

Detecção por fluorescência de raios X de biometais em tecido cerebral e olhos de ratos



Mariana Morais Martins
Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade de Coimbra

Orientador: Professor Doutor Jorge Manuel Maia Pereira
Co-Orientador: Doutor Rui Miguel Curado da Silva

Dissertação submetida para a obtenção do grau de Mestre em Engenharia Física - Ramo
de Instrumentação

Fevereiro 2016

*“Live as if you were to die tomorrow.
Learn as if you were to live forever.”*

Mahatma Gandhi

Agradecimentos

Terminado o trabalho de investigação, que se concretiza na realização da presente dissertação, apercebo-me que muitas foram as pessoas que contribuíram para o meu crescimento pessoal, académico e profissional.

Ao Professor Doutor Jorge Manuel Maia Pereira e ao Doutor Rui Miguel Curado da Silva, pela oportunidade, pelo conhecimento partilhado e aprendizagens promovidas, pelos momentos de orientação, incentivo e motivação, pelo rigor e exigência. Porque, pelo saber, abertura e disponibilidade, me potenciaram verdadeiros momentos de aprendizagem aplicada e com relevância científica.

Ao LIP, Laboratório de Instrumentação e Física Experimental de Partículas, por me facultar as condições necessárias para realização desta dissertação e pelo incentivo.

À Doutora Ana Clara Braz Cristóvão, pela oportunidade de me proporcionar novos conhecimentos em áreas de saúde importantes para o desenvolvimento deste trabalho, assim como pela disponibilidade e pela receptividade na ida ao CICS, Centro de Investigação em Ciências da Saúde, para observar o tratamento nos ratos do estudo.

Ao Professor Doutor José António de Carvalho Paixão, coordenador do TAIL-UC (*Trace Analysis and Imaging Laboratory*) facility funded under QREN-Mais Centro Project ICT/2009/02/012/1890 onde parte deste trabalho foi realizado, e ao Doutor Pedro Sidónio Pereira da Silva, responsável pelo laboratório, pelo contributo fundamental no trabalho laboratorial, apoiando de forma ativa em qualquer dúvida que surgisse relativamente ao sistema experimental.

Aos outros profissionais do LIP, em especial ao Mestre Alexandre Trindade e ao técnico Américo Pereira, pela ajuda técnica e científica prestada durante todo o processo.

Aos meus colegas de laboratório, em especial à Patrícia D'Amil, por todos os momentos partilhados, interajuda, aprendizagens conjuntas e trabalho de equipa.

Ao Gonçalo e ao João, à Catarina, à Diana, ao Rui, ao Papel, ao Henrique, ao Arede, ao Cardoso, ao Rodrigo, ao Mário e à Mafalda, por todo o apoio, carinho e preocupação, pelo crescimento conjunto ao longo destes anos e pela amizade sincera e eterna. Porque sei que aconteça o que acontecer estarão sempre presentes e serão sempre um abrigo de bem-estar.

Aos meus amigos que me acompanharam ao longo destes anos de curso, Daniel, Pedro, Francisco, André, Bruno e Olivier, por todos os momentos partilhados, pela descontração e boa disposição, pelas gargalhadas, pelas expectativas, incentivos, entusiasmo e carinho e porque estiveram sempre presentes quando foi preciso.

A todos os meus amigos dos "3 bicos" por me proporcionarem momentos memoráveis, de diversão e de partilha, por todos os dias juntos serem diferentes e fantásticos, cumprindo sempre com o verdadeiro significado de amizade.

Aos meus pais, por todo o amor e dedicação ao longo destes 23 anos. À minha irmã, pela eterna cumplicidade, orientação e compreensão, pela alegria e pela tristeza compartilhada e pela relação fantástica de sempre. Aos meus avós, em principal à minha avó pela companhia ao longo deste último ano. A toda a minha restante família, tias-avós, tios, primos e padrinhos, porque estão sempre presentes. Porque a minha gratidão não tem fim.

Obrigado a todos!

Resumo

A Doença de Parkinson é caracterizada por uma degeneração e morte progressiva dos neurónios dopaminérgicos presentes em determinadas áreas cerebrais, como a *substantia nigra* e o estriado, associadas ao percurso da dopamina.

O estudo qualitativo e quantitativo dos elementos químicos associados a esta doença tem sido realizado utilizando diversas técnicas espectrométricas, sendo a fluorescência de raios X por dispersão de energia (EDXRF) um exemplo destas. Para cada caso de estudo, estas técnicas precisam de uma otimização das condições do seu funcionamento para as respetivas amostras em análise, por exemplo a espessura e o suporte da amostra, a corrente e a tensão do tubo de raios X, os filtros, o colimador, a constante de tempo eletrónica e o tempo de aquisição. Nesta dissertação foram estudadas estas condições para a técnica EDXRF tendo em vista a análise de amostras de tecido de ratos tratados com a toxina 6-OHDA (6-hidroxi-dopamina), utilizada para induzir um modelo animal da doença de Parkinson em ratos. Neste trabalho preliminar foram analisadas quatro amostras de tecido cerebral (2 do estriado e 2 da *substantia nigra*) e 9 olhos.

A técnica XRF possibilitou a identificação de vários metais e do elemento Cl e a medição das respetivas intensidades de fluorescência de raios X, tornando possível a comparação entre tecidos tratados e não tratados. Para o caso dos olhos, para a região anterior, foram identificados os elementos químicos P, S, Cl, K e Ca e verificou-se uma diminuição de todos estes elementos nos olhos tratados. Na análise dos tecidos cerebrais, tanto para a *substantia nigra* como para o estriado, foram identificados os elementos P, S, Cl, K, Ca, Fe, Cu e Zn e verificou-se um aumento generalizado destes elementos nos hemisférios do tecido cerebral com a toxina.

Palavras-chave: Fluorescência, raios X, biometais, tecidos biológicos

Abstract

Parkinson Disease is a progressive degeneration and even death of the dopaminergic neurons in different brain areas, like *substantia nigra* and *striatum*, associated to dopaminergic paths.

Qualitative and quantitative studies on chemical elements correlated with this disease have been realized using different spectrometry techniques. Energy Dispersive X-Ray Fluorescence is one of them. Some conditions of this technique have to be adjusted for every type of samples to achieve better performance, for example thickness and support of the sample, current and voltage of X rays tube, filters, collimator, peaking time and acquisition time. In this study these conditions have been studied for EDXRF system taking into account the analysis of samples of rat's treated tissues with 6-OHDA toxin, used to induce one animal model of Parkinson Disease in rats. In this study were analysed four samples of brain tissue (2 of *striatum* and 2 of *substantia nigra*) and 9 eyes.

XRF technique made possible the identification of different elements and the comparison of those in treated and non-treated tissues. In the eyes were recognized elements like P, S, Cl, K and Ca and in all of them there was a decrease for the treated eyes. For the samples of the brain it was possible to see more elements (P, S, Cl, K, Ca, Fe, Cu and Zn) and it was found an increase in almost every element for the brain tissue with the toxin.

Keywords: Fluorescence, X rays, biometals, biological tissues

Índice

Agradecimentos	v
Resumo	vii
Abstract	ix
Lista de figuras	xv
Lista de tabelas	xviii
1 Introdução	1
1.1 Motivação e enquadramento	1
1.2 Técnicas espectrométricas	1
1.3 Técnica de Fluorescência de Raios X	8
1.4 Aplicações da técnica XRF	16
1.5 Doença de Parkinson	17
2 Metodologia e Sistema experimental	23
2.1 Instrumentação do sistema XRF	23
2.2 Amostras	32
2.3 Métodos de análise	36
3 Resultados e Discussão	49
3.1 Otimização das condições de análise	49
3.2 Análise dos olhos	65
3.3 Análise dos tecidos cerebrais	77
4 Conclusões	97
4.1 Limitações	98
4.2 Trabalho futuro	98
Referências	99
Anexos	103

Lista de Figuras

1	<i>Hardware</i> utilizado para FAAS	3
2	<i>Hardware</i> utilizado para GFAAS	3
3	Esquema de um espectrômetro de massa	5
4	Esquema da câmara de ionização	5
5	Ação do campo magnético na deflexão dos iões	6
6	Espectro gerado pelo espectrômetro de massa	6
7	Representação esquemática do Modelo atômico de Bohr	9
8	Algumas transições permitidas para as camadas K, L e M	10
9	Interação de raios X com a matéria	11
10	Efeitos produzidos por rearranjos dos elétrons	12
11	Rendimento de fluorescência em função do número atômico	13
12	Probabilidade da absorção fotoelétrica em função da energia do fóton	13
13	Dispersão de Compton	15
14	Processos de atenuação do feixe inicial quando incide na matéria	16
15	Coefficientes de atenuação mássicos para o elemento Si e para o composto H_2O	16
16	Divisão macroscópica do tecido cerebral	19
17	Percurso da dopamina no tecido cerebral	20
18	Instrumentação do sistema XRF	23
19	Estrutura típica do tubo de Raios X	23
20	Espectro (indireto) do tubo de raios X para várias tensões aplicadas.	24
21	Espectros de energia para cada filtro.	25
22	Estrutura de um detetor de Si multicátodo	27
23	Variação do potencial segundo diferentes tensões aplicadas aos anéis semi-condutores do tipo P	27
24	Percurso dos elétrons e das lacunas segundo o potencial criado para um detetor de espessura $300 \mu m$	28
25	Representação da distribuição gaussiana das contagens para a energia E_0	29
26	Comparação de resoluções em energia	30
27	Esquema da eletrônica de leitura de impulsos	31
28	Exemplo de um espectro de energia obtido no sistema.	31
29	Ligação nervosa do olho ao cérebro	32
30	Dimensões do olho.	32
31	Esquema da parte a ser analisada do olho.	33
32	Dimensões das amostras de tecido cerebral.	33
33	Localização do Bregma	33
34	Cortes realizados a partir do Bregma	34
35	Dimensões das regiões das amostras de tecido cerebral.	34
36	Kapton.	35
37	Transmitância de diferentes películas	35
38	Espectro de energia da análise do Kapton.	36
39	Espectro de energia da análise do <i>Frame</i>	36
40	Espectro de energia ideal	37
41	Linhas características e <i>background</i> no espectro de energia.	38
42	Ajuste gaussiano com linha de base zero.	40

43	Linhas de base que caracterizam o fundo dos espectros de energia na análise de tecido cerebral, utilizando diferentes filtros.	41
44	Exemplo do ajuste gaussiano para o elemento Cl.	42
45	Exemplo do ajuste gaussiano para o elemento Fe.	43
46	Espectros obtidos na análise dos diferentes discos de elementos puros.	44
47	Resolução em energia do sistema para diferentes <i>peaking time</i> e dimensões do feixe de raios X.	45
48	Sobreposição dos picos do potássio com o do cálcio.	46
49	Ajuste com gaussiana dupla na sobreposição do K com o Ca.	47
50	Espectros de energia das análises de amostras de tecido cerebral de diferentes espessuras.	49
51	Coeficientes de atenuação mássicos para a matéria cinzenta e matéria branca do cérebro	50
52	Atenuação do feixe de raios X em função da espessura da amostra.	51
53	Espectros de energia de uma amostra de tecido cerebral com e sem utilização de hélio.	52
54	Espectros de energia de uma amostra de tecido cerebral com aplicação de uma tensão de 15 kV e de 30 kV no tubo de raios X.	53
55	Espectros de energia para uma amostra de tecido cerebral com diferentes intensidades de corrente no tubo de raios X.	55
56	Espectros de energia de uma amostra de <i>substantia nigra</i> utilizando diferentes filtros.	56
57	Espectros de energia de uma amostra de estriado utilizando diferentes filtros.	57
58	Espectros de energia de um olho utilizando diferentes filtros.	58
59	<i>Frame</i> de PCB.	59
60	Determinação das dimensões do feixe de raios X para um colimador de $0.5 \times 0.5 \text{ mm}^2$ de área.	60
61	Determinação das dimensões do feixe de raios X para um colimador de $1.2 \times 1.2 \text{ mm}^2$ de área	61
62	Espectros de energia de uma amostra de tecido cerebral para diferentes <i>peaking time</i>	62
63	Espectro obtido numa análise da plataforma XYZ do sistema.	63
64	Espectros de fundo dos diferentes suportes para as amostras.	64
65	Exemplo de espectros obtidos para os olhos com os diferentes filtros.	65
66	Espectros obtidos para a análise dos olhos do rato 1.	66
67	Exemplo do ajuste realizado para o pico K_{α} do elemento K e do Ca do olho de direito do rato 1.	67
68	Intensidade de fluorescência de raios X para cada medida, e respetiva média ponderada, para os diferentes elementos detetados nos olhos, utilizando o filtro para o Cl.	69
69	Intensidade de fluorescência de raios X para cada medida, e respetiva média ponderada, para os diferentes elementos detetados nos olhos, utilizando o filtro para o Cr.	70
70	Intensidade de fluorescência de raios X para cada medida, e respetiva média ponderada, para os diferentes elementos detetados nos olhos, utilizando o filtro para o Pb.	71
71	Resultados obtidos para as intensidades relativas de fluorescência de raios X com os diferentes filtros.	73

72	Intensidade de fluorescência de raios X obtida para diferentes elementos no olho direito de um rato, utilizando os diferentes filtros. O símbolo '*' representa o fato do sistema não ter sensibilidade suficiente para medir o respectivo elemento.	75
73	Intensidade de fluorescência de raios X obtida para diferentes elementos no olho esquerdo de um rato, utilizando os diferentes filtros. O símbolo '*' representa o fato do sistema não ter sensibilidade suficiente para medir o respectivo elemento.	76
74	Intensidade de fluorescência de raios X obtida para diferentes elementos na parte posterior dos dois olhos de um rato.	77
75	Áreas de irradiação nas amostras de tecido cerebral.	77
76	Exemplo de espectros obtidos na análise da <i>substantia nigra</i> com os diferentes filtros.	78
77	Exemplo de espectros obtidos na análise do estriado com os diferentes filtros.	79
78	Espectros obtidos pela análise da <i>substantia nigra</i> e do estriado, em ambos os hemisférios cerebrais, utilizando o filtro para o Cr.	80
79	Intensidade de fluorescência de raios X para cada medida, e respectiva média ponderada, para os diferentes elementos detetados na <i>substantia nigra</i> , utilizando o filtro para o Cl.	85
80	Intensidade de fluorescência de raios X para cada medida, e respectiva média ponderada, para os diferentes elementos detetados na <i>substantia nigra</i> , utilizando o filtro para o Cr.	86
81	Intensidade de fluorescência de raios X para cada medida, e respectiva média ponderada, para os diferentes elementos detetados na <i>substantia nigra</i> , utilizando o filtro para o Pb.	87
82	Intensidade de fluorescência de raios X para cada medida, e respectiva média ponderada, para os diferentes elementos detetados no estriado, utilizando o filtro para o Cl.	88
83	Intensidade de fluorescência de raios X para cada medida, e respectiva média ponderada, para os diferentes elementos detetados no estriado, utilizando o filtro para o Cr.	89
84	Intensidade de fluorescência de raios X para cada medida, e respectiva média ponderada, para os diferentes elementos detetados no estriado, utilizando o filtro para o Pb.	90
85	Resultados obtidos para as intensidades relativas de fluorescência de raios X para a região da <i>substantia nigra</i> , utilizando os diferentes filtros.	92
86	Resultados obtidos para as intensidades relativas de fluorescência de raios X para a região do estriado, utilizando os diferentes filtros.	93

Lista de Tabelas

1	Designação dos neutrões consoante as suas energias	4
2	Vantagens e desvantagens das diferentes técnicas espectrométricas.	8
3	Números quânticos e respetivo significado	10
4	Energia limiar de excitação (E_K), energias médias das possíveis transições de eletrões entre camadas ($E_{K\alpha}$ e $E_{K\beta}$) e rendimento de fluorescência (w_K) para vários elementos	11
5	Aplicações da técnica XRF.	17
6	Importância dos diferentes elementos químicos presentes no tecido cerebral	18
7	Propriedades do silício à temperatura de 300 K	26
8	Resolução em energia do sistema para diferentes <i>peaking time</i> de acordo com o próprio manual do utilizador	30
9	Exemplo com a comparação do ROI do sistema e do ROI utilizado.	39
10	Resolução em energia do sistema obtida para diferentes <i>peaking time</i> e dimensões do feixe de raios X	45
11	Resultados obtidos pelo ajuste de gaussianas para as duas amostras de diferentes espessuras.	50
12	Coefficientes de atenuação mássicos em tecido cerebral para diferentes energias.	51
13	Resultados obtidos com e sem fluxo de hélio.	52
14	Resultados obtidos pelo ajuste de gaussianas para as duas tensões do tubo de raios X.	53
15	Resultados obtidos com uma amostra de <i>substantia nigra</i> pelo ajuste de gaussianas para os diferentes filtros.	56
16	Resultados obtidos com uma amostra de estriado pelo ajuste de gaussianas para os diferentes filtros.	57
17	Resultados obtidos pelo ajuste de gaussianas para os diferentes filtros nos olhos.	58
18	Resultados obtidos para as dimensões dos feixes de raios X.	61
19	Energias médias das possíveis transições L e M dos elementos de Pb, Nb e W	63
20	Condições finais otimizadas para utilização na análise das três amostras em estudo.	64
21	Intensidades de fluorescência de raios X (contagens/s) obtidas para cada pico correspondente aos elementos P, S, Cl, K e Ca para os olhos de 6 ratos.	68
22	Intensidades de fluorescência de raios X (contagens/s) obtidas para cada pico correspondente a elemento Zn para os olhos de 6 ratos.	68
23	Médias ponderadas, normalização (controlo a 100%) e respetivos desvios padrão obtidos para os diferentes elementos nos olhos.	72
24	Diferenças do olho esquerdo relativamente ao olho direito.	72
25	Intensidades de fluorescência de raios X (contagens/s) obtidas para cada pico correspondente aos elementos P, S, Cl, K, Ca, Fe e Zn para a parte anterior e posterior dos olhos de 1 rato.	74
26	Intensidades de fluorescência de raios X (contagens/s) obtidas nos ajustes gaussianos de cada pico correspondente à linha $K\alpha$ de cada elemento para os dois hemisférios do tecido cerebral, na região da <i>substantia nigra</i> e respetiva soma.	81

27	Intensidades de fluorescência de raios X (contagens/s) obtidas nos ajustes gaussianos de cada pico correspondente à linha K_{α} de cada elemento para os dois hemisférios do tecido cerebral, na região do estriado e respetiva soma.	82
28	Resultados obtidos para as médias e os respetivos desvios padrão para a região da <i>substantia nigra</i> e para os diferentes filtros.	83
29	Resultados obtidos para as médias e os respetivos desvios padrão para a região do estriado e para os diferentes filtros.	84
30	Médias ponderadas, normalização (controlo a 100%) e respetivos desvios padrão obtidos para os diferentes elementos para a <i>substantia nigra</i> .	91
31	Médias ponderadas, normalização (controlo a 100%) e respetivos desvios padrão obtidos para os diferentes elementos para o estriado.	91
32	Diferença de percentagens dos diferentes elementos na <i>substantia nigra</i> entre os dois hemisférios, obtida utilizando as melhores condições.	94
33	Diferença de percentagens dos diferentes elementos no estriado entre os dois hemisférios, obtida utilizando as melhores condições.	94
34	Resultados obtidos para os diferentes olhos dos vários ratos para o elemento de Fósforo	103
35	Resultados obtidos para os diferentes olhos dos vários ratos para o elemento de Enxofre	103
36	Resultados obtidos para os diferentes olhos dos vários ratos para o elemento de Cloro	104
37	Resultados obtidos para os diferentes olhos dos vários ratos para o elemento de Potássio	104
38	Resultados obtidos para os diferentes olhos dos vários ratos para o elemento de Cálcio	105
39	Resultados obtidos para os diferentes olhos dos vários ratos para o elemento de Zinco	105
40	Resultados obtidos para os diferentes elementos para a região da <i>substantia nigra</i> utilizando o filtro de Cl	106
41	Resultados obtidos para os diferentes elementos para a região da <i>substantia nigra</i> utilizando o filtro de Cr	107
42	Resultados obtidos para os diferentes elementos para a região da <i>substantia nigra</i> utilizando o filtro de Pb	107
43	Resultados obtidos para os diferentes elementos para a região do estriado utilizando o filtro de Cl	108
44	Resultados obtidos para os diferentes elementos para a região do estriado utilizando o filtro de Cr	108
45	Resultados obtidos para os diferentes elementos para a região do estriado utilizando o filtro de Pb	109

1 Introdução

1.1 Motivação e enquadramento

O aumento da esperança média de vida, resultado da melhoria da qualidade de vida e do avanço científico-tecnológico, permitiu um envelhecimento acentuado da população. No entanto, este envelhecimento populacional é acompanhado pelo aparecimento de várias doenças da idade, como por exemplo as doenças neurodegenerativas.

Em 2010 havia cerca de 153 mil cidadãos portugueses, 9.9 milhões de europeus e 35.6 milhões de pessoas em todo o mundo com doenças neurodegenerativas e estes números têm tendência a duplicar nos próximos 20 anos [1]. A doença de Parkinson é uma doença neurodegenerativa, que se caracteriza pela perda progressiva dos neurónios dopaminérgicos, cujos corpos celulares se encontram na *substantia nigra* e os respetivos terminais no estriado. Estas regiões cerebrais são bastante importantes na coordenação motora e a perda destes neurónios leva, conseqüentemente, a problemas de mobilidade, tremores quando em repouso, rigidez musculares, bradicinesia, entre outros.

Ao longo dos anos os investigadores têm estudado a constituição do cérebro, como as fibras nervosas e os vasos sanguíneos que o constituem, as ligações que são realizadas até aos membros, etc. No entanto, a complexidade destas investigações tem vindo a aumentar paralelamente à complexidade encontrada nestas “novas doenças” que, por sua vez, provocam a anomalia das funções até então conhecidas, ampliando a necessidade de desenvolvimento e atualização de conhecimentos científicos.

Esta necessidade tem vindo a ser colmatada pela aplicação de recursos e instrumentos tecnológicos avançados e precisos, desenvolvidos nos últimos anos. Instrumentos que permitem conhecer os elementos químicos que existem numa determinada região, que permitem obter resultados comparativos entre tecido cerebral saudável e “doente” e que permitem um aumento do conhecimento químico de toda a região. As técnicas de espectroscopia e espectrometria são bastante utilizadas neste âmbito e a técnica de fluorescência de raios X por dispersão de energia (EDXRF) é um exemplo de uma técnica utilizada neste tipo de instrumentos. A EDXRF proporciona uma análise multi-elemental e não destrutiva das amostras, permitindo através do espectro de energia de raios X medido, uma identificação e quantificação dos elementos químicos presentes nas amostras.

O objetivo deste trabalho consiste no estabelecimento e otimização das condições de operação, de um equipamento comercial de espectrometria por fluorescência de raios X, tendo em vista o estudo da assimetria de vários elementos químicos no modelo 6-OHDA da doença de Parkinson em ratos.

1.2 Técnicas espectrométricas

A espectroscopia é conhecida desde que Newton fez incidir luz branca num prisma, verificando que, a partir das refrações sofridas, esta era constituída por luz de várias cores do espectro luminoso. Esta técnica permite realizar uma análise qualitativa de amostras, dando a conhecer os elementos da tabela periódica que as constituem. Por outro lado, a espectrometria proporciona uma análise quantitativa, i.e. da concentração de cada elemento identificado. A conjugação das técnicas de espectroscopia e de espectrometria num único sistema resulta numa técnica analítica multi-elemental.

Neste subcapítulo estão detalhadas algumas destas técnicas que têm vindo a ser utilizadas e melhoradas ao longo dos anos.

Espetrometria de absorção atômica (AAS)

As amostras são constituídas por uma grande quantidade de elementos químicos diferentes. Para um estudo apropriado é necessário primeiramente conseguir separar todos os átomos das moléculas. Neste tipo de análise, o método para a separação dos elementos é o aumento da temperatura da amostra.

Quando se fornece uma quantidade de energia suficiente ao átomo é possível que os seus eletrões, que se encontram no estado fundamental, sejam excitados para um nível de energia mais elevado. A este processo dá-se o nome de absorção, visto que o átomo absorve a diferença de energia entre os estados em que ocorreram a transição. A espetrometria de absorção atômica é sumariada de seguida:

- à medida que a temperatura da fonte de aquecimento vai aumentando, vai sendo fornecida energia térmica aos átomos que constituem a amostra, quebrando as suas ligações químicas e produzindo átomos livres que se encontram no estado fundamental;
- de seguida faz-se incidir um feixe de fotões, provenientes de uma lâmpada de cátodo oco ou de uma lâmpada de descarga, e os átomos livres absorvem os fotões com um determinado comprimento de onda e ficam no estado excitado. Esta absorção é específica de cada elemento, uma vez que um elemento absorve um determinado comprimento de onda [2–4].

Para seleccionar o comprimento de onda que se pretende, de modo a detetar-se o elemento que se quer medir, utiliza-se um monocromador. Por outro lado, a intensidade de fotões transmitida é medida por um fotomultiplicador e pode ser relacionada com a concentração de cada elemento na amostra [3].

O calor para aquecer a amostra pode ser gerado tanto por uma chama como por um forno de grafite. Estes dois métodos diferenciam os dois tipos de espetrometria de absorção atômica: *Flame AAS* e *Graphite Furnace AAS*, respetivamente.

Na espetrometria de absorção atômica de chama a amostra tem de ser líquida ou gasosa, uma vez que elas são aspiradas para um nebulizador antes de serem aquecidas pela chama (Figura 1) [5].

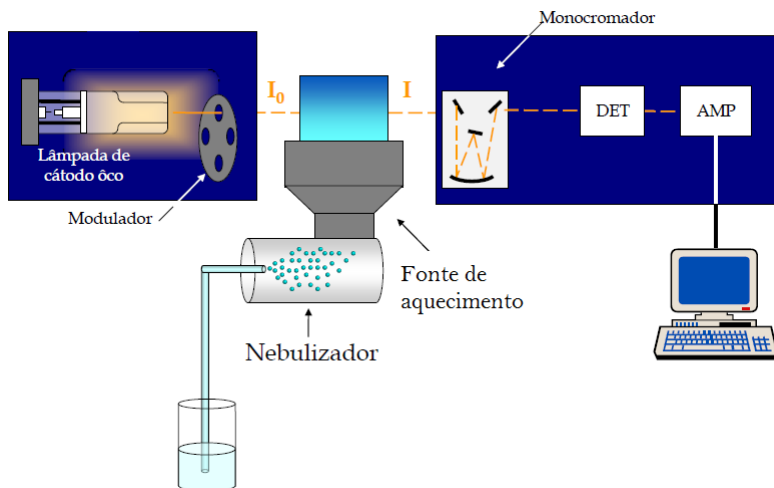


Figura 1: *Hardware* utilizado para FAAS (*adaptado de [6]*).

Na espectrometria de absorção atômica de forno de grafite, a amostra é colocada dentro de um tubo de grafite que, por sua vez, é aquecido eletricamente. Todo o interior do tubo encontra-se sob um fluxo contínuo de argônio para não ocorrer oxidação do tubo, para promover uma zona inerte durante a separação dos átomos e para remover os resíduos restantes após divisão da amostra em átomos (Figura 2) [2, 5].

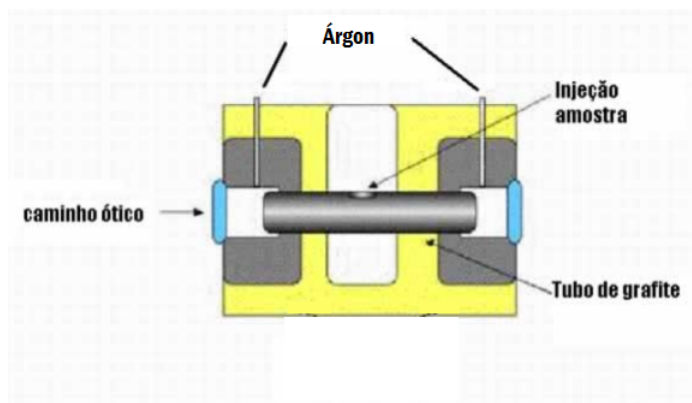
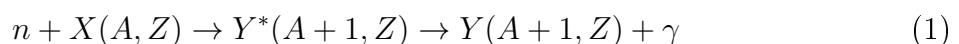


Figura 2: *Hardware* utilizado para GFAAS (*adaptado de [7]*).

Análise com ativação de nêutrons (NAA)

Após a sua descoberta em 1932 por James Chadwick, o nêutron passou a ser bastante utilizado para irradiar núcleos. Quando se incide um nêutron num núcleo de um determinado elemento, pode ocorrer uma colisão inelástica, ou o nêutron pode ser capturado formando-se um novo núcleo que se encontra no estado excitado. Este núcleo instável irá decair para um estado mais estável, emitindo radiação gama. A este processo dá-se o nome de decaimento gama [8,9].

Consideremos um nuclídeo X que é ativado por um nêutron térmico (Tabela 1), n , originando um radionuclídeo Y^* . A reação que irá ocorrer é a seguinte:



em que Z é o número atômico e A o número de massa.

	Neutrões			
	Térmicos	Epitérmicos	Lentos	Rápidos
Energia	$\simeq 0.025$ eV	~ 1 eV	~ 1 keV	$= 100$ keV - 10 MeV

Tabela 1: Designação dos neutrões consoante as suas energias (*adaptado de* [9]).

Cada nuclide possui um tempo característico próprio, tempo de meia-vida ($t_{1/2}$), que é o tempo que uma amostra inicial com N_0 núcleos demora a reduzir-se a metade. Este tempo, consoante os núcleos em estudo, pode ir desde frações de segundos a vários anos [9].

A lei do decaimento radioativo relaciona o número inicial de núcleos radioativos com o tempo de meia-vida e com o tempo de decaimento através da equação 2 [9].

$$N = N_0 \exp\left(-\frac{\ln(2)}{t_{1/2}}t\right) \quad (2)$$

Na análise de ativação de neutrões, as amostras que se pretendem estudar são irradiadas por um feixe de neutrões que provém de reatores nucleares, de aceleradores ou de radionuclídeos emissores de neutrões. Após os tempos de decaimento adequados, obtidos pela verificação da lei do decaimento radioativo, realizam-se as medições dos elementos das amostras, através das contagens dos fotões γ , características de cada radionuclídeo. Esta medição é feita geralmente por um detetor semiconductor ligado a uma cadeia eletrónica e a um computador, permitindo que seja possível a medição de muitos elementos ao mesmo tempo sem qualquer processo químico. A este processo, em que ocorre este tipo de aplicação instrumental, designa-se análise de ativação de neutrões instrumental (INAA) [3, 10, 11]. Por outro lado, se forem feitas separações químicas à amostra antes da irradiação para remover interferências ou para retirar radioisótopos de interesse dá-se o nome de análise de ativação de neutrões radioquímica (RNAA) [3, 10].

Deve referir-se que ambos os processos têm uma elevada sensibilidade e são utilizados para medições quer qualitativas quer quantitativas de vários elementos.

Espetrometria de massa (MS)

Nos últimos 20 anos, características, como a sensibilidade e os limites de deteção, da espetrometria de massa têm vindo a ser melhoradas, possibilitando a sua aplicação em diferentes áreas. Um espetrómetro de massa típico é constituído por uma área de vaporização da amostra, uma zona de ionização dos elementos da amostra, um ou mais analisadores de massa onde há a separação dos iões, um detetor para detetar os iões emergentes do analisador e, ainda, um sistema de processamento de dados para produzir um espetro (Figura 3) [12].

Todos os dispositivos encontram-se num ambiente de vácuo para que os iões cheguem ao detetor sem que sofram colisões com outras moléculas gasosas, uma vez que as colisões podem produzir um desvio da trajetória dos iões ou reações indesejadas.

O primeiro passo na análise de espetrometria de massa num composto é vaporizar a amostra e produzir iões numa câmara de ionização (Figura 4). Neste processo de produção de iões é utilizada uma fonte de ionização. Se a energia do feixe de ionização for suficiente para retirar um ou mais eletrões das orbitais das moléculas neutras que constituem a amostra, estas transformam-se em iões positivos [3, 4, 12].

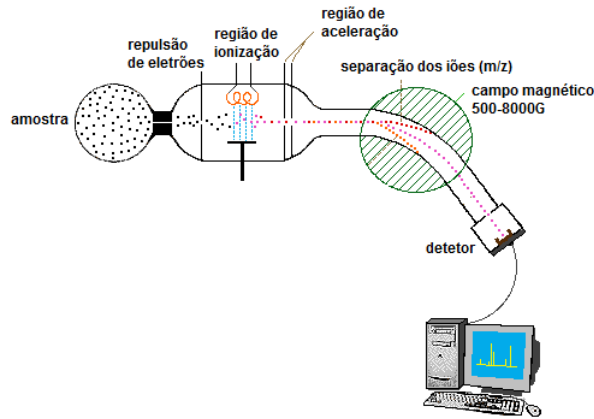


Figura 3: Esquema de um espectrômetro de massa (*adaptado de [13]*).

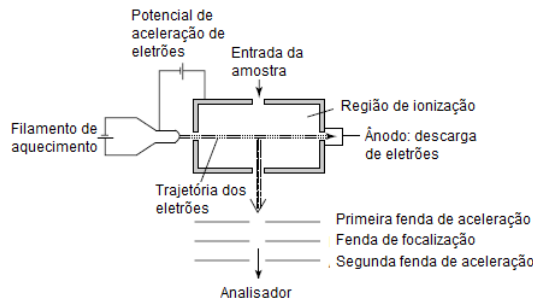


Figura 4: Esquema da câmara de ionização (*adaptado de [12]*).

Os íons são acelerados até atingirem a região com um campo magnético gerado por um ímã. Uma partícula carregada, que se movimenta num campo magnético homogêneo, sofre a ação de uma força magnética, perpendicular à direção de deslocamento e do próprio campo. A força será então obtida pela seguinte expressão [14]:

$$\vec{F} = q\vec{v} \times \vec{B} \quad (3)$$

sendo q a carga da partícula, \vec{v} o vetor velocidade e \vec{B} o vetor campo magnético.

Caso a velocidade seja perpendicular ao campo magnético:

$$\vec{F} = q\vec{v} \times \vec{B} \Leftrightarrow qvB = \frac{mv^2}{r} \Leftrightarrow \frac{1}{r} = \frac{qB}{mv} \quad (4)$$

onde r é o raio da trajetória circular e m a massa da partícula.

A ação do campo magnético faz com que os íons sejam defletidos segundo diferentes ângulos, consoante a massa e a carga de cada íon. Todos estes íons são, assim, separados no espectrômetro de massa de acordo com a razão entre a massa e a carga (Figura 5). Os íons que ultrapassarem este campo magnético são detetados por um detector e, a partir do sistema eletrónico de processamento de dados, um espectro de massa da molécula é produzido. Este representa a abundância iónica em função da razão massa/carga (Figura 6) [4].

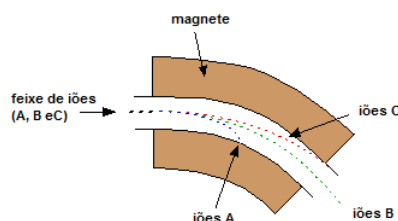


Figura 5: Ação do campo magnético na deflexão dos íons (*adaptado de [15]*).

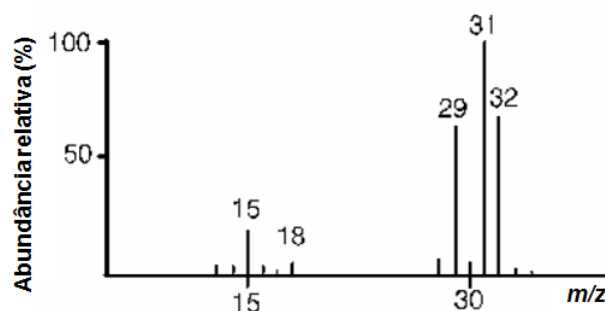


Figura 6: Espectro gerado pelo espectrômetro de massa (*adaptado de [12]*).

Existem muitas técnicas de espectrometria de massa e as suas diferenças verificam-se, essencialmente, na fonte de ionização e no tipo de analisador de massa.

Um exemplo é a técnica que recorre à ablação por laser, conhecida como *Laser ablation inductively coupled plasma mass spectrometry* (LA-ICP-MS). Esta técnica tem uma alta resolução espacial e bastante importância na microanálise, permitindo a análise de múltiplos elementos. A amostra é aquecida pelo movimento térmico dos portadores de carga que surge quando um feixe laser é incidido nessa mesma amostra. Parte destas partículas são transportadas para serem coletadas e ionizadas através de um plasma acoplado indutivamente. Em seguida são direcionadas para um analisador de massa [16, 17].

Outra técnica que, por outro lado, implica íons secundários, designa-se *Secondary Ion Mass Spectrometry* (SIMS). Neste método é incidido um feixe de íons numa amostra sólida. Para gerar este feixe de íons é necessário haver emissão de eletrões por um filamento designado como cátodo numa câmara em vácuo. Nesta câmara é introduzido um gás, como o oxigénio ou o árgon, com o qual os eletrões interagem provocando ionização, formando um plasma. O plasma é acelerado formando-se um feixe de íons. Os íons interagem com os elementos que constituem a amostra, originando íons secundários que serão depois acelerados e passarão para o espectrômetro de massa que, por sua vez, separará os íons de acordo com a razão massa/carga [3, 17].

Métodos que utilizam raios X

A emissão e a fluorescência de raios X são dois processos que têm vindo a ser bastante utilizados na espectroscopia e espectrometria, dado que possibilitam uma análise rápida de vários elementos que constituem a amostra que se pretende estudar. São ainda processos não destrutivos, podendo as amostras ser novamente utilizadas para outras análises com outros dispositivos [18].

Consoante a fonte de radiação usada sobre as amostras para produzir raios X, o processo de emissão destes toma uma designação particular. Assim, para o caso da emissão de raios X por indução de partículas designa-se PIXE. No PIXE faz-se incidir um feixe homogéneo e bastante energético de prótons na amostra. Estes ao interagir com os elementos que constituem a matéria provocam a excitação de um eletrão que se encontra nas camadas internas do átomo. Um eletrão da camada mais externa tem tendência a ocupar a lacuna que ficou na orbital interna, emitindo um fóton com o comprimento de onda na gama dos raios X. É este fóton que é detetado e processado dando origem a um espetro de energia. As energias de emissão dos elementos são únicas, sendo possível identificar os elementos atômicos que constituem a amostra a partir do espetro de energia [17].

No caso da fluorescência de raios X, fótons de raios X interagem com a amostra. Dessa interação ocorrem processos físicos de excitação/desexcitação dos átomos que tornam possível a emissão de radiação eletromagnética na gama dos raios X (cf. Técnica XRF). Existem muitos métodos que incorporam esta técnica, entre eles a *Energy Dispersive XRF* (EDXRF) e a *Wavelength Dispersive XRF* (WDXRF). A fluorescência de raios X por energia dispersiva é a técnica utilizada neste trabalho e será descrita no seu decurso. No entanto, esta pode ser dividida em diferentes modalidades devido aos diferentes métodos de produção de raios X que podem ser utilizados: tubos de raios X, fontes radioativas de raios X, radiação de sincrotrão, etc. A SRXRF (*Synchrotron Radiation XRF*), uma das mais conhecidas técnicas de EDXRF, utiliza a radiação de sincrotrão, radiação eletromagnética originada pela aceleração de eletrões a velocidades próximas à da luz. A radiação interage com a amostra e provoca fluorescência de raios X. Estes raios X secundários são detetados por um detetor e processados por uma cadeia eletrónica. Porém, o fato de ser necessário um acelerador de partículas torna este método bastante inacessível, devido ao custo e ao número reduzido de infraestruturas internacionais [19].

Para selecionar uma técnica adequada a dada aplicação existem vários critérios importantes a considerar, incluindo limite de deteção, qualidade dos resultados, custo, facilidade na utilização, número de elementos químicos que se consegue identificar, preparação das amostras, entre outras [16]. Na tabela 2 encontram-se algumas destas características para as diferentes técnicas discutidas acima.

	Vantagens	Desvantagens
AAS	Baixo custo [3]	Destrutiva, limite de detecção elevado, identificação de 1 elemento por análise [3]
NAA	Análise multi-elemental, não destrutiva, elevada sensibilidade [2]	Elevado custo, presença necessária de um reator nuclear [2]
MS	Análise multi-elemental, limite de detecção baixo [12]	Destrutiva [12]
PIXE	Análise multi-elemental, não destrutiva, análise rápida [4]	Acelerador de partículas necessário, dificuldades em análise quantitativa [4]
EDXRF	Análise multi-elemental, não destrutiva, baixo custo [20]	Deteção de elementos a partir de $Z > 10$ [20]
SRXRF	Análise multi-elemental, não destrutiva [19]	Elevado custo, presença necessária de um sincrotrão [19]

Tabela 2: Vantagens e desvantagens das diferentes técnicas espectrométricas.

1.3 Técnica de Fluorescência de Raios X

A fluorescência de Raios X por energia dispersiva é uma análise não destrutiva, podendo a amostra, no final da sua análise, ser utilizada para novas medições através de outras técnicas. Para além disto, esta técnica apresenta um carácter multi-elemental, sendo capaz de identificar vários elementos presentes nas amostras apenas numa medição, possibilita a análise de pequenas áreas, tem elevada precisão e exatidão, é bastante versátil, uma vez que vários tipos de amostras podem ser analisados, e é aplicada para medir um grande intervalo de concentrações. O fato de só ser possível analisar elementos com $Z > 10$ não será uma limitação à realização do presente trabalho, uma vez que se pretendem identificar elementos com $Z > 14$ [4, 20]. Por estas razões, foi escolhida a técnica de fluorescência de raios X para a realização deste estudo.

Origem e História dos raios X

Os raios X foram descobertos acidentalmente em 1895 por Wilhelm Conrad Roentgen. Quando se encontrava no seu laboratório verificou que passando uma corrente elétrica num tubo de vidro em vácuo havia produção de fluorescência num papel impregnado por cianureto de bário e platina (emulsão fotográfica). Este efeito incluía, assim, a produção de uma radiação invisível, de baixo comprimento de onda e capaz de atravessar corpos sólidos. A procura constante de conhecimentos sobre esta radiação possibilitou a descoberta de determinadas características como a sua difração (que tornou possível saber a ordem do seu comprimento de onda) e a sua absorção na matéria [21, 22]. Na gama de energia entre 0.11 e 100 keV encontram-se os raios X, que são objeto de estudo neste trabalho.

Produção de raios X

Para explicar a produção de raios X considera-se o modelo simplificado do átomo: o *Modelo Atómico de Bohr*. Os eletrões encontram-se distribuídos em camadas com energias

específicas. Estas camadas são representadas pelas letras K, L, M, N, O, P e Q, em que a K é a que se encontra mais próxima do núcleo e, portanto, é a camada para a qual é necessária aplicar mais energia para conseguir extrair um dos elétrons que a constitui (Figura 7) [23].

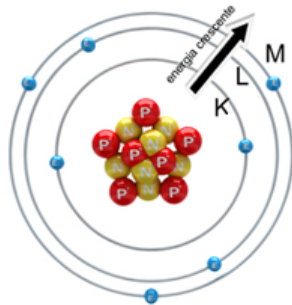


Figura 7: Representação esquemática do Modelo atômico de Bohr (*adaptado de* [24]).

Para ionizar um átomo é necessário aplicar uma energia igual ou superior à energia de ligação do elétron na camada. Supondo que a energia aplicada a um determinado átomo é suficiente para provocar a ejeção de um elétron de uma determinada camada, uma lacuna será criada nessa mesma camada. O átomo encontra-se num estado instável e irá responder instantaneamente preenchendo esta lacuna com um elétron de uma camada mais externa. A perda de energia resultante pode aparecer sob a forma de energia eletromagnética igual à diferença das energias de ligação das duas camadas [19, 25].

Qualquer elétron num dado átomo move-se numa orbital que é caracterizada por quatro números quânticos. A partir destes foi possível determinar a quantidade de subcamadas de cada camada e o número máximo de elétrons presentes em cada camada para cada átomo estável (Tabela 3). Adicionalmente, o princípio de exclusão de Pauli impõe que num dado átomo não pode existir mais do que um elétron por estado eletrónico.

