

APLICAÇÃO DE TXRF NA ANÁLISE MULTIELEMENTAR EM DIFERENTES  
REGIÕES DO CÉREBRO DE CRIAS DE MÃES LACTANTES ALCOOLIZADAS

Luciano de Azedias Marins

TESE SUBMETIDA AO CORPO DOCENTE DA COORDENAÇÃO DOS  
PROGRAMAS DE PÓS-GRADUAÇÃO DE ENGENHARIA DA UNIVERSIDADE  
FEDERAL DO RIO DE JANEIRO COMO PARTE DOS REQUISITOS  
NECESSÁRIOS PARA A OBTENÇÃO DO GRAU DE DOUTOR EM CIÊNCIAS  
EM ENGENHARIA NUCLEAR.

Aprovada por:

---

Prof. Edgar Francisco Oliveira de Jesus, D.Sc.

---

Prof. Marcelino José dos Anjos, D.Sc.

---

Prof<sup>ª</sup>. Maria das Graças Tavares do Carmo, D.Sc.

---

Prof. Luiz Fernando de Oliveira, D.Sc.

---

Prof<sup>ª</sup>. Eliane Fialho de Oliveira, D.Sc.

---

Prof. Ademir Xavier da Silva, D.Sc.

RIO DE JANEIRO, RJ – BRASIL

JUNHO DE 2007

MARINS, LUCIANO DE AZEDIAS

Aplicação de TXRF na análise multielementar em diferentes regiões do cérebro de crias de mães lactantes alcoolizadas [Rio de Janeiro] 2007

XIV, 146p., 29,7 cm (COPPE/UFRJ D.Sc, Engenharia Nuclear, 2007)

Tese – Universidade Federal do Rio de Janeiro, COPPE

1. Fluorescência de Raios X
2. TXRF
3. etanol
4. Comportamento cognitivo
5. Ratos Wistar

I. COPPE/UFRJ II. Título (série)

*"Bem aventurado aquele que tem Deus por seu auxílio, e cuja esperança está posta no Senhor Deus, que fez os céus e a terra, o mar e tudo que neles há, e que guarda a verdade para sempre; que faz justiça aos oprimidos, que dá pão aos famintos. O Senhor solta os encarcerados, o Senhor abre os olhos dos cegos, o Senhor levanta os abatidos; o Senhor ama os justos. Vive o Senhor, e bendito seja o meu rochedo, e exaltado seja Deus, a rocha da minha salvação.*

**(II Sam 22.47; Sal 146.5-8)**

## AGRADECIMENTOS

À Deus, que com todo o seu cuidado e amor, possibilitou esta caminhada. A Ele que esteve presente nos momentos de alegria e vitória, e que nos momentos de dificuldade e desânimo, carregou-me, levantou-me e ergueu-me. A Ele, a honra e a glória hoje e sempre. Obrigado Senhor!!!

Ao meu orientador, professor Edgar Francisco Oliveira de Jesus pela ajuda, pela compreensão e pela paciência que teve durante esses seis anos de convivência. Sempre sucinto, discreto e disposto a ajudar tanto no campo acadêmico como no âmbito pessoal.

Ao meu segundo orientador, professor Marcelino José dos Anjos, pela orientação, pelo apoio, pelas palavras de ânimo nos momentos difíceis e pelas sugestões neste trabalho.

Ao chefe do laboratório de Instrumentação Nuclear, professor Ricardo Tadeu Lopes, por ceder as dependências e os recursos viabilizando a minha pesquisa.

A professora Maria das Graças Tavares do Carmo, do Instituto de Nutrição Josué de Castro - UFRJ, pela oportunidade concedida em utilizar seu laboratório, pela obtenção dos animais necessários à pesquisa, pela ajuda proporcionada no período da gestação, amamentação e do sacrifício dos ratos, pelas sugestões neste trabalho e por seu carinho.

A professora Mônica dos Santos Rocha, do Departamento de Farmacologia Básica e Clínica - UFRJ, por ceder as dependências de seu laboratório para o teste comportamental, pelos ensinamentos relacionados à técnica, pela disposição e paciência no período da dissecação do cérebro dos animais, pelas críticas construtivas e pela atenção concedida a mim durante este trabalho.

Ao Dr. Carlos Pérez, LNLS/CNPq, pela ajuda proporcionada no período de realização de medidas no LNLS.

Aos meus pais, pelo apoio e pelo amor incondicional em todos os momentos da minha vida.

A minha querida e amada esposa, Walkiria, pela dedicação, pela compreensão, pelos conselhos, por realizar a minha função de pai nos momentos de ausência e pelo seu amor que possibilitaram a realização desta pesquisa.

A minha irmã e seu esposo, Fernanda e Maico, e aos meus grandes amigos, Pastor Moysés Antunes e família, Maria dos Anjos, Fabio e Raquel, Josué e Laila, Roberto e Fabiana, que contribuiram para a realização e conclusão desta pesquisa, através de orações e palavras de conforto.

Ao meu amigo Carlos Henrique, pela sua coragem e disposição em ajudar-me a realizar o sacrifício dos animais.

Ao funcionário Zezinho, do Instituto de Nutrição Josué de Castro – UFRJ, por cuidar dos animais durante a pesquisa.

As alunas do curso de mestrado de Nutrição da UFRJ que desenvolviam suas pesquisas no Instituto de Nutrição Josué de Castro - UFRJ, pela familiarização com o ambiente e pela ajuda na preparação da dieta.

A aluna Maria Cristina, do curso de Enfermagem da UFRJ, pelo apoio durante os testes comportamentais.

Aos amigos do Curso de Engenharia Nuclear pelos momentos de descontração, pelos ensinamentos e pelas sugestões.

A minha amiga Renata pelos seis anos de uma agradável, descontraída e sincera amizade que solidificou-se sempre nos momentos cruciais, pelas sugestões e pelo apoio neste trabalho.

Agradeço com muito carinho a todos os funcionários do laboratório de Instrumentação Nuclear.

Ao Laboratório Nacional de Luz Síncrotron, LNLS, pela concessão dos equipamentos que proporcionaram os resultados desta pesquisa.

Ao Centro Nacional de Pesquisas (CNPq), pelo apoio financeiro essencial no decorrer do estudo.

Resumo da Tese apresentada à COPPE/UFRJ como parte dos requisitos necessários para a obtenção de grau de Doutor em Ciências (D.Sc.)

APLICAÇÃO DE TXRF NA ANÁLISE MULTIELEMENTAR EM DIFERENTES  
REGIÕES DO CÉREBRO DE CRIAS DE MÃES LACTANTES ALCOOLIZADAS

Luciano de Azedias Marins

Junho/2007

Orientador: Edgar Francisco Oliveira de Jesus

Marcelino José dos Anjos

Programa: Engenharia Nuclear

Pesquisas evidenciam os danos causados aos bebês em decorrência da ingestão de etanol durante todas as fases do desenvolvimento fetal. Os efeitos oriundos do álcool na fase de lactação podem afetar o desenvolvimento cognitivo incluindo prejuízos em diferentes tipos de memória, no aprendizado e na percepção visuoespacial podendo ser observados, através dos testes comportamentais através da fluorescência de raios X por reflexão total (TXRF). Por outro lado, sabe-se que a ingestão de etanol altera o estado dos micronutrientes, principalmente aqueles associados com o desenvolvimento cognitivo como o Zn e o Fe. Assim, este trabalho tem por objetivo, analisar as concentrações de micronutrientes em tecidos cerebrais de ratos Wistar cujas mães foram submetidas à dieta líquida de etanol durante a fase da lactação, e associar em função do comportamento cognitivo. As medidas de fluorescência foram realizadas no Laboratório Nacional de Luz Síncrotron, Campinas, São Paulo. Os resultados obtidos mostraram que: 1°) A técnica de TXRF foi sensível para detectar elementos traços em diminutas regiões do cérebro de ratos que foram expostos ao etanol no período perinatal; 2°) no córtex entorrinal dos animais do grupo etanol com 90 dias de idade, ocorre uma redução dos níveis de K, Cl, P, Fe, Ca e Br e no hipocampo, um aumento de Zn, K e Br. Essas áreas influenciam em todo o desenvolvimento cognitivo dos animais; 3°) O teste do labirinto aquático de Morris mostrou que os animais que receberam etanol durante o período de lactação tiveram, ao final do treinamento, o mesmo desempenho cognitivo que os animais saudáveis, entretanto, a aprendizagem neste grupo foi mais lenta tendo, como uma possível causa, a redução dos micronutrientes no córtex entorrinal.

Abstract of Thesis presented to COPPE/UFRJ as a partial fulfillment of the requirements for the degree of Doctor of Science (D.Sc.)

APPLICATION OF TXRF IN THE MULTIELEMENTARY ANALYSIS IN  
DIFFERENT REGIONS OF THE BRAIN OF YOU CREATE OF DRUNK NURSING  
MOTHERS

Luciano de Azedias Marins

June/2007

Advisors: Edgar Francisco Oliveira de Jesus

Marcelino José dos Anjos

Department: Nuclear Engineering

Researches evidence the damages babies suffer from ethanol ingestion during all fetal development phases. The effects caused by alcohol in the lactation phase can affect the cognitive development including damages in different types of memory, learning and visuospatial perception, which can be observed, through behavior tests. Thus, this present paper aims at analyzing the micronutrients concentrations in cerebral tissues Wistar rats whose mothers had been submitted to the ethanol liquid diet during the lactation phase, according to cognitive behavior through the Total Reflection X-Ray Fluorescence (TXRF). The measures of fluorescence had been carried at Laboratório Nacional de Luz Síncrotron, Campinas, São Paulo. The results had shown that the 90-day-rats entorhinal cortex ethanol groups, occurs a reduction in the levels of K, Cl, P, Fe, Ca and Br and in the hippocampus, an increase of Zn, K and Br. These areas influence in all cognitive developments of the animals. The behavior test had been carried at Laboratório de Neurobiologia da UFRJ. The results presented at the Water Maze of Morris had shown that the animals which received ethanol during the lactation phase got, at the end of the training, the same cognitive performance as the healthy ones. However, the learning in this group was slower having, as a possible cause, the reduction of micronutrients in the entorhinal cortex.

ÍNDICE

<b>CAPÍTULO 1</b> .....	1
<b>1 – INTRODUÇÃO</b> .....	1
1.1 – Objetivos.....	6
<b>CAPÍTULO 2</b> .....	8
<b>2 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	8
2.1–O Álcool .....	8
2.1.1 – Aspectos sociais e epidemiológicos.....	8
2.1.2 – Manifestações clínicas.....	9
2.1.3 – A Síndrome Alcoólica Fetal.....	11
2.1.4 – Efeitos do álcool no Sistema Nervoso Central.....	14
2.1.4.1 – Estudos morfológicos.....	15
2.1.4.2 – Estudos neurofisiológicos e funcionais.....	19
2.1.4.3 – Estudo das deficiências cognitivas.....	19
2.1.5 – A importância dos metais no Sistema Nervoso Central .....	21
2.1.5.1 – O Zinco (Zn).....	22
2.1.5.2 – O Manganês (Mn).....	24
2.1.5.3 – O Alumínio (Al).....	26
2.1.5.4 – O Chumbo (Pb).....	26
2.1.5.5 – O Mercúrio (Hg).....	27
2.1.5.6 – O Ferro (Fe).....	28
2.1.5.7 – O Cobre (Cu).....	30
2.2 – Memória e Aprendizagem.....	31
2.2.1 – O condicionamento aversivo.....	31
2.2.2 – O labirinto aquático de Morris.....	33
2.3 – A Fluorescência de raios X .....	35
<b>CAPÍTULO 3</b> .....	40
<b>3 – FUNDAMENTOS TEÓRICOS</b> .....	40
3.1–O Sistema Nervoso.....	40
3.1.1 – Neurônios e Células Gliais.....	40
3.1.1.1 – Neurônios.....	42
3.1.1.2 – Tipos de neurônios.....	42
3.1.1.3 – Células da glia.....	42
3.1.2 – A estrutura do Sistema Nervoso.....	43
3.1.2.1 – As funções e divisões do Sistema Nervoso.....	43
3.1.2.2 – A formação do Sistema Nervoso Central.....	44
3.1.2.3 – A estrutura do Sistema Nervoso Central.....	45
3.1.2.3.1 – O Telencéfalo.....	46
3.1.2.3.2 – O Diencéfalo.....	51
3.1.2.3.3 – O Cerebelo.....	53
3.1.2.3.4 – O Tronco Encefálico.....	54
3.1.2.4 – O Sistema Nervoso Periférico.....	55
3.1.2.5 – Os Neurotransmissores.....	58
3.2 – O Álcool.....	61
3.2.1 – A Farmacologia do Álcool.....	61
3.2.1.1 – A Absorção.....	62
3.2.1.2 – A Biotransformação.....	62
3.2.1.3 – O Modo de Ação .....	63
3.2.2 – O Álcool e os Neurotransmissores.....	63
3.2.3 – Os efeitos causados no Sistema Nervoso Central.....	64
3.3 – Memória e Aprendizagem.....	65
3.3.1 – Introdução.....	65
3.3.2 – Memória.....	66
3.3.3 – A importância dos neurotransmissores nos processos de aprendizagem,	



memória e plasticidade neuronal .....	68
3.4 – Espectrometria de Raios X.....	69
3.4.1 – A Fluorescência de Raios X .....	69
3.4.2 – A Fluorescência de Raios X por Reflexão Total.....	73
3.4.2.1 – A Análise Quantitativa .....	79
3.4.2.2 – O limite de detecção em TXRF.....	82
3.4.2.3 – A Radiação Síncrotron.....	84
<b>CAPÍTULO 4.....</b>	<b>87</b>
<b>4 – MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>	<b>87</b>
4.1 - Animais e condições experimentais.....	87
4.2 - Delineamento experimental.....	87
4.3 - Controle do consumo alimentar.....	87
4.4 - Composição e preparação da dieta líquida.....	88
4.5 - Sacrifício dos animais e coleta das amostras.....	89
4.6 . Estudo comportamental.....	90
4.8 – Determinação dos teores de micronutrientes por TXRF.....	92
4.8.1 – Preparação das amostras.....	92
4.8.2 – Branco.....	92
4.8.3 - Amostras Certificadas.....	93
4.8.4 – A Instrumentação.....	93
<b>CAPÍTULO 5.....</b>	<b>95</b>
<b>5 - RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>95</b>
5.1 – Análise quantitativa por TXRF.....	95
5.1.1 – Sensibilidade do sistema.....	95
5.2 – Limite de detecção.....	96
5.3 – Análise estatística .....	98
5.4 – Concentração elementar nas regiões cerebrais de filhotes de mães controles e tratados com etanol.....	99
<b>CAPÍTULO 6.....</b>	<b>119</b>
<b>6 - CONCLUSÃO.....</b>	<b>119</b>
<b>REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>122</b>
<b>APÊNDICE.....</b>	<b>144</b>

# CAPÍTULO I

## 1. INTRODUÇÃO

Uma variante da fluorescência de raios X por dispersão de energia, denominada de Reflexão Total (TXRF), vem sendo utilizada principalmente na análise de elementos traços (na faixa de  $\text{ng.g}^{-1}$ ) em amostras líquidas (da ordem de  $\mu\text{L}$ ) e em amostras sólidas ( $\mu\text{g}$ ) precedidas por digestão química [01], em pesquisas relacionadas ao Monitoramento Ambiental, Oceanografia, Biologia, Medicina, Indústria e Mineralogia. [02]. A amostra a ser analisada através da TXRF pode ser considerada um filme fino, uma vez que esta técnica necessita de diminutas quantidades de amostra para a análise. Dessa forma, os efeitos de absorção e os efeitos de matriz observados na Fluorescência de Raios X por Dispersão de Energia (EDXRF) podem ser desprezados, tornando-a uma técnica bastante competitiva com outras técnicas analíticas.

Além disso, na TXRF, a determinação da concentração elementar é realizada através do método da adição do padrão interno, corrigindo as instabilidades do sistema, como flutuações no gerador de raios X, emissão de raios X pelo anodo, detecção dos raios X, e erros operacionais, como a posição do filme formado no refletor, posicionamento das amostras, dentre outros fatores. [03-05].

De modo geral, os limites de detecção para a técnica de TXRF são bem menores que os limites de detecção da fluorescência de raios X convencional EDXRF, devido principalmente a três fatores:

(1) redução da radiação de fundo, devido à mínima interação da radiação incidente com o suporte da amostra em relação à EDXRF;

(2) o fluxo da radiação primária disponível para a excitação da amostra, devido ao feixe refletido, é muito mais efetivo do que na XRF;

(3) a distância entre a amostra (filme fino) e o detector, em geral, é muito menor do que na EDXRF, aumentando, portanto, a eficiência de detecção dos raios X característicos.

O álcool tem sido relacionado aos efeitos adversos sobre os recém-nascidos. Citações bíblicas já referiam proibições ao consumo de cerveja e de vinho por gestantes, sendo ainda norma proibitiva em algumas cidades da Antigüidade o brinde nupcial com bebidas alcoólicas, no sentido de prevenir efeitos teratogênicos já na concepção [06. Na Grécia antiga os filósofos discutiam os possíveis efeitos deletérios do álcool sobre os filhos de mães que consumiam bebidas alcoólicas durante a gravidez. [07].

Estudos clínicos e experimentais [08-11] têm relatado que o consumo de bebidas alcoólicas durante a gestação causa malformação e retardo do crescimento, caracterizando a síndrome fetal alcoólica, cujas características mais importantes são: retardo do crescimento pré e pós-natais; alterações do sistema nervoso central, como microencefalia; alterações faciais, como hipoplasia facial e microftalmia. São ainda desconhecidos alguns dos principais mecanismos pelos qual o álcool induz tais efeitos, e vários autores sugeriram que estes efeitos ocorrem através de mecanismos metabólicos atuando nos distintos estágios pré e pós-natais. [12-13]

Os efeitos decorrentes do uso de substâncias como etanol, cafeína, nicotina e outras, cujo consumo deve ser socialmente com baixos volumes, vêm sendo investigados por vários autores, com evidências de que o álcool interfere no processo de lactação em grandes proporções, alterando a produção, o volume, o aroma, a composição e a excreção do leite materno (LM), provocando efeitos deletérios no recém-nascido (RN). [14-21]

A maioria das gestantes tem conhecimento de que não deve consumir álcool neste período, entretanto o mesmo não ocorre com relação ao período de lactação, uma vez que a cerveja tradicionalmente e, em menor grau, o vinho, são recomendados como lactogênicos, fontes de vitaminas do complexo B e capazes de provocar sensação de repouso no binômio mãe/filho.[22]

Menella *et al* [23] investigaram os efeitos do álcool no lactente, evidenciando que o odor do LM é modificado imediatamente após a ingestão alcoólica. Assim, o lactente, apesar de sugar de forma mais vigorosa, ingere menos leite por tempo de sucção, fato não percebido pelas mães. Segundo alguns autores [24-27], o sistema imunológico é afetado pela ingestão alcoólica na lactação, sendo observado déficit, a longo prazo, na imunidade celular e no sistema nervoso, indicando sensibilidade ao álcool em etapas precoces do desenvolvimento. Alguns efeitos são evidenciados nas mães em decorrência da ingestão de álcool na gestação-lactação. As variações no peso feminino também afetam a desintoxicação alcoólica, necessitando, as mulheres magras, de maior tempo para metabolizar a mesma quantidade de álcool. [22].

Segundo Silva *et al*. [28], a absorção do etanol entre mulheres lactantes é menor do que nas não-lactantes (após o grupamento por idade, peso e etnia). Assim, a taxa de captação de álcool pelo fígado apresenta diferenças em relação ao menor teor de álcool circulante. As pesquisas pioneiras de Lawton [29] evidenciaram que o teor de álcool no LM é diretamente proporcional ao do sangue, e esse teor não é afetado pela sucção ou aleitamento pré ou pós-ingestão de álcool. Ou seja, à medida que a droga é absorvida e é encontrada no sangue, cresce a sua concentração. Resumidamente, um maior consumo de etanol está associado diretamente com o aumento da sua concentração sanguínea.

Pesquisa realizada, em 1989, no Instituto Nacional de Saúde Infantil e Desenvolvimento Humano nos Estados Unidos, detectou diferenças significativas no desenvolvimento motor de RN de mães que bebiam de forma regular [21].

Efeitos tóxicos do uso de álcool levam à alterações no sistema nervoso central, que dependem da idade da criança (o fígado imaturo será o mais afetado), do Índice de Massa Corporal (IMC) materno, da quantidade e concentração da bebida consumida, do período de jejum ou pós-prandial e da quantidade de gordura consumida [30].

Redução pondo-estatural e aumento da mortalidade neonatal, foram encontrados por diversos autores. [13, 30-36] Várias alterações metabólicas e hormonais maternas e conseqüentemente na composição do LM, bem como da metabolização do etanol, repercutem de forma significativa no desenvolvimento da prole. Foram também observadas alterações nos RNs após consumo de 20% de álcool, pelas mães, com redução do peso do fígado e do cérebro, diminuição do conteúdo protéico e do DNA, bem como dos níveis de glicogênio hepático (sem alterar os níveis de lipídeos destes tecidos), elevação de colesterol, ácidos graxos e de b-hidroxibutirato na circulação; hipoglicemia e hiponatremia. [33]

Em função, justamente da TXRF necessitar de diminutas quantidades de amostra para análise (em amostras líquidas,  $\mu\text{L}$ , e em amostras sólidas,  $\mu\text{g}$ ) e por ter um limite de detecção da ordem de  $\text{ng.g}^{-1}$ , esta técnica foi empregada para determinar as concentrações elementares em regiões cerebrais muito pequenas de ratos Wistar.

A fonte de radiação para a excitação utilizada neste estudo foi a radiação síncrotron tendo em vista as suas características:

- a) Alta sensibilidade ( $1 \text{ ng.g}^{-1}$  para fluorescência de raios X por dispersão em comprimento de onda e  $10 \text{ ng.g}^{-1}$  para fluorescência de raios X por dispersão em energia);

- b) Pequena quantidade de amostra necessária para a análise;
- c) Aplicação multielementar (diversos elementos podem ser medidos simultaneamente, levando em consideração as características do arranjo experimental de cada centro de pesquisa);
- d) Rápida obtenção de resultados;
- e) A possibilidade de medidas da distribuição elementar na superfície e volume;
- f) Aplicação em várias áreas da ciência e tecnologia: geologia, indústria, medicina e meio ambiente [37].

Devido aos efeitos adversos causados pelo álcool sobre os filhotes das mães alcoolizadas no período da lactação, este estudo tem por objetivo, analisar as concentrações dos elementos no córtex temporal, córtex entorrinal e hipocampo de filhotes de ratas Wistar submetidas a uma dieta líquida com etanol, além de avaliar o desempenho cognitivo dos mesmos.

Este trabalho abrange o período da lactação tendo em vista que durante esta fase o crescimento e desenvolvimento cerebral dos ratos ocorre de maneira mais acentuada que na fase pré-natal.

O estudo consiste em duas etapas:

(1) na primeira etapa as mães foram separadas em dois grupos. Após o nascimento das proles, as mães, a partir do 1º dia, estiveram submetidas à dieta líquida sem a presença do etanol (grupo controle) e com a presença do etanol (grupo etanol). No vigésimo dia, 10 filhotes fêmeas e 7 filhotes machos de cada grupo foram sacrificados, por decapitação. O córtex temporal, o córtex entorrinal e o hipocampo de cada filhote foram separados. Após a separação, as regiões foram estocadas em um freezer à  $-70^{\circ}\text{C}$ , e logo

depois foram preparadas para uma análise elementar através da TXRF no Laboratório Nacional de Luz Síncrotron. Os espectros obtidos foram analisados através do software Sistema de Análise Quantitativa de Raios X obtendo, posteriormente as concentrações elementares. ;

(2) na segunda etapa foram separados 7 filhotes machos de cada grupo. Os animais estiveram submetidos à dieta líquida, através do leite materno, até os 20 dias e ração comercial do 21º dia até os 90 dias de idade. Aos 90 dias foram realizados os testes comportamentais visando observar os aspectos relacionados à aprendizagem e a memória, através do labirinto aquático de Morris [38]. Em seguida foram sacrificados por decapitação. O córtex temporal, o córtex entorrinal e o hipocampo de cada filhote foram separados. Após a separação, as regiões foram estocadas em um freezer à  $-70^{\circ}\text{C}$ , e logo depois foram preparadas para uma análise elementar através da TXRF no Laboratório Nacional de Luz Síncrotron. Os espectros obtidos foram analisados através do software Sistema de Análise Quantitativa de Raios X obtendo, posteriormente as concentrações elementares. ;

## **1.1 Objetivo Geral**

Determinar a aplicação da TXRF em amostras de diferentes regiões do cérebro (córtex temporal, córtex entorrinal e hipocampo) utilizando como modelo experimental a administração de etanol, por dieta líquida, durante a lactação.

## **1.2. Objetivos específicos**

(1) Avaliar, se a ingestão materna de etanol durante a lactação produz alterações nas concentrações dos elementos traços no córtex temporal, no córtex entorrinal e no hipocampo dos filhotes com 20 dias de idade, comparando-os com os animais controle da mesma idade;

(2) Determinar, se na fase adulta dos filhotes (90 dias de idade) de mães que ingeriram etanol durante a amamentação, os teores de elementos traços no córtex temporal, no córtex entorrinal e no hipocampo e o desempenho nos testes comportamentais comparando com os filhotes de mães que não receberam etanol durante a lactação;

(3) Comparar as concentrações de microminerais no córtex temporal, no córtex entorrinal e no hipocampo dos filhotes com 20 dias de idade (intoxicação alcoólica) com 90 dias de idade (após a recuperação nutricional e abstinência alcoólica);

(4) Correlacionar as informações obtidas nos períodos supracitados, discutindo as suas causas e comparando com dados publicados na literatura;



## **CAPÍTULO II**

### **2. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

#### **2.1 – O Álcool**

##### **2.1.1 – Aspectos sociais e epidemiológicos**

Atualmente, o consumo de álcool é um dos principais problemas de saúde pública no mundo. De acordo com dados da Organização Mundial da Saúde (OMS), o consumo tanto moderado quanto excessivo de álcool são os maiores fatores de risco à saúde do brasileiro, sendo em média duas vezes maior que os riscos decorrentes do tabagismo [39]. Além disso, estima-se que o consumo de álcool esteja relacionado com a maioria dos suicídios, homicídios, agressões a mulheres e crianças, estupros e acidentes de trânsito fatais [40-42].

Obtido por fermentação ou destilação da glicose presente em cereais, raízes e frutas, o etanol (ou álcool etílico) é consumido exclusivamente por via oral [43].

Em pesquisa realizada em conjunto com o Centro Brasileiro de Informações sobre Drogas Psicotrópicas (CEBRID) e com a Secretaria Nacional Antidrogas (SENAD), envolvendo uma amostra de 8.589 brasileiros com idade entre 12 e 65 anos, foi estimado que 69% dos indivíduos eram usuários de bebidas alcoólicas [44]. Neste mesmo estudo, foi estimado que o percentual de indivíduos que consomem álcool na região Norte é de 53%, na região Nordeste de 68%, na região Centro-Oeste de 60%, na região Sudeste de 71% e na região Sul de 69%. Vale ainda ressaltar que 11% dos indivíduos foram considerados dependentes de álcool.

O alcoolismo é caracterizado pelo uso repetido e prolongado do etanol. De acordo com o Conselho Nacional de Alcoolismo e Dependência a Drogas dos Estados

Unidos, a dependência para o álcool ou alcoolismo é uma doença primária crônica, sendo frequentemente progressiva e fatal. Nos EUA, uma pesquisa constatou que 80% dos estudantes das escolas secundárias já haviam ingerido bebidas alcoólicas e 10% precisaram de tratamentos para abandonar o álcool [45-47].

O consumo de álcool por adolescentes no mundo tem sido um dos grandes desafios para os gestores de saúde pública [48]. O consumo excessivo de álcool pode estar associado a acidentes, suicídios, homicídios e violências, além de aumentar os riscos de contração de doenças sexualmente transmissíveis (incluindo infecção pelo vírus HIV), gravidez e baixo rendimento escolar. A “The European School Survey Project on Alcohol and other Drugs”, pesquisou mais de 90.000 adolescentes entre 15 e 16 anos de 30 países e encontrou resultados preocupantes. Em alguns países da Europa, 25 % dos entrevistados afirmaram já consumir álcool a teores de intoxicações [46].

### **2.1.2 – Manifestações clínicas**

Na fase adulta, os efeitos gerados pelo consumo do álcool também são nocivos. Os principais efeitos ocorrem no sistema nervoso central (SNC), onde suas ações depressoras assemelham-se às dos anestésicos voláteis. Os efeitos da intoxicação aguda pelo etanol no homem dependem da tolerância do paciente ao álcool, do volume, da sua frequência de ingestão e de quanto e qual alimento consumiu junto com o álcool e são bem conhecidos: lentidão ao pensar, suscetibilidade emocional, comportamento desinibido, euforia ou depressão, agitação, convulsão, andar instável, tremores, náuseas, vômito, hipotermia, vermelhidão ou palidez, fraqueza muscular, coma e até, morte por insuficiência respiratória [49].

Os sintomas dependem do nível de álcool no sangue. Na tabela 2.1 podemos observar os valores de dose em g/l de etanol associada com os efeitos causados para um indivíduo de 70 kg de massa corporal [49].

**Tabela 2.1** – Os efeitos do álcool em relação à dose consumida em g/l [43].

<b>EFEITOS DO ÁLCOOL</b>		
<b>DOSE (g/l)</b>	<b>EQUIVALENTE</b>	<b>EFEITOS</b>
0,2 a 0,3	1 copo de cerveja ou 1 cálice pequeno de vinho ou 1 dose de uísque ou de outra bebida destilada.	As funções cerebrais começam a ficar comprometidas. A percepção da distância e da velocidade são prejudicadas.
0,31 a 0,5	2 copos de cerveja ou 1 cálice grande de vinho ou 2 doses de bebida destilada.	O grau de vigilância diminui, assim como o campo visual. O controle cerebral relaxa, dando a sensação de calma e satisfação.
0,51 a 0,8	3 ou 4 copos de cerveja ou 3 copos de vinho ou 3 doses de uísque.	Reflexos retardados, dificuldades de adaptação da visão e diferenças de luminosidade; superestimulação das possibilidades e minimização de riscos; e tendência à agressividade.
0,81 a 1,5	Grandes quantidades de bebida alcoólica.	Dificuldades de controlar automóveis; incapacidades de concentração e falhas de coordenação neuromuscular.
1,51 a 2,0	Grandes quantidades de bebida alcoólica.	Embriaguez, torpor alcoólico, dupla visão.
2,1 a 5,0	Grandes quantidades de bebida alcoólica.	Embriaguez profunda.
Acima de 5,0	Grandes quantidades de bebida alcoólica.	Coma alcoólico.

Um grupo que merece cuidados especiais é o grupo das gestantes. Na década de 60 surgiram as primeiras pesquisas, publicadas na França, envolvendo o consumo de álcool por gestantes com os danos causados ao feto [50-51]. Grande parte das mulheres consome etanol antes de saber que está grávida. Qualquer quantidade de etanol, por

menor que seja, pode pôr em risco o desenvolvimento do feto, produzindo doenças mentais e físicas. Os efeitos podem ser leves ou agressivos, como a Síndrome Alcoólica Fetal.

### **2.1.3 – A Síndrome Alcoólica Fetal**

Crianças com Síndrome Alcoólica Fetal (SAF) ou Efeito Alcoólico Fetal (EAF) exibem numerosos problemas cognitivos, entretanto, em muitos casos as conseqüências começam a aparecer somente com uma idade mais avançada. Também é conhecido que nem todas as mulheres que consomem álcool durante a gravidez geram crianças com SAF ou EAF. Os fatores que determinam os efeitos de comportamento e patologias anatômicas incluem o estágio de desenvolvimento do feto durante a exposição e o valor da concentração de álcool no sangue [52].

As possíveis alterações causadas pela SAF durante a ingestão alcoólica no período fetal ou após o nascimento estão listadas abaixo:

- a) Alterações craniofacial;
- b) Mudanças no sistema nervoso central e alterações neurocomportamentais, tais como retardamento mental de leve a moderado, (QI entre 65 a 70), retardo do desenvolvimento, alterações na coordenação, comprometimento cognitivo/sensorial, irritabilidade e hiperatividade na infância, deficiências de atenção, comprometimento da linguagem, convulsões, paralisia cerebral;
- c) Problemas cardiovascular, urológico, gastrointestinal, ocular e auditivo, tais como anormalidade dos grandes vasos sanguíneos, rins em ferradura, hérnia, estrabismo, catarata, glaucoma, surdez central;

d) Associação do quadro com neoplasias, como, tumores endodérmicos, leucemia linfótica aguda [48,50-51, 63-80].

Para entender as alterações causadas em fetos e neonatos devido à ingestão alcoólica devemos conhecer o desenvolvimento cerebral.

O córtex e o núcleo subcortical da matéria cinzenta desenvolvem, durante a vida fetal, uma seqüência de proliferação, migração e maturação de células cuidadosamente orquestrada. No momento do nascimento, este processo continua com, aproximadamente, 100 bilhões de neurônios. O cérebro de neonatos tem somente um terço ou um quarto do volume adulto, e continua a crescer segundo o programa genético, com modificações dirigidas por influências do ambiente que gira ao seu redor, podendo ter contribuições produtivas ou destrutivas [53].

Na década de 80 surgiram trabalhos que mostraram que o crescimento ou redução sináptica em cérebro humano variam bastante por região. No córtex visual, toda a produção sináptica alcança o máximo, aproximadamente, no quarto mês após o nascimento. Já no córtex medial pré-frontal, a área do cérebro que envolve as funções de execução, atenção e regulação, o pico ocorre entre 3 e 4 anos de idade e declina substancialmente não ocorrendo mais após a adolescência [1,3,5,8].

Os estudos que envolvem as mudanças devido o desenvolvimento mostram que o volume de matéria cinzenta geralmente declina após 6-7 anos de idade e continua decrescendo durante a adolescência, enquanto que o volume de matéria branca aumenta linearmente ano a ano [54].

Toga *et al.*[54] observaram o cérebro de crianças e jovens normais entre 4 e 21 anos. Foram mapeados formando imagens que possibilitaram a observação da matéria cinzenta em diversas regiões ao longo dos anos. Entre 4 e 8 anos ocorre uma perda no dorso parietal e regiões sensorimotor primário. Áreas envolvidas na orientação

espacial e linguagem (lobo parietal) iniciam, em seguida, a perda na idade da puberdade (11-13 anos). Áreas com funções mais avançadas – integrando informações de sentido, reação e outras funções (em geral, córtex pré-frontal) – maturam após o fim da adolescência.

Estudos confirmam que o cérebro apresenta anormalidades morfológicas em crianças expostas ao etanol ainda no ventre. No córtex, o lobo parietal apresenta redução significativa de volume. O desenvolvimento incompleto da matéria branca tem sido mais acentuado que a matéria cinzenta e em relação ao hipocampo, o volume permanece inalterado. As alterações no lobo parietal comprovam as deficiências observadas nos testes neuropsicológicos [55-62].

As disfunções faciais, característica da SAF, ocorrem devido à exposição de etanol durante o período embrionário, que abrange a terceira e a oitava semana de gestação. Segundo Floyd *et al.* [61], neonatos nascidos de mães que consumiram quantidades moderadas de álcool durante o primeiro trimestre podem ter aumento das taxas de aborto espontâneo, decréscimo de comprimento e peso, aumento das anormalidades craniofacial e deficiências neurocomportamentais.

Em animais, as pesquisas, em sua maioria, são conduzidas em ratos em função de seu curto período de gestação (aproximadamente 22 dias) e tamanho relativamente pequeno. Por ter um período de gestação menor, o desenvolvimento cerebral dos animais continua após o nascimento, tendo acelerado crescimento durante a fase pós-natal. Com isso, o SNC continua sensível à exposição de drogas e agressões patofisiológicas. Contudo, não é possível assegurar que os animais submetidos ao etanol durante a fase pós-natal, apresentarão alterações semelhantes as causadas pela SAF.

Segundo a OMS, a cada ano, 12.000 neonatos no mundo nascem com a SAF. No mundo ocidental, são estimados 0,97 casos para 1000 nascimentos. No Japão a SAF

prevalece em menos de um caso para 10.000 nascimentos, resultado bem inferior ao de países europeus e os Estados Unidos da América [81]. Segundo May *et al.*[82], a maior frequência tem sido observada na África do Sul onde crianças entre 5 e 9 anos apresentam sintomas da síndrome numa proporção de 40,5 a 46,4 casos para 1000 crianças investigadas. Alguns sintomas podem não serem óbvios até o neonato completar uma idade entre 3 e 4 anos.

Recentemente existem sugestões que indicam que pessoas com SAF podem, também, manifestar mudanças no comportamento social. A exposição ao etanol durante o período pré e pós-natal pode provocar mudanças na memória recognitiva social [83].

#### **2.1.4 – Efeitos do álcool no Sistema Nervoso Central**

A substância com propriedades psicotrópicas presente nos diversos tipos de bebidas alcoólicas é o etanol. Por ser uma pequena molécula apolar solúvel tanto em água como em lipídeos, o etanol ultrapassa facilmente a barreira hematoencefálica e exerce boa parte dos seus efeitos no sistema nervoso central [84].

Inicialmente, acreditava-se que o etanol, devido à facilidade em atravessar a membrana plasmática, exercia efeitos generalizados, atuando de modo não específico em muitos alvos celulares. Contudo, tem sido demonstrado que o etanol afeta de modo diferenciado, a transmissão sináptica, sendo que, alguns tipos de receptores pós-sinápticos são particularmente mais sensíveis. Dentre eles, destacam-se, por exemplo, os receptores GABA<sub>A</sub> [85-86], os receptores NMDA para glutamato [87].

Os efeitos agudos da intoxicação com etanol em humanos são bem conhecidos, e dentre eles podem-se destacar dificuldade na fala, dificuldade na coordenação motora, redução da discriminação sensorial e alteração do humor. Em geral, é bem estabelecido

que o álcool produz efeitos centrais bifásicos característicos, com fase estimulante inicial (para baixas doses) seguida de depressão do sistema nervoso central (com o aumento da dose). Com maiores níveis de intoxicação, freqüentemente o humor tende a tornar-se instável, com euforia, melancolia, agressão e submissão ocorrendo sucessivamente.

King *et al.* [88] verificaram que indivíduos que esporadicamente ingerem grandes quantidades de álcool apresentam a fase estimulante mais pronunciada e uma tolerância maior aos efeitos depressivos do álcool do que indivíduos que bebem em menor quantidade e/ou freqüência. Tem sido sugerido que a fase estimulante pode constituir um reforço e, portanto, ter papel relevante para a determinação de um padrão de consumo crônico em humanos [89].

O consumo crônico de álcool pode produzir um amplo espectro de efeitos no sistema nervoso. Esses efeitos podem ser observados sob o ponto de vista morfológico, neurofisiológico e neuropsicológico.

#### **2.1.4.1 - Estudos morfológicos**

Diversas alterações morfológicas têm sido associadas com o consumo abusivo de álcool. A exposição afeta componentes químicos e celulares, cruciais para o desenvolvimento do cérebro.

Entre os componentes celulares afetados estão as células gliais, que constituem o tipo mais comum no cérebro. As células gliais são profundamente afetadas pelo etanol na fase pré-natal, e é sugerido que alterações provoquem anormalidades no SNC, entre elas, a má formação congênita. A exposição ao etanol provoca efeitos no DNA, RNA e síntese de proteínas, decrescendo o número de células mitóticas.



