, (1998) 198–204.
- [75] M.L. Carvalho, A.F. Marques, X-ray fluorescence spectrometry: applications in trace elements studies in human tissues from patients with cirrhosis, *X-Ray Spectrom.* 30, (2001) 397–402.
- [76] U. Majeweska, J. Braziewicz, D. Banas, A. Kubala-Kukus, S. Gozdz, M. Pajek, J. Smok, A. Urbaniak, An elemental correlation study in cancerous breast tissue by total reflection X-ray fluorescence, *Biol. Trace Elem. Res.* 60, (1997) 91–100.
-

- [77] M. Kucharzewski, J. Braziewicz, U. Majewska, S. Gozdz, Iron concentrations in intestinal cancer tissue and in colon and rectum polyps, *Biol. Trace Elem. Res.* 95, (2003) 19–28.
- [78] M.E. Poletti, O.D. Gonçalves, C.A. Pérez, S.D. Magalhães, A preliminary study of the distribution of trace elements in healthy and neoplastic breast tissues with synchrotron radiation X-ray fluorescence, *Radiat. Phys. Chem.* 71, (2004) 975–976.
- [79] S.L. Rizk, H.H. Sky-Peck, Comparison between concentrations of trace elements in normal and neoplastic human breast tissue, *Cancer Res.* 44, (1984) 5390–5394.
- [80] K.-H. Ng, D.A. Bradley, L.M. Looi, Elevated trace element concentrations in malignant breast tissues, *Br. J. Radiol.* 70, (1997) 375–382.
- [81] K. Geraki, M.J. Farquharson, D.A. Bradley, Concentrations of Fe, Cu and Zn in breast tissue: a synchrotron XRF study, *Phys. Med. Biol.* 47, (13) (2002) 2327–2339.
- [82] K. Geraki, M.J. Farquharson, D.A. Bradley, X-ray fluorescence and energy dispersive X-ray diffraction for the quantification of elemental concentrations in breast tissue, *Phys. Med. Biol.* 49, (2004) 99–100.
- [83] U. Majewska, J. Braziewicz, D. Banaś, A. Kubala-Kukuś, S. Gózdź, M. Pajek, M. Zadrożna, M. Jaskóla, T. Czyżewski, Some aspects of statistical distribution of trace element concentrations in biomedical samples, *Nucl. Instrum. Methods Phys. Res., B Beam Interact. Mater. Atoms* 150, (1999) 254–259.
- [84] A. Kubala- Kukuś, E. Kutergona, J. Braziewicz and M. Pajek, Log-stable concentration distributions of trace elements in biomedical samples, *Spectrochim. Acta Part B* 59, (2004) 14711–1716.
- [85] National Academy of Sciences, *Drinking water and health*. Washington (DC); 3 (1985).
- [86] C.P. Caygill, A. Chalett, M.J Hill, *Br. J.*, *Cancer* 74, (1996) 159–164.
-

[87] M.F. Robinson, P.J. Godfrey, C.D. Thomson, et al., Blood selenium and glutathione peroxidase activity in normal subjects and surgical patients with and without cancer in New Zealand, *Am. J. Clin. Nutr.* 32, (1979) 1477–1485.

[88] B. Bjerre, H. von Schenck, B. Sörbo, Hyposelenaemia: patients with gastrointestinal disease are at risk, *J. Intern. Med.* 225, (1989) 85–88.

[89] L. Pothier, W.W. Lane, A. Bhargava, et al., Plasma selenium levels in patients with advanced upper gastrointestinal cancer, *Cancer* 60, (1987) 2251–2260.

[90] A.N. Garg, V. Singh, R.G. Weginwar, An elemental correlation study in cancerous and normal breast tissue with successive clinical stages by neutron activation analysis, *Biol. Trace Elem. Res.* 46, (1994) 185–201.

[91] K.H. Ng, D.A. Bradley, L.M. Looi, et al., Differentiation of elemental composition of normal and malignant breast tissue by instrumental neutron activation analysis, *Appl. Radiat. Isotopes* 44, (1993) 511–516.

[92] A. Zoboli, A case-control study on selenium, zinc and copper in plasma and hair of subjects affected by breast and lung cancer, *Biol. Trace Elem. Res.* 51, (1996) 23–30.

[93] G.N. Schrauzer, Anticarcinogenesis effects of selenium, *Cell. Mol. Life Sci.* 622, (2000) 1864–1873.

[94] L. Benninghoff, D. von Czarnowski, E. Denkhaus, K. Lemke, Analysis of human tissues by total reflection X-ray fluorescence. Application of chemometrics for diagnostic cancer recognition, *Spectrochim. Acta Part B* 52, (1997) 1039–1046.

[95] L. Benninghoff, E. Denkhaus, Trace element distribution in human tissues of the digestive tract for malignant-normal and tissue type classification, *Metal Ions Biol. Med.* 5, (1998) 572–577.

[96] T. Magalhães, M. Becker, M.L. Carvalho and A. von Bohlen, Br, Zn, Cu and Fe role in breast cancer: TXRF applications, *Spectrochimica Acta Part B*. (submitted 2007).

-
- [97] M.L.Carvalho, L.Ascensão, T.Magalhães, A.Casimiro, EDXRF and TXRF Application to cadmium toxicity in *Acer pseudoplatanus* L. cells: cytological features and cation interactions, *X-Ray Spectrometry* 34, (2005) 406–410.
- [98] D.von Czarnowski, E. Denkhaus, K.Lemke, Determination of trace element distribution in cancerous and normal human tissues by total reflection X-ray fluorescence analysis, *Spectrochimica Acta Part B* 52, (1997) 1047–1052.
- [99] D. Yam, A. Fink, A. Mashiah, E. Ben-Hur, Hyperinsulinemia in colon, stomach and breast cancer patients, *Cancer Letters* 104, (1996) 129–132.
- [100] V.V. Bazhanova, L.F. Guljaeva, S.E. Krasilnikov, V.S. Titova, A.D. Shaporenko, Y. Shulga, *Nucl. Instrum. Methods Phys. Res., A* 575, (2007) 206–209.
-

ANEXOS

Resultados Experimentais

As tabelas que se seguem (da tabela 99 à tabela 103) mostram todos os valores experimentais que foram estudados. Todas essas tabelas utilizam a seguinte legenda:

	– Amostra de tecido saudável;
	– Amostra de tecido com tumor;
P	– Amostra Portuguesa;
A	– Amostra Alemã;
< LMD	– Abaixo do limite de detecção.

Amostra	Origem	Técnica	S	K	Ca	Fe	Cu	Zn	Br
Sigmóide	P	TXRF	3893,30 ±711,15	53,00 ±14,11	1863,30 ±347,04	125,30 ±13,43	4,30 ±0,93	104,30 ±5,13	< LMD
		EDXRF	3585,90 ±537,02	51,40 ±13,10	725,20 ±40,43	111,20 ±4,24	9,30 ±2,50	76,50 ±4,38	< LMD
Tiróide	P	TXRF	2163,30 ±219,62	273,00 ±31,24	175,30 ±15,95	33,30 ±3,79	1,60 ±0,06	18,30 ±1,53	< LMD
		EDXRF	2488,30 ±738,95	913,00 ±245,50	418,50 ±102,70	122,00 ±15,47	5,30 ±2,50	71,20 ±4,59	< LMD
Rim	P	TXRF	2100,00 ±416,05	75,00 ±15,72	168,70 ±36,47	1210,00 ±346,99	1,90 ±0,12	30,00 ±8,19	< LMD
		EDXRF	1459,90 ±20,13	77,50 ±1,34	245,50 ±71,43	635,30 ±39,26	3,50 ±2,00	37,80 ±0,45	< LMD
Rim	P	TXRF	1876,70 ±704,65	196,00 ±101,77	158,30 ±95,46	1553,30 ±571,34	2,10 ±0,38	18,30 ±8,58	< LMD
		EDXRF	1156,30 ±120,00	183,40 ±20,00	568,10 ±60,00	634,60 ±70,00	2,70 ±1,00	23,00 ±5,00	< LMD
Pulmão	P	TXRF	3028,80 ±1074,63	64,30 ±12,63	661,50 ±273,56	316,30 ±143,26	1,70 ±0,73	21,30 ±6,60	< LMD
		EDXRF	2919,80 ±544,16	116,90 ±24,76	836,40 ±50,53	415,60 ±82,94	3,90 ±2,00	48,10 ±2,26	< LMD
Laringe	P	TXRF	2440,00 ±84,85	213,00 ±24,04	300,00 ±30,00	71,00 ±4,24	2,00 ±0,14	29,00 ±7,07	< LMD
		EDXRF	2291,00 ±112,87	405,70 ±22,18	1116,00 ±57,42	157,90 ±16,00	5,50 ±2,50	58,20 ±7,00	< LMD
Recto	P	TXRF	5491,70 ±1000,43	67,70 ±17,01	64,30 ±15,63	73,30 ±11,59	2,50 ±0,42	17,70 ±3,79	< LMD
		EDXRF	< LMD	202,80 ±50,00	261,20 ±52,00	113,60 ±20,00	14,40 ±5,00	66,90 ±10,00	< LMD
Recto	P	TXRF	2263,30 ±300,22	80,70 ±5,86	181,00 ±21,52	40,00 ±1,73	2,60 ±0,92	29,00 ±3,61	< LMD
		EDXRF	2550,80 ±798,08	74,00 ±18,77	272,30 ±12,42	89,80 ±10,00	4,70 ±2,00	63,80 ±1,41	< LMD
Recto	P	TXRF	1380,67 ±207,89	98,33 ±7,07	570,67 ±57,00	32,50 ±9,00	1,20 ±2,00	18,83 ±9,00	< LMD
		EDXRF	1722,90 ±96,75	193,80 ±27,35	577,60 ±57,00	87,70 ±9,00	3,70 ±2,00	70,90 ±9,00	< LMD
Cólon	A	TXRF	2830,70 ±844,92	1624,70 ±446,62	499,00 ±103,15	43,70 ±8,14	6,00 ±0,90	35,30 ±9,24	< LMD
		EDXRF	1997,30 ±200,00	1645,10 ±165,00	693,70 ±69,40	93,40 ±9,00	19,70 ±3,00	90,50 ±9,00	6,60 ±0,60
Cólon	A	TXRF	3384,60 ±1229,89	578,60 ±202,32	505,20 ±192,09	47,60 ±15,52	8,00 ±3,39	33,20 ±12,79	2,60 ±1,52
		EDXRF	1396,70 ±140,00	524,50 ±52,00	564,50 ±56,00	107,50 ±11,00	20,00 ±3,00	71,30 ±7,00	5,80 ±0,60
Cólon	A	TXRF	10469,60 ±3263,45	1072,20 ±253,30	2622,60 ±630,17	106,20 ±41,23	33,60 ±11,15	103,00 ±25,56	< LMD
		EDXRF	2168,70 ±217,00	928,10 ±93,00	1342,70 ±134,00	76,90 ±8,00	41,90 ±6,30	82,80 ±8,00	3,50 ±0,40
Mama	A	TXRF	3240,60 ±1722,99	164,30 ±78,78	1273,60 ±621,73	98,30 ±62,54	14,10 ±5,40	39,10 ±21,00	5,00 ±2,65
		EDXRF	1705,60 ±171,00	361,20 ±36,00	1529,30 ±153,00	147,30 ±15,00	27,30 ±4,00	63,70 ±6,00	9,30 ±0,90
Útero	A	TXRF	3036,70 ±396,14	912,00 ±130,37	330,30 ±58,77	52,70 ±6,43	3,30 ±1,53	33,70 ±6,43	2,00 ±0,03
		EDXRF	1855,40 ±186,00	1201,70 ±120,00	355,90 ±36,00	80,60 ±8,00	8,60 ±1,00	79,10 ±8,00	6,80 ±0,70

Tabela 99 – Resultados experimentais obtidos pelas duas técnicas.

Amostra	Origem	TXRF / tecido da mama								
		P	S	K	Ca	Fe	Ni	Cu	Zn	Br
1	P	270,40 ±100,80	399,60 ±151,93	11,70 ±5,05	18,80 ±7,35	4,30 ±1,74	1,00 ±0,05	1,00 ±0,02	2,00 ±0,73	1,20 ±0,43
		1485,20 ±86,60	2309,40 ±303,22	118,30 ±15,14	91,80 ±10,88	87,20 ±6,33	1,20 ±0,10	2,30 ±0,45	17,30 ±2,54	6,60 ±0,85
		382,70 ±83,27	537,10 ±96,98	10,60 ±3,56	26,60 ±5,30	4,80 ±0,67	1,80 ±0,17	1,70 ±0,19	3,50 ±0,46	1,00 ±0,02
2	P	692,40 ±45,85	1165,20 ±92,99	8,10 ±2,56	57,60 ±8,16	17,40 ±1,40	0,80 ±0,01	1,00 ±0,03	6,30 ±0,34	2,00 ±0,23
		371,80 ±188,44	381,00 ±209,98	8,50 ±1,70	18,50 ±7,89	11,60 ±5,22	1,80 ±0,83	1,20 ±0,29	3,00 ±1,39	< LMD
		1683,50 ±88,68	2580,30 ±93,27	15,80 ±2,55	108,80 ±11,03	84,70 ±9,14	2,60 ±0,40	2,50 ±0,25	22,50 ±1,38	6,70 ±0,59
4	P	2731,80 ±390,15	2319,40 ±358,63	105,10 ±21,99	101,40 ±19,69	54,20 ±9,73	3,10 ±0,28	3,30 ±0,67	14,20 ±1,99	2,70 ±0,60
		2217,80 ±808,00	3259,50 ±823,56	97,90 ±34,15	185,10 ±55,69	121,90 ±107,47	2,20 ±0,07	4,70 ±2,50	25,30 ±10,17	21,70 ±9,57
		86,20 ±42,31	117,50 ±80,81	20,30 ±0,50	14,80 ±7,11	9,60 ±0,94	2,80 ±1,61	2,50 ±0,71	2,00 ±0,13	< LMD
5	P	3306,80 ±448,17	3904,40 ±554,02	113,00 ±14,14	96,60 ±13,84	121,40 ±21,16	3,00 ±0,00	3,50 ±0,74	41,00 ±5,64	4,20 ±0,57
		481,10 ±82,23	564,20 ±101,45	17,10 ±5,28	36,50 ±10,32	18,50 ±14,36	5,50 ±2,05	6,60 ±0,56	4,10 ±1,26	2,90 ±1,10
		1272,20 ±139,23	1683,70 ±267,12	40,90 ±6,43	70,80 ±8,32	22,60 ±4,29	6,10 ±1,07	4,20 ±1,96	14,60 ±1,65	4,00 ±0,47
7	P	105,30 ±28,04	129,60 ±19,96	< LMD	28,00 ±8,43	21,60 ±2,79	4,50 ±1,93	3,80 ±0,05	3,60 ±1,41	< LMD
		1228,60 ±267,76	3126,60 ±580,70	149,40 ±37,79	411,60 ±143,79	28,50 ±6,72	3,30 ±0,90	5,50 ±0,82	23,80 ±5,89	29,10 ±7,19
		108,70 ±16,77	108,30 ±23,95	9,10 ±3,31	12,10 ±3,53	10,00 ±1,34	3,80 ±1,55	3,10 ±1,91	1,50 ±0,56	< LMD
8	P	583,80 ±50,92	746,20 ±25,16	18,30 ±2,57	48,80 ±5,43	27,70 ±2,06	3,00 ±0,40	6,50 ±4,32	6,50 ±0,64	2,30 ±0,32
		74,30 ±50,38	80,80 ±53,83	< LMD	12,70 ±7,82	8,20 ±2,83	1,70 ±0,75	3,30 ±0,57	1,50 ±0,60	< LMD
		1103,60 ±369,44	988,00 ±324,79	49,70 ±13,27	83,90 ±27,46	68,80 ±17,65	2,80 ±0,90	3,70 ±0,34	6,40 ±2,27	1,40 ±0,48
10	P	179,30 ±55,71	258,20 ±75,16	23,80 ±8,29	37,00 ±9,15	8,10 ±2,78	1,70 ±0,68	1,40 ±0,32	2,10 ±0,59	2,00 ±0,64
		2096,40 ±176,72	2978,70 ±209,74	471,90 ±57,42	260,10 ±44,55	84,90 ±6,27	4,80 ±1,58	4,20 ±0,74	26,60 ±4,11	12,70 ±1,02
		502,00 ±190,01	528,00 ±224,97	9,00 ±1,70	23,20 ±5,60	13,70 ±3,47	1,90 ±0,73	1,20 ±0,29	3,80 ±1,08	1,90 ±0,75
11	P	1684,00 ±108,57	2674,00 ±187,03	16,00 ±2,28	106,00 ±8,86	87,60 ±9,61	2,50 ±0,36	2,40 ±0,33	21,90 ±1,34	7,00 ±0,88
		2732,00 ±390,15	2319,00 ±358,63	105,00 ±21,99	101,00 ±16,69	54,20 ±9,73	3,10 ±0,28	3,30 ±0,67	14,20 ±1,99	2,70 ±0,60
		1939,00 ±187,03	3136,00 ±805,78	86,00 ±6,81	170,00 ±38,51	89,00 ±56,68	2,00 ±0,07	4,00 ±0,77	22,00 ±2,25	23,00 ±9,90
13	P	108,00 ±48,90	166,00 ±91,34	20,30 ±0,60	19,50 ±6,61	8,40 ±2,88	3,80 ±1,91	< LMD	2,90 ±1,37	< LMD
		3307,00 ±448,17	3904,00 ±554,02	113,00 ±14,14	97,00 ±13,84	121,40 ±21,16	< LMD	3,50 ±0,74	41,00 ±5,64	4,20 ±0,57
		331,00 ±75,73	521,00 ±128,21	10,70 ±3,14	13,70 ±5,39	12,20 ±2,99	1,50 ±0,21	< LMD	2,40 ±0,65	< LMD
14	P	1962,00 ±302,88	2783,00 ±494,23	171,00 ±23,13	103,00 ±13,75	37,40 ±5,43	2,10 ±0,10	1,90 ±0,46	19,50 ±2,22	3,40 ±0,56

Tabela 100 – Resultados experimentais obtidos para amostras do tecido da mama.

Amostra	Origem	TXRF / tecido da mama								
		P	S	K	Ca	Fe	Ni	Cu	Zn	Br
15	A	72,00 ±0,50	666,40 ±119,57	52,80 ±10,43	379,00 ±99,96	10,90 ±2,59	2,30 ±0,50	5,00 ±0,76	6,80 ±1,75	< LMD
		186,80 ±14,02	909,40 ±94,64	49,60 ±8,08	336,60 ±43,55	11,90 ±0,74	1,70 ±0,03	11,00 ±1,25	12,10 ±3,43	2,30 ±0,39
16	A	< LMD	294,80 ±116,55	16,80 ±8,38	153,30 ±53,07	5,30 ±2,06	1,70 ±1,15	2,30 ±0,96	5,80 ±2,99	1,00 ±0,02
		< LMD	3240,60 ±1722,99	164,30 ±78,78	1273,60 ±621,73	98,30 ±62,54	3,00 ±1,87	14,10 ±5,40	39,10 ±21,00	5,00 ±2,65

Tabela 100 – Resultados experimentais obtidos para amostras do tecido da mama (continuação).

