



ANA RITA FIALHO ENSINA

Licenciada em Ciências da Engenharia Biomédica

ANÁLISE DE ELEMENTOS QUÍMICOS EM TECIDOS
HUMANOS COM E SEM PATOLOGIA TUMORAL
UTILIZANDO FLUORESCÊNCIA DE RAIOS-X

MESTRADO EM ENGENHARIA BIOMÉDICA

Universidade NOVA de Lisboa
Setembro, 2021

ANÁLISE DE ELEMENTOS QUÍMICOS EM TECIDOS HUMANOS COM E SEM PATOLOGIA TUMORAL UTILIZANDO FLUORESCÊNCIA DE RAIOS-X

ANA RITA FIALHO ENSINA

Licenciada em Ciências da Engenharia Biomédica

Orientador: Doutor António Alberto Dias,
Professor Auxiliar,
NOVA School of Science and Technology
Universidade NOVA de Lisboa

Coorientadora: Doutora Alda Sofia Pessanha de Sousa Moreno,
Investigadora Auxiliar,
NOVA School of Science and Technology
Universidade NOVA de Lisboa

Júri:

Presidente: Doutora Carla Maria Quintão Pereira,
Professora Auxiliar,
Universidade NOVA de Lisboa

Arguente: Doutora Ana Luísa Monteiro da Silva,
Professora Auxiliar,
Universidade de Aveiro

Vogal: Doutor António Alberto Dias
Professor Auxiliar,
Universidade NOVA de Lisboa

MESTRADO EM ENGENHARIA BIOMÉDICA

Universidade NOVA de Lisboa
Setembro, 2021

Análise de elementos químicos em tecidos humanos com e sem patologia tumoral utilizando fluorescência de raios-X

Copyright © Ana Rita Fialho Ensina, NOVA School of Science and Technology | FCT NOVA, Universidade NOVA de Lisboa.

A NOVA School of Science and Technology | FCT NOVA e a Universidade NOVA de Lisboa têm o direito, perpétuo e sem limites geográficos, de arquivar e publicar esta dissertação através de exemplares impressos reproduzidos em papel ou de forma digital, ou por qualquer outro meio conhecido ou que venha a ser inventado, e de a divulgar através de repositórios científicos e de admitir a sua cópia e distribuição com objetivos educacionais ou de investigação, não comerciais, desde que seja dado crédito ao autor e editor.

Aos meus pais.

Agradecimentos

Esta dissertação representa o fim de um longo percurso, marcado por muitas aventuras e desventuras, mas que culminou num projeto interessantíssimo. A oportunidade de desenvolver este projeto, do qual resultou ainda a publicação de um artigo, é algo que levarei comigo para o resto da vida. Endereço por isso um agradecimento enorme aos meus orientadores, Professores António Dias e Sofia Pessanha, por todo o tempo dispendido, apoio e compreensão nos tempos mais difíceis. Foram uma ajuda deveras preciosa na realização deste estudo, sempre com boa disposição e palavras de incentivo. Nunca me esquecerei de vós.

Ao Dr. José Vilchez da unidade de Anatomia Patológica do Centro Hospitalar Barreiro Montijo, EPE, um grande obrigada pela disponibilização das amostras para análise neste estudo, mesmo após todos os entraves no processo de cedência das mesmas. Além disso, tornou-se também uma ajuda indispensável na análise dos resultados obtidos, sem a qual não seria possível retirar as conclusões mais acertadas. Agradeço ainda ao Dr. Carlos Montenegro pela sua participação neste processo.

O desenvolvimento de uma metodologia de tratamento de imagens com recurso ao ambiente R foi um método que proveio da partilha de código pela Professora Sofia Barbosa, que demonstrou toda a disponibilidade e boa vontade para o ensino da linguagem, e também desta nova abordagem às imagens obtidas pelo sistema de M4 TORNADO.

Um agradecimento especial à Professora Maria Luísa Carvalho pela partilha da sua vasta sabedoria sobre a técnica de Fluorescência de Raios-X.

Gostaria ainda de agradecer aos colegas que, apesar de toda a situação pandémica, marcaram a passagem pelo Laboratório de Física Atómica e Molecular do LIBPhys-UNL, nomeadamente à Patrícia Carvalho pela iniciação na utilização do sistema M4 TORNADO, e ao Filipe Santos pela companhia nesta etapa.

Aos meus amigos que, de perto ou de longe, sempre me apoiaram.

Finalmente, um agradecimento muito sentido aos meus pais, a quem dedico este trabalho, por me terem dado todas as oportunidades, por todo o apoio e por nunca me deixarem desistir. Esta tese também é vossa.

*“The nitrogen in our DNA, the calcium in our teeth,
the iron in our blood, the carbon in our apple pies
were made in the interior of collapsing stars.*

We are made of starstuff.”

– Carl Sagan, Cosmos

Resumo

O cancro é uma das principais causas de morte a nível mundial, pelo que é essencial o desenvolvimento de investigação que possa conduzir à descoberta de novos biomarcadores tumorais. A técnica de Fluorescência de Raios-X tem-se revelado adequada para a análise dos elementos químicos presentes em tecidos humanos, nomeadamente para comparação entre tecidos normais e tumorais. No entanto, para uma correta determinação quantitativa destes elementos é necessária a avaliação da matriz escura destas amostras, contendo os elementos não detetados pela técnica utilizada.

Num estudo inicial, procedeu-se à determinação da matriz dos tecidos humanos para utilização do método dos Parâmetros Fundamentais como método de quantificação. Foram analisados 4 Materiais de Referência Certificados e testadas diferentes composições de matriz com o objetivo de alcançar o melhor resultado possível. A matriz obtida consiste em 10% H, 22% C, 3% N e 60% O e foi validada por comparação com outro método de exatidão já comprovada (método comparativo com padrões), tendo-se demonstrado a sua aplicabilidade na quantificação deste tipo de amostras.

Analisaram-se 39 pares de amostras de tecido humano incluídas em parafina por Micro-Fluorescência de Raios-X, sendo cada par normal-tumor pertencente ao mesmo indivíduo. Os tipos de tumor estudados foram os seguintes: adenocarcinomas do cólon e carcinomas da mama do tipo não-especial. Para quantificação utilizou-se o método dos Parâmetros Fundamentais pela aplicação da matriz determinada anteriormente. As áreas a quantificar em cada amostra foram escolhidas com base numa rotina desenvolvida em ambiente R. A análise estatística dos resultados foi feita com recurso ao *software* OriginPro®, tendo sido aplicados o teste de normalidade Shapiro-Wilk e o teste não-paramétrico Kruskal-Wallis ANOVA.

Observou-se que no cólon, os elementos P, Fe e Cu apresentam concentrações significativamente mais elevadas nos tecidos tumorais, enquanto na mama os elementos que têm concentrações significativamente superiores em tecido tumoral são P, S, Ca, Fe, Cu e Zn. Concluiu-se que o P e o Fe têm potencialidade como biomarcadores tumorais do cólon. Por outro lado, os elementos P, S, Ca, Fe e Zn apresentam-se como possíveis biomarcadores tumorais da mama. O Cu revelou ser um constituinte da parafina em que as amostras estão incluídas, pelo que não deve ser avaliado em amostras com este material.

Palavras-chave: μ -XRF; Matriz Escura; Parâmetros Fundamentais; Cancro; Cólon; Mama

Abstract

Cancer is one of the leading causes of death worldwide, so it is essential to develop research that can lead to the discovery of new tumour biomarkers. The X-Ray Fluorescence technique has proved to be adequate for the analysis of the chemical elements present in human tissues, namely for comparison between normal and tumour tissues. However, for a correct quantitative determination of these elements it is necessary to evaluate the dark matrix of these samples, which contains the elements that are not detected by the technique used for this purpose.

In an initial study, the matrix of human tissues was determined for use with the Fundamental Parameters method as a quantification approach. Four Certified Reference Materials were analysed and different matrix compositions were tested in order to achieve the best possible result. The obtained matrix is composed of 10% H, 22% C, 3% N and 60% O and it has been validated by comparison with another method of proven accuracy (comparative method with standards). Its applicability in the quantification of this type of samples was demonstrated.

