

UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA ELÉTRICA E
INFORMÁTICA INDUSTRIAL

PRISCILA RESMER CASTILHO

**ESTUDO DA APLICAÇÃO DA TÉCNICA DE ED-XRF PARA
CARACTERIZAÇÃO ELEMENTAR DE TECIDOS MAMÁRIOS**

DISSERTAÇÃO

CURITIBA

2014

PRISCILA RESMER CASTILHO

**ESTUDO DA APLICAÇÃO DA TÉCNICA DE ED-XRF PARA
CARACTERIZAÇÃO ELEMENTAR DE TECIDOS MAMÁRIOS**

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Elétrica e Informática Industrial da Universidade Tecnológica Federal do Paraná como requisito parcial para obtenção do grau de “Mestre em Ciências” - Área de Concentração: Engenharia Biomédica.

Orientador: Prof. Dr. Sergei Anatolyevich Paschuk

Co-orientador: Prof. Dr. André Luiz Coelho
Conceição

CURITIBA

2014

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação

C352e Castilho, Priscila Resmer
2014 Estudo da aplicação da técnica de ED-XRF para
caracterização elementar de tecidos mamários / Priscila
Resmer Castilho.-- 2014.
84 f. : il. ; 30 cm

Texto em português, com resumo em inglês.
Dissertação (Mestrado) - Universidade Tecnológica
Federal do Paraná. Programa de Pós-Graduação em Engenharia
Elétrica e Informática Industrial, Curitiba, 2014.
Bibliografia: f. 69-78.

1. Espectroscopia de fluorescência. 2. Espectroscopia
de raios X. 3. Mama - Câncer. 4. Tecidos (Anatomia
e fisiologia) - Análise. 5. Filtros e filtração. 6.
Calibração. 7. Medição. 8. Elementos traços. 9. Engenharia
biomédica. 10. Engenharia elétrica - Dissertações.
I. Paschuk, Sergei Anatolyevich, orient. II. Conceição,
André Luiz Coelho, coorient. III. Universidade Tecnológica
Federal do Paraná - Programa de Pós-Graduação em Engenharia
Elétrica e Informática Industrial. IV. Título.

CDD 22 -- 621.3

Título da Dissertação N°. _____

Estudo da Aplicação da Técnica de ED-XRF para Caracterização de Tecidos Mamários Neoplásicos.

por

Priscila Resmer Castilho.

Orientador: Prof. Dr. Sergei Anatolyevich Paschuk
Coorientador: Prof. Dr. André Luiz Coelho Conceição.

Esta dissertação foi apresentada como requisito parcial à obtenção do grau de MESTRE EM CIÊNCIAS – Área de Concentração: Engenharia Biomédica do Programa de Pós-Graduação em Engenharia Elétrica e Informática Industrial – CPGEI – da Universidade Tecnológica Federal do Paraná – UTFPR, às 9h00 do dia 27 de agosto de 2014. O trabalho foi aprovado pela Banca Examinadora, composta pelos professores doutores:

Prof. Dr. Sergei Anatolyevich Paschuk
(Presidente – UTFPR)

Prof. Dr. Valeriy Denyak
(INST. PEQUENO PRÍNCIPE)

Prof. Dr. Joaquim Teixeira de Assis
(UERJ)

Prof.^a Dr.^a Janine Nicolosi Corrêa
(UTFPR)

Visto da coordenação:

Prof. Emilio Carlos Gomes Wille, Dr.
(Coordenador do CPGEI)

Dedico este trabalho às mulheres.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pela vida.

Agradeço aos meus pais Mauro Luiz Resmer e Marília Sueli Resmer por me conceberem, me educarem e me amarem tanto.

Agradeço imensamente ao meu esposo, Rogério Chequer Castilho por toda a paciência, companheirismo e por acreditar tanto em mim.

Agradeço aos meus irmãos Giovana Resmer Mayor e Juliano Prevedello Resmer por estarem sempre comigo, e por todo estímulo.

Agradeço a todos meus professores, que me ensinaram, e me permitiram chegar até aqui.

Agradeço à Universidade Tecnológica Federal do Paraná por disponibilizar este Programa de Pós-Graduação, e tornar dele uma referência, assim como por ter me aceitado como aluna.

Agradeço em especial ao professor Dr. Sergei Anatolyevich Paschuk por me aceitar como sua orientada, mesmo sem me conhecer; pelos conselhos, que sempre foram tão bem-vindos, e por toda a sua orientação.

Agradeço ao professor Dr. André Luiz Coelho Conceição pelas orientações, pela disponibilidade, e por me permitir que usasse suas amostras para desenvolver esta pesquisa.

Agradeço ainda de forma especial ao professor Dr. Valeriy Denyak por estar sempre presente, e por tanto ter me ajudado no desenvolvimento desta dissertação.

Agradeço também a todos os colegas do laboratório por me permitirem estar junto com esta equipe. Em especial à professora Dr. Janine Nicolosi Corrêa pela acolhida ao laboratório, assim como à professora Dr. Jaqueline Kappke. Agradeço ainda, especialmente, aos colegas Alessandro Luiz de Lara, por tanto auxílio, assim como Alana Caroline França, Flávia Del Claro, Catarina A. M. T. Torres, Danielle Narloch, Allan Felipe N. Perna e Manoel R. Martins, e todos que sempre foram tão prestativos e atenciosos.

E agradeço à CAPES pelo auxílio financeiro.

"Divido com você uma maçã e temos metade cada. Divido com você meu conhecimento e temos o triplo: o seu, o meu e o que resultou da interação."

Lala Deheinzelin

RESUMO

CASTILHO, Priscila Resmer. Estudo da aplicação da técnica de ED-XRF para caracterização elementar de tecidos mamários. 2014. 84 f. Dissertação - Programa de Pós-Graduação em Engenharia Elétrica e Informática Industrial, Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Curitiba, 2014.

O câncer de mama deve atingir cerca de 57.120 novos pacientes no Brasil em 2014, como divulgado pelo serviço de epidemiologia do Instituto Nacional de Câncer. Pesquisadores têm associado neoplasias mamárias às alterações nas concentrações de alguns elementos no tecido da mama, tais como: cálcio, ferro, cobre e zinco. Neste sentido a técnica de espectroscopia por fluorescência de raios X surge como uma ferramenta para caracterização elementar deste tipo de tecido. A eficácia da referida técnica é fortemente dependente do espectro de raios X incidente na amostra, bem como do procedimento de calibração do sistema de medição. Neste trabalho foi avaliada a influência dos filtros de alumínio na eficiência de medição das concentrações dos elementos atrelados à neoplasias mamárias e avaliação das concentrações mínimas que o equipamento do Laboratório de Física Nuclear Aplicada da Universidade Tecnológica Federal do Paraná é capaz de registrar. O equipamento sob investigação foi o da Amptek composto por um *kit* de um tubo de raios X modelo *Mini-X* e um detector do modelo *X-123SD*. Dos resultados, observou-se que para a quantificação dos referidos elementos simultaneamente, o uso de filtros de Al com espessura de 0,25 mm proporciona melhor eficácia na excitação dos mesmos. Além disso, foi verificado que são necessárias curvas de calibração específicas para cada elemento, as quais foram obtidas com cinco padrões biológicos da Agência Internacional de Energia Atômica. Os resultados permitiram comparar as concentrações dos padrões certificados aos obtidos pelos cálculos, assim como quantificar duas amostras de tecido mamário de características neoplásicas.

Palavras-chave: ED-XRF. Tecidos mamários. Caracterização elementar. Curvas de calibração. Elementos-traço.

ABSTRACT

CASTILHO, Priscila Resmer. Application study of ED-XRF technique for elemental characterization of breast tissue. 2014. 84 f. Dissertation – Graduate Program in Electrical Engineering and Industrial Informatics emphasis in Biomedical Engineering, of Technology Federal University – Paraná (UTFPR). Curitiba, 2014.

Breast cancer can reach around 57.120 new cases in Brazil in 2014, according the service of epidemiology in the National Cancer Institute. Researchers have been associated mammary neoplasm with changes of elements concentrations such as: calcium, iron, copper and zinc. In this way the technique of X-Ray Fluorescence appears like a tool to characterize this kind of neoplasm. The effectiveness of this technique is strongly dependent of X-ray spectrum incident on the sample as well as the calibration procedure of the measuring system. In present work, were evaluated the influence of aluminum filters on the measurement efficiency of the concentrations of the elements changed in mammary neoplasm and to evaluate the minimum concentrations that the equipment of the Laboratory of Applied Nuclear Physics at Federal University of Technology – Paraná is capable to register. The equipment under study was the Amptek kit of X-ray tube *Mini-X* and detector *X-123SDD*. The results obtained shown a simultaneous analysis, in that Al filters with thicknesses of 0.25 mm provides the best efficiency. Besides, it was verified that specific calibration curves for each element was required, and it were obtained with five biological standards of International Atomic Energy Agency. The results made possible to compare the concentration of biological standards certificates with the equation obtained, in addition to analyze quantitatively two sample of breast tissue.

Keywords: ED-XRF. Breast tissues. Elemental characterization. Calibration curves. Trace elements.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Diferenciações no parênquima e estroma de tecido mamário normal e neoplásico.	23
Figura 2 – Interações típicas do elétron com o alvo. Em “a” o elétron sofre perdas de ionização resultando em raios delta e eventualmente em calor.....	29
Figura 3 – Diagrama esquemático para um átomo de tungstênio.....	30
Figura 4 - Predominância dos efeitos dominantes do número atômico (Z) do meio absorvedor em função da energia do fóton, em Megaelétron Volts (MeV).....	32
Figura 5 – Representação esquemática do efeito fotoelétrico	32
Figura 6 – Coeficiente de atenuação do efeito fotoelétrico (cm^2/g) em relação à energia do fóton (MeV) para os elementos Ca, Fe, Cu e Zn.....	35
Figura 7 – Intensidade relativa pelo comprimento de onda (Å).....	37
Figura 8 – Relação de fluência ou exposição em relação à energia	38
Figura 9 – Esquema ilustrativo de um detector multicanais.....	39
Figura 10 – Típico espectro de raios X com demonstração dos picos $K\alpha$ do Mn e do Fe	41
Figura 11 – Componentes estruturais do detector	45
Figura 12 – Arranjo experimental	46
Figura 13 – Filtro de alumínio (Al)	47
Figura 14 – Posicionamento do molde plástico e amostras em relação ao tubo de raios X e detector	50
Figura 15 – Erro relativo dos elementos Ca, Fe, Cu e Zn (em porcentagem) em função da espessura dos filtros de Al (em mm, no eixo x)	54
Figura 16 – Espectro do padrão biológico V8 da IAEA	57
Figura 17 – Comparativo de espectros	57
Figura 18 – Intensidade do pico de Ca em relação à concentração (em mg/kg) da amostra....	59
Figura 19 – Intensidade do pico de Fe em relação à concentração (em mg/kg) da amostra. ...	60
Figura 20 – Intensidade do pico de Cu em relação à concentração (em mg/kg) da amostra. ..	61
Figura 21 – Intensidade do pico de Zn em relação à concentração (em mg/kg) da amostra....	62

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Função desempenhada no organismo pelos elementos-traço de neoplasias de tecido mamário	27
Tabela 2 - Especificações do Desempenho da Espectroscopia	46
Tabela 3 -Concentração IAEA e obtida pela curva de calibração para Ca.....	63
Tabela 4 - Concentração IAEA e obtida pela curva de calibração para Fe	63
Tabela 5 - Concentração IAEA e obtida pela curva de calibração para Cu	64
Tabela 6 - Coconcentração IAEA e obtida pela curva de calibração para Zn.....	64
Tabela 7 - Análise quantitativa para tecido neoplásico mamário benigno	65
Tabela 8 - Análise quantitativa para tecido neoplásico mamário maligno.....	65

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- ADC – Analog to digital converter – Conversor analógico para digital
- DCIS – Ductal carcinoma *in situ* – Carcinoma ductal *in situ*
- DNA – Deoxyribonucleic acid – Ácido desoxirribonucléico
- ETDA – Ethylenediamine tetraacetic acid – Ácido etilenodiaminotetracético
- ED-XRF – Energy dispersive X-Ray Fluorescence – Fluorescência de raios X por dispersão em energia
- FET – Field-effect transistor – Transistor de campo-efeito
- FWHM - Full width at half maximum – Largura a meia altura
- INCA – Instituto nacional do câncer
- IAEA – International atomic energy agency – Agência internacional de energia atômica
- ICR - Integrated client radio – Integração rádio cliente
- Mcps – Mega contagens por segundo
- MMPs – Matrix metalloproteinases – Metaloproteinases de matriz
- OMS – Organização mundial de saúde
- RNA – Ribonucleic acid – Ácido ribonucléico
- SDD – Si Drift Diodo – Diodo de silício (Si)
- TIMPs – Tissue inhibitors metalloproteinases – Inibidores de tecidos de metaloproteinases
- TXRF – Total Reflection X-Ray Fluorescence – Fluorescência de raios X por reflexão total
- UTFPR – Universidade Tecnológica Federal do Paraná
- XRF – X-Ray Fluorescence – Fluorescência de raios X
- VEGF - Vascular endothelial growth factor – Fator de crescimento vascular endotelial
- μ XRF – micro X-Ray Fluorescence – Microfluorescência de raios X

LISTA DE SÍMBOLOS

$\alpha\tau$: Seção de choque para efeito fotoelétrico

Bl: *Background* esquerdo é a área usada para calcular o *background* esquerdo do centro do pico

Br: *Background* direito é a área usada para calcular o *background* direito do centro do pico

c: Velocidade da luz

C_a : Concentração da amostra

E_k : Energia cinética

E_b : Energia de ligação do elétron

f : Frequência

G: Soma de todas as contagens abaixo do pico marcado, excluindo os picos de *background*

h : Constante de Planck

hf_K : Energia de ligação na camada K

hf_L : Energia de ligação na camada L

I: Intensidade do feixe

I_0 : Intensidade inicial do feixe

I_E : Intensidade fluorescente do elemento de interesse

I_{EN} : Intensidade fluorescente do elemento de interesse normalizado

I_{ESP} : Intensidade fluorescente do espalhamento

k : Constante

K_α : Energia de ligação entre as subcamadas L e K da eletrosfera do átomo

K_β : Energia de ligação entre as subcamadas M e K da eletrosfera do átomo

n: Largura de ambos os campos de *background*

N: Número de canais abaixo do pico

S_a : Sensibilidade da amostra

x : Espessura do material

Z: Número de elétrons por átomo de um elemento ou pela molécula que o compõe

σ : Desvio padrão

σ_m : Desvio padrão do valor médio

Σ : Somatório

λ : Comprimento de onda

ϕ : Ângulo de espalhamento representado pela letra grega *phi*

θ : Ângulo de espalhamento representado pela letra grega *Theta*

$\mu(E)$: Coeficiente de atenuação linear do meio

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	17
1.1 OBJETIVOS	20
1.1.1 Objetivo Geral	20
1.1.2 Objetivos Específicos	20
1.2 ESTRUTURA DA DISSERTAÇÃO.....	21
2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	22
2.1 Neoplasias	22
2.1.1 Neoplasias mamárias	25
2.1.1.1 Importância dos elementos-traço em neoplasias	26
2.1.1.2 Elementos-traço em tecidos mamários	27
2.2 Física das radiações	29
2.2.1 Produção de raios X.....	29
2.2.1.1 Raios X característicos.....	30
2.2.2 Interação da radiação com a matéria	31
2.2.2.1 Efeito fotoelétrico	32
2.2.2.2 Atenuação e seção de choque para o efeito fotoelétrico	33
2.2.3 Fluorescência de raios X.....	35
2.2.1 Vantagens e desvantagens da ED-XRF	36
2.2.1.1 Espectroscopia	37
2.3 Fatores que influenciam a ED-XRF.....	38
2.3.1 Filtros.....	38
2.3.2 Detectores de raios X.....	39
2.3.2.1 Detectores semicondutores	39
2.3.2.2 Pré-amplificadores e amplificadores.....	40
2.3.2.3 Analisadores multicanais	40
2.4 Estatísticas	41
2.4.1 Estatísticas e obtenção de curvas espectrais	42
2.4.2 Cálculo do espalhamento Compton.....	42
2.4.3 Normalização da curva de calibração	42
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	44
3.1 Características do equipamento	44
3.1.1 Tubo de raios X	44

3.1.2	Detector	44
3.1.3	Arranjo experimental	45
3.1.4	Desempenho	46
3.1.5	Ajustes e calibração do espectro.....	47
3.2	Filtros de Alumínio	47
3.3	Curva de calibração	48
3.3.1	Preparação dos padrões de amostras	48
3.3.2	A técnica	49
3.3.3	Normalização da curva de calibração.....	51
3.4	Amostras de neoplasias mamárias	52
3.4.1	Análise quantitativa	53
4.	RESULTADOS E DISCUSSÕES	54
4.1	Filtro de Al.....	54
4.1.1	O uso de filtros de Al e suas interferências para o elemento Ca	55
4.1.2	O uso de filtros de Al e suas interferências para o elemento Fe.....	55
4.1.3	O uso de filtros de Al e suas interferências para o elemento Cu.....	55
4.1.4	O uso de filtros de Al e suas interferências para o elemento Zn	55
4.1.5	Avaliação da análise gráfica	56
4.2	Otimização da técnica	56
4.2.1	Técnica ideal para análise de todos os elementos simultaneamente	58
4.3	Curvas de Calibração	59
4.3.1	Cálcio.....	59
4.3.2	Ferro	60
4.3.3	Cobre	61
4.3.4	Zinco	62
4.4	Análise quantitativa	62
4.4.1	Fibroadenoma	65
4.4.2	Neoplasia ductal invasivo.....	65
5.	CONCLUSÕES	67
5.1	Conclusões gerais	67
5.2	Sugestões para trabalhos futuros.....	68
	REFERÊNCIAS	69
	APÊNDICE A – PUBLICAÇÕES ASSOCIADAS A ESTA DISSERTAÇÃO	79

APÊNDICE B – REFERÊNCIAS DA AMOSTRA IAEA A-13	80
APÊNDICE C – REFERÊNCIAS DA AMOSTRA IAEA V-8	81
APÊNDICE D – REFERÊNCIAS DA AMOSTRA IAEA V-10	82
APÊNDICE E – REFERÊNCIAS DA AMOSTRA IAEA 153.....	83
APÊNDICE F – REFERÊNCIAS DA AMOSTRA IAEA 407	84

1. INTRODUÇÃO

A Organização Mundial de Saúde (OMS) estima que até o ano de 2030 surgirão cerca de 21,4 milhões de novos casos de câncer (neoplasia maligna), e 13,2 milhões de mortes por câncer. No Brasil, dados epidemiológicos do Instituto Nacional de Câncer (INCA) para os anos de 2014 e 2015 aproximam-se de 57.120 novos casos diagnosticados para o câncer de mama. Entre os cânceres mais incidentes na população brasileira, o de mama perde apenas para o câncer de pele do tipo não melanoma (182 mil novos casos) e para os tumores de próstata (69 mil novos casos). No Paraná são estimados 3.490 novos casos de câncer de mama, sendo destes, 910 em Curitiba (INCA, 2014).

Pesquisas recentes como as de Farquharson *et al.* (2013); Silva *et al.* (2013), e Mersov *et al.* (2014) utilizam diferentes técnicas espectroscópicas a fim de entender as transformações que ocorrem nas células neoplásicas, benignas ou malignas (neste último caso, também conhecido por câncer).

Sabe-se contudo que a célula é constituída, em sua maior parte pela água, e que elementos-traço representam menos que um por cento do peso do material biológico. Elementos-traço são caracterizados como essenciais, de acordo com o papel desempenhado na célula. Alguns formam compostos com proteínas e apresentam grande probabilidade de realizar funções catabólicas, como reações químicas de redução, facilmente vistas *in vitro* na presença dos elementos: manganês, ferro, cobre e molibdênio. Tais elementos apresentam diferentes concentrações em cada tecido. É o caso do cálcio, por exemplo, que se concentra em maior proporção nos osso e dentes; e, é o elemento menos encontrado no sangue e nos tecidos moles. Nota-se que existe um limiar ótimo da concentração dos elementos-traço em decorrência a quantidade necessária para que a célula desempenhe sua função, de forma que não haja deficiências e nem toxicidade (CESAREO, 1988).