Sabendo que as transições mais energéticas são as que envolvem os elétrons da camada K, e, portanto, as que envolvem uma maior perda de energia nas transições, vamos tomá-la como exemplo. Quando um elétron é ejetado da camada K é criada uma lacuna. Assim, um elétron das camadas superiores irá preenchê-la de modo a tornar o átomo ionizado estável. Nesta transição há libertação de energia correspondente à gama dos raios X. A estes raios X dá-se o nome de raios X característicos [4, 22, 25].

A camada mais próxima da K é a L, a qual possui 3 subcamadas: L_I , L_{II} e L_{III} (Figura 8). Conforme a subcamada em que se encontra o elétron que irá preencher a lacuna na camada K, uma designação é dada à transição: de L_{III} para K dá-se o nome de K_{α_1} e de L_{II} para K, K_{α_2} . No entanto, os elétrons poderão vir da camada M ou N e as denominações destas transições são: de M_{III} para K, K_{β_1} e de M_{II} para K, K_{β_3} [19, 20]. Apenas algumas transições são permitidas pelas regras de seleção impostas pela mecânica quântica [4, 19, 20]:

$$\Delta n \geq 1, \Delta l = \pm 1, \Delta j = 0, \pm 1$$

Na figura 8 encontram-se algumas transições possíveis para as camadas K, L e M.

	n	l	ml	s	j
Nome	principal	momento angular	momento magnético	spin	momento angular total
Significado	número da orbital	forma da orbital	orientação da orbital no campo magnético	sentido de rotação do elétron	quando necessário ter em conta interações entre s e l
Valores permitidos	1,2,3,4,... n	0,1,2,... (n-1)	-l, ..., 0, ..., l $\in \mathbb{Z}$	$\pm 1/2$	$ l + s $
Exemplo	1	0	0	$\pm 1/2$	1/2
	2	0	0	$\pm 1/2$	1/2
		1	-1,0,1	$\pm 1/2$	1/2, 3/2
	3	0	0	$\pm 1/2$	+1/2
		1	-1,0,1	$\pm 1/2$	1/2, 3/2
		2	-2,-1,0,1,2	$\pm 1/2$	3/2, 5/2

Tabela 3: Números quânticos e respetivo significado (*adaptado de [4, 20, 21]*).

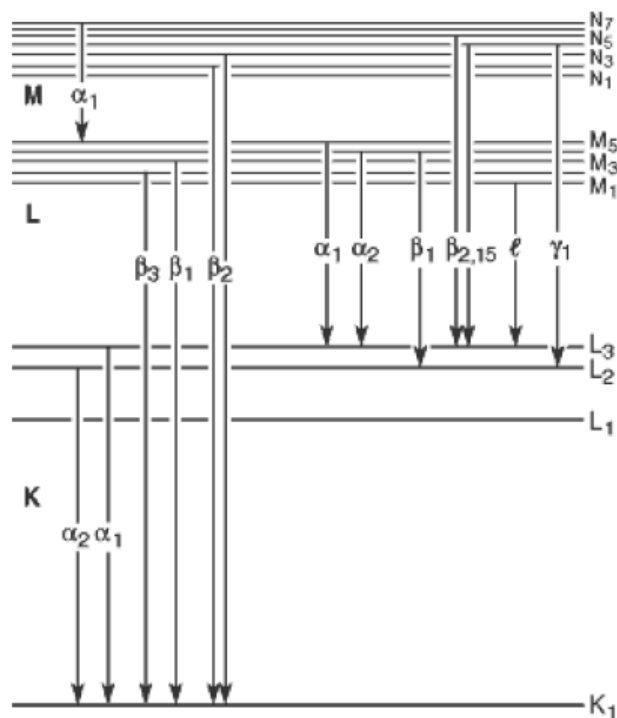


Figura 8: Algumas transições permitidas para as camadas K, L e M (*adaptado de [26]*).

Os raios X emitidos, por cada elemento químico que constitui uma substância, possuem energias características bem definidas. Na tabela 4 estão representados alguns destes valores para as linhas (transições) K em vários elementos.

N Atômico	Elemento		E_K (keV)	E_{K_α} (keV)	E_{K_β} (keV)	w_K
1	Hidrogênio	H	0.014	-	-	-
2	Hélio	He	0.025	-	-	-
14	Silício	Si	1.837	1.740	1.829	0.055
15	Fósforo	P	2.142	2.015	2.136	0.070
16	Enxofre	S	2.470	2.308	2.464	0.090
17	Cloro	Cl	2.819	2.622	2.816	0.105
18	Árgon	Ar	3.202	2.958	3.191	0.125
19	Potássio	K	3.606	3.312	3.590	0.140
20	Cálcio	Ca	4.037	3.690	4.014	0.190
24	Crômio	Cr	5.987	5.412	5.947	0.260
26	Ferro	Fe	7.109	6.402	7.057	0.320
29	Cobre	Cu	8.978	8.041	8.908	0.410
30	Zinco	Zn	9.657	8.629	9.568	0.435
41	Nióbio	Nb	18.981	16.577	18.650	0.755
74	Tungstênio	W	69.479	58.768	67.390	0.960
82	Chumbo	Pb	88.037	74.251	84.930	0.970

Tabela 4: Energia limiar de excitação (E_K) [19], energias médias das possíveis transições de elétrons entre camadas (E_{K_α} e E_{K_β}) [20] e rendimento de fluorescência (w_K) (cf. Interação dos raios X com a matéria) [19] para vários elementos.

Interação dos raios X com a matéria

Quando um feixe de fótons de raios X incide sobre uma amostra, a intensidade do feixe emergente é inferior à do feixe incidente, devido à interação de fótons com os átomos da amostra. Neste processo, alguns fótons serão absorvidos e outros dispersados do caminho original (Figura 9) [27].

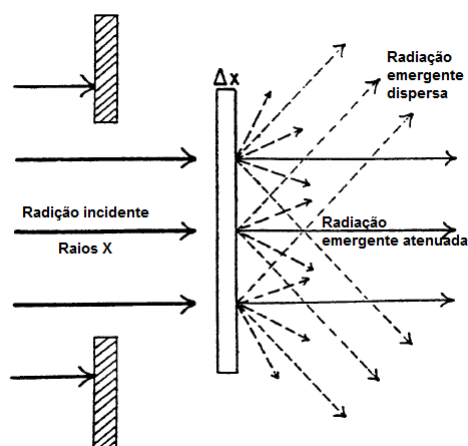


Figura 9: Interação de raios X com a matéria (*adaptado de* [28]).

Os raios X interagem na matéria por processos de absorção e dispersão, entre eles o efeito fotoelétrico, a dispersão de Compton e a de Rayleigh [22, 29]. No processo de absorção por efeito fotoelétrico, o fóton é completamente absorvido pelo átomo e desaparece. Parte da energia do fóton incidente é dispensada para extrair um elétron do átomo,

sendo a restante energia transferida ao elétron ejetado sob a forma de energia cinética. O fóton incidente tem que ter uma energia maior ou igual à energia limiar de excitação para a camada/subcamada do elétron [4]. Ao elétron ejetado dá-se o nome de fotoelétron. Apesar deste processo poder ocorrer com qualquer elétron do átomo, é mais provável para elétrons mais fortemente ligados ao núcleo, i.e. para as camadas mais internas como K ou L, desde que o fóton, tenha energia suficiente. Em adição a este fotoelétron, a interação cria uma lacuna na camada do átomo absorvente, ficando ionizado. Esta lacuna é rapidamente preenchida por rearranjo de elétrons das outras camadas do átomo. Esta transferência de energia faz com que sejam emitidos raios X, denominados raios X secundários (ou de fluorescência). A este processo dá-se o nome de fluorescência de raios X (Figura 10a) [22,30]. No entanto, nem todas as lacunas levam a uma produção de raios X, uma vez que há um processo de rearranjo interno competitivo a este, denominado efeito de Auger. Neste efeito, há transferência da energia de excitação diretamente para um elétron de uma camada mais externa, causando a sua ejeção do átomo. O elétron extraído é chamado por elétron de Auger (Figura 10b) [19, 22, 30]. Pode-se então concluir que as lacunas criadas nem sempre dão origem a raios X de fluorescência. Assim, é importante definir a razão entre o número de raios X de fluorescência emitidos e o número total de ionizações, i.e. o número total de lacunas geradas em processos de excitação. A esta razão dá-se o nome de rendimento de fluorescência.

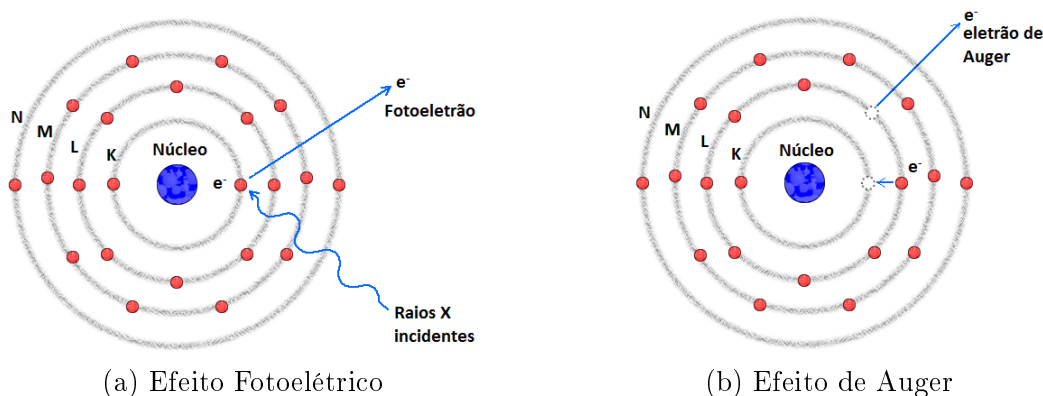


Figura 10: Efeitos produzidos por rearranjos dos elétrons (*adaptado de [31]*).

O rendimento de fluorescência, w , para as camadas K, L e M em função do número atômico encontra-se representado na figura 11.

Como se pode observar a probabilidade de ocorrer emissão de raios X de fluorescência é muito mais baixa para elementos de baixo Z , havendo predominantemente produção de elétrons de Auger, como também é muito menor (um fator de $\sim \frac{1}{3}$) para as camadas L relativamente às camadas K, para o mesmo número atômico.

O rendimento de fluorescência pode ser estimado pela seguinte expressão empírica:

$$w = \frac{Z^4}{A + Z^4} \quad (5)$$

onde A é $\sim 10^6$ para a camada K e 10^8 para a camada L [25].

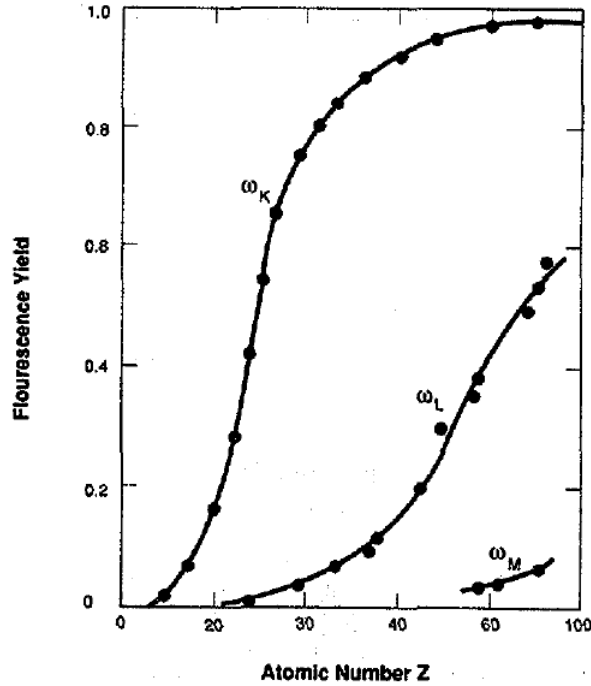


Figura 11: Rendimento de fluorescência em função do número atômico (*adaptado de [25]*).

A dependência típica da probabilidade de ocorrência do processo de absorção fotoelétrica, $\left(\frac{\mu(E)}{\rho}\right)_{\text{fotoel.}}$, com a energia do fóton mostra-se na figura 12.

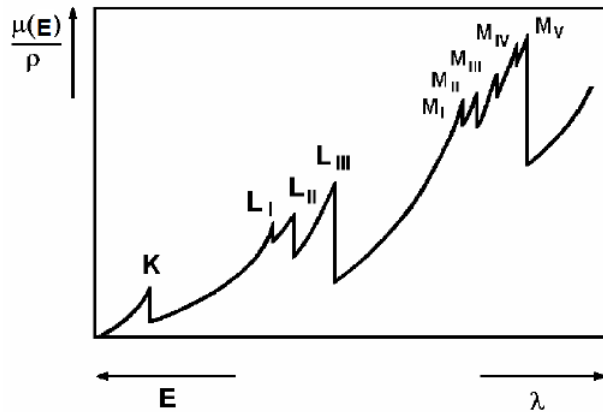


Figura 12: Probabilidade da absorção fotoelétrica em função da energia do fóton (*adaptado de [23]*).

Note-se que a probabilidade aumenta à medida que a energia do fóton diminui. Isto acontece até um determinado valor, mais propriamente até à energia de ligação da camada/subcamada em questão. Neste ponto há uma diminuição abrupta da probabilidade, uma vez que os raios X de menor energia não conseguem extrair elétrons desta camada. No entanto, estes fótons continuam a interagir com os elétrons das camadas mais exteriores. Estas discontinuidades são designadas limiares de absorção [4, 23].

Para energias afastadas dos limiares de absorção, a probabilidade de ocorrência da absorção fotoelétrica pode ser descrita pela seguinte expressão [30]:

$$\left(\frac{\mu(E)}{\rho}\right)_{\text{fotoel.}} \sim \frac{Z^n}{E_X^{3.5}} \quad (6)$$

com n no intervalo 4-5.

Nos processos de dispersão ocorre uma mudança na direção do fóton incidente, quer para a dispersão coerente (Rayleigh), quer para a dispersão incoerente (Compton). Na dispersão coerente, os raios X incidem no átomo, ocorre uma colisão elástica entre o fóton e os elétrons que pertencem ao átomo absorvente, i.e. quando um fóton incidente de baixa energia passa perto de um elétron das camadas externas do átomo este causa uma oscilação momentânea com a mesma frequência que o fóton incidente, fazendo com que o elétron irradie energia na forma de outro fóton de raios X com a mesma frequência e energia que o fóton incidente [19, 20, 27]. Neste processo apenas a direção do fóton incidente é alterada. A probabilidade de ocorrer dispersão de Rayleigh diminui com o aumento da energia do fóton incidente, tomando valores mais elevados para baixas energias [19].

O processo de dispersão incoerente encontra-se representado na figura 13. Neste caso, o fóton de raios X incidente (com energia muito maior do que a energia de ligação da camada mais interna do átomo do meio) colide com um elétron das camadas externas do átomo. O fóton incidente é desviado da sua direção original. O elétron sofre um recuo no impacto e transporta parte da energia do fóton incidente, ficando livre para poder ionizar outros átomos [29, 30]. Considerando desprezáveis os efeitos de ligação do elétron no átomo e assumindo que este está em repouso é possível deduzir uma expressão que relaciona a energia do fóton disperso com a energia do fóton incidente e o ângulo de dispersão (equação 7) [4, 30].

$$\lambda_f - \lambda_0 = \frac{h}{m_e c} (1 - \cos(v)) \Leftrightarrow E_f = \frac{E_0}{1 + \frac{E_0}{m_e c^2} (1 - \cos(v))} \quad (7)$$

sendo λ_f e λ_0 o comprimento de onda do fóton final e inicial, E_f e E_0 a energia do fóton final e inicial, v o ângulo de dispersão e $m_e c^2$ a energia em repouso do elétron. A energia transferida para o elétron pode variar de zero a uma grande fração da energia do fóton incidente.

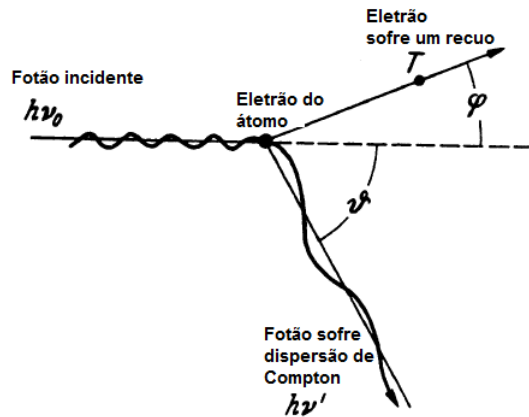


Figura 13: Dispersão de Compton (*adaptado de [28]*).

A probabilidade de ocorrer dispersão de Compton depende do número de elétrons disponíveis e, portanto, aumenta com o número atômico dos átomos que constituem a amostra. Adicionalmente, esta probabilidade diminui com o aumento da energia do fóton incidente (equação 8) [30].

$$\left(\frac{\mu}{\rho}\right)_{Compton} \sim \frac{Z}{E} \quad (8)$$

Cada uma das interações descritas anteriormente remove fótons do feixe, quer por absorção, quer por dispersão, e pode ser caracterizada por uma probabilidade de ocorrência por unidade de caminho percorrido no meio. A soma destas probabilidades é designada por coeficiente de atenuação linear, μ [22, 30]. O uso deste coeficiente de atenuação linear é limitado pelo fato de variar com a densidade do meio, ρ , sendo, portanto, mais utilizado o coeficiente de atenuação mássico que é definido pela razão entre μ e ρ [30].

Observando a figura 14, e sabendo que há uma atenuação do feixe inicial, é possível relacionar a intensidade do feixe incidente, I_0 , com a intensidade do feixe transmitido, I . Para um feixe paralelo e monocromático, a atenuação de fótons num meio homogêneo é descrito por uma lei exponencial:

$$I = I_0 \exp(-\mu x) \quad (9)$$

onde x é a espessura do meio que é atravessado pelo feixe [19].

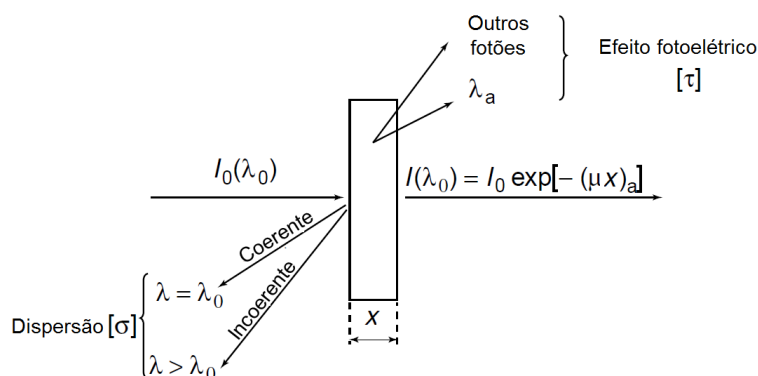


Figura 14: Processos de atenuação do feixe inicial quando incide na matéria (*adaptado de [32]*).

Se o meio for um composto químico ou uma mistura, o seu coeficiente de atenuação mássico pode ser definido pelos coeficientes dos seus elementos constituintes, $\left(\frac{\mu}{\rho}\right)_i$, tendo em conta a sua fração em massa, w_i (equação 10) [19].

$$\left(\frac{\mu}{\rho}\right)_C = \sum_i w_i \left(\frac{\mu}{\rho}\right)_i \quad (10)$$

Na figura 15 encontram-se representados os coeficientes de atenuação mássicos para o elemento Si e o composto H₂O.

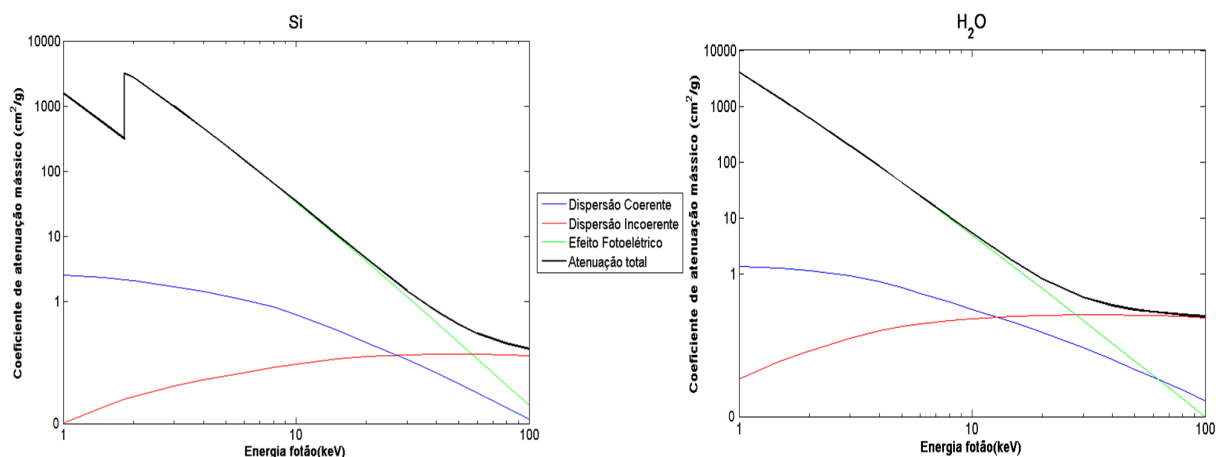


Figura 15: Coeficientes de atenuação mássicos para o elemento Si e para o composto H₂O (*calculados a partir de [33]*).

1.4 Aplicações da técnica XRF

A técnica de fluorescência de raios X é aplicada em diversas áreas devido às suas vantagens, uma vez que possibilita a análise de vários elementos num dado intervalo de tempo e por ser uma técnica não destrutiva. Entre essas áreas destaca-se a arqueologia, o ambiente, as ciências forenses, a geologia, a eletrónica, as ciências farmacêuticas, a biologia e a medicina (Tabela 5) [34].

Área	Aplicações
Arqueologia	Obter informações sobre artefactos e outros vestígios arqueológicos; verificar produtos de corrosão; provar autenticidade das obras; estudar melhores condições de manutenção das obras; etc.
Ambiente	Analisar e caracterizar materiais recicláveis e sedimentos existentes, por exemplo, no mar; estudar a contaminação dos solos; identificar elementos tóxicos; etc.
Ciências Forenses	Identificar materiais presentes nas cenas de crimes, comparando-as com aqueles encontrados nos suspeitos; observar padrões dos resíduos dos tiros; providenciar informações sobre os constituintes de bombas; etc.
Geologia	Analisar espécies inorgânicas; identificar espécies de minerais; reconhecer os constituintes de meteoritos; fornecer informação sobre a estrutura interna das rochas e suas contaminações; etc.
Eletrónica	Analisar dispositivos como <i>PCBs</i> ; etc.
Ciências Farmacêuticas	Obter informações sobre estrutura interna (e respetivas concentrações de cada elemento) de comprimidos e detetar contaminantes; analisar pomadas, produtos de cosmética, pós, entre outros; etc.
Biologia e Medicina	Identificar e quantificar os elementos presentes em determinadas partes do corpo; investigar acumulações de drogas ou produtos farmacológicos em tecidos; comparar tecidos saudáveis com tecidos "doentes"; reconhecer micronódulos em folhas de plantas; etc.

Tabela 5: Aplicações da técnica XRF.

1.5 Doença de Parkinson

Doenças neurodegenerativas

As doenças neurodegenerativas são resultado da perda da estrutura e de funções do neurónio ou mesmo da sua morte, de uma forma progressiva e irreversível. Esta degeneração pode causar problemas com o movimento ou mesmo no funcionamento cerebral, alterando funções cognitivas como a memória, o comportamento, a linguagem, a emoção, entre outros [1, 35].

Estas doenças são caracterizadas por várias condições patológicas que partilham pro-

cessos críticos semelhantes, como o *stress* oxidativo, neuroinflamação, agregações de proteínas, disfunção das mitocôndrias, falhas de energia, etc. Estes processos podem ser mediados e desencadeados por um desequilíbrio dos íons metálicos, que leva a mudanças críticas em sistemas biológicos e inicia uma cascata de eventos que pode conduzir à neurodegeneração e à morte neuronal [36].

Importância dos metais

O cérebro é um órgão com uma grande complexidade biológica que serve como centro de comando para funções cognitivas e motoras. Assim, este sistema tem de possuir uma composição química e uma reatividade a nível molecular única.

Alguns elementos químicos, como o manganês, o ferro, o cobre e o zinco são essenciais para o crescimento e bom funcionamento do cérebro. No entanto, o excesso ou o defeito de alguns destes metais, ou mesmo a presença de alguns metais pesados como chumbo ou mercúrio, podem levar à danificação de algumas células cerebrais. Portanto, é bastante importante ter bem ciente a razão da presença de determinados metais e das suas concentrações normais para uma boa atividade cerebral (Tabela 6) [2, 3, 36].

Elemento químico	Funções
Potássio	Importante na propagação de cada ação dos neurónios, proporcionando reações químicas que ativam cadeias de eventos em que há envio de impulsos elétricos ao longo do sistema nervoso.
Cálcio	Bastante relevante na transmissão dos impulsos nervosos, uma vez que desencadeia a libertação de neurotransmissores.
Ferro	Essencial nos processos metabólicos, como transporte de oxigénio, síntese de DNA e respiração mitocondrial; associado à via nigroestriatal.
Cobre	Fundamental no controlo da homeostasia de neurotransmissores e neuropeptídeos; fator importante na produção de ATPs.
Zinco	Importante na síntese de DNA, na estrutura da cromatina, na divisão das células e na modulação da transmissão sináptica.

Tabela 6: Importância dos diferentes elementos químicos presentes no tecido cerebral [2, 3, 36].

Doença de Parkinson

Torna-se importante no conhecimento da doença estudada nesta investigação compreender em particular a anatomia e funcionamento de duas grandes estruturas cerebrais: a *substantia nigra* e o estriado.

A *substantia nigra* encontra-se localizada no mesencéfalo (Figura 16) e é constituída por duas partes: a reticular e a compacta, diferenciando-se no tipo de conexões dos neurónios. Os axónios provenientes da parte reticular terminam normalmente no tálamo, uma estrutura que se encontra no diencefalo. A *substantia nigra* compacta contém neurónios especializados que produzem o neurotransmissor dopamina e que projetam os seus axónios para a estrutura cerebral chamada estriado [37].

O estriado é constituído por duas partes: o *putamen* e o núcleo caudado, que são duas partes com inúmeras células e bastante vascularizadas. Ele encontra-se no gânglio basal que, por sua vez está situado no telencéfalo (Figura 16). Entre as suas funções encontra-se o fato de pertencer à cadeia da dopamina, sendo recetora desta. O estriado está conectado a várias áreas do córtex cerebral [37].

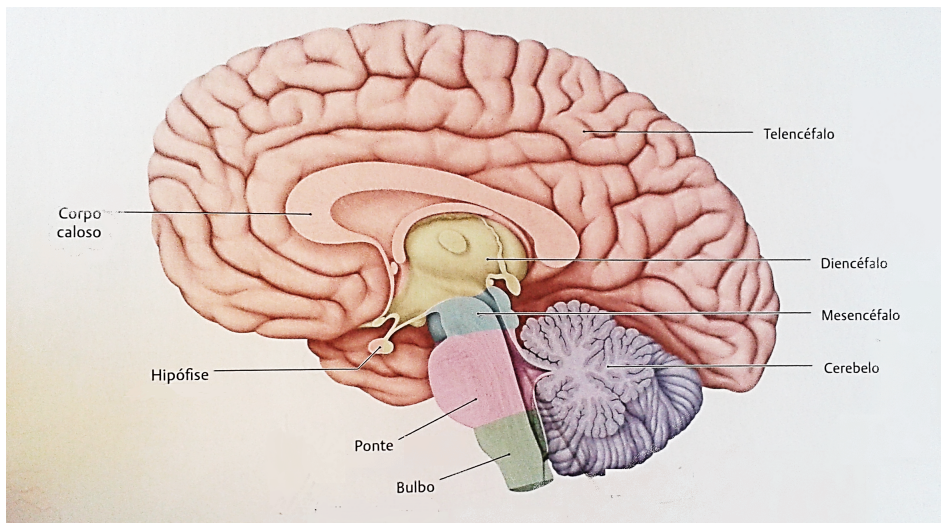


Figura 16: Divisão macroscópica do tecido cerebral (*adaptado de [38]*).

Na doença de Parkinson, os neurónios que se encontram na *substantia nigra* degeneram, fazendo com que os níveis de dopamina no estriado diminuam drasticamente. Esta perda no estriado faz com que haja uma inibição das conexões ao tálamo motor, fazendo com que o controlo do movimento por parte da pessoa seja impossibilitado (Figura 17) [37].

SRXRF, mediu quantitativamente os elementos P, S, Cl, K, Ca, Fe, Cu, Zn, Br e Rb, verificando-se para todos um aumento na região da *substantia nigra* de pacientes com Parkinson, embora apenas as diferenças dos elementos S, Cl, Ca, Fe e Zn tenham sido estatisticamente significativas.

Alguns autores têm estudado os elementos de número atômico baixo e, conseqüentemente, com os raios X de fluorescência de energias baixas. Exemplo disso foi um estudo realizado por outro grupo de japoneses, onde estudaram a distribuição espacial de elementos como Na, P, S, Cl, K e Ca, no tecido cerebral de ratos saudáveis e ratos isquêmicos através da análise por fluorescência de raios X (EDXRF), utilizando amostras de secções coronais com 3 mm de espessura [50].

Relativamente à identificação e quantificação de elementos químicos em olhos de ratos no estudo da Doença de Parkinson não existe qualquer bibliografia sobre o tema.

2 Metodologia e Sistema experimental

2.1 Instrumentação do sistema XRF

Neste trabalho utilizou-se um espectrômetro de fluorescência de raios X por dispersão de energia (EDXRF), modelo SEA6000VX da Hitachi. Este sistema é constituído por várias componentes que estão esquematizadas no diagrama de blocos da figura 18.

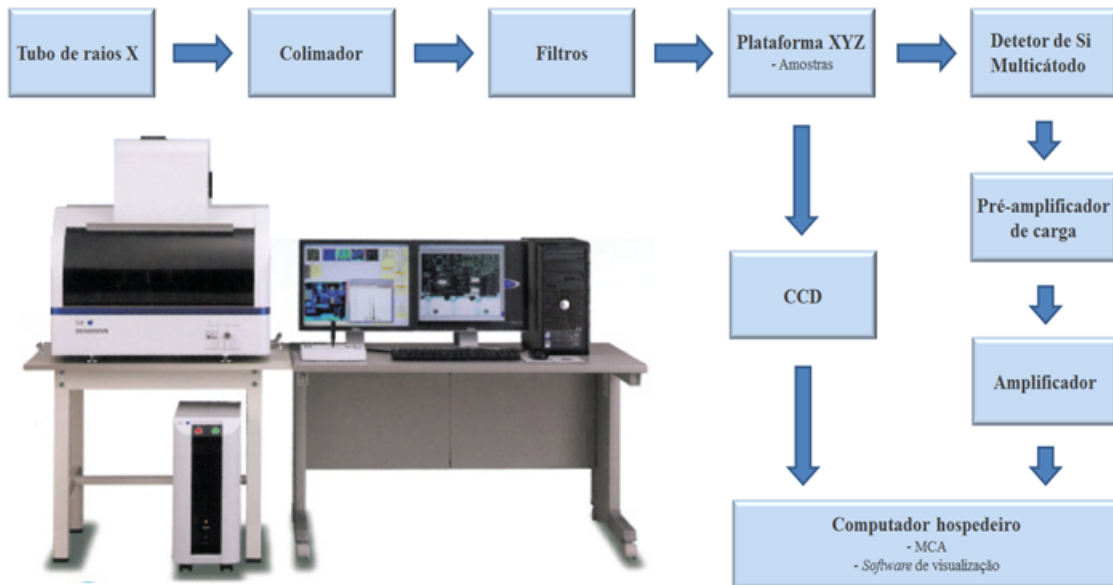


Figura 18: Instrumentação do sistema XRF (*adaptado de [51]*).

De seguida apresenta-se uma descrição detalhada dos principais constituintes do espectrômetro.

Tubo de raios X

Os raios X primários utilizados para irradiar as amostras são produzidos por um tubo de raios X, o qual é constituído por dois elétrodos (ânodo e cátodo) separados por uma distância pequena (~ 1 ou 2 cm) que se encontram em vácuo (Figura 19).

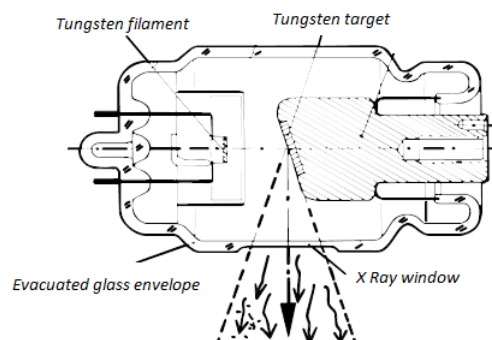


Figura 19: Estrutura típica do tubo de Raios X (*adaptado de [22]*).

O cátodo consiste num filamento metálico constituído por tungsténio, W, que é aquecido pela passagem de uma corrente elétrica libertando elétrons por efeito termoiónico. Aplicando uma determinada diferença de potencial, os elétrons são acelerados em direção a um disco fino, também de tungsténio, de elevado ponto de fusão, denominado ânodo [4].

Ao incidirem no alvo de W, os elétrons interagem com os átomos através de dois processos principais. Em primeiro, os elétrons incidentes podem sofrer dispersão elástica ou inelástica com o núcleo do átomo de W, podendo mesmo sofrer mudanças de direções de 180° , voltando na direção oposta. Apenas uma pequena parte dos elétrons incidentes sofre dispersão inelástica e são continuamente desacelerados pela ação de forças coulombianas atrativas do núcleo e gradualmente perdem a sua energia, provocando a emissão de raios X de travagem. Este processo origina o conhecido espectro contínuo, que também é conhecido como *bremsstrahlung*. Por outro lado, os elétrons incidentes no ânodo podem ainda interagir com os elétrons do alvo e transferir-lhes a sua energia. O processo dominante consiste numa sequência de colisões com elétrons das camadas mais externas com pequenas perdas de energia a cada colisão. No entanto, por vezes, um elétron da camada mais interna do átomo do alvo é removido, ficando este átomo ionizado. De seguida outro elétron de diferente orbital preenche a lacuna, levando à emissão de raios X característicos. Este processo origina as linhas características do espectro de emissão de um tubo de raios X [22].

Apenas 1% ou menos da energia total dos elétrons que se encontram no feixe são utilizados na produção dos raios X primários. A restante energia é convertida em calor [4, 20].

O espectro de emissão de um tubo de raios X consiste, assim, em duas componentes: o espectro contínuo e as linhas características do material que constitui o ânodo. A forma deste espectro pode ser modificada quando a tensão de aceleração dos elétrons é alterada. A figura 20 mostra o espectro do tubo de raios X do sistema para diferentes tensões aceleradoras aplicadas. As tensões possíveis são 15 kV, 30 kV, 40 kV e 50 kV [51].

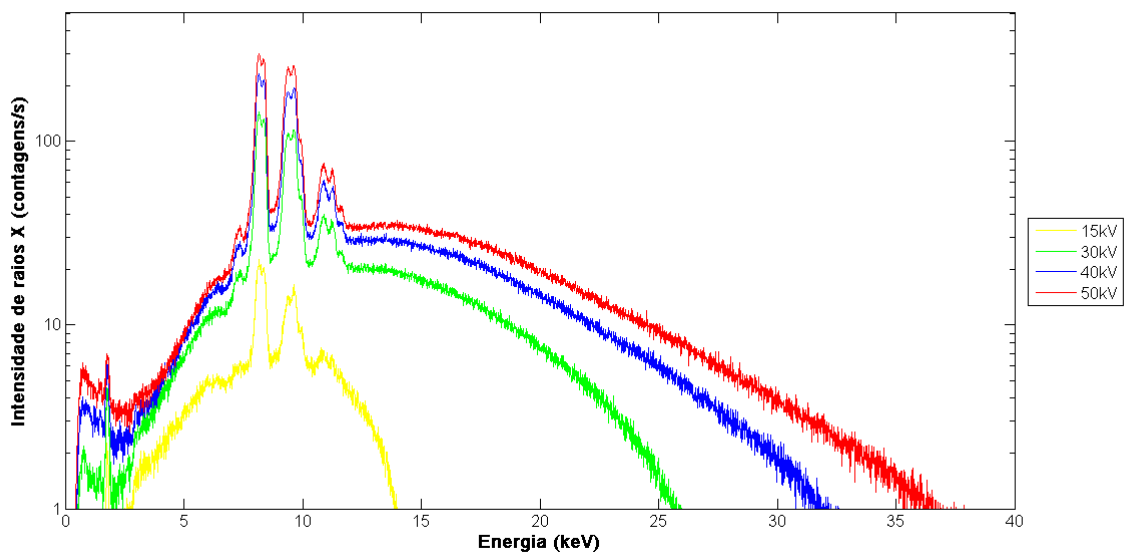


Figura 20: Espectro (indireto) do tubo de raios X para várias tensões aplicadas.

O espectro da figura 20 foi obtido de modo indireto, uma vez que não é possível irradiar diretamente o detetor com os raios X do tubo de raios X. Em contrapartida, utilizou-

se uma base em Perspex com uma espessura de ~ 2 cm sobre a plataforma XYZ que é irradiada com o tubo de raios X. Este espectro consiste na sobreposição do espectro contínuo (*bremstrahlung*) com as linhas características das transições L (L_α , L_β e L_γ) do tungstênio, dado que estas ocorrem para energias médias de 8.392 keV, 9.742 keV e 11.286 keV, respetivamente [51]. No espectro pode ainda verificar-se a presença das linhas de transição L do tântalo (8.140 keV, 9.415 keV e 10.895 keV [26]) que está presente na constituição interna do tubo de raios X.

Os raios X são emitidos do ânodo em todas as direções. No entanto, eles só podem emergir por uma janela de saída especial. Esta janela é normalmente de berílio, de modo a minimizar a absorção de raios X de energia baixa. O ângulo entre a superfície do ânodo e a normal à janela pode variar entre os $15\text{-}20^\circ$, de modo a que a abertura total do feixe de saída de raios X possa chegar aos $30\text{-}40^\circ$ [22].

Filtros

Alguns filtros são frequentemente posicionados entre o tubo de raios X e a amostra, para modificar a forma do espectro de energia final dos raios X incidentes. A sua função é modificar o espectro de emissão do tubo de raios X que é utilizado para irradiar as amostras, minimizando a intensidade dos raios X do tubo detetados na região da energia dos elementos a analisar, ou seja, o *background* (fundo) na banda de energias de determinados elementos, uma vez que os filtros absorvem os fótons de raios X de energia baixa até valores ligeiramente acima dos limiares de absorção da camada K ou L do elemento para o qual o filtro foi construído [20].

Este sistema apresenta 4 opções de filtros: filtro para o crómio (que retira fundo da banda de energia do Cr), filtro para o cloro, filtro para o chumbo e, por fim, filtro para o chumbo para mapeamento [51]. Na figura 21 estão representados exemplos de espectros de energia obtidos pelo sistema XRF, utilizando os diferentes filtros.

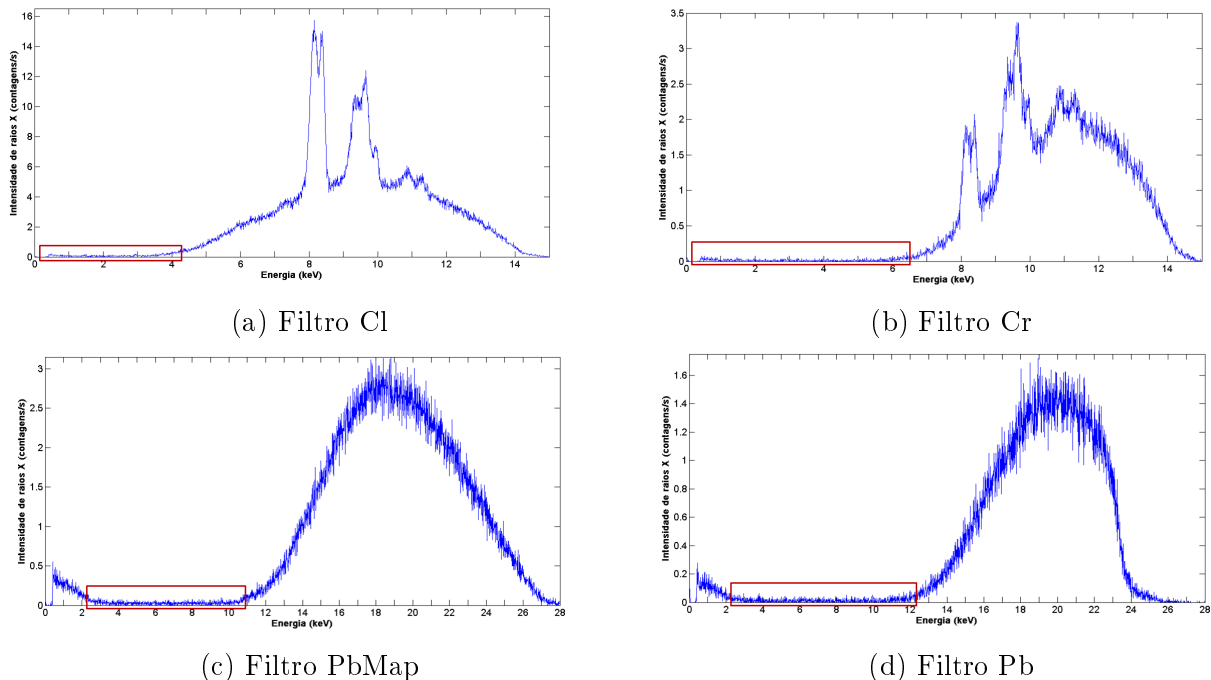


Figura 21: Espectros de energia para cada filtro.

Pode-se verificar a existência de uma banda de energia limpa, i.e. uma região cujo *background* é muito menor, situando-se entre 0.4 e 4kV, 0.4 e 6kV, 3 e 10kV e, ainda, 2 e 12kV para o filtro para o Cl, para o Cr, para o PbMap e para o Pb, respetivamente.

Colimador

Um colimador metálico é utilizado para definir as dimensões do feixe de raios X incidente sobre as amostras [20].

Neste sistema existem várias opções de escolha para o colimador, sendo possível incidir feixes de diferentes áreas, consoante as dimensões da zona da amostra que se pretende irradiar ($0.2 \times 0.2 \text{ mm}^2$, $0.5 \times 0.5 \text{ mm}^2$, $1.2 \times 1.2 \text{ mm}^2$, $3.0 \times 3.0 \text{ mm}^2$) [51].

Plataforma XYZ para colocar as amostras

Uma plataforma com movimento translacional XYZ é usada para a colocação das amostras e para permitir ajustar a sua posição relativamente ao tubo de raios X e ao detetor, possibilitando o posicionamento da amostra na zona que se pretende estudar [51].

Detetor de raios X

Um detetor de raios X tem como função converter a energia do fóton incidente no seu material em energia elétrica, i.e. num impulso elétrico. Este processo de conversão irá depender do modo de interação da radiação incidente com o material do próprio detetor.

O espectrómetro de fluorescência de raios X SEA6000VX utiliza um detetor semicondutor de silício com multicátodos. Na tabela seguinte sumaria-se algumas propriedades importantes deste material tendo em vista o processo de deteção de raios X.

Si		
	Número atómico, Z	14
	Massa atómica (g)	28.09
	Densidade (g/cm^3)	2.33
300 K	Gap de energia proibida (eV)	1.115
	Mobilidade dos eletrões (cm^2/Vs)	1350
	Mobilidade das lacunas (cm^2/Vs)	480
	Energia por par eletrão-lacuna (eV)	3.62

Tabela 7: Propriedades do silício à temperatura de 300 K (*adaptado de* [30]).