Amostra	Origem	TXRF / tecido do intestino								
		P	S	K	Ca	Fe	Ni	Cu	Zn	Br
1	P	1640,00 ±249,17	2509,00 ±182,73	68,20 ±11,96	113,70 ±17,62	31,00 ±4,18	< LMD	4,70 ±2,82	44,90 ±5,22	3,00 ±0,79
		3176,00 ±824,39	3499,00 ±915,78	81,90 ±21,64	118,10 ±29,97	83,80 ±24,73	< LMD	7,60 ±2,97	51,40 ±12,66	3,80 ±0,51
2	P	1931,00 ±480,00	3447,00 ±803,06	69,50 ±12,70	142,00 ±30,28	102,70 ±30,07	2,60 ±0,85	3,80 ±0,47	58,20 ±13,48	4,90 ±1,28
		3397,00 ±606,35	4642,00 ±836,99	66,06 ±6,60	23,81 ±2,38	23,11 ±23,11	< LMD	3,70 ±0,91	57,70 ±11,25	4,70 ±0,90
3	A	578,00 ±84,12	2109,00 ±288,54	569,20 ±56,05	282,20 ±43,24	36,40 ±7,13	2,30 ±0,83	4,10 ±0,81	45,60 ±6,73	< LMD
		790,00 ±87,10	2429,20 ±307,91	96,60 ±9,40	522,00 ±50,64	55,60 ±6,91	1,70 ±0,15	8,30 ±1,76	30,20 ±3,03	2,70 ±0,47
4	A	878,80 ±144,07	1297,20 ±163,74	180,20 ±21,51	587,00 ±65,72	41,00 ±5,00	2,18 ±1,09	8,60 ±1,41	27,80 ±2,86	1,60 ±0,35
		1421,80 ±371,70	2196,00 ±658,40	422,00 ±48,58	662,20 ±80,73	40,40 ±8,47	2,20 ±1,70	7,00 ±0,78	30,60 ±4,45	1,80 ±0,48
5	A	688,60 ±175,74	1848,20 ±355,19	97,20 ±30,31	314,40 ±136,13	43,40 ±10,14	3,60 ±2,14	7,80 ±1,34	30,60 ±3,27	2,10 ±0,28
		877,60 ±141,56	2063,00 ±290,61	298,00 ±32,53	775,80 ±105,94	38,00 ±7,25	1,80 ±0,70	4,10 ±0,31	25,40 ±6,11	2,40 ±0,62
6	A	481,60 ±79,01	2752,40 ±555,22	98,80 ±13,66	463,80 ±53,40	36,60 ±7,83	2,34 ±0,66	10,08 ±2,33	39,20 ±6,10	6,62 ±1,24
		2241,40 ±368,95	3967,40 ±606,75	182,40 ±22,72	963,20 ±97,85	57,20 ±10,26	1,50 ±0,06	7,00 ±0,81	46,00 ±4,64	2,20 ±0,88
7	A	1395,00 ±248,92	2102,80 ±631,55	68,30 ±10,05	1628,00 ±253,97	43,00 ±5,72	1,70 ±0,46	21,30 ±9,50	36,00 ±8,04	2,00 ±0,28
		321,70 ±33,61	874,30 ±33,38	27,30 ±7,37	353,00 ±66,90	51,30 ±9,24	1,90 ±0,55	11,30 ±2,14	16,30 ±2,89	2,20 ±0,03
8	A	651,40 ±317,51	2024,00 ±953,37	146,60 ±34,95	451,40 ±79,49	48,80 ±14,86	2,30 ±0,98	8,80 ±1,66	35,60 ±5,41	2,30 ±0,67
		693,20 ±156,93	3520,80 ±888,88	932,20 ±205,22	787,00 ±180,99	93,80 ±22,60	2,60 ±0,84	7,40 ±1,68	34,00 ±8,22	3,90 ±1,07
9	A	564,00 ±230,77	1931,30 ±693,18	191,70 ±58,16	574,00 ±156,29	36,00 ±13,45	3,00 ±0,08	12,30 ±2,08	38,00 ±11,53	< LMD
		2249,20 ±650,69	4891,40 ±1226,38	347,40 ±61,30	1250,20 ±339,77	30,60 ±7,44	3,00 ±0,10	17,80 ±6,87	42,20 ±10,03	< LMD
10	A	256,70 ±99,17	767,30 ±111,79	137,30 ±9,02	235,00 ±6,24	13,30 ±3,51	1,50 ±0,71	2,30 ±0,58	15,00 ±2,00	< LMD
		811,00 ±367,29	1336,30 ±601,86	175,70 ±59,77	343,70 ±129,52	24,30 ±9,07	3,00 ±1,41	11,30 ±6,66	12,30 ±4,93	< LMD
11	A	1892,00 ±478,96	5109,00 ±849,83	1828,00 ±435,49	465,00 ±47,19	108,90 ±7,27	4,70 ±1,53	9,30 ±1,50	83,00 ±8,76	< LMD
		1716,00 ±535,77	2830,70 ±844,92	1624,70 ±446,62	499,00 ±103,15	43,70 ±8,14	3,00 ±0,07	6,00 ±0,03	35,30 ±9,24	< LMD
12	A	1021,00 ±266,25	2368,40 ±621,43	454,00 ±154,57	468,60 ±111,78	150,20 ±44,67	2,30 ±0,35	4,60 ±1,52	33,00 ±9,87	3,00 ±0,82
		1845,80 ±691,46	3384,60 ±1229,89	578,60 ±202,32	505,20 ±192,09	47,60 ±15,52	2,50 ±0,71	8,00 ±3,39	33,20 ±12,79	2,60 ±1,52
13	A	1517,30 ±586,94	2580,50 ±1156,02	212,00 ±89,17	1337,30 ±480,40	51,30 ±23,19	10,30 ±4,73	13,30 ±4,35	51,80 ±20,07	< LMD
		7730,40 ±2353,89	10469,60 ±3263,45	1072,20 ±253,30	2622,60 ±630,17	106,20 ±41,23	17,40 ±4,99	33,60 ±11,15	103,00 ±25,56	< LMD

Tabela 101 – Resultados experimentais obtidos para amostras do tecido do intestino.

Amostra	Origem	TXRF / tecido do estômago								
		P	S	K	Ca	Fe	Ni	Cu	Zn	Br
1	A	540,10 ±67,68	1494,00 ±126,48	300,90 ±53,98	285,90 ±43,18	30,10 ±3,68	2,30 ±0,47	3,00 ±0,72	21,80 ±3,85	1,80 ±0,28
		994,60 ±177,66	2730,80 ±335,39	851,60 ±130,36	348,00 ±55,26	53,20 ±7,46	2,20 ±0,32	3,90 ±0,93	37,00 ±5,52	3,10 ±0,54
2	A	422,25 ±77,73	1090,50 ±243,52	587,50 ±140,31	195,00 ±45,93	51,25 ±11,79	2,00 ±0,26	3,35 ±2,12	51,50 ±6,37	< LMD
		1414,00 ±400,19	2819,40 ±923,89	176,00 ±44,37	1290,20 ±270,26	108,20 ±36,23	2,70 ±0,57	12,10 ±1,82	37,60 ±8,56	< LMD
3	A	1923,40 ±150,95	3161,80 ±324,55	1602,20 ±128,54	358,40 ±24,94	53,60 ±5,13	2,10 ±0,53	3,76 ±0,38	38,60 ±3,21	2,34 ±0,51
		570,20 ±140,29	1799,00 ±484,88	468,00 ±88,08	277,40 ±45,01	33,40 ±7,92	1,50 ±0,71	3,46 ±1,01	31,40 ±5,86	2,58 ±1,12
4	P	1190,00 ±364,68	1721,00 ±465,59	20,40 ±5,53	70,60 ±22,31	30,10 ±6,80	< LMD	1,90 ±0,62	18,60 ±5,06	4,00 ±1,00
		1285,00 ±410,98	1638,00 ±435,57	21,60 ±8,64	69,30 ±18,68	80,00 ±22,78	1,70 ±0,68	3,00 ±1,40	18,80 ±4,74	1,80 ±0,33
5	P	2256,00 ±366,54	3896,00 ±591,84	101,00 ±10,86	165,00 ±20,53	130,10 ±14,90	7,00 ±2,84	4,90 ±0,89	42,70 ±4,69	8,00 ±1,62
		3751,00 ±814,70	4563,00 ±945,91	427,00 ±115,50	193,00 ±52,16	180,30 ±38,10	< LMD	3,30 ±0,93	30,00 ±8,83	3,10 ±1,18

Tabela 102 – Resultados experimentais obtidos para amostras do tecido do estômago.

Amostra	Origem	TXRF / tecidos do útero								
		P	S	K	Ca	Fe	Ni	Cu	Zn	Br
1	A	2212,00 ±118,01	3775,40 ±279,89	570,60 ±50,28	1590,00 ±92,04	59,20 ±6,26	3,00 ±0,01	4,40 ±0,89	39,60 ±2,61	18,80 ±2,59
		1675,70 ±148,55	3036,70 ±396,14	912,00 ±130,37	330,30 ±58,77	52,70 ±6,43	2,50 ±0,71	3,30 ±1,53	33,70 ±6,43	2,00 ±0,01
2	A	1041,00 ±161,72	1861,00 ±324,40	122,00 ±19,47	83,00 ±16,46	19,60 ±2,96	1,20 ±0,39	1,10 ±0,46	18,90 ±2,740	2,10 ±0,27
		1232,00 ±104,21	2472,00 ±112,04	148,00 ±18,67	69,80 ±8,74	6,60 ±1,02	1,10 ±0,01	1,30 ±0,24	29,80 ±4,310	3,70 ±0,17

Tabela 103 - Resultados experimentais obtidos para amostras do tecido do útero.

Funções das classificações**Amostras de tecido da mama**

```

function [Pe, confusao]=knn_classify(data,k,nclasses)
% data: lines- samples; collumns- features (last col
%represents the class)
% k - number of neighbors
% nclasses - number of classes

[n,m]=size(data);
results=zeros(1,n);

for i=1:n
    %leave-one out
    if i==n
        classifica=1:n-1;
    elseif i==1
        classifica=[2:n];
    else
        classifica=[1:i-1 i+1:n];
    end
    s=data(i,:);
    fprintf(1,[num2str(i) ':']);
    results(i)=knn(s,data(classifica,:),k,nclasses);
end

Pe=sum(results)/n;
fprintf(1,['\nPe:' num2str( Pe ) '\n']);

%so p este conjunto de dados
confusao(1,1)=length( find( results(1:16) == 0 ) );
confusao(1,2)=length( find( results(1:16) == 1 ) );
confusao(2,1)=length( find( results(17:32) == 1 ) );
confusao(2,2)=length( find( results(17:32) == 0 ) );

function erro = knn(s,classifica,k,nclasses)
%s: sample to classify
%classifica: training set
%k: number of neighbors

[n,m]=size(classifica);
% euclidean norm
dist=sqrt(sum((ones(n,1)*s(1,1:m-1)-classifica(:,1:m-1)).^2,2));

[Y,i]=sort(dist);

%For each considered neighbor verify the class
votos=zeros(1,k);
for ii=1:k
    votos(ii)=classifica(i(ii),m); %column m - sample class
end

classes=zeros(1,nclasses);

for ii=1:nclasses
    temp = find(votos==ii);
    if ~isempty(temp)
        classes(ii)=length(temp);
    else

```

```

    classes(ii)=0;
    end
end

[Y,i] = max(classes);

erro = i ~= s(1,m);

fprintf(1, ['voting:' num2str(i) ' ; class:' num2str(s(1,m)) ' ; erro='
num2str(erro) '\n']);

load('mama.mat')
legendas={'Ori','P','S','K','Ca','Fe','Ni','Cu','Zn','Br'}
%classe 1 (N Cancro)
mama(1:16,11)=1;
%classe 2 (Cancro) - confirmar
mama(17:32,11)=2;

```

Testes

```

% S, P, Zn, Cu
data=mama(:,[2, 3, 7, 8, 11]);
[Pe,confusao]=knn_classify(data,2,2)
% Pe = 0.0625
% confusao =
%      16      0
%      2      14

%Ca, Ni, Fe
data=mama(:,[5, 6, 7, 11]);
[Pe,confusao]=knn_classify(data,2,2)
% Pe = 0.2188
% confusao =
%      15      1
%      6      10

```

Amostras de tecido do intestino

```

function [Pe, confusao]=knn_classify(data,k,nclasses)
% data: lines- samples; collumns- features (last col
%represents the class)
% k - number of neighbors
% nclasses - number of classes

[n,m]=size(data);
results=zeros(1,n);

for i=1:n
%leave-one out
    if i==n
        classifica=1:n-1;
    elseif i==1
        classifica=[2:n];
    else
        classifica=[1:i-1 i+1:n];
    end
    s=data(i,:);

```

```

    fprintf(1,[num2str(i) ':']);
    results(i)=knn(s,data(classifica,:),k,nclasses);
end

Pe=sum(results)/n;
fprintf(1,['\nPe:' num2str( Pe ) '\n']);

%so p este conjunto de dados
confusao(1,1)=length( find( results(1:13) == 0) );
confusao(1,2)=length( find( results(1:13) == 1) );
confusao(2,1)=length( find( results(14:26) == 1) );
confusao(2,2)=length( find( results(14:26) == 0) );

function erro = knn(s,classifica,k,nclasses)
%s: sample to classify
%classifica: training set
%k: number of neighbors

[n,m]=size(classifica);
% euclidean norm
dist=sqrt(sum((ones(n,1)*s(1,1:m-1)-classifica(:,1:m-1)).^2,2));

[Y,i]=sort(dist);

%For each considered neighbor verify the class
votos=zeros(1,k);
for ii=1:k
    votos(ii)=classifica(i(ii),m); %column m - sample class
end

classes=zeros(1,nclasses);
for ii=1:nclasses
    temp = find(votos==ii);
    if ~isempty(temp)
        classes(ii)=length(temp);
    else
        classes(ii)=0;
    end
end

[Y,i] = max(classes);

erro = i ~= s(1,m);

fprintf(1, ['voting:' num2str(i) '; class:' num2str(s(1,m)) '; erro='
num2str(erro) '\n']);

load('intestino.mat')
legendas={'Ori','P','S','K','Ca','Fe','Ni','Cu','Zn','Br'}
%classe 1 (N Cancro)
intestino(1:13,11)=1;
%classe 2 (Cancro) - confirmar
intestino(14:26,11)=2;

```

Testes

```

% Fe (6), Ni(7), Cu(8) ;
data=intestino(:,[6,7,8,11]);
[Pe,confusao]=knn_classify(data,2,2)
% Pe = 0.6154

```

```

% confusao =
%      4      9
%      7      6

% P (2), Zn(9)
data=intestino(:,[2,9,11]);
[Pe,confusao]=knn_classify(data,2,2)
% Pe = 0.4231
% confusao =
%      7      6
%      5      8

```

Amostras de tecido do estômago

```

function [Pe, confusao]=knn_classify(data,k,nclasses)
% data: lines- samples; collumns- features (last col
%represents the class)
% k - number of neighbors
% nclasses - number of classes

[n,m]=size(data);
results=zeros(1,n);

for i=1:n
%leave-one out
    if i==n
        classifica=1:n-1;
    elseif i==1
        classifica=[2:n];
    else
        classifica=[1:i-1 i+1:n];
    end
    s=data(i,:);
    fprintf(1,[num2str(i) ' :']);
    results(i)=knn(s,data(classifica,:),k,nclasses);
end

Pe=sum(results)/n;
fprintf(1,['\nPe:' num2str( Pe ) '\n']);
%so p este conjunto de dados
confusao(1,1)=length( find( results(1:5) == 0 ) );
confusao(1,2)=length( find( results(1:5) == 1 ) );
confusao(2,1)=length( find( results(6:10) == 1 ) );
confusao(2,2)=length( find( results(6:10) == 0 ) );

function erro = knn(s,classifica,k,nclasses)
%s: sample to classify
%classifica: training set
%k: number of neighbors

[n,m]=size(classifica);
% euclidean norm
dist=sqrt(sum((ones(n,1)*s(1,1:m-1)-classifica(:,1:m-1)).^2,2));

[Y,i]=sort(dist);

%For each considered neighbor verify the class
votos=zeros(1,k);
for ii=1:k

```

```

    votos(ii)=classifica(i(ii),m); %column m - sample class
end

classes=zeros(1,nclasses);
for ii=1:nclasses
    temp = find(votos==ii);
    if ~isempty(temp)
        classes(ii)=length(temp);
    else
        classes(ii)=0;
    end
end

[Y,i] = max(classes);

erro = i ~= s(1,m);

fprintf(1, ['voting:' num2str(i) ' ; class:' num2str(s(1,m)) ' ; erro='
num2str(erro) '\n']);

load('estomago.mat')
estomago=data(:,[2, 3:2:20])%bom
estomago(6:10,:)=data(:,[2, 4:2:20])%mau
legendas={'Ori','P','S','K','Ca','Fe','Ni','Cu','Zn','Br'}
%classe 1 (N Cancro)
estomago(1:5,11)=1;
%classe 2 (Cancro) - confirmar
estomago(6:10,11)=2;

```

Teste

```

%P (2), Fe (6)
data=estomago(:,[2,6,11]);
[Pe,confusao]=knn_classify(data,2,2)
% Pe = 0.2000
% confusao =
%      3      2
%      0      5

```

Artigos

X-RAY SPECTROMETRY

X-Ray Spectrom. 2005; **34**: 406–410

Published online 10 May 2005 in Wiley InterScience (www.interscience.wiley.com). DOI: 10.1002/xrs.832



EDXRF and TXRF Application to cadmium toxicity in *Acer pseudoplatanus* L. cells: cytological features and cation interactions

M. L. Carvalho,^{1*} L. Ascensão,² T. Magalhães¹ and A. Casimiro²

¹ Departamento de Física, Centro de Física Atómica, Faculdade de Ciências, Universidade de Lisboa, Av. Prof. Gama Pinto 2, 1649-003 Lisbon, Portugal

² Departamento de Biologia Vegetal, Faculdade de Ciências, Universidade de Lisboa, C2, 1749-016 Lisbon, Portugal

Received 2 July 2004; Accepted 18 January 2005

Cadmium is one of the most toxic heavy metals that can be taken up by plants. Although cadmium toxicity in plants is well established, the mechanism of Cd actions at the cell level is not entirely known. The aim of this work was the investigation of Cd effects on cation contents (K, Ca, Mn, Fe, Cu, Zn) and cytological changes in sycamore cells (*Acer pseudoplatanus* L.). Sycamore cells were treated with 20 μM CdSO_4 , a sub-lethal concentration, for 7 days. Energy-dispersive x-ray fluorescence (EDXRF) spectrometry was applied to quantify cation concentrations in cells. Cd concentration was measured by total reflection x-ray fluorescence (TXRF) spectrometry. The quantification was performed with cells taken directly from the culture and also after being washed in an acidified medium. Light and scanning microscope observations showed several modifications of cadmium-treated cells, namely increased cell volume and vacuolation. Cells exposed to cadmium also showed variations in cation concentrations. An increase in Mn, Fe, Cu and Zn contents and a decrease in K content were observed in Cd-stressed cells. Fe was the most increased element, followed by Mn and Cu and a similar behaviour was observed for Ca and Zn. K was the only cation showing a decreased concentration under Cd stress. The high levels of Cd in cells exposed to Cd are in agreement with the amount of Cd accumulated within the cells. The results obtained allowed differentiation between adsorption of ions on the cell wall and uptake of ions into the intracellular compartments. Copyright © 2005 John Wiley & Sons, Ltd.

INTRODUCTION

Cadmium is a heavy metal that appears in the environment mainly due to industrial processes, phosphate fertilizers and car exhaust gases. Owing to the high pathogenic effects of Cd in humans, mainly renal tubular damage, pulmonary emphysema and bone demineralization, many workers have studied this element. Plants accumulate heavy metals when grown in soils with high metal concentrations. *In vitro*-grown plants and cell suspension cultures of carrot were treated with several Cd concentrations by Sanità di Toppi *et al.*¹ The elemental content of biological systems, especially at the cell level, is important in understanding the mechanisms of toxicity for non-essential elements in plants.

The major reason for Cd toxicity in plants is its interaction with several essential elements.¹ On intact plants, a reduction in Mn uptake and transport was observed in the presence of Cd.^{2,3} Changes in cation concentrations in isolated sycamore cells, under Cd stress, have been described by Carvalho *et al.*⁴ Cation interactions under Cu excess have also been studied in sycamore cells.⁵ It was observed that the excess of both

essential and non-essential heavy metals in the soil or culture medium can induce not only increased concentrations of those elements but also anomalous concentrations of the other elements.

Cadmium is one of the most toxic heavy metals that can be taken up by plants. Although heavy metal toxicity in plants is well established,^{6,7} Cd compartmentation and the mechanism of Cd actions at the cell level are not entirely known. Recent studies suggest the vacuole^{8–11} as the major compartment for Cd accumulation in plant cells. Cd transport across tonoplast vesicles from oat roots was studied by Salt and Wagner.¹² They concluded that Cd accumulates in the vacuole of plant cells, and suggested Cd^{2+} transport via $\text{Cd}^{2+}/\text{H}^+$ antiport activity across the tonoplast-enriched vesicles isolated from oat roots.

The effects of high doses of Cd on the root plants of *Phragmites australis* were studied by Ederli *et al.*,¹³ who from light and electron microscopy observations of root sections did not draw conclusions about any structural or ultra-structural modifications induced by Cd, although histochemical localization of Cd revealed accumulation of the metal in the parenchyma cells below the exodermis.

Studies on Cd transport to cell compartments are scarce. In this work, a first step in this direction was made by differentiation between ion adsorption to the cell wall and ion uptake into the intracellular compartments.

*Correspondence to: M. L. Carvalho, Departamento de Física, Centro de Física Atómica, Faculdade de Ciências, Universidade de Lisboa, Av. Prof. Gama Pinto 2, 1649-003 Lisbon, Portugal.
E-mail: luisa@cii.fc.ul.pt



EXPERIMENTAL

Cell growth conditions

Sycamore cells (*Acer pseudoplatanus* L.) were grown at 20 °C as a suspension in a liquid medium. A suspension liquid culture medium for cells is the optimum situation for studying effects at the cell level. Culture cells were maintained in exponential growth by subculture every 7 days. Bligny and Leguay¹⁴ defined the culture medium regarding the concentrations of macroelements and microelements. Control cells were grown without Cd, whereas 20 µM cadmium sulfate was added to the medium of cells subjected to Cd stress for 7 days.

Sample preparation

Cells harvested from the culture medium on the seventh day were filtered on a glass-fibre filter. Half of the total filtered cells were washed several times in an acidified medium (HCl, pH 5) to remove the ions adsorbed on the surface cell wall. They were dried at 60 °C and powdered in a quartz mortar. For energy-dispersive x-ray fluorescence (EDXRF) analysis, samples were prepared with the powder obtained, pressed into pellets 2.0 cm in diameter and without any chemical treatment. Each pellet was glued on a Mylar film on a sample holder and placed directly in the x-ray beam for elemental determination. A minimum of three replicates of each sample were made to reduce the analysis errors. All spectra were processed in order to quantify K, Ca, Mn, Fe, Cu and Zn in the cells.