39 pairs of human tissue samples embedded in paraffin were analysed by Micro-X-Ray Fluorescence, each normal-tumour pair belonging to the same subject. The types of tumour studied were: adenocarcinomas of the colon and carcinomas of the breast of no special type. For quantification, the Fundamental Parameters method was used by the application of the matrix previously determined. The areas for quantification were chosen based on a routine developed in R environment. Statistical analysis of the results was performed using the OriginPro[®] software, the Shapiro-Wilk normality test and the Kruskal-Wallis ANOVA non-parametric test being applied.

It was observed that in the colon, the elements P, Fe and Cu have significantly higher concentrations in tumour tissues, while in the breast the elements with significantly higher concentrations in tumour tissues are P, S, Ca, Fe, Cu and Zn. It was found that P and Fe have potential as tumour biomarkers for colon. On the other hand, the elements P, S, Ca, Fe and Zn are possible tumour biomarkers for breast. Cu has been shown to be a constituent of the paraffin in which the samples are embedded, so it should not be evaluated in samples embedded in this material.

Keywords: μ -XRF; Dark Matrix; Fundamental Parameters; Cancer; Colon; Breast

Índice

Lista de Figuras	xvii
Lista de Tabelas	xix
Siglas	xxi
1 Introdução	1
1.1 Contextualização	1
1.2 Motivação	5
1.3 Objetivos	5
1.4 Estrutura da Dissertação	6
2 Estado da Arte	7
2.1 Cólon	8
2.2 Mama	11
2.3 Relevância do Estudo	12
3 Princípios Físicos da XRF	15
3.1 Raios-X	15
3.1.1 Produção de Raios-X	15
3.1.2 Interação dos Raios-X com a Matéria	17
3.2 Técnica de Fluorescência de Raios-X (XRF)	21
3.2.1 Fluorescência de Raios-X Dispersiva em Energia (EDXRF)	22
3.3 Quantificação em EDXRF	24
3.3.1 Método dos Parâmetros Fundamentais	24
4 Determinação da Matriz Escura dos Tecidos Humanos	27
4.1 Metodologia	27
4.1.1 Sistema de μ -XRF	27
4.1.2 Composições de Matrizes	28
4.1.3 Materiais de Referência Certificados (CRMs)	30
4.2 Resultados e Discussão	33
4.2.1 Quantificação dos CRMs	33
4.2.2 Determinação da Matriz Escura	36
4.2.3 Validação do Método de Quantificação	37

5	Análise de Amostras de Tecido Humano Incluídas em Parafina	41
5.1	Metodologia	41
5.1.1	Cedência de Amostras	41
5.1.2	Descrição das Amostras	41
5.1.3	Amostras de Teste	42
5.1.4	Análise das Amostras Cedidas	43
5.1.5	Metodologia de Tratamento de Imagens em Ambiente R	44
5.1.6	Quantificação das Amostras	45
5.1.7	Análise Estatística	46
5.2	Resultados e Discussão	47
5.2.1	Bloco de Parafina	47
5.2.2	Escolha das Áreas a Quantificar	47
5.2.3	Quantificação das Amostras e Resultados Estatísticos	52
5.2.4	Cólon	64
5.2.5	Mama	65
6	Conclusões	67
6.1	Trabalho Futuro	68
	Bibliografia	69
	Apêndices	75
A	Matrizes de Tecido Humano	77
B	Artigo Publicado	79

Lista de Figuras

1.1	Gráfico da incidência do cancro a nível mundial em 2020	2
1.2	Gráfico da incidência do cancro em Portugal em 2020	2
1.3	Elementos essenciais para os seres vivos	4
2.1	Número de publicações por ano relacionadas com μ -XRF	8
3.1	Exemplo de um espectro de raios-X	16
3.2	Esquema da emissão de radiação característica	17
3.3	Gráfico dos efeitos predominantes para a atenuação de raios-X	17
3.4	Efeito fotoelétrico e possíveis processos consequentes	19
3.5	Rendimentos de fluorescência e de Auger em função do número atómico	20
3.6	Esquema de um tubo de raios-X	22
3.7	Esquema de uma lente policapilar	24
4.1	Principais componentes do sistema M4 TORNADO	28
4.2	Pastilha de Oyster Tissue SRM 1566	30
4.3	Espectro de raios-X da pastilha de Oyster Tissue SRM 1566	32
4.4	Imagens da distribuição de P, S e K na pastilha de Oyster Tissue SRM 1566	32
4.5	Imagens da distribuição de Ca e Fe na pastilha de Oyster Tissue SRM 1566	32
4.6	Aplicação da matriz ICRP para a quantificação do CRM Oyster Tissue SRM 1566	33
5.1	Amostras de teste: cólon e mama	42
5.2	Exemplo de um espectro de uma amostra de mama	43
5.3	Distribuições elementares de uma amostra do cólon	44
5.4	Painel de controlo do <i>software</i> MQuant	45
5.5	Aglomerados de P e Ca numa amostra tumoral da mama	48
5.6	Distribuição do elemento Fe numa amostra tumoral da mama	48
5.7	Amostra de um tumor da mama	48
5.8	Pontos de uma imagem no espaço das cores	49
5.9	Divisão de uma imagem por grupos de cores	50
5.10	Imagem preenchida pelo ambiente R	51
5.11	Escolha das áreas a quantificar	51
5.12	Imagem preenchida pelo ambiente R com dispersão de S	52
5.13	Histogramas com as concentrações do elemento P (normal e tumor)	53
5.14	Diagrama de caixas para o elemento P no cólon	54

5.15 Diagrama de caixas para o elemento P na mama	54
5.16 Diagrama de caixas para o elemento S no cólon	55
5.17 Diagrama de caixas para o elemento S na mama	56
5.18 Diagrama de caixas para o elemento K no cólon	57
5.19 Diagrama de caixas para o elemento K na mama	57
5.20 Diagrama de caixas para o elemento Ca no cólon	58
5.21 Diagrama de caixas para o elemento Ca na mama	58
5.22 Diagrama de caixas para o elemento Fe no cólon	59
5.23 Diagrama de caixas para o elemento Fe na mama	60
5.24 Diagrama de caixas para o elemento Ni no cólon	61
5.25 Diagrama de caixas para o elemento Ni na mama	61
5.26 Diagrama de caixas para o elemento Cu no cólon	62
5.27 Diagrama de caixas para o elemento Cu na mama	62
5.28 Diagrama de caixas para o elemento Zn no cólon	63
5.29 Diagrama de caixas para o elemento Zn na mama	63
5.30 Gráfico com os resultados do cólon	64
5.31 Gráfico com os resultados da mama	65

Lista de Tabelas

2.1	Resultados presentes na literatura sobre o cólon	10
2.2	Resultados presentes na literatura sobre a mama	13
4.1	Configurações do tubo de raios-X e filtros utilizados	28
4.2	Composição das matrizes utilizadas e Z efetivo	29
4.3	Composição elementar certificada dos CRMs	31
4.4	Quantificação do elemento Ca na pastilha de Oyster Tissue SRM 1566	34
4.5	Cálculo dos desvios da matriz ICRP no CRM Oyster Tissue SRM 1566	34
4.6	Desvios $\Delta\%$ dos elementos analisados com a configuração L	34
4.7	Desvios $\Delta\%$ dos elementos analisados com a configuração P	35
4.8	Composição da MatrizEnsina	36
4.9	Desvios $\Delta\%$ relativos à MatrizEnsina (configuração L)	36
4.10	Desvios $\Delta\%$ relativos à MatrizEnsina (configuração P)	36
4.11	Validação da MatrizEnsina em amostras do ovário	38
4.12	Validação da MatrizEnsina em amostras da próstata	38
5.1	Limites de Detecção e Quantificação do sistema M4 TORNADO	46
5.2	Porcentagem de ocorrência dos <i>clusters</i>	49
5.3	Resultados estatísticos do elemento P para o cólon	54
5.4	Resultados estatísticos do elemento P para a mama	54
5.5	Resultados estatísticos do elemento S para o cólon	55
5.6	Resultados estatísticos do elemento S para a mama	56
5.7	Resultados estatísticos do elemento K para o cólon	57
5.8	Resultados estatísticos do elemento K para a mama	57
5.9	Resultados estatísticos do elemento Ca para o cólon	58
5.10	Resultados estatísticos do elemento Ca para a mama	58
5.11	Resultados estatísticos do elemento Fe para o cólon	59
5.12	Resultados estatísticos do elemento Fe para a mama	60
5.13	Resultados estatísticos do elemento Ni para o cólon	61
5.14	Resultados estatísticos do elemento Ni para a mama	61
5.15	Resultados estatísticos do elemento Cu para o cólon	62
5.16	Resultados estatísticos do elemento Cu para a mama	62
5.17	Resultados estatísticos do elemento Zn para o cólon	63
5.18	Resultados estatísticos do elemento Zn para a mama	63

