



ESTUDO DE ASSOCIAÇÃO DE MINERAIS E PATOLOGIAS
DERMATOLÓGICAS ATRAVÉS DA TÉCNICA DE
FLUORESCÊNCIA DE RAIOS X

Júlio César de Avellar Corsini e Reis Soares

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Engenharia Nuclear, COPPE, da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Doutor em Engenharia Nuclear.

Orientadores: Ricardo Tadeu Lopes

Marcelino José dos Anjos

Rio de Janeiro
Novembro de 2013

ESTUDO DE ASSOCIAÇÃO DE MINERAIS E PATOLOGIAS
DERMATOLÓGICAS ATRAVÉS DA TÉCNICA DE
FLUORESCÊNCIA DE RAIOS X

Júlio César de Avellar Corsini e Reis Soares

TESE SUBMETIDA AO CORPO DOCENTE DO INSTITUTO ALBERTO LUIZ
COIMBRA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA DE ENGENHARIA (COPPE) DA
UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO COMO PARTE DOS
REQUISITOS NECESSÁRIOS PARA A OBTENÇÃO DO GRAU DE DOUTOR EM
CIÊNCIAS EM ENGENHARIA NUCLEAR.

Examinada por:

Prof. Ricardo Tadeu Lopes, D.Sc.

Prof. Marcelino José dos Anjos, D.Sc.

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

Profa. Catarine Canellas Gondim Leitão, D.Sc.

Prof. Joaquim Teixeira de Assis, D.Sc.

Profa. Renata de Faria Barbosa, D.Sc.

RIO DE JANEIRO, RJ - BRASIL

NOVEMBRO DE 2013

Soares, Júlio César de Avellar Corsini e Reis

Estudo de associação de minerais e patologias dermatológicas através da técnica de fluorescência de raios X/
Júlio César de Avellar Corsini e Reis Soares – Rio de Janeiro: UFRJ/COPPE, 2013.

XIV, 106 p.: il.; 29,7 cm.

Orientadores: Ricardo Tadeu Lopes

Marcelino José dos Anjos.

Tese (doutorado) – UFRJ/ COPPE/ Programa de Engenharia Nuclear, 2013.

Referências Bibliográficas: p. 52-60.

1. Fluorescência de raios X. 2. Lesões de pele. 3. Ceratose seborrêica. 4. Pólipo fibroepitelial. 5. Hemangioma rubi. 6. Dermatose papulosa nigra. 7. Fluorescência com luz síncrotron. I. Lopes, Ricardo Tadeu *et al.*. II. Universidade Federal do Rio de Janeiro, COPPE, Programa de Engenharia Nuclear. III. Título.

Ao meu muito saudoso avô,
Humberto Corsini, que sempre me
forneceu apoio e amor incondicionais.

Aos meus pais, Araceli e Ribamar, a
quem devo a vida e muita dedicação.

À minha esposa Adriana, por seu
apoio na coleta das amostras usadas
na pesquisa.

Às minhas amadas filhas, motivos
pelos quais sempre valerá a pena
viver mais um dia.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Ricardo Tadeu Lopes minha gratidão pela oportunidade que me proporcionou para desenvolvimento deste trabalho de pesquisa no Laboratório de Instrumentação Nuclear (PEN/COPPE/UFRJ).

Ao Prof. Marcelino José dos Anjos (IF/UERJ), amigo querido de longa data, pela amizade, orientação e apoio dispensado em todas as etapas da tese.

À Dra. Catarine Canellas Gondim Leitão por sua valiosa colaboração no desenvolvimento da etapa experimental, quando generosamente compartilhou toda sua experiência.

Ao Prof. Edgar Francisco Oliveira de Jesus (PEN/COPPE/UFRJ - IF/UERJ), externo mais uma vez minha gratidão pela sua orientação na minha tese de mestrado.

Ao Dr. Carlos Pérez pelo seu apoio e ajuda técnica na linha de XRF do LNLS.

Ao Prof. Hilton Augusto Koch, pelo apoio e incentivos que sempre me proporcionou.

Aos meus amigos e companheiros de COTAR-X, em especial à Dalila já que trabalhamos junto por ininterruptos 24 anos.

A todos do LIN e do Programa de Engenharia Nuclear que de alguma forma contribuíram nesta minha trajetória.

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

ESTUDO DE ASSOCIAÇÃO DE MINERAIS E PATOLOGIAS
DERMATOLÓGICAS ATRAVÉS DA TÉCNICA DE
FLUORESCÊNCIA DE RAIOS X

Júlio César de Avellar Corsini e Reis Soares

Novembro/2013

Orientadores: Ricardo Tadeu Lopes
Marcelino José dos Anjos

Programa: Engenharia Nuclear

Usando a técnica de fluorescência de raios X por reflexão total com radiação síncrotron (SRTXRF) no Laboratório Nacional de Luz Síncrotron (LNLS), foram medidas as concentrações de elementos traço em quatro lesões de pele: ceratose seborrêica, pólipo fibroepitelial, hemangioma rubi e dermatose papulosa nigra. Através da análise de espectros de 64 pares de amostras, cada um tendo sido colhido do mesmo paciente, foi possível determinar e comparar as concentrações de P, S, K, Ca, Fe, Cu, Zn e Rb em pele sadia e lesões em relação a um padrão interno de Ga. A fluorescência de raios X foi induzida por um feixe branco com energias entre 4 e 20 keV e o ângulo de incidência ideal do feixe sobre as amostras foi ajustado em aproximadamente 1 mrad via incrementos de 10 μ rad. Os espectros foram processados pelo *software* AXIL do pacote de análise quantitativa da Agência Internacional de Energia Atômica (AIEA). Os resultados mostraram diferenças significativas nos níveis de P, Ca, K, Fe e Cu, bem como uma tendência comum em suas variações entre as amostras de lesões e controle das doenças de pele estudadas. Esse trabalho de pesquisa apresenta uma importante ferramenta que pode ser útil para pesquisas de doenças dermatológicas.

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

ASSOCIATION STUDY OF MINERALS AND DERMATOLOGICAL DISEASES
USING THE X-RAY FLUORESCENCE TECHNIQUE

Júlio César de Avellar Corsini e Reis Soares

November/2013

Advisors: Ricardo Tadeu Lopes

Marcelino José dos Anjos

Department: Nuclear Engineering

Using the synchrotron radiation total X-ray fluorescence (SRTXRF) technique at Brazilian National Synchrotron Light Laboratory (LNLS), the concentrations of trace elements were measured in four skin lesions: seborrheic keratosis, fibroepithelial polyp, cherry angioma and dermatosis papulosa nigra. Through spectral analysis of 64 pairs of samples, each one having been collected from the same patient, it was possible to determine and compare concentrations of P, S, K, Ca, Fe, Cu, Zn and Rb in healthy skin and lesions in relation to an internal standard of Ga. The X-ray fluorescence was induced by a white beam with energies between 4 and 20 keV and the ideal incidence angle of the beam was found at approximately 1mrad using increments of 10 μ rad. The spectra were processed by the AXIL software package for quantitative analysis of the International Atomic Energy Agency (IAEA). The results showed significant differences of P, Ca, K, Fe and Cu levels as well as a common trend in their variations between lesion and control samples of the skin diseases studied. This research revealed a powerful tool that can be useful for skin disorders research.

SUMÁRIO

Capítulo 1	1
1.1- Introdução	1
1.2- Os elementos traço e as doenças dermatológicas.....	2
1.3- Doenças de pele estudadas	2
1.4- Justificativas para a realização da pesquisa.....	3
1.5- Elementos químicos essenciais para a vida humana	4
Capítulo 2 – Revisão Bibliográfica	6
2.1- Técnicas usadas na detecção de elementos em tecidos humanos.....	6
2.2- Elementos traço em tecidos humanos	7
2.3- Elementos traço em pele normal e com lesões.....	11
Capítulo 3 – Fundamentos teóricos	14
3.1- Estrutura da pele.....	14
3.2- Lesões de pele estudadas na tese.....	15
3.2.1- Ceratose seborrêica	15
3.2.2- Pólipo fibroepitelial.....	16
3.2.3- Hemangioma rubi.....	17
3.2.4- Dermatose papulosa nigra	20
3.3- A luz síncrotron e a técnica TXRF.....	20

Capítulo 4 – Materiais e Métodos	23
4.1- Coleta das amostras	23
4.2- Preparação das amostras.....	24
4.3- Arranjo experimental	25
4.4- Curva de sensibilidade	28
4.5- Amostra de referência	30
Capítulo 5 – Apresentação dos Resultados	31
5.1- Cálculo da sensibilidade relativa e a estabilidade do sistema	31
5.2- Amostra de referência: precisão e limite mínimo de detecção.....	33
5.2.1- Precisão do sistema SRTXRF	33
5.2.2- Limite mínimo de detecção (LMD)	34
5.3- Médias das concentrações elementares	35
5.3.1- Composição média da pele normal dos pacientes doadores	35
5.3.2- Composição da pele normal e com ceratose seborréica.....	36
5.3.3- Composição de pele normal e com pólipos fibroepiteliais.....	38
5.3.4- Composição da pele normal e com hemangioma rubi	40
5.3.5- Composição da pele normal e com dermatose papulosa nigra.....	42
5.4- Influências exógenas na composição das amostras.....	43
5.5- Discussão dos resultados.....	46
Capítulo 6 - Conclusões e Sugestões	50
Referências Bibliográficas.....	52

APÊNDICE A – Pele humana	61
APÊNDICE B – A técnica SRTXRF e o LNLS.....	70
APÊNDICE C - Artigo ICXOM 2011.....	101
APÊNDICE D – Artigo ISPR2012.....	104

LISTA DE FIGURAS

Figura 3.1- Estrutura da pele	14
Figura 3.2- Ceratose seborrêica.....	15
Figura 3.3- Pólipo Fibroepitelial	17
Figura 3.4- Hemangioma rubi	18
Figura 3.5- Dermatose papulosa nigra.....	20
Figura 3.6- Esquema da técnica SRTXRF.....	21
Figura 4.1- Porta-amostra da técnica SRTXRF do LNLS.....	26
Figura 4.2- Diagrama do sistema de aquisição de espectros da técnica SRTXRF.....	27
Figura 5.1- Curva de sensibilidade relativa da técnica SRTXRF.....	32
Figura 5.2- Limite de detecção em amostras de fígado bovino.....	34
Figura 5.3- Comparação entre espectros de fluorescência de raios X.....	35
Figura 5.4- Concentrações significativamente diferentes entre pele normal e ceratose seborrêica ($p < 0,05$ e $N=30$).....	37
Figura 5.5- Concentrações significativamente diferentes entre amostras de pele normal e pólipo fibroepitelial ($p < 0,05$ e $N=17$).....	39
Figura 5.6- Concentrações significativamente diferentes entre amostras de pele normal e com hemangioma rubi ($p < 0,05$ e $N=11$).....	41
Figura 5.7- Concentração significativamente diferente entre pele normal e dermatose papulosa nigra ($p < 0,05$ e $N=4$).....	42
Figura B.1- Diagrama de energias para as linhas K, L M e N.....	74
Figura B.2- Reflexão e refração de um feixe de luz.....	81

Figura B.3– Representação da reflexão total.....	84
Figura B.4– Ângulo crítico em função da energia para diferentes materiais	87
Figura B.5- Pico de fluorescência de raios X	90
Figura B.6– Limites de detecção de técnicas analíticas	93
Figura B.7– Visão panorâmica do anel de luz no LNLS.....	98

LISTA DE TABELAS

Tabela 4.1- Parâmetros utilizados na composição dos brancos do experimento.....	25
Tabela 4.2- Características do sistema de detecção do LNLS.....	28
Tabela 4.3- Composição da solução mono I.....	29
Tabela 4.4- Composição da solução mono II	29
Tabela 4.5- Composição da solução mono III.....	30
Tabela 5.1- Sensibilidades relativas usadas para o ajuste da curva de sensibilidade.	32
Tabela 5.2- Concentrações certificadas de fígado bovino e as obtidas na tese.	33
Tabela 5.3- Limites mínimos de detecção do experimento.	34
Tabela 5.4- Concentrações obtidas na tese para a pele sadia \pm IC=95% (N=60) comparadas às obtidas por PIXE (N=9) ^(*)	35
Tabela 5.5- Concentrações nas amostras de controle e de ceratose seborrêica \pm IC=95% e N=30	36
Tabela 5.6- Concentrações nas amostras de controle e de pólipo fibroepitelial \pm IC=95%, N _{CONTR.} =15 e N _{LESÃO} =17.....	38
Tabela 5.7- Concentrações nas amostras de controle e de hemangioma rubi \pm IC=95% e N=11.	41
Tabela 5.8- Concentrações nas amostras de controle e de dermatose papulosa nigra \pm IC de 95% e N=4.....	42
Tabela 5.9- Concentrações no hemangioma rubi(HR) nas amostras de controle e lesão (N=11), e nas de controle (33C) e lesão (33L) do paciente 33.....	43
Tabela 5.10- Alimentos e suplementos ingeridos pelo paciente número 33.	44

Tabela 5.11- Concentrações nas amostras de ceratose seborrêica do paciente 57 que usou medicamento tópico sobre a lesão.	45
Tabela 5.12- Variações de aumento (\uparrow) ou redução (\downarrow) das concentrações nas amostras de controle (AC) em relação às de lesão (AL) com a razão AC/AL entre parênteses.	46
Tabela B.1- Os níveis e subníveis de energias possíveis de K a N	76
Tabela B.2- Densidades de materiais (ρ) e partes real (δ) e imaginária (β) do índice de refração da linha K_{α} do Mo (17,4 keV)	85
Tabela B.3- Ângulos críticos da TXRF para vários materiais e diferentes energias.	86
Tabela B.4- Principais parâmetros do anel de armazenamento de elétrons	99
Tabela B.5- Características da linha de luz síncrotron D09B-XRF do LNLS	100

Capítulo 1

INTRODUÇÃO

1.1- Introdução

Para realizar as medidas experimentais, o Laboratório de Instrumentação Nuclear (LIN/COPPE) teve aprovado o projeto D09B-XRF-9323 submetido ao Laboratório Nacional de Luz Síncrotron (LNLS), localizado em Campinas/SP, para utilização da linha XRF de fluorescência de raios X. O LIN, laboratório de excelência na área de física nuclear aplicada, mantém diversas linhas de pesquisa que utilizam técnicas analíticas atômicas e nucleares desde 1999 quando se iniciou a linha de fluorescência de raios X (ANJOS *et al.*, 2000a).

O trabalho foi desenvolvido buscando um conjunto de procedimentos que permitisse avaliar as concentrações de elementos químicos em tecidos de pele humana e, usando amostras pareadas do mesmo paciente, comparar suas composições químicas e variações em quatro tipos de lesões dermatológicas: ceratose seborréica, pólipos fibroepiteliais, hemangioma rubi e dermatose papulosa nigra. A técnica analítica escolhida foi a SRTXRF, ou seja, a fluorescência de raios X por reflexão total com uso de um feixe branco de radiação síncrotron, na tese, com energias entre 4 e 20 keV.

Como o projeto envolve análise de amostras de pele, o LIN firmou um acordo de cooperação com a clínica AMADERM (Clínica de Dermatologia e Medicina Avançada Adriana Moura de Aquino) para a coleta das amostras assim como consulta de seu banco de dados na expectativa de tentar identificar fatores que pudessem estar associados às lesões ou influenciar sua composição.

Foram avaliadas as concentrações de P, S, K, Ca, Fe, Cu, Zn e Rb em 64 pares de amostras de pele composta de tecidos saudáveis e com de lesões, cada um coletado a partir do mesmo paciente, ou seja, são amostras pareadas.

O projeto de pesquisa desta tese foi submetido ao Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Universitário Clementino Fraga Filho da UFRJ (CEP-HUCFF), registrado sob número 159/09, tendo sido sua execução integralmente aprovada por satisfazer todos os requisitos da resolução CSN 196/96 do Conselho Nacional de Saúde da Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP) do Ministério da Saúde.

A originalidade da tese provém da aplicação da SRTXRF ao estudo da composição da pele sadia, e de lesões de pele pouco ou mesmo não estudadas, assim como também da possibilidade de terem sido avaliadas amostras pareadas, ou seja, terem sido comparados os elementos traço contidos nas lesões e em tecidos saudáveis do mesmo paciente, que foram separadas e retiradas das bordas das lesões.

1.2- Os elementos traço e as doenças dermatológicas

As pesquisas sobre a composição multielementar de tecidos do corpo humano têm grande importância para área biomédica, uma vez que estes elementos podem ser essenciais às suas fisiologias. Várias doenças estão diretamente associadas com a deficiência ou excesso desses elementos, o que pode interferir diretamente no metabolismo em seres humanos.

Estudos comparativos das concentrações elementares entre amostras tecidos humanos sadios e com lesões são escassos. Além disso, os valores apresentados em pesquisas realizadas por diferentes métodos diferem muito entre si, principalmente por causa das imprecisões inerentes a cada método.

As concentrações de alguns elementos em tecidos podem apresentar diferenças se comparadas aos sadios. Estudos mostram que as concentrações elementares desempenham um papel crucial em um grande número de enzimas que estão envolvidas na evolução das doenças e seu tratamento (**THEODORAKOU *et al.*, 2008**).

A escolha da técnica **SRTXRF** foi feita pelo fato dela nos permitir investigar pequenas quantidades de tecido com precisão, ou seja, massas da ordem de décimos de miligrama.

1.3- Doenças de pele estudadas

As doenças de pele estudadas são a ceratose seborrêica, pólipo fibroepitelial, hemangioma rubi e a dermatose papulosa nigra.

A escolha dessas lesões como objeto de estudo foi feita devido à:

- a) necessidade de amostras de lesões de pele para iniciar as pesquisas e estabelecer um conjunto de procedimentos para analisar tecidos de pele visando, futuramente, abordar os neoplásicos;
- b) facilidade de se coletar as amostras e com baixo risco para os pacientes, já que não há malignidade envolvida e, portanto não há necessidade de encaminhamento para biópsia;

c) alta frequência de ocorrência desses tipos de lesões de pele em humanos que, apesar disso, são muito pouco ou mesmo ainda não estudadas.

1.4- Justificativas para a realização da pesquisa

Dados sobre a composição elementar de amostras de pele sadia e com lesões são escassos, mas de grande importância para estudos da evolução, tratamento e prevenção de doenças (**THEODORAKU *et al.*, 2008**). A aplicação da técnica utilizada, inédita em pesquisas de pele, foi ajustada às características desse tipo de tecido visando analisar patologias cutâneas para, futuramente, incluir as neoplasias.

Os resultados obtidos com as amostras pareadas, raros na literatura, foram comparados entre as quatro doenças abordadas neste trabalho. A expectativa é de que, futuramente, possam ser comparados com os de pele normal de outras populações, com outras doenças dermatológicas benignas, mas principalmente malignas, como o carcinoma basocelular e o melanoma, que possui alto índice de letalidade. Desta forma seria possível se observar se as diferenças entre as concentrações em tecidos normais e com lesões, deste e de outros trabalhos, são características pontuais ou gerais.

A fluorescência de raios X (XRF) é uma técnica analítica multielementar bastante difundida com aplicações em várias áreas da ciência e da tecnologia. Tem como princípio físico básico a produção de raios X característicos emitidos por átomos de um elemento presente em uma amostra quando devidamente excitada, neste caso, por radiação síncrotron.

A técnica escolhida para analisar as amostras, a SRTXRF, é uma variante da XRF convencional que tem maior poder de detecção e exige uma técnica de preparação de amostras mais simples. É uma técnica bastante confiável em análises em nível de partes por milhão ($\mu\text{g.g}^{-1}$) e que permite a determinação da composição multielementar de amostras com aplicações no meio ambiente, na Odontologia, na Medicina, entre outras (**PRANGE, 1989**). Outra vantagem em relação aos trabalhos já realizados é que a técnica empregada aqui é muito mais apurada em relação às outras técnicas de fluorescência, devido ao padrão de gálio que é incorporado às amostras. Além disso, ela é perfeitamente adequada às análises de amostras com massas pequenas, caso da pele.

Obedecendo estritamente aos critérios éticos, que inclui sigilo, conforme a resolução nº 196/96 do Conselho Nacional de Saúde, a clínica Amaderm forneceu as

amostras de lesões de pele e disponibilizou parte de seu banco de dados para se tivesse acesso aos resultados de exames de rotina dos sujeitos da pesquisa. Dentre eles estão resultados de exames de sangue, biópsias, parâmetros biométricos, etc. Todos os exames são normalmente pedidos pela clínica independentemente deste projeto.

A preparação das amostras para armazenamento como secção, lavagem e liofilização, assim como o processamento dos dados e a análise dos resultados foram realizados no Laboratório de Instrumentação Nuclear (LIN) do Programa de Engenharia Nuclear da COPPE/UFRJ.

O processamento das amostras para a confecção dos refletores foi feito no Laboratório de Química de Apoio aos Usuários (LQAU) que, em seguida, foram analisados na linha de fluorescência D09-XRF. Ambas as instalações são do LNLS.

1.5- Elementos químicos essenciais para a vida humana

Existe uma série de elementos químicos que são considerados essenciais para a vida humana. Mas, para que seja considerado como tal, deve-se verificar se:

- a) a ingestão insuficiente do elemento químico provoca deficiências funcionais reversíveis se o elemento retornar a suas concentrações adequadas;
- b) perante a ausência do elemento, o organismo não cresce nem completa seu ciclo vital;
- c) o elemento influencia diretamente o organismo através dos seus processos metabólicos;
- d) o mesmo efeito no organismo não pode ser conseguido por nenhum outro elemento. (**GIBSON, 1989, ANDERSON, 2002 e FRANCO, 2005**):

Alguns elementos químicos não são essenciais apesar de estarem presentes no organismo. É comum e bastante provável que um elemento se incorpore ao organismo através da ingestão ou inalação de compostos químicos, medicamentos, pesticidas, produtos derivados de solventes, etc. Dessa maneira, o indivíduo pode a curto, médio ou longo prazo, apresentar sintomas ou mesmo doenças. A análise da deficiência ou presença de um elemento químico em tecidos do organismo é um estudo delicado devido às pequenas concentrações elementares envolvidas, da ordem de traços.

Acredita-se que a importância dos elementos químicos está relacionada à sua abundância e acessibilidade. Qualquer elemento, seja ele essencial ou não, pode ser tóxico a partir de certo limite. Para cada elemento químico há uma faixa de concentração considerada ótima para o organismo (**PESCE *et al.*, 1999**). Dentro dessa faixa de concentração, o organismo é capaz de desenvolver adequadamente as funções que dependem deste elemento, mas quando o nível de concentração é muito alto são produzidos efeitos tóxicos que causam doenças e até mesmo a morte do indivíduo.

Há diversos mecanismos que regulam os níveis ideais de cada elemento e controlam a absorção, armazenamento e excreção dos elementos químicos. O organismo pode apresentar deficiência ou excesso de um elemento devido à dieta, problemas no mecanismo de absorção e provavelmente devido à deficiência do mecanismo homeostático gerada por determinadas doenças. As principais funções relativas os tecidos epiteliais implicadas neste estudo, serão abordadas nas discussões dos resultados, no capítulo 5.

Capítulo 2

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Neste capítulo é apresentada uma revisão de trabalhos publicados que abordam as concentrações de elementos traço presentes em amostras de tecidos humanos, sobretudo pele e algumas de suas lesões, analisadas por diferentes técnicas analíticas.

2.1- Técnicas usadas na detecção de elementos em tecidos humanos

Os raios X são usados em medicina e biologia desde sua descoberta, em 1895, por Wilhelm Conrad Röntgen, e, ainda hoje, é a mais importante ferramenta para o diagnóstico e tratamento. Dentre as aplicações na área de pesquisa, há diversas técnicas que usam os raios X em análises de tecidos humanos. Algumas das principais são: o espalhamento Compton (**SPELLER *et al.*, 1999**), a difração (**SPELLER *et al.*, 1991**), a transmissão, o contraste de fase, o espalhamento a baixos ângulos (SAXS) (**HILLER *et al.*, 2006**, **SVERGUN *et al.*, 2003**), e a fluorescência de raios X (XRF) (**POTTS *et al.*, 2005** e **2006**). Todas elas se valem dos efeitos das interações dos raios X com as amostras de forma a obter informações sobre sua estrutura e composição. O principal objetivo dessas aplicações tem sido desenvolver novas modalidades de diagnóstico assim como melhor entender processos envolvidos na evolução e tratamento de doenças.

Alguns resultados provenientes de outras técnicas aplicadas à caracterização de tecidos humanos são citados como referências. Dentre elas têm-se a análise por ativação por nêutrons (**GARG *et al.*, 1994**, **NG *et al.*, 1997**), espectrometria de absorção atômica (**ISBIR *et al.*, 1995**, **JIN *et al.*, 1999**) e (**SANTOLIVADO *et al.*, 1976**) e emissão de raios X induzido por prótons (PIXE) (**JOAHANSSON *et al.*, 1987**), (**KWIATEK *et al.*, 1996**, **REDDY *et al.*, 2002**).

A técnica fluorescência de raios X por reflexão total (TXRF- *total reflection X-ray fluorescence*) foi escolhida para ser usada na tese, em conjunto com a radiação síncrotron, adequadas às características dos tecidos epiteliais, em especial, às pequenas massas disponíveis (**AINGINGER *et al.*, 1974** e **1975**, **WOBRAUSCHEK *et al.*, 1994**, **STRELI *et al.*, 2000**, **POTTS *et al.*, 2005**). A análise por TRXF é um método especial de análise por fluorescência de raios X por dispersão em energia (EDXRF- *energy*

dispersive X-ray fluorescence), mas, que estende esta última ao nível de elementos ultra traço, ou seja, concentrações abaixo de $1 \mu\text{g.g}^{-1}$. O limite de detecção depende da quantidade de amostra excitada, na faixa de picogramas a fentogramas, dentro da qual se insere uma quantidade conhecida de um elemento que é usado como padrão interno. Assim é possível analisar massas muito pequenas (STRELI *et al.*, 2006).

O surgimento da técnica TXRF permitiu um grande avanço às pesquisas em elementos e tem como vantagens:

a- a significativa redução da radiação de fundo devido ao espalhamento do suporte da amostra, como um refletor de Lucite, por exemplo, já que ao se refletir totalmente, não há penetração do feixe incidente;

b- o sinal de fluorescência dobra já que a amostra é excitada tanto pelo feixe incidente na sua entrada quanto pelo refletido, na sua saída;

c- o detector pode ser colocado bem próximo à amostra e, assim, aumentar a eficiência de detecção devido ao maior ângulo sólido para detecção da fluorescência (GRIEKEN *et al.*, 2002).

Outro avanço que impulsionou a técnica TXRF foi a utilização de radiação ou luz síncrotron (LEWIS *et al.*, 1997, SUORTTI *et al.*, 2003, STRELI *et al.*, 2005 e 2008), gerada por aceleradores de partícula que vêm sendo construídos em todo mundo voltados também para promissoras aplicações na área biomédica (SUN *et al.*, 2009). Dentre as vantagens do uso da radiação síncrotron há a alta intensidade e estabilidade do feixe e o fato de que esse maior brilho que permite selecionar e ajustar feixes de fótons monocromáticos com uma largura de banda de energia bem mais estreita. Devido a essa alta intensidade é possível analisar amostras pequenas em um tempo relativamente curto. As características dessa radiação constituem enormes avanços para diversas aplicações biomédicas.

2.2- Elementos traço em tecidos humanos

Diversos trabalhos têm sido realizados através de técnicas que utilizam radiações na análise de amostras biológicas tentando elucidar quais elementos são relevantes, ou se são encontrados em concentrações mais altas ou mais baixas em tecidos com patologias quando comparados aos saudáveis (THEODORAKOU *et al.*, 2008).

Em todos os trabalhos foi constatada uma associação entre os níveis de certos elementos traço em tecidos humanos na incidência de várias doenças. É sabido, por exemplo, que a concentração de alguns elementos traço em tecidos cancerosos é diferente daquela encontrada em tecidos saudáveis (ALBERT *et al.*, 1994).

Diversos pesquisadores abordaram tecidos humanos por meio de técnicas de excitação da amostras induzindo a fluorescência, dentre outras técnicas analíticas.

Em novembro de 1994, KWIATEK *et al.* (1996) iniciou estudos preliminares sobre câncer renal buscando diferenças nas concentrações de elementos traço entre o tecido normal e canceroso por meio da técnica SRIXE (*synchrotron radiation induced X-ray emission*) com feixe branco. Foi verificado que as concentrações de Cd, Cr, Ti, V, Cu, Se, Zn são mais baixas no câncer. O inverso foi observado para o Fe.

MARQUES *et al.* (2004) traçou o perfil elementar de dentes de pacientes com insuficiência renal por meio da técnica SRXRF, analisando a influência do tratamento de diálise ao longo do tempo. As concentrações elementares de Ti, Mn, Fe, Co, Ni, Cu, Zn, Se, Br, Rb Sr e Pb em partes diferentes dos dentes dos pacientes são correlacionados com os valores de pessoas saudáveis. Foram encontrados níveis bem mais elevados de Pb na pulpa nos pacientes do que em indivíduos saudáveis. As concentrações de Mn, Fe, Cu e Se eram equivalentes entre os dois grupos, enquanto que as concentrações de Ti, Co, Ni, Se, Br e Rb foram muito baixas em pacientes submetidos a longos períodos de tratamento.

Amostras de tecidos benignos e malignos do pulmão foram analisadas pelas técnicas PIXE e TXRF (KUBALA-KUKUS *et al.*, 1999). As concentrações de P, S, K, Ca, Ti, Cr, Mn, Fe, Cu, Zn, Se, Sr, Pb e Hg foram determinadas em amostras de carcinoma e tumor benigno de 65 e 5 pacientes, respectivamente. Verificou-se aumento nos níveis de alguns elementos em tecidos cancerosos de mulheres em comparação com os homens, isto é, apresentou níveis de Ti, Cr e Mn mais altos e, ao mesmo tempo, as concentrações de Sr e Pb declinaram na população feminina.

CARVALHO *et al.* (2001) comparou tecidos humanos saudáveis e com neoplasias, incluindo amostras de fígado, com ajuda das técnicas SRIXE, EDXRF, PIXE, e obteve resultados muito próximos.

A patogênese do câncer de próstata foi investigada com auxílio das técnicas complementares SRIXE e XANES com o intuito de entender o papel de elementos traço no stress oxidativo e ajudar a compreender o papel de estado de oxidação do Fe subjacente à oncogênese (**KWIATEK *et al.*, 2005**). Mais recentemente, **LEITÃO *et al.*, (2007)** utilizaram a técnica SRTXRF para analisar as concentrações de P, S, Cl, K, Ca, Fe, Cu, Zn, Br, Rb em amostras de 45 pacientes de 40 a 85 anos.

Amostras de intestino foram analisadas por TXRF na determinação de Fe, Se, Zn e Cu em tecido canceroso e pólipos colorretal por **KUCHARZEWSKI *et al.*, (2003a e 2003b)** avaliando a relação entre os níveis de elementos traço, a localização de neoplasias e o estágio de seu desenvolvimento. As concentrações destes oligoelementos foram examinadas em 67 pacientes com câncer colorretal e em 42 pacientes com pólipos do cólon e do reto.

KUCHARZEWSKI *et al.*, (2003c) investigaram, usando a técnica de TXRF, diferenças entre as concentrações de Cu, Zn e Se no sangue e tecido tireoidiano de pacientes com diferentes distúrbios da tireóide. As concentrações de Zn e Se em câncer de tireóide foram significativamente menores que em pacientes saudáveis. Além disso, as proporções médias de Cu/Zn e Cu/Se no câncer de tireóide foram significativamente mais elevadas do que nos pacientes com outras doenças de tireóide.

