



UNIVERSIDADE DA BEIRA INTERIOR
Ciências da Saúde

Análise de biometais em tecido cerebral por Microscopia Eletrónica Analítica

(Versão final após defesa pública)

Joana Fabíola Rocha Baptista

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em

Ciências Biomédicas

(2º ciclo de estudos)

Orientador: Professor Doutor Jorge Manuel Maia Pereira

Co-orientadora: Professora Doutora Ana Clara Cristóvão

Covilhã, novembro de 2017

O conteúdo do presente trabalho é da exclusiva responsabilidade do autor:

(Joana Fabíola Rocha Baptista)

“The true voyage of discovery is not in search
of new landscapes, but in having new eyes”

- *Marcel Proust*

Agradecimentos

Ao Professor Doutor Jorge Maia, orientador da dissertação, agradeço o apoio, a partilha do saber e as valiosas contribuições para o trabalho. Encontro-me extremamente grata pela oportunidade, interesse, disponibilidade e por todas as sugestões e conhecimentos transmitidos na área da física, sem os quais não seria capaz de evoluir neste trabalho e que, ao mesmo tempo me fez despertar gosto por ela. Obrigada por tornar possível a realização desta dissertação.

À minha co-orientadora, Professora Doutora Ana Clara Cristóvão, pelo enorme interesse e disposição em colaborar sempre que solicitada a sua ajuda. Obrigada pela oportunidade e pelos conhecimentos que me transmitiu durante o projeto.

A Doutora Ana Paula Gomes, pela disponibilidade e ajuda ao longo do ano.

Ao Laboratório de Microscopia Eletrónica da Universidade da Beira Interior onde o projeto foi desenvolvido e ao Departamento de Física, por disponibilizar um lugar e conforto para a minha aprendizagem durante este trabalho.

Aos meus pais. Pela paciência, amor e compreensão. Apesar da distância física, posso dizer que ao longo deste ano estiveram sempre presentes. É a vocês que devo todo o meu percurso e força, agradeço do fundo do coração o vosso tão sincero apoio.

Ao meu namorado Guilherme Santos, que me acompanhou ao longo deste ano, que por causa da descontração, entreajuda, incentivos e de gargalhadas, que levo daqui momentos e lembranças inesquecíveis.

As minhas amigas Mariana Feijó e Patrícia Pinto que me acompanharam durante estes anos todos no curso. Pelo apoio, ajuda e a grande amizade que levo e que nunca vou esquecer.

Resumo

A doença de Parkinson é uma doença neurodegenerativa que afeta os neurónios responsáveis pelo controlo do movimento. Esta resulta da perda de neurónios específicos na região da *substantia nigra* (SN), responsáveis pela produção de dopamina. As causas para esta doença ainda são desconhecidas, mas entre os fatores que se pensa que estejam associados, o desequilíbrio da homeostase de certos elementos químicos responsáveis pelo bom funcionamento das células, é um deles. Assim a caracterização do comportamento destes elementos na doença de Parkinson é importante para melhor perceber os mecanismos patológicos a ela associada. Deste modo, as técnicas espectrométricas podem auxiliar na investigação do comportamento destes elementos químicos existentes nos tecidos biológicos.

As técnicas espectrométricas permitem fazer um estudo qualitativo e quantitativo dos tecidos biológicos, fornecendo informações relativamente ao tipo de elementos químicos e à concentração desses mesmos elementos na amostra. Algumas técnicas conhecidas para estes tipos de análises podem usar a espectrometria de fluorescência de raios-X, associada por exemplo, à Microscopia Eletrónica Analítica (AEM). As técnicas que usam a fluorescência de raios-X apresentam como principal vantagem o facto de não serem destrutivas. Para cada caso de estudo e para cada tecido é necessário otimizar certas condições de operação espectrométricas do sistema, no sentido de se extrair informações nas medidas efetuadas aos tecidos de estudo.

No presente trabalho usou-se a AEM que combina a Microscopia Eletrónica de Varrimento (AEM/SEM) com a espectrometria de fluorescência de raios-X (XRF), para a identificação de alterações dos elementos químicos, a fim de se proceder à comparação entre dois grupos de estudo, o grupo controlo (animais saudáveis) e tratado (animais expostos a uma toxina indutora de doença de Parkinson). As regiões cerebrais avaliadas foram selecionadas de forma a incluírem a *substantia nigra pars compacta* (SNpc) e a *substantia nigra pars reticular* (SNpr).

A técnica utilizada possibilitou a identificação de vários elementos químicos e a medição das respetivas intensidades de fluorescência de raios-X, tornando possível a comparação entre tecidos controlo e tecidos tratados. Os elementos químicos identificados, na AEM/SEM foram C, N, O, Na, P, S e Ca para ambos grupos, no qual se verificou uma diminuição na concentração destes elementos no grupo tratado relativamente ao grupo controlo, com a exceção de Na, que contrariamente aos restantes elementos mostra um aumento no grupo tratado. Na literatura foram documentadas a diminuição da concentração dos elementos referidos em amostras de cérebros de animais, o que é concordante com os resultados obtidos no presente estudo.

Como resultados finais, podemos afirmar que a otimização das condições de operação da AEM/SEM foi conseguida, uma vez que foi possível medir e analisar vários elementos atômicos em ambos os grupos.

Palavras-chave

Microscopia Eletrônica Analítica, fluorescência de raios-X, biometais, Doença de Parkinson.

Abstract

Parkinson disease is a degenerative neurological disease that affects the neurons responsible for movement control. Such disease is caused by the loss of specific neurons in *the substantia nigra* region, the referred specific neurons are the ones responsible for dopamine production. The causes of this disease are still unknown, but one of the factors that may be associated with it is homeostasis dysregulation of certain chemical elements responsible for the proper operation of the cells. Therefore, the characterization of the behavior of these elements in Parkinson's disease is important to better understand the pathological mechanisms associated with this disease. Thus, spectrometric techniques can aid in the investigation of the behavior of these chemical elements in biological tissues.

Spectrometric techniques allow a qualitative and quantitative study of the biological tissues, providing information on the type and also concentration of the chemical elements in the sample. Some techniques known for this type of analysis may use X-ray fluorescence spectrometry, associated to analytical electron microscopy. The main advantage of techniques that use X-ray fluorescence is that they are non-destructive. For each study case and for each tissue it is necessary to optimize certain operation conditions, in order to obtain better results in the measurements made for the study tissues.

In the present work it was used the Analytical Electron Microscopy (AEM) that combines the Scanning Electron Microscopy (SEM) with the X-ray fluorescence spectrometry for the identification of atomic elements alterations in the brain, in order to do so, two study groups were compared - control (healthy animals) and treated (animals exposed to a Parkinson's disease-inducing toxin). The evaluated brain regions were selected to include substantia nigra pars compacta (SNpc) and substantia nigra pars reticulata (SNpr). The used technique allowed the identification of various chemical elements and also the measurement of their respective X-rays fluorescence intensity levels, making this way the comparison between control and treated groups possible. The chemical elements identified in AEM/SEM were C, N, O, Na, P, S and Ca for both groups, in which a decrease in the concentration of these elements in the treated group relative to the control group was observed, with the exception of Na which contrary to the other elements shows an increase in group treated. In literature, it was found study's referring to the decrease of the concentration of the previously mentioned elements in samples of animal brains, justifying the results obtained in the present work.

As final results, we can confirm that by optimizing the AEM / SEM operating conditions it is possible to measure and analyze several atomic elements in biological tissues.

Keywords

Electron Microscopy, fluorescence, X-rays, biometals, Parkinson Disease.

Índice

1. Introdução.....	1
1.1 Origem e produção de Raios X.....	3
1.2 Técnicas Espectrométricas.....	6
1.2.1 Microscopia Eletrônica Analítica.....	6
1.2.2 Microscopia de Fluorescência de Raios-X baseada em Sincrotrão.....	8
1.2.3 Emissão raios-X por indução de partículas	8
1.2.4 Espectrometria de Massa	8
1.2.5 Espectrometria de absorção atômica	10
1.2.6 Análise por ativação de neutrões	11
1.3 Doença de Parkinson.....	12
2. Sistema Experimental e Metodologia.....	17
2.1 Microscópio Eletrônico de Varrimento.....	19
2.2 Princípio de funcionamento do AEM/SEM.....	21
2.3 Sistema de detecção de raios-X e de eletrões.....	25
2.3.1 Detetor de raios-X e sistema de eletrônica de leitura.....	26
2.3.1.1 Resolução em energia do sistema de detecção de raios-X.....	28
2.4 Preparação e Montagem das amostras.....	30
2.4.1 Análise à composição elementar da fita adesiva.....	32
2.5 Tratamento dos espectros de energia.....	32
2.6 Medição da área de tecido irradiada.....	34
2.7 Análise Estatística.....	34
3. Resultados e Discussão.....	37
3.1 Otimização das condições de irradiação das amostras	39
3.2 Análise ao tecido cerebral.....	42
4. Conclusões.....	51
5. Referências.....	55

Lista de Figuras

Figura 1 - Esquema com o Espectro Eletromagnético.	4
Figura 2 - Representação de um modelo atômico com apenas três camadas.....	4
Figura 3 - Esquema exemplificativo da formação de raios-X característicos..	5
Figura 4 - Esquema com as principais transições eletrônicas permitidas para as camadas K, L, e M.....	5
Figura 5 - Esquema exemplificativo do princípio geral do funcionamento da SEM.....	7
Figura 6 - Esquema com os constituintes principais de um espectrómetro de massa.	9
Figura 7 - Esquema representativo da LA-ICP-MS..	10
Figura 8 - Esquema representativo da espectrometria de absorção atômica.	11
Figura 9 - Esquema da fenda sináptica.....	14
Figura 10 - Fotografia do microscópio eletrônico de varrimento	19
Figura 11 - Esquema do microscópio eletrônico de varrimento (SEM) com os seus principais constituintes.....	21
Figura 12 - Controlo do movimento do suporte do porta-amostras segundo os eixos X, Y, e Z e na rotação no plano XY	21
Figura 13 - Partículas emitidas da amostra pela irradiação de um feixe de eletrões.	23
Figura 14 - Rendimento de fluorescência para as camadas K, L e M em função do número atômico, Z.....	24
Figura 15- Detetor semiconductor de EDX..	26
Figura 16 - Fotografia da janela de raios-X, modelo AP3.3 da Moxtek.....	26
Figura 17 - Esquema com o sistema de deteção de raios-X.	28
Figura 18 - Representação de uma distribuição gaussiana para a resposta a raios-X monoenergéticos com a energia E_0	29
Figura 19 - Resolução em energia para as linhas K_{α} de alguns elementos atômicos identificados nas amostras.	30
Figura 20 - a) Esquema de um corte sagital, de acordo com o atlas anatómico do cérebro de mergunho, b) Esquema relativo à SN.....	31
Figura 21 - Fotografias do procedimento experimental.....	32
Figura 22 - Espectro em energia dos raios-X para a fita-adesiva irradiada com o feixe de eletrões.	32
Figura 23 - Espectro de raios-X obtido para uma fatia cerebral.....	33
Figura 24 - Área total da SN para os 4 animais em ambos os grupos, controlo e MPTP	34
Figura 25 - Simulação do comportamento dos eletrões na H_2O para a energia de 20 keV.....	38
Figura 26 - Simulação do comportamento dos eletrões no tecido saudável equivalente à composição de SN realizada para diferentes energias.	39
Figura 27 - Alcance médio em tecido cerebral.	40

Figura 28 - Região da SN selecionada para diferentes fatias do tecido cerebral para grupo de controlo, ao longo da profundidade.	445
Figura 29 - Região da SN selecionada para diferentes fatias do tecido cerebral para grupo MPTP, ao longo da profundidade.	46
Figura 30 - Espectros de raios-X para 8 fatias do animal 2 do grupo	44
Figura 31- a) Intensidade média dos raios-X de fluorescência ao longo da posição para para elemento identificado nas análises ao tecido cerebral, b) Intensidade total de fluorescência de raios-X	468-49
Figura 32 - Intensidade de raios-X de fluorescência normalizada à média de cada grupo para os diferentes elementos detetados na SN	47

Lista de Tabelas

Tabela 1 - Energias de limiar de excitação para a camada K e energias das linhas de emissão K_{α} e K_{β} , para alguns elementos de baixo número atômico, Z	5
Tabela 2 - Resumo das principais vantagens e desvantagens de algumas técnicas espectrométricas.....	12
Tabela 3 - As principais funções de alguns elementos atômicos que podem ser encontrados no cérebro.	15
Tabela 4 - Rendimento de fluorescência de elementos de baixo Z	24
Tabela 5 - Transmissão máxima para as energias K_{α} de vários elementos para janela de raios X AP3.3.....	27
Tabela 6 - ROI para os vários elementos atômicos detetados.	33
Tabela 7 - Parâmetros do feixe de elétrons e do sistema AEM/SEM.	40

Lista de Acrónimos

α -syn	α -sinucleína
AAS	Espectrometria de Absorção Atômica
AES	Espectrometria de Emissão Atômica
AEM	Microscopia Eletrônica Analítica
BSE	Elétrões retrofundidos
CL	Corpos de Lewis
DP	Doença de Parkinson
EDXRF	Fluorescência de Raios-X por Dispersão em Energia
FeS	Centros de Ferros-Enxofre
FWHM	Full-Width at Half-Maximum
ICP-MS	Espectrometria de Massa de Plasma Acoplado Indutivamente
IV	Infra-Vermelho
LA-ICPMS	Espectrometria de Massa de Plasma Acoplado Indutivamente por Ablação a Laser
MCA	Analisador MultiCanal
MPTP	Metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina
MS	Espectrometria de Massa
NAA	Análise por Ativação com Neutrões
PIXE	Emissão de raios-X por Indução de Partículas
PMT	Tubo FotoMultiplicador
ROI	Região de Interesse
SE	Elétrões Secundários
SEM	Microscopia Eletrônica de Varrimento
SN	<i>Substantia Nigra</i>
SNpc	<i>Substantia Nigra</i> pars compacta
SNpr	<i>Substantia Nigra</i> pars reticular
SRXRF	Fluorescência de Raios-X baseada em Radiação de Sincrotrão
TEM	Microscopia Eletrônica de Transmissão
XRF	Fluorescência de Raios-X
UV	Radiação Ultravioleta

1.Introdução

1.1 Origem e produção de raios-X

Os raios-X foram descobertos pelo físico alemão Conrad Röntgen em 1895, durante uma experiência realizada com um tubo de raios catódicos (constituído por um invólucro de vidro em vácuo com elétrodos em cada uma das extremidades, uma fonte de elétrons e um ecrã luminescente) onde um feixe de elétrons, designado de raios catódicos, é acelerado por um campo elétrico colidindo no ecrã. Nesta experiência, verificou-se que quando se aplicava o feixe de elétrons, i.e. uma corrente elétrica no tubo de raios catódicos, produzia-se um brilho de fluorescência numa tela quimicamente revestida com cristais de cianureto de bário e platina, que se encontrava na vizinhança. Assim, como consequência deste acontecimento e após várias experiências, descobriu pela primeira vez que um tipo de raios invisíveis e de natureza desconhecida possuía a capacidade de atravessar a maioria dos materiais, inclusive os tecidos humanos [1,2], o qual designou de raios-X.

Alguns anos após a sua descoberta provou-se que os raios-X são ondas eletromagnéticas (Figura 1) como a luz visível, os raios infravermelho (IF), os raios ultravioleta (UV), as ondas de rádio, as micro-ondas e os raios gama (raios- γ), que se propagam no vácuo à velocidade da luz, $c \approx 2.998 \times 10^8$ m/s.

Pela teoria quântica da luz, a radiação eletromagnética pode ser emitida ou absorvida na forma de quanta ou fótons com energia que é proporcional à frequência f da radiação ou inversamente proporcional ao comprimento de onda λ [3]:

$$E = hf = \frac{hc}{\lambda} \quad (1)$$

onde h é a constante de Planck, possuindo um valor de 6.626×10^{-34} J.s = 4.136×10^{-15} eV.s. Tipicamente, a energia dos fótons é medida em elétron-volt (eV), enquanto o comprimento de onda e a frequência em metro (m) e em hertz (Hz), respetivamente.

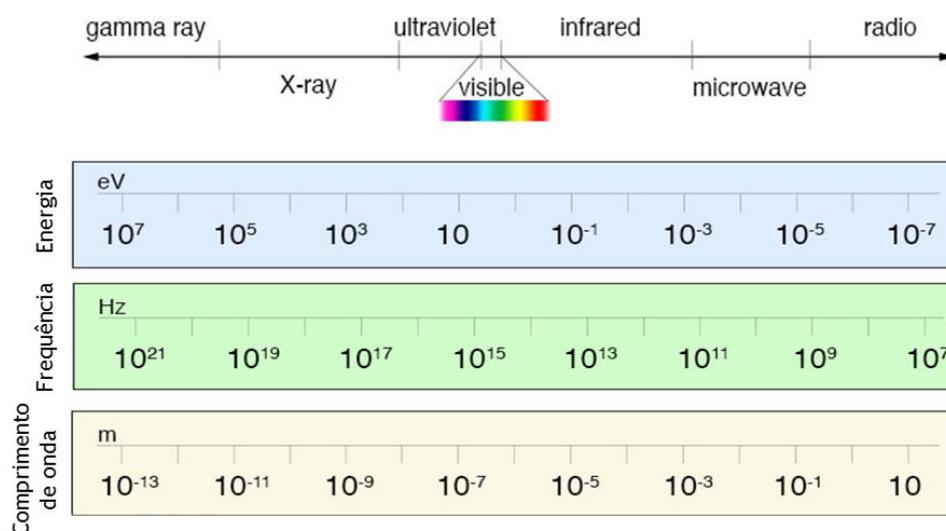


Figura 1 - Esquema com o Espectro Eletromagnético (adaptado de [4]).

A nuvem eletrônica representa a região do átomo, em torno do núcleo, na qual existe uma determinada probabilidade de se encontrarem elétrons. Estes distribuem-se por camadas de acordo com as suas energias específicas. A camada mais próxima do núcleo é a camada *K*, logo possui uma energia de limiar de ionização mais elevada em comparação com as restantes, seguida da camada *L* com 3 subcamadas e posteriormente da camada *M* com 5 subcamadas (Figura 2) [1,3]. Dependendo do número de elétrons que o átomo apresenta, poderemos ter camadas adicionais.

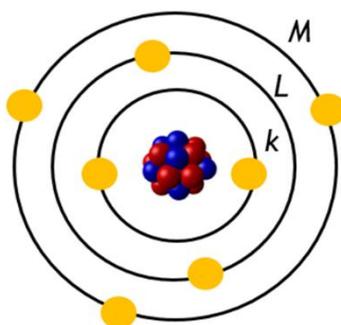


Figura 2 - Representação de um modelo atômico com apenas três camadas, em que cada letra indica uma camada: a camada *K*, representando a camada mais interna, seguida da *L* e como última camada encontra-se a *M*.