Um detetor semicondutor clássico de Si ou de Ge é constituído não por um bloco de material semicondutor puro, mas sim pela união de dois semicondutores dopados, um tipo P e outro tipo N, entre dois elétrodos. Desta união estabelece-se uma junção PN (originando a designada região de depleção de carga) na qual se baseia o funcionamento do detetor. Assim, polarizando reversamente a junção PN através da aplicação de uma tensão externa, estabelece-se um campo elétrico no interior da região de depleção. Logo, ao incidirmos radiação nesta zona de depleção, parte da sua energia é absorvida e irá fazer com que os eletrões presentes na banda de valência (BV) sejam excitados, passando para a banda de condução (BC) e deixando lacunas na banda de valência. A restante energia é convertida em fonões (vibrações da rede), i.e. em energia térmica [30]. Assim, estes

pares elétron-lacuna passam a estar sob ação do campo elétrico, gerando-se uma corrente elétrica momentânea que é integrada pela eletrônica, cuja carga é proporcional à energia depositada pela radiação no material semiconductor.

No caso particular do detetor de Si multicátodo, este é constituído por um semiconductor do tipo N, em que numa das suas faces, do lado da janela de radiação, temos um semiconductor do tipo P bastante dopado (o que explica a sigla adaptada, P^+) e na outra temos um ânodo central formado por um semiconductor tipo N (N^+) rodeado por semicondutores tipo P, todos bastante dopados (Figura 22). Por conseguinte, é possível verificar que se podem formar várias junções PN no detetor [22, 52].

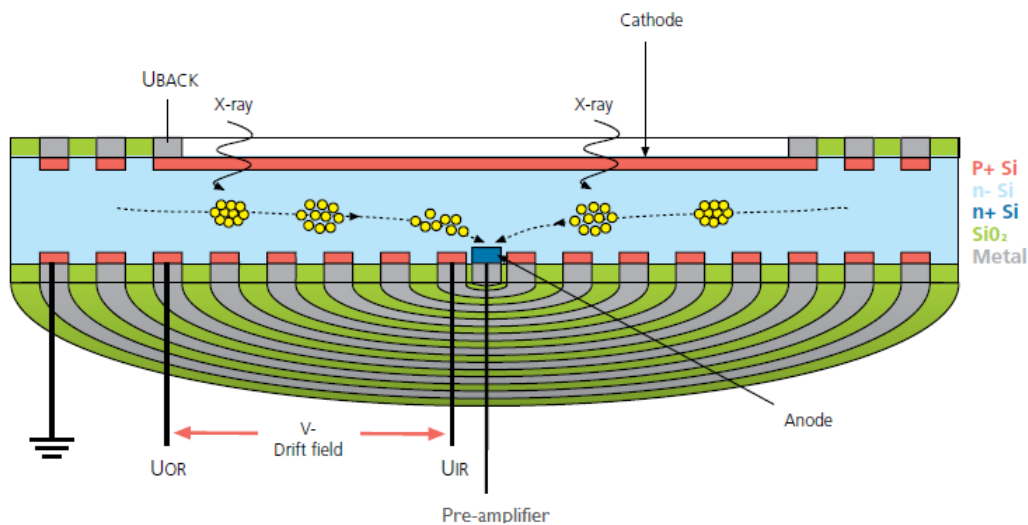
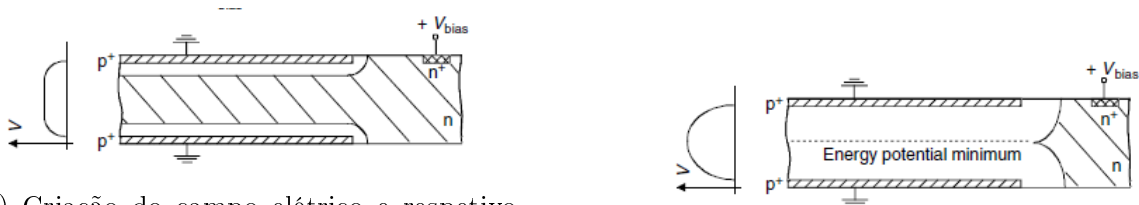


Figura 22: Estrutura de um detetor de Si multicátodo (*adaptado de [53]*).

A aplicação de uma tensão externa a partir de um divisor de tensão aos anéis dos semicondutores P^+ resulta num campo elétrico "paralelo" à superfície (Figura 23a). Aplicando o potencial certo ao longo dos anéis, toda a zona do semiconductor do tipo N será uma zona de depleção, criando-se, deste modo um poço potencial com forma parabólica dentro de todo o volume (Figura 23b).



(a) Criação do campo elétrico e respetivo potencial

(b) Criação do potencial de elétrons

Figura 23: Variação do potencial segundo diferentes tensões aplicadas aos anéis semicondutores do tipo P (*adaptado de [22]*).

Quando esta tensão é aplicada e o detetor está exposto a raios X, o detetor converte cada raio X detetado numa nuvem de elétrons com uma carga que é proporcional à energia característica desse raio X. Estes elétrons são ejetados para a banda de condução do semiconductor de silício e deixam lacunas que se comportam como cargas positivas. As lacunas

seguem rapidamente na direção do campo elétrico, migrando para os semicondutores P^+ , e os elétrons migram ao longo do poço potencial, para serem coletados no ânodo (Figura 24) [22, 53].

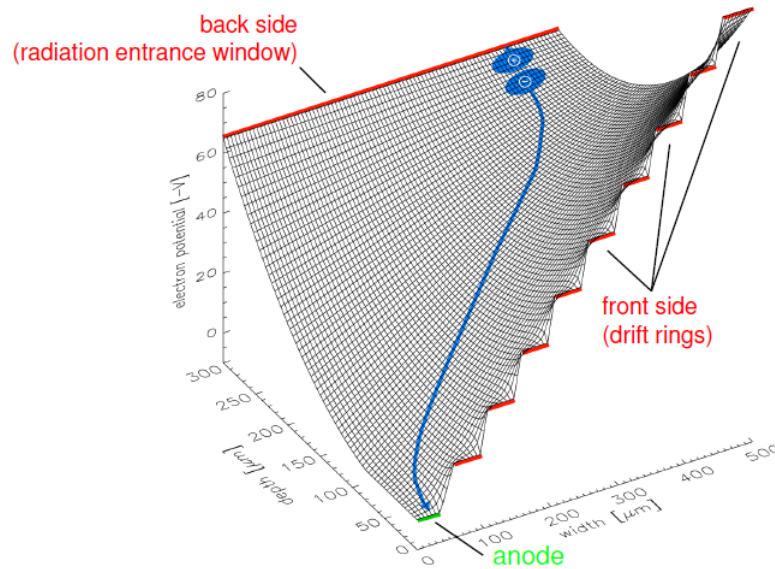


Figura 24: Percurso dos elétrons e das lacunas segundo o potencial criado para um detector de espessura $300 \mu\text{m}$ (*adaptado de [54]*).

Na figura 22 podemos ver várias camadas de dióxido de silício (SiO_2) e alumínio (Al). O SiO_2 forma uma camada dielétrica que é utilizada para o isolamento elétrico entre condutores. A camada de alumínio é utilizada para formar interconexões e contactos ôhmicos de baixa resistência [52].

O sistema de detecção deste espectrómetro não necessita de sistemas de arrefecimento tradicionais, baseados na utilização de azoto líquido ($\sim 196^\circ\text{C}$). Neste caso o arrefecimento moderado necessário para o detector e para o pré-amplificador de carga é implementado por uma célula de *Peltier*, via arrefecimento termoelétrico. Ao arrefecer o detector e o pré-amplificador, a corrente de fuga do detector e o ruído eletrónico do pré-amplificador diminuem, fazendo com que a resolução em energia do sistema melhore. Com este tipo de arrefecimento pode-se atingir temperaturas no intervalo de -30°C a -90°C [22, 30].

Características do detector

Num detector, para além da sua constituição e funcionamento, é necessário sumariar algumas características operacionais que determinam o desempenho do detector: eficiência de detecção e sensibilidade, tempo de resposta e taxa de contagem e resolução em energia.

- **Eficiência de detecção**

A eficiência total (ou absoluta) de um detector é definida como a fração de fótons emitidos pelo tubo de raios X que são registados pelo detector, ou seja, que interagem no volume ativo do detector. Pode ser ainda definida pelo produto da eficiência intrínseca com a eficiência geométrica. Enquanto que a eficiência intrínseca é a fração de fótons que incidem no detector e são registados, a eficiência geométrica depende inteiramente da configuração geométrica tubo de raios e do detector [55].

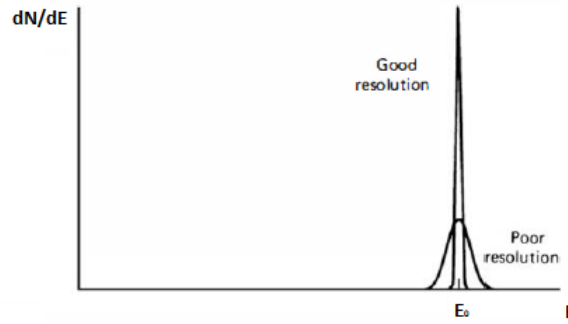


Figura 26: Comparação de resoluções em energia [30].

Considerando E_0 a energia do centróide da gaussiana, i.e. a energia dos raios X incidentes, e ΔE a banda de energia correspondente a FWHM, a resolução pode ser expressa pela equação 11 [22, 55].

$$R = \frac{\Delta E}{E_0} \quad (11)$$

Para o espectrômetro SEA6000VX utilizado neste trabalho, o fabricante apresenta duas opções para a constante de tempo da eletrônica de leitura, designada de *peaking time*, 1 e 8 μs . Na tabela seguinte sumaria-se a resolução em energia dada pelo fabricante, para raios X de 5.9 keV, para as duas situações [51].

Peaking time (μs)	1	8
Resolução em energia (eV)	≤ 180	≤ 150
Taxa de contagem (contagens/s)	150×10^3	15×10^3

Tabela 8: Resolução em energia do sistema para diferentes *peaking time* para raios X de 5.895 keV de acordo com [51]

O detector de raios X utilizado no sistema apresenta uma elevada sensibilidade, permitindo que os raios X de fluorescência sejam detetados com elevada eficiência de detecção. Permite, ainda, operar a altas taxas de contagem, $\sim 10^5$ contagens/s.

Eletrônica de leitura

A carga coletada no ânodo do detector terá de ser convertida num impulso de tensão e digitalizada, de modo a que no fim de toda a cadeia eletrônica seja possível montar o espectro de energia, com a melhor relação sinal-*background*.

A carga total coletada pelo ânodo é, normalmente, muito pequena para ser medida diretamente, sendo necessário, portanto, um pré-amplificador de carga que amplifica a amplitude dos impulsos gerados pelo detector [30, 55]. O pré-amplificador deve ser colocado o mais próximo possível do detector, maximizando assim a relação sinal-ruído à sua saída [55]. De seguida, os impulsos à saída do pré-amplificador são amplificados e formatados por um amplificador de formatação (o qual permite a seleção de duas constantes de tempo, *peaking time*).

A estrutura eletrônica de leitura típica de um detector de raios X que opera em modo impulso é esquematizada na figura 27 [30].

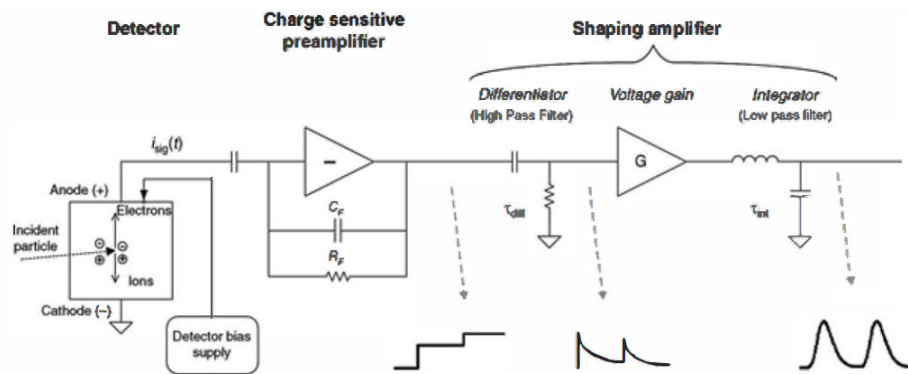


Figura 27: Esquema da eletrônica de leitura de impulsos (*adaptado de [30]*).

O amplificador de formatação destina-se a modelar a forma dos impulsos. Esta parte da eletrônica pretende, ainda, transformar o sinal de saída do pré-amplificador num sinal com uma melhor relação sinal-ruído, amplificando-os [22]. Para esta finalidade são necessários um filtro passa alto, que limita a largura do impulso, e um filtro passa baixo, que aumenta o tempo de subida do impulso para formar um impulso de saída com uma forma aproximadamente gaussiana (Figura 27) [30].

De seguida a amplitude do impulso gerado, para cada fóton de raios X, será digitalizada através de um conversor analógico-digital (ADC) e acumulada pelo analisador multicanal (MCA) [22]. O MCA utiliza os valores digitalizados e distribui-os por canais, onde a cada canal é atribuído um intervalo de valores de amplitude digitalizados. Assim, os impulsos são divididos numa espécie de histograma que contém o número de contagens (eventos detetados) em função do canal, i.e. da energia [55]. A este histograma dá-se o nome de espectro de energia e encontra-se um exemplo representado na figura 28.

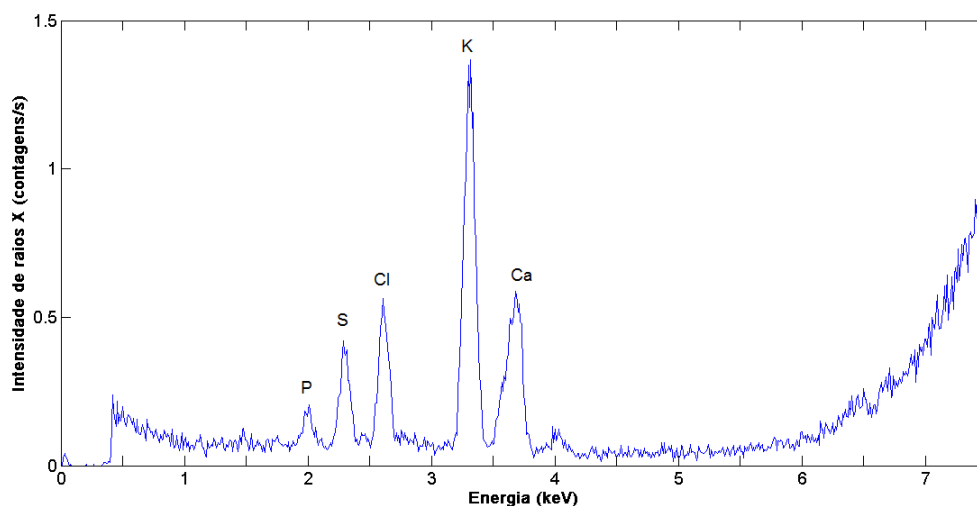


Figura 28: Exemplo de um espectro de energia obtido no sistema.

2.2 Amostras

Neste trabalho utilizaram-se amostras de tecidos biológicos: tecido cerebral e olhos de ratos.

Os ratos foram tratados com a toxina 6-OHDA que foi estereotaxicamente injetada no estriado direito, sendo que o hemisfério esquerdo serve como controlo (não tratado).

A ligação do olho ao cérebro é feita através dos nervos óticos. Os nervos óticos que saem de cada olho seguem até ao chamado quiasma ótico, um ponto onde as fibras cruzam, passando o nervo ótico do olho direito a estar ligado ao tálamo do hemisfério esquerdo do cérebro e, por conseguinte o olho esquerdo ao hemisfério direito (Figura 29) [38]. Portanto, relativamente aos olhos, olho de controlo é o direito e o tratado é o esquerdo.

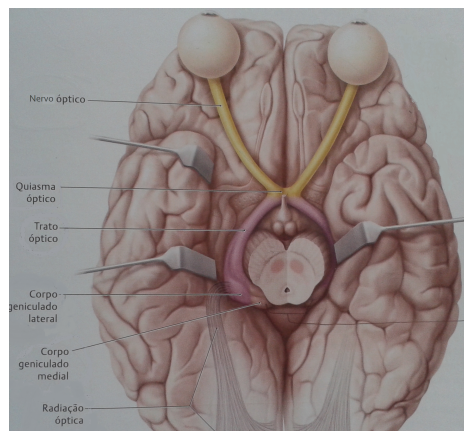


Figura 29: Ligação nervosa do olho ao cérebro (*adaptado de [38]*).

De forma a remover o sangue dos tecidos a estudar, os animais foram perfundidos transcárdicamente.

Os olhos apresentam uma forma esférica cujo raio é de ~ 2.5 mm (Figura 30).

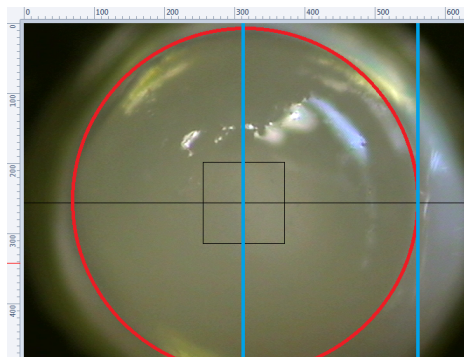


Figura 30: Dimensões do olho.

A parte analisada foi a parte contrária ao nervo ótico, que envolve estruturas como a córnea, a câmara anterior, a íris, a pupila e o cristalino (Figura 31).

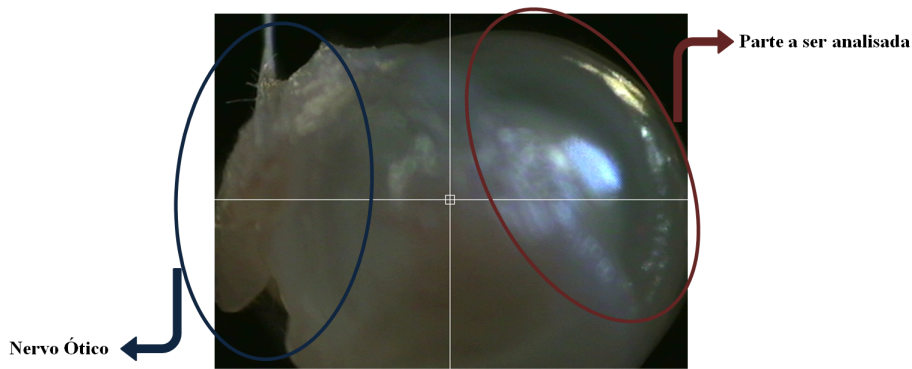


Figura 31: Esquema da parte a ser analisada do olho.

As restantes análises foram feitas nas *substantia nigra* e no estriado. As amostras de tecido cerebral foram retiradas dos mesmos ratos e apresentam ~ 18 mm de largura e ~ 11 mm de comprimento (Figura 32).

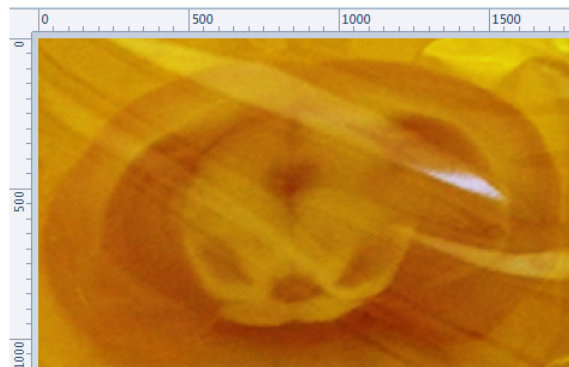


Figura 32: Dimensões das amostras de tecido cerebral.

Estas amostras foram cortadas coronalmente com uma espessura de ≈ 3 mm. Tendo como referência o ponto Bregma, um ponto de junção das suturas coronais e sagitais (Figura 33), e tendo em consideração o atlas anatómico do cérebro do rato, os cortes foram realizados segundo as seguintes coordenadas (Figura 34) [37]:

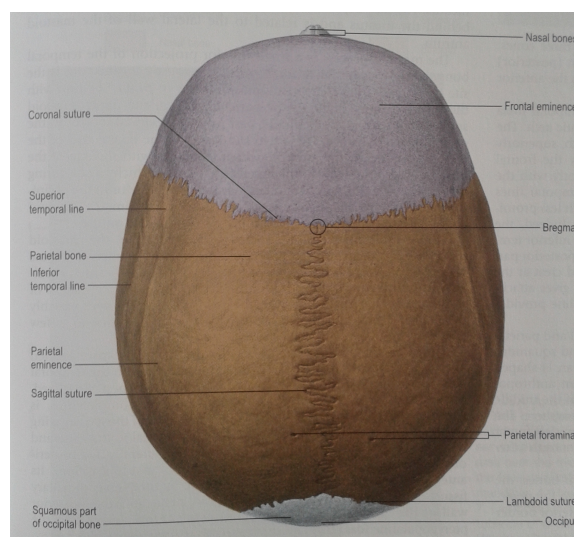


Figura 33: Localização do Bregma [37].

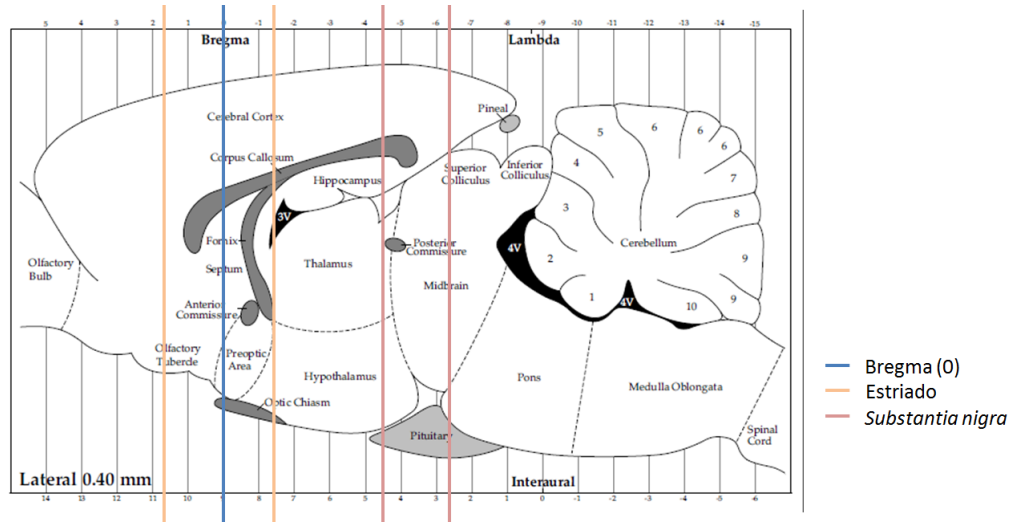
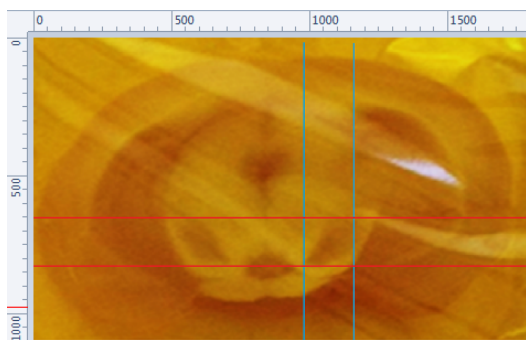


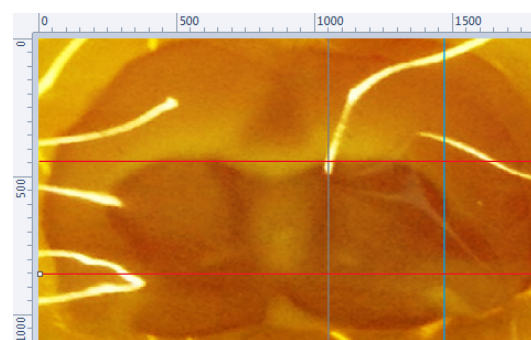
Figura 34: Cortes realizados a partir do Bregma (adaptado de [56]).

- *Substantia nigra*: de -4.52 mm até -6.30 mm na região posterior do cérebro [56]
- Estriado: de 1.70 mm a -1.30 mm na região anterior do cérebro [56]

As regiões do cérebro estudadas apresentavam a seguinte área superficial: $\sim 1.8 \times 2.2 \text{ mm}^2$ (Figura 35a) e $\sim 4.00 \times 4.47 \text{ mm}^2$ (Figura 35b), para a *substantia nigra* e estriado, respectivamente.



(a) Dimensões das regiões de *substantia nigra*



(b) Dimensões das regiões de estriado

Figura 35: Dimensões das regiões das amostras de tecido cerebral.

As amostras de tecido cerebral são montadas entre duas folhas de Kapton com $\sim 7.5 \mu\text{m}$ de espessura (Figura 36) em molduras de plástico com $\sim 3 \times 3 \text{ cm}^2$ de área aberta e com uma espessura de $\sim 1.7 \text{ mm}$.



Figura 36: Kapton.

Películas muito finas de alguns materiais poliméricos, como o Kapton, são ideais para análises espectrométricas de raios X. Para permitirem uma transmissão elevada do feixe de raios X incidentes devem possuir uma espessura no intervalo de 10 – 200 μm . Este material deve ter um teor baixo de impurezas e deve ter uma resistência à degradação elevada, de modo a proteger a amostra de ataques químicos, descidas de temperatura, riscos, rasgos, etc. O material da película e a sua espessura devem ser escolhidos de modo a providenciar uma transmissão elevada para os raios X, o que é muito crítico para estudos com raios X de energia baixa e para concentrações muito baixas dos elementos. A transmissão para várias películas encontra-se representada na figura 37 [19].

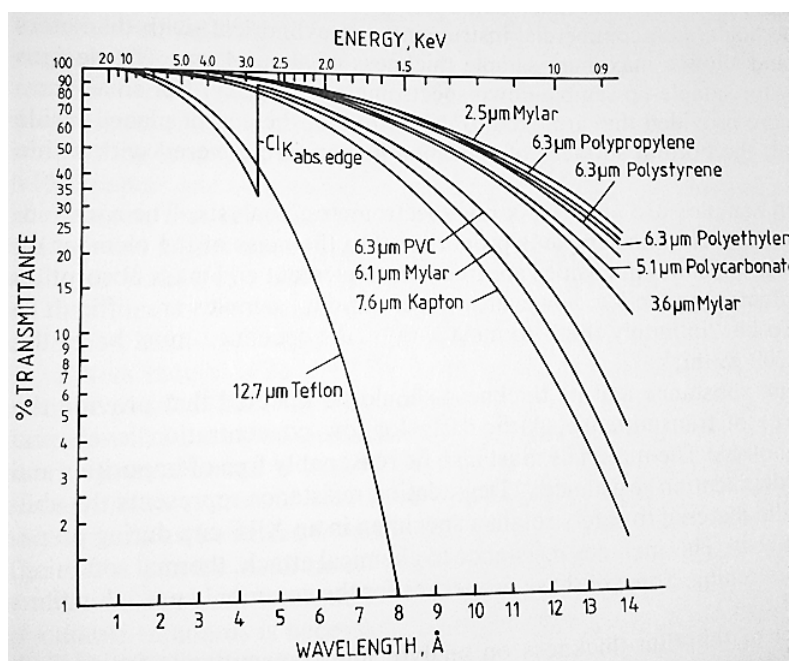


Figura 37: Transmitância de diferentes películas [19].

Pode-se observar que o Kapton com 7.6 μm de espessura apresenta uma transmissão de $\sim 50\%$ para raios X com ~ 1.75 keV e, assim, deve ser utilizado para energias superiores, que é o caso deste trabalho.

Um espectro de energia de raios X obtido com o espectrômetro SEA6000VX para a análise da película de Kapton usada neste trabalho é apresentado na figura 38 e pode-se verificar que o sistema não deteta a presença de qualquer elemento químico na gama de energia até ~ 6 keV.

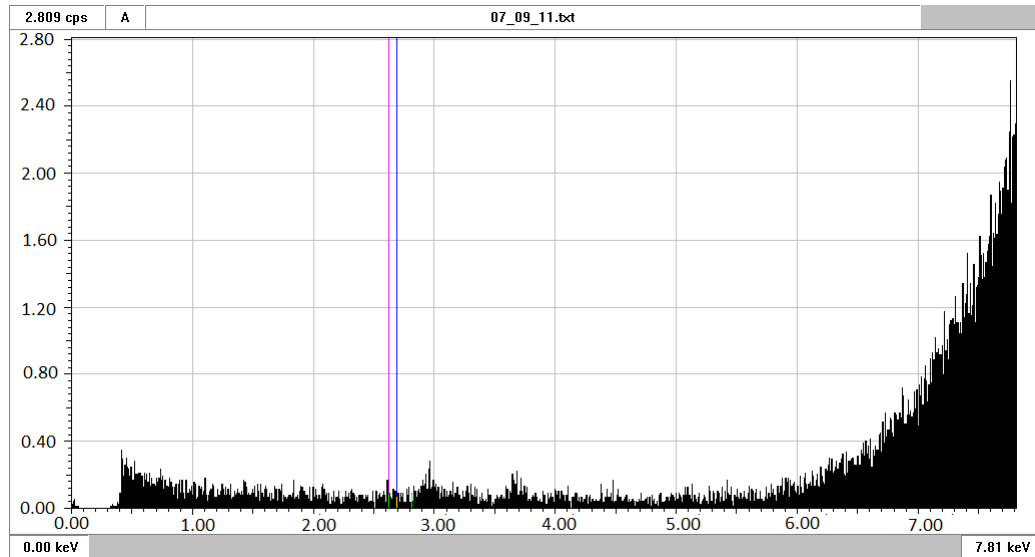


Figura 38: Espectro de energia da análise do Kapton.

Adicionalmente, realizaram-se análises das molduras (*frames*) de plástico e da sua vizinhança para verificar a presença de alguns elementos químicos que poderiam interferir com os nossos resultados (Figura 39). Observou-se a presença de um pico de titânio (Ti) outro pico não significativo $\sim 2.75\text{keV}$ no espectro do *frame*.

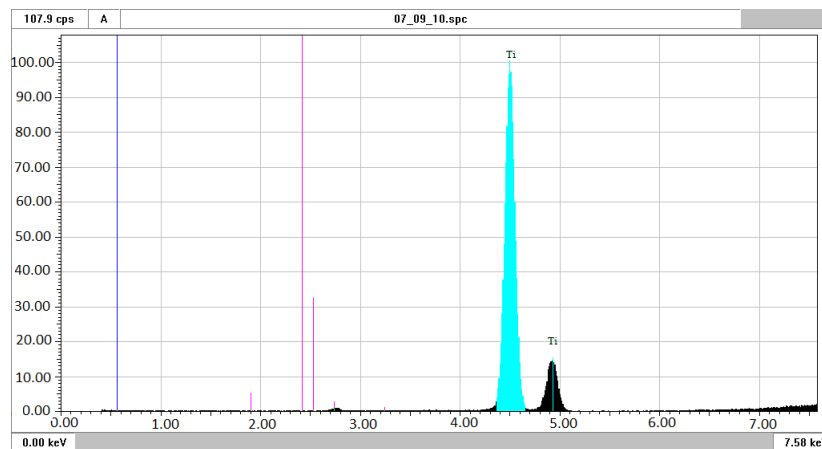


Figura 39: Espectro de energia da análise do *Frame*.

2.3 Métodos de análise

Análise Espetral

O espectro típico que se obtém pelo software do sistema SEA6000VX, figura 28, inclui em si a informação relacionada com a interação da radiação com a matéria, i.e. com a absorção e dispersão de raios X incidentes nas amostras, com a produção e deteção da fluorescência, com a deteção da radiação de fundo, etc. e, por outro lado, com os erros associados ao funcionamento do sistema de deteção, como a presença de ruído eletrónico, o empilhamento dos impulsos, o tempo morto, etc.

O espectro de energia é uma representação da relação entre a intensidade dos raios X que chegam ao detetor e a sua energia. Esta intensidade é normalmente medida como o

número de fótons detetados por segundo, tipicamente em contagens por segundo.

Como já foi dito anteriormente, a energia dos fótons de fluorescência que atingem o detetor é característica de cada elemento presente na tabela periódica, sendo assim possível fazer uma análise qualitativa, onde são identificados os elementos presentes na amostra em estudo.

O comprimento das linhas características de cada elemento representa a intensidade dos raios X que provém da fluorescência e chegam ao detetor (Figura 40). No entanto, devido à sobreposição de linhas de raios X, como por exemplo correspondentes às transições $K_{\alpha 1}$ e $K_{\alpha 2}$, aos limites de detecção do sistema e às características do detetor, como a resolução em energia limitada, as linhas degeneram em picos suaves com forma gaussiana (Figura 41) [21].

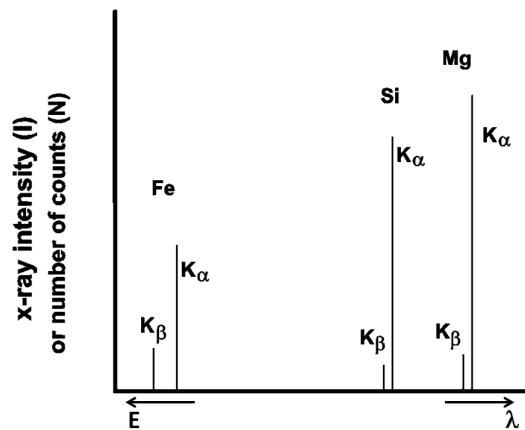


Figura 40: Espectro de energia ideal (*adaptado de [21]*).

Por outro lado, os picos gaussianos correspondentes às transições K_{α} e K_{β} de cada elemento deveriam assentar sobre uma linha de base nula, i.e. com zero contagens por segundo. Na realidade isto também não acontece, pois a taxa de contagem nunca é nula. O fato de existir fundo, que provém da radiação cósmica e radioatividade natural e da radiação dispersa que atinge o detetor, faz com que as gaussianas se encontrem sobrepostas a um fundo, que em casos simples pode ser descrito por uma função linear, e noutros por uma função quadrática, exponencial, etc. Por exemplo, no nosso caso, este fundo está relacionado com a dispersão coerente e incoerente da radiação de *bremstrahlung*, já referido anteriormente (Figura 41) [21].

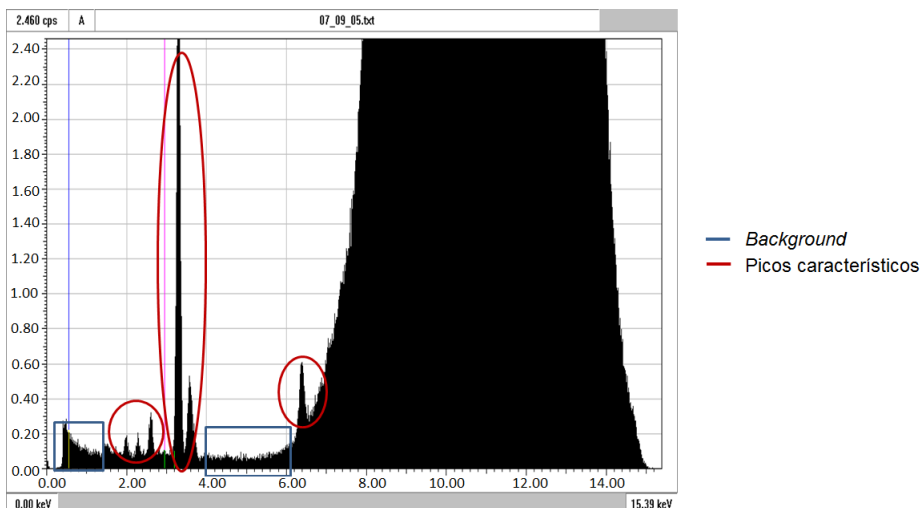


Figura 41: Linhas características e *background* no espectro de energia.

Alguns espectros podem ainda apresentar os chamados picos de escape. Quando o fóton, resultante da fluorescência de raios X, incide no detetor multicátodo de silício, o átomo de Si fica ionizado com uma lacuna na camada K. Esta lacuna é rapidamente preenchida por um elétron da camada L ou M, podendo originar raios X de fluorescência. Se os raios X forem absorvidos dentro do volume ativo do detetor, este medirá a energia total. Se, por outro lado, os raios X de fluorescência do Si escaparem do volume de detecção do detetor, a energia final medida será igual à energia do pico de escape, i.e. sabendo que a energia que corresponde à transição K_{α} do Si é de ~ 1.74 keV e, seja E a energia dos raios X incidentes, o espectro terá um pico de escape com uma energia de $E - 1.74$ keV [57].

Outro fato que pode ocorrer é a sobreposição de picos. Em muitos elementos as energias que correspondem a transições K_{α} estão sobrepostas com energias de K_{β} de outros elementos [19]. Vejamos o caso da energia K_{α} do cálcio (3.691 keV) e a energia K_{β} do potássio (3.590 keV). O sistema de detecção não tem resolução em energia suficiente para os conseguir separar, havendo portanto a sobreposição dos dois picos e das respectivas curvas gaussianas.

Para se conseguir tirar alguma informação pertinente de um espectro de energia é necessário efetuar uma análise detalhada de todos estes aspectos.

Em seguida estão descritos todos os métodos utilizados para resolver todos estes problemas, de modo a se conseguir obter as contagens líquidas de raios X de fluorescência de cada elemento detetado.

Ajuste de gaussianas

Cada pico de energia correspondente a cada elemento segue uma distribuição normal (Figura 25).

A distribuição gaussiana segue o teorema do limite central, verificando-se uma simetria da curva em relação ao centróide:

$$F(x) = h \times \exp\left(-\frac{(x - \mu)^2}{2(\sigma)^2}\right) \quad (12)$$

onde μ , o centróide, σ , o desvio padrão, e h , a altura do pico, representam os três parâmetros que caracterizam a curva gaussiana [19]. O centróide é o valor da variável aleatória

no qual o centro do pico se situa. Neste estudo, este simboliza a energia das transições de cada elemento. O desvio padrão quantifica a dispersão de um conjunto de valores e está diretamente relacionado com a largura da gaussiana, w (equação 13) [20]. A altura do pico representa a intensidade máxima de fótons que, de cada elemento, chega ao detetor com a energia do centróide.

$$w = 2\sigma \quad (13)$$

No entanto, uma vez que se pretende determinar a área, A , da gaussiana que representa cada elemento, é necessário relacionar a expressão 12 com esta variável (equação 14) [19].

$$F(x) = \frac{A}{\sigma\sqrt{2\pi}} \exp\left(-\frac{(x-\mu)^2}{2(\sigma)^2}\right) \leftrightarrow F(x) = \frac{A}{\frac{w}{2}\sqrt{2\pi}} \exp\left(-\frac{(x-\mu)^2}{2\left(\frac{w}{2}\right)^2}\right) \\ \leftrightarrow F(x) = \frac{A}{w\sqrt{\frac{\pi}{2}}} \exp\left(-2\frac{(x-\mu)^2}{w^2}\right) \quad (14)$$

Um ajuste desta função foi realizado para cada pico presente no espetro. Para tal, foi necessário escolher uma região de energia na qual toda a forma da curva gaussiana estivesse completamente contida, de modo a minimizar os erros nos resultados das áreas. A esta região dá-se o nome de região de interesse (ROI).

O próprio sistema SEA6000VX aplica um método básico de estatística para determinação do ROI. O sistema verifica o intervalo de energia na região do pico que contém 99.73% das observações. Para tal utiliza a expressão $\mu \pm 3\sigma$.

O programa utilizado neste trabalho para realizar o ajuste de gaussianas foi o *OriginPro 8*. No entanto, o ROI do sistema não foi utilizado, uma vez que se queria integrar um número suficiente de valores para que o ajuste fosse o melhor possível (Tabela 9).

	ROI _{sistema} (keV)		ROI _{utilizado} (keV)	
	min	max	min	max
P	1.90	2.13	1.80	2.20
S	2.19	2.42	2.13	2.45
Cl	2.50	2.74	2.40	2.75
K	3.19	3.44	3.05	3.50
Ca	3.56	3.82	3.45	3.90
Fe	6.25	6.55	6.10	6.70
Cu	7.86	8.23	7.80	8.30
Zn	8.44	8.82	8.20	9.10

Tabela 9: Exemplo com a comparação do ROI do sistema e do ROI utilizado.

De seguida sumaria-se o método implementado pelo *OriginPro 8* para a realização dos ajustes gaussianos. Este método analisa os dados do sistema de medida e determina os parâmetros da gaussiana que melhor se ajusta aos dados.

O modelo geral para ajuste de curvas não lineares é expresso do seguinte modo:

$$Y_i = F_i(X, \theta) + \varepsilon_i$$

com $X = (x_1, x_2, x_3, \dots, x_n)$ a representar as variáveis independentes, $\theta = (\theta_1, \theta_2, \theta_3, \dots, \theta_n)$ os parâmetros da curva, $\varepsilon_i = (\varepsilon_1, \varepsilon_2, \varepsilon_3, \dots, \varepsilon_n)$ os erros e Y_i as variáveis dependentes [58].

O objetivo de um ajuste não linear é estimar os valores dos parâmetros que melhor descrevem os resultados, i.e. que minimizam os desvios entre os valores previstos pela curva teórica e o conjunto de dados experimentais. Este método baseia-se na função Qui-Quadrado, χ^2 , que considera o número de contagens obtidas experimentalmente num dado intervalo, Y_i , o número de contagens esperado teoricamente, $F_i(X, \theta)$, e o desvio padrão das medidas nesse mesmo intervalo, σ_i , que é definido como a raiz quadrada do número de contagens experimentais ($\sigma_i = \sqrt{Y_i}$):

$$\chi^2 = \sum_{i=1}^N \left[\frac{Y_i - F_i(X, \theta)}{\sigma_i} \right]^2 \leftrightarrow \chi^2 = \sum_{i=1}^N \frac{(Y_i - F_i(X, \theta))^2}{Y_i} \quad (15)$$

Segundo este método, para estimar os valores dos parâmetros é necessário resolver as equações das derivadas parciais da função χ^2 em ordem a cada parâmetro, quando igual a zero [58].

Tipicamente é aplicada uma estratégia iterativa de modo a conseguir-se obter valores de parâmetros que apresentem o melhor resultado de χ^2 [58].

Para determinar os valores dos parâmetros neste processo iterativo o *Origin* utiliza o algoritmo de Levenberg-Marquardt, um algoritmo que aperfeiçoa o método de Gauss-Newton. O algoritmo de Levenberg-Marquardt começa por dar valores iniciais aos parâmetros e para cada iteração é analisado o valor de χ^2 . Os valores dos parâmetros são reajustados de modo a que o χ^2 seja reduzido para o valor mínimo [59]. Veja-se de seguida um exemplo de uma curva gaussiana obtida (Figura 42).

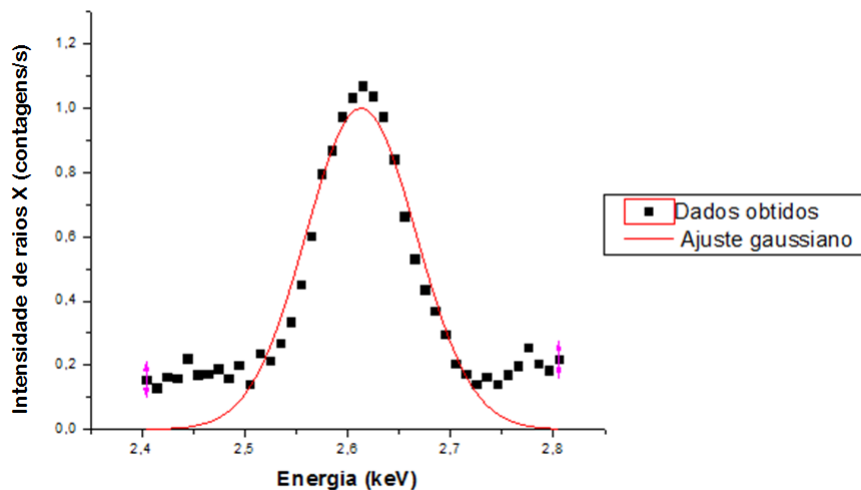
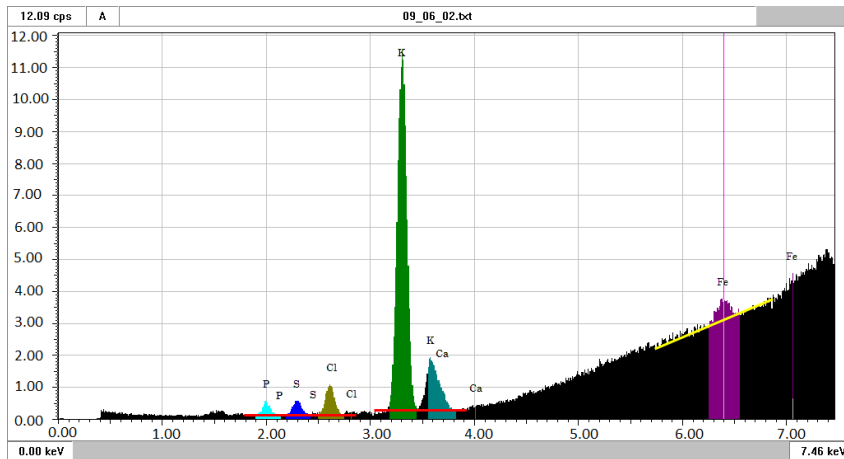


Figura 42: Ajuste gaussiano com linha de base zero.