Estudos em humanos demonstram que em alcoólicos ocorre uma redução do volume cerebral com dilatação ventricular e espessamento das meninges. É possível que esta redução esteja associada às alterações no metabolismo celular e não à desnutrição ou que a desnutrição deve-se às alterações no metabolismo celular, em função do consumo de etanol que já é sabido leva à saciedade e o indivíduo ingere menor quantidade de alimentos, mesmo tendo mesma densidade calórica [90].

Harper *et al.* [91] descreveram uma redução média de 14% na substância branca dos hemisférios cerebrais. A síndrome de Marchiafava-Bignami, outra seqüela do uso do álcool, é caracterizada pela desmielinização do corpo caloso e de outras estruturas cerebrais como, a comissura anterior, os pedúnculos cerebelares, os tratos ópticos, as colunas posteriores da medula espinhal, o putâmen e algumas áreas do córtex cerebral.

Estudos neuropatológicos têm descrito uma marcante atrofia cortical em cérebros de alcoólicos crônicos. A redução cortical tem se mostrado mais pronunciada no lobo frontal [92].

Esta redução deve-se ao aumento nas perdas neuronais, que são reportadas por muitos autores em diferentes regiões do cérebro de ratos jovens quando expostos ao etanol durante o período pré-natal e neonatal. Segundo alguns autores, estas deficiências neuronais são permanentes, estendendo-se até a fase adulta [93]. Harper *et al.* [91] demonstraram uma redução significativa no número de neurônios do córtex frontal superior em alcoólicos crônicos. Recentemente, tem sido sugerido que esses efeitos podem estar relacionados ao aumento moderado da densidade de receptores NMDA para glutamato, observados no córtex frontal de alcoólicos crônicos [92]. Alterações no córtex pré-frontal podem contribuir para deficiências observadas na memória, atenção e atividades locomotoras. Entretanto, de acordo com Krahl *et al.* [94], as mudanças no córtex cerebral desaparecem com 70 dias após o nascimento.

O cerebelo e o hipocampo são regiões bem vulneráveis em relação ao estresse oxidativo e mecanismo que se agrava em função da ingestão alcoólica. Enquanto o cerebelo é importante no controle de todo o desempenho motor do organismo, o hipocampo é crucial nos processos mnemônicos. É consenso que as deficiências no controle motor e cognitivo são as conseqüências mais comuns da intoxicação com o álcool [93].

O cerebelo é mais vulnerável que o hipocampo quando exposto ao etanol na fase pré-natal e durante a fase pós-natal (período onde ocorre acelerado crescimento do cérebro em ratos). As células Purkinje do cerebelo têm relação funcional com o circuito neuroanatômico, responsável pela locomoção e coordenação motora e são mais vulneráveis nos lobos I, IX e X que nos lobos VI e VII.

Klintsova *et al.* [52] demonstraram que os neurônios Purkinje reduzem sua capacidade em realizar a plasticidade sináptica em ratos recém-nascidos cujas mães ingeriram álcool entre os dias 4 e 9 pós-nascimento. Porém, quando este grupo foi exposto a um programa de treinamento em habilidades motoras foi observado um aumento significativo nas sinapses das fibras paralelas por neurônios Purkinje, apresentando também, uma evolução em seu desempenho. Ao final de 10 dias de treinamento, nenhuma diferença foi observada quando este grupo foi comparado com os animais controle. Este estudo tem demonstrado que a aquisição de testes motores complexos, não meros exercícios, pode reabilitar as deficiências motoras, ocorridas no período de desenvolvimento, geradas pelo consumo do álcool. Isto ocorre devido ao aumento da sinaptogênese no córtex cerebral. Ou seja, animais expostos ao etanol têm rendimento pior na realização de tarefas, mas essa diferença desaparece ao longo de cursos de treinamento.

A neurogênese hipocampal é afetada causando prejuízos à memória e aprendizagem, e humor, em casos de alta ingestão de drogas, estresse e/ou danos cerebrais. Os estudos em ratos adultos usando modelos com alta ingestão alcoólica, têm observado redução na neurogênese hipocampal por estar inibindo a proliferação de células neurais e sobreviventes [52].

O número de células é reduzido significativamente nas regiões CA1 e CA3 do hipocampo durante o período equivalente ao terceiro mês de gestação. Em ratos, embora a neurogênese nas células piramidais hipocampal ocorra entre o período gestacional (entre os dias 16 e 20), a exposição ao etanol durante o período neonatal (os primeiros 12 dias pós-nascimento) ocasiona detrimientos maiores nas funções cerebrais. Tal fato deve-se à rápida proliferação neuronal e acelerado crescimento cerebral. De acordo com O'leary-Moore *et al.* [95], um estudo com ratos jovens demonstrou deficiências no aprendizado após um dia de exposição extrema ao etanol (o sexto dia pós-nascimento) ainda na fase da amamentação.

Contudo, ainda não é bem estabelecida a relação entre os prejuízos no aprendizado espacial apenas com as alterações na formação do hipocampo. É provável que o etanol, ou um de seus metabólicos, esteja agindo diretamente nas células hipocampais causando alguns transtornos ou até mesmo a morte celular. Os efeitos secundários oriundos da ingestão alcoólica podem causar deficiências nas células do hipocampo e afetar neurônios em todos os estágios do desenvolvimento.

#### **2.1.4.2 – Estudos neurofisiológicos e funcionais**

A exposição crônica ao etanol produz uma série de alterações neuroadaptativas que podem, ao longo do tempo, ter sérias conseqüências na função do sistema nervoso

central. As deficiências eletrofisiológicas observadas em alcoólatras podem refletir o início eminente de futuras mudanças da estrutura cerebral [92]. Alterações do lobo frontal também são descritas em estudos que envolvem a análise de imagens funcionais do cérebro.

Kuruoglu *et al.* [96], com recursos da Tomografia Computadorizada com Emissão de Fóton Único, verificaram que alcoólatras com personalidade anti-social apresentaram maiores evidências de hipoperfusão do lobo frontal do que seus respectivos controles.

George *et al.* [97], com recursos da Ressonância Magnética Funcional, demonstraram que alcoólatras, diante de estímulos visuais relacionados ao álcool, apresentaram aumento na atividade cerebral no córtex pré-frontal e regiões do tálamo, fato que não ocorreu com o grupo controle. Este dado é particularmente interessante, pois sugere uma estrutura cognitiva desorganizada nos alcoólicos, uma vez que as regiões pré-frontais e talâmicas estão em indivíduos normais, relacionadas com o equilíbrio emocional, com o comportamento adaptativo e com a atenção.

#### **2.1.4.3 – Estudo das deficiências cognitivas**

Diversos estudos envolvendo técnicas neuropsicológicas têm revelado um amplo espectro de deficiências cognitivas associados com a dependência ao álcool. As deficiências cognitivas incluem prejuízos em tarefas que envolvem percepção visuoespacial, aprendizado, diferentes tipos de memória, incluindo memória de trabalho, memória de curto prazo, memória espacial, memória verbal, abstração e resolução de problemas [98]. O consumo crônico de álcool também tem sido relacionado a diversos distúrbios comportamentais [56, 98-101].

Deficiências mnemônicas são usualmente reconhecidas como bons indicadores dos prejuízos cognitivos decorrentes do alcoolismo [102]. Particularmente as memórias visuoespaciais [98], auditiva [103] e verbal [104] têm se mostrado mais afetadas. Os prejuízos do álcool na memória parecem variar proporcionalmente com o grau de consumo, sendo que, normalmente, observa-se a perda temporária na memória de curto prazo em consumo moderado de etanol, esquecimento temporário em alguns alcoólatras, e até mesmo, a incapacidade permanente em consolidar memórias após alguns anos de uso crônico [102].

Já a síndrome de Wernicke-Korsakoff é um distúrbio neurológico comum após muitos anos de consumo crônico de álcool, caracterizada por marcantes deficiências de memória [105].

Outro dado importante observado especialmente em alcoólatras é que o consumo crônico de álcool afeta predominantemente o processamento da informação visual. Deficiências visuoespaciais são observadas em alcoólatras e podem variar do período de intoxicação até prolongada abstinência [98,106].

Os alcoólatras apresentam deficiências no rastreamento visual e aumento no tempo de procura de pistas espaciais. Tem sido sugerido também, que o processamento incorreto ou inadequado da informação visual, observado em alcoólatras, decorre da redução da atenção a estímulos ambientais [106]. Contudo, o abuso no consumo do álcool também pode gerar distúrbios nas vias visuais, como por exemplo, a ambliopia tóxica que é uma neurite do nervo óptico que progressivamente compromete a visão central, resultando em dificuldades de distinção do vermelho e do verde [107]. Provavelmente, estas alterações podem colaborar com o grande número de acidentes de trânsito envolvendo alcoólatras.

Vários autores têm sugerido que as deficiências cognitivas decorrentes do alcoolismo crônico se assemelham às observadas em indivíduos com danos no hemisfério direito. Em função disso, foi proposto um modelo de declínio cognitivo do hemisfério direito relacionado ao alcoolismo. Esse modelo parte do pressuposto de que as funções cognitivas em que o hemisfério direito é normalmente especializado são mais afetadas pelo alcoolismo do que as funções em que há especialização do hemisfério esquerdo. De acordo com esta idéia, as habilidades visuoespaciais, que são normalmente associadas à especialização do hemisfério direito, são bastante comprometidas pelo consumo crônico de álcool [106,108].

Para observar estes prejuízos na memória e aprendizagem são utilizados testes comportamentais. As deficiências de aprendizagem, gerados pelo efeito do álcool no SNC, são processos complexos. Muitos testes com roedores envolvem fortes reforços externos (privação de comida, estresse na piscina, choque no pé) que podem interferir nos resultados finais. O labirinto aquático de Morrise (teste de aprendizagem aquático) é um exemplo desta complexidade. É um teste que envolve estresse, integração visuo-espacial e habilidades motoras. Alterações em alguns desses parâmetros podem contribuir para a fraca performance, e confundir a interpretação das deficiências de aprendizado espacial [62].

### **2.1.5 – A importância dos minerais no SNC**

Alguns minerais (cálcio, cobre, manganês, ferro, zinco, cobalto e molibdênio) são essenciais nas funções do sistema nervoso central. Eles têm grande importância nas funções cerebrais como catalisadores, entre outras funções e são necessários para ativação e estabilização de enzimas [109].

Por causa da sua alta razão metabólica e baixa capacidade de regeneração, o sistema nervoso central é muito sensível à distúrbios nas concentrações de elementos traço. Logo, as concentrações de minerais no SNC têm que atingir níveis aceitáveis, uma vez que a ausência ou excesso pode resultar alterações em suas funções. Clinicamente, envenenamento com chumbo, mercúrio e arsênico tem demonstrado induzir a destruição vascular e hemorragia cerebral [109]. Por serem essenciais para o desenvolvimento do SNC, deve-se tentar entender, de maneira mais profunda, a atuação dos elementos traço.

#### **2.1.5.1 – O Zinco (Zn)**

O zinco é um elemento traço essencial no sistema nervoso. Diversos experimentos evidenciam um papel crítico e único para o zinco nas transmissões sinápticas no SNC e na morte de células neuronais [110-111]. O cérebro tem uma alta quantidade de zinco quando comparado com outros órgãos. A média da concentração total de zinco no cérebro tem sido estimada em, aproximadamente, 150  $\mu\text{mol/L}$ . O zinco tem uma predominância maior na massa cinzenta do que na massa branca do cérebro e quando analisado por regiões fica evidente uma maior concentração deste metal nas áreas do hipocampo, amígdala e neocórtex [110-111].

Histologicamente o zinco tem sido localizado exclusivamente no córtex cerebral, no núcleo da amígdala e na formação hipocampal. O transporte do zinco no cérebro ocorre via sistema de barreira cerebral. A carência desse mineral, principalmente observada em idosos, pode acarretar danos neurodegenerativos e estão relacionadas às deficiências de memória e de aprendizado [110-111]

O papel do zinco nas funções cognitivas e comportamentais tem sido estudado em dietas com deficiências de zinco durante o desenvolvimento e na fase adulta. Os sintomas mais comuns da deficiência de zinco no desenvolvimento cognitivo são: alterações na atenção, no comportamento neuropsicológico e no desenvolvimento motor. Os períodos de crescimento intenso (gravidez e infância) são mais suscetíveis a deficiência de zinco na dieta.

Em estudos com camundongos, tem sido observado que a carência de zinco em ratos jovens (62 dias de idade) acarreta sérios danos nos processos de memória. Um período de privação de zinco durante o desenvolvimento pode também ser crucial para o comportamento, aprendizagem e memória em idades adultas. Entretanto, nenhum efeito quanto à memória de longo prazo tem sido apresentado durante este período [111].

Em humanos, a deficiência de zinco tem sido vinculada a uma variedade de anormalidades fisiológicas e comportamentais, como informações de hipogonadismo, teste de acuidade anormal, geofagia e prejuízos cognitivos. Enquanto uma recente revisão de literatura mostra que os efeitos cognitivos e psicológicos da deficiência de zinco e suplementação de zinco em bebês e crianças são heterogêneos, em adultos, deficiências severas de zinco têm sido vinculadas à depressão, paranóia, alucinações e esquizofrenia [112].

As primeiras observações de prejuízos nas funções cognitivas relatando as deficiências de zinco foram apresentadas em 1961 (pesquisas em países como Egito e Iran) onde crianças tinham severos retardos no crescimento, hipogonadismo e letargia mental. Um estudo observou baixos níveis de zinco também em crianças nascidas na China, Guatemala, Índia, Brasil e México, devido a alimentação pobre em zinco ou rica em fibras, que induz a perda de zinco. Tratamento contendo a adição de zinco apresentou melhorias nas funções neuropsicológicas das crianças chinesas, bem como



desenvolvimento mental e psicomotor nas crianças indianas e brasileiras. Contudo, outros estudos reportam fracassos nestes tratamentos [111].

Também existe uma correlação entre o zinco e a idade. Estudos têm mostrado que com a idade, a carência de zinco passa a ser mais acentuada causando deterioração da memória e aprendizado em camundongos exibido em testes como o labirinto aquático. Isto deve-se às baixas concentrações de zinco na região CA3 do hipocampo quando comparado com ratos jovens. A concentração de zinco, medida por níveis plasmáticos, é diferente nas doenças neurodegenerativas (em algumas ocorre o excesso e em outras a carência) [111].

#### **2.1.5.2 – O Manganês (Mn)**

O Manganês é um elemento traço essencial que é encontrado em todos os tecidos e é necessário para o metabolismo de aminoácidos, lipídios, proteínas e carboidratos. A Academia Nacional de Ciências estabeleceu um consumo adequado para manganês em homens adultos de 2,3 mg/dia e mulheres adultas de 1,8 mg/dia. A quantidade maior para os homens adultos deve-se ao maior decréscimo na absorção do manganês. Mulheres grávidas e lactantes devem consumir 2,0 e 2,6 mg/dia respectivamente, uma vez que durante o período de desenvolvimento cerebral ocorre uma necessidade maior de manganês. Neonatos devem consumir 0,03 mg/dia enquanto bebês entre 07 e 12 meses devem consumir 0,6 mg/dia [113-114].

As deficiências de manganês podem iniciar múltiplos efeitos incluindo alterações no crescimento, carência na formação de ossos tendo deficiências esqueléticas, ataxia irreversível, tolerância anormal a glicose e alteração nos metabolismos de lipídios e carboidratos. Ratas grávidas submetidas à carência de

manganês geram filhotes que desenvolvem ataxia severas e irreversíveis. Embora a deficiência de manganês tenha gerado danos em diferentes espécies, em humanos, apesar de alguns sinais clínicos e sintomas serem observados em indivíduos sujeitos à dieta, os prejuízos ainda não estão bem estabelecidos [113-114].

O manganismo está associado aos elevados níveis de manganês no cérebro. A neurotoxicidade do manganês é bem conhecida desde o último século, sendo descrita e caracterizada pelos transtornos nas células piramidais e sintomas neuropsiquiátricos [115].

Estudos tentam comprovar a associação do manganês com a atividade dos neurônios. Sua função não é totalmente compreendida e isto deve-se à baixa concentração nos tecidos. Em muitos tecidos humanos e animais a concentração de manganês é inferior a  $1 \mu\text{g g}^{-1}$  [113,114].

Como no SNC a eliminação do manganês requer um longo tempo, efeitos neurotóxicos podem ocorrer aumentando a frequência de distúrbios Parkisonianos em indivíduos idosos. Concentrações anormais no cérebro, especialmente na região glial, têm ocasionado, também, doenças com sintomas similares à de Parkinson. Esta síndrome tem afetado trabalhadores que manufacturam baterias e trabalham em mineradoras, uma vez que o excesso deste elemento tem sido estimado por ressonância magnética sendo observado no sangue [114].

Mudanças comportamentais e distúrbios na locomoção também podem ser observados devido à intoxicação deste mineral [113-115].

### **2.1.5.3 – O Alumínio (Al)**

A toxicidade do alumínio tem sido bem conhecida desde o último século. A presença do alumínio pode causar ou contribuir para doenças específicas semelhante a encefalopatia e a doença de Alzheimer. É proposto que o núcleo celular pode ser um importante alvo para o acúmulo de alumínio por causa da alta densidade de fosfatos no DNA e RNA. O acúmulo deste elemento provavelmente inicia uma série de interferências bioquímicas afetando a atividade de algumas enzimas [116-117].

O excesso de Al foi considerada uma possível causa para a alta frequência de esclerose e demência Parkinsoniana entre os nativos de certa região do Oeste da Índia, onde o solo é rico em  $Al^{+3}$  e carente em  $Mg^{+2}$  e  $Ca^{+2}$  [117].

O consumo diário de alumínio no homem é, aproximadamente, 3 mg por dia, entretanto, apenas cerca de 0,06 a 0,1 da dose ingerida é absorvida em vias gastrointestinal [116].

### **2.1.5.4 – O Chumbo (Pb)**

Metais pesados como chumbo e cádmio são desprovidos de funções biológicas. Ou seja, naturalmente, estes elementos não participam das reações bioquímicas necessárias à manutenção da vida. Contudo, uma vez ingressando no organismo através de contaminação exógena, estes elementos são transportados para diversos sítios, interagem de várias formas com a maquinaria celular e geram uma extensa lista de efeitos tóxicos. A carga tóxica e o tempo de contaminação são fundamentais na determinação da qualidade e da intensidade das manifestações a serem apresentadas [118].

O chumbo pode ser absorvido através de ingestão, inalação ou através da pele e, uma vez absorvido, pode se concentrar em diversos órgãos. Sua vida média em tecidos moles corresponde a cerca de 4 a 6 semanas, podendo atingir décadas quando depositado no tecido ósseo [119]. A toxicidade por chumbo afeta especialmente os sistemas renal, endócrino e nervoso.

A penetração do chumbo no sistema nervoso central pode dar-se através de lesões da barreira hematoencefálica. De fato, o acúmulo de chumbo em células endoteliais destrói a barreira, criando uma porta de acesso do metal ao encéfalo. Em crianças e animais jovens, a penetração do chumbo no cérebro é facilitada pela imaturidade funcional da barreira hematoencefálica [120].

Além disso, mesmo no cérebro adulto, o metal pode atingir regiões desprovidas de barreira hematoencefálica ou penetrar por difusão passiva lenta. A intoxicação crônica por chumbo em humanos pode levar a disfunção do sistema nervoso central, caracterizada como hiperatividade idiopática, redução de QI , assim como dificuldades auditivas, diminuição da atenção e problemas relacionados à linguagem e ao aprendizado [120]. Do ponto de vista neuroquímico, a presença de chumbo no cérebro perturba a função de vários neurotransmissores, como a serotonina, a dopamina, o GABA, a noradrenalina e a acetilcolina [121].

#### **2.1.5.5 – O Mercúrio (Hg)**

O mercúrio pode facilmente cruzar as barreiras da interface na placenta. Consumo de altos níveis de metilmercúrio (MeHg) durante a gravidez pode iniciar encefalopatologia nas crias. Existem diferenças nas mudanças patológicas em jovens quando comparadas com adultos expostos a MeHg. Exposição de MeHg em adultos

danifica áreas específicas do SNC como camadas do cerebelo e córtex visual. Já em fetos afeta todo o SNC. A autópsia de uma vítima de um acidente mostrou alta taxa de mercúrio no cérebro ao longo dos 26 anos de exposição. O depósito do metal tinha histologicamente, se concentrado nas células gliais e em neurônios de áreas específicas do cérebro e células epiteliais. Estudos com animais tratados com mercúrio também demonstram significativos edemas cerebrais, mudanças vascular, degeneração e perda de parênquima [109].

#### **2.1.5.6 – O Ferro (Fe)**

A deficiência de ferro está associada às anormalidades cognitivas. O ferro é essencial para o sustento de quase todos os organismos visto que tem um papel importante no neurodesenvolvimento através da interferência em enzimas que controlam a síntese de neurotransmissores, divisão celular, energia de metabolismo neuronal e mielinização. Nos casos de deficiência de ferro, estes mecanismos são afetados [107,109, 122-123].

Estudos eletrofisiológicos em crianças sugerem o risco da carência de ferro. Esta carência prejudica o desenvolvimento do hipocampo, área responsável pela memória cognitiva. O desenvolvimento do hipocampo se inicia no feto e continua após o nascimento em humanos e ratos.

Em ratos, a continuação da neurogênese, a remodelagem das células piramidais, as velocidades do pico de mielinização e a proliferação das sinapses resultam em aumento exponencial do tamanho do hipocampo durante as quatro primeiras semanas após o nascimento. O crescimento rápido acompanha um aumento no nível de ferro, necessário para o desenvolvimento do hipocampo. A crescente taxa de crescimento tem

aumentado a vulnerabilidade do desenvolvimento hipocampal ocasionando várias perdas pré e pós-nascimento. Logo, a alteração no desenvolvimento do hipocampo, por deficiência de ferro, pode ter um papel importante nas anormalidades cognitivas [122].

As mudanças neuroquímicas acompanham as alterações estruturais durante o desenvolvimento regional do cérebro.

A deficiência de ferro ocorre em função dos problemas nutricionais afetando aproximadamente 2 bilhões de pessoas em todo o mundo. A deficiência de ferro é também vista como um fator de risco para a toxicidade de metais (em geral, cádmio, alumínio e chumbo). A carência de ferro tem uma relação inversa com a absorção gastrointestinal de uma grande quantidade de metais. Por exemplo, alto consumo de ferro decresce absorção gastrointestinal de manganês, enquanto deficiência de ferro faz aumentar a absorção. Além disso, ratos expostos a altas doses de manganês exibiram alteração no metabolismo de ferro no cérebro. A carência de ferro também está associada ao aumento de manganês no cérebro, que proporciona efeitos heterogêneos [123].

De acordo com Erikson *et al.* [123], a carência de ferro gera aumento nas concentrações de Zn e Mg no globo pálido. O globo pálido é importante para o controle motor e o aumento ou o decréscimo de zinco, nas regiões cerebrais, pode acarretar danos severos. As regiões mais afetadas devido à carência nas concentrações de ferro são o cerebelo e a região do gânglio basal : o putâmen.

O acúmulo de ferro no SNC está vinculado à diversas doenças neurodegenerativas, incluindo a doença de Alzheimer, de Huntington e a síndrome de Hallervordewn-Spatz. A doença de Parkinson está associada à altas concentrações de ferro na substância negra. A contribuição que o ferro exerce nas doenças neurodegenerativas deve-se a sua participação em reações ocorridas, que podem

danificar o DNA, as proteínas, os lipídios e os neurotransmissores semelhantes a dopamina [112].

#### **2.1.5.7 – O Cobre (Cu)**

O cobre é essencial para o desenvolvimento e funções do SNC. É fundamental para as enzimas uma vez que, com a sua presença, elas realizam atividades catalisadoras e ficam estáveis. Distúrbios no funcionamento das enzimas podem contribuir para severos sintomas neurológicos e doenças neurológicas [124].

Ele pode existir como  $\text{Cu}^+$  ou  $\text{Cu}^{+2}$  nas condições fisiológicas e é altamente reativo, portanto, muito tóxico para as células [124].

Embora a presença do cobre seja fundamental, o excesso ocasiona danos no DNA, propiciando doenças como a de Wilson, que é caracterizada pelo acúmulo de cobre em órgãos e células. Enquanto esta desordem apresenta frequentemente disfunções ou alterações hepáticas incluindo hepatite, cirrose e edemas, é interessante notar que, aproximadamente 20% dos pacientes, apresentam, inicialmente, sintomas neurológicos e espasmos musculares. Pacientes também evidenciam sintomas neuropsiquiátricos incluindo depressão, perda de memória, ansiedade, manias e uma variedade de tipos esquizofrênicos [112].

Recentes estudos relacionam o cobre na patogênese de lesão neuronal na doença de Alzheimer premeditando a encefalopatologia [112].

## **2.2 – Memória e Aprendizagem**

### **2.2.1 – O condicionamento aversivo**

O conhecimento sobre os mecanismos celulares e moleculares, subjacentes aos processos de aprendizagem e memória, teve um grande desenvolvimento, por meio de estudos com modelos animais e de diferentes tipos de situações de aprendizagem, dentre as quais destacamos o condicionamento aversivo [125].

Posteriormente aos estudos referentes a amígdala, o hipocampo passou a receber maior atenção quanto ao seu envolvimento nesse processo de aprendizado e memória. A amígdala e o hipocampo desempenham um papel importante na organização e no controle de diversas respostas motoras e vegetativas, relativas ao condicionamento aversivo, como por exemplo, a locomoção, a hipotermia e as vocalizações ultrassônicas [126].

Segundo Sperandio [127], o trabalho de Kim e Fanselow (1992) foi um marco importante na análise do papel do hipocampo na consolidação de memória emocional aversiva em ratos. Nesse trabalho, foi usado o pareamento som-choque em ratos submetidos à lesões hipocâmpais 1, 7, 17 ou 28 dias, após o treino. No primeiro dia após a lesão, os animais tiveram menor intensidade de hipotermia no treino quando re-expostos ao contexto. No teste realizado em outro contexto com reapresentação do som, todos os grupos apresentaram hipotermia. Esses dados mostraram o papel dinâmico do hipocampo na formação de memórias e indicaram um processamento diferente para o armazenamento das informações aversivas, relativas ao pareamento dos estímulos num contexto, e ao som, quando apresentado em outro contexto.



Segundo Sperandeo [127], muitos trabalhos emergiram, no sentido de analisar, como o contexto ambiental influencia o aprendizado e a memória, e principalmente as relações das funções do hipocampo na memória contextual. Na espécie humana também já é bem conhecida a influência da informação contextual sobre o comportamento. A informação contextual é dada por um estímulo multimodal, dessa forma, o contexto é caracterizado como uma configuração de estímulos. Assim, o condicionamento de um contexto ambiental, implica na aquisição e na retenção do valor funcional de uma situação ou contexto que foi associado a eventos, podendo ambos, valor funcional e eventos, serem positivos ou negativos.

De um modo geral, os estudos indicam que as memórias contextuais podem ser armazenadas em outras regiões, além do hipocampo. O'reilly *et al.* [128] sugerem que, em mamíferos, essas regiões seriam o hipocampo e o neocórtex, e que elas teriam diferentes características operacionais. Esses autores sugerem que o hipocampo é ideal para o aprendizado rápido e incidental que é necessário para o condicionamento contextual. Similarmente, segundo Fanselow [129], o hipocampo forma a representação contextual, entretanto, é possível que o neocórtex exerça essa função em sua ausência.

Muitos estudos focalizaram os efeitos de alterações funcionais em vias neuroquímicas no hipocampo e abrangeram a análise dos diferentes neurotransmissores que atuam nos circuitos hipocampais. Contudo, observa-se que na literatura sobre a neuroquímica hipocampal, os circuitos glutamatérgicos foram alvos de um elevado número de investigações, em diferentes laboratórios como reportado por Sperandeo [127].

### **2.2.2 – O labirinto aquático de Morris**

A memória espacial e a atividade locomotora podem ser avaliadas pelo labirinto aquático de Morris. Em ratos, a versão espacial do labirinto aquático é um modelo de memória dependente do hipocampo. Nesta tarefa, o animal precisa aprender a encontrar uma plataforma submersa fixa e invisível para ele, partindo de vários pontos do labirinto [130]. Desta forma o animal aprende a triangular as distâncias entre as dicas visuais do ambiente e a posição da plataforma de uma forma flexível, como em um mapa cognitivo.

Trabalhos anteriores mostram que mesmo um animal com lesão hipocampal pode aprender a encontrar a plataforma se ele parte sempre de um mesmo ponto do labirinto, pois desta forma ele não precisa usar propriedades dedutivas do seu mapa cognitivo para associar as dicas espaciais e, por triangulação deduzir a posição da plataforma, independente de se liberado próximo ou distante de uma dica específica. O animal pode simplesmente aprender a se aproximar de um conjunto de dicas próximas à plataforma [131].

Esta é uma tarefa que pode ser resolvida com um aprendizado do tipo estímulo-resposta, semelhante à versão do labirinto aquático com dica visual, onde os animais precisam aprender a associar uma dica visual (uma bola fixada em cima da plataforma) com a resposta de se aproximar desta dica. Já foi demonstrado que o aprendizado do labirinto aquático com dica visual dependente do estriado dorsal e da substância negra, e não é afetado pela lesão do hipocampo [132].

O labirinto aquático com plataforma submersa só funciona como um modelo de aprendizado espacial se o animal partir de vários pontos, podendo, assim, traçar uma relação entre as dicas. Espera-se, portanto, que o aprendizado (quando o animal parte de

um único ponto com a plataforma fixa sempre na mesma localização) seja dependente da substância negra e do estriado, estruturas cerebrais que medeiam o aprendizado [132].

Santucci *et al.* [133], utilizando o teste de Morris, observaram baixo rendimento nos processos de aprendizagem em ratos que consomem 20% de etanol desde o 21º dia pós-natal durante quatro meses. Em seu estudo os testes comportamentais asseguraram que o álcool causa interferência na memória, resultando em danos na localização espacial.

Boulouard *et al.* [134] ofereceram uma solução com etanol por duas semanas aos ratos Sprague-Dawley e , em seguida, realizaram o teste de Morris durante uma semana. Eles observaram que o consumo crônico de álcool (1,5 g/kg) resulta em deficiências de retenção de memória, levando os animais a percorrer grandes distâncias na piscina para encontrar a plataforma.

Segundo Zimmerberg *et al.* [135], animais submetidos à uma dieta líquida com 35% das calorias derivadas do álcool entre o 15º e 21º dia, submetidos ao teste de Morris entre o 22º e 24º dia, apresentam deficiências cognitivas relacionadas à “navegação espacial”.

Todavia, o teste também mostrou que os animais tratados com etanol foram capazes de aprender tão bem quanto os animais tratados dieta normal após 3 meses de exposição ao etanol (10 a 12% na dieta) e também não foi possível observar prejuízos cognitivos [136].

### 2.3 - A Fluorescência de Raios X

A fluorescência de raios X (FRX) foi, efetivamente, introduzida como técnica de análise elementar na década de 50. A análise multielementar instrumental por Fluorescência de Raios X, é baseada na medida das intensidades dos raios X característicos emitidos pelos elementos químicos componentes de uma amostra, quando devidamente excitados. O crescente desenvolvimento dos detectores semicondutores contribuiu para aumentar e diversificar as aplicações dos sistemas de fluorescência por dispersão de energia da fluorescência de raios X por **dispersão de energia** (ED-XRF, *energy dispersive X-ray fluorescence*), com instrumentação menos dispendiosa e emprego mais prático [137].

Esta técnica vem sendo utilizada principalmente para amostras sólidas, permitindo a determinação simultânea ou seqüencial da concentração de vários elementos, sem a necessidade de destruição da amostra, ou seja, de modo instrumental, sem nenhum pré-tratamento químico. Para amostras líquidas pode-se recorrer a uma pré-concentração, empregando-se troca iônica, precipitação, quelação, etc.

Uma variante da fluorescência de raios X por dispersão de energia, denominada de Reflexão Total (TXRF) vem sendo utilizada principalmente na análise de elementos traços (na faixa de  $\text{ng.g}^{-1}$ ) em amostras líquidas (da ordem de  $\mu\text{L}$ ) e em amostras sólidas ( $\mu\text{g}$ ) precedidas por digestão química [32], em pesquisas relacionadas ao Monitoramento Ambiental, Oceanografia, Biologia, Medicina, Indústria e Mineralogia [33, 138-139].

A TXRF foi inicialmente sugerida por Yoneda *et al.* [140], sendo o seu princípio físico definido claramente quatro anos após por Aiginger *et al* [141]. Entre 1978 e 1982, Schewenke *et al.* [142] deram um impulso nesta técnica, desenvolvendo

um instrumento compacto, denominado Extra II, Rich. Seifert & Co., Ahrensburg, Alemanha, com grande melhoria na parte ótica e suficiente estabilidade, surgindo depois outros equipamentos visando a análise de superfície semicondutoras, como o XSA 8000 produzido pela Atomika, Munique, e TREX 600 pela Technos, Osaka.

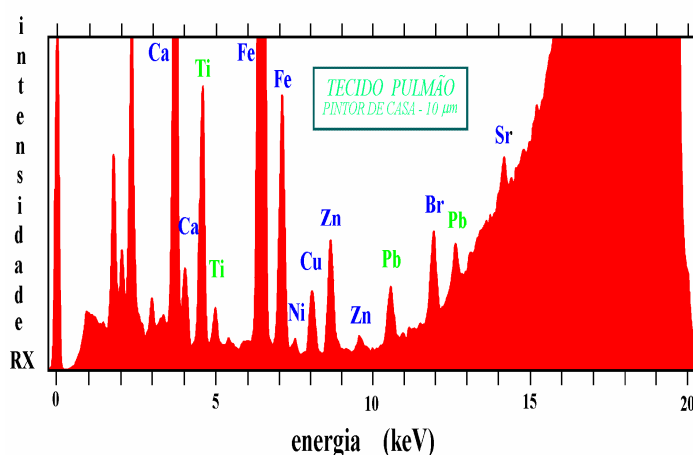
As duas primeiras reuniões internacionais para discutir esta técnica foram realizadas em 1986 e 1988 na Alemanha, a terceira em 1990 na Áustria e a quarta novamente na Alemanha, em 1992 [143-145]. Publicações mais recentes sobre os conceitos físicos e aplicações práticas da TXRF, assim como detalhes sobre a geometria do suporte da amostra, filtros de corte para raios X de altas energias e tendências desta nova técnica, estão sendo apresentadas em revistas especializadas.

De acordo com Klockenkämper [34] em 1996, já existiam, aproximadamente, 20 laboratórios trabalhando com equipamentos comerciais em uma variedade de aplicações, envolvendo as áreas de Oceanografia, Mineralogia, Biologia, Medicina, Medicina Legal e Pesquisa Ambiental [146-147].

Em alguns casos é necessário um tratamento prévio da amostra, como liofilização, incineração e técnicas cromatográficas. Amostras sólidas e filtros de aerossóis são geralmente analisados após digestão com ácidos, com limites de detecção abaixo de  $\mu\text{g.g}^{-1}$ , podendo-se também pipetar diretamente sobre o suporte alíquotas de suspensões de materiais em pó muito fino [34].

As várias áreas de aplicação da TXRF são descritas por Klockenkämper *et al.* [148], enfatizando-se a análise de água, solo e ar em Monitoramento Ambiental; sangue, fluídos corporais e tecidos na Medicina, e plantas e alimentos na Biologia. A diversidade nas áreas de aplicação é muito ampla, como concentrações de elementos em vinhos tinto e branco [149], em ossos de humanos [150], em fumaça e cinza de cigarros [151].

Para tecidos biológicos é possível analisar cortes histológicos de 10  $\mu\text{m}$  (200  $\mu\text{g}$ ), colocados diretamente sobre o suporte [152-154]. Como ilustração desta técnica, a Figura 2.1 mostra o espectro de raios X de um corte de tecido de pulmão de um pintor de casas, obtido com excitação com tubo de Mo, podendo-se visualizar claramente os raios X característicos K e L dos elementos Ti e Pb, respectivamente, provenientes de tintas e vernizes [33].



**Figura 2.1** - Espectro de fluorescência de raios X de um corte de tecido de pulmão de pintor de casas, visualizando-se claramente a sua contaminação por Ti e Pb, proveniente de tintas e vernizes [33].

Chwiej et al.[155] analisaram, através da  $\mu\text{XRF}$ , tecidos do sistema nervoso central de pacientes com desordem neurodegenerativa (esclerose) e pacientes normais. Observaram as concentrações de P, S, Cl, , Ca, Fe, Cu, Zn e Br e os resultados indicaram diferenças significativas no acúmulo de elementos nos tecidos analisados (matéria cinzenta, matéria branca, células nervosas).

Serpa et al. [156] compararam as concentrações elementares em diferentes regiões do cérebro de ratos normais da linhagem Wistar, entre elas, córtex temporal, córtex entorrinal, córtex visual e hipocampo, de animais jovens, adultos e velhos por TXRF com Radiação Síncrotron. Concluíram que, no córtex entorrinal, alguns

elementos decrescem com a idade, como o Zn, S, Cl, K, Ca e Br. Já no hipocampo ocorreu aumento de Al, P, S, K, Fe, Cu, Zn e Rb com a idade dos animais.

Magalhães et al.[157] estudaram as distribuições de elementos em tecidos normais e cancerosos de mulheres em 7 cidades localizadas na Alemanha por TXRF. As amostras dos tecidos carcinomatosos (do colo, da mama e do útero) tiveram maiores concentrações de P, S, K, Ca, Fe e Cu e decréscimo de Zn e Br quando comparado com os tecidos normais. As deficiências de Zn podem estar associadas à inibição de funções dos elementos essenciais, alterações do metabolismo e modificações da função das proteínas no transporte de certos números de elementos. Por outro lado, o aumento de alguns elementos pode estar associado à mecanismos toxicológicos quando estes elementos estão em excesso. Em associação com enzimas e moléculas biológicas, eles podem mudar sua reatividade e originar mudanças nas reações químicas.

Liu et al [158] determinaram as concentrações de elementos traço, através da XRF com Radiação Síncrotron, em seções do cérebro de ratos Wistar que foram submetidos à dieta com deficiência de iodo em relação aos animais controle. Os níveis de Ca no tálamo e Cu e Fe no córtex cerebral de animais submetidos a dieta foram significativamente menores quando comparado com os animais controle, enquanto que o P, S, K Rb, Br, Cl, Zn, Ca e Cu, no hipocampo, foram significativamente maiores.

Serpa et al. [159] determinaram deficiências cognitivas em ratos Wistar idosos, avaliando também as concentrações de elementos traço em seis diferentes regiões do cérebro através da TXRF com radiação Síncrotron. O desempenho cognitivo foi avaliado através da aplicação do Teste do Labirinto Aquático de Morris, sendo os ratos Wistar separados em dois grupos, um grupo saudável e o outro com deficiência cognitiva. O hipocampo dos animais com deficiência cognitiva apresentou concentrações superiores de Al, Fe, Cu, Zn e Br em relação ao hipocampo dos animais

saudáveis. Todavia, a concentração de K foi maior em todas as regiões dos animais saudáveis.

Czarnowski et al. [160] encontraram as concentrações de diferentes elementos traço em tecidos normais e cancerosos do trato digestivo, do colo e do estômago de humanos através da TXRF. Foram observadas diminuições nos níveis de Cr, Fe e Ni no carcinoma do estômago e um acúmulo significativo de K em tecidos cancerosos no colo.

Ektessabi et al. [161] investigaram os elementos traço em cérebro de pacientes com doenças neurodegenerativas, como demência, através da  $\mu$ XRF com Radiação Síncrotron. As regiões analisadas foram o córtex temporal, frontal e occipital e os resultados apresentaram maiores concentrações de Pb e Ca. O Pb é a substância que apresenta maior neurotoxicidade no SNC e este excesso pode ser um dos fatores etiológicos.