Cd analysis was performed by total reflection x-ray fluorescence (TXRF) spectrometry. This process is destructive and requires sample digestion. Three samples of each cell powder were taken. Around 50 mg of powder were added to 5 ml of HNO₃. Yttrium was used as an internal standard at a concentration of 1 mg g⁻¹. Digestion took place in an oven 170 °C for 12 h. Three replicates were analyzed for each sample. Volumes of 10 µl of this solution were pipetted on quartz glass sample carriers and dried.

Fresh and calcofluor white-stained cells were observed on a Leitz microscope using Nomarski optics and on an epifluorescence microscope, respectively. For scanning electron microscopy (SEM), cells were fixed with glutaraldehyde (3%), critical point dried and sputter-coated with gold following standard methods. Diameters of randomly selected cells were measured to calculate cell volumes. Data from 50 measurements were analysed statistically.

Respiration measurements

Oxygen uptake was monitored polarographically with a Clark-type electrode system. The solubility of O₂ at 20 °C is 276 µM. Respiration (control and cadmium-treated cells) was measured at 20 °C, pH 6.5, using the culture medium.

Energy-dispersive x-ray fluorescence spectrometry

The spectrometer used for the analysis of all the samples consisted of an x-ray tube equipped with a changeable secondary target, normally of molybdenum.¹⁵ With this arrangement, it is possible to obtain a monochromatic source, which makes it possible to select the secondary target in order to obtain the best excitation conditions for a particular sample.

The x-ray tube, the secondary target and the sample are in a triaxial geometry. This allows a decrease in the background, using the advantage of the effect of polarization of the incident x-ray beam from the tube.

An Si(Li) detector with a 30 mm² active area and 8 µm beryllium window and 135 eV resolution at 5.9 keV was used. Quantitative calculations were made through the fundamental parameters method.^{16,17} The experimental parameters were obtained by calibration of the whole system by means of biological standard reference materials of known elemental concentrations, NBS SRM 1571 (orchard leaves) and CRM 279 (*Lilium lactuca*). The x-ray generator was operated at 50 kV and 20 mA and a typical acquisition time of 1000 s was used.

Total reflection x-ray fluorescence spectrometry

Cadmium quantification was carried out in a TXRF 8030C spectrometer (Atomika Instruments).¹⁸ All the remaining elements were studied by analysis of their K spectra. Cd L lines are overlapped by potassium K α and K β lines. The high concentration of potassium in the studied samples makes Cd quantification almost impossible, or at least with low accuracy, by this process. To guarantee higher precision, we preferred to study the Cd through its K spectrum. However, the EDXRF spectrometer used has an Mo secondary target, and the energy of its emission spectrum is lower than the K ionization level for Cd. Therefore, it was necessary to perform a supplementary measurement in which the sample was excited by continuous radiation of W. The system used (TXRF) is equipped with a 3 kW x-ray tube with an Mo/W alloy anode and a routable double-multilayer monochromator, which guides the excitation beam on to the totally reflecting sample carrier. This spectrometer has the advantage of allowing the best excitation energy conditions for a specific sample and element. The incident angle may be adjusted by tilting the sample holder unit. Stepper motors under software control do all the necessary movements. The emitted radiation was detected using an Si(Li) detector, 80 mm² active area and 150 eV resolution for Mn K α (5.9 keV). The acquisition time was 1000 s.

The accuracy was checked by analysis of a biological standard reference material, NBS SRM 1575 (pine needles) for both systems. The elemental concentrations obtained in the present work are in good agreement with the certified values. The standard deviations (SD) for almost all of the studied elements were <5% and have already been presented.⁴

RESULTS AND DISCUSSION

Scanning electron micrographs show that Cd-treated cells have a spherical shape and are larger than control cells [Fig. 1(A) and (B)]. On the other hand, in Nomarski microscopy observations [Fig. 1(C) and (D)], control cells exhibit a dense cytoplasm and several small vacuoles, whereas cells under Cd stress are swollen, nearly spherical, with only one large central vacuole. This observation is confirmed by measurements of cell diameter, 52 ± 6 and 67 ± 8 µm for control and Cd-treated cells, respectively, and cell volume, (74 ± 25) × 10³ and (159 ± 57) × 10³ µm³ for

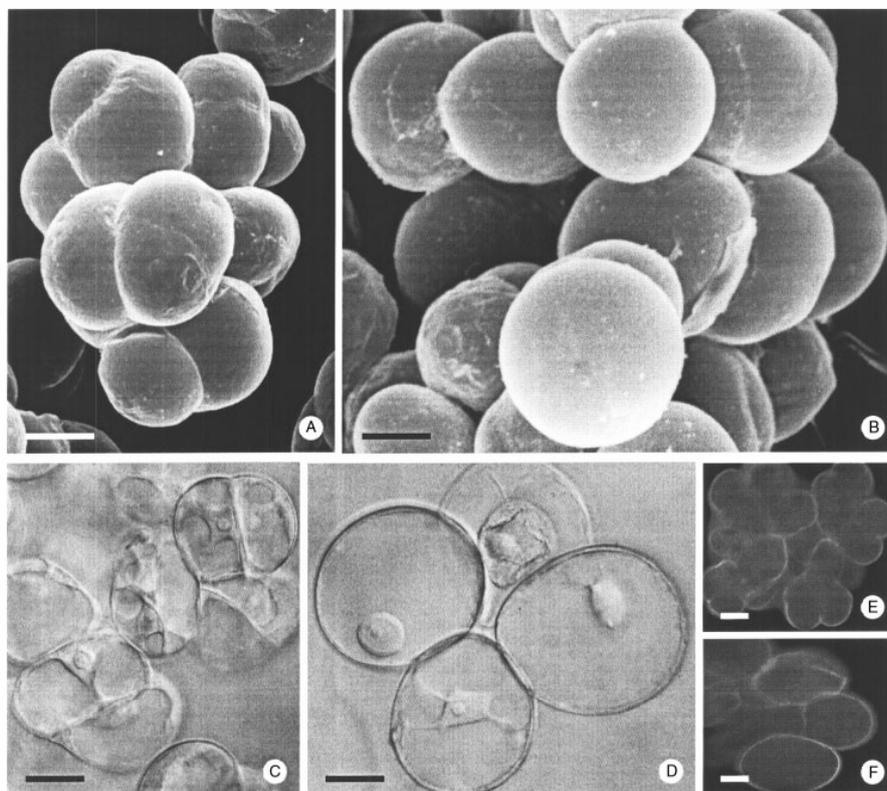


Figure 1. *Acer pseudoplatanus* control cells (A, C, E) and Cd-treated cells (B, D, F). (A, B) Obtained by scanning electron microscopy; (C, D) obtained by Nomarski microscopy; (E, F) fluorescence micrographs of calcofluor white-stained cells. Bars = 25 µm.

control and Cd-treated cells, respectively. A difference in cell volume was also evident when cells were treated with calcofluor [Fig. 1(E) and (F)]. The same blue fluorescence for both cells type is a demonstration that 20 µM Cd in culture cell medium did not deeply affect the cell metabolism. The whole cells are fluorescent with calcofluor, which means that they are in good physiological conditions. The volume of Cd-treated cells is more or less twice that of control cells. It seems that there is a correlation between the increase in cell volume and cell vacuole volume. Visviki and Rachlin¹⁹ previously obtained similar results with *Dunaliella salina* and *Dunaliella minuta* algae, after having been subjected to Cd action. According to Salt and co-workers,^{12,20} Cd might be transported to the vacuole, leading to a decrease in the water potential and hence an uptake of water to the cell, increasing the cell volume.

In Fig. 2, respiration rates of control and Cd-treated cells are presented as a function of the culture time; a progressive decrease in Cd cell respiration was observed. By the seventh day, a reduction of 57% of respiration rate was observed for Cd-treated cells. This decrease seems to be associated with Cd accumulation in the vacuole and the consequent

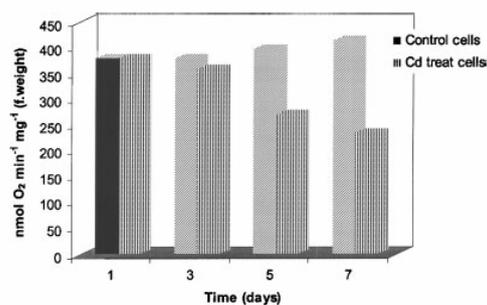


Figure 2. Respiration measurements on *Acer pseudoplatanus* control cells and Cd-treated cells.

increase in the cell volume. In order to clarify this better, one must remember that respiration rates were expressed per gram fresh weight. Considering the larger volume of Cd cells, the same cell weight does not correspond to the same cell number. Taking into account that it is not possible to count the number of cells, in the future this issue



Table 1. Elemental concentration ($\mu\text{g g}^{-1}$) in cells grown under control conditions and exposed to cadmium ($20 \mu\text{M}$)

Elements	Control cells	Cd-treated cells	Washed control cells	Washed cd-treated cells
K	42 400 \pm 2500	33 440 \pm 2300	38 200 \pm 2500	30 580 \pm 2300
Ca	900 \pm 80	1200 \pm 80	850 \pm 75	950 \pm 80
Mn	20 \pm 2	36 \pm 3	18 \pm 2	29 \pm 2
Fe	31 \pm 3	68 \pm 5	25 \pm 3	43 \pm 3
Cu	6.8 \pm 0.8	11 \pm 1	6.3 \pm 0.8	10 \pm 1
Zn	46 \pm 4	58 \pm 7	45 \pm 4	53 \pm 7
Cd		320 \pm 10		260 \pm 10

will be solved with protoplast preparations for respiration experiments expressed per number of protoplasts.

Table 1 presents the mean elemental concentrations and standard deviations ($\mu\text{g g}^{-1}$) for K, Ca, Mn, Fe, Cu, Zn and Cd in cells grown under control conditions and exposed to cadmium ($20 \mu\text{M}$). Values for washed and non-washed cells are displayed.

The observed values show a decrease in K concentration in cells grown with $20 \mu\text{M}$ Cd. All the other cations, Ca, Mn, Fe, Cu and Zn, show an increase in concentration in cells subjected to Cd effects. Figure 3(A) illustrates the normalized elemental concentrations in Cd-exposed cells relative to control cells for non-washed cells. Special attention may be paid to K, which is the only element with a decreased concentration in Cd-treated cells. Efflux of K is probably

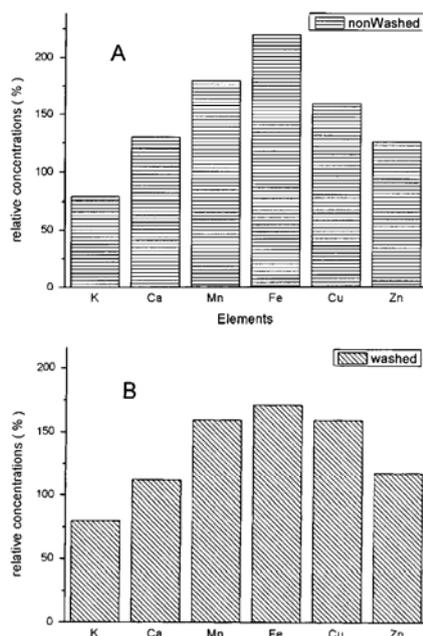


Figure 3. Normalized elemental concentrations in Cd-exposed cells relative to control cells for (A) non-washed cells and (B) washed cells.

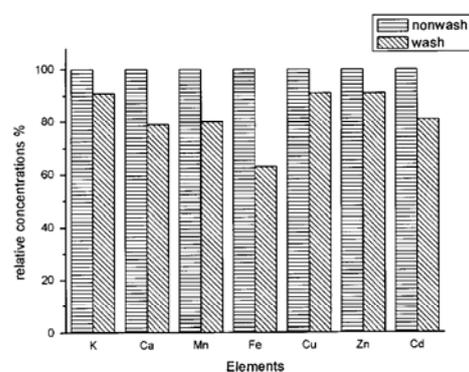


Figure 4. Normalized elemental concentrations in Cd-exposed cells for non-washed cells relative to washed cells.

important for maintenance of plasma membrane potential.

Our results also suggest that the vacuole must be the cell compartment for cation accumulation. In contrast, Fe is the most increased element. This higher concentration increase has also been observed for *Acer pseudoplatanus* L. cells grown under Cu excess.⁵ This increase is not yet completely understood.

Figure 3(B) shows the normalized elemental concentrations in Cd-exposed cells relative to control cells for washed cells containing the elements inside the cell. The washing process removed the elements adsorbed on the cell wall. Confirming the results presented in Fig. 3(A) for non-washed cells, a similar behaviour was observed in washed cells for all the elements studied. A decrease in K concentration and an increase in all the remaining cation concentrations were observed.

To demonstrate better the correlation between ion adsorption on the cell wall and ion uptake into the intracellular compartments, Fig. 4 displays the normalized elemental concentrations in Cd-exposed cells for non-washed relative to washed cells.

CONCLUSIONS

We can conclude that Cd stress induces several types of damage in *Acer pseudoplatanus* L. cells: a spherical shape and a significant swelling, with an increase in cell volume due

410 M. L. Carvalho *et al.*

to the increase in vacuole volume (the volume is twice that of the control cells). The cell metabolism due to Cd in the culture medium is not greatly affected. The addition of Cd to the culture medium affects the content not only of Cd but also of all the essential elements in the cell. A decrease in K concentration and an increase in the concentrations of Ca, Mn, Fe, Cu and Zn are observed. It was found that the excess of one toxic element may interfere with the normal concentrations of essential elements in biological organisms. The results obtained still suggest that the vacuole must be the cell compartment for cation accumulation, which is supported by microscopy observations. A decrease in respiration rate was observed for cells treated with Cd. The results obtained allowed differentiation between ion adsorption to the cell wall and ion uptake into the intracellular compartments.

Further research is needed to investigate the ion transport mechanism across the plasma membrane and tonoplast on cells under cadmium stress.

REFERENCES

1. Sanità di Toppi L, Lambardi M, Pazzagli L, Cappugi G, Durante M, Gabrielli R. *Plant Sci.* 1998; **137**: 119.
2. Jarvis SC, Jones LHP, Hopper MJ. *Plant Soil* 1976; **44**: 977.
3. Hernández LE, Lozano E, Gárate A, Carpena R. *Plant Sci.* 1998; **132**: 139.
4. Carvalho ML, Silveira L, Casimiro A. *Anal. Bioanal. Chem.* 2002; **373**: 827.
5. Pádua MMC. PhD Thesis, University of Lisbon, 1998; (unpublished).
6. Hall JL. *J. Exp. Bot.* 2002; **53**: 1.
7. Zhu YL, Pilon-Smits EAH, Tarun AS, Weber SU, Jouanin L, Terry N. *Plant Physiol.* 1999; **121**: 1169.
8. Krotz RM, Evangelou BP, Wagner GJ. *Plant Physiol.* 1989; **81**: 780.
9. Vögelli-Lange R, Wagner GJ. *Plant Physiol.* 1990; **92**: 1086.
10. Ernest WHO, Verkleij JAC, Schat. *Acta Bot. Neer.* 1992; **41**: 229.
11. Blaudez D, Botton BB, Chalot M. *Microbiology* 2000; **146**: 1109.
12. Salt DE, Wagner GJ. *J. Biol. Chem.* 1993; **268**: 12 297.
13. Ederli L, Reale L, Ferranti F, Pasqualini S. *Physiol. Plant.* 2004; **121**: 66.
14. Bligny R, Leguay JJ. *Methods Enzymol.* 1987; **148**: 3.
15. Carvalho ML, Pereira RA, Brito J. *Sci. Total Environ.* 2002; **292**: 247.
16. Rindby A. *X-Ray Spectrom.* 1989; **18**: 113.
17. Van Grieken R, Markowicz A. *Handbook of X-ray Spectrometry.* Marcel Dekker: New York, 1993.
18. Markert B, Reus U, Herpin U. *Sci. Total Environ.* 1994; **152**: 213.
19. Visviki I, Rachlin JW. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 1994; **26**: 154.
20. Salt DE, Smith RD, Raskin I. *Ann. Rev. Plant Physiol. Mol. Biol.* 1998; **49**: 643.



Spectrochimica Acta Part B 61 (2006) 1185–1193

SPECTROCHIMICA
ACTA
PART B

www.elsevier.com/locate/sab

Trace elements in human cancerous and healthy tissues from the same individual: A comparative study by TXRF and EDXRF[☆]

T. Magalhães^a, A. von Bohlen^b, M.L. Carvalho^{a,*}, M. Becker^b^a Centro de Física Atómica Universidade de Lisboa, Faculdade de Ciências, Av. Prof. Gama Pinto 2, 1649-003 Lisboa, Portugal^b Institut für Analytische Wissenschaften (ISAS), Bunsen-Kirchhoff-Str. 11, 44139 Dortmund, Germany

Received 9 December 2005; accepted 1 June 2006

Available online 1 August 2006

Abstract

In this work we studied the elemental distribution of P, S, Cl, K, Ca, Cr, Mn, Fe, Ni, Cu, Zn, Ni, Se, Br, Rb, Sr, I and Pb in normal and cancerous tissues of the same individual along several contiguous thin sections (up to 10 μm thick) of each tissue. Samples of healthy and carcinoma tissues, of colon, breast and uterus on a total of 7 citizens from German population, were analysed directly by total-reflection X-ray fluorescence (TXRF). The tissues were also analysed by normal energy-dispersive X-ray fluorescence (EDXRF).

An additional application was performed by studying, by the same processes, 10 carcinoma samples of 10 Portuguese citizens from: rectum, sigmoid, thyroid, kidney, larynx and lung, in order to find out a similar correlation pattern in the studied elements in carcinoma tissues.

As major conclusion of this work a similar pattern for almost all the analysed tissues were obtained for all the studied samples: increased or constant levels of P, S, K, Ca, Fe and Cu, and decreased levels of Zn and Br were found in carcinoma tissues, when compared with the corresponding healthy ones. Some exceptions were found in some samples for a few numbers of elements.

When comparing the results obtained for both techniques, the patterns were the same, however not always the results did coincide. This can be explained by considering that the analysed samples were not exactly the same and the differences can be explained by inhomogeneities.

© 2006 Elsevier B.V. All rights reserved.

Keywords: Carcinoma; Uterus carcinoma; Breast carcinoma; Colon carcinoma; Microtome section; Total-reflection X-ray fluorescence analysis; Trace element distribution

1. Introduction

The purpose of this work is to study the elemental distribution in normal and cancerous tissues of the same individual along several contiguous thin sections of each tissue in order to obtain a pattern for elemental distribution in healthy and carcinoma tissue both in the same tissue and for the different tissues. Furthermore we intend to study the homogeneity of the elemental content in the tissues.

Several thin sections (up to 10 μm thick) were obtained from carcinomas of colon, breast and uterus by means of a freezing microtome on the total of 7 citizens from German population, and

put on to a quartz glass carrier and analysed directly by total-reflection X-ray fluorescence (TXRF). Samples of healthy tissue and of carcinoma, belonging to the same individual were prepared on the same way and analysed. Samples were originally available as compact pieces. After taking at least five thin sections of each one, the remaining tissue was analysed by normal energy-dispersive X-ray fluorescence (EDXRF), in order to compare the elemental amount in the bulk of the homogenised tissue, and compare the elemental content obtained by the two techniques for each element for any analysed tissue. Also the potential of EDXRF with triaxial geometry when compared to TXRF is discussed. An additional application was performed by studying 10 carcinoma samples of 10 Portuguese citizens from: rectum, sigmoid, thyroid, kidney, larynx and lung, in order to find out a similar correlation pattern in the studied elements in carcinoma tissues.

The role of trace elements in the development and inhibition of cancer has been studied by several authors using many different techniques.

[☆] This paper was presented at the 11th International Conference on Total Reflection X-ray Fluorescence Spectrometry and Related Methods (TXRF-2005), held in Budapest, Hungary, 18–22 September 2005, and is published in the special issue of Spectrochimica Acta Part B, dedicated to that conference.

* Corresponding author.

E-mail address: luisa@cii.fc.ul.pt (M.L. Carvalho).

The biological function of some metal ions in combination with an investigation of element distribution patterns in malignant and in normal human tissues of cancer patients can give some indication of the effect of metal ions on carcinogenesis [1–4]. Metallic elements have important roles in various cell functions. Metallic ions and also metalloproteins such as heme-protein and superoxide dismutase (SOD), have a close relationship with cell regulatory dynamics and the energy metabolism of the cells. Under normal conditions, the metallic elements are in equilibrium with regard to the density distributions at the cell level in the tissues. Excessive accumulation or an imbalance of the elements may disturb the cell functions and may result in degeneration or cell death. This way, further investigation aims to give a contribution in cancer development prevention.

This study requires analytical multi-element techniques appropriate to the large number of samples and measurements. It may be said that XRF techniques have become established as representative multi-element techniques during the past few years. In this study both EDXRF and TXRF techniques were applied.

Total-reflection X-ray fluorescence (TXRF) has proved to be a versatile tool, especially for ultra-microanalysis of elements in biological samples [5–10]. It permits quantitative multi-elemental determinations and requires only an easy sample preparation. TXRF is the latest important developed method that differs from classical energy-dispersive X-ray fluorescence (EDXRF) by the chosen special excitation geometry [11,12].