Entre as técnicas mais utilizadas para caracterização elementar, a fluorescência de raios X (*X-Ray Fluorescence* – XRF) vem se tornando nos últimos anos, uma importante ferramenta, sobretudo na identificação de elementos-traço em tecidos como os de neoplasias mamárias (GERAKI, FARQUHARSON e BRADLEY, 2003; PEREIRA *et al.*, 2008; THEODORAKOU e FARQUHARSON, 2008; AL-EBRAHEEM, FARQUHARSON e RYAN, 2009; SILVA *et al.*, 2009; TOMAL *et al.*, 2010; CONCEIÇÃO, 2011; SILVA, 2011; FARQUHARSON *et al.*, 2013; SILVA *et al.*, 2013; MARGUÍ, ZAWISZA e SITKO, 2014; MERSOV *et al.*, 2014).

Logo, alterações nas concentrações de alguns elementos-traço, como Ca, Fe, Cu e Zn poderiam fornecer informações a respeito de uma possível neoplasia de tecido mamário, como sugerem as pesquisas de Geraki e Farquharson (2001); Poletti, Gonçalves e Mazzaro (2001); Geraki, Farquharson e Bradley (2003); Poletti *et al.* (2004); Magalhães *et al.* (2008); Pereira *et al.* (2008); Theodorakou e Farquharson (2008); Al-ebraheem, Farquharson e Ryan (2009); Silva *et al.* (2009); Silva (2011); Silva *et al.* (2013).

Entre as pesquisas dos últimos cinco anos, que relacionam o uso da XRF e câncer de mama encontram-se estudos de Silva *et al.* (2009), que avaliaram diferentes concentrações de elementos-traço em tecidos mamários normais, neoplásicos benignos e malignos. Para tanto, um total de 83 amostras de tecido mamário foi analisado e observou-se a presença dos elementos-traço: Ca, Ti, Fe, Cu e Zn. De todos os elementos-traço, com exceção do Ti, observou-se um aumento significativo de suas concentrações, tanto para tecidos mamários neoplásicos benignos quanto malignos.

Neste mesmo ano Marguí, Queralt e Hidalgo (2009) salientaram a importância do uso de filtro sobretudo na identificação de elementos-traço. Argumentaram que sua importância é justificada uma vez que uma amostra excitada por uma fonte de raios X primários produz um espalhamento relativamente significativo, além do espalhamento secundário que ocorre na amostra. Para a identificação de elementos-traço essa soma de espalhamentos pode ser relevante, considerando sua proporção na matriz da amostra. Por este motivo o uso de filtros pode ser uma boa maneira para reduzir os efeitos de espalhamento.

De encontro com esse estudo, Silva *et al.* (2009) utilizaram uma relação dos efeitos de espalhamento elástico e inelástico em seus cálculos no comportamento de 52 amostras de tecidos mamários, dos quais metade eram neoplásicos e a outra metade normais. Os resultados indicaram concentração significativamente superior para os elementos Ca, Fe, Cu e Zn em tecidos neoplásicos. E ainda neste estudo, Silva abordou a hipótese de que Fe e Cu possivelmente estejam relacionados com o aumento da atividade celular e com o suprimento sanguíneo para formação de neoplasias em tecidos mamários, enquanto o Ca e o Zn atuam com função reguladora, considerando que estejam presentes em matrizes de metaloproteinases (MMPs).

Em sua tese de doutorado Silva (2011) combina diferentes técnicas de XRF no estudo de neoplasias mamárias, sendo elas: a fluorescência de raios X por dispersão em energia (*Energy Dispersive X-Ray Fluorescence*, ED-XRF), fluorescência de raios X por reflexão total (*Total Reflection X-Ray Fluorescence* - TXRF) e a microfluorescência de raios X (μ -XRF) para determinar a concentração dos elementos Ca, Fe, Cu e Zn e avaliar os papéis desses

elementos-traço nas células neoplásicas, como também publicado por Silva *et al.* (2013). Em seus resultados, Silva apresentou que a expressão dos elementos-traço pode ser utilizada como marcador tumoral e fator prognóstico. Além disso, a μ -XRF permitiu que Silva avaliasse as distribuições espaciais dos elementos-traço e as comparasse com a expressão imunohistoquímica de MMPs e seus inibidores (*Tissue Inhibitors Metalloproteinases* - TIMPs), assim como com o fator de crescimento vascular endotelial (*Vascular Endothelial Growth Factor* - VEGF). Nesta avaliação, concluiu-se que os elementos Fe, Cu e o VEGF estão relacionados, sugerindo o acúmulo destes elementos associado ao processo angiogênico (formação de novos vasos) em neoplasias mamárias, e que a presença de Ca e Zn e a expressão de MMPs e TIMPs possivelmente está relacionada à presença destes elementos em expressões imunohistoquímica e seus inibidores.

Pesquisas de Al-Ebraheem *et al.* (2013) encontraram através da XRF os valores de concentração aumentados para tecidos neoplásicos de mama nas proporções de 85%, 20%, 23% e 117% para os elementos: Ca, Fe, Cu e Zn respectivamente, e relacionaram à fatores como a presença de receptores de estrogênio.

Farquharson *et al.* (2013) argumentaram o quanto é importante relacionar a medida dos parâmetros de raios X à histologia das amostras de tecido mamário avaliado. Para tanto, desenvolveram diferentes modelos que ajudam a avaliar a importância de estudos histológicos, considerando particularmente as informações clínicas que descrevem a porcentagem do tumor em cada uma das amostras. Níveis de K, Ca, Fe, Cu, Zn, Br e Rb foram avaliadas usando XRF e comparados nos tecidos de mama normais e neoplásicos. Como resultado, encontraram uma forma de distinguir entre tecidos mamários neoplásicos e normais.

Também com o objetivo de diferenciar tecidos mamários neoplásicos e normais, Mersov *et al.* (2014) avaliaram dados coletados da interação dos raios X de baixa energia com tecidos mamários na XRF. No entanto este estudo considerou a densidade eletrônica, a estrutura molecular, espalhamentos coerentes e incoerentes, assim como a amplitude dos picos associados ao tipo de tecido. Como resultado do modelo aplicado, os pesquisadores estimaram quais eram os tecidos mamários saudáveis e neoplásicos.

Portanto, tendo em vista o grande interesse atual em pesquisas nesta área e o potencial da técnica de ED-XRF, este trabalho dedica-se à otimização dos parâmetros técnicos desta técnica, de modo a melhorar a eficácia na quantização dos elementos-traço presentes em neoplasias mamárias.

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 Objetivo Geral

- ✓ Avaliar a influência dos filtros de alumínio na eficiência de medição das concentrações dos Ca, Fe, Cu e Zn em amostra neoplasia mamária e as concentrações mínimas que equipamento Amptek (*kit* de um tubo de raios X modelo *Mini-X* e um detector do modelo *X-123SD*) é capaz de registrar.

1.1.2 Objetivos Específicos

- ✓ Medir espectros de raios X espalhados sem filtração e com filtração igual: 0,25 mm, 0,50 mm, 0,75 mm, 1,00 mm e 1,25 mm de Al.
- ✓ Construir, utilizando os espectros obtidos, os gráficos do erro relativo de concentração de cada elemento químico em função da espessura de filtro.
- ✓ Avaliar a espessura do filtro mais favorável para cada elemento com base dos gráficos construídos.
- ✓ Executar a calibração absoluta do equipamento em relação aos elementos: Ca, Fe, Cu e Zn.
- ✓ Comparar as concentrações certificadas dos padrões biológicos em relação às obtidas com a equação da curva de calibração.
- ✓ Usando a curva de calibração, definir o limite inferior do equipamento.
- ✓ Analisar quantitativamente duas amostras de tecido neoplásico mamário.

1.2 ESTRUTURA DA DISSERTAÇÃO

Esta dissertação foi estruturada em capítulos, os quais foram organizados da seguinte forma:

Como já visto, o capítulo 1 tratou da introdução deste trabalho.

No capítulo 2 é realizada a fundamentação teórica pertinente ao trabalho. O conceito de neoplasias e suas características no tecido mamário são apresentados. A atuação e a importância dos elementos-traço para esse tecido também fazem parte do primeiro capítulo. Em seguida, a física das radiações é descrita contemplando: a produção de raios X, raios X característicos, interação da radiação com a matéria, efeito fotoelétrico e seção de choque para os elementos Ca, Fe, Cu e Zn.

A fluorescência, as vantagens e desvantagens e então os fatores que influenciam a ED-XRF, tais como: arranjo experimental, filtros, detectores semicondutores, amplificadores e analisadores multicanais são então abordados, e a fundamentação teórica encerra com considerações estatísticas e obtenção de curvas espectrais.

Os materiais e métodos são descritos no capítulo 3. Este capítulo é destinado a detalhar a metodologia realizada, e os materiais que permitiram o uso da técnica de ED-XRF. Para tanto, são descritos: o arranjo experimental, os procedimentos de calibração, a técnica utilizada, a amostra, assim como as especificações técnicas dos equipamentos que permitiram este estudo.

No capítulo 4 são apresentados os resultados provenientes da análise da espectroscopia e dos cálculos estatísticos. É abordado neste capítulo o impacto do uso de filtros no feixe primário da radiação, a otimização da técnica para análise simultânea de todos os elementos, as curvas de calibração, as respectivas equações de reta e limites inferiores; assim como análises quantitativas das neoplasias benignas e malignas de tecido mamário.

Nas conclusões, no capítulo 5, o entendimento dos resultados encontrados é descrito. Ainda neste capítulo são sugeridos outros trabalhos que podem ser desenvolvidos a partir do conhecimento e das dificuldades encontradas para a realização deste.

As referências bibliográficas são então mencionadas, antecedente aos Anexos desta dissertação.

2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1 Neoplasias

O termo médico neoplasia refere-se à proliferação celular excessiva e autônoma de um tecido, que persiste mesmo após a cessação da causa que lhe deu origem (BECKER, 1997). Alguns autores, como Robbins e Cotran (2010) e Liotta e Kohn (2001) sugerem que não seria uma doença, mas sim muitas desordens que desregulam o crescimento celular. Essas alterações estão relacionadas a modificações no ácido desoxirribonucléico (*deoxyribonucleic acid*, DNA) destas células, local no qual oncogenes são ativados, desregulando o controle mitótico celular. Uma vez desreguladas, estas células podem se dividir de forma anormal, mas ainda preservar a funcionalidade e estrutura do tecido que a deu origem. No entanto, em outras células passam a se reproduzir descontroladamente, alterando sua fisiologia, e por vezes invadindo tecidos vizinhos. Essa diferenciação de comportamento e características permitem distinguir neoplasias benignas e malignas (ROBBINS e COTRAN, 2010; INCA, 2014).

Segundo Becker (1997) as neoplasias consideradas benignas costumam apresentar características micro e macroscópicas, que não provocam danos tão efetivos aquele organismo, assim como pelo fato de não invadirem vasos sanguíneos. Já as neoplasias malignas possuem um comportamento mais agressivo, normalmente se multiplicam em maior velocidade, tendem a infiltrar-se nos vasos sanguíneos, e disseminar-se no organismo; afetando outros órgãos e produzindo uma nova desregulação, ainda que em tecidos distantes da sua origem, originando as metástases (BECKER, 1997; ROBBINS e COTRAN, 2010; INCA, 2014).

Em caráter microscópico, as neoplasias benignas e malignas distinguem-se, sobretudo no parênquima e ao estroma, como pode ser observado na Figura 1. Em relação ao parênquima, as células neoplásicas benignas tendem a preservar a histoarquitetura original, sua diferenciação, e as mitoses típicas. Já as células neoplásicas malignas perdem sua diferenciação e função específica. O índice mitótico é elevado, ocorre o aumento do nucléolo, citoplasma basófilo (aumento de ácido ribonucléico, *ribonucleic acid*, RNA - no citoplasma), polimorfismo celular, entre outras evidências. Nas neoplasias do tecido conjuntivo observa-se ainda subtipos celulares da mesma linhagem tecidual, como fibrolipomas e osteocondromas

nas benignas, e fibropolissarcomas e osteocondrossarcomas nas malignas, associadas à uma transformação mixomatóide (BECKER, 1997).

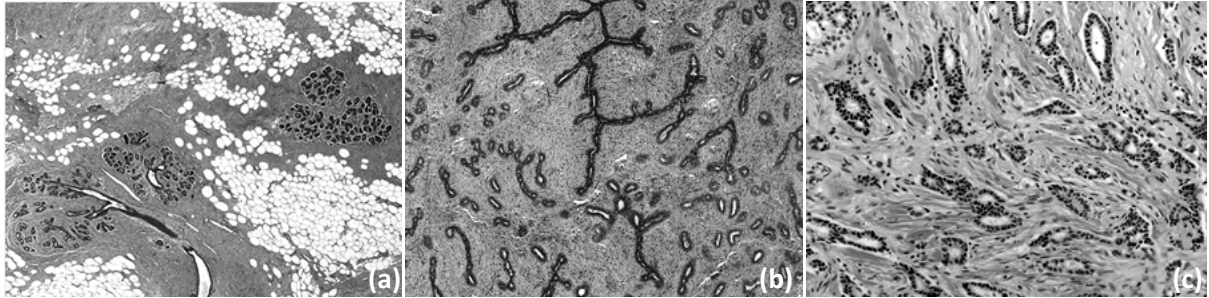


Figura 1 – Diferenciações no parênquima e estroma de tecido mamário normal e neoplásico. Em (a) observa-se um parênquima de mama normal constituído de uma mistura de tecido adiposo e fibroso. Aderidos neste tecido sem estas características de tecido fibroadiposo estão os ductos terminais lobulares e o sistema de ductos. Na ilustração (b) visualiza-se o fibroadenoma em padrão pericanalicular nas bordas da direita e da esquerda do campo onde o epitélio não é comprimido pela proliferação do estroma como no centro do campo. Em (c) é representado um carcinoma ductal invasivo bem-diferenciado, a desorganização e a diferenciação do tamanho dos núcleos é visualizada
Fonte: Imagem adaptada de Kopans (2007).

O estroma está associado ao suporte e nutrição da célula, e é importante para que uma neoplasia sobreviva (BECKER, 1997; BROWN *et al.*, 1999). Alterações observadas no estroma, como em adenocarcinomas mamários são decorrente da predominância de formação de fibras colágenas. Em geral, em neoplasias malignas o estroma tende a ser afrouxado e destruído, e associa-se à produtos neoplásicos secretados pela própria célula, como muco, e advindos de reação inflamatória coexistente, o que facilita que estes migrem para a corrente sanguínea e linfonodos próximos. Nas neoplasias benignas é característico o encapsulamento do estroma, o que lhe dá caráter de uma lesão circunscrita (BECKER, 1997).

Para que uma célula cresça é necessário oxigênio e nutrientes. Estes devem estar pelo menos a uma distância de 100 a 200 μm de distância do vaso, para que a difusão do oxigênio ocorra, segundo Carmeliet e Jain (2000). Para propiciar este estroma celular vascularizado ideal para que esta neoplasia se desenvolva é necessário que alguns fatores a estimulem e a façam se desenvolver (BROWN *et al.*, 1999). Com intuito de entender como o estroma vascular se forma em cânceres de mama, pesquisadores avaliam o fator de permeabilidade vascular e o fator de permeabilidade de crescimento vascular endotelial que funcionam como contribuintes para a angiogênese (processo que possibilita que novos vasos sejam criados a partir de vasos sanguíneos já existentes). Além deste fator, são consideradas as metaloproteinases e seus inibidores associadas à presença de colágeno I e IV nos tecidos

mamários (DVORAK, NAGY e DVORAK, 1991; BROWN *et al.*, 1999; SILVA, 2011; SILVA *et al.*, 2013).

No estudo sobre neoplasias também observam-se correlações em relação à ação dos radicais livres e oxidação celular, especificidade de sítios de ligação celulares, angiogênese, estabilidade protéica, a presença de colágeno do tipo I e IV em neoplasias mamárias e oncogenes como é apresentado em mais detalhes nos próximos parágrafos.

A estabilidade de um metal vinculado a proteínas varia consideravelmente e tem servido para diferenciá-las entre duas diferentes classes: as metaloproteínas e os complexos de metal-proteínas. O metal é fixado suficientemente firme às metaloproteínas, o que dificulta que sejam separados. Ao contrário, nos complexos metal-proteínas o metal é ligado fracamente, e a agressividade de tumores, tanto *in vitro* quanto *in vivo*, tem sido correlacionada com a síntese de metaloproteínas. Sugere-se que estes aumentam a atividade de colágeno, tornando o tecido cancerígeno mais agressivo, e justificando a presença de colágeno dos tipos I e IV em neoplasias mamárias como citado por Ioachim *et al.* (2002); Sirchia e Luparello (2005); Borrirukwanit *et al.* (2007), além de Dvorak, Nagy e Dvorak (1991), Brown *et al.* (1999), Silva (2011) e Silva *et al.* (2013).

O Fe, Cu e o Zn são importantes cofatores enzimáticos, ainda que cada um desempenhe uma função específica, todos estão relacionados à vitalidade celular. Também estão envolvidos com o transporte do sangue, o que justifica a sua presença em demasia, uma vez conhecida a importância do processo da angiogênese para o desenvolvimento tumoral (HUANG, SHEU e LIN, 1999; CARMELIET e JAIN, 2000). Os efeitos destes elementos são relacionados às suas concentrações e observações relacionadas à sua deficiência ou ao seu excesso (HUANG, SHEU e LIN, 1999).

Muitos pesquisadores associam a presença dos elementos-traço à oxidação celular. Os danos provocados pela oxidação celular são bem conhecidos nas células, e são causados por algumas reações do oxigênio e por radicais livres (HUANG, SHEU e LIN, 1999). É interessante observar que existe uma correlação fisiológica destes metais-traço nas interações no material genético da célula (MAGALHÃES *et al.*, 2008).

Cantley e Pawson (2001) descrevem que a eficiência do controle celular está associada à especificidade de certos sítios de ligação que são receptores de proteínas. Estes sítios são locais específicos que funcionam como uma região de acoplamento para que estas proteínas possam desempenhar a sua função. É como uma chave e uma fechadura, no qual o sítio só permitirá que uma proteína específica agregue-se a ele, e desempenhe sua funcionalidade.

Segundo Vallee e Falchuk (1993) o aumento da quantidade de oncogenes na célula e sua estimulação por citocinas, críticas para o crescimento de metástases, atuam como fatores que implicam na produção e regulação de metaloproteinases em células malignas.

2.1.1 Neoplasias mamárias

A maior parte das neoplasias mamárias malignas são adenocarcinomas. Os adenocarcinomas podem ser carcinoma *in situ* e carcinomas invasivos. O primeiro refere-se à proliferação neoplásica limitada apenas aos ductos e lóbulos pela membrana basal, enquanto o segundo, carcinomas invasivos ou infiltrantes tendem a penetrar na membrana basal para o estroma (BROWN *et al.*, 1999; ROBBINS e COTRAN, 2010).

Entre neoplasias mamárias benignas mais incidentes está o fibroadenoma. O fibroadenoma é um tumor originado no estroma intralobular de histologia epitelial e conjuntiva. É um câncer que ocorre em idade fértil na mulher, e responde hormonalmente, motivo o qual o faz alterar de tamanho (aumentando) nos períodos de gestação. Morfologicamente o fibroadenoma cresce como nódulos esféricos, circunscritos e ligeiramente móveis. Seu estroma é delicado, mixoide e assemelha-se à um estroma intralobular normal. O tecido conjuntivo raramente apresenta elementos mesênquimais como gordura, osso ou músculo (ROBBINS e COTRAN, 2010).

Carcinomas *in situ* e hiperplasia (aumento do tecido) lobular atípicos não são relacionados tão diretamente à progressão de invasão celular como as lesões ductais. Carcinomas ductais *in situ* (*Ductal carcinoma in situ* – DCIS) podem ser invasivos ou não. Diferenciações histológicas variam entre os bem-diferenciados (que apresentam células uniformes em seu tamanho e formato, distribuição imparcial de cromatina abscesso ou nucléolo e raras evidências de mitose), diferenciações intermediárias (pleoformismo, cromatina e nucléolo ligeiramente agrupados e mitoses ocasionais) e pouco diferenciados (pleoformismo das células e do núcleo, cromatina agrupada, nucléolo proeminente e frequentes mitoses). Necroses normalmente não estão presentes nos DCIS bem-diferenciados, ocasionalmente são encontradas em diferenciações intermediárias e frequentemente nos DCIS pouco diferenciados (KOPANS, 2007).