O átomo é ionizado por ação de uma radiação incidente externa se esta contém uma energia igual ou superior à energia de ligação do elétron na respetiva camada. Deste modo, a energia aplicada é suficiente para provocar a ejeção do elétron, deixando uma lacuna. O átomo encontra-se assim num estado instável e de forma a rearranjar-se irá responder instantaneamente preenchendo esta lacuna com um elétron de uma camada mais externa, libertando energia sob a forma de um fóton de raios-X característico também designado por raios-X de fluorescência (Figura 3). Esta energia libertada na forma de raios-X característicos contribuem para a formação de um espectro de emissão com energias discretas que permite identificar os elementos atômicos. Tomando como exemplo o modelo acima apresentado (Figura 2), quando a energia é suficiente para ejetar um elétron da camada *K*, um elétron proveniente da camada mais externa, como por exemplo da camada *M* ou *L* preencherá a lacuna, sendo libertada energia na forma de raios-X igual à diferença entre os níveis de energia do elétron [1,3]. Quando a transição eletrônica ocorre entre a camada *L* e a camada *K*, designa-se de K_{α} , se a transição eletrônica ocorrer entre a camada *M* e a camada *K*, designa-se de K_{β} (Figura 4)). Conforme a subcamada que se encontra um elétron do átomo que irá preencher a lacuna na camada *K*, é dada uma designação para a transição. Na tabela 1 estão representadas algumas dessas energias provenientes das transições eletrônicas entre as camadas.

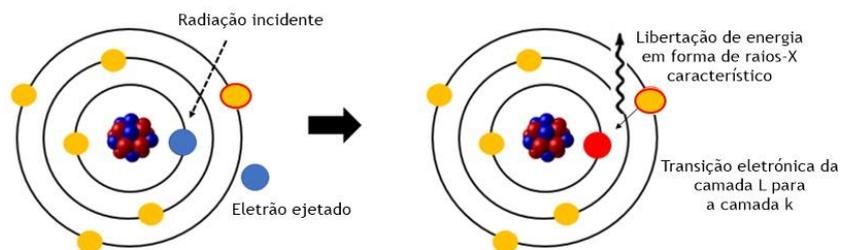


Figura 3 - Esquema exemplificativo da formação de raios-X característicos. A radiação incidente tem energia suficiente para ejetar um elétron (azul) da camada K. De seguida, a lacuna produzida, é preenchido por um elétron de uma camada mais externa (vermelho), emitindo energia na forma de raios-X característico.

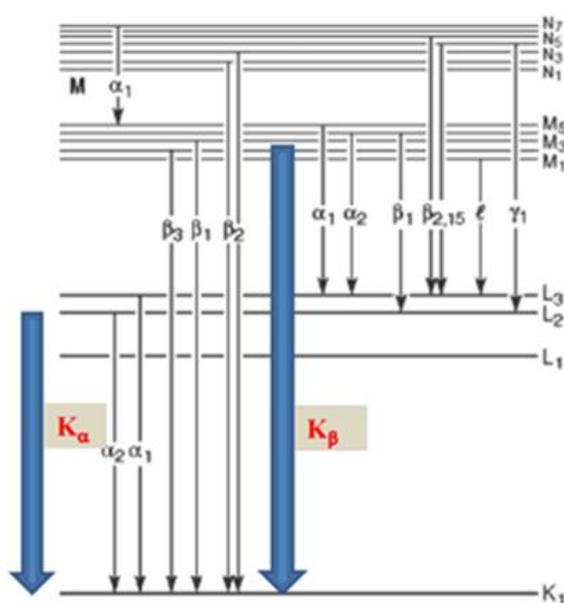


Figura 4 - Esquema com as principais transições eletrônicas permitidas para as camadas K, L, e M (adaptado de [5,6]).

Tabela 1 - Energias de limiar de excitação para a camada K [7] e energias das linhas de emissão K_α e K_β , para alguns elementos de baixo número atômico, Z [5,6].

Elemento/Z	Limiar de excitação da camada k, E_K (keV)	$E_{K\alpha}$ (keV)	$E_{K\beta}$ (keV)
Carbono, C/6	0.284	0.282	----
Azoto, N/7	0.400	0.392	----
Oxigénio, O/8	0.532	0.526	----
Sódio, Na/11	1.072	1.040	1.070
Fósforo, P/15	2.142	2.014	2.140
Enxofre, S/16	2.470	2.308	2.464
Cloro, Cl/17	2.819	2.622	2.817
Potássio, K/19	3.607	3.312	3.590
Cálcio, Ca/20	4.037	3.690	4.013

1.2. Técnicas Espectrométricas

Os processos biológicos a nível celular e sub-celular, têm vindo a ser estudados exaustivamente nas últimas décadas, no entanto, a capacidade de se obter informações a uma escala tão reduzida, como a escala atómica, constitui ainda hoje um desafio. Alguns métodos tradicionais, como as técnicas de coloração histoquímicas são utilizados para localizar metais e para se obter informações da amostra em estudo, todavia sempre com algumas limitações, tais como a baixa sensibilidade para iões livres e o facto de não ser uma análise multi-elemental [11]. Por isso, estas necessidades têm vindo a ser colmatadas pela aplicação de novas técnicas de espectrometria e/ou de microscopia. A espectrometria resulta na análise qualitativa e quantitativa de uma amostra, fornecendo informações relativamente ao tipo de elementos atómicos e à sua concentração na amostra. Na tabela 2 (ver no final deste subcapítulo) sumaria-se as principais vantagens e desvantagens das técnicas espectrométricas que serão apresentadas de seguida.

1.2.1 Microscopia Eletrónica Analítica (AEM)

A Microscopia Eletrónica Analítica (AEM) combina a espectrometria de fluorescência de raios-X (XRF) com a microscopia eletrónica, constituindo simultaneamente uma técnica de microscopia e de espectrometria multi-elemental utilizada para obter informação qualitativa e quantitativa, incluindo a distribuição espacial, dos vários elementos atómicos em amostras de variadíssimos materiais, quer orgânicos quer inorgânicos [10]. Entre as tecnologias que utilizam esta técnica destaca-se a Microscopia Eletrónica de Varrimento (*SEM–Scanning Electron Microscopy*) e a microscopia eletrónica de transmissão (*TEM–Transmission Electron Microscopy*). O primeiro conceito da SEM foi descrito por M. Knoll em 1935. Mais tarde, Von Ardenne, em 1938, realizou algumas experiências neste sistema analítico, no qual adaptou as bobinas usadas na TEM, bem como outros componentes que ainda hoje estão presentes nestes equipamentos, tornando-se uma ferramenta imprescindível em vários campos de investigação, como por exemplo na medicina, biologia e na química [8].

O princípio geral do funcionamento da SEM está ilustrado na Figura 5. Resumidamente, na SEM um feixe de eletrões é produzido por efeito termiónico num filamento de tungsténio aquecido pela passagem de uma corrente elétrica. De seguida, estes eletrões são acelerados em direção ao ânodo por um campo elétrico produzido por uma diferença de potencial elétrico aplicada entre o cátodo e o ânodo, passando depois por lentes eletromagnéticas, as quais pela ação de um campo magnético, têm como principal função a focagem do feixe de eletrões sobre a amostra. Estes sistemas utilizam o feixe de eletrões incidente na amostra para produzir uma variedade de fenómenos físicos com objetivo de observar e analisar a superfície da amostra, bem como o volume desta no qual os eletrões conseguem penetrar. Entre os processos físicos principais, destacam-se: a produção de eletrões secundários (SE) e eletrões retrofundidos (BSE), ambos recolhidos por detetores específicos e utilizados em

modos diferentes de formação de imagem, e a produção de raios-X de fluorescência, que são a base da espectrometria de fluorescência de raios-X (XRF) utilizada na obtenção da composição elemental [8-10].

A Microscopia Eletrônica Analítica (AEM) baseada na SEM (AEM/SEM) para além de ser uma técnica multi-elemental e não destrutiva, apresenta outras vantagens que são úteis em diferentes ramos. A elevada ampliação no intervalo de $5\times$ a $300000\times$ permite a realização de observações a uma escala nanométrica, produzindo imagens de elevada resolução espacial da superfície da amostra. A AEM/SEM torna-se uma ferramenta essencial e prática na investigação devido à sua capacidade de selecionar diferentes regiões de estudo, e posteriormente, à análise sequencial das partes selecionadas, sendo possível a comparação *on-line* dos espectros de energia dos raios-X durante aquisição dos dados. A rapidez na identificação e quantificação dos elementos atômicos presentes nas amostras é uma das maiores vantagens, uma vez que após alguns segundos consegue formar um espectro de energia dos raios-X com boa estatística e representativo da amostra. A possibilidade de se conseguir trabalhar com imagens obtidas em modos diferentes, i.e. com boa resolução espacial ou com bom contraste, é também importante dependendo do tipo de análise que está a ser desenvolvido. Adicionalmente, a possibilidade da realização do mapeamento dos elementos atômicos constitui uma mais-valia, permitindo determinar a distribuição dos elementos atômicos na amostra.

Por outro lado, esta técnica possui algumas desvantagens, entre elas salienta-se o custo do microscópio, a preparação de amostras muito laboriosa [11] e ainda, uma relativamente baixa sensibilidade da técnica, que depende do elemento em análise, e que é tipicamente $\sim 10^3$ ppm [13].

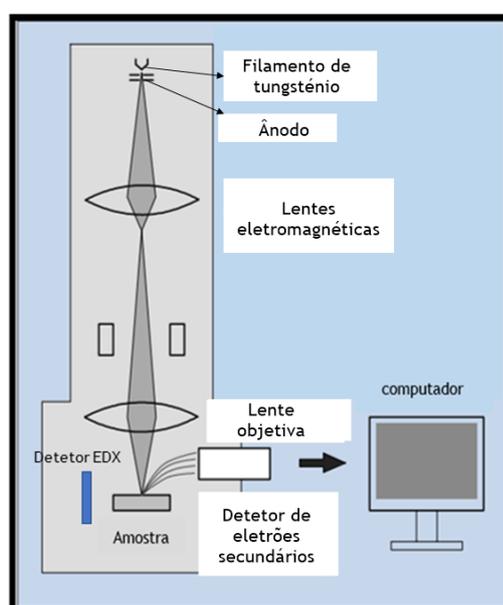


Figura 5 - Esquema exemplificativo do princípio geral do funcionamento da SEM, com os constituintes principais do microscópio eletrônico de varrimento (adaptado de [8]).

O princípio geral do funcionamento da TEM difere da SEM no facto de o feixe de eletrões incidente ser transmitido pela amostra a analisar, a qual terá de ser muito fina, com espessura sub-micrométrica. Entre as vantagens da TEM salienta-se a obtenção de imagens com elevada resolução espacial, numa escala sub-nanométrica, do interior da amostra, e.g. imagens da morfologia celular, organelos e ainda de alterações de efeitos citoplasmáticos. A principal desvantagem desta técnica está relacionada com a necessidade de utilizar amostras muito finas para o feixe de eletrões incidente ser transmitido [9,13].

1.2.2 A Fluorescência de Raios-X baseada em Radiação de Síncrotrão (SRXRF)

Uma técnica que tem como base a fluorescência de raios-X (XRF) é a fluorescência de raios-X baseada em radiação de síncrotrão (SRXRF), a qual é proveniente de eletrões que são acelerados a grandes velocidades, próximas da velocidade da luz, e quando esta interage com uma amostra provoca a emissão de raios-X de fluorescência [7,15]. Trata-se de uma técnica não destrutiva que apresenta uma boa resolução espacial [7], dada a possibilidade de obter um feixe de fótons de raios-X incidente da radiação de síncrotrão com dimensões sub-micrométricas. Por outro lado, como desvantagens salienta-se a necessidade de otimizar todas as amostras para se obter uma boa resolução espacial e uma boa precisão. Caso a referida optimização dos tecidos não seja efectuada, serão necessários durante a análise tempos de permanência relativamente longos por píxel para alcançar um limite de deteção (sensibilidade) adequado, podendo por vezes o mapa elementar resultante conter informações lacunadas de certas partes de interesse da amostra [14]. Por último, como desvantagem não poderíamos deixar de referir de que esta se trata de uma técnica muito dispendiosa [25] dada a exigência de um acelerador de síncrotrão.

1.2.3 Emissão de Raios-X por Indução de Partículas (PIXE)

Na técnica PIXE um feixe de prótons produzido por um acelerador de partículas com energia suficiente para ionizar os átomos [15] incide sobre a amostra, resultando na emissão de raios-X de fluorescência. Trata-se de uma técnica vantajosa para análises devido à sua rapidez, capacidade multi-elemental [15-17], versatilidade [15], e à sua capacidade não destrutiva [16]. Em contrapartida, a interação do feixe de prótons com certos materiais, sobretudo com número atómico, Z , elevado, pode produzir uma intensidade elevada de radiação de travagem (*bremstrahlung*), o que pode limitar a sensibilidade [15].

1.2.4 Espectrometria de Massa (MS)

A espectrometria de massa (MS), contrariamente às técnicas de produção de raios-X de fluorescência que utilizam a interação de radiação ionizante (eletrões, prótons, raios-X, etc) com a matéria para obter informações sobre a amostra, é uma técnica que tem como

princípio básico a produção de íons e a sua separação a partir da razão entre a massa e a carga (m/q), permitindo a identificação, bem como a quantificação dos íons, logo dos elementos atômicos das amostras. Nesta técnica a amostra é vaporizada e convertida em íons pela fonte de ionização, geralmente em catiões devido a perda dos elétrons. Posteriormente, estes são transferidos para um analisador de massa, onde são desviados por um campo magnético de acordo com a sua razão m/q , e posteriormente contados por um detetor de íons (Figura 6) [18,19].

Apesar de ser uma técnica de análise multi-elemental e de elevada sensibilidade, podendo distinguir íons com razões m/q muito próximas [18,19], apresenta algumas desvantagens, entre as quais: a incapacidade de observar diferenças morfológicas devido a mudanças físicas, induzidas pelos procedimentos de preparação [20], bem como por ser uma técnica destrutiva [21]. Para colmatar certas desvantagens da MS surgiu a técnica de espectrometria de massa de plasma acoplado indutivamente por ablação a laser (LA-ICP-MS), constituindo uma das técnicas mais poderosas na espectrometria, a qual facilita a construção de mapas da distribuição dos elementos na amostra, entre outras vantagens que discutimos a seguir [11].

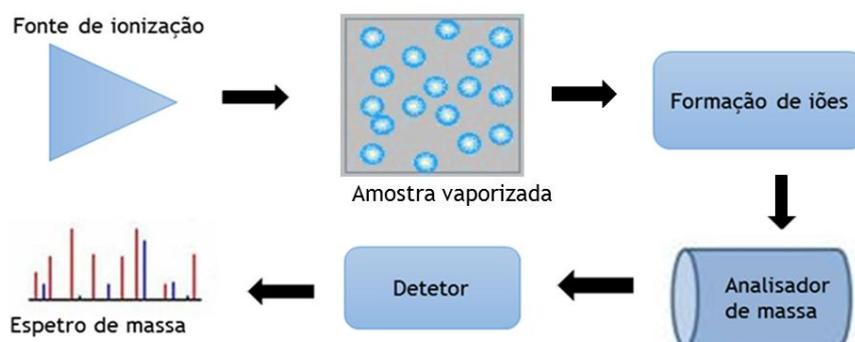


Figura 6 - Esquema com os constituintes principais de um espectrômetro de massa.

A LA-ICP-MS é uma técnica que se baseia na utilização de uma fonte de luz laser associada a um espectrômetro de massa de plasma acoplado indutivamente (ICP-MS). O laser pelas suas propriedades específicas produz um feixe de luz com intensidade elevada que é focada na superfície da amostra com objetivo de converter uma pequena quantidade de massa em vapor, transformando-se assim num aerossol [11, 14]. Este processo designa-se por ablação a laser (LA). De seguida, estas partículas gasosas são transportadas por um fluxo de gás para a fonte de ionização, onde os átomos são ionizados através de um plasma acoplado indutivamente, sendo depois transportados para o analisador de massa (Figura 7) [22, 23].

A LA-ICP-MS, para além, de ser uma técnica multi-elemental com excelente limite de detecção (sensibilidade) [25], permite a construção de mapas bi-dimensionais dos elementos atômicos, facultando deste modo um mapa da distribuição dos elementos nas amostras com uma elevada resolução espacial (de 10 μm a 200 μm) [11], proporcionando assim dados mais

precisos e fiáveis. As amostras não necessitam de qualquer preparação, podendo estas ser condutoras ou não condutoras [10,26]. Em contrapartida, esta técnica possui algumas limitações e.g. interferências espectrais [22,25] e ocorrências de fracionamento elemental, devido a baixa volatilidade de alguns elementos, favorecendo a formação do aerossol para um determinado elemento atômico. Ao mesmo tempo, esta técnica apresenta-se como sendo uma técnica destrutiva, na medida que a ablação por laser provoca o aquecimento do tecido, proporcionando uma destruição local e por vezes na vizinhança dependendo das condições de funcionamento do feixe de incidência e do tamanho da amostra a analisar [24].

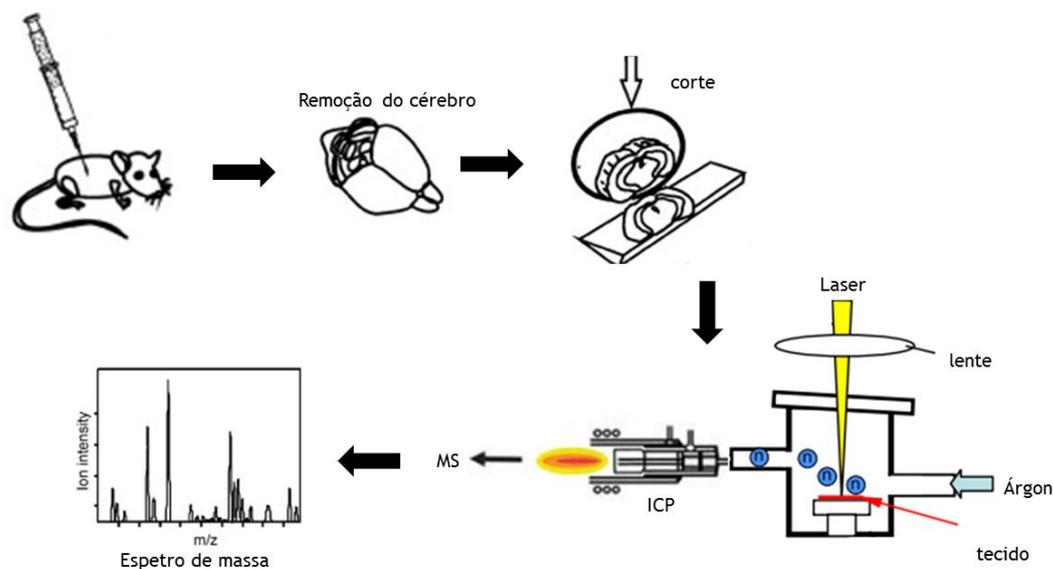


Figura 7 - Esquema representativo da LA-ICP-MS. O laser é focado na amostra formando partículas que ao misturar-se com um fluxo de argônio vão ser transportadas para a região do ICP, onde são ionizadas através do plasma acoplado indutivamente, e posteriormente são levados para um analisador de massa (adaptado de [11,23,25]).