Marcò et al. [162] determinaram as concentrações de Zn e Cu, através da TXRF, em diferentes regiões do cérebro de humanos que sofreram morte acidental e instantânea. Os resultados analíticos foram comparados com amostras certificadas e com os dados obtidos utilizando a Espectrometria de Absorção Atômica. O método proposto foi eficiente apresentando resultados satisfatórios quando comparado.



## CAPÍTULO III

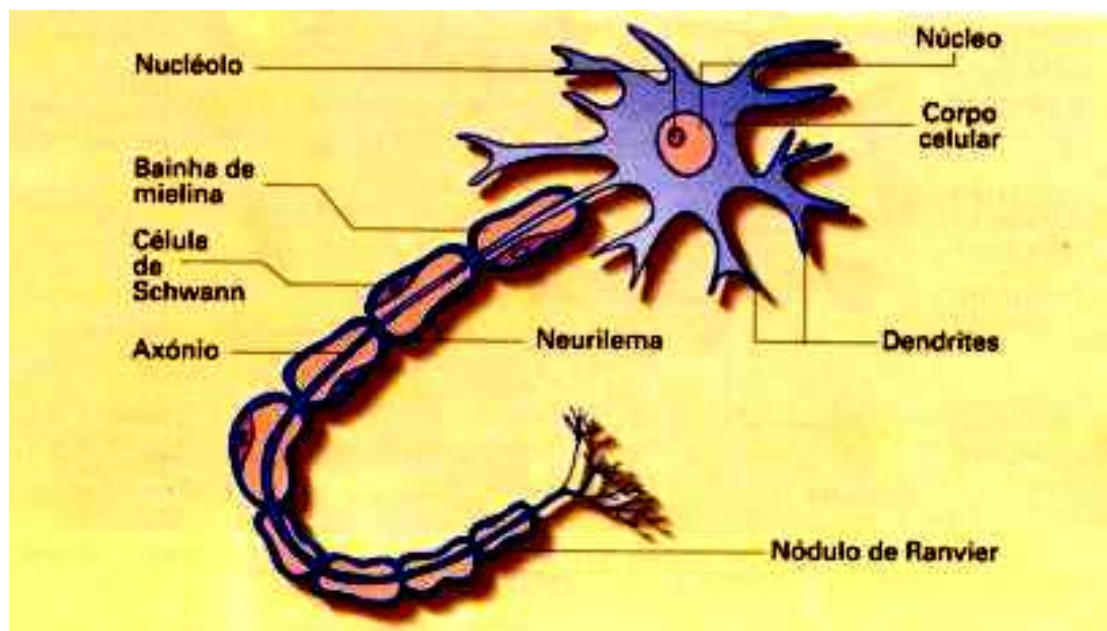
### 3 - FUNDAMENTOS TEÓRICOS

#### 3.1 – Sistema nervoso

##### 3.1.1 – Neurônios e Células Gliais

Para compreendermos melhor as funções de coordenação e regulação exercidas pelo sistema nervoso, precisamos primeiro conhecer a estrutura básica de um neurônio e como a mensagem nervosa é transmitida.

Um neurônio é uma célula composta de um corpo celular (onde está o núcleo, o citoplasma e o citoesqueleto), e de finos prolongamentos celulares denominados neuritos, que podem ser subdivididos em dendritos e axônios, como representado na figura 3.1.



**Figura 3.1** – Os componentes básicos de um neurônio [163]

Os dendritos são prolongamentos geralmente muito ramificados e que atuam como receptores de estímulos, funcionando, portanto, como "antenas" para o neurônio. Os axônios são prolongamentos longos que atuam como condutores dos impulsos nervosos. Os axônios podem se ramificar e essas ramificações são chamadas de colaterais. Todos os axônios têm um início (cone de implantação), um meio (o axônio propriamente dito) e um fim (terminal axonal ou botão terminal). O terminal axonal é o local onde o axônio entra em contato com outros neurônios e/ou outras células e passa a informação (impulso nervoso) para eles. A região de passagem do impulso nervoso de um neurônio para a célula adjacente chama-se sinapse. Às vezes os axônios têm muitas ramificações em suas regiões terminais e cada ramificação forma uma sinapse com outros dendritos ou corpos celulares. Estas ramificações são chamadas coletivamente de arborização terminal [163].

O axônio está envolvido por um dos tipos celulares seguintes: célula de Schwann (encontrada apenas no SNP) ou [oligodendrócito](#) (encontrado apenas no SNC). Em muitos axônios, esses tipos celulares determinam a formação da bainha de mielina - invólucro principalmente lipídico (também possui como constituinte a chamada proteína básica da mielina) que atua como isolante térmico e facilita a transmissão do impulso nervoso. Em axônios mielinizados existem regiões de descontinuidade da bainha de mielina, que acarretam a existência de uma constrição (estrangulamento) denominada nódulo de Ranvier. No caso dos axônios mielinizados envolvidos pelas células de Schwann, a parte celular da bainha de mielina, onde estão o citoplasma e o núcleo desta célula, constitui o chamado neurilema [163].

### **3.1.1.2 – Tipos de Neurônios**

De acordo com as funções na condução dos impulsos, os neurônios podem ser classificados em:

1. neurônios receptores ou sensitivos (aférentes): são os que recebem estímulos sensoriais e conduzem o impulso nervoso ao sistema nervoso central;
2. neurônios motores ou efetuadores (eferentes): transmitem os impulsos motores (respostas ao estímulo);
3. neurônios associativos ou interneurônios: estabelecem ligações entre os neurônios receptores e os neurônios motores. [163]

### **3.1.1.3 - Células da Glia**

As células da neuroglia cumprem as funções de sustentar, proteger, isolar e nutrir os neurônios. Há diversos tipos celulares, distintos quanto à morfologia, à origem embrionária e às funções que exercem. Distinguem-se, entre elas, os astrócitos, oligodendrocitos e microglia. Têm formas estreladas e prolongações que envolvem as diferentes estruturas do tecido.

Os astrócitos são as maiores células da neuroglia e estão associados à sustentação e à nutrição dos neurônios. Preenchem os espaços entre os neurônios, regulam a concentração de diversas substâncias com potencial para interferir nas funções neuronais normais (como, por exemplo, as concentrações extracelulares de potássio), regulam os neurotransmissores (restringem a difusão de neurotransmissores liberados e possuem proteínas especiais em suas membranas que removem neurotransmissores da fenda sináptica). Estudos recentes também sugerem que podem ativar a maturação e a proliferação de células-tronco nervosas adultas e ainda, que fatores de crescimento produzidos pelos astrócitos podem ser críticos na regeneração dos tecidos cerebrais ou espinhais danificados por traumas ou enfermidades [52,163].

Os oligodendrócitos são encontrados apenas no SNC. Devem exercer papéis importantes na manutenção dos neurônios, uma vez que, sem eles, os neurônios não sobrevivem em meio de cultura. No SNC, são as células responsáveis pela formação da bainha de mielina. Um único oligodendrócito contribui para a formação de mielina de vários neurônios.

A micróglia é constituída por células fagocitárias, análogas aos macrófagos e que participam da defesa do sistema nervoso.

### **3.1.2 – A Estrutura do Sistema Nervoso**

#### **3.1.2.1 – As Funções e Divisões do Sistema Nervoso**

O sistema nervoso capacita o organismo a perceber as variações do meio (interno e externo), a difundir as modificações que essas variações produzem e a executar as respostas adequadas para que seja mantido o equilíbrio interno do corpo (homeostase). São os sistemas envolvidos na coordenação e regulação das funções corporais.

No sistema nervoso diferenciam-se duas linhagens celulares: os neurônios e as células da glia (ou da [neuróglia](#)). Os neurônios são as células responsáveis pela recepção e transmissão dos estímulos do meio (interno e externo), possibilitando ao organismo a execução de respostas adequadas para a manutenção da homeostase. Para exercerem tais funções, contam com duas propriedades fundamentais: a irritabilidade (também denominada excitabilidade ou responsividade) e a condutibilidade. Irritabilidade é a capacidade que permite a uma célula responder a estímulos, sejam eles internos ou externos. Portanto, irritabilidade não é uma resposta, mas a propriedade que torna a célula apta a responder. Essa propriedade é inerente aos vários tipos celulares

do organismo. No entanto, as respostas emitidas pelos tipos celulares distintos também diferem umas das outras. A resposta emitida pelos neurônios assemelha-se a uma corrente elétrica transmitida ao longo de um fio condutor: uma vez excitados pelos estímulos, os neurônios transmitem essa onda de excitação - chamada de impulso nervoso - por toda a sua extensão em grande velocidade e em um curto espaço de tempo. Esse fenômeno deve-se à propriedade de condutibilidade [164].

O SNC recebe, analisa e integra informações. É o lugar onde ocorre a tomada de decisões e o envio de ordens. O SNP carrega informações dos órgãos sensoriais para o sistema nervoso central e o do sistema nervoso central para os órgãos efetores (músculos e glândulas)

### **3.1.2.2 – A formação do Sistema Nervoso Central**

O sistema nervoso origina-se da ectoderme embrionária e se localiza na região dorsal. Durante o desenvolvimento embrionário, a ectoderme sofre uma invaginação, dando origem à goteira neural, que se fecha, formando o tubo neural. Este possui uma cavidade interna cheia de líquido, o canal neural [52,163].

Em sua região anterior, o tubo neural sofre dilatação, dando origem ao encéfalo primitivo. Em sua região posterior, o tubo neural dá origem à medula espinhal. O canal neural persiste nos adultos, correspondendo aos ventrículos cerebrais, no interior do encéfalo, e ao canal do epêndimo, no interior da medula [52,163].

Durante o período embrionário, verifica-se que a partir da vesícula única que constitui o encéfalo primitivo, são formadas três outras vesículas: a primeira, denominada prosencéfalo; a segunda, mesencéfalo e a terceira, rombencéfalo [52,163].

O prosencéfalo e o rombencéfalo sofrem estrangulamento, dando origem, cada um deles, a duas outras vesículas. O mesencéfalo não se divide. Desse modo, o encéfalo do embrião é constituído por cinco vesículas em linha reta. O prosencéfalo divide-se em

telencéfalo (hemisférios cerebrais), e diencéfalo (tálamo e hipotálamo); o mesencéfalo não sofre divisão e o rombencéfalo divide-se em metencéfalo (ponte e cerebelo) e miencéfalo (bulbo). As divisões do SNC se definem já na sexta semana de vida fetal [52,163].

### 3.1.2.3 – A estrutura do Sistema Nervoso Central

O SNC divide-se em encéfalo e medula. O encéfalo corresponde ao telencéfalo (hemisférios cerebrais), diencéfalo (tálamo e hipotálamo), cerebelo, e tronco encefálico, que se divide em : bulbo, situado caudalmente; mesencéfalo, situado cranialmente; e ponte, situada entre ambos. As divisões do encéfalo humano estão representadas na figura 3.2

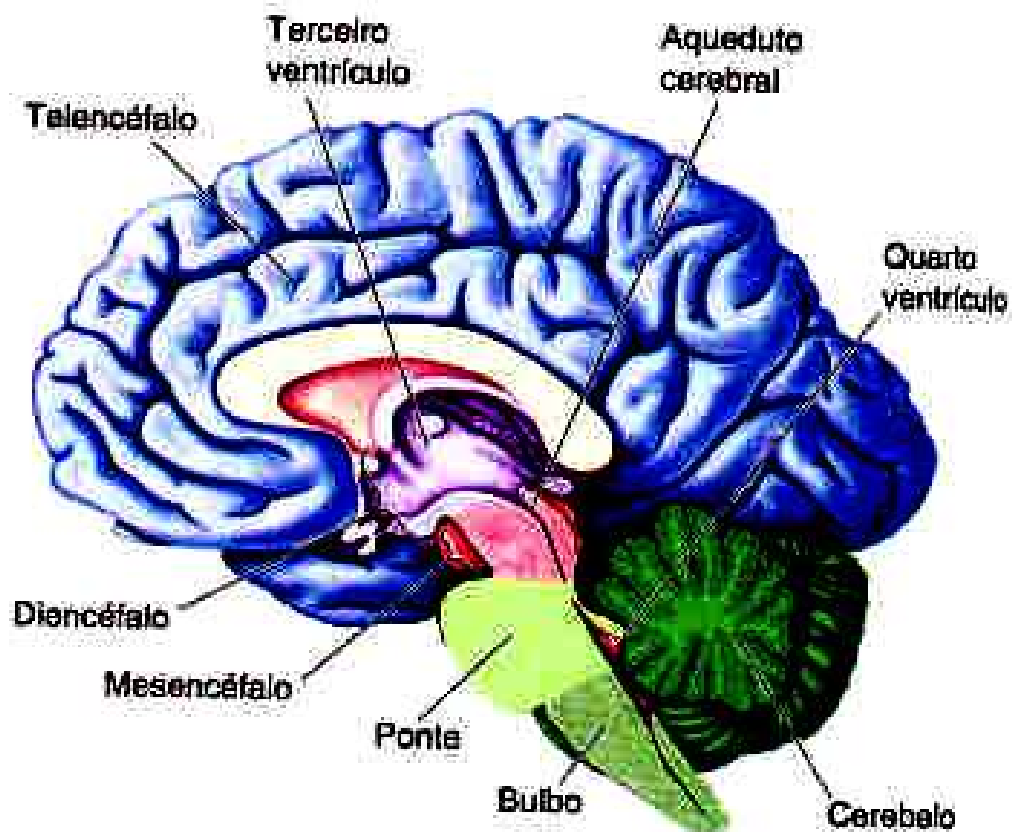
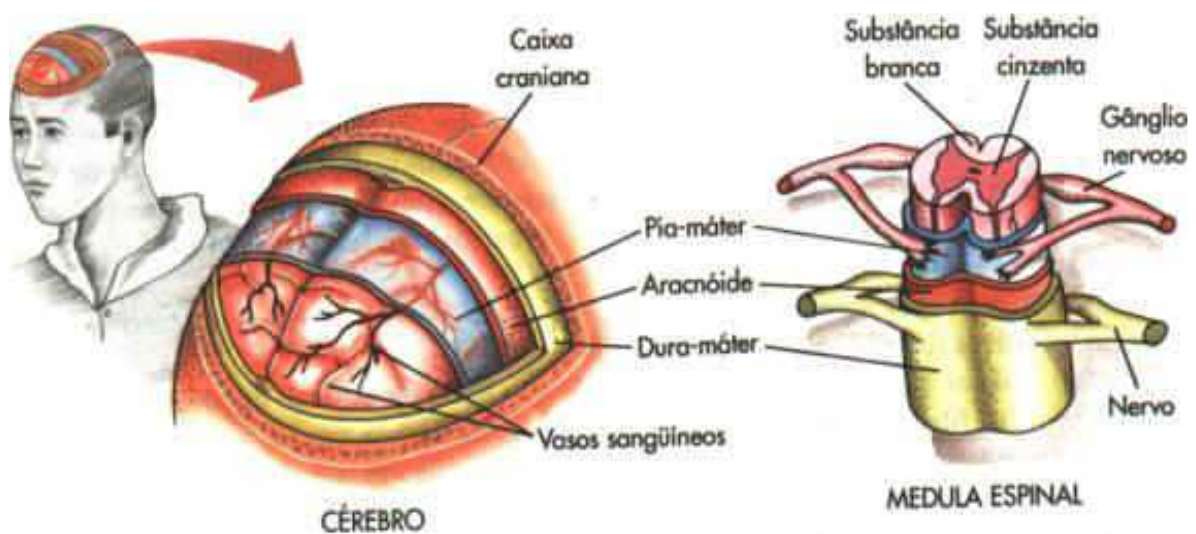


Figura 3.2 – As divisões do encéfalo humano [163]

No SNC, existem as chamadas substâncias cinzenta e branca. A substância cinzenta é formada pelos corpos dos neurônios e a branca, por seus prolongamentos. Com a exceção do bulbo e da medula, a substância cinzenta ocorre mais externamente e a substância branca, mais internamente [52,163].

Os órgãos do SNC são protegidos por estruturas esqueléticas (caixa craniana, protegendo o encéfalo; e coluna vertebral, protegendo a medula, também denominada raque) e por membranas denominadas meninges, situadas sob a proteção esquelética: dura-máter, aracnóide e a pia-máter. Entre as meninges aracnóide e pia-máter há um espaço preenchido por um líquido denominado líquido cefalorraquidiano ou líquor como pode ser observado pela figura 3.3 [52,163,165].



**Figura 3.3** – As estruturas esqueléticas e as membranas que envolvem o encéfalo. [165]

### 3.1.2.3.1 – O Telencéfalo

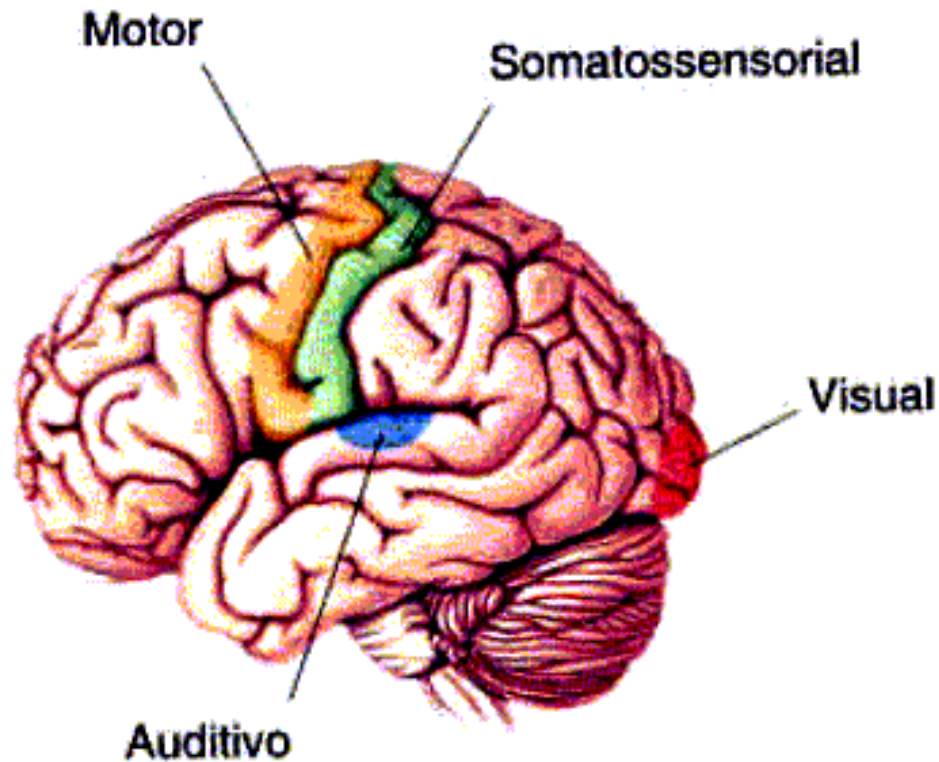
O encéfalo humano contém cerca de 35 bilhões de neurônios e pesa aproximadamente 1,4 kg. O telencéfalo ou cérebro é dividido em dois hemisférios cerebrais bastante desenvolvidos. Nestes, situam-se as sedes da memória e dos nervos sensitivos e motores. Entre os hemisférios, estão os ventrículos cerebrais (ventrículos

laterais e terceiro ventrículo); existe ainda um quarto ventrículo, localizado mais abaixo, ao nível do tronco encefálico. São reservatórios do líquido céfalo-raquidiano, que participam da nutrição, da proteção e da excreção do sistema nervoso [166].

A região superficial do telencéfalo, que acomoda bilhões de corpos celulares de neurônios (substância cinzenta), constitui o córtex cerebral, formado a partir da fusão das partes superficiais telencefálicas e diencefálicas. Em seu desenvolvimento, o córtex ganha diversos sulcos permitindo a compactação do cérebro na calota craniana, que não acompanha o seu crescimento. Em função deste fato, no cérebro adulto, apenas 1/3 de sua superfície fica “exposta”, pois o restante permanece entre os sulcos. A espessura do córtex cerebral varia de 2 a 6 mm. O lado esquerdo e direito do córtex cerebral são ligados por um feixe grosso de fibras nervosas chamado de corpo caloso [166].

Os lobos são as principais divisões físicas do córtex cerebral. O lobo frontal é o responsável pelo planejamento consciente e pelo controle motor. O lobo temporal tem uma função importante no desenvolvimento da memória e da audição, o lobo parietal lida com os sentidos corporal e espacial e o lobo occipital direciona a visão. Na figura 3.4 é possível observar as localizações dos lobos no córtex cerebral [163].





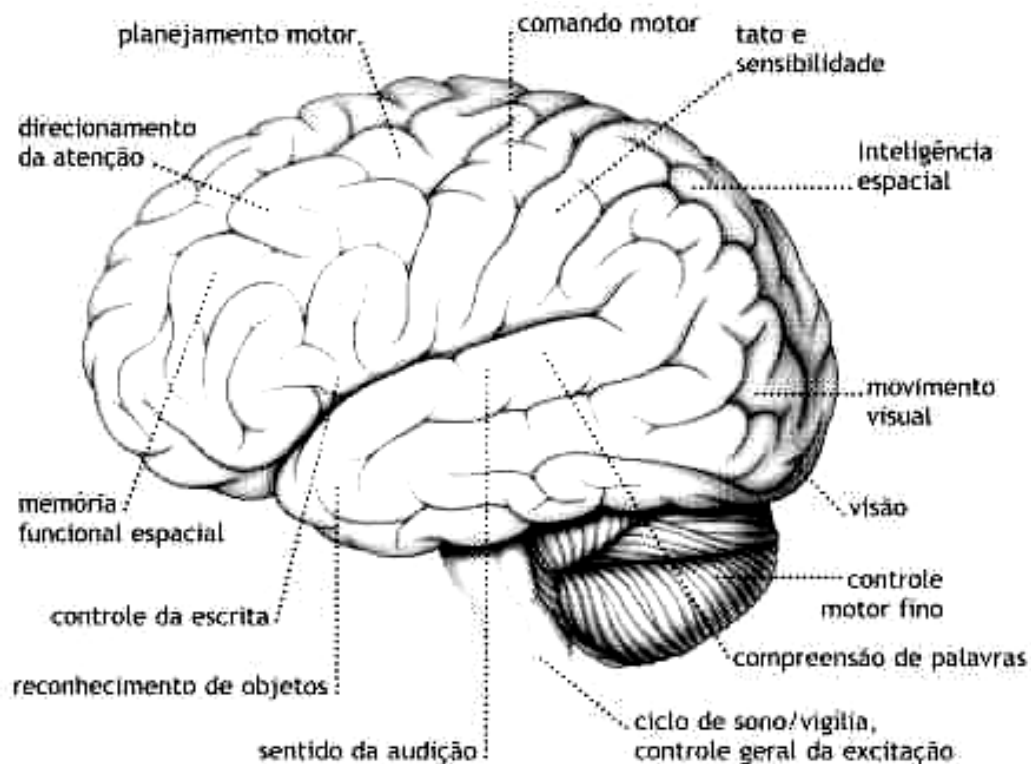
**Figura 3.4** – A localização dos lobos no córtex cerebral [163]

O córtex recobre um grande centro medular branco, formado por fibras axonais (substância branca). Em meio a este centro branco (nas profundezas do telencéfalo), há um agrupamento de corpos celulares neuronais que formam os núcleos (gânglios) da base ou núcleos (gânglios) basais – caudato, putamen, globo pálido e núcleo subtalâmico, envolvidos em conjunto, no controle do movimento. Tem sido determinado que os gânglios da base também participam de um grande número de circuitos paralelos, entretanto, em relação a função motora a participação não é tão intensa. Diversos circuitos estão envolvidos em certos aspectos da memória e da função cognitiva.

As funções mais específicas dos gânglios basais relacionadas aos movimentos são:

- a) núcleo caudato: controla movimentos intencionais grosseiros do corpo (isso ocorre a nível sub-consciente e consciente) e auxilia no controle global dos movimentos do corpo;
- b) Putamen: funciona em conjunto com o núcleo caudato no controle de movimentos intencionais grosseiros. Ambos os núcleos funcionam em associação com o córtex motor, para controlar diversos padrões de movimento;
- c) Globo pálido: provavelmente controla a posição das principais partes do corpo, quando uma pessoa inicia um movimento complexo. Isto é, se uma pessoa deseja executar uma função com precisão ela, com uma de suas mãos, deve primeiro colocar seu corpo numa posição apropriada e, então, contrair a musculatura do braço. Acredita-se que essas funções sejam iniciadas, principalmente, pelo globo pálido;
- d) Núcleo subtalâmico: e áreas associadas: controlam possivelmente os movimentos da marcha [167].

O córtex cerebral está dividido em mais de quarenta áreas funcionalmente distintas, sendo a maioria pertencente ao chamado neocórtex. Cada uma das áreas do córtex cerebral controla uma atividade específica e essas regiões estão representadas na figura 3.5 [163].



**Figura 3.5** – As atividades específicas de cada região do córtex cerebral [168].

O hipocampo está localizado na base do lobo temporal do córtex cerebral perto de muitas associações nervosas. Seu nome deve à semelhança ao formato de um cavalo-marinho (hipo = cavalo). Uma das razões para o interesse no estudo do hipocampo foi que desde o início da década de 50, ele tem sido reconhecido como tendo um papel fundamental em algumas formas de memória e aprendizado. O grande interesse no entendimento dos mecanismos cerebrais envolvidos na memória e aprendizado ocasionou um aumento nas pesquisas envolvendo o hipocampo nos níveis neuroanatômicos, fisiológicos e comportamentais. Sobretudo, o que é conhecido atualmente sobre a fisiologia e a farmacologia da transmissão sináptica do sistema nervoso central deve-se a estes estudos [166].

O hipocampo possui uma camada de células principais denominada camada celular piramidal (estrato piramidal), e ela pode ser claramente dividida em duas regiões principais, uma região de células maiores próximas ao giro denteado e outra região

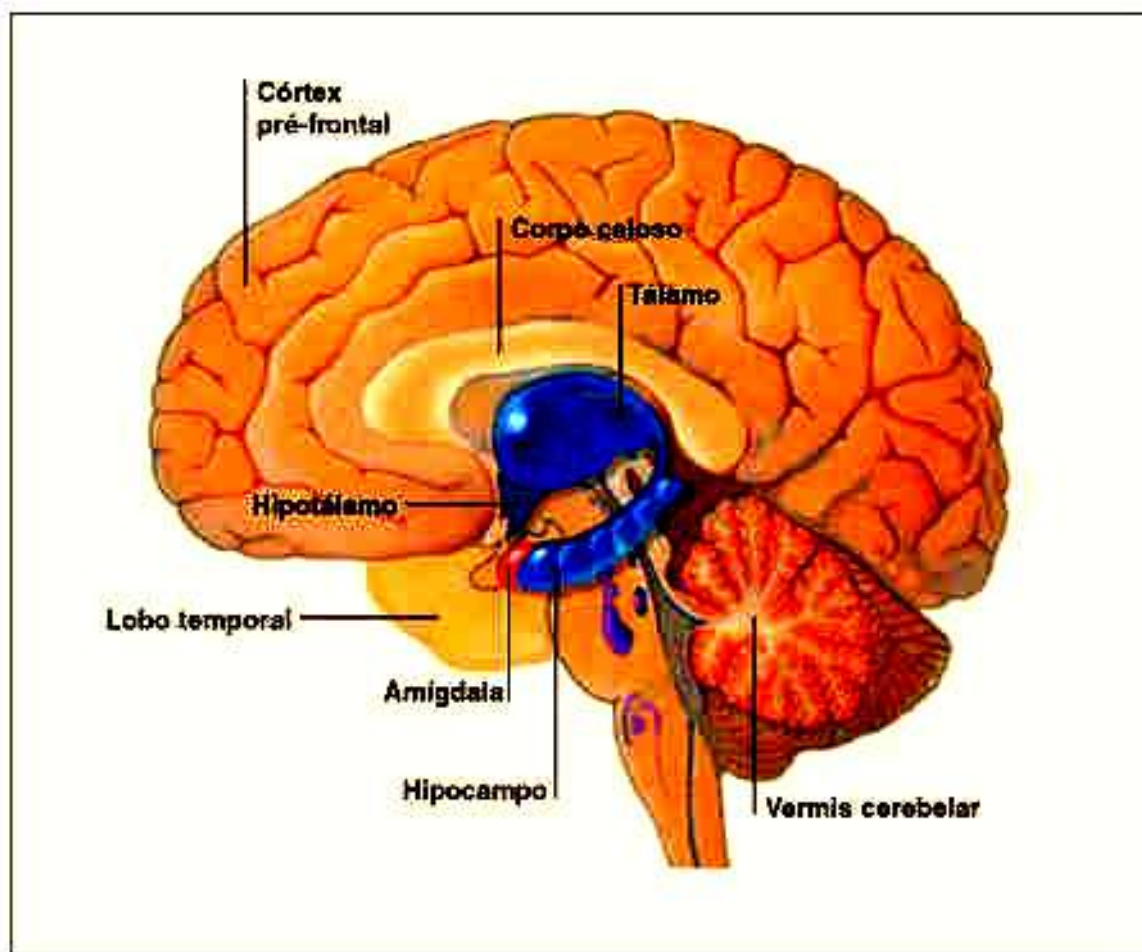
distal de células menores. Lorente de Nó, em 1934, dividiu o hipocampo em três regiões (CA1, CA2 e CA3). As regiões CA3 e CA2 equivalem à região de células maiores enquanto que a região CA1, as células menores [166].

O hipocampo, assim como outras partes do sistema límbico, trocam sinais constantemente com todo o córtex cerebral. Tem sido demonstrado que o hipocampo é uma estrutura importante para a consolidação da memória recente. Em contrapartida, o armazenamento da memória de longo prazo está relacionada ao córtex cerebral [166].

#### **3.1.2.3.2 - O Diencéfalo**

Todas as mensagens sensoriais, com exceção das provenientes dos receptores do olfato, passam pelo tálamo antes de atingir o córtex cerebral. Esta é uma região de substância cinzenta localizada entre o tronco encefálico e o cérebro. O tálamo atua como estação transmissora de impulsos às regiões apropriadas do cérebro onde eles devem ser processados. O tálamo também está relacionado com alterações no comportamento emocional; que decorre, não só da própria atividade, mas também de conexões com outras estruturas do sistema límbico (que regula as emoções ) [163].

O sistema límbico é um grupo de estruturas que inclui hipotálamo, tálamo, amígdala, hipocampo, os corpos mamilares e o giro do cíngulo. Todas estas áreas são muito importantes para a emoção e reações emocionais e podem ser observadas através da figura 3.6[166].



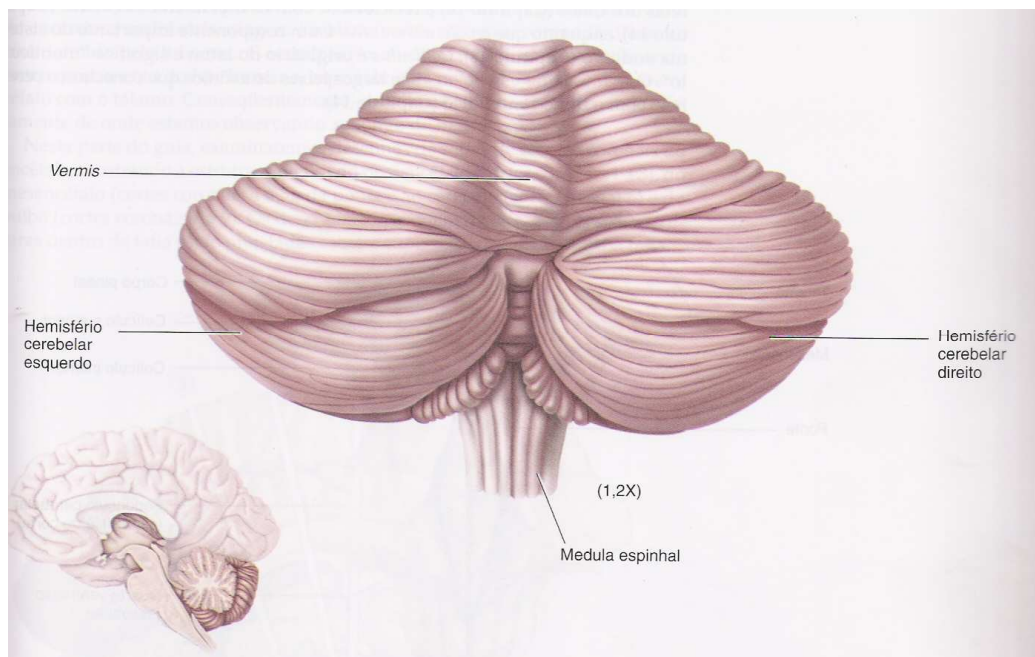
**Figura 3.6** – Regiões do encéfalo [163]

O hipotálamo é constituído por substância cinzenta e é o principal centro integrador das atividades dos órgãos viscerais, sendo um dos principais responsáveis pela homeostase corporal. Ele faz ligação entre o sistema nervoso e o sistema endócrino, atuando na ativação de diversas glândulas endócrinas. É o hipotálamo que controla a temperatura corporal, que regula o apetite e o balanço de água no corpo, o sono e está envolvido na emoção e no comportamento sexual. Tem amplas conexões com as demais do prosencéfalo e com o mesencéfalo. É bem estabelecido que o hipotálamo desempenhe, ainda, um papel nas emoções. Especificamente, as partes laterais parecem envolvidas com o prazer e a raiva, enquanto que a porção mediana parece mais ligada à aversão, ao desprazer e à tendência ao riso (gargalhada) incontrolável. De um modo geral, a participação do hipotálamo é menor na gênese

(“criação”) do que na expressão (manifestações sintomáticas) dos estados emocionais [167].

### 3.1.2.3.3 – O Cerebelo

Situado atrás do cérebro está o cerebelo, que é primariamente um centro para o controle dos movimentos iniciados pelo córtex motor (possui extensivas conexões com o cérebro e a medula espinhal). Como o cérebro, também está dividido em dois hemisférios. Porém, ao contrário dos hemisférios cerebrais, o lado esquerdo do cerebelo está relacionado movimentos do lado esquerdo do corpo, enquanto o lado direito, com os movimentos do lado direito do corpo [166]. O cerebelo e seu hemisfério está representado na figura 3.7.



**Figura 3.7 – O cerebelo [163]**

O cerebelo recebe informações do córtex motor e dos gânglios basais de todos os estímulos enviados aos músculos. A partir das informações do córtex motor sobre os movimentos musculares que pretende executar e de informações proprioceptivas que

recebe diretamente do corpo (articulações, músculos, áreas de pressão do corpo, aparelho vestibular e olhos), avalia o movimento realmente executado. Após a comparação entre o desempenho e aquilo que se teve em vista realizar, estímulos corretivos são enviados de volta ao córtex para que o desempenho real seja igual ao pretendido. Dessa forma, o cerebelo relaciona-se com os ajustes dos movimentos, equilíbrio, postura e tônus muscular [166].

#### **3.1.2.3.4 - O Tronco Encefálico**

O tronco encefálico interpõe-se entre a medula e o diencéfalo, situando-se ventralmente ao cerebelo. Possui várias estruturas como o bulbo, o mesencéfalo e a ponte. O bulbo recebe informações de vários órgãos do corpo, controlando as funções autônomas (a vida vegetativa): batimento cardíaco, respiração, pressão do sangue, reflexos de salivação, tosse, espirro e o ato de engolir. A Ponte participa de algumas atividades do bulbo, interferindo no controle da respiração, além de ser um centro de transmissão de impulsos para o cerebelo. Serve ainda de passagem para as fibras nervosas que ligam o cérebro à medula.

Possui três funções gerais;

- a) recebe informações sensitivas de estruturas cranianas e controla os músculos da cabeça;
- b) contém circuitos nervosos que transmitem informações da medula espinhal até outras regiões encefálicas e, em direção contrária, do encéfalo para a medula espinhal (lado esquerdo do cérebro controla os movimentos do lado direito do corpo; lado direito do cérebro controla os movimentos do lado esquerdo do corpo);

c) regula a atenção, função esta que é mediada pela formação reticular (agregação mais ou menos difusa de neurônios de tamanhos e tipos diferentes, separados por uma rede de fibras nervosas que ocupa a parte central do tronco encefálico) [163].

Além destas três funções gerais, as várias divisões do tronco encefálico desempenham funções motoras e sensitivas específicas.

#### **3.1.2.4 – Sistema Nervoso Periférico**

O sistema nervoso periférico é formado por nervos encarregados de fazer as ligações entre o sistema nervoso central e o corpo. Nervo é a reunião de várias fibras nervosas, que podem ser formadas de axônios e dendritos [53].

Os nervos que levam informações da periferia do corpo para o SNC são os nervos sensoriais, que são formados por prolongamentos de neurônios sensoriais. Aqueles que transmitem impulsos do SNC para os músculos ou glândulas são os nervos motores. Ainda existem os nervos mistos, formados por axônios de neurônios motores e sensoriais[53].

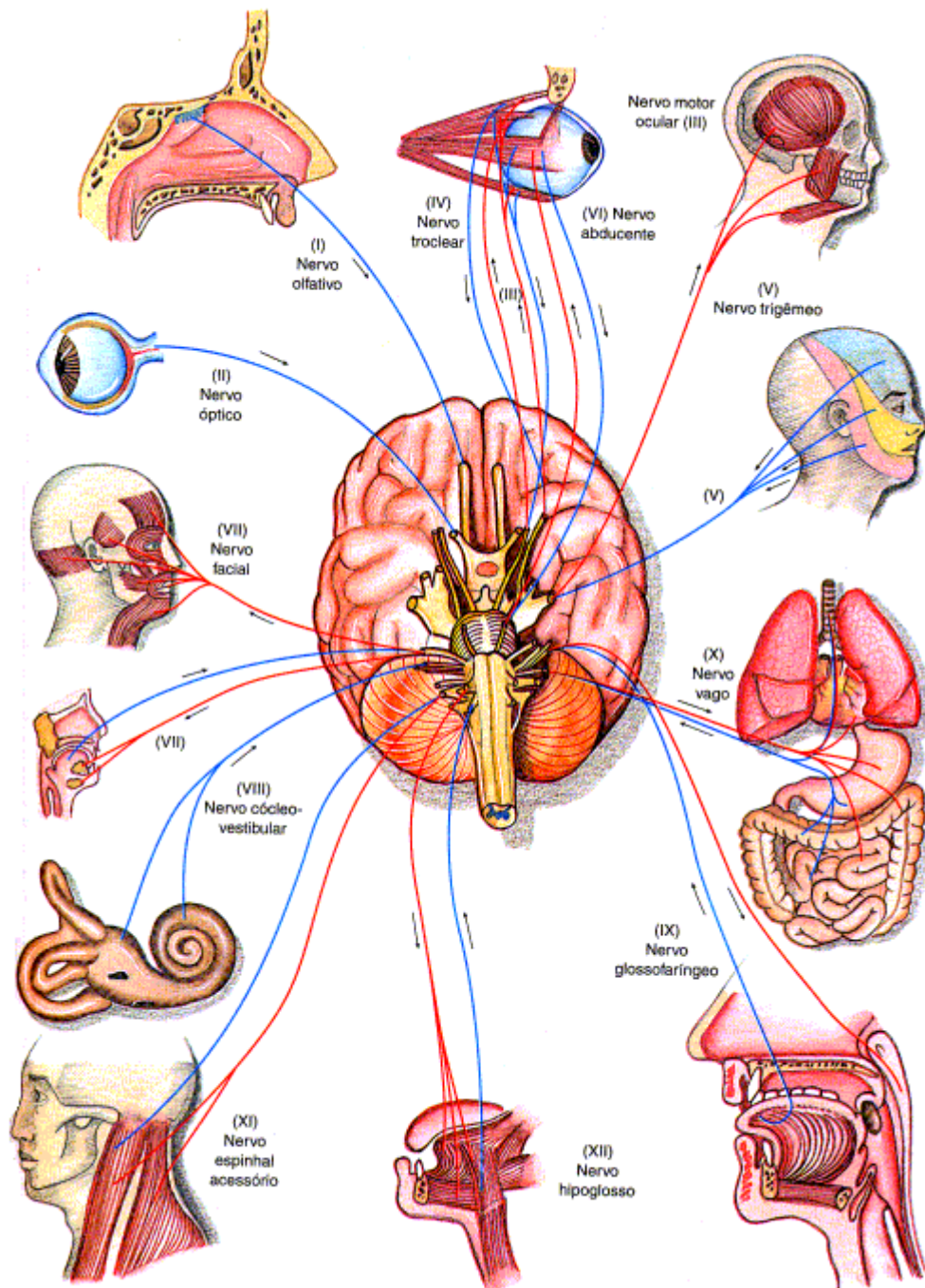
Quando partem do encéfalo, os nervos são chamados de cranianos; quando partem da medula espinhal denominam-se raquidianos.