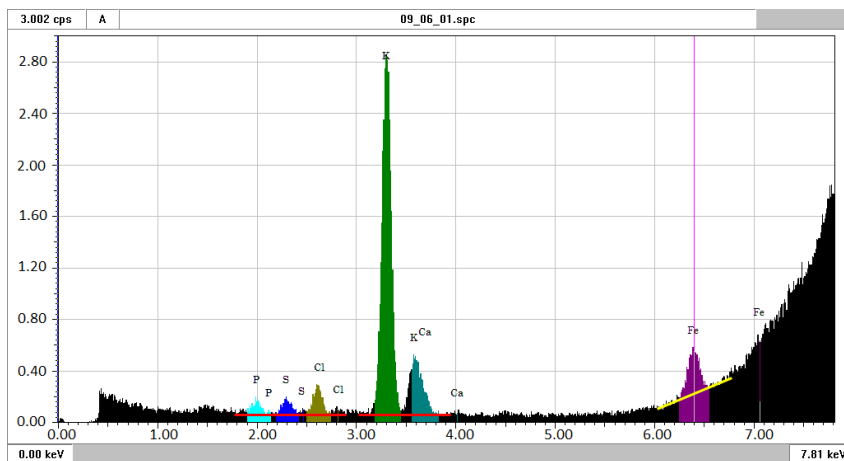
Fundo

Observando-se a figura 42 pode-se verificar que o ajuste não é bom, uma vez que se considerou uma linha de base nula. Assim, é necessário entrar em conta com o fundo associado ao pico de cada elemento e, como tal, considerar uma curva para descrevê-lo, de modo a que as contagens obtidas correspondam a valores líquidos reais e não a valores alterados pela omnipresença das contagens de fundo.

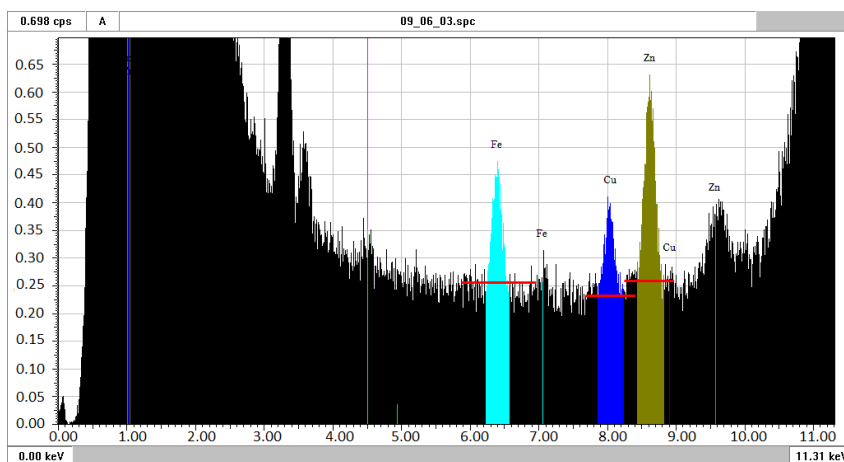
Os três espectros seguintes, figura 43, são exemplos dos espectros de energia obtidos pelo sistema quando analisado um tecido cerebral com os diferentes filtros do sistema. Observa-se que todos os picos dos diferentes elementos detetados estão sobrepostos sobre um fundo que pode ser bem descrito por uma função linear.



(a) Filtro para o Cl



(b) Filtro para o Cr



(c) Filtro para o Pb

Figura 43: Linhas de base que caracterizam o fundo dos espectros de energia na análise de tecido cerebral, utilizando diferentes filtros.

Assim, a alteração da expressão 14 terá se ser implementada de modo a ter em conta uma função que descreva o fundo presente debaixo dos picos de cada elemento.

Para os elementos P, S, Cl, K, Ca com os filtros para o cloro e para o crómio, assim como para os elementos Fe, Cu e Zn com o filtro para o chumbo, foi utilizada uma reta horizontal conjugada com a curva gaussiana, i.e. uma linha de base descrita por uma ordenada na origem, y_0 , logo a função usada no ajuste para estes elementos foi [19]:

$$F(x) = y_0 + \frac{A}{w\sqrt{\frac{\pi}{2}}} \exp\left(-2\frac{(x - \mu)^2}{w^2}\right) \quad (16)$$

Na figura 44 está representada esta função, demonstrando-se uma boa concordância entre os dados experimentais e a curva gaussiana com linha de base.

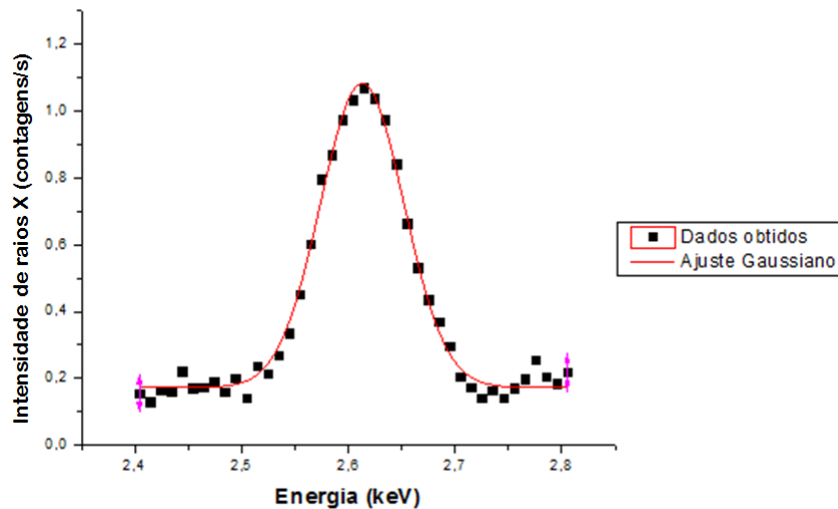


Figura 44: Exemplo do ajuste gaussiano para o elemento Cl.

Para o elemento de Fe, é necessário uma reta para caracterizar o fundo, considerando um determinado declive, m . Assim, a função utilizada no ajuste foi [19]:

$$F(x) = y_0 + mx + \frac{A}{w\sqrt{\frac{\pi}{2}}} \exp\left(-2\frac{(x - \mu)^2}{w^2}\right) \quad (17)$$

Na figura 45 representa-se o ajuste que se obtém com esta função, mostrando-se também uma boa concordância com os dados experimentais para o caso do ferro.

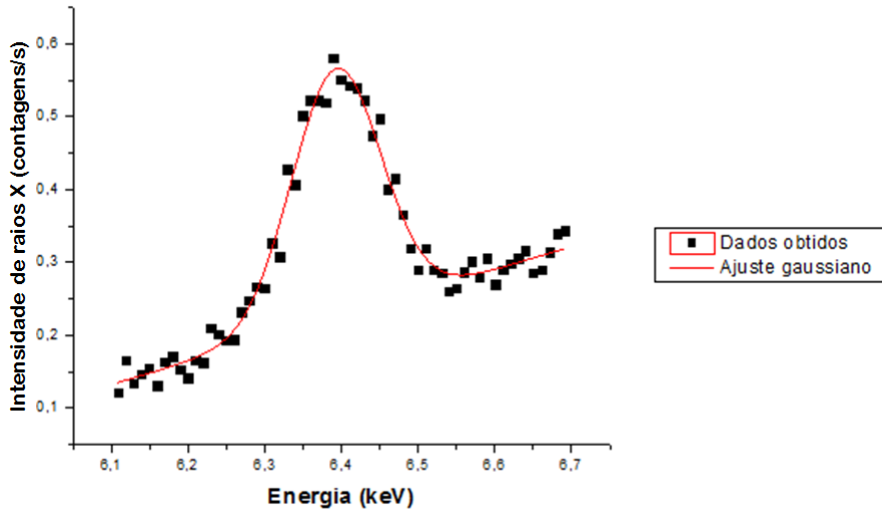


Figura 45: Exemplo do ajuste gaussiano para o elemento Fe.

Os ajustes foram realizados para se conseguir determinar o parâmetro da área, que nos indica as contagens líquidas, i.e. o número de fótons de fluorescência (linha K_{α}) que o sistema mede para cada elemento.

Resolução do sistema

A resolução em energia do sistema de detecção é uma característica muito importante do espectrômetro de raios X. Esta é limitada por diferentes fontes de flutuações estatísticas, que na prática contribuem para o alargamento dos picos de energia dos raios X. Uma delas está relacionada com flutuações estatísticas no processo de conversão da energia do fóton de raios X em portadores de carga no material do detetor. Esta contribuição é inevitável e não pode ser reduzida com qualquer refinamento do sistema, sendo caracterizada por uma variância, σ^2 , proporcional ao número de cargas geradas no detetor. Para uma distribuição gaussiana, o desvio padrão está relacionado com a largura a meia altura da distribuição através da expressão [22]:

$$\Delta E = FWHM = 2\sigma\sqrt{2\ln(2)} \approx 2.35\sigma \quad (18)$$

Assim, considerando o fator de conversão, ϵ , de energia para carga, i.e. a energia média para produzir um par elétron-lacuna no silício, e um novo fator que descreve as correções à estatística de Poisson utilizada para descrever as flutuações no número de portadores de carga, o fator de Fano, F , para a energia E , o limite estatístico para a resolução em energia, em unidades de energia, i.e. a contribuição intrínseca, é dada por [22]:

$$\Delta E_{int.} = FWHM_{int.} = 2.35\sqrt{F\epsilon E}$$

Para o silício, F e ϵ são ~ 0.11 e 3.62 eV, respectivamente a 300 K [22].

Outra fonte é o ruído eletrônico do sistema de detecção. Este é muitas vezes expresso pelo *equivalent noise charge* (ENC), definido como a carga que produz, no final da cadeia eletrônica, um impulso de amplitude igual ao valor rms (*root-mean-square*) do ruído. A contribuição do ruído eletrônico para a resolução em energia, em unidades de energia, é dada pela expressão:

$$\Delta E_{ruido} = FWHM_{ruido} = 2.35\epsilon(ENC)/e$$

onde e é a carga do elétron [22].

Desprezando outras contribuições com uma importância muito menor que as duas acima, podemos escrever, para uma dada energia E , a resolução em energia total do sistema de detecção [22]:

$$\Delta E_{total} = FWHM_{total} = 2.35\epsilon\sqrt{\frac{F}{\epsilon}E + \frac{ENC^2}{e^2}} \quad (19)$$

A resolução em energia do sistema versus a energia, no intervalo 1.7-8.7 keV, foi determinada a partir da utilização de discos com um grau de pureza elevado de diferentes elementos, mais propriamente de silício, enxofre, cloro, cálcio, titânio, crómio, manganês, níquel, cobre e zinco. Na figura 46 estão sobrepostos os espectros de energia para todos os elementos usados, observando-se os respetivos picos para as linhas K_α e, a partir da energia correspondente ao Ca (3.690 keV), as linhas K_β dos restantes elementos.

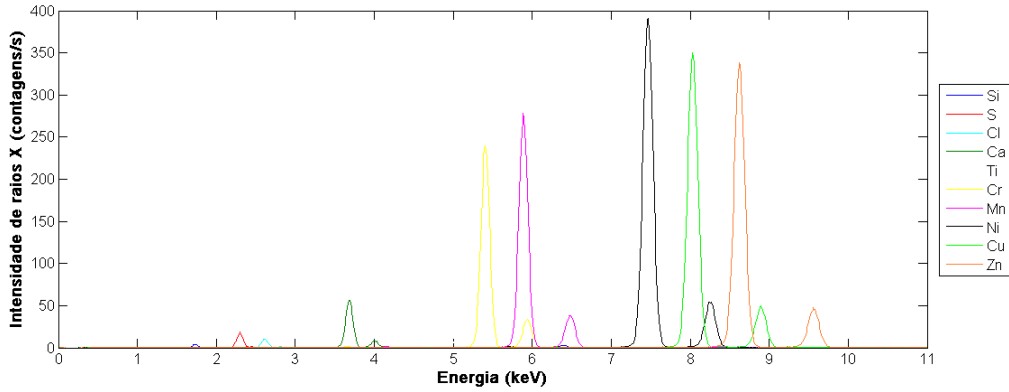
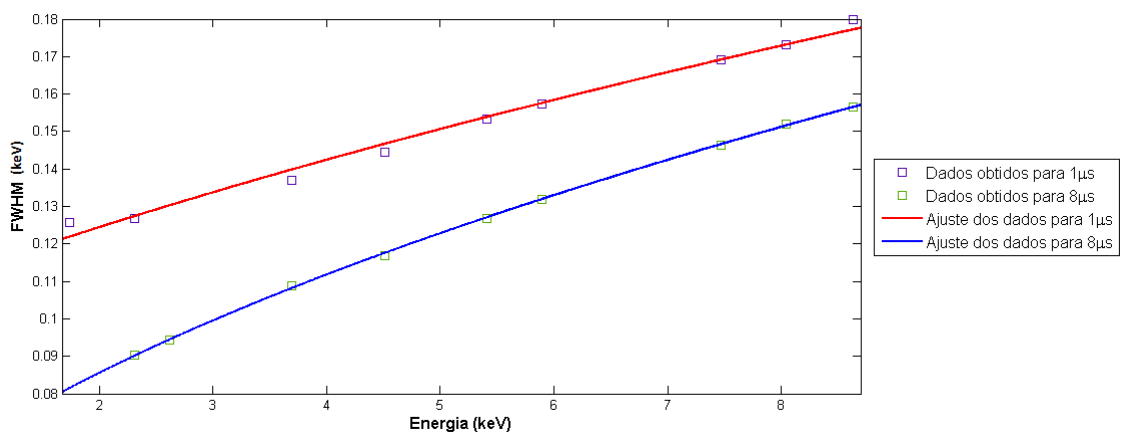
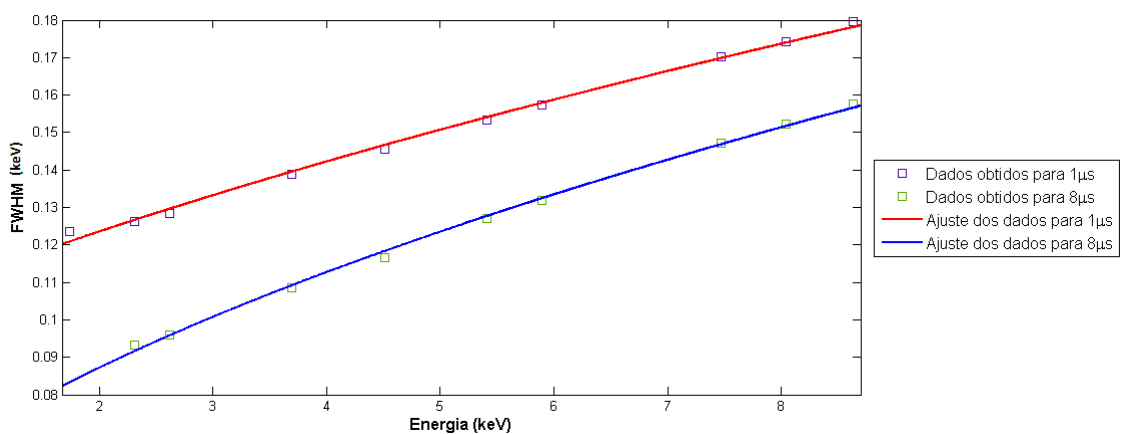


Figura 46: Espectros obtidos na análise dos diferentes discos de elementos puros.

A partir dos ajustes gaussianos aos picos das linhas K_α , obteve-se os respetivos valores dos desvios padrões, possibilitando o cálculo da resolução em energia $FWHM$ a partir da equação 18. De seguida foi realizado um ajuste, no *Matlab* do tipo $\sqrt{ax + b}$, de acordo com a equação 19, às $FWHM$ dos diferentes elementos para dois valores de *peaking times* (1 e $8\mu s$) e duas dimensões do feixe incidente na amostra ($1.2 \times 1.2 \text{ mm}^2$ e $3 \times 3 \text{ mm}^2$). Os gráficos estão representados na figura 47 em função da energia.



(a) Feixe de $1.2 \times 1.2 \text{ mm}^2$



(b) Feixe de $3 \times 3 \text{ mm}^2$

Figura 47: Resolução em energia do sistema para diferentes *peaking time* e dimensões do feixe de raios X.

Para uma energia de 5.895 keV, a resolução em energia obtida está na tabela 10.

Dimensão do feixe de raios X	$3 \times 3 \text{ mm}^2$		$1.2 \times 1.2 \text{ mm}^2$	
Peaking time (μs)	1	8	1	8
Resolução em energia (eV)	158.6	133.3	158.3	132.8

Tabela 10: Resolução em energia do sistema obtida para diferentes *peaking time* e dimensões do feixe de raios X

Sobreposição de picos

Outra situação a considerar foi a sobreposição dos picos do potássio e do cálcio. Como já foi tomado como exemplo anteriormente, a transição K_β do potássio tem uma energia de 3.590 keV e a transição K_α do cálcio tem uma energia de 3.691 keV, segundo a tabela 4. A resolução em energia do espectrômetro, mesmo para um *peaking time* de 8 μs , não é suficiente para separar os dois picos (Figura 48).

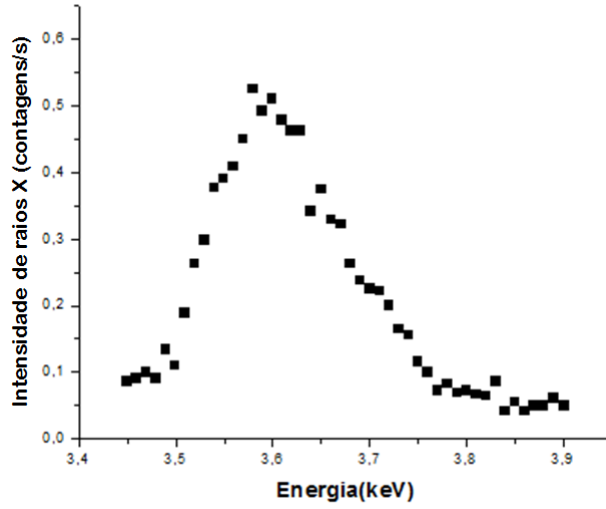


Figura 48: Sobreposição dos picos do potássio com o do cálcio.

A sobreposição dos picos, para estas duas energias muito próximas, limita a capacidade do espectrômetro, não sendo possível realizar a medição direta do Ca das amostras. No entanto, assumindo que as respostas do sistema para as duas energias são independentes, podemos realizar um ajuste que considera a sobreposição de duas curvas gaussianas, uma para cada energia dos raios X de fluorescência. Assim, supondo que a gaussiana do pico K_{β} do K é caracterizada pelo centróide μ_1 , uma área A_1 e uma largura w_1 , e a gaussiana do pico K_{α} do Ca por μ_2 , A_2 e w_2 , o ajuste é realizado com a seguinte função [19]:

$$F(x) = y_0 + \frac{A_1}{w_1 \sqrt{\frac{\pi}{2}}} \exp\left(-2 \frac{(x - \mu_1)^2}{w_1^2}\right) + \frac{A_2}{w_2 \sqrt{\frac{\pi}{2}}} \exp\left(-2 \frac{(x - \mu_2)^2}{w_2^2}\right) \quad (20)$$

No entanto, se todos os parâmetros da função forem livres, é natural que os parâmetros não tomem os valores que descrevem a situação física em particular. Assim, vamos fixar alguns dos parâmetros físicos, como a largura, w , das gaussianas e os centróides, e deixamos as áreas e a linha de base livres. Os valores de w são determinados a partir do ajuste realizado aos dados da figura 46, que se encontra na figura 47. Para os valores dos centróides usou-se as energias tabeladas para as duas riscas. Na figura 49 observa-se o ajuste realizado, verificando-se uma boa concordância entre dados experimentais e a curva gaussiana dupla.

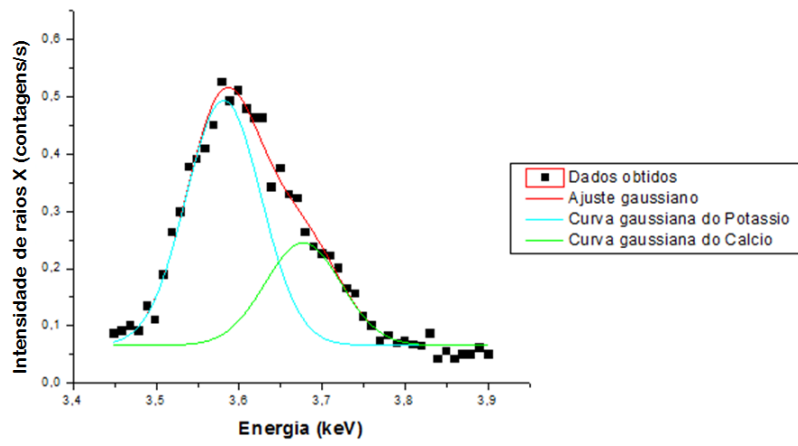


Figura 49: Ajuste com gaussiana dupla na sobreposição do K com o Ca.

3 Resultados e Discussão

3.1 Otimização das condições de análise

As condições de medição foram estudadas detalhadamente, no sentido de obter os melhores resultados para as medidas efetuadas nas amostras de tecido biológico que se pretendiam analisar.

Conhecer o sistema minuciosamente e todos os processos físicos a ele associado favoreceu o estudo das condições que se poderiam alterar para cumprir um dos grandes objetivos desta tese. A tensão e a corrente do tubo de raios X, o colimador, o filtro e o *peaking time* foram os parâmetros do espectrómetro avaliados, de modo a realizar a sua otimização. Relativamente às amostras de tecido cerebral foi também necessário otimizar a sua espessura, bem como a distância entre a amostra e o detetor.

Espessura das amostras de tecido cerebral

As primeiras amostras de tecido cerebral testadas tinham ≈ 1 mm de espessura. Testaram-se 5 amostras de tecido cerebral, extraídas por diferentes cortes coronais sequenciais.

Realizaram-se um conjunto de análises, alterando-se vários parâmetros do espectrómetro, como tensão e corrente no tubo de raios X, e filtros de raios X. No entanto, para alguns elementos de interesse, o número de contagens dos raios X de fluorescência era muito baixo, e outros elementos, como os metais de transição, não eram detetados. Assim, foram disponibilizadas amostras de ≈ 3 mm de espessura.

A comparação prática para as duas espessuras das amostras está representada na figura 50, em que para as mesmas condições de tensão, corrente, filtro, *peaking time* e tempo de medição foram medidos os espectros de energia para cada caso.

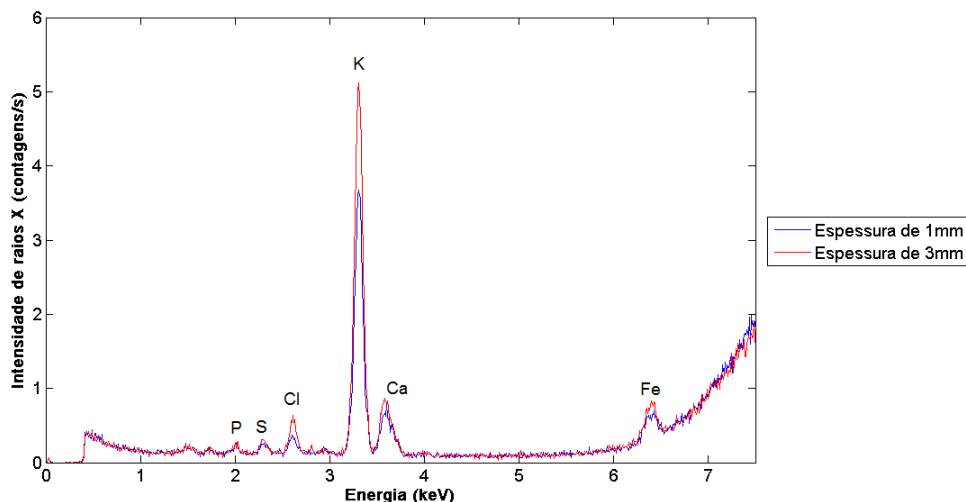


Figura 50: Espectros de energia das análises de amostras de tecido cerebral de diferentes espessuras.

Na tabela 11 encontram-se os valores dos resultados obtidos do ajuste de cada pico, I_{XRF} , com o respetivo desvio padrão percentual, $\sigma_{I_{XRF}}$, para a intensidade de fluorescência

de raios X de cada elemento, i.e. para a taxa de contagem líquida. Mostra-se também a razão sinal-*background* (SBR).

	1 mm			3 mm		
	I_{XRF}	$\sigma_{I_{XRF}}(\%)$	SBR	I_{XRF}	$\sigma_{I_{XRF}}(\%)$	SBR
P	0.774	11.83	0.252	1.129	15.32	0.380
S	1.282	11.78	0.432	1.605	7.477	0.530
Cl	2.178	6.657	0.669	4.118	3.788	1.170
K	39.43	1.301	9.087	55.66	0.825	12.87
Ca	2.810	11.64	1.001	2.784	8.549	0.888
Fe	4.780	7.385	0.387	6.175	5.587	0.478

Tabela 11: Resultados obtidos pelo ajuste de gaussianas para as duas amostras de diferentes espessuras.

Os resultados práticos mostraram um aumento da SBR para uma espessura de 3 mm, confirmando a necessidade de aumentar a espessura das amostras de tecido cerebral.

Esta questão foi ainda estudada teoricamente, determinando a variação da atenuação dos raios X em função da espessura da amostra.

A partir da tabela de composições dada pelo NIST para matéria cinzenta/branca do cérebro, foi possível ver quais os elementos químicos e as respetivas frações em massa:

H: 0.1070, C: 0.1450, N: 0.0220, O: 0.7120, Na: 0.0020, P: 0.0040, S: 0.0020, Cl: 0.0030 e K: 0.0030.

Na figura 51 representa-se os coeficientes de atenuação mássicos versus a energia para o tecido cerebral.

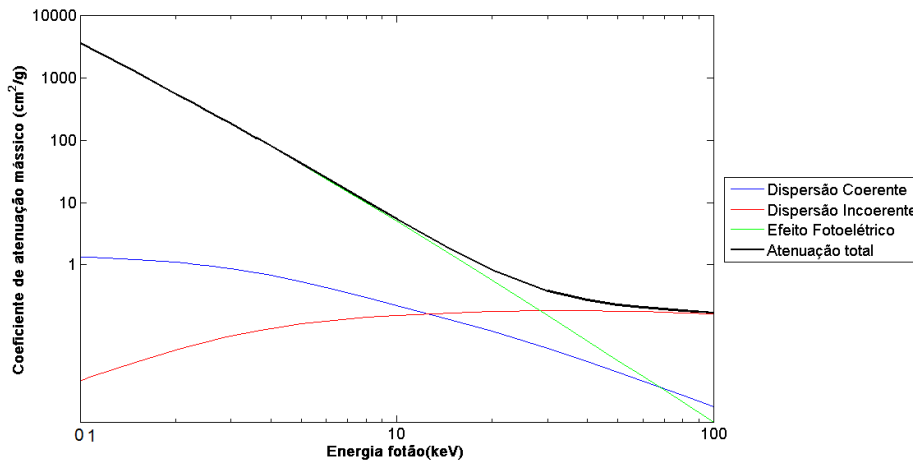


Figura 51: Coeficientes de atenuação mássicos para a matéria cinzenta e matéria branca do cérebro (*calculados a partir de [33]*).

As energias escolhidas para determinar a atenuação total para um feixe de raios X incidente numa amostra de tecido cerebral foram 6 keV, 10 keV e 15 keV e os respetivos coeficientes de atenuação mássicos estão representados na tabela 12.

Energia (keV)	$\frac{\mu}{\rho}$ (cm^2/g)
6	24.68
10	5.411
15	1.71

Tabela 12: Coeficientes de atenuação mássicos em tecido cerebral para diferentes energias.

Os valores da atenuação total para um feixe de raios X incidente numa amostra de tecido cerebral estão representados na figura 52.

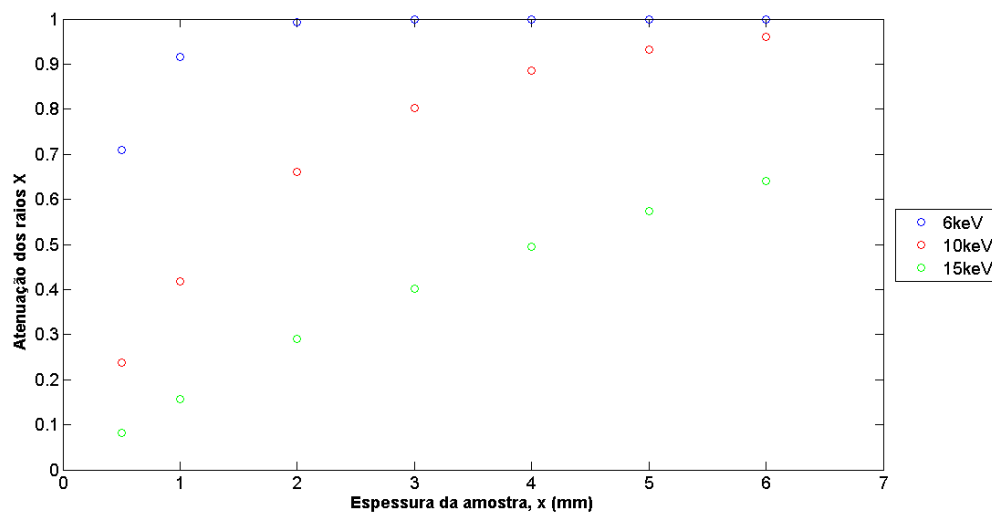


Figura 52: Atenuação do feixe de raios X em função da espessura da amostra.

Conclui-se, assim, que, como provado experimentalmente, se teria de aumentar a espessura das amostras de tecido cerebral, de modo a que os raios X incidentes sofressem uma maior atenuação, melhorando os resultados.

Após esta conclusão, todas as análises das amostras de tecido cerebral foram realizadas com uma espessura de 3 mm. Relativamente às amostras de olhos, a espessura do globo ocular era suficiente para obter bons resultados.

Utilização de Hélio

No primeiro espetro que se mediu com uma amostra de tecido cerebral verificou-se a existência de um pico de árgon, que advém da composição do ar atmosférico que rodeia as amostras. A redução da distância entre as amostras e o detetor resultou na redução da intensidade do pico de Ar. No entanto, decidiu-se utilizar um fluxo de hélio, de modo a eliminar este pico dos espetros, e evitando também as interferências no resultado final.

Os espetros da figura 53 foram obtidos para as mesmas condições de intensidade e tensão do tubo de raios X, de dimensões do colimador, de filtros, de tempo de medição e de *peaking time*. O fluxo de He ejetado sobre a camada de ar, localizada entre o tubo de raios X e as amostras, passa por um controlador de fluxo manual, mantendo-se uma pressão de ~ 1.2 bar à saída do monoredutor da garrafa de He.

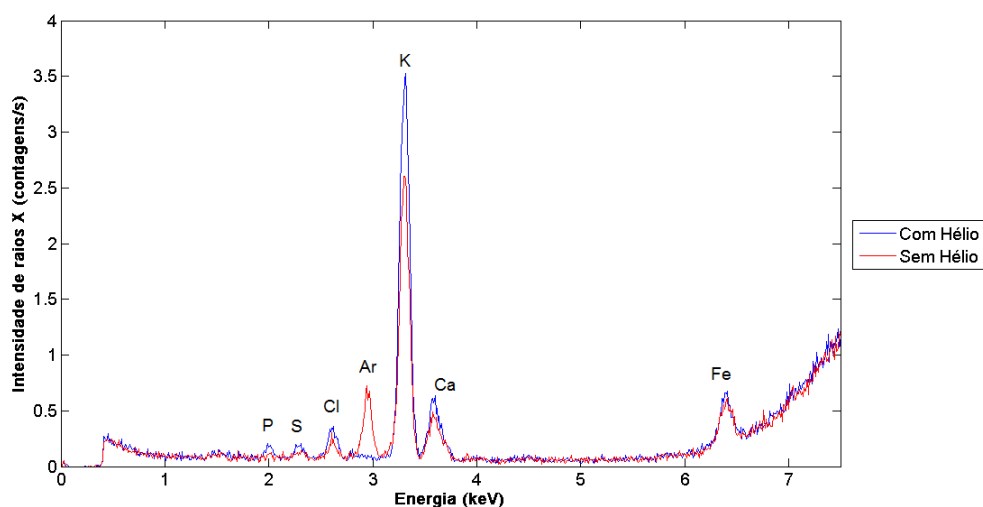


Figura 53: Espectros de energia de uma amostra de tecido cerebral com e sem utilização de hélio.

As intensidades de fluorescência de raios X, I_{XRF} , de cada elemento encontram-se na tabela 13, bem como a SBR.

	Sem Hélio			Com Hélio		
	I_{XRF}	$\sigma_{I_{XRF}}$ (%)	SBR	I_{XRF}	$\sigma_{I_{XRF}}$ (%)	SBR
P	-	-	-	0.951	8.811	0.507
S	-	-	-	1.112	8.110	0.593
Cl	1.310	10.76	0.639	2.819	5.605	1.450
Ar	5.654	3.926	2.223	-	-	-
K	27.96	1.524	7.863	39.65	1.092	21.74
Ca	1.567	11.29	0.932	1.826	10.95	0.997
Fe	5.296	4.890	0.695	5.460	4.542	0.655

Tabela 13: Resultados obtidos com e sem fluxo de hélio.

Pode-se concluir que o fluxo de hélio melhorou bastante os resultados, fazendo com que fosse possível observar a presença dos elementos P e S, e também que a intensidade de fluorescência de raios X correspondente às linhas características dos elementos e, por conseguinte, as relações sinal-*background* aumentassem para a gama de energia em redor da linhas K do Ar, i.e. no intervalo de $\sim 2.6-4.0$ keV.

Seleção de Tensões

Utilizando as mesmas condições de corrente, filtro, *peaking time* e distância da amostra ao detetor estudou-se o efeito da tensão aplicada no tubo de raios X. Maior tensão aplicada ao tubo implica maior energia dos elétrons incidentes no alvo do tubo, que por sua vez se traduz no aumento da intensidade de raios X de travagem, *bremstrahlung*, para toda a gama de energia. No entanto, ao incidirem na amostra, maior será o número de fótons que vão sofrer dispersão coerente e dispersão incoerente, produzindo um *background* mais elevado.

Realizaram-se medições da amostra de tecido cerebral de *substantia nigra* para comparar os valores de tensão de 15 kV com o de 30 kV no tubo de raios X (Figura 54).

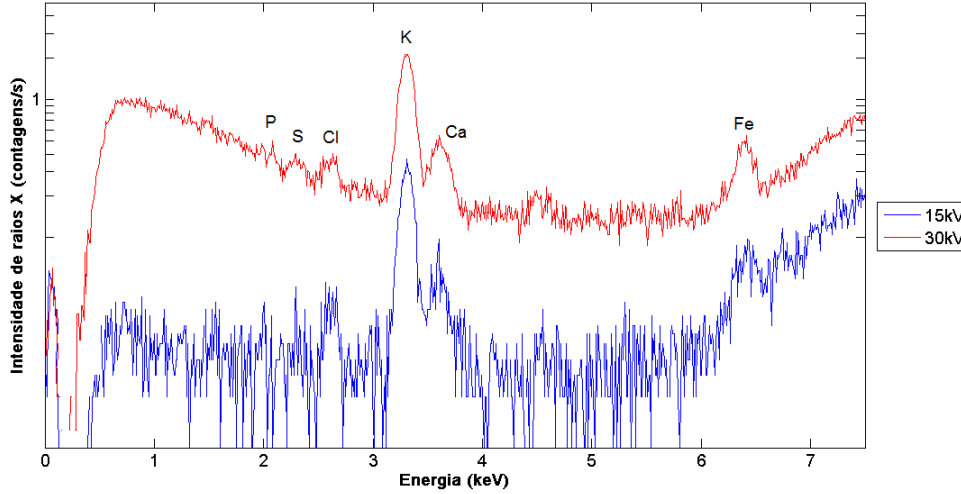


Figura 54: Espectros de energia de uma amostra de tecido cerebral com aplicação de uma tensão de 15 kV e de 30 kV no tubo de raios X.

Pode-se observar que o espectro para 30 kV, para baixas energias (<3 keV), apresenta muito *background*. No entanto, as contagens líquidas, assim como a razão sinal-*background*, foram determinadas para cada pico dos dois espectros (Tabela 14).

	V = 30 kV			V = 15 kV		
	I_{XRF}	<i>Background</i>	SBR	I_{XRF}	<i>Background</i>	SBR
P	-	-	-	0.106	0.240	0.442
S	-	-	-	0.115	0.230	0.500
Cl	2.714	5.000	0.543	0.331	0.250	1.324
K	27.020	5.200	5.196	4.208	0.390	10.790
Ca	4.812	4.320	1.114	0.538	0.405	1.328
Fe	3.684	7.274	0.506	0.472	1.384	0.341

Tabela 14: Resultados obtidos pelo ajuste de gaussianas para as duas tensões do tubo de raios X.

Verifica-se um maior número de contagens líquidas de elementos como o Cl, o K e o Ca quando é aplicada uma tensão de 30 kV, comparando com 15 kV, mas esta também apresenta um maior número de contagens de *background*, produzindo uma menor razão sinal-*background*.

Tratando-se de uma análise estatística, pretende-se que a razão sinal-*background* seja a mais elevada possível, demonstrando que, a obtenção de melhores resultados para elementos em que a energia das linhas K é baixa, a melhor condição de operação é utilizar uma tensão de 15 kV.

Observando o caso do Fe verifica-se que SBR é maior para 30kV quando comparada com 15kV, o que nos permite concluir que a partir da energia do Fe obter-se-iam melhores resultados utilizando esta tensão.

O caso do ferro foi estudado mais detalhadamente, sendo este elemento também analisado para condições similares às usadas com os elementos Cu e Zn, com uma tensão de 30 kV e um filtro para o Pb. No entanto, conclui-se que a SBR seria muito inferior às obtidas quando utilizada uma tensão de 15 kV com o filtro para Cr. Assim, a tensão de 30 kV apenas foi aplicada quando se queria analisar os elementos de Cu e Zn.

Pela mesma razão, não foi escolhida nenhuma tensão superior (40 kV ou 50 kV) porque embora as intensidade de raios X fossem superiores, as de *background* também eram muito mais elevadas, verificando uma melhoria da SBR aquando aplicada a tensão de 15 kV e de 30 kV.

Seleção de Correntes

O estudo sobre a corrente do tubo de raios X foi executado tendo em conta o tempo morto e a estatística dos resultados. Aumentando a corrente do tubo há um aumento da taxa de eletrões que vão chocar com o ânodo do tubo, o que aumenta proporcionalmente a intensidade de raios X emitidos pelo tubo e, por conseguinte, a taxa de raios X que irá incidir na amostra. Ao aumentar a taxa de fotões incidentes na amostra, maior será a taxa de fotões que o sistema de deteção terá de analisar. Consequentemente é importantíssimo conciliar estes dois aspetos, de modo a que o número de fotões que excita a amostra seja suficiente para evitar um tempo de aquisição muito longo, para se obter boa estatística nos picos, e, por outro lado, evitar a degradação da resposta do espectrómetro devido à excessiva taxa de contagem, que se traduz na deformação dos picos por empilhamento dos impulsos, no aumento da fração de tempo morto e na dificuldade da sua correção. Assim, optou-se por garantir que a fração de tempo morto fosse sempre inferior a 10%.

Quanto menor for a intensidade no tubo, menor será o número de fotões a chegar à amostra e, portanto, para obter uma boa estatística no espectro final, é necessário que o tempo de aquisição de dados ou tempo de medida seja maior.

Vejamos o seguinte exemplo do estudo da *substantia nigra* (Figura 55), em que foi alterada a intensidade da corrente e foi determinada a fração de tempo morto do sistema, t_{morto} .

O mesmo procedimento foi realizado tanto para a amostra do estriado como para os olhos e as intensidades de corrente escolhidas estão na tabela 20.

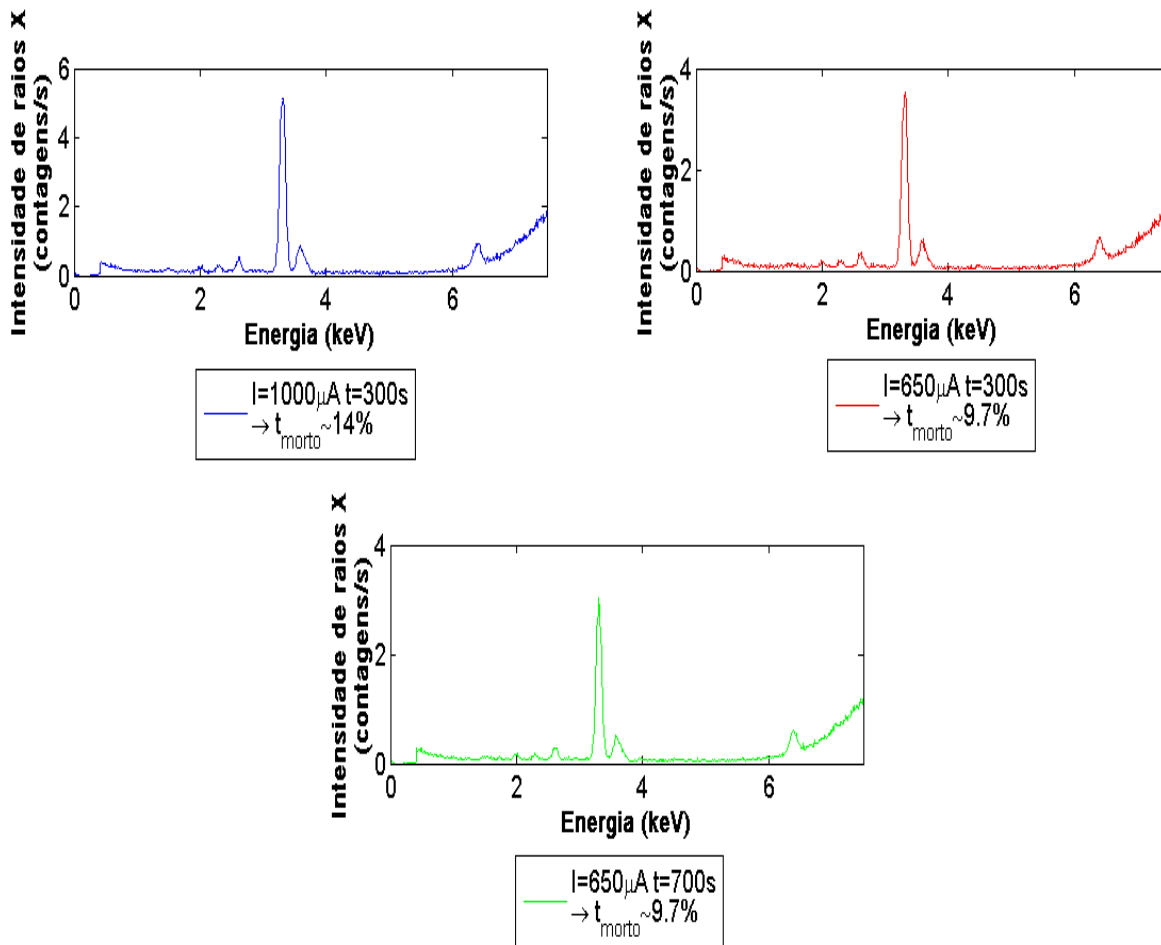


Figura 55: Espetros de energia para uma amostra de tecido cerebral com diferentes intensidades de corrente no tubo de raios X.