MAJEWSKA *et al.*, (2007) determinaram as concentrações de Fe, Cu, Zn e Se em tecidos cancerosos e benignos de mama, pulmão e no intestino (cólon) e compararam-nas entre tecidos cancerosos e benignos do mesmo órgão, também entre tecidos cancerosos e benignos provenientes de diferentes órgãos. Comparando tecidos benignos e com os malignos, diferenças significativas foram encontradas entre as distribuições das concentrações de Fe e Se na mama, bem como para o Cu e Zn, no caso dos tecidos pulmonares e, para tecidos do cólon, o Zn. As concentrações de Fe e Cu foram estatisticamente diferentes nos tecidos pulmonares do câncer de cólon. Para tecidos benignos do pulmão e cólon foi encontrada alteração significativa somente para o Zn.

Amostras de tecidos de mama normal e com neoplasia foram estudados por **RIZK *et al.*, (1984)** em 25 pacientes submetidos a mastectomia. Foram analisados os níveis de Ca, V, Cu, Zn, Fe, Cr, Mn, Ni, Se, Mo, Br, Rb, Sr, Hg, As e Pb. **KIDANE *et al.*, (1999)** analisaram 100 amostras de tecido mamário. **CASTRO *et al.*, (2004)** analisou

as propriedades de dispersão de diferentes tecidos humanos, incluindo mama, de acordo com as classificações histológicas. Foram medidas as assinaturas do espalhamento coerente de tecidos saudáveis e neoplásicos de mama, útero e rins através da radiação síncrotron na linha XRD2 do LNLS.

No sangue, **CANELLAS *et al.* (2006)** aplicaram a técnica SRTXRF para analisar soro de pacientes com leucemia mielóide para determinar as concentrações dos elementos P, S, Cl, K, Ca, Cr, Mn, Fe, Ni, Cu, Zn, Br e Rb. Observaram que a presença dos elementos P, S, Ca, Cr, Mn, Fe, Cu e Rb elementos diferiram significativamente entre grupos de indivíduos saudáveis e pacientes com a doença. Através da técnica TXRF, **MARTINEZ *et al.* (2004)** determinaram as concentrações de S, Ca, Cu, Zn, Rb e Pb em amostras de sangue de indivíduos da zona metropolitana do vale do México. As concentrações de K e Br foram altas possivelmente devido a hábitos alimentares e fatores geográficos ou ambientais. **KHUDER *et al.* (2012)** utilizaram a técnica EDXRF para determinar os níveis de S, Cl, K, Ca, Fe, Cu, Zn, Br, e Rb no sangue de pacientes com leucemia e voluntários saudáveis e mostrou que a concentração média dos elementos estudados foi significativamente mais baixa em pacientes com leucemia que nas amostra de controle.

CARVALHO *et al.* (1998), através da técnica EDXRF, analisaram amostras de tecido humano de cadáveres (cabelo, fígado, osso e rim) coletados logo após a morte clínica e os elementos Mn, Fe, Cu, Zn, Sr, As, Rb e Pb foram relacionados. No cabelo, houve uma significativa diferença na concentração de Zn entre homens e mulheres. Para as amostras de osso, Zn, Sr e Pb apresentaram correlação com a idade. Descobriu-se uma correlação positiva entre Fe e Pb e negativa entre Zn e Pb em amostras de fígado. Para as amostras de rim, constatou-se forte correlação positiva entre Zn e Fe e entre Cu e Zn enquanto que uma correlação fraca entre Rb e Pb.

CASTRO *et al.* (2005) utilizaram a distribuição angular de espalhamento coerente para determinar as propriedades de dispersão em diferentes tecidos. Foram levantadas as assinaturas de espalhamento coerente de tecidos saudáveis e com neoplasias de mama, útero e rins utilizando radiação síncrotron no LNLS.

KWIATEK *et al.* (1996, 2002) determinaram e compararam as concentrações de elementos em tecidos renais, com e sem neoplasias, utilizando a técnica de emissão de raios X induzida por radiação síncrotron SRIXE (*synchrotron radiation-induced X-*

ray emission) com feixe branco. Imagens de escaneamentos bidimensionais são apresentados para ilustrar as diferenças entre tecidos perfundidos e não-perfundidos. Esse estudo avaliou que as concentrações de Cd, Cr, Ti, V, Cu, Se e Zn são mais baixas nas amostras com câncer que nas sadias com indícios de que o Cd é acumulado nas células, e não no sangue, mas, para o Fe, o contrário.

2.3- Elementos traço em pele normal e com lesões

As informações sobre concentrações elementares em tecidos epiteliais normais ou com lesão são escassas e, no caso das lesões estudadas, praticamente inexistentes. Para essas lesões não há artigos publicados que analisem as concentrações elementares por meio da técnica de SRTXRF. Há poucos valores apresentados em artigos científicos obtidos por outros métodos e que diferem muito uns dos outros. A obtenção de valores precisos pode ser útil já que tem sido notado que alterações na concentração de alguns elementos estão freqüentemente associadas a diversas lesões, e elementos traço desempenham um papel crucial junto a um grande número de enzimas envolvidas na evolução das doenças e seu tratamento.

O primeiro estudo da composição da pele foi publicado por **BROWN et al. (1927)** que analisaram amostras retiradas de cadáveres onde as amostras eram calcinadas e as concentrações dos elementos constituintes eram determinados por meio de processos químicos.

MOLOKIA et al. (1969) utilizaram a técnica nuclear de ativação por nêutrons para determinar os níveis de Zn em 36 amostras de pele normal proveniente de cadáveres e sugeriram que este elemento desempenha um papel importante no metabolismo da pele humana.

MOLIN et al. (1973a) determinaram as concentrações de Co, Zn e Cu em pele normal e com psoríase, e, repetiram o estudo para o Fe (**MOLIN et al. , 1973b**).

GORODETSKY, R. et al. (1986), usando a técnica de emissão de raios X induzida por radiação síncrotron *in vivo* DXS (*diagnostic X-ray spectrometry in vivo*), estudaram amostras de 45 pacientes com lesões de pele e compararam 26 amostras sadias de controle. Encontraram diferenças nas concentrações de Zn, Cu e Fe entre pele normal e lesões dos tipos dermatite solar, ceratose solar, carcinomas baso-celulares, melanoma, nevos pigmentados e lesões não malignas induzidas pela luz solar. Foi

detectado que as concentrações de Fe e Zn eram elevadas para lesões não malignas induzidas pela luz solar. Nas lesões malignas, nevos pigmentados, dermatite solar e ceratoses as concentrações de Fe e Cu eram também elevadas, mas a média era menor do que as não malignas. As concentrações de Fe, Cu e Zn nos melanomas revelaram-se aumentadas se comparadas às amostras de controle de tecidos sadios.

SHESKIN *et al.* (1981a) usando também DXS avaliou as concentrações de Zn, Cu e Fe em pele de pacientes com prurigo antes e depois de tratamento com talidomida. Verificaram que antes do tratamento as lesões maiores possuíam níveis significativamente mais altos de Zn e Fe que as lesões menores. Sob tratamento, as concentrações desses elementos voltaram aos níveis normais, já os níveis de Cu não se alteraram.

MICHELSON *et al.* (1980), retiraram biópsias tangenciais de pele delgada de 40 sujeitos sadios e analisaram sua composição através da espectroscopia de absorção atômica (AAS- atomic absorption spectroscopy) determinaram a concentração média de Zn na epiderme em 60 µg/g em amostras secas, e concluíram que essa concentração era muito mais alta na camada superior.

SHESKIN, J. *et al.* (1981b), na mesma linha, mediram as concentrações de Fe, Zn, Cu na pele de pacientes com lepra nos locais das lesões antes e depois de tratamento com talidomida, e compararam com os níveis desses elementos na pele de indivíduos sadios. Nenhuma alteração significativa foi detectada nos níveis de Cu em tecidos com lepra. Os níveis de Zn encontrados estavam significativamente alterados em algumas lesões, mas sem apresentar um padrão. Em contraste com a rápida melhora clínica devido ao tratamento, os níveis de Fe continuaram os mesmos após longo período.

KURZ *et al.* (1987) estudaram o perfil das concentrações elementares em diversos estágios de tecido de pele com psoríase. As concentrações de P, K e Zn eram significativamente mais altas em comparação com os tecidos sadios. As concentrações de Fe eram menores em placas de psoríase mais antigas. As concentrações de Cl na epiderme permaneceram inalteradas.

WERNER-LINDLE *et al.* (1998), usando as técnicas **PIXE** (*próton induced X-ray emission*) e **XRMA** (*X-ray microanalysis*, em microscópio eletrônico), compararam as concentrações de Zn, Ca e Fe entre seções transversais congeladas de amostras pele normal e com psoríase e também pesquisaram suas distribuições.

Relataram anormalidades nos tecidos lesionados tanto na distribuição quanto nos níveis desses elementos, relatados muito mais altos.

Entretanto, embora haja diversos trabalhos sobre a composição de tecidos epiteliais, há poucos dados publicados sobre a composição de lesão de pele do tipo ceratose seborrêica, sobretudo utilizando técnicas de fluorescência, em especial a SRTXRF. Quanto aos outros tipos de lesões estudadas, pólipos fibroepiteliais, dermatose papulosa nigra e hemangioma rubi, dados de suas composições são inexistentes.

Capítulo 3

FUNDAMENTOS TEÓRICOS

3.1- Estrutura da pele

A pele é um órgão externo que reveste o organismo humano e provê proteção às estruturas internas contra agressões exógenas.

Em anatomia, é um órgão integrante do sistema tegumentar, juntamente com o cabelo e pelos, unhas, glândulas sudoríparas e sebáceas, que atuam na proteção dos tecidos subjacentes, regulação da temperatura somática, reserva de nutrientes e ainda contem terminações nervosas sensitivas.

A pele constitui o maior órgão do corpo humano e representa aproximadamente 16% do peso corpóreo, com variações estruturais ao longo de sua extensão. É composta por três camadas interdependentes: a epiderme, a mais externa, a derme, intermediária; e a hipoderme ou panículo adiposo, que permite que a pele se movimente livremente sobre as estruturas mais profundas do corpo.

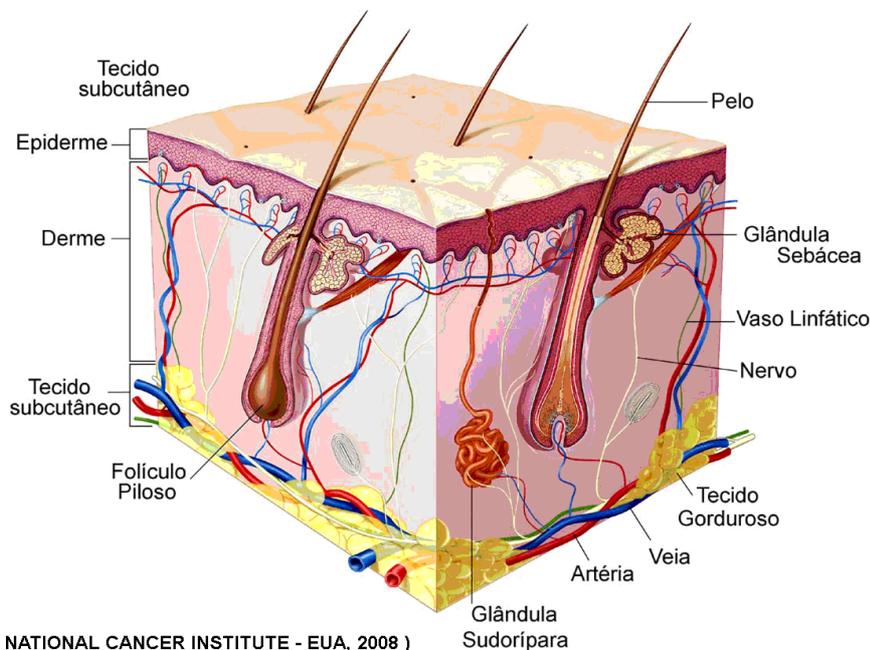


Figura 3.1- Estrutura da pele

A pele desempenha diversas funções no organismo humano, como nos sistemas imunológico e sensorial, e também na proteção contra exógenos, excreção,

termorregulação, hemoregulação, metabolização, secreção e renovação dos tecidos de revestimento.

Uma descrição mais completa dessas funções da pele assim como outras informações detalhadas sobre sua estrutura, patologias mais comuns, dentre outras, são apresentadas no Apêndice B.

3.2- Lesões de pele estudadas na tese

3.2.1- Ceratose seborrêica

É a lesão dermatológica benigna mais frequente na população branca, e cujo tratamento envolve sua retirada por processo cirúrgico, o que, muitas vezes, resulta em grandes cicatrizes. Trata-se de um crescimento não-canceroso benigno da pele que se origina a partir dos queratinócitos que são células diferenciadas do tecido epitelial e invaginações da epiderme para a derme, como os cabelos e unhas, responsáveis pela síntese da queratina. A figura 3.2 mostra algumas formas de manifestação da lesão. (disponível em www.dermatologia.net, 2012).

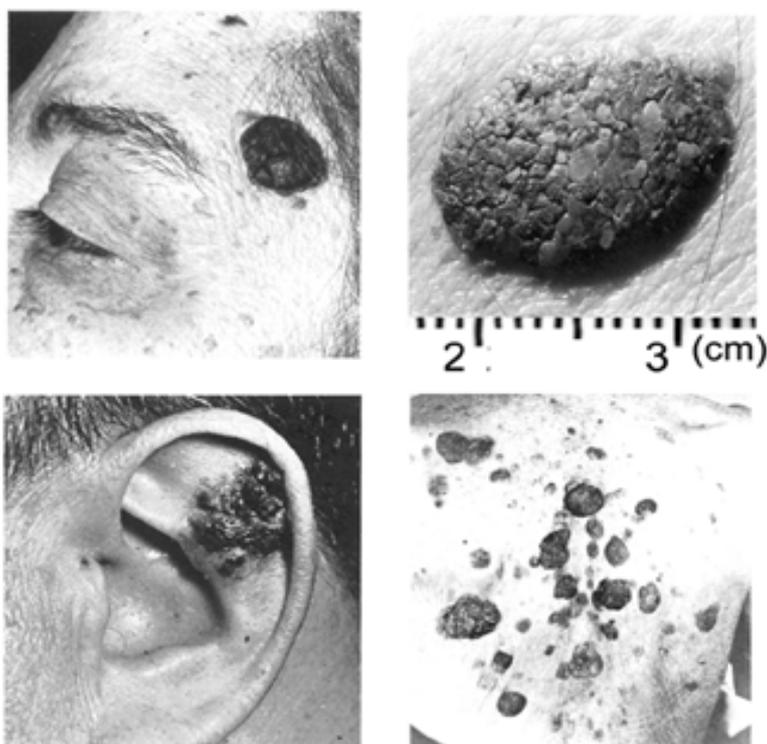


Figura 3.2- Ceratose seborrêica.

A incidência da ceratose seborrêica ocorre principalmente no tronco, face e membros, e tem aparência de placas verrugosas coladas na epiderme com cores

variando de amarelo escuro ao negro. Suas dimensões normalmente variam de 1 a 50 mm de diâmetro. Algumas vezes surgem dezenas de grandes lesões que podem cobrir áreas extensas. Pode ocorrer sangramento, inchaço, exsudação, inflamações em consequência de traumas e, mais raramente, infecção secundária, tornando as lesões eritematosas, crostosas e doloridas.

Quando surgem subitamente múltiplas lesões de forma eruptiva, pode haver relação com tumores malignos internos. Esta manifestação característica constitui o sinal de Leser-Trelart, considerado manifestação paraneoplásica podendo estar associado adenocarcinomas gástricos ou de cólon, carcinomas de mama e linfomas. Este sinal seria consequência de secreção de fatores de crescimento epitelial pelo tumor. As ceratoses seborréicas devem ser tratadas se apresentarem crescimento perceptível, se estiverem localizadas em áreas de atrito com as roupas ou acessórios, quando podem ferir e inflamar, ou, por motivos estéticos, já que são lesões escuras e que podem ter aspecto desagradável.

O tratamento vai depender do diagnóstico, tamanho e quantidade de lesões, e pode ser feito através do uso de substâncias químicas (cauterização) química, ou congelamento com nitrogênio líquido ou criocirurgia, ou mesmo cirurgia, dentre outras opções. Quanto mais cedo for feito o diagnóstico e, conseqüentemente, menores forem as lesões, mais fácil será o tratamento.

3.2.2- Pólipo fibroepitelial

Também chamado de acrocórdon, é o mais comum dentre os tumores fibrosos. São pólipos macios da cor da pele ou bronzeados que ocorrem frequentemente nas áreas intertriginosas e que aumentam de tamanho e de número ao longo do tempo. A figura 3.3 mostra imagens da lesão (**disponível em www.dermatologia.net, 2012**).

Apresentam-se na forma de pápulas filiformes de 1 a 5 mm de tamanho, da cor da pele ou castanho avermelhada ou castanho escura, localizadas principalmente no pescoço, pálpebras, porção superior do tronco e axilas, podendo ocorrer em pequeno ou grande número.

Os pólipos fibroepiteliais, um quadro frequente que geralmente surge na meia idade, são mais comuns nas pessoas idosas, nas mulheres, especialmente durante a gravidez, e nos doentes obesos.

Embora assintomáticos, podem se tornar incômodos e dolorosos após um traumatismo como fricção ou torção. Quando há torção do pedúnculo geralmente ocorre necrose, quando podem adquirir coloração escura. Eles são lesões benignas e só requerem tratamento no caso de existirem sintomas ou por motivos cosméticos.



Figura 3.3- Pólipo Fibroepitelial

A histopatologia revela epiderme normal recobrando o centro fibroso-vascular constituído por colágeno frouxo ou denso e com vasos centrais dilatados. A diagnose é clínica e apenas excepcionalmente se recorre a histopatologia.

Na diagnose diferencial eventualmente podem ser consideradas as lesões papulosas da síndrome de Birt-Hogg-Dube, da síndrome de Cowden, angiofibromas, nevos celulares e ceratoses seborrêicas, podem ser facilmente diferenciadas através de exame histopatológico. O tratamento consiste na eletrodissecação das lesões, exérese ou criocirurgia com nitrogênio líquido.

3.2.3- Hemangioma rubi

Também chamados de hemangiomas senis, angiomas senis, angiomas rubi ou manchas de Campbell de Morgan, são tumores vasculares benignos bastante frequentes na população. Seu surgimento costuma ser imperceptível, pois se localizam, geralmente, em locais de difícil visualização como dorso ou couro cabeludo. A figura 3.4 mostra imagens da lesão (**disponível em www.dermatologia.net, 2012**).

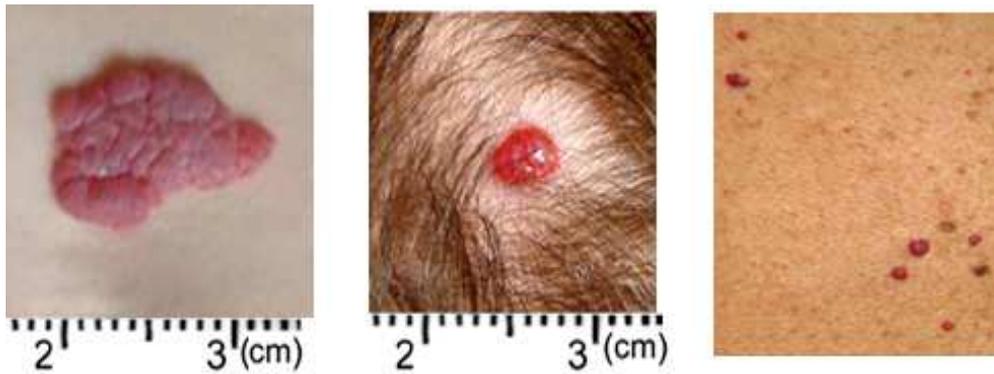


Figura 3.4- Hemangioma rubi

Embora não haja dados precisos quanto à sua prevalência, em um estudo realizado na Austrália a frequência foi de aproximadamente 55%. As lesões costumam surgir na idade adulta e aumentar em tamanho e número, além de se modificarem com o envelhecimento. Constitui uma das principais dermatoses do idoso, juntamente com lesões de ceratose seborrêica.

Clinicamente, podem surgir na pele com aspecto semelhante à petéquias, maculares ou planas. Com o tempo, apresentam-se como pápulas esféricas de cor violácea ou vermelha brilhante e não são compressíveis à vitropressão. Medem, em geral, de 1 a 5 mm, são assintomáticas e são encontradas mais frequentemente no tronco mas podem ser encontradas em qualquer parte do corpo, incluindo o couro cabeludo.

O hemangioma rubi, ao exame histopatológico, apresenta-se como proliferações vasculares do tipo capilar ou vênula pós-capilar, compostas de uma camada de células endoteliais sob epiderme normal.

Apesar de sua alta prevalência, pouco se sabe sobre a patogênese dessas lesões. Alguns trabalhos relatam o surgimento de erupções desse tipo após exposição prolongada a substâncias com componentes a base de brometos, gás mostarda, alguns tipos de solvente, como o 2-butoxietanol, e após tratamento de vitiligo com mostarda nitrogenada. A influência hormonal também foi sugerida em trabalho com gestantes que desenvolveram hemangiomas rubi e em pacientes com diabetes melito, nos quais as lesões são mais numerosas e volumosas (BURNS *et al.* 2010).

Embora reconhecidas como lesões benignas, em algumas situações os hemangiomas rubi podem ser marcadores de doenças graves. Muitos trabalhos têm apresentado a associação dessa doença com doenças sistêmicas e, inclusive, mostrado o

valor investigatório destas lesões, uma vez que podem levar ao diagnóstico de outras enfermidades.

Em trabalho apresentado por **KOBAYASHI *et al.* (2000)**, um paciente com sintomas neurológicos inexplicáveis por métodos de imagem teve o diagnóstico de linfoma angiotrópico cerebral confirmado através de alterações no exame histopatológico de angiomas existentes no tronco. Em uma publicação sobre um homem de meia-idade com episódios recorrentes de vertigem, náusea e vômitos e com exames de imagem mostrando hemorragia pontina e más formações cavernosas, apresentava centenas de lesões tipo hemangioma rubi no corpo (**CLATTERBUCK *et al.* 2002**).

Outra enfermidade, a síndrome POEMS (polyneuropathy organomegaly, endocrinopathy monoclonal gammopathy skin changes), que consiste de um distúrbio multissistêmico, com polineuropatia, organomegalia, endocrinopatia, elevação de anticorpos monoclonais e alterações cutâneas, apresentando lesões características, conhecidas como hemangiomas glomerulares.

A presença de hemangiomas rubi com halos purpúricos ao seu redor pode ocorrer em pacientes com amiloidose sistêmica. Outra associação importante é a de lesões semelhantes no corpo, principalmente na face e couro cabeludo, em pacientes com histórico de carcinoma renal – uma vez que as metástases cutâneas, presentes em até 3,4% dos pacientes, podem mimetizar outras dermatoses, representando um estágio avançado da doença, pois surgem em fase tardia, já com disseminação sistêmica. O manejo dessas lesões depende da localização, quantidade, e presença ou não de desconforto pelos pacientes. Em alguns casos é preferível observar a evolução das lesões, verificando se há crescimento ou involução espontânea, enquanto em outros as lesões podem ser tratadas por motivos estéticos, através de laser, eletrodissecção ou excisão em caso de lesões maiores, ou podem ser retiradas para exame histopatológico, se houver suspeita de outra patologia.

Apesar dessas lesões geralmente apresentarem um curso benigno e não serem acompanhadas de sintomas, sugere-se que sejam observadas quanto ao possível aumento de tamanho, disseminação pelo corpo e presença de outras características distintas. Em casos suspeitos, ou nos quais haja modificação da morfologia das lesões, é aconselhável que os pacientes procurem um médico dermatologista.

3.2.4- Dermatose papulosa nigra

Trata-se de doença benigna que representa uma forma clínica específica da ceratose seborrêica. Pode se manifestar em qualquer pessoa, sendo mais frequente em negros e mulatos, e predomina no sexo feminino. Há uma forte componente familiar. A figura 3.4 mostra imagens da lesão (**disponível em www.dermatologia.net, 2012**).

O surgimento das lesões podem se iniciar ainda na juventude, mas é mais comum o aparecimento das primeiras lesões na idade adulta.

As lesões são pequenas, elevadas, de cor marrom escura ou preta, atingindo principalmente a face e pescoço. São assintomáticas e começam formando pequeninos pontos, do tamanho de uma cabeça de alfinete que crescem progressivamente até cerca de 2 a 5 milímetros de diâmetro. Podem se unir formando placas maiores.



Figura 3.5- Dermatose papulosa nigra.

Novas lesões vão se formando ao longo da vida e, em alguns casos, atinge um grande número, o que provoca considerável prejuízo estético, devido ao aspecto resultante de pele manchada e cicatrizes no caso de excisão. O quadro histopatológico é idêntico ao da ceratose seborrêica, apenas com grande quantidade de melanina, e, em geral, não há pseudocistos córneos. O tratamento inclui extração cirúrgica e crioterapia.

No apêndice A são apresentados mais detalhes sobre as funções e algumas patologias comuns da pele humana.

3.3- A luz síncrotron e a técnica TXRF

A luz ou radiação síncrotron, de natureza eletromagnética, é emitida quando partículas carregadas com velocidades relativísticas sofrem aceleração radial. Sua

utilização permite alcançar limites de detecção mais baixos do que quando se utiliza um tubo raios X de alta potência (KLOCKENKAMPER, 1996b).

Algumas propriedades da radiação síncrotron convenientes para usos da TXRF:

1. forma contínua na faixa de energias do infravermelho aos raios X;
2. alta intensidade;
3. alto grau de colimação;
4. polarização linear no plano de órbita;
5. polarização elíptica ou circular acima e abaixo do plano da órbita para a radiação magnética da curva;
6. tamanho da fonte é pequeno e determinado pelo feixe de elétrons;
7. estrutura de tempo bem definida;
8. características quantitativas conhecidas;
9. alta estabilidade de intensidade e posição de fonte.

A técnica de fluorescência de raios X por reflexão total com radiação síncrotron (SRTXRF) permite investigar pequenas quantidades de tecidos, ou seja, massas da ordem de décimos de mg. Algumas das amostras de pele sadia da tese, de controle, tinham massas em torno de 1mg. Entre outras vantagens há a diminuição do *background*, dupla excitação da amostra pelos feixes primário e refletido, pequena distância amostra-detector resultando em um ângulo sólido grande, baixos limites de detecção, etc (ANJOS, 2000b). A figura 3.6 mostra um esboço da técnica.

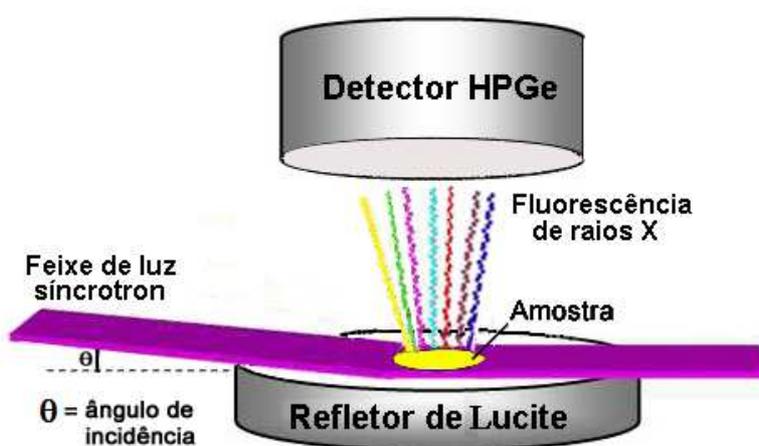


Figura 3.6- Esquema da técnica SRTXRF

A reflexão total ocorre num campo não homogêneo de ondas estacionárias. A intensidade da radiação na fluorescência de raios X por reflexão total está relacionada

ao fenômeno de interferência e formação de ondas estacionárias na superfície do refletor. Os átomos do material ao interagirem neste campo, são excitados e produzem fluorescência de raios X com uma probabilidade proporcional à intensidade do campo de ondas estacionárias. Nesta região, há formação de ondas estacionárias com nodos e anti-nodos a partir do fenômeno de interferência. A intensidade dos nodos é zero e dos anti-nodos é aproximadamente 4 vezes a intensidade do feixe incidente, e, ambos possuem um comprimento de onda da ordem de 10 nm.

Assim, se na superfície do refletor for depositada uma fina camada de um material para análise, o feixe incidente pode penetrar na amostra e sofrer reflexão total na interface amostra/refletor, desde que o ângulo de incidência seja menor do que o ângulo crítico. Neste caso, ondas estacionárias serão produzidas na superfície da amostra, dentro da amostra e na interface amostra/refletor e novamente nodos e anti-nodos serão formados.

O LNLS tem como objetivo fomentar o desenvolvimento científico e tecnológico, e coloca ao alcance dos pesquisadores do Brasil e do exterior uma moderna infraestrutura para utilização da luz síncrotron em diversas áreas. Nele existem estações experimentais que recebem fótons de radiação ultravioleta, raios X moles (até 15 keV), e raios X duros (faixa de 15 a 23 keV). Periodicamente, cientistas de todo mundo submetem propostas de pesquisa para utilizarem os recursos concentrados no LNLS.

No apêndice B são abordados mais detalhadamente assuntos relativos à espectrometria por fluorescência de raios X por reflexão total usando luz síncrotron, incluindo o desenvolvimento da análise quantitativa, assim como as principais características dos equipamentos que compõem a linha de luz síncrotron utilizada.

Capítulo 4

MATERIAIS E MÉTODOS

Neste capítulo são apresentados os processos envolvidos na obtenção dos dados experimentais, tais como a coleta das amostras dos pacientes envolvidos na pesquisa, a descrição da preparação das amostras para análise, bem como também as características da instrumentação da linha de fluorescência de raios X (XRF) do LNLS.

4.1- Coleta das amostras

Foi analisado um total de 64 amostras pareadas de pele sadia e com lesão coletadas, cada par obtido de um mesmo paciente. Ambos os sexos foram avaliados, e suas idades variaram entre 20 e 89 anos, e as amostras aproveitadas foram daqueles que relataram não terem feito uso recente de medicamentos ou cosméticos tópicos nas áreas das lesões, com exceção de apenas um paciente. Em dois pacientes foram retirados mais de um par de amostras como relatado adiante na apresentação dos resultados relativos à lesão pólipó fibroepitelial. Todas as extrações de tecidos nos pacientes foram realizadas pela mesma médica assessorada por duas enfermeiras treinadas para garantir o cumprimento das exigências éticas da pesquisa e para que se evitasse contaminação nas amostras.

Todos os instrumentos que entraram em contato com as amostras foram lavados com solução de HNO_3 a 10% e enxaguados com água ultrapura. Após a extração, as amostras de tecido saudável e com lesão foram lavadas com água ultra pura Milli-Q de $18,2\text{M}\Omega$ e acondicionadas em tubos diferentes para que, posteriormente, as suas composições pudessem ser analisadas e comparadas. Os tubos estéreis e selados contendo as amostras foram armazenados a temperaturas inferiores a -5°C .

A etapa seguinte foi submeter as amostras, ao mesmo tempo, mas em dois lotes, ao processo de liofilização em ambiente livre de contaminação de forma a reproduzir as condições de secagem. As massas das amostras liofilizadas variaram de $0,9\pm 0,1$ e $18,4\pm 0,1$ mg. As menores quantidades estão relacionadas às amostras de controle, ou seja, as de tecidos saudáveis.