A.1	Matrizes testadas para determinação da MatrizEnsina	78
-----	---	----

Siglas

AES	Espetrografia de Emissão Atômica <i>Atomic Emission Spectrography</i>
CHBM	Centro Hospitalar Barreiro Montijo, EPE
CRM	Material de Referência Certificado <i>Certified Reference Material</i>
EAS	Espetroscopia de Emissão Atômica
EDXRF	Fluorescência de Raios-X Dispersiva em Energia <i>Energy Dispersive X-Ray Fluorescence</i>
FWHM	Largura a Meia Altura <i>Full Width at Half Maximum</i>
IARC	<i>International Agency for Research on Cancer</i>
ICP-MS	Espetrometria de Massa por Plasma Acoplado por Indução <i>Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry</i>
ICRP	<i>International Commission on Radiological Protection</i>
ICRU	<i>International Commission on Radiation Units and measurements</i>
LD	Limite de Detecção
LQ	Limite de Quantificação
NIST	<i>National Institute of Standards and Technology</i>
OMS	Organização Mundial de Saúde
PE	Método dos Padrões Externos
PF	Método dos Parâmetros Fundamentais
PIXE	Emissão de Raios-X Induzida por Protões <i>Proton Induced X-ray Emission</i>

SDD	<i>Silicon Drift Detector</i>
SRIXE	Emissão de Raios-X Induzida por Radiação do Sincrotrão <i>Synchrotron Radiation Induced X-ray Emission</i>
SR-XRF	Fluorescência de Raios-X com Radiação do Sincrotrão <i>Synchrotron Radiation X-Ray Fluorescence</i>
TXRF	Fluorescência de Raios-X por Reflexão Total <i>Total-reflection X-Ray Fluorescence</i>
WDXRF	Fluorescência de Raios-X Dispersiva em Comprimento de Onda <i>Wavelength Dispersive X-Ray Fluorescence</i>
XRF	Fluorescência de Raios-X <i>X-Ray Fluorescence</i>
μ-XRF	Micro-Fluorescência de Raios-X <i>Micro-X-Ray Fluorescence</i>

Capítulo 1

Introdução

1.1 Contextualização

Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), o cancro define-se como «um grande conjunto de doenças que podem surgir em praticamente qualquer órgão ou tecido do corpo humano, quando células anormais crescem descontroladamente e ultrapassam os seus limites habituais para invadirem partes adjacentes do corpo e/ou se espalharem para outros órgãos» [1].

Atualmente o cancro é uma das principais causas de morte a nível mundial, o que faz com que o aumento da esperança média de vida em todo o mundo não seja tão significativo como expectável sem a influência deste tipo de doença [2]. Todos os anos, milhões de pessoas são diagnosticadas com cancro, sendo que este número está a aumentar rapidamente de ano para ano [2–4]. Esta situação tem efeitos negativos ao nível de toda a sociedade, afetando também os sistemas de saúde, particularmente os dos países de baixo ou médio Índice de Desenvolvimento Humano, os quais estão menos preparados para lidar com o problema [5].

De acordo com as estimativas da OMS para o ano de 2019, o cancro foi a primeira ou segunda causa de morte mais comum antes dos 70 anos em 112 de 183 países, estando ainda em terceiro ou quarto lugar noutros 23 [2].

Os dados mais atuais, correspondentes ao ano de 2020, apontam para 19,3 milhões de novos casos no mundo inteiro, e praticamente 10 milhões de óbitos [2, 6]. Na Figura 1.1 está representado um gráfico com a estimativa dos tipos de cancro com maior incidência nesse ano. É possível observar que os cancros mais comuns foram o da mama, o do pulmão e o colorretal, sendo que este último inclui os órgãos cólon, reto e ânus.

Segundo dados da *International Agency for Research on Cancer* (IARC) foram registados em Portugal, no ano de 2020, um total de 60 467 novos casos de cancro e 30 168 óbitos por causa destas doenças [7]. Estes números são preocupantes tendo em conta a população do país. Na Figura 1.2 estão representados os dados correspondentes ao número de novos casos em Portugal no referido ano, separados por tipo de cancro. É de notar que os tipos com maior incidência foram o colorretal e o da mama. Por esta razão, foram escolhidos para análise no presente estudo dois órgãos: o cólon, por representar a maior fatia no tipo de cancro mais comum em Portugal, o colorretal [7]; e a mama, por se encontrar em segundo lugar nos tipos de cancro com maior incidência neste país.

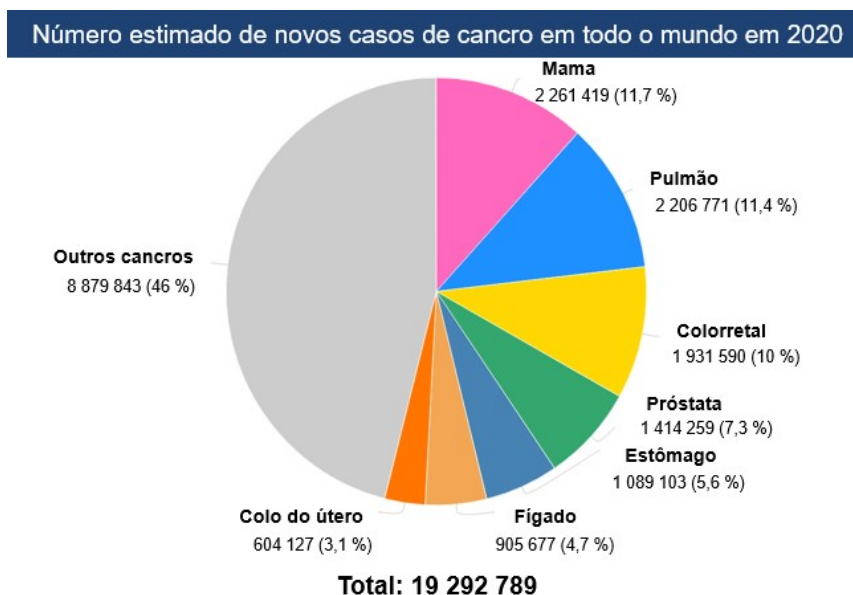


Figura 1.1: Gráfico da estimativa do número de novos casos de cancro a nível mundial no ano de 2020, separados por tipo de cancro (adaptado de [6]).

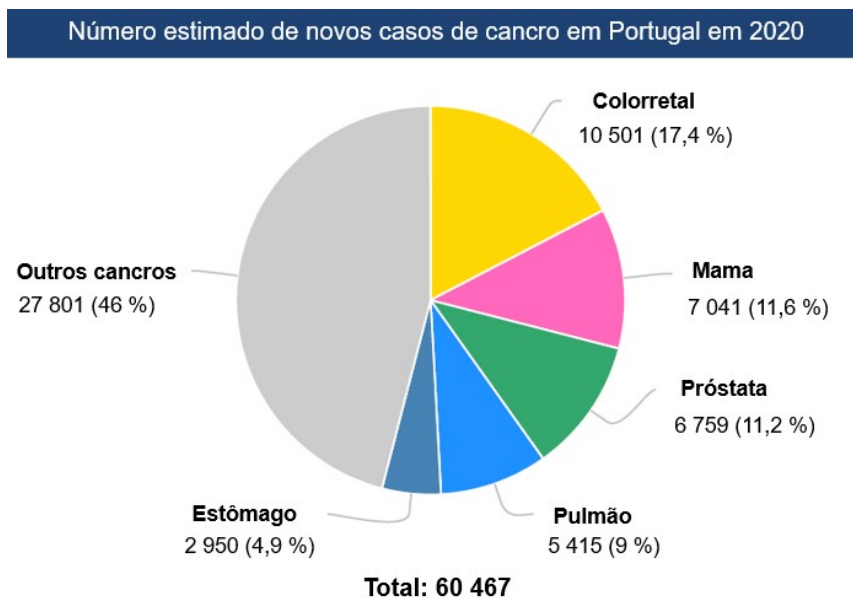


Figura 1.2: Gráfico da estimativa do número de novos casos de cancro em Portugal no ano de 2020, separados por tipo de cancro (adaptado de [7]).