2.1.1.1 Importância dos elementos-traço em neoplasias

Presentes em menos de um por cento (1%) do total do material biológico, os elementos-traço são classificados como essenciais, provavelmente essenciais e não essenciais. Elementos-traço conhecidos como essenciais são assim chamados devido à sua importância no desempenho de diversas funcionalidades no organismo, e são eles: sódio, magnésio, cloro, potássio, cálcio, manganês, ferro, cobalto, níquel, cobre, zinco, iodo, selênio e molibdênio. Os elementos provavelmente essenciais são: flúor, silício, vanádio, cromo, arsênio e estanho (SCHWARTZ, 1975; CESAREO, 1988).

Como citado anteriormente, várias pesquisas associam a presença de elementos-traço ao desenvolvimento de neoplasias mamárias. Sabe-se que estes elementos desempenham importante função em vários processos biológicos, como a ativação e inibição de reações enzimáticas, assim com a ação de MMPs nos sítios de ligação, e na modificação da permeabilidade de membrana celular. Todos estes sugestivos para o processo cancerígeno (PASHA, MALIK e SHAH, 2008).

Diferenças significativas na concentração de certos elementos-traço têm sido observadas em pacientes com neoplasias, como citado por Garg *et al.* (1994), Ng, Bradley e Looi (1997), Huang, Sheu e Lin (1999), Geraki, Farquharson e Bradley (2003), Theodorakou e Farquharson (2008), Al-Ebraheem, Farquharson e Ryan (2009), Conceição, (2011), Al-Ebraheem *et al.* (2013). Devido a várias evidências, os elementos-traço atuam em importantes processos de reações enzimáticas, ativando-as ou inibindo-as, e afetam a permeabilidade das membranas celulares entre outros mecanismos; pesquisadores como Ng, Bradley e Looi (1997); Huang, Sheu e Lin (1999); Cantley e Pawson (2001); Liotta e Kohn (2001); Hinestrosa *et al.* (2007) acreditam que os elementos-traço atuam como biomarcadores naturais do organismo.

Resultados encontrados por Silva (2011) e Silva *et al.* (2013) demonstraram que os elementos Fe e Cu e a expressão do fator de crescimento vascular endotelial, ou VEGF estão relacionados, fato que permite associar a presença destes elementos-traço essenciais ao desenvolvimento de angiogênese em neoplasias mamárias, assim como a correlação entre as distribuições de Ca e Zn e a expressão de MMPs e TIMPs.

2.1.1.2 Elementos-traço em tecidos mamários

Diferentes pesquisas identificaram que em células neoplásicas mamárias há a presença de alguns elementos-traço essenciais, estando entre os mais importantes, os elementos: Ca, Fe, Cu e Zn (GERAKI e FARQUHARSON, 2001; POLETTI, GONÇALVES e MAZZARO, 2001; GERAKI, FARQUHARSON e BRADLEY, 2003; POLETTI *et al.*, 2004; MAGALHÃES *et al.*, 2008; PEREIRA *et al.*, 2008; THEODORAKOU e FARQUHARSON, 2008; AL-EBRAHEEM, FARQUHARSON e RYAN, 2009; SILVA *et al.*, 2009; SILVA, 2011; SILVA *et al.*, 2013). Decorrente ao estudo desta dissertação focar nestes quatro elementos-traço citados, a importância de cada um destes elementos no processo neoplásico de tecido mamário é citada na Tabela 1.

Tabela 1- Função desempenhada no organismo pelos elementos-traço de neoplasias de tecido mamário

(continua)

Elemento-traço	Funções no organismo	Particularidades
Ca	Mineralização de tecidos como ossos e dentes. Está presente no sangue e atua também como mediador de contrações vasculares e musculares, vasodilatação, transmissão nervosa e em secreções glandulares (CASHMAN,2002).	<p>Relaciona-se aos carcinomas mamários no processo de calcificação do tecido mamário. Fato que ocorre em torno de 30-50% dos cânceres de mama, e sugerem a malignidade da lesão. Microcalcificações de um determinado tipo de oxalato de Ca sugerem a benignidade da lesão, ou a presença de um carcinoma <i>in situ</i>. Enquanto a presença de cristais de hidroxiapatita de Ca tendem a relacionar-se tanto a neoplasias benignas quanto malignas, tais como carcinomas invasivos e adenocarcinomas intraductais (MORGAN <i>et al.</i>, 2005).</p> <p>Ainda que a presença de Ca seja de muita importância no diagnóstico do câncer de mama a origem destas calcificações ainda não é clara. A principal discussão é se esta calcificação é decorrente de um processo degenerativo, ou, de um processo ativo celular não resolvido (BÜSING <i>et al.</i>, 1981; MORGAN <i>et al.</i>, 2005).</p> <p>Outros estudos como os de Mihai et al. (2006) e Horseman e Hernandez (2014) sugerem que a presença de Ca em cânceres de mama predispõe a origem de metástases ósseas. Uma sugestão para essa ocorrência seria que a presença de Ca extracelular promove a ativação dos receptores de Ca intracelulares, e, contribuem para a produção das metástases ósseas (SAIDAK <i>et al.</i>, 2009). Além disso, estudos da ativação destes receptores de Ca, juntamente com os mais variados ligantes, associam a capacidade única de conformações do receptor. As quais não estão associadas com a malignidade da lesão, mas sim com a progressão do câncer (BRENNAN <i>et al.</i>, 2013).</p>

Tabela 1- Função desempenhada no organismo pelos elementos-traço de neoplasias de tecido mamário

(conclusão)

Elemento-traço	Funções no organismo	Particularidades
Fe	Desempenha diversas funções fisiológicas relevantes para a célula, como o transporte de ferro no sangue (transferrina), e é um componente importante de muitas proteínas (como por exemplo: a ferritina) e enzimas (MAGALHÃES <i>et al.</i> , 2008).	<p>O Fe é abundante no corpo humano, e é o elemento-traço encontrado em maior quantidade no organismo (KABAT e ROHAN, 2007; TOYOKUNI, 2009).</p> <p>A deficiência de ferro está associada com inúmeras doenças, assim como o excesso de Fe causa inúmeros danos ao organismo. O stress oxidativo, a produção de radicais livres e danos no DNA são os mais relevantes. Danos causados pela oxidação celular são agressivos à célula, e são provenientes de determinadas reações com o oxigênio e resultam na liberação de radicais livres (HUANG <i>et al.</i>, 1999). A ação dos radicais livres, muitas vezes conhecidos como stress oxidativo, são capazes de romper membranas celulares, causar danos em DNAs, inativar enzimas, desnaturar proteínas, atacar ácidos nucleicos e promover um extenso dano à célula, contribuindo para a manifestação cancerígena e para o seu desenvolvimento (MAGALHÃES <i>et al.</i>, 2008).</p> <p>Estudos de Huang <i>et al.</i> (1999), Carmeliet e Jain (2000); Kabat e Rohan (2007), Toyokuni (2009) relacionam ainda a presença de Fe no processo da angiogênese.</p> <p>Um fator de importante correlação, em relação à presença de Fe no organismo feminino, é que este aumenta após a menopausa (TOYOKUNI, 2009).</p>
Cu	Contribui na formação de glóbulos vermelhos, vasos sanguíneos, nervos, além de atuar no sistema imunológico e também na manutenção dos ossos (MAGALHÃES <i>et al.</i> , 2008).	<p>Ainda que essencial para vários processos bioquímicos, o Cu pode ser potencialmente tóxico. Os efeitos deletérios dos estados de oxidação do Cu (Cu⁺ e Cu²⁺) podem gerar determinadas reações com o oxigênio capazes de modificar proteínas, lipídeos e ácidos nucleicos (MAGALHÃES <i>et al.</i>, 2008).</p> <p>Além disso, o Cu também é considerado um importante cofator para a angiogênese. Suspeita-se que o excesso do nível de Cu, observado nos tecidos do câncer de mama possivelmente desenvolve o câncer de mama através da angiogênese e dos danos oxidativos ao DNA (HUANG <i>et al.</i>, 1999; MAGALHÃES <i>et al.</i>, 2008).</p>
Zn	Capacidade de estimular a atividade de enzimas, colaborar nas funções do sistema imunológico, processos de cicatrização, e também na percepção de cheiro e sabores, além da síntese, transcrição e translação de material genético (VALLEE e FALCHUK, 1993; MAGALHÃES <i>et al.</i> , 2008).	<p>O Zn é o segundo elemento-traço essencial em maior abundância no ser humano. Durante o processo da amamentação, a glândula mamária tem a capacidade de transferir em torno de 0,5 a 1 mg de Zn/dia junto ao leite. A transferência correta de Zn é essencial para o recém-nascido, visto que o Zn é essencial para o sistema imune. E a sua deficiência ou excesso sugere deficiências nas funções desempenhadas por este sistema. O que implica diretamente no descontrole e no aumento de danos ao organismo, resultando em doenças severas, como o câncer (CAVALLO <i>et al.</i>, 1991; MAGALHÃES <i>et al.</i>, 2008; KELLEHER, AH SEO E LOPEZ, 2009).</p>

Fonte: Autoria própria.

Ainda que muitas vezes saiba-se muito menos do que se gostaria sobre os elementos-traço e o seu comportamento, estes já permitiram entender melhor o relacionamento que desempenham no processo neoplásico (CORNELIS, BORGUET e DE KIMPE, 1993). O conhecimento das concentrações alteradas destes elementos permite que estes atuem como biomarcadores tumorais e tornem o diagnóstico, o tratamento adotado, e, a qualidade de vida dos pacientes com câncer mais assertivo, e eficaz como mencionado por Robbins e Cotran (2010) e Hinestrosa *et al.* (2007).

2.2 Física das radiações

2.2.1 Produção de raios X

A produção de raios X ocorre no momento em que elétrons são acelerados no interior de um tubo de raios X. Um campo elétrico de um potencial de centenas de Volts (V) permite que elétrons sejam acelerados do cátodo (região do tubo em que um filamento termoiônico está presente) ao ânodo (alvo), e resultem na produção de raios X (BORN, 1969). Quando um elétron com alta velocidade colide com a superfície do alvo diferentes tipos de colisão podem ocorrer. Neste instante uma quantidade energética é transferida e ioniza os átomos do alvo, como é representado em “a” na Figura 1. Outras interações produzem raios X como é ilustrado na Figura 2 nos casos “b”, “c” e “d” (JOHNS e CUNNINGHAM, 1983).

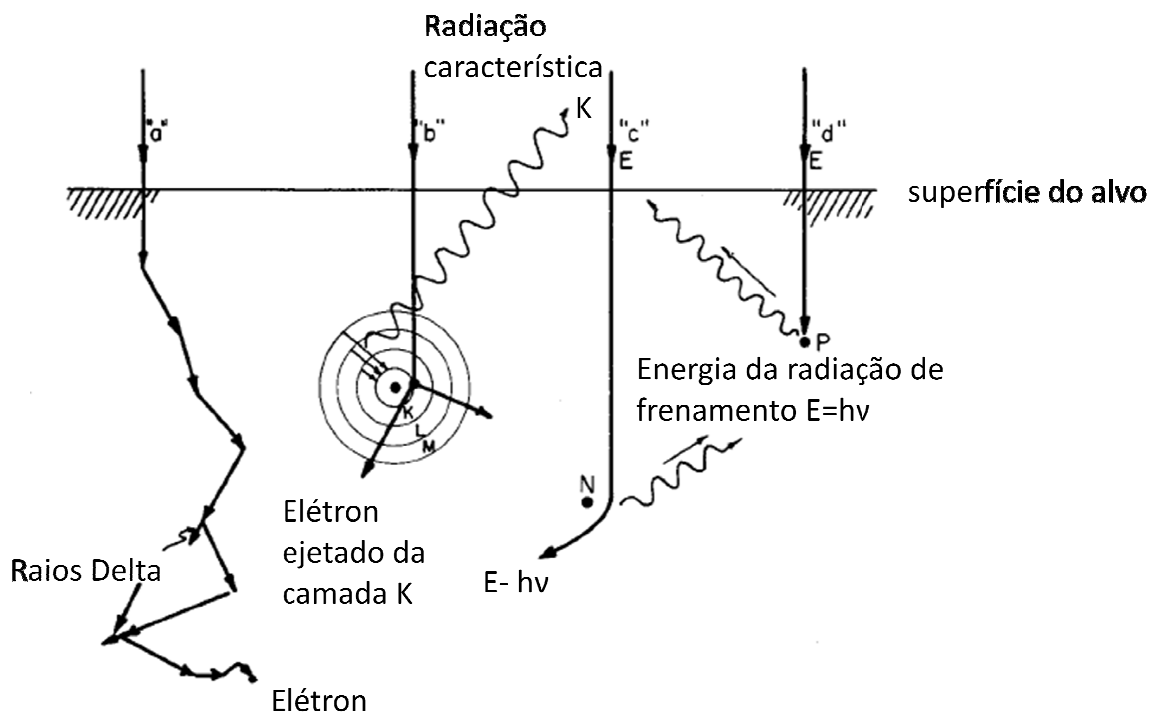


Figura 2 – Interações típicas do elétron com o alvo. Em “a” o elétron sofre perdas de ionização resultando em raios delta e eventualmente em calor. Na situação “b” o elétron ejeta um elétron da camada K dando origem a radiação característica. Em “c” as colisões energéticas do elétron (E) com o núcleo resultam em radiação de frenamento de energia: hf . Sendo que o elétron retorna da colisão com energia $E-hf$. Enquanto em “d” um tipo raro de colisão ocorre quando um elétron é completamente parado após uma colisão, resultando em um fóton de energia $E=hf$

Fonte: (JOHNS e CUNNINGHAM, 1983).

2.2.1.1 Raios X característicos

Os raios X característicos são produzidos no momento em que um elétron da camada externa decai de um nível energético mais alto para um nível energético mais baixo, e emite raios X. Estes são chamados de característicos porque é necessário que seja fornecido um valor energético específico para realizar este “salto” eletrônico. A energia, que é única para cada elemento, permite identificar os elementos em espectros na técnica como a ED-XRF (EISBERG e RESNICK, 1979; CESAREO, 1988; GILMORE e HEMINGWAY, 1995).

As transições podem ocorrer em diferentes camadas eletrônicas. E a energia necessária para deslocar um elétron de uma camada para outra é diferente para diferentes níveis energéticos (JOHNS e CUNNINGHAM, 1983), como pode-se observar na Figura 3.

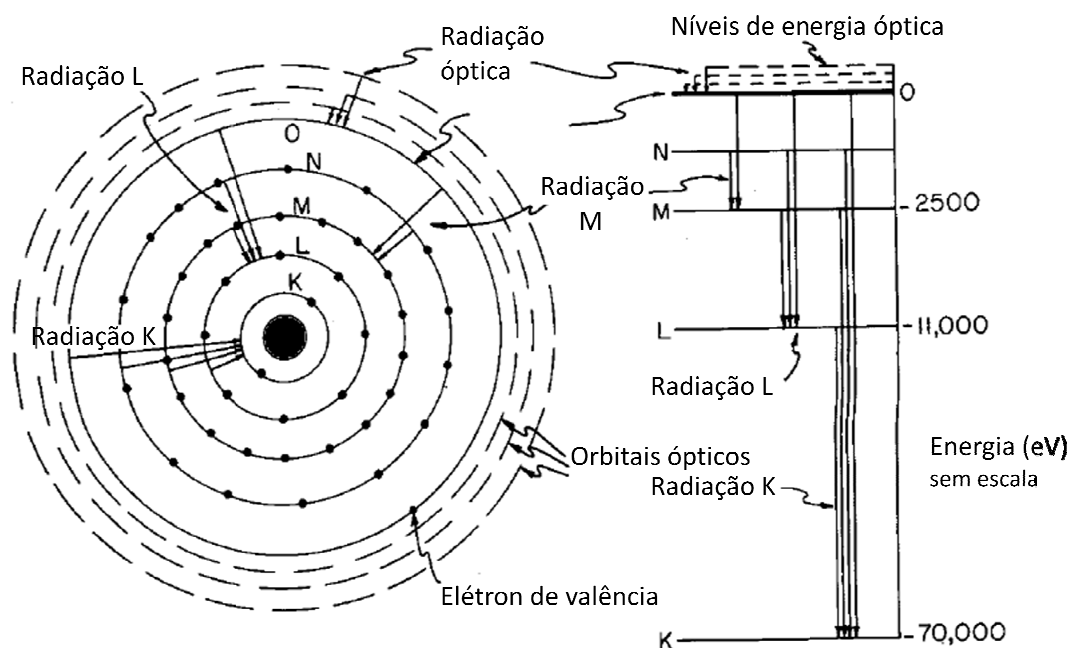


Figura 3 – Diagrama esquemático para um átomo de tungstênio. À esquerda são ilustradas as camadas eletrônicas e à direita é ilustrado um diagrama de níveis energéticos
 Fonte: Imagem adaptada de Johns e Cunningham (1983).

Para que ocorra a transição de um elétron da camada L para a camada K é necessário que uma energia seja fornecida. E para que a transição ocorra da camada M para a camada K outro valor energético para um mesmo elemento será necessário (chamada de λ), visto que a força de ligação que une este elétron ao núcleo é diferente da que a une na camada L. Cada

elemento apresenta um valor único e bem definido de energia necessária para que estas transições ocorram, o que permite caracterizá-los em espectros (EISBERG e RESNICK, 1979).

Estes valores energéticos aumentam uniformemente com valores crescentes do número atômico, e não são afetados por variações periódicas do número de elétrons das camadas externas do átomo que afetam espectros óticos (EISBERG e RESNICK, 1979).

2.2.2 Interação da radiação com a matéria

As interações da radiação com a matéria podem ocorrer decorrentes ao: efeito fotoelétrico, espalhamentos coerentes, e, incoerentes (ATTIX, 1986; THEODORAKOU e FARQUHARSON, 2008). Na absorção fotoelétrica ocorre a interação entre um fóton e um átomo. Nesta colisão um fóton é totalmente absorvido e a sua energia é transferida para um elétron de uma camada eletrônica liberando um fotoelétron. No espalhamento coerente (que também pode ser conhecido como elástico ou *Rayleigh*) um fóton incidente interage com um elétron de uma camada atômica e não há trocas energéticas entre eles. E no espalhamento incoerente (também conhecido como inelástico ou espalhamento Compton) ocorre uma troca de energias entre o fóton de raios X e o “elétron espalhado”. Decorrente a esta colisão o fóton altera sua direção e a energia transferida para o elétron depende do ângulo que esta deflexão gerou (POLETTI, GONÇALVES e MAZZARO, 2001).

O efeito fotoelétrico é o de maior importância para o processo da fluorescência de raios X visto que aumenta a emissão de raios X por fluorescência, enquanto os espalhamentos elásticos e inelásticos contribuem sobretudo para formar o *background* (radiação de fundo) do espectro (CESAREO, 1988). Isso ocorre porque o efeito fotoelétrico é o de maior predominância para baixas energias, uma vez que as seções de choque de interações fotoelétricas aumentam significativamente, especialmente com o aumento do número atômico, como exemplificado na Figura 4 (ATTIX, 1986).

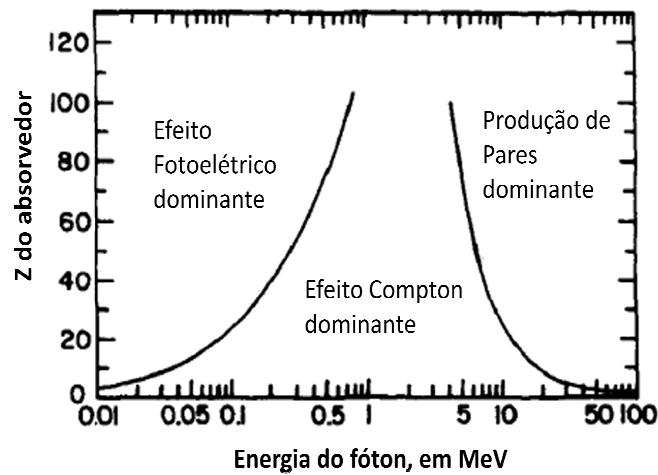


Figura 4 – Predominância dos efeitos dominantes do número atômico (Z) do meio absorvedor em função da energia do fóton, em Megaelétron Volts (MeV)

Fonte: Imagem adaptada de Attix (1986).