4.2- Preparação das amostras

A análise da composição elementar por meio da técnica SRTXRF requer que as amostras de tecidos liofilizados estejam na forma de um filme fino depositadas sobre uma superfície com propriedades favoráveis à reflexão total do feixe colimado de luz síncrotron. Por esse motivo foi necessário submetê-las ao processo de digestão ácida. Para tal, foi adicionado ácido nítrico (HNO₃) Suprapur a 65% aos tubos das amostras na razão aproximada de 7:1 em massa e levados a estufa a 60 °C até que a digestão tenha se completado.

Após a digestão, as amostras foram imediatamente diluídas em água Milli-Q para que se obtivesse 50, 100, 150 ou 500 µg, dependendo das suas massas iniciais e focando em obter soluções com o mesmo grau de diluição. A homogeneização foi feita por um agitador magnético automático.

Em seguida, alíquotas de uma solução padrão de gálio foram adicionadas de forma a se obter uma concentração final de aproximadamente 2,0 µg.g⁻¹ em cada amostra diluída, valor escolhido como referência baseado na mesma ordem de magnitude da concentração de Zn na pele humana (**KURZ *et al.*, 1987** e **GOOLAMALI *et al.*, 1973**).

Com o objetivo de se obter um filme fino sobre o refletor, um volume de 5 µL de cada solução, ou seja, que contém as amostras digeridas com ácido, diluídas em água e com o padrão de Ga já inserido, foi depositado sobre o centro da superfície de um refletor constituído de placa retangular polida constituída de resina acrílica de com dimensões de 30x20x2 mm³. Todos os refletores do experimento foram secados em estufa a 60°C e acondicionados em porta-amostra selado individual para isolá-los do meio externo e evitar contaminações acidentais.

Cada amostra foi avaliada em triplicata. Os valores das concentrações em cada amostra obtidos na tese são, portanto, a média dessas triplicatas.

Optou-se por não se utilizar pipetas para medidas de volumes de ácido, água e soluções, mesmo aquelas mais precisas com divisões de 0,1 µL. Isto porque foi verificado que volumes pipeta da ordem de 5,0 µL de água acusavam variações da ordem de até 22% quando checados pela balança de precisão. Em substituição às pipetas foi utilizada uma balança da marca Sartorius com precisão de 0,1 mg pertencente ao

Laboratório de Química de Apoio ao usuário do LNLS. Portanto, a balança de precisão foi utilizada em todas as medições em substituição às de volume, mas considerando-se as massas específicas das substâncias envolvidas.

O levantamento da composição do branco, denominação que se dá à composição elementar de todas as substâncias que entram em contato com a amostra, com exceção da própria amostra, ou seja, do refletor, da água e do ácido nítrico, foi realizado seguindo-se exatamente os mesmos procedimentos usados na preparação das amostras de tecidos.

Os refletores contendo os brancos foram preparados de acordo com a faixa de massa das amostras de modo a reproduzir fielmente o experimento. A tabela 4.1 mostra os valores aproximados adicionados às amostras.

Tabela 4.1- Parâmetros utilizados na composição dos brancos do experimento.

Branco	Massas (mg)	Água/amostra (mg)	HNO₃ a 10% (mg)	Água (mg)	Ga de 10 µg.g⁻¹ (mg)
Br-4	0,9	1,0	4,0	15,0	4,0
Br-7	1,0 a 1,9	2,0	7,0	30,0	8,0
Br-28	2,0 a 7,0	4,0	28,0	120,0	32,0
Br-80	8,8 a 15,4	15,0	80,0	300,0	80,0
Br-140	18,0	30,0	200,0	600,0	160,0

Os brancos do experimento foram preparados da mesma forma que as amostras, mas, para cada solução foram confeccionados cinco refletores.

4.3- Arranjo experimental

A figura 4.1 mostra a foto do experimento onde um refletor de Lucite contendo a amostra é posicionado entre o feixe de luz síncrotron e o detector HPGe no LNLS.

Os espectros de fluorescência foram obtidos em um tempo de 100 s fazendo incidir sobre os refletores com as amostras um feixe branco com intervalo de energia entre 4 a 20 keV. Foi utilizado um detector HPGe com uma resolução de 140eV a 5,9 keV e a distância amostra-detector foi de 50 mm. A posição ideal para se obter o melhor o espectro possível foi conseguida através da variação do ângulo de incidência do feixe em incrementos de 10 µrad e foi ajustado a cerca de 1 mrad, menor do que o ângulo

crítico de reflexão total para a interface ar-Lucite. Essa etapa da pesquisa foi realizada na linha de luz síncrotron D09B-XRF do LNLS em Campinas (**PEREZ *et al.*, 1999**).

Ao escolher um tipo de refletor deve-se observar características tais como superfície maciça e plana, ser de material quimicamente inerte e livre de impurezas, a disponibilidade/custo e garantir que nenhum pico de fluorescência de raios X originado a partir de sua constituição ocorra na faixa de energia de interesse. Por isso optou-se por refletores de Lucite em forma de placas finas e retangulares, mostrado na figura 4.1.

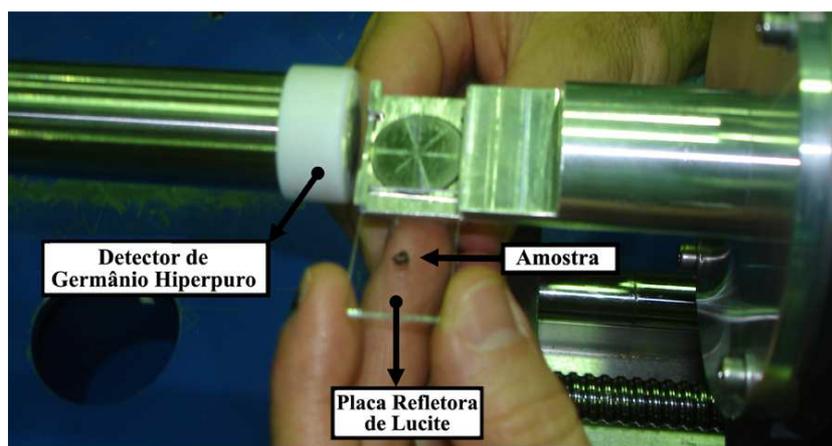


Figura 4.1- Porta-amostra da técnica SRTXRF do LNLS.

A concentração de cada elemento foi determinada em relação ao pico interno de gálio inserido nas amostras como referência, e cuja concentração era bem conhecida, também se considerando os brancos do experimento e as correções de massa. O teste t de Student com nível de significância $\alpha = 0,05$ foi utilizado para identificar diferenças de concentração entre as amostras de controle e de lesão.

As concentrações obtidas diretamente a partir das medidas experimentais correspondiam não somente aos tecidos de pele e lesões, mas às soluções onde elas estavam diluídas, resultado do processo de preparação das amostras. Portanto, elas representavam a concentração considerando-se todo o conteúdo do tubo que as continha incluindo ácido nítrico, água ultrapura e o padrão de Ga. Por isso, também foi necessário se fazer a correção em massa de maneira a obter a concentração absoluta de cada elemento correspondente somente à massa da amostra liofilizada.

O sistema de detecção experimental da SRTXRF é mostrado na figura 4.2. Na base desse arranjo está representado o porta-amostra, mas, o dispositivo real do LNLS é mostrado na figura 4.1. Esse sistema consiste de um mecanismo que permite movimentos de elevar ou abaixar a amostra em relação ao feixe de luz síncrotron com

uma resolução espacial de 0,5 μm , bem como variar o ângulo de incidência da luz síncrotron sobre a amostra em cima do refletor com resolução angular de aproximadamente de 10 μrad . Este sistema permite ajustar de forma eficiente a posição e o ângulo ideais para que aconteçam a reflexão total, a fluorescência resultante e sua detecção. O controle deste mecanismo é realizado por motores de passo. O posicionamento do feixe sobre a amostra é monitorada por uma câmara CCD cuja imagem é mostrada em vídeo.

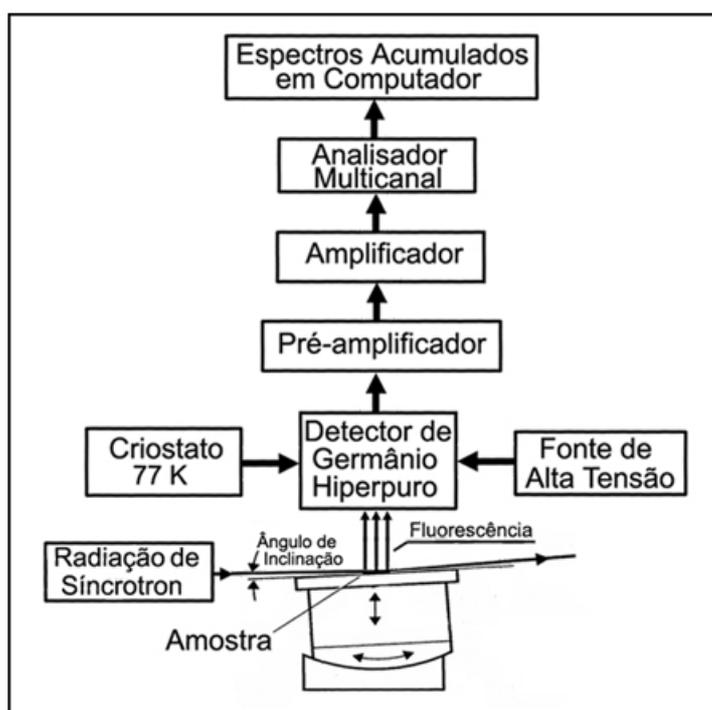


Figura 4.2- Diagrama do sistema de aquisição de espectros da técnica SRTXRF

O sistema eletrônico de detecção é composto por módulos que consistem, basicamente, de um detector de HPGe resfriado à temperatura do nitrogênio a partir do qual se obtêm espectros de energia dos fótons provenientes da fluorescência de raios X. Em seguida, um computador armazena os espectros para posterior análise. Mais especificamente, o programa QXAS da AIEA foi usado para fazer a identificação dos picos de fluorescência, identificar o elemento correspondente, ajustar os espectros e determinar as contagens líquidas acima do *background* sob os fotopicos (BERNASCONI at al., 1996).

A tabela 4.2 mostra as características do sistema de detecção utilizado no levantamento dos dados. Dentre as possibilidades de escolha da energia do feixe, de 4 a 20 keV, foi utilizado um feixe branco com energia máxima em torno de 20 keV.

Tabela 4.2- Características do sistema de detecção do LNLS

INSTRUMENTAÇÃO	SRTXRF
Feixe (faixa de energia)	Branco (de 4,0 a 20 keV)
Absorvedor de Al	0,75 mm
Colimador de Ta	1,0 mm
Distância amostra-detector	50 mm
Detector (resolução)	HpGe (140 eV à 5,9 keV)
Altura do feixe	0,2 mm
Largura do feixe	5,0 mm
Ângulo de Incidência	1,0 mrad
Deslocamento angular	10 μ rad
Pressão na câmara	1 atm

O Lucite foi escolhido por ser um material barato, que se obtém com facilidade no mercado e pode ser descartado após o uso. Possui um coeficiente de reflexão de aproximadamente 99,8 % e contém apenas hidrogênio, carbono e oxigênio. Esses refletores são comprados com as faces recobertas por uma película de proteção contra contaminações e arranhões.

Depois de retiradas as películas protetoras, os refletores foram preparados para uso tendo sido lavados em água com detergente, enxaguados, imersos em banho de ácido nítrico Suprapur a 10% e novamente enxaguados com água Milli-Q por duas vezes. A secagem foi feita em estufa a 50 °C.

4.4- Curva de sensibilidade

Na técnica SRTXRF, as amostras devem formar um filme bastante fino sobre o refletor e, portanto, os efeitos de auto-absorção são desprezados no cálculo das concentrações. Assim, a área sob o pico de fluorescência de raios X é uma relação linear entre a concentração do elemento *i* e a sensibilidade do sistema experimental para esse elemento.

A sensibilidade pode ser determinada usando-se soluções padrão com concentrações bem determinadas. É desejável que a solução, contendo esses elementos em baixa concentração, na faixa de $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$, emitam os fótons de fluorescência de raios X com energias não muito próximas de maneira a para se evitar a sobreposição de picos.

Para aprimorar o levantamento da curva de sensibilidade da técnica SRTXRF, adiciona-se um elemento que serve como padrão interno à amostra para minimizar influências de fatores geométricos, flutuações do sistema de detecção dos raios X da fluorescência e de outros possíveis desvios operacionais. O elemento Ga foi usado como padrão interno por não fazer parte da composição das amostras analisadas.

Devido à forte correlação existente entre a sensibilidade de detecção e o número atômico dos elementos, é possível se estimá-la para os elementos detectados nas amostras, porém não contidos nas soluções padrão de forma a se obter as concentrações elementares. Esses resultados são mostrados na tabela 5.1.

A curva de sensibilidade do sistema SRTXRF para as linhas K foi determinada utilizando três soluções padrões com quatro elementos acrescidos do elemento Ga, usado como padrão interno. As soluções foram preparadas a partir de soluções monoelementares padrão ICP e rastreadas pelo SRM-NIST (*Standard Reference Materials - National Institute of Standards & Technology*).

Os valores de sensibilidades foram calculados a partir das medidas de intensidade da radiação de fluorescência obtidas para cada elemento e suas respectivas concentrações.

Foram preparadas três soluções denominadas mono I, II e III, mostradas, respectivamente, nas tabelas 4.3, 4.4 e 4.5.

Tabela 4.3- Composição da solução mono I

Elementos	Concentrações ($\mu\text{g.g}^{-1}$)
Sc	150
Cr	25
Ni	8
Ge	6
Ga	5

Tabela 4.4- Composição da solução mono II

Elementos	Concentrações ($\mu\text{g.g}^{-1}$)
K	400
Tl	80
Fe	10
Zn	6
Sr	30
Ga	50

Tabela 4.5- Composição da solução mono III

Elementos	Concentrações ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$)
Ca	300
V	25
Cu	8
Rb	6
Ga	5

Além dessas três soluções, foram preparadas soluções individuais com os elementos P e S:

- a- **P**: 1000 μL de P com 50 μL de Ga, ambas soluções à 1000 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$
- b- **S**: 1000 μL de S com 50 μL de Ga, ambas soluções à 1000 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$

Todas as soluções foram preparadas de forma a obter concentrações finais de todos os elementos, em média, da mesma ordem de grandeza que aquelas encontradas nos tecidos analisados. Todas as amostras para a sensibilidade foram medidas em cinco repetições.

4.5- Amostra de referência

Visando determinar os limites mínimos de detecção dos elementos, verificar a qualidade da metodologia no preparo das amostras e avaliar a precisão do sistema SRTXRF, foram analisados refletores preparados a partir de 50 mg de uma amostra de fígado bovino certificada (NIST 1577b) e cujo preparação se deu exatamente nas mesmas condições que as das amostras estudadas, ou seja, ácido adicionado na razão de 7:1, grau de diluição, etc. Esses resultados são mostrados no item 5.2.

Capítulo 5

APRESENTAÇÃO DOS RESULTADOS

Um dos principais objetivos desta pesquisa foi buscar diferenças entre as concentrações de alguns elementos químicos entre amostras de tecidos sadio e com lesão. A intenção ao se optar por utilizar amostras de controle e com lesão pertencentes ao mesmo paciente era a de minimizar os efeitos de componentes individuais dos pacientes tais como, alimentação, idade, uso de remédios ou suplementos alimentares e mesmo fatores ambientais.

As concentrações absolutas foram determinadas com auxílio dos espectros de fluorescência obtidos pela técnica SRTXRF. Os valores foram calculados considerando-se a área sob cada pico de fluorescência, acima da linha de *background*, correspondente à emissão de cada elemento presente na amostra. Posteriormente, os resultados foram relacionados à concentração conhecida do padrão interno de Ga, valores os quais foram corrigidos pela massa e também se considerando os brancos do experimento.

Como os resultados dos cálculos eram referentes à concentração do volume total no tubo de ensaio que continha a massa da amostra diluída em ácido nítrico, água e o padrão de gálio, foi necessário se fazer a correção em massa para se obter concentrações absolutas, ou seja, somente na amostra de tecido.

Todos os valores apresentados são expressos em $\mu\text{g.g}^{-1}$. Eles representam as concentrações absolutas. Os erros e as barras de erro apresentados nas tabelas e gráficos representam um intervalo de confiança (IC) de 95%. Esta escolha foi devida ao uso do teste t de Student com significância também de 95%. Esses cálculos foram executados com as ferramentas de estatística descritiva do programa Excel 2007 da Microsoft Office.

5.1- Cálculo da sensibilidade relativa e a estabilidade do sistema

No levantamento da sensibilidade relativa ($S_{r,i}$) foram utilizadas soluções monoelementares para linha de fluorescência K apropriadas à técnica **SRTXRF**.

Os valores das sensibilidades relativas foram obtidos a partir da concentração do padrão interno de Ga nas amostras padrão, juntamente com a intensidade relativa de

cada elemento ($I_{r,i}$) das soluções monoelementares. Uma vez determinada a $S_{r,i}$ para cada elemento presente nas soluções padrão fez-se um ajuste de uma curva tornando possível determinar os valores de $S_{r,i}$ para os demais elementos.

A análise das amostras foi realizada em duas ocasiões, em maio e em setembro de 2010, o que tornou necessário o levantamento da sensibilidade relativa em ambos os períodos. A tabela 5.1 mostra as sensibilidades para a linha K dos elementos presentes nas soluções padrão, aos quais foram realizados ajustes polinomiais.

Tabela 5.1- Sensibilidades relativas usadas para o ajuste da curva de sensibilidade.

Elemento	$S_{r,i}$ de maio/2010	$S_{r,i}$ de set/2010
P	0,00045	0,00083
S	0,00123	0,00219
K	0,01885	0,01211
Ca	0,03396	0,02669
Mn	0,27972	0,28790
Fe	0,38749	0,33170
Co	0,50928	0,41706
Ni	0,64091	0,53740
Cu	0,71784	0,67922
Zn	0,80667	0,82378
Ga	1	1
Sr	0,22999	0,31224
Mo	0,05601	0,05811

A figura 5.1 mostra uma curva da sensibilidade relativa ajustada aos dados experimentais.

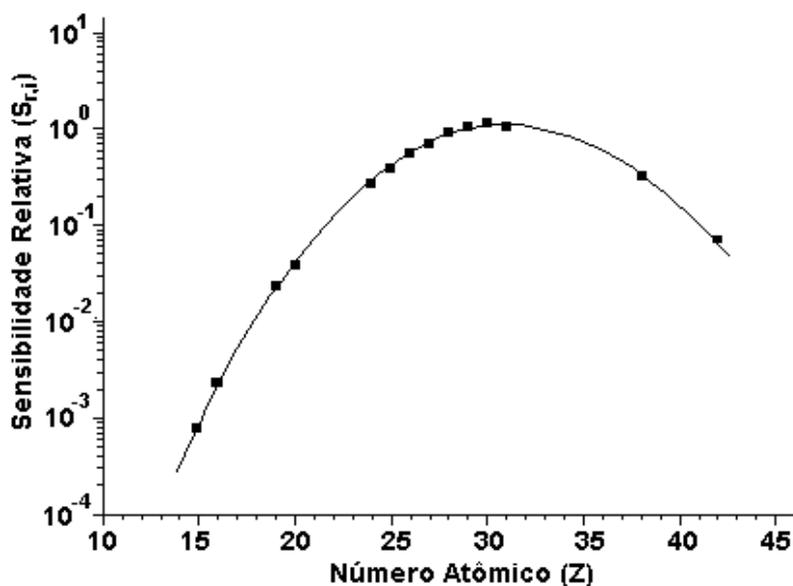


Figura 5.1- Curva de sensibilidade relativa da técnica SRTXRF

Os pontos no gráfico foram obtidos com auxílio de soluções padrão monoelementares em setembro de 2010 para o intervalo de números atômicos de interesse. A curva de sensibilidade do período anterior foi suprimida por ser muito semelhante. A equação do ajuste polinomial à curva de sensibilidade é:

$$Y = 2.10^{-7} X^6 - 4.10^{-5} X^5 + 0,0021 X^4 - 0,0603 X^3 + 0,919 X^2 - 6,952 X + 20 \quad (5.1)$$

onde o coeficiente de ajuste é $R^2 = 0,989$

5.2- Amostra de referência: precisão e limite mínimo de detecção

Nas análises a seguir, foram confeccionados seis refletores (N=6) e o tempo de acumulação dos espectros foi de 1000 segundos.

5.2.1- Precisão do sistema SRTXRF

A precisão do sistema foi obtida após análise de 50 mg de uma amostra certificada de fígado bovino, denominada NIST 1577b, preparada exatamente como as amostras estudadas. Na tabela 5.2 são apresentados os valores certificados, os obtidos experimentalmente e o erro relativo entre esses dois valores.

Tabela 5.2- Concentrações certificadas de fígado bovino e as obtidas na tese.

Elemento	Concentração ($\mu\text{g.g}^{-1}$)		Erro relativo
	Valor certificado	Valor medido	
P (%)	1,10 ± 0,03	1,08 ± 0,16	0,02
S (%)	0,785 ± 0,006	0,81 ± 0,07	0,03
K (%)	0,994 ± 0,02	1,01 ± 0,12	0,01
Ca	116 ± 4	127 ± 58	0,09
Mn	11 ± 2	9 ± 1	0,18
Fe	184 ± 15	171 ± 7	0,07
Cu	160 ± 8	166 ± 6	0,04
Zn	127 ± 16	139 ± 8	0,09
Rb	14 ± 1	11 ± 2	0,21

Os valores obtidos indicam um bom ajuste para a curva de calibração da técnica SRTXRF. Os erros relativos foram inferiores a 10% para a maioria dos elementos, com exceção do Rb e Mn, não presentes nas amostras, com desvios de 21% e 18 %.

As análises das amostras de fígado bovino foram realizadas com o objetivo de se avaliar a repetibilidade e reprodutibilidade do sistema de detecção da técnica SRTXRF.

O coeficiente de variação (CV=desvio padrão/média) oscilou no intervalo entre 1% e 14%, considerado satisfatório.

5.2.2- Limite mínimo de detecção (LMD)

Os valores dos limites de detecção foram obtidos pela análise das amostras de fígado e calculados com base na equação B.37 do apêndice B (STRELI, *et al.*, 2008):

$$\text{LMD} = 3\sqrt{N_B} \frac{C_i}{N_i} \quad (\text{B.37})$$

onde: N_B é o *background* sob o pico de fluorescência do elemento i na amostra,

C_i é a concentração do elemento i em uma amostra certificada, e

N_i é a intensidade da fluorescência relativa ao elemento i na amostra.

Na tabela 5.3, são apresentados os valores dos limites mínimos de detecção (LMD) e, na figura 5.2, a curva correspondente. O tempo de contagem foi de 1000 segundos.

Tabela 5.3- Limites mínimos de detecção do experimento.

Elemento	LMD (ng.g ⁻¹)
P	16000
S	5700
K	490
Ca	240
Mn	56
Fe	46
Cu	76
Zn	65
Rb	34

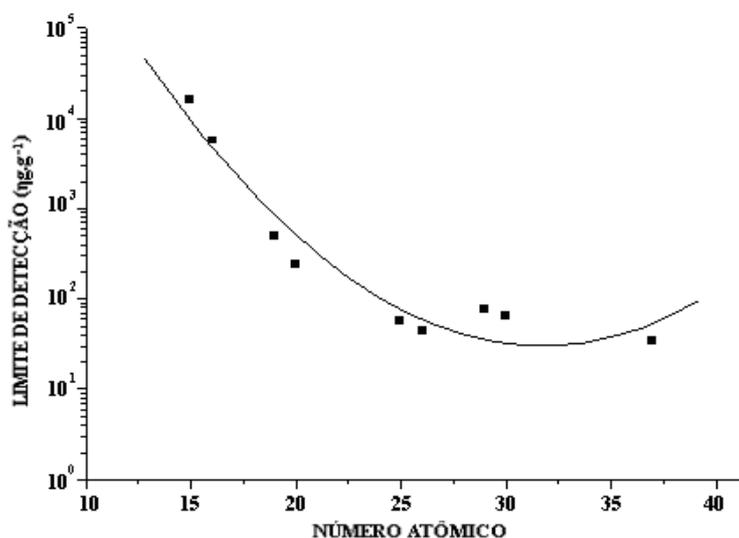


Figura 5.2- Limite de detecção em amostras de fígado bovino.

Os demais valores de LMD da série K para qualquer elemento podem ser obtidos da equação 5.1 ajustada aos pontos do gráfico da figura (5.2):

$$\text{LOG(LMD)} = 10,436 - 0,565 Z + 0,009 Z^2 \quad (5.2)$$

onde o coeficiente de ajuste da curva é $R^2 = 0,93$

5.3- Médias das concentrações elementares

A figura 5.3 compara dois espectros de amostra pareada obtidos por SRTXRF.

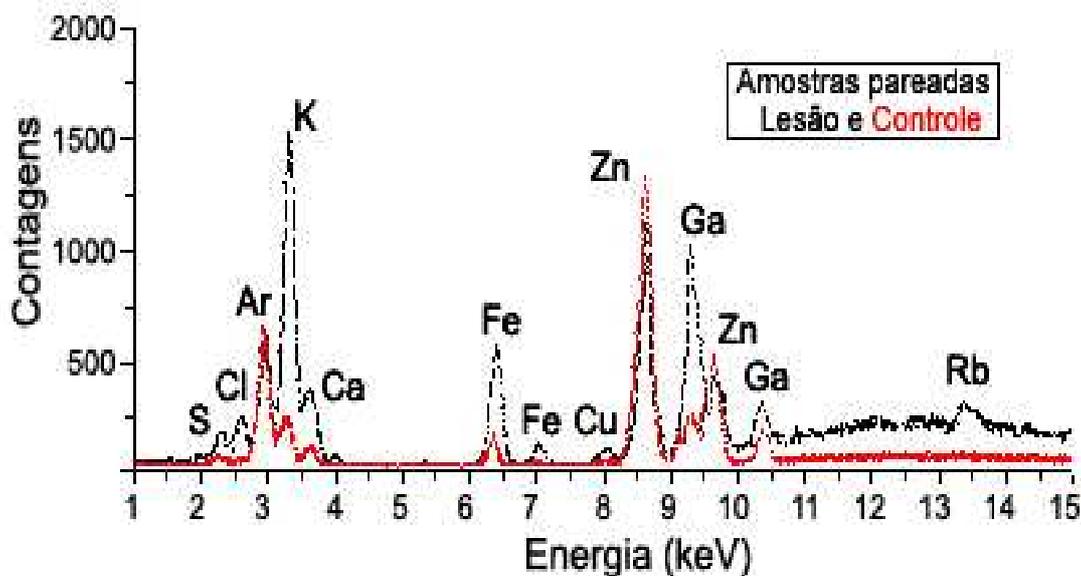


Figura 5.3- Comparação entre espectros de fluorescência de raios X

5.3.1- Composição média da pele normal dos pacientes doadores

Foram calculadas as médias das concentrações elementares nas amostras de tecidos normais de 60 de um total de 62 pacientes que participaram da pesquisa, sendo que dois casos serão apresentados separadamente. Na tabela 5.4 são comparadas aos valores obtidos pela técnica PIXE.

Tabela 5.4- Concentrações obtidas na tese para a pele sadia \pm IC=95% (N=60) comparadas às obtidas por PIXE (N=9)^(*).

Elementos	Concentração ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$)	Concentração ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$)
P	3089 ± 1137	12500 ± 4300
S	9727 ± 2461	11400 ± 900
K	7085 ± 2114	8900 ± 2200
Ca	2379 ± 859	---
Fe	218 ± 78	240 ± 225
Cu	9 ± 3	$8,3 \pm 0,6$
Zn	88 ± 34	77 ± 22
Rb	16 ± 7	---

^(*) (KURZ *et al.*, 1987)

Na última coluna da tabela 5.4 constam valores de concentrações obtidos pela técnica PIXE (emissão de raios X induzida por prótons) para a pele sem lesões realizados por **KURZ *et al.* (1987)**. A maioria dos resultados das concentrações de pele normal encontrados na tese, por meio da SRTXRF, está fora dos intervalos de valores descritos na literatura se comparados aos resultados obtidos por outras técnicas analíticas tais como ativação com nêutrons (**MOLOKIA *et al.*, 1969**), espalhamento Compton de raios X (**SPELLER *et al.*, 1999**), DXS (diagnóstico por espectrometria de raios X *in vivo*) (**GORODETSKY *et al.*, 1986**). Entretanto, em sua maioria, são de mesma ordem de grandeza quando a técnica TXRF é utilizada no estudo de lesões de pele (**THEODORAKOU *et al.*, 2008**). Em favor da SRTXRF tem-se a inserção de um padrão interno de Ga nas amostras com concentração bem conhecida.

5.3.2- Composição da pele normal e com ceratose seborrêica

Nessa análise foram avaliadas 30 amostras pareadas de 30 pacientes. No item 5.4 é apresentado em separado um caso extra de uso de fármaco sobre a lesão.

A tabela 5.5 mostra a concentrações dos elementos identificados nas amostras de controle e de lesão, onde, nas áreas sombreadas, estão destacadas as concentrações dos elementos identificados como significativamente diferentes.

Tabela 5.5- Concentrações nas amostras de controle e de ceratose seborrêica \pm IC=95% e N=30

Elementos	Amostras de Controle ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$)	Amostras de Lesão ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$)
P	3269 \pm 796	3291 \pm 723
S	10686 \pm 2.381	9266 \pm 1.856
K	6607 \pm 1582	8384 \pm 1746
Ca	2257 \pm 404	1531 \pm 343
Fe	239 \pm 46	130 \pm 26
Cu	11 \pm 2	6 \pm 2
Zn	94 \pm 15	91 \pm 18
Rb	12 \pm 4	15 \pm 3

A análise dos dados por meio do teste t de Student com significância de 0,05 revelou que apenas os valores médios das concentrações de K, Ca, Fe e Cu entre as amostras de controle e de lesão são significativamente diferentes. A figura 5.4 mostra uma comparação entre essas concentrações.

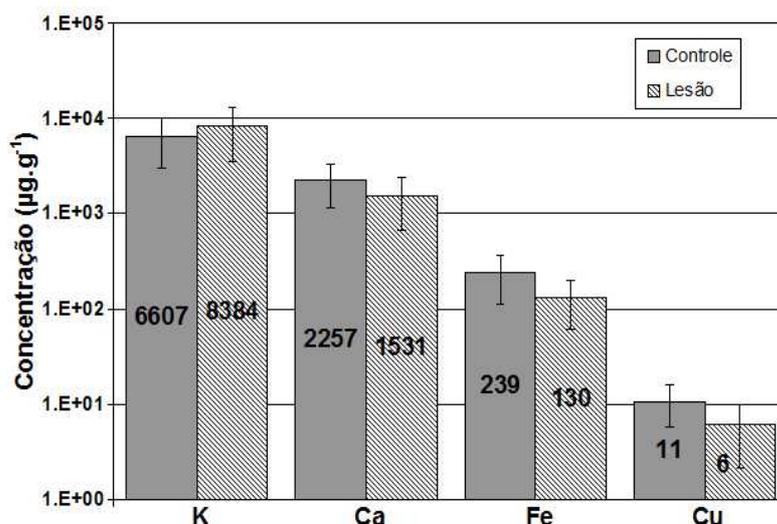


Figura 5.4- Concentrações significativamente diferentes entre pele normal e ceratose seborrêica ($p < 0,05$ e $N=30$).