Face aos dados apresentados, torna-se urgente que exista uma melhoria dos meios de diagnóstico já existentes, bem como a introdução de novas formas de detecção precoce do cancro, o que permitirá melhorar a qualidade de vida dos doentes oncológicos. Quando este tipo de doença é identificada precocemente, é mais provável que responda bem aos tratamentos, o que resulta numa maior probabilidade de sobrevivência para os doentes em causa [5].

Existem moléculas biológicas que, ao serem detetadas em fluidos ou tecidos corporais, são sinais de um processo normal ou anormal no corpo humano, ou até mesmo da presença de uma doença. Estas moléculas têm o nome de biomarcadores, e a sua presença, ausência, ou níveis de concentração podem permitir diferenciar uma pessoa doente de uma outra sem patologia [8,9].

Um exemplo destas moléculas são os biomarcadores tumorais, que têm como principal aplicação a detecção de tumores cancerígenos, ou seja, a distinção entre tecidos normais e tumorais [9,10]. Este tipo de biomarcador também tem um papel muito importante na monitorização das doenças oncológicas, ao determinar se a resposta aos tratamentos poderá ser benéfica para os doentes. Desta forma, é possível aumentar a qualidade de vida dos mesmos, poupando-os a tratamentos agressivos que não tenham boas perspetivas [10]. Existe ainda uma outra aplicação de extrema importância para toda a população: a identificação de um possível risco de aparecimento de tumores cancerígenos [9].

Todos os biomarcadores tumorais necessitam de ser validados antes de poderem ser utilizados como tal [9,11]. A primeira fase deste processo é a realização de um estudo comparativo entre amostras pareadas de tecido normal e tumoral [11], que é o grande objetivo deste trabalho.

Os seres vivos são constituídos por um conjunto de elementos químicos, os quais podem ser divididos segundo os seus valores de concentração nos organismos [12]. Esta divisão pode ser feita grosseiramente em elementos abundantes e elementos traço [13,14]. Os primeiros incluem os constituintes principais dos organismos (H, C, N e O), bem como os minerais essenciais (Na, Mg, P, S, Cl, K e Ca), sendo que estes últimos se dividem em maioritários e minoritários. Em particular nos seres humanos, os elementos abundantes constituem mais de 99% da massa do seu organismo, enquanto os elementos traço (Mn, Fe, Cu e Zn, entre outros), também chamados de oligoelementos, perfazem no total menos de 1% da mesma [12,14–16].

Na Figura 1.3 estão assinalados os elementos essenciais para os seres vivos, bem como alguns que são possivelmente essenciais, mas dos quais ainda não existem dados suficientes que o provem.

Os elementos essenciais, quando presentes em concentrações abaixo ou acima dos valores necessários, podem ter efeitos adversos: sintomas de deficiência ou efeitos de toxicidade, respetivamente [12,13]. Existem ainda elementos que, independentemente da sua concentração, são tóxicos para os seres vivos. Alguns destes elementos estão presentes nos organismos, nomeadamente nos seres humanos, uma vez que a sua presença no meio ambiente é ubíqua. Estes elementos, por se encontrarem em concentrações relativamente baixas, também podem ser considerados elementos traço [17]. Assim, à luz desta informação, pode definir-se um elemento traço como estando presente no organismo em concentrações da ordem das dezenas ou centenas de $\mu\text{g g}^{-1}$, ou ppm (partes por milhão), seja ele essencial ou tóxico para o ser humano [17,18].

H																			He
Li	Be													B	C	N	O	F	Ne
Na	Mg													Al	Si	P	S	Cl	Ar
K	Ca	Sc	Ti	V	Cr	Mn	Fe	Co	Ni	Cu	Zn	Ga	Ge	As	Se	Br	Kr		
Rb	Sr	Y	Zr	Nb	Mo	Tc	Ru	Rh	Pd	Ag	Cd	In	Sn	Sb	Te	I	Xe		
Cs	Ba	La	Hf	Ta	W	Re	Os	Ir	Pt	Au	Hg	Tl	Pb	Bi	Po	At	Rn		
Fr	Ra	Ac	Th	Pa	U														

 Elementos orgânicos abundantes
 Elementos traço que se acredita serem essenciais para plantas e animais
 Elementos traço possivelmente essenciais

Figura 1.3: Tabela periódica com os elementos químicos essenciais (abundantes e traço) e os elementos traço possivelmente essenciais para os seres vivos assinalados (adaptado de [12]).

Segundo estudos realizados, referidos no Capítulo 2, é possível a utilização de alguns elementos traço como biomarcadores tumorais da mama e do cólon, quer sejam elementos essenciais ou tóxicos.

Para que seja possível comparar os valores de concentração dos vários elementos, incluindo os elementos traço, presentes em tecidos humanos com e sem patologia tumoral, é essencial que exista uma técnica que permita fazer a medição dessas concentrações. Esta técnica deve, assim, possibilitar a identificação e quantificação dos referidos elementos, fornecendo desta forma informações sobre a composição de ambos os tipos de tecido. Por preencher estes requisitos, foi escolhida para a realização do presente estudo a técnica de espectrometria de Fluorescência de Raios-X (XRF).

Uma característica importante da XRF, e que lhe dá vantagem sobre as restantes técnicas de análise de elementos químicos, é a sua natureza não-destrutiva, o que significa que as amostras analisadas não são influenciadas pelo processo de medição, ou seja, a sua integridade é mantida, podendo as mesmas ser utilizadas posteriormente para outros fins [19].

No entanto, para a utilização da técnica de XRF convencional, é preferível ter amostras homogêneas que representem o material a caracterizar, uma vez que a área analisada é relativamente grande. Para tal, é preciso realizar um processo destrutivo das mesmas, antes de estas serem analisadas. Isto gera um problema se o que interessar analisar for a heterogeneidade das amostras em si, o que só é possível por um processo completamente não-destrutivo. Este problema pode ser resolvido pela Micro-Fluorescência de Raios-X (μ -XRF) [19].

A grande vantagem desta técnica em relação à XRF convencional é a análise de áreas muito pequenas. Os sistemas de μ -XRF possuem uma resolução espacial da ordem dos μm , o que permite a caracterização de amostras não-homogêneas [19,20]. Para além disso, possibilitam ainda conhecer a distribuição de cada um dos elementos detetados, ao medirem uma sequência de pequenas áreas (mapeamentos), o que permite a obtenção de informações sobre a estrutura dos

tecidos analisados [21,22]. Este fator pode ser muito vantajoso na análise dos tecidos humanos, uma vez que os mesmos são, no geral, heterogêneos.

1.2 Motivação

O principal motivo para a realização deste estudo está relacionado com a procura de uma melhoria dos métodos de diagnóstico já existentes para as doenças oncológicas, quer pelo aumento do número de métodos disponíveis quer para complementar os habitualmente utilizados.

Atualmente, existem inúmeros biomarcadores tumorais, mas todos eles tiveram de passar por um processo de descoberta e validação antes de poderem ser utilizados como tal [11, 23]. Com a identificação e, principalmente, com a quantificação dos elementos químicos presentes em tecidos normais e tumorais, salientando as diferenças encontradas, está dado um passo para a descoberta de novos biomarcadores do cancro.

Os estudos nesta área revelam variações consideráveis nos resultados correspondentes a diferentes pacientes. Desta forma, torna-se essencial que sejam realizadas novas medições com amostras variadas, para que a estatística neste campo possa aumentar, pois só assim se poderão validar os resultados obtidos.

Um outro fator que motiva esta análise é o facto de os serviços hospitalares recolherem amostras dos tecidos removidos cirurgicamente, englobando parte do tecido normal envolvente, a chamada margem cirúrgica. Estas amostras são posteriormente incluídas em parafina e armazenadas para uma possível necessidade de análise histológica, encontrando-se por isso muitas vezes em número bastante elevado nestes serviços. Por esta razão, a cedência das mesmas para estudo em laboratório só traz benefícios para a investigação científica. Como a μ -XRF é uma técnica completamente não-destrutiva, torna-se excelente para esta aplicação, uma vez que as amostras não podem ser danificadas.