2.2.2.1 Efeito fotoelétrico

O efeito fotoelétrico é gerado pela interação entre um fóton e um átomo no qual o fóton é absorvido pelo meio (OKUNO e YOSHIMURA, 2010).

Para que o efeito fotoelétrico ocorra é necessário que a energia do fóton seja no mínimo igual a energia de ligação do elétron com o átomo (EISBERG e RESNICK, 1979), como ilustrado na Figura 5.

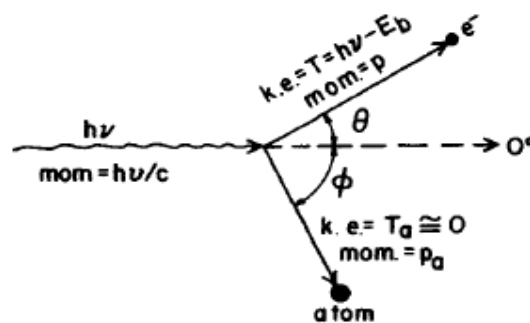


Figura 5 – Representação esquemática do efeito fotoelétrico. Um fóton de energia $h\nu$ colide com um átomo de energia E_b . O fóton desaparece, deixando a energia cinética de $T = h\nu - E_b$ para o elétron, o qual afasta-se a um ângulo relativo θ da direção do fóton incidente. Para conservar o momento (mom.) o restante do átomo afasta-se a um ângulo ϕ . A energia cinética T_a é praticamente zero

Fonte: Imagem adaptada de Attix (1986).

O elétron afasta-se da interação com um ângulo relativo Θ da direção do fóton incidente, carregando um momento p , observa-se então, a Equação 1.0:

$$T = hv - E_b - T_a \quad \text{Eq. 1.0}$$

Onde:

T : energia cinética do elétron ejetado;

hv : energia do fóton;

E_b : energia de ligação do elétron e

T_a : energia cinética do átomo

Como a energia cinética é aproximadamente zero para T_a a conservação do momento (mom) demonstrado na Figura 5 pode ser obtida pela Equação 1.1:

$$T = hv - E_b \quad \text{Eq. 1.1}$$

Onde:

T : energia cinética do elétron ejetado;

hv : energia do fóton;

E_b : energia de ligação do elétron e

Sendo assim para que o efeito fotoelétrico ocorra é necessário que $hv > E_b$. Vale ressaltar que o momento p_a não pode ser negligenciado, e que a direção necessária para que ocorra a conservação do momento em cada evento fotoelétrico deve permanecer no intervalo de $0 < \Theta < 180^\circ$ (ATTIX, 1986).

2.2.2.2 Atenuação e seção de choque para o efeito fotoelétrico

Os fotoelétrons são ejetados, e tendem a emitir a direção do vetor elétrico do fóton para fótons de baixa energia. Com o aumento da energia a distribuição é empurrada a ângulos cada vez menores. Espalhamentos de 0° são proibidos porque são perpendiculares ao vetor elétrico (ATTIX, 1986).

A seção de choque para o efeito fotoelétrico, integrando todos os ângulos de emissão fotoelétrica pode ser descrito como sendo (ATTIX, 1986):

$${}_a\tau \cong k \cdot (Z^n / (h\nu)^m) \quad \text{Eq. 1.2}$$

Onde:

${}_a\tau$ = seção de choque para efeito fotoelétrico;

k : constante;

Z : número de elétrons por átomo de um elemento ou pela molécula que o compõe;

$n \cong 4$ para $h\nu = 0,1$ MeV (Megaelétron Volt), e gradualmente aumenta para 4,6 a 3 MeV, e

$m \cong 3$ para $h\nu = 0,1$ MeV, e gradualmente decresce para 1 a 5 MeV.

Sendo a unidade igual a (cm^2/atom).

Na região de energia $h\nu \cong 0,1$ MeV e abaixo, é conveniente recordar que (ATTIX, 1986):

$${}_a\tau \approx Z^4 / (h\nu)^3 \quad \text{Eq. 1.3}$$

E conseqüentemente o coeficiente de atenuação de massa torna-se (ATTIX, 1986):

$$\tau/\rho \approx (Z/h\nu)^3 \quad \text{Eq. 1.4}$$

Onde:

τ/ρ : coeficiente de atenuação de massa mensurado em (cm^2/g) (ATTIX, 1986).

Na figura 6 é apresentado o coeficiente de atenuação de massa para o efeito fotoelétrico para os elementos de estudo desta dissertação.

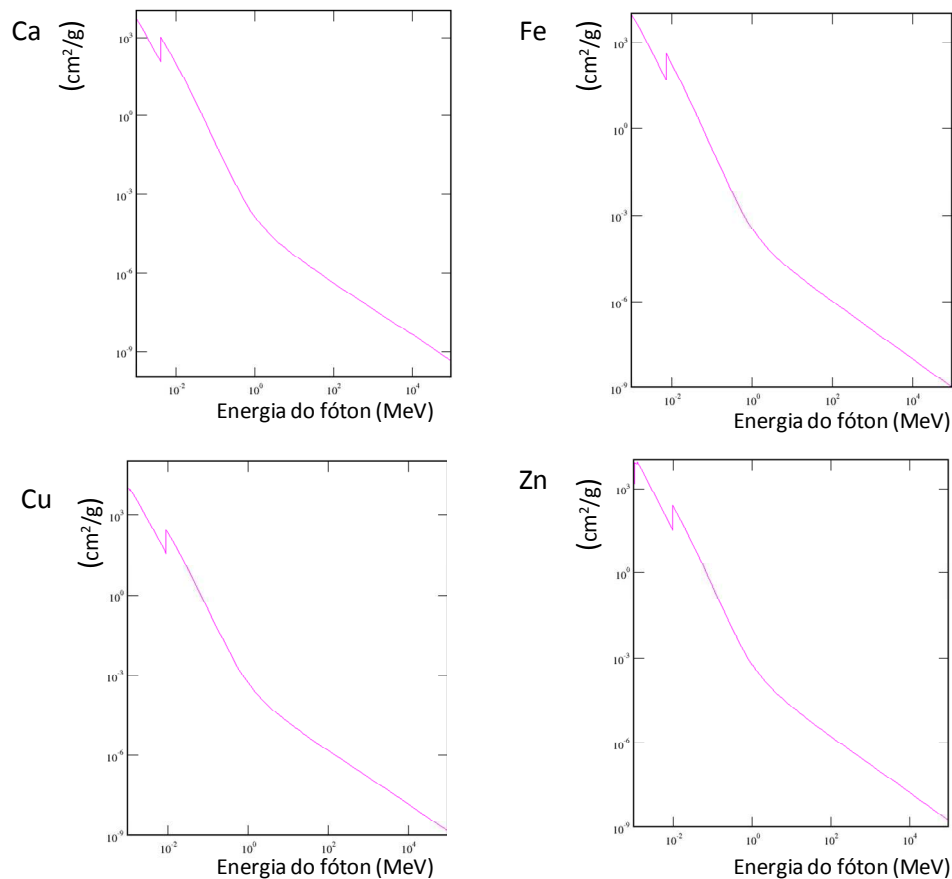


Figura 6 – Coeficiente de atenuação de massa para o efeito fotoelétrico (cm²/g) em relação à energia do fóton (MeV) para os elementos Ca, Fe, Cu e Zn

Fonte: Imagem obtida e adaptada de Us Department of Commerce (2014).

2.2.3 Fluorescência de raios X

Até 1966 a XRF era realizada apenas por espectrômetros por dispersão de comprimento de onda (*Wavelength Dispersive X-Ray Fluorescence*, WD-XRF). Foi com contribuições como a de (ELAD, 1965) no campo de detectores semicondutores de silício lítio (Si(Li)) de alta resolução, capazes de diferenciar raios X próximos na espectroscopia, que surgiu a ED-XRF.

Entre as variações da XRF ainda pode-se encontrar a TXRF, μ -XRF, assim como a fluorescência de raios X por radiação síncrotron (*Synchrotron Radiation X-Ray Fluorescence* – SR-XRF) (THEODORAKOU e FARQUHARSON, 2008; SILVA *et al.*, 2009; SILVA, 2011).

Para que o processo da fluorescência ocorra é cedido à amostra energia capaz de excitá-la. Esta energia remove um elétron da camada eletrônica e quando outro elétron ocupa esta vacância, a energia que é liberada permite identificar o elemento presente no átomo. Por exemplo, ao ocupar a camada K, este elemento necessita de valores específicos de energia, conhecidos por K_{α} e K_{β} os quais são únicos para cada elemento (EISBERG e RESNICK, 1979).

2.2.1 Vantagens e desvantagens da ED-XRF

Como descrito por Yaman (2006), entre as mais variadas técnicas a ED-XRF passou a ser um dos métodos mais utilizados para análises sensitivas devido ao seu baixo custo, sem necessitar de pré-tratamento químico, ou mesmo da destruição da amostra, a ED-XRF é capaz de determinar simultaneamente a concentração de vários elementos presentes no material de interesse.

Marguí, Queralt e Hidalgo (2009) salientam, em seu estudo, a interferência dos efeitos físicos e químicos na matriz da amostra quando submetida à fluorescência, uma vez que os efeitos físicos nas matrizes resultam da variação do tamanho das partículas, uniformidade, homogeneidade e condições da superfície da amostra, e os efeitos químicos à interferência da diferença de concentração dos elementos presentes. Isso ocorre porque em amostras biológicas, a matriz é formada praticamente por elementos como C, N, H e O.

Esta técnica permite a análise qualitativa e quantitativa dos elementos químicos presentes na amostra e quantificá-los. Para o câncer de mama estes elementos, referem-se sobretudo, à: Ca, Fe, Cu e Zn (GERAKI e FARQUHARSON, 2001; POLETTI, GONÇALVES e MAZZARO, 2001; GERAKI, FARQUHARSON e BRADLEY, 2003; POLETTI *et al.*, 2004; MAGALHÃES *et al.*, 2008; PEREIRA *et al.*, 2008; THEODORAKOU e FARQUHARSON, 2008; AL-EBRAHEEM, FARQUHARSON e RYAN, 2009; SILVA *et al.*, 2009; SILVA, 2011; SILVA *et al.*, 2013).

Em sua tese de doutorado Silva (2011) compara os limites de detecção das técnicas de ED-XRF e TXRF para tecido mamário. Em seus estudos, a ED-XRF apresentou uma variação de 0,2 mg/kg para elementos de maior número atômico e 3,5 mg/kg para elementos mais leves; enquanto para a TXRF os valores variaram de 0,02 mg/kg para elementos de maior número atômico e 0,5 mg/kg para elementos mais leves. Silva constatou ainda que a diferença

dos valores certificados e os obtidos experimentalmente apresentaram diferenças menores que 7% tanto para ED-XRF quanto para a TXRF.

2.2.1.1 Espectroscopia

A emissão de fótons de uma determinada energia, que é única para cada elemento, permite que estes sejam identificados na espectroscopia. Normalmente os espectros são compostos por uma curva de distribuição contínua e pelos picos energéticos, como ilustrado na Figura 7.

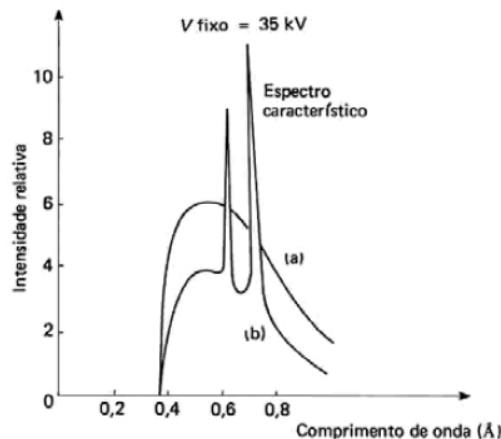


Figura 7 – Intensidade relativa pelo comprimento de onda (Å). Em (a) é demonstrado o espectro contínuo de raios X com alvo de tungstênio de 35kV e em (b) espectros contínuos e característicos superpostos provenientes de um tubo de raios X com alvo de molibdênio para 35kV
Fonte: (OKUNO, 1982).

Os raios X de freamento apresentam espectro contínuo de energias e são emitidos em interações elétron-núcleo. Os raios X característicos ou de fluorescência apresentam espectro de linhas com energias bem definidas, resultantes da transição eletrônica entre camadas; como pode ser observado na Figura 7, nas linhas espectrais “a” e em “b”, respectivamente (RADIATION ONCOLOGY PHYSICS: A HANDBOOK FOR TEACHERS AND STUDENTES; OKUNO e YOSHIMURA, 2010).

A intensidade com que os raios X serão produzidos é determinada pela intensidade do feixe de elétrons (JOHNS e CUNNINGHAM, 1983).

A curva de distribuição contínua é formada devida às interações que ocorrem na produção dos raios X, no interior do tubo de raios X (EISBERG e RESNICK, 1979).

2.3 Fatores que influenciam a ED-XRF

2.3.1 Filtros

O uso da ação de filtros pode ser compreendido visto que os espectros podem sofrer alterações com o seu uso (OKUNO e YOSHIMURA, 2010).

Marguí, Zawisza e Sitko (2014) sintetizaram que a espectroscopia por ED-XRF consiste basicamente da excitação da fonte e da capacidade do sistema de detecção. E como a resolução do sistema de energia dispersiva está diretamente relacionada com a resolução do detector, detectores semicondutores de alta resolução são utilizados em conjunto com analisadores multicanais, o que permitem que vários elementos sejam detectados ao mesmo tempo. No entanto, existe um limite para a taxa de contagem máxima em um detector semicondutor. Por este motivo justifica-se o uso de fontes modificadoras, como filtros, a fim de reduzir o espectro contínuo do tubo e evitar a saturação.

A utilização de filtros é comumente usada nas técnicas de XRF e possibilita que feixes de baixa energia tornem o feixe *quasi*-monocromático, como descrito por (ANJOS *et al.*, 2002) e (PEREIRA *et al.*, 2008). Na Figura 8 observa-se uma relação de exposição em relação à energia comparada ao uso de filtros de Al.

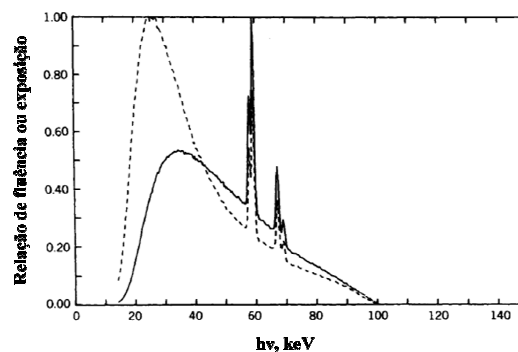


Figura 8 – Relação de fluência ou exposição em relação à energia. Na linha contínua são representados o número de fótons do espectro, e na linha pontilhada o espectro que foi exposto
Fonte: (ATTIX, 1986).

2.3.2 Detectores de raios X

Os primeiros detectores de raios X foram os filmes fotográficos. Desde então diversos detectores foram desenvolvidos a fim de melhorar a capacidade de detecção energética. Cintiladores e outros tipos de detectores foram desenvolvidos. A eficiência para a maioria destes detectores varia de 15 a 50% dos raios X absorvidos. A fim de permitir resoluções energéticas superiores, detectores semicondutores foram desenvolvidos e operam na ordem de 100 a 200 eV, o que os atribui a propriedade de atuarem como detectores de energia dispersiva, sendo a resolução espacial determinada pelo sistema de colimação dos feixes (FEIGIN e SVERGUN, 1987). O esquema ilustrativo de um detector multicanais pode ser observado na Figura 9.

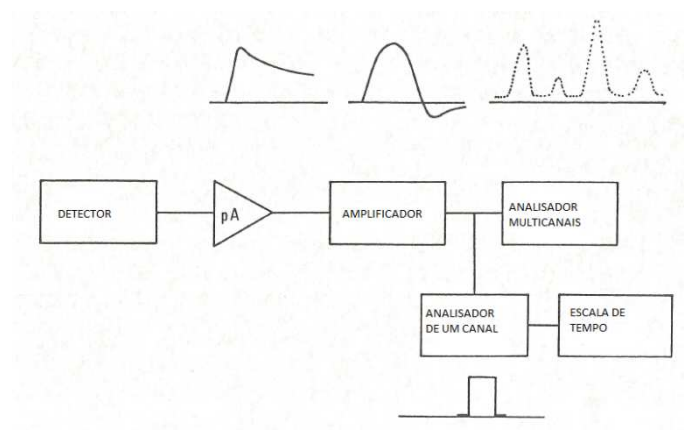


Figura 9 – Esquema ilustrativo de um detector multicanais
Fonte: Imagem adaptada de Cesareo (1988).

2.3.2.1 Detectores semicondutores

Um dos detectores mais utilizados em análises de alta sensibilidade de multi elementos em espectroscopia por XRF são os detectores semicondutores, como o de Si(Li) (CESAREO, 1988).

Os detectores absorvem a energia dos fótons incidentes através da absorção, decorrentes do efeito fotoelétrico, e convertem-na em um pulso eletrônico, sendo a amplitude deste pulso proporcional à energia do fóton (CESAREO, 1988).

2.3.2.2 Pré-amplificadores e amplificadores

Uma vez convertido em pulso eletrônico este sinal é eletronicamente processado. Pré-amplificadores funcionam como um primeiro estágio deste processamento, e usam transistores FET (*Field-Effect Transistors*) próximos aos detectores. No entanto os pulsos dos pré-amplificadores tendem a decair em frações de segundos na ordem de milisegundos e na amplitude de alguns miliVolt, momento no qual os amplificadores aumentam os níveis de tensão (CESAREO, 1988).

2.3.2.3 Analisadores multicanais

A saída do amplificador consiste na sequência de pulsos de amplitudes variadas correspondentes à distribuição energética dos fótons incidentes. A amplitude de cada pulso é então medida e convertida em um número digital que é armazenado em um histograma com uma memória. Este histograma passa por subseqüentes análises e interpretações, o que é conhecido como analisador multicanal, o qual é composto basicamente por um conversor analógico digital (*Analog to Digital Converter*, ADC) e por uma memória (CESAREO, 1988).

Ajustes no ganho do amplificador determinam o alcance energético que será gravado no analisador. A energia de calibração, em Volt por canal, é obtida pela divisão de uma energia conhecida que separa no espectro duas linhas de dois elementos conhecidos pelo número de canais e os separa em picos. A resolução energética do sistema (dada em eV ou keV) para cada pico é medida pela largura à meia altura, ou melhor conhecido do inglês por: *Full Width at Half Maximum* (FWHM), dos picos *quasi* Gaussianos, como ilustrado na Figura 10 (CESAREO, 1988).

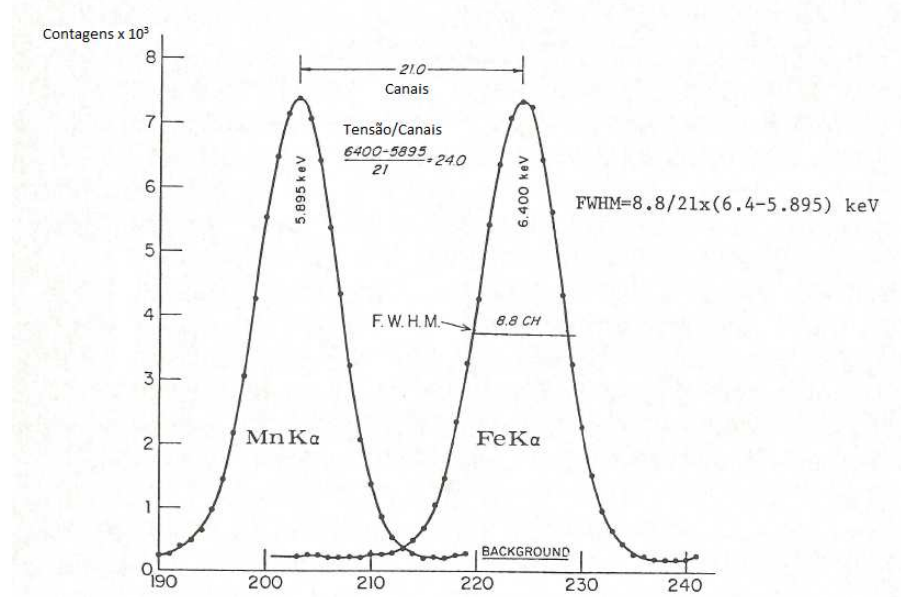


Figura 10 – Típico espectro de raios X com demonstração dos picos K_{α} do Mn e do Fe
Fonte: Imagem adaptada de Cesareo (1988).