Seleção de Filtros

A resposta do sistema com diferentes filtros pode ser visualizada na figura 21. A ideia geral era selecionar os filtros que se deveriam utilizar para os diferentes elementos químicos em estudo, tendo em atenção a região de energia com menor *background*. Os elementos P, S, Cl, K, Ca e Fe foram estudados com o filtro para o Cr e com o filtro para o Cl (com exceção do Fe), uma vez que as energias das linhas K características destes elementos se encontram na região de energia limpa para estes dois filtros. O Fe, o Cu e o Zn foram estudados com o filtro para o Pb.

A análise dos diferentes elementos químicos da amostra de tecido cerebral da região da *substantia nigra* foi realizada para todas as opções de filtros após a otimização da tensão e da intensidade de corrente no tubo de raios X, podendo-se observar os respetivos espectros resultantes na figura 56.

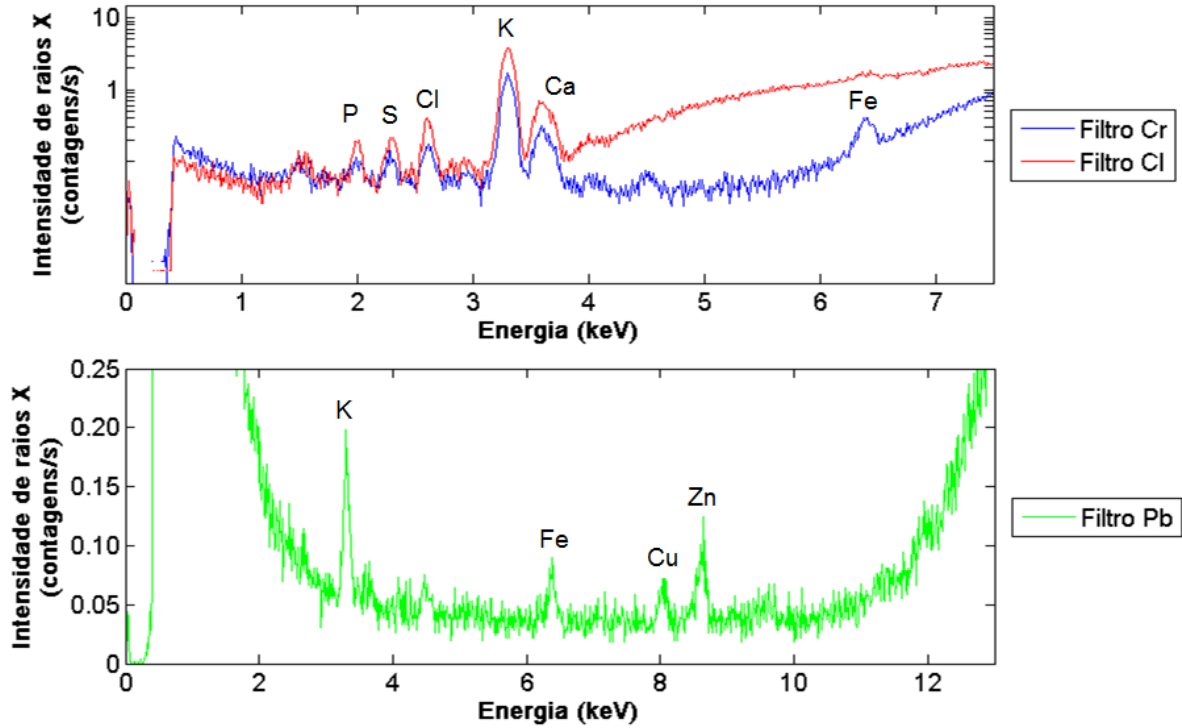


Figura 56: Espectros de energia de uma amostra de *substantia nigra* utilizando diferentes filtros.

A determinação das contagens líquidas dos picos foi bastante importante para a seleção dos filtros que se utilizariam na análise dos diferentes elementos químicos. Os resultados comparativos encontram-se na tabela 15.

SN									
	Filtro Cl			Filtro Cr			Filtro Pb		
	I_{XRF}	$\sigma_{I_{XRF}}(\%)$	SBR	I_{XRF}	$\sigma_{I_{XRF}}(\%)$	SBR	I_{XRF}	$\sigma_{I_{XRF}}(\%)$	SBR
P	1.159	5.831	0.914	0.577	16.43	0.460	-	-	-
S	1.488	6.788	1.070	0.588	12.63	0.456	-	-	-
Cl	2.847	5.304	1.695	1.101	6.456	0.816	-	-	-
K	41.98	1.000	13.40	16.99	1.983	9.704	-	-	-
Ca	3.163	8.188	1.043	1.182	12.77	0.812	-	-	-
Fe	4.589	12.77	0.092	2.869	5.716	0.474	0.514	10.64	0.404
Cu	-	-	-	-	-	-	0.502	15.96	0.437
Zn	-	-	-	-	-	-	0.883	8.519	0.673

Tabela 15: Resultados obtidos com uma amostra de *substantia nigra* pelo ajuste de gaussianas para os diferentes filtros.

Conclui-se que, para os elementos de P, S, Cl, K e Ca, o filtro para o Cl seria o mais indicado, uma vez que apresenta uma maior razão sinal-*background*. No mesmo sentido, para o Fe escolheu-se o filtro para o Cr e para o Cu e o Zn o filtro para o Pb.

O mesmo estudo foi realizado tanto para a amostra de tecido cerebral da região do estriado como para os olhos. As figuras 57 e 58, bem como as tabelas 16 e 17 correspon-

dentos às duas amostras representam os resultados obtidos para verificar quais os filtros que apresentam uma melhor razão sinal-*background*.

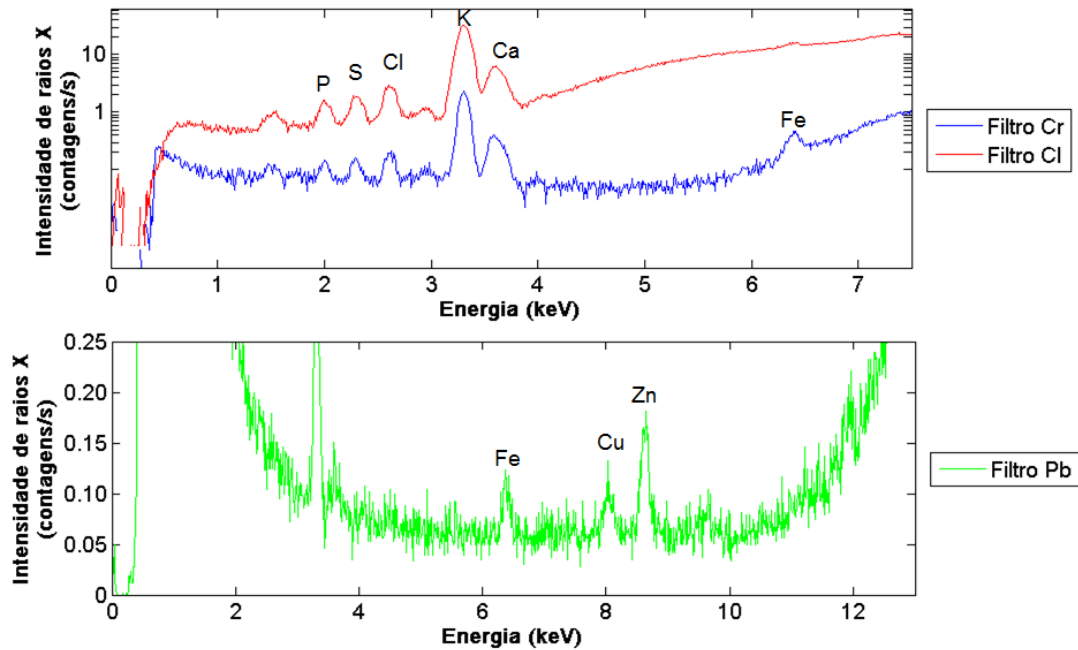


Figura 57: Espetros de energia de uma amostra de estriado utilizando diferentes filtros.

ST									
	Filtro Cl			Filtro Cr			Filtro Pb		
	I_{XRF}	$\sigma_{I_{XRF}}(\%)$	SBR	I_{XRF}	$\sigma_{I_{XRF}}(\%)$	SBR	I_{XRF}	$\sigma_{I_{XRF}}(\%)$	SBR
P	11.30	5.444	0.793	0.584	11.56	0.341	-	-	-
S	15.84	4.911	1.029	0.823	7.566	0.512	-	-	-
Cl	28.41	3.668	1.538	1.434	8.368	0.896	-	-	-
K	446.7	1.132	10.76	22.84	0.976	8.669	-	-	-
Ca	29.78	5.537	0.733	1.999	5.753	1.347	-	-	-
Fe	25.75	8.854	0.052	3.034	5.669	0.406	0.712	20.08	0.349
Cu	-	-	-	-	-	-	0.753	11.66	0.350
Zn	-	-	-	-	-	-	1.710	5.277	0.801

Tabela 16: Resultados obtidos com uma amostra de estriado pelo ajuste de gaussianas para os diferentes filtros.

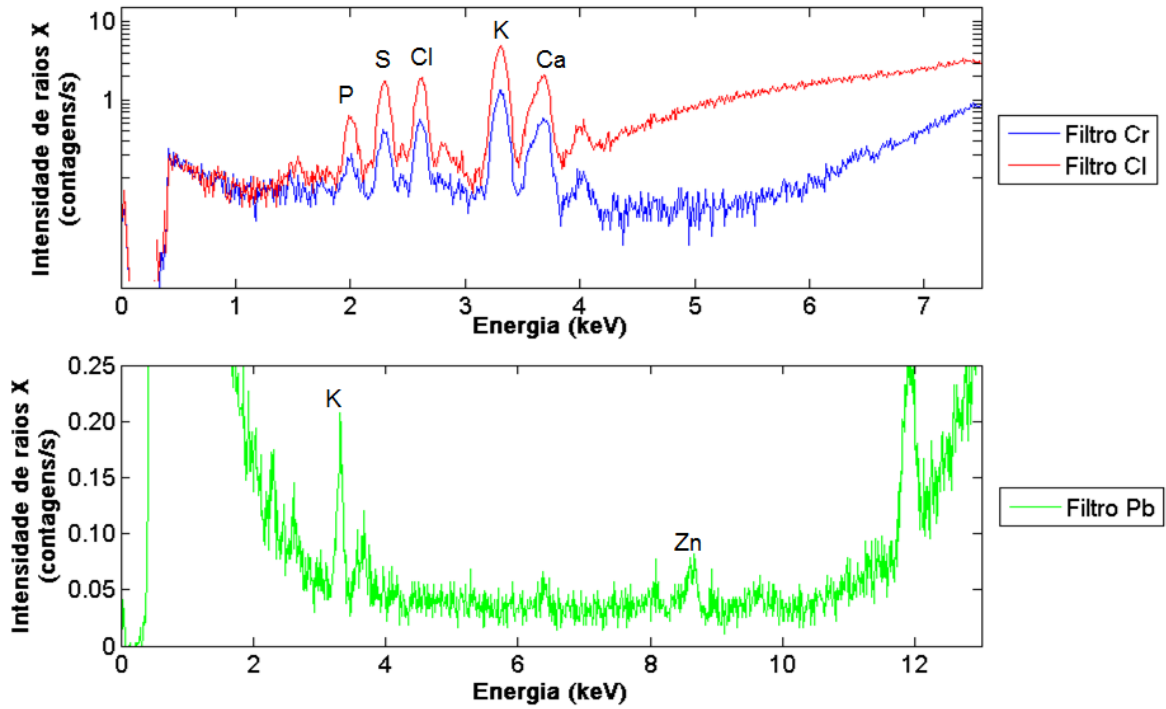


Figura 58: Espectros de energia de um olho utilizando diferentes filtros.

Olho									
	Filtro Cl			Filtro Cr			Filtro Pb		
	I_{XRF}	$\sigma_{I_{XRF}}$ (%)	SBR	I_{XRF}	$\sigma_{I_{XRF}}$ (%)	SBR	I_{XRF}	$\sigma_{I_{XRF}}$ (%)	SBR
P	5.261	5.436	2.006	1.075	7.907	0.647	-	-	-
S	15.58	2.452	3.968	3.250	4.738	1.998	-	-	-
Cl	15.99	2.565	3.114	4.320	3.565	1.979	-	-	-
K	55.46	0.907	14.54	14.22	1.758	7.409	-	-	-
Ca	21.60	1.958	5.470	6.018	3.107	4.875	-	-	-
Zn	-	-	-	-	-	-	0.671	12.54	0.556

Tabela 17: Resultados obtidos pelo ajuste de gaussianas para os diferentes filtros nos olhos.

Observando os resultados verifica-se que, para amostra de tecido cerebral da região do estriado, os elementos de P, S, Cl e K devem ser medidos com o filtro para o Cl, os elementos de Ca e Fe com o filtro para o Cr e os elementos de Cu e Zn com o filtro para o Pb.

Para o caso do olho, todos os elementos, à exceção do Zn que pode ser medido utilizando o filtro para o Pb, devem ser analisados tendo como condição o filtro para o Cl. No entanto, as medidas com o filtro para o Cr foram também realizadas para todas as amostras de globo ocular, para se verificar a presença de Fe.

Dimensões dos Colimadores

A dimensão do feixe de raios X sobre as amostras foi selecionada a partir da área aberta do colimador de raios X. Esta teve em consideração as áreas das diferentes estruturas de tecido a irradiar. Para o estudo dos olhos, embora estes apresentem um diâmetro de ~ 5 mm, escolheu-se o colimador cujo feixe de raios X incide na amostra com 1.2×1.2 mm². Em relação às amostras de tecido cerebral, para a *substantia nigra* foi utilizado o colimador com 1.2×1.2 mm² e para o estriado com 3×3 mm². Como as dimensões do colimador projetadas sobre as amostras dependem da distância a que se encontra a amostra da saída do colimador, estudou-se se, para a posição padrão das amostras sobre a plataforma XYZ, a dimensão do feixe medida coincidia com o valor indicado pelo *software* do sistema.

Para realizar este estudo utilizou-se um *frame* de PCB com pistas de Cu de ~ 200 μ m de largura e um passo de ~ 1 mm (Figura 59). As dimensões dos feixes de 0.5×0.5 mm² e de 1.2×1.2 mm² foram testadas.

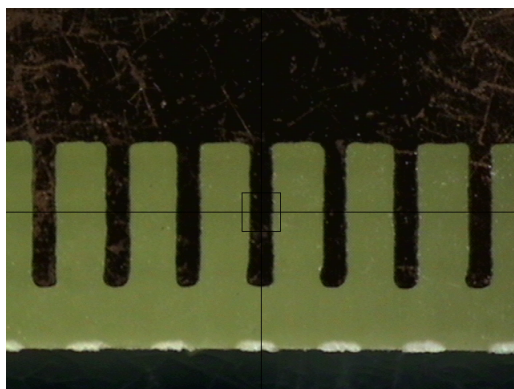
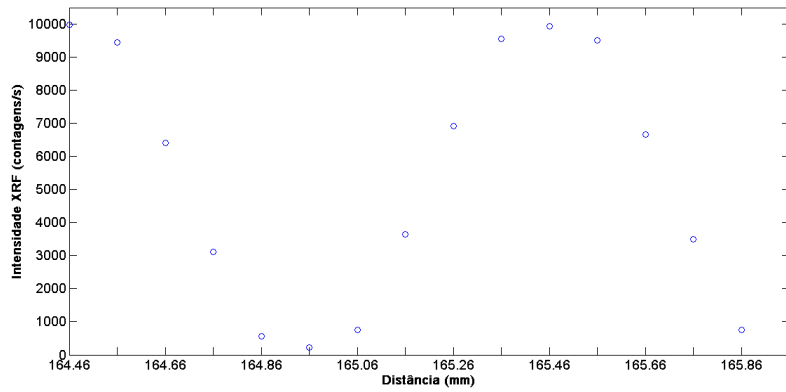


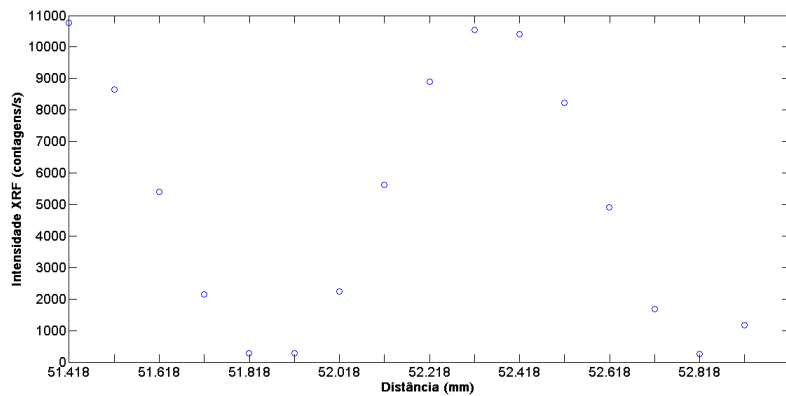
Figura 59: *Frame* de PCB.

Após o alinhamento do *frame* de PCB a 0° com o eixo dos x, iniciou-se a aquisição de dados com o feixe de raios X centrado com uma das pistas de Cu e, mantendo sempre o mesmo valor para a coordenada z foram realizadas medições de 100 s para os espectros de raios X de modo a medir o pico K_α da fluorescência do Cu, variando a coordenada x com um passo de 100 μ m. Para cada medição realizou-se o ajuste gaussiano ao pico K_α do Cu obtendo-se a taxa de contagem líquida.

O mesmo processo foi realizado para a coordenada y, com o mesmo *frame*, mas com as pistas de Cu orientadas a 90° relativamente à situação anterior. Os resultados encontram-se representados na figura 60 que ilustra as intensidades de fluorescência de raios X de Cu em função das respectivas coordenadas.



(a) Coordenada x

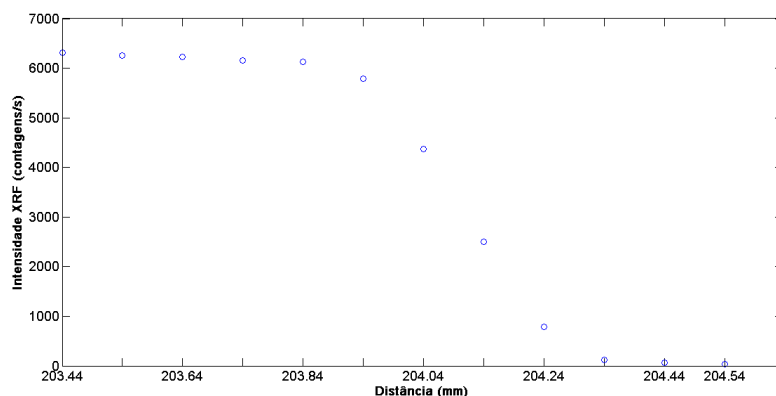


(b) Coordenada y

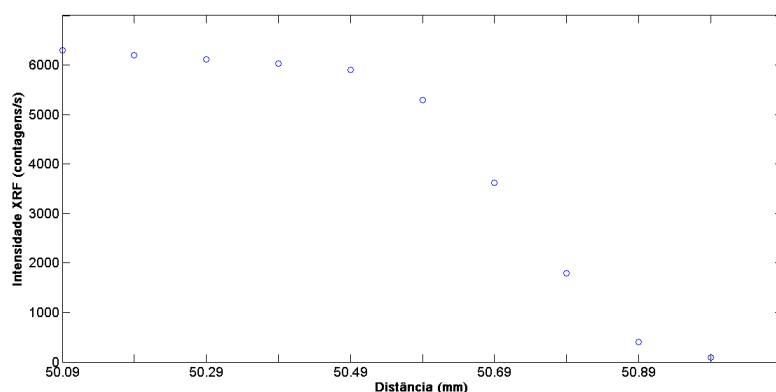
Figura 60: Determinação das dimensões do feixe de raios X para um colimador de $0.5 \times 0.5 \text{ mm}^2$ de área.

Para se obter as dimensões aproximadas do feixe, utilizou-se um método simples e expedito, em que se subtraem os valores das coordenadas, x ou y, correspondentes às intensidades de raios X que tomam um valor igual a 50% da intensidade máxima, aos valores das coordenadas para as intensidades máximas. Os resultados obtidos encontram-se na tabela 18.

Para o feixe de $1.2 \times 1.2 \text{ mm}^2$ o procedimento foi bastante semelhante, apenas alterando a corrente do tubo para $500 \mu\text{A}$ e a posição do primeiro ponto. Neste caso, como a dimensão do feixe é superior à distância de separação entre as pistas de Cu, utilizou-se a pista que se encontra no extremo do *frame*, de modo a que não houvesse interferência das outras pistas. Os dados obtidos pelo ajuste gaussiano encontram-se ilustrados na figura 61 e os resultados na tabela 18.



(a) Coordenada x



(b) Coordenada y

Figura 61: Determinação das dimensões do feixe de raios X para um colimador de 1.2×1.2 mm² de área

Colimador	z (mm)	x (mm)	y (mm)
0.5×0.5 mm ²	22.226	$(164.71-164.46) \times 2 = 0.5$	$(52.618-(52.318+0.05)) \times 2 = 0.5$
1.2×1.2 mm ²	22.588	$(204.1-203.444) \times 2 = 1.32$	$(50.72-50.090) \times 2 = 1.26$

Tabela 18: Resultados obtidos para as dimensões dos feixes de raios X.

As discrepâncias entre os valores medidos e os valores indicados no sistema, podem ser explicadas com base em erros de medição. Concluiu-se que os colimadores têm as dimensões indicadas pelo fabricante.

Seleção de *Peaking-time*

O *peaking time* é uma medida da duração dos impulsos à saída do amplificador da eletrônica de leitura, i.e. é uma constante de tempo que depende da eletrônica do sistema e que, por outro lado, pode ser usada para alterar o ruído eletrônico. O sistema SEA6000VX apresenta duas opções para o *peaking time*: $1 \mu s$ e $8 \mu s$. Com um *peaking time* de $8 \mu s$ a ENC é menor e, conseqüentemente a resolução em energia é melhor, quando comparado com $1 \mu s$ (Figura 47). No entanto para taxas de contagem elevadas ocorrerá um maior empilhamento dos impulsos. Para solucionar isto, diminui-se a intensidade de corrente no

tubo de raios X e aumenta-se o tempo de aquisição. Portanto, para um *peaking time* mais elevado, a resolução em energia é melhor e, por sua vez, a probabilidade de sobreposição dos picos com energias muito próximas será menor.

Neste estudo de elementos de baixo Z, onde há maior probabilidade de ocorrer sobreposição é entre os 3.5 keV e os 3.7 keV, visto que é neste intervalo que se situam as transições K_{β} do K e K_{α} do Ca.

A comparação da sobreposição de picos para os dois *peaking time* do sistema encontram-se ilustrados na figura 62.

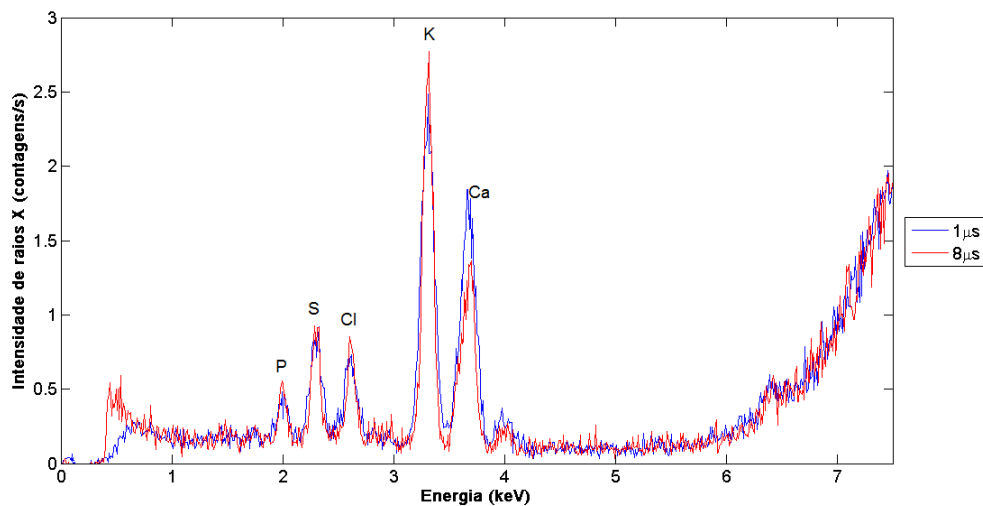


Figura 62: Espectros de energia de uma amostra de tecido cerebral para diferentes *peaking time*.

Na figura pode-se observar que, para um *peaking time* de $8\mu s$, a resolução em energia é melhor, notando-se bem no gráfico na gama de energias da sobreposição das linhas K_{β} do K e K_{α} do Ca.

Tendo isto em conta, os *peaking times* escolhidos para cada medição estão representados na tabela 20. Optou-se por utilizar na maior parte das vezes um *peaking time* de $8\mu s$ no sistema. Apenas na amostra de estriado se decidiu utilizar, em alguns casos, $1\mu s$ de *peaking time*, tendo em conta que apenas na sobreposição dos picos de K e Ca seria necessário a utilização de $8\mu s$, uma vez que as linhas das transições K dos restantes elementos estão separadas entre si com diferenças de energia acima das respectivas FWHM. O mesmo raciocínio foi feito para o filtro para o Pb na análise da amostra de *substantia nigra*.

Suportes das amostras

As amostras foram colocadas sobre a plataforma XYZ do sistema. Como tal, primeiramente analisou-se esta plataforma (Figura 63) e verificou-se a presença de elementos como Al, Cr, Fe, Ni, Cu, Zn e Ga, dado que as energias das transições K_{α} são 1.487 keV, 5.412 keV, 6.400 keV, 7.472 keV, 8.042 keV, 8.631 keV e 9.243 keV respetivamente. Assim, tornou-se necessário a utilização de um suporte para amostras, i.e. de uma base, de modo a que os raios X primários do tubo não atingissem a plataforma e que os raios X de fluorescência dos elementos desta não interferissem com os nossos resultados.

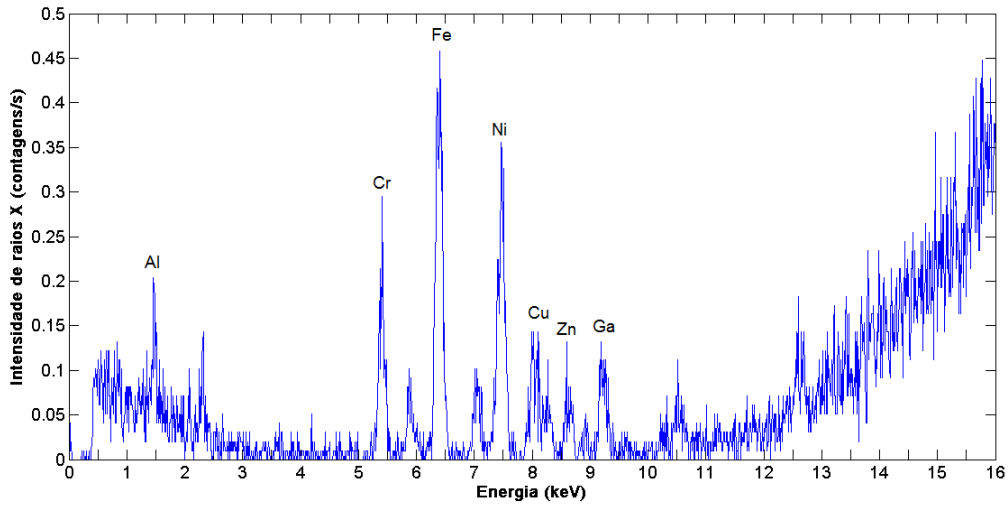


Figura 63: Espectro obtido numa análise da plataforma XYZ do sistema.

Várias bases para colocar a amostra foram estudadas para determinar qual produziria o menor fundo, desde uma placa de chumbo, como um disco de nióbio até uma base de polimetilmetacrilato - Perspex. A base de chumbo apresenta uma espessura de ~ 5 mm, o disco de nióbio de ~ 6.8 mm e o Perspex de ~ 20 mm.

Os suportes de Nb e Pb foram considerados devido às suas principais linhas de raios X possuírem energias em intervalos que não interferem com as energias de fluorescência dos elementos que constituem as amostras (Tabela 19). O suporte de Perspex foi ponderado pela fluorescência dos elementos químicos que o constituem ser indetetável neste sistema.

	$E_{L\alpha}$	$E_{L\beta}$	$E_{L\gamma}$	$E_{M\alpha}$	$E_{M\beta}$
Nb	2.166	2.269	2.462	-	-
Pb	10.540	12.630	14.760	2.343	2.443
W	8.392	9.742	11.286	1.774	1.835
Ta	8.140	9.415	10.895	1.710	1.766

Tabela 19: Energias médias das possíveis transições L e M dos elementos de Pb, Nb e W [51].

Os espectros dos diferentes suportes, utilizando o filtro para o Cl, mostram-se na figura 64.

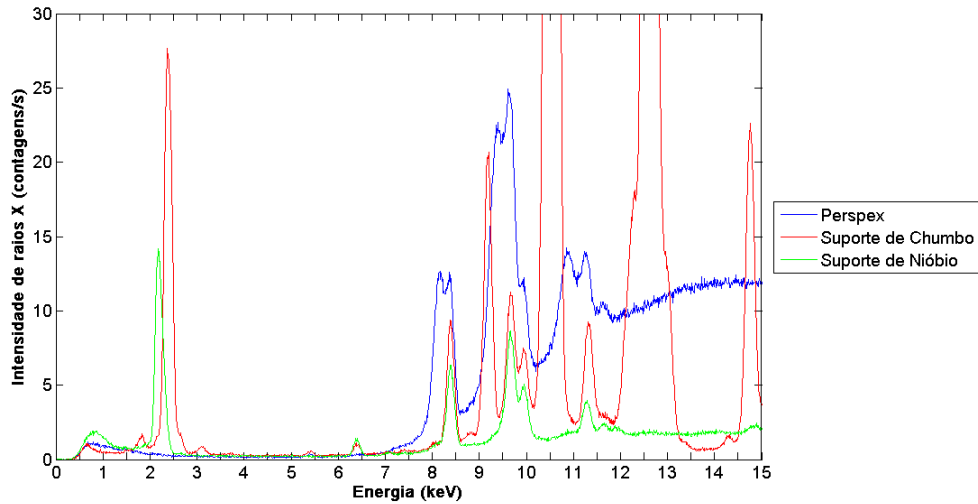


Figura 64: Espectros de fundo dos diferentes suportes para as amostras.

No espectro é possível observar as linhas da transição L_{α} do Nb, as linhas das transições L_{α} , L_{β} , L_{γ} e M_{α} do Pb e, para todos os suportes, também as linhas de transição L do W que constitui o ânodo do tubo de raios X do Ta (Tabela 19). Verifica-se, ainda, a presença de um pico a ~ 6.4 keV cuja energia não é justificável pelas transições que ocorrem nos dois componentes. Concluiu-se, assim, que tanto a placa de Pb como o disco de Nb se encontravam contaminados com outros elementos químicos. Utilizando no tubo de raios X uma tensão de 30kV, com o filtro para o Pb, as transições quer do Ta, quer do W, já não são visualizadas no espectro de energia, permitindo que este apresente uma região limpa (com *background* minimizado) até ~ 12 keV para o Perspex. Por estas razões, decidiu-se utilizar o suporte de Perspex, uma vez que com este teríamos a certeza que não seriam visíveis elementos que o constituem na análise das amostras de olhos e tecido cerebral, dada a indetetabilidade desses elementos pelo sistema.

Na tabela 20 sumaria-se todos os parâmetros do sistema selecionados, na sequência do processo de otimização, definindo assim todas as condições utilizadas na análise das três amostras: *substantia nigra*, estriado e olho.

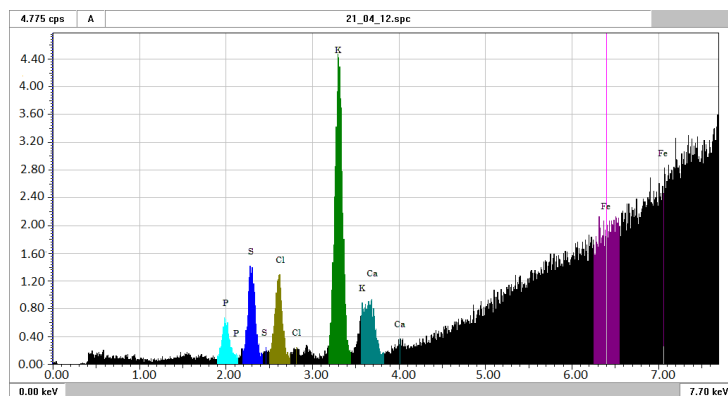
	<i>Substantia nigra</i>			Estriado			Olho		
Espessura (mm)	3			3			5		
Utilização de He	✓			✓			✓		
Suporte	Perspex			Perspex			Perspex		
Colimador	$1.2 \times 1.2 \text{ mm}^2$			$3 \times 3 \text{ mm}^2$			$1.2 \times 1.2 \text{ mm}^2$		
Filtro	Cl	Cr	Pb	Cl	Cr	Pb	Cl	Cr	Pb
Tensão (kV)	15	15	30	15	15	30	15	15	30
Corrente (μA)	200	650	1000	150	100	350	100	400	300
<i>Peaking Time</i> (μs)	8	8	1	1	8	1	8	8	8
Tempo de medida (s)	500	700	900	300	900	600	200	300	400

Tabela 20: Condições finais otimizadas para utilização na análise das três amostras em estudo.

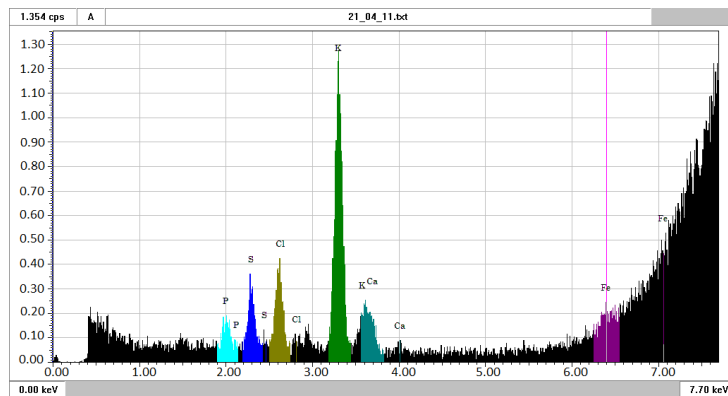
3.2 Análise dos olhos

Um dos objetivos deste trabalho remete para a comparação semi-quantitativa de amostras de olhos dos ratos que foram tratados com a toxina 6-OHDA num dos hemisférios do cérebro. Foram utilizados 6 ratos, onde o olho direito é o normal (ou também denominado controlo) e o esquerdo o tratado. Neste estudo, devido a problemas relacionados com a extração dos olhos, apenas foi possível analisar 4 olhos do lado direito e 5 do lado esquerdo.

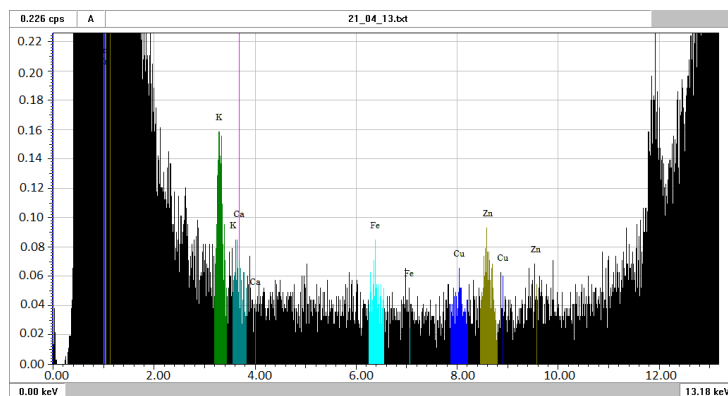
Para este estudo comparativo, foram realizadas 3 medições para cada olho com as condições da tabela 20. A figura 65 representa três dos espectros obtidos para os olhos.



(a) Filtro para o Cl



(b) Filtro para o Cr



(c) Filtro para o Pb

Figura 65: Exemplo de espectros obtidos para os olhos com os diferentes filtros.

Após a análise do primeiro rato, quer do olho direito quer do olho esquerdo, decidiu-se avaliar as diferenças entre as intensidades de raios X para os vários elementos químicos entre os dois olhos. Utilizando o filtro para o Cl obtiveram-se os espectros de energia para os dois olhos, apurando-se a existência de uma descida das contagens do olho esquerdo, quando comparada com o olho direito, de todos os elementos à exceção do P (Figura 66).

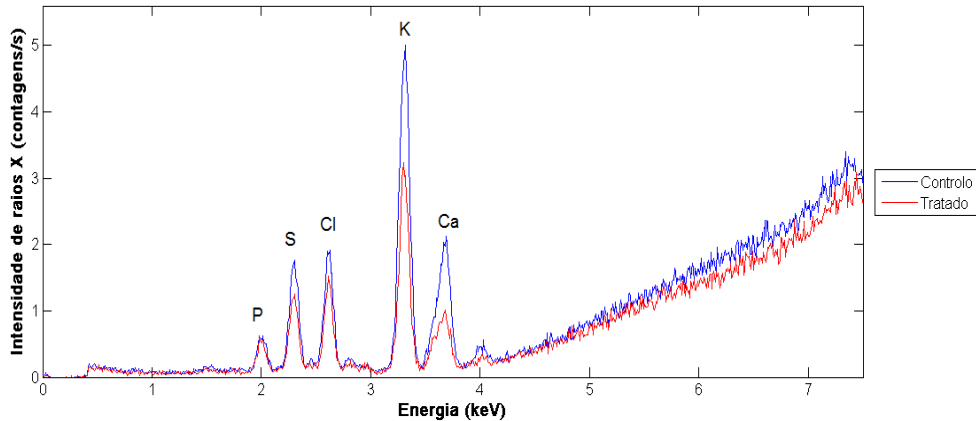
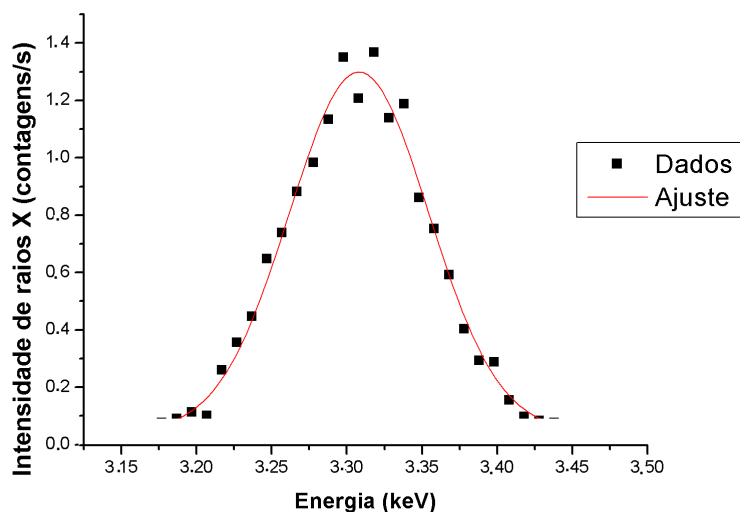


Figura 66: Espectros obtidos para a análise dos olhos do rato 1.

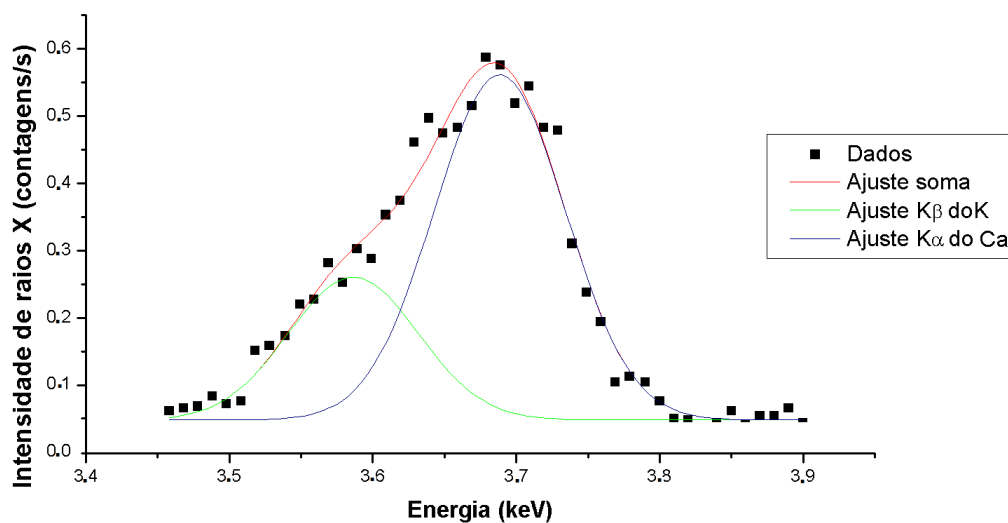
Seguidamente, realizou-se um ajuste gaussiano a cada pico K_{α} que caracteriza cada elemento, não esquecendo pormenores como a sobreposição de picos no caso do Ca (Figura 67). Em nenhuma das análises se verificou, no entanto, a presença quer de Fe, quer de Cu.

A partir dos valores dos parâmetros das funções gaussianas e dos respetivos desvios padrão, realizou-se, a partir do *software Matlab*, um programa que gerasse automaticamente todas as variáveis pretendidas: as intensidades de fluorescência de raios X no ROI, de modo a se comparar com o obtido diretamente pelo sistema; a taxa de contagem de *background* existentes no ROI; a relação sinal-*background*, resultado da divisão entre a área da gaussiana e a área do *background*; o parâmetro 3σ , que, como definido em [50], está diretamente relacionada com o limite de deteção em contagens/s e é obtido pela expressão $3\sigma_{fundo} = 3\sqrt{I_{fundo}}$. Os resultados foram guardados num ficheiro .txt, de modo a poderem ser utilizados e verificados a qualquer altura.

As tabelas 34-39, que se encontram no Anexo I, sumarizam os resultados obtidos para as intensidades de fluorescência de raios X (I_{XRF}), para o desvio padrão desta grandeza ($\sigma_{I_{XRF}}$), para a intensidade de *background*, para a razão sinal-*background* (SBR) e para o parâmetro 3σ . Nas tabelas 21 e 22 encontram-se, resumidamente, apenas os resultados relativos às intensidades de fluorescência de raios X (contagens/s) para cada elemento e para cada filtro.



(a) Pico K_{α} do K



(b) Pico K_{α} do Ca

Figura 67: Exemplo do ajuste realizado para o pico K_{α} do elemento K e do Ca do olho de direito do rato 1.

Nos resultados, à exceção do Zn, realça-se o fato das intensidades relativas de fluorescência de raios X serem quase sempre superiores ao parâmetro de 3σ e de a SBR ser na maior parte das vezes superior a 1, indicando que o sinal é superior ao *background*. Relativamente ao Zn, os resultados possuem desvios padrão muito elevados ($>10\%$), uma SBR muito baixa (<1) e o parâmetro 3σ sempre superior ao valor da intensidade de XRF (~ 4 a 5 vezes superior), provando que as intensidades de fluorescência de raios X deste elemento são menores que o limite de detecção do sistema. Pode-se verificar, ainda, que os dados relativamente aos olhos do rato 6 são bastante superiores dos restantes, chegando

mesmo a ser o triplo (como por exemplo no caso do K). Isto deve-se ao fato deste olho ter sido a amostra na qual se estudaram as condições do sistema e quando chegou a altura de o analisar, já escolhidas as melhores condições, o olho já se encontrava bastante degradado. Por esta razão, o olho direito deste rato não foi utilizado para as análises dos resultados, ficando apenas 3 olhos direitos na discussão de resultados.