Na maior parte dos estudos realizados neste campo, o número de amostras analisadas é bastante reduzido, o que implica que os resultados obtidos não sejam estatisticamente significativos. No entanto, para existir validação de um biomarcador tumoral, é necessária a existência de significância estatística nos estudos realizados para esse fim. Ao associar a estes estudos as amostras incluídas em parafina, torna-se possível a análise de tecidos provenientes de um número superior de doentes, bem como de diversos órgãos. Para este efeito, apenas é necessária autorização por parte dos serviços hospitalares envolvidos, desde que as amostras sejam previamente anonimizadas. O aumento da significância estatística nesta área é um dos motivos mais importantes para a realização do presente estudo.

1.3 Objetivos

Esta dissertação foi dividida em duas partes, tendo dois objetivos principais:

- Determinação de uma aproximação da matriz dos tecidos humanos composta por H, C, N e O, utilizando Materiais de Referência Certificados para validação da mesma;

- Comparação das concentrações dos elementos químicos em amostras pareadas de tecido humano com e sem patologia tumoral incluídas em parafina.

Para atingir estes objetivos utilizou-se um sistema de μ -XRF e o método dos Parâmetros Fundamentais para quantificação.

Como objetivos secundários, podem ainda ser considerados os seguintes pontos:

- Análise das tendências de distribuição espacial do enxofre em amostras incluídas em parafina para avaliação da relação tecido/parafina presente nas mesmas, utilizando uma rotina desenvolvida em ambiente R;
- Análise estatística dos resultados recorrendo ao *software* OriginPro[®].

1.4 Estrutura da Dissertação

Este documento está dividido em 6 capítulos. O Capítulo 1 contextualiza o estudo desenvolvido nesta dissertação, apresentando ainda os motivos para a realização do mesmo e os principais objetivos a atingir. No Capítulo 2 descreve-se brevemente o estado da arte relativo ao estudo de amostras de tecido humano com e sem patologia tumoral do cólon e da mama por XRF. O Capítulo 3 apresenta os princípios físicos em que se baseia a técnica de XRF. Por sua vez, o Capítulo 4 é dedicado à determinação da matriz escura dos tecidos humanos, contendo a metodologia utilizada para esse fim, os resultados obtidos e a discussão dos mesmos. O Capítulo 5 contém os métodos aplicados na comparação de amostras de tecido humano normal e tumoral do cólon e da mama, os seus resultados e respetiva discussão. Por fim, no Capítulo 6 são discutidas as conclusões do presente estudo e algumas perspetivas futuras para este tipo de análise.

Um dos estudos desenvolvidos nesta dissertação, descrito no Capítulo 4, deu origem à publicação de um artigo, intitulado *Analysis of human tissues using Energy Dispersive X Ray Fluorescence – Dark matrix determination for the application to cancer research* e apresentado no Apêndice B.

Capítulo 2

Estado da Arte

A comparação da composição elementar entre tecidos cancerígenos e normais é um tema que se estuda já há algumas décadas, sendo o principal foco os elementos traço. Schwartz [24] descreveu o papel de alguns destes elementos no desenvolvimento de cancro do ponto de vista da sua ação inibitória ou causadora deste tipo de doença, realçando que este é um tema de estudo onde se reportam resultados e conclusões contraditórias.

Mais tarde, Yaman [25] fez uma compilação dos resultados encontrados na literatura sobre o aumento/diminuição das concentrações de alguns elementos traço em tecidos tumorais e normais de diferentes órgãos, referindo que os dados neste campo são escassos e os resultados contraditórios. Segundo este autor, existe um grande número de estudos sobre a alteração dos níveis dos elementos traço no soro sanguíneo de vários pacientes com neoplasias, ao contrário do número reduzido de estudos sobre os valores dos diferentes elementos nos tecidos em si.

É assim necessária a obtenção de mais dados sobre o tema, com o objetivo de reduzir as diferenças encontradas nesta área. Para tal, podem ser utilizadas diversas técnicas de análise de elementos químicos, sendo uma das mais utilizadas a Fluorescência de Raios-X (XRF). Carvalho *et al.* [26] realizaram uma revisão dos dados encontrados na literatura sobre as concentrações dos elementos traço em tecidos com e sem patologia tumoral pertencentes a vários órgãos, obtidas com 4 métodos que se enquadram na XRF, concluindo que são necessários estudos com um maior número de amostras para os vários órgãos.

A Micro-Fluorescência de Raios-X (μ -XRF) é uma técnica de análise multi-elementar que tem vindo a ganhar relevância ao longo dos anos na área da análise de tecidos biológicos, como se pode verificar pela observação do gráfico da Figura 2.1, onde está representado o número de artigos relacionados com esta técnica publicados por ano, desde 1980 até 2020, disponíveis na plataforma PubMed.

Apesar de alguns estudos considerarem que se podem comparar as concentrações elementares encontradas em tecidos tumorais de diferentes órgãos, Mulay *et al.* [28] afirmam que os diferentes tipos de cancro não devem ser agrupados numa só categoria, pelo que cada tipo deve ser tratado como uma entidade separada. Os metais, por exemplo, podem ser carcinogénicos se a sua concentração celular se tornar elevada de modo a que possam competir com os elementos essenciais por locais de ligação, ajudando assim na formação de ácidos nucleicos anormais. Desta forma, os cancros dos diferentes tecidos serão diferentes, uma vez que cada tecido concentra metais diferentes. Majewska *et al.* [29] compararam as concentrações de al-

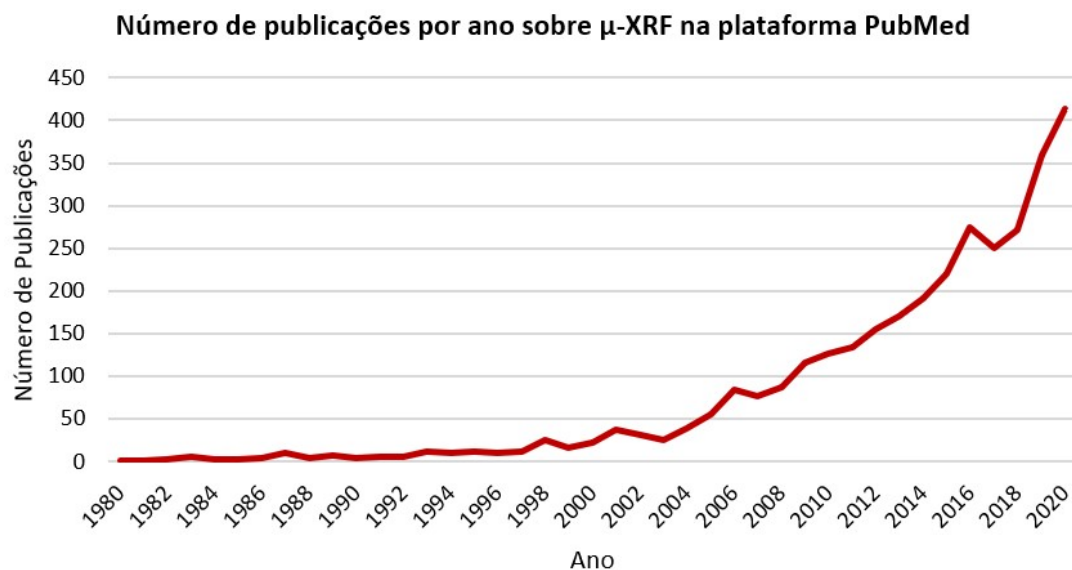


Figura 2.1: Gráfico do número de publicações por ano, no período de 1980 a 2020, relacionadas com a técnica de μ -XRF disponíveis na plataforma PubMed (elaborado com base em dados retirados de [27]).

guns elementos em diferentes órgãos, incluindo o cólon e a mama, e descobriram diferenças nas concentrações de todos os elementos analisados, confirmando assim esta teoria. Por este motivo, os diferentes tipos de cancro têm sido estudados separadamente, apresentando resultados diferentes consoante o tecido envolvido. Como tal, os resultados presentes na literatura para os dois órgãos estudados nesta dissertação serão apresentados em separado.

2.1 Cólon

O número de estudos existentes sobre a concentração dos diferentes elementos em pacientes com cancro do cólon é bastante reduzido [30], apesar de este tipo de cancro se encontrar entre os mais frequentes em todo mundo [7]. Este número ainda diminuiu mais quando se consideram apenas os estudos que dizem respeito à comparação das concentrações elementares nos tecidos.