O elemento K, o principal cátion dentro do fluido intracelular, mostrou níveis mais elevados em amostras de lesão ceratose seborrêica em relação à pele sadia. Isto sugere que a concentração de K no interior das células lesionadas, grandes queratinócitos, é mais elevada. Essa é a principal característica dessa doença encontrada aqui e que, até então, para esta lesão, ainda não havia sido relatada na literatura.

Relatos de diferenças nos níveis de K entre tecidos sadios e lesões não são frequentes. No caso de câncer de mama sua concentração é apenas levemente aumentada. Nos rins, pulmão e cânceres da próstata seus níveis são praticamente os mesmos, mas, na cirrose hepática (THEODORAKOU *et al.*, 2008) e, na psoríase, mais baixos (KURZ K. *et al.*, 1987, WERNER-LINDLE Y. *et al.*, 1998).

As concentrações de Ca estimadas aqui são compatíveis com o método XRF na literatura (THEODORAKOU *et al.*, 2008). Do mesmo modo, a diminuição de sua concentração nas lesões, em relação aos tecidos normais, já havia sido descrita em pele psoriática (KURZ K. *et al.*, 1987). O Ca, assim como o equilíbrio entre este íon e o Zn, é amplamente reconhecido por desempenhar um papel importante na apoptose, a morte celular programada (BARR *et al.*, 1994 e DEMAUREX *et al.*, 2003).

Os níveis mais elevados de Fe nas amostras de controle podem ser explicados, em parte, por sua maior presença porcentual na derme papilar, mais irrigada e com maior presença de sangue que tem hemoglobina, rica em Fe.

As concentrações de Cu foram menores nas lesões que na pele normal, o que é compatível com resultados publicados sobre doenças cutâneas psoríase e lesões malignas. O Cu está envolvido na síntese de hemoglobina, melanina, e elastina, e é um cofator de enzimas por parte de alguns citocromos na respiração celular. Auxilia na síntese de fosfolípido, de metabolismo de proteínas, de oxidação vitamina C e na formação de RNA (KURZ K. *et al.*, 1987 e WERNER-LINDLE Y. *et al.*, 1998).

5.3.3- Composição de pele normal e com pólipo fibroepitelial

No caso das lesões do tipo pólipo fibroepitelial, as concentrações dos elementos identificados como significativamente diferentes foram avaliadas sobre um total de 17 amostras retiradas de 15 pacientes. Em dois pacientes foram tiradas duas amostras da mesma lesão, porém de locais diferentes. No primeiro paciente, cujas amostras foram identificadas como 42L e 43L, foram colhidas lesões da axila e pescoço, e, no segundo, cujas amostras foram identificadas como 66L1 e 66L2, do pescoço e ombro, respectivamente.

A tabela 5.6 mostra a média das concentrações dos elementos identificados nas amostras de controle e da lesão. Uma análise dos dados por meio do teste t de Student ($p=0.05$) revelou que apenas os valores médios das concentrações de P, Ca, Fe e Cu são significativamente diferentes, mostrados na área sombreada.

Tabela 5.6- Concentrações nas amostras de controle e de pólipo fibroepitelial \pm IC=95%, $N_{\text{CONTR.}}=15$ e $N_{\text{LESÃO}}=17$.

Elemento	Controle	Lesão
P	2967 \pm 904	3755 \pm 951
S	8318 \pm 2282	8922 \pm 1896
K	9939 \pm 2674	11417 \pm 3190
Ca	2313 \pm 795	999 \pm 262
Fe	233 \pm 66	149 \pm 29
Cu	8 \pm 2	5 \pm 1
Zn	79 \pm 21	68 \pm 21
Rb	22 \pm 9	19 \pm 4

Uma comparação entre as médias das concentrações entre amostras de controle e da lesão é mostrada na figura 5.5.

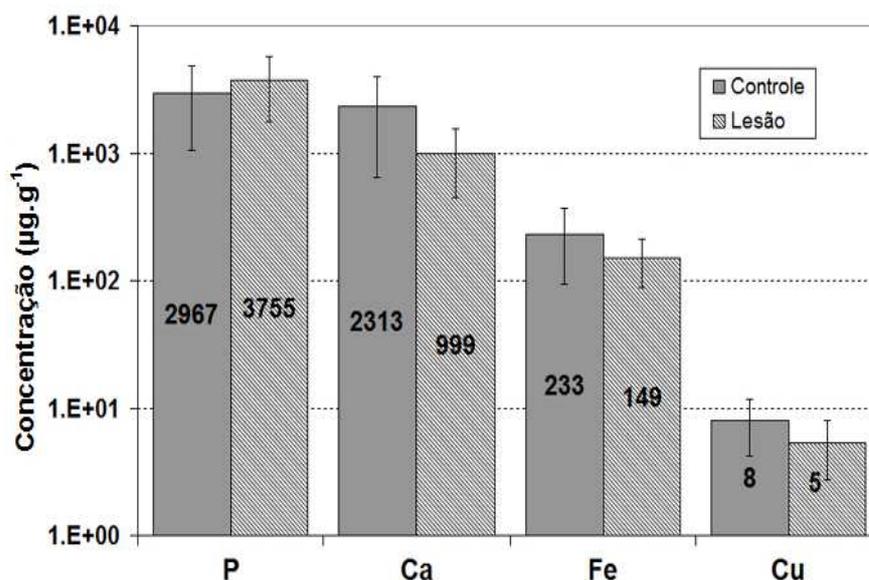


Figura 5.5- Concentrações significativamente diferentes entre amostras de pele normal e pólipó fibroepitelial ($p < 0,05$ e $N=17$).

Os níveis de P nas lesões mostraram-se superiores aos estimados nas amostras de controle, de tecido sadio. Os compostos que possuem o P em sua composição estão envolvidos em funções vitais no organismo, tais como a formação de substâncias fundamentais para a construção de DNA e RNA (DEMAUREX *et al.*, 2003). Além disso, as células usam o P para estocar e transportar energia em forma de ATP (trifosfato adenosina), uma molécula que é indispensável à vida da célula, encontrado universalmente nos sistemas vivos, cuja função essencial é armazenar energia para as atividades vitais básicas das células, ou seja, armazenar energia química para várias atividades celulares. Além disso, constitui um importante elemento do protoplasma e do tecido nervoso.

Entretanto, para validar os valores mais altos encontrados na tese, e também por causa da baixa sensibilidade da SRTXRF para o P, serão necessárias investigações adicionais. Por exemplo, utilizando novamente esta técnica, mas, ajustada para detecção à vácuo de elementos de baixo número atômico (PEREZ *et al.* 1999, LEITÃO *et al.* 2009).

O elemento K, embora levemente mais aumentado nas amostras de pólipó fibroepitelial em relação às amostras de controle, não apresentou diferenças significativas entre as concentrações de amostras de controle e de lesão pelo teste t de Student, como aconteceu nas outras três lesões aqui estudadas.

As concentrações de Ca estimadas são compatíveis com as publicadas na literatura obtidas pelo método de fluorescência de raios X. Do mesmo modo, a diminuição da sua concentração em lesões em relação aos tecidos normais é exatamente como descrita no item 5.3.2 no caso da ceratose seborrêica.

Os níveis mais elevados de Fe nas amostras de controle, como no caso da ceratose seborrêica, podem ser explicados, em parte, por sua maior presença porcentual na derme papilar, mais irrigada e com maior presença de sangue, rico em Fe. Praticamente a mesma quantidade deste elemento foi encontrada em ambos os casos.

A concentração de Cu no caso do pólipo fibroepitelial mostrou-se menor nas lesões do que no tecido sadio, o que é compatível com resultados para lesões cutâneas de psoríase (**KURZ K. et al., 1987**, **WERNER-LINDLE Y. et al., 1998**) e lesões malignas descritos na literatura (**GORODETSKY et al., 1986**), e também com os resultados aqui encontrados para a ceratose seborrêica.

5.3.4- Composição da pele normal e com hemangioma rubi

No caso lesão hemangioma rubi, foram colhidas 12 amostras de um total de 12 pacientes. Os resultados de um desses 12 pacientes serão apresentados separadamente no item 5.4 que trata de influências exógenas. As médias das concentrações dos elementos presentes nas amostras foram calculadas considerando apenas 11 pacientes.

O paciente número 33 foi excluído do cálculo dessas médias, cujas amostras foram analisadas em separado devido às concentrações extremamente elevadas da maioria dos elementos nas amostras correspondentes somente à lesão, possivelmente devido à algumas particularidades detectadas na anamnese e que serão relatadas, tais como consumo de suplementos e alimentos.

A tabela 5.7 mostra as concentrações dos elementos identificados nas amostras de controle e da lesão. Uma análise dos dados por meio do teste t de Student ($p= 0.05$) revelou que apenas os valores médios das concentrações de P, K, Ca, Fe e Cu são significativamente diferentes, mostrados na área sombreada.

Como na lesão pólipo fibroepitelial, os níveis de P nas lesões hemangioma rubi mostraram-se superiores aos estimados nas amostras de controle, de tecido sadio.

As concentrações de Ca, seguindo a tendência mostrada nas análises das lesões ceratose seborrêica e pólipos fibroepiteliais, também decresceram nas amostras de lesão, assim como também o K, com concentrações mais altas na lesão.

Com relação às concentrações de Fe nas amostras de lesão do hemangioma rubi, aconteceu o contrário do verificado nas análises das lesões ceratose seborrêica e pólipos fibroepiteliais. Ao invés da concentração de Fe decrescer nas amostras de lesões, ele está mais presente.

Tabela 5.7- Concentrações nas amostras de controle e de hemangioma rubi \pm IC=95% e N=11.

Elemento	Amostras de Controle ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$)	Amostras de Lesão ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$)
P	2888 \pm 996	4004 \pm 1.247
S	9376 \pm 2.767	10982 \pm 2.603
K	5180 \pm 1.905	7642 \pm 1.763
Ca	2742 \pm 1.159	1397 \pm 591
Fe	187 \pm 59	309 \pm 88
Cu	7 \pm 2	5 \pm 1
Zn	90 \pm 30	65 \pm 11
Rb	15 \pm 6	19 \pm 3

A figura 5.6 mostra uma comparação entre as médias das concentrações entre amostras de controle e da lesão.

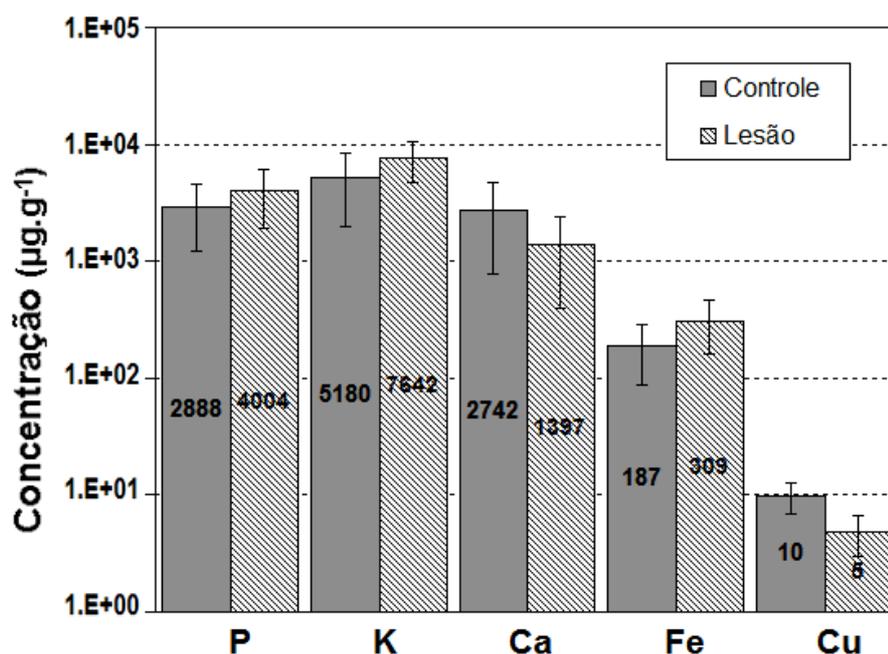


Figura 5.6- Concentrações significativamente diferentes entre amostras de pele normal e com hemangioma rubi ($p < 0,05$ e $N = 11$).

5.3.5- Composição da pele normal e com dermatose papulosa nigra

Foram colhidas 4 pares de amostras da lesão dermatose papulosa nigra de um total de 4 pacientes. A tabela 5.8 mostra as médias concentrações dos elementos identificados nas amostras de controle e da lesão.

Tabela 5.8- Concentrações nas amostras de controle e de dermatose papulosa nigra \pm IC de 95% e N=4.

Elemento	Amostras de Controle ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$)	Amostras de Lesão ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$)
P	2757 \pm 1629	5071 \pm 1956
S	8782 \pm 1760	12714 \pm 3229
K	5220 \pm 4581	8921 \pm 8142
Ca	2545 \pm 1373	1877 \pm 774
Fe	88 \pm 60	130 \pm 25
Cu	9 \pm 5	9 \pm 4
Zn	65 \pm 20	106 \pm 83
Rb	19 \pm 9	12 \pm 8

O teste t de Student ($p= 0.05$) identificou diferença significativa apenas para as concentrações do K, entre as amostras de controle e lesão, mostrada na área sombreada. O mesmo que aconteceu nos casos da ceratose seborrêica e do hemangioma rubi.

Devido à grande dispersão dos valores utilizados no levantamento das médias, aliada ao baixo número de amostras analisadas (N=4), os intervalos de confiança para os concentrações obtidos foram muito grandes. A figura 5.7 mostra o gráfico das concentrações do K nas amostras de controle e de lesão para essa lesão de pele.

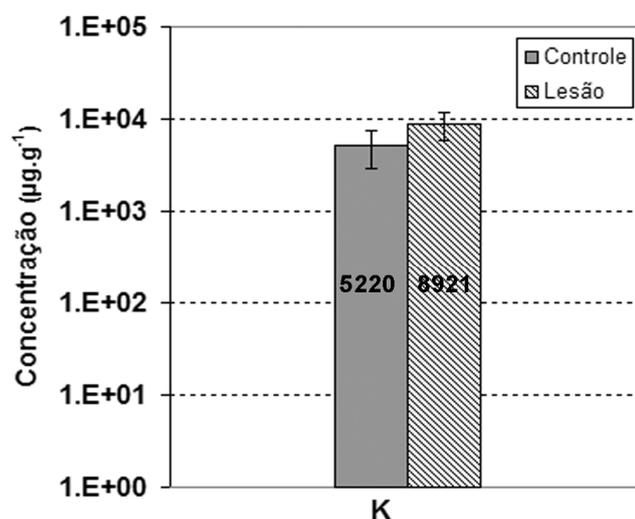


Figura 5.7- Concentração significativamente diferente entre pele normal e dermatose papulosa nigra ($p<0,05$ e N=4).

5.4- Influências exógenas na composição das amostras

Além de se buscar por diferenças entre as concentrações elementares das amostras de lesão e de controle, tinha-se o objetivo de procurar fatores que influenciam a composição tanto dos tecidos de pele sadia quanto das lesões. Para tal, foi realizada uma análise conjunta das concentrações e dos dados das anamneses.

Dois casos interessantes foram identificados e serão analisados separadamente.

a) Influência da suplementação no hemangioma rubi

Os resultados das concentrações encontradas nas amostras da lesão do tipo hemangioma rubi do paciente de número 33 foram bem maiores do que os valores médios das amostras dos demais pacientes, para a mesma lesão. Na tabela 5.9 onde são mostrados esses dados, é possível se comparar os resultados das concentrações nas amostras de controle e de lesão do paciente 33, com os respectivos valores médios dos 11 pacientes doadores dessa mesma lesão analisados nessa pesquisa.

Tabela 5.9- Concentrações no hemangioma rubi(HR) nas amostras de controle e lesão (N=11), e nas de controle (33C) e lesão (33L) do paciente 33.

Elementos	Controle HR	Lesão HR	33C	33L
P	2888 ± 996	4004 ± 1.247	2324 ± 417	142542 ± 18024
S	9376 ± 2767	10982 ± 2603	7555 ± 1033	473827 ± 14268
K	5180 ± 1905	7642 ± 1763	4441 ± 494	129190 ± 16998
Ca	2742 ± 1159	1397 ± 591	1398 ± 116	286279 ± 11618
Fe	187 ± 59	309 ± 88	111 ± 9	10436 ± 2214
Cu	7 ± 2	5 ± 1	6 ± 1	5421 ± 129
Zn	90 ± 30	65 ± 11	51 ± 8	15348 ± 737
Rb	15 ± 6	19 ± 3	26 ± 5	1184 ± 485

Ao consultar a anamnese deste paciente, constatou-se que ele ingeria regularmente há mais de cinco anos grandes quantidades de alimentos e também suplementos alimentares ricos em alguns dos elementos identificados como alterados entre as amostras sadias e com lesões de pele.

Toda a prescrição ao paciente foi feita em função de um tratamento conduzido por um médico endocrinologista para fins de atividades esportivas intensas e também atenuação dos efeitos do envelhecimento.

Na tabela 5.9 pode-se observar que, comparando-se somente as amostras de controle da população do paciente, os valores das concentrações para os tecidos sadios retirados do contorno das lesões são da mesma ordem de grandeza. Mas, quando se compara as concentrações das lesões, verifica-se que os valores para as amostras do paciente 33 são até duas ordens de grandeza maiores.

A tabela 5.10 mostra parte dos alimentos ou suplementos ingeridos pelo paciente. Somente estão listados os suplementos que têm em sua composição elementos pertinentes a este trabalho. As informações foram colhidas dos rótulos dos produtos e do banco de dados dos pacientes da clínica de onde as amostras foram coletadas.

Tabela 5.10- Alimentos e suplementos ingeridos pelo paciente número 33.

Suplemento	Qtde/dose(mg)	Total dia(mg)
a) duas vezes ao dia (manhã e noite):		
Potássio quelado (associado a outras subst.)	27,4	54,8
Iodeto de potássio (no Mega Men® Sport)	150	300
Cloreto de potássio (Mega Men® Sport)	80	160
Carbonato de potássio (no Mega Men® Sport)	200	400
Pantotenato de potássio (no Mega Men® Sport)	5	10
Óxido de cobre (no Mega Men® Sport)	25	50
Sulfato de Condroitina (TriFlex™ da GNC)	1.200	2.400
Sulfato de Glucosamina (TriFlex™ da GNC)	1.500	3.000
b) 3 a 5 vezes por semana (em dias de treino):		
Cálcio (em 40 g de Whey Protein™ - Gold Std)	Qtde/Dose (mg) 170	Total semanal (mg) 510 a 850
Creatina (GNC)	5.000	15.000 a 25.000
Glutamina (GNC e Whey Protein™)	10.000	30.000 a 50.000
Potássio (em 40 g de Whey Protein™)	220	440
Potássio (em 500g de água de côco)	800	2.400 a 4.000
Fósforo (em 500g de água de côco)	25	75 a 125
Cálcio (em 500g de água de côco)	100	300 a 500
Ferro (em 200 g de carne mal passada)	10	30 a 50
Cálcio em iogurte natural (em 300g)	500	1.500 a 2.500

Supondo não ter havido contaminação das amostras ou instabilidade do sistema eletrônico durante a análise, esses dados podem sugerir que os suplementos ingeridos pelo paciente não aparecem nas amostras de controle, pois, possivelmente, foram funcionalmente eliminados pelo tecido sadio de pele normal. Já no tecido da lesão

hemangioma rubi poderia ter ocorrido disfunções dentro do tecido com lesão que permitiria o acúmulo dos elementos presentes na suplementação do paciente.

Cabe ressaltar que tanto as amostras de controle como as de lesão foram analisadas em triplicata, cujos valores obtidos apresentaram pouca dispersão, o que reforçaria a hipótese de que a pele com hemangioma rubi, um tumor vascular, pode acumular elementos ingeridos pelo doador. Entretanto, por ter sido o único caso detectado, será necessária pesquisa adicional para testar essa hipótese.

b) Influência de medicação tópica utilizada sobre a lesão ceratose seborrêica

O paciente 57 relatou na anamnese haver se automedicado para tratar uma lesão de pele que pensava ser uma verruga, geralmente causada por vírus. Entretanto, posteriormente, a lesão foi diagnosticada como sendo do tipo ceratose seborrêica de formato circular que tinha, no momento da extração, aproximadamente uma altura de 5mm por 12mm de diâmetro. A medicação Verrux® foi usada durante cerca de duas semanas. Seu princípio ativo é um agente queratolítico, ou seja, da classe de medicamentos capazes de dissolver formações queratínicas, indicado para remoção de verrugas planas, comuns e plantares (VERRUX, 2012). Ocorre que a evolução da ceratose seborrêica se dá nas células epiteliais denominadas queratinócitos, que produzem queratina. O medicamento é composto por ácido salicílico (0,165 g.g⁻¹), ácido láctico (0,1452 g.g⁻¹) e colódio flexível q.s.p.= 1,00g, onde q.s.p. significa quantidade suficiente para, no caso, de material inerte necessário para completar 1,00g.

A tabela 5.11 mostra as concentrações encontradas nessas amostras de lesão.

Tabela 5.11- Concentrações nas amostras de ceratose seborrêica do paciente 57 que usou medicamento tópico sobre a lesão.

Elementos	*57C	*57L-IN	*57L-EX
P	1475 ± 145	512 ± 201	1341 ± 540
S	6464 ± 510	8485 ± 1012	2948 ± 1100
K	6282 ± 1215	6910 ± 481	9785 ± 1788
Ca	2844 ± 134	1557 ± 194	562 ± 168
Fe	175 ± 12	83 ± 5	62 ± 4
Cu	5 ± 1	6 ± 1	2 ± 1
Zn	65 ± 7	64 ± 9	39 ± 6
Rb	10 ± 2	4 ± 2	14 ± 4

* onde: 57C representa a amostra de controle, 57L-IN a porção interna da amostra da lesão e 57L-EX a porção externa da amostra da lesão.

Como a lesão era grande para a capacidade dos tubos de ensaio para a digestão, optou-se por dividi-la longitudinalmente ao meio (a fatia 57L-IN é interna e contígua ao corpo, e a fatia 57L-EX é externa) com a intenção de detectar diferenças nas concentrações elementares devido à ação do remédio inapropriadamente utilizado pelo paciente.

O efeito da medicação utilizada por duas semanas foi reduzir a concentração de quase todos os elementos na camada externa da lesão 57L-EX, em relação à interna 57L-IN. As exceções foram o P e o K que resultaram em valores mais elevados sugerindo concentração desses elementos na porção externa da lesão que teve maior contato e, portanto, sofreu efeito mais intenso do medicamento.

As concentrações da camada interna da lesão mostram um comportamento semelhante relativo às concentrações dos elementos cujas diferenças foram identificadas como significativas na ceratose seborrêica (K, Ca, Fe Cu), conforme tabela 5.5. A exceção foi o Cu cuja concentração permaneceu constante.

5.5- Discussão dos resultados

Dos cinco elementos cujas concentrações foram identificadas como diferentes nas quatro lesões estudadas, P, S, K, Ca e Cu, quase todos mostraram comportamentos similares em relação às suas variações das amostras de controle para as amostras de lesão, conforme mostra a tabela 5.12.

Tabela 5.12- Variações de aumento (↑) ou redução (↓) das concentrações nas amostras de controle (AC) em relação às de lesão (AL) com a razão AC/AL entre parênteses.

	CERATOSE SEBORRÊICA (N=30)	PÓLIPO FIBRO-EPITELIAL (N=17)	HEMANGIOMA RUBI (N=11)	DERMATOSE PAPULOSA NIGRA (N=4)
E	---	P ↑ (1,3)	P ↑ (1,4)	---
L				
E	K ↑ (1,3)	---	K ↑ (1,5)	K ↑ (1,7)
M				
E	Ca ↓ (0,7)	Ca ↓ (0,4)	Ca ↓ (0,5)	---
N				
T	Fe ↓ (0,5)	Fe ↓ (0,6)	Fe ↑ (1,7)	---
O				
S	Cu ↓ (0,5)	Cu ↓ (0,6)	Cu ↓ (0,7)	---

A deficiência de Ca em lesões de pele já foi relatada anteriormente como consequência de defeitos relacionados ao DNA na expressão de genes específicos (SZIGETI *et al.* 2006) que causam defeitos nas bombas de Ca nos queratinócitos, mesmas células epiteliais onde se origina a ceratose seborrêica, porém, relacionada a duas outras lesões, a doença de Darier e doença de Hailey-Hailey (BURNS *et al.* 2010). Em comum com essas últimas, há a deficiência de Ca nas lesões analisadas na tese, ceratose seborrêica, pólipo fibroepitelial e hemangioma rubi.

A tabela mostra que, quando os elementos P, K, Ca ou Cu são detectados como sendo significativamente diferentes pelo teste t de Student ($\alpha=0,05$), eles exibem comportamentos semelhantes. Ou seja, o P e o K estavam presentes em níveis mais altos nas lesões do que no tecido sadio, já o Ca e o Cu, o contrário, mais baixos. O comportamento desses quatro elementos pode representar uma tendência comum das concentrações nas respectivas lesões. A exceção, o Fe, cuja concentração nas amostras de lesões é mais baixa nos casos da ceratose seborrêica e pólipo fibro-epitelial, mas, no hemangioma rubi, mais alta. Sendo um tumor vascular, apresenta maior irrigação no interior da lesão, por isso sua coloração rubi conforme mostra a figura 3.4. Como há mais sangue, portanto, maior quantidade de hemoglobina, rica em Fe, é possível que essa seja a causa da concentração mais elevada nas amostras liofilizadas.

Apesar dos valores das concentrações de pele normal encontrados neste trabalho por meio da SRTXRF diferirem dos resultados obtidos por outras técnicas analíticas, em sua maioria, são da mesma ordem de grandeza se comparados aqueles obtidos quando a técnica XRF é utilizada. Entretanto, pesam a favor da técnica SRTXRF, a estabilidade do sistema de detecção de excelência do LNLS, testada por meio das amostras de referência, assim como uma característica inerente ao método, a de se inserir nas amostras uma solução padrão de gálio, que, por ter a sua concentração muito bem conhecida, confere maior confiabilidade aos dados.

O público da clínica de dermatologia onde as amostras foram colhidas é diferenciado, composto, predominantemente, por pessoas que tem alto poder aquisitivo. Isto traz uma componente adicional, o acesso ao consumo e uso de substâncias exógenas, como relatou na anamnese mais de 90% dos doadores de amostras. Para citar apenas algumas delas, são os suplementos alimentares (vitaminas, sais minerais, omega-3, etc), cremes para a pele (anti-rugas, hidratantes, clareadores, filtros solares, etc) ou

mesmo medicamentos de uso regular. A diversidade dessas substâncias compromete um estudo preciso da constituição elementar natural do tecido epitelial, mas esse problema é menor quando se compara tecidos com e sem lesão do mesmo paciente, que é exatamente a vantagem de se trabalhar com amostras pareadas.

Outro fator limitador importante presente na pesquisa foi que, embora esta investigação tenha feito uso de amostras pareadas, ou seja, amostras de controle e de lesões retiradas de um mesmo paciente, algumas delas eram muito pequenas, condição de contorno imposta por questões éticas em pesquisa.

Uma importante decisão que se tomou durante a realização dessa pesquisa e que conferiu maior precisão aos resultados foi ter-se optado por não se utilizar medidas de volumes por meio de pipetas dos líquidos utilizados como o ácido nítrico, água e demais soluções, ainda que a precisão nominal de algumas fosse de 0,1 μL . Com ajuda uma balança de precisão do LNLS, com divisões de 0,1 mg, foi verificado que um volume particular da ordem de 5,0 μL muito utilizado no experimento, acusava variações da ordem de até 20%. Isto era devido à retenção de parte dos líquidos nas ponteiros das pipetas. Portanto, em substituição às medidas de volume, a balança de precisão foi utilizada em todas as medições.

Também foi possível concluir que uma das etapas que deve-se ter cuidado especial é o período pós-liofilização. Durante a execução de um projeto piloto para testar a viabilidade da tese, percebeu-se a grande influência que a umidade no ar exerce nas massas das amostras liofilizadas. Um pedaço de uma amostra de pele sadia liofilizada sobre o prato da balança que, inicialmente com 0,2 mg, após alguns minutos exposta à umidade do ambiente, cresceu sua massa para 1,3 mg. Isto se repetiu para as outras amostras. Para se evitar essa influência, as amostras de tecido de pele eram desidratadas e liofilizadas dentro do tubo *ependorf* aberto, para que, imediatamente depois de terminado o processo, se pudesse lacrar com rapidez o tubo com a tampa. Da mesma forma, ao medir as massas das amostras, os tubos que as continham eram abertos somente na hora da pesagem cujos valores eram prontamente colhidos.

No apêndice C é mostrado o artigo *Elemental concentrations in skin of patients with fibroepithelial polip using synchrotron radiation total reflection X-ray fluorescence* contendo resultados parciais da pesquisa que foi apresentado no ICXOM2011- XXI *International Congress of X-ray Optics and Microanalysis*, e publicado no *American*

Institute of Physics Conference Proceedings, AIP Conf. Proc. 1437 (2012), pp. 50-53 - ISSN 1551-7616, disponível em <http://dx.doi.org/10.1063/1.3703342>.

Em atendimento às exigências da COPPE, foi publicado outro artigo em revista indexada.

No apêndice D é mostrado um segundo artigo intitulado *Multielemental analysis of samples from patients with dermatological pathologies using synchrotron radiation* que contém os resultados finais da pesquisa e que foi apresentado no ISRP2012 - *International Symposium on Radiation Physics*. Sua publicação impressa está prevista para 2013 no periódico *Radiation Physics and Chemistry* (ISSN 0969-806X, Fator de impacto=1.375 e classificação Qualis A1). O artigo está em processo de publicação impressa e disponível no site <http://dx.doi.org/10.1016/j.radphyschem.2013.04.032>.

Capítulo 6

CONCLUSÕES E SUGESTÕES

Informações como as obtidas neste trabalho sobre as doenças dermatológicas são escassas. Há poucos estudos sobre a ceratose seborrêica e, no caso das outras três, pólipo fibroepitelial, hemangioma rubi e dermatose papulosa nigra, inexistentes na bibliografia (**THEODORAKOU *et al.*, 2008**).

Foram encontrados indícios que sugerem que tanto medicações tópicas aplicadas sobre a pele quanto as ingeridas podem alterar a concentração de alguns elementos em pelo menos dois tipos de lesão, em relação às amostras de controle de tecido sadio do mesmo paciente.

Os resultados obtidos serão úteis, pois poderão ser confrontados com dados sobre pele normal assim como com outras lesões. Assim será possível saber se as diferenças entre as concentrações de tecidos normais e com lesões, deste e de outros trabalhos, são características específicas ou gerais. Outra vantagem em relação aos trabalhos já realizados é que a técnica empregada aqui, a SRTXRF, é bem mais apurada em relação às outras técnicas de fluorescência.

Pode-se afirmar que a técnica SRTXRF, pelas vantagens que reúne, é mais adequada para determinar elementos traço em amostras pequenas de tecidos epiteliais. Além disso, com a ajuda de ferramentas estatísticas, conseguiu-se evidenciar que há diferenças significativas entre concentrações elementares nas amostras de lesões e as de controle.

Portanto, parece valer à pena continuar empenhando esforços nesta linha de pesquisa visando detectar variações nas concentrações de outros elementos, e no futuro comparar esses resultados com outros tipos de lesões de modo a alcançar uma melhor compreensão entre suas composições elementares e fisiologias normais e anormais. Além disso, pode-se também pesquisar mais detalhadamente influências de hábitos humanos na composição da pele normal.