		Fósforo		Enxofre		Cloro		Potássio		Cálcio	
		Dir.	Esq.	Dir.	Esq.	Dir.	Esq.	Dir.	Esq.	Dir.	Esq.
Filtro Cl	Rato 1	5.261	4.528	15.58	10.55	15.99	12.06	55.46	33.38	21.60	8.650
	Rato 2	4.319	5.372	12.17	12.27	10.86	10.69	39.66	46.85	8.54	7.771
	Rato 3	4.58	4.529	11.44	12.55	11.71	11.79	38.77	40.93	5.79	6.684
	Rato 4	-	4.635	-	13.75	-	12.92	-	46.61	-	12.43
	Rato 5	-	4.355	-	10.74	-	7.34	-	29.70	-	6.784
	Rato 6	9.839	-	27.74	-	32.09	-	115.9	-	28.60	-
Filtro Cr	Rato 1	1.075	0.973	3.250	2.233	4.321	3.420	14.22	9.374	6.018	1.973
	Rato 2	0.901	1.119	2.614	1.988	3.567	3.074	12.57	12.38	2.528	1.439
	Rato 3	0.944	1.449	2.458	3.402	3.806	3.379	11.62	11.54	1.298	2.255
	Rato 4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Rato 5	-	0.902	-	2.404	-	2.606	-	8.721	-	1.653
	Rato 6	2.703	-	7.922	-	9.358	-	37.28	-	9.537	-

Tabela 21: Intensidades de fluorescência de raios X (contagens/s) obtidas para cada pico correspondente aos elementos P, S, Cl, K e Ca para os olhos de 6 ratos.

		Zinco	
		Dir.	Esq.
Filtro Pb	Rato 1	0.671	0.461
	Rato 2	0.420	0.629
	Rato 3	0.297	0.354
	Rato 4	-	0.595
	Rato 5	-	0.343
	Rato 6	1.078	-

Tabela 22: Intensidades de fluorescência de raios X (contagens/s) obtidas para cada pico correspondente a elemento Zn para os olhos de 6 ratos.

A partir destes resultados realizaram-se vários gráficos com todos os dados obtidos para os olhos direitos e esquerdos para os diferentes filtros utilizados e elementos químicos identificados (Figuras 68, 69 e 70). Nestes gráficos estão igualmente representadas as médias ponderadas dos valores e os respectivos desvios padrão associados. Estes dois parâmetros podem ser determinados tendo em conta as equações seguintes:

$$M = \frac{\sum_{i=1}^n \frac{I_{XRF_i}}{\sigma_{I_{XRF_i}}^2}}{\sum_{i=1}^n \frac{1}{\sigma_{I_{XRF_i}}^2}} \quad (21)$$

$$\sigma_M^2 = \frac{1}{\sum_{i=1}^n \frac{1}{\sigma_{IXRF_i}^2}} \quad (22)$$

sendo n o número total de amostras.

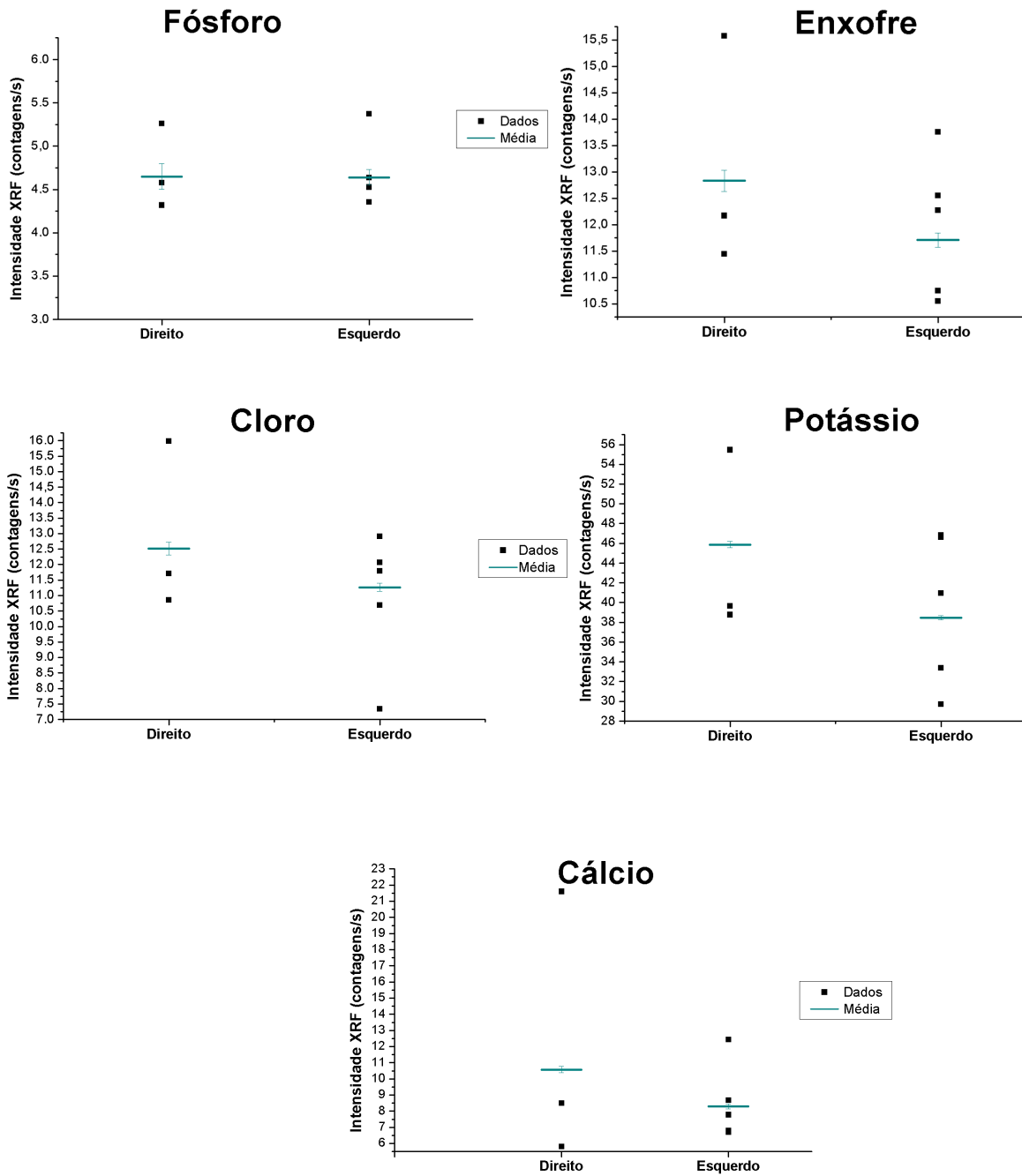


Figura 68: Intensidade de fluorescência de raios X para cada medida, e respectiva média ponderada, para os diferentes elementos detetados nos olhos, utilizando o filtro para o Cl.

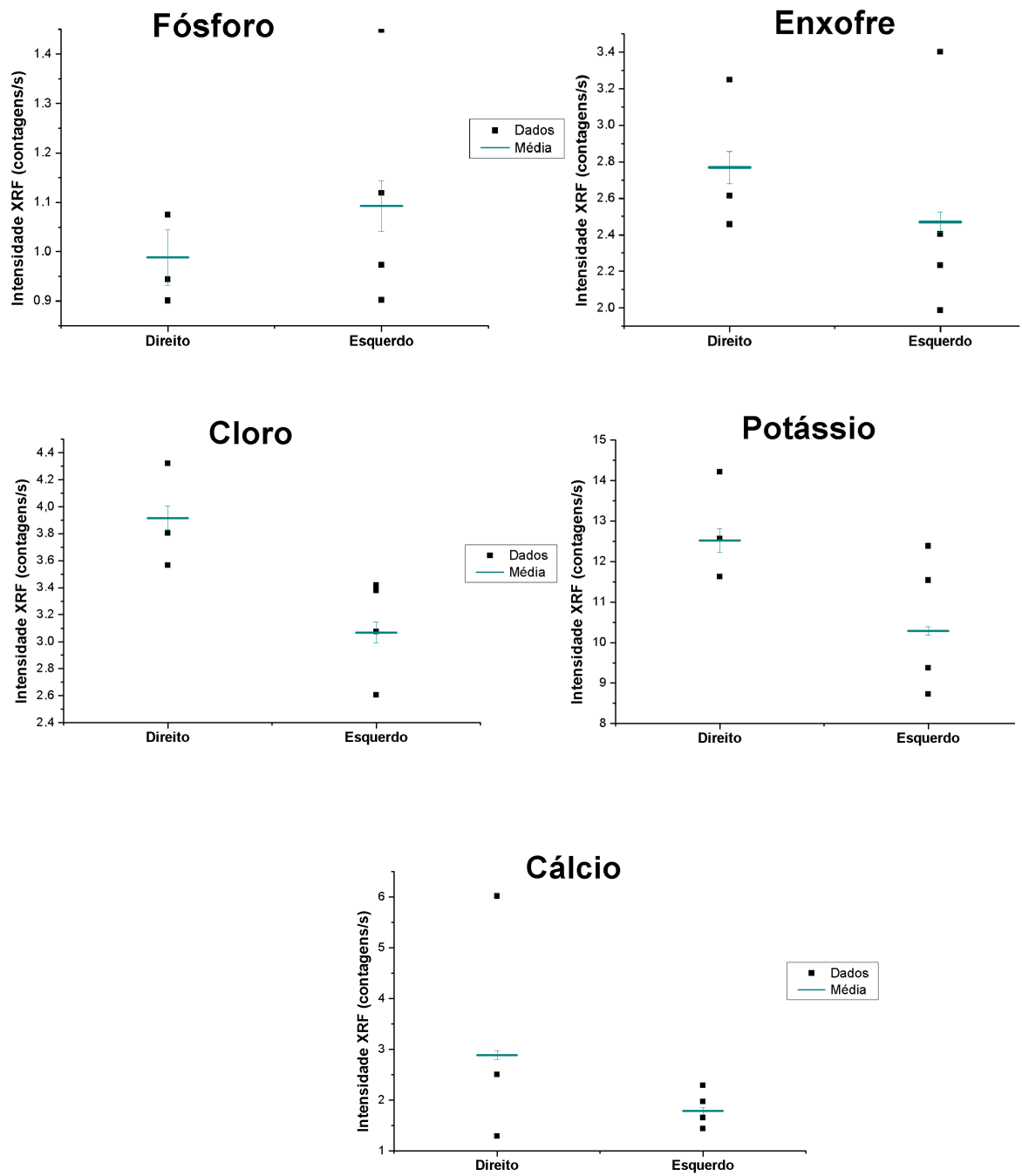


Figura 69: Intensidade de fluorescência de raios X para cada medida, e respectiva média ponderada, para os diferentes elementos detetados nos olhos, utilizando o filtro para o Cr.

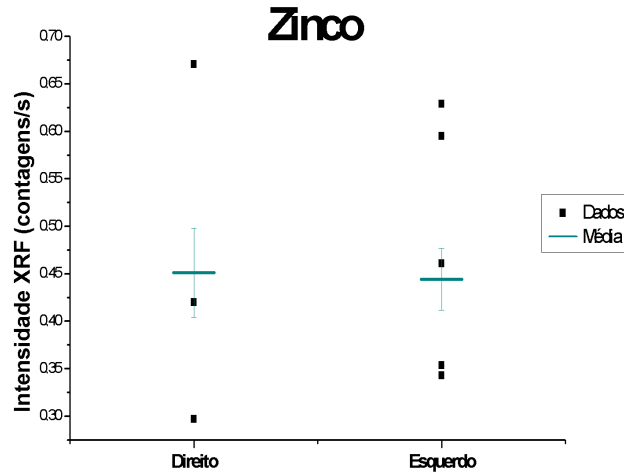


Figura 70: Intensidade de fluorescência de raios X para cada medida, e respectiva média ponderada, para os diferentes elementos detetados nos olhos, utilizando o filtro para o Pb.

Verificando a necessidade de uma realização comparativa mais simples de todos os elementos, entre controlos e tratados, para um melhor entendimento dos resultados obtidos, decidiu-se realizar uma normalização das médias ponderadas obtidas para o elemento, e para o filtro usado. Para tal, atribuindo um valor de 100% ao olho direito, relacionou-se as médias dos olhos esquerdos (M_{trat}) com as médias dos olhos direitos (M_{cont}), de modo a explicitar a alteração dos valores dos diferentes elementos químicos. Para tal utilizou-se a equação 23.

$$N_{trat} = 100 \frac{M_{trat}}{M_{cont}} \quad (23)$$

O desvio padrão associado a esta medida é determinado pela propagação de desvios padrão dado pela equação:

$$\sigma_{N_{trat}} = N_{trat} \sqrt{\left(\frac{\sigma_{M_{trat}}}{M_{trat}}\right)^2 + \left(\frac{\sigma_{M_{cont}}}{M_{cont}}\right)^2} \quad (24)$$

Na tabela 23 encontram-se os resultados obtidos, através do *Matlab*, para as médias ponderadas, o valor da normalização e os respetivos desvios padrão para cada elemento. Os resultados estão, ainda, representados na figura 71.

		Olho Direito		Olho Esquerdo			
		M_{cont}	$\sigma_{M_{cont}}$	M_{trat}	$\sigma_{M_{trat}}$	$N_{trat}(\%)$	$\sigma_{N_{trat}}(\%)$
Filtro Cl	P	4.649	0.148	4.641	0.090	99.82	3.716
	S	12.83	0.205	11.71	0.138	91.25	1.985
	Cl	12.52	0.209	11.27	0.131	90.04	2.031
	K	45.87	0.323	38.47	0.220	83.87	0.853
	Ca	10.58	0.203	8.291	0.163	78.40	2.747
Filtro Cr	P	0.988	0.056	1.093	0.052	110.6	7.398
	S	2.768	0.087	2.469	0.056	89.20	3.882
	Cl	3.916	0.091	3.068	0.075	78.36	3.392
	K	12.52	0.291	10.29	0.105	82.15	2.533
	Ca	2.888	0.086	1.782	0.069	61.72	4.893
Filtro Pb	Zn	0.451	0.047	0.444	0.033	98.39	12.74

Tabela 23: Médias ponderadas, normalização (controlo a 100%) e respetivos desvios padrão obtidos para os diferentes elementos nos olhos.

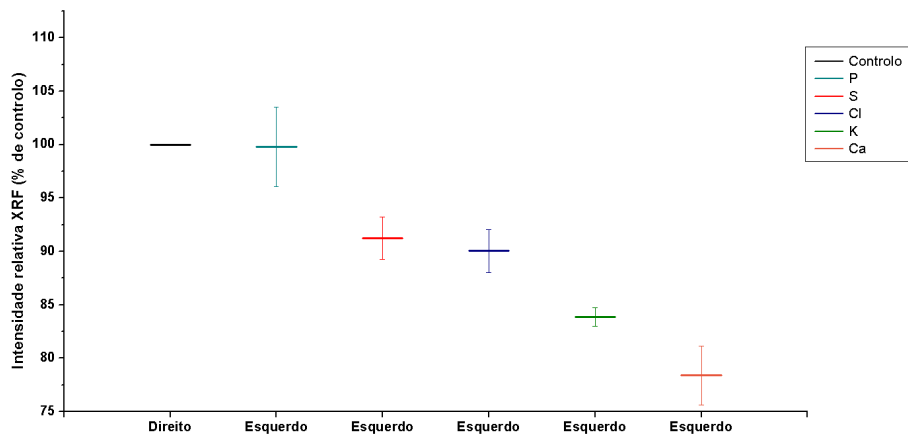
Pode-se verificar que os gráficos para dois filtros estão em consonância, apurando que para quase todos os elementos, à exceção do P, ocorre uma diminuição da sua percentagem nos olhos esquerdos, i.e. nos olhos tratados.

Como já foi mencionado anteriormente (cf. Otimização das condições de análise), os resultados relativamente aos elementos em análise são melhores com o filtro para o Cl e com o filtro para o Pb. Na tabela 24 estão representados as diferenças do olho esquerdo relativamente ao olho direito para estes filtros.

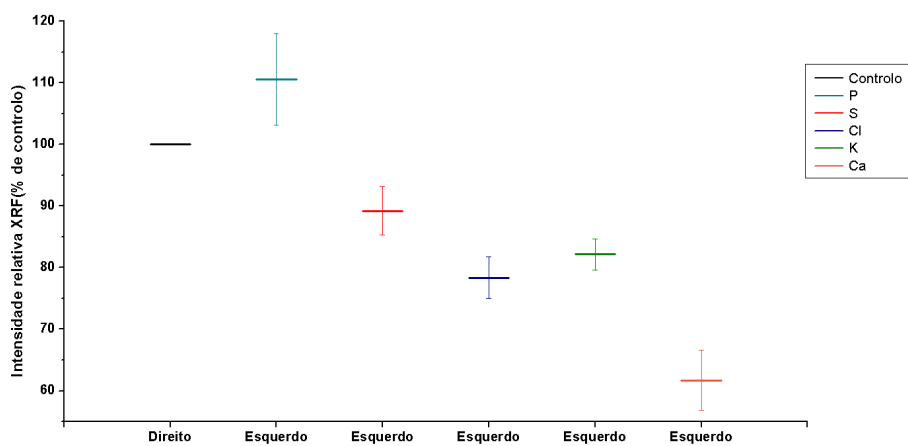
	Diferença (%)
P	-0.179 ± 3.716
S	-8.749 ± 1.985
Cl	-9.961 ± 2.031
K	-16.13 ± 0.853
Ca	-21.61 ± 2.747
Zn	-1.610 ± 12.74

Tabela 24: Diferenças do olho esquerdo relativamente ao olho direito.

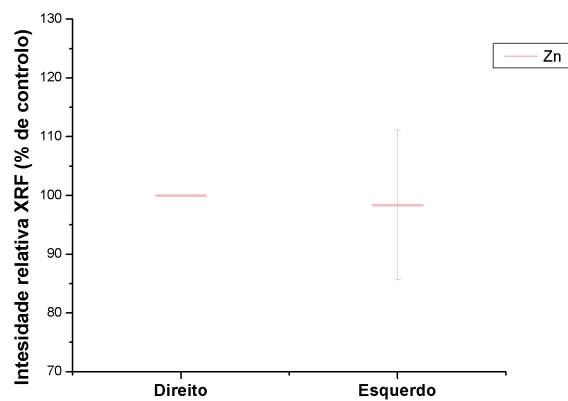
A partir da tabela e dos dados acima, podemos concluir que, com exceção do P e do Zn, se observa uma diminuição da concentração dos elementos S, Cl, K e Ca nos olhos tratados (~ 9 - 22%). No caso do Zn, a sua concentração residual é inferior à sensibilidade do espetómetro, não permitindo a sua medição.



(a) Filtro para o Cl



(b) Filtro para o Cr



(c) Filtro para o Pb

Figura 71: Resultados obtidos para as intensidades relativas de fluorescência de raios X com os diferentes filtros.

Realizou-se, ainda, a análise da parte posterior dos olhos, i.e. da parte relativa ao nervo ótico, de modo a averiguar a existência de diferenças na concentração dos diferentes elementos detetados e entre olhos tratados e normais. Estas medições foram realizadas apenas para o rato 1. Foi possível, nesta parte do olho, verificar a presença do elemento de Fe. Na tabela 25 encontram-se os resultados obtidos para cada elemento.

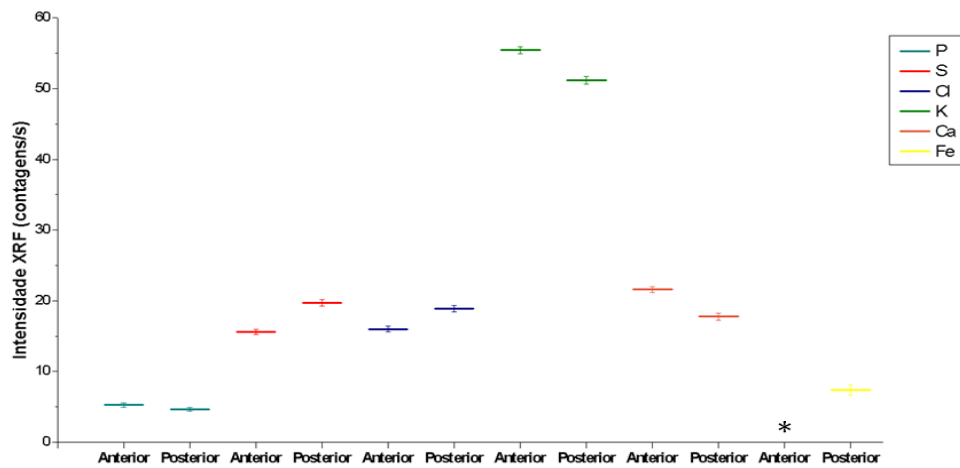
		Direito				Esquerdo			
		Anterior		Posterior		Anterior		Posterior	
		I_{XRF}	$\sigma_{I_{XRF}}$	I_{XRF}	$\sigma_{I_{XRF}}$	I_{XRF}	$\sigma_{I_{XRF}}$	I_{XRF}	$\sigma_{I_{XRF}}$
Filtro Cl	P	5.261	0.286	4.658	0.231	4.528	0.218	6.559	0.259
	S	15.58	0.382	19.68	0.466	10.55	0.247	20.81	0.485
	Cl	15.99	0.410	18.88	0.465	12.06	0.248	22.14	0.407
	K	55.46	0.503	51.19	0.550	33.38	0.402	50.92	0.435
	Ca	21.60	0.423	17.75	0.473	8.684	0.379	15.72	0.416
	Fe	-	-	7.414	0.695	-	-	-	-
Filtro Cr	P	1.075	0.085	1.408	0.168	0.973	0.087	1.474	0.1100
	S	3.250	0.154	5.901	0.236	2.233	0.095	4.784	0.185
	Cl	4.321	0.154	5.686	0.193	3.420	0.169	6.887	0.2100
	K	14.22	0.250	16.90	0.202	9.374	0.191	16.05	0.263
	Ca	6.018	0.187	6.057	0.193	1.973	0.146	3.563	0.176
	Fe	-	-	4.866	0.216	-	-	3.872	0.172
Filtro Pb	Fe	0.545	0.061	0.595	0.091	-	-	-	-
	Zn	0.671	0.084	0.461	0.071	1.000	0.108	0.953	0.077

Tabela 25: Intensidades de fluorescência de raios X (contagens/s) obtidas para cada pico correspondente aos elementos P, S, Cl, K, Ca, Fe e Zn para a parte anterior e posterior dos olhos de 1 rato.

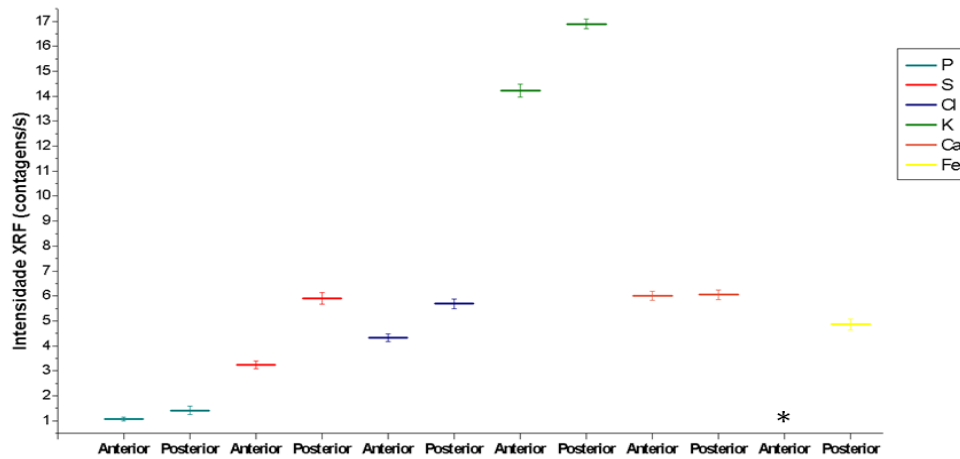
Nas figuras 72 e 73 encontram-se representadas as diferenças das intensidades de raios X, em taxa de contagens líquidas, entre a parte anterior e a parte posterior para os dois olhos, medidas com os diferentes filtros.

A partir dessas figuras, verificou-se que na parte posterior do olho é possível observar a presença de Fe, algo que na parte anterior não era possível, e que a concentração tanto deste elemento como do P, do S e do Cl, para os dois olhos analisados com qualquer filtro, na parte posterior do olho era superior à parte anterior. Relativamente aos elementos K e Ca exibem um comportamento diferente para os diferentes filtros, olhos e parte anterior/posterior, diminuindo no olho direito quando estudado com o filtro para o Cl e aumentando quando analisado nas outras condições, da parte anterior para a posterior.

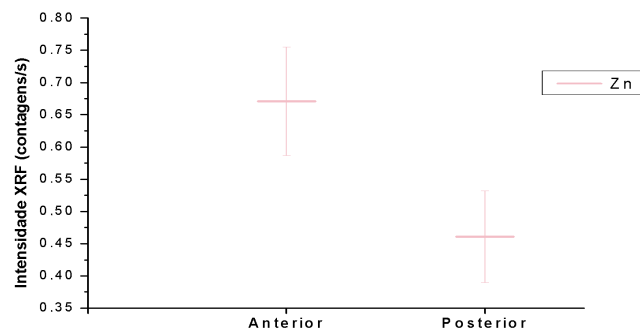
Analisou-se, ainda, utilizando o filtro para o Cr, a parte posterior do olho direito e comparou-se com a parte posterior do olho esquerdo (Figura 74), obtendo-se resultados semelhantes aos alcançados para a parte anterior do olho, verificando-se para todos os elementos (à exceção do Cl) uma diminuição da intensidade XRF do olho esquerdo, tratado, relativamente ao olho normal.



(a) Filtro para o Cl

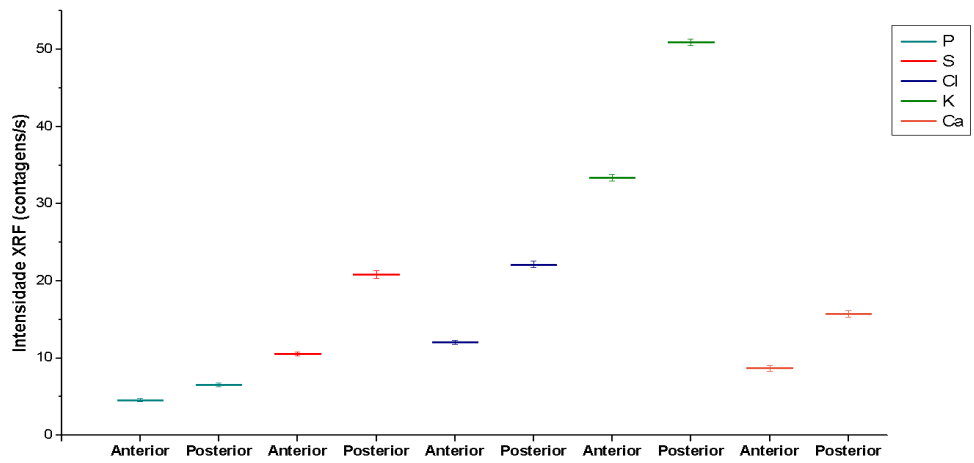


(b) Filtro para o Cr

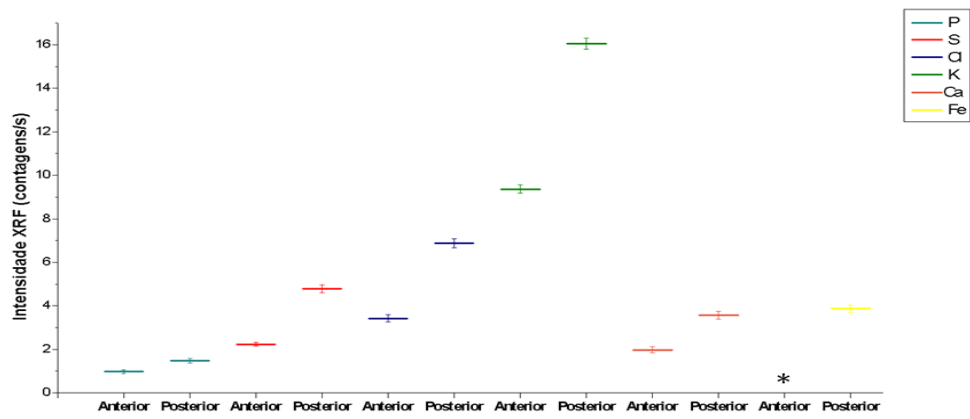


(c) Filtro para o Pb

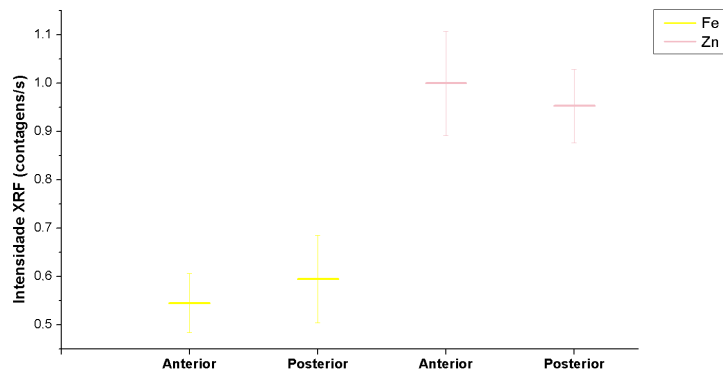
Figura 72: Intensidade de fluorescência de raios X obtida para diferentes elementos no olho direito de um rato, utilizando os diferentes filtros. O símbolo '*' representa o fato do sistema não ter sensibilidade suficiente para medir o respectivo elemento.



(a) Filtro para o Cl



(b) Filtro para o Cr



(c) Filtro para o Pb

Figura 73: Intensidade de fluorescência de raios X obtida para diferentes elementos no olho esquerdo de um rato, utilizando os diferentes filtros. O símbolo '*' representa o fato do sistema não ter sensibilidade suficiente para medir o respectivo elemento.

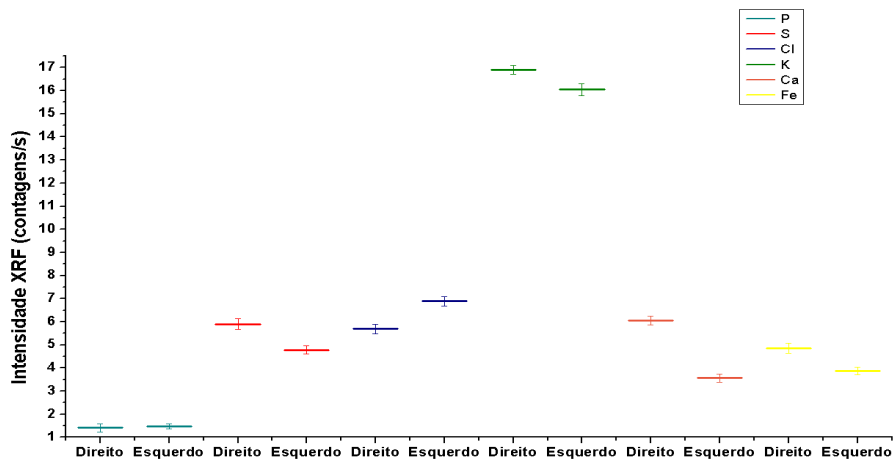


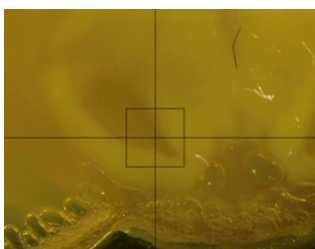
Figura 74: Intensidade de fluorescência de raios X obtida para diferentes elementos na parte posterior dos dois olhos de um rato.

Note que o estudo comparativo, entre as partes anterior e posterior dos olhos, foi realizado apenas com um rato, não se podendo tirar conclusões estatísticas.

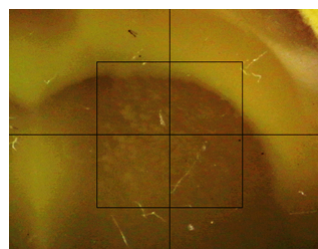
3.3 Análise dos tecidos cerebrais

Para além do estudo dos olhos de ratos - normais e tratados, pretendia-se ainda realizar um estudo preliminar semi-quantitativo da concentração dos mesmos elementos químicos, em duas regiões cerebrais muito importantes no percurso da dopamina, a *substantia nigra* e o estriado, e comparar as suas concentrações medidas através da intensidade de fluorescência de raios X dos diferentes elementos para estas regiões em tecidos normais - saudáveis e tratados com a toxina 6-OHDA. Como já foi referido anteriormente (cf., Métodos de análise – Amostras), o hemisfério direito corresponde ao lado cerebral que foi tratado.

Analisaram-se, para cada rato, duas amostras de tecido cerebral, uma para a região da *substantia nigra* e outra para a região do estriado, com as condições otimizadas apresentadas na tabela 20. Dado que as dimensões escolhidas para o feixe de raios X são aproximadamente metade da área de cada região, realizaram-se duas medições para cada hemisfério de cada amostra (Figura 75). Assim, para cada elemento químico detetado, a respetiva intensidade de fluorescência para a linha K_{α} é igual à soma das duas intensidades.



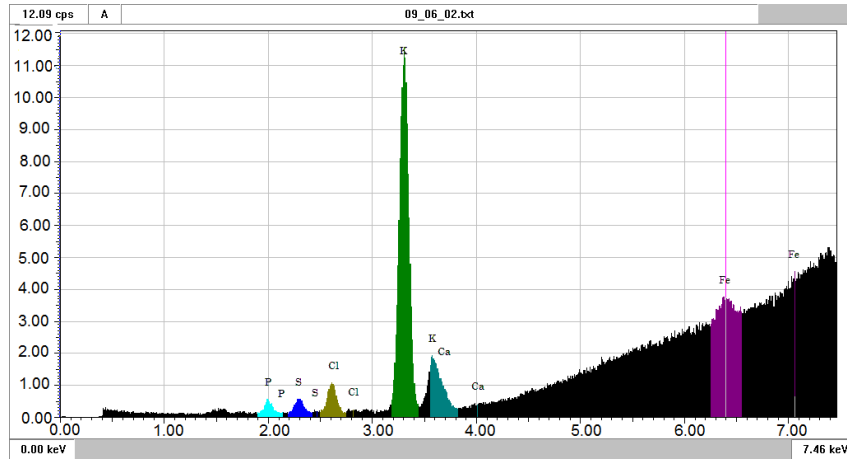
(a) *Substantia nigra*



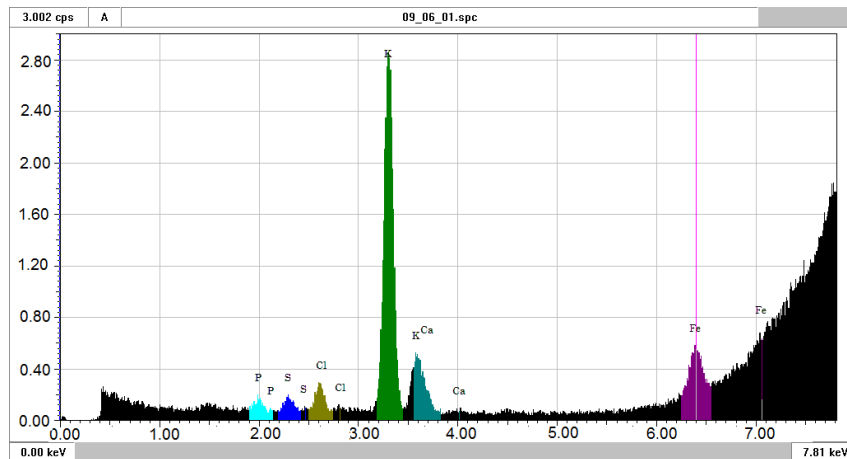
(b) Estriado

Figura 75: Áreas de irradiação nas amostras de tecido cerebral.

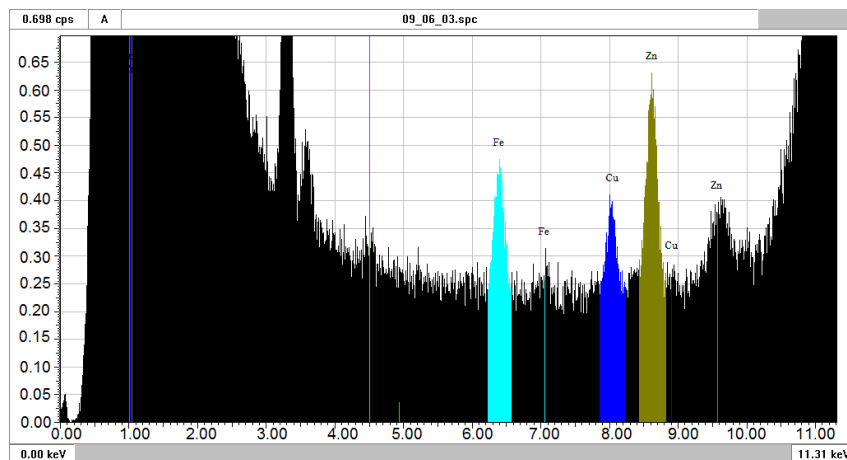
Nas figuras 76 e 77 mostram-se espectros de energia típicos obtidos para cada uma das regiões com os três filtros de raios X selecionados para este trabalho.



(a) Filtro para o Cl

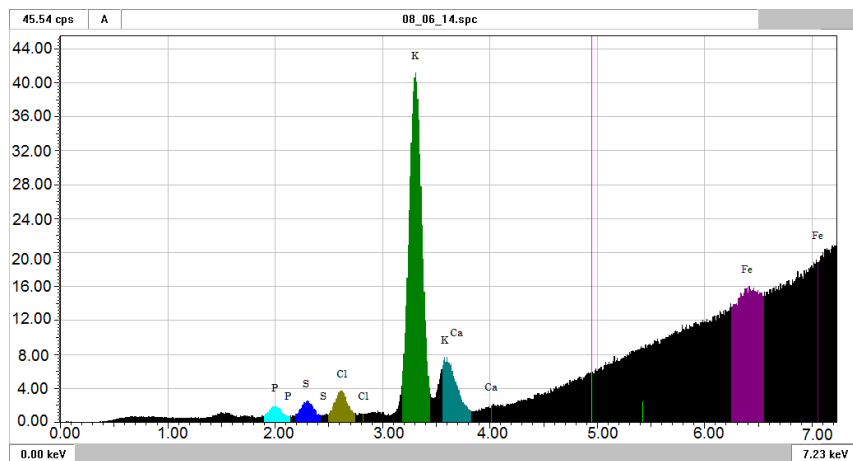


(b) Filtro para o Cr

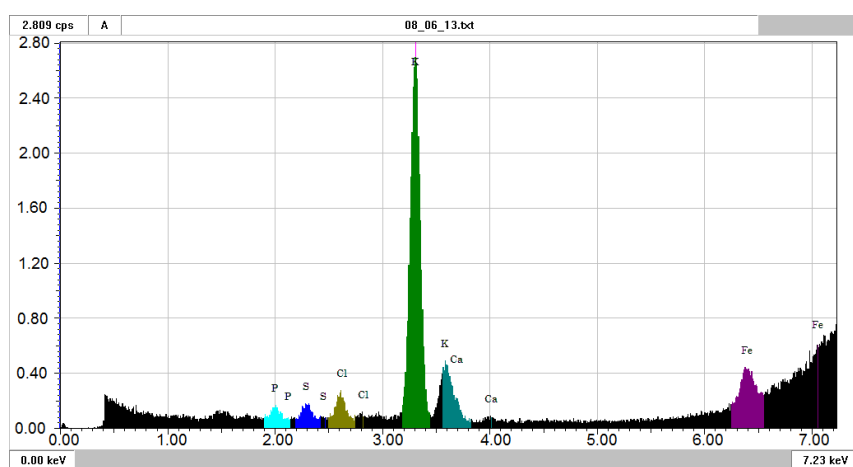


(c) Filtro para o Pb

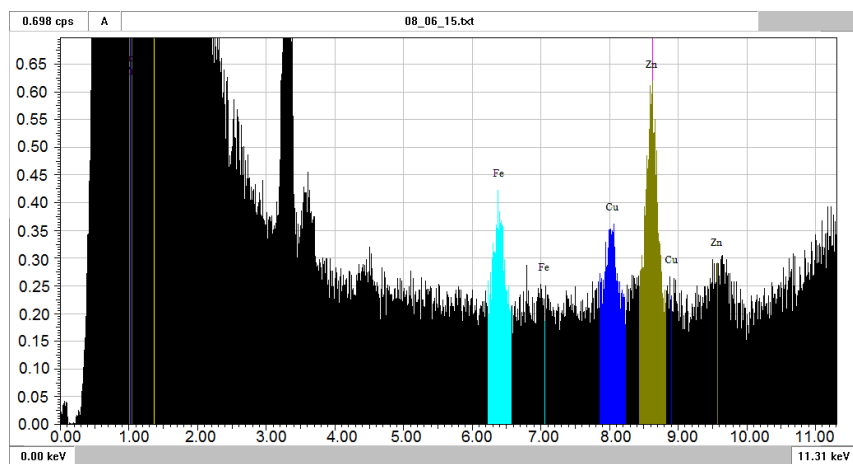
Figura 76: Exemplo de espectros obtidos na análise da *substantia nigra* com os diferentes filtros.



(a) Filtro para o Cl



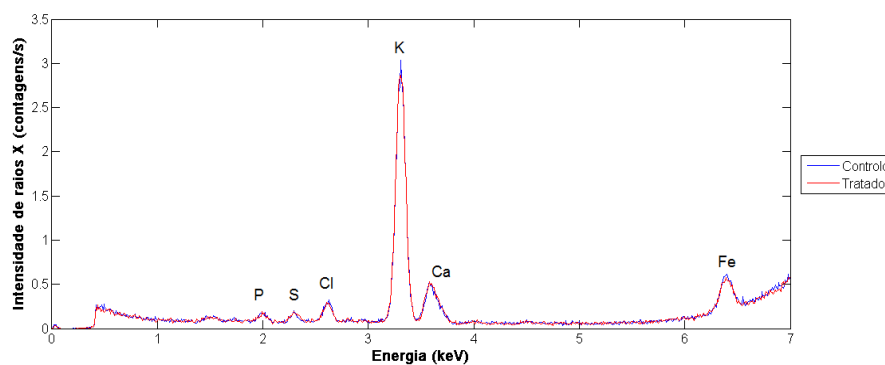
(b) Filtro para o Cr



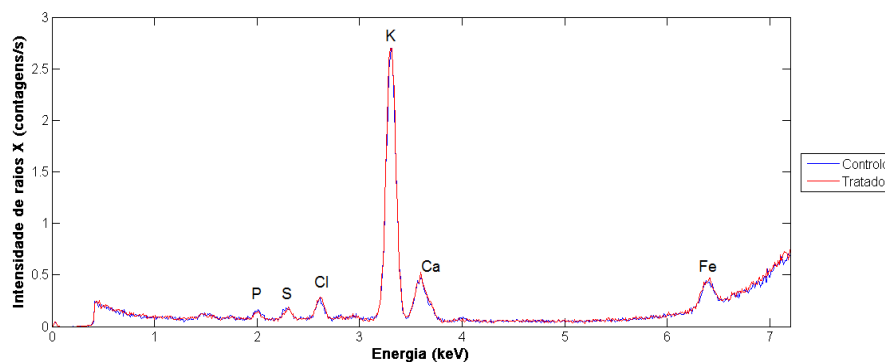
(c) Filtro para o Pb

Figura 77: Exemplo de espectros obtidos na análise do estriado com os diferentes filtros.

Na figura 78 representa-se, para cada região cerebral, no mesmo gráfico, dois exemplos de espectros para os hemisférios controlo e tratado.



(a) *Substantia nigra*



(b) Estriado

Figura 78: Espetros obtidos pela análise da *substantia nigra* e do estriado, em ambos os hemisférios cerebrais, utilizando o filtro para o Cr.

De seguida examinaram-se os elementos químicos presentes nas duas amostras de cada região. Os resultados obtidos do ajuste de cada pico das linhas K_{α} dos elementos para cada filtro e cada região estão sumariados nas tabelas 40 - 45, em anexo (Anexo II) para dois ratos.