1.2.5 Espectrometria de Absorção Atômica (AAS)

A espectrometria de absorção atômica (AAS) baseia-se na utilização de uma fonte de calor, que pode ser em forma de chama ou por forno de grafite, com a capacidade de dissociar os átomos das amostras, i.e. capaz de os converter em átomos livres no seu estado fundamental através da quebra das suas ligações químicas. De seguida, a radiação incidente proveniente de uma fonte de luz, fornece energia suficiente para excitar os átomos livres constituintes da amostra, absorvendo fótons com um comprimento de onda específico do elemento atômico, passando para o seu estado excitado. Estas transições formam espectros de absorção, o que leva à identificação e quantificação dos elementos presentes na amostra em análise [26]. O monocromador seleciona o comprimento de onda específico do elemento que se pretende analisar, e seguidamente a intensidade de luz com esse comprimento de onda é medida num detetor de luz (Figura 8) [26]. O que torna esta técnica num potencial método analítico é a sua elevada sensibilidade, sendo possível a análise de amostras líquidas, como sangue e urina,

de baixo volume (5–10 μl) [20]. No entanto, as principais desvantagens passam essencialmente por algumas interferências espectrais e não espectrais, pela impossibilidade de se fazer simultaneamente a análise multi-elemental e ainda por ser uma técnica destrutiva [20, 27].

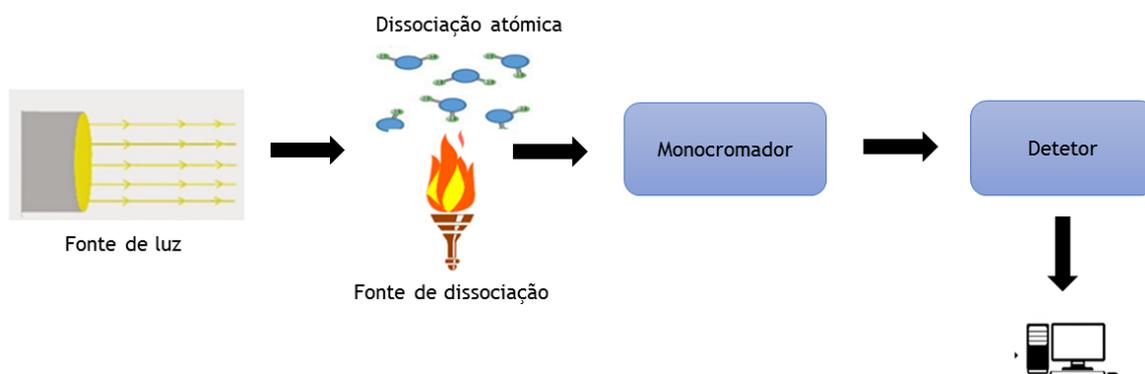


Figura 8 - Esquema representativo da espectrometria de absorção atômica.

1.2.6 Análise por Ativação com Neutrões (NAA)

A técnica NAA baseia-se na interação de neutrões com os núcleos-alvo das amostras, originando novos núcleos que se encontram num estado nuclear excitado. Estes núcleos instáveis irão decair para um estado nuclear mais estável, emitindo raios gama com energia específica da espécie nuclear (e que permite identificar o respetivo elemento atômico) que são medidos por detetores semicondutores [27, 28]. Devido à capacidade multi-elemental, à elevada sensibilidade e ainda à capacidade não destrutiva da amostra, a NAA ocupa uma das técnicas mais importantes em métodos analíticos. Apesar das suas vantagens, esta técnica possui claras desvantagens: a preparação da amostra é um processo laborioso, a medição de um grande número de elementos atômicos constitui um procedimento moroso e ainda a utilização de um feixe de neutrões, que terá de ser produzido em reatores nucleares ou em aceleradores, ou que provém de radioisótopos emissores de neutrões [29].

Tabela 2 - Resumo das principais vantagens e desvantagens de algumas técnicas espectrométricas.

Técnica	Vantagens	Desvantagens
AEM/SEM	<ul style="list-style-type: none"> Análise multi-elemental [9]; Não destrutiva [9]; Rapidez; Elevada resolução espacial [12]; Mapas bi-dimensionais [12]; 	<ul style="list-style-type: none"> Baixa sensibilidade [13]; Elevado custo [11]; Preparação de amostras trabalhosa [11];
SRXRF	<ul style="list-style-type: none"> Análise multi-elemental [7]; Não destrutiva [7]; Alta resolução espacial [7,25]; Mapas bi-dimensionais [14]; Elevada precisão [14]; 	<ul style="list-style-type: none"> Otimização das amostras para obter uma boa resolução espacial e precisão [11]; Elevado custo, presença do sincrotrão [7];
PIXE	<ul style="list-style-type: none"> Análise multi-elemental [15]; Não destrutiva [15, 31]; Rapidez [16]; 	<ul style="list-style-type: none"> Otimização das amostras; Elevado custo, presença do acelerador de partículas [15].
MS	<ul style="list-style-type: none"> Análise multi-elemental [18,30]; Elevada sensibilidade [30]. 	<ul style="list-style-type: none"> Destrutiva [18]; Elevado custo [18]
LA-ICPMS	<ul style="list-style-type: none"> Análise multi-elemental [11]; Rapidez [25] Elevada sensibilidade [25,16]; Mapas bi-dimensionais [25]; 	<ul style="list-style-type: none"> Destrutiva [24]; Elevado custo [27]
AAS	<ul style="list-style-type: none"> Análise multi-elemental [26]; Baixo custo [26]; 	<ul style="list-style-type: none"> Interferência espectrais e não espectrais [20]; Destrutivo [20];
NAA	<ul style="list-style-type: none"> Multielemental [29]; Não destrutiva [29]; Elevada sensibilidade [29]; 	<ul style="list-style-type: none"> Morosa [28]; Elevado custo, presença do reator nuclear [28];

1.3. Doença de Parkinson

A doença de Parkinson (DP) é uma doença neurodegenerativa cuja perda de neurónios dopaminérgicos na *substantia nigra* (SN), provoca a diminuição do neurotransmissor dopamina, no estriado [31]. A perda deste neurotransmissor pode resultar na inibição de certas conexões ao tálamo e ao estriado, dificultando os movimentos e coordenação dos pacientes com DP [32]. A comunicação neuronal é assegurada pelas funções de certos iões, inclusivamente a comunicação que ocorre na via nigroestriatal. Neste último tipo de comunicação, a desordem associada aos processos pelos quais a mesma ocorre, pode desencadear mudanças críticas no organismo, promovendo por vezes uma cascata de acontecimentos, que podem, em último caso, culminar numa disfunção cerebral [32]. Na figura 9 apresenta-se um esquema representativo da referida comunicação neuronal que depende de elementos químicos na sua forma iónica, cuja função principal é a criação e condução do impulso nervoso, que é conseguida através do comportamento homeostático de alguns iões. A propagação do impulso nervoso faz-se através do fluxo de iões, positivos e negativos, ao nível da membrana celular do axónio. Num estado de repouso que corresponde à ausência de estímulos na superfície interna da membrana celular do neurónio esta encontra-se carregada negativamente em relação à superfície externa da membrana, que se encontra carregada positivamente. A diferença de potencial elétrico entre as duas faces da membrana (potencial de membrana) deve-se principalmente, à distribuição desigual dos iões de sódio (Na^+) e potássio (K^+) dentro e fora do neurónio, por ação de bombas. Quando o neurónio recebe um estímulo, a polaridade da membrana celular é trocada - despolarização -, devido à passagem do impulso nervoso, e o neurónio passa a ter um potencial de ação. Após a passagem do impulso nervoso, a membrana celular volta ao seu estado inicial polarizado - repolarização - e o neurónio retoma ao seu estado de repouso.

Diversas hipóteses têm sido propostas para explicar a origem da DP. Para cada uma delas são apontadas disfunções ao nível de diferentes mecanismos intracelulares, sendo por isso aceite que a DP é uma doença de etiologia multifactorial. A produção de radicais livres [38], disfunção mitocondrial [32], predisposição genética [40] e ainda a exposição a neurotoxinas ambientais [40] são alguns fatores associados a DP.

Os corpos de Lewis (CL) são considerados uns dos marcadores bioquímicos da DP, podendo ser encontradas em outras doenças degenerativas. Tais corpos são inclusões citoplasmáticas eosinofílicas com uma estrutura esférica anormal no interior das células nervosas, podendo ser considerada como marcador de perda neuronal [41]. Segundo um estudo feito por Y. Kimula et al., identificaram por espectrometria de fluorescência de raios-X que os CL continham P, S, e Ca [42]. Um outro estudo, construíram uma bioimagem da distribuição de Cu, Mn, Fe e Zn em modelos de cérebros de rato com DP, através da utilização de LA-ICP-MS, no qual mostraram concentrações elevadas destes elementos na SN em ratos doentes [43].

As regiões cerebrais, descritas como estando afetadas em diversas doenças neurodegenerativas têm sido alvo de estudo. Assim para melhor compreender os mecanismos celulares envolvidos no desenvolvimento das mesmas, tem sido desenvolvidas tecnologias que contêm características indispensáveis que permitem conhecer os elementos químicos presentes nestas regiões, extraindo resultados comparativos entre modelos de animais com doença e saudáveis

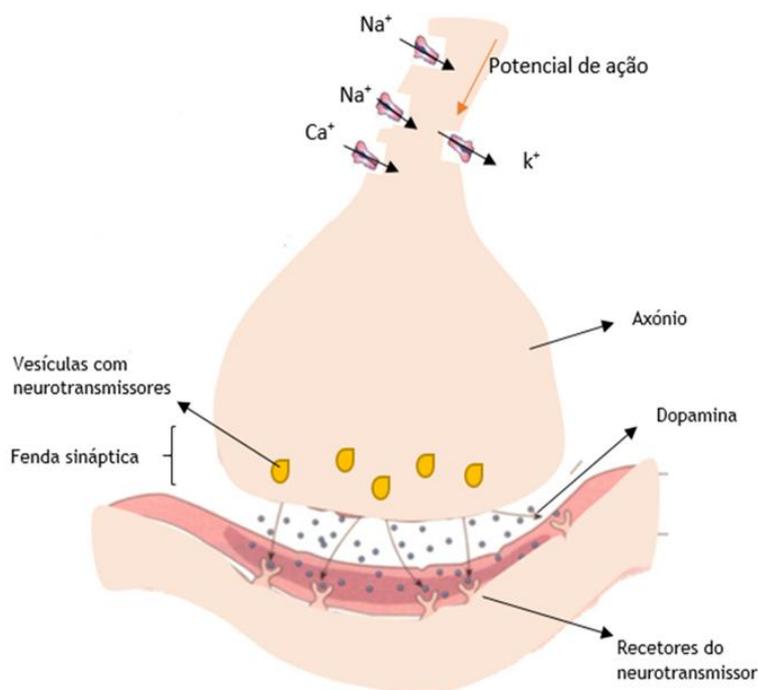


Figura 9 - Esquema da fenda sináptica. O potencial de ação que chega ao neurônio promove a abertura dos canais de Na^+ , despolarizando a membrana. Ocorre também a abertura dos canais de Ca^{2+} , que proporciona o deslocamento das vesículas contendo neurotransmissores para a extremidade do neurônio, sendo depois libertada para a fenda sináptica. De seguida, os neurotransmissores libertados na fenda ligam-se aos receptores que se localizam na membrana do neurônio pós-sináptico, provocando a abertura dos canais de Na^+ nesse neurônio propagando a transmissão neuronal [33].

Deste modo, dada a importância da homeostase de elementos químicos situados nestas regiões do cérebro para o bom funcionamento do mesmo (e.g. ver a tabela 3), e sendo crucial o desenvolvimento/otimização de técnicas mais eficazes na medição destes elementos, o presente trabalho tem como objetivo a otimização das condições de operação da AEM baseada na SEM (AEM/SEM), e a sua aplicação na identificação e quantificação dos elementos atômicos presentes em tecido cerebral de murghanos com e sem neurodegeneração dopaminérgica induzida pela exposição à neurotoxina MPTP. Pretende-se com este estudo discriminar as diferenças quantitativas de vários biometais em tecido cerebral das regiões da SN de um modelo animal da doença de Parkinson comparativamente à mesma região cerebral de animais saudáveis.

Tabela 3 - As principais funções de alguns elementos químicos que podem ser encontrados no cérebro.

Sódio, Na	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Está envolvido na excitação das células nervosas através dos potenciais de ação [31]; ✓ É usado por muitos sistemas como um meio de transporte secundário, como por exemplo no transporte de glutamato [32]; ✓ Importante na diferenciação neuronal [33].
Fósforo, P	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Tem um papel importante nas atividades metabólicas das células, logo níveis adequados de fósforo garantem uma adequada função cerebral e desenvolvimento cognitivo [34]; ✓ É um dos componentes importantes na produção de trifosfato de adenosina (ATP), para a síntese e metabolismo das proteínas e na produção de hormona como a vitamina D [33, 35].
Enxofre, S	<ul style="list-style-type: none"> ✓ O enxofre ligado ao ferro desempenha funções importantes na transferência de elétrões [36]; ✓ Pode atuar como anti-oxidante [37]; ✓ É um dos elementos que está mais presente nos proteossomas e estão integrados em aminoácidos como a cistina e a metionina, que são importantes para manter a estrutura de certas proteínas e defesas do organismo [36].
Cloro, Cl	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Normalmente encontra-se em equilíbrio com o sódio e o potássio [35]; ✓ Em sinapses inibitórias a membrana pós-sináptica possui canais iônicos de cloro, controlados quimicamente, que causam a hiperpolarização da membrana e diminuem a probabilidade de esta gerar um potencial de ação [33, 35].
Potássio, K	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Tem um papel importante na transmissão do sinal elétrico [35]; ✓ É fundamental no controlo da despolarização da membrana [35]; ✓ Importante na excitabilidade neuronal [35,39]; ✓ Os canais de potássio quando se ligam a certos complexos têm funções regulatórias [39].
Cálcio, Ca	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Tem função excitaria nas células [32]; ✓ Importante no estabelecimento de equilíbrio e na interação com outros neurónios [39]; ✓ Importante na regulação de certas enzimas [39,40]; ✓ Responsável pela libertação de vesículas sinápticas [35,40]; ✓ Importante na sinalização celular [39].

2. Sistema Experimental e Metodologia

2.1 Microscópio eletrónico de varrimento

O sistema de microscopia eletrónica analítica (AEM) baseada na SEM (AEM/SEM) utilizado no decurso deste trabalho tem por base um microscópio eletrónico de varrimento (SEM), modelo S-3400N da Hitachi (Figura 10), o qual é composto por um canhão de eletrões (canhão de emissão termiónica), um sistema de lentes eletromagnéticas, um colimador metálico, uma plataforma móvel para os porta-amostras, um detetor semiconductor de raios-X e por dois detetores de eletrões, um semiconductor e um de cintilação (Fig.11) [8,9].



Figura 10 - Fotografia do microscópio eletrónico de varrimento, modelo S-3400N da Hitachi. Laboratório de Microscopia Eletrónica do Centro de Óptica da Universidade da Beira Interior.

O canhão de eletrões é constituído por um filamento muito fino de tungsténio ligado a uma fonte de tensão que ao ser atravessado por uma corrente elétrica aquece, emitindo eletrões por efeito termiónico em todas as direções. Uma parte destes eletrões atravessa a abertura do elétrodo *Wehnelt*, que está posicionado entre o cátodo (filamento) e o ânodo [8,9]. Pela aplicação de uma diferença de potencial positiva entre o cátodo e o elétrodo *Wehnelt* a intensidade da corrente de eletrões é ajustada e a secção transversal do feixe possui um diâmetro de 15–20 μm [9]. De seguida, o feixe de eletrões é acelerado em direção ao ânodo (o qual possui um orifício central para os eletrões o atravessarem), pela aplicação de uma diferença de potencial negativa no intervalo de 0.3–30 kV entre o cátodo e o ânodo, produzindo feixes de eletrões com energia cinética no intervalo de 0.3–30 keV [9,44].

De seguida o feixe de elétrons atravessa um sistema de duas lentes eletromagnéticas, designadas de lentes condensadoras, as quais são constituídas por bobines de cobre percorridas por uma corrente elétrica, e que produzem campos magnéticos [8]. O campo magnético formado na zona central das lentes tem como função primordial focar os elétrons em direção à amostra [7-9]. Entre as lentes condensadoras e a lente objetiva (última lente eletromagnética) existe uma placa de metal com 4 orifícios de diâmetros diferentes que podem ser colocados no caminho do feixe de elétrons e que funcionam como colimadores [13]. Estes orifícios são designados de abertura da lente objetiva. Os diâmetros de abertura disponíveis são: 30, 50, 80 e 100 μm [44], tendo sido usada no presente trabalho a abertura de 100 μm . Antes da lente objetiva existe bobines defletores que provocam uma deflexão do feixe, fazendo um varrimento deste feixe de elétrons (em direções X e Y) sobre a amostra [9]. A lente objetiva é a última lente pela qual os elétrons passam antes de atingir a amostra e é responsável pela convergência do feixe de elétrons sobre a amostra, formando um pequeno *spot* com um diâmetro típico de ≈ 10 nm [6-9].

Na figura 11 é apresentado uma região do microscópio em redor da amostra (Figura 11) onde se indicam os valores de alguns parâmetros geométricos importantes para a espectrometria de fluorescência de raios-X (XRF) por energia dispersiva (EDXRF) utilizada neste trabalho, tais como a distância de trabalho, WD, i.e. a distância entre a superfície inferior da lente objetiva e a amostra, a posição angular do detetor de raios-X (designada por *take-of angle*) relativamente à superfície da amostra, a distância do detetor de raios-X à amostra e o seu diâmetro.

Por fim, o porta-amostras encontra-se sobre uma plataforma móvel segundo as direções, X, Y e Z, e que pode rodar no plano XY (Figura 12) [44].

É de salientar ainda que o microscópio pode operar em dois modos de vácuo: o VP-SEM que se refere ao modo pressão variável e que contém ar atmosférico a baixa pressão, e o HV-SEM, que se refere a alto-vácuo na câmara do microscópio [44]. No presente trabalho foi usado o último modo, para que os elétrons provenientes do feixe primário não colidissem com moléculas do ar. O processo de evacuação da câmara é muito rápido, sendo que a sua conclusão ocorre ao fim de ≈ 5 minutos.

O alinhamento do feixe de elétrons é uma condição importante para evitar aberrações e para melhorar a qualidade da imagem. O alinhamento do feixe deve ser feito sempre que há substituição do filamento, quando se altera a tensão ou corrente no *software* do AEM/SEM e quando a abertura da lente objetiva é alterada [44]. É importante que o feixe incidente passe no centro das lentes eletromagnéticas e da lente objetiva e que, simultaneamente, seja paralelo aos referidos elementos. A calibração e alinhamento dos elementos acima descritos são essenciais para o correto funcionamento do microscópio.