Dentre as principais contribuições dessa pesquisa, pode-se destacar que:

I- as concentrações de elementos traço foram medidas e comparadas entre amostras pareadas de tecidos de pele sadia e de 4 tipos de lesões de pele,

II- foram encontradas diferenças significativas nas médias das concentrações dos elementos P, Ca, K, Fe e Cu, e

III- foi proposta uma nova abordagem através de método de análise que pode ser útil em outras pesquisas de desordens da pele, incluindo neoplasias.

Algumas das possibilidades que parecem promissoras para a continuação dessa linha de pesquisa são:

- a) repetir as análises pela técnica SRTXRF para baixos números atômicos;
- b) continuar o trabalho comparando as concentrações em diferentes estágios das lesões;
- c) utilizar a técnica de microfluorescência com o objetivo de mapear as concentrações elementares em áreas de seções transversais das lesões;
- d) fazer o mesmo levantamento em populações com características distintas, por exemplo, de condições socioeconômicas inferiores, e comparar os resultados; e
- e) estender este estudo para os cânceres de pele.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AIGINGER, H., WOBRAUSCHEK, P., 1974, "Method for quantitative X-ray fluorescence analysis in nanogram region", **Nuclear Instruments and Methods Phys.**, v. 114, pp. 157-158.
- AIGINGER, H., WOBRAUSCHEK, P., 1975, "Total reflection X-ray fluorescence spectrometry determination of elements in nanogram amounts", **Analytical Chemistry**, v. 47, pp. 852 - 855.
- AIGINGER, H., WOBRAUSCHEK, P., STRELI, C., 1995, "Principles and development of total reflection X-ray fluorescence analysis", **Analytical Sciences**, v.11, pp. 471-475.
- ALBERT, B., BRAY, D., LEWIS, J., RALF, M, ROBERTS, K, WATSON, J.D, "Molecular Biology of the Cell", 3rd ed. Garland Publishing, New York, 1994.
- ANDERSON, J. J. B., "Minerais. In: Mahan, L. K., Escott-Stump, S., Alimentos, Nutrição e Dietoterapia" 10th ed. Roca, São Paulo, 2002.
- ANJOS, M. J., 2000a "Análise de solos agrícolas por fluorescência de raios X por dispersão em energia". Tese de D.Sc, COPPE/UFRJ, Rio de Janeiro, RJ, Brasil.
- ANJOS, M. J.; LOPES, R. T.; JESUS, E. F. O.; *et al.*, 2000b, "Quantitative analysis of metals in soil using X-ray fluorescence", **Spectrochemical Acta**, v. B55, pp. 1189-1194.
- ARNOLD, H. L., "Andrews' Diseases of the Skin: Clinical Dermatology", 8th ed. W.B. Saunders Company, USA, 1990.
- AZULAY; AZULAY, "Dermatologia", 5th ed. Guanabara Koogan S.A., Brasil, 2008.
- BARR, P.J., TOMEI, L.D., 1994, "Apoptosis and its role in human disease", **Biotechnology**, 12 pp. 487-493.
- BERNASCONI, G., TAJANI, A., "Quantitative X-ray analysis system (QXAS) software", Package: Documentation Version 1.2. International Atomic Energy Agency, Viena, 1996.
- BROWN, H., "The mineral content of human skin", **Journal of Biology and Chemistry**, 1927, v. 75 pp. 789-794.

BURNS T., BREATHNACH S., COX N. e GRIFFTHS C., “Rook’s Textbook of Dermatology”, 8 ed. Wiley-Blackwell, Cingapura, 2010.

CANELLAS, C.G., CARVALHO, S.M.F., DE JESUS, E.F.O, ANJOS, M. J., LOPES, R.T., 2006, “Trace and major elements in serum of patients with chronic myelogenous leukemia”, **Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry**, v. 269, n.3, pp.631-634.

CARVALHO, M. L., BRITO, J., BARREIROS, M. A., 1998, "Study of trace elements concentrations in human tissues by EDXRF", **X-ray Spectrometry**, v. 27, pp. 198-204.

CARVALHO, M. L. e MARQUES, A. F., 2001, “X-ray fluorescence spectrometry: applications in trace element studies in human tissues from patients with cirrhosis”, **X-Ray Spectrometry**, v.30 pp.397–402.

CASTRO, A. R. B., 2001, “Synchrotron light and its applications”, **Physical**, v. 2, pp. 31-41.

CASTRO, C. R. F., BARROSO, R. C., ANJOS, M. J., LOPES, R. T. AND BRAZ, D., 2004, “Coherent scattering of normal and pathological breast human tissues”, **Radiation Physics and Chemistry**, v.71, pp.649–651.

CASTRO, C. R. F., BARROSO, R. C. AND LOPES, R. T., 2005 “Scattering signatures for some human tissues using synchrotron radiation”, **X-ray Spectrometry**, v. 34, pp.477–480.

CHAMPION, R. H., BURTON, J.L. & EBLING, F. J. G., “Text book of dermatology”, 5th ed. Blackwell Scientific Publications, London, 1992.

CLATTERBUCK R, RIGAMONTI D. CHERRY, 2002, “Angiomas associated with familial cerebral cavernous malformations”. **Journal of Neurosurgery**, v. 96, pp. 964.

COSTA, A. C. M., 2003, “Análise da poluição ambiental produzida por metais pesados em águas superficiais da Baía de Sepetiba usando SRTXRF”. Tese de M.Sc., COPPE/UFRJ, Rio de Janeiro, RJ, Brasil.

DERMATOLOGIA.NET disponível em <http://www.dermatologia.net/>. Acessado em 22 de abril de 2012 às 21:18h.

DEMAUREX, N., DISTELHORST, C., “Apoptosis-the calcium connection”, **Science**, v.300 (n.5616), pp. 65-67, 2003.

EISBERG, R., RESNIK, R., “Física quântica: átomos, moléculas, sólidos, núcleos e partículas”, 7 ed. Rio de Janeiro, Campus, 1988.

FRANCO, G., “Tabela de composição química de alimentos”, 9 ed. São Paulo, Atheneu, 2005.

GARG A. N., SINGH V., WEGINWAR R. G. AND SAGDEO V. N., 1994, “An elemental correlation study in cancerous and normal breast tissue with successive clinical stages by neutron activation analysis”, **Biological Trace Element Research**, v. 46, pp. 185-202.

GIBSON, R. S., 1989, “Assessment of trace elements status in human”, **Progress in Food and Nutrition Science**, v. 13, pp. 67 – 111.

GOOLAMALI, S. K., COMAISH, J. S., 1973, “Zinc and Skin”, **International Journal of Dermatology**, v.14, pp.182-187.

GORODETSKY R., SHESKIN J. e WEINREB A., 1986, " Iron, Copper, and Zinc Concentrations in Normal Skin and in Various Nonmalignant and Malignant Lesions”, **International Journal of Dermatology**, v. 25, pp 440–445.

GRUNDIN, T. G., ROOMANS, G. M., FORSLIND, B., LINDBERG M., WERNER, Y., 1985, “X-ray Microanalysis of Psoriatic Skin”, **Journal of Investigative Dermatology**, v.85, pp.378-380.

HILLER, J. C., WESS, T. J., 2006, “The use of small-angle X-ray scattering to study archeological and experimentally altered bone”, **Journal of Archeological Science**, v.33, pp. 567-573.

ISBIR T, TAMER L., ERKISI M., KEKEC Y., DORAN F., VARINLI S., TAYLOR A., 1995, “Cu, Zn and Mg in serum and tissues from patients with carcinoma of breast, stomach and colon”, **Trace Elements Electrolytes**, v.12, pp.113-115.

JIN, R. X., BAY, B.H., TAN, P. H., TAN B. K. H., 1999, “Metallothien expression and zinc levels in invasive ductal breast carcinoma”, **Oncology Reports**, v.6, pp.871-875.

JOAHANSSON E., LINDH, U., SUNDSTRON, C., 1987, “Micro-PIXE analysis of macro elements and trace elements in blood-cells and tumors of patients with breast cancer”, **Nuclear Instruments and Methods Physics Research**, v. 22, pp. 179-183.

- KHUDER, A., BAKIR, M. A., SOLAIMAN, A., ISSA, H., HABIL, K., MOHAMMAD, A., 2012, "Major, minor, and trace elements in whole blood of patients with different leukemia patterns", **Nukleonika**, v.57(3), pp.389–399.
- KIDANE, G., SPELLER, R. D., ROYLE, G. J., HANBY, A. M., 1999, "X-ray scatter signatures for normal and neoplastic breast tissues", **Physics in Medicine and Biology**, v.44, pp.1791–1802.
- KLOCKENKAMPER R., 1996a, "Total-reflection x-ray fluorescence analysis", **Institut für Spectrochemie und Angewandte Spektroskopie**. v. 140. Dourtmund, Germany.
- KLOCKENKAMPER R., VON BOHLEN, A., 1996b, "Elemental analysis of environmental samples by total reflection fluorescence: a review", **X-ray Spectrometry**, v. 25, pp. 156-162.
- KOBAYASHI T, MUNAKATA S, SUGIURA H, *et al.*, 2000 "Angiotropic Lymphoma: Proliferation of B Cells in the Capillaries of Cutaneous Angiomas. **British Journal of Dermatology**, v.143, pp. 162-164.
- KUBALA-KUKUS, A, BRAZIEWICZ, J., BANAS D, MAJEWSKA U, GOZDZ, S., URBANIAK, A., 1999, "Trace element load in cancer and normal lung tissue", **Nuclear Instruments and Methods in Physics Research**, v.150, pp.193–199.
- KUCHARZEWSKI, M., BRAZIEWICZ, J., MAJEWSKA, U. E, GÓZDZ, S., 2003a "Selenium, Copper, and Zinc concentrations in intestinal cancer tissue and in colon and rectum polyps", **Biological Trace Element Research**. v.92, pp.1-10.
- KUCHARZEWSKI, M., BRAZIEWICZ, J., MAJEWSKA, U. E., GÓZDZ, S., 2003b "Iron concentrations in intestinal cancer tissue and in colon and rectum polyps", **Biological Trace Element Research**. v.95, pp. 19–28.
- KUCHARZEWSKI, M., BRAZIEWICZ, J., MAJEWSKA, U. E, GÓZDZ, S., 2003c, "Copper, zinc and selenium in whole blood and thyroid tissue of people with various thyroid diseases", **Biological Trace Element Research**. v.93, pp.9-18.
- KURZ, K., STEINGLEDER, G, BISCHOF, W., GONSIOR, B., 1987, "PIXE in Different Stages of Psoriatic Skin" **Journal of Investigative Dermatology**, v.88, pp. 223-226.

- KWIATEK, W. M., LEKKA, M., DREWNIAK, T., WAJDOWICZ, A., 1996 “Investigation of trace elements in cancer kidney tissues by SRIXE and PIXE”, **Nuclear Instruments and Methods Physics. Research**, v.109 pp.284–288
- KWIATEK, W. M., DREWNIAK, T., GAJDA, M., GALKA, M., HANSON, A. L., CICHOCKI, T., 2002, “Preliminary study on the distribution of selected elements in cancerous and non-cancerous kidney tissues”, **Journal of Trace Elements in Medicine and Biology**, v.16 pp.155–160
- KWIATEK, W. M., HANSON, A. L., PALUSZKIEWICZ, C., GAŁKA, M., GAJDA, M., CICHOCKI, R., 2004, “Application of SRIXE and XANES to the determination of the oxidation state of iron in prostate tissue sections”, **Journal of Alloys and Compounds**, v.362 pp. 83–87
- KWIATEK, W. M., BANAS, A. BANAS, K., GAJDA, M., GAŁKA, M., FALKENBERG, G., CICHOCKI, T., 2005, “Iron and other elements studies in cancerous and non-cancerous prostate tissues”, **Journal of Alloys and Compounds**, v. 401 pp. 178–183.
- LACHANCE, G. R., CLAISSE, F., 1995, “Quantitative X-Ray Fluorescence Analysis: Theory and Application”, 1 ed. New York, John Willey & Sons.
- LEWIS, 1997, “Medical applications of synchrotron radiation X-rays”, **Physics in Medicine and Biology**, v. 42 pp.1213-1243
- LEITÃO, C. C. G., 2009, “*Estudo de Doenças Hematológicas Usando a Técnica de Fluorescência de Raios X com Radiação Síncrotron*”. Tese de DSc da COPPE/UFRJ, Rio de Janeiro, RJ, Brasil
- LEITÃO, R. G., CANELLAS, C. G. L, PALUMBO, A. J, SOUZA, P. A. V. R., NASCIUTTI, L. E., FERREIRA, L. C., ANJOS, M. J., and LOPES, R. T., “Analysis of Prostate Tissues using SRTXRF”, **Brazilian Synchrotron Light Laboratory (LNLS)**, Activity Report 2007
- LNLS. Disponível em: [http:// www.LNLS.br](http://www.LNLS.br). Acessado em 10 de novembro de 2013 às 14:48h.
- MAJEWSKA, U., BANÁS, D., BRAZIEWICZ, J, GÓZDZ, S., KUBALA-KUKÚS, A., KUCHARZEWSKI, M., 2007, “Trace element concentration distributions in breast, lung and colon tissues”, **Physics in Medicine and Biology**, v.52 pp. 3895–3911

- MAJEWSKA, U., BRAZIEWICZ, J., BANÁS, D., KUBALA-KUKÚS, A., KUCHARZEWSKI, M., WALER, J., GÓZDZ, S., WUDARCZYK, J., 2001, "Zn concentration in thyroid tissue and whole blood of women with different diseases of thyroid", **Biological Trace Element Research**, v.80 pp.193–199
- MARQUES, A. F., MARQUES, J. P., CASADA, C., CARVALHO, M. L., 2004, "X-ray microprobe synchrotron radiation X-ray fluorescence application on human teeth of renal insufficiency patients", **Spectrochemical Acta** , Part B, v. 59, pp. 1675 - 1680.
- MARTINEZ, T., LARTIGUE, J., AVILA-PEREZ, P., ZARAZUA, G., NAVARRETE, M., TEJEDA, S., RAMÍREZ, A., 2004, "Determination of trace elements in blood samples by TXRF analysis", **Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry**, v.599(3) pp.511 - 514.
- MICHELSON, G., LJUNGHAL, K., DANIELSON, B. G., 1980, "Zinc in epidermis and dermis in normal subjects", **Acta Dermato-Venereologica**, v.60, pp.295-298.
- MOLIN, L., WEBSTER, P. O., 1973a, "Cobalt, copper and zinc in normal and psoriatic epidermis", **Acta Dermato-Venereologica**, v.53, pp.477-480.
- MOLIN, L., WEBSTER, P.O., 1973b, "Iron content in normal and psoriatic epidermis". **Acta Dermato-Venereologica**, v.53, pp.473-476.
- MOLOKIA, M., PORTNOY, B., 1969, "Neutron Activation Analysis of Trace Elements in Skin: III Zinc in normal Skin", **British Journal of Dermatology**, v.81, pp.759-762.
- NATIONAL CANCER INSTITUTE - EUA, <https://visualsonline.cancer.gov/details.cfm?imageid=7280> Acesso em 24 nov 2013, 22:40h.
- NG, K. H., BRADLEY D. A., LOOI L. M., 1997, "Elevated trace element concentrations in malignant breast tissues", **British Journal of Radiology**, v.70, pp.375-382.
- PEREIRA, M. O., 2003, "Análise de Metais Pesados em Água e Sedimento de Fundo do Rio Paraíba do Sul por Fluorescência de Raios X com Radiação Síncrotron (SRTXRF)". Tese de M.Sc., COPPE/UFRJ, Rio de Janeiro, RJ, Brasil.
- PEREZ, C. A., RADTKE, MARTIN, S., HECTOR J., *et al.*, 1999, "Synchrotron Radiation X-ray Fluorescence at the LNLS: Beamline Instrumentation and Experiments", **X-ray Spectrometry**, v.28, 320-326.

- PESCE, A. J., KAPLAN, L. A., “Química clínica: métodos, 1 ed. Buenos Aires, Panorâmica, 1999.
- PHILIP J. POTTS, “Recent advances in TXRF”, **Applied Spectrometry**, v.41, pp. 473-489, 2005.
- POLETTI, M. E., GONÇALVEZ, O. D., MAZZARO, I., 2002a, “Coherent and incoherent scattering of 17.44 and 6.93 a keV X-ray photons scattered from biological and biological-equivalent samples: characterization of tissues X-ray”., **Spectrometry**, v.31 pp. 57–61.
- POLETTI, M. E., GONÇALVEZ, O. D., MAZZARO, I., 2002b, “X-ray scattering from human breast tissues and breast-equivalent materials”, **Physics in Medicine and Biology**, v.47 pp.47–63.
- POLETTI, M. E., GONÇALVEZ, O. D., MAGALHÃES, 2004, “A preliminary study of the distribution of trace elements in healthy and neoplastic breast tissues with synchrotron radiation X-ray fluorescence”, **Radiation Physics and Chemistry**, v.71, pp. 975–976.
- POTTS P. J., ELLIS, A. T., KREGSAMER, P., STRELI, C., VANHOOF, C., WEST, M., WOBRAUSCHECK, P., 2005, “Atomic spectrometry update X-ray fluorescence spectrometry”, **Journal of Analytical Atomic Spectrometry**, v.20 pp.1124-1154.
- PRANGE, A., 1989, “Total Reflection X-Ray Spectrometry: Method and Applications”, **Spectrochimical Acta (A)**, v. 44B, n.5, pp.437-452.
- REDDY, S. B., CHARLES, M. J., REDDY B. S., ANJANEYULU, C., RAJU, G. J., SUNDARESWAR, B., VIAJAYAN, V., 2002, “Trace elemental analysis of adenoma and carcinoma thyroid by PIXE”, **Nuclear Instruments and Methods Physics Research**, v.196 pp. 333-339.
- RIZK, SHERIF L., SKY-PECK, HOWARD H., 1984, “Comparison between concentrations of trace elements in normal and neoplastic human breast tissue”, **Cancer Research**, v.44, pp. 5390-5394.
- SAMPAIO, S. A. P., RIVITI E. A., “Dermatologia”, 3th ed. Artes médicas, Brasil, 2007.

- SANTOLIVUO, P. M., SOUTHWICK, H. W., OLWIN, J. H., 1976, "Trace metal levels in cancer of breast", **Surgery Gynecology and Obstetric**, v.142, pp. 65-70.
- SHESKIN, J., GORODETSKY, R., WEINREB, A. *et al.*, 1981a, "In vivo measurements of iron, copper and zinc in the skin of prurigo nodularis patients treated with thalidomida", **Dermatologica**, v.162(2) pp. 86-90.
- SHESKIN, J., GORODETSKY, R., WEINREB, A. *et al.*, 1981b, "Iron level in the skin before and after thalidomide treatment of lepra reaction", **Dermatologica**, v.162 pp. 145.
- SPELLER, R., 1999, "Tissue analysis using X-ray scattering", **X-ray Spectrometry** v.28(4) pp.224-250.
- SPELLER, R. D. AND HORROCKS, J. A., 1991, "Photon scattering- a 'new' source of information in medicine and biology?", **Physics in Medicine and Biology**, v.36 pp.1-6.
- STRELI, C., WOBRAUSCHECK, P., MEIRER, F., PEPPONI, G., 2008, "Synchrotron radiation induced TXRF", **Journal of Analytical Atomic Spectrometry**, v.23, pp. 792-798.
- STRELLI, C., 2000, "Recent advances in TXRF", **Applied Spectrometry**, v.41 pp.473-489
- SUN, Z., 2009, "The promise of synchrotron radiation in medical science", **Australasian Medical Journal**, v.1-5, pp.1-5
- SUORTTI, P., THOMLISON, W., 2003, "Medical applications of synchrotron radiation", **Physics in Medicine and Biology**, v. 48 pp. R1-R35.
- SVERGUN, D. I., KOCH, M. H. J, 2003, "Small-angle scattering studies of biological macromolecules in solution", **Reports on Progress in Physics**, v.66 pp.1735-1782.
- SZIGETI, R., KELLERMAYER, R., 2006 "Autosomal-Dominant Calcium ATPase Disorders" **Journal of Investigative Dermatology**, v. 126, pp. 2370-2376.
- TAPIERO, H., TEW, K. D., 2003, "Trace elements in human physiology and pathology: zinc and metallothioneins", **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v.57-59 pp.399-411
- THEODORAKOU, C, FARQUARSON, M. J, 2008,"Human soft tissue analysis using X-rays or gamma-ray techniques", **Physics in Medicine and Biology**, v.53, pp. R111-R149.

TOLG, G, KLOCKENKÄMPER, R., 1993, "Spectrochimica Acta", v.48B, pp. 111-127

GRIEKEN, V., MARKOWICS, A. A., 2002, "Handbook of X-ray Spectrometry", chapter 1: X-ray physics and Chapter 9: Total Reflection X-ray Fluorescence, 1 ed. New York: Marcel Dekker.

VERRUX. Disponível em <http://www.bulas.med.br/bula/70773/verruux.htm>, consultado em 10 de abril de 2012 às 16:24h.

WERNER-LINDLE, Y., PALLON, J., FORSLIND, B., 1998, "Physiologically Important Trace Elements of Paralesional Psoriatic Skin", **Scanning Microscopy**, v.12 pp. 599-608.

WOBRAUSCHEK, P., KREGSAMER, P., STRELI, C., *et al.*, 1991, "Instrumental Developments in Total Reflection X-Ray Fluorescence Analysis for K-Lines from Oxygen to the Rare-earth Elements", **X-Ray Spectrometry.**, v.20 pp. 23-28.

WOBRAUSCHEK, P., 1994, "Use of total reflection X ray fluorescence analysis in the life sciences", **Biological Trace Element Research**, v.43-5 pp.65-71.

APÊNDICE A

PELE HUMANA

A.1- Funções da pele

Dentre as funções que a pele desempenha no organismo humano tem-se:

- a) **Proteção do organismo:** função primordial da pele. Ela preserva as estruturas internas contra agressões do meio externo como traumatismos e, através do sistema melânico, das radiações solares. A camada córnea impermeabiliza a pele contra perdas excessivas de água e de eletrólitos mantendo o equilíbrio hidroeletrólítico.
- b) **Imunológica:** a pele atua como elemento de defesa do organismo por meio das células de Langerhans, dos linfócitos, macrófagos e mastócitos, todos com atividade antimicrobiana. As células de Langerhans são especializadas e, na epiderme, controlam a presença de antígenos, substâncias estranhas ao organismo ou que possam desencadear um processo inflamatório ou uma reação alérgica.
- c) **Excreção:** as glândulas sudoríparas produzem o suor que é constituído por excretas, toxinas e eletrólitos que devem ser eliminados do organismo.
- d) **Termorregulação e hemoregulação:** a pele apresenta plexos vasculares e glomos (aglomerados de minúsculas veias e artérias) que auxiliam a manutenção e a regulação do débito circulatório. Na termorregulação há a participação das glândulas sudoríparas écrinas as quais, liberando a secreção sobre a pele, ajudam a refrigerá-la.
- e) **Metabolização:** a pele auxilia na metabolização de hormônios como testosterona, progesterona e vitamina D, sendo que esta última tem a produção ativada pela radiação solar.
- f) **Secreção de substâncias:** produz melanina, queratina, gordura e suor das quais depende para seu equilíbrio.
- g) **Renovação dos tecidos de revestimento:** os epitélios apresentam um ciclo de vida limitado que é consequência direta função que desempenha. A renovação dessas células é constante graças a uma atividade mitótica contínua. Em circunstâncias

normais o tempo de renovação epidérmica (queratinócitos) é de aproximadamente quatro semanas e as células da camada basal (células tronco) são as responsáveis pela regeneração da epiderme através da divisão mitótica.

h) **Sensorial:** toda a superfície cutânea está provida de terminações nervosas capazes de captar estímulos térmicos, mecânicos ou dolorosos. Cada uma desses receptores cutâneos ou terminações nervosas são especializados na recepção de estímulos específicos. Não obstante, alguns podem captar estímulos de natureza distinta. Nas regiões da pele providas de pelo, existem terminações nervosas específicas nos folículos capilares, além de outras, denominadas terminais ou receptores de Ruffini. Os folículos capilares, formadas por axônios que envolvem o folículo piloso, captam as forças mecânicas aplicadas contra o pelo. Os terminais de Ruffini, com sua forma ramificada, são receptores térmicos de calor. Na pele desprovida de pelo e também na que está coberta por ele, encontram-se ainda três tipos de receptores comuns:

h.1) **Corpúsculos de Paccini:** captam especialmente estímulos vibráteis e táteis. São formados por uma fibra nervosa cuja porção terminal, amielínica, é envolta por várias camadas que correspondem a diversas células de sustentação. A camada terminal é capaz de captar a aplicação de pressão que é transmitida para as outras além de enviá-las aos centros nervosos correspondentes.

h.2) **Discos de Merkel:** de sensibilidade tátil e de pressão. Uma fibra aferente costuma estar ramificada com vários discos terminais destas ramificações nervosas. Estes discos estão englobados em uma célula especializada, cuja superfície distal se fixa às células epidérmicas por um prolongamento de seu protoplasma. Assim, os movimentos de pressão e tração sobre epiderme desencadeiam o estímulo.

h.3) **Terminações nervosas livres:** sensíveis aos estímulos mecânicos, térmicos e especialmente aos dolorosos. São formadas por um axônio ramificado envolto por células de Schwann sendo, por sua vez, ambos envolvidos por uma membrana basal.

Na pele sem pelo encontram-se, ainda, outros receptores específicos:

h.4) **Corpúsculos de Meissner**: funções táteis. Estão nas saliências da pele sem pelos (como nas partes mais altas das impressões digitais). São formados por um axônio mielínico, cujas ramificações terminais se entrelaçam com células acessórias.

Bulbos terminais de Krause: receptores térmicos de frio. São formados por uma fibra nervosa cuja terminação possui forma de clava. Situam-se nas regiões limítrofes da pele com as membranas mucosas (por exemplo: ao redor dos lábios e dos genitais).

A pele é constituída por três camadas que, de fora para dentro, são a epiderme, a derme e a hipoderme.

Epiderme

A epiderme é formada por tecido epitelial estratificado córneo tem uma estrutura diversificada que é constituída por células como queratonócitos (responsáveis pela produção da queratina), melanócitos (responsáveis pela pigmentação da pele), anexos cutâneos (pelos, unhas, glândulas) apresentando, ainda cinco camadas:

- basal ou germinativa: é a região onde estão as células jovens com intensa capacidade de reprodução ou mitose.
- espinhosa: onde estão presentes as células de Malpighi , responsáveis pela produção de queratina
- granulosa: é a área onde são encontradas células achatadas formadas por grânulos de queratina
- lúcida: aqui encontraremos células anucleadas, achatadas e ricas em queratina
- córnea: é formada por diversas células mortas que constituem uma capa de queratina e que se renova continuamente. Esta camada é responsável pelo aumento da espessura da pele, principalmente na palma da mão e sola dos pés. É a camada da pele que protege o organismo contra agressões físicas, químicas e biológicas do meio ambiente.

Os queratinócitos são as células mais presentes na epiderme e representam 80% das células presentes, e, na epiderme, formam as quatro camadas: basal, espinhosa, granulosa e córnea.

Ocorre uma renovação constante da epiderme para a manutenção de sua integridade, e se inicia a partir das células basais que levam de 60 a 75 dias para chegar até a camada córnea.

Além do sistema queratínico a pele também é formada pelo sistema melanocítico que tem como célula mais importante o melanócito, responsável pela síntese da melanina que é o pigmento da pele.

Estes melanócitos estão na camada basal e se encontram na proporção de 1 para cada 10 queratinócitos basais nos indivíduos da raça branca podendo existir em maior quantidade nos indivíduos mulatos e negros.

A luz solar auxilia no processo de ativação da síntese de melanina na pele tornando-a mais bronzeada.

Ainda na epiderme e derme estão presentes as células de Langerhans que tem função imunológica porque atuam como fagócitos nos processos alérgicos e infecciosos como micoses provocadas por fungos.

Porém na epiderme não existem vasos sanguíneos. Os nutrientes e oxigênio chegam à epiderme por difusão a partir de vasos sanguíneos da derme.

Anexos da Epiderme

Os anexos da epiderme são o folículo pilossebáceo, a glândula sudorípara e a unha.

O folículo pilossebáceo é composto pelo pelo, glândula sebácea e músculo eretor do pêlo que tem estrutura muscular. Estão dispersos por várias regiões do organismo sendo que existem regiões como barba e couro cabeludo onde os pelos são mais espessos, porém as glândulas sebáceas são menores enquanto que na face há predomínio de pelos finos, mas com glândulas sebáceas bem desenvolvidas.

As unhas são lâminas de queratina que recobrem as falanges e originam-se da matriz ungueal e seu crescimento é contínuo servindo como um elemento de proteção das pontas dos dedos.

As glândulas sudoríparas são de dois tipos: apócrinas e écrinas.

As glândulas sudoríparas apócrinas desembocam nos folículos pilossebáceos e secretam um líquido leitoso constituído por substâncias protéicas, lipídicas e glicídicas. Estas glândulas estão presentes em regiões do corpo como axilas, genitais, etc e sua secreção apresentam odor típico que é proveniente da decomposição pela ação das enzimas bacterianas.

As glândulas do tipo écrinas estão presentes nas regiões palmoplantares e em toda extensão do corpo lançando sua secreção diretamente sobre a epiderme.

Derme

A derme é a camada intermediária localizada entre a epiderme e a hipoderme, e é responsável pela resistência e elasticidade da pele. É constituída por tecido conjuntivo (fibras colágenas e elásticas envoltas por substância fundamental formada pelo fluido intersticial, complexos de glicosaminoglicanas e proteínas, denominadas proteoglicanas e glicoproteínas), vasos sanguíneos e linfáticos, nervos e terminações nervosas. Os folículos pilossebáceos e glândulas sudoríparas, originadas na epiderme, também se localizam na derme.

A derme apresenta três diferentes camadas:

- papilar: é a região onde estão presentes as células e as fibras colágenas;
- reticular: é intermediária entre a camada papilar e a hipoderme apresentando feixes de fibras colágenas mais espessos;
- derme adventicial: é encontrada ao redor dos folículos pilossebáceos, glândulas e vasos sendo formado por feixes delgados de colágeno.

A substância fundamental encontrada na derme tem composição de mucopolissacarídeos ácidos, 70% de fibras colágenas, fibras elásticas associadas às

colágenas, fibras reticulares também associadas às colágenas com intensa elasticidade. Estas fibras associadas se entrelaçam formando uma trama na derme que é responsável pela elasticidade e resistência da pele.

Ainda na derme são encontrados os vasos sanguíneos e linfáticos, células como fibroblastos, histiócitos e mastócitos que tem funções como síntese de fibras colágenas, elásticas e reticulares e de defesa da pele.

Hipoderme

Também chamado de tecido subcutâneo, é formado por células adiposas que se agrupam formando lóbulos separados por filamentos de colágeno e por vasos sanguíneos.

A constituição celular dos adipócitos apresenta basicamente os lipídeos do tipo triglicerídeos e colesterol, vitaminas e água.

A hipoderme tem funções como proteger o organismo contra choques e traumatismos, atuando ainda como reserva energética e isolante térmico.

3.4- Lesões elementares

A análise da pele é um dos passos mais importantes para se definir a forma de tratamento após o reconhecimento das alterações que ocorrem nos tecidos que compõem a sua estrutura tegumentar.

Qualquer alteração presente na estrutura da pele seja qual for a causa que a provocou caracteriza a formação de lesões elementares.

Os mecanismos indutores de lesões elementares podem ser de natureza circulatória, inflamatória, metabólica, degenerativa ou hiperplásica.