2. Experimental

2.1. Sampling and TXRF sample preparation

The sampling of normal and neoplastic tissues from the same individual took place at the same time of surgery. For TXRF analysis, about 5 thin sections of each tissue were obtained. A microtome (Leica CM1100, Wetzlar) for cutting frozen tissue which incorporates separate temperature control for the refrigerator box was used. Temperatures ranging from $-25\text{ }^{\circ}\text{C}$ to $-15\text{ }^{\circ}\text{C}$, depending on the type of tissue, were applied for optimal cutting conditions. Non consecutive thin sections between 5 and $10\text{ }\mu\text{m}$ thick were used. Thinner sections are difficult to handle and thicker sections are not suitable for analytical reasons.

Immediately after the cutting process the sections were smoothed out with the aid of a section stretcher. So it is avoided that a material tension in cutting direction will cause the thin sections to roll up. The samples were left in the cooled microtome for 30 s before being removed. In the meantime, the sections were stabilized and transported to the refrigerator until further analysis.

2.2. Positioning the samples onto the sample carriers

The sections have to be positioned onto the quartz glass carriers. These sample carriers must not be hydrophobic by aid of an alcoholic silicone solution, as commonly used for TXRF analysis of liquids otherwise the sections could tear up and form droplets. It is also necessary that the sample carriers have to be thoroughly cleaned with nitric acid. They also have to be at moderate temperature so that the prepared section is neither

repelled (sample carrier too cold) nor attracted (sample carrier too warm). If the latter occurs, edges and waves appear which will contribute to the spectral background produced by scattering of the exciting beam during the TXRF measurements and leading to worst detection limits. Special care must be taken in order to position the prepared samples precisely in the centre of the sample carrier. It is also necessary to be sure that the whole sample and the internal standard are in the field of view of the detector (8 mm in diameter), otherwise the quantification via internal standard fails. After positioning the thin cuts the sample carrier is warmed up at room temperature. Thereby the thin section dried fast (about 30 s) and adheres evenly to the surface of the sample carrier.

In a first run the spectrum of the sample is recorded without any treatment in order to determine the best internal standard, which is prepared and used to spike the sample for each type of tissue.

For most of the tissues Ga was used as the internal standard, however, Se and Y were also used as internal standard. The samples were thoroughly dried for about 15 min. After recording the X-ray spectra, the sections were dried again in an oven at $85\text{ }^{\circ}\text{C}$ for 1 h. This final drying is highly important in order to determine the correct total dry mass of the section. The weighing of the quartz glass carrier with and without the sample (after scraping it off with a scalpel) for each sample, allows the concentration of the internal standard, which will be later used to calculate the concentration of every element present in each sample. The typical masses of the samples are around $100\text{ }\mu\text{g}$ (precision of the balance is $0.1\text{ }\mu\text{g}$).

2.3. EDXRF sample preparation

Samples were lyophilised for 48 h at $-60\text{ }^{\circ}\text{C}$ and low pressure, approximately 10^{-1} atm . This time was optimised for total removal of the water. The low temperature of lyophilization is indispensable to avoid loss of volatile elements like arsenic and

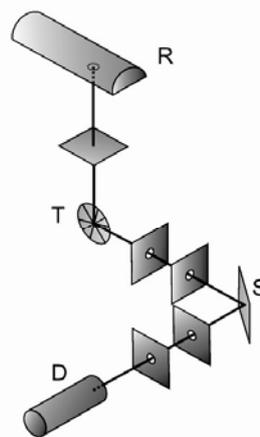


Fig. 1. Diagram showing the EDXRF triaxial geometry (R=X-ray tube, T=secondary target, S=sample, D=detector; angles between the incident and the emitted beams are 90° both for the secondary target and for the sample).

Table 1
Comparison of elemental concentrations ($\mu\text{g g}^{-1}$) in orchard leaves, NBS standard reference material 1571, measured in this work by EDXRF (mean values \pm standard deviation) and the certified values

	K	Ca	Fe	Mn	Cu	Zn	As	Br	Rb	Pb
Present work	15,300 \pm 900	21,500 \pm 1000	310 \pm 20	95 \pm 5	13 \pm 1	26 \pm 2	13 \pm 2	10.6 \pm 0.8	12.5 \pm 0.8	42 \pm 2
Certified value	14,700 \pm 300	20,900 \pm 300	300 \pm 20	91 \pm 4	12 \pm 1	25 \pm 3	14 \pm 2	10*	12 \pm 1	45 \pm 3

* Non-certified value.

mercury. Prior to analysis each sample was powdered in polyester containers in a mill and the obtained powdered samples were stored under controlled humidity conditions. The samples of this study were difficult to grind and it was necessary to use a freezer mill cooled by means of liquid nitrogen. For analysis, the samples were pressed into pellets of 2.0 cm in diameter without any further chemical treatment or additive. Each pellet was glued on a Mylar film, mounted on a sample holder and placed on the X-ray beam for the element determination. At least three replicates of each sample were made to determine the sampling error, provided that enough material was available.

During the grinding sample preparation special care has been paid to contamination, as well as during the whole procedure. For sample preparation, all the used materials are made of polyester, to avoid any contact with metals.

2.4. Experimental setup

2.4.1. TXRF device

The TXRF-spectrometer "Extra II" used for analysis is equipped with a Mo X-ray tube and a low-pass reflection module (Seifert and Co., Ahrensburg), and combined with a Si (Li) detector computer-controlled analyzer, Link System QX-2000 (Oxford Instruments).

The operating conditions for the Mo X-ray tube were adjusted to 50 kV and 20 mA, and the acquisition time for all spectra was set to 100 s. Sixty elements with atomic numbers from 15 to 40 and 57 to 92 can in general be detected, up to 25 of them simultaneously. The quantification procedure for TXRF is easily obtained.

Thin films, layers or sections with a thickness up to 7 μm can be calibrated easily. To avoid the condition of reproducible thickness (not necessary to control exactly the sample thickness), a standard solution with a suitable internal standard element i is added to the sections. The calibration function is:

$$c_j = \frac{S_i N_j}{S_j N_i} c_i$$

It only contains the net intensities N_j related to N_i and sensitivity values S_j related to S_i of the analyte and the internal standard element and its mass fraction c_i . The S -values have to be determined once by means of standard samples.

The different sensitivity values S_j were determined by aqueous standard solutions spiked with different multi-element standards of known concentrations c_j (about 1 $\mu\text{g/ml}$) [7].

2.4.2. EDXRF device

The spectrometer used in this work for EDXRF analysis consists of a commercial X-ray tube (PW 1140; 100 kV, 80 mA) equipped with a changeable secondary target, in molybdenum [11,12]. With this arrangement it is possible to obtain practically a monochromatic source, with $K\alpha$ and $K\beta$ lines of Mo, energies 17.44 keV and 19.60 keV respectively.

The X-ray tube, the secondary target and the sample are in a triaxial geometry with 90° angles, Fig. 1. With this arrangement we decrease the background, taking the advantage of the effect of polarisation of the incident X-ray beam from the tube. Both the X-ray beam emitted by the secondary target and the sample

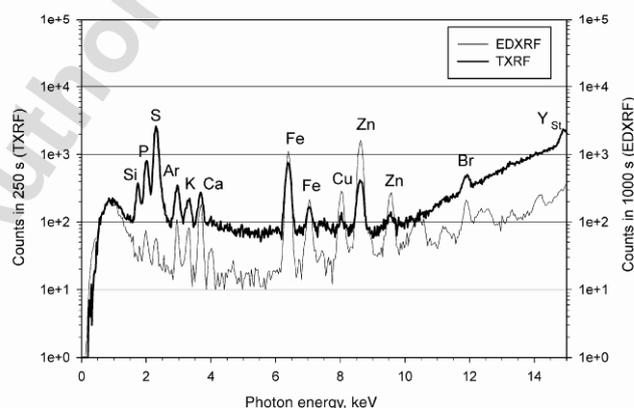


Fig. 2. Comparison of two spectra of the same rectum sample obtained by TXRF and EDXRF.

1188

T. Magalhães et al. / Spectrochimica Acta Part B 61 (2006) 1185–1193

Table 2

Comparison of elemental concentration ($\mu\text{g g}^{-1}$) in the IAEA's freeze dried animal blood (A-13), measured in this work (\pm standard deviation) and the certified values with the corresponding range

	K	Ca	Fe	Cu	Zn	Se	Br	Rb	Pb
Present work	2300 \pm 200	320 \pm 20	2500 \pm 200	4.8 \pm 0.7	14 \pm 1	\leq 2	22 \pm 2	1.9 \pm 0.3	\leq 2
Certified value	2500 [2100–2800]	286 [226–332]	2400 [2200–2500]	4.3 [3.7–4.8]	13 [12–14]	0.24 [0.15–0.31]	22 [19–24]	2.3 [1.7–3.1]	0.18 [0.15–0.29]

are collimated through two silver apertures, in order to reduce the scattered radiation and improve the detection limits.

The characteristic radiation emitted by the elements present in the sample was detected by a Si (Li) detector, with a 30 mm² active area and 8 μm beryllium window. The energy resolution is 135 eV at 5.9 keV and the acquisition system is a Nucleus PCA card. The quantitative evaluation is made by the fundamental parameters methods [13,14]. The sample mass is obtained through the information in the coherent and incoherent scattered radiation with a normalising condition which means that all concentrations within a sample should add up to unity, i.e.

$$\sum_i C_i = 1$$

The interference of the lines Pb and As was checked with a standard reference material, orchard leaves, NBS standard reference material 1571 and the obtained values are presented in Table 1. In spite of the good agreement obtained for this

standard, when As and Pb are very close to the detection limit, the error of the fitting process is relatively high and we disregard both elements. This was checked with the reference materials with both elements in concentrations below 1 $\mu\text{g g}^{-1}$. Similar detection limits were found for the analysed tissues and are in agreement with literature [7].

The X-ray generator was operated at 50 kV and 20 mA and a typical acquisition time of 1000 s was used. A collimator of silver was placed in front of the detector in order to restrict the effective area of the detector by excluding regions close to the edges. In Fig. 2 a spectrum of a sample obtained with this system is presented. The detection limits (DL) obtained by EDXRF, were calculated according to:

$$DL = \frac{3C_i\sqrt{N_b}}{N_p}$$

Where: C_i is the concentration of the element i ; N_b is the counting rate for the background and N_p is the counting rate for the corresponding peak.

Table 3

Comparison of elemental concentrations dry weight ($\mu\text{g g}^{-1}$) for cancerous tissues from Portuguese citizens, obtained by TXRF and EDXRF

Tissues	Cancerous Portuguese samples							
	Elements							
	P	S	K	Ca	Fe	Cu	Zn	Sr
Sigmoid								
TXRF	4460 \pm 600	3890 \pm 710	53 \pm 14	860 \pm 180	125 \pm 13	4 \pm 1	104 \pm 5	9 \pm 1
EDXRF		3590 \pm 540	51 \pm 13	725 \pm 40	111 \pm 4	9 \pm 3	77 \pm 4	8 \pm 1
Rectum								
TXRF	3070 \pm 310	2260 \pm 300	81 \pm 6	181 \pm 22	40 \pm 2	3 \pm 1	29 \pm 4	3 \pm 1
EDXRF		2550 \pm 800	74 \pm 19	272 \pm 12	90 \pm 10	5 \pm 2	64 \pm 1	4 \pm 1
Rectum								
TXRF	1000 \pm 200	1380 \pm 390	98 \pm 20	570 \pm 700	33 \pm 10	1.0 \pm 0.5	19 \pm 7	2 \pm 1
EDXRF		1720 \pm 100	194 \pm 27	578 \pm 57	88 \pm 9	4 \pm 2	71 \pm 9	3 \pm 1
Kidney								
TXRF	1500 \pm 740	1880 \pm 700	196 \pm 100	158 \pm 95	1550 \pm 570	2.0 \pm 0.5	18 \pm 9	
EDXRF		1160 \pm 120	183 \pm 20	568 \pm 60	635 \pm 70	3 \pm 1	23 \pm 5	
Kidney								
TXRF	1490 \pm 210	2100 \pm 420	75 \pm 16	169 \pm 36	1210 \pm 350	2.0 \pm 0.5	30 \pm 8	2.0 \pm 0.5
EDXRF		1460 \pm 20	78 \pm 1	246 \pm 70	635 \pm 40	4 \pm 2	38 \pm 1	4.0 \pm 0.5
Lung								
TXRF	2970 \pm 810	3030 \pm 1080	64 \pm 13	660 \pm 270	316 \pm 140	2 \pm 1	21 \pm 7	2 \pm 1
EDXRF		2920 \pm 540	117 \pm 25	836 \pm 50	416 \pm 83	4 \pm 2	48 \pm 2	4 \pm 1
Larynx								
TXRF	3480 \pm 60	2440 \pm 85	213 \pm 24	300 \pm 30	71 \pm 4	2.0 \pm 0.5	29 \pm 7	
EDXRF		2290 \pm 110	406 \pm 22	1120 \pm 57	158 \pm 16	6 \pm 3	58 \pm 7	
Thyroid								
TXRF	1590 \pm 40	2160 \pm 220	273 \pm 31	175 \pm 16	33 \pm 4	2.0 \pm 0.5	18 \pm 2	
EDXRF		2490 \pm 740	910 \pm 250	420 \pm 100	122 \pm 16	5 \pm 3	71 \pm 5	

Table 4
Comparison of elemental concentrations dry weight ($\mu\text{g g}^{-1}$) for cancerous tissues from German individuals, obtained by TXRF and EDXRF

Tissues	Cancerous German samples										
	Elements										
	P	S	K	Ca	Fe	Ni	Cu	Zn	Br	Sr	I
Cólon											
4130											
TXRF	1715±540	2830±845	1625±447	500±100	44±8	3.0±0.5	6±1	35±9			
EDXRF			1645±165	695±70	93±9		20±3	91±9	7±1	4±1	
Cólon											
3422											
TXRF	7730±2350	10,470±3260	1072±253	2620±630	106±40	17±15	34±11	103±26		9±2	
EDXRF			928±93	1340±130	77±8		42±6	83±8	4.0±0.5	7±1	
Cólon											
4131											
TXRF	1850±690	3385±1230	579±200	510±190	48±16	3±1	8±3	33±13	3±2		175±72
EDXRF			525±50	565±56	108±11		20±3	71±7	6±1	6±1	
Breast											
TXRF		3240±1720	165±80	1270±620	98±63	3±2	14±5	39±21	5±3		
EDXRF			360±36	1530±150	147±15		27±4	64±6	9±1	8±1	
Uterus											
TXRF	1680±150	3040±400	910±130	330±59	53±6	3±1	3±2	34±6	2.0±0.5		
EDXRF			1200±120	356±36	81±8		9±1	79±8	7±1	3.0±0.5	

The accuracy was checked by analysis of reference materials, prepared in pellets following the used sample preparation method. The elemental concentrations obtained for one standard reference material, IAEA freeze dried animal blood (A-13), are displayed in Table 2. The results obtained in the present work are in very good agreement with the certified values. The standard deviation was obtained considering the error resulting from the fitting process and the differences in concentration values for three pellets analysed repeatedly five times. The reproducibility of both techniques has been checked previously and during measurements and was found to be in the order of 5% [7,11].

3. Results and discussion

In Fig. 2 we present two superposed spectra of the same rectum tissue obtained by TXRF and EDXRF respectively. From this figure we realize that TXRF technique is much more sensitive for light elements, while EDXRF has advantages for heavier elements e.g. Cu, Zn, Se, Br, Rb and Sr. The acquisition time is longer in EDXRF than in TXRF, in spite of that the background is better for EDXRF. This can be explained considering that triaxial geometry is used producing polarized radiation, together with the small solid angle of the detector avoiding charge collection by the

Table 5
Comparison of elemental concentrations dry weight ($\mu\text{g g}^{-1}$) for healthy tissues from the same German individuals presented in Table 4, obtained by TXRF and EDXRF

Tissues	Healthy German samples											
	Elements											
	P	S	K	Ca	Fe	Ni	Cu	Zn	Br	Sr	Rb	I
Cólon												
4130												
TXRF	1890±480	5110±850	1830±440	465±47	109±7	5±2	9±2	83±9			6±1	
EDXRF			1050±110	398±40	108±11		13±2	99±10	7±1	3.0±0.5		
Cólon												
3422												
TXRF	1520±590	2580±1150	210±90	1340±480	51±23	10±5	13±4	52±20		4±2		
EDXRF			260±26	820±80	70±7		28±4	100±10	8±1	6±1		
Cólon												
4131												
TXRF	1020±270	2370±620	454±155	469±110	150±45	2.0±0.5	5±2	33±10	3±1			660±30
EDXRF			439±44	607±60	260±26		12±2	81±8	9±1	5±1		
Breast												
TXRF		295±120	17±8	153±53	5±2	2±1	2±1	6±3	1.0±0.5			
EDXRF			112±12	970±97	32±3		35±5	31±3	7±1	6±1		
Uterus												
TXRF	2210±120	3775±280	571±50	1590±90	59±6	3.0±0.5	4±1	40±3	19±3			
EDXRF			685±69	1550±160	66±7		9±1	74±7	30±3	5±1		

1190

T. Magalhães et al. / Spectrochimica Acta Part B 61 (2006) 1185–1193

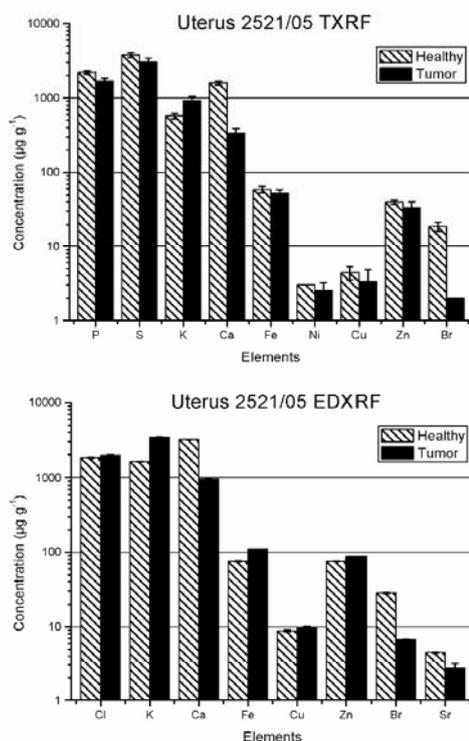


Fig. 3. Comparison of elemental concentrations dry weight ($\mu\text{g g}^{-1}$) obtained by TXRF and EDXRF for carcinoma and healthy uterus tissue.

borders, contributing to a decrease of the scattered radiation. On the other hand, the organic matrix, mostly represented by light elements (H, C, O, N, etc) contributes to a certain scatter of the primary beam for TXRF.

In a first run 10 Portuguese tissue samples with carcinoma (rectum, sigmoid, thyroid, kidney, larynx and lung) were analysed in order to compare both methods.

The results are presented in Table 3. Differences were observed between the results obtained by both techniques. The standard deviation is high because of the inhomogeneity of the samples, which means that any microtome slice and sub-sample was different from each other. Furthermore, the analysed tissue by the two techniques was not exactly the same, but it belonged to the same individual.

Iron is the element with the highest scatter, followed by Zn, Ca and K. This can be explained taking into account that the amount of blood in each piece was different and differences in Fe, Zn and Cu could be observed. Concerning K and Ca, the differences in concentrations obtained by the two techniques must be due to the different amount of fat tissue observed during sample preparation. Moreover we have to consider that in the cases where the differences were more significant, the sample

was not placed properly in the centre of the quartz glass carrier and/or the sample area was superior to the field of view of the detector. If the sample was not placed in the centre of the quartz glass carrier, neither the complete elements of the sample nor the complete added standard is recorded in the TXRF spectrum.

In a second run, a set of German samples, each one containing cancerous and healthy tissue belonging to the same individual were also analysed by both techniques. In many cases it was not possible to analyse the tissues by EDXRF, due to the small amount of available sample. In Tables 4 and 5 the results for the analysed samples by the two techniques are presented. The obtained results by both techniques are consistent with those obtained for Portuguese samples.

Moreover we can compare the elemental concentrations for healthy and diseased tissue. For colon samples the levels of Ca, Zn and Sr are similar for both healthy and cancerous tissue; Unlike, P, K, Cu and Ni show a tendency to be increased in tumor tissue; I and Br are the only elements in which concentrations are decreased in cancerous tissue (except for breast). The high amount of I in only one analysed sample could be explained by some recent incorporation of iodine-based contrast agent for X-ray radiography examination. These results are displayed in Fig.

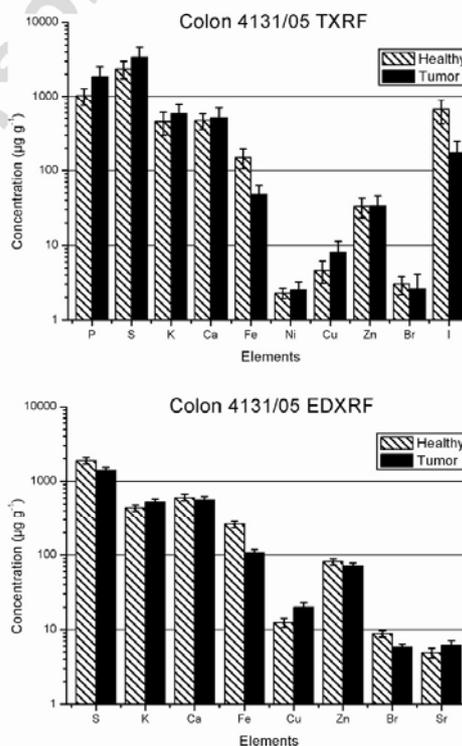


Fig. 4. Comparison of elemental concentrations dry weight ($\mu\text{g g}^{-1}$) obtained by TXRF and EDXRF for carcinoma and healthy colon tissue.