Mais tarde, Drake e Sky-Peck [31] procederam à análise de 15 pares de amostras de tecidos cancerígenos e normais do cólon por Fluorescência de Raios-X Dispersiva em Energia (EDXRF), sendo que cada par de amostras era proveniente do mesmo paciente. Neste estudo, os autores concluíram que os elementos mais importantes para distinguir entre tecidos tumorais e normais deste órgão eram o Ca, o Fe e o Zn, estando os dois primeiros presentes em concentração superior nos tecidos normais, e o último nos tecidos tumorais.

Von Czarnowski *et al.* [32] efetuaram um estudo no qual foram analisados 8 pares de amostras de tecido cancerígeno e normal do cólon para determinação dos elementos presentes nas mesmas, tendo utilizado para tal um sistema de Fluorescência de Raios-X por Reflexão Total (TXRF). O K foi considerado como sendo um elemento muito significativo para a distinção entre os dois tipos de tecido, estando presente numa concentração cerca de 11 vezes superior em tecidos com patologia tumoral. Outros dois elementos, o Cr e o Co, apresentaram concentrações significativamente superiores em tecidos normais, sendo o primeiro 3 vezes e o segundo 5 vezes superior.

Magalhães *et al.* [33] realizaram um estudo comparativo utilizando as técnicas de TXRF e EDXRF com geometria triaxial para análise dos elementos presentes em tecidos tumorais e normais pertencentes ao mesmo paciente, sendo um dos tipos de cancro analisados o do cólon. Neste órgão, os elementos P, K, Cu e Ni mostraram uma tendência para estarem presentes em concentrações mais elevadas no tecido neoplásico, enquanto o I e o Br se encontram em concentrações inferiores nesse tipo de tecido.

No ano seguinte, Majewska *et al.* [29] fizeram a comparação de tumores malignos e benignos do cólon, utilizando para tal a técnica de TXRF. Descobriram diferenças significativas na concentração de Zn, elemento este que apresentou uma concentração mais elevada nos tecidos correspondentes a tumores malignos.

Num outro estudo, Magalhães *et al.* [34], ao analisarem 15 amostras pareadas de tecido normal e tumoral do cólon por TXRF, concluíram que os elementos Se e Br tinham concentrações mais elevadas em tecido normal, enquanto os elementos P, S, K, Cu, Zn e Rb apresentavam concentrações superiores em tecido com cancro.

Existem estudos que colocam alguns elementos traço como potenciais biomarcadores tumorais do cancro do cólon, como é o exemplo do estudo realizado por Stepień *et al.* [35], cujos autores utilizaram a técnica de TXRF para determinar as concentrações dos elementos Cu e Zn em pacientes com diagnóstico de cancro do cólon, tendo concluído que existe um risco superior de desenvolvimento deste tipo de cancro em pacientes com níveis de Cu mais elevados do que os valores médios, e um risco inferior em pacientes com níveis de Zn superiores à média dos pacientes analisados.

Finalmente, Carvalho *et al.* [18] utilizaram um par de amostras normal-tumor do cólon proveniente do mesmo indivíduo e analisaram-no por EDXRF para aplicação do método de quantificação dos padrões externos para os elementos traço Fe, Cu e Zn. Apesar de não se poder analisar estatisticamente este resultado, observou-se um aumento de Cu no tecido tumoral.

Como se pode concluir pela análise dos vários estudos apresentados, os elementos que são identificados como relevantes para uma correta distinção entre tecidos com e sem patologia tumoral variam bastante de estudo para estudo. Nalguns casos, o número de amostras é bastante reduzido para se poderem tirar conclusões significativas. Na Tabela 2.1 apresentam-se os valores encontrados na literatura para a comparação de algumas concentrações elementares entre tecidos normais e tumorais do cólon. Nos valores apresentados encontram-se também alguns referentes a estudos nos quais foram utilizadas outras técnicas.

Tabela 2.1: Resultados presentes na literatura sobre a comparação das concentrações de alguns elementos em tecidos normais e tumorais do cólon.

Ref.	Técnica	Tecido	N° de amostras	Tipo de amostra	Concentração/ $\mu\text{g g}^{-1}$							
					P	S	K	Ca	Fe	Ni	Cu	Zn
[28]	AES	Normal Tumor	6* 6*	Tecido liofilizado Tecido liofilizado	- -	- -	- -	804 872	109 95	- -	8 5	101 78
[31]	EDXRF	Normal Tumor	15* 15*	Tecido liofilizado Tecido liofilizado	- -	- -	- -	591 $\pm$ 253 393 $\pm$ 195	189 $\pm$ 51 129 $\pm$ 41	0,9 $\pm$ 0,5 0,9 $\pm$ 0,3	14 $\pm$ 4 9 $\pm$ 3	64 $\pm$ 21 98 $\pm$ 19
[33]	TXRF	Normal Tumor	? ?	Tecido liofilizado Tecido liofilizado	1020 $\pm$ 270 1850 $\pm$ 690	2370 $\pm$ 620 3385 $\pm$ 1230	454 $\pm$ 155 579 $\pm$ 200	469 $\pm$ 110 510 $\pm$ 190	150 $\pm$ 45 48 $\pm$ 16	2,0 $\pm$ 0,5 3 $\pm$ 1	5 $\pm$ 2 8 $\pm$ 3	33 $\pm$ 10 33 $\pm$ 13
[33]	EDXRF	Normal Tumor	? ?	Tecido liofilizado Tecido liofilizado	- -	- -	439 $\pm$ 44 525 $\pm$ 50	607 $\pm$ 60 565 $\pm$ 56	260 $\pm$ 26 108 $\pm$ 11	- -	12 $\pm$ 2 20 $\pm$ 3	81 $\pm$ 8 71 $\pm$ 7
[29]	TXRF	Benigno Maligno	42 73	Tecido fresco Tecido fresco	- -	- -	- -	- -	43 $\pm$ 8 45 $\pm$ 33	- -	4 $\pm$ 2 ¹ 4 $\pm$ 2 ²	10 $\pm$ 5 15 $\pm$ 10
[36]	ICP-MS	Normal Tumor	59* 59*	Tecido digerido Tecido digerido	- -	- -	1780 $\pm$ 334 2392 $\pm$ 612	87 $\pm$ 19 135 $\pm$ 95	23 $\pm$ 13 23 $\pm$ 19	0,1 $\pm$ 0,4 0,7 $\pm$ 4,9	1,3 $\pm$ 0,4 1,5 $\pm$ 0,5	19 $\pm$ 5 17 $\pm$ 3

* amostras pareadas

¹ 38 amostras

² 72 amostras

2.2 Mama

Ao contrário do número reduzido de estudos existentes sobre a medição das concentrações elementares em tecidos com cancro do cólon, os estudos sobre o tecido mamário são bastante mais frequentes.

Rizk e Sky-Peck [37] analisaram os tecidos de 25 pacientes com carcinoma primário da mama por EDXRF, tendo apresentado as médias para 22 pares de amostras de tecido normal e tumoral, cada par pertencente ao mesmo paciente. Com estes resultados, concluíram que as concentrações de Ca, V, Cu, Zn, Se e Rb são estatisticamente mais elevadas no tecido tumoral. Drake e Sky-Peck [31] estudaram 26 pares de amostras normal-tumor da mama pertencentes aos mesmos pacientes pela mesma técnica do estudo anterior. Os elementos considerados mais importantes para uma correta distinção entre tecidos normais e tumorais deste órgão foram o Ca, o Zn e o Rb, todos eles presentes em concentrações mais elevadas nos tecidos tumorais.

Farquharson e Geraki [38] mediram a concentração de alguns elementos em 38 amostras normais e 39 com patologia tumoral da mama utilizando a técnica de EDXRF. Neste estudo, todos os elementos analisados (K, Fe, Cu e Zn) apresentaram concentrações superiores nos tecidos tumorais. Geraki *et al.* [39] analisaram os mesmos elementos em 20 amostras pareadas da mama (normal/tumor pertencentes aos mesmos pacientes) e outras 40 amostras independentes, sendo 20 de tumores e 20 de tecido normal, designadas amostras não-pareadas. Os autores chegaram à mesma conclusão do estudo anterior, embora os valores obtidos variem entre os dois estudos. É ainda de realçar que a diferença entre as amostras independentes é superior à das amostras pareadas.