Dependendo dos tipos de lesões e das causas que a provocaram podemos classificar as lesões da pele da seguinte forma:

- 1) quanto à modificações da cor

A) manchas pigmentares: estão relacionadas à melanina e podem ser classificadas em hipercrômicas, hipocrômicas e acrômicas.

As manchas hipercrômicas apresentam tom escuro por excesso de melanina no local onde estão presentes. As manchas hipocrômicas são claras por apresentarem menor quantidade de pigmento e as acrômicas são desprovidas de melanina.

Manchas por pigmentos como bilirrubina, caroteno, alcaptona podem ter coloração amarelada, marron, predominantemente.

Manchas podem estar relacionadas a pigmentos estranhos ao organismo como ouro, prata, arsênio, corantes, etc.

Medicamentos e substâncias que contenham ouro, prata e arsênico podem alterar a coloração da pele assim como tatuagens através dos pigmentos coloridos que ficam nela impregnados e os antimaláricos que a tornam amarelado.

B) Manchas devidas a alterações vasculares

a) transitórias: eritema e enantema, cianose e cianema que são manchas de coloração arroxeada.

O eritema é de cor avermelhada devido à presença de sangue arterial e é provocada por hiperemia enquanto que na cianose a coloração da pele se torna azulada devido à redução da hemoglobina no sangue principalmente nas extremidades digitais, orelhas, conjuntivas e leito ungueal. Quando este processo ocorre nas mucosas é chamado de cianema e também chamamos de enantema o eritema das mucosas.

b) permanentes: nevo vascular (hemangioma) e telangiectasia

O aumento do número de vasos sanguíneos é chamado de nevo vascular e a telangiectasia é a dilatação permanente do calibre de pequenos vasos.

C) Manchas devidas ao pigmento sanguíneo

São as púrpuras de coloração avermelhada que, dependendo da extensão da mancha, podem ser classificadas como petéquia, víbice, hematoma, equimose.

A petéquia é uma lesão purpúrica puntiforme, a víbice é uma lesão purpúrica linear, a equimose é uma lesão purpúrica de grande extensão e o hematoma é uma coleção de lesões purpúricas geralmente de origem traumática.

2) Eflorescências elementares sólidas

Segundo o aspecto que apresentam podem ser subdivididas em:

a) Ponto ou seropápula: é uma eflorescência circunscrita de tamanho variável que faz saliência na pele, com coloração que varia do eritematoso ao anêmico. Nesta lesão surge vasodilatação com saída de plasma e de células sanguíneas.

b) Pápula: eflorescência de consistência dura, superficial com menos de 5 cm, com certa elevação que não forma cicatriz ao regredir. Podem ser epidérmicas com aumento de células de uma ou várias camadas da epiderme ou em placas que são lesões elevadas em platô provenientes da formação de numerosas pápulas.

c) Tubérculo: é uma formação de consistência endurecida, elevada com mais de 5 mm devido à infiltração de células mesenquimais em toda derme deixando cicatriz ao regredir.

d) Nódulo: é uma formação de consistência endurecida de dimensões variáveis, muitas vezes reconhecidas pela palpação, em virtude do número de células presentes na hipoderme ou derme profunda.

e) Queratose: é um espessamento da epiderme por proliferação da camada córnea. A superfície das queratoses em geral é áspera e esbranquiçada.

f) Vegetação: é a hipertrofia de algumas papilas dérmicas podendo se apresentar sob o aspecto de verrugas

3) Eflorescências elementares de conteúdo líquido

São as bolhas, vesículas e pústulas. As bolhas apresentam conteúdo líquido (seroso) de grandes dimensões enquanto que as vesículas apresentam pequenas dimensões.

Nas pústulas observamos presença de conteúdo líquido purulento podendo conter bactérias e diversos neutrófilos.

O abscesso é uma coleção de pus presente na profundidade dos tecidos.

Todas as lesões de conteúdo líquido, ao involuírem, em geral não deixam cicatrizes com exceção dos abscessos.

4) Eflorescências por solução de continuidade

São as erosões, ulcerações, fissuras, escoriações. As escoriações são roturas de tecidos provenientes de mecanismo traumático como cortes com objetos, arranhões, etc.

As erosões provocam lesões do tegumento por mecanismo patológico superficial que agride a epiderme.

Nas ulcerações temos erosão profunda da derme e até mesmo da hipoderme, músculos e até ossos. As fissuras são lesões lineares ou estreitas da pele.

5) Eflorescências elementares caducas

São as escamas, crostas e escaras. As escamas são lamínulas epidérmicas que se desprendem com facilidade e são devidas a distúrbios de queratinização.

As crostas são decorrentes do ressecamento de exsudatos do tipo seroso, purulento ou hemático que se eliminam espontaneamente.

As escaras são lesões negras mais ou menos espessas que podem atingir planos profundos da pele e são provenientes de necrose tecidual.

6) Sequelas

São as cicatrizes e as atrofias. As cicatrizes são sequelas provenientes de lesão de pele e as atrofias são caracterizadas pela diminuição da espessura da pele com redução do número de camadas.

APÊNDICE B

A TÉCNICA SRTXRF E O LNL

B.1- Fluorescência

O fenômeno consiste na capacidade espontânea que algumas substâncias tem de emitir fótons quando absorvem radiações (raios X, luz síncrotron, UV, etc) gerando fótons com comprimento de onda, em geral, maiores que o da radiação incidente. Por exemplo, alguns materiais brilham quando expostos à radiação ultravioleta emitida por uma lâmpada do tipo luz negra ou mesmo aos raios X.

A fluorescência de raios X está associada à emissão de radiação eletromagnética devido às transições de elétrons entre diferentes orbitais e está relacionada ao modelo quântico da estrutura atômica.

Na teoria quântica, uma função de onda consiste numa função $\Psi(x,y,z)$ que surge na equação de Schrödinger na mecânica quântica, uma expressão matemática que envolve as coordenadas de uma partícula no espaço. Se esta puder ser resolvida para uma partícula num dado sistema, então, dependendo das condições de contorno, a solução consiste num conjunto de funções de onda permitidas (autofunção) da partícula, cada uma correspondendo a um nível de energia permitido (autovalor). O significado físico da função de onda é que o quadrado do seu valor absoluto, $|\Psi|^2$, para um ponto, é diretamente proporcional à probabilidade de encontrar a partícula num pequeno elemento de volume. Para um elétron num átomo isto dá origem ao conceito de orbital atômico ou molecular.

No caso do elétron, o quadrado do módulo da função de onda do elétron $|\Psi|^2$ fornece a probabilidade de se encontrar o elétron numa certa região do espaço próximo do núcleo (**EISBERG *et al.*, 1988**). Esta região é conhecida como o orbital e representa a região do espaço onde se tem grande probabilidade de encontrar um determinado elétron. Segundo este modelo, enquanto o elétron permanece num orbital ele não ganha e nem perde energia. Quando o elétron faz uma transição entre dois estados diferentes, ele dá o chamado salto quântico. Como estados diferentes estão associados a energias

diferentes, os saltos quânticos são acompanhados pela emissão de radiação eletromagnética. Os elétrons são caracterizados pelos seus estados quânticos. A estes estados estão associados quatro números, denominados números quânticos:

- a) principal n , um número inteiro positivo;
- b) orbital l , que pode assumir valores inteiros entre zero e $n - 1$;
- c) magnético m , que pode ter $2l+1$ valores inteiros possíveis entre $-l$ e $+l$; e
- d) *spin* s , que pode assumir apenas os valores $+1/2$ e $-1/2$.

O número quântico principal está associado à dependência entre a função de onda do elétron e à distância r do núcleo e, portanto, à probabilidade de se encontrar o elétron a certa distância do núcleo.

Os números quânticos l e m estão associados ao momento angular do elétron e à dependência angular da função de onda do elétron.

O número quântico de spin indica a orientação do elétron ao redor do seu próprio eixo. Como existem apenas dois sentidos possíveis, este número quântico assume apenas os valores $-1/2$ e $+1/2$, indicando a probabilidade de 50% do elétron estar girando em um sentido ou no outro. Quando o elétron muda de estado quântico emite radiação eletromagnética. Esta radiação é chamada de fluorescência de raios X ou raios X característicos.

Os fótons emitidos por uma fonte, ao incidirem sobre uma amostra, são absorvidos pelos átomos da substância deixando-os em estados excitados, ou seja, elétrons são removidos de sua eletrosfera. Os elétrons retirados do átomo têm maior probabilidade de pertencerem aos níveis K ou L. Quando o átomo se desexcita, há a emissão de fótons correspondentes às transições eletrônicas $L \rightarrow K$, $M \rightarrow K$ ou $M \rightarrow L$, etc. O espectro de energia correspondente a estas transições é único para cada tipo de elemento, permitindo assim identificá-lo.

Existem diversas maneiras de se induzir a emissão dos raios X característicos dos elementos que constituem uma determinada amostra. Dentre as mais usadas estão as excitações por meio de partículas aceleradas tais como elétrons, prótons ou íons, de

partículas alfa, beta menos, raios gama ou raios gama provenientes de radionuclídeos, através de raios X gerados por tubos com anodos de Tungstênio, Molibdênio ou Ródio, e, mais recentemente, por radiação síncrotron.

O tipo de fonte de excitação depende dos elementos e da região do espectro que se pretende analisar. A fonte usada neste trabalho é a de radiação síncrotron.

B.2- Os raios X característicos

Para que haja a produção de raios X característicos é preciso se retirar elétrons das camadas mais internas dos átomos. Para que isto ocorra, a energia mínima deve ser maior que energia de ligação do elétron deste nível, denominada energia de ligação. Esta energia pode ser calculada de modo aproximado utilizando a teoria atômica de Bohr para os átomos de hidrogênio e hidrogenóides, que são átomos formados por apenas um núcleo e um elétron. Assim são chamados porque seu comportamento químico é similar ao do hidrogênio, tais como deutério, trítio e outros íons leves.

A energia de ligação de um elétron na camada K ou L pode ser calculada, aproximadamente, pela equação B.1:

$$E = \frac{me^4(Z-b)^2}{8\epsilon_0^2 h^2 n^2} \quad (B.1)$$

onde:

E = energia de ligação eletrônica (J),

m = massa de repouso do elétron = $9,11 \times 10^{-31}$ kg

e = módulo da carga elétrica do elétron = $1,6 \times 10^{-19}$ C,

Z = número atômico do elemento emissor dos raios X,

b = constante de Moseley, com valores iguais a 1 e 7,4, para as camadas K e L, respectivamente.

ϵ_0 = permissividade elétrica no vácuo = $8,8534 \cdot 10^{-12}$ C².N⁻¹.m⁻²

h = constante de Planck = $6,625 \cdot 10^{-34}$ J.s, e

n = numero quântico principal do nível eletrônico ($n = 1, 2, 3$, etc. para as camadas K, L, M, etc., respectivamente).

Substituindo-se na equação B.1 os valores das constantes no sistema internacional de unidades, a energia dos raios X, em joules, é dada por:

$$E = 2,18 \cdot 10^{-18} \frac{(Z - b)^2}{n^2} \quad (\text{B.2})$$

Reescrita em termos de elétron-volt, a equação B.2 torna-se:

$$E = 13,65 \frac{(Z - b)^2}{n^2} \quad (\text{B.3})$$

Pela equação B.3, vê-se que a energia de ligação para um dado nível é diretamente proporcional ao quadrado do número atômico Z do elemento. Assim, para retirar elétrons do nível K dos elementos Al, Fe e Te, de números atômicos 13, 26 e 52, serão necessários, para o nível **K** 1,560; 7,114 e 31,814 keV e para o nível **L**, 0,074 - 0,723 e 4,612 keV, respectivamente.

Como é necessário que um elétron seja ejetado do átomo, por exemplo, da camada K, para que ocorra uma transição entre dois estados quânticos, a energia da radiação que excita o átomo, deve ser igual ou superior a energia de ligação do elétron ao átomo, neste caso E_K . De maneira semelhante, a liberação de elétrons do nível L, gera o espectro de energia das linhas L e a energia de radiação incidente deve ser igual ou superior as energias de ligação E_{L1} , E_{L2} e E_{L3} . Portanto, para que ocorra emissão de raios X característicos é necessário que a energia da radiação incidente seja igual ou superior a essas energias críticas (**EISBERG et al., 1988**). As transições entre estados quânticos são representadas em termos de um diagrama de níveis de energia. A figura B.1 mostra, esquematicamente, as principais linhas até $n = 4$ (**ANJOS, 2000a**).

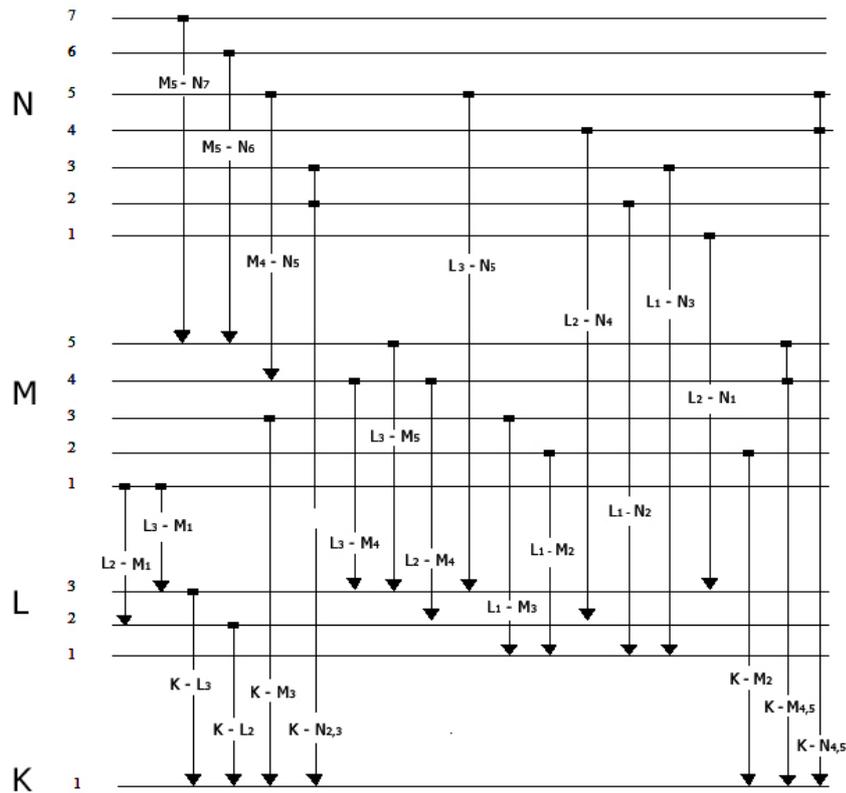


Figura B.1- Diagrama de energias para as linhas K, L M e N

Na teoria da espectrometria de raios X, os estados quânticos estão associados a níveis de energias. Estes níveis de energia dependem não apenas dos números quânticos n e l , mas também do número quântico j , que representa a soma vetorial de l e s , com a restrição que j não seja negativo.

$$j = l + s \quad (\text{B.4})$$

assim, j somente assumirá os seguintes valores:

$$j = l \pm \frac{1}{2} \quad (\text{B.5})$$

Quando l assumir valor zero, então $j = \frac{1}{2}$.

Se l for 1; então $j = \frac{1}{2}$ e $j = \frac{3}{2}$; e sucessivamente para todos os valores de l .

O número máximo de elétrons, n_e , em um subnível é dado por:

$$n_e = 2j + 1 \quad (\text{B.6})$$

Um espectro de raios X é formado pelos fótons emitidos por cada preenchimento de vacância. Suponha que um elétron do nível K é inicialmente removido do átomo de uma amostra abrindo uma vacância. Na primeira desexcitação, um elétron do nível L pode realizar um salto quântico para preenchê-la produzindo um vazio no nível L. Este poderá ser preenchido por um elétron no nível M, onde surge outro vazio que por sua vez será preenchido por um elétron do nível N.

O efeito dessa cadeia de preenchimentos de vazios equivale à migração de cada vacância sempre em direção a um nível de menor energia. Quando a vacância surge, finalmente, no nível de mais baixa energia, também chamada de banda de valência, ela é preenchida por um elétron livre qualquer no material e o átomo estaria de volta ao seu estado fundamental.

Cada um dos eventos de transição de elétrons entre estados quânticos está relacionado a uma perda de energia na forma de emissão de raios X característicos, ou seja, fótons com energias características bem definidas para cada elemento. Estes fótons é que formam o de espectro de raios X característicos.

A diferença de energia entre os dois estados quânticos envolvidos será a energia do fóton emitido em cada evento de ocupação de vacâncias. Assim, a transição entre um elétron do subnível L_3 para o nível K, resulta na emissão de fótons chamada K- L_3 . A energia deste fóton é expressa como:

$$E_{K-L_3} = E_K - E_{L_3} \quad (B.7)$$

Se a transição for do subnível M_3 para o nível K, temos a emissão de fótons da linha K- M_3 , com energia:

$$E_{K-M_3} = E_K - E_{M_3} \quad (B.8)$$

Entretanto, nem todas as transições entre estados quânticos são possíveis, uma vez que existem transições proibidas, como pode ser notado nas de regras de variação dos números quânticos:

$$\begin{pmatrix} \Delta l = \pm 1 \\ \Delta j = 0, \pm 1 \end{pmatrix} \quad (B.9)$$

Tabela B.1- Os níveis e subníveis de energias possíveis de K a N

Nível	Subnível	Números quânticos			Número máximo de elétrons
		n	l	j	
K		1	0	1/2	2
L	L ₁	2	0	1/2	2
	L ₂	2	1	1/2	2
	L ₃	2	1	3/2	4
M	M ₁	3	0	1/2	2
	M ₂	3	1	1/2	2
	M ₃	3	1	3/2	4
	M ₄	3	2	3/2	4
	M ₅	3	2	5/2	6
N	N ₁	4	0	1/2	2
	N ₂	4	1	1/2	2
	N ₃	4	1	3/2	4
	N ₄	4	2	3/2	4
	N ₅	4	2	5/2	6
	N ₆	4	3	5/2	6
	N ₇	4	3	7/2	8

São permitidas apenas as transições que estão de acordo com as regras representadas pela equação B.9. O nível L, por exemplo, possui 3 subníveis L₁, L₂ e L₃. Apenas as transições K-L₂ e K-L₃ ocorrem. A transição K-L₁ é proibida ($\Delta l=0$ e $\Delta j=0$).

B.3- A emissão de fluorescência de raios X

Basicamente, o processo de interação predominante entre a radiação ionizante e a matéria responsável pela fluorescência de raios X é o efeito fotoelétrico. O espalhamento coerente e incoerente também ocorre, mas são parâmetros indesejáveis porque prejudicam o limite de detecção. A fluorescência de raios X por dispersão em

energia utiliza detectores de estado sólido que discriminam diretamente a energia dos raios X que chegam ao detector. A análise por fluorescência de raios X consiste de três etapas: a excitação dos elementos que constituem a amostra, a absorção dos raios X e a detecção dos raios X emitidos pela amostra (LACHANCE *et al.*, 1995; e ANJOS, 2000a).

Para chegar a uma relação entre a intensidade da radiação fluorescente e a concentração W_i de cada elemento i numa amostra; assume-se que a amostra é homogênea e possui uma espessura D . Ela é composta por n elementos com diferentes concentrações W_i (onde $i = 1, 2, 3, \dots, n$).

A fração da radiação incidente que leva a emissão de uma determinada linha de raios X característicos é determinada por uma probabilidade de excitação que é produto de três outras probabilidades (COSTA, 2003, PEREIRA, 2003):

$$P_{E_i} = P_{\text{nível}} \cdot P_{\text{linha}} \cdot P_{\text{fluorescência}} \quad (\text{B.10})$$

onde:

$P_{\text{nível}}$ é a probabilidade que a radiação incidente retire elétrons de um dado nível quântico, níveis K, L, M, N, etc;

P_{linha} é a probabilidade que uma determinada linha seja emitida dentro de sua série. Para um elétron retirado do nível K podemos ter as seguintes transições do nível L: K-L₂ e K-L₃;

$P_{\text{fluorescência}}$ é a probabilidade de ocorrer emissão de fluorescência de raios X ao invés de elétron Auger, a partir de uma transição realizada entre dois estados quânticos.

O átomo fica excitado quando libera um elétron orbital. Os elétrons de níveis mais energéticos vão preenchendo as vacâncias produzidas e a energia na transição é liberada de duas formas:

- a) Como um fóton na forma de fluorescência de raios X;
- b) Como um elétron na forma de elétron Auger. Neste caso, o fóton liberado é reabsorvido dentro do átomo por outro elétron orbital. Este elétron é liberado do átomo com uma energia igual à diferença entre a energia do fóton absorvido e a energia de

ligação do elétron. Uma importante consequência na emissão de elétrons Auger é o fato que o número de raios X característicos produzidos é menor do que o esperado.

O rendimento de fluorescência ω é definido como a probabilidade para que o fóton produzido seja liberado do átomo sem ser reabsorvido gerando um elétron Auger. Assim, ω pode ser representado como:

$$\omega = \frac{n_s}{n_p} \quad (\text{B.11})$$

$$n_p = n_s + n_A \quad (\text{B.12})$$

onde:

n_s é o número de fótons produzidos como fluorescência de raios X;

n_p é o número de fótons que são produzidos devido as vacância nos níveis e sub-níveis atômicos;

n_A é o número de fóton que são reabsorvidos dentro do átomo, produzindo elétrons Auger.

O rendimento de fluorescência para linha K é dado pelo número de fótons n_K emitidos como fluorescência de raios X, para todas as linhas K, dividido pelo número de fótons criados N_K devido as transições entre os estados quânticos. Assim, tem-se:

$$\omega_K = \frac{n_{K-L_3} + n_{K-L_2} + n_{K-M_3} + \dots}{N_K} = \frac{\sum n_K}{N_K} \quad (\text{B.13})$$

O rendimento de fluorescência ω_L para as linhas L tendo pode assumir três diferentes valores, ω_{L_1} , ω_{L_2} e ω_{L_3} .

A emissão de elétrons Auger é mais comum em elementos com baixo número atômico ($Z < 20$) porque os elétrons estão mais fracamente presos e os fótons característicos são mais facilmente absorvidos.

Uma das consequências do efeito Auger é que as linhas espectrais de uma dada série não são tão intensas como prevista pelo número de vacâncias criadas no orbital associado.

As emissões de fótons de fluorescência e elétrons Auger são processos de decaimentos concorrentes e a predominância de um ou outro depende basicamente do número atômico do elemento analisado na amostra. A emissão de elétrons Auger é a principal limitação na sensibilidade de experimentos com elementos com baixo número atômico.

Pode-se definir o rendimento de fluorescência de um modo geral como o número de raios X efetivamente emitidos em relação ao número de vacâncias produzidas em um dado nível

B.4- A Intensidade relativa das linhas de raios X característicos:

A intensidade relativa entre a linha específica e as outras linhas na série dá probabilidade para que uma determinada linha específica seja emitida dentro de uma série. Assim, a probabilidade que a linha K-L_{2,3} seja emitida em relação as outras linhas K é dada pelo fator:

$$f_{K-L_{2,3}} = \frac{I_{K-L_{2,3}}}{\sum I_{\text{todas as linhas K}}} \quad (\text{B.14})$$

Experimentalmente a linha K-L₃ é, aproximadamente, duas vezes mais intensa que a linha K-L₂. A intensidade relativa para linha K-L_{2,3} é dada por:

$$f_{K-L_{2,3}} = \frac{I_{K-L_{2,3}}}{I_{K-L_{2,3}} + I_{K-M_3}} \quad (\text{B.15})$$

As intensidades das demais linhas por serem muito pequenas podem ser desprezadas. A probabilidade de emissão da série L₃-M_{4,5} em relação as outras linhas L é dada pela equação:

$$f_{L_3-M_{4,5}} = \frac{I_{L_3-M_{4,5}}}{\sum I_{\text{todas as linhas L}}} \quad (\text{B.16})$$

B.5- A espectrometria por fluorescência de raios X

A espectrometria por fluorescência de raios X é útil tanto como técnica de análise qualitativa, técnica não destrutiva que permite identificar os elementos presentes em uma amostra e também útil como técnica de análise quantitativa, ou seja, que auxilia na determinação da concentração elementares. (KLOCKENKAMPER, 1996a).

Na espectrometria de fluorescência de raios X uma fonte de radiação provoca a excitação dos átomos das substâncias que se pretende analisar. Quando um átomo no estado fundamental é irradiado por ação de uma fonte externa de energia, ele absorve esta energia promovendo elétrons a níveis mais energéticos. Neste estado o átomo estará em um estado instável chamado estado excitado.

Como na natureza tudo tende a buscar o estado de estabilidade, o átomo excitado tende naturalmente a retornar ao seu estado fundamental, ocorrendo uma emissão de energia. Esta energia envolvida na absorção é uma característica específica de cada elemento químico, permitindo a sua identificação e correspondente quantificação.

Quando um feixe de radiação ionizante incide sobre a amostra, ocorrem interações dos fótons do feixe com os átomos dos elementos constituintes da amostra. Desta forma, pode ocorrer, além da excitação, a ionização dos elementos por meio do efeito fotoelétrico ou espalhamento Compton, por exemplo. Como consequência, os átomos dos elementos emitem linhas espectrais com energias características e cujas intensidades estão relacionadas com a concentração do elemento na amostra.

A técnica analítica da fluorescência e suas variantes tem sido de grande valia em pesquisas nas áreas biológicas e das ciências exatas, principalmente nas pesquisas ligadas à agropecuária, agroindústria, geologia, ciências ambientais, físicas e químicas, etc., por permitir na maioria das vezes uma análise química inorgânica, de modo não destrutivo e simultâneo para vários elementos químicos.

As técnicas de fluorescência têm ainda a vantagem de permitir a análise direta de amostras sólidas, como nas técnicas de fluorescência de raios X com dispersão em energia (EDXRF), fluorescência de raios X por dispersão de comprimento de onda (WDXRF) ou fluorescência de raios X com microsonda (μ -XRF), que e não têm a

necessidade de fazer a digestão química das amostras, normalmente obrigatória em equipamentos tradicionais utilizados na química analítica.

Quando se trata de amostras líquidas, traz a vantagem de necessitar de pouco volume (TXRF), da ordem de microlitros, com sensibilidade analítica compatível com instrumentação mais sofisticada, como espectrofotometria de absorção atômica (AAS), espectrofotometria de emissão atômica (AES).

B.6- A reflexão e refração da luz

A reflexão e a refração são fenômenos comuns que estão relacionados não só à propagação da luz, mas também à propagação das ondas eletromagnéticas em geral, incluindo os raios X.

Quando a luz está se propagando em um determinado meio e atinge uma superfície de um meio translúcido como, por exemplo, um bloco de vidro transparente, parte dessa luz retorna para o meio no qual estava se propagando. Este fenômeno é chamado de reflexão da luz. Já a outra parte do feixe de luz que passa para o outro meio, ou seja, do ar para o vidro, caracteriza a refração da luz.

Esses dois fenômenos podem ocorrer de forma simultânea, no entanto, pode acontecer de um dos dois prevalecer sobre o outro, mas isso depende da natureza dos meios que a luz está incidindo e das condições de incidência.

A figura B.2 mostra um esquema demonstrando os fenômenos da refração e da reflexão da luz, onde α_1 é o ângulo de incidência e α_2 é o ângulo de refração. Na reflexão, o ângulo de incidência é igual ao de reflexão (α_1).

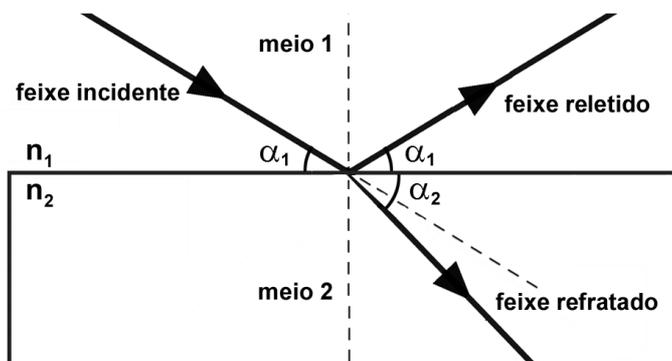


Figura B.2- Reflexão e refração de um feixe de luz

A reflexão e refração da luz obedecem às seguintes regras:

- a) os feixes incidente, refletido e refratado pertencem a um plano normal à superfície da interface
- b) na reflexão, o ângulo incidente é igual ao ângulo refletido
- c) na refração, a relação entre o feixe incidente e o feixe refratado é dado pela lei de Snell:

$$v_2 \cdot \cos(\alpha_1) = v_1 \cdot \cos(\alpha_2) \quad (\text{B.17})$$

onde: v_1 é a velocidade de propagação da luz no meio 1, v_2 a velocidade de propagação no meio 2, α_1 é o ângulo incidente e α_2 o ângulo da refração.

Dividindo-se a equação B.17 pela velocidade da luz no vácuo (c), tem-se:

$$\frac{v_2}{c} \cdot \cos(\alpha_1) = \frac{v_1}{c} \cdot \cos(\alpha_2) \quad (\text{B.18})$$

Como o índice de refração absoluto é definido como:

$$n = \frac{c}{v} \quad (\text{B.19})$$

sendo v é a velocidade da luz no meio em que a luz se propaga, a equação B.18 pode ser reescrita:

$$n_1 \cdot \cos(\alpha_1) = n_2 \cdot \cos(\alpha_2) \quad (\text{B.20})$$

onde: n_1 e n_2 são os índices de refração absolutos dos meios 1 e 2, respectivamente.

Quando se trata de radiação eletromagnética de energia na faixa dos raios X no espectro, o fenômeno da refração é mais bem descrito pela Teoria de Lorentz.

Neste caso, o índice de refração é dado por um número complexo e também adimensional:

$$n = 1 - \delta - i\beta \quad (\text{B.21})$$

A parte real do índice de refração é dada por:

$$n = 1 - \delta \quad (\text{B.22})$$

Na equação B.21, o termo δ está associado com a dispersão de raios X no meio 2. O valor de δ pode ser obtido pela equação B.23 para raios X com energias superiores às das bandas de absorção do material do meio 2 (E_K e E_L) (**KLOCKENKAMPER, 1996a**):

$$\delta = (4,16 \times 10^{-4}) \cdot \rho \cdot \frac{Z}{A} \cdot \frac{1}{E^2} \quad (\text{B.23})$$

onde: ρ é a densidade do material (g/cm^3) do meio 2;

Z é o número atômico;

A é a massa atômica (g/mol) e

E é a energia dos raios X incidentes (keV).

A parte imaginária β está associada com a absorção dos raios X no meio e pode ser representada como:

$$\beta = \frac{9,87 \times 10^{-9} \cdot \left(\frac{\mu}{\rho} \right)}{E} \cdot \rho \quad (\text{B.24})$$

Onde (μ/ρ) é o coeficiente de absorção de massa do material do meio 2 (cm^2/g) para a energia dos raios X incidentes.

Os parâmetros δ e β são quantidades pequenas (da ordem de 10^{-5} a 10^{-10}). Na região dos raios X, os valores de β são muito menores do que δ . A tabela B.2 mostra valores de δ e β para alguns materiais calculados para a energia da linha K_α do molibdênio (17,4 keV). Para compostos e misturas, δ e β são calculados, levando-se em conta a contribuição de cada elemento:

$$\delta_{\text{total}} = \sum_{i=1}^n c_i \cdot \delta_i \quad (\text{B.25})$$

$$\beta_{\text{total}} = \sum_{i=1}^n c_i \cdot \beta_i \quad (\text{B.26})$$

onde c_i é a fração de massa de cada elemento individualmente.