Do encéfalo partem doze pares de nervos cranianos. Três deles são exclusivamente sensoriais, cinco são motores e os quatro restantes são mistos. Os nervos e suas funções podem ser visualizados através da figura 3.8.



**Tabela 3.1** – As funções dos nervos cranianos

<b>Nervo craniano</b>		<b>Função</b>
I - OLFATÓRIO	sensitiva	Percepção do olfato.
II - ÓPTICO	sensitiva	Percepção visual.
III - OCULOMOTOR	motora	Controle da movimentação do globo ocular, da pupila e do cristalino.
IV - TROCLEAR	motora	Controle da movimentação do globo ocular.
V - TRIGÊMEO	mista	Controle dos movimentos da mastigação (ramo motor); Percepções sensoriais da face, seios da face e dentes (ramo sensorial).
VI - ABDUCENTE	motora	Controle da movimentação do globo ocular.
VII - FACIAL	mista	Controle dos músculos faciais – mímica facial (ramo motor); Percepção gustativa no terço anterior da língua (ramo sensorial).
VIII - VESTÍBULO-COCLEAR	sensitiva	Percepção postural originária do labirinto (ramo vestibular); Percepção auditiva (ramo coclear).
IX - GLOSSOFARÍNGEO	mista	Percepção gustativa no terço posterior da língua, percepções sensoriais da faringe, laringe e palato.
X - VAGO	mista	Percepções sensoriais da orelha, faringe, laringe, tórax e vísceras. Inervação das vísceras torácicas e abdominais.
XI - ACESSÓRIO	motora	Controle motor da faringe, laringe, palato, dos músculos esternocleidomastóideo e trapézio.
XII - HIPOGLOSSO	motora	Controle dos músculos da faringe, da laringe e da língua.



**Figura 3.8** – Os nervos cranianos e suas funções [169]

Com base na sua estrutura e função, o sistema nervoso periférico pode ainda subdividir-se em duas partes: o sistema nervoso somático e o sistema nervoso autônomo.

O SNP somático tem por função reagir a estímulos provenientes do ambiente externo. Ele é constituído por fibras motoras que conduzem impulsos do sistema

nervoso central aos músculos esqueléticos. O corpo celular de uma fibra motora do SNP somático fica localizado dentro do SNC e o axônio vai diretamente do encéfalo ou da medula até o órgão que inerva [163].

O SNP autônomo, como o próprio nome diz, funciona independentemente de nossa vontade e tem por função regular o ambiente interno do corpo, controlando a atividade dos sistemas digestório, cardiovascular, excretor e endócrino. Ele contém fibras nervosas que conduzem impulsos do SNC aos músculos lisos das vísceras e à musculatura do coração.

O SNP autônomo divide-se em sistema nervoso simpático e sistema nervoso parassimpático.

O SNP autônomo simpático estimula ações que mobilizam energia, permitindo ao organismo responder a situações de estresse. Por exemplo, o sistema simpático é responsável pela aceleração dos batimentos, pelo aumento da pressão arterial, da concentração de açúcar no sangue e pela ativação do metabolismo geral do corpo [163].

Já o SNP autônomo parassimpático estimula principalmente atividades relaxantes, como as reduções do ritmo cardíaco e da pressão arterial, entre outras [163].

O hormônio secretado pelos neurônios do SNP autônomo parassimpático é a acetilcolina, razão pela qual esses neurônios são chamados colinérgicos, enquanto os neurônios do sistema simpático secretam principalmente noradrenalina, razão por que a maioria deles é chamada neurônios adrenergicos. A acetilcolina e a noradrenalina têm a capacidade de excitar alguns órgãos e inibir outros, de maneira antagônica [165].

### **3.1.2.5 – Os Neurotransmissores**

A maioria dos neurotransmissores situa-se em três categorias: aminoácidos, aminas e peptídeos. Os neurotransmissores aminoácidos e aminas são pequenas

moléculas orgânicas com pelo menos um átomo de nitrogênio, armazenadas e liberadas em vesículas sinápticas. Sua síntese ocorre no terminal axonal a partir de precursores metabólicos ali presentes. As enzimas envolvidas na síntese de tais neurotransmissores são produzidas no soma (corpo celular do neurônio) e transportadas até o terminal axonal e, neste local, rapidamente dirigem a síntese desses mediadores químicos. Uma vez sintetizados, os neurotransmissores aminoácidos e aminas são levados para as vesículas sinápticas que liberam seus conteúdos por exocitose. Nesse processo, a membrana da vesícula funde-se com a membrana pré-sináptica, permitindo que os conteúdos sejam liberados. A membrana vesicular é posteriormente recuperada por endocitose e a vesícula reciclada é recarregada com neurotransmissores [163].

Os neurotransmissores peptídeos constituem-se de grandes moléculas armazenadas e liberadas em grânulos secretores. A síntese dos neurotransmissores peptídeos ocorre no retículo endoplasmático rugoso do soma. Após serem sintetizados, são clivados no complexo de golgi, transformando-se em neurotransmissores ativos, que são secretados em grânulos secretores e transportados ao terminal axonal para serem liberados na fenda sináptica [163].

Diferentes neurônios no SNC liberam também diferentes neurotransmissores. A transmissão sináptica rápida na maioria das sinapses do SNC é mediada pelos neurotransmissores aminoácidos glutamato, gama-aminobutírico (GABA) e glicina. A amina acetilcolina medeia a transmissão sináptica rápida em todas as junções neuromusculares. As formas mais lentas de transmissão sináptica no SNC e na periferia são mediadas por neurotransmissores das três categorias [163].

O glutamato e a glicina estão entre os 20 aminoácidos que constituem os blocos construtores de proteínas. Conseqüentemente são abundantes em todas as células do

corpo. Em contraste, o GABA e as aminas são produzidas apenas pelos neurônios que os liberam [163].

O mediador químico adrenalina, além de servir como neurotransmissor no cérebro, também é liberado pela glândula adrenal para a circulação sanguínea.

Abaixo são citadas as funções específicas de alguns neurotransmissores.

- Endorfinas e encefalinas: bloqueiam a dor, agindo naturalmente no corpo como analgésicos;
- Dopamina: neurotransmissor inibitório derivado da tirosina. Produz sensações de satisfação e prazer. Os neurônios dopaminérgicos podem ser divididos em três subgrupos com diferentes funções. O primeiro grupo regula os movimentos: uma deficiência de dopamina neste sistema provoca a doença de Parkinson, caracterizada por tremuras, inflexibilidade, e outras desordens motoras, e em fases avançadas pode verificar-se demência. O segundo grupo, o mesolímbico, funciona na regulação do comportamento emocional. O terceiro grupo, o mesocortical, projeta-se apenas para o córtex pré-frontal. Esta área do córtex está envolvida em várias funções cognitivas, memória, planejamento do comportamento e pensamento abstrato, assim como em aspectos emocionais, especialmente relacionado com o estresse. Distúrbios nos dois últimos sistemas associados estão associados com a esquizofrenia;
- Serotina: neurotransmissor derivado do triptofano regula o humor, o sono, a atividade sexual, o apetite, o ritmo circadiano, as funções neuroendócrinas, temperatura corporal, sensibilidade à dor, atividade motora e funções cognitivas. Atualmente vem sendo intimamente relacionada aos transtornos do humor, ou produzindo um aumento da disponibilidade dessa substância no espaço entre um neurônio e outro. Tem efeito inibidor da conduta e modulador geral da atividade

psíquica. Influi sobre quase todas as funções cerebrais, inibindo-a de forma direta ou estimulando o sistema GABA;

- GABA: principal neurotransmissor inibitório do SNC. Ele presente em quase todas as regiões do cérebro, embora sua concentração varie conforme a região. Está envolvido com os processos de ansiedade. Seu efeito ansiolítico seria fruto de alterações provocadas em diversas estruturas do sistema límbico, inclusive a amígdala e o hipocampo. A inibição da síntese do GABA ou bloqueio de seus neurotransmissores no SNC, resultam em estimulação intensa, manifestada através de convulsões generalizadas;
- Glutamato: principal neurotransmissor estimulador do SNC. A sua ativação aumenta a sensibilidade aos estímulos dos outros neurotransmissores.[165]

## **3.2 – O álcool**

### **3.2.1 – A Farmacologia do Álcool**

O etanol (EtOH), ou álcool etílico, é um depressor do SNC e, em doses altas, é também um agente anestésico. Têm propriedades euforizantes e inebriantes, conhecidas desde a antiguidade. Estudos antropológicos demonstram que, com raríssimas exceções (algumas tribos australianas e alguns esquimós), todos os grupos humanos estiveram em contato com o etanol. Textos gregos e egípcios comentavam os efeitos do álcool e distinguiam seus efeitos agradáveis, quando usado com moderação, dos efeitos provenientes de uso abusivo e crônico [171].

O álcool etílico é um produto da quebra natural de carboidratos em plantas. No processo de fabricação de bebidas alcoólicas por fermentação podem-se alcançar concentrações de etanol de aproximadamente 10%. Concentrações maiores são obtidas por destilação, processo descoberto pelo químico persa Rhases em 800 A.C.

No Brasil, como na maioria dos países ocidentais, o EtOH, em suas diversas preparações, é a substância psicoativa mais amplamente utilizada. Seu consumo aumentou significativamente nas últimas décadas, particularmente nos países de Terceiro Mundo [172].

### **3.2.1.1 - A Absorção**

O álcool, por sua alta lipossolubilidade, é fácil e completamente absorvido por todo o trato gastrointestinal. O álcool distribui-se rapidamente para todos os tecidos e fluidos corporais, sendo rápida sua difusão através das barreiras hemato-cerebral e placentária. Como consequência, as concentrações no SNC e na circulação fetal são similares às do sangue [171].

### **3.2.1.2 - Biotransformação**

A quase totalidade do etanol ingerido sofre biotransformação, sendo a oxidação hepática a principal via metabólica. A taxa máxima de biotransformação é de 20 ml de etanol por hora, para homens adultos sem tolerância (média de 30 ml cada 3 horas) [171].

O etanol é oxidado a acetaldeído, principalmente pela álcool desidrogenase, e em menor quantidade pelas oxidases microssômicas, em um processo dependente da transformação de NAD em NADH. Esta segunda via metabólica é a responsável pela interação do álcool com outras drogas cuja metabolização se dá por via oxidativa hepática [171].

O acetaldeído é o responsável por algumas manifestações desagradáveis do uso do etanol (rubor facial, náuseas) e possivelmente por algumas de suas ações tóxicas

nos tecidos. Normalmente, o acetaldeído é convertido em Acetil-CoA, que é usada como substrato em diversas vias metabólicas [171].

### **3.2.1.3 – Modo de Ação**

A hipótese de que o etanol agiria sobre as membranas celulares do SNC data de 1901. Hoje parece claro que ele não interage com nenhum “sítio específico” ou receptor no SNC.

O etanol diminui a liberação de neurotransmissores na fenda sináptica. Isso parece decorrer de alterações induzidas na estrutura e fluidez da membrana neuronal, com conseqüente interferência com as trocas iônicas e propagação do impulso nervoso. Certas regiões do córtex são particularmente afetadas [171].

Outro modo de atuação do etanol no SNC é indireto, através de deficiências do estado nutricional do indivíduo. Os dependentes de etanol costumam apresentar algum grau de deficiência nutritiva, especialmente vitamínica, prejudicando o funcionamento do sistema nervoso, pois o cérebro (responsável por 25-30% do metabolismo basal do indivíduo) depende de afluxo constante e ininterrupto de O<sub>2</sub> e nutrientes. Em dependentes, há deficiência de reserva nutricional [171].

### **3.2.2 - O Álcool e os Neurotransmissores**

O etanol afeta diversos neurotransmissores no cérebro, entre eles o ácido gama-aminobutírico (GABA). Existem dois tipos de receptores deste neurotransmissor: os GABA-alfa e os GABA-beta, dos quais apenas o primeiro é estimulado pelo álcool, o que resulta numa diminuição de sensibilidade para outros estímulos [172].

O resultado é um efeito muito mais inibitório no cérebro, levando ao relaxamento e sedação do organismo. Diversas partes do cérebro relacionadas ao



movimento, à memória, ao julgamento, à respiração, dentre outras são afetadas pelo efeito sedativo do álcool.

O sistema glutamatérgico, que utiliza glutamato como neurotransmissor, também parece desempenhar papel relevante nas alterações nervosas promovidas pelo etanol, pois o álcool também altera a ação sináptica do glutamato no cérebro, promovendo a diminuição da sensibilidade aos estímulos [172].

### **3.2.3 – Os efeitos causados pela ingestão de etanol**

Usado com moderação, o etanol exerce uma série de efeitos considerados agradáveis pela maioria dos indivíduos: desinibe, aumentando a socialização, produz euforia e estimula o apetite. O efeito euforizante da embriaguez inicial é classicamente atribuído à inibição da atividade dos sistemas inibitórios. Com o aumento da alcoolemia, o efeito é sempre de depressão no SNC. Além dos danos causados no SNC, o etanol afeta o aparelho cardiovascular, causando vasodilatação com aquecimento, ruborização e perda de calor corpóreo; o aparelho digestivo, aumentando os níveis plasmáticos de secretina, conseqüentemente o estímulo à produção protéica pancreática; aparelho geniturinário, apresentando um efeito diurético; sistema endócrino agindo praticamente sobre todo o sistema reduzindo os níveis de testosterona sérica [172].

O consumo crônico do etanol está associado à diversas síndromes psiquiátricas e à vários quadros neurológicos. Embora existam evidências clínicas e patológicas sugerindo que aspectos nutricionais têm grande relevância nestes distúrbios, atualmente, à exceção de quadros específicos, sua confirmação como agentes etiológicos principais é bastante complicada.

### **3.3 – Memória e Aprendizagem**

#### **3.3.1 – Introdução**

No início do século XX pouco se sabia sobre a neurobiologia da memória. Alguns modelos teóricos foram então concebidos para explicar a operação dos mecanismos da memória, principalmente por uma escola de pensamentos que se originou na década de 20 com os experimentos do psicólogo experimental americano Karl Lashley (1890 - 1958) [53].

Lashley concluiu que a memória tinha localização distribuída no sistema nervoso. E foi além: propôs que também as demais funções neurais careciam de localização precisa, sendo representadas igualmente em todas as regiões.

Um aluno de Lashley, o canadense Donald Hebb (1904 - 1985) levou à frente a sua concepção. Imaginou que, quando um evento fosse percebido por uma pessoa, certos circuitos do neocórtex seriam ativados. Esses circuitos, então “representariam” o evento, e a sua evocação (a lembrança) consistiria na reativação deles. Com a repetição, a ativação de apenas alguns componentes do circuito já seria suficiente para evocar o evento. A memória, então, seria uma propriedade inerente a todos os circuitos neurais. Na década de 40, quando Hebb criou o seu modelo, as sinapses eram ainda uma hipótese, mas ele imaginou que as conexões mais ativas seriam fortalecidas e estabilizadas, enquanto o contrário ocorreria com as conexões que permanecessem inativas. Essas novas idéias estabeleceram as bases conceituais da plasticidade sináptica, comprovadas nos mais recentes experimentos celulares e moleculares [53].

Outro psicólogo, David Marr, já no final da década de 70, elaborou um modelo computacional a partir dos conceitos de Hebb. Surgiu então a idéia de redes neurais, isto é, circuitos de neurônios capazes de aprender, armazenando informações a cada passo

para serem utilizadas para a construção de computadores adaptativos, a última geração de máquinas com capacidade de aprendizagem [53].

O modelo de Hebb/ Marr foi criticado porque o número de eventos que somos capazes de memorizar exigiria um número enorme de circuitos, talvez acima da nossa real capacidade biológica. Além disso, a evocação por ativação parcial poderia resultar em erro, já que eventos diferentes poderiam ser evocados pelo mesmo conjunto parcial de componentes. Em resposta a essas críticas, Marr sugeriu a existência de um processador separado que armazenaria as memórias temporariamente para depois transferi-las ao córtex. Esse processador funcionaria como a memória RAM dos computadores, e tornou-se uma explicação aceitável com a descoberta de que havia realmente regiões cerebrais – no lobo frontal e no lobo temporal – envolvidas com o armazenamento temporário das informações novas [53].

### **3.3.2 – Memória**

A sobrevivência de indivíduos de todas as espécies depende, em grande parte, da sua habilidade em reagir adequadamente aos perigos, aos desafios e às ameaças a sua integridade física e comportamental. Esta habilidade está diretamente relacionada com a capacidade de prever eventos aversivos e de coordenar as reações defensivas diante deles. Nesse sentido a previsão e a antecipação desses eventos têm importância fundamental, de tal forma que os animais aprendem a evitá-los, usando as informações referentes às associações dos estímulos às quais são submetidos e às características do ambiente no quais lhes são apresentados. Como é característico da aprendizagem, esse tipo de habilidade decorre de uma interação do indivíduo com o meio ambiente pela qual o ambiente altera o comportamento e este altera o ambiente. As informações relativas aos eventos e às experiências da vida adquiridas por meio da aprendizagem são

armazenadas no sistema nervoso central e podem ser evocadas. Essa capacidade característica do encéfalo, que é conhecida como memória, constitui uma das mais importantes formas de plasticidade do sistema nervoso central. A memória é criticamente dependente do hipocampo e de estruturas límbicas relacionadas, tal como a amígdala [53,163].

A memória das relações aprendidas estabelece-se por meio de interações entre um número de estruturas que compõem um circuito neural, ou seja, o conjunto de entradas e saídas neurais, e de sistemas de armazenamento que garantem a organização de respostas de adaptação ao meio ambiente [53,163].

A memória de eventos aversivos, tal como qualquer outra memória, pode ser classificada em duas formas distintas quanto à duração: memória de curto-prazo, com a duração de segundos, minutos e horas; e memória de longo-prazo que persiste por horas, dias e mesmo semanas com a duração de pelo menos 24 horas. Uma característica fundamental que distingue a memória de curto e a de longo-prazo é que esta última depende de mecanismos de síntese de novas proteínas. As memórias de curto-prazo devem ser consolidadas para se tornarem memórias de longo-prazo. Esse fato relaciona-se diretamente à existência de fases distintas de processamento da memória que são: a codificação ou aquisição, a consolidação, e a recuperação ou evocação [53, 163].

A codificação se refere aos processos pelos quais as informações são recebidas, transformadas em códigos neurais (padrões de potenciais de ação) e processadas no sistema nervoso central. A informação codificada deve ser associada de forma significativa e sistemática com os conhecimentos já estabelecidos na memória, de tal forma a permitir que se integre a nova informação com o que já é conhecido.

A consolidação se refere àqueles processos que alteram as informações recém-armazenadas e ainda instáveis, de forma a torná-las mais estáveis para o armazenamento de longo-prazo. Pode-se, assim, considerar que a consolidação é o processo pelo qual as memórias transientes tornam-se persistentes e resistentes à desorganização. Para que a memória seja consolidada e armazenada por longo prazo é necessário que haja a expressão de genes e a síntese de novas proteínas, dando origem a mudanças estruturais que armazenam a memória estavelmente ao longo do tempo [53,163].

A recuperação ou evocação da memória se refere ao processo que permite acessar e usar informações armazenadas em diferentes regiões neurais. A recuperação da informação é mais efetiva quando ocorre no mesmo contexto no qual a informação foi adquirida e na presença das mesmas pistas (pistas de recuperação) que estavam disponíveis durante o aprendizado. Pode-se considerar que quando uma memória consolidada é evocada, novamente ela se torna instável e passa por um processo de reconsolidação. A reconsolidação permitiria que uma memória já formada se altere, e, assim, poderia requerer uma outra fase de síntese protéica, tal como na consolidação. Nos últimos anos, vários grupos de pesquisa investigaram se as mesmas moléculas e vias medeiam a formação de uma memória e a sua reconsolidação [53,163].

### **3.3.3 – A importância dos neurotransmissores nos processos de aprendizagem, memória e plasticidade neuronal.**

Dentre os vários neurotransmissores já descritos como presentes no hipocampo de mamíferos destacam-se o glutamato, o qual parece exercer papel fundamental nos processos de aprendizagem e memória. O glutamato é classificado como um neurotransmissor Tipo I, porque é um aminoácido simples, como a glicina e o GABA

(ácido gama-amino butírico), perfazendo, em conjunto, cerca de 90% das sinapses existentes em todo o SNC de mamíferos [173].

A importância da ação de sinapses glutamatérgicas como sendo o sítio de desencadeamento do processo de potenciação sináptica de longa duração cresceu a partir da descoberta de Bliss e Lomo (1973) de que um estímulo breve, mas de alta frequência, em qualquer uma das três principais vias sinápticas do hipocampo aumenta a amplitude do potencial excitatório pós-sináptico (PEPS) no neurônio alvo. O hipocampo de mamíferos tem três principais vias sinápticas: a via perfurante oriunda do córtex entorrinal (principal via de entrada de informações para o hipocampo) para o giro denteado, a via das fibras musgosas que contêm os axônios das células granulares que direcionam para as células piramidais na região CA3 do hipocampo e a via colateral de Schaffer, constituída por axônios glutamatérgicos das células piramidais da região CA3, que fazem sinapses com as células piramidais da região CA1 do hipocampo [173].

As evidências indicam uma importante participação dos circuitos glutamatérgicos hipocampais nos processos de memória que, envolvem a aquisição, consolidação.

### **3.4 – Espectrometria de Raios X**

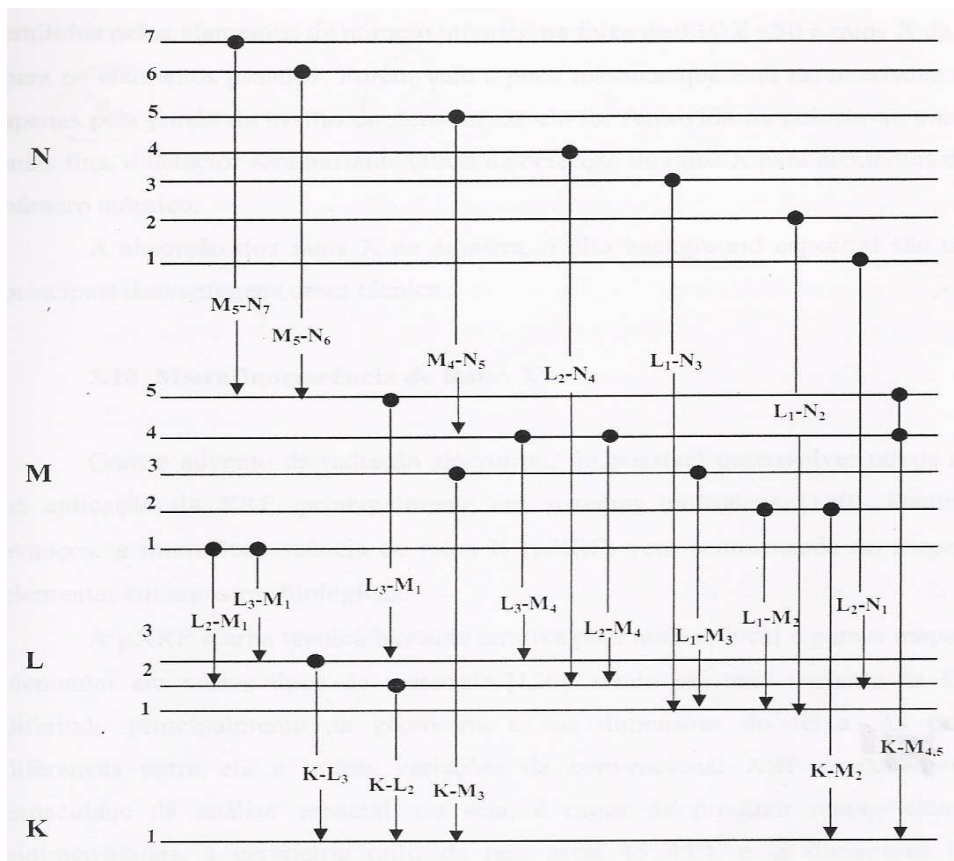
#### **3.4.1 – A Fluorescência de raios X**

A partir das bases analíticas dos espectros de Raios X, proposta por Moseley em 1913, relacionando o comprimento de onda à linhas características com os elementos atômicos dos elementos, é que surgiram os trabalhos que consideravam a fluorescência de raios X como um processo analítico [33].

A análise por fluorescência de raios X é um método quali-quantitativo baseado na medida das intensidades (números de raios X detectados por unidade de tempo) dos

raios X característicos emitidos pelos elementos que constituem a amostra, quando devidamente excitada. Os raios X emitidos por tubo de raios X, ou raios X ou gama por uma fonte radioativa, podem ser utilizados na excitação dos elementos, os quais, por sua vez, emitirão linhas espectrais com energias características e cujas intensidades estão relacionadas com a sua concentração na amostra [34].

Quando um átomo de um elemento presente em uma amostra é excitado, este tende a ejetar os elétrons dos níveis internos, e como consequência disto, elétrons dos níveis mais afastados realizam um salto quântico para preencher a vacância. Cada transição eletrônica constitui uma perda de energia para o elétron, e esta energia é emitida na forma de um fóton de raios X, de energia característica, podendo ser utilizado para a identificação do elemento emissor. O diagrama de energia para as linhas K, L, M e N está representado através do figura 3.10.



**Figura 3.9** – Diagrama de energia para a linha K, L, M e N [33]

Assim, a análise por fluorescência de raios X consiste em três fases:

- a) Excitação dos elementos que constituem a amostra;
- b) Dispersão dos raios X característicos emitidos;
- c) Detecção e medida desses raios.

#### **a) Excitação dos elementos**

Para provocar a emissão dos raios X característicos pelos elementos que constituem a amostra, a excitação pode ser feita de vários modos:

- (1) por partículas carregadas aceleradas;
- (2) por raios X e gama, partículas alfa e beta, emitidas por radionuclídeos;
- (3) por raios X gerados em tubos.

Deste modo, as máquinas geradoras de raios X têm sido as mais utilizadas, mas em análises de amostras com altos teores tem-se empregado fontes radioativas. Dependendo da energia da radiação X ou gama emitida pelo radionuclídeo utilizado, pode-se focar os elementos de interesse.

O tubo de raios X é a fonte mais utilizada para a geração de energia necessária para excitação. Um tubo com alto vácuo contendo um cátodo formado por um filamento de tungstênio (W) e um anodo maciço (alvo). Circuitos distintos servem para aquecer o filamento e acelerar os elétrons emitidos pelo cátodo em direção ao alvo. No processo de interação com o alvo, os elétrons transferem energia e momento para os átomos do alvo. O resultado é a emissão de raios X na forma de um espectro contínuo [34-36].

Para existir a produção de raios X característicos ocorre a necessidade de se retirar elétrons localizados nos níveis mais internos dos átomos, por exemplo, camada



K, e para isto a energia mínima para excitação deve ser superior à energia de ligação do elétron nesta camada, denominada energia de ligação eletrônica. Após ocorrer a ionização, um elétron mais externo tende a ocupar a vacância, havendo desse modo a emissão de raios X da energia característica, cujo valor depende da diferença da energia de ligação do elétron nos dois níveis eletrônicos.

### **b) Dispersão dos raios X**

Os métodos de dispersão usados na maioria dos espectrômetros de raios X podem ser classificados em duas categorias: dispersão por comprimento de onda (WDXRF) e dispersão por energia (EDXRF), também chamado não-dispersivo.

Na WDXRF existe a necessidade de um instrumento específico, onde os raios X característicos são selecionados por um cristal, de acordo com seus comprimentos de onda, obedecendo a lei de Bragg da difração. No caso da EDXRF, os raios X são selecionados através de pulsos eletrônicos produzidos em um detector apropriado, sendo as amplitudes destes pulsos diretamente proporcionais às energias dos raios X.

### **c) Detectores**

Os detectores mais utilizados na WDXRF são os proporcionais a gás e os cintiladores sólidos de Na(Tl), denominados de baixa resolução (a separação dos raios X é feita pelo cristal difrator), e na EDXRF, os semicondutores de Si(Li) e Ge hiperpuro, denominados de alta resolução, pois têm a habilidade de separar diretamente os raios X característicos.

Na EDXRF, o detector semicondutor de Si(Li) é empregado na detecção de raios X de energia entre 1 a 25 keV, ou seja, raios X da camada K para a camada L, emitidos pelos elementos de número atômico na faixa de 11 (Na) à 50 (Sn) e raios X da transição

M – L dos elementos pesados, na faixa de 31 (Ga) a 92 (U). Para os raios X da camada K de alta energia, emitidos pelos elementos de número atômico alto ( $Z > 50$ ), são mais aconselhados o uso dos detectores de Ge hiperpuro, devido à sua maior eficiência de detecção nesta região [35].

### **3.4.2 – A Fluorescência de Raios X por Reflexão Total**

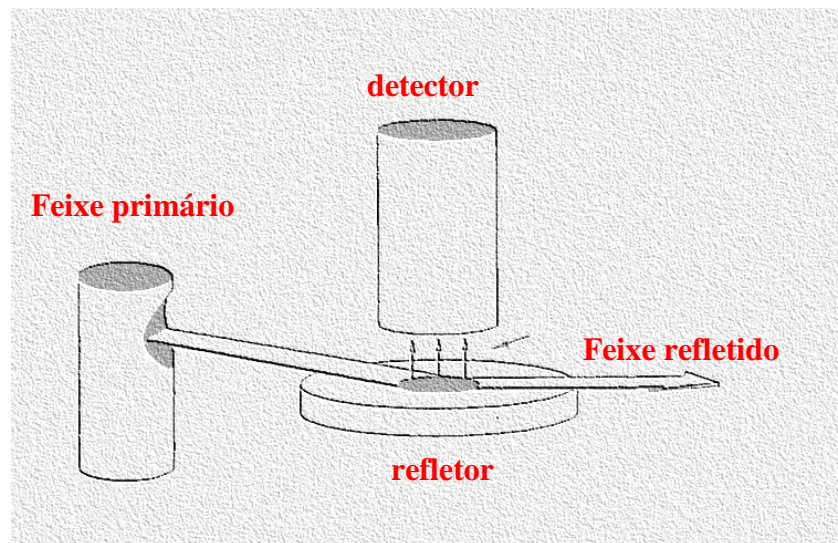
O fenômeno da reflexão total para raios X tinha sido descoberto em 1923 por Compton. Ele encontrou que a reflexibilidade de uma superfície plana atingida aumentaria estando o alvo a um ângulo crítico abaixo de  $0,1^\circ$ . Mas em 1971, Yoneda e Horiuchi apresentaram a aplicação desta técnica para a XRF. Analisando uma pequena quantidade de material aplicado em um suporte refletor plano. Esta técnica passou a ser chamada de fluorescência de raios X por reflexão total e se baseia no processo de reflexão total onde o ângulo de refração tende a zero [33-34, 140].

Ao contrário da XRF, que utiliza o feixe da radiação incidindo na amostra com um ângulo em torno de  $45^\circ$ , a TXRF utiliza um feixe com um ângulo de incidência menor que  $0,1^\circ$ . A TXRF difere da XRF, em relação ao tipo e preparo da amostra, calibração, análise de dados e limites de detecção.

A técnica de TXRF pode ser aplicada para materiais sólidos como solo, sedimentos, filtros de ar, materiais particulados, e outros, devendo ser antecedida de digestão química e/ou diluição apropriada, como as utilizadas em fotometria de chama, espectrometria, absorção/emissão atômica (AES) e suas variantes (ICP-AES, ICP-MS), e para este tipo de amostra apresenta a vantagem de necessitar de quantidades muito pequenas para a digestão [34,36,141] .

Os efeitos de absorção, comuns na WDXRF e EDXRF, não ocorrem na TXRF, pois são utilizadas massas pequenas de amostras, que depositadas em um suporte,

formam um filme fino. Portanto, não é necessário efetuar correções para o efeito matriz, e desta forma, na análise quantitativa, pode ser estabelecer uma regressão linear entre a intensidade dos raios X e a concentração dos elementos. As análises de amostras sólidas por TXRF, geralmente, são realizadas após a digestão com ácidos, com limites de detecção abaixo de  $\mu\text{g.g}^{-1}$ . A figura 3.11 apresenta um esquema experimental para análise de amostras através da TXRF.



**Figura 3.10** – Arranjo experimental da TXRF [175]

A equação que envolve os índices de refração absoluto dos meios e feixes incidente e refratado é dada pela equação de Snell-Descartes.

$$n_1 \cdot \text{sen } \theta_1 = n_2 \cdot \text{sen } \theta_2 \quad [3.1]$$

onde :

$n_1$  e  $n_2$  são os índices de refração dos meios 1 e 2, definidos pela razão entre a velocidade da luz no vácuo e a velocidade no meio.

$\theta_1$  é o ângulo incidente

$\theta_2$  é o ângulo refratado.

Na região do espectro de energia dos raios X, o índice de refração pode ser derivado da teoria de Lorentz. Considerando-se a absorção, este índice deve ser escrito como uma quantidade complexa, sendo definido como:

$$\mathbf{n} = \mathbf{1} - \boldsymbol{\delta} - i\boldsymbol{\beta} \quad [3.2]$$

onde:  $i$  é a unidade imaginária

A parte real de  $n$  é dada por:

$$\mathbf{n}' = \mathbf{1} - \boldsymbol{\delta} \quad [3.3]$$

onde:  $\delta$  é termo associado com a dispersão de raios X no meio refratado.

Para raios X com energias maiores que a banda de absorção do material do meio refratado, este termo pode ser representado por:

$$\boldsymbol{\delta} = \frac{N_A}{2\pi} r_e \rho \frac{Z}{A} \lambda^2 \quad [3.4]$$

Sendo:

$\lambda$  – comprimento de onda dos feixes primários

$\rho$  - densidade do material ( $\text{g/cm}^3$ );

$Z$  - número atômico;

A - massa atômica (g/mol);

E - energia dos raios X incidentes (keV)

O termo  $\beta$  está relacionado com a absorção dos raios X no meio e pode ser expresso por:

$$\beta = \frac{\lambda}{4\pi} \left( \frac{\mu}{\rho} \right) \rho \quad [3.5]$$

Onde:

$\mu / \rho$  - coeficiente de absorção do material do meio refratado ( $\text{cm}^2/\text{g}$ ) para a energia dos raios X incidentes.

Para os raios X, a quantidade de  $\delta$  é da ordem de  $10^{-6}$ . O valor muito pequeno é justificado pela baixa amplitude de oscilação dos elétrons. A quantidade de  $\beta$  é ainda menor que a de  $\delta$ , na região dos raios X.

Existe um ângulo de incidência mínimo, que é chamado de ângulo crítico, e, a partir deste, a refração não ocorre e toda a radiação incidente sofre reflexão total. Então, podemos entender que a reflexão total de raios X ocorre apenas quando o ângulo de incidência for menor que o ângulo crítico. Para a maioria dos refletores utilizados em TXRF este valor é menor que  $0,1^\circ$  [34,36,141].

Existem também dois parâmetros importantes na reflexão total:

a) o coeficiente de reflexão total (R), que é 100% abaixo do ângulo crítico;

b) o poder de penetração ( $Z_p$ ), que é reduzido à nanômetros neste caso.

**a) o coeficiente de reflexão total (R)**

O coeficiente pode ser definido pela intensidade média do feixe refletido e o feixe incidente e pode ser derivado da fórmula de Fresnel. O valor de R pode ser calculado para três situações.

1ª situação – Quando o ângulo de incidência for muito menor que o ângulo crítico.

$$\alpha \ll \alpha_{\text{crítico}} \quad R \approx 1 - \sqrt{\frac{2}{\delta}} \frac{\beta}{\delta} \alpha_1 \quad [3.6]$$

2ª situação – Quando o ângulo de incidência for igual ao ângulo crítico.

$$\alpha = \alpha_{\text{crítico}} \quad R \approx \frac{\delta + \beta - \sqrt{(2\beta\delta)}}{\delta + \beta + \sqrt{(2\beta\delta)}} \quad [3.7]$$

3ª situação – Quando o ângulo de incidência for muito maior que o ângulo crítico

$$\alpha \gg \alpha_{\text{crítico}} \quad R \approx \frac{\delta^2}{4\alpha^4} \quad [3.8]$$

**b) o poder de penetração ( $Z_p$ )**

O poder de penetração é definido sendo a profundidade alcançada pela radiação incidente em um meio homogêneo quando a sua intensidade está reduzida por um fator de 1/e ou 37% do seu valor inicial. Novamente, três valores podem ser dados:

$$1) \text{ quando } \alpha \ll \alpha_{\text{crítico}} \quad Z \approx \frac{\lambda}{4\pi} \frac{1}{\sqrt{2\delta}} \quad [3.9]$$

$$2) \text{ quando } \alpha = \alpha_{\text{crítico}} \quad Z \approx \frac{\lambda}{4\pi} \frac{1}{\sqrt{\beta}} \quad [3.10]$$

3) quando  $\alpha \gg \alpha_{\text{crítico}}$

$$Z \approx \frac{\lambda}{4\pi} \frac{\alpha}{\sqrt{\beta}} \quad [3.11]$$

Por apresentar uma geometria diferente em relação à XRF e diferenças em relação à intensidade da radiação, podemos citar algumas vantagens da técnica de TXRF em relação à intensidade:

- redução do *background*;
- dupla excitação dos feixes incidente e refletido;
- pequena distância entre a amostra e o detector (da ordem de aproximadamente 1 mm) gerando um grande ângulo sólido;
- necessidade de amostras em pequenas quantidades;
- limites de detecção da ordem de  $10^{-12}$ g. [35]

Enquanto que na XRF a intensidade da radiação é constante e diminui exponencialmente ao interagir com um material, na TXRF, a intensidade de radiação está relacionada a interferência e a formação de ondas estacionárias. A reflexão total ocorre num campo não homogêneo de ondas estacionárias.

Pesquisadores da Universidade da Antuérpia, na Bélgica, desenvolveram um software para o ajuste dos espectros de raios X chamado de QXAS (Quantitative X-ray Analysis System) [33].

Os parâmetros do ajuste se referem à área, a posição e a largura das funções, que são basicamente gaussianas e que descrevem os picos característicos e a função do modelo do background. Após o término do ajuste de raios X, o programa fornece um

relatório contendo as informações referentes à energia, à área líquida do pico e os desvios padrões para cada linha característica dos elementos selecionados no espectro de pulsos.

### 3.4.2.1 - Análise quantitativa

Uma das grandes vantagens da técnica é a pequena quantidade de amostra necessária para a análise. Normalmente, uma alíquota de 5 s 50 µL da amostra “in natura” ou digerida é colocada no centro de um suporte refletor e seca.

Dentre os suportes refletores para as amostras podemos destacar o quartzo, que tem uma excelente superfície para a reflexão e o lucite, que tem um alto coeficiente de reflexão além de um custo muito baixo.