3, respectively for TXRF and EDXRF analysis. Once again we can observe the agreement in the conclusions obtained by the two techniques. Similar results were previously obtained for digestive tract tissues [1–3].

As a further example, results for uterus, carcinoma and healthy tissue, are displayed in Fig. 4, respectively for TXRF and EDXRF. A similar behaviour could be observed for increased levels of K in carcinoma samples. Further, Ca, Sr and Br are decreased in carcinoma samples and Fe, Cu and Zn are constant. This behaviour is clearly reflected in the results of both techniques.

Concerning breast, an increase of all the studied elements was observed including Br, which was the only element decreased in tumor samples for all the analysed tissues. This behaviour is consistent in the results obtained by the two techniques. The

increase of element concentration for Fe, Cu and Zn in breast carcinoma was previously observed by Geraki et al [4], using synchrotron radiation induced XRF (SRXRF). Breast tissue is completely dissimilar to the other studied tissues. It is only fat material, very difficult to cut and difficult to spike with standard. The sample preparation for EDXRF was also difficult, because the fat tissue even frozen with liquid nitrogen produces a kind of glue hard to manage in pellets.

An additional result of the combined procedure of microtome cuts of the sample analysed by TXRF provides an insight into the homogeneity of the sample material. In Fig. 5 the elemental concentrations for several slices of the same healthy and tumor breast tissue are shown. In Fig. 6 a similar representation of the results attained for colon tissues are

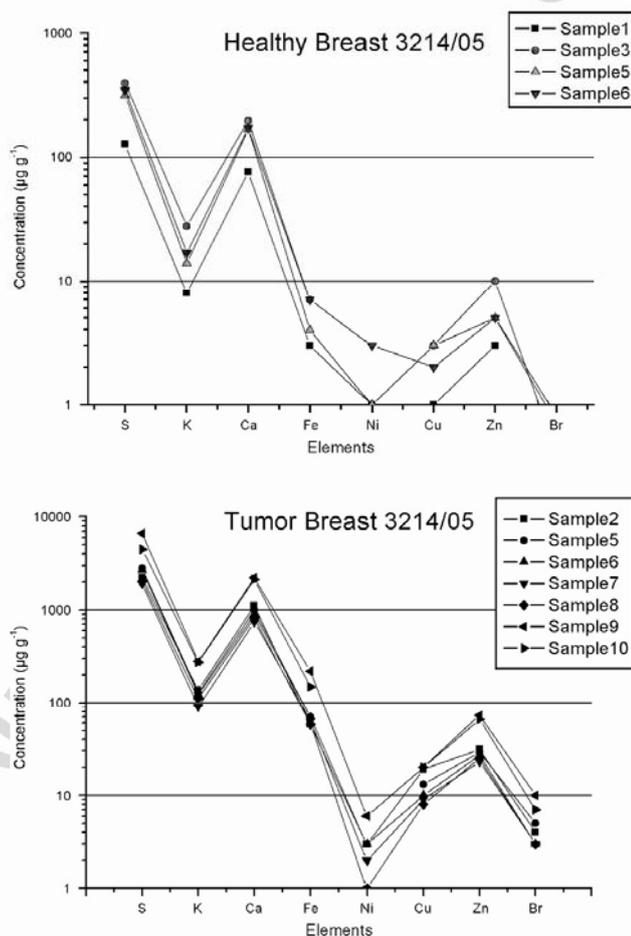


Fig. 5. Comparison of elemental concentrations dry weight ($\mu\text{g g}^{-1}$) obtained by TXRF for several slices of the same sample for healthy and tumor breast tissue of the same individual.

1192

T. Magalhães et al. / Spectrochimica Acta Part B 61 (2006) 1185–1193

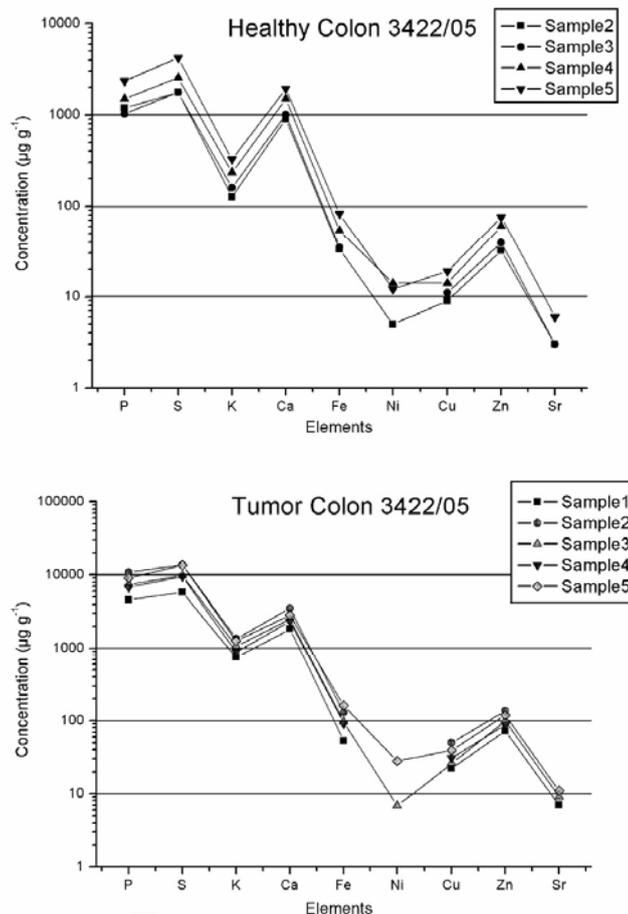


Fig. 6. Comparison of elemental concentrations dry weight ($\mu\text{g g}^{-1}$) obtained by TXRF for several slices of the same sample for tumor colon tissue of the same individual.

displayed. The first finding is the higher scattered values for the different slices in breast tissue, both for healthy and diseased ones. This observation is in good agreement with the difficulties in the sample preparation, already explained above. When we compare the results for healthy and cancerous tissues, a similar behaviour is observed for breast and colon analyses showing a smaller scatter in the results for healthy tissues. This is a common statement for all the other analysed tissues. Healthy tissues are more homogeneous than cancerous ones.

4. Conclusions

From this preliminary work we can conclude that both techniques are reliable for elemental analysis of human tissues.

We can consider them complementary in the sense that TXRF is more sensitive for light elements and EDXRF, under the chosen geometry, is better for detection of heavier elements.

Regarding the sample preparation, freeze cutting is easier than homogenising and pelleting these kind of samples. However the weighing procedure in TXRF is tremendously time consuming considering the high sensitivity of the microbalance ($0.1 \mu\text{g}$) and the high sensibility for humidity.

The required sample for analysis is another factor to be taken into account. Especially, in situations where big amount of sample is difficult or even impossible to be obtained. In such cases TXRF combined with freeze cutting requiring only a tiny quantity of material is the method of choice.

Moreover, EDXRF allows only the average concentration in the whole bulk sample, while TXRF is able to distinguish

inhomogeneities due to its micro-analytical character. Again, we can conclude that both techniques are complementary.

Concerning the obtained results for healthy and cancerous tissue from the same individual, from our results, a certain elemental pattern was achieved. Br is always decreased in diseased samples and Zn shows a tendency to decrease or to remain constant. For Fe and Cu a tendency for an increase in tumor samples could be observed, while the remaining observed elements did not show a special pattern. These conclusions are based on the results of both techniques.

The decrease of Zn in cancerous tissues is in agreement to low Zn levels found in other pathologies, e.g. arteriosclerosis, malignant tumors and cirrhotic liver [12]. The deficiency of this essential element seems to be associated to the inhibition of the functions of essential elements, alteration of metabolism and modification of protein function in the transport and maintenance of a certain number of essential elements. On the other side the increase of certain trace metals in cancerous tissues might be associated to mechanisms of toxicity whenever these elements are in excess. In association to enzymes and biological molecules, they can change its reactivity, they can originate complexes or precipitates with metals involved in the metabolism, and they can act as catalyze in chemical reactions originating decomposition of essential metabolites.

There is no biological explanation for the decrease of Br in some cancerous tissues, once the role of Br in human body is still not well known. This element might have an important role in the metabolism normally being disregarded.

References

- [1] D. von Czarnowski, E. Denkhaus, K. Lemke, Determination of trace element distribution in cancerous and normal human tissues by total reflection X-ray fluorescence analysis, *Spectrochim. Acta Part B* 52 (1997) 1047–1052.
- [2] L. Benninghoff, D. von Czarnowski, E. Denkhaus, K. Lemke, Analysis of human tissues by total reflection X-ray fluorescence. Application of chemometrics for diagnostic cancer recognition, *Spectrochim. Acta Part B* 52 (1997) 1039–1046.
- [3] L. Benninghoff, E. Denkhaus, in: Ph. Coltery (Ed.), *Metal Ions Biology and Medicine*, vol. 5, 1998, pp. 572–577.
- [4] K. Geraki, M.J. Farquharson, D.A. Bradley, Concentrations of Fe, Cu and Zn in breast tissue: a synchrotron XRF study, *Phys. Med. Biol.* 47 (2002) 2327–2339.
- [5] A. von Bohlen, R. Klockenkämper, G. Tolg, B. Wiecken, Qualitative survey analysis of thin layers of tissue samples — heavy metal traces in human lung tissue, *Int. Arch. Occup. Environ. Health* 59 (1987) 403–411.
- [6] A. von Bohlen, R. Klockenkämper, G. Tolg, B. Wiecken, Microtome sections of biomaterials for trace analyses by TXRF, *Fresenius Z. Anal. Chem.* 331 (1988) 454–458.
- [7] R. Klockenkämper, A. von Bohlen, B. Wiecken, Quantification in total reflection X-ray fluorescence analysis of microtome sections, *Spectrochim. Acta Part B* 44 (1989) 511–517.
- [8] A. von Bohlen, R. Klockenkämper, P. Rechmann, J. Tourmann, Ultramicro analysis of dental plaque films by total reflection X-ray fluorescence, *J. Trace Elem. Electrolytes Health Dis.* 8 (1994) 37–42.
- [9] L. Marcó, E. Greaves, J. Alvarado, Analysis of human blood serum and human brain samples by total reflection X-ray fluorescence spectrometry applying Compton peak standardization, *Spectrochim. Acta Part B* 54 (1999) 1469–1480.
- [10] A. Prange, H. Böttcher, W. Michaelis, Multielement determination of trace elements in whole blood and blood serum by TXRF, *Fresenius Z. Anal. Chem.* 335 (1989) 914–918.
- [11] M.L. Carvalho, J. Brito, M.A. Barreiros, Study of trace element concentrations in human tissues by EDXRF spectrometry, *X-Ray Spectrom.* 27 (1998) 198–204.
- [12] M.L. Carvalho, A.F. Marques, X-ray fluorescence spectrometry: applications in trace elements studies in human tissues from patients with cirrhosis, *X-Ray Spectrom.* 30 (2001) 397–402.
- [13] P.J. Custódio, M.L. Carvalho, F. Nunes, Direct analysis of human blood, mother and newborn baby, by energy dispersive X-ray fluorescence (EDXRF), *Trace Elem. Med. Biol.* 19 (2005) 151–158.
- [14] I. Marques, L. Carvalho, T. Ramos, P. Amorim, M. Öblad, EDXRF analysis of trace elements in *Nerium oleander* for pollution monitoring, *X-Ray Spectrom.* 22 (1993) 244–248.



Spectrochimica Acta Part B 62 (2007) 1004–1011

SPECTROCHIMICA
ACTA
PART B

www.elsevier.com/locate/sab

Viewpoint

Trace elements in human cancerous and healthy tissues: A comparative study
by EDXRF, TXRF, synchrotron radiation and PIXE[☆]M.L. Carvalho^{a,*}, T. Magalhães^a, M. Becker^b, A. von Bohlen^b^a Faculdade de Ciências, Centro de Física Atómica Universidade de Lisboa, Av. Prof. Gama Pinto 2, 1649-003 Lisboa, Portugal^b Institute for Analytical Sciences (ISAS), Bunsen-Kirchhoff-Str. 11, 44139 Dortmund, GermanyReceived 17 December 2006; accepted 27 March 2007
Available online 1 April 2007

Abstract

It is known that trace elements play an important role in a number of biological processes. These include the activation or inhibition of enzymatic reactions, competition between elements and metal proteins for binding positions and modifications in the permeability of cellular membranes. These elements may also influence carcinogenic processes, thus the knowledge of trace element concentrations in healthy and neoplastic tissues might help in diagnostic and in the etiology and development of cancer.

This work intends to give an overview of the achieved results in the analysis of several healthy and neoplastic human tissues, using multi-elemental techniques. The described measurements were carried out by means of synchrotron radiation induced X-ray emission (SRIXE), energy dispersive X-ray fluorescence (EDXRF), total-reflection X-ray fluorescence (TXRF), and proton-induced X-ray emission (PIXE). A brief description of each method is given and the analytical results discussed and compared. There is a good agreement between the results obtained with the several techniques for the same tissue.

However, the behavior of the elements is not always the same for the several analyzed tissues.

© 2007 Elsevier B.V. All rights reserved.

Keywords: Human cancerous tissues; Total-reflection X-ray fluorescence; Energy dispersive X-ray fluorescence; Proton-induced X-ray emission; Synchrotron radiation

Contents

1. Introduction	1005
2. Methods	1005
2.1. Energy dispersive X-ray fluorescence	1005
2.2. Total reflection X-ray fluorescence	1006
2.3. Particle induced X-ray emission	1006
2.4. Synchrotron radiation induced X-ray emission	1006
3. Samples	1006
3.1. Breast tissue	1006
3.2. Lung tissue	1007
3.3. Serum	1007
3.4. Intestinal tissue	1008
3.5. Prostate	1008

[☆] This paper was presented at the 9th Rio Symposium on Atomic Spectrometry, held in Barquisimeto, Venezuela, 5–10 November 2006, and is published in the special issue of Spectrochimica Acta Part B, dedicated to that conference.

* Corresponding author.

E-mail address: luisa@cii.fc.ul.pt (M.L. Carvalho).

3.6. Uterus	1009
4. Discussion	1009
References	1010

1. Introduction

This work is a carry-over of research on the quantification of several elements in healthy and cancerous tissues.

Trace elements play an important role in all biological systems. They take part in all metabolic processes, being components of different enzymes, catalyzing chemical interactions in living cells [1–3]. Trace elements deficiency or excess with respect to the human physiological level has been found in patients with certain diseases, including cancer. The study of the role of the essential trace elements has been emphasized in the search for the possible causes of cancer. The International Agency for Research on Cancer has proposed trace elements for their carcinogenesis [4,5]. Some of them or their compounds are now recognized as carcinogenic to humans. Those elements include: Be, Cr, Co, Ni, As, Cd, Sb, Pb, Hg, and Pt. The carcinogenesis of Mn, Fe, Cu, Zn, Se and Sr has not been proved yet, hence the importance of careful analysis of trace elements in the course of diagnosing diseases is necessary [6]. For medical purposes, blood and soft tissues are very often analyzed in order to diagnose a disease.

In this work, four X-ray fluorescence methods for direct analysis of biological samples were reviewed and the analytical results discussed and compared.

Synchrotron radiation induced X-ray emission (SRXRF) was used in a study intending to quantify the levels of K, Fe, Cu and Zn in healthy and cancerous breast samples. The statistical analysis revealed a tendency of higher concentrations in the cancerous tissues. The increase was most pronounced for K and reduced for Fe [7]. Another study for Fe, Cu and Zn quantification for the same type of tissue, indicated increased levels of these trace elements in the carcinogenic tissues [8]. This technique was also used in other studies, which aimed to investigate the differences in the density and the distribution of metallic elements in healthy and carcinogenic prostate tissues. Calcium and Zn, and other trace elements were studied in cancerous and normal tissues [9]. SRXRF was also used to prove the implication of trace elements in the carcinogenesis of the prostate. Higher concentration for the elements Mn, Fe, Co and Ni, was detected in the cancerous regions of the tissues in comparison with healthy ones [10]. This study connected the development of the prostate cancer with the amount of Fe, Cu and Zn.

Total reflection X-ray fluorescence (TXRF) was applied to determine the concentrations of trace elements in healthy and cancerous neoplasma human tissues, in the attempt to develop new means of cancer diagnosis and therapy monitoring. The statistical analysis of the analytical results, from TXRF determination of more than 20 trace elements distributions in malignant and normal tissues in human colon, was used to demonstrate the possibility of cancer diagnosis categorization

[11]. Another study tried to show different distributions of trace elements in the digestive system (stomach, colon and rectum) in healthy and carcinogenic tissues. The results obtained show the dependence of trace element concentrations on the stage of cancer development and the possibility of cancer cells differentiation, suggesting the modification in the metabolism of cancer cells and the role of the elements in the bio-synthesis or enzymatic processes, combining nourishing factors with the analytical results [12]. TXRF was used to determine Se, Zn, and Cu concentrations in intestinal cancer tissue and colorectal polyp. The relationship among the trace element levels in cancer tissue, the localization of neoplasm, and their development stage has been determined. Significantly higher concentrations of Se and Zn in the cancer tissue were observed but this statement was not confirmed for polyp. Furthermore it was observed that the level of Cu was lower in the malignant tumor than in a benign one [13].

Hernández-Caraballo et al. demonstrated the potential of the TXRF when used with artificial neural network approach in clinical chemistry [14]. TXRF was also employed in the determination of Fe, Cu, Zn and Se in samples of serum of healthy individuals and cancer patients. The results indicated that the ratio Zn/Cu and the concentration of Cu can be useful instruments of the diagnosis of cancer [15].

In a recent publication Greaves et al. [16] studied the uptake and decay of platinum in the blood serum of patients subjected to chemotherapies with different cytostatic drugs based on platinum compounds.

Samples of malignant and benign human lung tissue were analyzed by two complementary methods, proton-induced X-ray emission (PIXE) and TXRF, in a study where several trace elements showed an increased concentration in cancerous lung tissue of women in comparison to men. At the same time trace element concentrations of Sr and Pb were decreased in the women population [17].

A comparative study of energy dispersive X-ray fluorescence (EDXRF) and TXRF, in different types of human tissues (colon, breast and uterus), revealed the same tendency in accumulation of P, S, K, Ca, Fe and Cu in carcinogenic tissues and a reduction of Zn and Br [18].

2. Methods

2.1. Energy dispersive X-ray fluorescence

Energy dispersive X-ray fluorescence is a method used to determine the energy spectrum of X-ray radiation, emitted by the elements of a sample, following an ionization originated by an X-ray beam. It is mainly used in non-destructive chemical analysis, in a great diversity of non-portable and portable

experimental set-ups. The non-portable spectrometers can be used under triaxial geometry with a secondary target, allowing almost monochromatic radiation of selected energy, according to the element of the secondary target. The detector is normally a Si(Li) or Ge, cooled by liquid nitrogen, again, depending on the energy of the elements to be studied [19–21]. Portable spectrometers are based on radioactive sources or low-power X-ray tubes. To reduce the electronic noise, the detector is cooled by Peltier effect [22]. Due to its lower sensitivity, most of portable systems using the latter detectors are not currently used for trace elements determination in biological samples, rather they are mostly used in archaeology and cultural heritage characterization.

2.2. Total reflection X-ray fluorescence

Total reflection X-ray fluorescence is a variation of EDXRF with, however, one significant difference. In contrast to EDXRF, where the primary beam is conducted to the sample at an angle normally about 45°, in TXRF the primary beam strikes the sample at a glancing angle of less than 0.1°. Owing to this grazing incident the primary beam shaped like a strip of paper is totally reflected. Today, TXRF is primarily used for chemical micro and trace analyses. For this purpose, small quantities of mostly solutions or suspensions are placed on optical flats, e.g., quartz glass, serving as sample carrier. After evaporation of the solvent, the residue is excited to fluorescence under the fixed small glancing angle. The fluorescence radiation is recorded by a Si(Li) detector as an energy dispersive spectrum. It is the high reflectivity of the sample holder that nearly eliminates the spectral background of the support and lowers the absolute detection limits from 10^{-7} to 10^{-12} g [21]. Although this mode of operation does not permit the entirely non-destructive investigation of bulk material, it offers new challenging possibilities in ultra-micro and trace analyses. Besides its high detection power, simplified quantification is made possible by internal standardization [11]. This is due to the absence of matrix effects which cannot build up within the minute residues or thin layers of a sample [14,23,24].

2.3. Particle induced X-ray emission

Particle induced X-ray emission is a powerful elemental analytical technique used routinely by bio-physicists, biologists, archaeologists and art conservators to answer questions about the identification and quantization of trace elements. Bombardment with ions of sufficient energy (usually MeV protons) produced by an ion accelerator, will cause inner shell ionization of atoms in a specimen. Outer shell electrons drop down to replace inner shell vacancies. X-rays of a characteristic energy of the element are emitted. An energy dispersive detector is used to record and measure these X-rays and the intensities are then converted to elemental concentrations. Recent extensions of PIXE using tightly focused beams (down to 1 μm) give the additional capability of microscopic analysis. This technique, called micro-PIXE, can be used to determine the distribution of trace elements in a wide range of samples such as aerosols or fly

ash. Other applications include determining the elemental composition of liquid and crystalline proteins. In micro-PIXE the quantification of metal content in the protein molecules can reach the relative accuracy of 10% to 20% [25,26].