2.4 Estatísticas

O uso de números na área da pesquisa permite mensurar os dados esperados, ou muitas vezes refutá-los (JACK e FOX, 2012). Uma hipótese inicial, derivada de várias deduções, é validada quando comparada aos dados encontrados. Quando estes dados falham, a discrepância é identificada e permite por indução modificar a hipótese. É então que um novo ciclo se inicia, a fim de encontrar dados que coincidam com a hipótese estabelecida, afirmando-a (BOX, HUNTER e HUNTER, 1978).

As variações produzidas pela distribuição de vários fatores que envolvem a coleta de uma medida, considerando os erros conhecidos e desconhecidos, são chamadas de erros experimentais. A confusão que os erros podem gerar sob os dados pode ser minimizada pelo uso de análises estatísticas adequadas (BOX, HUNTER e HUNTER, 1978).

2.4.1 Estatísticas e obtenção de curvas espectrais

O acúmulo de contagens medidas por unidade de tempo de fótons de raios X é distribuída em uma flutuação estatística que se assemelha à uma distribuição Gaussiana, a qual é distribuída com um desvio padrão igual à raiz quadrada das contagens totais. Sendo assim a precisão da medida de raios X relaciona-se diretamente com a intensidade medida. (BECKHOFF *et al.*, 2006).

2.4.2 Cálculo do espalhamento Compton

Para obter o valor energético do pico de espalhamento do Compton usa-se:

$$E' = E / 1 + \frac{E}{m_e} \times (1 - \cos 135) \quad \text{Eq. 1.5}$$

Na qual:

E' : é a energia final a ser calculada;

E : a energia K_α da Ag;

m_e : massa do elétron = 511 MeV; e,

$\cos 135$: ângulo de espalhamento que gera o pico Compton (ATTIX, 1986).

2.4.3 Normalização da curva de calibração

A primeira aproximação para a análise quantitativa foi o cálculo das intensidades espalhadas, descrito por Tertian e Claisse (1982) e aplicado por Silva *et al.* (2009); Silva (2011), na qual, foi considerada a sensibilidade da amostra como sendo:

$$S_\alpha = (I_E / I_{Esp}) / C_\alpha \quad \text{Eq. 1.6}$$

Onde:

S_a : Sensibilidade da amostra;

I_E : Intensidade fluorescente do elemento de interesse;

I_{Esp} : Intensidade fluorescente do espalhamento; e,

C_a : Concentração do elemento na amostra.

A intensidade fluorescente do elemento de interesse corresponde à área do pico que este elemento apresenta no espectro para a amostra em estudo, enquanto o espalhamento compreende à soma das áreas dos picos de espalhamento elástico e inelástico; e a concentração do elemento na amostra é dada pelo padrão de certificação da amostra da IAEA (Apêndices B - F).

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Características do equipamento

O equipamento de ED-XRF do Laboratório de Física Nuclear Aplicada da UTFPR é composto por um *kit* composto por um tubo de raios X modelo *Mini-X* e um detector do modelo *X-123SDD* (*Silicon Drift Detectors* – detectores de Si), ambos da marca Amptek®. Por tratar-se de um sistema de detecção é possível detectar diversos picos energéticos simultaneamente. Estes são identificados em um espectro no *software* que acompanha o equipamento (*software DppMCA*).

3.1.1 Tubo de raios X

O tubo de raios X *Mini-X* possui 360 g, uma janela de berílio na espessura de 127 μm e de ponto focal de aproximadamente 2 mm. Posicionando um filme radiográfico odontológico o ponto focal foi testado, e mensurado em 0,28 cm com um paquímetro.

O ângulo sólido formado entre o tubo de raios X e o detector é de 120° , e possui uma leve inclinação para aumentar a quantidade de feixes de fótons emitidos sob a amostra.

3.1.2 Detector

O detector semicondutor que acompanha o *kit*, denominado *X-123SDD* é um detector de Si, com um eletrodo capaz de melhorar a capacidade energética e aumentar as taxas de contagem.

O detector é montado em um refrigerador termoelétrico com uma entrada FET e acoplado à um pré-amplificador sensível, como ilustrado na Figura 11.

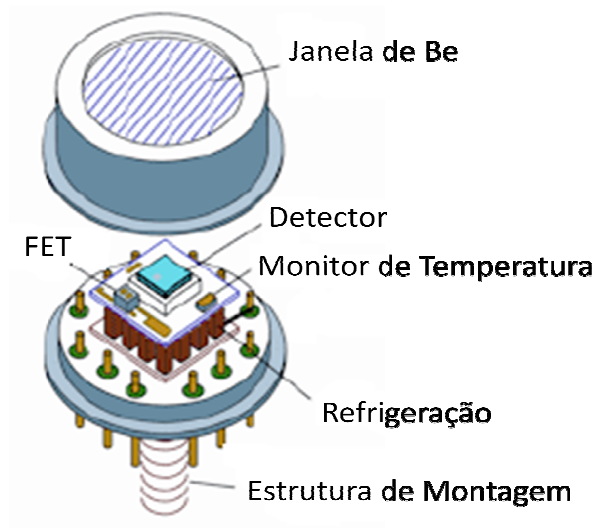


Figura 11 - Componentes estruturais do detector

Fonte: Imagem adaptada Amptek (2014b).

A área ativa do detector corresponde a 7 mm^2 , a espessura da janela de Be é de $25 \mu\text{m}$ e a conversão de ganho do pré-amplificador corresponde a 1 mV/keV . A combinação de ganhos finos e grossos pode ser ajustada entre 0,84 e 127,5. A correção do tempo morto, período em que o detector não consegue separar ou identificar os picos que chegam até ele, é corrigido de forma manual baseada na medida do canal rápido de ICR (*Integrated Client Radio*). Precisão de 1% para ICR < 1Mcps (Mega contagens por segundo) sob condições típicas (AMPTEK, 2014b).

3.1.3 Arranjo experimental

O arranjo experimental, ilustrado na Figura 12, é composto por: tubo de raios X, detector e pré-amplificador e amostra.

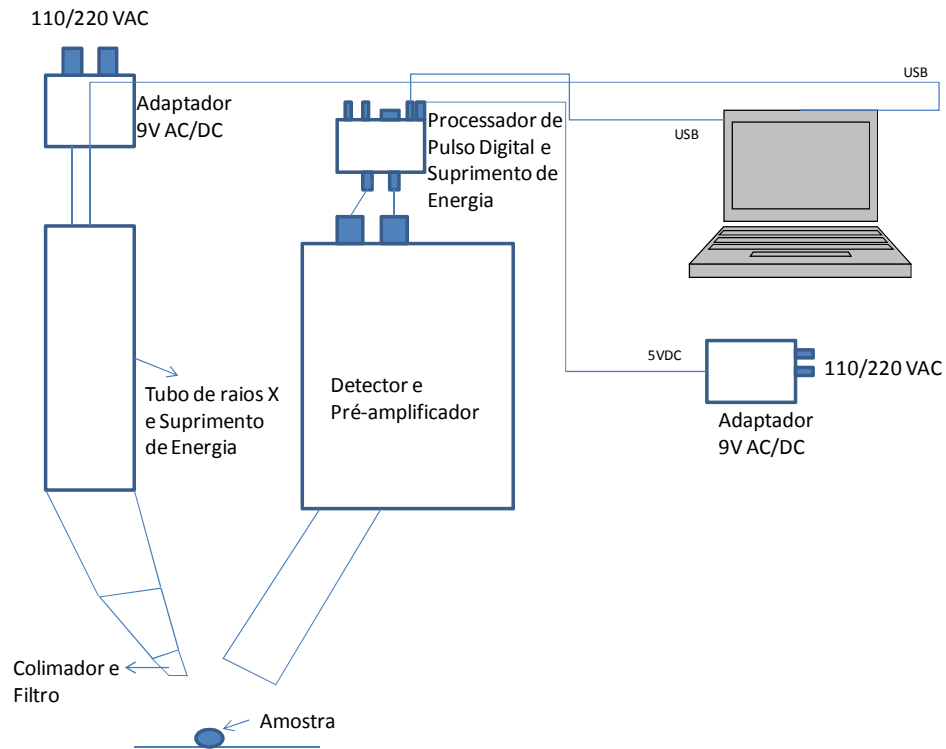


Figura 12 – Arranjo experimental
Fonte: Imagem adaptada Amptek (2014b).

3.1.4 Desempenho

As especificações sobre o desempenho do *kit* da Amptek® podem ser consultadas na Tabela 2.

Tabela 2 - Especificações do Desempenho da Espectroscopia

Resolução energética	135 to 155 eV FWHM/ 5,9 keV
Ruído do sinal (típico)	73 eV FWHM
Alcance energético	Eficiência >25% para raios X de 1 a 25 keV
Picos de <i>background</i>	7.000 a 1 (razão entre as contagens de 5,9 keV a 2 keV)
Taxa de contagem máxima	Dependente do pico. Taxa de entrada máxima varia em torno de: $1,0 \times 10^5$ a $4,9 \times 10^4$ (sec^{-1})

Fonte: Tabela adaptada Amptek (2014b).

3.1.5 Ajustes e calibração do espectro

Para ajustar os canais às faixas energéticas é preciso calibrar o *software DppMCA*. Antes de qualquer aquisição espectral uma amostra padrão de aço, disponibilizada com o *kit* foi irradiada à uma distância de 1,5 cm em relação ao tubo de raios X e o detector semiconductor. Como orientado pelo fabricante, foi definida a técnica de 30 kV e corrente de 30 μ A no tempo de 60 segundos, e identificado os picos de Fe e Mo. Com estes picos de referência, o *software* foi calibrado. Para garantir que de fato estes valores estavam coerentes à região dos canais o procedimento foi repetido até que os mesmos canais coincidisse com o valor energético esperado. Todos os espectros obtidos foram devidamente calibrados, da mesma maneira, para assegurar a veracidade dos dados obtidos.

3.2 Filtros de Alumínio

O primeiro estudo realizado com a neoplasia de tecido mamário de fibroadenoma foi a intervenção de filtros de alumínio (Apêndice A). Sob a mesma condição de técnica, ainda sem a curva de calibração, a amostra foi exposta sem o uso de filtros e com o uso de filtros de Al nas espessuras de 0,25 mm, 0,5 mm, 0,75 mm, 1 mm e 1,25 mm. Na Figura 13 pode-se observar a espessura de dois dos diferentes filtros em (a), e a região do tubo de raios X a qual os filtros foram posicionados em (b).



Figura 13 – Filtro de alumínio (Al). Em (a) são visualizados dois filtros de Al, um de 0,25 mm e o outro de 1 mm. E em (b) o tubo de raios X “aberto” no local onde foram inseridos os filtros de Al
Fonte: Imagem adaptada Amptek (2014b).

Os picos de Ca, Fe, Cu, e Zn foram analisados para as diferentes energias aplicadas sem o filtros de Al, e com o filtro de Al nas espessuras de 0,25 mm, 0,5 mm, 0,75 mm, 1 mm e 1,25 mm.

3.3 Curva de calibração

Para análise quantitativa é necessário definir uma curva de calibração para cada um dos elementos de interesse.

Estes padrões devem se assemelhar ao máximo à amostra que a ser analisada, simulando, sobretudo a sua matriz biológica, neste caso, basicamente os elementos carbono, nitrogênio, hidrogênio e oxigênio. Desta forma, os elementos-traço podem ser identificados sob as mesmas condições, pois, como descrito por Marguí, Queralt e Hidalgo (2009) existe interferência dos efeitos físicos e químicos na matriz da amostra. Estas interferências são provocadas devido à variação do tamanho das partículas, uniformidade, homogeneidade e condições da superfície da amostra, assim como pela diferença de concentração dos elementos presentes.

Cinco diferentes padrões de amostras com matrizes biológicas da Agência de Energia Atômica Internacional (*International Atomic Energy Agency - IAEA*) foram submetidos à técnica de ED-XRF (IAEA, 2014). Referem-se aos códigos: A13, V8, V10, 153 e 407, e correspondem respectivamente a sangue de animal, flores de centeio, feno em pó, leite em pó e peixe; todos no estado físico de pó. Mais detalhes, como a concentração dos elementos Ca, Fe, Cu e Zn presente em cada um dos padrões podem ser observados nos Apêndices B, C, D, E e F.

3.3.1 Preparação dos padrões de amostras

Para estabelecer a curva de calibração os cinco padrões biológicos da IAEA foram submetidos à mesma técnica e as mesmas condições, estando cada um deles inserido em um compartimento diferente de um mesmo molde de plástico.

Antes dos padrões serem submetidos à técnica o molde de plástico foi esterilizado com ácido etilenodiamino tetra-acético (*Ethylenediamine tetraacetic acid* - EDTA) disódico (reagente analítico de $2H_2O: C_{10}H_{14}N_2O_8Na.2H_2O$), na proporção de 50 ml de água para uma colher de chá de EDTA disódico. O molde plástico permaneceu por 24 horas nesta solução na capela Scientech (da marca Brolesi®) até secar completamente. Esta solução foi retirada com água e álcool isopropílico.

Cada um dos orifícios foi isolado com fitas dupla face (da marca Delfix®). O isolamento permitiu evitar a contaminação dos padrões biológicos, já que o pó da amostra estava aderido à superfície da fita dupla face, reduzindo a possibilidade de contaminação no próximo orifício.

Os padrões biológicos caracterizados pelo IAEA pelas descrições: A13, V8, V10, 153 e 407 foram inseridos em diferentes orifícios do mesmo molde plástico. Todos no estado físico de pó, a fim de simular a matriz das amostras neoplásicas liofilizadas*, foram homogeneizados com um bastão metálico até que ficassem uniformes e homogêneos. Depois de criar uma superfície que se aproxima da plana, estes padrões receberam uma película de filme PVC (cloreto de polivinil) transparente (Bom preço, produzido por Alumileste® e comercializado pela rede Wal-Mart Brasil®). Vale ressaltar que primeiramente foi utilizado parafilm (filme para laboratórios, da marca Bemis®), mas o espalhamento provocado por este e a análise espectral dos dois materiais identificou a menor interferência do filme PVC transparente na obtenção dos espectros, o qual foi utilizado.

3.3.2 A técnica

Para estabelecer a curva de calibração, diferentes técnicas foram testadas. Como o padrão biológico do IAEA conhecido como V8 representa o padrão de maior dificuldade na identificação dos picos energéticos, este foi utilizado como base para estabelecer a técnica, entendendo que, estabelecida técnica e fatores de exposição capazes de identificar o padrão V8, logo os demais estarão adequados a esta parametrização.

* O processo de liofilização corresponde à retirada da água do material, e é realizado através de um equipamento de liofilização (neste caso um liofilizador modelo LS 3000 da Terroni® (Conceição, 2011), que por meio de pressões negativas e aumento gradativo de temperatura realiza a sublimação das partículas de água, as quais passam da fase sólida para a fase gasosa, sem alterar as propriedades estruturais da amostra (Al-Bahri e Spyrou, 1996; Conceição, 2011).

Os picos de interesse são os de Ca, Fe, Cu e Zn, os quais estão respectivamente na faixa energética igual à: 3,69 keV, 6,40 keV, 8,04 keV e 8,63 keV. Por estarem nesta faixa energética, apenas o tubo com alvo de Ag foi utilizado. O uso do alvo de Au dificultaria a identificação dos elementos devido sua interferência em faixas energéticas de interesse ($L\alpha_1$ igual a 9,71 keV).

Primeiramente estabeleceu-se a técnica de 20 keV com 99 μ A, no tempo de 300 s e a distância de 1,5 cm aproximadamente, como ilustrado na Figura 14.

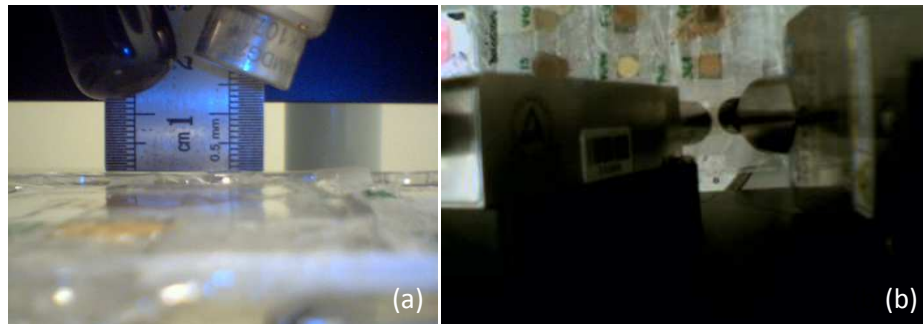


Figura 14 – Posicionamento do molde plástico e amostras em relação ao tubo de raios X e detector. Em (a) vista lateral e em (b) visão superior
Fonte: Autoria própria.

Esta técnica foi a primeira testada visto que com a mesma atenderia-se todas as energias de interesse, além de permitir que todos os elementos fossem identificados. A corrente foi estabelecida no máximo valor permitido pelo equipamento, para permitir a maior excitação da amostra, e o máximo de contagens. E o tempo foi estabelecido em 300 s porque em torno de 150 s já se observava a estabilização do espectro, no qual novos picos não aparecem e apenas ocorre um aumento proporcional das contagens. No entanto esta primeira técnica apresentou um *dead time* de 11%, além de que nem todos os picos de interesse foram identificados.

Considerando os estudos já descrito por Marguí, Queralt e Hidalgo (2009); Marguí, Zawisza e Sitko (2014) sobre a importância do uso de filtros de Al para identificação de elementos-traço em amostras biológicas e a inviabilidade da técnica estabelecida em primeiro momento, uma segunda técnica foi testada. Nesta segunda tentativa de otimizar o espectro, e já tendo os resultados do estudo com filtro de Al para tecido de mama optou-se pelo uso de um filtro de Al na espessura de 0,25 mm, inserido externamente, acoplado ao tubo de raios X (a fim de avaliar se de fato era necessário inseri-lo no interior do tubo). Com a mesma técnica

a mesma amostra V8 foi analisada. No entanto o espectro apresentou apenas “ranhuras” dos locais que se esperavam visualizar os picos dos elementos Ca, Fe, Cu e Zn.

Na terceira tentativa a técnica foi alterada para 30 keV para que os espalhamentos inelásticos e elásticos fossem calculados (conforme equação 1.5).

A corrente permaneceu no valor máximo, a fim de otimizar a técnica, e com o objetivo de analisar como o *dead time* se comportaria na presença do filtro de Al. A técnica estabelecida foi de 30 keV, 99 μ A, e a distância de 1,5 cm aproximadamente. Ao tempo de 300 s já se observava os picos de interesse, diferente da situação anterior; no entanto, ainda que fossem visíveis suas contagens não eram representativas. Para que a incerteza fosse menor que 3% o tempo estabelecido foi de 1000 s.

3.3.3 Normalização da curva de calibração

Todos estes cálculos foram realizados calculando os erros associados (para os erros da área do pico energético a incerteza do mesmo foi considerada).

A amostra V10 foi então escolhida como o padrão certificado de base, visto que é a amostra que mais se assemelha às matrizes das neoplasias de fibroadenoma e a ductal invasiva. O cálculo do ajuste de normalização foi obtido ao dividir a sensibilidade da amostra em estudo pela sensibilidade da amostra V10 (amostra padrão), e para encontrar a intensidade fluorescente da amostra normalizada, a intensidade do pico obtida experimentalmente foi dividida pelo fator de normalização.

O erro da concentração, apresentado na certificação do IAEA, foi subtraído do intervalo de confiança (95%) e então dividido por dois, para que fosse ajustado ao intervalo de confiança, assim como os demais valores de intensidade fluorescente; considerando os picos Gaussianos (VUOLO, 1996).

O cálculo demonstrado na equação 1.6 torna os valores encontrados praticamente independentes das suas matrizes (SILVA *et al.*, 2009).