O filme fino obtido, com massa entre picogramas a 10 microgramas, cobrindo o círculo com aproximadamente 5 mm de diâmetro, está pronto para ser analisado por TXRF. Com isso, as amostras são consideradas como filmes finos e a análise quantitativa torna-se mais fácil uma vez que os efeitos de absorção passam a ser desprezados. Nesse caso, a concentração elementar é determinada através de uma relação entre a intensidade da radiação fluorescente de um determinado elemento  $i$ , a sensibilidade do sistema de espectrometria para este elemento, o coeficiente de reflexão do refletor e a transmissão da radiação no ar é dado através da equação 3.12.

$$I_i(\alpha) = K \cdot I_o \cdot S_i \cdot W_i \cdot [1 + R(\alpha)] \cdot T_{ar} \quad [3.12]$$

onde:

$K$  é uma constante que depende apenas de fatores geométricos;

$I_o$  é a intensidade da radiação incidente;

$S_i$  é a sensibilidade para o elemento  $i$  na amostra;



$W_i$  é a concentração do elemento  $i$ ;

$T_{ar}$  é a absorção da radiação no ar para o feixe incidente e o feixe de radiação fluorescente;

$R(\alpha)$  é o coeficiente de reflexão do material utilizado como refletor para a energia da radiação incidente

$\alpha$  o ângulo de incidência da radiação.

Como, normalmente, a amostra não apresenta uma geometria regular (as intensidades de raios X dependem de sua posição no refletor), é adicionado um elemento ausente na amostra e com concentração conhecida (o padrão interno). Assim, é possível normalizar as linhas elementares de raios X em função do padrão interno.

Os elementos a serem utilizados como padrões internos não devem estar presentes e/ou devem ocorrer em concentrações baixíssimas nas amostras. A função do padrão interno como mencionado acima, é corrigir os efeitos de geometria. Dessa forma, a contagem obtida na irradiação da amostra depende da posição em que esta for colocada no suporte. Com a adição do padrão interno, o resultado obtido será sempre em relação a este padrão. Desta forma, a equação 3.12, pode ser escrita da seguinte forma em relação a um padrão com intensidade  $I_S$ .

$$\frac{I_i}{I_S} = \frac{K \cdot I_o \cdot S_i \cdot W_i [1 + R(\alpha)] \cdot T_{ar}}{K \cdot I_o \cdot S_S \cdot W_S [1 + R(\alpha)] \cdot T_{ar}} \quad [3.13]$$

onde:

$I_i$  e  $W_i$  são a intensidade da radiação fluorescente e a concentração do elemento  $i$  na amostra;

$I_S$  e  $W_S$  a intensidade da radiação fluorescente e a concentração do padrão interno na amostra;

$S_i$  e  $S_S$  são as sensibilidades para o elemento  $i$  e para o padrão interno.

Logo:

$$\frac{I_i}{I_S} \cdot W_S = \frac{S_i}{S_S} \cdot W_i \quad [3.14]$$

A equação 3.14 pode ainda ser escrita como:

$$I_{r,i} = S_{r,i} \cdot W_i \quad [3.15]$$

onde:

$I_{r,i}$  é chamado de intensidade relativa  $\left( \frac{I_i}{I_S} \cdot W_S \right)$

$S_{r,i}$  sua sensibilidade relativa  $\left( \frac{S_i}{S_S} \right)$ .

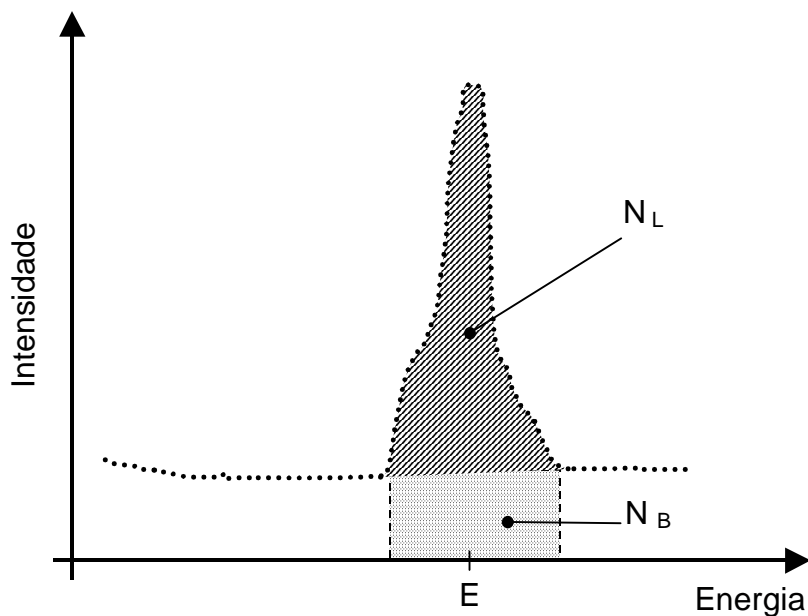
A relação 3.15 é a equação básica da TXRF quando se utiliza um padrão interno. Ela mostra uma relação linear bastante simples entre a intensidade relativa e a concentração de um elemento  $i$ . Na prática, o parâmetro que se deseja determinar é a concentração elementar  $W_i$ . A intensidade relativa é obtida experimentalmente e a sensibilidade relativa é obtida através de padrões multielementares, com concentrações conhecidas.

É interessante saber que existe uma relação matemática entre a sensibilidade relativa e o número atômico dos elementos. Assim, com base nas sensibilidades relativas calculadas para os elementos contidos na solução padrão multielementar, pode-

se estimar a sensibilidade para um elemento detectado na amostra, mas, não contido na solução padrão e conseqüentemente estimar a concentração na amostra de interesse. De maneira análoga, as mesmas equações podem ser utilizadas para a linha  $K_{\alpha}$  e outras, como L e M, onde logicamente as sensibilidades relativas terão outros valores.

### 3.4.2.2 - O Limite de Detecção em TXRF

O limite de detecção (LD) representa a menor quantidade (concentração, massa, volume, etc) que pode ser discriminada estatisticamente em relação ao *background* de uma medida. A figura. 3.12 mostra, esquematicamente, um espectro em energia com um único pico de fluorescência de raios X, onde,  $N_L$  é a contagem líquida e  $N_B$  é a contagem relativa ao *background*.



**Figura 3.11** - Representação Esquemática de um espectro em energia para um pico de fluorescência de raios X.

O limite de detecção (LD) é obtido a partir da equação 3.16 [175], sendo ele extrapolado em um tempo de medida de 1000 s.

$$LD = 3 \sqrt{\frac{I_i(BG)}{t}} \frac{C_{Ga}}{I_{Ga} S_i} \quad [3.16]$$

Onde:

$I_i(BG)$  é a intensidade do *background* por unidade de tempo (fótons/s);

$I_{Ga}$  é a intensidade da radiação fluorescente relativa ao padrão interno (fótons/s), gálio (Ga);

$C_{Ga}$  a concentração do padrão interno;

$S_i$  a sensibilidade relativa (adimensional) para o elemento  $i$  e  $t$  o tempo de medida.

Normalmente, o limite de detecção é determinado para alguns elementos e depois por extrapolação (curva do limite de detecção) determina-se o limite de detecção para os elementos de interesse. O limite de detecção em TXRF é da ordem de  $\text{ng.g}^{-1}$ .

Este limite pode ser expresso como uma concentração elementar ( $\mu\text{g.g}^{-1}$ ) que resulta em uma intensidade líquida igual a 3 vezes a intensidade do BG (cps):

$$LD_i(ppm) = \frac{3\sqrt{BG_i}}{S_{r,i}} \quad [3.17]$$

Onde,  $S_{r,i}$  representa a sensibilidade relativa, já definida.

De modo geral, os limites de detecção para a técnica de TXRF são bem menores que aqueles da fluorescência convencional EDXRF, devido principalmente a três fatores:

- baixa intensidade do background, devido a reduzida transferência de energia ao suporte da amostra em relação à EDXRF;
- o fluxo da radiação primária disponível para a excitação da amostra, devido ao feixe refletido, é muito mais efetivo do que na XRF;
- a distância entre a amostra (filme fino) e o detector de Si é muito maior que na EDXRF, aumentando portanto a eficiência de detecção dos raios X característicos.

### 3.4.2.2 – Radiação Síncrotron

A radiação síncrotron é a radiação eletromagnética emitida por partículas carregadas aceleradas em direção ao centro da órbita circular. Ao sofrerem desvios devido à presença de campos magnéticos, elas emitem radiação eletromagnética que são chamadas de radiação síncrotron. Esta radiação, além de ser colimada na direção tangencial da órbita dos elétrons, também é polarizada. A polarização pode minimizar o espalhamento quando a amostra é analisada ao longo de sua direção. A utilização de uma fonte de luz síncrotron permite alcançar limites de detecção mais baixos que um tubo de raios X com alta potência. Segundo Klockenkamper [34], o uso dessa fonte apresenta algumas vantagens:

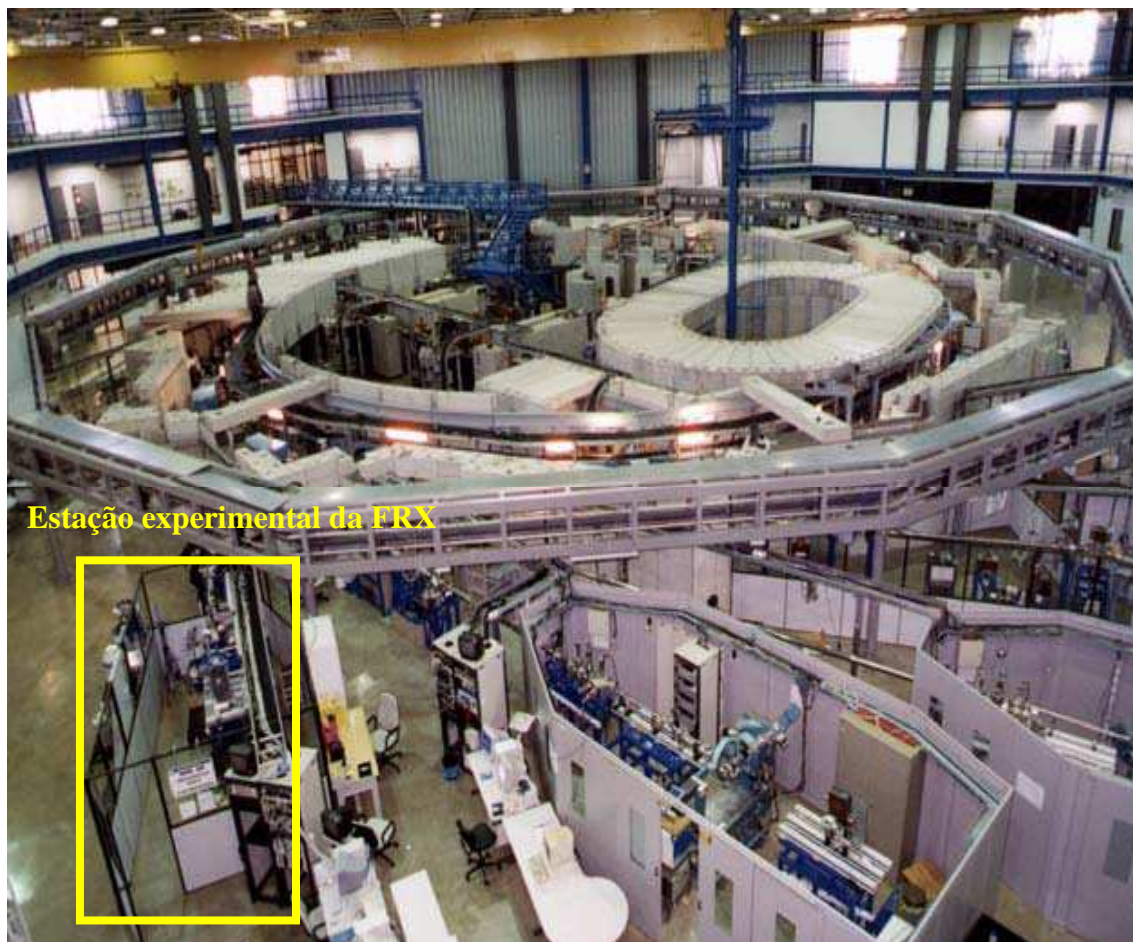
- Um alto brilho espectral, que deve-se à baixa divergência vertical;
- Um baixo background espectral devido à polarização.

O síncrotron consiste em um acelerador circular de elétrons, compreendendo uma câmara de vácuo, onde os elétrons relativísticos se movem numa órbita fechada durante muitas horas; ímãs dipolares, utilizados para manter os elétrons em órbita circular; cavidades de radiofrequência, onde os elétrons são acelerados por campos eletromagnéticos resistentes. O anel de armazenamento de elétrons tem por objetivo

armazenar uma alta corrente de elétrons a energias elevadas, possuindo, além dos ímãs dipolares, ímãs quadrupolares e sextupolares, a fim de focalizar e reduzir aberrações do feixe eletrônico. []

A luz síncrotron produzida abrange o infravermelho (baixa energia, alto comprimento de onda), os raios X, o ultravioleta e a faixa de luz visível. As características dessa luz a tornam uma ferramenta poderosa que permite estudar as propriedades químicas, físicas e biológicas de diversos componentes da natureza.

A estação experimental é instalada em uma linha de luz e formada por equipamentos e instrumentação que inclui o conjunto porta-amostra, local onde é colocada a amostra; aparelhos que permitem o posicionamento da amostra com o intuito de receber incidência de luz adequada; detectores de feixes de fótons espalhados ou transmitidos que armazenam os acontecimentos físicos que ocorrem nos átomos e moléculas do material em estudo.



Estação experimental da FRX

**Figura 3.13** - Vista superior do anel de armazenamento do LNLs – Estação da Fluorescência de Raios X.

## CAPÍTULO IV

### **4 – MATERIAIS E MÉTODOS**

#### **4.1 - Animais e Condições Experimentais**

Foram utilizadas ratas da linhagem Wistar com 3 meses de idade, provenientes do Biotério do Instituto de Nutrição da Universidade Federal do Rio de Janeiro. As ratas foram acasaladas com machos da mesma linhagem. Durante o estudo, os animais foram mantidos no biotério, em gaiolas individuais, em ambiente com temperatura em torno de 25 °C, em ciclos de 12 /12 horas (claro e escuro).

#### **4.2 - Delineamento experimental**

No dia do nascimento (primeiro dia de lactação), as quatro mães foram pesadas e divididas em dois grupos, cada uma com oito filhotes:

- Grupo etanol – ratas mães que receberam a dieta líquida de etanol durante 21 dias, a partir do primeiro dia de lactação.
- Grupo controle – ratas mães que receberam a dieta líquida, isocalórica, durante 21 dias, a partir do primeiro dia de lactação.

#### **4.3 - Controle do consumo alimentar**

As dietas foram oferecidas diariamente, no mesmo horário, em bebedouros. Para calcular a quantidade de dieta ingerida era realizada a diferença entre o volume oferecido e a sobra. Para não ter como variável a diferença energética, cada mãe do



grupo controle foi pareada com uma mãe do grupo etanol, recebendo o volume da dieta consumido no dia anterior (os filhotes do grupo etanol nasceram um dia antes).

As mães e os filhotes foram pesados nos dias primeiro, quinto, décimo e décimo quarto-dia da lactação, em balança digital marca Coleman, modelo PW –1100, com capacidade de 1100 g e precisão de 0,1g. Por não ter como distinguir os filhotes, foi considerado a média de seus pesos.

#### 4.4 - Composição e Preparação da dieta líquida

A composição das dietas líquida com etanol e sem etanol encontra-se na tabela 4.1.

**Tabela 4.1** - Composição das dietas com e sem etanol (dieta líquida – AIN 93G)

<b>Ingredientes</b>	<b>Dieta sem etanol (em g/L)</b>	<b>Dieta com etanol (em g/L)</b>
Caseína <sup>a</sup>	53,00	53,00
L-cisteína <sup>b</sup>	0,80	0,80
Celulose <sup>c</sup>	13,30	13,30
Malto-dextrina <sup>b</sup>	135,40	43,30
Sacarose <sup>d</sup>	26,50	26,50
Óleo de soja <sup>e</sup>	18,60	18,60
Mistura de Vitaminas <sup>a</sup>	2,65	2,65
Mistura de Minerais <sup>a</sup>	9,28	9,28
Bitartarato de colina <sup>b</sup>	0,66	0,66
Goma xantana <sup>b</sup>	3,0	3,0
Etanol <sup>f</sup>	-	65,40

<sup>a</sup> empresa Dytes(USA); <sup>b</sup> empresa Rhoster (Brasil); <sup>c</sup> celulose cristalina ph101, Farnos (Brasil); <sup>d</sup> açúcar União; <sup>e</sup> óleo de soja

Liza; <sup>f</sup> etanol a 95 %, VETEC.

As dietas líquidas foram preparadas, de acordo com os procedimentos usuais de assepsia. Para facilitar o preparo, foram confeccionadas misturas dos ingredientes em pó, utilizando-se um misturador em V, para cada tipo de dieta. Após a preparação, as dietas foram colocadas em local refrigerado com temperatura em torno de  $4 \pm 1^{\circ}\text{C}$ . Antes da oferta aos animais, as misturas eram mantidas em temperatura ambiente visando um equilíbrio térmico. Posteriormente era adicionado o óleo de soja na dieta sem etanol e o óleo de soja mais o etanol na dieta com etanol. Procedeu-se a homogeneização em liquidificador da marca Wallita, modelo W20 por cinco minutos, para garantir a completa dispersão do estabilizador (goma xantana). A seguir, as dietas foram colocadas em bebedouros graduados, com a ajuda de uma proveta graduada em 200ml, nas gaiolas individuais. Os ingredientes foram pesados em balança digital marca Gehaka, modelo BG 440, com capacidade de 4000g e precisão de 0,01g. Este procedimento foi realizado durante todos os 21 dias de lactação dos filhotes.

#### **4.5 - Sacrifício dos animais e Coleta das amostras**

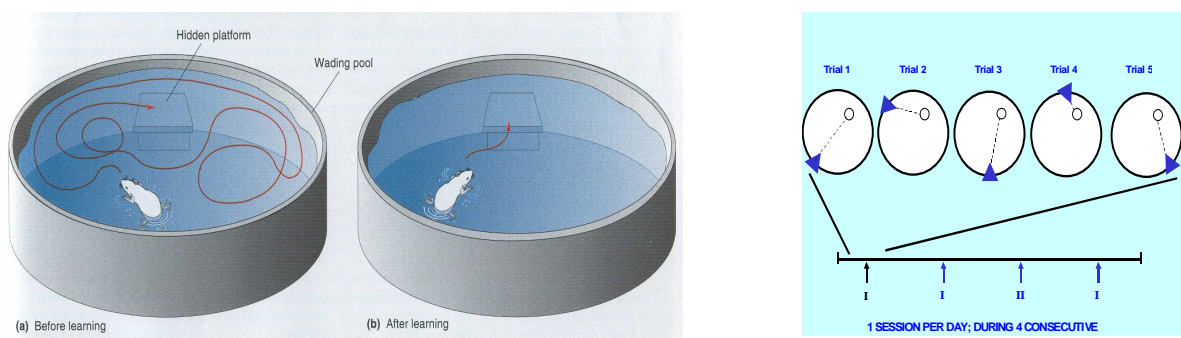
Aos 21 dias de lactação, 10 animais fêmeas de cada grupo foram sacrificados por decapitação em guilhotina, tendo o cérebro rapidamente removido e separado por regiões de interesse para o estudo. Com o objetivo de não ter perdas significativas em relação às concentrações dos micronutrientes, as amostras foram armazenadas em freezer à temperatura de  $-70^{\circ}\text{C}$  visando a preparação por TXRF.

Após o desmame 7 animais machos de cada grupo foram separados em gaiolas individuais e a partir de então, todos os animais passaram a ser alimentados com a ração comercial até os 90 dias de vida.

#### 4.6 . Estudo comportamental

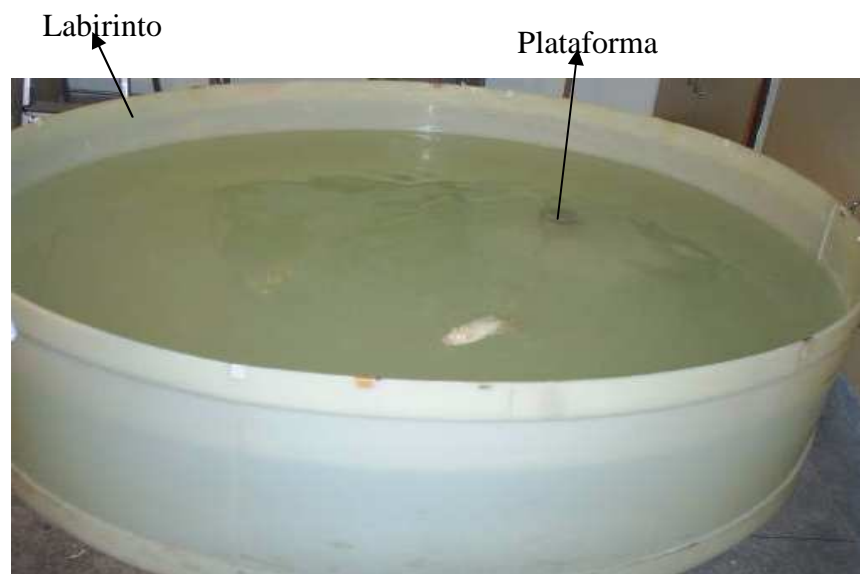
Ao completar a idade desejada, os animais dos grupos etanol e controle foram transferidos para o Laboratório de Neurobiologia da UFRJ, onde foram aclimatados nas condições de temperatura, iluminação e umidade descritas anteriormente e submetidos ao teste do labirinto aquático de Morris tendo por objetivo o estudo dos efeitos comportamentais.

Uma piscina circular, com 180 cm de diâmetro e 50 cm de altura, foi utilizada para o experimento. Preenchida por uma camada de 30 cm de água opaca, à temperatura de  $20 \pm 2^\circ\text{C}$ , acrescentou-se, a ela, uma plataforma de 8 cm de diâmetro com altura inferior à superfície da água em 1 cm, equidistante do centro e da borda em um dos quadrantes de acordo com a figura 4.1.



(a) (b)  
**Figura 4.1.** - (a) Labirinto Aquático; (b) Diagrama das diferentes posições de largada do animal.

O animal foi colocado na piscina com a face frente à borda e foi medido o tempo levado pelo animal para encontrar a plataforma. Caso o animal levasse mais de 120s para encontrar a plataforma, ele era colocado na mesma durante 10s e então retirado da piscina. Foram realizadas cinco tentativas por dia durante cinco dias consecutivos com um intervalo de 40 minutos entre cada uma. Cada tentativa era realizada de um ponto diferente (na borda da piscina tínhamos as localizações das largadas). A figura 4.3 apresenta um dos animais realizando o teste.



**Figura 4.2** – Experimento realizado no labirinto aquático

Após a realização dos testes, os animais foram sacrificados, de maneira semelhante à descrita anteriormente, também objetivando o estudo das concentrações dos micronutrientes por TXRF.

## **4.7 – Determinação dos teores de micronutrientes por TXRF**

### **4.7.1 – Preparação das amostras**

O cérebro foi separado em sete regiões: hipocampo, córtex temporal, córtex entorrinal, córtex visual, córtex frontal, colículo superior e cerebelo. A separação dessas regiões foi feita com o auxílio de um bisturi, placa de Petri e um microscópio óptico. Algumas amostras tinham regiões com quantidades de massa tão pequenas que acabaram sendo desprezadas. As regiões foram digeridas em meio ácido: ácido nítrico – 65% (HNO<sub>3</sub>-65%) e aquecidas a uma temperatura de 60°C durante duas horas. Após a digestão química, o volume foi ajustado com água deionizada (18 MΩ). Uma alíquota de 500 µL foi colocada em *ependorf* adicionando-se 50 µL de gálio (102,5 ppm) utilizado como padrão interno.

As amostras foram preparadas em triplicatas. Em seguida 8 µL foram pipetados no centro de um suporte refletor, lucite, secando-as sob luz infravermelha.

### **4.7.2 - Branco**

Com o intuito de corrigir efeitos referentes a possíveis contaminações, amostras foram preparadas de maneira análoga às amostras de análise, contendo apenas água e demais reagentes. Este procedimento permite verificar a qualidade dos materiais utilizados na dissolução das amostras.

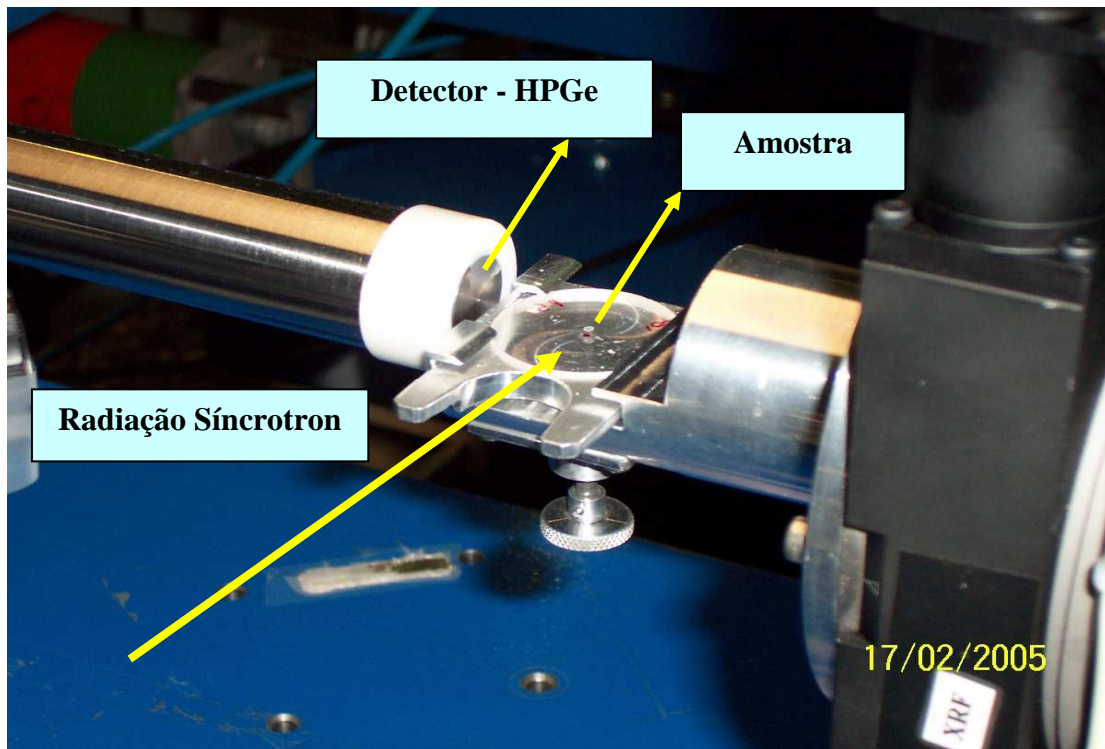
### **4.7.3 - Amostras Certificadas**

A acurácia das medidas foi verificada através da determinação da concentração elementar em uma amostra certificada de fígado bovino (NIST1577b), preparada por digestão, seguindo o mesmo procedimento usado para o preparo das amostras de cérebro.

### **4.7.4 – A Instrumentação**

As amostras foram medidas no mês de abril de 2006 no Laboratório Nacional de Luz Síncrotron, Campinas – São Paulo (Linha: Fluorescência de Raios X). Cada amostra foi posicionada horizontalmente ao detector de germânio hiperpuro (HPGe) – resolução de 140 eV em 5,9 keV e excitada através de um feixe branco de irradiação de energia máxima igual a 20 keV, filtrado por 0,5 mm de alumínio com um ângulo de incidência de 1,0 mrad. O intervalo de tempo proposto para a medida das amostras e dos padrões foi de 100s e os espectros de raios X característicos obtidos foram analisados através do software Sistema de Análise Quantitativa de raios X (AXIL), que é distribuído pela Agência Internacional de Energia Atômica (AIEA), obtendo assim, as intensidades dos raios X para cada elemento, associado a uma incerteza.

A estrutura experimental para as medidas por TXRF pode ser observada na figura 4.3.



**Figura 4.3** - Arranjo experimental para as medidas de TXRF.

## CAPÍTULO V

### 5 - RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 5.1 - Análise Quantitativa por TXRF

Os fundamentos da análise quantitativa por TXRF estão descritos no capítulo 3. A concentração elementar, de acordo com a equação 3.15, é obtida a partir da medida da intensidade da radiação fluorescente emitida por um elemento  $i$  em função da sensibilidade do sistema.

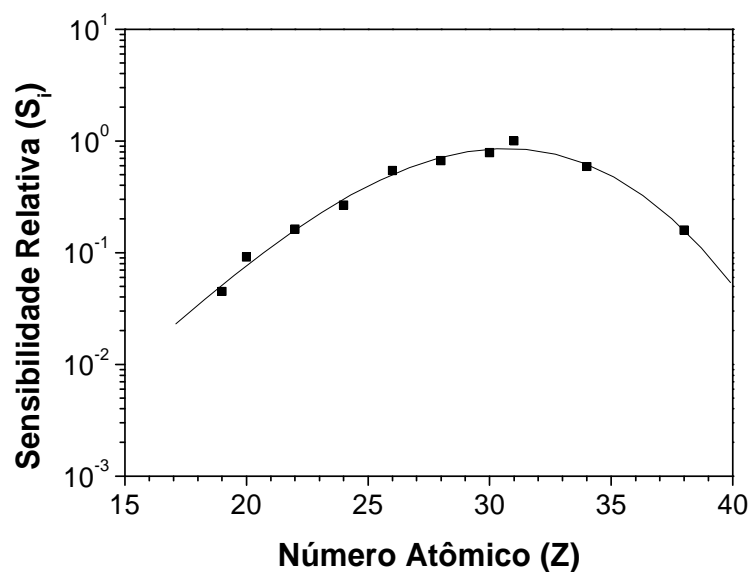
##### 5.1.1. Sensibilidade do Sistema

A curva de calibração é determinada através da medida de cinco soluções padrões multielementares com concentrações diferentes e conhecidas. A tabela 5.1 mostra os elementos e suas respectivas concentrações utilizados na determinação da curva de calibração para a série K. A figura 5.1 mostra a sensibilidade para a série K.

Elementos	Padrão 1K	Padrão 2K	Padrão 3K	Padrão 4K	Padrão 5K
Al	3,50	6,12	12,25	18,38	24,51
Si	3,54	6,20	12,40	18,60	24,80
K	0,59	1,03	2,07	3,11	4,14
Ca	0,59	1,04	2,08	3,12	4,15
Ti	0,58	1,02	2,05	3,07	4,09
Cr	0,58	1,02	2,05	3,07	4,09
Fé	0,59	1,03	2,05	3,08	4,10
Ni	0,59	1,03	2,06	3,08	4,11
Zn	0,58	1,02	2,05	3,07	4,09
Se	0,58	1,01	2,01	3,02	4,03
Sr	0,59	1,03	2,07	3,10	4,13
<b>Ga</b>	4,88	4,88	4,88	4,88	4,88

**Tabela 5.1.** Concentração final ( $\text{mg.mL}^{-1}$ ) os elementos utilizados na solução padrão para a determinação da curva de sensibilidade para os elementos da série K.





**Figura 5.1-** Curva de calibração para os elementos da série K utilizando TXRF.

Utilizando a equação 5.1, obtêm-se quaisquer valores de sensibilidade para a série K, em função do número atômico (Z).

$$S_i(Z) = \log(4,22 + 0,04 * Z + 0,01 * Z^2 - 2,41E-4 * Z^3) \quad [5.1]$$

$$R^2 = 0,99$$

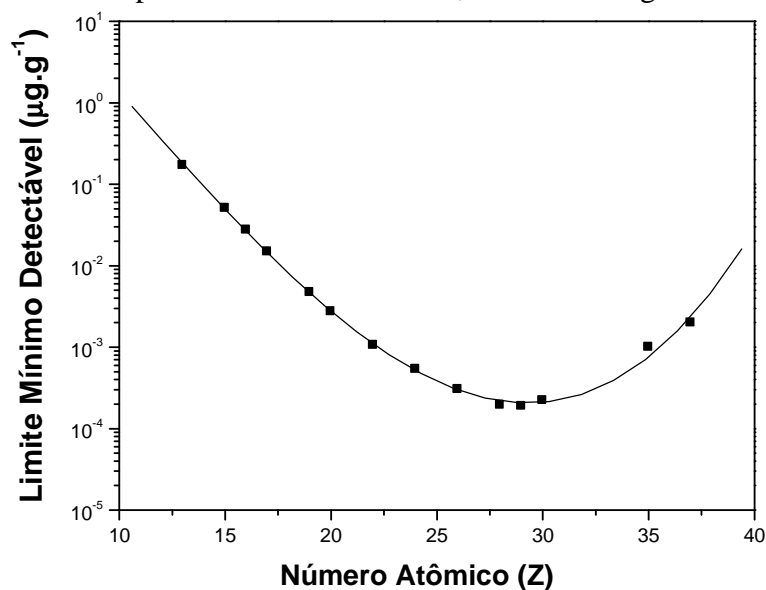
## 5.2 - Limite de Detecção (LD)

A tabela 5.2 mostra os limites de detecção calculados utilizando a equação 3.16 para os elementos da série K nas amostras de cérebro de ratos.

**Tabela 5.2** - Limite de detecção para os elementos da série K, nas amostras de cérebro de rato utilizando SR-TXRF.

<b>Elementos</b>	<b>LD para a série K (ng.g<sup>-1</sup>)</b>
Al	181
P	49
S	26
Cl	14
K	5
Ca	3
Ti	1
Cr	0,5
Fe	0,3
Ni	0,2
Cu	0,2
Zn	0,2
Br	1
Rb	2

Com os dados apresentados na tabela 5.2, obtêm-se a figura 5.2.



**Figura 5.2** - Limite de detecção dos elementos da série K nas amostras de cérebro de rato, utilizando TXRF.

Utilizando a equação 5.2, obtêm-se quaisquer valores para o LD em função de Z.

$$LD(Z) = \log_{10} (2,71484 - 0,19752 * Z - 0,00890 * Z^2 + 2,79444E-4 * Z^3) \quad [5.2]$$

$$R^2 = 0,998$$

### 5.3 - Análise Estatística

Os resultados da TXRF estão dispostos como média ± desvio padrão. Os resultados foram comparados utilizando uma análise de variância (ANOVA) com um nível de significância de 5% . As médias entre os valores foram comparadas utilizando o teste Bonferroni. Todas essas análises estatísticas foram realizadas através do programa de Bioestatística Primer.

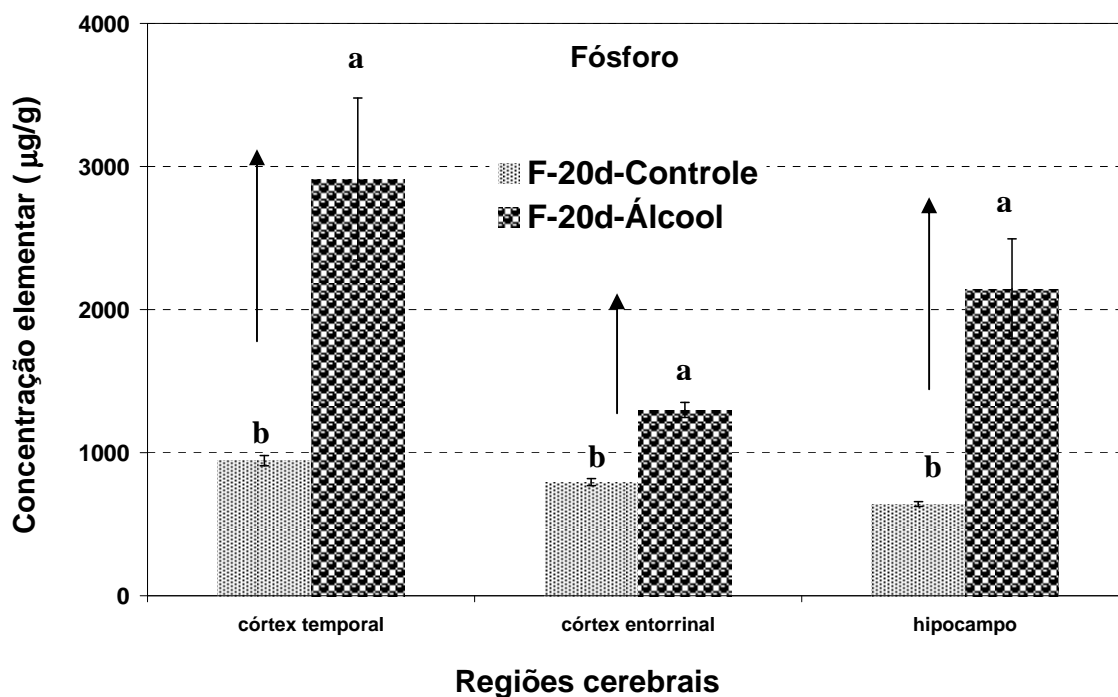
#### **5.4 - Concentração elementar nas regiões cerebrais de filhotes de mães controles e tratados com etanol**

É bem estabelecido que a ingestão de uma dieta composta de aproximadamente um terço de suas calorias provenientes do etanol, durante o período de lactação, reduz a produção de leite, alterando também sua composição e, além disso, retarda o desenvolvimento do sistema nervoso [31].