2.4. Synchrotron radiation induced X-ray emission

Synchrotron radiation is electromagnetic radiation, similar to cyclotron radiation, but generated by the acceleration of ultra-relativistic electrons through magnetic fields. This may be achieved artificially by storage rings in a synchrotron, or naturally by fast moving electrons flying through magnetic fields in space. Electrons are accelerated to high velocities in several stages to achieve a final energy that is typically in the GeV range. The change of direction is a form of acceleration and thus the electrons emit radiation at GeV frequencies. This makes synchrotron radiation sources the brightest known sources of X-rays. The planar acceleration geometry makes the radiation linearly polarized when observed in the orbital plane, and circularly polarized when observed at a small angle to that plane [8,27]. In addition the third important property of this radiation is the high collimation level. These characteristics are the main key for making the synchrotron radiation the most powerful tool for microanalysis, and mapping of elemental distribution in medical samples [27–29]. Synchrotron radiation has also been used with great success in TXRF techniques to study low elements analysis in biological applications [30].

3. Samples

3.1. Breast tissue

The study of elemental concentration in relation to tumor diseases, including breast tumor, has been an active area of research for several decades [32–36].

The involvement of some trace elements in the development of breast tumors has been suggested to be due to their role as co-factors in enzymatic processes. In particular, Cu and Zn belong to the group of antioxidant metals, assisting the function of antioxidant enzymes. Iron may be implicated through its role as a regulatory factor for angiogenesis. Distinct from these suggested mechanisms for uptake, the demand for increased blood supply for a growing tumor provides a basis for the accumulation of many other elements, including electrolytes such as K.

The study from M.E. Poletti et al. using SRPIXE [34] and the measurements reported by Rizk and Sky-Peck [35], for Ca and Mn, Geraki et al. [8] for Cu and Zn, and finally K.-H. Ng et al. [36] for K, are in agreement. The results confirm that the elements K, Ca, Cu and Zn are valuable indicators, to be considered as tracers for the identification of pathological disorders in breast tissues. The concentrations of K, Ca, Cu and Zn are significantly higher in neoplastic breast tissues compared to normal ones.

The study of K. Geraki et al. by synchrotron radiation [8] revealed increased concentrations of K, Fe and Zn in the tumors. The increase in concentration levels reaches the minimum value for Fe and it is more pronounced for K. Higher levels of K, Fe

Table 1
Comparison of elemental concentrations dry weight ($\mu\text{g g}^{-1}$) for healthy and tumor breast tissues

Breast tissue								
Elements	Ref. [18] (TXRF)		Ref. [18] (EDXRF)		Ref. [31] (SRDXE)		Ref. [8] (SRIXE)	
					Paired samples		Paired samples	
	Healthy	Tumor	Healthy	Tumor	Healthy	Tumor	Healthy	Tumor
K	17±8	165±80	112±12	360±36	438±321	1112±735		
Fe	5±2	98±63	32±3	147±15	14.1±12.9	21.7±17.8	11.58±10.92	18.84±15.59
Cu	2±1	14±5	35±5	27±4	0.33±0.32	0.96±0.60	0.29±0.29	0.89±0.56
Zn	6±3	39±21	31±3	64±6	2.9±2.0	6.9±5.8	2.68±1.82	6.53±5.46
Br	1±0.5	5±3	7±1	9±1				

and Zn are observed in healthy tissues obtained from areas close to tumors compared to normal tissues obtained from healthy women. This is revealed by the significantly different mean values of element concentrations (35% deviation from average for K, 33% for Fe and 23% for Zn).

In another study by EDXRF and X-ray diffraction, K. Geraki et al. [31] indicate increased levels of Fe, Cu and Zn in tumor tissues. The effect is more prominent for Cu and Zn while the contrast between healthy and diseased tissue is enhanced when comparing the independent specimens rather than the paired samples.

The concentrations of P, S, K, Ca, Fe, Ni, Se, and Rb were found to be statistically different in healthy and cancerous tissues in several tissue samples using TXRF [37,38]. An increase in concentrations of breast malignant neoplasm tissues was observed, as compared to breast benign neoplasm tissues.

A study using both EDXRF and TXRF by T. Magalhães et al. [18] indicates an increase of most of the trace elements (mainly Fe, Cu and Zn) including Br in breast carcinoma (see Table 1).

3.2. Lung tissue

Lung cancer alone accounts for approximately one third of all cancer deaths in men and more than 7% of all deaths in both

sexes. The incidence is increasing dramatically in women and lung cancer has passed breast carcinoma as a cause of cancer death in women.

Several factors are known to be responsible for promoting the development of lung cancer. Between risk factors one can find smoking, occupation, environment, chronic bronchitis and scars in the lung. Epidemiological studies have shown the importance of nutrition, in particular vitamins (A, C, E), and trace elements as active compounds. The modulation of immune functions by vitamins and the trace elements is very important and affects survival.

Using both PIXE and TXRF analysis, A. Kubala-Kukus et al. [17] observed enhancement of some trace element concentration in tissue with lung cancer: Ti (48%), Cr (20%), Mn (36%) and decrease for Sr (30%) and Pb (20%). Concentrations of elements in the cancer tissue of women and men are statistically equal. It was also found that linear correlation between elements in tissue from lung cancer exists, as observed between P and S, Ti and Cr, Ti and Se, Cr and Mn, Se and Hg, and Fe and Mn. The observed results are in good agreement with data by Piatnochka and Sikora [39].

The elements found by D.G. Bostwick et al. [40] to be the most important in distinguishing between malignant and normal lung tissues are Fe, Mn and Cu (see Table 2).

3.3. Serum

Trace analyses of body fluids such as blood, serum, plasma and urine are used as monitors for part or the entire organism. Essential elements such as Cr, Mn, Fe, Co, Ni, Cu, I, Zn or Se have important biological function and an impact on all living beings, as a depletion of these elements will lead to a poor

Table 2
Comparison of elemental concentrations dry weight ($\mu\text{g g}^{-1}$) for healthy and tumor lung tissues

Lung tissue				
Elements	Ref. [17] (PIXE, TXRF)		Ref. [18] (TXRF)	Ref. [18] (EDXRF)
	Healthy	Tumor	Tumor	Tumor
P	967±58.1	722±202	2970±810	
S	1326±67.9	1521±312	3030±1080	2920±540
K	253±16.8	414±303	64±13	117±25
Ca	355±42.5	886±248	660±270	836±50
Ti	4.89±1.32	2.59±1.79		
Cr	2.32±0.371	3.23±1.32		
Mn	2.55±0.352	3.61±1.20		
Fe	75.1±9.66	199±101	316±140	416±83
Cu	2.71±0.175	6.10±1.50	2±1	4±2
Zn	11.6±0.492	23.5±3.58	21±7	48±2
Se	0.691±0.048	0.871±0.198		
Sr	0.287±0.062	0.405±0.135	2±1	4±1
Hg	1.23±0.075	1.45±0.337		
Pb	1.093±0.169	0.522±0.117		

Table 3
Comparison of elemental concentrations dry weight ($\mu\text{g mL}^{-1}$) for healthy and tumor serum obtained by TXRF

Serum samples ($\mu\text{g mL}^{-1}$)				
Elements	Ref. [14]		Ref. [15]	
	Healthy	Tumor	Healthy	Tumor
Fe	1.50±0.18	1.12±0.17	1.37±0.23	1.14±0.18
Cu	1.13±0.06	1.55±0.15	1.08±0.05	1.51±0.15
Zn	1.32±0.12	1.03±0.06	1.21±0.08	1.06±0.05
Se	0.18±0.01	0.20±0.02	0.177±0.002	0.169±0.003

performance of the organism and an accumulation can lead to toxic symptoms or even poisoning [23].

TXRF results by L.M. Marco-Parra et al. [15] show that the determination of Cu concentration and the Zn/Cu ratio in serum samples could be a useful screening tool for cancer diagnosis. The same tendency of the Zn/Cu ratio was observed for adult and pediatric patients. However, Cu concentrations are more useful diagnostic in the case of adults than in the case of pediatric patients. For the elements Fe and Se different tendency was found in the adult and pediatric groups. Zn concentrations, although significantly different for cancer and normal individuals are less useful as diagnostic than Cu concentration or Zn/Cu ratios.

Further work from E.A. Hernández-Caraballo and L.M. Marcó-Parra [14] states that estimation (98%) and prediction (94%) rates, using concentrations of Fe, Cu, Zn and Se, are comparable to those obtained by other researchers [41–43], and may be considered adequate for preliminary and fast diagnosis (see Table 3).

3.4. Intestinal tissue

Different epidemiological studies concerning the colorectal cancer indicate a correlation with the nutrition system. Because of their richer food in fat, the incidence rate of colorectal cancer in the developed countries is 20 times bigger than in underdeveloped ones. At the prevention level, general recommendations invite people to consume less fat and much more fiber. A few studies treat the correlation between cancer and specific food [44], but none treat, the elemental contents of food and its relation to the disease.

In some studies, Ca has almost the same concentration in the tumor samples and the non-tumor samples, whereas in other studies the use of Ca in the prevention of colorectal cancer is suggested [45,46].

Using TXRF analysis, Robinson et al. [47] support that the low Se level in cancer patients is a result of the disease rather than the reason for the malignancy development. Bjerre et al. [48] pointed out that patients with gastrointestinal disease are

especially at risk of developing Se deficiency and that they should be monitored by repeated determinations of serum Se concentrations. L. Pothier et al. [49] provided evidence for the importance of the relationship between nutrition and Se levels in the case of patients with cancer. They showed that Se levels were not only lower in the case of stable cancer patients but were also substantially decreased by recent radiotherapy or sepsis, regional tumor spread, and increased tumor burden.

The higher concentrations of Cu and Zn in cancerous cells in comparison to normal ones were reported in the studies of A.N. Garg et al. [50], K.H. Ng et al. [51] and A. Zoboli [52]. Interactions between these elements show antagonistic relationships, although there are no conclusive data. Experiments by G. N. Schrauzer [53] with spontaneous tumors in mice demonstrated that subtoxic amounts of Zn prevented Se toxicity and neutralized the cancer-protecting effect of Se and accelerated tumor growth.

As a result of his study using TXRF, L. Benninghoff et al. [11] assumed that only the elements P, S, K, Ti, Se and Rb show a tendency to accumulation in neoplastic colon tissue, conclusions mostly asserted by their other TXRF study [12] in which P, K, Se and Rb show a significant tendency to accumulation in malignant colon tissues, while S shows a tendentious accumulation in colorectal carcinoma.

T. Magalhães et al. [18] studied colon tissues using EDXRF and TXRF and found that the levels of Ca, Zn and Sr were similar for both healthy and cancerous tissues; unlike P, K, Ni and Cu which show a tendency to increased in tumor tissue; Br and I were the only elements whose concentrations were decreased in the cancerous tissue (see Table 4).

3.5. Prostate

A. Ide-Ektessabi et al. [9] investigated the correlation between the concentration of Zn and Ca in the cells of prostate tissues. Several differences were observed in healthy and cancerous samples. In cancerous tissues the concentration of Zn was 89–221 $\mu\text{g g}^{-1}$ in the adenocarcinoma and 44–713 $\mu\text{g g}^{-1}$ in the stroma. In the normal tissues, Zn was detected at 158–474 $\mu\text{g g}^{-1}$

Table 4
Comparison of elemental concentrations dry weight ($\mu\text{g g}^{-1}$) for healthy and tumor intestinal tissues

Elements	Ref. [13] (TXRF)		Ref. [33] (TXRF)		Ref. [18] (TXRF)	Ref. [18] (EDXRF)	Ref. [18] (TXRF)	Ref. [18] (EDXRF)	Ref. [18] (TXRF)	
	Colon cancer	Colon polyp	Colon cancer	Colon polyp	Sigmoid Tumor	Sigmoid Tumor	Rectum Tumor	Rectum Tumor	Colon Healthy	Colon Tumor
Se	0.86±0.19	0.57±0.16								
Zn	14.8±0.82	9.84±1.62			104±5	77±4	19±7	71±9	33±10	33±13
Cu	3.87±0.27	3.94±0.63			4±1	9±3	1.0±0.5	4±2	5±2	8±3
Fe			46.1±4.27	43.2±3.05	125±13	111±4	33±10	88±9	150±45	48±16
Ca					860±180	725±40	570±700	578±57	469±110	510±190
K					53±14	51±13	98±20	194±27	454±155	579±200
S					3890±710	3590±540	1380±390	1720±100	2370±620	3385±1230
P					4460±600		1000±200		1020±270	1850±690
Br									3±1	3±1
I									660±30	175±72

Table 5
Comparison of elemental concentrations dry weight ($\mu\text{g g}^{-1}$) for healthy and tumor prostate tissues

Prostate ($\mu\text{g g}^{-1}$)					
Elements	Ref. [9] (SRIXE)		Ref. [10] (SRIXE)		
	Tumor	Healthy	Tumor (CA5)	Tumor (CA3)	Healthy
Zn	149.2	290.5	174±16	176±19	158±28
Ca	1.83×103	6.54×103	410±43	150±13	120±24
Cl			1830±190	1700±60	1800±190
K			3620±80	2560±470	1475±250
V			2.02±0.21	0.11±0.01	0.41±0.06
Cr			0.87±0.07	0.33±0.06	1.30±0.10
Mn			3.45±0.52	2.74±0.27	1.8±0.2
Fe			114.50±19.20	24.1±3.5	52±4
Co			5.4±0.6	4.7±0.4	3.8±0.3
Ni			5.1±0.8	6.3±1.2	4.5±0.4
Cu			12.1±1.5	15.3±2.2	12.7±2.5

CA5 refers to tissues classified as adenocarcinoma with Gleason score 5 and CA3 refers tissues classified as adenocarcinoma with Gleason score 3.

in the epithelial cells and 101–180 $\mu\text{g g}^{-1}$ in the stroma. According to this work, the correlations between Zn and Ca in the adenocarcinoma and in the stroma in the cancerous tissues are similar, whereas the same correlations in the epithelial cells and at the stroma in the normal tissues are different. In conclusion these findings are not conclusive.

W.M. Kwiątek et al. [10] report an increase of Mn, Ni and Co levels in cancerous tissues. A steady ratio of Zn/Cu was also observed which leads to an association of both elements on the advance of prostate cancer (see Table 5).

3.6. Uterus

Similar analytical results between EDXRF and TXRF were achieved by T. Magalhães et al. [18] in a study of uterus samples. An increase of K and a decrease of Ca, Sr, Br concentrations in carcinoma samples were observed and Fe, Cu and Zn showed constant concentrations in both healthy and carcinoma samples.

4. Discussion

The use of analytical techniques for medical physics applications is receiving an increasing amount of attention, both by analytical scientists as well as medical doctors.

X-ray fluorescence techniques have become established as representative multi-element techniques during the past few years.

Due to the fact that excessive accumulation or an imbalance of metallic elements may disturb the cell functions and may result in degeneration or cell death, fast analytical multi-element techniques, capable of dealing with large number of samples and measurements are required.

This paper intends to be a summary of the most used X-ray fluorescence techniques which are currently being applied in the field of medical physics, specifically in the field of oncology, which aim to give a contribution in cancer diagnostics, its development and prevention.

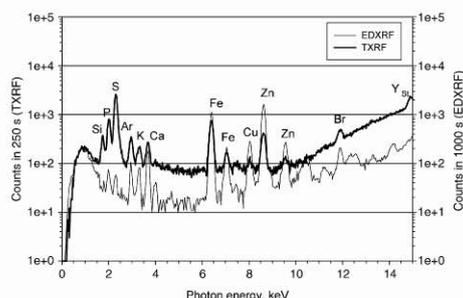


Fig. 1. Comparison of two spectra of the same rectum sample obtained by TXRF and EDXRF [18].

All the above-mentioned techniques of X-ray fluorescence show an agreement when used in comparative studies, which makes them complementary tools. For example Fig. 1 presents two superposed spectra of the same rectum tissue obtained by TXRF and EDXRF, respectively [18]. This figure shows that the TXRF technique is much more sensitive for light elements, while EDXRF has advantages for heavier elements e.g. Cu, Zn, Sr, Br, Rb and Sr. In this spectrum, the acquisition time is longer in EDXRF than in TXRF, and the background of the former technique is better in some regions, in contrast to what was expected. This can be explained considering that the used spectrometer for EDXRF consists of a triaxial geometry producing polarized radiation, which together with the small solid angle of the detector, contributes to a decrease of the scattered radiation. On the other hand, the organic matrix, mostly represented by light elements (H, C, O, N) contributes to a certain scatter of the primary beam for TXRF.

In another work lung samples were analyzed by TXRF and PIXE and the obtained results by the two methods were similar [17]. The dependence of the detection limit as a function of the atomic number in lung tissue samples during typical measurements by PIXE and TXRF methods is shown in Fig. 2. The PIXE technique is characterized by high background at X-ray energy region below 10 keV, which is mainly caused by

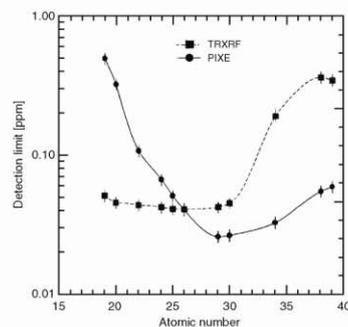


Fig. 2. Estimated minimum of detectable concentration for PIXE and TXRF methods for measured lung tissue as a function of atomic number [17].

Compton scattering of primary and secondary radiation by charging effects of the target by low energy photons. For higher X-ray energies the detection limit observed for TXRF is much better as a result of the higher cross section for K-shell photo ionization by the radiation from the used Mo X-ray tube.

From all these works it is obvious that trace elements play an important role on cancer disease.

Concerning breast cancer, the elements K, Fe, Cu, Zn, and Br show a significant increase in cancerous tissues when compared to healthy ones.

Regarding lung tissues, the elements which appear to be important are Fe, Cu, Zn and Se, because these are the ones that present enhanced concentration values in malignant tissues when compared with the healthy ones.

In intestinal samples, the elements that show increased concentrations in cancerous tissues are Si, P, K, Ni and Cu, whereas Br presents a reduction over healthy tissues.

In serum samples, the elements Zn and Cu show an important role in cancer diagnosis, because of their increased concentration in cancerous tissues.

In prostate tissues there is a tendency for elements Mn, Co, Ni, Cu and Zn to show an increased concentration in malignant tumor tissues.

There is little knowledge regarding uterus tissues, but it seems that K is an element that shows increased levels whereas Br presents lower concentrations in tumor over healthy tissues. Elements Fe, Cu and Zn present stable concentrations in both kinds of tissues.

A special remark can be made for Br, unlike the other elements its concentration decreases in cancerous samples with the exception for breast cancerous tissues.

This work highlights that some elements could be a good marker for risk of carcinogenesis processes [54], but in order to better understand the role of the elements and its changes, further examination with wider population, searching for the correlation between elemental concentrations in cancerous tissues and healthy ones for a bigger number of organs, is needed and should be conducted.