Com estes dados, gráficos foram construídos no software OriginPro®. E a equação de reta de primeiro grau foi construída como base para que as concentrações presentes nas amostras pudessem ser calculadas, como é observado na Equação 1.7:

$$I_{EN} = C_{\alpha}x + b \quad \text{Eq. 1.7}$$

Onde:

I_{EN} : Intensidade fluorescente do elemento de interesse normalizado

Devido a intensidade do pico b (da Equação 1.7) não existir, este foi igualado à zero. Então o valor da concentração normalizada foi obtido pela divisão da intensidade fluorescente do elemento de interesse normalizado pelo valor de x encontrado para cada elemento em diferentes equações de reta (os quais tiveram seus valores ajustados para o mesmo intervalo de confiança dos picos energéticos). Esses cálculos permitiram ainda que houvesse uma transferência do erro do valor de x da equação 1.7, calculado para cada elemento e para cada amostra, em relação ao valor de erro da concentração certificada pela IAEA. Essa transferência de erro permitiu que o erro total fosse calculado e um novo gráfico construído.

3.4 Amostras de neoplasias mamárias

A amostra de tecido neoplásico mamário de característica fibroadenoma, assim como a de tecido ductal invasivo é resultante de trabalhos de (CONCEIÇÃO, 2011). Ambas amostras foram submetidas ao processo de liofilização. Obtido para fins de processos cirúrgicos, este material foi aprovado pelo Comitê de Ética do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto de acordo com diretrizes éticas da declaração de Helsinki e suas revisões, e corresponde ao processo de número 4305/2009 como descrito em Conceição (2011).

Após ter sido retirada do frasco com uma pinça cirúrgica, a amostra biológica foi disposta sob um guardanapo a uma distância de 1,5 cm em relação ao tubo de raios X e ao detector semicondutor. Distância que se manteve como padrão para todas as incidências e para a calibração do *software*.

3.4.1 Análise quantitativa

As intensidades dos picos para cada uma das neoplasias foram calculadas conforme Equação 1.7, e permitiram que as concentrações para cada elemento das amostras de tecido mamário fossem encontradas.

4. RESULTADOS E DISCUSSÕES

4.1 Filtro de Al

Na Figura 15 o erro relativo de medida dos diferentes elementos é apresentado em função da espessura do filtro de Al para o tecido de neoplasia mamária de fibroadenoma.

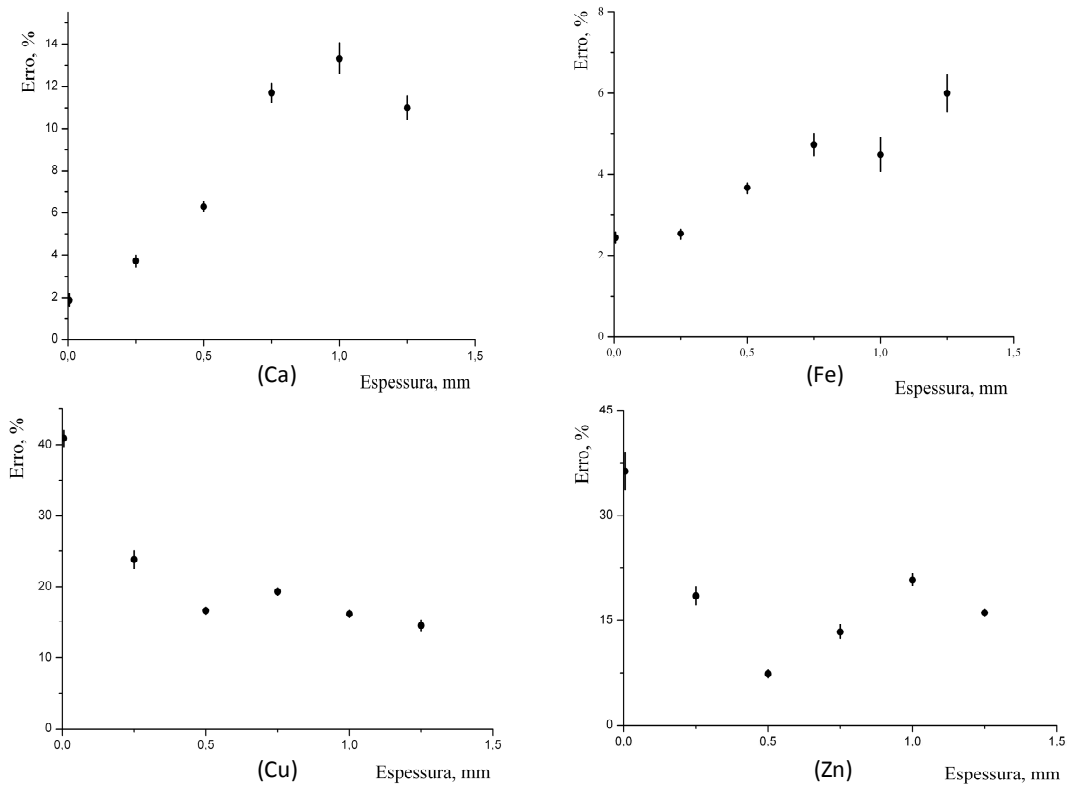


Figura 15 – Erro relativo dos elementos Ca, Fe, Cu e Zn em função da espessura dos filtros de Al
Fonte: Gráficos gerados no software OriginPro®.

4.1.1 O uso de filtros de Al e suas interferências para o elemento Ca

No caso do Ca o erro cresce com o aumento da espessura do filtro, atinge ao máximo com o filtro de 1 mm e começa a diminuir novamente.

Para atingir a maior eficiência de medição da concentração de Ca é preciso fazer medidas sem filtração do feixe primário.

4.1.2 O uso de filtros de Al e suas interferências para o elemento Fe

O erro de medição da concentração de Fe praticamente não muda no começo do espectro, e começa a crescer linearmente em caso das espessuras maiores de 0,25mm.

Utilização dos filtros de espessura até 0,25mm proporciona as melhores condições para medição da concentração de Fe.

4.1.3 O uso de filtros de Al e suas interferências para o elemento Cu

A dependência do erro de concentração de Cu em relação da espessura do filtro mostra a brusca diminuição do erro com o aumento da espessura do filtro no começo do espectro. Uma tendência à estabilidade inicia com o uso de filtros na espessura de 0,5mm.

Os filtros com espessura maior de 0,5mm são mais favoráveis para medição de concentração de Cu.

4.1.4 O uso de filtros de Al e suas interferências para o elemento Zn

O erro de medição da concentração de Zn diminui com o aumento da espessura do filtro até 0,5mm, onde então o menor erro relativo é atingido. Depois o erro recomeça a crescer, atinge o máximo em 1mm e no fim do espectro de novo diminui.

A espessura do filtro que permite obter o menor erro de concentração é igual aproximadamente a 0,5mm.

4.1.5 Avaliação da análise gráfica

O resultado do uso de filtros de Al demonstra que para alguns elementos, como o Ca, que chega a diminuir o erro relativo na ordem de 3 a 7 vezes. Para a melhor eficácia de medição de concentração observa-se que para os elementos Ca e Fe o não uso de filtros no feixe primário é o ideal, enquanto para o Cu e Zn o uso de filtros de 0,5 mm pode ser representa o menor erro de incerteza da intensidade do pico.

Para medição de concentração de todos os elementos químicos mencionados acima de uma vez, a escolha de filtro de 0,25 mm é favorável.

4.2 Otimização da técnica

Na Figura 16 observa-se que para o padrão biológico V8 da IAEA sem o filtro de Al de 0,25 mm os picos dos elementos Cu e Zn são bem menos visíveis quando comparados ao seu uso (espectro em vermelho na Figura 16).

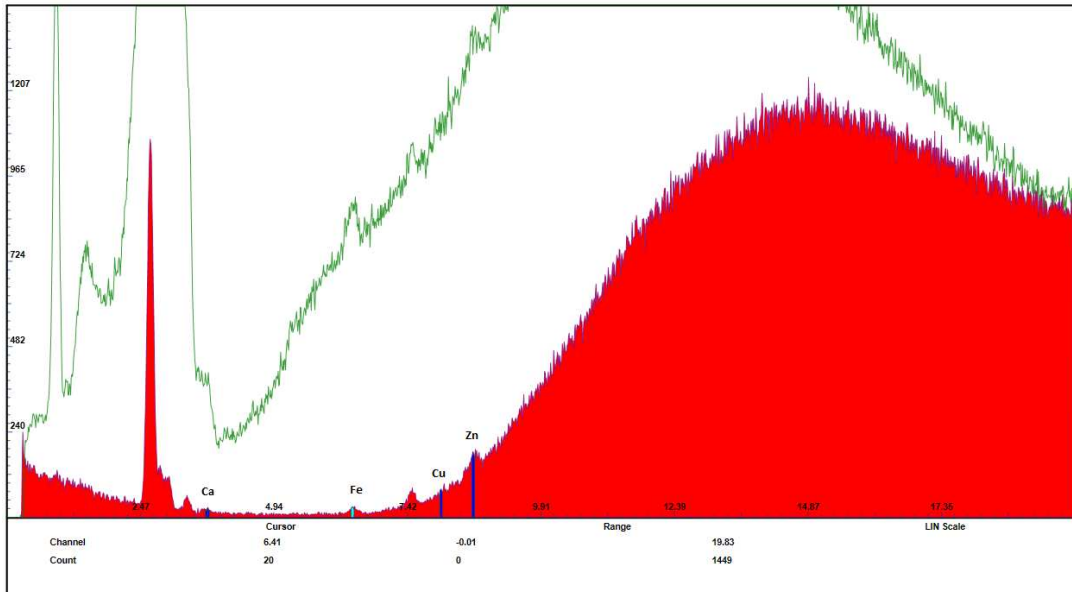


Figura 16 – Espectro do padrão biológico V8 da IAEA. Em verde observa-se a técnica de 30Kv, 99 μ A e 1000s sem filtros. Em vermelho observa-se a mesma técnica com filtro de Al de 0,25mm no interior do tubo de raios X do ED-XRF

Fonte: Imagem adaptada do *software DppMCA*.

A constatação apresentada na Figura 16 e os resultados encontrados com o estudo de filtros para a amostra de tecido neoplásico mamário definiram a necessidade da utilização de filtros de Al na espessura de 0,25 mm. O impacto do uso do filtro de Al no interior ou acoplado no final do tubo de raios X é apresentado na Figura 17.

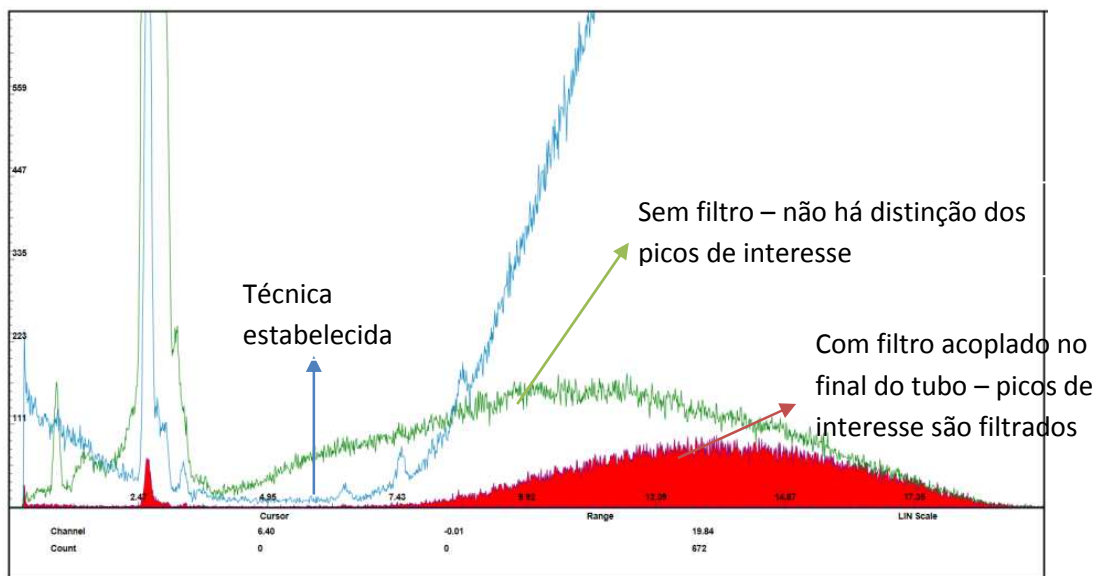


Figura 17 – Comparativo de espectros. Em verde é demonstrada a primeira técnica descrita para a amostra V8. Em vermelho a segunda técnica e em azul a técnica definida como padrão

Fonte: Imagem adaptada do *software DppMCA*.

O uso do filtro no interior do tubo de raios X e não acoplado no final do tubo demonstra que a diferença deve ocorrer pelo fato de possíveis interações no interior do tubo de raios X ocorram antes que este atinja a amostra.

O uso de filtros no interior do tubo de raios X permitiu que o *dead time* variasse de inexistente à 6%.

4.2.1 Técnica ideal para análise de todos os elementos simultaneamente

A energia de 30 keV permite que todos os elementos de interesse para o estudo de tecido neoplásico mamário sejam visualizados, assim como os picos de espalhamento elástico e inelástico. Não havendo necessidade de mais energia, já que todos os picos são visualizados com 30 keV.

A corrente do equipamento da UTFPR trabalha em microAmpéres (μA). Para obter a maior intensidade o seu valor máximo foi adotado, não fazendo sentido diminuí-lo, sobretudo considerando a intervenção do uso de filtros de Al.

O estudo do tempo foi avaliado considerando o desgaste do tubo e a otimização dos procedimentos. Sendo assim, tempos inferiores à 1000 s, ainda que muitas vezes já apresentem todos os picos de interesse, não devem ser utilizados devido a poucas contagens para os elementos-traço.

O uso do filtro de Al no interior do tubo de raios X antes do colimador elimina os fótons espalhados. Fato que faz com que os resultados sejam diferentes quando o filtro é posicionado no seu interior ou se, acoplado ao tubo e posicionado na porção final do tubo de raios X e do protetor de borracha.

O estudo da aplicação da técnica para que todos os elementos sejam simultaneamente analisados é igual a 30 keV, 99 μs , 1000 s e com filtro de Al de espessura de 0,25 mm no interior do tubo de raios X.

4.3 Curvas de Calibração

4.3.1 Cálcio

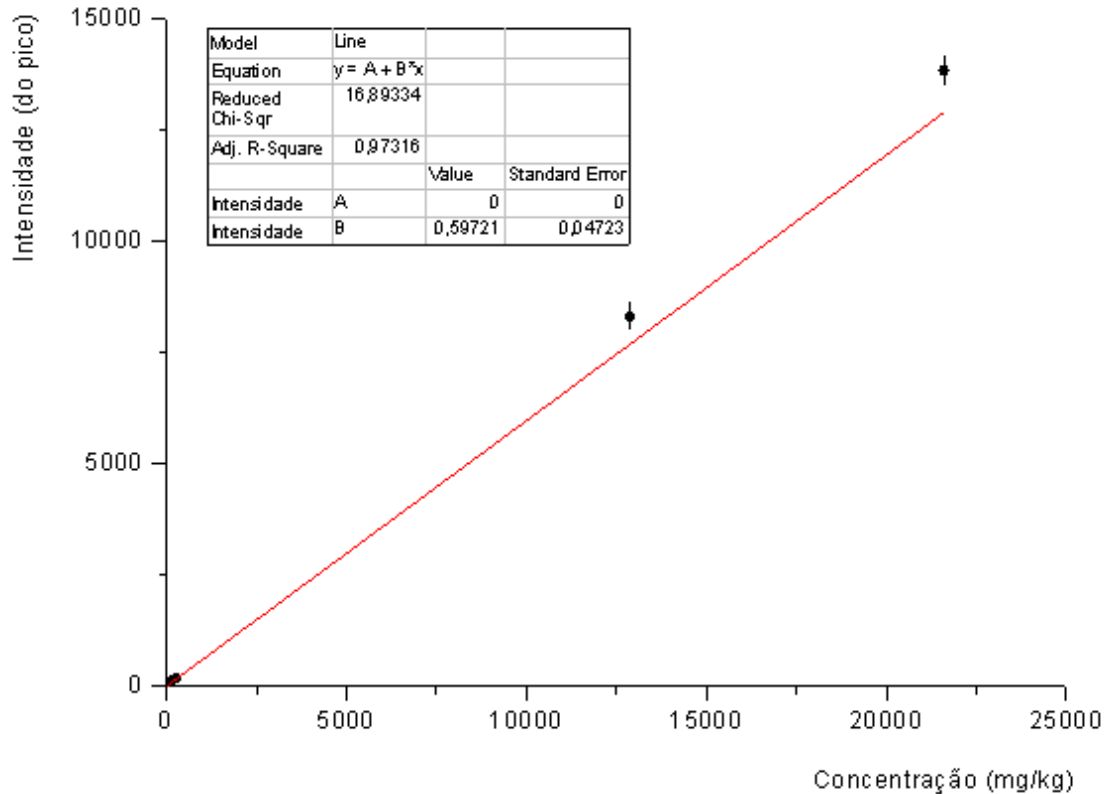


Figura 18 – Intensidade do pico de Ca em relação à concentração (em mg/kg) da amostra
Fonte: Gráficos gerados no software OriginPro®.

A Figura 18 é o resultado da calibração para o elemento Ca. A equação final: $\text{Concentração} = (1,67 \pm 0,14) \text{ Intensidade}$. O limite inferior do equipamento é aproximadamente igual a 1 mg/kg.

4.3.2 Ferro

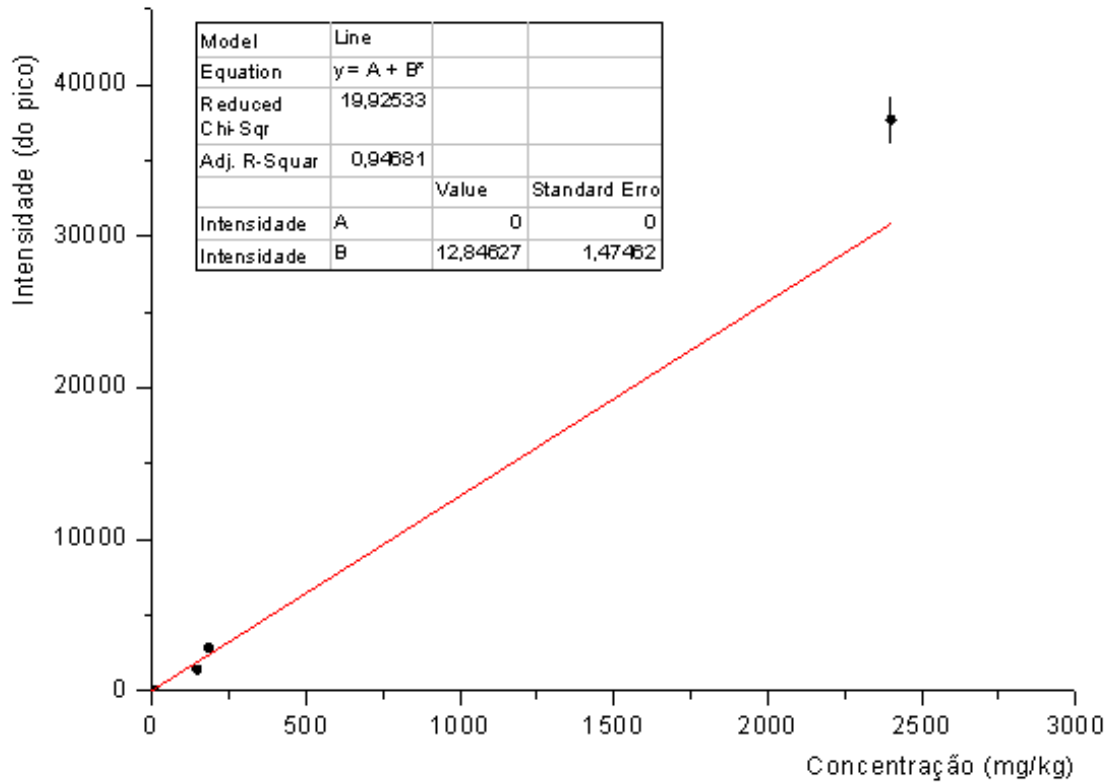


Figura 19 – Intensidade do pico de Fe em relação à concentração (em mg/kg) da amostra.
Fonte: Gráficos gerados no software OriginPro®.