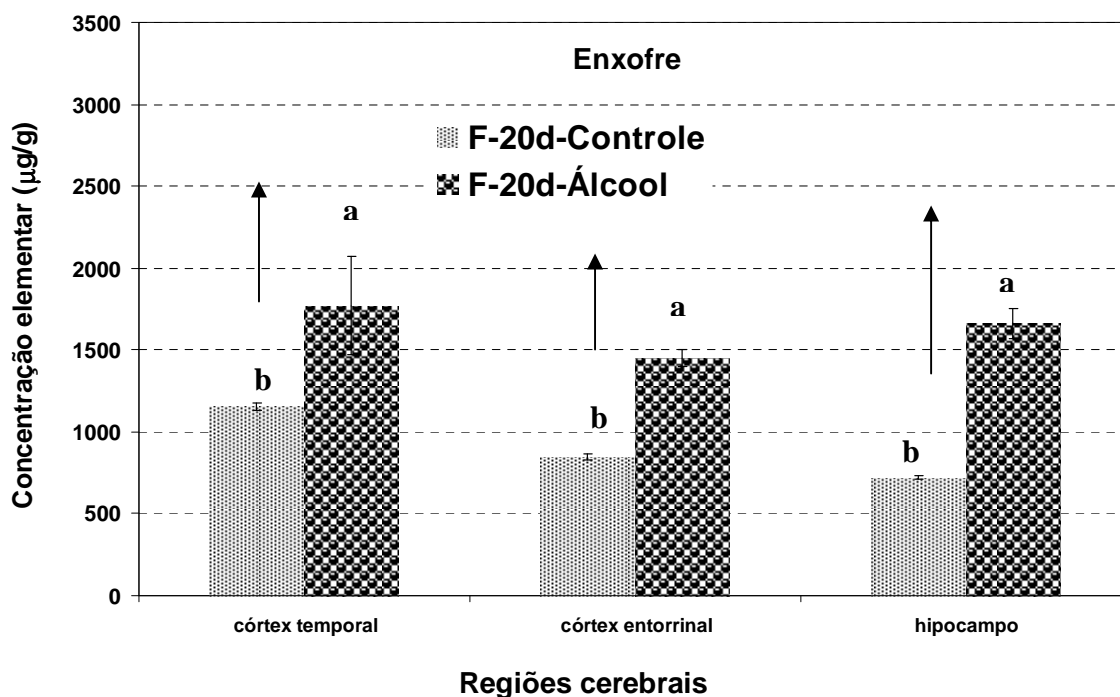
Para promover uma discussão mais clara, objetiva e concisa, as concentrações elementares obtidas através da TXRF foram separadas em duas vertentes:

- 1) Concentrações elementares no córtex temporal, no córtex entorrinal e no hipocampo durante a intoxicação alcoólica materna (10 animais fêmeas com 20 dias de cada grupo que estiveram expostos ao etanol do 1° ao 20° dia de nascido através do leite materno);
- 2) Concentrações elementares no córtex temporal, no córtex entorrinal e no hipocampo durante o período de recuperação com dieta normal/controle dos filhotes adultos com 90 dias de idade (7 animais machos de cada grupo que estiveram sujeitos à ingestão alcoólica do 1° ao 20° dia e à ração comercial do 21° ao 90° dia de nascido);

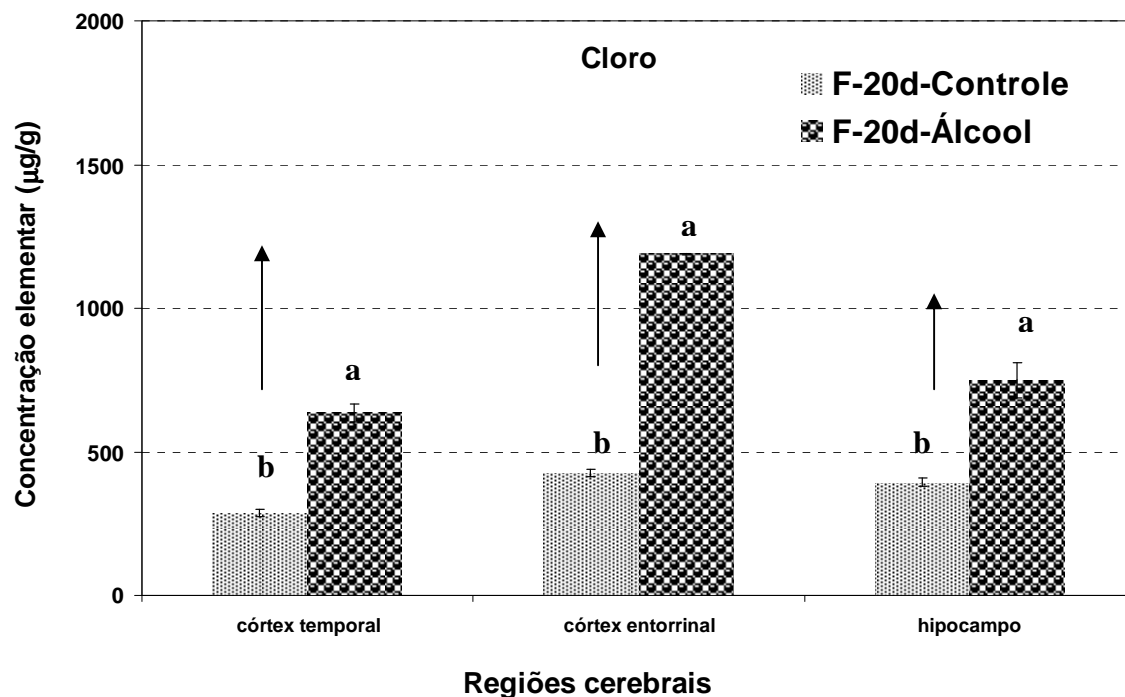
Sendo assim, as figuras 5.3 a 5.11 comparam as concentrações para cada elemento determinado em diferentes estruturas cerebrais dos ratos Wistar fêmeas do grupo controle e do grupo álcool com 20 dias de nascimento, como já mencionado anteriormente.



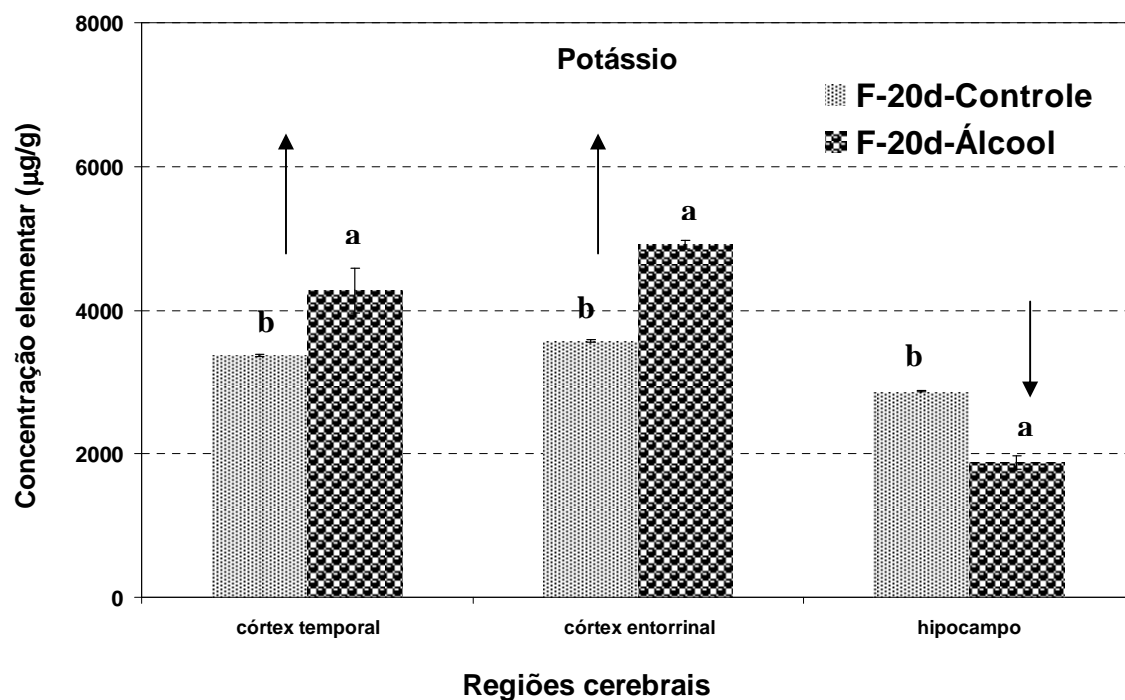
**Figura 5.3.** Concentração de fósforo nas regiões cerebrais de ratos Wistar fêmeas do grupo controle e do grupo álcool. Letras diferentes indicam diferenças estatisticamente significativas,  $p \leq 0,05$ .



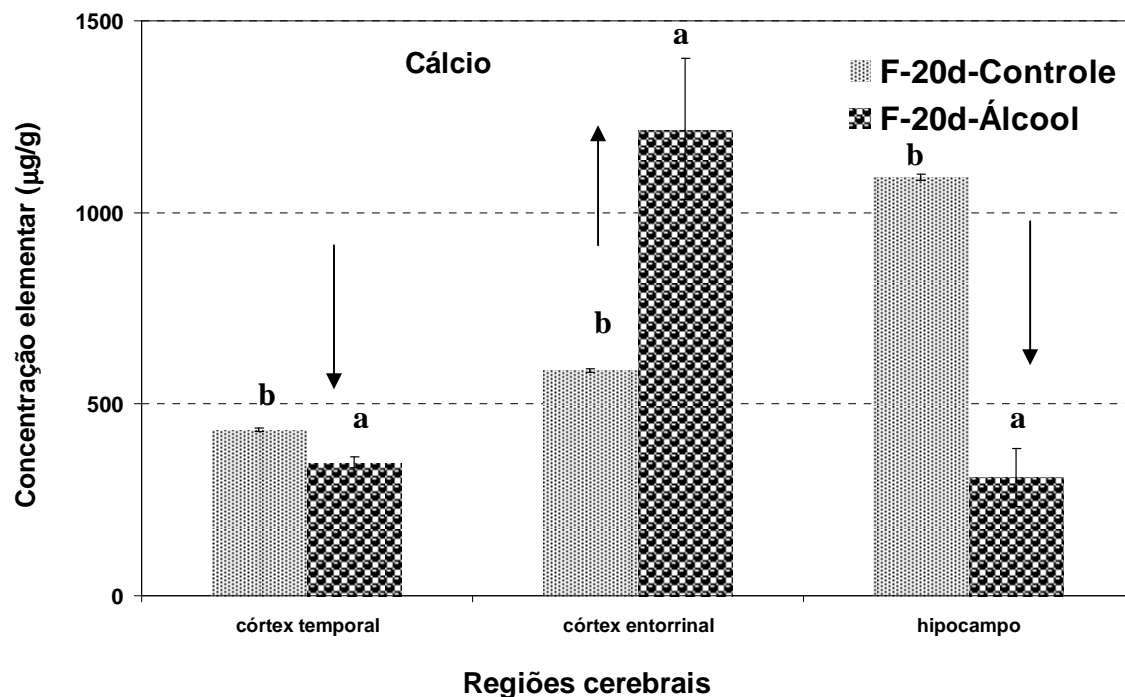
**Figura 5.4.** Concentração de enxofre nas regiões cerebrais de ratos Wistar fêmeas do grupo controle e do grupo álcool. Letras diferentes indicam diferenças estatisticamente significativas,  $p \leq 0,05$ .



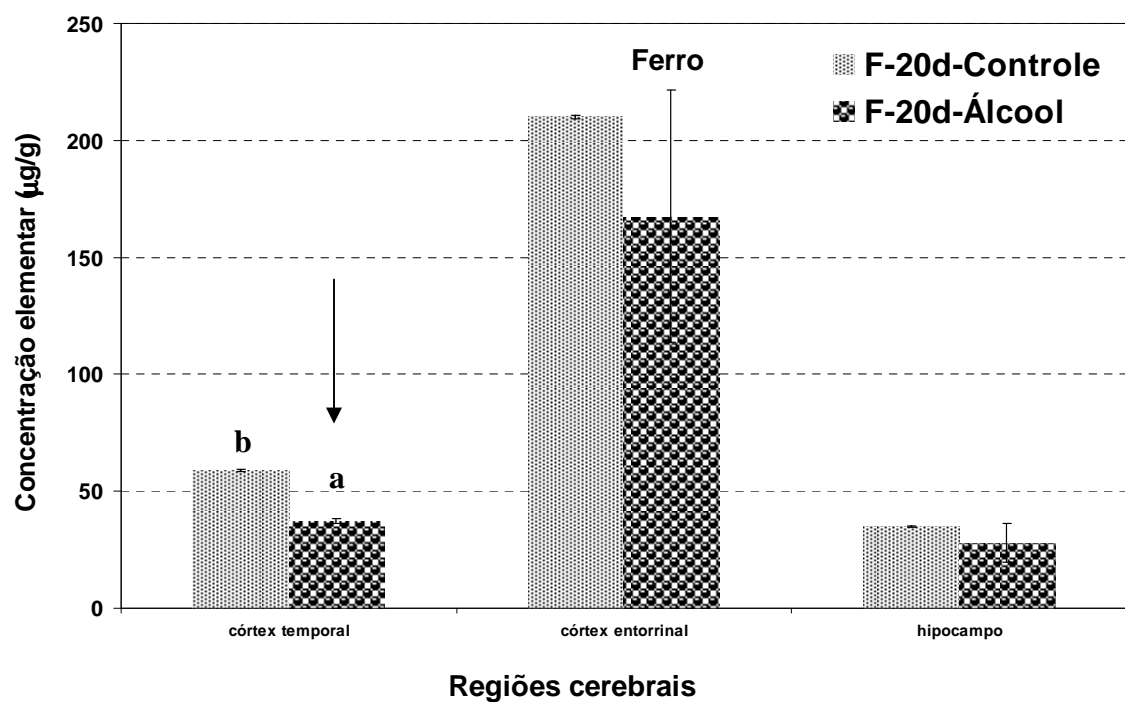
**Figura 5.5.** Concentração de cloro nas regiões cerebrais de ratos Wistar fêmeas do grupo controle e do grupo álcool. Letras diferentes indicam diferenças estatisticamente significativas,  $p \leq 0,05$ .



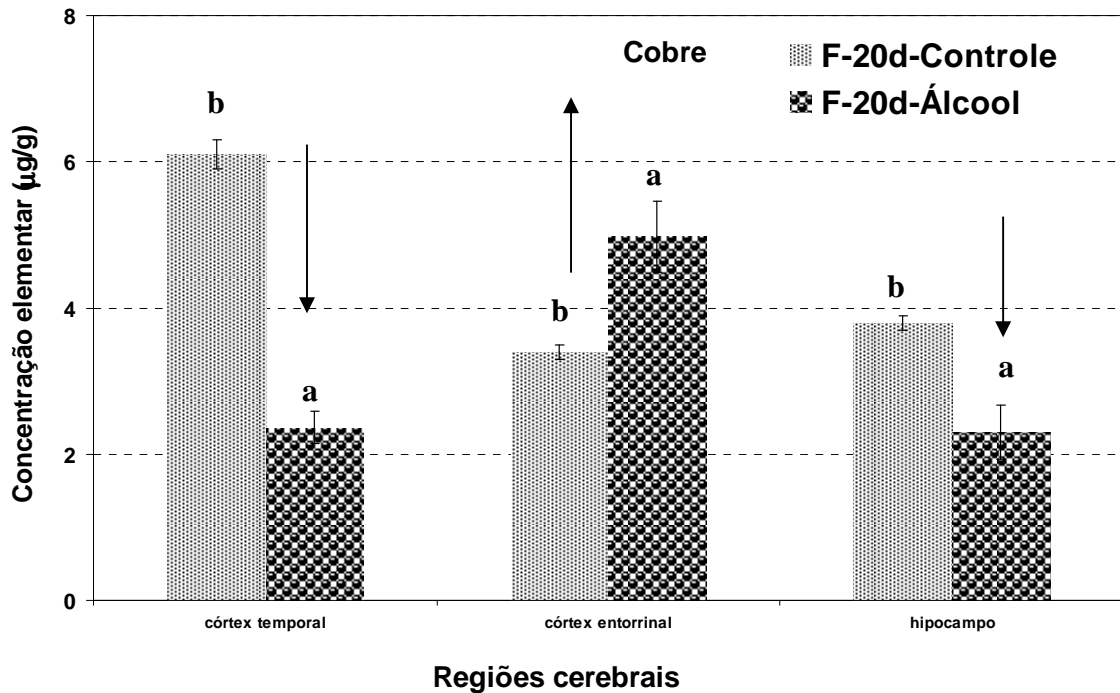
**Figura 5.6.** Concentração de potássio nas regiões cerebrais de ratos Wistar fêmeas do grupo controle e do grupo álcool. Letras diferentes indicam diferenças estatisticamente significativas,  $p \leq 0,05$ .



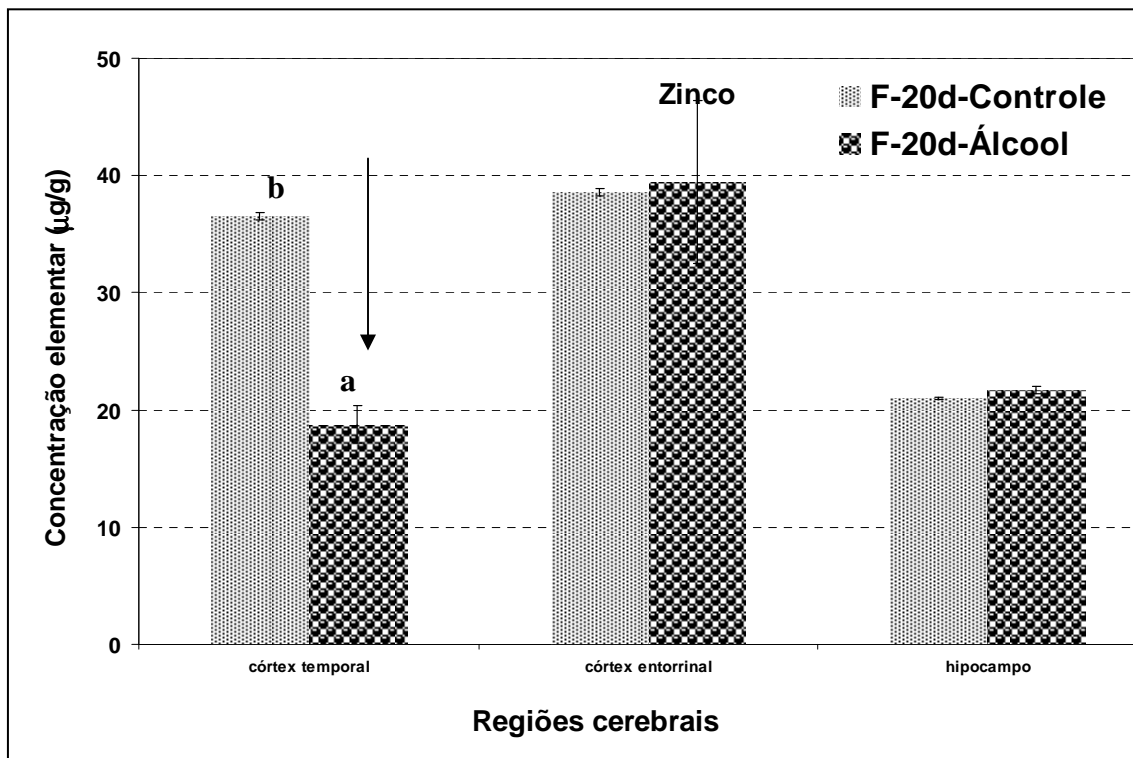
**Figura 5.7.** Concentração de cálcio nas regiões cerebrais de ratos Wistar fêmeas do grupo controle e do grupo álcool. Letras diferentes indicam diferenças estatisticamente significativas,  $p \leq 0,05$ .



**Figura 5.8.** Concentração de ferro nas regiões cerebrais de ratos Wistar fêmeas do grupo controle e do grupo álcool. Letras diferentes indicam diferenças estatisticamente significativas,  $p \leq 0,05$ .

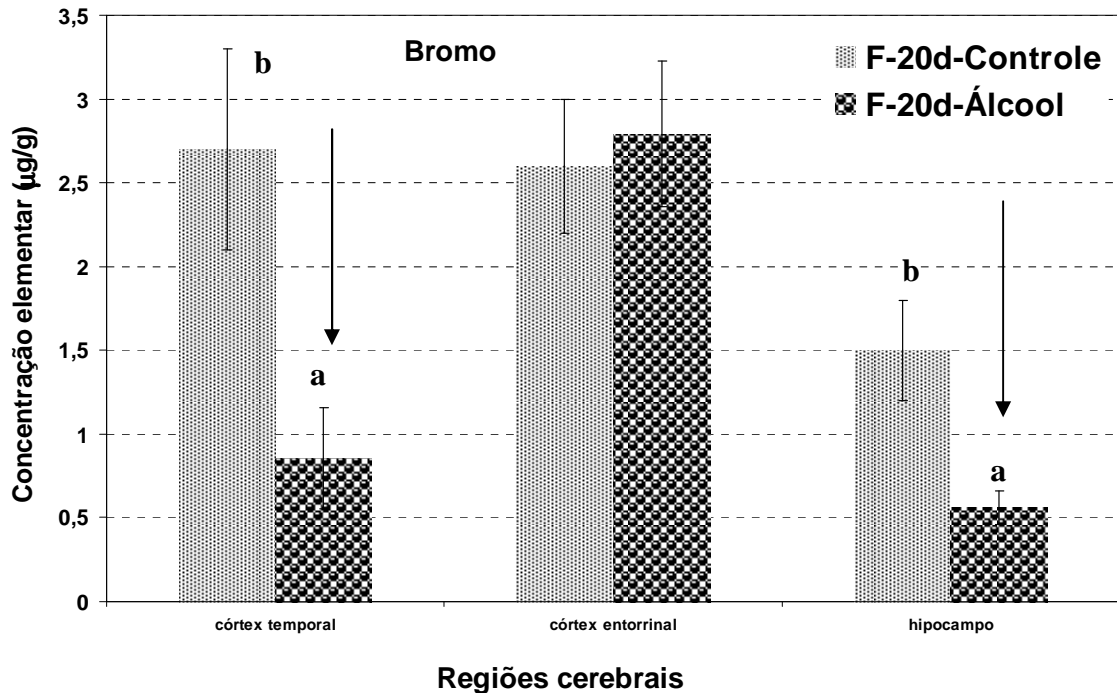


**Figura 5.9** - Concentração de cobre nas regiões cerebrais de ratos Wistar fêmeas do grupo controle e do grupo álcool. Letras diferentes indicam diferenças estatisticamente significativas,  $p \leq 0,05$ .



**Figura 5.10.** Concentração de zinco nas regiões cerebrais de ratos Wistar fêmeas do grupo controle e do grupo álcool. Letras diferentes indicam diferenças estatisticamente significativas,  $p \leq 0,05$ .





**Figura 5.11.** Concentração de bromo nas regiões cerebrais de ratos Wistar fêmeas do grupo controle e do grupo álcool. Letras diferentes indicam diferenças estatisticamente significativas,  $p \leq 0,05$ .

1) Concentrações elementares no córtex temporal, no córtex entorrinal e no hipocampo durante a intoxicação alcoólica materna (10 animais fêmeas com 20 dias de cada grupo que estiveram expostos ao etanol do 1° ao 20° dia de nascido através do leite materno);

Avaliando as figuras 5.3 a 5.11, observamos que os animais expostos ao etanol, através do leite materno (uma vez que a mãe era quem ingeria a dieta líquida de etanol) apresentaram aumento significativo nas concentrações de P, S e Cl no córtex temporal, no córtex entorrinal e no hipocampo comparado com animais controle. Além destes elementos, no córtex entorrinal ocorreu também um aumento nos teores de K, Ca, Ti e Cu. Entretanto, a administração alcoólica provocou uma redução nos níveis de Ca, Ti, Cu, Br e Rb tanto no córtex temporal como no hipocampo. O córtex temporal também

teve redução nas concentrações de Fe e Zn enquanto que o hipocampo teve redução de K.

Apesar da influência do etanol na alteração dos níveis de certos elementos no cérebro, as concentrações de Fe e Zn não sofreram alterações estatisticamente significativas no córtex entorrinal e no hipocampo das fêmeas. Os níveis de Br e Rb também não apresentaram mudanças significativas em relação aos dois grupos estudados.

Contudo, a dieta alcoólica influenciou no aumento nos níveis de Mn, Ni e Co em relação ao grupo controle das fêmeas, pois nesses animais, não foi nem mesmo possível detectar esses elementos, por estarem abaixo do limite de detecção.

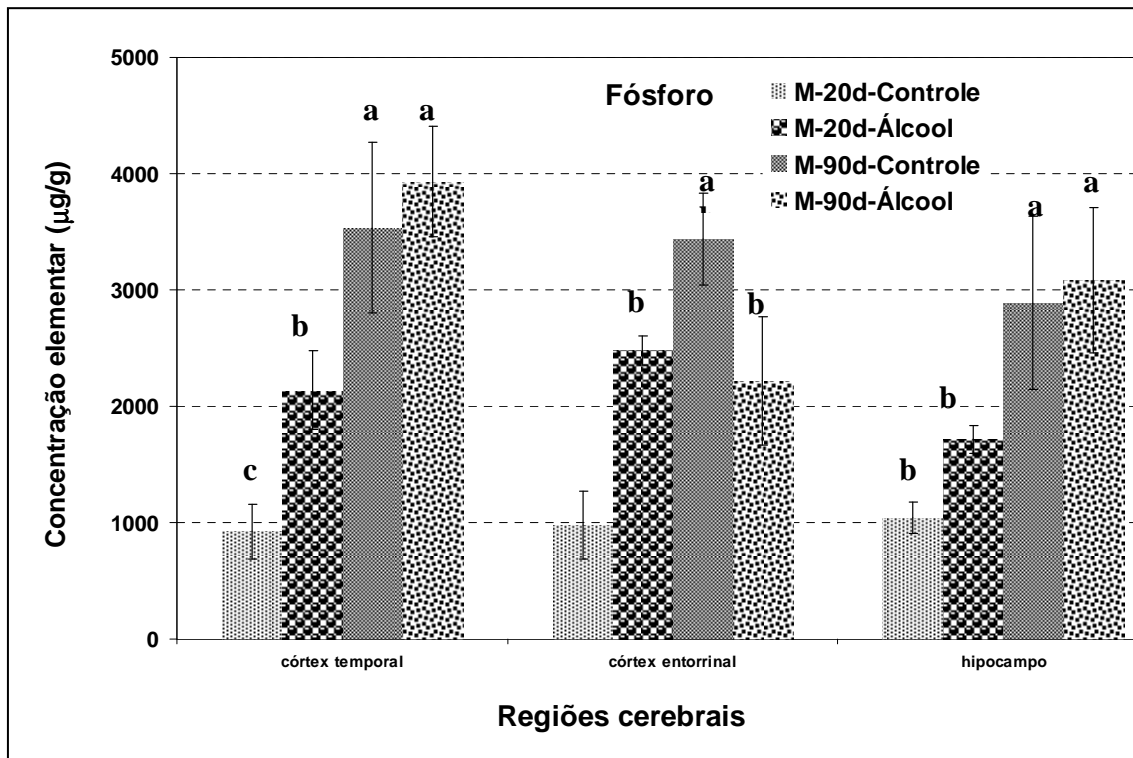
Na pesquisa realizada por Serpa *et al.*, [156] foi analisada a concentração elementar em diferentes regiões de ratos Wistar fêmeas jovens, adultos e velhos. Comparando as concentrações elementares encontradas nas fêmeas jovens com o grupo controle desta pesquisa não foram observadas diferenças significativas dos elementos Cl, K, Cu, Zn e Ca. Entretanto, elementos como o Br, o S, e o Cl tiveram valores maiores neste estudo.

Tahohda *et al.*[176] determinaram as concentrações de elementos em ratos Wistar normais com 1,3,5,7,14,21,42, 87 e 147 através da técnica ICP-MS em diversas regiões cerebrais. Ao observar a concentração de Mn nos animais com 21 dias neste trabalho, conclui-se não existir diferenças significativas quando comparado com o grupo etanol com 20 dias desta pesquisa. A concentração de Zn dos animais supracitado na pesquisa de Tahohda *et al.* [176] também não apresenta diferenças com o grupo controle.

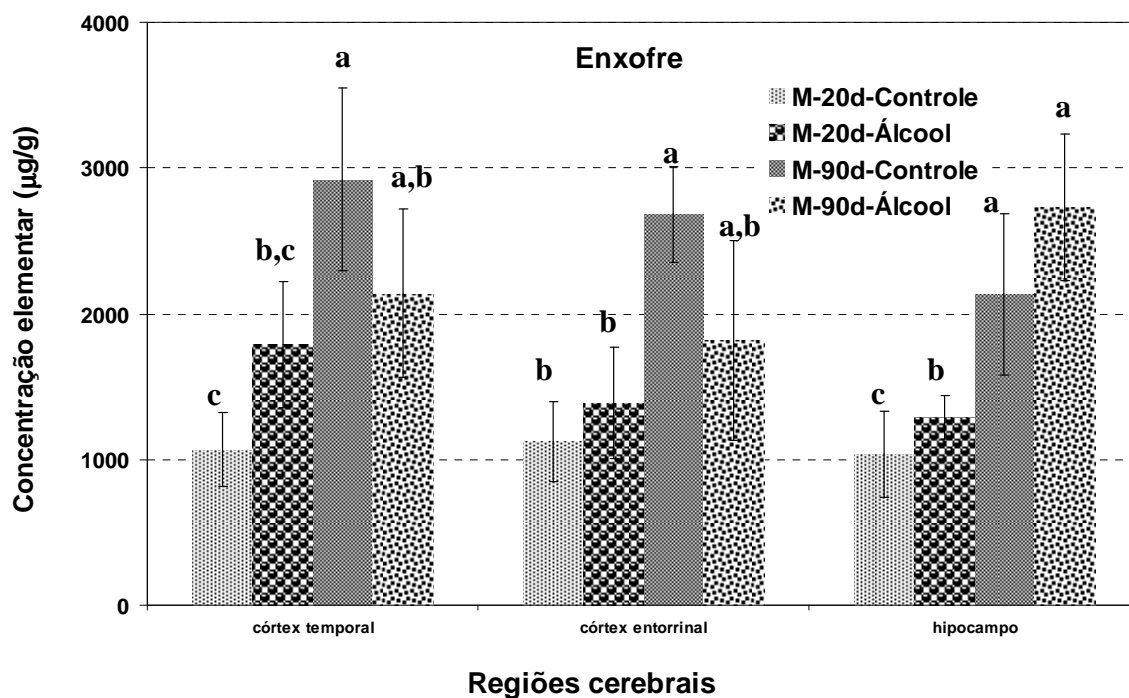
O córtex entorrinal, região de extrema importância para a aprendizagem e a memória, comprova não sentir o efeito do etanol neste estudo, tendo em vista que todos

os elementos ou apresentaram concentrações maiores ou não apresentaram diferenças significativas ao serem comparados com os animais controle.

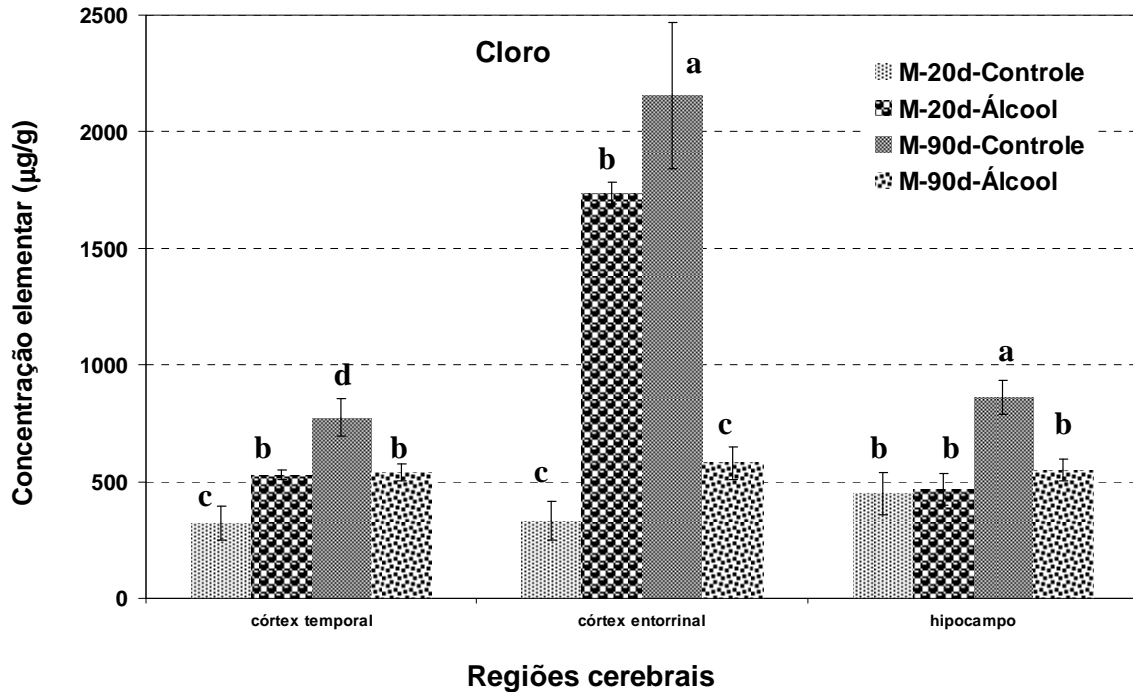
As figuras 5.12 a 5.20 comparam as concentrações para cada elemento determinado em diferentes estruturas cerebrais dos ratos Wistar machos do grupo controle e do grupo álcool com 20 e 90 dias de idade.



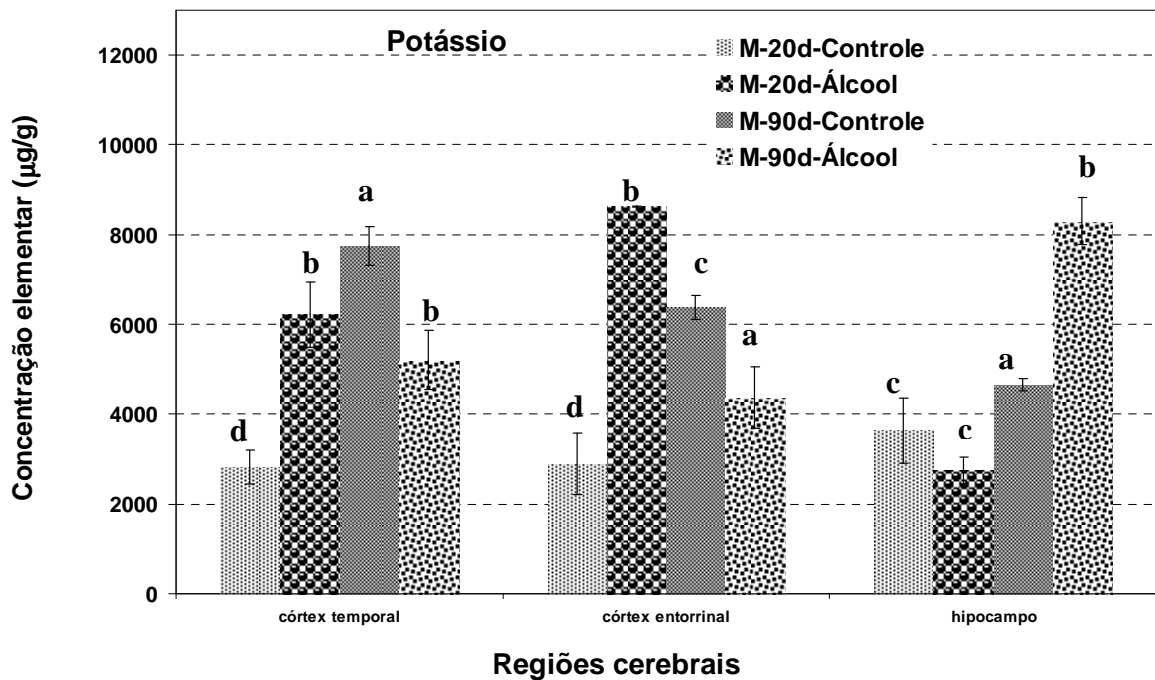
**Figura 5.12.** Concentração de fósforo nas regiões cerebrais de ratos Wistar machos do grupo controle e do grupo álcool. Letras diferentes indicam diferenças estatisticamente significativas,  $p \leq 0,05$ .



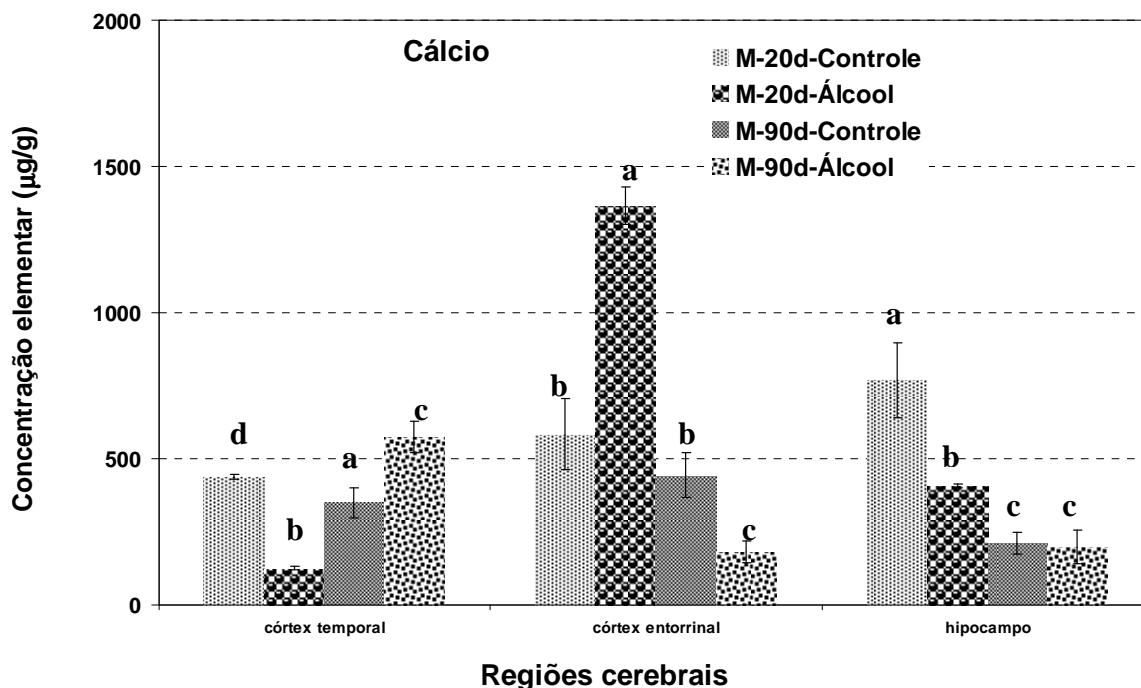
**Figura 5.13.** Concentração de enxofre nas regiões cerebrais de ratos Wistar machos do grupo controle e do grupo álcool. Letras diferentes indicam diferenças estatisticamente significativas,  $p \leq 0,05$ .



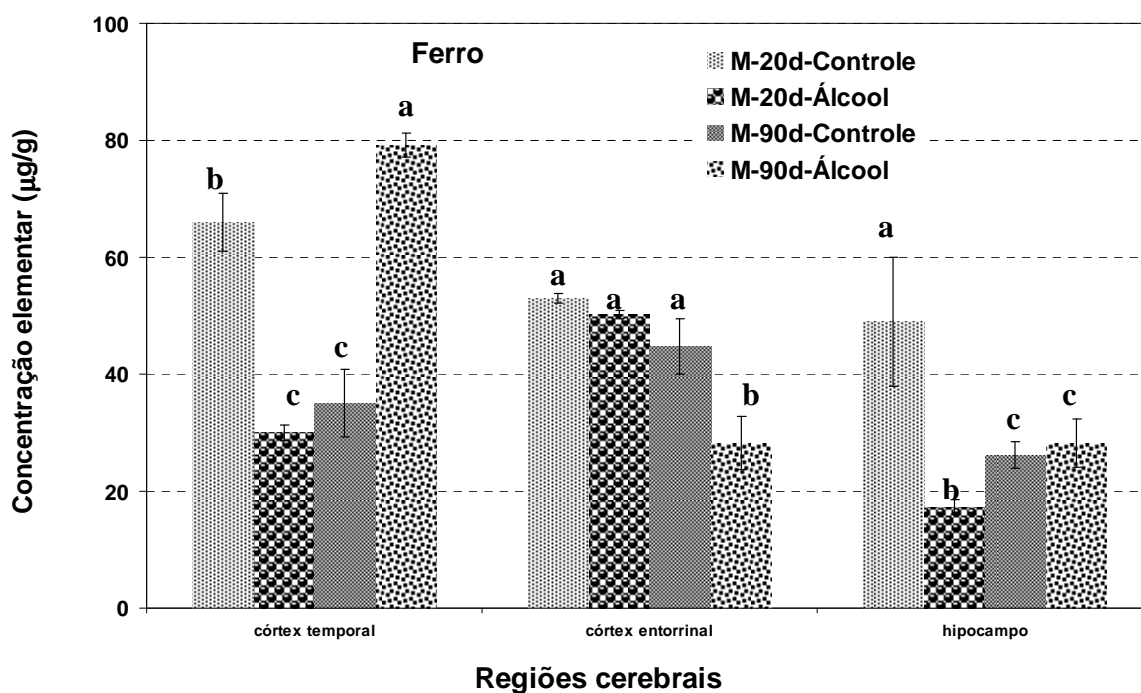
**Figura 5.14.** Concentração de cloro nas regiões cerebrais de ratos Wistar machos do grupo controle e do grupo álcool. Letras diferentes indicam diferenças estatisticamente significativas,  $p \leq 0,05$ .