Tanto na região da *substantia nigra* como na região do estriado, a razão sinal-*background* e o parâmetro 3σ variam bastante consoante o elemento em estudo e o filtro utilizado durante a medição. Com o filtro para o Cl, os elementos P, S, Cl e K têm $SBR > 1$, sendo a mais elevada para o K com valores > 14.5 , e o 3σ , à exceção do Cl e do K, é superior à intensidade de fluorescência de raios X nos restantes elementos. Com o filtro para o Cr, à exceção do K e do Ca, os elementos P, S, Cl e Fe apresentam uma $SBR < 1$ e um 3σ superior à intensidade de fluorescência de raios X. Com o filtro para o Pb, todos os elementos (Fe, Cu e Zn) apresentam uma $SBR < 1$ e um 3σ superior à intensidade de fluorescência de raios X. É de notar ainda que a SBR do Fe é superior quando se utiliza o filtro para o Cr, quando comparado com o filtro de Pb. Isto foi obtido tanto para o hemisfério controlo como para o hemisfério tratado com a toxina.

As tabelas 26 e 27 sumarizam as intensidades da fluorescência de raios X, I_{XRF} , obtidas para cada medição e a respetiva soma para a mesma região e para o mesmo hemisfério de cada rato (a negrito).

		P	S	Cl	K	Ca	
		I_{XRF}	I_{XRF}	I_{XRF}	I_{XRF}	I_{XRF}	
Filtro Cl	Controlo	3.642	3.972	9.117	125.9	6.316	
		3.429	4.240	11.18	131.4	6.843	
		7.071	8.212	20.30	257.4	13.16	
		3.955	4.546	7.400	115.2	7.015	
		3.144	3.725	7.850	113.9	6.465	
	7.099	8.271	15.25	229.1	13.48		
	Tratado	3.555	3.987	8.905	125.4	6.634	
		3.492	4.185	10.36	134.1	6.881	
		7.047	8.172	19.26	259.5	13.51	
		4.135	4.658	8.302	121.0	7.007	
3.592		4.376	8.955	124.0	7.503		
7.727	9.034	17.26	245.0	14.51			
		P	S	Cl	K	Ca	Fe
		I_{XRF}	I_{XRF}	I_{XRF}	I_{XRF}	I_{XRF}	I_{XRF}
Filtro Cr	Controlo	0.8910	0.8010	2.341	31.39	1.794	5.260
		0.7060	1.070	2.510	33.40	2.116	5.273
		1.5970	1.871	4.851	64.80	3.910	10.53
		0.8600	1.098	1.6370	29.59	2.326	5.238
		0.7870	0.8950	1.8370	28.91	2.229	8.530
	1.647	1.993	3.474	58.50	4.555	13.77	
	Tratado	0.8970	1.1890	2.0610	31.72	2.052	4.948
		0.8790	0.9600	2.473	33.68	1.798	5.992
		1.776	2.149	4.534	65.40	3.850	10.94
		0.8230	0.9740	1.832	30.91	2.215	6.732
0.6080		1.089	2.010	31.60	2.099	8.601	
1.431	2.063	3.842	62.50	4.314	15.33		
		Fe	Cu	Zn			
		I_{XRF}	I_{XRF}	I_{XRF}			
Filtro Pb	Controlo	3.533	2.273	6.288			
		4.138	2.199	7.066			
		7.671	4.472	13.35			
		4.407	2.135	6.588			
		5.597	2.189	7.043			
	10.00	4.324	13.63				
	Tratado	3.833	2.193	6.752			
		4.085	2.468	6.811			
		7.918	4.661	13.56			
		4.5780	2.273	7.040			
5.4890		2.153	7.272				
10.07	4.426	14.31					

Tabela 26: Intensidades de fluorescência de raios X (contagens/s) obtidas nos ajustes gaussianos de cada pico correspondente à linha K_{α} de cada elemento para os dois hemisférios do tecido cerebral, na região da *substantia nigra* e respetiva soma.

		P	S	Cl	K			
		I_{XRF}	I_{XRF}	I_{XRF}	I_{XRF}			
Filtro Cl	Controlo	17.36	23.63	37.76	570.7			
		12.32	17.70	43.95	603.4			
		29.68	41.33	81.70	1174			
		15.96	20.57	37.86	576.9			
		16.42	24.74	44.66	676.1			
			32.37	45.30	82.52	1253		
	Tratado	14.74	20.35	40.39	589.5			
		14.62	18.48	42.77	623.2			
		29.35	38.83	83.16	1213			
		19.82	24.20	54.98	760.0			
16.69		22.11	52.83	755.0				
		36.50	46.31	107.81	1515			
		P	S	Cl	K	Ca	Fe	
		I_{XRF}	I_{XRF}	I_{XRF}	I_{XRF}	I_{XRF}	I_{XRF}	
Filtro Cr	Controlo	0.7750	1.030	1.772	29.53	1.606	3.172	
		0.6020	0.8560	2.282	31.08	1.707	4.004	
		1.377	1.886	4.054	60.61	3.313	7.176	
		0.6940	0.8720	1.948	29.08	1.748	5.488	
		0.7780	1.108	2.274	33.63	2.002	9.708	
			1.472	1.980	4.222	62.72	3.750	15.19
	Tratado	0.5120	0.9100	2.012	30.20	1.873	3.356	
		0.5710	0.8630	2.082	31.87	1.683	4.359	
		1.083	1.773	4.094	62.07	3.556	7.715	
		0.9010	1.123	2.557	38.08	2.105	5.751	
0.7620		1.049	2.553	38.34	2.245	9.021		
		1.663	2.172	5.110	76.42	4.350	14.77	
		Fe	Cu	Zn				
		I_{XRF}	I_{XRF}	I_{XRF}				
Filtro Pb	Controlo	2.883	1.923	6.568				
		2.999	1.736	6.723				
		5.882	3.659	13.29				
		3.407	2.573	6.980				
		5.352	2.050	7.867				
			8.759	4.623	14.85			
	Tratado	2.620	2.066	7.132				
		3.278	2.002	7.733				
		5.898	4.068	14.86				
		4.041	2.506	7.296				
5.024		2.226	7.516					
		9.065	4.732	14.81				

Tabela 27: Intensidades de fluorescência de raios X (contagens/s) obtidas nos ajustes gaussianos de cada pico correspondente à linha K_{α} de cada elemento para os dois hemisférios do tecido cerebral, na região do estriado e respetiva soma.

Com o intuito de realizar uma análise preliminar, da variação das concentrações

de cada elemento nos hemisférios tratados, similar ao que foi realizado para os olhos, determinou-se a média da intensidade de fluorescência de raios X (contagens/s) de cada hemisfério (controle e tratado), tendo em conta os dados adquiridos para os dois ratos. Nas tabelas seguintes estão representadas as somas das medições e os resultados finais da média e do respetivo desvio padrão para cada elemento, cada filtro e cada região (equações 21 e 22).

		Controlo				Tratado			
		I_{XRF}		M_{cont}	$\sigma_{M_{cont}}$	I_{XRF}		M_{trat}	$\sigma_{M_{trat}}$
Filtro Cl	P	7.071	7.099	7.089	0.123	7.047	7.727	7.456	0.137
	S	8.212	8.271	8.233	0.177	8.172	9.034	8.579	0.170
	Cl	20.30	15.25	18.12	0.201	19.26	17.26	18.31	0.215
	K	257.4	229.1	244.4	0.695	259.5	245.0	251.7	0.732
	Ca	13.16	13.48	13.32	0.312	13.51	14.51	14.19	0.251
Filtro Cr	P	1.597	1.647	1.625	0.067	1.776	1.431	1.518	0.067
	S	1.871	1.993	1.923	0.080	2.149	2.063	2.111	0.086
	Cl	4.851	3.474	3.983	0.096	4.534	3.842	4.280	0.101
	K	64.80	58.50	61.99	0.274	65.40	62.50	63.71	0.269
	Ca	3.910	4.555	4.341	0.131	3.850	4.314	4.090	0.133
	Fe	10.53	13.77	11.95	0.183	10.94	15.33	12.71	0.168
Filtro Pb	Fe	7.671	10.00	8.749	0.171	7.918	10.07	9.158	0.165
	Cu	4.472	4.324	4.386	0.224	4.661	4.426	4.566	0.245
	Zn	13.35	13.63	13.52	0.185	13.56	14.31	13.93	0.167

Tabela 28: Resultados obtidos para as médias e os respetivos desvios padrão para a região da *substantia nigra* e para os diferentes filtros.

		Controlo				Tratado			
		I_{XRF}		M_{cont}	$\sigma_{M_{cont}}$	I_{XRF}		M_{trat}	$\sigma_{M_{trat}}$
Filtro Cl	P	29.68	32.37	31.00	0.591	29.35	36.50	33.50	0.624
	S	41.33	45.30	42.60	0.958	38.83	46.31	42.40	0.915
	Cl	81.70	82.52	82.10	0.90	83.16	107.8	94.00	1.154
	K	1174	1253	1222	4.566	1213	1515	1353	5.654
Filtro Cr	P	1.3770	1.472	1.422	0.065	1.083	1.663	1.328	0.053
	S	1.886	1.980	1.936	0.062	1.773	2.172	1.956	0.063
	Cl	4.054	4.222	4.153	0.084	4.094	5.110	4.445	0.075
	K	60.61	62.72	61.76	0.237	62.07	76.42	70.88	0.242
	Ca	3.313	3.750	3.558	0.128	3.556	4.350	3.901	0.141
	Fe	7.176	15.19	10.73	0.138	7.715	14.77	13.08	0.183
Filtro Pb	Fe	5.882	8.759	7.161	0.191	5.898	9.065	7.434	0.189
	Cu	3.659	4.623	4.037	0.270	4.068	4.732	4.238	0.280
	Zn	13.29	14.85	14.02	0.240	14.86	14.81	14.84	0.233

Tabela 29: Resultados obtidos para as médias e os respetivos desvios padrão para a região do estriado e para os diferentes filtros.

Os gráficos que se encontram representados nas figuras 79, 80 e 81 simbolizam os dados da tabela 28 para a região da *substantia nigra*, enquanto que os das figuras 82, 83 e 84 exibem os resultados da tabela 29 para a região do estriado.

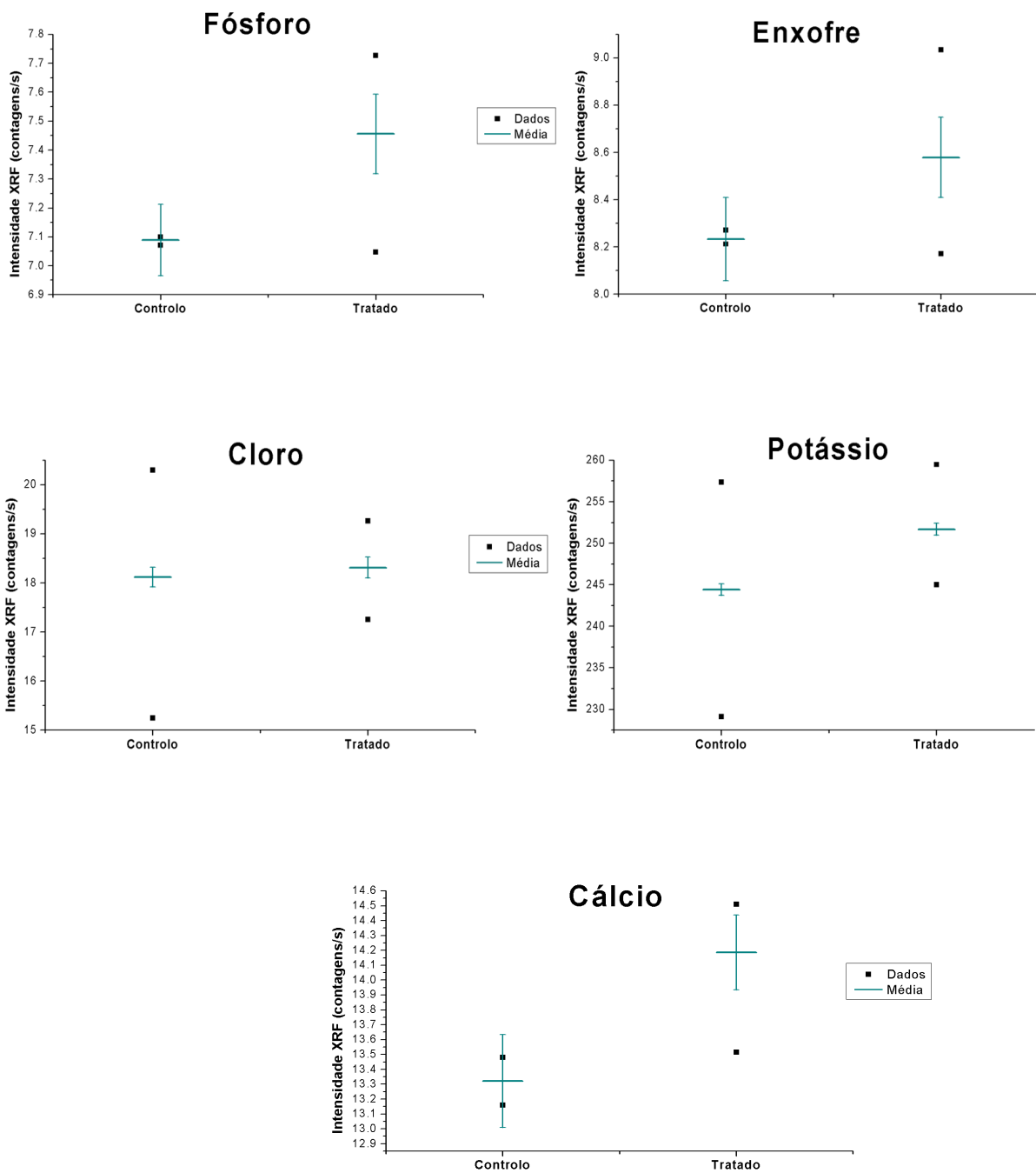


Figura 79: Intensidade de fluorescência de raios X para cada medida, e respetiva média ponderada, para os diferentes elementos detetados na *substantia nigra*, utilizando o filtro para o Cl.

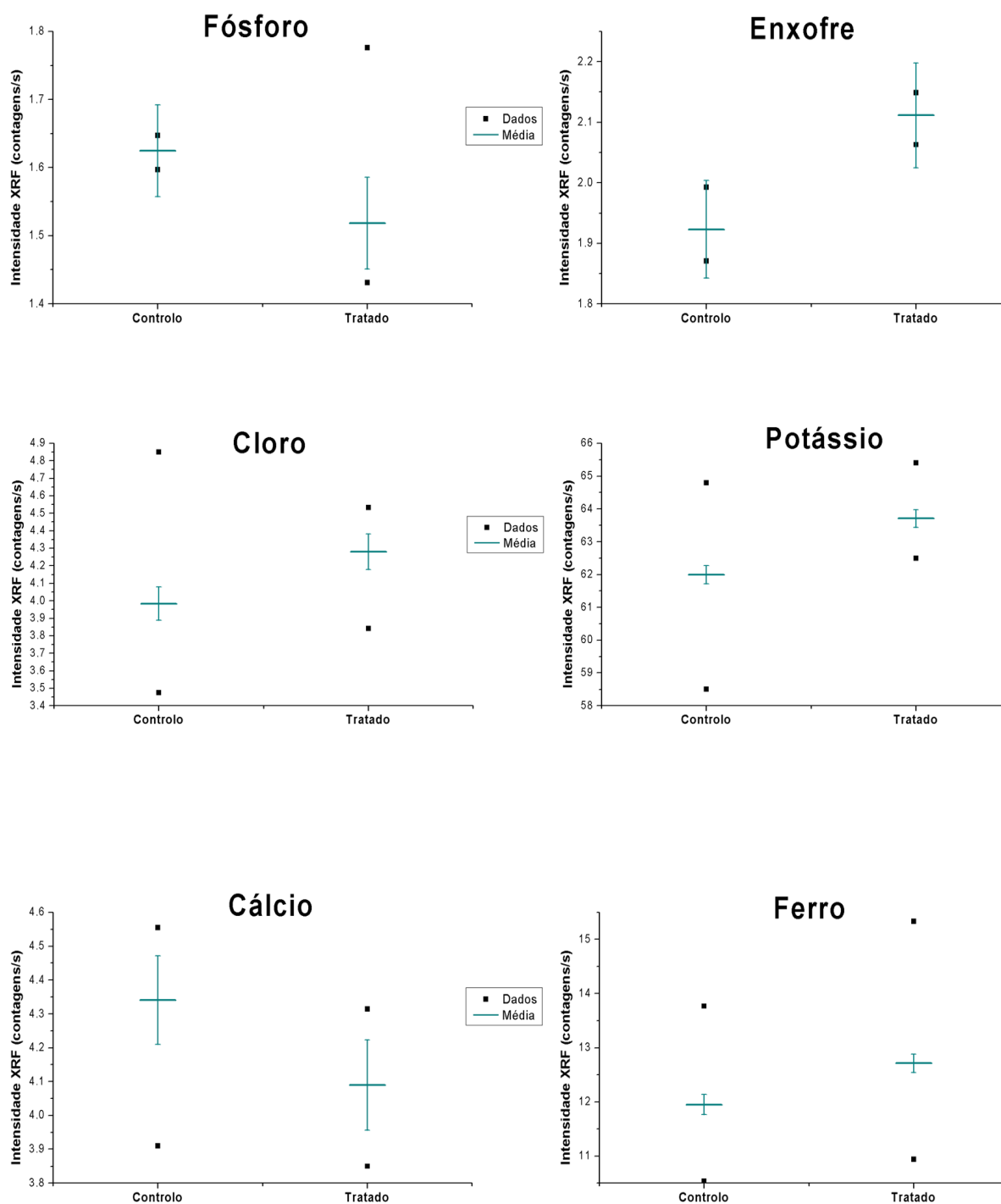


Figura 80: Intensidade de fluorescência de raios X para cada medida, e respetiva média ponderada, para os diferentes elementos detetados na *substantia nigra*, utilizando o filtro para o Cr.

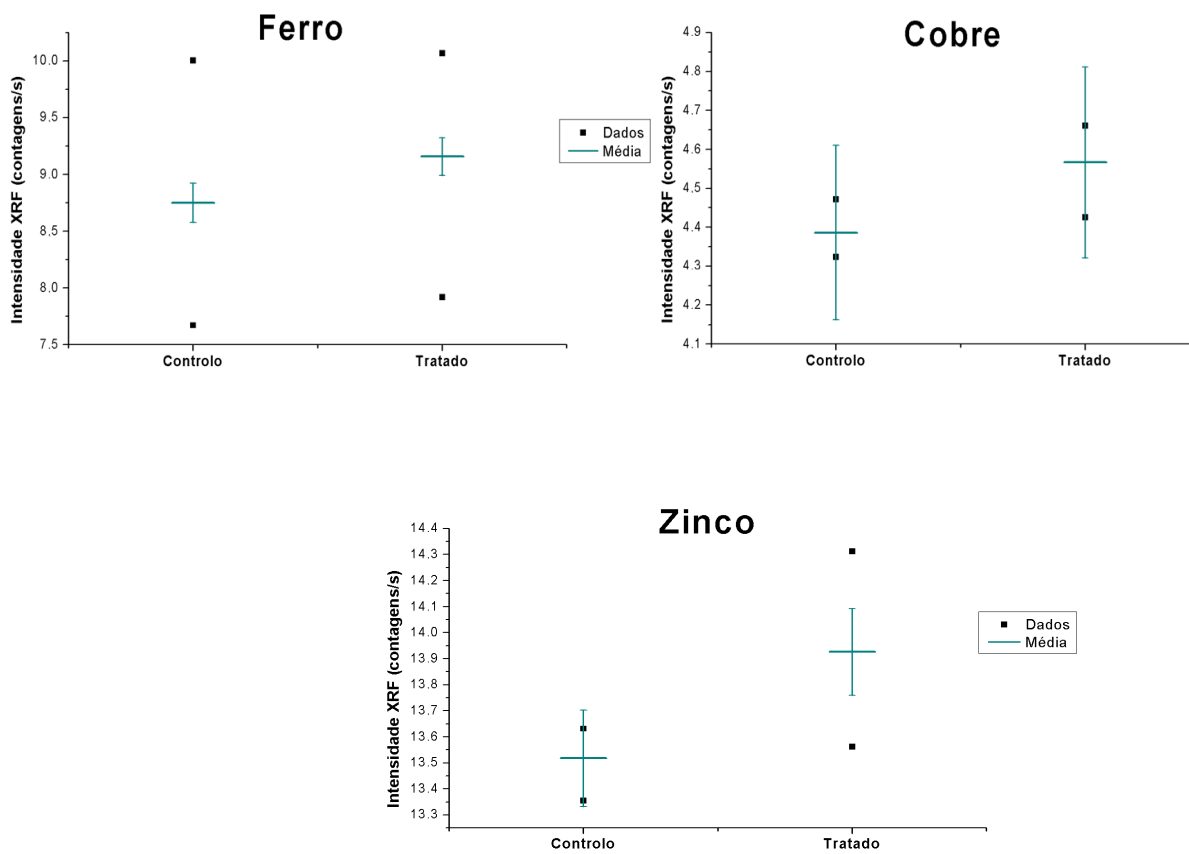


Figura 81: Intensidade de fluorescência de raios X para cada medida, e respetiva média ponderada, para os diferentes elementos detetados na *substantia nigra*, utilizando o filtro para o Pb.

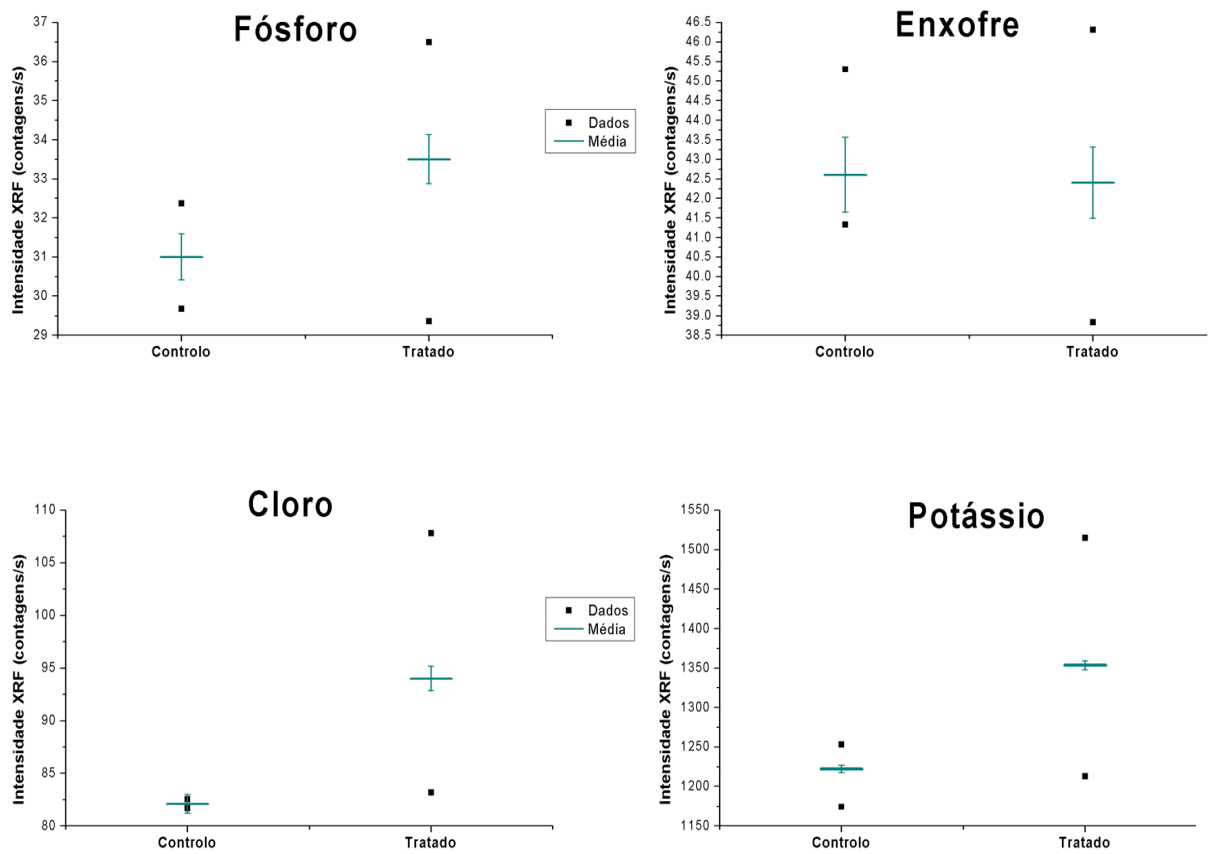


Figura 82: Intensidade de fluorescência de raios X para cada medida, e respetiva média ponderada, para os diferentes elementos detetados no estriado, utilizando o filtro para o Cl.

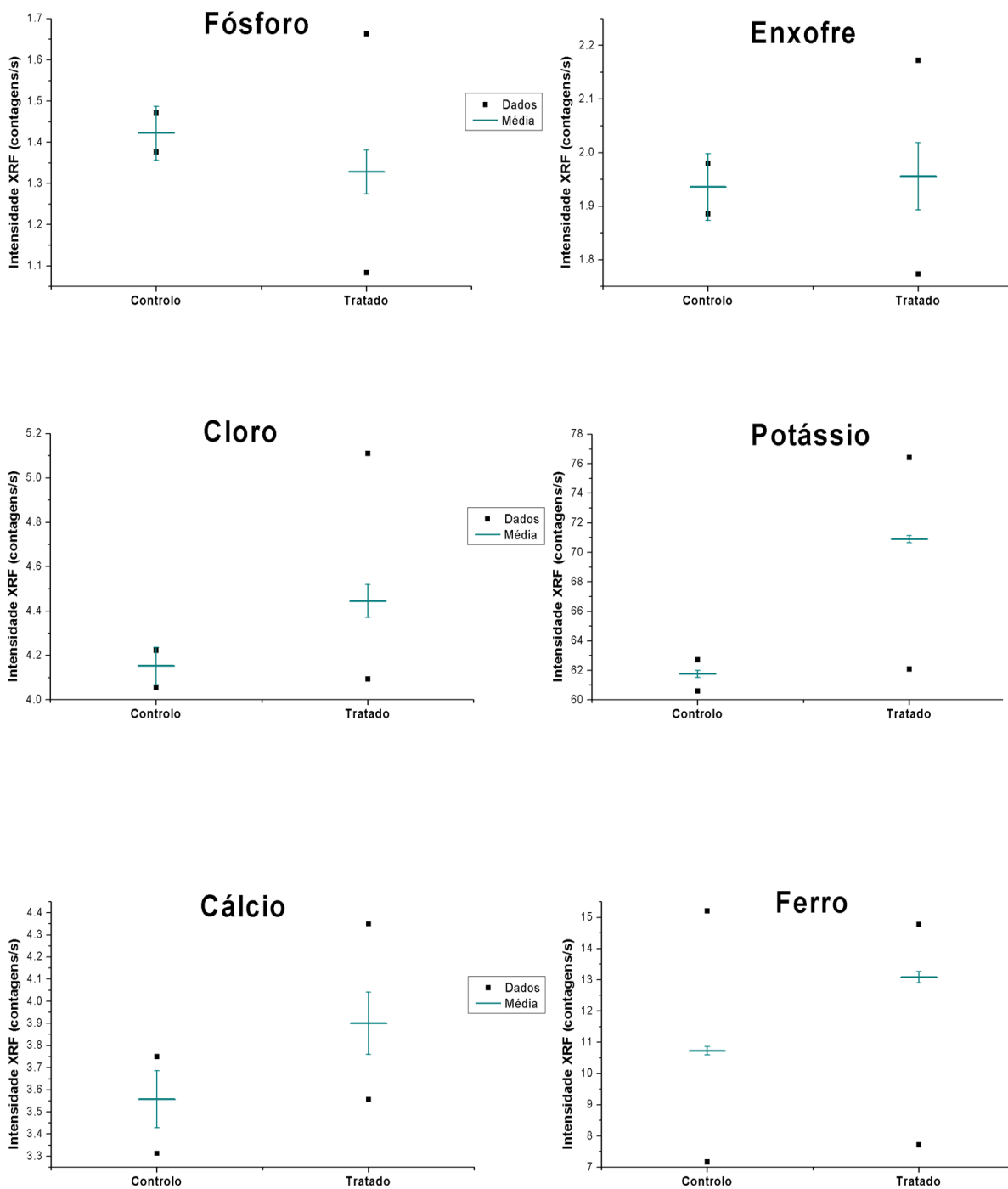


Figura 83: Intensidade de fluorescência de raios X para cada medida, e respetiva média ponderada, para os diferentes elementos detetados no estriado, utilizando o filtro para o Cr.

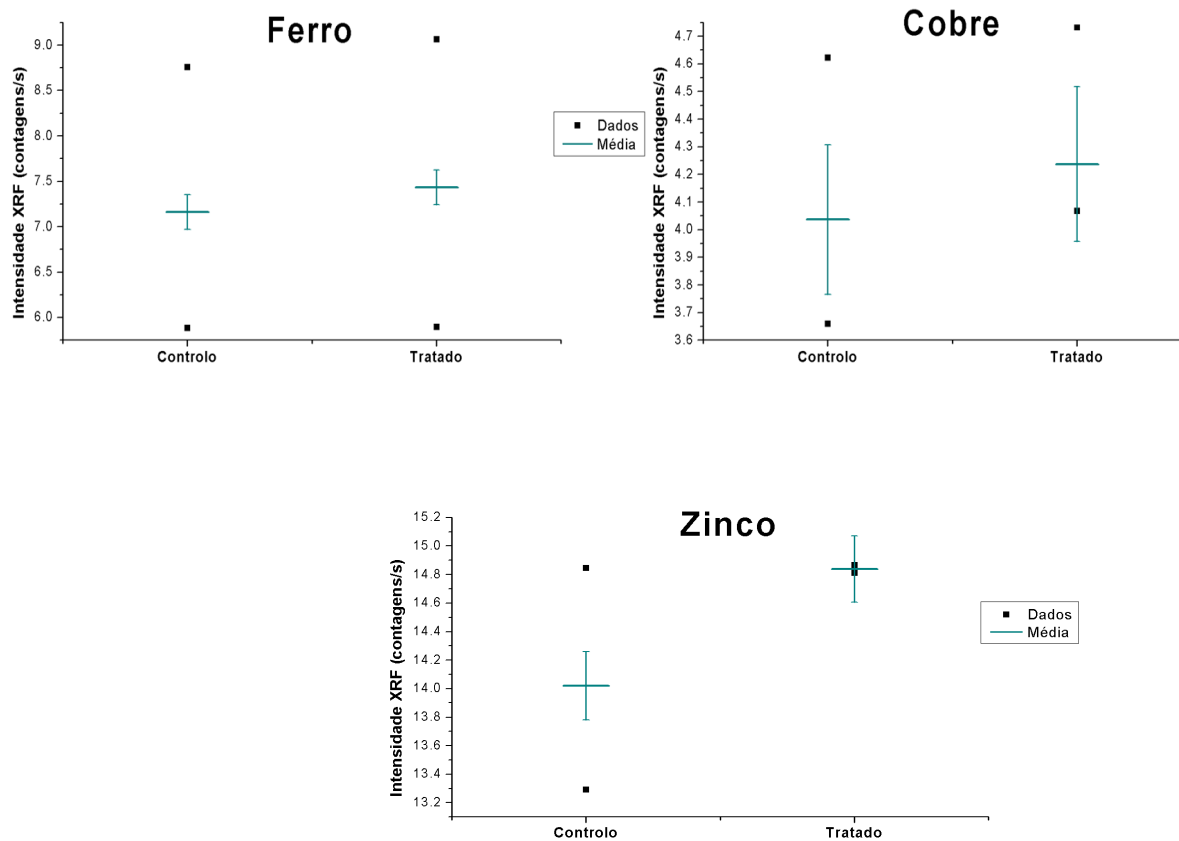


Figura 84: Intensidade de fluorescência de raios X para cada medida, e respetiva média ponderada, para os diferentes elementos detetados no estriado, utilizando o filtro para o Pb.

Para estes resultados das médias foi, ainda, realizada a sua normalização em relação à média do hemisfério do tecido cerebral de controlo. Para tal, utilizaram-se as equações 23 e 24. A tabela 30 e os gráficos da figura 85 demonstram os resultados obtidos para a região da *substantia nigra*.

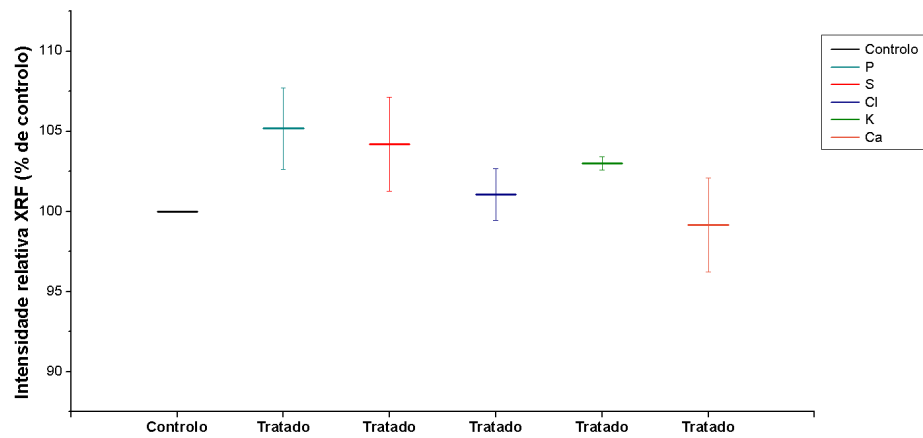
		Controlo		Tratado			
		M_{cont}	$\sigma_{M_{cont}}$	M_{trat}	$\sigma_{M_{trat}}$	$N_{trat}(\%)$	$\sigma_{N_{trat}}(\%)$
Filtro Cl	P	7.089	0.123	7.456	0.137	105.2	2.532
	S	8.233	0.177	8.579	0.170	104.2	2.922
	Cl	18.12	0.201	18.31	0.215	101.1	1.615
	K	244.4	0.695	251.7	0.732	103.0	0.407
	Ca	13.32	0.312	14.19	0.251	99.14	2.935
Filtro Cr	P	1.625	0.067	1.518	0.067	93.44	6.071
	S	1.923	0.080	2.111	0.086	109.8	5.847
	Cl	3.983	0.096	4.280	0.101	107.4	3.374
	K	61.99	0.274	63.71	0.269	102.8	0.611
	Ca	4.341	0.131	4.090	0.133	94.21	4.437
	Fe	11.95	0.183	12.71	0.168	106.4	2.022
Filtro Pb	Fe	8.749	0.171	9.158	0.165	104.7	2.659
	Cu	4.386	0.224	4.566	0.245	104.1	7.407
	Zn	13.52	0.185	13.93	0.167	103.0	1.820

Tabela 30: Médias ponderadas, normalização (controlo a 100%) e respetivos desvios padrão obtidos para os diferentes elementos para a *substantia nigra*.

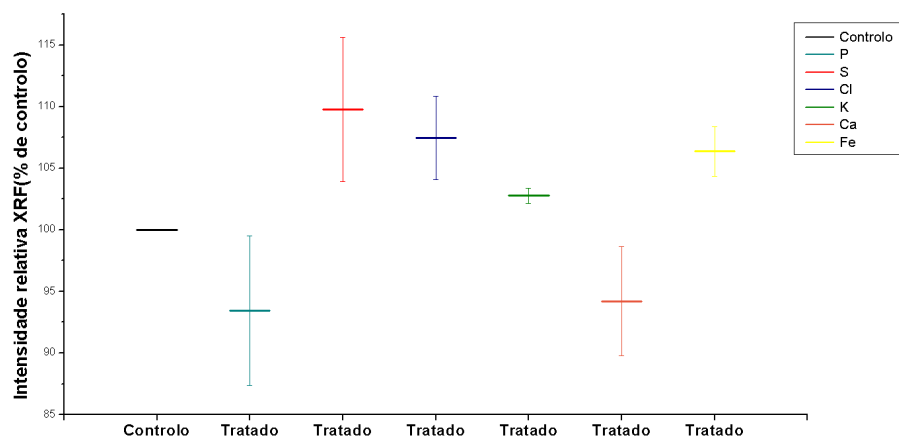
A tabela 31, assim como os gráficos da figura 86 mostram os resultados obtidos para a região do estriado.

		Controlo		Tratado			
		M_{cont}	$\sigma_{M_{cont}}$	M_{trat}	$\sigma_{M_{trat}}$	$N_{trat}(\%)$	$\sigma_{N_{trat}}(\%)$
Filtro Cl	P	31.00	0.591	33.50	0.624	108.3	2.666
	S	42.60	0.958	42.40	0.915	99.34	3.116
	Cl	82.10	0.901	94.00	1.154	114.5	1.647
	K	1222	4.566	1353	5.654	110.7	0.560
Filtro Cr	P	1.422	0.065	1.328	0.053	93.36	6.114
	S	1.936	0.062	1.956	0.063	101.1	4.543
	Cl	4.153	0.084	4.445	0.075	107.0	2.639
	K	61.76	0.237	70.88	0.242	114.8	0.514
	Ca	3.558	0.128	3.901	0.141	109.6	5.108
	Fe	10.73	0.138	13.08	0.183	121.9	1.901
Filtro Pb	Fe	7.161	0.191	7.434	0.189	103.8	3.691
	Cu	4.037	0.270	4.238	0.280	105.0	9.411
	Zn	14.02	0.240	14.84	0.233	105.8	2.324

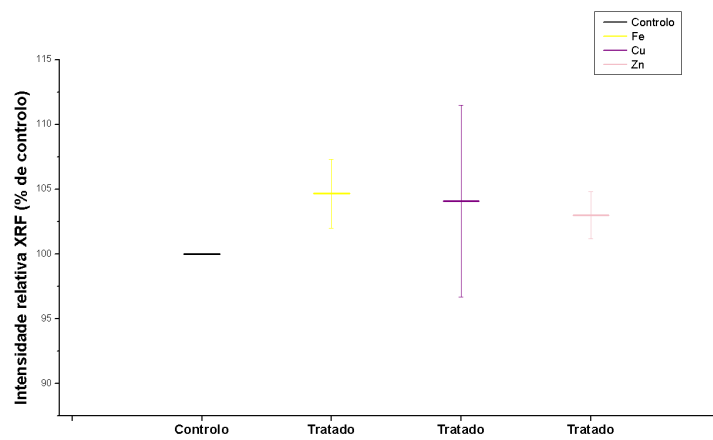
Tabela 31: Médias ponderadas, normalização (controlo a 100%) e respetivos desvios padrão obtidos para os diferentes elementos para o estriado.



(a) Filtro para o Cl

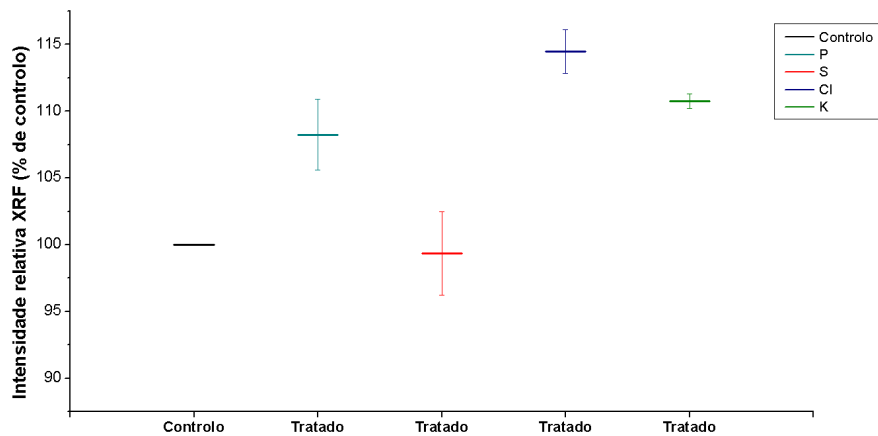


(b) Filtro para o Cr

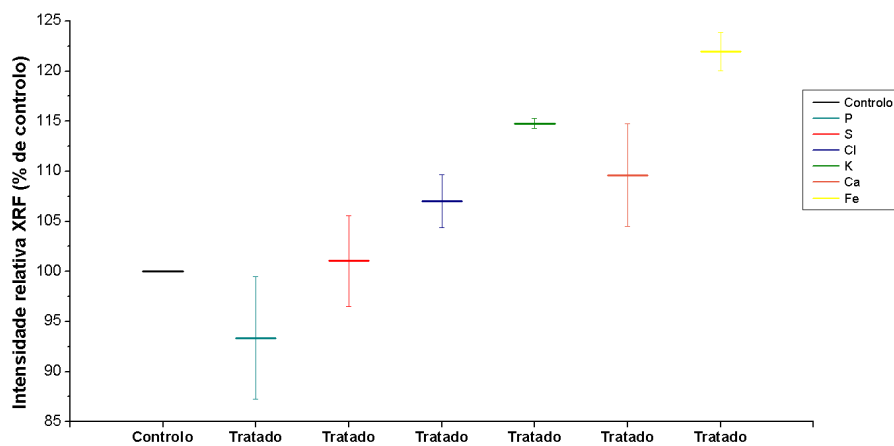


(c) Filtro para o Pb

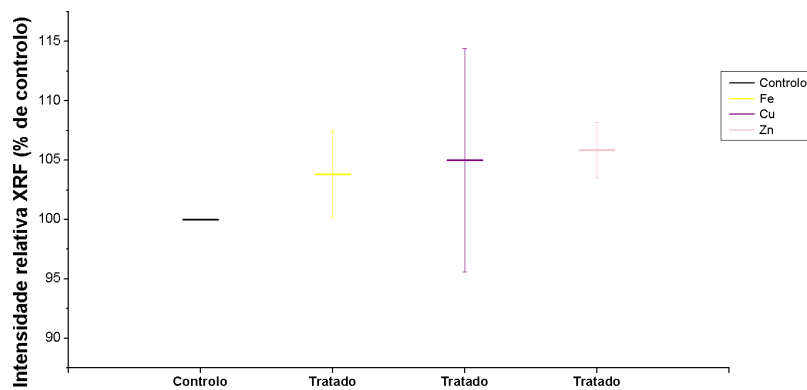
Figura 85: Resultados obtidos para as intensidades relativas de fluorescência de raios X para a região da *substantia nigra*, utilizando os diferentes filtros.



(a) Filtro para o Cl



(b) Filtro para o Cr



(c) Filtro para o Pb

Figura 86: Resultados obtidos para as intensidades relativas de fluorescência de raios X para a região do estriado, utilizando os diferentes filtros.

Observando os resultados da *substantia nigra* (Figura 85), verifica-se um aumento da concentração dos elementos S, Cl e K e uma diminuição da concentração do Ca no hemisfério tratado com a toxina, quando comparado com o hemisfério de controle, quando são utilizados ambos os filtros para o Cl e para o Cr. O elemento P exibe um comportamento diferente para os dois filtros. Em relação a elementos com energias de fluorescência superiores, como o Fe, o Cu e o Zn, todos têm tendência a aumentar no hemisfério tratado. Os resultados do Fe estão em conformidade quando se utiliza o filtro para o Cr e o filtro para o Pb.

Nos gráficos correspondentes à região do estriado (Figura 86) é possível verificar que, para os dois filtros (Cl e Cr), as intensidades relativas de fluorescência de raios X dos elementos químicos Cl e K têm tendência a aumentar no hemisfério tratado, assim como o Fe, o Cu e o Zn analisados com o filtro para o Pb. Elementos como P e S variam os seus valores consoante os filtros.

Como já foi referido anteriormente, para a *substantia nigra*, o filtro para o Cl favorece a medição dos elementos P, S, Cl, K e Ca, o filtro para o Cr o elemento de Fe e o filtro para o Pb os elementos de Cu e Zn. Assim, a tabela 32 representa as diferenças em percentagem de cada elemento do hemisfério tratado quando comparado com o controle para as melhores condições de operação. O mesmo foi realizado para o estriado, tendo em conta que P, S, Cl e K devem ser analisados com o filtro para o Cl, Ca e Fe com o filtro para o Cr e Cu, e Zn com o filtro para o Pb. A tabela 33 demonstra-o.