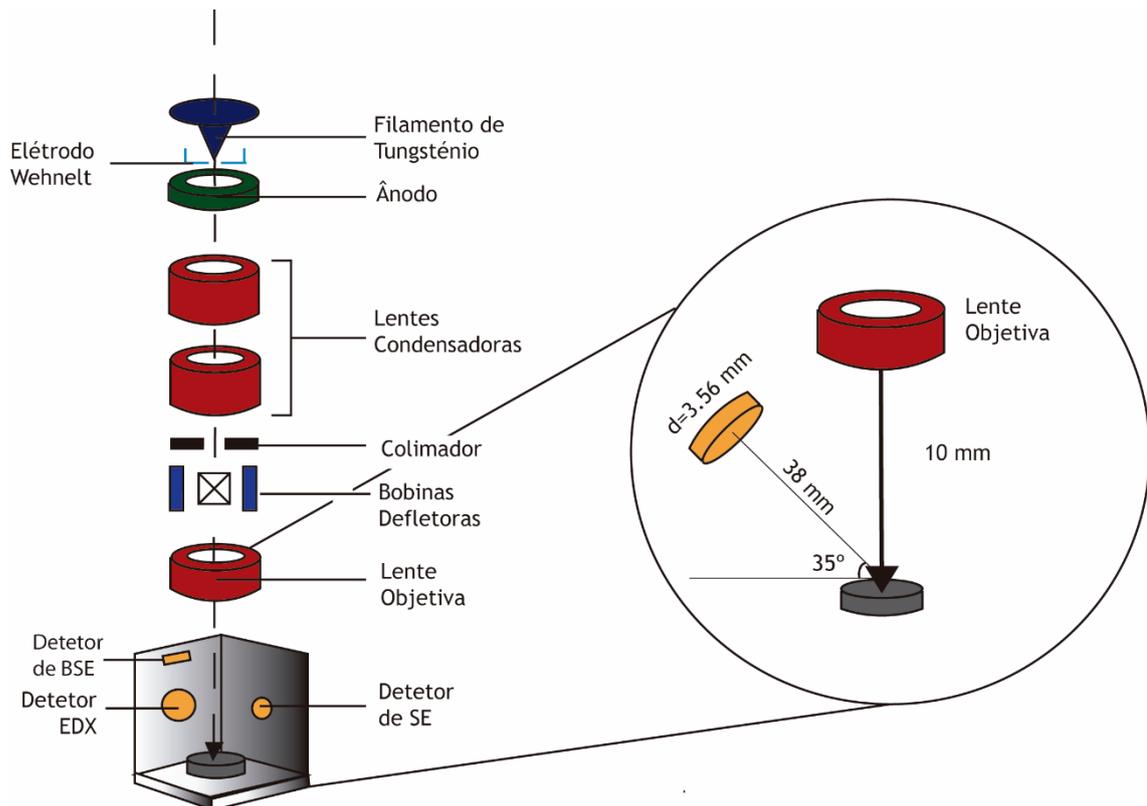


Figura 11 - Esquema do microscópio eletrônico de varrimento (SEM) com os seus principais constituintes. Inclui-se o zoom da região do microscópio em redor da amostra.

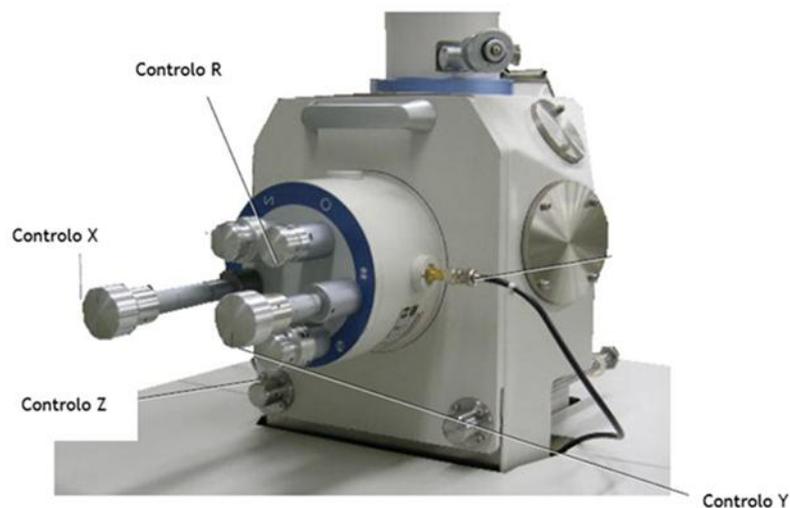


Figura 12 - Controlo do movimento do suporte do porta-amostras segundo os eixos X, Y, e Z e na rotação no plano XY (adaptado de [44]).

Neste trabalho utilizou-se um feixe de elétrons com uma energia de 20 keV, proporcionando uma penetração adequada nestes nas amostras do tecido analisado. A intensidade da corrente de elétrons emitida pelo filamento de tungstênio, que está relacionada com a quantidade de elétrons que atingem a amostra por unidade de tempo, estava no intervalo de $\approx 100\text{--}110 \mu\text{A}$.

Assim, quanto maior esta for, maior é a taxa de elétrons incidente no tecido e, conseqüentemente, maior a taxa de raios-X de fluorescência emitidos que irá atingir o detetor de raios-X.

Note-se que a intensidade da corrente de elétrons emitida pelo filamento exibia um pequeno decréscimo ao longo do tempo, durante o período de irradiação sequencial das amostras de tecido cerebral, de $\approx 2 \mu\text{A}/\text{h}$. Devido a esta instabilidade, posteriormente, as medidas de cada amostra foram corrigidas em concordância para tornar possível a comparação destas. Adicionalmente para evitar que alterações pontuais nas condições de operação do microscópio, não passíveis de serem controladas, entre blocos de medidas, introduzissem variabilidade nas medições, utilizou-se um padrão de Al para realizar a sua correção.

2.2 Princípio de funcionamento da AEM/SEM

Como já se referiu no subcapítulo 1.2.1 a AEM/SEM é uma técnica que utiliza um feixe de elétrons de pequeno diâmetro que vai irradiar a amostra, e que ao interagir com os átomos desta, produz uma variedade de processos físicos que são posteriormente analisados por detetores de radiação adequados. À medida que os elétrons do feixe incidente penetram na amostra, perdem energia, participando em processos físicos que resultam na emissão de elétrons Auger (AE), elétrons secundários (SE), elétrons retrofundidos (BSE) e raios-X característicos, ou de fluorescência (Figura 13) [8, 45].

Estas partículas emitidas (elétrons ou fótons) permitem observar a superfície da amostra e abaixo da superfície através da penetração do feixe de elétrons incidentes e, por sua vez, medir a composição elemental (análise elemental) da amostra. Deste modo, as amostras podem ser analisadas sob o ponto de vista estrutural, morfológico e da sua composição elemental ou atômica [45].

Os elétrons do feixe que bombardeiam a amostra podem participar em dois tipos de interações: a dispersão elástica – na qual o elétron incidente se aproxima do núcleo de um átomo, e conseqüentemente, altera-se a direção da sua trajetória, com alguma perda de energia, mas desprezável, e a dispersão inelástica – na qual o elétron incidente perde parte ou a totalidade da sua energia numa colisão com os elétrons dos átomos da amostra [45].

Quando os elétrons do feixe incidente são muito energéticos, a dispersão elástica ocorre com maior probabilidade, e dado que estes elétrons se aproximam dos núcleos, e devido ao potencial coulombiano do núcleo carregado positivamente, sofrem uma mudança na sua trajetória, por vezes, brusca que resulta na inversão da trajetória e na retrodifusão destes elétrons, os quais acabam por escapar da amostra. Estes elétrons são designados por elétrons retrofundidos (BSE–*Backscattered Electrons*, Figura 13), e como possuem energia próxima da energia incidente [45], fornecem informações de regiões da amostra relativamente profundas. Mais, estes elétrons são sensíveis à composição atômica da amostra – à medida que o número atômico Z dos átomos constituintes da amostra é maior, o rendimento de

produção dos BSE é maior. Logo regiões da amostra com átomos pesados aparecem em tom brilhante na imagem obtida com os BSE.

Por outro lado, quando o feixe de elétrons incidente contém uma energia mais baixa tem a tendência de ceder parte ou totalidade da sua energia para os elétrons dos átomos constituintes da amostra, arrancando os elétrons que estão fracamente ligados, como os elétrons de valência. Estes tipos de elétrons denominam-se de elétrons secundários (SE–Secondary Electrons, Figura 13) e possuem uma energia relativamente baixa até 50 eV [3, 8], logo os que são produzidos em regiões profundas da amostra são rapidamente absorvidos. Apenas os elétrons secundários que são produzidos no topo da superfície da amostra é que são emitidos para o exterior, fornecendo informações topográficas da superfície da amostra. Os SE são sensíveis a topografia da superfície, i.e. o rendimento de emissão dos SE é maior quando o feixe incidente entra obliquamente (e não perpendicularmente) relativamente à superfície das estruturas da amostra. Assim a diferença no brilho da superfície na imagem obtida com os SE é o resultado da diferença do ângulo de incidência do feixe de elétrons [9].

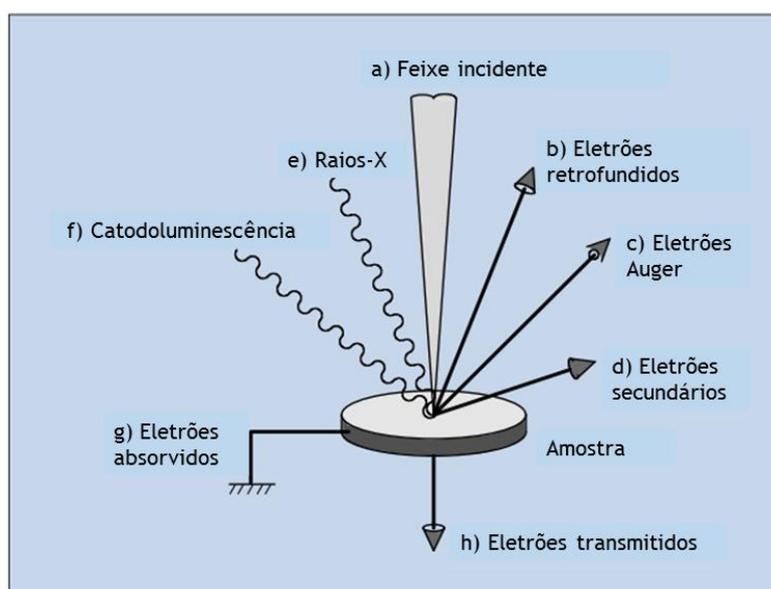


Figura 13 - Partículas emitidas da amostra pela irradiação de um feixe de elétrons (adaptado de [8]).

Durante a penetração do feixe de elétrons incidente na amostra, estes vão perdendo energia, participando em colisões inelásticas com os átomos da amostra, que podem resultar na ionização das suas camadas mais internas, i.e. se a energia dos elétrons incidentes é igual ou superior à energia de ligação do elétron na camada do átomo poderá ocorrer a ejeção deste.

Como consequência, surge uma lacuna na camada, a qual irá ser preenchida por um elétron de uma camada mais externa (ver Figura 3, subcapítulo 1.1). O processo acima descrito provoca uma série de transições eletrônicas no átomo, que pode resultar na emissão de energia sob a forma de raios-X característicos (de fluorescência, Figura 13) [3], com energia

específica que são utilizados na análise elemental da amostra. Este processo é designado de fluorescência de raios-X. Um processo competitivo que pode ocorrer, para a redução da energia interna do átomo, é a emissão de elétrons das camadas mais externas, o qual é designado de efeito Auger (Figura 13). Aqui, o excesso de energia do átomo é dirigido para um elétron de uma camada mais externa, levando à sua ejeção do átomo, a estes elétrons são designados de elétrons Auger, os quais possuem energias também específicas [3,45].

A probabilidade de ocorrer a emissão de raios-X de fluorescência (e não a emissão de elétrons Auger) na sequência da excitação de uma das camadas do átomo é medida pelo rendimento de fluorescência, ω [3]. Na Figura 14 representa-se o ω para as camadas K , L e M em função do número atômico, Z , verificando-se que a probabilidade de formar raios-X de fluorescência aumenta com Z , e que é muito maior na camada K do que na camada L . Na tabela 4, indica-se os valores do rendimento de fluorescência para a camada K , ω_K , de vários elementos de baixo Z .

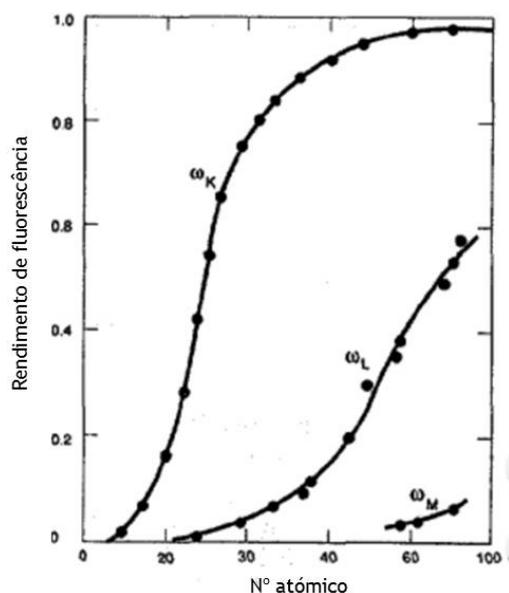


Figura 14 - Rendimento de fluorescência para as camadas K , L e M em função do número atômico, Z (adaptado de [5]).

Tabela 4 - Rendimento de fluorescência de elementos químicos de baixo número atômico [5].

Elementos/Nº atômicos	Rendimento de fluorescência (ω_K)
C/6	0.0025
N/7	0.0055
O/8	0.0085
Na/11	0.0240
P/15	0.060
S/16	0.076
Cl/17	0.094
Ca/20	0.163

Os raios-X característicos ou de fluorescência emitidos na sequência da excitação de elétrons das camadas *K* ou *L* de um átomo são designados de linhas *K* ou *L*, respetivamente, e a energia dos raios-X característicos de cada elemento atômico forma um espectro descontínuo de energias, a partir do qual é possível obter informações qualitativas e quantitativas da composição elemental da amostra.

É de salientar que quando os elétrons do feixe incidente são desacelerados pelos núcleos dos átomos da amostra, vão perdendo energia sob a forma de raios-X [3]. Este tipo de radiação designa-se por *bremstrahlung* ou radiação de travagem, e contribui para formação de um espectro contínuo de energia, que toma como valor máximo a energia do feixe de elétrons incidente, e que será uma parte importante na formação do espectro de fundo (*background*) não apresentado interesse analítico, mas que limita a sensibilidade da AEM [3, 45].

Adicionalmente, ainda podem ocorrer outros processos (Figura 13) na amostra aquando da passagem do feixe de elétrons incidentes, sem relevância para este trabalho, como a catodoluminescência. Aqui, quando o feixe de elétrons atinge um material isolador ou semicondutor, são emitidos fótons com elevado comprimento de onda (baixa energia), situados nas regiões do espectro eletromagnético referentes às radiações UV, visível e IV [6,45].

Por outro lado, os elétrons do feixe incidente que perdem toda a sua energia na amostra, acabam por ser absorvidos pela matéria, e, portanto, contribuem para uma corrente elétrica que é drenada para a terra [10], evitando-se assim o carregamento elétrico da superfície da amostra. Daí para as amostras não condutoras é necessário a deposição de um filme fino condutor sobre estas.

Por último, para amostras muito finas uma parte do feixe de elétrons incidente é transmitido.

2.3 Sistema de deteção de raios-X e de elétrons

Os detetores têm como função principal converter a energia dos raios-X/elétrons que chegam ao detetor num impulso elétrico. O processo de conversão depende do modo de interação do feixe incidente com o material que constitui o detetor. No SEM utilizado o sistema de deteção é composto por dois detetores semicondutores de Si, um para a deteção dos BSE e outro para os fótons de raios-X, e ainda por um detetor de cintilação para os SE [20, 44]. De seguida apresentam-se apenas as características do detetor de raios-X, que é fundamental para os resultados deste trabalho.

2.3.1 Detetor de raios-X e sistema de eletrónica de leitura

Neste trabalho, o espectrómetro de fluorescência de raios-X por dispersão em energia (EDXRF), é composto por um detetor semicondutor de silício, do tipo SDD – *Silicon Drift Detector*, modelo X-Flash 5010 da Bruker [44], caracterizado por uma excelente resolução em

energia (5.895 keV). O detetor é constituído por um cristal de Si com 0.45 mm de espessura ativa e uma área ativa de 10 mm² (∅ 3.56 mm). Acima da região ativa do detetor (região de depleção) existe uma pequena camada morta de Si com 0.029 µm. Uma janela de raios-X muito fina, modelo AP3.3 da Moxtek, com elevada transmissão de raios-X de baixa energia, que é utilizada para separar a superfície do detetor da câmara da amostra do SEM, mantendo vácuo no caminho dos raios-X (Figura 15) [44].

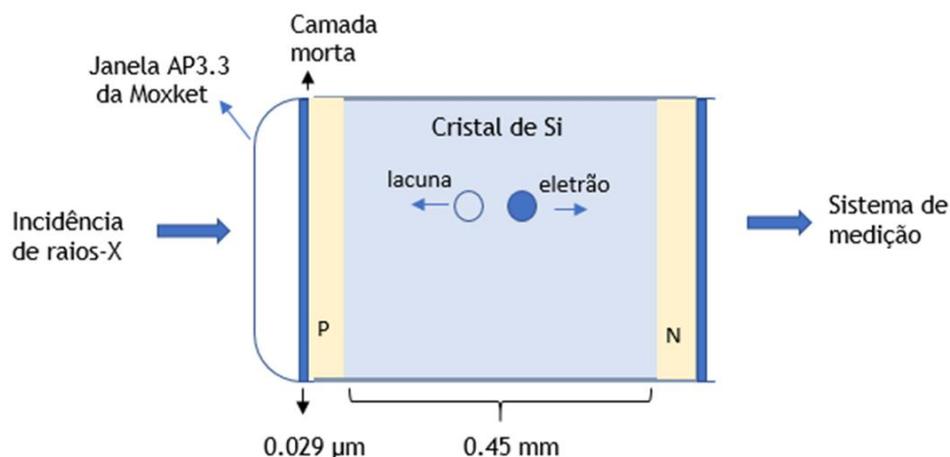


Figura 15- Detetor semicondutor de EDX.

A janela de raios-X do detetor (Figura 16) é constituída por um polímero ultrafino que permite uma boa transmissão para raios-X de baixa energia (tabela 5) sendo suportada por uma estrutura de silício que garante uma alta resistência mecânica, resultando numa área aberta de ≈70% [46], e possui ainda uma cobertura fina de alumínio, que rejeita a luz visível, UV e IV.



Figura 16 - Fotografia da janela de raios-X, modelo AP3.3 da Moxtek [46].

Tabela 5 - Transmissão máxima para as energias $K\alpha$ de vários elementos para janela de raios X AP3.3 [46].