No processo de reflexão total o ângulo de refração tende a zero e o feixe de radiação refratado tangencia a interface entre os meios 1 e 2. Consequentemente há um ângulo de incidência mínimo, chamado de ângulo crítico, a partir do qual a refração não ocorre e toda radiação incidente sofre reflexão total. A figura B.3 mostra esquematicamente o processo de reflexão total. Nas situações A e B não ocorre reflexão total por que o ângulo de incidência é maior que o ângulo crítico e, portanto, ocorre refração. Já na situação C, o feixe incide num ângulo menor do que o ângulo crítico, como consequência toda a radiação incidente sofre reflexão total, ou seja, não há refração.

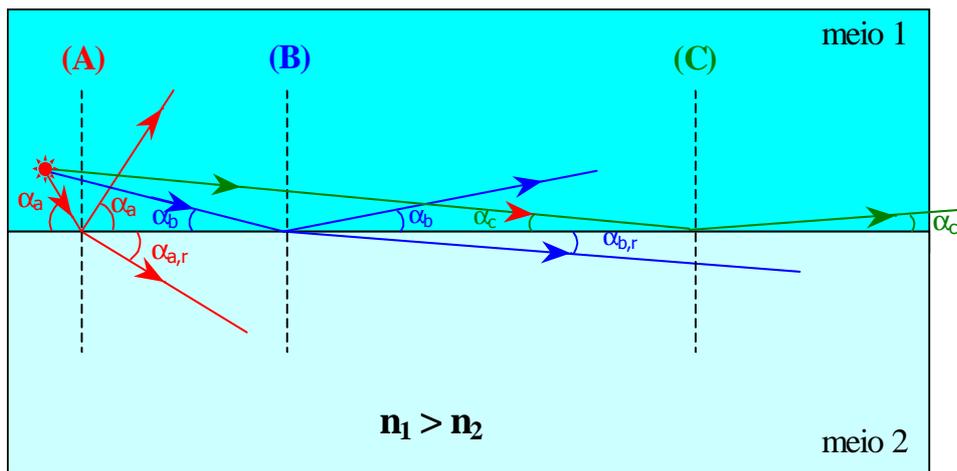


Figura B.3– Representação da reflexão total

De acordo com a equação B.20, se o ângulo de refração (α_2) tender a zero, e considerando o índice de refração do meio 1 como o índice de refração do ar ($n_1 \cong 1$), pode-se determinar o ângulo crítico, ou seja, o valor que o ângulo de incidência tem que assumir para que ocorra o fenômeno da reflexão total:

$$\cos(\alpha_{\text{crítico}}) = n_2 \quad (\text{B.27})$$

Como o índice de refração do meio 2 pode ser representado pela parte real do índice de refração dado pela equação B.16, tem-se:

$$\cos(\alpha_{\text{crítico}}) = 1 - \delta \quad (\text{B.28})$$

Tabela B.2– Densidades de materiais (ρ) e partes real (δ) e imaginária (β) do índice de refração da linha K_{α} do Mo (17,4 keV)

Refletor	ρ (g/cm ³)	δ (10 ⁻⁶)	β (10 ⁻⁸)
Lucite	1,16	0,9	0,055
Vidro de carbono	1,41	1,0	0,049
Nitrato de boro	2,29	1,5	0,090
Quartzo	2,20	1,5	0,46
Alumínio	2,70	1,8	0,79
Silício	2,33	1,6	0,84
Cobalto	8,92	5,6	19,8
Níquel	8,91	5,8	21,9
Cobre	8,94	5,6	24,1
Germânio	5,32	3,2	18,7
Tântalo	16,6	9,1	87,5
Platina	21,45	11,7	138,2
Ouro	19,3	10,5	129,5

Como o ângulo crítico é muito pequeno, portanto pode-se expandir a função cosseno numa série de Taylor:

$$\cos(\theta) = 1 - \frac{\theta^2}{2!} + \frac{\theta^4}{4!} - \dots \quad (\text{B.29})$$

Usando apenas os dois primeiros termos da expansão na equação B.29, tem-se:

$$\cos(\alpha_{\text{crítico}}) = 1 - \frac{\alpha_{\text{crítico}}^2}{2} \quad (\text{B.30})$$

Relacionando-se as equações B.29 e B.28, obtém-se:

$$1 - \frac{\alpha_{\text{crítico}}^2}{2} = 1 - \delta \quad (\text{B.31})$$

Desta forma pode-se escrever uma relação mais simples para o ângulo crítico da reflexão total:

$$\alpha_{\text{crítico}} \approx \sqrt{2\delta} \quad (\text{B.32})$$

Substituindo a relação de δ dada pela equação B.23 na equação B.32, tem-se:

$$\alpha_{\text{crítico}} \approx \frac{2,88 \times 10^{-2}}{E} \sqrt{\rho \cdot \frac{Z}{A}} \quad (\text{B.33})$$

A equação B.33 fornece valiosas conclusões sobre a técnica TXRF. Além de fornecer o ângulo crítico de reflexão total, mostra que o ângulo crítico é diretamente proporcional à densidade do material do meio 2 e inversamente proporcional à energia da radiação incidente. A tabela B.3 fornece os valores dos ângulos críticos para as energias de 8,4 keV, 17,4 keV e 35 keV para diferentes materiais e elementos.

Tabela B.3– Ângulos críticos da TXRF para vários materiais e diferentes energias.

Refletores	Ângulo crítico (mrad)		
	8,4 keV	17,44 keV	35 keV
Lucite	2,7	1,3	0,7
Vidro de carbono	2,9	1,4	0,7
Nitrato de boro	3,7	1,7	0,9
Vidro de quartzo	3,7	1,7	0,9
Alumínio	3,8	1,9	0,9
Silicone	3,7	1,7	0,9
Cobalto	7,0	3,3	1,7
Níquel	7,2	3,5	1,7
Cobre	7,0	3,3	1,7
Germânio	5,2	2,6	1,3
Tântalo	8,9	4,4	2,1
Platina	10,1	4,9	2,4
Ouro	9,6	4,5	2,3

A figura B.4 mostra o comportamento do ângulo crítico para quatro materiais: silício, Lucite, quartzo e ouro em função da energia da radiação incidente. Pode-se observar que o quartzo apresenta uma característica semelhante ao do silício.

O fenômeno de reflexão total de raios X somente ocorre se o ângulo de incidência do feixe incidente (α_1) for menor do que o ângulo crítico. Para a maioria dos refletores utilizados em TXRF este valor é menor do que $0,1^\circ$. Dois parâmetros são importantes quando ocorre a reflexão total, o coeficiente de reflexão total (R), que é aproximadamente 100% para ângulos de incidência menores do que o ângulo crítico, e o poder de penetração (Z_p), que para ângulos menores do que o ângulo crítico é da ordem de 10^{-9} m. Tanto o coeficiente de reflexão (R) como o poder de penetração (Z_p), pode ser calculado a partir da teoria do eletromagnetismo clássico.

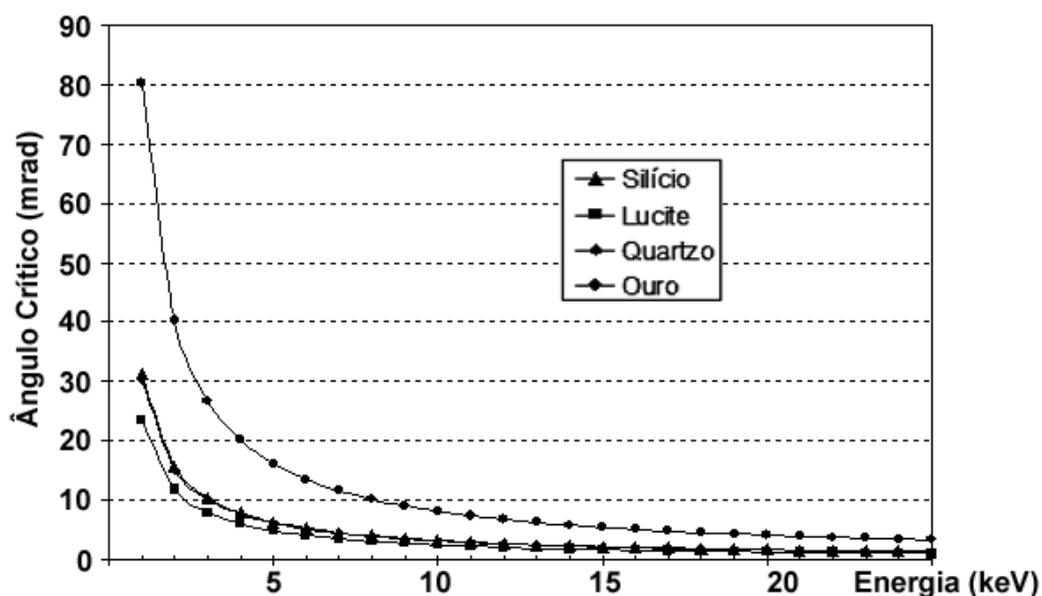


Figura B.4– Ângulo crítico em função da energia para diferentes materiais

B.7- Análise quantitativa

Uma das características importantes sobre a técnica de TXRF são as pequenas quantidades de amostras necessárias para de proceder à análise. Amostras da ordem de 1mg, ou menos, podem ser processadas, quando, então, se deposita 5 μ L dessa amostra já processada sobre o refletor que será exposto à radiação para que aconteça a excitação e, posteriormente, a fluorescência.

Neste caso, a amostra pode ser considerada um filme fino e os efeitos de absorção podem ser desprezados. Neste 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 para este elemento, o coeficiente de reflexão do refletor e a transmissão da radiação no ar.

Além disso, as amostras depositadas nos refletores não possuem uma geometria regular e reprodutível, características das quais dependem as análises por meio de incidência de radiação usada na etapa de excitação.

A dependência do método de análise da geometria do sistema pode ser contornado calculando-se a intensidade relativa ($I_{r,i}$) para cada elemento em relação à concentração conhecida de um padrão interno adicionado na amostra. Desta forma, pode-se escrever uma equação em relação a um padrão com intensidade I_S :

$$\frac{I_i}{I_S} = \frac{K \cdot I_o \cdot S_i \cdot W_i [1 + R(\alpha)] \cdot T_{ar}}{K \cdot I_o \cdot S_S \cdot W_S [1 + R(\alpha)] \cdot T_{ar}} \quad (\text{B.34})$$

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 são 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:

$$\frac{I_i}{I_S} \cdot W_S = \frac{S_i}{S_S} \cdot W_i \quad (\text{B.35})$$

A equação B.35 pode ainda ser escrita como:

$$I_{r,i} = S_{r,i} \cdot W_i \quad (\text{B.36})$$

onde:

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

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

A equação B.36, fundamental na análise por TXRF quando se utiliza um padrão interno, mostra uma relação simples entre a intensidade relativa e a concentração de um elemento i . O objetivo, ou seja, o parâmetro que se quer determinar, é a concentração elementar W_i . A intensidade relativa se obtém experimentalmente, e, a sensibilidade relativa, através de padrões mono ou multielementares com concentrações conhecidas.

B.8- O limite de detecção na técnica SRTXRF

Em um espectro de pulsos de raios X pode-se observar uma linha aproximadamente contínua sob os picos característicos dos elementos que compõe a amostra. A base delimitada por esta linha decorre principalmente das contagens devido às interações das radiações espalhadas pela amostra, estruturas em torno, pelo próprio detector, e também dos raios X características emitidos pelos elementos.

O limite de detecção, ou limite mínimo detectável (LMD), representa a menor quantidade, seja de concentração, massa, volume, que pode ser discriminada estatisticamente em relação contagens fortuitas de fundo no espectro, ou seja, o *background* ou radiação de fundo. Para o cálculo LMD na técnica SRTXRF, foi determinada a área abaixo do pico de cada elemento de interesse presente no espectro, obtendo-se, assim, as intensidades do *background*. Os ajustes foram realizados para amostras certificadas de fígado bovino utilizando-se a seguinte equação (STRELI, *et al.*, 2008):

$$\mathbf{LMD} = 3 \sqrt{N_B} \frac{C_i}{N_i} \quad (\text{B.37})$$

onde:

C_i = concentração certificada do elemento i em uma amostra de referência

N_B = *background* sob o pico de fluorescência do elemento i na amostra

N_i : intensidade da fluorescência relativa ao elemento i na amostra.

Os limites de detecção para a técnica de TXRF são bem menores do que para outras técnicas de fluorescência, devido principalmente a três fatores:

- (1) baixa intensidade do *continuum*, devido à reduzida transferência de energia ao suporte da amostra em relação à XRF,
- (2) o fluxo da radiação primária disponível para a excitação da amostra, devido ao feixe refletido, é muito mais efetivo do que na XRF e
- (3) a distância amostra - detector é muito menor que na ED-XRF, aumentando, assim a eficiência de detecção dos raios X característicos.

Um espectro de energia com um único pico de fluorescência de raios X é representado esquematicamente na figura B.5, onde, N_i é a contagem líquida e N_B a contagem relativa ao *background*.

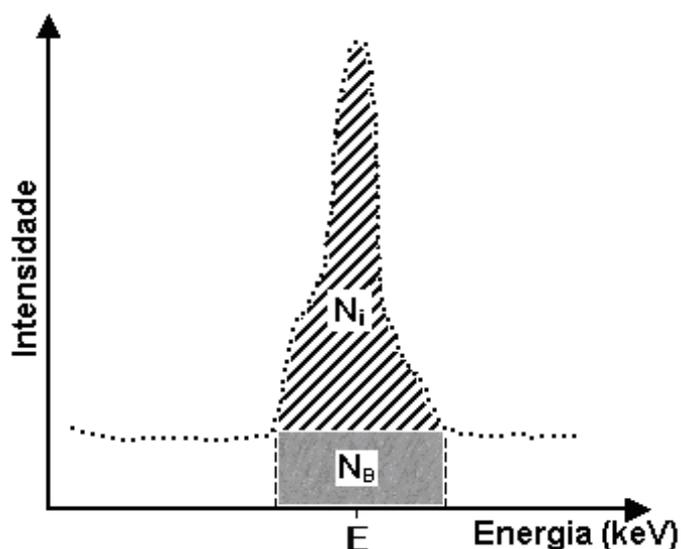


Figura B.5- Pico de fluorescência de raios X

Uma maneira usual de se comparar diferentes técnicas analíticas é utilizando o LMD. Normalmente, ele é determinado para alguns elementos e, para os demais elementos de interesse, são obtidos por extrapolação a partir do qual se constrói a curva do limite de detecção.

O limite de detecção em TXRF é da ordem de $\text{ng}\cdot\text{g}^{-1}$. Entretanto, em algumas condições especiais, pode se chegar a valores para o limite de detecção de $\text{pg}\cdot\text{g}^{-1}$ (WOBRAUSCHEK *et al.*, 1991).

Dentre algumas das vantagens do uso das técnicas de fluorescência por reflexão total pode-se citar:

- a) a excitação da amostra é efetuada por ambos os feixes, o incidente e o refletido;
- b) o sinal fluorescente é, pelo menos, duas vezes maior se comparado às geometrias da excitação convencional no caso EDXRF, de $45^\circ/45^\circ$;
- c) o *background* espectral causado pelo espalhamento no refletor é bastante reduzido (alta reflexibilidade – baixa transmissão no material);
- d) a contribuição do espalhamento na amostra é mínima devido ao ângulo de 90° entre a radiação incidente e a radiação espalhada em relação ao detector;
- e) o detector é posicionado bem próximo a amostra na superfície do refletor resultando num ângulo sólido de detecção bem maior se comparada às outras técnicas;
- f) as massas de amostras necessárias são muito pequenas e devem ser preparadas de maneira a formar um filme fino sobre um refletor. Portanto, nenhuma absorção praticamente ocorre dentro da amostra. Além disso, verifica-se uma correlação linear entre a intensidade da radiação fluorescente e a concentração dos elementos na amostra.

Valores mais baixos para os limites de detecção ainda podem ser alcançados se os parâmetros físicos que o influenciam forem ajustados, tais como a sensibilidade e o nível de *background*.

A sensibilidade desta técnica pode ser aumentada considerando-se a(o):

- a) intensidade da radiação incidente;
- b) distância da fonte à amostra e da amostra ao detector;
- c) área ativa do detector;

- d) sistema eletrônico utilizado para processar os pulsos de voltagem, que têm origem no detector;
- e) mecanismo de monocromatização do feixe primário para modificar a distribuição do espectro da radiação.

Da mesma forma, a intensidade do *background* pode ser melhorada considerando-se a(o):

- a) intensidade da radiação incidente, sua distribuição espectral e a respectiva seção de choque de espalhamento para a cada amostra;
- b) massa da amostra;
- c) forma geométrica e do material do substrato, assim como da profundidade de penetração da radiação incidente no substrato e do coeficiente de reflexão;
- d) medida no ar que leva o espalhamento da radiação primária e a contribuição da radiação característica do ar (ou atmosfera de Ar ou Kr);
- e) ajuste real do ângulo de incidência; e
- f) ângulo sólido do detector.

A figura B.6 mostra uma comparação do limite de detecção entre técnicas analíticas que concorrem com a TXRF (STRELI, 1996).

A TXRF, cuja geometria é de aproximadamente $0^\circ/90^\circ$, possui vantagens em relação à EDXRF convencional cuja geometria é de $45^\circ/45^\circ$. O campo de radiação é uniforme e a intensidade da radiação é constante, mas, no caso da EDXRF, diminui exponencialmente ao interagir com o material devido à atenuação da radiação na sua penetração.

Dentre essas vantagens da técnica podemos citar:

- a) diminuição do *background*;
- b) dupla excitação da amostra por ambos os feixes primário e refletido;
- c) pequena distância amostra-detector (em torno de 1 mm);
- d) ângulo sólido grande;
- e) pequenas quantidades de amostra; e
- f) baixos limites de detecção.

O LMD para os elementos de número atômico abaixo de 13 (Al) é afetado pelo baixo rendimento de fluorescência e outras limitações bem conhecidas em energia dispersiva, como baixa probabilidade de ocorrência do efeito fotoelétrico, absorção dos raios X característicos pela janela de Be e pelo ar entre a amostra e o detector. Trabalhando sob vácuo e com detector sem janela de Be, alguns autores tem relatado limites de detecção de 10 ng para o O e 0,8 ng para Mg (STRELI *et al.*, 1991)

1,0 E+03				
1,0 E+02	Ni Mg, F Cr, Y			
1,0 E+01	K, Zn, Ge Pt, Ta, Mo, Zn			
1,0 E+00	Cl Bi, Sm, Nd Rb, Ba		Hg	
1,0 E-01	Co, Se Sb, Gd As, Cd, Rh, Sr, La Ag, Na, W, Al Hg, U V, Cu, Ga Sm Au, Hf	Al Si P S Cl, Ag, In, U Pd, Cd, Sm, Sb, Yb Mo, K, Hf, Ta W, Ba, Ca, La Pt, Au, Hg, Pb, Bi Rb, Sr, Y Ni, Ti, Cu, Se, As V, Co, Zn, Ga, Ge Cr, Mn, Fe	Se, Ti	Ca K Fe P Br
1,0 E-02	Ir, Lu Mn, Eu In Dy		Ba Co, Cu, Fe, Mo Al, Cr, Mn	B Na Be, Li Cr
1,0 E-03			Ag Mg Cd Zn	Cd Mg, I Al, Au, Ni Hg Ag, Cu, Ge, Mo, Pd, Bi Ba, Gd, Mn, Ni, Pt
1,0 E-04				Au, Dy, Ga, Pb Co, Er, Nb Eu Bi, Ca, La, Hf, Ir, Pr
	INAA	TXRF	ET-AAS	ICP-MS

Figura B.6– Limites de detecção de técnicas analíticas (TOLG *et al.*, 1993).

Em relação à figura B.6, seguem-se as abreviações e com os nomes das técnicas de análise: **INAA** (*induced neutron activation analysis*), **ET-AAS** (*electro-thermal atomic absorption spectroscopy*) e **ICP-MS** (*inductively coupled plasma mass spectrometry*).

B.9- Radiação síncrotron

A radiação síncrotron é a radiação eletromagnética emitida quando partículas carregadas com velocidade relativística são submetidas à aceleração radial. A base teórica para a produção de radiação síncrotron está relacionada à descobertas do elétron por Thomson. Em 1897, Larmor derivou uma expressão da eletrodinâmica clássica para a potência total instantânea irradiada por uma partícula acelerada carregada. No ano seguinte, Liénard estendeu este resultado ao caso de uma partícula relativística submetida a aceleração centrípeta numa trajetória circular. A fórmula de Liénard mostrou que a potência da radiação é proporcional a $(E/mc^2)^4/R^2$, onde E é a energia da partícula, m é massa de repouso do elétron, e R é o raio da trajetória. A primeira observação visual da radiação síncrotron ocorreu em 1947 por Frank Elder, Robert Langmuir, Anatole Gurewitsch e Herb Pollock, no General Electric's Research Laboratory, em Schenectady (Nova York/US) (STRELI, 1996).

O uso de uma fonte de luz síncrotron na técnica TXRF permite alcançar limites de detecção baixos mais do que quando se utiliza raios X de alta potência.

Três vantagens do uso dessa fonte de excitação são especialmente importantes (KLOCKENKAMPER, 1996a):

- a) o alto brilho espectral de um feixe da radiação síncrotron resulta em um aumento da intensidade de raios X primários da ordem de 3-5 vezes comparado com os tubos de raios X convencionais;
- b) como a radiação síncrotron cobre uma ampla faixa de energias do espectro de raios X, ela é altamente indicada para *energy tuning*. Um cristal com multicamadas preferencialmente usado para a seleção de uma banda de energia particular pode ser facilmente ajustado para uma determinada energia de excitação na busca por elementos;
- c) o *background* espectral já reduzido por reflexão total é bastante baixo devido a polarização da radiação síncrotron. O feixe é linearmente polarizado a 100% do plano horizontal do anel de armazenamento. O detector deve ser colocado num plano horizontal ou vertical. Com esta configuração, o nível *background* pode ser atingir valores menores.

A radiação síncrotron constitui uma fonte de luz de alto brilho que os cientistas utilizam para reunir informações sobre propriedades estruturais, químicas e físicas de material a nível molecular.

Um síncrotron produz luz usando poderosos eletroímãs e ondas de radiofrequência para acelerar elétrons, em um anel de armazenamento, a velocidades próximas à da luz. O anel de armazenamento é um polígono regular de doze lados, feito de secções retas em conjunto com magnetos de flexão. À medida que os elétrons passam por cada ímã, eles perdem energia sob a forma de uma luz muito brilhante e altamente concentrada.

Esta luz é composta de diferentes espectros de luz (ou faixas de energia), tais como infravermelho, ultravioleta, raios X. Essa radiação pode ser conduzida para fora do anel de armazenamento em direção às estações experimentais ou linhas de luz, onde os pesquisadores podem escolher uma faixa de comprimentos de onda para analisar suas amostras.

Esta ferramenta pode ser usada para investigar a matéria e analisar uma série de processos físicos, químicos, geológicos e biológicos. As informações obtidas pelos cientistas podem ser usadas para ajudar a conceber novas drogas, examinar a estrutura de superfícies, desenvolver óleos de motores mais eficientes e menores, construir chips de computadores mais poderosos, desenvolver novos materiais para implantes médicos mais seguros, e ajudar com a limpeza de resíduos de mineração, dentre diversas outras aplicações.

Algumas propriedades básicas da radiação síncrotron trazem ganhos importantes para TXRF (**STRELI, 1996**):

- a) forma contínua na faixa do infravermelho aos raios X;
- b) alta intensidade;
- c) alto nível de colimação;
- d) polarização linear no plano de órbita;
- e) polarização elíptica ou circular acima e abaixo do plano da órbita para a radiação magnética da curva;
- f) tamanho da fonte é pequena, determinada por feixe de elétrons;
- g) estrutura de tempo bem definida;
- h) características quantitativas conhecidas;

i) alta estabilidade de intensidade e posição de fonte.

Alguns aspectos gerais da engenharia da envolvida da produção de luz síncrotron por ressaltadas por **CASTRO (2001)**, que resumiu os principais elementos:

a) a câmara de vácuo: onde os elétrons relativísticos movem-se numa órbita fechada durante horas. A câmara necessita de alto vácuo de modo a aumentar o tempo de vida do feixe armazenado, pois, colisões desses elétrons com os átomos ou moléculas do gás residual no interior da câmara constituem um dos fatores limitantes do tempo de duração do feixe útil.

b) ímãs dipolares: geram um campo vertical constante para manter os elétrons numa trajetória fechada.

c) ímãs quadrupolares geradores de campos lineares: os elétrons em suas trajetórias circulares sofrem pequenos movimentos de amplitude lateral chamados de oscilações bétatron. Os ímãs quadrupolares são necessários para a sua focalização. Conforme indica o nome, estes ímãs têm quatro pólos opostos a 90° em volta do eixo de movimento.

d) suprimento de energia de precisão para os ímãs controlados remotamente: o campo nos ímãs é proporcional às correntes, e se contrapõem aos efeitos de histerese. Para alcançar uma órbita circular, a corrente nas curvas dos ímãs dipolares deve ser mantida constante. Além disto, se as partículas carregadas são aceleradas depois que elas são ejetadas na máquina, todo campo deve ser aumentado em sincronismo, portanto todos os suprimentos de energias são controlados por computador.

e) cavidade de radiofrequência (RF) ressonante: é a cavidade onde os elétrons são acelerados por campos eletromagnéticos resistentes. A energia perdida é substituída pela aceleração das partículas pelos fortes campos RF dentro da cavidade de ressonância. Estes campos são constituídos por ondas estacionárias. Portanto, para qualquer aceleração ser experimentada, os elétrons devem ser bem agrupados, e também devem chegar e partir da cavidade RF em fase própria com os campos de ressonância RF. De fato, isto é alcançado quase automaticamente, porque os elétrons mais rápidos serão encontrados com campos da fase imprópria e serão retardados, enquanto os mais lentos serão ainda retardados até se fundirem com o próximo feixe. Portanto, o processo é auto-regulável.

f) monitores de feixe: permitem uma estimativa das coordenadas X e Y dos elétrons movendo-se ao longo do eixo Z. Quatro eletrodos colocados simetricamente sobre a órbita carregam sinais induzidos com os feixes de elétrons movendo-se nas suas órbitas. Estes sinais são mais fortes se o feixe passar perto do eletrodo e podem ser usados no circuito fechado de realimentação para direcionar ímãs dipolares pequenos com campos nas direções X e Y e trazerem de volta o feixe desviado para a órbita oficial. A estabilidade da órbita é uma vantagem da luz síncrotron.

g) o sistema de injeção: é utilizado para preencher a máquina com elétrons já se movendo em uma direção apropriada com uma energia bastante elevada. No LNLS o sistema de injeção é usualmente um acelerador linear seguido por um anel síncrotron auxiliar. O acelerador linear deve suportar 80 keV de elétrons gerados num canhão termo iônico e elevar essa energia de 80 keV a 120 MeV, usando mais uma vez as cavidades de ressonância de RF onde os elétrons não somente são acelerados, mas como também são agrupados. Um síncrotron auxiliar pequeno depois recebe estes elétrons de 120 MeV e os aumenta a 500 MeV. Então, esses elétrons de 500 MeV são injetados no síncrotron principal, onde, mais uma vez, são acelerados a 1,37 GeV.

h) as linhas de luz: é a instrumentação que é acoplada ao anel de armazenamento de elétrons. Em cada linha de luz chegam os feixes de fótons provenientes do síncrotron e gerados pelos elétrons que circulam no anel de armazenamento. Que define a característica de luz em cada linha é o monocromador.

i) a estação experimental: é instalada numa linha de luz e formada por equipamentos e instrumentação que permitem pesquisas utilizando a luz síncrotron. Uma estação experimental inclui o sistema porta-amostra, no qual é colocada a amostra do material que se quer analisar, o aparelho goniométrico, que permite posicionar a amostra para receber adequadamente a incidência da luz síncrotron e detectores de feixes de fótons espalhados ou transmitidos, que registram os acontecimentos físicos que ocorrem nos átomos e moléculas do material em estudo.

j) tempo de vida: o tempo de vida do feixe de elétron no anel é limitado, ocorrendo um decaimento exponencial na sua intensidade no decorrer de algumas horas. O tempo de vida é definido como o tempo decorrido até a corrente do anel decresça $1/e$ de seu valor inicial (onde e é o número natural). O fator dominante sobre o tempo de vida do feixe é o espalhamento dos elétrons nos gases residuais do anel de armazenamento.

B.10- Laboratório Nacional de Luz Síncrotron(LNLS)

O Laboratório Nacional de Luz Síncrotron (LNLS), na cidade de Campinas, no estado de São Paulo, foi inaugurado em 2 de julho de 1997. Por muitos anos o laboratório foi a única fonte de luz síncrotron existente em todo o hemisfério sul.

A instalação é operada pela Associação Brasileira de Tecnologia de Luz Síncrotron (ABTLus) mediante um contrato de Gestão assinado com o Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e o Ministério da Ciência e Tecnologia (MCT).

O acelerador do LNLS conta com doze dipolos acoplados à uma tubulação com alto vácuo em forma de um dodecágono, polígono regular com 12 lados. Cada um desses dipolos curva a trajetória dos elétrons em 30 graus. Na tabela B.4 estão relacionados os principais parâmetros do anel de armazenamento de elétrons.

O objetivo desse laboratório é fomentar o desenvolvimento científico e tecnológico, colocando ao alcance de pesquisadores do Brasil e do exterior infraestrutura de luz síncrotron, microscópios eletrônicos de alta resolução, microscópios de varredura de ponta e espectrômetros de ressonância magnética nuclear. A figura B.7 mostra uma panorâmica do anel e a disposição de algumas linhas de luz no LNLS.



Figura B.7– Visão panorâmica do anel de luz no LNLS

No LNLS existem quinze estações experimentais que oferecem ótimas condições para pesquisas com nível de competitividade mundial, instalações de apoio, hospedagem e apoio financeiro a pesquisadores e projetos de pesquisa.

Tabela B.4- Principais parâmetros do anel de armazenamento de elétrons

Parâmetros	Quantidade	Unidades
Energia de operação	1,37	GeV
Energia de Injeção	120	MeV
Corrente de elétrons (máxima)	175	mA
Circunferência	93,2	m
Diâmetro médio	29,7	m
Simetria da rede magnética	6	-
Frequência de revolução	3,2	MHz
Frequência de RF	476	MHz
Emitância natural	100	nm.rad
Sintonia betatron horizontal	5,27	-
Sintonia betatron vertical	2,17	-
Frequência síncrotron (p/ tensão de 400 kV)	24	kHz
Cromaticidade natural horizontal	-7,8	-
Cromaticidade natural vertical	-9,5	-
Fator de compactação de momentum	0,0083	-
Dispersão natural de energia	0,07	%
Tempo de amortecimento betatron horizontal	7,8	ms
Tempo de amortecimento betatron vertical	7,5	ms
Tempo de amortecimento síncrotron	3,7	ms
Raio de curvatura dos dipolos	2,735	m
Campo Magnético defletor	1,67	T
Número de dipolos	12	-
Número de trechos retos para dispositivos de inserção	4	-
Comprimento livre para dispositivos de inserção	2,95	m
Perda de energia por volta nos dipolos	114	keV
Potência total irradiada nos dipolos (p/ I=100 mA)	11,4	kW
Energia crítica dos fótons emitidos nos dipolos	2,08	keV
Tempo de vida do feixe	15	h

Nas instalações do LNSL, são realizados experimentos que contribuem para ampliar os conhecimentos nas áreas de Física, Química, Engenharia, Meio Ambiente, Arqueologia, Biologia, Medicina entre outras.