Poletti *et al.* [40] utilizaram a técnica de Emissão de Raios-X Induzida por Radiação do Síncrotrão (SRIXE) para a análise de 8 amostras de tecido mamário normal e 9 de tecido tumoral da mama, tendo reportado que as concentrações dos elementos K, Ca, Cu e Zn são bons indicadores da presença de patologias tumorais em tecidos da mama, uma vez que as mesmas se encontravam significativamente mais elevadas em tecidos com neoplasia do que em tecidos normais.

No estudo comparativo entre as técnicas de TXRF e EDXRF com geometria triaxial realizado por Magalhães *et al.* [33] foram também analisados tecidos da mama, tendo os resultados sugerido que todos os elementos analisados (S, K, Ca, Fe, Ni, Cu, Zn, Br e Sr) estão presentes em concentrações superiores nos tecidos tumorais.

Majewska *et al.* [29] compararam tumores malignos e benignos da mama pela utilização de um espectrómetro de TXRF, tendo descoberto diferenças estatisticamente significativas nas concentrações de Fe e Se nestes tecidos, com uma concentração mais elevada de ambos os elementos nos tumores malignos.

Num estudo efetuado por Silva *et al.* [10], no qual foi utilizada a técnica de EDXRF para análise de amostras provenientes de tumores malignos e benignos da mama, bem como de tecido normal dos mesmos pacientes, os autores concluíram que os elementos Ca, Fe, Cu e Zn têm grande potencial como biomarcadores tumorais da mama. No ano seguinte, investigadores do mesmo grupo [41] realizaram um outro estudo onde utilizaram as técnicas de EDXRF e μ -XRF para tentar compreender o papel dos elementos Ca, Fe, Cu e Zn no cancro da mama. Devido à utilização da técnica de μ -XRF, foi possível obter um mapeamento com a distribuição

espacial de cada um dos elementos analisados, o que permitiu encontrar relações espaciais entre os mesmos.

Na tabela 2.2 estão apresentados os resultados presentes na literatura para as concentrações dos elementos considerados mais relevantes em tecidos normais e tumorais da mama. Mais uma vez, estão presentes alguns resultados obtidos com outra técnica. É possível verificar que os valores variam consoante o tipo de amostra (tecido fresco, tecido liofilizado). Esta diferença justifica-se pelo facto de a percentagem de água presente nos tecidos alterar a concentração dos elementos existentes na amostra, pelo que é muito importante ter em conta este fator quando se pretende comparar resultados.

2.3 Relevância do Estudo

Face aos estudos apresentados nas Secções 2.1 e 2.2, pode-se concluir que os níveis de diferenciação das concentrações dos elementos químicos entre tecido com e sem patologia tumoral têm variações consideráveis conforme o tecido afetado. Para além disso, como se pode observar nas Tabelas 2.1 e 2.2, existem também grandes variações de estudo para estudo no que diz respeito ao mesmo órgão.

Apesar de se tornar evidente que os elementos traço têm um papel essencial na distinção entre tecidos cancerígenos e normais, sendo desta forma potenciais biomarcadores do cancro, é ainda necessária muita investigação e análise de um número elevado de amostras de cada órgão para que se possa descobrir de forma inequívoca quais os elementos essenciais para uma correta identificação da existência ou ausência de tumor. Este estudo tem como objetivo aumentar os resultados nesta área de conhecimento.

O campo das amostras conservadas em parafina, que se encontram armazenadas nos hospitais, é muito importante para este tipo de estudo, sendo uma área a explorar na comparação elementar entre tecidos com e sem neoplasias.

A técnica de μ -XRF, muito pouco documentada na literatura sobre este tema, permite obter mapeamentos com a distribuição espacial de cada um dos elementos químicos identificados, e posteriormente quantificá-los em pontos ou áreas específicas. Este método tem características únicas que permitem obter bons resultados mesmo com amostras não-homogéneas e sem preparação prévia das mesmas.

Tabela 2.2: Resultados presentes na literatura sobre a comparação das concentrações de alguns elementos em tecidos normais e tumorais da mama.

Ref.	Técnica	Tecido	N° de amostras	Tipo de amostra	Concentração/ $\mu\text{g g}^{-1}$							
					P	S	K	Ca	Fe	Ni	Cu	Zn
[31]	EDXRF	Normal Tumor	26* 26*	Tecido liofilizado Tecido liofilizado	- -	- -	- -	358 $\pm$ 86 872 $\pm$ 375	218 $\pm$ 149 239 $\pm$ 113	1,0 $\pm$ 0,5 1,3 $\pm$ 0,6	9 $\pm$ 2 21 $\pm$ 11	26 $\pm$ 12 68 $\pm$ 27
[38]	EDXRF	Normal Tumor	38 39	Tecido fresco Tecido fresco	- -	- -	163 $\pm$ 141 512 $\pm$ 336	- -	9 $\pm$ 9 18 $\pm$ 14	- -	0,3 $\pm$ 0,2 0,9 $\pm$ 0,5	2 $\pm$ 1 7 $\pm$ 5
[39]	SR-XRF	Normal Tumor	20* 20*	Tecido fresco Tecido fresco	- -	- -	438 $\pm$ 321 1112 $\pm$ 735	- -	14 $\pm$ 13 22 $\pm$ 18	- -	0,3 $\pm$ 0,3 1,0 $\pm$ 0,6	3 $\pm$ 2 7 $\pm$ 6
[39]	SR-XRF	Normal Tumor	20 20	Tecido fresco Tecido fresco	- -	- -	210 $\pm$ 123 1032 $\pm$ 619	- -	7 $\pm$ 8 19 $\pm$ 16	- -	0,3 $\pm$ 0,2 1,0 $\pm$ 0,4	2 $\pm$ 1 8 $\pm$ 7
[33]	TXRF	Normal Tumor	? ?	Tecido liofilizado Tecido liofilizado	- -	295 $\pm$ 120 3240 $\pm$ 1720	17 $\pm$ 8 165 $\pm$ 80	153 $\pm$ 53 1270 $\pm$ 620	5 $\pm$ 2 98 $\pm$ 63	2 $\pm$ 1 3 $\pm$ 2	2 $\pm$ 1 14 $\pm$ 5	6 $\pm$ 3 39 $\pm$ 21
[33]	EDXRF	Normal Tumor	? ?	Tecido liofilizado Tecido liofilizado	- -	- -	112 $\pm$ 12 360 $\pm$ 36	970 $\pm$ 97 1530 $\pm$ 150	32 $\pm$ 3 147 $\pm$ 15	- -	35 $\pm$ 4 27 $\pm$ 4	31 $\pm$ 3 64 $\pm$ 6
[29]	TXRF	Benigno Maligno	68 26	Tecido fresco Tecido fresco	- -	- -	- -	- -	13 $\pm$ 10 24 $\pm$ 17	- -	1,2 $\pm$ 0,8 0,9 $\pm$ 0,6	5 $\pm$ 4 6 $\pm$ 3
[10]	EDXRF	Normal Norm. adj. Maligno Benigno	38 25 34 9	Tecido fresco Tecido fresco Tecido fresco Tecido fresco	- - - -	- - - -	- - - -	131 283 669 1770	16 16 33 15	- - - -	3 1 1 2	2 3 7 12
[42]	PIXE	Normal Tumor	10* 10*	Tecido liofilizado Tecido liofilizado	242 $\pm$ 14 1577 $\pm$ 20	804 $\pm$ 14 2312 $\pm$ 21	493 $\pm$ 6 2863 $\pm$ 11	348 $\pm$ 4 509 $\pm$ 7	205 $\pm$ 1 182 $\pm$ 3	- -	2 $\pm$ 1 3 $\pm$ 1	14 $\pm$ 4 30 $\pm$ 6

* amostras pareadas

Capítulo 3

Princípios Físicos da XRF

3.1 Raios-X

Os raios-X são um tipo de radiação eletromagnética cujo comprimento de onda se encontra entre os valores da ordem de grandeza de 1 nm até cerca de 6×10^{-3} nm, tendo a sua energia valores compreendidos entre 1,2 keV e $2,4 \times 10^2$ keV [43].