Elemento/Z	Transmissão máxima ($K\alpha$) %
Be/4	9
B/5	29
C/6	47
N/7	31
O/8	47
F/9	54
Na/11	69
Al/13	75
Si/14	74

Quando os raios-X emitidos da amostra atingem a região ativa do detetor de Si depositando a sua energia E_0 , por absorção fotoelétrica, são produzidos pares elétron-lacuna cujo número, N_{par} , é dado por [5]:

$$N_{par} = \frac{E_0}{\varepsilon_{par}} \quad (2)$$

com ε_{par} , a energia média para produzir um par elétron-lacuna no Si, tomando um valor de ≈ 3.62 eV. De seguida, estes pares derivam sob a ação de um campo elétrico, estabelecido na região de depleção do detetor por uma diferença de potencial elétrico negativa aplicado entre os dois elétrodos metálicos em Au depositados sobre as camadas tipo-p e tipo-n do Si [5, 16], originando um impulso em tensão na saída do primeiro andar da eletrônica de leitura, i.e. na saída do pré-amplificador de carga, cuja amplitude é proporcional à carga produzida (ou ao N_{par} logo a E_0) pelo raios-X incidente [16]. Note que o pré-amplificador de carga tem como função converter o impulso em corrente gerado pela deriva dos portadores de carga (elétrons e lacunas) no detetor num impulso em tensão (carga) [5, 6]. De seguida este impulso é lido por uma amplificação/formatação (um amplificador linear), que permite, simultaneamente, amplificar e moldar a forma do impulso [5,47], garantindo uma boa relação, relação sinal-ruído na saída. Por fim, o impulso entra num analisador multicanal (MCA) com 4096 canais que gera o espectro de energia dos raios-X detetados (Figura 17) [16]. O MCA é constituído por um conversor analógico-digital (ADC) que converte a amplitude do impulso num número binário que contém a informação da energia do evento (raios-X) detetado, o qual será acumulado num histograma [16], onde se representa o número de eventos detetados (contagens) em função da sua energia, i.e. o espectro de energia dos raios-X.

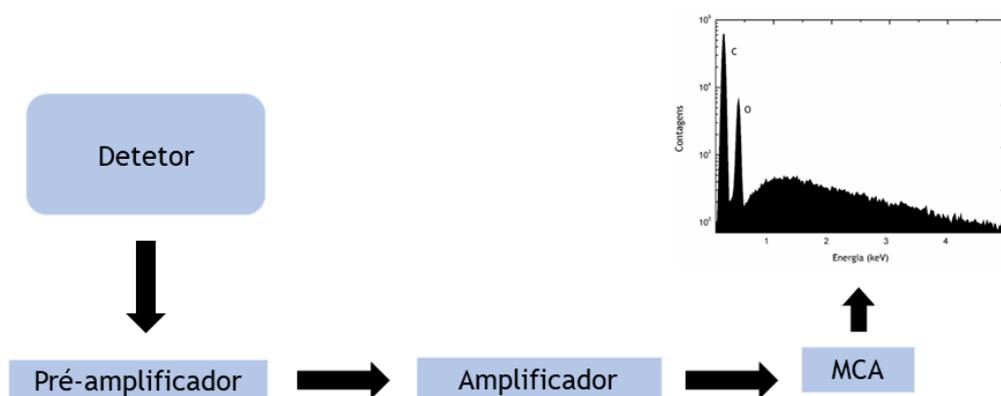


Figura 17 - Esquema com o sistema de detecção de raios-X.

Uma vez que o espectrómetro de EDXRF deve detetar e resolver (i.e. distinguir as energias, ver secção seguinte) raios-X de baixa energia, é necessário um sistema de arrefecimento do detetor de Si e da entrada do pré-amplificador de carga, para reduzir o ruído elétrico do sistema de detecção. Para tal é utilizada uma célula de Peltier, que funciona como um refrigerador termoelétrico, que garante um arrefecimento até temperaturas no intervalo de -40° – -30° C [44].

2.3.1.1 Resolução em energia do sistema de detecção de raios-X

A resolução em energia do sistema de detecção mede a capacidade do sistema de distinguir dois valores de energia de raios-X muito próximos entre si, e pode ser medida observando a resposta do sistema para raios-X monoenergéticos, a qual se traduz num pico gaussiano no espectro de energia (Figura 18). Deste modo uma medida direta da resolução em energia é dada pela largura a meia-altura (*FWHM – Full-Width at Half-Maxium*) do pico, a qual se relaciona com o desvio padrão σ da gaussiana [7]:

$$FWHM = 2.35\sigma \quad (3)$$

Deste modo, quanto menor for a *FWHM*, melhor será resolução em energia, uma vez que a magnitude das flutuações da energia medida também é menor.

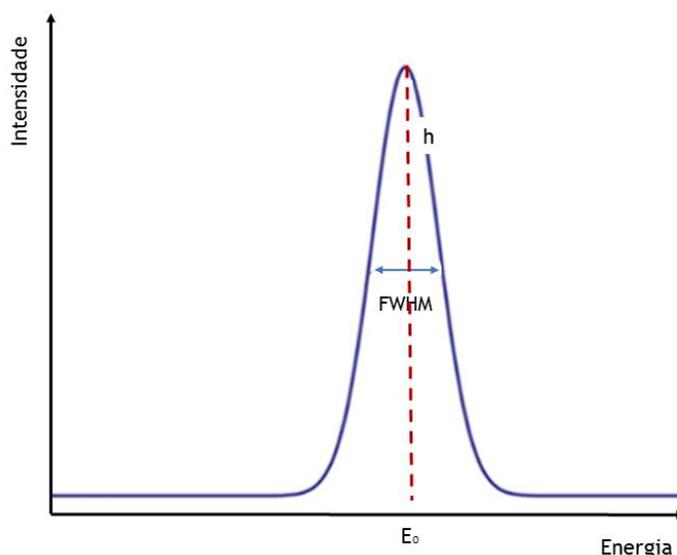


Figura 18 - Representação de uma distribuição gaussiana para a resposta a raios-X monoenergéticos com a energia E_0 . Na figura está representado a altura h do pico com energia E_0 e a largura a meia-altura (FWHM). O valor médio da distribuição, designado de centróide, mede a energia E_0 .

Para o sistema de detecção de raios-X baseado no detetor de Si, temos duas contribuições principais para a resolução em energia, $FWHM$: as flutuações estatísticas no número de portadores de carga produzido pelos raios-X de energia E_0 , i.e. no número de pares elétron-lacuna, e o ruído elétrico proveniente do detetor e da eletrônica de leitura [6, 47]. Deste modo a $FWHM$ total para a energia E_0 é dada por [7]:

$$FWHM = 2.35 \sqrt{F \epsilon_{pair} E_0 + \sigma_{noise}^2} \quad (4)$$

com F o fator de Fano, uma constante empírica, introduzido para corrigir a estatística de Poisson, a qual não explica as flutuações estatísticas observadas para o número de pares elétron-lacuna, e que toma um valor de ≈ 0.11 para o Si, e o σ_{noise} é o desvio padrão que caracteriza o ruído elétrico do sistema ($RMS - Root-Mean-Square$), o qual é fortemente dependente da temperatura do detetor de Si e da entrada do pré-amplificador de carga. [6,7]

Na Figura 19 apresenta-se a resolução em energia, $FWHM$, para as linhas de emissão K_{α} de vários elementos atômicos de baixo Z identificados nos espectros de energia medidos no decorrer deste trabalho (C, N, O, Na, P, S e Ca) e ainda para o Mn (5.895 keV) usado na calibração em energia do sistema, tomando para este caso o excelente valor de 124.5 eV.

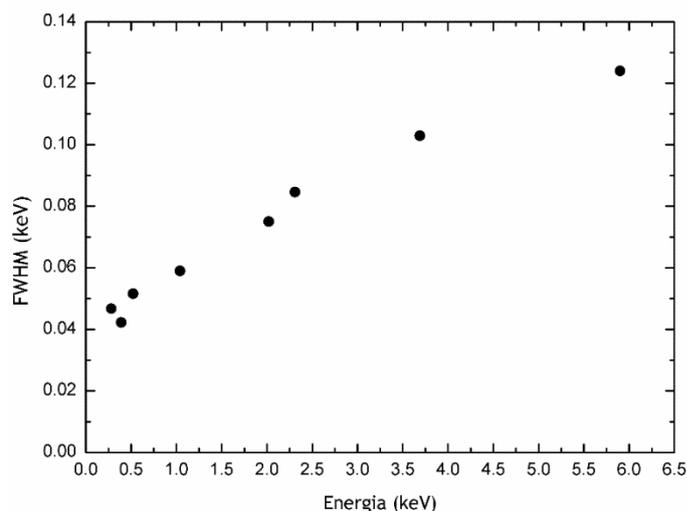


Figura 19 - Resolução em energia para as linhas K_{α} de alguns elementos atômicos identificados nas amostras.

2.4 Preparação e montagem das amostras

A composição elemental das amostras de tecido cerebral, foi avaliada num modelo *in vivo* da doença de Parkinson, induzida pela exposição de murganhos a metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina (MPTP), e cedidos pela Doutora Ana Clara Cristóvão.

O cérebro foi seccionado em fatias coronais de $\approx 30 \mu\text{m}$ de espessura sendo a SN totalmente recolhida entre as coordenadas -2.80 a -3.80 mm relativamente ao bregma [48]. Os estudos foram realizados em 8 fatias onde a primeira fatia corresponde à SN anterior e a última à SN posterior. As fatias têm um espaçamento de $\approx 180 \mu\text{m}$ entre elas, e as 8 fatias totais analisadas representam toda a SN do murganho.

Para o estudo da composição elemental dos tecidos, analisaram-se as regiões da SN do grupo controlo (murganhos injetados com o veículo, i.e. salino) e do grupo exposto a MPTP (Figura 20). De forma a remover possíveis vestígios dos tampões usados durante o processo de recolha e processamento das amostras, com potencial de interferir com as avaliações posteriores por EDXRF, todos os tecidos analisados foram lavados durante ≈ 30 minutos em água MilliQ. Depois cada uma das fatias foi colocada no respetivo porta-amostras de alumínio sobre uma fita adesiva previamente fixada (Figura 21) e, de seguida, foram colocados a $\approx 37^{\circ}\text{C}$ durante um intervalo de 16–18 horas, para permitir a sua desidratação. Note que a espessura das fatias cerebrais é reduzida durante a desidratação para valores no intervalo de 10–15 μm .

No dia da análise por AEM/SEM, e uma vez que se usou o modo de operação do SEM de alto-vácuo foi necessário revestir todas as amostras com uma pequena cobertura de carbono recorrendo a um evaporador térmico. Esta cobertura tem tipicamente uma espessura no intervalo de 10–20 nm, e permite que as amostras se tornem condutoras para os eletrões do feixe incidente (Figura 21).

De seguida as fatias de tecido nos porta-amostras foram colocadas sobre a plataforma móvel na câmara do SEM, e esta é evacuada, até se atingir o alto-vácuo. As regiões do tecido cerebral avaliado foram selecionadas de modo a incluírem a SN (SN *pars compacta* + SN *reticular*).

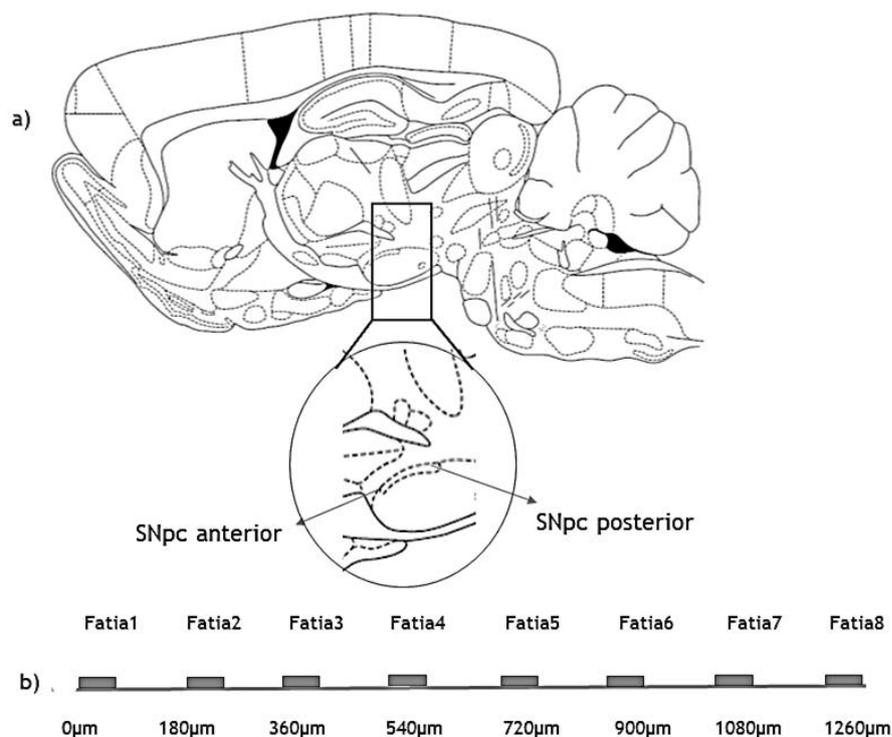


Figura 20 - a) Esquema de um corte sagital, de acordo com o atlas anatómico do cérebro de murganho, indicando a totalidade da região de estudo, indicando a SN anterior e a SN posterior. b) Esquema relativo à SN representada pelas 8 fatias com 30 µm de espessura e um espaçamento de 180 µm entre elas, cuja a primeira fatia corresponde ao lado da SNpc anterior e a última fatia ao lado SNcp posterior, assim, a fatia 1= 0µm, fatia 2=180µm, fatia 3=360µm, fatia 4= 540 µm, fatia 5=720µm, fatia 6=900µm, fatia 7=1080 µm, fatia 8=1260 µm.

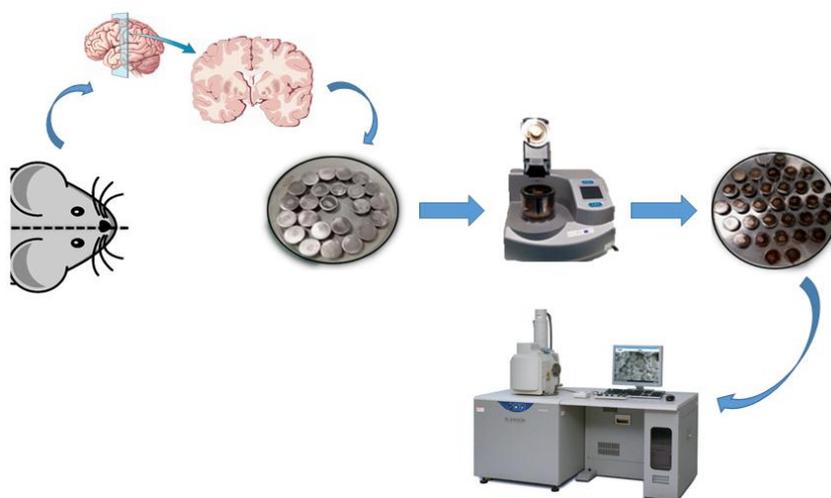


Figura 21 - Diagrama esquemático representativo das etapas associadas ao procedimento experimental realizado no presente trabalho.

2.4.1 Análise à composição elementar da fita adesiva

Antes de se ter procedido à análise dos tecidos, foi realizada uma análise, por AEM/SEM, à fita adesiva (modelo 71-002 112, da Micro- to-Nano) utilizada para fixar as fatias do tecido cerebral aos porta-amostras. A análise permitiu confirmar que a fita adesiva era composta por C e O, e não por quaisquer outros elementos que interferissem com a análise elementar dos tecidos (Figura 22).

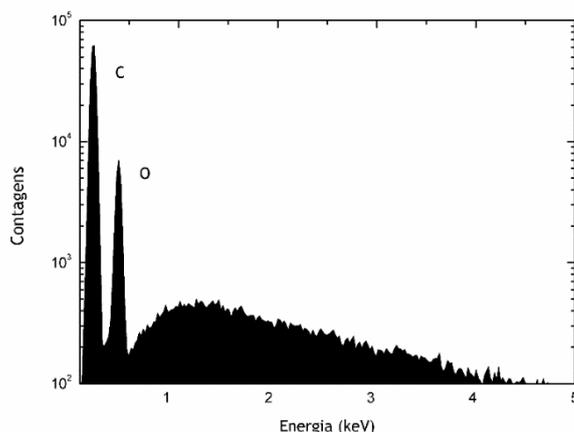


Figura 22 - Espectro em energia dos raios-X para a fita-adesiva irradiada com o feixe de elétrons.

2.5 Tratamento dos espectros de energia

Neste trabalho, cada espectro de energia dos raios-X medido para as amostras é processado de modo a extrair o número de eventos líquido (i.e as contagens) correspondente às energias K_{α} de vários elementos atômicos detetados. Deste modo, foi utilizado um procedimento típico, onde para cada pico de energia dos raios-X de fluorescência se ajustou uma curva gaussiana sobreposta sobre uma linha reta, que caracteriza os eventos do fundo (*background*) que resultam de raios-X contínuos provenientes maioritariamente da radiação de travagem nas amostras, i.e. do *bremsstrahlung* [5, 6].

Para a realização dos ajustes foi necessário previamente escolher uma região de interesse (ROI–*Region-of-Interest*) em redor de cada pico de energia (ver um espectro de energia típico obtido neste trabalho com uma amostra de tecido cerebral (Figura 23)). Deste modo, a escolha do ROI implicou a escolha de um intervalo de energia, que contenha, o mais centralizado possível, o pico de interesse, para tal foi escolhido uma distância de 6σ . Considerando o pico no ponto central, verifica-se uma distância de -3σ para o limite inferior do ROI e uma distância de $+3\sigma$ para o limite superior do ROI. O critério da seleção do ROI tem em consideração a resolução em energia *FWHM* medida para o pico de energia E_0 . Assim para todos os picos medidos, definiu-se a ROI como:

$$ROI \approx E_0 \pm 3\sigma \approx E_0 \pm 1.27 FWHM \quad (5)$$

Através da expressa acima, fez-se uma tabela do ROI usado em alguns elementos identificados nas medições feitas ao tecido cerebral.

Tabela 6 - ROI para os vários elementos atômicos detetados.

Elemento	$E_{K\alpha}$ (keV)	ROI (keV)
Carbono	0.27	0.21-0.34
Azoto	0.39	0.33-0.44
Oxigênio	0.52	0.45-0.59
Sódio	1.04	0.92-1.07
Fósforo	2.01	1.91-2.10
Enxofre	2.30	2.19-2.41
Cálcio	3.69	3.56-3.81

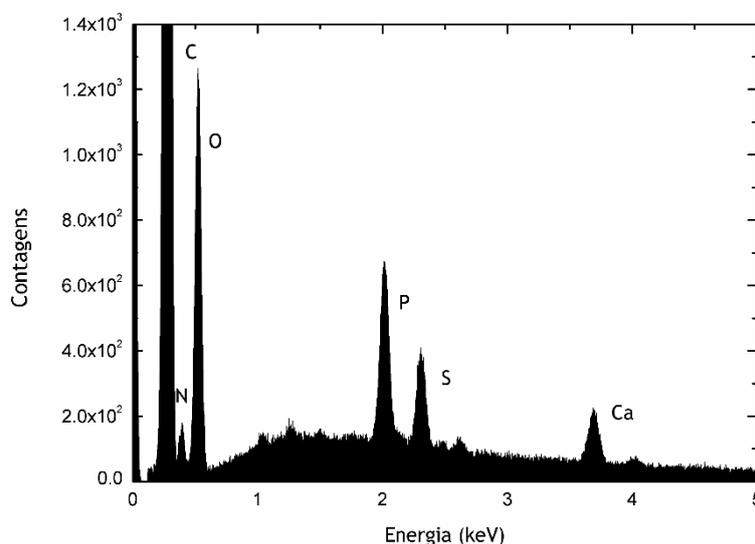


Figura 23 - Espectro de raios-X obtido para uma fatia cerebral, no qual se identifica vários picos dos elementos atômicos mais importantes.