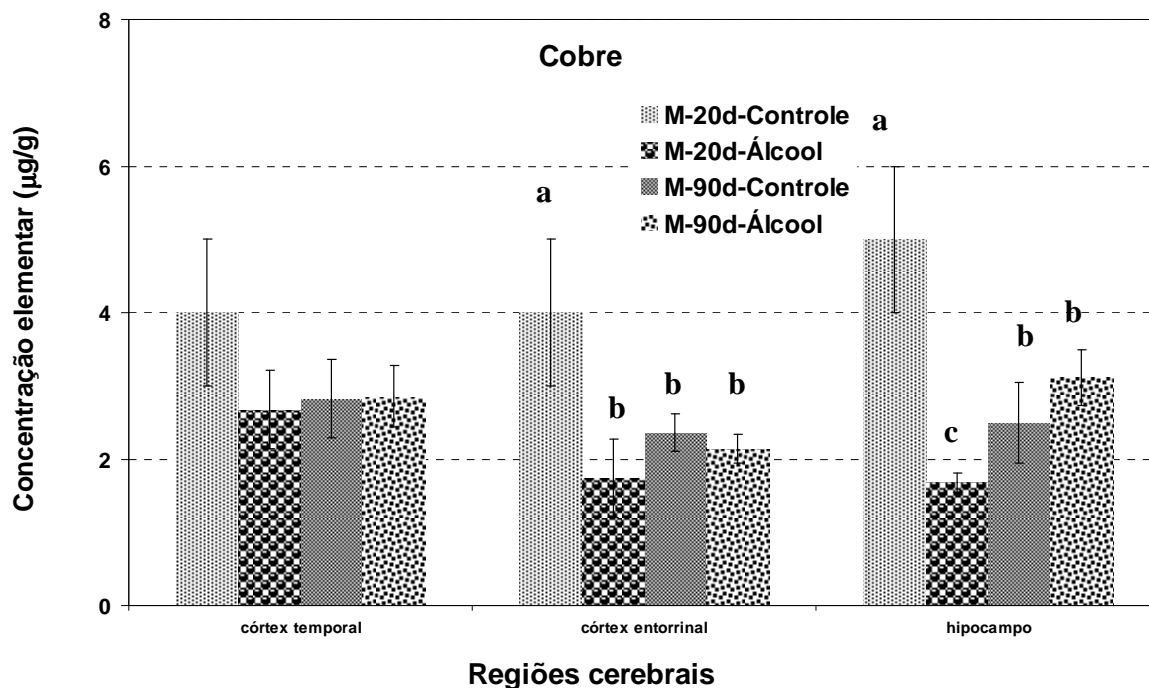
**Figura 5.15.** Concentração de potássio nas regiões cerebrais de ratos Wistar machos do grupo controle e do grupo álcool. Letras diferentes indicam diferenças estatisticamente significativas,  $p \leq 0,05$ .



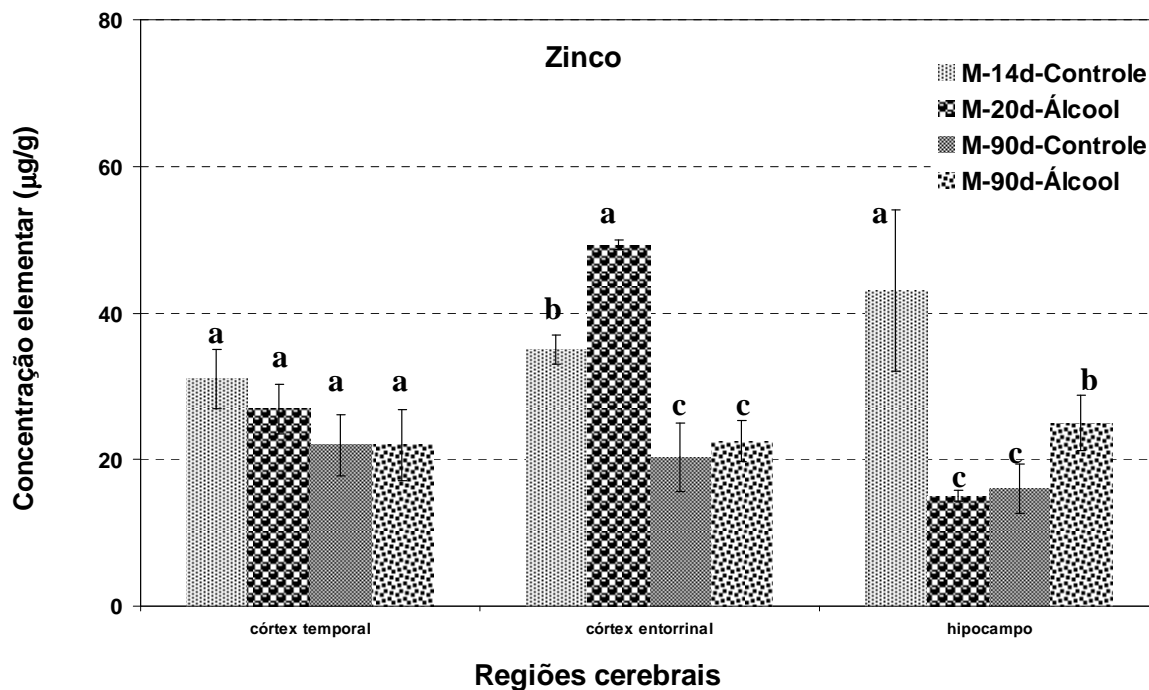
**Figura 5.16.** Concentração de cálcio nas regiões cerebrais de ratos Wistar machos do grupo controle e do grupo álcool. Letras diferentes indicam diferenças estatisticamente significativas,  $p \leq 0,05$ .



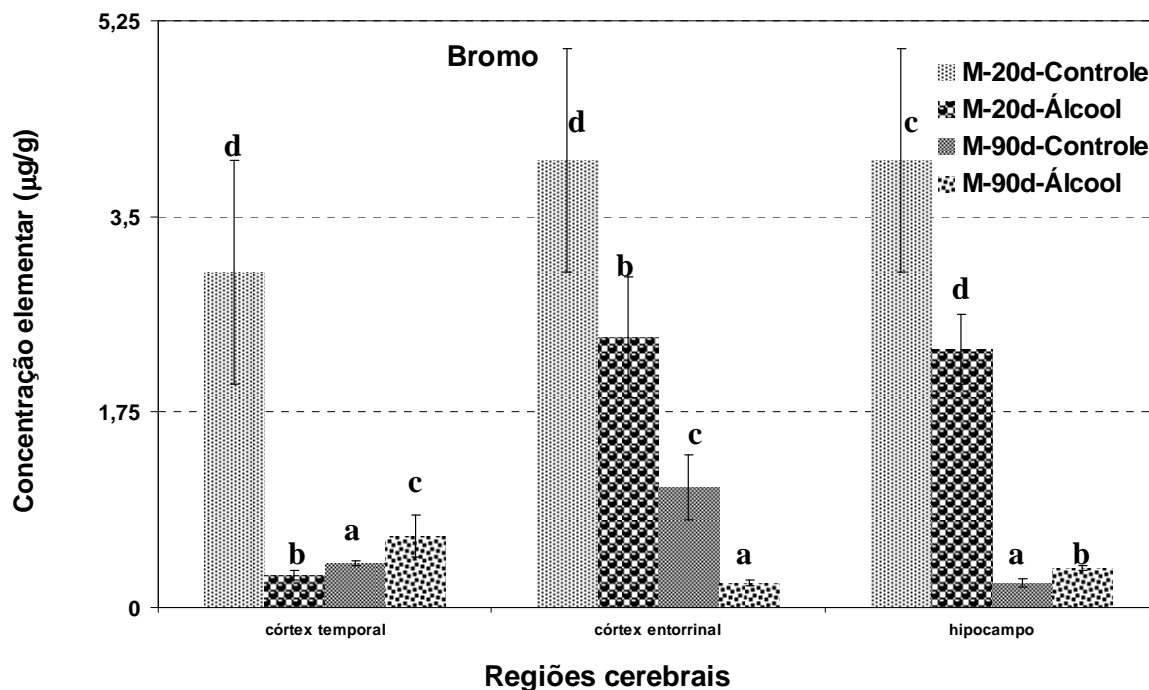
**Figura 5.17.** Concentração de ferro nas regiões cerebrais de ratos Wistar machos do grupo controle e do grupo álcool. Letras diferentes indicam diferenças estatisticamente significativas,  $p \leq 0,05$ .



**Figura 5.18.** Concentração de cobre nas regiões cerebrais de ratos Wistar machos do grupo controle e do grupo álcool. Letras diferentes indicam diferenças estatisticamente significativas,  $p \leq 0,05$ .



**Figura 5.19.** Concentração de zinco nas regiões cerebrais de ratos Wistar machos do grupo controle e do grupo álcool. Letras diferentes indicam diferenças estatisticamente significativas,  $p \leq 0,05$ .



**Figura 5.20.** Concentração de bromo nas regiões cerebrais de ratos Wistar machos do grupo controle e do grupo álcool. Letras diferentes indicam diferenças estatisticamente significativas,  $p \leq 0,05$ .

**2)Concentrações elementares no córtex temporal, no córtex entorrinal e no hipocampo durante o período de recuperação com dieta normal/controle dos filhotes adultos com 90 dias de idade (7 animais machos de cada grupo que estiveram sujeitos à ingestão alcoólica do 1° ao 20° dia e à ração comercial do 21° ao 90° dia de nascido);**

O objetivo de comparar apenas o córtex entorrinal e o hipocampo dos animais com 90 dias deve-se à importância dessas regiões para o aprendizado e para a memória tendo, também em vista, uma comparação com os resultados obtidos no teste comportamental realizado no labirinto aquático do Laboratório de Farmacologia .



- **Hipocampo**

Nos animais do grupo etanol foi observado um aumento nos níveis de Z, K e Br e uma redução de Br. Elementos como o S, P, Fe, Ca e Cu não apresentaram diferenças significativas.

Ao comparar a concentração do Fe e o Cu no hipocampo dos animais com 87 dias da pesquisa de Tahohda *et al.* [176], com os animais dos grupos controle e etanol com 90 dias deste estudo, observa-se não haver diferenças significativas entre os resultados obtidos.

A pesquisa de Rajan *et al.*[177] apresenta a distribuição de elementos em 12 regiões do cérebro de 8 homens adultos normais (não tinham históricos de doenças neurológicas, neurodegenerativas e psiquiátricas). As concentrações de Fe e P não proporcionam diferenças significativas quando observado os resultados deste estudo. Contudo, os níveis de K, Ca e Zn são maiores nos cérebros dos homens adultos.

Comparando os resultados das concentrações de elementos no hipocampo dos animais com 90 dias do grupo controle desta pesquisa com as concentrações dos animais normais, adultos de oito semanas da pesquisa de Serpa *et al.*[156], conclui-se que os níveis de Fe, Ca e K, apresentam valores maiores, entretanto, na mesma ordem de grandeza. O Zn, Cu, S e P não apresentam diferenças significativas ao serem comparados com os animais controle desta pesquisa.

- **Córtex entorrinal**

Ao comparar os animais com 90 dias de vida fica evidenciado que os níveis de K, Cl, P, Fe, Ca e Br diminuíram nos animais do grupo etanol nos 90 dias de vida e o S, o Zn e o Cu não apresentaram diferenças significativas.

Comparando os resultados das concentrações de elementos no córtex entorrinal dos animais com 90 dias do grupo controle desta pesquisa com as concentrações dos animais normais, adultos de oito semanas da pesquisa de Serpa *et al.*[156], conclui-se que os níveis de Cl, K, Ca e Fe, apresentam valores maiores, entretanto, na mesma ordem de grandeza. Já os níveis de Zn, Cu, e P dos animais controle desta pesquisa apresentam valores menores e os níveis de S e Br não apresentam diferenças significativas ao serem comparados com os animais controle deste estudo.

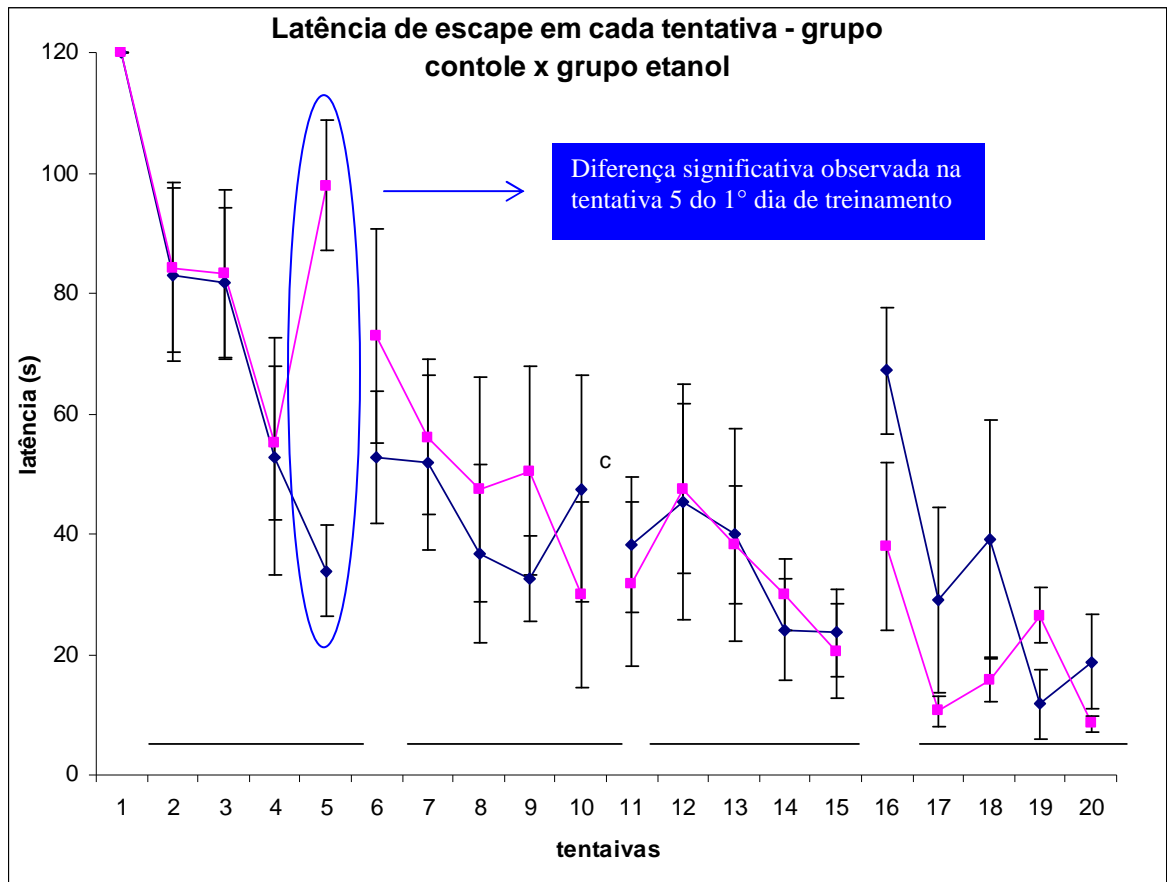
- **Córtex temporal**

As concentrações de Fe, Ca e Br aumentaram enquanto que os níveis de Cl e K diminuíram nos animais do grupo etanol . Todavia, os níveis de S, P, Na e Cu não sofreram variações significativas.

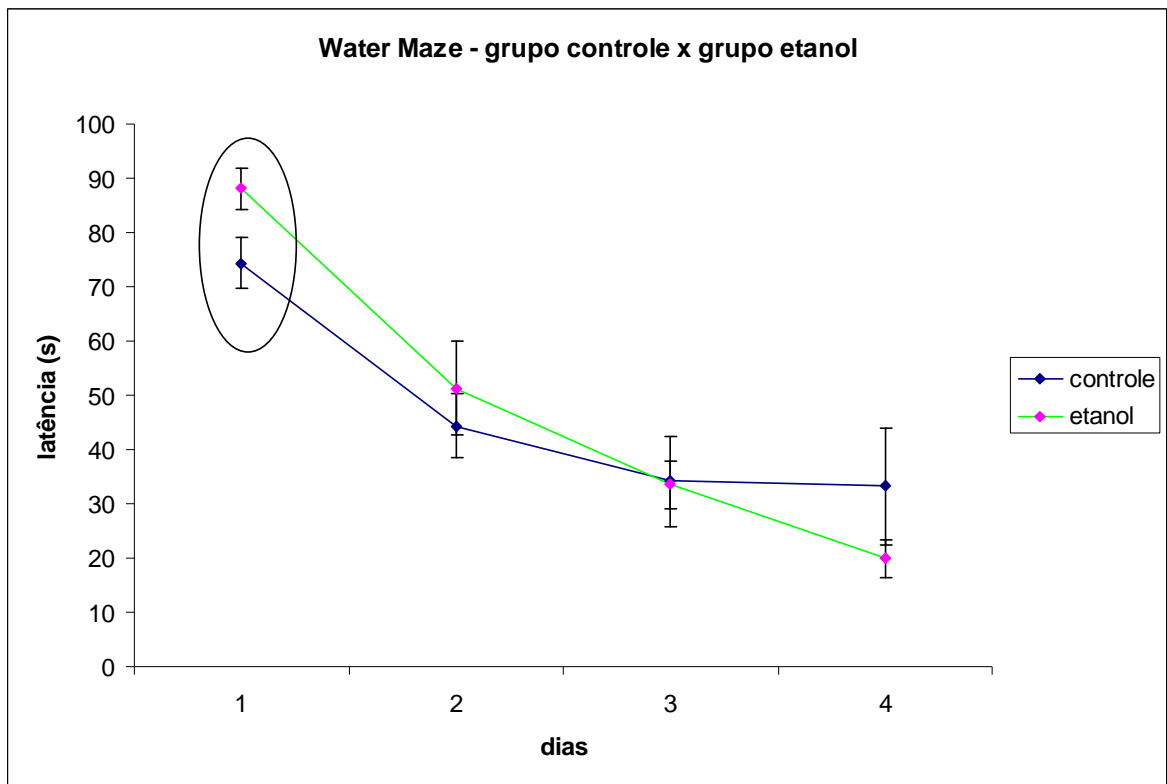
Ao comparar os níveis de P, S, Cl, K, Ca, Fe, Cu, Zn e Br dos animais controle com a os animais adultos da pesquisa desenvolvida por Serpa *et al.*[156], que estuda os níveis de diversos elementos em diferentes regiões cerebrais em idades variadas, conclui-se que as concentrações de Cl, S, K e Ca, aumentaram significativamente. Todavia, os níveis de P, Fe, Cu e Zn não indicaram diferenças.

Uma outra proposta levantada por esta pesquisa foi a realização de um teste comportamental com os animais com 90 dias de vida dos grupos controle e etanol durante quatro dias consecutivos, tendo em vista uma comparação entre as latências de escape dos animais.

As informações da latência (em segundos) em função das tentativas aparecem no gráfico 5.21. O resultado da latência (em segundos) em função dos dias de treinamento é apresentado na figura 5.22



**Figura 5.21** – Latência de escape (em segundos) em função das tentativas de cada grupo durante os quatro dias de treinamento



**Figura 5.22** – Latência de escape (em segundos) em função dos dias de treinamento de cada grupo.

Na figura 5.21 o gráfico permite observar a latência de escape, que foi determinada através do valor médio de cada grupo (controle e etanol), para cada tentativa, durante os quatro dias de treinamento. A latência de escape indica o aprendizado do animal, em função do intervalo de tempo gasto para o encontro da plataforma.

Os resultados obtidos pelos grupos indicam que ambos têm desempenhos semelhantes desde o primeiro dia de treinamento. Os animais, no decorrer do teste, mostram aprender a atividade proposta, entretanto ao observar o grupo controle, conclui-se que este chega próximo à latência final já no primeiro dia de teste, fato não observado no grupo etanol. A figura 5.22, reforça este conceito a partir do gráfico do tempo gasto para cada grupo encontrar a plataforma em função do dia de treinamento. Fica explícito a diferença significativa entre os grupos através do teste da análise de

variância no primeiro dia 1, porém esta diferença deixa de existir a partir do segundo dia. A diferença do primeiro dia deve-se à tentativa 5, sendo também detectada pelo teste de Mann-Whitney (Rank Sum test ) ao comparar a mediana dos grupos, uma medida de tendência central. Nos outros dias dos testes não foram observadas diferenças significativas ( $p < 0,05$ ).

Lukoyanov *et al.* [179] analisaram as conseqüências do consumo crônico de etanol em 17 animais machos que foram submetidos ao etanol aos 2 meses de idade ingerindo uma dose de 5%, aumentando progressivamente 1% a cada dia chegando até os 20° de solução alcoólica. Após duas semanas de aumento progressivo, o consumo continuou durante 12 meses em ratos da linhagem Wistar, e não foram observadas deficiências cognitivas significativas nos animais continuamente expostos ao etanol de acordo com o protocolo utilizado descrito por Mandel *et al.*[180] e Netto *et al.*[181]. Neste protocolo, os animais foram submetidos ao teste durante cinco dias consecutivos de tratamento tendo quatro tentativas por dia. Se os animais, durante 60 segundos, não encontrassem a plataforma, eles eram gentilmente colocados na mesma durante 15 s. A localização da plataforma encontrava-se à 2 cm abaixo da água. Segundo este teste, a memória de trabalho não sofreu alterações significativas apesar da grande perda de células da região hipocampal CA1(18%) e CA3(19%). Segundo os autores, os animais dos grupos controle e etanol obtiveram resultados muito próximos do presente estudo. No último dia de treinamento, os animais do grupo etanol, segundo Lukoyanov *et al.* [179] tiveram uma latência de escape de, aproximadamente, 25s considerando uma média entre as quatro tentativas . Neste estudo, os animais do mesmo grupo concluíram este o ultimo dia do teste com um resultado de, aproximadamente 20 s de latência considerando a media das 5 tentativas.

Boulouard *et al.* [134] também observaram os efeitos causados na memória espacial de ratos machos Sprague-Dawley em função da administração de etanol durante duas semanas de administração alcoólica. Quarenta e quatro ratos machos foram separados em dois grupos (controle e etanol). Os animais do grupo etanol foram submetidos a uma dieta líquida com 10% de etanol durante as duas semanas que antecederam os testes comportamentais. Todos os animais foram sujeitos à uma injeção intraperitoneal com 1,5g/kg de etanol trinta minutos antes da primeira tentativa. Os animais foram treinados durante cinco dias consecutivos realizando quatro tentativas em cada dia. Se ao final de 90 segundos eles não tivessem encontrado a plataforma, os animais eram colocados na mesma durante 20 segundos. Após o teste, foi observado que o grupo etanol encontrou a plataforma em um intervalo de tempo menor que o grupo controle.

Santin *et al.*[182] analisaram os efeitos causados pelo consumo crônico de etanol durante quatro meses. Para esta pesquisa, os autores utilizaram 26 ratos Wistar machos sendo separados em dois grupos (etanol e controle). O tratamento com etanol ocorreu em período de cinco meses e vinte sete dias. Os animais inicialmente estiveram sujeitos à uma concentração de 2% de etanol que foi sendo aumentada gradativamente até chegar a 20%. Assim, os animais continuaram a ingerir o etanol durante quatro meses. O teste comportamental foi realizado, segundo o labirinto aquático de Morris, durante quatro dias consecutivos sendo realizada quatro tentativas a cada dia de quadrantes diferentes. Os animais que não encontravam a plataforma num intervalo de 60 segundos, foram colocados na mesma durante 15 segundos. Após esses quatro dias o treinamento continuou com outros objetivos. Os resultados comprovam que ambos os animais foram capazes de assimilar a localização da plataforma em diferentes localidades, sem diferenças significativas entre a latência de escape. Este resultado

sugere que o consumo crônico de etanol não afeta o aprendizado espacial dos animais, assim como os trabalhos propostos por diversos autores [183-185].

## CONCLUSÃO

Ao comparar os animais com 20 dias de nascimento, dos grupos controle e etanol, observamos, no córtex entorrinal, um aumento nos níveis de K, Ca, Cu, P, S e Cl. Nenhuma região do córtex entorrinal dos animais do grupo etanol sofreu redução em nas concentrações elementares (Br, Zn e Fe não apresentaram diferenças significativas). No córtex temporal, ocorreu um aumento de K, Cl, P e S e uma redução de Ca, Fe, Br, Cu e Zn comparando os animais etanol com os animais do grupo controle. Já no hipocampo, observamos um aumento nos níveis de Cl, P e S, e uma redução de Ca, Cu e K (Zn e Fe não apresentaram diferenças significativas).

Comparando as concentrações elementares nos animais com 90 dias de nascimento, observamos que, no colículo superior, os níveis de P, Fe, K e Cl do grupo etanol aumentaram e a concentração de Br diminuiu significativamente em relação aos animais controle. Os níveis de Ca, S, Zn e Cu não apresentaram mudanças significativas ao comparar os dois grupos.

As concentrações de Fe, Ca e Br aumentaram enquanto que os níveis de Cl e K diminuíram no córtex temporal nos animais do grupo etanol. Todavia, os níveis de S, P, Na e Cu não sofreram variações significativas.

Nos animais do grupo etanol foi, também, observado um aumento nos níveis de Z, K e Br e uma redução de Br na região do hipocampo. Elementos como o S, P, Fe, Ca e Cu não apresentaram diferenças significativas.



Nos animais com 90 dias de vida do grupo etanol, os níveis de K, Cl, P, Fe, Ca e Br diminuíram e o S, o Zn e o Cu não apresentaram diferenças significativas no córtex entorrinal.

No cerebelo, o nível de Fe dos animais do grupo etanol aumentou enquanto que o nível de Cl diminuiu, entretanto as concentrações de K, S, P, Ca, Br, Zn e Cu dos grupos não sofreram diferenças significativas.

Em suma os resultados apresentados nesta pesquisa concluem que, de acordo com o protocolo utilizado, os animais que foram submetidos a dieta líquida de etanol durante os primeiros 20 dias de vida, ao receberem ração comercial durante os 70 dias seguintes, não apresentaram diferenças em relação ao teste comportamental do labirinto aquático de Morris nos 90 dias de vida.

Entretanto, os animais do grupo etanol, ao final do primeiro dia, tiveram maior dificuldade para encontrar a plataforma. Isso pode ser justificado pela redução das concentrações elementares de quase todos os elementos no córtex entorrinal, no período de 90 dias. Essa região tem grande importância no aprendizado e na memória e variações nos níveis de elementos podem acarretar danos nos processos cognitivos. Todavia, é possível também concluir, que essas alterações não comprometem completamente as ações cognitivas, pois já no segundo dia de treinamento os resultados dos testes comportamentais, dos grupos etanol e controle, mostram não ter diferenças significativas.

Com isso, conclui-se que a dieta líquida de etanol, em relação à concentração alcoólica proposta por este trabalho, não altera as estruturas cerebrais das proles de uma mãe que consome álcool durante o período da amamentação.

Com o objetivo fazer uma análise mais profunda neste assunto propomos as seguintes sugestões para enriquecimento deste trabalho.

- Ingestão alcoólica, com diferentes concentrações pela mãe em diferentes períodos para analisar as concentrações elementares dos filhotes e compará-las com os animais do grupo controle;
- Utilização de outras técnicas analíticas, como a PIXE, ICP-MS além da TXRF, para a determinação das concentrações elementares;
- Determinação da concentração dos micronutrientes, em diferentes períodos, após o consumo de outras drogas psicotrópicas, que apresentam altos níveis de aceitação;
- Avaliação cognitiva dos animais submetidos às propostas supracitadas, através do labirinto aquático e de outros testes.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [01] MISTRA, N.L., SINGH MUDHER, K.D., “Total reflection X ray fluorescence: a technique for trace element analysis in materials”, **Progress in Crystal Growth and Characterizations of Materials**, pp.65-74, 2002.
- [02] NASCIMENTO FILHO, V.F., “Técnicas Analíticas Nucleares de Fluorescência de Raios X por Dispersão de Energia (ED-XRF) e por Reflexão Total (TXRF)”, 1999, disponível on line: [www.cena.usp.br/apostilas/Virgilio/CEN-5723/EDXRF\\_TXRF.doc](http://www.cena.usp.br/apostilas/Virgilio/CEN-5723/EDXRF_TXRF.doc), pesquisa realizada em 05/08/2006.
- [03] KLOCKENKÄMPER, R., “Total-Reflection X-Ray Fluorescence Analysis”, AWiley-Interscience Publication, United States of America, 123p.1996.
- [04] SZALÓKI, I., OSÁN, J., VAN GRIEKEN, R.E, “X-ray Spectrometry”, **Anal. Chem.**, v.78, pp. 4069-4096, 2006.
- [05] PRANGE, A., “Total reflection X-ray spectrometry: method and applications”, **Spectrochimica Acta Part B**, v. 44, n. 05, pp. 1469-1480, 1989.
- [06] STREISSGUTH, A.P., LANDESMAN-DWYER, S., MARTIN, J.C., et al., “Teratogenic effects of alcohol in humans and laboratory animals”, **Science**, v.209, pp.353-361, 1980.
- [07] WARNER, R.H, ROSETT, H.L., “The effects of drinking on off spring an historical survey of the American and British literature”, **J Stud Alcohol**, v. 36, pp. 1395-420, 1975.
- [08] GALLO, P.V., WEINBERG, J., “Organ growth and celular development in ethanol exposed rats”, **Alcohol** , v.3, pp. 261-267, 1986.

- [09] MENA, M.A., ZORZANO, A., HERRERA, E., “Acute effects of ethanol on brain, plasma and adrenal monoamine concentration virgin and pregnant rats and their fetuses”, **Nev Rochem Int** , v.9, pp. 371-378, 1986.
- [10] SANCHIS, R., SANCHOTELO, M., CHIRIVELLA, M., et al., “The role of maternal alcohol-damage on ethanol teratogenicity in the rat”, **Teratology** , v.36, pp. 199-208, 1987.
- [11] JONES, K.K, SMITH, D.W., ULLELAND, C.N., et al., “Pattern of malformation in off spring of chronic alcoholic mothers”, **Lancet** ,v.1, pp. 1267-1271, 1973.
- [12] CARMO, M.G.T., NASCIMENTO, C.M.O., MARTIN, A., et al., “Ethanol intake during lactation impairs milk production in rats and affects growth and metabolism of suckling pups”, **Alcohol**, v.18, pp. 71-76, 1999.
- [13] DETERING, N., REED, W.D., OZAND, P.T., et al., “The effects of maternal ethanol consumption in the rat on the development of their offspring”, **J. Nutrition**, v.109, pp. 999-1009, 1979.
- [14] MENELLA, J.A., “The transfer of alcohol to human milk”, **N. Engl. J. Med.**, v. 325, pp. 981-985, 2001.
- [15] MENELLA, J.A., “Effects of beer on brestfed infants”, **JAMA**, v. 269, pp. 1637-1638, 2003.
- [16] SUBRAMANIAN, M.G., “Prolactin secretion in lactatino rats following chronic alcohol exposure-provacative tests with secretagogues”, **Life Science** , v.57, pp. 533-539, 2005.
- [17] SUBRAMANIAN, M.G., “Effects of chronic alcohol administration on lactational performance in the rat”, **Alcohol**, v. 12, pp. 137-143, 1995.
- [18] SUBRAMANIAN, M.G., “Alcohol inhibits suckling-induced oxytocin release in the lactating rat”, **Alcohol**, v.19, pp. 51-55, 1999.

- [19] SUBRAMANIAN, M.G., ABEL, E.L., "Alcohol inhibits suckling-induced prolactin-release and milk-yield", **Alcohol**, v.5, pp. 95-98, 1988.
- [20] SUBRAMANIAN, M.G., "Inhibitory effect of alcohol on the established suckling-induced prolactin surge in lactating rats", **Proc. Soc Exp. Biol. Med.**, v.198, pp. 579-583, 1991
- [21] LISTON, J., "Breastfeeding and the use of recreational drugs-alcohol, caffeine, nicotine and marijuana", **Breastfeed Revistal**, v.6, pp. 27-30, 1998.
- [22] GOTTSFELD, A., LEGRUE, S.J., "Lactational alcohol exposure elicits long-term immune deficits and increased noradrenergic synaptic transmission in lymphoid organs", **Life Science**, v.47, pp. 457-465, 1990.
- [23] MENELLA, J.A., BEAUCHAMP, G.K., "Short-term effects of maternal alcohol consumption on lactational performance", **Alcohol Clin. Exp. Res.**, v.22, pp.1389-1392, 1998.
- [24] SEELIG, L.L., STEVEN, W.N., STEWART, G.L., "Second generation effects of maternal ethanol consumption on immunity to trichinella spiralis infemale rats", **Alcohol Alcohol**, v.34, 520-528, 1994.
- [25] GROSSMAN, E., "Beer and breast feeding: the wisdom of old wines", **JAMA** v.259, pp. 1096, 2003.
- [26] NA, A.R, DANIELS, L.C., SEELIG, L.L., "Preliminary study of how alcohol consumption during pregnancy affects immune components in breast milk and blood of postpartum women", **Alcohol Alcohol**, v.32, pp. 581-589, 1997.
- [27] ZORDANO, A., HERRERA, E., "Decreased in vivo rate of ethanol metabolism in the suckling rat", **Alcohol Clin. Exp. Res.**, v.13, pp. 527-32, 1989.

- [28] SILVA, V.A., MALHEIROS, L.R., SANTOS, A.R.M., et al., "Ethanol pharmacokinetics in lactating women", **Braz. J. Med. Biol**, v.26, pp.1097-1103, 1993.
- [29] LAWTON, M.E., "Alcohol in breast milk", **Aust. N. Z. J. Obstet. Gynaecol.**, v. 25, pp. 71-73, 2001.
- [30] ALBUQUERQUE, K.T., RAMALHO, R.A., SOARES, A.G., et al., "Effects of ethanol intake on retinol concentration in the milk of lactating rats", **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v.31, pp. 929-932, 1998.
- [31] SANCHIS, R., SANCHO-TELLO. M., GUERRI, C., "The role of liquid diet formulation in the postnatal ethanol exposure of rats via mother's milk", **J. Nutrition**, v.119, pp. 82-88, 1989.
- [32] CARMO, M.G.T., CURI, C.M.O.N., "Effects of ethanol intake on lipid metabolism in the lactating rat", **Alcohol**, v.13, pp. 443-448, 1996.
- [33] GOODLETT, C.R., MERCUSSEN, B.L., WEST, J.R., "A single day of alcohol exposure during the brain growth spurt induces brain weight restriction and Purkinje cell loss", **Alcohol**, v.7, pp. 107-114, 1990.
- [34] NEVES, J., FACCIN, G.L., CARMO, M.G.T., "Efeito da ingestão de álcool durante a lactação sobre a produção e composição do LM e sobre o crescimento da prole: estudo em ratas", **R. Nutrition**, v.8, pp. 47-64, 1995.
- [35] VAGLENOVA, J., PETKOV, V.V., "Fetal alcohol effects in rats exposed pre-and postnatally to a low of ethanol", **Alcohol Clin. Exp. Res.**, v .22, pp. 697-703, 1998.
- [36] OYAMA, L.M., COUTO, R.C., COUTO, G.E.C., et al., "Ethanol intake during lactation-effects on dams' metabolism and pups' body weight gain", **Alcohol**, v. 21, pp.195-200, 2000.

- [37] BAURR, K., BRENNAN, S., BURROW, B., et al., “Laboratory and synchrotron radiation total-reflection X-ray fluorescence: new perspectives in detection limits and data analysis”, **Spectrochimica Acta Part B**, v.56, pp. 2049-2056, 2001.
- [38] MORRIS, R.G., “Spatial localization does not require the presence of local cues”, **Learn. Motiv.**,v.12, pp.239-260, 1981.
- [39] WHO - The World Health Report 2002 - Quantifying selected major risks to health, 2002, disponível on line: <http://www.who.int/whr/2002/en>, pesquisa realizada em 08/09/2005.
- [40] HIROEH, U., APPLEB, Y.L., MORTENSEN, P.B., et al., “Death by homicide, suicide, and other unnatural causes in people with mental illness: a population-based study”, **Lancet.** , v. 358, pp. 2110-2112, 2001.
- [41] WHITE, H.R., CHEN, P.H., “Problem drinking and intimate partner violence”, **J. Stud.Alcohol**, v. 63, pp. 205-214, 2002.
- [42] VIZCARRA, M.B., CORTES, J., BUSTOS, L., et al., “Conjugal violence in the city Temuco. Prevalence studies and associated factors”, **Rev. Med. Chile**, v. 129, pp. 1405-1412, 2001.
- [43] Estatística do álcool no Brasil, disponível on line: <http://www.opas.org.br>, pesquisa realizada em 05/06/2004.
- [44] CEBRID, SENAD, **Iº Levantamento Domiciliar sobre uso de Drogas Psicotrópicas no Brasil: estudo envolvendo as 107 maiores cidades do país**, 2001.
- [45] BELL R.L., RODD-HENRICKS, Z.A., KUC,K.A., et al., “Effects of concurrent access to a single concentration or multiple concentrations of ethanol on the intake of ethanol by male and female periadolescent alcohol-preferring(P) rats”, **Alcohol**, v.29, pp. 137-148, 2003.

- [46] DAWES, M.A., JOHNSON B.A., “Pharmacotherapeutic trials in adolescent alcohol use disorders: opportunities and challenges”, **Alcohol e alcoholism**, v.39, n°3, pp. 166-177, 2004.
- [47] REZVANI, A.H., OVERSTREET, D.H., PERFUMI, M., et al., “Plant derivatives in the treatment of alcohol dependency”, **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**, v.75, pp. 593-606, 2003.
- [48] KHAOLE, N.C.O., RAMCHANDANI, V.A., VILJOEN, D.L., et al., “A pilot study of alcohol exposure and pharmacokinetics in women with or without children with fetal alcohol syndrome”, **Alcohol e alcoholism**, v.39, n°6, pp. 503-508, 2004.
- [49] FARMACOLOGIA, 3° edição, Ed. Guanabara Koogan, 1997, p.520
- [50] LAMACHE, M.A., “Reflections sur la descendance des alcooliques”, **Bul. Acad. Nat. Medicine**, v.151, pp. 517-521, 1967.
- [51] LEMOINE, P., HAROSSEAU, H., BORTEYRU, J.P., et al., “Les enfants de parents alcooliques. Anomalies observees. A propos de 127 cas”, **Quest Medical**, v.21 pp. 476-482, 1968.
- [52] KLINTSOVA, A.Y., COWELL, R.M., SWAIN, R.A., et al., “Therapeutic effects of complex motor training on motor performance deficits induced by neonatal binge-like alcohol exposure in rats I. Behavioral results”, **Brain Research**, v. 800, pp. 48-61, 1998.
- [53] LENT, R., “Cem bilhões de Neurônios”, In: **Primeiros Conceitos da Neurociência**, 1° edição, capítulo 1, Rio de Janeiro, Editora Atheneu, 2001.
- [54] TOGA, A.W., THOMPSON, P.M., SOWELL, E.R., “Mapping brain maturation”, **Trends in Neuroscience**, v.29, n°3, 2006.