A Figura 19 é o resultado da calibração para o elemento Fe. A equação final: $\text{Concentração} = (0,0775 \pm 0,0090) \text{ Intensidade}$. O limite inferior do equipamento é aproximadamente igual a 0,3 mg/kg.

4.3.3 Cobre

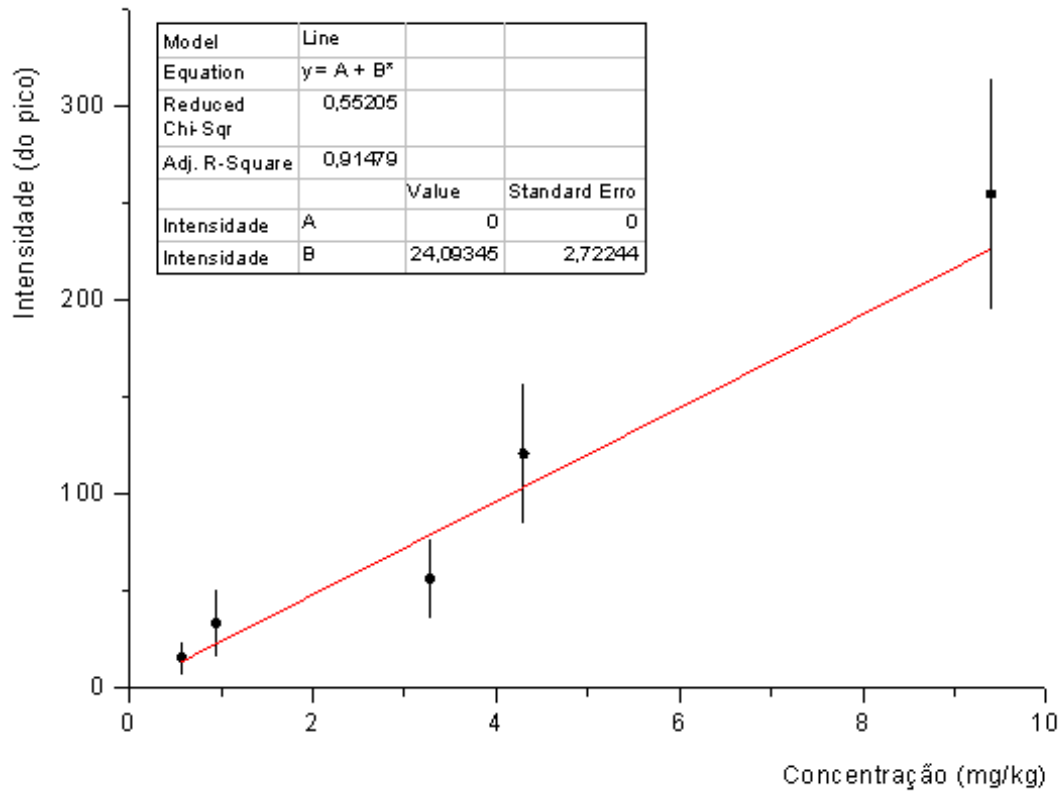


Figura 20 – Intensidade do pico de Cu em relação à concentração (em mg/kg) da amostra.
Fonte: Gráficos gerados no software OriginPro®.

A Figura 20 é o resultado da calibração para o elemento Cu. A equação final: $\text{Concentração} = (0,0415 \pm 0,0046) \text{ Intensidade}$. O limite inferior do equipamento é aproximadamente igual a 0,2 mg/kg.

4.3.4 Zinco

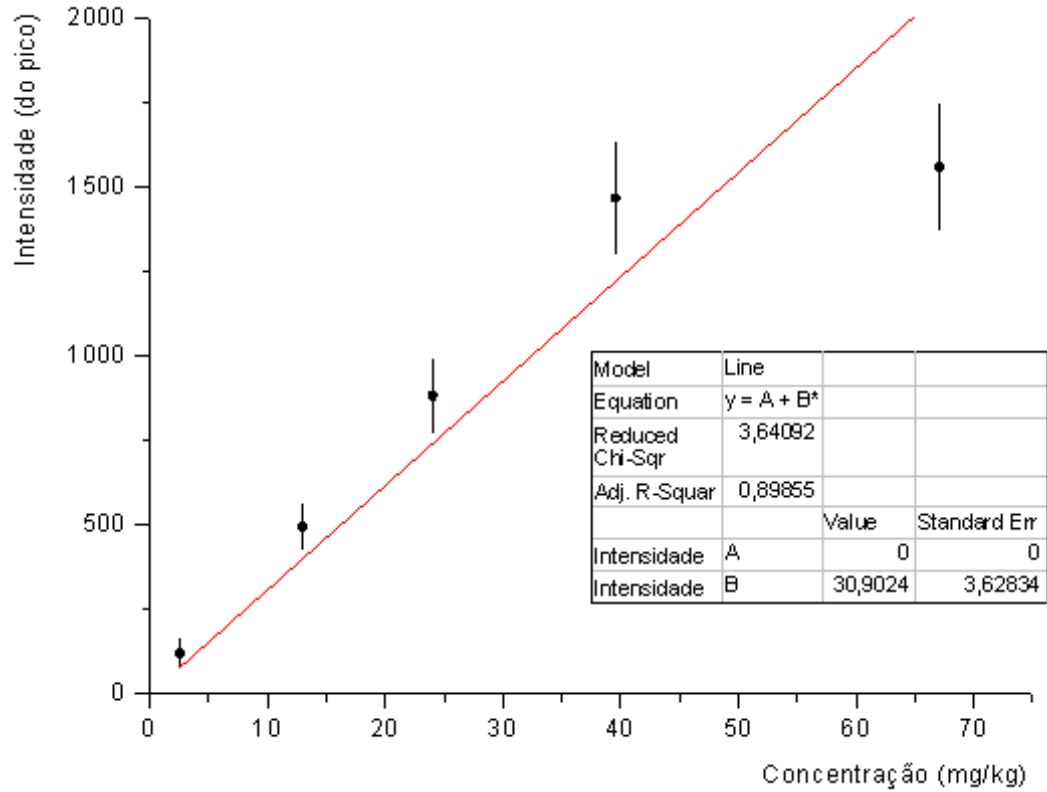


Figura 21 – Intensidade do pico de Zn em relação à concentração (em mg/kg) da amostra.
Fonte: Gráficos gerados no software OriginPro®.

A Figura 21 é o resultado da calibração para o elemento Zn. A equação final: $\text{Concentração} = (0,0324 \pm 0,0038) \text{ Intensidade}$. O limite inferior do equipamento é aproximadamente igual a 0,1 mg/kg.

4.4 Análise quantitativa

A comparação dos valores certificados para os padrões das amostras biológicas da IAEA e os resultados encontrados nas curvas de calibração para o Ca são apresentados na Tabela 3.

Tabela 3 - Concentração IAEA e obtida pela curva de calibração para Ca

Amostra IAEA	Concentração certificada IAEA (mg/kg)*	Concentração calculada (mg/kg)
A13	286 ± 23	318 ± 25
V8	149 ± 5	210 ± 17
V10	21600 ± 300	23200 ± 1800
153	12870 ± 150	13900 ± 1100
407	27 ± 0,5	18 ± 1

Fonte: Autoria própria

*Concentração certificada IAEA com erros calculados para intervalo de confiança de 68%.

Observa-se na Tabela 3 os valores da concentração certificada pela IAEA de cada padrão de amostra biológico estudado em relação aos valores encontrados pela curva de calibração para o elemento Ca. Uma das hipóteses para as diferenças apresentadas nos valores é o método usado para o cálculo de normalização da curva de calibração.

Na Tabela 4 as concentrações dos padrões de amostra biológico IAEA são comparados com os obtidos pela curva de calibração são apresentadas para o elemento Fe.

Tabela 4 - Concentração IAEA e obtida pela curva de calibração para Fe

Amostra IAEA	Concentração certificada IAEA (mg/kg)*	Concentração calculada (mg/kg)
A13	2400 ± 50	3000 ± 340
V8	4 ± 0,3	6 ± 1
V10	186 ± 2	220 ± 25
153	2,5 ± 0,5	3 ± 0,5
407	146 ± 1,5	109 ± 12

Fonte: Autoria própria

*Concentração certificada IAEA com erros calculados para intervalo de confiança de 68%.

Na Tabela 5 observa-se a análise de concentrações certificadas e calculadas por meio da curva de calibração para o elemento Cu. Observa-se que para a amostra 153 a concentração normalizada ficou muito próxima das diferenças encontradas por Silva (2011) em análises comparativas entre o padrão da amostra e o encontrado; ainda que em sua tese Silva compare-se também às técnicas de ED-XRF e TXRF.

Tabela 5 - Concentração IAEA e obtida pela curva de calibração para Cu

Amostra IAEA	Concentração certificada IAEA (mg/kg)*	Concentração calculada (mg/kg)
A13	4,3 ± 0,2	5,0 ± 0,6
V8	1,0 ± 0,1	1,4 ± 0,2
V10	9,4 ± 0,1	10,6 ± 1,2
153	0,6 ± 0,1	0,6 ± 0,1
407	3,3 ± 0,1	2,3 ± 0,3

Fonte: Autoria própria

*Concentração certificada IAEA com erros calculados para intervalo de confiança de 68%.

Para a análise quantitativa dos padrões biológicos para o elemento Zn observa-se a Tabela 6.

Tabela 6 - Coconcentração IAEA e obtida pela curva de calibração para Zn

Amostra IAEA	Concentração certificada IAEA (mg/kg)*	Concentração calculada (mg/kg)
A13	13,0 ± 0,5	16,1 ± 1,9
V8	2,5 ± 0,2	3,9 ± 0,5
V10	24,0 ± 0,5	28,6 ± 3,4
153	39,6 ± 0,8	47,5 ± 5,6
407	67,1 ± 0,4	50,5 ± 5,9

Fonte: Autoria própria

*Concentração certificada IAEA com erros calculados para intervalo de confiança de 68%.

Observa-se que para todos os elementos o padrão de amostra 407 (peixe) apresentou valores inferiores aos valores certificados, possivelmente decorra do cálculo de normalização da curva de calibração, no qual a sensibilidade da amostra foi encontrada. A amostra 153 foi a que apresentou valores mais próximos da concentração certificada pela IAEA.

4.4.1 Fibroadenoma

O resultado da análise quantitativa para o tecido mamário de fibroadenoma é demonstrado na Tabela 7.

Tabela 7 - Análise quantitativa para tecido neoplásico mamário benigno

Elemento	Concentração (mg/kg)	Erro (%)
Ca	481	8
Fe	78	11
Cu	27	11
Zn	11	13

Fonte: Autoria própria.

4.4.2 Neoplasia ductal invasivo

O resultado da análise quantitativa para o tecido mamário ductal invasivo é demonstrado na Tabela 8.

Tabela 8 - Análise quantitativa para tecido neoplásico mamário maligno

Elemento	Concentração (mg/kg)	Erro (%)
Ca	4223	8
Fe	155	11
Cu	20	12
Zn	86	12

Fonte: Autoria própria.

As análises quantitativas das neoplasias, apresentada nas Tabelas 7 e 8 demonstram o aumento significativo das concentrações da maioria dos elementos analisados em tecido neoplásico maligno (neoplasia ductal invasivo). O Fe e Zn, envolvidos no processo de

angiogênese, são encontrados em maior quantidade em neoplasia maligna. O elemento Cu apresentou menor concentração no tecido neoplásico maligno. Como ambas as análises foram realizadas em neoplasias seria interessante compará-lo a um tecido sadio de mama, submetido a mesma técnica de liofilização e à mesma exposição à ED-XRF. A presença de uma quantidade bastante superior do elemento Ca na neoplasia maligna pode estar relacionada com a propensão deste tecido ao processo de calcificação, comumente encontrado em neoplasias malignas.

5. CONCLUSÕES

5.1 Conclusões gerais

Para avaliação do impacto da filtração do feixe primário na eficiência de detecção de Ca, Fe, Cu, Zn em amostras de tecido neoplásico mamário através da técnica de ED-XRF foram medidos seis espectros de raios X espalhados: sem filtração e com filtração igual 0,25 mm, 0,50 mm, 0,75 mm, 1,00 mm e 1,25 mm de Al.

Analisando os espectros obtidos foram construídos os gráficos do erro relativo de concentração de cada elemento químico em função da espessura de filtro.

Observou-se a escolha correta da espessura do filtro pode diminuir o erro relativo de 3 a 7 vezes. Em caso de medição simultânea de todos os elementos deve ser escolhido o filtro de 0,25 mm.

O filtro deve ser posicionado entre o tubo de raios X e o colimador de saída.

Com intuito de sugerir a condição de medição mais favorável para a análise simultânea das concentrações de todos os elementos a técnica de 30 keV, 99 μ A, 1000 s e 0,25 mm de filtro de Al no feixe primário de excitação de raios X foi a que mais satisfaz as necessidades de análise em tecidos neoplásicos de mama.

Foi executada a calibração do equipamento em relação aos Ca, Fe, Cu e Zn usando os padrões biológicos de diferentes matrizes orgânicas. As concentrações dos padrões biológicos foram corrigidas considerando os picos de espalhamentos elásticos e inelásticos presentes no espectro. Diferenças entre os valores certificados e os resultados obtidos através da calibração mostraram que o processo de correção da concentração pelos picos de espalhamento é impreciso e permite reduzir o erro de calibração só até aproximadamente 10%.

Os limites inferiores do equipamento são: 1 mg/kg para Ca, 0,3 mg/kg para Fe, 0,2 mg/kg para Cu e 0,1 mg/kg para Zn.

As análises quantitativas das amostras de tecido neoplásico permitiram constatar as diferenças de concentração entre tecidos neoplásicos mamários benignos e malignos, e as concentradas alteradas, como visto para os elementos Fe e Zn, sugerem a continuidade das pesquisas.

5.2 Sugestões para trabalhos futuros

- i. Comparar os dados encontrados nesta dissertação com outros obtidos em diferentes *softwares* e obtidos por diferentes técnicas;
- ii. Realizar análises quantitativas com mais amostras de tecido neoplásico mamário;
- iii. Estabelecer curvas de calibração com outros padrões de amostras biológicas;
- iv. Comparar resultados experimentais com resultados obtidos por simulação Monte Carlo;
- v. Comparar os valores encontrados nas amostras neoplásicas com amostras de tecido mamário normal.
- vi. Repetir o estudo com anodos de Mo e Rh.

REFERÊNCIAS

AL-BAHRI, J. S.; SPYROU, N. M. **Photon Linear Attenuation Coefficients and Water Content of Normal and Pathological Breast Tissues.** *Appl. Radiat. Isot.* Great Britain: Elsevier. 47: 777-784 p. 1996.

AL-EBRAHEEM, A.; FARQUHARSON, M. J.; RYAN, E. **The evaluation of biologically important trace metals in liver, kidney, and breast tissue.** *Applied Radiation and Isotopes:* Elsevier 2009.

AL-EBRAHEEM, A.; GERAKI, K.; LEEK, R.; HARRIS, A. L.; FARQUHARSON, M. J. The use of bio-metal concentrations correlated with clinical prognostic factors to assess human breast tissues. **X-Ray Spectrometry**, v. 42, n. 4, p. 330-336, Jul-Aug 2013. ISSN 0049-8246.

AMPTEK. MP1 XRF Mounting Plate. 2014a. Disponível em: <<http://www.amptek.com/products/mp1-xrf-mounting-plate/>>. Acessado em 15/07/2014.

AMPTEK. Specifications. 2014b. Disponível em: <<http://www.amptek.com/technical-resources/>>. Acessado em 15/07/2014.

ANJOS, M. J.; LOPES, R. T.; JESUS, E. F. O.; SIMABUCO, S. M.; CESAREO, R. Quantitative determination of metals in radish using x-ray fluorescence spectrometry. **X-Ray Spectrometry**, v. 31, n. 2, p. 120-123, 2002.

ATTIX, F. H. **Introduction to radiological physics and radiation dosimetry.** U.S.A.: John Wiley & Sons, 1986. 607p.

BECKER, P. F. L. **Patologia Geral.** São Paulo, Brasil: Sarvier, 1997. 242p.

BECKHOFF, B.; KANNGIEßER, B.; LANGHOFF, N.; WEDELL, R.; WOLFF, H. **Handbook of Practical X-Ray Fluorescence Analysis.** Germany: Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 2006. 863p.

BORN, M. **Atomic physics**. 8 ed. New York, U.S.A.: Dover Publications, 1969. 495p.

BORRIRUKWANIT, K.; LAFLEUR, M. A.; MERCURI, F. A.; BLICK, T.; PRICE, J. T.; FRIDMAN, R.; PEREIRA, J. J.; LEARDKAMONKARN, V.; THOMPSON, E. W. The type I collagen induction of MT1-MMP-mediated MMP-2 activation is repressed by $\alpha V\beta 3$ integrin in human breast cancer cells. **Matrix Biology**, v. 26, n. 4, p. 291-305, 2007. ISSN 0945-053X. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0945053X06004082>>. Acessado em 20/05/2014.

BOX, G. E. P.; HUNTER, W. G.; HUNTER, U. S. **Statistics for experimenters: an introduction to design, data analysis, and model building**. U.S.A.: John Wiley & Sons, 1978. 653p.

BRENNAN, S. C.; THIEM, U.; ROTH, S.; AGGARWAL, A.; FETAHU, I. S.; TENNAKOON, S.; GOMES, A. R.; BRANDI, M. L.; BRUGGEMAN, F.; MENTAVERRI, R.; RICCARDI, D.; KALLAY, E. Calcium sensing receptor signalling in physiology and cancer. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research**, v. 1833, n. 7, p. 1732-1744, 7// 2013. ISSN 0167-4889. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0167488912003898>>. Acessado em 03/05/2014.

BROWN, L. F.; GUIDI, A.J.; SCHNITT, S. J.; VAN DE WATER, L.; IRUELA-ARISPE, M. L.; YEO, TET-KIN T.; KATHIDVORAK, H. F. **Vascular Stroma Formation in Carcinoma in Situ, Invasive Carcinoma, and Metastatic Carcinoma of the Breast** Clinical Cancer Research. U.S.A.: AACR Publications. 5: 1041-1056 p. 1999.

BÜSING, C. M.; KEPPLER, U.; MENGES, V. Differences in microcalcification in breast tumors. **Virchows Archiv [Patho Anat]**, v. 393, n. 3, p. 307-313, 1981.

CANTLEY, L.; PAWSON, T. Cell regulation. **Current Opinion in Cell Biology**, v. 13, n. 2, p. 121-124, 4/1/ 2001. ISSN 0955-0674. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0955067400001873>>. Acessado em 16/03/2014.

CARMELIET, P.; JAIN, R. K. Angiogenesis in cancer and other diseases **Nature**, U.S.A., v. 407, n. 6801, p. 249-257, 2000. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1038/35025220> >. Acessado em 21/03/2014.

CASHMAN, K. D. Calcium intake, calcium bioavailability and bone health. **The British Journal of Radiology**, v. 87, n. 2, p. S169-S177, 2002.

CAVALLO, F.; GERBER, M.; PUJOL, H.; MARUBINI, E.; DECARLI, A. RICHARDSON, S.; BARBIERI, A.; COSTA, A. Zinc and copper in breast cancer. A joint study in northern Italy and southern France. **Cancer**, v. 67, n. 3, p. 738-745, 1991. Disponível em: <[http://dx.doi.org/10.1002/1097-0142\(19910201\)67:3<738::AID-NCR2820670335>3.0.CO](http://dx.doi.org/10.1002/1097-0142(19910201)67:3<738::AID-NCR2820670335>3.0.CO)>. Acessado em 05/06/2014.

CESAREO, R. **Nuclear Analytical Techniques in Medicine**. Amsterdam, The Netherlands.: Elsevier Science Publishers, 1988. 404p.

CONCEIÇÃO, A. L. C. **Estudo das organizações moleculares e supramoleculares de tecidos mamários normais e neoplásicos por espalhamento de fótons**. 2011. 105p. (Doutorado em Física Aplicada à Medicina e Biologia). Programa de Pós-Graduação em Física Aplicada à Medicina e Biologia, Universidade de São Paulo, Faculdade de Filosofia Ciências e Letras de Ribeirão Preto.