	Diferença (%)
P	5.174 ± 2.532
S	4.203 ± 2.922
Cl	1.064 ± 1.615
K	2.981 ± 0.407
Ca	-0.858 ± 2.935
Fe	6.369 ± 2.022
Cu	4.102 ± 7.407
Zn	3.021 ± 1.820

Tabela 32: Diferença de percentagens dos diferentes elementos na *substantia nigra* entre os dois hemisférios, obtida utilizando as melhores condições.

	Diferença (%)
P	8.249 ± 2.666
S	-0.657 ± 3.116
Cl	14.49 ± 1.647
K	10.75 ± 0.560
Ca	9.625 ± 5.108
Fe	21.94 ± 1.901
Cu	4.985 ± 9.411
Zn	5.845 ± 2.324

Tabela 33: Diferença de percentagens dos diferentes elementos no estriado entre os dois hemisférios, obtida utilizando as melhores condições.

A partir da tabela e dos dados acima, podemos concluir que para a região da *substantia nigra*, com exceção do Cl e do Ca, se observa um aumento da concentração dos elementos P, S, K, Fe e Zn para o hemisfério tratado ($\sim 3-6\%$). Enquanto que para a região do estriado, com exceção do S e do Cu, se observa um aumento da concentração dos elementos P, Cl, K, Ca, Fe e Zn para o hemisfério tratado ($\sim 6-22\%$).

4 Conclusões

A incidência das doenças neurodegenerativas, em particular a doença de Parkinson, tem vindo a aumentar ao longo dos anos, tornando a qualidade de vida de muitas pessoas bastante limitada. É essencial que sejam detetadas as diferenças das concentrações dos elementos químicos que ocorrem a nível do organismo para desenvolver uma estratégia para minimizar os efeitos deste tipo de doença. As variadas técnicas espectrométricas podem auxiliar na investigação de diferenças entre os elementos químicos existentes em tecidos e sistemas de pacientes portadores da doença e em pessoas saudáveis.

Neste trabalho, em primeiro lugar estudou-se as características da técnica espectrométrica baseada na fluorescência de raios X, assim como toda a instrumentação do sistema comercial utilizado, o SEA6000VX. De seguida tornou-se possível a investigação das melhores condições de medição para a avaliação de amostras de tecido cerebral e de olhos de ratos. O aumento da espessura das amostras de tecido cerebral, a utilização de hélio, a escolha da dimensão do feixe de raios X incidente nas amostras, a escolha da intensidade de corrente no tubo de raios X e tempos de medida apropriados para obter um tempo morto $<10\%$ e a utilização de diferentes tensões e filtros de raios X adequados ao estudo dos diferentes elementos químicos, permitiu fazer a deteção de alguns elementos com número atómico baixo, tais como P, S, Cl, K e Ca, bem como os metais de transição: Fe, Cu e Zn.

Em segundo lugar, foi injetada, no estriado do hemisfério direito do tecido cerebral dos ratos, a toxina 6-OHDA, permitindo que o hemisfério esquerdo fosse de controlo. Os olhos relativos a estes ratos foram analisados. Assim, foi possível comparar as intensidades de raios X para cada elemento nas amostras (controlo-tratado). Inicialmente a parte anterior do olho foi analisada e verificou-se que, na utilização das melhores condições, o Fe não era detetado, e que para outros elementos como P, S, Cl, K e Ca, a $SBR > 1$ e o parâmetro 3σ era inferior à intensidade de fluorescência de raios X. O elemento Zn foi identificado mas apresentava valores de $SBR < 1$ e 3σ superior à intensidade de fluorescência de raios X, provando que a intensidade de fluorescência de raios X correspondente à transição K_{α} deste elemento é inferior ao limite de deteção do sistema para este elemento e neste tipo de amostras. Embora para alguns dos elementos a dispersão nos resultados fosse elevada, as diferenças obtidas entre a média dos resultados em amostras controlo e amostras tratadas confirmou uma diminuição da concentração de todos os elementos (P, S, Cl, K, Ca e Zn) dos ratos tratados, quando analisados com as condições de operação otimizadas. Relativamente à parte posterior do olho, esta foi estudada com apenas duas amostras (uma tratada e uma controlo) e possibilitou a identificação do Fe, algo que na parte anterior do olho não tinha sido possível verificar. No entanto, como o número de amostras analisadas era pequeno não foi possível tirar conclusões relativamente às diferenças de intensidades de fluorescência de raios X dos vários elementos químicos, quando comparando a parte anterior com a parte posterior do olho, nem mesmo quando se comparou o olho controlo com o tratado na parte posterior.

Em terceiro lugar, foram realizadas análises preliminares à diferença de intensidades de raios X entre as amostras de tecido cerebral (para a região do estriado e para a região da *substantia nigra*) controlo e tratadas. Neste tipo de amostras foi possível identificar os elementos P, S, Cl, K, Ca, Fe, Cu e Zn. Para as condições de operação do sistema otimizadas, quer para a região da *substantia nigra*, quer para a região do estriado, os elementos Cl e K têm $SBR > 1$ e 3σ inferiores às intensidades de fluorescência de raios X e os elementos Ca, Fe, Cu e Zn apresentam intensidades de fluorescência de raios X inferiores

ao limite de detecção do sistema para estes elementos. Relativamente aos elementos P e S, os resultados variaram para cada região, apresentando melhores SBR e 3σ para a região do estriado. Relacionando as contagens líquidas das amostras controlo com as tratadas, na zona da *substantia nigra*, verificou-se um pequeno aumento (sempre $<10\%$) de todos os elementos das amostras tratadas à exceção do Ca. O aumento destes elementos estão de acordo com alguns estudos referido anteriormente ([43], [45], [46], [47], [48] e [50]). Relativamente à região do estriado também aumentaram todos os elementos à exceção do S. Estes resultados contrapõem-se aos obtidos para os olhos.

4.1 Limitações

- Neste trabalho, para obter os resultados discutidos a cima, foram analisados 8 olhos (3 controlo e 5 tratado) e 4 amostras de tecido cerebral (2 da região da *substantia nigra* e 2 do estriado). Devido ao baixo número de amostras analisadas as conclusões retiradas necessitam de validação estatística.
- Para conservar as amostras é necessário mantê-las a uma temperatura baixa, sendo por isso colocadas no congelador. Quando são analisadas descongelam e, consequentemente, a temperatura pode variar de $\sim -5^\circ\text{C}$ para $\sim 20^\circ\text{C}$.
- Nem todas as amostras de tecido cerebral apresentam as mesmas dimensões das regiões da *substantia nigra* e de estriado, nem a distância do ventrículo a estas regiões. Assim, o posicionamento na mesma zona de irradiação torna-se bastante complexo entre as diferentes amostras.
- Primeiramente o objetivo do trabalho era analisar a parte anterior dos olhos do rato. Apenas após a primeira medição da parte posterior e depois de analisados os resultados, se ponderou que seria melhor analisar a parte posterior dos olhos, uma vez que esta está conectada diretamente ao tecido cerebral e não está sujeita a quaisquer contaminantes ambientais diretos. No entanto as amostras de olhos já se encontravam bastante deterioradas para voltarem a ser analisadas.
- O fato de se pretender identificar elementos químicos que possuem um número atômico baixo, logo um rendimento de fluorescência das camadas K muito baixo, implica que as intensidades de fluorescência de raios X das transições K_α destes elementos sejam baixas e a razão sinal-*background* seja também baixa.

4.2 Trabalho futuro

Deste trabalho surgiram novas ideias e possibilidade de trabalhos futuros. Uma das ideias passa por determinar a sensibilidade do sistema para este tipo de amostras e para cada elemento. Por outro lado, a determinação de uma reta de calibração para os vários elementos permitirá realizar uma análise quantitativa dos elementos presentes em cada tipo de amostras, i.e. da concentração de cada elemento medida em unidades de massa da amostra irradiada ($\mu\text{g/g}$).

Outro caminho a seguir é realizar a análise completa da parte posterior dos olhos e continuar o estudo do tecido cerebral, analisando um maior número de amostras.

Referências

- [1] “Doenças neurodegenerativas.” http://www.scml.pt/pt-PT/areas_de_investigacao/doencas_neurodegenerativas/informacao_geral/. Accessed:Maio,2015.
- [2] R. F. M. Herber and M. Stoeppler, *Trace element analysis in biological specimens*, vol. 15. Elsevier, 1994.
- [3] I. A. E. A., “Elemental analysis of biological materials,” tech. rep., World Health Organization, 1980.
- [4] G. Gauglitz and T. Vo-Dinh, *Handbook of Spectroscopy*. John Wiley & Sons, 2006.
- [5] S. Jignesh, K. Vineeta, S. Abhay, and K. Vilasrao, “Analytical methods for estimation of metals,” *Int. J. Res. Pharm. Chem*, vol. 2, pp. 146–163, 2012.
- [6] S. I. Costa, “Espectrofotometria de absorção atômica.” <http://repositorio.insa.pt/bitstream/10400.18/1920/1/Espectrofotometria%20de%20Absor%C3%A7%C3%A3o%20at%C3%B3mica%20com%20chama%20e%20camara%20de%20grafite.pdf>, 2013. Accessed:Agosto,2015.
- [7] N. P. Alves, “Espectrofotometria atômica: Fundamentos e instrumentação.” <http://docplayer.com.br/4937627-Espectrofotometria-atomica-fundamentos-e-instrumentacao.html>, 2011. Accessed:Agosto,2015.
- [8] M. D. Glascock, “An overview of neutron activation analysis,” *Anais eletrônicos*, 2003.
- [9] K. S. Krane, *Introductory nuclear physics*. John Wiley and Sons Inc., New York, NY, 1987.
- [10] A. Ahuja, H. Threja, P. Singh, and H. Sahota, “Analytical techniques for trace element analysis: an overview,” *International Journal of Engineering Research and General Science*, vol. 3, pp. 887–895, 2015.
- [11] N. Eby, “Instrumental neutron activation analysis (inaa).” http://serc.carleton.edu/research_education/geochemsheets/techniques/INAA.html. Accessed:Agosto,2015.
- [12] E. Hoffmann, *Mass spectrometry*. Wiley Online Library, 1996.
- [13] W. Reusch, “Mass spectrometry.” <https://www2.chemistry.msu.edu/faculty/reusch/VirtTxtJml/Spectrpy/MassSpec/masspec1.htm>. Accessed:Agosto,2015.
- [14] D. Freude, “Mass spectrometry.” <http://home.uni-leipzig.de/energy/pdf/freuse10.pdf>. Accessed:Agosto,2015.
- [15] J. Clark, “How the mass spectrometer works.” http://chemwiki.ucdavis.edu/Analytical_Chemistry/Instrumental_Analysis/Mass_Spectrometry/How_the_Mass_Spectrometer_Works. Accessed:Agosto,2015.

- [16] P. Elmer, “Atomic spectroscopy: a guide to selecting the appropriate technique and system,” *PerkinElmer Inc.*, 2008.
- [17] K. Jurowski, B. Buszewski, and W. Piekoszewski, “The analytical calibration in (bio) imaging/mapping of the metallic elements in biological samples—definitions, nomenclature and strategies: State of the art,” *Talanta*, vol. 131, pp. 273–285, 2015.
- [18] H. Verma, “X-ray fluorescence (xrf) and particle-induced x-ray emission (paxe),” *Atomic and Nuclear Analytical Methods: XRF, Mössbauer, XPS, NAA and B63Ion-Beam Spectroscopic Techniques*, pp. 1–90, 2007.
- [19] R. Van Grieken and A. Markowicz, *Handbook of X-ray Spectrometry*. CRC Press, 2001.
- [20] E. P. Bertin, *Principles and practice of X-ray spectrometric analysis*. Springer Science & Business Media, 2012.
- [21] “The generation and nature of x-rays.” http://epmalab.uoregon.edu/pdfs/X_natur3%20Chap%203_.pdf. Accessed:Fevereiro,2015.
- [22] B. Beckhoff, B. Kanngießer, N. Langhoff, R. Wedell, and H. Wolff, *Handbook of practical X-ray fluorescence analysis*. Springer Science & Business Media, 2007.
- [23] R. Schlotz and S. Uhlig, *Introduction to X-ray Fluorescence Analysis (XRF)*. Bruker AXS GmbH, 2000-2006.
- [24] J. R. V. Fogaça, “Modelo atômico de rutherford-bohr.” <http://mundoeducacao.bol.uol.com.br/quimica/modelo-atomico-rutherford-bohr.htm>. Accessed:Fevereiro,2015.
- [25] M. C. Miller, “X ray fluorescence.” <http://www.lanl.gov/orgs/n/n1/panda/00326405.pdf>. Accessed:Fevereiro,2015.
- [26] J. Kirz and D. Attwood, “X-ray data booklet,” *X-RAY DATA BOOKLET*, p. 13, 1986.
- [27] M. J. P. Paul W. Goaz, “Production of x-rays and interactions of x-rays with matter.” http://www.columbia.edu/itc/hs/dental/sophs/material/production_xrays.pdf. Accessed:Fevereiro,2015.
- [28] C. A. Carlsson, A. Carlsson, and G. Alm, “Basic physics of x-ray imaging,” 1973.
- [29] L. Gerward, “Basic x-ray interactions with matter,” in *Imaging Processes and Coherence in Physics*, pp. 132–138, Springer, 1980.
- [30] G. F. Knoll, *Radiation detection and measurement*. Michigan: John Wiley & Sons, 4 ed., 2010.
- [31] J. J. Chavez, “Auger electron spectroscopy (aes).” <https://wiki.utep.edu/pages/viewpage.action?pageId=51217142>. Accessed:Fevereiro,2015.
- [32] R. Jenkins, “X-ray techniques: Overview,” *Encyclopedia of analytical chemistry*, 2000.

- [33] M. Berger, J. Hubbell, S. Seltzer, J. Chang, J. Coursey, R. Sukumar, D. Zucker, and K. Olsen, "XCOM: Photon cross sections database," *NIST Standard reference database*, vol. 8, 2013.
- [34] "A new era in science - xrf applications with the xgt series." <http://www.horiba.com/scientific/products/x-ray-fluorescence-analysis/applications/>. Accessed: Fevereiro, 2015.
- [35] A. da Silva Elicker, "Doenças neurodegenerativas." http://pt-br.infomedica.wikia.com/wiki/Doen%C3%A7as_Neurodegenerativas.
- [36] K. A. Jellinger, "The relevance of metals in the pathophysiology of neurodegeneration, pathological considerations," *Int. Rev. Neurobiol*, vol. 110, pp. 1–47, 2013.
- [37] S. Standring, ed., *Gray's Anatomy: The Anatomical Basis of Clinical Practice*. Churchill Livingstone, Elsevier, 40 ed., 2008.
- [38] E. S. Michael Schünke and U. Schumacher, *Atlas de anatomia: cabeça e neuroanatomia*, vol. 3. Guanabara Koogan, 1 ed., 2007.
- [39] N. I. of Neurological Disorders and Stroke, "Parkinson's disease: Challenges, progress, and promise." <https://ethnomed.org/patient-education/neurological-conditions/parkinsons/Parkinsons%20Disease%20overview.pdf>, 2004. Accessed: Abril, 2015.
- [40] M. H. Mark, ed., *Parkinson's Disease Handbook*. The American Parkinson Disease Association, Inc, 2010.
- [41] J. Bové, D. Prou, C. Perier, and S. Przedborski, "Toxin-induced models of parkinson's disease," *NeuroRx*, vol. 2, no. 3, pp. 484–494, 2005.
- [42] A. Schober, "Classic toxin-induced animal models of parkinson's disease: 6-ohda and mptp," *Cell and tissue research*, vol. 318, no. 1, pp. 215–224, 2004.
- [43] T. Tarohda, Y. Ishida, K. Kawai, M. Yamamoto, and R. Amano, "Regional distributions of manganese, iron, copper, and zinc in the brains of 6-hydroxydopamine-induced parkinsonian rats," *Analytical and bioanalytical chemistry*, vol. 383, no. 2, pp. 224–234, 2005.
- [44] K. M. Davies, S. Bohic, A. Carmona, R. Ortega, V. Cottam, D. J. Hare, J. P. Finberg, S. Reyes, G. M. Halliday, J. F. Mercer, *et al.*, "Copper pathology in vulnerable brain regions in parkinson's disease," *Neurobiology of aging*, vol. 35, no. 4, pp. 858–866, 2014.
- [45] D. T. Dexter, P. Jenner, A. H. Schapira, and C. D. Marsden, "Alterations in levels of iron, ferritin, and other trace metals in neurodegenerative diseases affecting the basal ganglia," *Annals of neurology*, vol. 32, no. S1, pp. S94–S100, 1992.
- [46] D. Dexter, F. Wells, F. Agid, Y. Agid, A. Lees, P. Jenner, and C. Marsden, "Increased nigral iron content in postmortem parkinsonian brain," *The Lancet*, vol. 330, no. 8569, pp. 1219–1220, 1987.

- [47] K. Takada, A. Ektessabi, and S. Yoshida, “SRXRF imaging of a single brain cell from a patient with parkinson’s disease,” in *The fifteenth international conference on the application of accelerators in research and industry*, vol. 475, pp. 452–455, AIP Publishing, 1999.
- [48] B. F. G. Popescu, M. J. George, U. Bergmann, A. V. Garachtchenko, M. E. Kelly, R. P. McCrea, K. Lüning, R. M. Devon, G. N. George, A. D. Hanson, *et al.*, “Mapping metals in parkinson’s and normal brain using rapid-scanning x-ray fluorescence,” *Physics in medicine and biology*, vol. 54, no. 3, p. 651, 2009.
- [49] M. Szczerbowska-Boruchowska, A. Krygowska-Wajs, and D. Adamek, “Elemental micro-imaging and quantification of human substantia nigra using synchrotron radiation based x-ray fluorescence—in relation to parkinson’s disease,” *Journal of Physics: Condensed Matter*, vol. 24, no. 24, p. 244104, 2012.
- [50] S. Takahashi, S. Hatashita, Y. Taba, X.-Z. Sun, Y. Kubota, and S. Yoshida, “Determination of the spatial distribution of major elements in the rat brain with x-ray fluorescence analysis,” *Journal of neuroscience methods*, vol. 100, no. 1, pp. 53–62, 2000.
- [51] Hitachi High-Tech Science Corporation, *Operational manual SEA6000VX*, 2013.
- [52] G. Lutz *et al.*, *Semiconductor radiation detectors*, vol. 10. Springer, 1999.
- [53] Oxford Instruments, *Silicon Drift Detectors Explained*, 2012.
- [54] T. Eggert, “Semiconductor x-ray detectors.” <http://wwwmayr.informatik.tu-muenchen.de/konferenzen/Jass04/courses/4/Tobias%20Eggert/TalkIoffe.pdf>. Accessed:Abril,2015.
- [55] W. R. Leo, *Techniques for nuclear and particle physics experiments: a how-to approach*. Springer Science & Business Media, 2012.
- [56] G. Paxinos and C. Watson, “The rat brain in stereotaxic coordinate fourth edition,” 1998.
- [57] R. Jenkins, R. Gould, and D. Gedcke, *Quantitative X-ray spectrometry*. CRC Press, 1995.
- [58] OriginLab Corporation, *Origin 8 User Guide*, 1 ed., 2012.
- [59] “Método de levenberg-marquardt.” http://webserver2.tecgraf.puc-rio.br/~mgattass/LM_Fabiola/LM_Teoria.pdf. Accessed:Agosto,2015.

Anexos

Anexo I - Resultados da análise dos olhos

Tabelas de resultados

Fósforo										
Filtro Cl										
	Olho Direito					Olho Esquerdo				
	I_{XRF}	$\sigma_{I_{XRF}}$ (%)	<i>Background</i>	SBR	3σ	I_{XRF}	$\sigma_{I_{XRF}}$ (%)	<i>Background</i>	SBR	3σ
Rato 1	5.261	5.436	2.622	2.006	4.858	4.528	6.206	2.309	1.962	4.558
Rato 2	4.319	5.209	2.459	1.757	4.704	5.372	4.114	2.312	2.323	4.562
Rato 3	4.580	5.851	2.608	1.756	4.845	4.529	5.123	2.380	1.904	4.627
Rato 4	-	-	-	-	-	4.635	4.034	2.610	1.776	4.847
Rato 5	-	-	-	-	-	4.355	3.835	2.121	2.054	4.369
Rato 6	9.839	3.659	4.382	2.245	6.280	-	-	-	-	-

Filtro Cr										
	Olho Direito					Olho Esquerdo				
	I_{XRF}	$\sigma_{I_{XRF}}$ (%)	<i>Background</i>	SBR	3σ	I_{XRF}	$\sigma_{I_{XRF}}$ (%)	<i>Background</i>	SBR	3σ
Rato 1	1.075	7.907	1.669	0.6440	3.876	0.9730	8.905	1.312	0.7418	3.436
Rato 2	0.9010	11.43	1.540	0.5851	3.723	1.119	10.81	1.582	0.7075	3.773
Rato 3	0.9440	11.55	1.433	0.6586	3.592	1.449	7.453	1.377	1.053	3.520
Rato 4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Rato 5	-	-	-	-	-	0.9020	11.97	1.375	0.6558	3.518
Rato 6	2.703	6.104	1.959	1.380	4.199	-	-	-	-	-

Tabela 34: Resultados obtidos para os diferentes olhos dos vários ratos para o elemento de Fósforo

Enxofre										
Filtro Cl										
	Olho Direito					Olho Esquerdo				
	I_{XRF}	$\sigma_{I_{XRF}}$ (%)	<i>Background</i>	SBR	3σ	I_{XRF}	$\sigma_{I_{XRF}}$ (%)	<i>Background</i>	SBR	3σ
Rato 1	15.58	2.452	3.926	3.968	5.944	10.55	2.341	3.354	3.147	5.494
Rato 2	12.17	3.213	3.275	3.716	5.429	12.27	2.558	3.650	3.363	5.731
Rato 3	11.44	2.700	3.721	3.076	5.787	12.55	2.597	3.212	3.908	5.377
Rato 4	-	-	-	-	-	13.75	2.748	3.550	3.874	5.653
Rato 5	-	-	-	-	-	10.75	3.034	2.937	3.658	5.142
Rato 6	27.74	2.581	6.666	4.161	7.746	-	-	-	-	-

Filtro Cr										
	Olho Direito					Olho Esquerdo				
	I_{XRF}	$\sigma_{I_{XRF}}$ (%)	<i>Background</i>	SBR	3σ	I_{XRF}	$\sigma_{I_{XRF}}$ (%)	<i>Background</i>	SBR	3σ
Rato 1	3.250	4.738	1.627	1.998	3.826	2.233	4.240	1.588	1.406	3.780
Rato 2	2.614	5.662	1.662	1.572	3.868	1.988	5.785	1.850	1.075	4.080
Rato 3	2.458	6.225	1.493	1.647	3.665	3.402	3.469	1.561	2.180	3.748
Rato 4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Rato 5	-	-	-	-	-	2.404	5.200	1.424	1.689	3.580
Rato 6	7.922	2.562	2.652	2.987	4.885	-	-	-	-	-

Tabela 35: Resultados obtidos para os diferentes olhos dos vários ratos para o elemento de Enxofre

Cloro										
Filtro Cl										
	Olho Direito					Olho Esquerdo				
	I_{XRF}	$\sigma_{I_{XRF}}$ (%)	<i>Background</i>	SBR	3σ	I_{XRF}	$\sigma_{I_{XRF}}$ (%)	<i>Background</i>	SBR	3σ
Rato 1	15.99	2.565	5.134	3.114	6.797	12.06	2.056	3.997	3.019	5.998
Rato 2	10.86	3.232	3.998	2.716	5.999	10.69	2.311	4.180	2.557	6.133
Rato 3	11.71	2.870	4.148	2.822	6.110	11.79	2.706	3.791	3.110	5.841
Rato 4	-	-	-	-	-	12.92	2.462	4.172	3.096	6.128
Rato 5	-	-	-	-	-	7.337	5.438	3.318	2.211	5.465
Rato 6	32.09	2.138	8.232	3.899	8.607	-	-	-	-	-

Filtro Cr										
	Olho Direito					Olho Esquerdo				
	I_{XRF}	$\sigma_{I_{XRF}}$ (%)	<i>Background</i>	SBR	3σ	I_{XRF} (%)	$\sigma_{I_{XRF}}$	<i>Background</i>	SBR	3σ
Rato 1	4.321	3.564	2.183	1.980	4.432	3.420	4.942	1.567	2.183	3.755
Rato 2	3.567	4.682	1.920	1.858	4.157	3.074	4.587	1.954	1.574	4.193
Rato 3	3.806	4.073	1.918	1.984	4.155	3.379	4.824	1.742	1.939	3.960
Rato 4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Rato 5	-	-	-	-	-	2.606	5.295	1.407	1.852	3.559
Rato 6	9.358	2.297	3.543	2.641	5.647	-	-	-	-	-

Tabela 36: Resultados obtidos para os diferentes olhos dos vários ratos para o elemento de Cloro

Potássio										
Filtro Cl										
	Olho Direito					Olho Esquerdo				
	I_{XRF}	$\sigma_{I_{XRF}}$ (%)	<i>Background</i>	SBR	3σ	I_{XRF}	$\sigma_{I_{XRF}}$ (%)	<i>Background</i>	SBR	3σ
Rato 1	55.46	0.907	3.814	14.54	5.859	33.38	1.204	3.513	9.504	5.623
Rato 2	39.66	1.707	2.858	13.88	5.072	46.85	1.127	4.386	10.680	6.283
Rato 3	38.77	1.393	3.758	10.31	5.816	40.93	1.197	2.947	13.888	5.150
Rato 4	-	-	-	-	-	46.61	1.247	3.359	13.875	5.498
Rato 5	-	-	-	-	-	29.70	1.737	2.649	11.211	4.883
Rato 6	115.9	0.6060	5.054	22.94	6.744	-	-	-	-	-

Filtro Cr										
	Olho Direito					Olho Esquerdo				
	I_{XRF}	$\sigma_{I_{XRF}}$ (%)	<i>Background</i>	SBR	3σ	I_{XRF}	$\sigma_{I_{XRF}}$ (%)	<i>Background</i>	SBR	3σ
Rato 1	14.22	1.758	1.920	7.409	4.156	9.374	2.038	1.773	5.287	3.994
Rato 2	12.57	2.276	1.475	8.519	3.643	12.38	1.809	1.863	6.648	4.095
Rato 3	11.62	2.271	1.952	5.954	4.192	11.54	2.011	1.531	7.538	3.712
Rato 4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Rato 5	-	-	-	-	-	8.721	2.270	1.413	6.172	3.566
Rato 6	37.28	0.8070	2.478	15.04	4.723	-	-	-	-	-

Tabela 37: Resultados obtidos para os diferentes olhos dos vários ratos para o elemento de Potássio

Cálcio										
	Filtro Cl									
	Olho Direito					Olho Esquerdo				
	I_{XRF}	$\sigma_{I_{XRF}}$ (%)	<i>Background</i>	SBR	3σ	I_{XRF}	$\sigma_{I_{XRF}}$ (%)	<i>Background</i>	SBR	3σ
Rato 1	21.60	1.958	3.949	5.470	5.962	8.650	4.382	3.843	2.251	5.881
Rato 2	8.542	3.653	3.864	2.211	5.897	7.771	4.079	4.205	1.848	6.152
Rato 3	5.795	5.953	4.085	1.419	6.063	6.684	6.344	3.817	1.751	5.861
Rato 4	-	-	-	-	-	12.434	3.265	4.275	2.909	6.203
Rato 5	-	-	-	-	-	6.784	4.879	3.556	1.908	5.657
Rato 6	28.60	1.832	5.547	5.156	7.065	-	-	-	-	-

Filtro Cr										
	Filtro Cr									
	Olho Direito					Olho Esquerdo				
	I_{XRF}	$\sigma_{I_{XRF}}$ (%)	<i>Background</i>	SBR	3σ	I_{XRF}	$\sigma_{I_{XRF}}$ (%)	<i>Background</i>	SBR	3σ
Rato 1	6.018	3.107	1.234	4.875	3.333	1.973	7.400	1.344	1.468	3.478
Rato 2	2.528	4.826	1.160	2.180	3.231	1.439	9.243	1.294	1.112	3.413
Rato 3	1.298	12.17	1.383	0.9380	3.529	2.255	7.007	1.043	2.162	3.064
Rato 4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Rato 5	-	-	-	-	-	1.653	7.381	1.108	1.492	3.157
Rato 6	9.537	2.254	1.862	5.121	4.094	-	-	-	-	-

Tabela 38: Resultados obtidos para os diferentes olhos dos vários ratos para o elemento de Cálcio

Zinco										
	Filtro Pb									
	Olho Direito					Olho Esquerdo				
	I_{XRF}	$\sigma_{I_{XRF}}$ (%)	<i>Background</i>	SBR	3σ	I_{XRF}	$\sigma_{I_{XRF}}$ (%)	<i>Background</i>	SBR	3σ
Rato 1	0,6710	12,54	1,207	0,5560	3,295	0,4610	15,44	1,172	0,3930	3,248
Rato 2	0,4200	20,17	1,141	0,3680	3,205	0,6290	14,68	1,212	0,5190	3,303
Rato 3	0,2970	25,64	1,079	0,2750	3,116	0,3540	18,81	1,291	0,2740	3,409
Rato 4	-	-	-	-	-	0,5950	14,06	1,105	0,5380	3,154
Rato 5	-	-	-	-	-	0,3430	18,11	1,131	0,3030	3,191
Rato 6	1,078	8,602	1,276	0,8450	3,389	-	-	-	-	-

Tabela 39: Resultados obtidos para os diferentes olhos dos vários ratos para o elemento de Zinco

Anexo II - Resultados da análise dos tecidos cerebrais

Tabelas de resultados

Substantia nigra

Filtro Cl											
		Hemisfério direito					Hemisfério esquerdo				
		I_{XRF}	$\sigma_{I_{XRF}}$ (%)	<i>Background</i>	SBR	3σ	I_{XRF}	$\sigma_{I_{XRF}}$ (%)	<i>Background</i>	SBR	3σ
P	Rato1	3.555	3.966	3.137	1.133	5.313	3.642	4.613	3.187	1.143	5.355
		3.492	4.725	3.232	1.080	5.394	3.429	3.470	3.300	1.039	5.450
	Rato2	4.135	2.950	3.273	1.263	5.428	3.955	2.984	3.122	1.267	5.300
		3.592	3.563	3.288	1.092	5.440	3.144	3.154	3.013	1.043	5.207
S	Rato1	3.987	3.787	3.653	1.091	5.734	3.972	3.978	3.665	1.084	5.743
		4.185	4.277	3.730	1.122	5.794	4.240	3.632	3.562	1.190	5.662
	Rato2	4.658	3.778	3.667	1.270	5.745	4.546	5.455	3.058	1.487	5.246
		4.376	3.976	3.621	1.208	5.709	3.725	4.295	3.431	1.086	5.557
Cl	Rato1	8.905	2.257	4.329	2.057	6.242	9.117	1.283	4.126	2.210	6.094
		10.36	2.095	4.714	2.197	6.514	11.18	2.146	4.041	2.767	6.031
	Rato2	8.302	2.650	3.907	2.125	5.930	7.400	2.676	3.931	1.883	5.948
		8.955	2.479	4.398	2.036	6.291	7.850	2.981	4.295	1.828	6.217
K	Rato1	125.4	0.6269	7.893	15.88	8.428	125.9	0.4938	7.414	16.99	8.169
		134.1	0.5488	8.642	15.52	8.819	131.4	0.5410	8.282	15.87	8.634
	Rato2	121.0	0.5397	7.635	15.85	8.289	115.2	0.6309	7.708	14.95	8.329
		124.0	0.6097	8.365	14.82	8.677	113.9	0.6357	8.207	13.88	8.594
Ca	Rato1	6.634	4.447	7.626	0.8700	8.284	6.316	5.035	7.589	0.8323	8.264
		6.881	4.767	7.712	0.8922	8.331	6.843	4.516	7.611	0.8991	8.276
	Rato2	7.007	3.168	7.670	0.9135	8.309	7.015	4.049	7.578	0.9257	8.258
		7.503	2.799	8.078	0.9288	8.527	6.465	5.166	7.556	0.8556	8.246

Tabela 40: Resultados obtidos para os diferentes elementos para a região da *substantia nigra* utilizando o filtro de Cl

Filtro Cr											
		Hemisfério direito					Hemisfério esquerdo				
		I_{XRF}	$\sigma_{I_{XRF}}$ (%)	<i>Background</i>	SBR	3σ	I_{XRF}	$\sigma_{I_{XRF}}$ (%)	<i>Background</i>	SBR	3σ
P	Rato1	0.8970	11.93	1.852	0.4843	4.083	0.8910	8.900	1.908	0.4671	4.143
		0.8790	9.159	2.004	0.4386	4.247	0.7060	8.974	2.011	0.3511	4.254
	Rato2	0.8230	6.993	2.107	0.3906	4.355	0.8600	8.280	1.922	0.4475	4.159
		0.6080	8.655	2.025	0.3002	4.269	0.7870	6.970	1.730	0.4549	3.946
S	Rato1	1.189	7.944	1.710	0.6954	3.923	0.8010	8.831	1.909	0.4196	4.145
		0.9600	6.852	2.023	0.4745	4.267	1.070	7.417	1.923	0.5565	4.160
	Rato2	0.9740	8.451	2.073	0.4698	4.319	1.098	7.585	1.884	0.5830	4.117
		1.089	9.275	1.948	0.5589	4.187	0.8950	10.12	1.806	0.4956	4.031
Cl	Rato1	2.061	4.413	2.010	1.026	4.253	2.341	4.912	1.971	1.188	4.211
		2.473	3.615	2.189	1.130	4.438	2.510	4.263	2.064	1.216	4.310
	Rato2	1.832	5.274	2.217	0.8263	4.467	1.637	5.061	2.176	0.7524	4.425
		2.010	6.816	2.145	0.9371	4.394	1.837	4.757	2.070	0.8877	4.316
K	Rato1	31.72	0.8291	2.699	11.75	4.928	31.39	0.8378	2.918	10.76	5.125
		33.68	0.9619	2.972	11.33	5.172	33.40	0.7694	3.028	11.03	5.220
	Rato2	30.91	0.9092	2.830	10.92	5.047	29.59	1.064	2.690	11.00	4.921
		31.60	0.6678	2.963	10.66	5.164	28.91	0.9097	2.892	9.997	5.102
Ca	Rato1	2.052	7.359	1.783	1.151	4.005	1.794	7.804	1.850	0.9700	4.080
		1.798	6.563	1.966	0.9146	4.206	2.116	8.459	1.862	1.136	4.094
	Rato2	2.215	5.373	1.731	1.280	3.947	2.326	4.600	1.672	1.391	3.880
		2.099	6.765	1.709	1.228	3.922	2.229	5.338	1.656	1.346	3.860
Fe	Rato1	4.948	3.193	7.946	0.6227	8.457	5.260	2.852	8.007	0.6570	8.489
		5.992	2.487	8.189	0.7317	8.585	5.273	3.660	8.700	0.6061	8.849
	Rato2	6.732	3.015	8.710	0.7729	8.854	5.238	3.322	8.298	0.6312	8.642
		8.601	1.965	8.649	0.9945	8.823	8.530	2.520	8.346	1.022	8.667

Tabela 41: Resultados obtidos para os diferentes elementos para a região da *substantia nigra* utilizando o filtro de Cr

Filtro Pb											
		Hemisfério direito					Hemisfério esquerdo				
		I_{XRF}	$\sigma_{I_{XRF}}$ (%)	<i>Background</i>	SBR	3σ	I_{XRF}	$\sigma_{I_{XRF}}$ (%)	<i>Background</i>	SBR	3σ
Fe	Rato1	3.833	4.305	8.349	0.4591	8.669	3.533	4.444	8.443	0.4185	8.717
		4.085	3.647	8.690	0.4701	8.844	4.138	4.181	8.647	0.4786	8.822
	Rato2	4.578	3.648	8.678	0.5276	8.837	4.407	4.402	8.195	0.5378	8.588
		5.489	3.279	8.519	0.6443	8.756	5.597	2.876	8.400	0.6663	8.695
Cu	Rato1	2.193	6.657	8.608	0.2548	8.802	2.273	9.943	8.349	0.2723	8.668
		2.468	11.38	8.808	0.2802	8.904	2.199	11.87	8.856	0.2483	8.928
	Rato2	2.273	12.45	8.860	0.2565	8.930	2.135	8.150	8.511	0.2508	8.752
		2.153	12.17	8.733	0.2465	8.866	2.189	10.87	8.533	0.2565	8.763
Zn	Rato1	6.752	2.414	8.797	0.7676	8.898	6.288	3.053	8.727	0.7206	8.862
		6.811	2.437	9.183	0.7417	9.091	7.066	3.071	9.149	0.7723	9.074
	Rato2	7.040	2.401	9.113	0.7726	9.056	6.588	2.262	8.786	0.7499	8.892
		7.272	2.338	9.048	0.8037	9.024	7.043	2.683	8.836	0.7971	8.917

Tabela 42: Resultados obtidos para os diferentes elementos para a região da *substantia nigra* utilizando o filtro de Pb

Estriado

Filtro Cl											
		Hemisfério direito					Hemisfério esquerdo				
		I_{XRF}	$\sigma_{I_{XRF}}$ (%)	<i>Background</i>	SBR	3σ	I_{XRF}	$\sigma_{I_{XRF}}$ (%)	<i>Background</i>	SBR	3σ
P	Rato1	14.74	4.777	15.07	0.9781	11.64	17.36	3.831	14.50	1.197	11.42
		14.62	4.563	15.10	0.9677	11.66	12.32	3.927	15.56	0.7921	11.83
	Rato2	19.82	3.174	17.99	1.101	12.72	15.96	3.722	14.72	1.084	11.51
		16.69	3.116	16.76	0.9954	12.28	16.42	3.697	15.36	1.069	11.76
S	Rato1	20.35	4.623	16.28	1.250	12.11	23.63	4.194	16.17	1.461	12.06
		18.48	4.535	16.32	1.132	12.12	17.70	3.526	15.98	1.108	11.99
	Rato2	24.20	3.575	20.15	1.200	13.47	20.57	5.601	15.76	1.305	11.91
		22.11	4.576	18.91	1.170	13.04	24.74	4.855	16.41	1.507	12.15
Cl	Rato1	40.40	2.726	21.60	1.870	13.94	37.76	2.362	21.15	1.786	13.79
		42.77	2.527	21.94	1.949	14.05	43.95	2.116	21.39	2.054	13.85
	Rato2	54.98	2.450	25.77	2.134	15.23	37.86	2.345	21.32	1.776	13.85
		52.83	2.082	26.40	2.001	15.42	44.66	2.006	21.24	2.103	13.83
K	Rato1	589.5	0.8634	43.65	13.50	19.82	570.7	0.8291	42.54	13.42	19.57
		623.2	0.9335	42.77	14.57	19.62	603.4	0.9169	43.34	13.92	19.75
	Rato2	760.0	0.7998	45.56	16.6821	20.25	576.9	0.5972	33.31	17.32	17.31
		755.0	0.7466	46.61	16.20	20.48	676.1	0.7013	39.12	17.28	18.76

Tabela 43: Resultados obtidos para os diferentes elementos para a região do estriado utilizando o filtro de Cl

Filtro Cr											
		Hemisfério direito					Hemisfério esquerdo				
		I_{XRF}	$\sigma_{I_{XRF}}$ (%)	<i>Background</i>	SBR	3σ	I_{XRF}	$\sigma_{I_{XRF}}$ (%)	<i>Background</i>	SBR	3σ
P	Rato1	0.5120	9.315	1.726	0.2966	3.941	0.7750	8.465	1.742	0.4448	3.960
		0.5710	8.987	1.748	0.3266	3.967	0.6020	10.39	1.682	0.3578	3.891
	Rato2	0.9010	7.011	1.931	0.4666	4.169	0.6940	8.559	1.692	0.4103	3.902
		0.7620	6.947	2.005	0.3801	4.248	0.7780	9.510	1.695	0.4589	3.906
S	Rato1	0.9100	6.876	1.688	0.5392	3.897	1.030	6.664	1.725	0.5971	3.940
		0.8630	6.701	1.676	0.5149	3.884	0.8560	6.925	1.746	0.4904	3.964
	Rato2	1.123	5.589	2.015	0.5574	4.258	0.8720	6.533	1.800	0.4845	4.025
		1.049	6.488	1.919	0.5466	4.156	1.108	5.777	1.744	0.6354	3.962
Cl	Rato1	2.012	3.136	1.894	1.062	4.128	1.772	5.325	1.861	0.9524	4.092
		2.082	3.233	1.833	1.136	4.062	2.282	4.024	1.929	1.183	4.167
	Rato2	2.557	3.416	2.203	1.161	4.453	1.948	3.248	1.921	1.014	4.157
		2.553	3.615	2.241	1.139	4.491	2.274	3.965	1.838	1.237	4.067
K	Rato1	30.20	0.8910	2.641	11.43	4.876	29.53	0.8200	2.505	11.79	4.749
		31.87	0.8820	2.799	11.39	5.019	31.08	0.8270	2.687	11.5644	4.918
	Rato2	38.08	0.5730	3.007	12.66	5.202	29.08	0.6880	2.712	10.73	4.941
		38.34	0.5690	3.044	12.59	5.234	33.63	0.7460	2.895	11.62	5.104
Ca	Rato1	1.873	7.528	1.606	1.166	3.802	1.606	7.721	1.573	1.021	3.763
		1.683	7.427	1.777	0.9473	3.999	1.707	8.729	1.822	0.9370	4.049
	Rato2	2.105	6.318	1.904	1.105	4.140	1.748	6.522	1.575	1.110	3.765
		2.245	7.394	1.815	1.237	4.042	2.002	6.394	1.584	1.264	3.775
Fe	Rato1	3.356	10.31	7.509	0.4469	8.221	3.172	3.689	7.274	0.4361	8.091
		4.359	3.304	7.493	0.5817	8.212	4.004	3.571	7.265	0.5512	8.086
	Rato2	5.751	2.469	8.407	0.6840	8.699	5.488	2.624	7.486	0.7331	8.208
		9.021	1.718	7.856	1.148	8.408	9.708	1.535	7.542	1.287	8.239

Tabela 44: Resultados obtidos para os diferentes elementos para a região do estriado utilizando o filtro de Cr

Filtro Pb											
		Hemisfério direito					Hemisfério esquerdo				
		I_{XRF}	$\sigma_{I_{XRF}}$ (%)	<i>Background</i>	SBR	3σ	I_{XRF}	$\sigma_{I_{XRF}}$ (%)	<i>Background</i>	SBR	3σ
Fe	Rato1	2.620	7.252	7.569	0.3462	8.253	2.883	6.278	7.153	0.4031	8.023
		3.278	5.583	6.947	0.4719	7.907	2.999	6.069	7.001	0.4284	7.938
	Rato2	4.041	4.529	7.655	0.5279	8.300	3.407	5.577	7.569	0.4501	8.254
		5.024	4.001	7.525	0.6676	8.230	5.352	4.017	7.104	0.7533	7.996
Cu	Rato1	2.066	11.036	7.670	0.2694	8.308	1.923	10.71	7.881	0.2440	8.422
		2.002	11.54	7.284	0.2749	8.097	1.736	16.07	7.388	0.2350	8.154
	Rato2	2.506	15.60	7.496	0.3343	8.214	2.573	14.34	7.563	0.3402	8.250
		2.226	17.61	7.482	0.2975	8.206	2.050	10.98	7.245	0.2830	8.075
Zn	Rato1	7.132	3.141	7.766	0.9184	8.360	6.568	3.471	7.804	0.8417	8.380
		7.733	3.207	7.240	1.068	8.072	6.723	3.525	7.166	0.9382	8.031
	Rato2	7.296	3.495	7.897	0.9239	8.430	6.980	3.410	8.044	0.8677	8.509
		7.516	2.688	7.837	0.9590	8.398	7.867	3.279	7.423	1.060	8.174

Tabela 45: Resultados obtidos para os diferentes elementos para a região do estriado utilizando o filtro de Pb