O tratamento dos espectros foi realizado recorrendo ao *software OriginPro8* usando o bloco de estatística. Assim após definir o ROI para cada pico de energia E_0 , procedeu-se ao respetivo ajuste com a seguinte função $C(E)$ para extrair as contagens líquidas do pico:

$$C(E) = a + bE + \frac{A}{\sigma\sqrt{2\pi}} e^{-\frac{(E-E_0)^2}{2\sigma^2}} \quad (6)$$

Onde os parâmetros a e b caracterizam o fundo debaixo de cada pico, A (área) da gaussiana e mede as contagens líquidas para cada elemento. Os restantes parâmetros da gaussiana já foram definidos acima.

Seguidamente, comparou-se os resultados obtidos pelo nosso método, com os resultados dados pelo *software* de análise do SEM (2013 Bruker Nano, Berlin, Germany) – o *software* ESPRIT – de modo a validar ambos os resultados.

2.6 Medição da área de tecido irradiada

Durante os estudos de AEM, a área da região SN sobre as fatias de tecido cerebral foi selecionada, com o *software* ESPRIT (da Bruker) de micro-análise do SEM. No entanto, dada a geometria da região SN, não foi possível a medição direta da área superficial irradiada. Assim para o cálculo das áreas usou-se o *software* ImageJ, importando a imagem obtida pelo *software* ESPRIT em formato JPEG. Aqui desenhou-se uma linha fechada por cima do contorno da região SN previamente analisada por EDXRF, extraíndo assim a área em cada fatia em ambos os grupos de animais. Na figura 24 mostra-se as medições da área total analisada para cada animal (soma para as 8 fatias). Os valores médios obtidos foram de 8.96 mm² e 9.35 mm², para o grupo controlo e para o grupo MPTP, respetivamente.

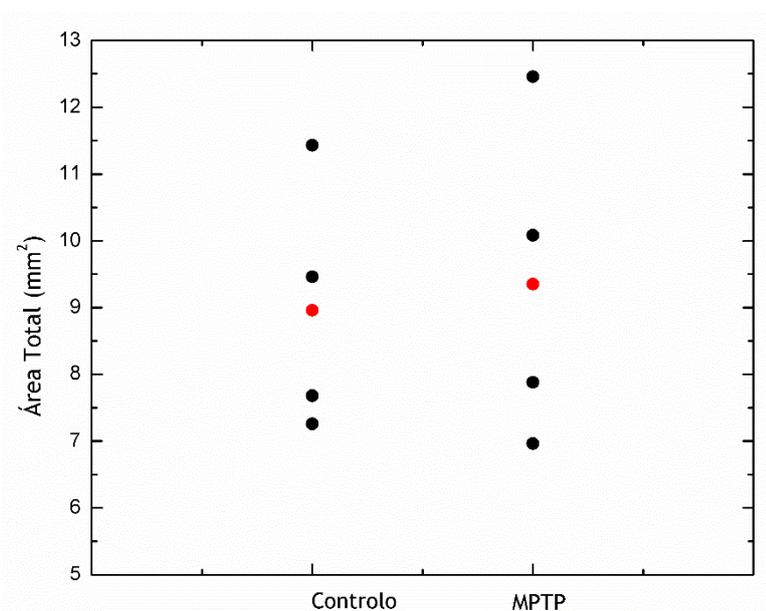


Figura 24 - Área total da SN para os 4 animais em ambos os grupos, controlo e MPTP, onde se indicam os valores médios obtidos.

2.7 Análise Estatística

A significância estatística das diferenças entre os grupos experimentais controlo e MPTP foi avaliada através de um *unpaired Student's t-test* e através de um teste *one-way ANOVA*, usando o GraphPad Prism (GraphPad Software, San Diego, CA, EUA). As diferenças foram consideradas significativas quando $p < 0.05$. Os dados experimentais são dados como média \pm SD ($n=4$ para cada condição experimental), com SD o desvio padrão.

3. Resultados e Discussão

3.1 Otimização das condições de irradiação das amostras

Com intuito de se estudar os elementos atômicos que estão presentes nos tecidos e a quantificação dos mesmos procedeu-se a seleção dos parâmetros do feixe de elétrons incidente nas amostras, nomeadamente a energia e a corrente de emissão do feixe incidente (100–110 μA , ver subcapítulo 2.1), e por outro lado as condições de operação do espectrómetro de EDXRF, tais como o tempo de aquisição, a taxa de contagem máxima, e a % de tempo morto, e ainda a distância de trabalho, o modo imagem (SE ou BSE) e a ampliação no SEM.

Para trabalhar com a melhor resolução em energia possível a taxa de contagem foi limitada a 90 kContagens/s. O tempo de aquisição utilizado foi ≈ 105 s para um *live-time* selecionado de 100 s, fazendo uso das condições enunciadas foi obtido um tempo morto do sistema inferior a 5%.

O modo de imagem utilizado no AEM/SEM foi o baseado nos elétrons retrodifundidos (BSE) uma vez que fornece informações estruturais sobre regiões da amostra relativamente profundas, e não apenas da sua superfície. A ampliação da imagem era de 35 \times , assegurando uma escolha mais rápida da região da SN e do lado do hemisfério a analisar. A distância de trabalho foi de 10 mm.

Por forma a avaliar qual o melhor valor de energia a utilizar no feixe de elétrons incidente nas amostras, que permita a realização de uma análise mais interna dos tecidos, evitando potenciais contaminantes pela maior exposição superficial dos tecidos ao seu tratamento, e que permita também analisar um maior volume representativo da SN, foi realizada uma simulação numérica do alcance da sonda de elétrons em tecido cerebral com recurso ao *software* CASINO (Université de Sherbrooke, Québec, Canada).

Para testar o funcionamento do programa, procurou-se por simular primeiramente para H_2O (Figura 25), cuja composição atômica estava previamente definida na base de dados do programa (uma fração mássica de H de 0.666 e de O de 0.333). Pretendia-se através desta simulação prévia na água, estudar o comportamento dos elétrons. Os parâmetros definidos para se proceder à simulação numérica da H_2O passaram por um feixe incidente com 5×10^4 elétrons com uma energia de 20 keV, pois foi a energia usada no decorrer do trabalho e pretende-se com esta simulação perceber o comportamento dos elétrons com a energia usada durante as análises.

No presente *software* para se proceder à simulação foi importante a introdução de parâmetros, como o número de elétrons (5×10^4 elétrons), a energia, a espessura do tecido (30 μm), a composição da amostra em fração mássica e ainda se considerou que a incidência do feixe com o tecido era normal. Posteriormente, procurou-se simular para um tecido equivalente ao tecido saudável de estudo (Figura 26), para isso foi necessário recorrer ao

software *ESPIRIT* do AEM-SEM e retirar as frações mássicas dos elementos químicos identificados no tecido cerebral saudável. No entanto, dada a falta de informação relativamente ao hidrogénio (H), recorreu-se a tabelas padrão [49], a fim de se completar essa informação. Todas as percentagens atómicas foram corrigidas de modo a incluir H, depois procedeu-se ao cálculo do alcance médio para o tecido biológico com a composição equivalente ao presente tecido de estudo. As frações atómicas definidas para o tecido equivalente foram 0.05, 0.70, 0.03, 0.20, 0.01, 0.007, 0.003 para C, N,O, Na, P,Se Ca, respetivamente.

Foi simulado para o display do software 500 eletrões, assim cada linha azul representada na figura 25 e 26, indica uma trajetória de cada eletrão incidente no tecido, enquanto as linhas vermelhas indicam os eletrões retrofundidos.

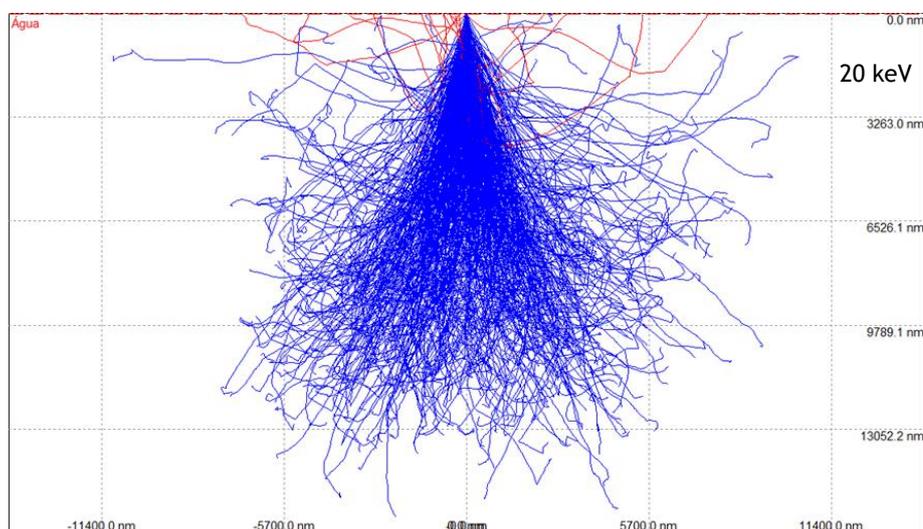


Figura 25 - Simulação trajetória dos eletrões na H₂O para a energia de 20 keV. No display do software utilizou-se 500 eletrões, assim cada linha azul indicam os eletrões retrofundidos.

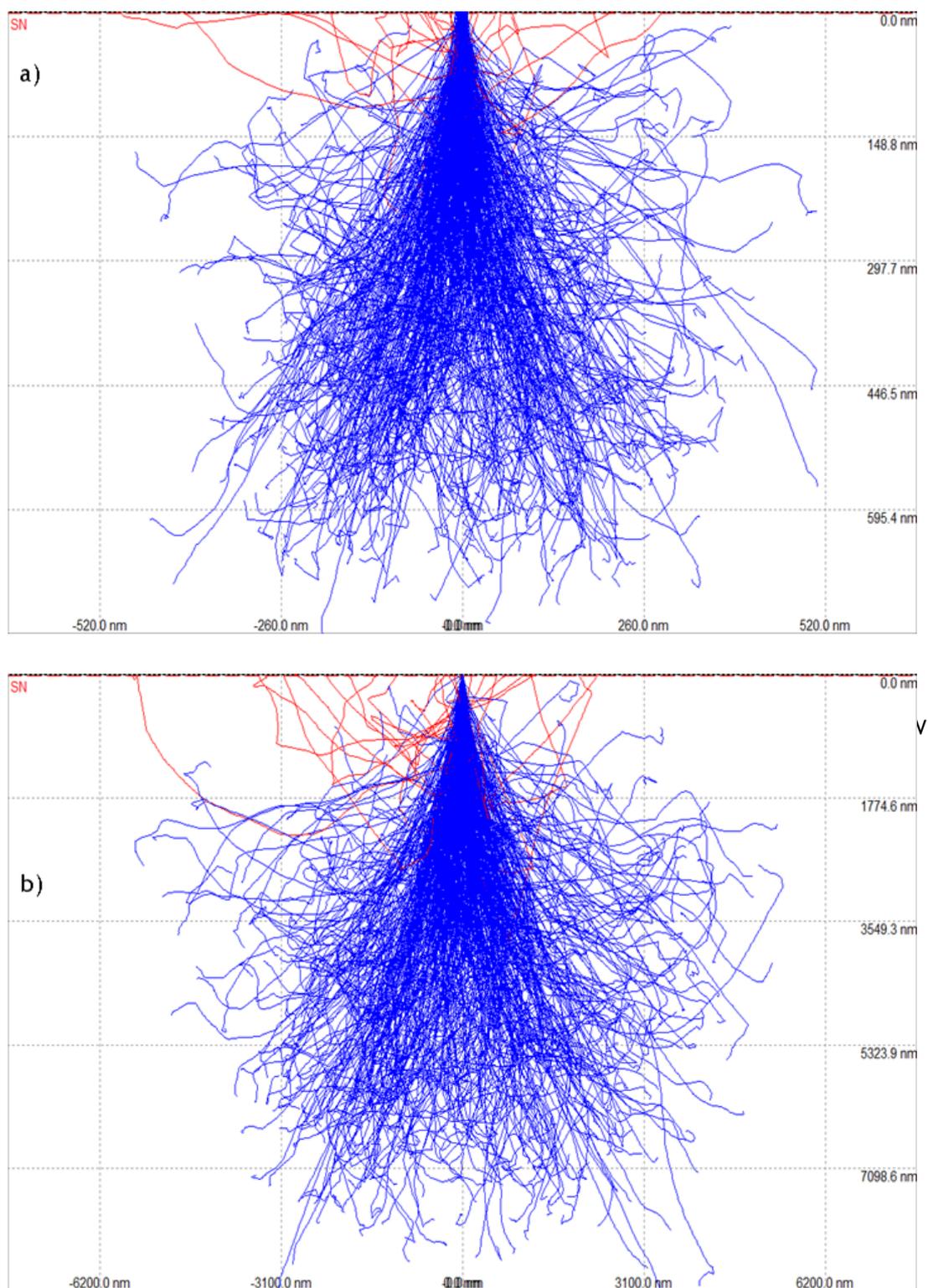


Figura 26 - Simulação da trajetória dos elétrons no tecido saudável equivalente à composição de SN realizada para diferentes energias: a) 5 keV e b) 20 keV. No display do software utilizou-se 500 elétrons, assim cada linha azul indicam os elétrons retrofundidos.

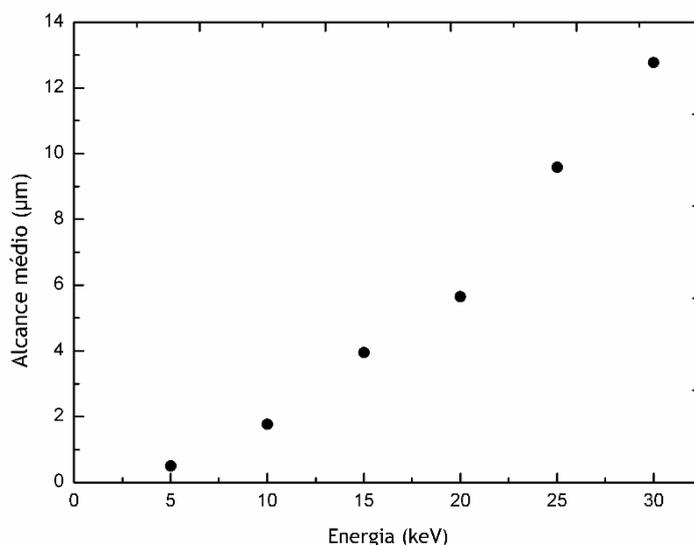


Figura 27 - Alcançe médio (μm) em tecido cerebral, com uma composição atômica equivalente à SN do grupo controle, em função da energia do feixe de elétrons.

Na tabela 7, resumiram-se os parâmetros do feixe de elétrons e do sistema AEM/SEM estabelecidos durante a avaliação do tecido cerebral.

Tabela 7- Características do feixe de elétrons e do sistema AEM/SEM.

Energia	20 keV
Corrente de emissão do feixe de elétrons	100-110 μA
Tempo de aquisição/live-time	105 s/ 100 s
Distância de trabalho	10 mm
Ampliação	35x
Modo de imagem	BSE

3.2 Análise ao tecido cerebral

A otimização feita para a análise dos tecidos constitui um dos objetivos do presente trabalho, assim como também a realização de um estudo dos elementos presentes no tecido cerebral, mais precisamente da região da SN e à comparação da concentração destes elementos entre os dois grupos em estudo. Para se proceder à análise e comparação dos níveis dos elementos químicos, o feixe de elétrons e o sistema AEM/SEM foram primeiramente calibrados de acordo com os parâmetros anteriormente referidos (tabela 7), procedendo seguidamente à análise e por fim a seleção da região da SN. Assim nas figuras 28 e 29 pode-se observar as 8 fatias da região SN do tecido cerebral do animal 3 controle e do animal 3 do grupo MPTP, ao longo da profundidade. Já na figura 30, representa-se espectros de energia das linhas $K\alpha$ dos elementos químicos detetados para as 8 fatias de ambos os grupos de estudo.

Neste gráfico observa-se que os elementos identificados nos animais controlo foram P, S e Ca, por sua vez no grupo MPTP, os elementos medidos foram Na, P e S. Os elementos C e O [49] encontram-se em maior concentração relativamente aos restantes elementos praticamente em todos os tecidos biológicos, daí ter sido possível a identificação destes elementos em ambos os grupos através desta técnica. O elemento N também foi identificado tanto no grupo de controlo como no de MPTP, uma vez que este elemento é característico de tecidos biológicos é espectável que seja encontrado nos tipos de tecidos utilizados no presente estudo.

Ao longo das medições efetuadas, outros elementos em quantidades minoritárias foram identificados, como Mg, Al, Cl e K, somente em algumas fatias. O que sugere uma presença destes elementos em quantidades muito residuais. i.e. com um número de contagens líquidas $N_L < 3 \times \sqrt{C_B}$ (com C_B o número de contagens do *background* na ROI do pico), logo inferiores ao limite de deteção do sistema [50]. Estes elementos podem não ser identificados em algumas fatias por causa do elevado limite de deteção da técnica e à presença de uma intensidade elevada de *background*.

Realizou-se a média dos resultados obtidos nos quatro animais de cada um dos grupos, esses pontos foram representados ao longo da profundidade da SN e expressam as intensidades médias de fluorescências de raios-X, para cada um dos elementos químicos (Figura 31 a)). Cada fatia representa uma posição na região da SN, no qual a primeira fatia corresponde à SNpc anterior e a última fatia à SNcp posterior (ver Figura 17 b)).

Para uma melhor interpretação dos resultados obtidos, foram também traçados gráficos específicos para cada elemento, onde foram comparadas a soma das contagens obtidas para esse mesmo elemento entre o grupo controlo e MPTP, estes gráficos permitem uma análise mais intuitiva dos resultados obtidos no sentido de se estabelecer uma comparação mais direta entre os grupos (Figura 31 b)).