As amostras foram analisadas através da técnica SRTXRF na linha XRF no LNLS. A linha XRF é o dipolo magnético D09B do anel de armazenamento. As características desta linha são apresentadas na tabela B.5.

Tabela B.5- Características da linha de luz síncrotron D09B-XRF do LNLS

XRF (4 - 20 keV)	Características
Aplicações	- Análises químicas de elementos traço ($Z > 14$) em ciências ambientais, biológicas e materiais, perfil de profundidade química de filmes finos e mapeamento químico. - Resolução espacial a 20 μm de.
Fonte	- Ímã defletor D09B (15°), $\sigma_y = 0,222$ mm. - Fluxo na amostra = $4 \cdot 10^9$ fótons. s^{-1} a 8 keV.
Monocromador	Monocromador de corte por canal (<i>channel-cut</i>)
Cristais	- Si(111): ($2d=6,217 \text{ \AA}$): 4-14 keV ($E/\Delta E=2800$) - Si(220): ($2d=3,84 \text{ \AA}$): 5-23 keV ($E/\Delta E=15000$)
Detectores	- Câmaras de ionização - Detectores de estado sólido: fotodiodos, HPGe com resolução de 150eV e Si(Li) com resolução 140 eV (ambas à 5.9 keV)
Óptica	- Capilar com 20 μm de resolução espacial
Manuseio das amostras	- Estações para experiências com incidência de feixe rasante e mapeamento bidimensional, ambas com controle de posicionamento de amostras - Câmara de vácuo (10^{-2} mbar) com geometria de excitação convencional ($45^\circ - 45^\circ$)

APÊNDICE C

ARTIGO ICXOM 2011

Elemental Concentrations in Skin of Patients with Fibroepithelial Polip Using Synchrotron Radiation Total Reflection X-Ray Fluorescence

Júlio C. A. C. R. Soares¹, Marcelino J. Anjos^{1,2}, Catarine G. L. Canellas¹ and Ricardo T. Lopes¹

¹ Nuclear Laboratory Instrumentation/COPPE Federal University of Rio de Janeiro (UFRJ)

P.O. Box 68509 - 21945-970, RJ, Brazil

ricardo@lin.ufrj.br; jcorsini@lin.ufrj.br

² Armando Dias Tavares Physics Institute, State University of Rio de Janeiro (UERJ),

524 São Francisco Xavier St. - block B - 20559-900- Rio de Janeiro, RJ - Brazil

marcelin@lin.ufrj.br

Abstract. In this work, the concentrations of trace elements were measured in acrochordon, a skin lesion also known as skin tag or fibroepithelial polyp, as well as in normal skin from the same patient. The samples were analyzed by Synchrotron Radiation Total Reflection X-ray Fluorescence (SRTXRF) in the Synchrotron Light National Laboratory (LNLS) in Campinas/São Paulo-Brazil. The collection of lesion and healthy skin samples, including papillary dermis and epidermis, has involved 17 patients. It was evaluated the presence of P, S, Cl, K, Ca, Fe, Cu and Zn in the paired samples, which were compared, and significant differences were found in some of them.

Keywords: SRTXRF, Fibroepithelial Polip, Skin Lesions, Elemental Concentration, Trace Elements.

Introduction

The information on the concentration of elements in normal and lesion using SRTXRF is scarce. Moreover, the values presented in researches done by different methods differ a lot from each other. The concentrations of some chemical elements in diseased human tissues can present differences if compared with healthy ones [1]. It has been seen that elemental content is often related with several skin lesions, and trace elements play a crucial role in a great number of enzymes that are involved in the disease evolution and its treatment [2,7,9,10]. The choice of the SRTXRF was made by the fact that it allows us to investigate small amounts of tissue with high precision.

The study of fibroepithelial polyp lesion was chosen, first, because it is easy to collect samples with low risks to the patients, and second, it is relatively frequent kind of benign skin lesions and, as others skin lesions, still not well understood.

The fibroepithelial polyp, one of the most common benign skin tumors, occur in almost half the population, equally in men and women and its incidence increase with age. Two thirds of people will have some skin tags present by the age of 70 years.

They are small, pedunculated skin-colored or brown papules that often develop in areas of skin friction around sites of skin folds, particularly around the neck, axila, between the thighs and on the eyelids. The sizes are usually 2 to 5 mm in diameter [3]. They are more common in obese patients. Some are thought to have a hormonal influence in their growth.

These lesions are benign but may be associated with

other disease states, occasionally warranting closer examination of the patient for other signs and symptoms. Many clinicians do not submit these to pathology, but occasionally it's possible to find seborrheic keratoses and melanocytic lesions in these specimens.

MATERIALS AND METHODS

Sample Collection

The paired samples were collected from 17 patients with ages between 32 to 74 years old. None of them had used any medication or cosmetic for at least a month before collecting. All the areas examined, located at face and torso, were thoroughly rinsed with 18.2MΩ Milli-Q ultra pure water. Before extracting the lesions, scissors, calipers and scalpels used were decontaminated, biological and chemically. The healthy skin were visually identified and separated from the lesion samples in order to compare the spectra to the lesions.

The samples were then washed with Milli-Q ultrapure water and then stored in polystyrene test tubes with cap at -5°C prior to analysis. Subsequently, the samples were lyophilized in free contamination environment at same time to maintain identical drying conditions. The dry weights of the samples measured were between 1.0 ± 0.1 and 17.4 ± 0.1 mg. The lowest values of weight are related to the healthy tissue, the control samples, that were extracted from the edge of lesions.

Sample Preparation

The digestion procedure of the samples was performed adding Suprapur HNO₃ (65%) to the samples at rate of 7:1

in mass and warmed in oven at 60°C for two hours. They were immediately diluted with Milli-Q ultrapure water to obtain final masses of 50, 100, 150 or 500 µg, depending on samples masses, and homogenized by strong agitation. Instead of measuring volumes, it was used the precision of a scale, with divisions of 0.1 mg, in order to improve the quality of measurements.

Next, aliquots of gallium standard solution were added to achieve a final concentration of 2 µg.g⁻¹ in each diluted sample, based on same order of magnitude of zinc concentrations in human skin as reference [4,9]. Finally, droplets of 5 µL of each sample were deposited on Lucite sample carriers and then dried in a stove to obtain a regular thin film.

Spectra Measurements

The X-ray fluorescence spectra were collected by SRTXRF, a method in which a collimated beam of synchrotron radiation hits, at small angle, the thin film over a Lucite plate and is totally reflected [6,8]. As result, an X-ray fluorescence spectrum emerges from the samples and is measured with a Si(Li) radiation detector. This experiment was carried out at set D09B-XRF bean line of LNLS (National Synchrotron Radiation Laboratory) in Campinas/São Paulo/Brazil. The area under each peak in the spectra was calculated with QXAS software from IAEA (International Atomic Energy Agency).

The concentration of each element was determined in relation to the gallium peak used as internal calibration. As the samples were diluted, it was necessary to do a correction in order to obtain the absolute concentration of the elements. To detect significant variations among concentrations, groups of normal and lesion samples were compared using the paired Student's t- test.

RESULTS

The main peaks of the elements were identified in a spectrum as showed in Figure 1.

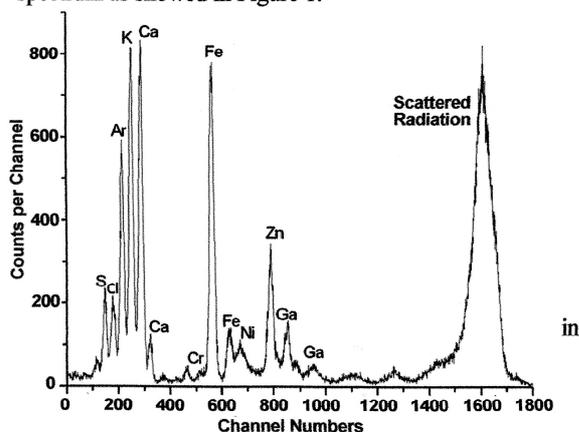


FIGURE 1. Example of a spectrum of skin samples with peaks identified.

Among the elements analyzed in this experiment (P, S, Cl, K, Ca, Fe, Cu and Zn), a comparison between control and lesions samples ($p < 0.05$), revealed significant differences in concentration of the elements P, Ca, Fe e Cu. The respective concentrations are showed for each bar in figure 2. All values are expressed in µg.g⁻¹. They represent the absolute elements concentrations in samples that included papillary dermis and epidermis, averaged over 17 patients. The error bars represents the 95% confidence interval calculated trough descriptive statistic tools.

The phosphor concentration we obtained is at the same order of magnitude as previously reported, for both control and lesion samples. It has been previously shown that P concentration decreases in seborrheic keratosis and psoriasis skin lesions if compared with healthy tissue [4,11]. However, in this work, its concentration is actually higher in lesion when compared to the healthy samples.

The phosphor-based compounds are involved in vital functions of the organism, such as building blocks for DNA and RNA [13]. Also, cells use it to store and transport energy in form of ATP. Furthermore, it is an important element of the protoplasm and nervous tissue. Nevertheless, in order to validate the higher values of P found and because of the low sensitivity of SRTXRF for this element, additional investigation is needed.

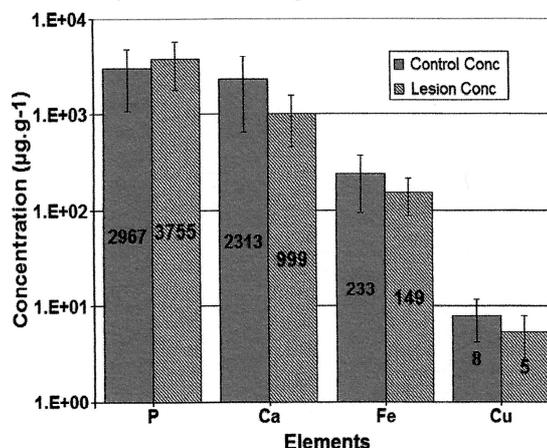


FIGURE 2. Mean values of elemental concentrations of normal and lesion samples which presented significant differences ($p < 0,05$ and $N=17$).

The estimated Ca concentrations are compatible with those obtained by XRF method. Similarly, the decrease in its concentration in lesions with relation to normal tissues, has been described before [1] and psoriatic skin [4]. Calcium, and the balance between this ion and Zinc, are known to play an important role in programmed cell death [14].

The lower level of Fe in control samples can be explained by the less amount of blood, rich in iron. Despite differences in absolute values of concentrations, practically

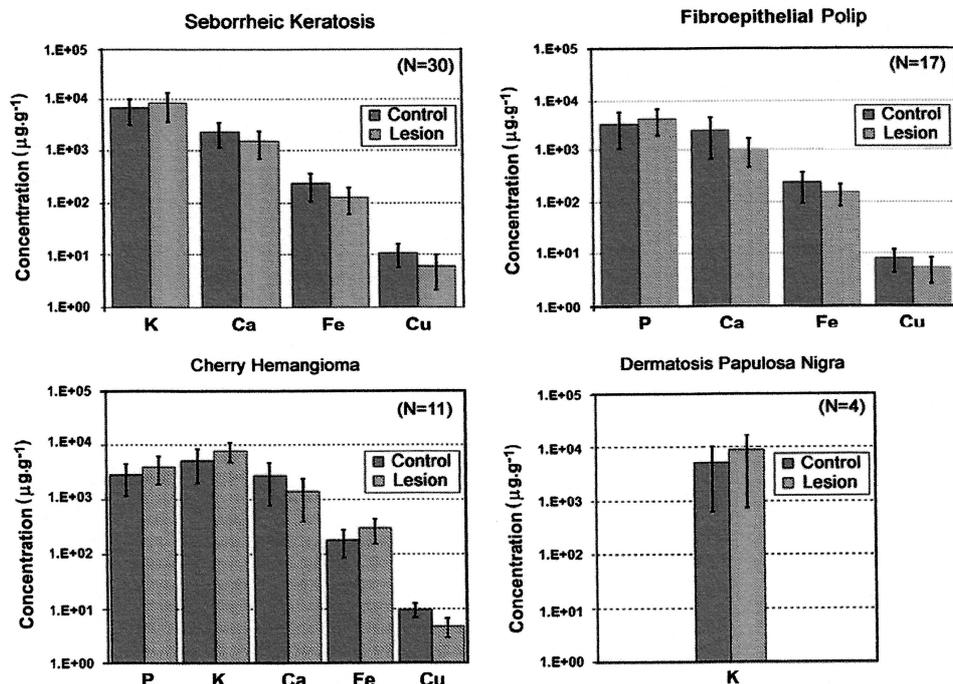


Fig. 2. Mean concentrations identified as significantly different between control and lesion samples. The error bars represent 95% confidence intervals and N is the number of samples.

However, further work is necessary to detect variations in the concentration of other elements as well as to compare the results with other types of lesions in order to better understand the elemental composition of the skin tissues and their normal and abnormal physiologies. The results in the present study can be compared with data of normal skin from its populations to see if certain habits influence its composition. Furthermore, they can be used to verify if the differences in concentration between normal skin and tissue skin disorders are general or specific.

The SRTXRF technique is adequate in quantifying trace elements present in small amounts of freeze-dried skin samples. It is relatively reliable, accurate and provides the researcher with multi-elemental information which is hard to obtain with other methods. In conjunction with statistical tools, it allows for the clear distinction of significant variations in element concentrations. The experiment, although satisfactory, can be improved by using polished silicon reflectors or even a scale with a resolution greater than 0.1 mg, used in this study. After careful assessment of this methodology and of the results obtained, it can be assured that this approach provides an important resource for the study of skin diseases including cancers.

Acknowledgments

We would like to thank FAPERJ (Fundação Carlos Chagas Filho de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro) and CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico) for their financial support, and the LNLS laboratory.

References

- Aiginger, H., Wobrauschek, P., Strek, C., 1995. Principles and development of TXRF analysis. *Anal. Sci.* 11, 471–475.
- Barr, P.J., Tomei, L.D., 1994. Apoptosis and its role in human disease. *Biotechnology* 12, 487–493.
- Bums, T., Breathnach, S., Cox, N., Griffiths, C., 2010. *Rook's Textbook of Dermatology*, eighth ed. Wiley-Blackwell, USA.
- Demaurex, N., Dischelhorst, C., 2003. Apoptosis—the calcium connection. *Science* 300, 65–67.
- Gorodetsky, R., Sheskin, J., Weinreb, A., 1986. Iron, copper and zinc in normal and in various non-malignant and malignant lesions. *Int. J. Dermatol.* 25, 440–445.
- Kurz, K., Steingleder, G., Bischof, W., Gonsior, B., 1987. PIXE in different stages of psoriatic skin. *J. Invest. Dermatol.* 88, 223–226.
- Strek, C., Wobrauschek, P., Meirer, F., Pepponi, G., 2008. Synchrotron radiation induced TXRF. *J. Anal. At. Spectrom.* 23, 792–798.
- Szigei, R., Kdlmayer, R., 2006. Autosomal-dominant calcium ATPase disorders. *J. Invest. Dermatol.* 126, 2370–2376.
- Tasaki, M., Hanada, K., Hashimoto, I., 1993. Analysis of serum copper and zinc levels and copper/zinc ratios in skin diseases. *J. Dermatol.* 20 (1), 21–24.
- Theodorakou, C., Farquarson, M.J., 2008. Human soft tissue analysis using X-rays or gamma-ray techniques. *Phys. Med. Biol.* 53, R111–149.

APÊNDICE D

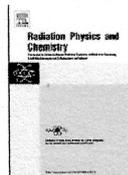
ARTIGO ISPR2012

ARTICLE IN PRESS



Radiation Physics and Chemistry

journal homepage: www.elsevier.com/locate/radphyschem



Multielemental analysis of samples from patients with dermatological pathologies using synchrotron radiation

J.C.A.C.R. Soares^a, C.G.L. Canellas^b, M.J. Anjos^{a,b}, R.T. Lopes^a

^a Nuclear Laboratory Instrumentation COPPE, Federal University of Rio de Janeiro, P.O. Box 68509-2194 5-970, Brazil

^b Physics Institute, State University of Rio de Janeiro, P.O. Box 68528-21941-972, Brazil

HIGHLIGHTS

Concentrations of trace elements were measured and compared in four skin lesions.

The results revealed significant differences of P, Ca, K, Fe and Cu levels.

This study reveals a powerful tool that can be useful for skin disorders research.

article info

Article history:

Received 29 October 2012

Accepted 23 April 2013

Key words:

Trace elements

Skin diseases

Synchrotron radiation

Skin cancer

TXRF

abstract

Using synchrotron radiation total X-ray fluorescence (SRTXRF) technique, the concentrations of trace elements were measured in four skin lesions: seborrheic keratosis, fibroepithelial polyp, cherry angioma and dermatosis papulosa nigra. The concentrations of P, S, K, Ca, Fe, Cu, Zn and Rb were evaluated in 62 pairs of lesions and healthy samples, each one having been collected from the same patient. The results revealed significant differences of P, Ca, K, Fe and Cu levels as well as a common trend in their variations between lesion and control samples among the skin diseases. This study revealed a powerful tool that can be useful for skin disorders research. The measurements were conducted at Brazilian National Synchrotron Light Laboratory (LNLS).

© 2013 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

The composition of human tissues has been frequently investigated and the results have shown that the levels of some trace elements are associated to pathologies. Found in small concentrations, they are associated to cell metabolism and have an important role in several biological processes involved in disease evolution and treatment (Theodorakou and Farquarson, 2008).

As cancer samples are rarely available, except for biopsies, the benign skin diseases analyzed have enabled us to assess the SRTXRF technique for future use in skin cancers. Aside from the aesthetic nuisance, their appearance can sometimes indicate malignancy (Burns et al., 2010) and some etiologies are not well understood.

Skin cancer is the most common form of cancer in humans and can be classified as basal-cell and squamous-cell carcinomas, derived from malignant keratinocytes, cells which are also affected in 2 of the diseases of this study, and melanoma, a malignant metastatic tumor.

The SRTXRF technique, chosen to determine elemental concentrations, has been used in several biomedical areas because it allows for analysis of small samples, due to its low detection limit and because it supplies the concentration of several chemical elements simultaneously during a single exposure (Aiginger et al., 1995; Strelcić et al., 2008).

2. Experimental

Paired samples were collected only from patients who reported not having used cosmetics or topical medication. After collection, the samples of healthy tissue and lesion were rinsed and placed separately in sealed test tubes at -5°C . For all chemical decontamination and sample dilutions, 18.2 M Ω Milli-Q ultrapure water was used.

The weight of the samples, after being freeze dried, varied from 0.9 to 18.4 mg. As the freeze-dried skin samples were lightweight and highly hydrophilic, their exposure to air moisture had to be carefully controlled to preserve the original weights.

The digestion of the samples was performed by adding Suprapur HNO₃ (65%) at the rate of 7:1 by weight and warmed in an oven at 60 $^{\circ}\text{C}$ for 2 h. Next, they were diluted with water and a Ga internal standard was added to arrive at a final concentration in the same order as Zn concentration of skin in the solution (2 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$).

Corresponding author. Tel.: +55 21 2562 7311; fax: +55 21 2562 8444.

E-mail addresses: jcorsini@superig.com.br, jcorsini@ig.com.br (J.C.A.C.R. Soares).

0969-806X/\$ - see front matter © 2013 Elsevier Ltd. All rights reserved.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.radphyschem.2013.04.032>

In order to get a thin film on the reflector, 5 μL of each solution was deposited at the center of polished rectangular plates ($30 \times 20 \times 2 \text{ mm}^3$) made of Perspex from Lucite acrylic resin and them oven dried at 60 $^{\circ}\text{C}$. The spectra were achieved at 100 s using a polychromatic beam with energy range from 4 to 20 keV and a HPGe detector with a resolution of 140 eV at 5.9 keV at sample-detector distance of 50 mm. The ideal position to optimize the spectra was achieved by varying the incidence angle of the beam in increments of 10 μrad and was adjusted at approximately 1 mrad, smaller than the total reflection critical angle for air-acrylic interface. The spectra were analyzed by AXIL software of the Quantitative X-ray Analysis package of the International Atomic Energy Agency. The concentrations were calculated taking into consideration the Ga standard, the experiment blanks and the weight corrections. Student's t test at significance level $\alpha=0.05$ was used to identify concentration differences between control and lesion samples.

One typical spectrum obtained (Fig. 1) shows all the elements detected, where statistically significant differences were revealed only for P, K, Ca, Fe and Cu. All the samples were prepared in triplicates which were used to calculate the mean concentration (Table 1) in the control and lesions samples of each disease group. Some of them are compared in Fig. 2, where the error bars represent a 95% confidence interval ($1-\alpha$) obtained from Microsoft Office Excel software. Although some statistically significant results have been found, there seems to be no difference within errors. The precision of the experiment was better than 12%. The accuracy was evaluated on bovine liver standard material NIST 1577b processed under the same conditions, yielding the results of P(2%), S(3%), K(1%), Ca(9%), Fe(7%), Cu(4%) and Zn(9%).

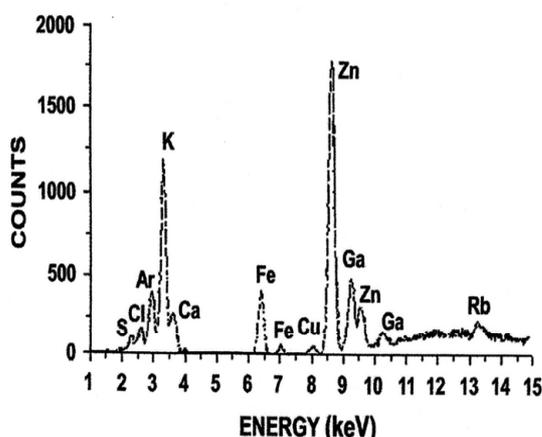


Fig. 1. Example of a typical spectrum obtained by SRTXRF.

Table 1 - Mean concentrations $\pm 95\%$ confidence intervals in $\mu\text{g g}^{-1}$. The dark areas indicate the results identified as significantly different by Student's t-test at 0.05 significance level, and N is the number of samples.

Groups of samples	P	S	K	Ca	Fe	Cu	Zn	Rb
Control-population (N=60)	3089 \pm 1137	9727 \pm 2461	7085 \pm 2114	2379 \pm 859	218 \pm 78	9 \pm 3	88 \pm 34	16 \pm 7
Control-seborrheic keratosis (N=30)	3269 \pm 796	10686 \pm 2381	6607 \pm 1582	2257 \pm 404	239 \pm 46	11 \pm 2	94 \pm 15	12 \pm 4
Seborrheic keratosis (N=30)	3291 \pm 723	9266 \pm 1856	8384 \pm 1746	1531 \pm 343	130 \pm 26	6 \pm 2	91 \pm 18	15 \pm 3
Control-fibroepithelial polyp (N=15)	2967 \pm 904	8318 \pm 2282	9939 \pm 2674	2313 \pm 795	233 \pm 66	8 \pm 2	79 \pm 21	22 \pm 9
Fibroepithelial polyp (N=17)	3755 \pm 951	8922 \pm 1896	11417 \pm 3190	999 \pm 262	149 \pm 29	5 \pm 1	68 \pm 21	19 \pm 4
Control-cherry angioma (N=11)	2888 \pm 996	9376 \pm 2767	5180 \pm 1905	2742 \pm 1159	187 \pm 59	7 \pm 2	90 \pm 30	15 \pm 6
Cherry angioma (N=11)	4004 \pm 1247	10982 \pm 2603	7642 \pm 1763	1397 \pm 591	309 \pm 88	5 \pm 1	65 \pm 11	19 \pm 3
Control-dermatosis papulosa nigra (N=4)	2757 \pm 1629	8782 \pm 1760	5220 \pm 4581	2545 \pm 1373	88 \pm 60	9 \pm 5	65 \pm 20	19 \pm 9
Dermatosis papulosa nigra (N=4)	5071 \pm 1956	12714 \pm 3229	8921 \pm 8142	1877 \pm 774	130 \pm 25	9 \pm 4	106 \pm 83	12 \pm 8

4. Discussion

The literature contains divergent results of human tissues analyses obtained through several techniques. For normal skin and seborrheic keratosis the data is scarce, and for the other 3 diseases studied, non-existent. The results found here are in the same order of magnitude as that obtained when freeze-dried skin samples are used (Kurz et al., 1987).

The data obtained show that when the concentrations of the elements P, K, Ca and Cu were significantly different, the variations in some of them followed a common trend, the only exception being Fe. The presence of P and K was higher in the lesions than in control, whereas the opposite was true for Ca and Cu. Similar lower levels of Fe were found in seborrheic keratosis and fibroepithelial polyp, most likely because there is higher amount of papillary dermis in control samples greatly irrigated by blood, which is Fe rich. On the other hand, the concentration of Fe was higher in the cherry angioma lesions than in the control samples, which may be explained because it is a vascular tumor. The main intracellular cation K presented higher concentrations in the lesions than in healthy skin, but for the fibroepithelial polyp there were no significant variations. P, an important element in proto-plasm involved in the storing and transport of energy for cell activity, presented higher concentrations in control samples than in fibroepithelial polyp and cherry angioma. The decrease in Ca concentration in seborrheic keratosis, fibroepithelial polyp and cherry angioma has already been documented for two severe skin disorders, Darier and Hailey-Hailey, as the consequence of disorders related to DNA in the expression of specific genes (Szigeti and Kellermayer, 2006) which cause dysfunction of the Ca pumps in the keratinocytes, the same cells where seborrheic keratosis and dermatosis papulosa nigra originate. The Ca concentration and its balance with Zn, plays an important role in programmed cell death called apoptosis (Bar and Tomei, 1994; Demarex and Distelhorst, 2003). Involved in protein, melanin and elastin syntheses, Cu was less present in seborrheic keratosis, fibroepithelial polyp and cherry angioma, contradicting previous reports that found higher serum levels of Cu in skin cancer patients (Tasaki et al., 1993) and higher levels of Cu, Fe and Zn in skin cancers samples (Gorodetsky et al., 1986). No variation in Zn was found among the lesions studied here, and a higher level of Fe was detected only in cherry angioma.

5. Conclusions

What sets this experiment apart from others is the use of healthy and lesioned pairs of samples extracted from the same area of the body from the same patient which made it possible to overcome variations due to patient's age, diet, clinical conditions, environmental influences, genetic factors, etc.

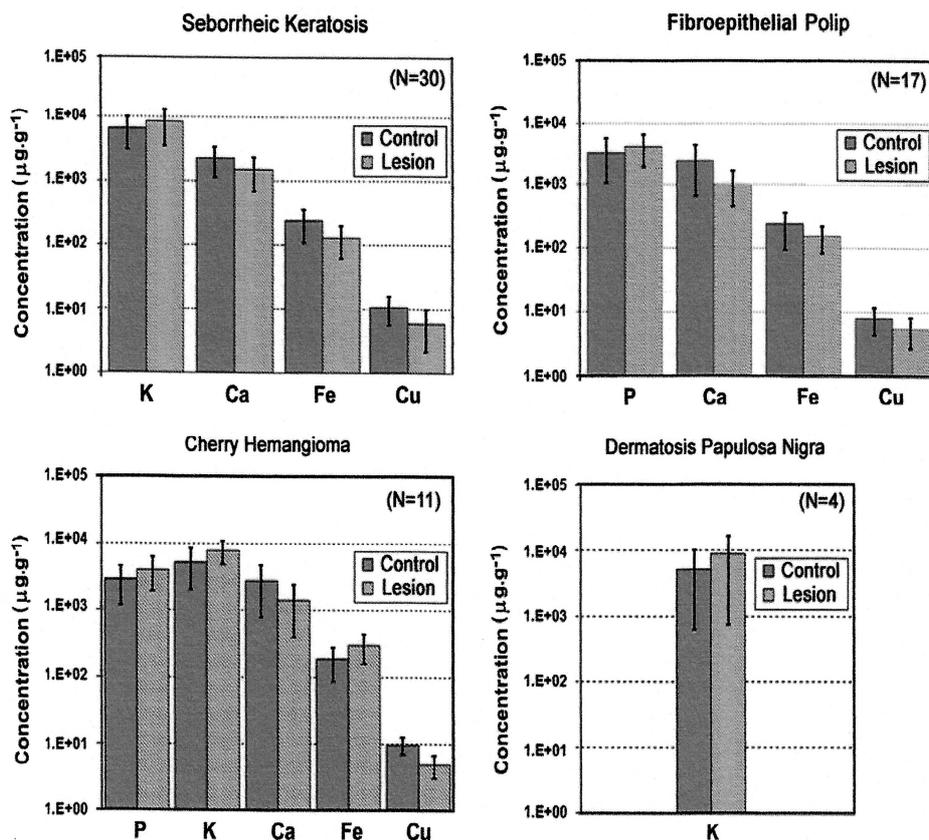


Fig. 2. Mean concentrations identified as significantly different between control and lesion samples. The error bars represent 95% confidence intervals and N is the number of samples.

However, further work is necessary to detect variations in the concentration of other elements as well as to compare the results with other types of lesions in order to better understand the elemental composition of the skin tissues and their normal and abnormal physiologies. The results in the present study can be compared with data of normal skin from its populations to see if certain habits influence its composition. Furthermore, they can be used to verify if the differences in concentration between normal skin and tissue skin disorders are general or specific.

The SRTXRF technique is adequate in quantifying trace elements present in small amounts of freeze-dried skin samples. It is relatively reliable, accurate and provides the researcher with multi-elemental information which is hard to obtain with other methods. In conjunction with statistical tools, it allows for the clear distinction of significant variations in element concentrations. The experiment, although satisfactory, can be improved by using polished silicon reflectors or even a scale with a resolution greater than 0.1 mg, used in this study. After careful assessment of this methodology and of the results obtained, it can be assured that this approach provides an important resource for the study of skin diseases including cancers.

Acknowledgments

We would like to thank FAPERJ (Fundação Carlos Chagas Filho de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro) and CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico) for their financial support, and the LNLS laboratory.

References

- Aiginger, H., Wobrascheck, P., Strell, C., 1995. Principles and development of TXRF analysis. *Anal. Sci.* 11, 471–475.
- Barr, P.J., Tomei, L.D., 1994. Apoptosis and its role in human disease. *Biotechnology* 12, 487–493.
- Burns, T., Breathnach, S., Cox, N., Griffiths, C., 2010. *Rook's Textbook of Dermatology*, eighth ed. Wiley-Blackwell, USA.
- Demaurex, N., Distelhorst, C., 2003. Apoptosis—the calcium connection. *Science* 300, 65–67.
- Gorodetsky, R., Sheskin, J., Weinreb, A., 1986. Iron, copper and zinc in normal and in various non-malignant and malignant lesions. *Int. J. Dermatol.* 25, 440–445.
- Kurz, K., Steingleder, G., Bischof, W., Gonsior, B., 1987. PIXE in different stages of psoriatic skin. *J. Invest. Dermatol.* 88, 223–226.
- Strell, C., Wobrascheck, P., Meirer, F., Peponi, G., 2008. Synchrotron radiation induced TXRF. *J. Anal. At. Spectrom.* 23, 792–798.
- Szigei, R., Kdlernayer, R., 2006. Autosomal-dominant calcium ATPase disorders. *J. Invest. Dermatol.* 126, 2370–2376.
- Tasaki, M., Hanada, K., Hashimoto, I., 1993. Analysis of serum copper and zinc levels and copper/zinc ratios in skin diseases. *J. Dermatol.* 120 (1), 21–24.
- Theodorakou, C., Farquarson, M.J., 2008. Human soft tissue analysis using X-rays or gamma-ray techniques. *Phys. Med. Biol.* 53, R111–149.