CORNELIS, R.; BORGUET, F.; DE KIMPE, J. Trace elements in medicine: Speciation: the new frontier. **Analytica Chimica Acta**, v. 283, n. 1, p. 183-189, 11/15/ 1993. ISSN 0003-2670. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0003267093852215>>. Acessado em 03/03/2014.

DVORAK, H. F.; NAGY, J. A.; DVORAK, A. M. Structure of solid tumors and their vasculature: implications for therapy with monoclonal antibodies. **Cancer Cells**, v. 3, n. 3, p. 77-85, Mar 1991. ISSN 1042-2196.

EISBERG, R. M.; RESNICK, R. **Física quântica: átomos, moléculas, sólidos, núcleos e partículas**. Rio de Janeiro: Elsevier, 1979. 928p.

ELAD, E. A preamplifier with 0.7 keV resolution for semiconductor radiation detectors. **Nuclear Instruments and Methods**, v. 37, n. 0, p. 327-329, 11// 1965. ISSN 0029-554X. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0029554X65903836>>. Acessado em 12/03/2014.

FARQUHARSON, M. J.; AL-EBRAHEEM, A.; CORNACCHI, S.; GOHLA, G.; LOVRICS, P. The use of X-ray interaction data to differentiate malignant from normal breast tissue at surgical margins and biopsy analysis. **X-Ray Spectrometry**, v. 42, n. 5, p. 349-358, Sep 2013. ISSN 0049-8246.

FEIGIN, L. A.; SVERGUN, D. I. **Structure analysis by small-angle X-ray and neutron scattering**. New York, U.S.A.: Plenum Press, 1987. 335.

GARG, A. N.; SINGH, V.; WEGINWAR, R.G.; SAGDEO, V.N. An elemental correlation study in cancerous and normal breast tissue with successive clinical stages by neutron activation **Biol Trace Elem Res**, v. 46, n. 3, p. 185-202, 1994. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1007/BF02789296>>. Acessado em 21/03/2014.

GERAKI, K.; FARQUHARSON, M. J. An X-ray fluorescence system for measuring trace element concentrations in breast tissue. **Radiation Physics and Chemistry**, v. 61, n. 3–6, p. 603-605, 2001. ISSN 0969-806X. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0969806X01003450>>. Acessado em 19/05/2014.

GERAKI, K.; FARQUHARSON, M. J.; BRADLEY, D. A. **Concentrations of Fe, Cu and Zn in breast tissue: a synchrotron XRF study**. *Physics in Medicine and Biology*. UK: Institute of Physics Publishing. 47: 2327–2339 p. 2002.

GERAKI, K.; FARQUHARSON, M. J.; BRADLEY, D. A. **X-Ray fluorescence and energy dispersive x-ray diffraction for the quantification of elemental concentrations in breast tissue**. *Phys. Med. Biol.* 2003.

GILMORE, G.; HEMINGWAY, J. **Practical Gamma-Ray Spectrometry**. John Wiley & Sons, 1995. 314p.

HINESTROSA, M. C.; DICKERSIN, K.; KLEIN, P.; MAYER, M.; NOSS, K.; SLAMON, D.; SLEDGE, G.; VISCO, F. M. **Shaping the future of biomarker research in breast cancer to ensure clinical relevance.** *Nature Reviews Cancer*. 7: 309-315 p. 2007.

HORSEMAN, N. D.; HERNANDEZ, L. L. New concepts of breast cell communication to bone. **Trends in Endocrinology & Metabolism**, v. 25, n. 1, p. 34-41, 1// 2014. ISSN 1043-2760. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1043276013001495>>. Acessado em 02/05/2014.

HUANG, Y.-L.; SHEU, J.-Y.; LIN, T.-H. Association between oxidative stress and changes of trace elements in patients with breast cancer. **Clinical Biochemistry**, v. 32, n. 2, p. 131-136, 3// 1999. ISSN 0009-9120. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0009912098000964>>. Acessado em 03/04/2014.

IAEA. CategoryDescriptionRelease Date. 2014. Disponível em: <<http://nucleus.iaea.org/rpst/ReferenceProducts/ReferenceMaterials/TraceElementsMethylmercury/index.htm>>. Acessado em 05/06/2014.

INCA. INCA - Instituto Nacional de Câncer - Estimativa 2014. 2014. Disponível em: <<http://www.inca.gov.br/estimativa/2014/>> Acessado em 28/04/2014.

IOACHIM, E.; CHARCHANTI, A.; BRIASOULIS, E.; KARAVASILIS, V.; TSANOU, H.; ARVANITIS, D. L.; AGNANTIS, N. J.; PAVLIDIS, N. Immunohistochemical expression of extracellular matrix components tenascin, fibronectin, collagen type IV and laminin in breast cancer: their prognostic value and role in tumour invasion and progression. **European Journal of Cancer**, v. 38, n. 18, p. 2362-2370, 2002. ISSN 0959-8049. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0959804902002101>>. Acessado em 11/06/2014.

JACK, L.; FOX, J. A. **Estatística para ciências humanas.** São Paulo: Pearson Education do Brasil, 2012. 472p.

JOHNS, H. E.; CUNNINGHAM, J. R. **The physics of radiology**. 4 ed. E.U.A.: Charles C. Thomas, 1983. 796p. ISBN 0-398-04669-7.

KABAT, G. C.; ROHAN, T. E. Does excess iron play a role in breast carcinogenesis? An unresolved hypothesis. **Cancer Causes Control**, v. 18, n. 10, p. 1047-53, Dec 2007. ISSN 0957-5243.

KELLEHER, S. L.; AH SEO, Y.; LOPEZ, V. **Mammary gland zinc metabolism: regulation and dysregulation**. *Genes Nutr*: Springer-Verlag. 4: 83–94 p. 2009.

KOPANS, D. B. **Breast Imaging**. 3 ed. Philadelphia, U.S.A: Lippincott Williams &Wilsins, 2007. 1114p.

LIOTTA, L. A.; KOHN, E. C. The microenvironment of the tumour-host interface. **Nature**, v. 411, n. 6835, p. 375-379, 17 maio de 2001.

MAGALHÃES, T.; BECKER, M.; CARVALHO, M.L.; VON BOHLEN, A. **Study of Br, Zn, Cu and Fe concentrations in healthy and cancer breast tissues by TXRF**. *Spectrochimica Acta Part B* Elsevier 2008.

MARGUÍ, E.; QUERALT, I.; HIDALGO, M. Application of X-ray fluorescence spectrometry to determination and quantitation of metals in vegetal material. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 28, n. 3, p. 362-372, 3// 2009. ISSN 0165-9936. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S016599360800280X>>. Acessado em 07/05/2014.

MARGUÍ, E.; ZAWISZA, B.; SITKO, R. Trace and ultratrace analysis of liquid samples by X-ray fluorescence spectrometry. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 53, n. 0, p. 73-83, 1/ 2014. ISSN 0165-9936. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0165993613002343>>. Acessado em 21/04/2014.

MERSOV, A.; MERSOV, G.; AL-EBRAHEEM, A.; CORNACCHI, S.; GOHLA, G.; LOVRICS, P.; FARQUHARSON, M. J. The differentiation of malignant and benign human

breast tissue at surgical margins and biopsy using x-ray interaction data and Bayesian classification. **Radiation Physics and Chemistry**, v. 95, p. 210-213, Feb 2014. ISSN 0969-806X.

MIHAI, R.; STEVENS, J.; MCKINNEY, C.; IBRAHIM, N. B. N.; Expression of the calcium receptor in human breast cancer—a potential new marker predicting the risk of bone metastases. **European Journal of Surgical Oncology (EJSO)**, v. 32, n. 5, p. 511-515, 6//2006. ISSN 0748-7983. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0748798306000576>>. Acessado em: 22/05/2014.

MORGAN, M. P.; COOKE, M. M.; MCCARTHY, G. M. Microcalcifications Associated with Breast Cancer: An Epiphenomenon or Biologically Significant Feature of Selected Tumors? **Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia**, v. 10 No. 2, p. S181-S187, 2005.

NG, K.-H.; BRADLEY, D. A.; LOOI, L.-M. Elevated trace element concentrations in malignant breast tissues. **The British Journal of Radiology**, v. 70, p. 375-382, 1997.

OKUNO, E. **Física para ciências biológicas e biomédicas**. São Paulo: Harper & Row do Brasil., 1982. p. 49-52.

OKUNO, E.; YOSHIMURA, E. **Física das radiações**. São Paulo: Oficina dos Textos, 2010. 296p.

PASHA, Q.; MALIK, S. A.; SHAH, M. H. Statistical analysis of trace metals in the plasma of cancer patients versus controls. **Journal of Hazardous Materials**, v. 153, n. 3, p. 1215-1221, 5/30/2008. ISSN 0304-3894. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0304389407013738>>. Acessado em 17/06/2014.

PEREIRA, G. R.; ROCHA, H.S.; ANJOS, M. J.; FARIAS, P.C.M.A.; PÉREZ, C.A.; LOPES, R.T **Elemental distribution mapping on breast tissue sample**. European Journal of Radiology: Elsevier 2008.

POLETTI, M. E.; GONÇALVES, O. D.; MAZZARO, I. **X-ray scattering from human breast tissues and breast-equivalent materials**. Phys. Med. Bio. 2001.

POLETTI, M. E.; GONÇALVES, O. D.; PÉREZ, C. A.; MAGALHÃES, S. D. A preliminary study of the distribution of trace elements in healthy and neoplastic breast tissues with synchrotron radiation X-ray fluorescence. **Radiation Physics and Chemistry**, v. 71, n. 3–4, p. 975-976, 10// 2004. ISSN 0969-806X. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0969806X04003354>>. Acessado em 09/06/2014.

Radiation Oncology Physics: A Handbook for Teachers and Students. Vienna: International Atomic Energy Agency.

ROBBINS, S. L.; COTRAN, R. S. **Patologia: bases patológicas das doenças**. 8 ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2010.

SAIDAK, Z.; BOUDOT, C.; ABDOUNE, R.; PETIT, L.; BRAZIER, M.; MENTAVERRI, R.; KAMEL, S.; Extracellular calcium promotes the migration of breast cancer cells through the activation of the calcium sensing receptor. **Experimental Cell Research**, v. 315, n. 12, p. 2072-2080, 7/15/ 2009. ISSN 0014-4827. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0014482709001116>>. Acessado em 03/05/2014.

SCHWARTZ, M. K. Role of Trace Elements in Cancer. **Cancer Research AACR**, v. 35, p. 3481 - 3487, 1975.

SILVA, M. P.; SILVA, D. M.; CONCEICAO, A. L. C.; RIBEIRO-SILVA, A.; POLETTI, M. E. Role of Ca, Fe, Cu and Zn in breast cancer: study by X-ray fluorescence techniques and immunohistochemical analysis. **X-Ray Spectrometry**, v. 42, n. 4, p. 303-311, Jul-Aug 2013. ISSN 0049-8246.

SILVA, M. P.; TOMAL, A.; PEREZ, C. A.; RIBEIRO-SILVA, A.; POLETTI, M. E. Determination of Ca, Fe, Cu and Zn and their correlations in breast cancer and normal

adjacent tissues. **X-Ray Spectrometry**, v. 38, n. 2, p. 103-111, Mar-Apr 2009. ISSN 0049-8246.

SILVA, M. P. D. **Papel dos elementos-traço em neoplasias mamárias: estudo através de técnicas espectroscópicas de fluorescência de raios X e análises imunohistoquímicas**. 2011. 108p. (Doutorado em Física Aplicada à Medicina e Biologia). Programa de Pós-Graduação em Física Aplicada à Medicina e Biologia, Universidade de São Paulo, Faculdade de Filosofia Ciências e Letras de Ribeirão Preto.

SIRCHIA, R.; LUPARELLO, C. Collagen-induced differential expression of an RNA polymerase subunit by breast cancer cells. **Biochimie**, v. 87, n. 8, p. 669-672, 2005. ISSN 0300-9084. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0300908405000970>. Acessado em 15/05/2014.

TERTIAN, R.; CLAISSE, M. **Principles of quantitative x-ray fluorescence analysis**. London: Ed. Heyden, 1982.

THEODORAKOU, C.; FARQUHARSON, M. J. **Human soft tissue analysis using x-ray or gamma-ray techniques**. 2008.

TOMAL, A.; MAZARRO, I.; KAKUNOC, E.M.; POLETTI, M.E. **Experimental determination of linear attenuation coefficient of normal, benign and malignant breast tissues**. Radiation Measurements: Elsevier 2010.

TOYOKUNI, S. Role of iron in carcinogenesis: cancer as a ferrotoxic disease. **Cancer Sci**, v. 100, n. 1, p. 9-16, Jan 2009. ISSN 1347-9032.

US DEPARTMENT OF COMMERCE, N. NIST Physical Measurement Laboratory Homepage. 2014-02-25 2014. Disponível em: <http://www.nist.gov/pml/index.cfm>. Acessado em 21/04/2014.

VALLEE, B. L.; FALCHUK, K. H. **The Biochemical Basis of Zinc Physiology**. Physiological Reviews. U.S.A.: American Physiological Society. 73: 79-105 p. 1993

VUOLO, J. H. **Fundamentos da teoria de erros**. 2 ed. São Paulo: Blucher, 1996. 249.

YAMAN, M. Comprehensive Comparison of Trace Metal Concentrations in Cancerous and Non-Cancerous Human Tissues. **Current Medicinal Chemistry**, v. 13, n. 21, p. 2513-2525, 2006. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.2174/092986706778201620>>. Acessado em 15/05/2014.

APÊNDICE A – PUBLICAÇÕES ASSOCIADAS A ESTA DISSERTAÇÃO

RESMER, P.; PASCHUK, Sergei A.; CONCEICAO, A. L. C.; DENYAK, Valeriy V. Análise de utilização de filtros de alumínio na técnica de ED-XRF para amostras biológicas. XI Workshop em Física Molecular e Espectroscopia, 2013, Feira de Santana, BA. Livro de Resumos de XI Workshop em Física Molecular e Espectroscopia. Feira de Santana, BA: Universidade Estadual de Feira de Santana, BA, 2013. v. 1. p. 26-26.

APÊNDICE B – REFERÊNCIAS DA AMOSTRA IAEA A-13



International Atomic Energy Agency
Analytical Quality Control Services
Wagramer Strasse 5, P.O.Box 100, A-1400 Vienna, Austria

REFERENCE SHEET

REFERENCE MATERIAL

IAEA-A-13

TRACE ELEMENTS
IN
FREEZE DRIED ANIMAL BLOOD

Date of issue: January 2000[●]

Recommended Values
(Based on dry weight)

Element	Recommended Value mg/kg	95% Confidence Interval mg/kg	N*
Br	22	19 – 24	13
Ca	286	226 – 332	18
Cu	4.3	3.7 – 4.8	32
Fe	2400	2200 – 2500	34
K	2500	2100 – 2700	18
Na	12600	11600 – 13500	19
Rb	2.3	1.7 – 3.1	10
S	6500	6000 – 7000	4
Se	0.24	0.15 – 0.31	7
Zn	13	12 – 14	34

* Number of accepted laboratory results which were used to calculate the recommended values and confidence intervals about the mean value.

● Revision of the original reference sheet dated March 1983

APÊNDICE C – REFERÊNCIAS DA AMOSTRA IAEA V-8



International Atomic Energy Agency
Analytical Quality Control Services
Wagramer Strasse 5, P.O.Box 100, A-1400 Vienna, Austria

REFERENCE SHEET

REFERENCE MATERIAL

IAEA-V-8

Trace Elements in Rye Flour

Date of issue: September 1999[●]

Recommended Values
(Based on dry weight)

Element	Recommended Value mg/kg	95% Confidence Interval mg/kg	N*
Br	0.38	0.31 - 0.45	8
Ca	149	139 - 159	19
Cl	570	460 - 680	12
Cu	0.95	0.76 - 1.14	20
Fe	4.1	3.4 - 4.8	15
K	1925	1790 - 2060	26
Mg	121	112 - 130	12
Mn	2.06	1.94 - 2.18	22
P	592	506 - 678	8
Rb	0.48	0.41 - 0.55	7
Zn	2.53	2.20 - 2.86	23

APÊNDICE D – REFERÊNCIAS DA AMOSTRA IAEA V-10



International Atomic Energy Agency
 Analytical Quality Control Services
 Wagramer Strasse 5, P.O.Box 100, A-1400 Vienna, Austria

REFERENCE SHEET

REFERENCE MATERIAL

IAEA-V-10

Trace Elements in Hay (Powder)

Date of issue: January 2000[●]

Recommended Values
(Based on dry weight)

Element	Recommended Value mg/kg	95% Confidence Interval mg/kg	N*
Ba	6	4 - 7	10
Br	8	7 - 11	11
Ca	21600	21000 - 22200	26
Cd	0.03	0.02 - 0.05	12
Co	0.13	0.11 - 0.14	11
Cr	6.5	5.6 - 7.1	32
Cu	9.4	8.8 - 9.7	33
Fe	186	177 - 190	38
Hg	0.013	0.009 - 0.016	6
Mg	1360	1330 - 1450	20
Mo	0.9	0.6 - 1.1	11
Ni	4.2	3.8 - 4.9	19
P	2300	2100 - 2500	11
Pb	1.6	0.8 - 1.9	19
Rb	7.6	7.3 - 7.8	17
Se	0.014	0.012 - 0.015	9
Sr	40	37 - 44	18
Zn	24	23 - 25	40

* Number of accepted laboratory results which were used to calculate the recommended values and confidence intervals about the median value.

● Update of the reference sheet dated July 1985

APÊNDICE E – REFERÊNCIAS DA AMOSTRA IAEA 153



International Atomic Energy Agency
 Analytical Quality Control Services
 Wagramer Strasse 5, P.O.Box 100, A-1400 Vienna, Austria

REFERENCE SHEET

REFERENCE MATERIAL

IAEA-153

Trace Elements in Milk Powder

Date of issue: January 2000

Recommended Values
(Based on dry weight)

Element	Recommended Value mg/kg	95% Confidence Interval mg/kg	N*
Br	12.32	11.01 - 13.64	5
Ca	12870	12540 - 13170	17
Fe	2.53	1.66 - 3.47	12
K	17620	16480 - 18760	15
Mg	1060	1000 - 1150	13
Na	4180	3870 - 4440	16
P	10100	9010 - 11040	7
Rb	14.03	12.27 - 16.10	8
Zn	39.56	37.66 - 41.23	21

APÊNDICE F – REFERÊNCIAS DA AMOSTRA IAEA 407



International Atomic Energy Agency
Analytical Quality Control Services
Wagramer Strasse 5, P.O.Box 100, A-1400 Vienna, Austria

REFERENCE SHEET

REFERENCE MATERIAL

IAEA-407

TRACE ELEMENTS AND METHYLMERCURY
IN FISH TISSUE

Date of issue: 24 January 2003

Recommended Values
(Based on dry weight)

Analyte	Recommended Value [mg/kg]	95% Confidence Interval [#] [mg/kg]	N ^{**}
Al	13.8	12.4 – 15.2	31
As	12.6	12.3 – 12.9	60
Br	94	86 – 102	7
Ca	27.0	25.7 – 28.3	9
Cd	0.189	0.185 – 0.193	75
Co	0.10	0.09 – 0.11	27
Cr	0.73	0.67 – 0.79	65
Cu	3.28	3.10 – 3.36	90
Fe	146	143 – 149	71
Hg	0.222	0.216 – 0.228	74
K	13.1	12.2 – 14.0	9
Li	0.685	0.62 – 0.74	13
Mg	2.71	2.58 – 2.86	7
Mn	3.52	3.44 – 3.60	64
Na	13.1	12.4 – 13.8	9
Ni	0.60	0.55 – 0.65	49
Pb	0.12	0.10 – 0.14	61
Rb	2.86	2.45 – 3.27	6
Sb	0.011	0.010 – 0.012	12
Se	2.83	2.70 – 2.96	38
Sr	130	125 – 135	26
V	1.43	1.34 – 1.52	22
Zn	67.1	66.3 – 67.9	93
Methyl [†]	0.200	0.188 – 0.212	16

^{*} 95% Confidence Interval, μ , defined as $T \pm 0.975 \frac{s}{\sqrt{n}}$ where t is the Student's t value.

^{**} Number of accepted laboratory results which were used to calculate the recommended values and confidence intervals about the mean value.

[†] As inorganic Hg.