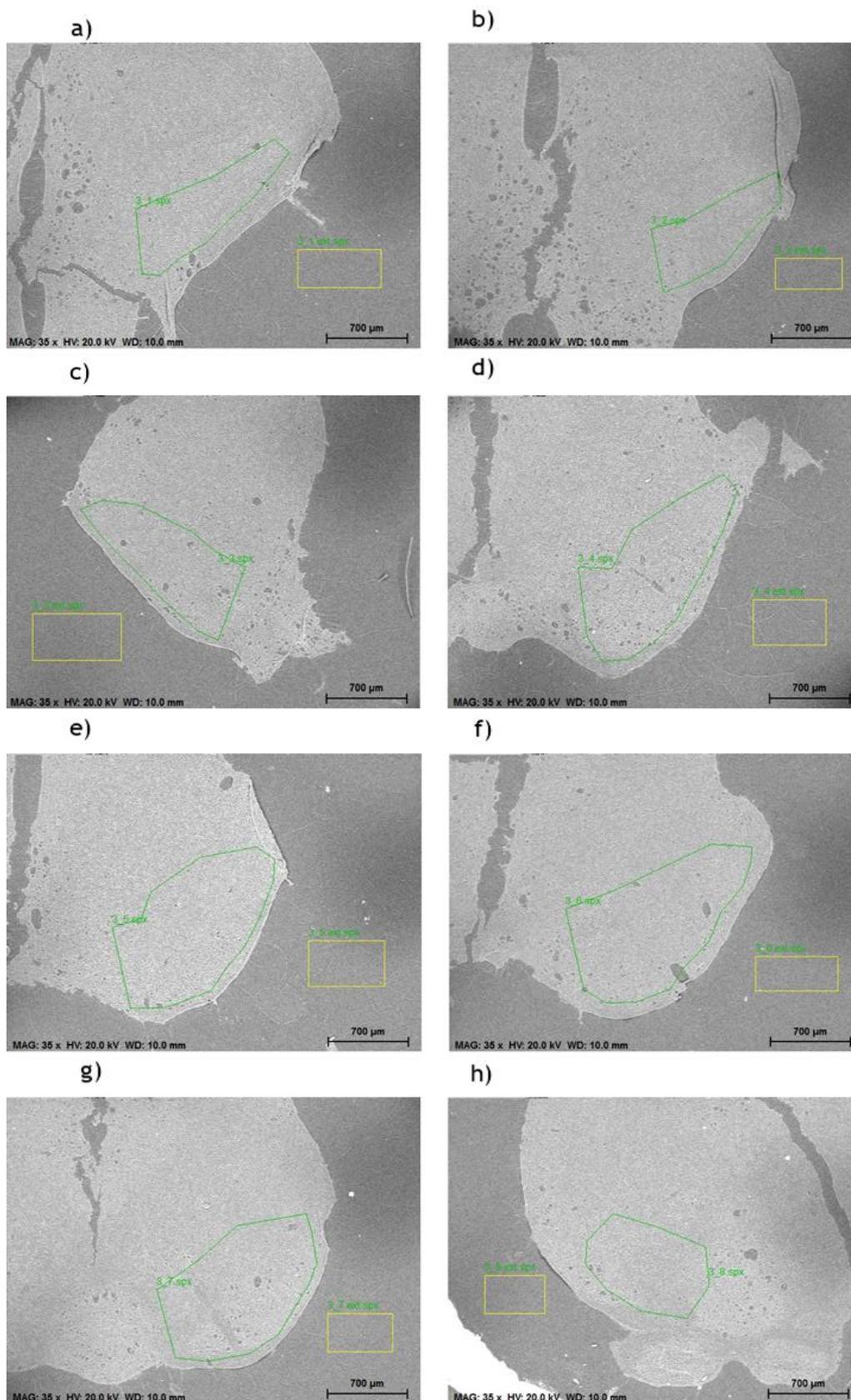


Figura 28 - Região da SN delimitada a verde para as diferentes fatias do tecido cerebral para grupo de controlo, ao longo da profundidade: a) fatia 1= 0µm, b) fatia 2=180µm, c) fatia 3=360µm, d) fatia 4= 540 µm, e) fatia 5=720µm, f) fatia 6=900µm, g) fatia 7=1080 µm, h) fatia 8=1260 µm.

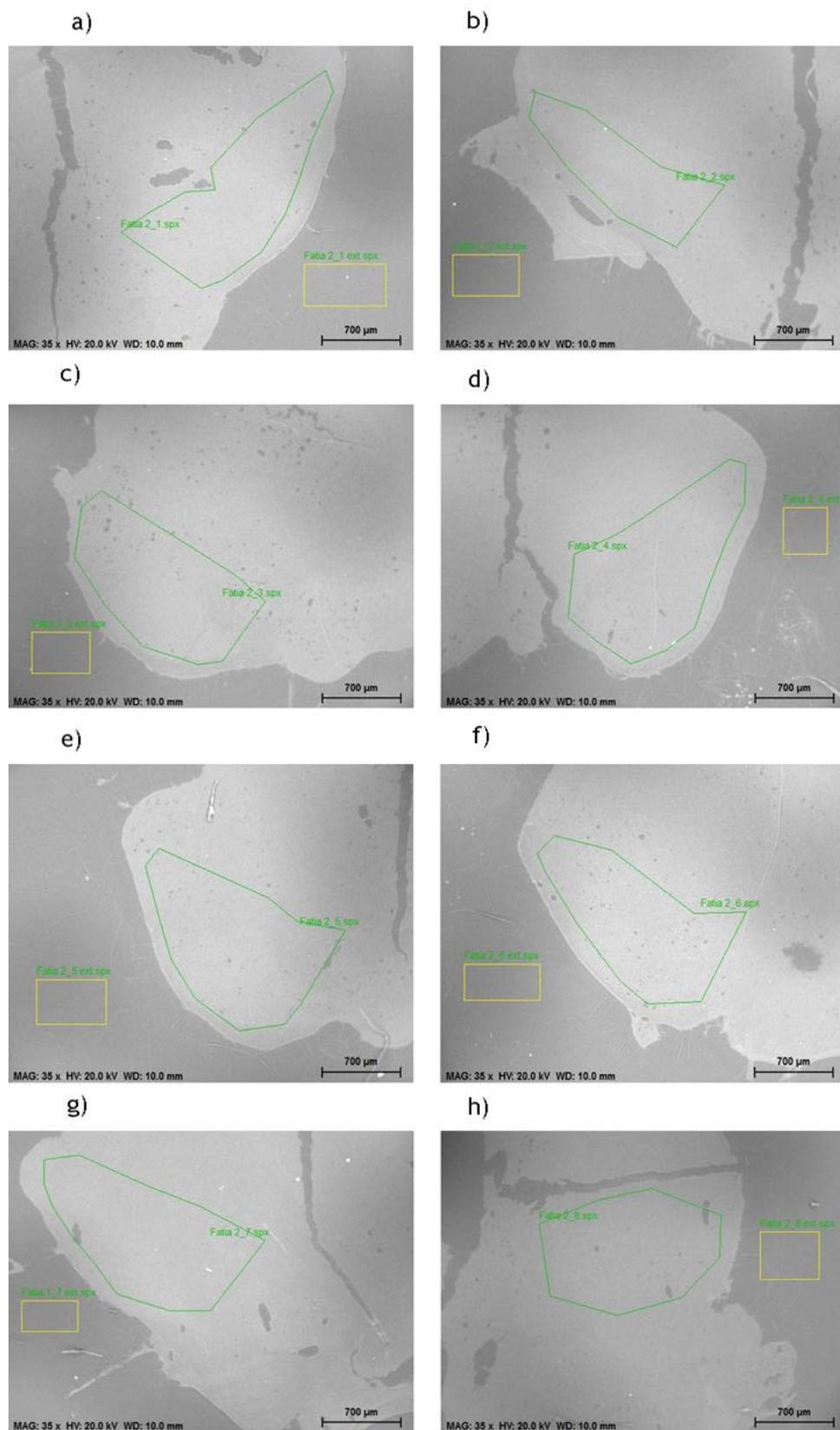


Figura 29 - Região da SN delimitada a verde para diferentes fatias do tecido cerebral para grupo de controlo, ao longo da profundidade: a) fatia 1= 0µm, b) fatia 2=180µm, c) fatia 3=360µm, d) fatia 4= 540 µm, e) fatia 5=720µm, f) fatia 6=900µm, g) fatia 7=1080 µm, h) fatia=1280 µm.

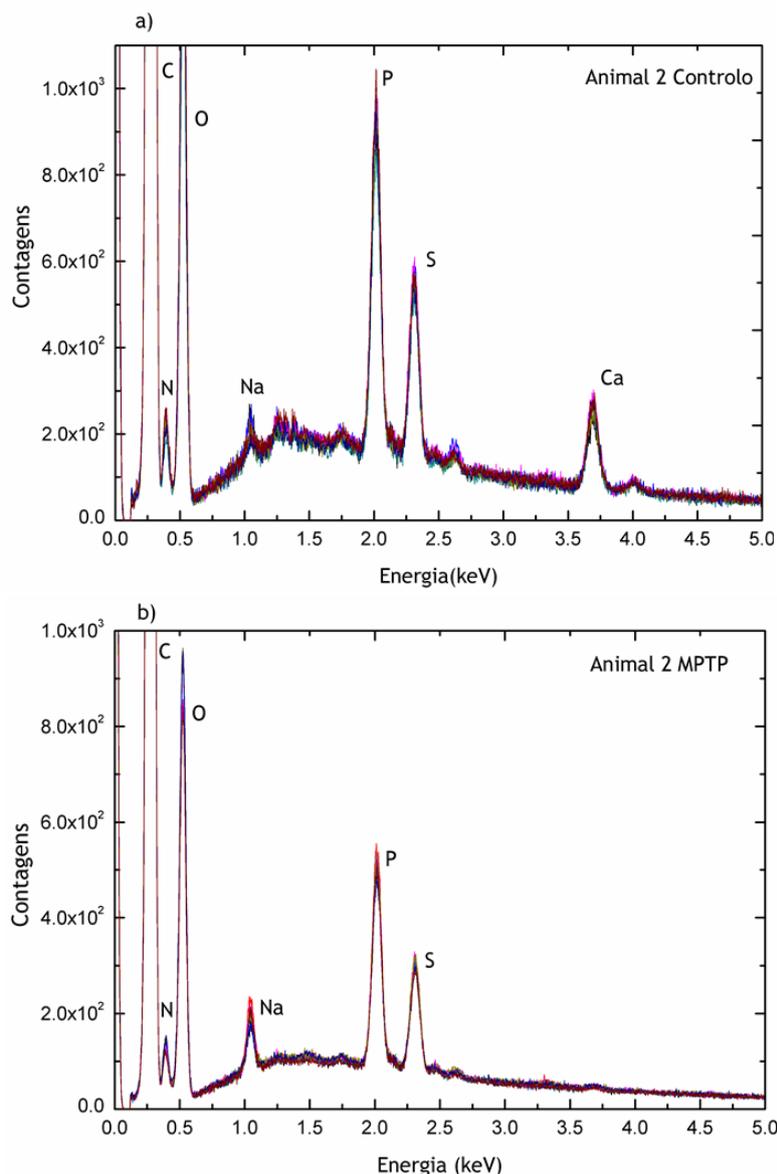
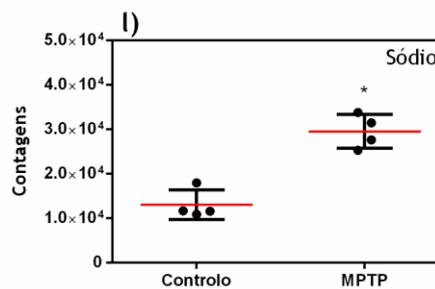
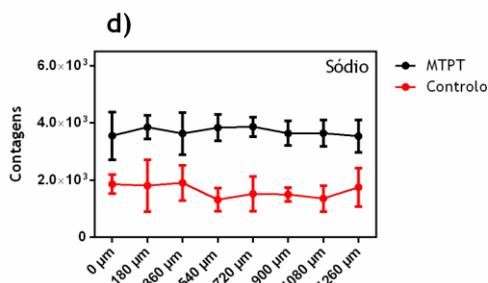
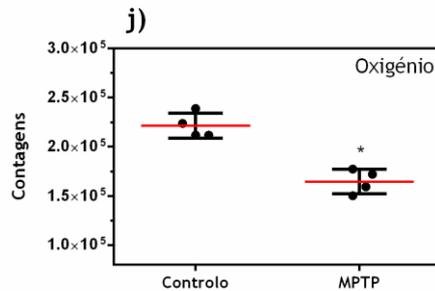
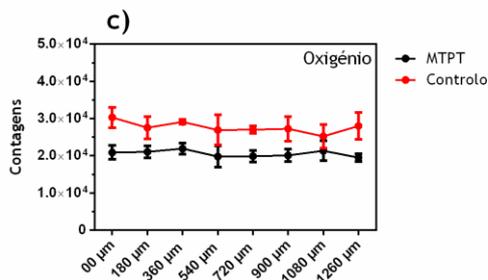
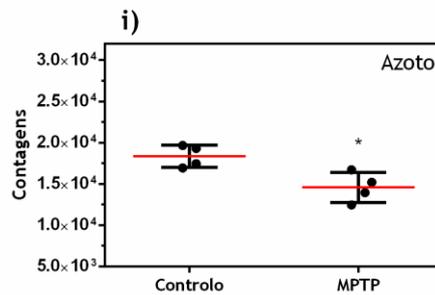
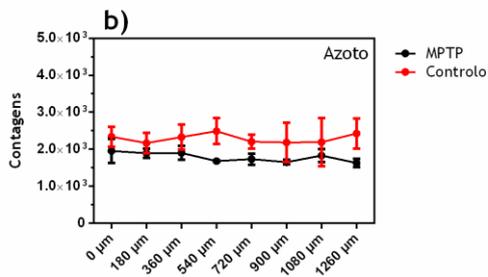
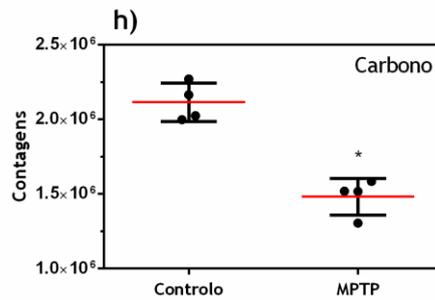
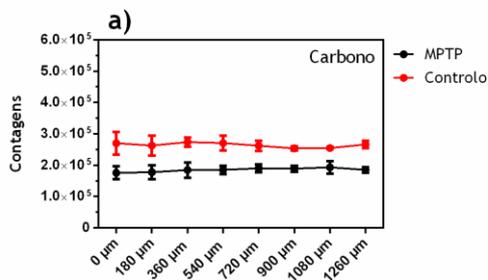


Figura 30 - Espectros de raios-X para 8 fatias do animal 2 do grupo: a) controlo e b) MPTP.

Os elementos C, N, O, Na, P e S, encontraram-se nos animais MPTP em menor quantidade do que no grupo controlo, pelo contrário o elemento Ca verificou-se ser mais significativo neste último grupo. Assim, observa-se uma redução de intensidade média de raios-X de fluorescência para o elemento C no grupo MPTP de $\approx 30\%$ relativamente ao grupo controlo, enquanto essa redução para os elementos N e O são de $\approx 20\%$ e $\approx 26\%$, respetivamente. Para o elemento Ca, observa-se uma redução de intensidade média de fluorescência de raios-X no grupo MPTP de $\approx 99\%$ em relação ao grupo de controlo, esta elevada percentagem pode estar associada ao facto de neste grupo existir uma profunda redução de neurónios dopaminérgicos e consequentemente do seu conteúdo. Já nos elementos P e S essa redução no grupo MPTP foi de 40% e 32% comparativamente ao grupo de controlo. Por outro lado, o elemento Na apresenta uma maior concentração no grupo MPTP, com uma intensidade média de raios-X de

fluorescência de $\approx 56\%$ maior do que no grupo controlo. Verifica-se também na Figura 31 a-g) que a média da intensidade de raios-X de fluorescência para os diferentes elementos em ambos os grupos, exhibe um comportamento relativamente semelhante ao longo da profundidade, permanecendo praticamente uniforme ao longo da mesma, i.e. a concentração mantém-se aproximadamente constante nas diferentes fatias. Na figura 31 h-o) avalia-se o comportamento das contagens em cada animal. É de notar a proximidade existente entre os valores das contagens de cada grupo, devido a isso podemos visualizar graficamente que os pontos referentes a cada animal se encontram também próximos entre si.



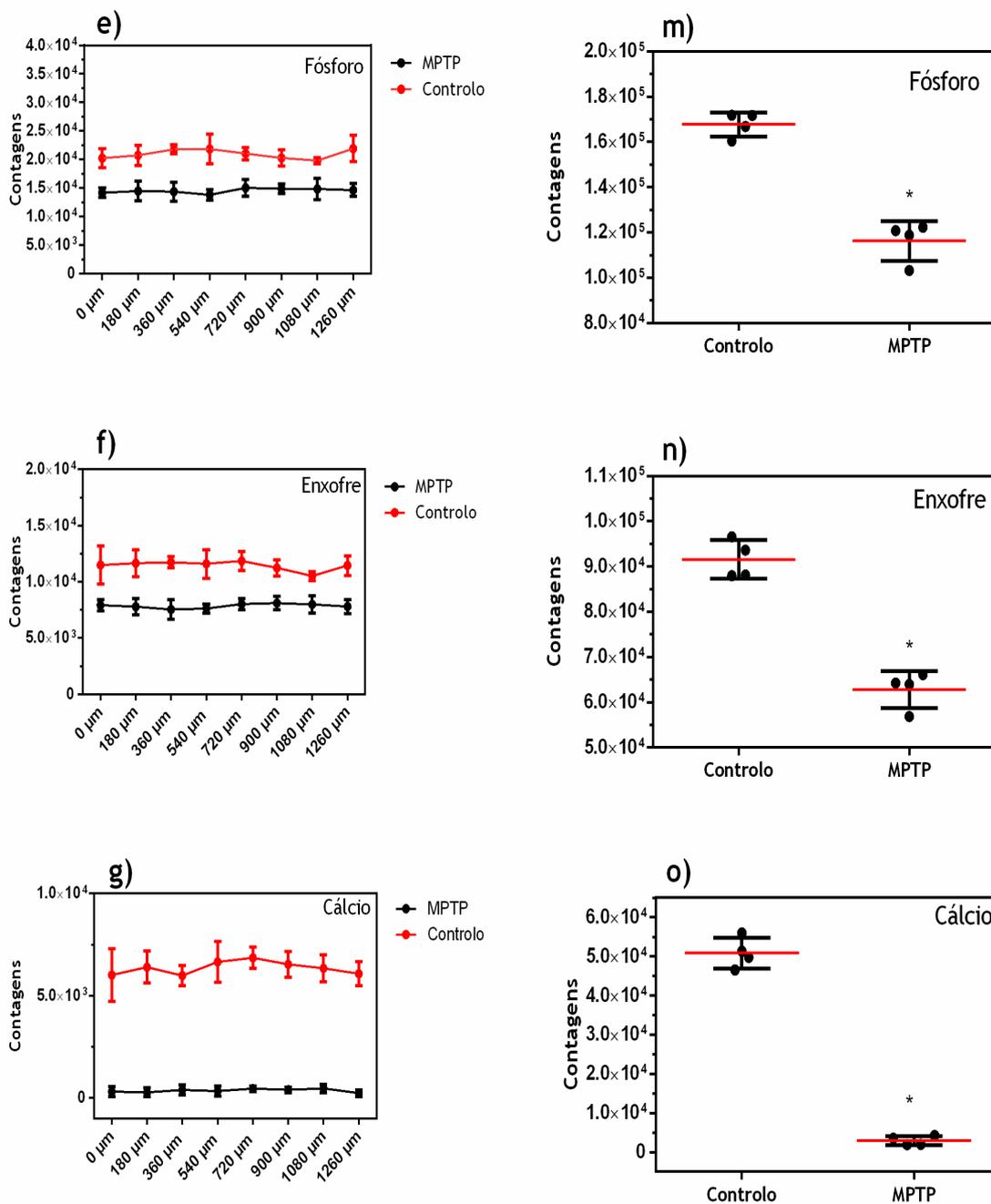


Figura 31- a-g) Intensidade média dos raios-X de fluorescência ao longo da posição para cada elemento identificado nas análises ao tecido. Os dados são apresentados como média±SD em ambos os grupos (n=4 em cada grupo). h-o) Intensidade total de fluorescência de raios-X de cada animal obtida da análise à SN em torno da respetiva intensidade média de fluorescência de raios-X (barra vermelha) de cada grupo. Os dados são apresentados como média±SD em ambos os grupos (n=4 em cada grupo).