References

- [1] J.R. Prolaska, Functions of trace elements in brain metabolism, *Physiol. Rev.* 67 (1987) 858–901.
- [2] G.V. Iyengar, W.E. Kollmer, H.J.M. Brown, in: H.F. Ebel (Ed.), *The Elemental Composition of Human Tissues and Body Fluids*, Verlag Chemie, Weinheim, 1970.
- [3] J. Rose, *Trace Elements in Health*, Butterworth, London, 1983.
- [4] L.C. Costello, R.B. Franklin, Novel role of zinc in the regulation of prostate citrate metabolism and its implications in prostate cancer, *Prostate* 35 (1998) 285–296.
- [5] J.K. Mclaughlin, L.M. Schumann, Epidemiology of renal cell carcinoma, in: A. Lilienfeldt (Ed.), *Reviews in Cancer Epidemiology*, Alan R. Liss Inc., New York, 1983, pp. 170–209.
- [6] American Cancer Society: *Cancer Facts and Figures*, American Cancer Society, Atlanta, GA, 1993.
- [7] H.H. Sky-Peck, Trace metals and neoplasia, *Clin. Physiol. Biochem.* 4 (1986) 99–111.
- [8] K. Genaki, M.J. Farquharson, D.A. Bradley, Concentrations of Fe, Cu and Zn in breast tissue: a synchrotron XRF study, *Phys. Med. Biol.* 47 (13) (2002) 2327–2339.
- [9] A. Ide-Ektessabi, S. Fujisawa, K. Sugimura, Y. Kitamura, A. Gotoh, Quantitative analysis of zinc in prostate cancer tissues using synchrotron radiation microbeams, *X-Ray Spectrom.* 31 (2002) 7–11.
- [10] W.M. Kwiatek, A. Banas, M. Gajda, M. Galka, B. Pawlicki, G. Falkenberg, T. Cichocki, Cancerous tissues analyzed by SRXRF, *J. Alloys Compd.* 401 (2005) 173–177.
- [11] L. Benninghoff, D. von Czarnowski, E. Denkhau, K. Lemke, Analysis of human tissues by total reflection X-ray fluorescence. Application of chemometrics for diagnostic cancer recognition, *Spectrochim. Acta Part B* 52 (1997) 1039–1046.
- [12] L. Benninghoff, E. Denkhau, Trace element distribution in human tissues of the digestive tract for malignant-normal and tissue type classification, *Metal Ions Biol. Med.* 5 (1998) 572–577.
- [13] M. Kucharzewski, J. Braziewicz, U. Majewska, S. Gozdz, Selenium, copper, and zinc concentrations in intestinal cancer tissue and in colon and rectum polyps, *Biol. Trace Elem. Res.* 92 (2003).
- [14] E.A. Hernández-Carballo, L.M. Marcó-Parra, Direct analysis of blood serum by total reflection X-ray fluorescence spectrometry and application of an artificial neural network approach for cancer diagnosis, *Spectrochim. Acta Part B* 58 (2003) 2195–2201.
- [15] L.M. Marco-P, E. Jiménez, E.A. Hernández, C.A. Rojas, E.D. Greaves, Determination of Zn/Cu ratio and oligoelements in serum samples by total reflection X-ray fluorescence spectrometry for cancer diagnosis, *Spectrochim. Acta Part B* 56 (2001) 2195–2201.
- [16] E.D. Greaves, M. Angeli-Greaves, U. Jaehde, A. Drescher, A. von Bohlen, Rapid determination of platinum plasma concentrations of chemotherapy patients using total reflection X-ray fluorescence, *Spectrochim. Acta Part B* 61 (2006) 1194–1200.
- [17] A. Kubala-Kukus, J. Braziewicz, D. Banas, U. Majewska, S. Gózd, A. Urbaniak, Trace element load in cancer and normal lung tissue, *Nucl. Instrum. Methods Phys. Res., B Beam Interact. Mater. Atoms* 150 (1999) 193–199.
- [18] T. Magalhães, A. von Bohlen, M.L. Carvalho, M. Becker, Trace elements in human cancerous and healthy tissues from the same individual: a comparative study by TXRF and EDXRF, *Spectrochim. Acta Part B* 61 (2006) 1185–1193.
- [19] P. Stand-zeniaks, E. Selin, Background reduction of X-ray fluorescence spectra in a secondary target energy dispersive spectrometer, *Nucl. Instrum. Methods Phys. Res., B Beam Interact. Mater. Atoms* 165 (1979) 63–70.
- [20] M.L. Carvalho, A.F. Marques, X-Ray fluorescence spectrometry: applications on trace elements study in human tissues of patients with cirrhosis, *X-Ray Spectrom.* 30 (2001) 397–402.
- [21] P. Custódio, M.L. Carvalho, F. Nunes, Placenta and membrane EDXRF application: a comparative study, *Anal. Bional. Chem.* 378 (2003) 1101–1106.
- [22] Roberto Cesaro, Alfredo Castellano, Giovanni Buccolieri, Stefano Quarta, Maurizio Marabelli, Paola Santopadre, Marcella Leole, Antonio Brunetti, Portable equipment for energy dispersive X-ray fluorescence analysis of Giotto's frescoes in the Chapel of the Scrovegni, *Nucl. Instrum. Methods Phys. Res., B Beam Interact. Mater. Atoms* 213 (2004) 703–706.
- [23] R. Klockenkämper, *Total-Reflection X-ray Fluorescence Analysis*, Wiley & Sons, New York, 1997.
- [24] R. Klockenkämper, A. von Bohlen, B. Wicken, Quantification in total reflection X-ray fluorescence analysis of microtome sections, *Spectrochim. Acta Part B* 44 (1989) 511–517.
- [25] A.N. Garg, V. Singh, R.G. Weginwar, V.N. Sagdeo, *Biol. Trace Elem. Res.* 46 (1994) 185–202.
- [26] S.A.E. Johansson, J.L. Campbell, *PXRF: a Novel Technique for Elemental Analysis*, Wiley & Sons, New York, 1988.
- [27] P. Chevallier, I. Ricordel, G. Meyer, Trace element determination in hair by synchrotron X-ray fluorescence analysis: application to the hair of Napoleon I, *X-Ray Spectrom.* 35 (2006) 125–130.
- [28] A. Erko, F. Schäfers, A. Firsov, W.B. Peatman, W. Eberhardt, R. Signorato, The BESSY X-ray microfocus beamline project, *Spectrochim. Acta Part B* 59 (2004) 1543–1548.
- [29] A.F. Marques, J.P. Marques, C. Casaca, M.L. Carvalho, X-ray microprobe SRXRF application on human teeth of renal insufficiency patients, *Spectrochim. Acta Part B* 59 (2004) 1675–1680.

- [30] H. Yuying, W. Yingrong, Z. Limin, L. Guangcheng, H. Wei, Y. Lizhen, C. Jiabei, L. Jiangfu, Z. Tongcan, C. Enhua, Beijing synchrotron radiation total-reflection X-ray fluorescence analysis facility and its applications on trace element study of cells, *Spectrochim. Acta Part B* 56 (2001) 2057–2062.
- [31] K. Geraki, M.J. Farquharson, D.A. Bradley, X-ray fluorescence and energy dispersive X-ray diffraction for the quantification of elemental concentrations in breast tissue, *Phys. Med. Biol.* 49 (2004) 99–100.
- [32] U. Majewska, J. Braziewicz, D. Banaś, A. Kubala-Kukus, S. Goźdź, M. Pajek, J. Smok, A. Urbaniak, An elemental correlation study in cancerous breast tissue by total reflection X-ray fluorescence, *Biol. Trace Elem. Res.* 60 (1997) 91–100.
- [33] M. Kucharzewski, J. Braziewicz, U. Majewska, S. Goźdź, Iron concentrations in intestinal cancer tissue and in colon and rectum polyps, *Biol. Trace Elem. Res.* 95 (2003) 19–28.
- [34] M.E. Poletti, O.D. Gonçalves, C.A. Pérez, S.D. Magalhães, A preliminary study of the distribution of trace elements in healthy and neoplastic breast tissues with synchrotron radiation X-ray fluorescence, *Radiat. Phys. Chem.* 71 (2004) 975–976.
- [35] S.L. Rizk, H.H. Sky-Peck, Comparison between concentrations of trace elements in normal and neoplastic human breast tissue, *Cancer Res.* 44 (1984) 5390–5394.
- [36] K.-H. Ng, D.A. Bradley, L.M. Looi, Elevated trace element concentrations in malignant breast tissues, *Br. J. Radiol.* 70 (1997) 375–382.
- [37] U. Majewska, J. Braziewicz, D. Banaś, A. Kubala-Kukus, S. Goźdź, M. Pajek, M. Zadrozna, M. Jaskóla, T. Czyżewski, Some aspects of statistical distribution of trace element concentrations in biomedical samples, *Nucl. Instrum. Methods Phys. Res., B Beam Interact. Mater. Atoms* 150 (1999) 254–259.
- [38] A. Kubala-Kukus, E. Kutemoga, J. Braziewicz, M. Pajek, Log-stable concentration distributions of trace elements in biomedical samples, *Spectrochim. Acta Part B* 59 (2004) 1711–1716.
- [39] I.T. Piatnoelka, V.Z. Sikora, *Probl. Tuberk.* 7 (1991) 35.
- [40] D.G. Bostwick, E.E. Alexander, R. Singh, A. Shan, J. Qian, R.M. Santella, L.W. Oberley, T. Yan, W. Zhong, X. Jiang, T.D. Oberley, Antioxidant enzyme expression and reactive oxygen species damage in prostatic intraepithelial neoplasia and cancer, *Cancer* 89 (2000) 123–134.
- [41] Y. Lin, E. Zhu, P. Yang, The studies of artificial neural networks applied to preliminary cancer diagnosis of blood serum, *Xiamen Daxue Xuebao, Ziran Kexueban* 35 (1996) 769–773.
- [42] H. Yin, P.-Y. Yang, E.-Y. Zhu, X.-Ru Wang, B.-L. Huang, Application of artificial neural network in cancer diagnosis based on the elemental concentration in hair, *Jiushanji Yu Yingyong Huaxue* 16 (1999) 115–120.
- [43] Z. Zhang, H. Zhuo, S. Liu, P.B. Harrington, Classification of cancer patients based on the elemental contents of serum using bidirectional associative memory networks, *Anal. Chim. Acta* 436 (2001) 281–291.
- [44] C.P. Caygill, A. Chalett, M.J. Hill, *Br. J. Cancer* 74 (1996) 159–164.
- [45] J.A. Baron, M. Beach, J.S. Mandel, R.U. van Stolk, R.W. Haile, R.S. Sandler, R. Rothstein, R.W. Summers, D.C. Snover, G.J. Beck, J.H. Bond, E.R. Greenberg, *N. Engl. J. Med.* 340 (2) (1999) 101–107.
- [46] J. Kearney, E. Giovannucci, E.B. Rimm, A. Ascherio, M.J. Stampfer, G.A. Colditz, A. Wing, E. Kampman, W.C. Willett, Calcium, vitamin D, and dairy foods and the occurrence of colon cancer in men, *Am. J. Epidemiol.* 143 (1996) 907–917.
- [47] M.F. Robinson, P.J. Godfrey, C.D. Thomson, et al., Blood selenium and glutathione peroxidase activity in normal subjects and surgical patients with and without cancer in New Zealand, *Am. J. Clin. Nutr.* 32 (1979) 1477–1485.
- [48] B. Bjerre, H. von Schenck, B. Sörbo, Hyposelenaemia: patients with gastrointestinal disease are at risk, *J. Intern. Med.* 225 (1989) 85–88.
- [49] L. Pothier, W.W. Lane, A. Bhargava, et al., Plasma selenium levels in patients with advanced upper gastrointestinal cancer, *Cancer* 60 (1987) 2251–2260.
- [50] A.N. Garg, V. Singh, R.G. Weginwar, An elemental correlation study in cancerous and normal breast tissue with successive clinical stages by neutron activation analysis, *Biol. Trace Elem. Res.* 46 (1994) 185–201.
- [51] K.H. Ng, D.A. Bradley, L.M. Looi, et al., Differentiation of elemental composition of normal and malignant breast tissue by instrumental neutron activation analysis, *Appl. Radiat. Isotopes* 44 (1993) 511–516.
- [52] A. Zoboli, A case-control study on selenium, zinc and copper in plasma and hair of subjects affected by breast and lung cancer, *Biol. Trace Elem. Res.* 51 (1996) 23–30.
- [53] G.N. Schrauzer, Anticarcinogenesis effects of selenium, *Cell. Mol. Life Sci.* 57 (2000) 1864–1873.
- [54] H.H. Sky-Peck, Trace metals and neoplasia, *Clin. Physiol. Biochem.* 4 (1986) 99–111.

Br, Zn, Cu and Fe role in breast cancer: TXRF applications

Tânia Magalhães¹, M. Becker², M. L. Carvalho¹, and A. von Bohlen²

¹*Faculdade de Ciências, Centro de Física Atómica da Univeridade de Lisboa, Av. Prof. Gama Pinto, 2, 1649-00, Lisboa, Portugal*

²*Institute for Analytical Sciences (ISAS), Bunsen-Kirchhoff-Str. 11, 44139 Dortmund Germany*

Abstract

Tissue samples of fifteen breasts were analyzed by X-ray fluorescence spectrometry in order to compare the elemental concentration in healthy and carcinoma regions of the same individual. Five women were from Germany and ten from Portugal living in big cities. The tissues were analyzed by Total-reflection X-ray fluorescence (TXRF). The elemental distribution of P, S, K, Ca, Fe, Ni, Zn, Cu and Br present in both normal and cancerous breast tissues were studied. Several contiguous thin sections (up to 10 µm thickness) of each tissue were analyzed by TXRF in order to study the homogeneity in the elemental concentration along each tissue. Correlations between elemental concentrations were established.

The main goal of this study was to demonstrate the presence of Br which is assumed to play an important role in breast carcinoma development. A similar pattern for almost all the analyzed tissues was obtained: levels of P, S, K, Ca, Fe, Cu, Zn and Br increased in carcinoma tissues when compared with the corresponding healthy ones.

Contrarily to the findings of this study, those of early studies showed decreased Br levels for different carcinoma tissues, unlike to most other heavy elements.

Key Words: Breast cancer; Trace elements; Bromine; Trihalomethanes; TXRF

1. Introduction

Breast cancer is the most common cancer among women [1]. In females, the most frequently reported malignancies were breast (22.7%) followed by uterine cervix (17.5%), gall bladder (6.4%) and ovary (5.8%) as reported by the Kolkatta cancer registry on the cancer profile in the Eastern India [2].

There are numerous well-established risk factors like sex, advancing age, early menarche, late menopause, late age at first birth and family history of breast cancer [3-4] but they do not fully explain the incidence or geographic variation related to the disease [5].

Breast cancer warrants attention because it is the most common cancer and the leading cause of cancer related deaths in women throughout the world. It is associated with excess estrogens levels and high levels of mutation and damage to DNA. Exposure to a variety of carcinogens including some trace elements induces the formation of ROS (reactive oxygen species). It is well known that ROS play important roles in the development of different human cancers. These ROS cause mutation and damage to DNA, consequently leading to tumour formation [6-10].

The estimation of trace elemental concentrations in cancer tissues offers a possibility of comparison with the normal tissues of the same patient, thereby ruling out the discrepancies arising out of the differences in environmental factors, diet, medication, genetics and hormonal status. In view of the facts described above, we considered it worthy to carry out the present work to determine the variations in trace elements between normal and malignant breast tissue specimens and to contribute in understanding the effect of altered homeostasis of these elements in the etiology of breast cancer.

Some trace elements present in the development of breast tumours has been suggested due to their role as enzymatic co-factors involved in processes. In particular, copper and zinc belong to the group of "antioxidant metals", assisting the function of antioxidant enzymes. Iron may be implicated through its role as a regulatory factor for angiogenesis. Distinct from these suggested mechanisms for uptake, the demand for increased blood supply for a growing tumour provides a basis for the accumulation of many other elements, including electrolytes such as potassium.

Bromates (BrO_3^-) are by-product of ozone disinfection of drinking water [11-12]. Furthermore, because of its oxidizing properties, potassium bromate (KBrO_3) is widely

used as a part of the bread-making process for the maturation of flour and is, therefore, a food additive. It is also used in the production of fish paste and fermented beverages. In addition, KBrO_3 is used in cold-wave hair lotion [13]. The International Agency for Research on Cancer (IARC) has classified KBrO_3 as a 2B (a possible human) carcinogen [14] based on sufficient evidence that KBrO_3 induces cancer in experimental animals [13].

2. Materials and Methods

2.1. Samples collection

Sampling of normal and neoplastic tissues from the same individual took place at the same time during surgery. A total of 30 samples from 15 cases of breast carcinoma were studied.

The tissue samples analyzed for this study were obtained from mastectomies, lumpectomies and breast reduction surgery. The tissue obtained from mastectomies or lumpectomies, was generally taken from the site of a tumour (invasive ductal carcinoma), although in a number of cases healthy tissue from areas distant to the tumour was also excised. Following excision, the samples were kept in formaldehyde until analysis.

2.2. Sample preparation

For TXRF analysis, about five thin sections of each tissue were obtained. A microtome (Leica CM1100, Wetzlar) for freeze-cutting tissue including a temperature control panel for the refrigerator box was used. Temperatures adjusted from -30°C to -15°C , depending on the type of tissue, were applied for optimal cutting conditions. Non consecutive (each 6th) thin sections between 5 and 10 μm thickness were used. Thinner sections are difficult to handle while thicker sections are not suitable for analytical reasons [15].

Immediately after the cutting process the sections were smoothed out with the aid of a section stretcher. So it is avoided that a material tension in cutting direction will cause the thin sections to roll up. The samples were allowed to stabilize in the cooled

microtome for 30 s before being removed. In the meantime, the sections were stored in the refrigerator until further analysis.

2.3. Experimental procedure for TXRF measurements

After cutting the sections have to be positioned onto the quartz-glass carriers. These sample carriers must not be hydrophobic by aid of an alcoholic silicone solution, as commonly used for TXRF analysis of liquids otherwise the sections could tear up and form droplets. Following the instructions for optimal sample preparation for freeze cut tissues [16] we adapted it slightly for (fatty) breast sample material.

A moderate temperature has to be chosen to transfer the prepared section. Neither repelled sample due to a too cold carrier, nor fast attracted sample due to a too warm carrier is mandatory. If the later occurs, edges and waves appear which will contribute to the spectral background produced by scattering of the exciting beam during the TXRF measurements leading to less good detection limits. Special care must be taken in order to position the thin section precisely in the centre of the sample carrier. Additionally, it is necessary to control presented whole sample and the internal standard to be in the field of view of the detector (8 mm in diameter), otherwise the quantification via internal standard fails. After positioning the thin cuts the sample carrier is warmed up at room temperature. Thereby, the thin section dried fast (about 30 s) and adheres evenly to the surface of the sample carrier.

In a first run the spectrum of the sample is recorded without any treatment in order to determine the best internal standard, which is prepared and used to spike the sample for each of tissue.

For most of the tissues Ga was used as the internal standard, however Se and Y were also used as internal standard. The samples were thoroughly dried for about 15min. After recording the X-ray spectra, the sections were allowed to dry again at room temperature for 1 h. This final conditioning is highly important in order to determine the correct total dry mass of the section. The weighing of the quartz glass carrier with and without the sample (after scraping it off with a scalpel) for each sample, allows the concentration of the internal standard, which will be later used to calculate the concentration of each element present in each sample. The typical masses of the

samples are around 100 µg and were determined with a balance showing a precision of 0.1 µg.

The TXRF-spectrometer "Extra II" used for analysis is equipped with a Mo X-ray tube and a low-pass reflection module (Seifert & Co., Ahrensburg). It is combined with a Si (Li)-detector computer-controlled analyzer, Link System QX-2000 (Oxford Instruments).

The operating conditions for the Mo X-ray tube were adjusted to 50kV and up to 38mA, and the acquisition time for all spectra was set to 180 seconds. Sixty elements with atomic numbers from 15 to 40 and 57 to 92 can in general be detected, up to 25 of them simultaneously.

Thin films, layers or sections with a thickness up to 10µm can be calibrated easily. To avoid the condition of reproducible thickness (not necessary to control exactly the sample thickness), a standard solution with a suitable internal standard element *i* is added to the sections. The calibration function is:

$$c_j = \frac{S_i N_j}{S_j N_i} c_i$$

It only contains the net intensities N_i related to N_j and sensitivity values S_i related to S_j of the analyte *j* and the internal standard element *i* and its mass fraction c_i . The *S*-values have to be determined once by means of standard samples.

The different sensitivity values *S* were determined by means of aqueous standard solutions spiked with different multi-element standards of known concentrations *c* [16].

3. Results and Discussion

The elements P, S, K, Ca, Fe, Ni, Cu, Zn and Br were identified and their concentrations were calculated.

The breast tissue is completely different from other already used tissues because it is basically fat material, thus very difficult to cut and to spike with standard. However, in table 1 similar pattern obtained for almost all the analyzed tissues are shown. Levels of P, S, K, Ca, Fe, Cu, Zn and Br are mostly increased in carcinoma breast tissues when compared with the corresponding healthy ones (Fig. 1).

In the present study, additionally, higher levels of iron in the malignant breast tissues relative to the normal tissues are observed.

Although iron is found in almost all living beings and fulfils numerous functions, in excess Fe is toxic. Iron reacts as hydrogenous peroxide producing free radicals, a process which is controlled by anti-oxidant mechanisms when iron is at normal levels.

On the other hand, iron is essential for the normal physiological functions in humans, as it is an integral part of many proteins and enzymes. It plays a vital role in the regulation of cell growth and in its differentiation [17, 18]. Physiological maintenance of relatively constant levels of iron is a crucial condition while both iron deficiency and iron overload are harmful and can contribute to disease development in several ways. Iron overload is associated to several chronic diseases, such as heart disease [19, 20], diabetes [21], defective immune regulatory control [22] and cancer [23, 24]. Iron can cause and promote cancer. It causes tissue damage by acting as a catalyst in the conversion of hydrogen peroxide to free-radical ions. These free-radical ions attack cellular membranes, causes DNA strand breaks, inactivate enzymes, depolymerize polysaccharides and initiate lipid peroxidation [17, 25]. Iron also contributes to disease development by functioning as a nutrient to microbial and neoplastic cells [26, 27]. It promotes inflammation and increase in cancer cell growth [27, 28]. The role of iron in stimulating angiogenesis has also been suggested [29]. The excess accumulation of iron in humans is associated with an increased risk of cancer in some previous studies [30–35]. Nevertheless contradictory results have also been reported by others [36-38].

Copper is an oligo-element. Just like iron it contributes in red globes formation and blood vessels, nerves, immunologic system and bones maintenance. Copper is found in some enzymes, such as cytochrome C oxidase and super-oxide dismutase. Copper is transported mostly by a protein through the blood flow. When absorbed in the intestine it is transported by another protein (albumina) to the liver.