- [55] LIVY, D.J., MILLER, E.K., MAIER, S.E., et al., “Fetal alcohol exposure and temporal vulnerability: effects of binge-like alcohol exposure on the developing rat hippocampus”, **Neurotoxicology and Teratology**, v. 25, pp.447-458, 2003.
- [56] NAGAHARA, A.H., HANDA, R.J., “Fetal Alcohol-exposed rats exhibit differential response to cholinergic drugs on a delay-dependent memory task”, **Neurobiology of Learning and Memory**, v. 72, pp. 230-243, 1999.
- [57] MILLER, R., KING, M.A., HEATON, M.B., et al., “The effects of chronic ethanol consumption on neurotrophins and their receptors in the rat hippocampus and basal forebrain”, **Brain Research**, v.950, pp. 137-147, 2002.
- [58] SPEAR-SMITH, J., BRIEN, J.F., GRAFE, M., et al., “Chronic ethanol exposure during late gestation produces behavioral anomalies in neonatal lambs”, **Neurotoxicology and Teratology**, v. 22, pp. 205-212, 2000.
- [59] MAIER, S.E., MILLER, J.A., WEST, J.R., “Prenatal binge-like alcohol exposure in the rat results in region-specific deficits in brain growth”, **Neurotoxicology and Teratology**, v. 21, n°3, pp. 285- 291, 1999.
- [60] AICARDI, J., “The etiology of developmental delay”, **Seminars in Pediatric Neurology**, v.5, n° 1, pp. 15-20, 1998.
- [61] FLOYD, R.L., DECOUFLÉ, P., HUNGERFORD, D.W., “Alcohol use prior to pregnancy recognition”, **Am.J. Prev.Med.**, v.17, n°2, pp. 101-107, 1999.
- [62] IQBAL, U., RIKHY, S., DRINGENBERG, H.C., et al., “Spatial learning deficits induced by chronic prenatal ethanol exposure can be overcome by non-spatial pre-training”, **Neurotoxicology and Teratology**, v. 28, pp. 333-341, 2006.
- [63] JONES, K.L., SMITH, D.W., “Recognition of the fetal alcohol syndrome in early infancy”, **Lancet**, pp. 999-1001, 1973.

- [64] TATOLLI, M., CAGIANO, R., GAETANI, S., et al., “Neurofunctional effects of developmental alcohol exposure in alcohol-preferring and alcohol-nonpreferring rats”, **Neuropsychopharmacology**, v.24, pp. 691-705, 2001.
- [65] MARINO , M.D., AKSENOV, M.Y., KELLY, S.J., “Vitamin E protects against alcohol-induced cell loss and oxidative stress in the neonatal rat hippocampus”, **International Journal of Developmental Neuroscience**, v. 22, pp. 363-377, 2004.
- [66] PIETRZAK, B., BOGUCKA, E.K., “ Influence of miaserin on some central effects of ethanol”, **Pharmacological Research**, v.46, pp., 2002.
- [67] HEATON, M.B., PAIVA, M., MADORSKY, I., et al., “Ethanol effects on neonatal rat cortex? Comparative analyses of neurotrophic factors, apoptosis-related proteins, and oxidative processes during vulnerable and resistant periods”, **Developmental Brain Research**, v. 145, pp. 249-262, 2003.
- [68] CARVAN, M.J., LOUCKS, E., WEBER, D.N., et al., “ Ethanol effects on the developing zebrafish: neurobehavior and skeletal morphogenesis”, **Neurotoxicology and Technology**, v. 26, pp. 757-768, 2004.
- [69] REYHANEH, A., REZA, A., MARJANEH, A., “ The effects of ethanol on glial cell proliferation: Mechanisms involved in central nervous system dysfunctions induced by prenatal ethanol exposure”. **Neurotoxicology and Technology**, v. 27, pp. 593-597, 2005.
- [70] ZAFAR, H., SHELAT, S.G., REDEI, E., et al., “ Fetal alcohol exposure alters serotonin transporter sites in rat brain”, **Brain Research**, v.856, pp. 184-192, 2000.
- [71] TAYLOR A.N., TIO, D.L., YIRMIYA,R., “ Fetal alcohol exposure attenuates interleukin-1 $\beta$ - induced fever: neuroimmune mechanisms”, **Journal of Neuroimmunology**, v. 99, pp. 44-52, 1999.

- [72] OYAMA, L.M., COUTO, R.C., DAMASO, A.R., et al., “Ethanol intake during lactation II. Effects on pups` liver and brain metabolism”, **Alcohol**, v. 21, pp. 201-206, 2000.
- [73] ROSIN A., KITCHEN, I., GEORGIEVA, J., “ Effects of single and dual administration of cocaine and ethanol on opioid and ORL1 receptor expression in rats CNS: An autoradiographic study”, **Brain Research**, v. 978, pp.1-13, 2003.
- [74] FAKOYA, F.A., “ Persistent neocortical astrogliosis in adult wistar rats following prenatal ethanol exposure”, **Brain & Development**, v. 27, pp. 259-265, 2005.
- [75] SCHUCKIT, M.A., SMITH, T.L., “Changes over time in the self-reported level of response to alcohol”, **Alcohol e alcoholism**, v.39, n°5, pp. 433-438, 2004.
- [76] LARSSON, A., EDSTRON, L., SVENSSON, L. et al., “Voluntary ethanol intake increases extracellular acetylcholine levels in the ventral tegmental area in the rat”, **Alcohol e alcoholism**, v.40, n°5, pp. 349-358, 2005.
- [77] DOSS, M.O., KUHNEL, A., GROSS, U., “Alcohol and porphyrin metabolism”, **Alcohol e alcoholism**, v.35, n°2, pp. 109-125, 2000.
- [78] WORST, T.J., VRANA, K.E., “Alcohol and gene expression in the central nervous system”, **Alcohol e alcoholism**, v.40, n°1, pp. 63-75, 2005.
- [79] PIANO, M.R., ARTWOHL, J., KIM, S.D., et al., “ The effects of a liquid ethanol diet on nutritional status and fluid balance in the rat”, **Alcohol e alcoholism**, v.36, n°4, pp. 298-303, 2001.
- [80] HEDLUND, L., WAHLSTROM G., “Forced ethanol treatment simulates and inhibits ethanol intake in a rat model of alcoholism”, **Alcohol e alcoholism**, v.35, n°5, pp. 446-451, 2000.

- [81] STROMLAND, K., PINAZO-DURAN, M.D., “Ophthalmic involvement in the fetal alcohol syndrome: clinical and animal model studies”, **Alcohol & alcoholism**, v. 37, n. 01, pp. 2-8, 2002.
- [82] MAY, P.A., BROOKE, L., GOSSAGE, J.P., et al., “Epidemiology of fetal alcohol syndrome in a South African community in the Western Cape province”, **American Journal of Public Health**, v.90, pp. 1905-1912, 1983.
- [83] LUGO JR, J.N., MARINO, M.D., CRONISE, K., et al., “Effects of alcohol exposure during development on social behavior in rats”, **Physiology & Behavior**, v.78, pp. 185-194, 2003.
- [84] CHARNESS, M.E., SIMOM, R.P., GREENBERG, D.A., “Ethanol and the nervous system”, **N. Engl. J. Med.**, v. 321, pp. 442-54, 1989.
- [85] KOOB, G.F., LE MOAL, M., “Drug abuse: hedonic homeostatic dysregulation” **Science**, v. 278, pp. 52-58, 1995.
- [86] TSAI, G., GASTFRIEND, D. R., COYLE, J. T., “The glutamatergic basis of human alcoholism”, **American Journal of Psychiatry**, v.152, pp. 332-340, 1995.
- [87] OLNEY, J.W., “Ethanol-induced apoptotic neurodegeneration in the developing C57BL/6 mouse brain”, **Developmental Brain Research**, v. 133, pp. 115-126, 2002.
- [88] KING, A.C., HOULE, T., WIT, H., et al. “A. Biphasic alcohol response differs in heavy versus light Drinkers”, **Alcoholism Clinical & Experimental Research**, v. 26, pp. 827-835, 2002.
- [89] ROSSETTI, Z.L., “Bidirectional modulation of spatial working memory by ethanol”, **Alcoholism Clinical & Experimental Research**, v. 26, pp. 181-185, 2002.

- [90] PFERFFERBAUM, A., SULULLIVAN, E. V., “Microstructural but not Macrostructural Disruption of White Matter in Women With Chronic Alcoholism”, **Neuroimage**, v. 15, pp. 708-718, 2002.
- [91] HARPER, C.G., KRIL, J.J., HOLLOWAY, R.L., “Brain shrinkage in chronic alcoholics: a pathological study”, **Br Med J (Clin Res Ed)**, v. 290, pp. 501-504, 1985.
- [92] MOSELHY, H. F., GEORGIU, G., KAHN, A., “Frontal Lobe changes in alcoholism: a review of the literature”, **Alcohol and Alcoholism**, v. 36, pp. 357-368, 2001.
- [93] DURSUN, I., JAKUBOWSKA-DOGRU, E., UZBAY, T., “Effects of prenatal exposure to alcohol on activity, anxiety, motor coordination, and memory in young adult Wistar rats”, **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**, v. 85, pp. 345-355, 2006.
- [94] KRAHL, S.E., BERMAN, R.F., HANNINGAN, J.H., “Electrophysiology of hippocampal CA1 neurons after prenatal ethanol exposure”, **Alcohol**, v. 17, n°2, pp. 125-131, 1999.
- [95] O’LEARY-MOORE, S.K., MCMECHAN, A.P., MATHISON, S.N., et al., “Reversal learning after prenatal or early postnatal alcohol exposure in juvenile and adult rats”, **Alcohol**, v. 38, pp. 99-110, 2006.
- [96] KURUOGLU, A. C., ARIKAN, Z., VURAL, G., et al., “Single photon emission computerised tomography in chronic alcoholism. Antisocial personality disorder may be associated with decreased frontal perfusion”, **British Journal of Psychiatry**, v. 169, pp.348- 354, 1996.
- [97] GEORGE, M., ANTON, R.F., BLOMER,C., et al., “Activation of prefrontal cortex and anterior thalamus in alcoholic subjects on exposure to alcohol-specific cues”, **Arch Gen Psychiatry**, v. 58, pp.345-352, 2001.
- [98] BEATTY, W.W., et al., “Neuropsychological performance of recently abstinent alcoholics and cocaine abuser”, **Drug and Alcohol Dependence**, v. 37, pp.

247-253, 1995. William W. Beatty, Vickie M. Katzung, Valerie J. Moreland and Sara J. Nixon

- [99] ILAN, A. B., GEVINS, “Prolonged neurophysiological effects of cumulative wine drinking”, **Alcohol**, v. 25, pp. 137- 152, 2001. Aaron B. Ilan and Alan Gevins
- [100] RINN, W., DESAI, N., ROSENBLATT, H., et al., “Addiction denial and cognitive dysfunction: A preliminary investigation”, **Journal Neuropsychiatry Clin. Neuroscience**, v. 14, nº1, 2002.
- [101] DEMIR, B., “Regional cerebral blood flow and neuropsychological functioning in early and late onset alcoholism”, **Psychiatry Research**, v. 115, pp.115-25, 2002.
- [102] JI, J., PORJESZ, B., BEGLEITER, H., “Event-related potential index of semantic mnemonic dysfunction in abstinent alcoholics”, **Bio Psychiatry**, v. 15, pp. 494-507, 1999.
- [103] GRAU, C., POLO, M.D., YAGO, E., et al., “Auditory sensory memory as indicated by mismatch negativity in chronic alcoholism”, **Clinical Neurophysiology**, v. 112, pp. 728-731, 2001.
- [104] KOKAVEC, A., CROWE ,S.F., “A comparison of cognitive performance in binge versus regular chronic alcohol misusers”, **Alcohol Alcohol**, v. 34, pp. 601-608, 1999.
- [105] ZUBARAN, C., FERNANDES, J., MARTINS, F., et al., “Clinical and neuropathological aspects of Wernicke-Korsakoff syndrome”, **Revista de Saúde Pública**, v. 30, pp. 602-608, 1996.
- [106] SCHANDLER, S.L, COHEN, M.J, ANTICK, JR., “Activation, attention, and visuospatial learning in adults with and without a family history of alcoholism”, **Alcohol Clin. Exp. Res**, v.16, pp. 566-571, 1992.
- [107] GILTOW, S.E., PEYSER, H. S., “**Alcoolismo: um guia prático de tratamento**”, Porto Alegre, Editora Artes médicas, pp.311, 1991.

- [108] WEGNER, A.J., GUNTHNER, A., FAHLE, M., “Visual performance and recovery in recently detoxified alcoholics”, **Alcohol**, v. 36, pp. 171-179, 2001.
- [109] ZHENG, W., ASCHNER, M., GHERSI-EGEA, J.F., “Brain barrier systems: a new frontier in metal neurotoxicological research”, **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 192, pp. 1-11, 2003.
- [110] COLVIN, R.A., DAVIS, N., NIPPER, R.W., et al., “Evidence for a zinc/proton antiporter in rat brain”, **Neurochemistry International**, v. 36, pp. 539-547, 2000.
- [111] MOCCHIGIANI, E., BERTONI-FREDDARI, C., MARCELLINI, F., et al., “Brain, aging and neurodegeneration: Role of zinc ion availability”, **Progress in Neurobiology**, v. 75, pp. 367-390, 2005.
- [112] LEVENSON, C.W., “Trace metal regulation of neuronal apoptosis: From genes to behavior”, **Physiology & Behavior**, v. 86, pp. 399-406, 2005.
- [113] ERIKSON, K.M., SYVERSEN, T., ASCHNER, J.L., et al., “Interactions between excessive manganese exposures and dietary iron-deficiency in neurodegeneration”, **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 19, pp. 415-421, 2005.
- [114] TAKEDA, A., “Manganese action in brain function”, **Brain Research Reviews**, v. 41, pp. 79-87, 2003.
- [115] ZATTA, P., LUCCHINI, R., VAN RENSBURG, S.J., et al., “The role of metals in neurodegenerative processes: aluminum, manganese and zinc”, **Brain Research Bulletin**, v. 62, pp. 15-28, 2003.
- [116] BAYDAR, T., NAGYMAJTENYI, L., ISIMER, A., et al., “Effect of folic acid supplementation on aluminum accumulation in rats”, **Nutrition**, v. 21, pp. 406-410, 2005.
- [117] CRICHTON, R.R., FLORENCE, A., WARD, R.J., “Aluminum and iron in the brain – prospects for chelation”, **Coordination Chemistry Reviews**, v. 228, pp. 365-371, 2002.

- [118] Al-SALEH, I., “The biochemical and clinical consequences of lead poisoning”, **Medicinal Research Reviews**, v. 14, pp. 415-486, 1994.
- [119] GOYER, R.A., “Lead toxicity: From overt to subclinical to subtle health effects”, **Environment Health Perspectives**, v.86, pp. 177-181, 1990.
- [120] GOLDSTEIN, G. W., “Brain capillaries: a target for inorganic lead poisoning”, **Neurotoxicology**, v. 5, pp. 167-176, 1994.
- [121] WIDMER, H. R., BUTIKOFER, E.E., SCLUMPF, M., et al., “Pre- and postnatal lead exposure affects the serotonergic system in the immature rat brain”, **Experientia**, v. 47, p. 463-466, 1991.
- [122] RAO, R., TKAC, I., TOWNSEND, E.L., et al., “Perinatal iron deficiency alters the neurochemical profile of the developing rat hippocampus”, **Nutritional Neurosciences**, v., pp. 3215-3221, 2003.
- [123] ERIKSON, K.M., SYVERSEN, T., ASCHNER, J.L., et al., “Globus pallidus: a target brain region for divalent metal accumulation associated with dietary iron deficiency”, **Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 15, pp. 355-341, 2004.
- [124] TURGUT, G., AKDOGAN, I., ADIGUZEL, E., et al., “Effect of copper overload together with ethanol uptake on hippocampal neurons”, **Tohoku J. Exp. Med.**, v. 199, pp. 239-245, 2003.
- [125] SCHAFE, G. E., NADER, K., BLAIR, J., et al., “Memory consolidation of Pavlovian fear conditioning: a cellular and molecular perspective”, **TRENDS Neurosci.**, v. 24, n. 9, pp. 540-546, 2001.
- [126] TEYLER, T. J., DISCENNA, P., “The role of hippocampus in memory: a hypothesis”, **Neurosci. Biobehav. Rev.**, v. 9, n. 3, pp.377-389, 1985.
- [127] SPERANDEO, M.L.A., “**Evocação da memória aversiva : Participação do receptor NMDA e análise da ativação de ZENK no hipocampo de pombos**”, Dissertação de Mestrado, Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia, Campinas, SP, 2005.



- [128] O'REILLY, R. C., RUDY, W., "Conjunctive representation in learning and memory principles of cortical and hippocampal function", **Psychochol. Rev.**, v. 108, pp. 311-345, 2001.
- [129] FANSELOW, M. S., "Contextual fear, gestalt memories, and the hippocampus", **Behav. Brain. Res.**, v. 110, pp. 73-81, 2000.
- [130] MORRIS, R.G.M., GARRUD P., RAWLINS, J.N.P, et al., "Place navigation impaired in rats with hippocampal lesions", **Nature**, v. 297, pp.681-683, 1982.
- [131] EICHENBAUN, H., STEWART, C., MORRIS, R.G.M., "Hippocampal representation in place learning", **The Journal of Neuroscience**, v. 10, n° 11, pp. 3531-3542, 1990.
- [132] CUNHA, C.; WIETZIKOSKI, S., WIETZIKOSKI, E. C., et al., "Evidence for the substantia nigra pars compacta as an essential component of a memory system independent of the hippocampal memory system", **Neurobiology of Learning and Memory**, v.79, pp. 236-242, 2003.
- [133] SANTUCCI, A.C, MERCADO, M., BETTICA, A .,et al., "Residual behavioral and neuroanatomical effects of short-term chronic ethanol consumption in rats", **Cognitive Brain Research**, v.20, pp. 449-461, 2004.
- [134] BOULOUARD, M., LELONG,V., DAOUST, M., et al.,"Chronic ethanol consumption induces tolerance to the spatial memory impairing effects of acute ethanol administration in rats", **Behavioural Brain Research**, v.136, pp. 239-246, 2002.
- [135] ZIMMERBERG, B., WESTON, H.E., "Postnatal stress of early weaning exacerbates behavioral outcome in prenatal alcohol-exposed juvenile rats", **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**, v.73, pp. 45-52, 2002.
- [136] LÊ, A.D., SHAHAM, Y., "Neurobiology of relapse to alcohol in rats", **Pharmacology e Therapeutics**, v.94, pp. 137-156, 2002.

- [137] KATSANOS, A. A. - X-Ray Methods. **In: IAEA, ed. - Elemental Analysis of Biological Materials.** Viena, IAEA, Technical Reports series no. 197, 1980 p. 231.
- [138] PEPPONI, G., STRELI, C., WOBRAUSCHEK, P., ZAMINI, S., et al., “Comparison of synchrotron radiation total reflection X-ray fluorescence excitation-detection geometries for samples with differing matrices”, **Spectrochimica Acta Part B**, v.58, pp. 2139-2144, 2003.
- [139] SIMABUCO, S. M., NASCIMENTO FILHO, V. F., “Quantitative analysis energy dispersive X-ray fluorescence by transmission method applied geological samples”, **Scientia Agricola**, v. 51(2), pp.197-206, 1994.
- [140] YONEDA, Y., HORIUCHI, T., “Optical flats for use in X-ray spectrochemical microanalysis”, **Reviews Scientific Instruments**, v. 42, pp. 1069-1070, 1971.
- [141] WOBRAUSCHEK, P., AIGINGER, H., “Analytical application of total reflection and polarized X-ray”, **Fresenius Journal of Analytical Chemistry**, v. 324, pp. 865-874, 1986.
- [142] SCHWENKE, H., KNOTH, J., “A highly sensitive energy dispersive X-ray spectrometer with multiple total reflection of the exciting beam”, **Nucl. Instr. Meth.**, v. 193, pp. 239, 1982.
- [143] BOUMANS, P., KLOCKENKÄMPER, R., “Total reflection X-ray fluorescence spectrometry”, Proc. of the Second Workshop on TXRF, Dortmund, 26-27 May, 1988. **Spectrochim. Acta B**, v.44, pp. 433-435, 1989.
- [144] BOUMANS, P., “Total reflection X-ray fluorescence spectrometry”, Proc. of the Third Workshop on TXRF, Vienna, 15-17 May, 1990. **Spectrochim. Acta B**, v.46, pp.1313, 1991.

- [145] BOUMANS, P., PRANGE, A., “Total reflection X-ray fluorescence spectrometry” Proc. of the Fourth Workshop on TXRF, Geestacht, 12-15 May, 1992. **Spectrochim. Acta B**, v.48, pp.107, 1989.
- [146] MICHAELIS, W., “Trace analytical capabilities of total reflection”, **Adv. X-ray Anal.**, v. 28, pp. 75, 1985.
- [147] MICHAELIS, W., “Multielement analysis of environmental samples by total-reflection X-ray fluorescence spectrometry, neutron activation analysis and inductively coupled plasma optical emission spectroscopy”, **Fres. Z. Anal. Chem.**, v. 324, pp. 662-671, 1986.
- [148] KLOCKENKÄMPER, R., KNOTH, J., PRANGE, A., et al., “Total reflection X-ray fluorescence spectroscopy”, **Anal. Chem.**, v.64, pp.1115A-1123A, 1992.
- [149] ANJOS, M.J., LOPES, R.T., JESUS, E.F.O., et al.,” Trace elements determination in red and white wines using total-reflection X-ray fluorescence”, **Spectrochimica Acta Part B**, v. 58, pp. 2227-2232, 2003.
- [150] CARVALHO, M.L., MARQUES, A.F., LIMA, M.T., et al., “Trace elements distribution and post-mortem intake in human bones from Middle Age by total reflection X-ray fluorescence”, **Spectrochimica Acta Part B**, v. 59, pp. 1251-1257, 2004.
- [151] SERPA, R.F.B., “ **Medidas de metais pesados no fumo, cinza e fumaça de cigarros nacionais usando a TXRF**”, dissertação de Mestrado, COPPE-UFRJ, RJ, 2003.
- [152] BOHLEN, A., ELLER, R., KLOCKENKÄMPER, R., et al., “Microanalysis of solid samples by total-reflection X-ray fluorescence spectrometry”, **Anal. Chem.**, v. 59, pp. 2551-2555, 1987.

- [153] BOHLEN, A., KLOCKENKÄMPER, R., OTTO, H., et al., “Qualitative survey analysis of thin layers of tissue samples: heavy metals traces in human lung tissue”, **Int. Arch. Occup. Environ. Health**, v.59, pp. 403-411, 1987.
- [154] BOHLEN, A., KLOCKENKÄMPER, R., TÖLG, G., et al, “Microtome sections of biomaterials for trace analysis by TXRF”, **Fres. Z. Anal. Chem.**, v. 331, pp. 454-458, 1988.
- [155] CHWIEJ, J., SZCZERBOWSKA-BORUCHOWSKA, M., WOJCIK, S., et al., “Implementation of X-ray fluorescence microscopy for investigation of elemental abnormalities in central nervous system tissue”, **Journal of Alloys and Compounds**, v. 401, pp. 184-188, 2005.
- [156] SERPA, R.F.B., JESUS, E.F.O., ANJOS, M.J., et al, “Elemental concentration analysis in brain structures from young, adult and old Wistar rats by total reflection X-ray fluorescence with synchrotron radiation”, **Spectrochimica Acta Part B**, v. 61, pp. 1205-1209, 2006.
- [157] MAGALHÃES, T., VON BOHLEN, A., CARVALHO, M.L., et al., “Trace elements in human cancerous and healthy tissues from the same individual: A comparative study by TXRF and EDXRF”, **Spectrochimica Acta Part B**, v. 61, pp. 1185-1193, 2006.
- [158] LIU, N.Q., ZHANG, F., ZHANG, Z.Y., et al., “Element distribution in the brain sections of rats measured by synchrotron radiation X-ray fluorescence”, **Spectrochimica Acta Part B**, v. 59, pp. 255-260, 2004.
- [159] SERPA, R.F.B., JESUS, E.F.O., ANJOS, M.J., et al, “Cognitive impairment related changes in the elemental concentration in the brain of old rat”, **Spectrochimica Acta Part B**, v. 61, pp. 1219-1223, 2006.
- [160] CZARNOWSKI, D.V., DENKHAUS, E., LEMKE, K., “Determination of trace elements in cancerous and normal human tissues by total reflection X-ray

fluorescence analysis”, **Spectrochimica Acta Part B**, v.52, pp. 1047-1052, 1997.

[161] EKTESSABI, A.I., KAWAKAMI, T., ISHIHARA, R., et al., “ Investigation on metal elements in the brain tissues from DNTC patients”, **Journal of Electron Spectroscopy and Related Phenomena**, v. 137, n°140, pp. 801-804, 2004.

[162] MARCO, L.M., GREAVES, E.D., ALVARADO, J., “Analysis of human blood serum and human brain samples by total reflection X-ray fluorescence spectrometry applying Compton peak standardization”, **Spectrochimica Acta Part B**, v. 54, pp. 1469-1480, 1999.

[163] BEAR, M.F., CONNORS, B.W., PARADISO, M.A., “**Neurociências – Desvendando o sistema nervoso**”, 2ª edição, Cap. 2,7,6 e 23, Porto Alegre, Editora Artmed, 2002.

[164] PINTO, L.C., “ **Neurofisiologia Clínica – Princípios Básicos e aplicações**”, , seção I, São Paulo, Editora Atheneu, 2006.

[165] VALE, M., “**Os riscos do alcoolismo e a medida do teor alcoólico no sangue - Seara da Ciência**”, disponível on line: <http://www.searadaciencia.ufc.br/especiais/biologia> , pesquisa realizada em 08/09/2006.

[166] DUUS, P., “**Diagnóstico Topográfico em Neurologia**”, 3ª edição, cap.3, 4, 5 e 8, Rio de Janeiro, RJ, Editora Cultura Médica, 1985.

[167] MACHADO, A., “**Neuroanatomia Funcional**”, 2ª edição, Cap. 3, São Paulo, Editora Atheneu, 1993.

[168] MCCRONE, J., “**Como funciona o cérebro: Uma análise da mente e da consciência - Série mais Ciência**”, 1ª edição, São Paulo, SP, Editora Publifolha, 2002.

- [169] AMABIS, J.M., MARTHO, G.R., “**Conceitos de Biologia**”, 2<sup>a</sup> edição, São Paulo, Editora Moderna, 2001.
- [170] HARPER, H., RODWELL, V.W., MAYES, P.A., “**Manual de Química Fisiológica**”, 5<sup>a</sup> edição, Cap. 3, São Paulo, Editora Atheneu, 1982.
- [171] ZANINI, A.C., OGA, S., “**Farmacologia Aplicada**”, 5<sup>a</sup> edição, Cap. 5, São Paulo, Editora Atheneu, 1994.
- [172] ALEXANDRE, J., “**Os efeitos deletérios do álcool: uma abordagem neuroanatomofuncional**, disponível on line: <http://www.edumed.org.br/cursos/neurosciencia/01/monografias/álcool-alexandre.doc> , pesquisa realizada em 06/03/2007.
- [173] KING, M.W., “**Neurotransmissores: Diversidade e funções**”, disponível on line: [http://www.cerebromente.org.br/n12/fundamentos/neurotransmissores/nerves\\_p.html](http://www.cerebromente.org.br/n12/fundamentos/neurotransmissores/nerves_p.html), pesquisa realizada em 06/03/2007.
- [174] “**TXRF – principles**” disponível on line: [http://www.bruker-axs.de/uploads/tx\\_linkselectorforpdfpool/LR\\_TXRF\\_Principles.pdf](http://www.bruker-axs.de/uploads/tx_linkselectorforpdfpool/LR_TXRF_Principles.pdf) , pesquisa realizada em 04/04/2007.
- [175] LADISICH, W., RIEDER, R., WOBRAUSCHEK, P., “Total reflection X ray fluorescence analysis with monoenergetic excitation and full spectrum excitation using rotating anode X-ray tubes”, **Nuclear Instruments and Methods in Physics Research A**, v. 330, pp. 501-506, 1993.

- [176] TAROHDA, T., YAMAMOTO, M., AMANO, R., “ Regional distribution of manganese, iron, copper and zinc in the rat brain during development”, **Anal. Bioanal. Chem.**, v.380, pp. 240-246, 2004.
- [177] RAJAN, M.T., RAO, K.S.J., MAMATHA, B.M., et al., “Quantification of trace elements in normal brain by inductively coupled plasma atomic emission spectrometry”, **Journal of the Neurological Sciences**, v. 146, pp. 153-166, 1997.
- [178] SERGEANT, C., VESVRES, M.H., DEVES, G., et al, “ Calcium, potassium, iron, copper and zinc concentrations in the white and gray matter of the cerebellum and corpus callosum in brain of four genetic mouse strains”, **Nuclear Instruments and Methods in Physics Research B**, v. 231, pp. 234-238, 2005.
- [179] LUKOYANOV, N.V., MADEIRA, M.D.,BARBOSA, M.P., “Behavioral and neuroanatomical consequences of chronic ethanol intake and withdrawal”, **Physiology & Behavior**, v.66, n°2, pp. 337-346, 1999.
- [180] MANDEL, R.J., GAGE, F.H., THAL, L.J., “Enhanced detection of nucleus basalis magnocellularis lesion-induced spatial learning deficit in rats by modification of training regimen”, **Behav. Brain Res.**, v. 31, pp.221-229, 1989.
- [181] NETTO, C.A., HODGES, H., SINDEN, J.D., et al.”Effects of fetal hippocampal field grafts on ischaemic- induce deficits in spatial navigation in the water maze, **Neuroscience**, v. 54, pp. 69-92, 1993.
- [182] SANTIN, L.J., RUBIO, S., BEGEGA, A., et al., “Effects of chronic alcohol consumption on spatial reference and working memory tasks”, **Alcohol**, v. 20, pp. 149-159, 2000.

- [183] HOMEWOOD, J., BOND, N.W., MCGREGOR, J.C., "The effects of chronic alcohol consumption or thiamin deficiency on radial-arm maze performance in the rat", *Alcohol*, v.8, pp. 265-272, 1991.
- [184] STEIGARWALD, E.S., MILLER, M.W., "Performance by adult rats in sensory mediated radial arm maze tasks in not impaired and may be transiently enhanced by chronic exposure to ethanol", *Alcohol Clin. Exp. Res.*, v.21, pp. 1553-1559, 1997.
- [185] PEREIRA, S.R.C., MENEZES, G.A., FRANCO, G.C., et al., 'Chronic ethanol consumption impairs spatial remote memory in rats but does not affect cortical cholinergic parameters', *Pharmacol. Biochem.Behav.*, v. 60(2), pp. 305-311.



**Apêndice A.** Concentração elementar ( $\mu\text{g.g}^{-1}$ ) em regiões cerebrais de ratos Wistar machos do grupo controle e do grupo álcool, utilizando TXRF.

<i>Elementos</i>	<i>Colículo Superior</i>				<i>Córtex Temporal</i>			
	20 dias Grupo controle	20 dias Grupo álcool	90 dias Grupo controle	90 dias Grupo álcool	20 dias Grupo controle	20 dias Grupo álcool	90 dias Grupo controle	90 dias Grupo álcool
P	RNA	1375 ± 310	4727 ± 687	6616 ± 590	923 ± 235	2140 ± 338	3533 ± 733	3931 ± 476
S	RNA	1579 ± 286	3658 ± 518	4010 ± 623	1067 ± 253	1791 ± 433	2920 ± 627	2138 ± 578
Cl	RNA	814 ± 1	786 ± 94	908 ± 90	321 ± 72	529 ± 22	775 ± 80	541 ± 36
K	RNA	5448 ± 386	6614 ± 405	8075 ± 439	2827 ± 365	6209 ± 730	7757 ± 428	5206 ± 655
Ca	RNA	320 ± 11	1303 ± 228	1439 ± 323	438 ± 7	126 ± 7	349 ± 50	574 ± 53
Ti	RNA	5 ± 1	6,5 ± 0,3	6,4 ± 0,4	<LMD	1,4 ± 0,2	5,5 ± 0,3	2,8 ± 0,6
Cr	RNA	<LMD	<LMD	3,1 ± 0,2	<LMD	<LMD	2,4 ± 0,4	16 ± 1
Mn	RNA	1,8 ± 0,2	<LMD	1,2 ± 0,4	<LMD	0,7 ± 0,1	1,0 ± 0,4	1,4 ± 0,2
Fe	RNA	25 ± 6	52 ± 6	83 ± 7	66 ± 5	30 ± 1	35 ± 6	79 ± 2
Co	RNA	0,28 ± 0,03	0,4 ± 0,1	1,7 ± 0,2	<LMD	0,19 ± 0,04	<LMD	0,3 ± 0,05
Ni	RNA	0,31 ± 0,05	0,4 ± 0,1	0,21 ± 0,01	<LMD	0,33 ± 0,03	0,31 ± 0,04	1,8 ± 0,1
Cu	RNA	3,3 ± 0,5	4,3 ± 0,5	4 ± 1	4 ± 1	2,7 ± 0,5	2,8 ± 0,5	2,8 ± 0,4
Zn	RNA	21 ± 3	20 ± 4	19 ± 4	31 ± 4	27 ± 3	22 ± 4	22 ± 5
Br	RNA	0,91 ± 0,01	1,0 ± 0,3	0,44 ± 0,02	3 ± 1	0,29 ± 0,04	0,39 ± 0,02	0,6 ± 0,2
Rb	RNA	3,4 ± 0,5	3,1 ± 0,5	3,2 ± 0,5	7 ± 2	3,3 ± 0,32	3,2 ± 0,5	4 ± 1
Sr	RNA	0,8 ± 0,2	<LMD	0,6 ± 0,1	<LMD	0,6 ± 0,1	0,6 ± 0,2	0,41 ± 0,03

Valores: média ± desvio padrão. Os índices iguais indicam diferença estatisticamente significativa entre os grupos controle e álcool em uma mesma região cerebral, para  $p \leq 0.05$ . RNA: Região não analisada; LMD: Limite Mínimo de Detecção.

**Apêndice A.** (Continuação). Concentração elementar ( $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ ) em regiões cerebrais de ratos Wistar machos do grupo controle e do grupo álcool, utilizando TXRF.

<i>Elementos</i>	<i>Córtex Frontal</i>				<i>Córtex entorrinal</i>			
	20 dias Grupo controle	20 dias Grupo álcool	90 dias Grupo controle	90 dias Grupo álcool	20 dias Grupo controle	20 dias Grupo álcool	90 dias Grupo controle	90 dias Grupo álcool
P	RNA	2111 ± 389	4697 ± 803	4016 ± 434	978 ± 288	2480 ± 126	3439 ± 394	2217 ± 550
S	RNA	1541 ± 126	3795 ± 654	3014 ± 391	1122 ± 275	1388 ± 382	2685 ± 329	1818 ± 685
Cl	RNA	730 ± 14	1391 ± 277	676 ± 97	332 ± 84	1739 ± 47	2155 ± 314	578 ± 69
K	RNA	2337 ± 84	8444 ± 874	10436 ± 1984	2882 ± 685	8630 ± 16	6376 ± 274	4369 ± 694
Ca	RNA	331 ± 29	431 ± 61	423 ± 64	583 ± 122	1365 ± 63	443 ± 76	182 ± 37
Ti	RNA	1,1 ± 0,1	3,3 ± 0,6	3,8 ± 0,4	<LMD	31 ± 1	5 ± 1	1,9 ± 0,3
Cr	RNA	<LMD	23 ± 1	25 ± 3	<LMD	<LMD	<LMD	<LMD
Mn	RNA	0,68 ± 0,04	1,0 ± 0,4	<LMD	<LMD	0,5 ± 0,1	<LMD	0,43 ± 0,04
Fe	RNA	27 ± 4	41 ± 6	42 ± 5	53 ± 8	50 ± 1	45 ± 5	28 ± 5
Co	RNA	0,15 ± 0,02	0,6 ± 0,2	0,3 ± 0,06	<LMD	0,27 ± 0,04	0,27 ± 0,01	0,14 ± 0,03
Ni	RNA	0,14 ± 0,03	0,52 ± 0,02	0,17 ± 0,06	<LMD	0,15 ± 0,06	0,14 ± 0,04	0,057 ± 0,005
Cu	RNA	2,2 ± 0,4	3 ± 0,2	3,9 ± 0,5	4 ± 1	1,7 ± 0,5	2,4 ± 0,2	2,1 ± 0,2
Zn	RNA	19 ± 1	23 ± 4	23 ± 5	35 ± 2	49 ± 1	20 ± 5	22 ± 3
Br	RNA	1,1 ± 0,1	0,43 ± 0,04	0,25 ± 0,06	4 ± 1	2,4 ± 0,5	1,1 ± 0,3	0,22 ± 0,02
Rb	RNA	4,3 ± 0,2	3,4 ± 0,6	3,5 ± 0,9	7 ± 2	3,2 ± 0,4	2,4 ± 0,6	3,2 ± 0,5
Sr	RNA	0,63 ± 0,02	0,6 ± 0,1	<LMD	<LMD	<LMD	0,9 ± 0,2	0,23 ± 0,01

Valores: média ± desvio padrão. Os índices iguais indicam diferença estatisticamente significativa entre os grupos controle e álcool em uma mesma região cerebral, para  $p \leq 0.05$ . RNA: Região não analisada. LMD: Limite Mínimo de Detecção.

**Apêndice A.** (Continuação). Concentração elementar ( $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ ) em regiões cerebrais de ratos Wistar machos do grupo controle e do grupo álcool, utilizando TXRF.

<i>Elementos</i>	<i>Hipocampo</i>				<i>Cerebelo</i>			
	20 dias Grupo controle	20 dias Grupo álcool	90 dias Grupo controle	90 dias Grupo álcool	20 dias Grupo controle	20 dias Grupo álcool	90 dias Grupo controle	90 dias Grupo álcool
P	1043 ± 134	1714 ± 122	2889 ± 743	3083 ± 625	RNA	2187 ± 94	4176 ± 791	4240 ± 490
S	1036 ± 298	1289 ± 153	2133 ± 556	2730 ± 502	RNA	1087 ± 38	2303 ± 384	2334 ± 281
Cl	450 ± 90	465 ± 69	859 ± 73	510 ± 46	RNA	267 ± 24	399 ± 53	177 ± 13
K	3623 ± 726	2752 ± 291	4659 ± 143	8301 ± 514	RNA	2997 ± 373	7189 ± 579	7028 ± 742
Ca	767 ± 128	406 ± 5	212 ± 37	198 ± 57	RNA	115 ± 8	179 ± 38	132 ± 36
Ti	<LMD	<LMD	1,7 ± 0,2	<LMD	RNA	0,8 ± 0,2	<LMD	<LMD
Cr	<LMD	<LMD	<LMD	14 ± 1	RNA	1,13 ± 0,2	7 ± 1	14 ± 4
Mn	<LMD	0,8 ± 0,1	<LMD	<LMD	RNA	0,34 ± 0,04	0,84 ± 0,05	0,7 ± 0,1
Fe	49 ± 11	17 ± 1	26 ± 2	28 ± 4	RNA	19 ± 4	31 ± 4	48 ± 2
Co	<LMD	0,14 ± 0,03	<LMD	0,25 ± 0,03	RNA	0,089 ± 0,01	0,18 ± 0,05	0,24 ± 0,02
Ni	<LMD	0,16 ± 0,04	<LMD	0,11 ± 0,01	RNA	0,23 ± 0,02	1,4 ± 0,1	1,9 ± 0,2
Cu	5 ± 1	1,7 ± 0,1	2,5 ± 0,5	3,1 ± 0,4	RNA	2,6 ± 0,3	3,4 ± 0,5	3,8 ± 0,3
Zn	43 ± 11	15 ± 1	16 ± 3	25 ± 4	RNA	15 ± 1	18 ± 3	16 ± 2
Br	4 ± 1	2,3 ± 0,3	0,22 ± 0,04	0,36 ± 0,02	RNA	1,1 ± 0,1	0,28 ± 0,04	<LMD
Rb	8 ± 2	3,5 ± 0,2	3,3 ± 0,5	5 ± 1	RNA	4,2 ± 0,5	4,6 ± 0,5	4,5 ± 0,5
Sr	<LMD	<LMD	0,4 ± 0,1	0,5 ± 0,1	RNA	<LMD	0,22 ± 0,05	0,22 ± 0,04

Valores: média ± desvio padrão. Os índices iguais indicam diferença estatisticamente significativa entre os grupos controle e álcool em uma mesma região cerebral, para  $p \leq 0.05$ . RNA: Região não analisada. LMD: Limite Mínimo de Detecção.