Na figura 32 representa-se, graficamente, a soma das intensidades de raios-X de fluorescência de cada animal e normalizou-se à intensidade média de raios-X resultante dos quatro animais para cada grupo (figura 32). Neles observa-se que os elementos N, Na e Ca contêm um espalhamento maior do que os outros elementos. Tal facto poderá dever-se à dificuldade em separa-los, devido a proximidade de picos C e O do elemento N, e ainda à reduzida área dos picos $K\alpha$ dos elementos Na e Ca sobrepostos ao *background*.

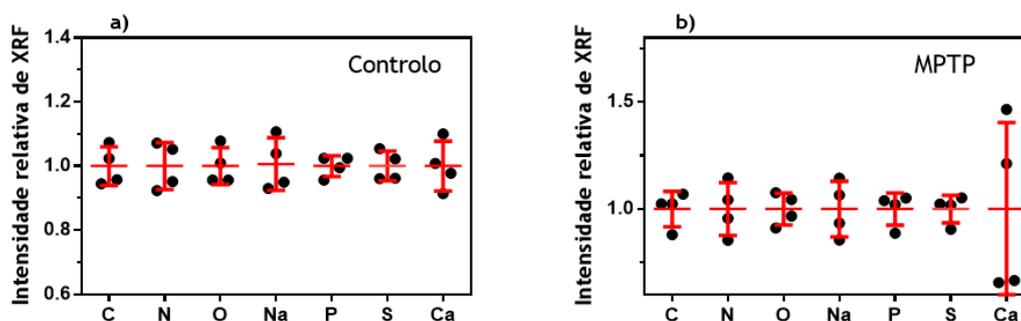


Figura 32 - Intensidade relativa de raios-X de fluorescência normalizada à média de cada grupo para os diferentes elementos detetados na SN: a) grupo controlo e b) grupo MPTP.

Em suma, a partir dos gráficos traçados observa-se que a concentração dos elementos químicos identificados durante as análises diminui para P e S no grupo MPTP cerca de 40% e 32%, respetivamente, em relação ao grupo controlo, com exceção do Na, cuja concentração está mais elevada neste mesmo grupo, cerca de 56%. No entanto, apesar da diminuição da concentração dos elementos químicos anteriormente referidos, inclusive o C, N e O no grupo MPTP, apresentam ao longo da profundidade um carácter uniforme em ambos os grupos.

Apesar dos elementos identificados nas análises não estarem reportados como determinantes na doença Parkinson, podem eventualmente estar associados indiretamente à mesma. Em relação ao cálcio, os resultados mostram uma diminuição deste elemento no grupo exposto a MPTP, quando comparado com o grupo controlo. Ao contrário das nossas observações, foi anteriormente reportado que na DP existe um aumento de cálcio na SN [53]. No entanto, existe um estudo que reporta diminuição da calbindina na SN, uma proteína de ligação ao cálcio, destes doentes, podendo indicar que também o cálcio pode diminuir [54]. Assim será necessário aprofundar o estudo deste elemento para esclarecer o seu comportamento neste modelo experimental da doença.

Relativamente ao sódio não existem claras evidências dos efeitos do papel deste elemento na DP. Porém, foi anteriormente reportado a possível associação entre níveis elevados de sódio e o aumento da produção de radicais livre, que por sua vez tem um efeito na viabilidade neuronal e também na α -syn, uma proteína diretamente associada ao desenvolvimento da DP [50]. Neste sentido, o aumento da concentração de sódio observado nos animais expostos a

MPTP (Figura 31) no presente trabalho pode estar relacionado com os efeitos do papel deste elemento na produção de radicais livres.

O fósforo é um elemento que tem um papel importante nas atividades metabólicas das células e participa na produção de ATP [35]. Foi anteriormente reportada a redução de fosfatos de alta energia em grupos de DP, como produto final de energia na fosforilação oxidativa mitocondrial [51]. Por isso, este efeito na redução de compostos de alta energia, pode justificar os resultados obtidos das análises efetuados aos tecidos, no qual se verificou uma redução da concentração de P no grupo de animais expostos a MPTP.

O enxofre, geralmente, encontra-se ligado a uma enzima, juntamente com ferro, que se designa por metaloproteína ou por aconitase mitocondrial. Esta contém um ou mais centros de ferro-enxofre (FeS) com objetivo de se ligar às cadeias polipeptídicas, desempenhando funções importantes na transferência de elétrões. Na presença de radicais livres, esta enzima pode ser inibida resultando em conglomerados de FeS [52]. Assim, como se observou a partir dos gráficos (Figura 31), o elemento S diminuiu no grupo MPTP, podendo o anterior fenómeno estar relacionada com essa redução.

4. Conclusões

As doenças neurodegenerativas afetam o sistema nervoso central, alterando certas funções cognitivas. O desenvolvimento de doenças neurodegenerativas está em alguns casos associado a causas multifactoriais, de entre as quais destacamos o desequilíbrio da homeostase de certos elementos químicos, que pode desencadear uma cascata de eventos que culminará na neurodegeneração. A incidência destas doenças neurodegenerativas, em particular a doença de Parkinson (DP), tem vindo aumentar, o desenvolvimento desta doença advém de uma série de eventos, tais como stress oxidativo e agregação de proteínas, resultando na degeneração dos neurónios dopaminérgicos. Acredita-se que tais eventos podem ser ativados devido ao desequilíbrio de certos elementos químicos. Por forma a estudar tais eventos, as mais variadas técnicas espectrométricas permitem identificar e conhecer as concentrações desses elementos existentes em tecidos biológicos.

Neste trabalho, o estudo qualitativo e quantitativo dos elementos químicos da região SN, foi realizado através da Microscopia Eletrónica Analítica (AEM), combinando a Microscopia Eletrónica de Varrimento (SEM) com a espectrometria de fluorescência de raios-X por dispersão em energia (EDXRF). Inicialmente, otimizaram-se os parâmetros de análise para se proceder à avaliação de amostras de tecido cerebral, entre estes evidencia-se a energia do feixe de eletrões que foi de 20 keV, a intensidade da corrente (100–110 μ A) e um tempo de aquisição de ≈ 105 s para um *live-time* selecionado de 100 s. Em último lugar foi possível a identificação e quantificação dos elementos químicos através da AEM/SEM, fazendo uso dos parâmetros e calibração acima referidos, na região de SN em murganhos. Os elementos atómicos identificados em ambos os grupos foram C, N, O, Na, P, S e Ca.

A concentração de C, N, O, Ca, P e S no grupo MPTP encontram-se mais elevados do que no grupo controlo, com a exceção do Na que está em maiores quantidades. Verificou-se que a concentração dos elementos químicos P e S no grupo MPTP apresentam uma redução no intervalo de 31–33% relativamente ao grupo de controlo e uma redução para o elemento de Ca, de $\approx 90\%$. Observou-se ainda que o nível médio para cada um destes elementos na SN era aproximadamente constante ao longo da profundidade, em ambos os grupos. A redução destes elementos químicos foram reportados como determinantes na doença Parkinson, podendo estar associados indiretamente à mesma. É de salientar que o metabolismo biológico e físico inerente a cada animal dentro do mesmo grupo influenciam a concentração dos elementos, sobretudo os que se encontram em menor concentração na composição da amostra e, portanto, é importante que esses parâmetros sejam considerados. Neste trabalho usaram-se no total 64 tecidos (4 animais controlo e 4 animais expostos a uma toxina indutora da DP), com 8 fatias por animal) permitindo validar os resultados estatisticamente.

Como considerações de futuros trabalhos, seria interessante que este estudo fosse realizado noutros modelos da DP, bem como a realização de estudos mais detalhados nos tecidos, para que se possa analisar possíveis alterações em certas estruturas, como por exemplo, na mitocôndria ou nos ribossomas, uma vez que os primeiros efeitos do modelo animal de Doença

Parkinson usado neste trabalho (MPTP) ocorre essencialmente ao nível de organelos intracelulares existentes na célula.

5.Referências

1. B. Bechhoff, B. Kanngieber, N. Langhoff *et al.*, *Handbook of practical X-ray fluorescence analysis*, Springer, 2006.
2. Origem e produção de raios-X: Disponível em: <http://www.history.com/this-day-in-history/german-scientist-discovers-x-rays>, acesso em maio, 2017.
3. A. C. Carlsson and G. A. Carlsson, "Basic physics of X-ray imaging, Faculty of Health Sciences", Linköping university, Department of Radiation Physics, Sweden, Second edition 1996.
4. O espectro eletromagnético: Disponível em <https://imagine.gsfc.nasa.gov/science/toolbox/emspectrum2.html>, acesso em setembro 2017.
5. G. F. Knoll, *Radiation Detection and Measurement* 3rd ed., John Wiley & Sons, New York, 2000
6. W. R. Leo, *Techniques for Nuclear and Particle Physics Experiments: a how to approach*. Springer Science & Business Media, 2012.
7. R. Van Grieken, A. Markowicz, *Handbook of X-ray Spectrometry*. CRC Press, 2001.
8. JEOL, "Scanning Electron Microscope A To Z", *Serving Advanced Technology*, p. 32, 2006.
9. R. F. Egerton, *Physical principles of electron microscopy*. New York: Springer, 2005.
10. J. Goldstein, D E. Newbury, P. Echlin, D. C. Joy *et al.* "Scanning Electron Microscopy and X-Ray Microanalysis: A Text for Biologists", Springer, second edition, 1981.
11. J. Sabine Becker, "Imaging of metals in biological tissue by laser ablation inductively coupled plasma mass spectrometry (LA-ICP-MS): state of the art and future developments", *Journal of mass spectrometry*, vol. 48, pp. 255-268, 2013.
12. Peter J. Goodhew, J. Humphreys, R. Beeland, *Electron Microscopy and Analysis*, Third Edition, Taylor & Francis, 2001.
13. J.J. Bozzola, L.D. Russell, *Electron microscopy*. Boston: Jones and Bartlett Publishers, p.670 1999.
14. Brian J., Steve H., Laura S. *et al.* "Elemental mapping and quantitative analysis of Cu, Zn, and Fe in rat brain sections by laser ablation ICP-MS", *Anal. Bioanal Chem*, vol. 384 pp. 951-957, 2006.
15. D. B. Isabelle, "The pixel analytical technique: Principle and applications," *Radiat. Phys. Chem.*, vol. 44, no. 1-2, pp. 25-30, 1994.
16. G. Gauglitz, T. Vo-Dinh, *Handbook of Spectroscopy*. John Wiley & Sons, 2006.
17. Z. Alfassia, M. Peisach, *Elemental Analysis by Particle Accelerators*, CRC Press, 1992.
18. E. Hoffmann, V. Stroobant, *Mass spectrometry, Principles and Applications*, Wiley, 3rd edition, 2007.
19. R. Martin Smith, *Understanding mass spectra, a basic approach*, Wiley, 2nd edition, 2004.
20. A. James, D. E. Myers, M. D. De Jonge *et al.*, "Quantitative comparison of preparation methodologies for x-ray fluorescence microscopy of brain tissue," *Anal. Bioanal. Chem.*, vol. 401, no. 3, pp. 853-864, 2011.
21. Espectrometria de massa: Disponível em: <http://aboutforensics.co.uk/mass-spectrometry>, acesso em agosto 2017.
22. R. E. Russo, X. Mao, J. J. Gonzalez *et al.*, "Laser ablation in analytical chemistry," *Anal. Chem.*, vol. 85, no. 13, pp. 6162-6177, 2013.
23. D. Pozebon, V. L. Dressler, M. F. Mesko *et al.*, "Bioimaging of metals in thin mouse brain section by laser ablation inductively coupled plasma mass spectrometry: novel online

- quantification strategy using aqueous standards,” *J. Anal. At. Spectrom.*, vol. 25, no. 11, p. 1739, 2010.
24. L. M. Neufeld, “Introduction to Laser Ablation ICP-MS for the Analysis of Forensic Samples,” *Agil. Technol. Publ.*, pp. 1-6, 2004.
 25. Matusch, Andreas, et al. “Cerebral bioimaging of Cu, Fe, Zn, and Mn in the MPTP mouse model of Parkinson’s disease using laser ablation inductively coupled plasma mass spectrometry (LA-ICP-MS).” *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, vol. 21, pp. 161-171, 2010.
 26. C. B. Boss, K. J. Fredeen, “Concepts, Instrumentation and Techniques in Atomic Absorption Spectrophotometry,” *North*, pp. 2-12, 1997.
 27. I.A.E.A., “Elemenall analysis of biological materials”, *tech. rep. World Health Organization*, 1980.
 28. K. S. Krane, *Introductory nuclear physics*. John Wiley and Sons Inc., New York, NY, 1987.
 29. A. Simonits, F. De Corte, J. Hoste, “Single-comparator methods in reactor Neutron activation analysis”, *Journal of Radioanalytical Chemistry*, Vol. 24, pp. 31-46, 1975.
 30. R. Martin Smith, *Understanding mass spectra, a basic approach*, Wiley, 2nd edition, 2004. T. Calì, D. Ottolini, and M. Brini, “Calcium signaling in Parkinson’s disease,” *Cell Tissue Res.*, vol. 357, no. 2, pp. 439-454, 2014.
 31. P. Redgrave, M. Rodriguez, Y. Smith, M. C. Rodriguez-Oroz *et al.*, “Goal-directed and habitual control in the basal ganglia: implications for Parkinson’s disease,” *Nat. Rev. Neurosci.*, vol. 11, no. 11, pp. 760-772, 2010.
 32. D. James, “Calcium, ageing, and neuronal vulnerability in Parkinson’s disease”; *Lance Neural*, vol.6, pp. 933-38, 2007.
 33. S. Standring, ed., *Gray’s Anatomy: The Anatomical Basis of Clinical Practice*. Churchill Livingstone, Elsevier, 40 ed., 2008.
 34. R. Raina, G. Garg, S. K. Seth *et al.*, “Phosphorus Metabolism”, *J Nephrol Therapeutic*, 2012.
 35. C. Sartore, Simone C. Cardoso, “Trace elements during primordial plexiform network formation in human cerebral organoids”, *Peer J*, vol. 5, pp- 1-28, 2017.
 36. E. E. Battin, J. L. Brumaghim, “Antioxidant Activity of Sulfur and Selenium: A Review of Reactive Oxygen Species Scavenging, Glutathione Peroxidase, and Metal-Binding Antioxidant Mechanisms”, *Cell Biochem Biophys* vol. 55, pp. 1-23, 2009.
 37. M.Gruhlke, A. J. Slusarenko, “The biology of reactive sulfur species (RSS)”, *Plant Physiology and Biochemistry*, vol 59 pp. 98-107, 2012.
 38. F. Sesti, “Oxidation of potassium channels by ROS”, *Trends in Cell Biology*, vol.20, 2009.
 39. G. I. Giles, karen M. Tasker *et al.*, “Hypothesis: the role of reactive sulfur species in oxidative stress, free radical biology & medicine”, vol. 31, no. 10, pp. 1279-1283, 2001.
 40. T. Calì, D. Ottolini, M. Brini, “Calcium signaling in Parkinson’s disease,” *Cell Tissue Res.*, vol. 357, no. 2, pp. 439-454, 2014.
 41. M. G. Spillantini, R. A. Crowther, R. Jakes *et al.*, “alpha-Synuclein in filamentous inclusions of Lewy bodies from Parkinson’s disease and dementia with lewy bodies.,” *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 95, no. 11, pp. 6469-73, 1998.
 42. Kimula, Y., *et al.* “Element analysis of Lewy and adrenal bodies in Parkinson’s disease by electron probe microanalysis.” *Acta neuropathologica* vol. 59, pp. 233-236, 1983.

43. J. Sabine Becker, Miroslav Zoriy, J. Susanne Becker *et al.*, 'Determination of Phosphorus-, Copper-, and Zinc-Containing Human Brain Proteins by LA-ICPMS and MALDI-FTICR-MS', *Anal. Chem.*, vol 77, pp 5851-5860, 2005.
44. Instruction Manual for model S-3400N scanning electron microscope, user operation, Hitachi Sciences Systems, Ltd, 2004.
45. D. C. Joy, Bell Laboratories, Beam interactions, contrast and resolution in the SEM, *Journal of Microscopy*, vol. 136, pp. 241-258, 1984.
46. "Janela AP3-3": <http://moxtek.com/wp-content/uploads/pdfs/ap3-window-datasheet/ap3.pdf>.
47. N. T. Ranger, 'Radiotaion Detetors in Nuclear Medicin', *Imaging & Therapeutic Technology*, vol. 19, pp. 481-502, 1999.
48. M. Esteves, A. C. Cristóvão, T. Saraiva, S. M. Rocha, G. Baltazar, L. Ferreira, and L. Bernardino, "Retinoic acid-loaded polymeric nanoparticles induce neuroprotection in a mouse model for parkinson's disease," *Front. Aging Neurosci.*, vol. 7, pp. 1-10, 2015.
49. NIST: X-ray mass attenuation Coefficients: Disponível em: <http://physics.nist.gov/PhysRefData/XrayMassCoef/tab2.html>, acesso em: Março, 2017.
50. N. Rodríguez, A. Fuertes, M. Amorín, J. R. Granja, "The Alkali Metal Ions: Their Role for Life," vol. 16, pp. 485-556, 2016.
51. E. Hattingen, J. Magerkurth, U. Pilatus *et al.*, "Phosphorus and proton magnetic resonance spectroscopy demonstrates mitochondrial dysfunction in early and advanced Parkinson's disease," *Brain*, vol. 132, no. 12, pp. 3285-3297, 2009.
52. L. P. Liang, M. Patel, "Iron-sulfur enzyme mediated mitochondrial superoxide toxicity in experimental Parkinson's disease," *J. Neurochem.*, vol. 90, no. 5, pp. 1076-1084, 2004.
53. D. J. Surmeier, P. T. Schumacker, J. D. Guzman and E. Zampese, "Calcium and Parkinson's disease," *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, vol. 483, no. 4, pp. 1013-1019, 2017.
54. A. M. Iacopino, S. Christakos, "Specific reduction of calcium-binding protein (28-kilodalton calbindin-D) gene expression in aging and neurodegenerative diseases.," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 87, no. 11, pp. 4078-4082, 1990.
55. S. Takahashi, S. Hatashita, Y. Taba, *et al.*, "Determination of the spatial distribution of major elements in the rat brain with x-ray fuorescence analysis", *Journal of neuroscience methods*, vol. 100, no. 1, pp. 5362, 2000.