Copper is found in all living cells. Though it is essential for a wide range of biochemical processes, it is also a potentially toxic substance. Owing to its ability to change between its two oxidation states, Cu^+ and Cu^{2+} , it can cause deleterious effects on the functioning of the cell through the generation of highly reactive oxygen species, which produce hydroxyl radicals that adversely modify proteins, lipids and nucleic acids [39, 40]. Tissue and DNA damage caused by oxygen free radicals, account for the prominent role of copper in neoplastic formation. Another means by which copper can affect carcinogenesis is by being an important cofactor for angiogenesis [41-43]. Without

copper, the mediators of angiogenesis cannot function, thereby stopping the growth of new blood vessels. The excess copper levels observed in the breast cancer tissue possibly promote breast cancer through angiogenesis and oxidative DNA damage. The present findings of elevated levels of copper in the cancerous tissue are in agreement with the results of earlier studies on breast cancer, irrespective of the nature of the sample [37, 44-52].

Zinc is an essential element in human life: it as a big part in protein and nucleic acid metabolism, it stimulates activity in over 100 enzymes, collaborates in proper immunologic system function, it is necessary to the cicatrisation/healing of injuries, flavour and smell perception and DNA syntheses. It is found in insulin zinc finger proteins and several enzymes.

It has been reported in several human studies [37, 44-48] that breast cancer tissues contain elevated concentrations of zinc when compared to normal breast tissues. Zinc is an essential element for the immune system [53, 54]. Zinc levels have to be balanced for the proper functioning of the immune system since both deficiency and excess of zinc causes defects in immune function [55]. Alterations in immune function increase the risk of several diseases including cancer. Lee et al. [56] have suggested altered zinc homeostasis in breast cancer tissues to be responsible for elevated zinc concentrations in these tissues. The elevated concentration of Zn possibly leads to the development of breast cancer since zinc is required for cell proliferation and tumour growth.

In this study, higher concentrations of Br were found in cancerous tissues in comparison to healthy. Br is found at trace levels in humans and considered an essential element, though the functions it fulfils are not know yet. Br is used in production of spraying products, non flammable agents and others like water purification products. The trihalomethanes are compounds that are formed during water treatment process as by-products of disinfection. The reaction occurs between Cl used for disinfection and organic matter in the water under treatment. The substances formed subsequently are the most varied being the main ones chloroform (CHCl_3), bromodichloromethane (BrCHCl_2), chlorodibromomethane (ClCHBr_2) and bromoform (CHBr_3). According to the International Agency of Research on Cancer [57], the evidence on the carcinogenesis of the CHCl_3 and the BrCHCl_2 is sufficient on animals but not on humans, thus making both being in a 2B group (possible risks for human). The National Academy of Sciences [58] in its publication on water supply and health, shows negative

results for CHCl_3 for mutagenesis, though under the same conditions other trihalomethanes present positive results.

The data obtained from 148 single samples (containing information of more than 1300 single element concentrations) was subjected to a statistical evaluation using a software SYSTAT package (SPSS Ink. USA, Systat 11). In a first run the results of all analyzed samples (healthy and cancerous) were mixed and hierarchical clusters were calculated. For that purpose the logarithm (\log_{10}) of the concentrations of all elements were calculated. The logarithm of a small number ($0.001 \mu\text{g/g}$) was introduced in order to prevent singularities in the calculation for elements detected close to or below the detection limit. The logarithm was used following the log-normal distribution of elements in the earth crust [59]. The result of the two dimensional hierarchical clustering calculation is presented in Fig. 3. It can easily be recognized that high amounts of Bromine are nearly exclusively connected to cancerous tissues. Additionally, several sub-groups can be observed. Most of these groups are related to consecutive microtome sections obtained from the same tissue BPS.

Further, in order to evaluate a possible dependence with other elements, some pseudo-3D scatter plots were generated showing the distribution of bromine at a time with two other elements. The groups represented in Fig. 4 are A) Br, Zn and S, B) Br, Ni and Cu, C) Br, Fe and S and D) Br, Ni and S, whereas the dark dots represent cancer tissue and the bright normal tissues. Depending on the element combination two or three clusters can be observed. For the first combination (Br, S, and Zn) the groups are only separated by the presence or absence of Br. This finding is not common to other element combinations as can be seen in Fig. 5. There, like in Fig. 4, pseudo-3D scatter plots of some element combinations are shown. In plot A) Fe, Cu, and Zn, in B) Fe, Ca, and S, in C) Fe, S, and P, and in D) Zn, S, and P are combined. With exception of the samples containing elements below the detection limits, only one cluster per group can be distinguished. The distribution again plotted for the \log_{10} of the concentration, show straight lines confirming the log-normal distribution of elements in human tissues. Like in Fig. 4 the dark dots represent the cancer tissues and the lighter the healthy samples.

The presence of some normal tissue samples in the high Br region predominantly filled by cancerous samples cannot be neglected. This finding obstructs the option for a simple monitoring based on the determination of Bromine by X-ray fluorescence. In general, a high number of healthy breast tissue samples show lower concentrations of heavier elements in comparison to the breast cancer samples. An inter-subject

comparison of the element composition is risky. The margin of variation is too large and the amounts of lipids (grease) are extremely different for a reliable general characterization. It is preferable to perform analyses of cancer and healthy tissue the same subject.

Conclusions

The aim of the present study was to determine the variation in trace element concentrations between normal and malignant human breast tissue. It should be understood as a contribution to study the effects of altered homeostasis of these elements in the etiology of breast cancer.

Almost all the elements identified were found to be elevated in the cancerous tissues when compared with normal tissues of breast. Regarding their role in the initiation or promotion of breast cancer, one possible interpretation is that the elevated levels of Cu, Fe and Zn could have lead to the formation of free radicals or other reactive oxygen containing species affecting adversely DNA and thereby causing breast cancer. An implication of the obtained results of this study suggests Br to be related to breast cancer development.

Additionally, breast cancer is mainly attributed to genetic abnormalities. Moreover, since Cu and Fe are required for angiogenesis, elevated concentrations of these elements are likely to promote breast cancer by increasing the blood supply for tumour growth.

Tumours, characterized by unregulated multiplication of cells, need an ever-increasing supply of essential nutrients including trace elements related to increased cellular activities and requirements. This probably results in an increased vascularity of malignant tissues, which in turn leads to enhancement of elemental concentrations in tumours.

The quantitative results extracted from a fast and reliable inspection of small amounts of tissue applying a modern analytical tool like TXRF is, suggest the presented method for screening tasks. In any case a larger number of analyses would be of interest to corroborate the presented results. Beyond these average analyses performed on 10 micrometer thin but ten square millimetre large tissue section, a local inspection with speciation capabilities will be focused in the future.

References

- [1] D.M. Parkin, F.F. Bray, S.S. Devesa Cancer burden in the year 2000: the global picture, *Eur J Cancer* 37 (2001) 54–66.
- [2] U. Sen., R. Sankaranarayanan, S. Mandal, A.V. Ramanakumar, D.M. Parkin., M.Siddiqui, Cancer patterns in Eastern India: the first report of the Kolkatta cancer registry, *Int J Cancer* 100 (2002) 86–91.
- [3] J.R. Harris, M.E. Lippman., U. Veronesi, W. Willett, Breast cancer, *N. Engl. J. Med.* 327 (1992) 319–328.
- [4] M.P. Madigan, R.G. Zielger, J. Benichou, C. Byrne, R.N. Hoover, Proportion of breast cancer cases in the united states explained by well established risk factors, *J. Natl. Cancer Inst.* 87 (1995) 1681–1685.
- [5] S.R. Strugeon, C. Schairer, M. Gail, M. McAdams, L.A. Briuton, R.N. Hoove, Geographic variation in mortality from breast cancer among white women in the United States, *J. Natl. Cancer Inst.* 87 (1995) 1846–1853.
- [6] A. Hartwig, Recent advances in metal carcinogenicity, *Pure Appl. Chem.* 72 (2000) 1007-1014.
- [7] K.S. Kasprzak, The role of oxidative damage in metal carcinogenicity, *Chem. Res. Toxicol.* 4 (1991) 604.
- [8] P.A. Cerutti, Oxy-radicals and cancer, *Lancet* 344 (1994) 862.
- [9] A.R. Collins, Oxidative DNA damage, antioxidants, and cancer, *Bioessays* 21 (1999) 238-246.
- [10] B. Halliwell, O.I. Aruoma (Eds.), *DNA and Free Radicals*, CRC Press, Boca Raton, 1993.

- [11] F. Fiessinger, J.J., Rook, J.P., Duguet, Alternative methods for chlorination, *Sci. Total Environ.* 47 (1985) 299–315.
- [12] Y. Kurokawa, Y., Hayashi, A., Maekawa, M., Takahashi, T., Kokubo, Induction of renal cell tumors in F-344 rats by oral administration of potassium bromate, a food additive, *Gann* 73 (1982) 335–338.
- [13] IARC Monographs on the Evaluation of the Carcinogenic Risk of chemicals to humans. Some naturally occurring and synthetic food components, furocoumarins and ultraviolet radiation. IARC Publication 40, World Health Organization/IARC, Lyon, France, 1986, pp. 207–220.
- [14] IARC Monographs on the Evaluation of the Carcinogenic Risk of chemicals to humans. Some naturally occurring and synthetic food components, furocoumarins and ultraviolet radiation. IARC Scientific Publication 40, World Health Organization/IARC Supplement 7, Lyon, France, 1987, p. 91.
- [15] A. von Bohlen, R. Klockenkämper, G. Tölg, B. Wiecken. Microtome sections of biomaterials for trace analyses by TXRF. *Fresenius Z Anal Chem* 331 (1988) 454-458.
- [16] R. Klockenkämper, A. von Bohlen, B. Wiecken, Quantification in total reflection X-ray fluorescence analysis of microtome sections, *Spectrochimica. Acta Part B* 44 (1989) 511-517.
- [17] T.H. Bothwell, R.W. Charlton, J.D. Cook, C.A. Finch, *Iron Metabolism in Man*, Blackwell Scientific Publications, Oxford, 1979.
- [18] N.C. Andrews, Medical progress: Disorders of iron metabolism, *New England J. Med.* 341 (1999) 1986-1995.
- [19] J.T. Salonen, K. Nyyssonen, H. Korpela, J. Tuomilehto, R. Seppanen, R. Salonen, High stored iron levels are associated with excess risk of myocardial infarction in eastern Finnish men, *Circulation* 86 (1992) 803-811.

- [20] T.-P. Tuomainen, K. Punnonen, K. Nyysönen, J.T. Salonen, Association between body iron stores and the risk of acute myocardial infarction in men, *Circulation* 97 (1998) 1461-1466.
- [21] J.T. Salonen, T.-P. Tuomainen, K. Nyysönen, H.-M. Lakka, K. Punnonen, Relation between iron stores and non-insulin dependent diabetes in men: case-control study, *Br. Med. J.* 317 (1998) 727.
- [22] E.M. Walker Jr., S.M. Walker, Review: Effects of iron overload on the immune system, *Ann. Clin. Lab. Sci.* 30 (2000) 354-365.
- [23] R.G. Stevens, D.Y. Jones, M.S. Micozzi, P.R. Taylor, Body iron stores and the risk of cancer, *N. Engl. J. Med.* 319 (1988) 1047-1052.
- [24] P. Whittaker, M.G. Robl, V.C. Dunkel, *Proc. Am. Assoc. Câncer Res.* 35 (1994) 103.
- [25] J.M. McCord, Effects of positive iron status at a cellular level, *Nutr. Rev.* 54 (1996) 85- 88.
- [26] E.D. Weinberg, The role of iron in cancer, *Eur. J. Câncer Prev.* 5 (1996) 19-36.
- [27] E.D. Weinberg, Iron Loading and Disease Surveillance, *Emerging Infectious Dis.* 5 (1999) 346-352.
- [28] P.T. Lieu, M. Heiskala, P.A. Peterson, Y. Yang, The roles of iron in health and disease, *Mol. Aspects Med.* 22 (2001) 1-87.
- [29] K. Norrby, I. Mattsby-Baltzer, M. Innocenti, S. Tuneberg, Orally administered bovine lactoferrin systemically inhibits VEGF (165)-mediated angiogenesis in the rat, *Int. J. Câncer* 91 (2001) 236-240.

- [30] R.L. Nelson, F. Davis, P. Bowen, J.W. Kikendal, in: J. Anastassopoulou, Ph. Collery, J.C. Etienne, Th. Theophanides (Eds.), *Metal Ions in Biology and Medicine*, Vol. 2, John Libbey Eurotext, Paris, 1992, p. 358.
- [31] N. Chau, L. Benamghar, Q.T. Pham, D. Teculescu, E. Rebstock, J.M. Mur, Mortality of iron miners in Lorraine (France): relations between lung function and respiratory symptoms and subsequent mortality, *Br. J. Ind. Med.* 50 (1993) 1017-1031.
- [32] M.B. Meyer, G.D. Luk, J.M. Sotelo, B.H. Cohen, H.A. Menkes, Hypothesis: the role of the lung in stomach carcinogenesis, *Am. Rev. Respir. Dis.* 121 (1980) 887-892.
- [33] H. Cunzhi, J. Jiexian, Z. Xianwen, G. Jingang, Z. Shumin, D. Lili, Serum and tissue levels of six trace elements and copper/zinc ratio in patients with cervical cancer and uterine myoma, *Biol. Trace Elem. Res.* 94 (2003) 113-122.
- [34] M. Kucharzewski, J. Braziewicz, U. Majewska, S. Gozdz, Iron concentrations in intestinal cancer tissue and in colon and rectum polyps, *Biol. Trace Elem. Res.* 95 (2003) 19-28.
- [35] S.B. Reddy, M.J. Charles, G.J.N. Raju, B. S. Reddy, T.S. Reddy, P.V.B.R. Lakshmi, V. Vijayan, Trace elemental analysis of cancer-afflicted intestine by PIXE technique, *Biol. Trace Elem. Res.* 102 (2004) 265-281.
- [36] A.N. Garg, R.G. Weginwar, V. Sagdeo, Minor and trace elemental contents of cancerous breast tissue measured by instrumental and radiochemical neutron activation analysis, *Biol. Trace Elem. Res.* 26-27 (1990) 485-496.
- [37] S.L. Rizk, H.H. Sky-Peck, Comparison between Concentrations of Trace Elements in Normal and Neoplastic Human Breast Tissue, *Cancer Res.* 44 (1984) 5390-5394.
- [38] A.N. Garg, V. Singh, R.G. Weginwar, V.N. Sagdeo, An elemental correlation study in cancerous and normal breast tissue with successive clinical stages by neutron activation analysis, *Biol. Trace Elem. Res.* 46 (1994) 185-202.

- [39] A.D. Armendariz, C.D. Vulpe, Nutritional and Genetic Copper Overload in a Mouse Fibroblast Cell Line, *Am. Soc. Nutr. Sci. J. Nutr.* 133 (2003) 258E.
- [40] T.D. Rae, P.J. Schmidt, R.A. Pufahl, V.C. Culotta, T.V. O'Halloran, Undetectable intracellular free copper: The requirement of a copper chaperone for superoxide dismutase, *Science* 284 (1999) 805-808.
- [41] S. Brem, Angiogenesis and Cancer Control: From Concept to Therapeutic Trial *Cancer Control* 6 (1999) 436-458.
- [42] S. Brem, M.C. Wotoczek-Obadia, Regulation of angiogenesis by copper reduction and penicillamine: antagonism of cytokine and growth factor activity. AACR Special Conference: Angiogenesis and Cancer Research, Orlando, FL, (1998) 24–28.
- [43] G.F. Hu, Copper stimulates proliferation of human endothelial cells under culture, *J. Cell Biochem.* 69 (1998) 326-335.
- [44] K. Geraki, M.J. Farquharson, D.A. Bradley, Concentrations of Fe, Cu and Zn in breast tissue: a synchrotron XRF study, *Phys. Med. Biol.* 47 (2002) 2327–2339.
- [45] K. Geraki, M.J. Farquharson, D.A. Bradley, X-ray fluorescence and energy dispersive x-ray diffraction for the quantification of elemental concentrations in breast tissue, *Phys. Med. Biol.* 49 (2004) 99-110.
- [46] H.W. Kuo, S.F. Chen, C.C. Wu, D.R. Chen, J.H. Lee, Serum and tissue trace elements in patients with breast cancer in Taiwan, *Biol. Trace Elem. Res.* 89 (2002) 1-11.
- [47] A.N. Garg, R.G. Weginwar, V. Sagdeo, Minor and trace elemental contents of cancerous breast tissue measured by instrumental and radiochemical neutron activation analysis *Biol. Trace Elem. Res.* 26–27 (1990) 485-496.

- [48] A.N. Garg, V. Singh, R.G. Weginwar, V.N. Sagdeo, An elemental correlation study in cancerous and normal breast tissue with successive clinical stages by neutron activation analysis *Biol. Trace Elem. Res.* 46 (1994) 185-202.
- [49] K. Sharma, D.K. Mittal, R.C. Kesarwani, V.P. Kamboj, Chowdhery, Diagnostic and prognostic significance of serum and tissue trace elements in breast malignancy, *Indian J. Med. Sci.* 48 (1994) 227-232.
- [50] I.D. Capel, M.H. Pinnock, D.C. Williams, I.W. Hanham, The serum levels of some trace and bulk elements in cancer patients, *Oncology* 39 (1982) 38-41.
- [51] Y.L. Huang, J.Y. Sheu, T.H. Lin, Association between oxidative stress and changes of trace elements in patients with breast cancer, *Clin. Biochem.* 32 (1999) 131-136.
- [52] C. Koksoy, G.O. Kavas, E. Akcil, P.A. Kocaturk, S. Kara, C. Ozarslan, Trace elements and superoxide dismutase in benign and malignant breast diseases, *Breast Cancer Res. Treat.* 45 (1997) 1-6.
- [53] L. Rink, P. Gabriel, Zinc and the immune system, *Proc. Nutr. Soc.* 59 (2000) 541-552.
- [54] L. Rink, P. Gabriel, Extracellular and immunological actions of zinc, *Biometals* 14 (2001) 367-383.
- [55] K.-H. Ibs, L. Rink, Zinc-altered immune function, *Am. Soc. Nutr. Sci. J. Nutr.* 133 (2003) 1452S-1456S.
- [56] R. Lee, W. Woo, B. Wu, A. Kummer, H. Duminy, Z. Xu, Zinc accumulation in N-methyl-N-nitrosourea-induced rat mammary tumors is accompanied by an altered expression of ZnT-1 and metallothionein, *Exp. Biol. Med.* 228 (2003) 689-696.
- [57] National Academy of Sciences. Drinking water and health. Washington (DC); 3 (1985). .

[58] IARC. Chlorinated drinking-water, chlorination by products, some other halogenated compounds, cobalt and cobalt compounds. Lyon, 1991, pp. 45-268.

[59] M.J. Baxter, C.E. Buck, Data handling and statistical analysis, in: E. Ciliberto, G. Spoto (Eds.), *Modern Analytical Methods in Art and Archaeology*, Wiley, New York, 2000.

Figure captions

Fig.1 - Element concentrations ($\mu\text{g g}^{-1}$) and STD for several microtome slices ($n = 10$, Se $n = 5$) of healthy and tumour tissue of sample 10.

Fig. 2 - Pseudo-3D scatter plots generated to show the distribution of bromine at a time with sulphur and iron in healthy (gray dots, $n = 4$) and tumour (black dots, $n = 10$) tissue of sample 10. Log_{10} of the concentrations were used.

Fig. 3 - Permuted data matrix containing all samples. The hierarchical clustering procedure shows a correlation between cancer tissue and Br. In this graphical representation the colours are assigned to the log_{10} values of the concentration except for the 'sample' row. There, the blue colour represents healthy tissue and green cancer tissue.

Fig. 4 - Pseudo-3D scatter plots generated to show the distribution of bromine at a time with sulphur and iron in healthy (gray dots) and tumour (black dots) tissue of all analyzed samples.

Fig. 5 - Pseudo-3D scatter plots generated to show the distribution of three elements at a time in healthy (gray dots, $n = 4$) and tumour (black dots) tissue of all analyzed samples.

Table 1 - Some of the obtained results regarding healthy/cancerous pairs of analysed breast samples. Values are given in $\mu\text{g g}^{-1}$ with respect to the dry mass of samples, dl = below the detection limit (for transition metals $\sim 0.5 \mu\text{g g}^{-1}$, for P $\sim 20 \mu\text{g g}^{-1}$).

Element	Normal 1	Tumor 1	Normal 2	Tumor 2	Normal 3	Tumor 3	Normal 4	Tumor 4	Normal 5	Tumor 5	Normal 6	Tumor 6
P	500	1680	2730	1890	110	3310	72	190	33	1960	dl	dl
S	530	2670	2320	3590	170	3900	670	910	520	2780	295	3240
K	dl	16	105	89	20	113	53	50	11	171	17	164
Ca	23	106	101	185	20	97	380	337	14	103	153	1270
Fe	13	88	54	57	8.4	121	11	12	12	37	5.3	98
Ni	1.9	dl	dl	dl	3.8	dl	2.3	1.7	1.5	2.1	1.7	3.0
Cu	dl	2.4	dl	3.9	dl	3.5	5.0	11	DI	1.9	2.3	14
Zn	3.8	22	14	21	2.9	41	6.8	12	2.4	20	5.8	39
Br	1.9	7.0	2.7	29	dl	4.2	dl	2.3	DI	3.4	1.0	5.0