3.1.1 Produção de Raios-X

Bremsstrahlung

Quando um feixe de elétrons de elevada energia incide sobre um alvo constituído por um material de número atómico elevado, são emitidos fótons de raios-X numa gama contínua de comprimentos de onda. Os valores desta gama variam entre o correspondente à energia cinética máxima dos elétrons e o caso em que os últimos não perdem energia ao colidir com o alvo. Esta radiação tem o nome de radiação contínua, ou *bremsstrahlung* (do alemão *bremsen*, travagem, e *strahlung*, radiação), por ser libertada durante a travagem dos elétrons incidentes, como resultado da sua interação com a rede de átomos do alvo. Cada um dos elétrons é desacelerado, perdendo parte da sua energia cinética, o que conduz à emissão de um fóton de raios-X com um valor de energia igual ao da perdida pelo elétron. O espectro contínuo terá energias entre zero e um valor máximo dependente do potencial utilizado para acelerar os elétrons [44]. O comprimento de onda correspondente à intensidade máxima do espectro contínuo, λ_{max} , é aproximadamente $3/2$ do comprimento de onda mínimo, λ_{min} [45].

Radiação Característica

Concomitante com a emissão de *bremsstrahlung*, existe um outro processo que ocorre devido à interação dos elétrons com os átomos do alvo. Se os elétrons incidentes possuírem energia suficiente para ejetar elétrons das orbitais mais internas dos átomos, criando desta forma lacunas, as mesmas poderão ser preenchidas por outros elétrons provenientes de orbitais mais externas do próprio átomo. Estas transições conduzirão à emissão de fótons com energias iguais às diferenças das energias de ligação dos elétrons nas duas orbitais envolvidas [44], de acordo com a

equação 3.1,

$$E_{\text{fotão}} = |E_{\text{final}} - E_{\text{inicial}}| \quad (3.1)$$

onde E_{final} se refere ao estado de menor energia, e E_{inicial} ao de maior energia dos elétrons.

Cada elemento irá assim emitir fótons com energias diferentes, pelo que este tipo de radiação tem o nome de radiação característica.

Na Figura 3.1 está representado um exemplo de um espectro gerado por um tubo de raios-X, onde se pode observar a radiação contínua com as riscas características do material utilizado no alvo.

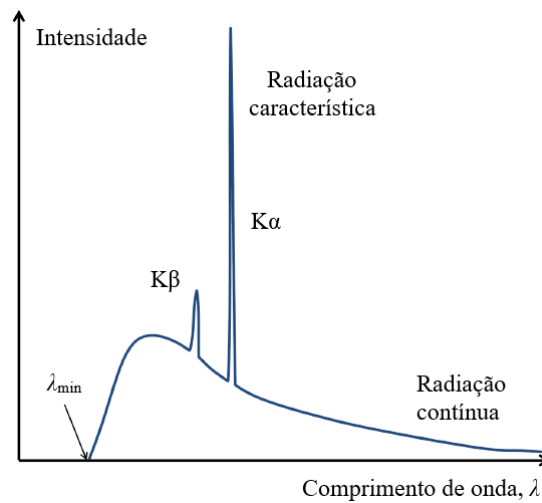


Figura 3.1: Exemplo de um espectro gerado por um tubo de raios-X. É possível observar-se o espectro da radiação contínua bem como os picos $K\alpha$ e $K\beta$ que representam a radiação característica emitida pelo material presente no alvo (adaptado de [46]).

Uma vez que os estados final e inicial dos elétrons podem corresponder a diferentes números quânticos, existem diversas séries espectrais correspondentes às várias transições permitidas. Como se pode ver na Figura 3.2, quando ocorre uma transição da camada L para a camada K, obtêm-se linhas características correspondentes à série $K\alpha$. Se a transição for da camada M para a camada K, as linhas características pertencem à série espectral $K\beta$. Na mesma figura estão ainda representadas as séries $L\alpha$ e $L\beta$, que correspondem às transições da camada M para a camada L.

A relação entre o comprimento de onda, λ , de um fóton de raios-X característico e o número atômico, Z , do elemento ionizado é dada pela lei de Moseley, representada na equação 3.2,

$$\frac{1}{\lambda} = K(Z - \sigma)^2 \quad (3.2)$$

na qual K representa uma constante que toma valores diferentes consoante a série espectral a que está associada, e σ representa a constante de blindagem, que está relacionada com a blindagem dos elétrons mais externos devido à presença dos elétrons mais internos, tomando um valor próximo de um [44,48,49].

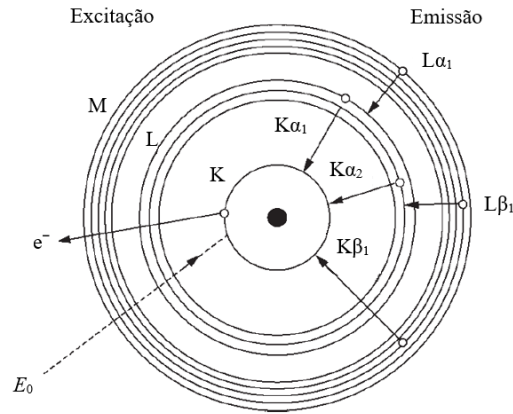


Figura 3.2: Esquema da emissão de radiação característica: um elétron da camada K é ejetado do átomo por uma partícula incidente de energia E_0 . A lacuna deixada por este elétron pode, por exemplo, ser preenchida por um elétron proveniente da camada L, sendo emitidos raios-X da série $K\alpha$ (adaptado de [47]).

3.1.2 Interação dos Raios-X com a Matéria

Quanto uma amostra é irradiada com um feixe de raios-X, podem ocorrer diversas situações, dependendo da energia dos fótons e do tipo de material irradiado. Na Figura 3.3 estão representados os efeitos dominantes em materiais de número atômico Z irradiados por feixes de fótons de energia E .

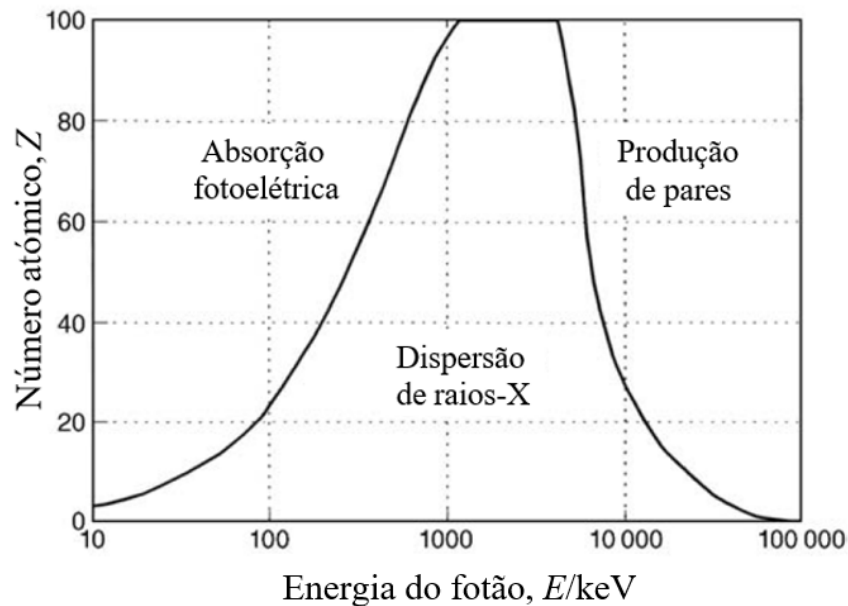


Figura 3.3: Gráfico dos efeitos predominantes para a atenuação de raios-X em materiais de número atômico Z em função da energia do fóton incidente, E (adaptado de [50]).

É de notar que a parte identificada como "Dispersão de raios-X" se refere tanto à dispersão elástica, ou de Rayleigh, como à dispersão inelástica, ou de Compton, ambas descritas em seguida.

Dispersão Elástica (Dispersão de Rayleigh)

A dispersão é um fenômeno no qual existe mudança de direção dos fótons incidentes após a sua interação com os átomos de um material. No caso da dispersão elástica, também conhecida como dispersão de Rayleigh, a energia do fóton é a mesma antes e depois da interação, ou seja, não existe perda de energia [44].

Na dispersão elástica, o átomo não fica ionizado, pois a energia do fóton tem um valor inferior à energia de ligação dos elétrons no átomo. Este tipo de interação é mais provável para fótons de baixas energias e materiais de número atômico, Z , elevado, sendo a sua probabilidade de ocorrência proporcional a Z^2 [51].

Dispersão Inelástica (Dispersão de Compton)

Outro tipo de dispersão é a dispersão inelástica, ou dispersão de Compton, onde existe perda de energia dos fótons incidentes ao interagirem com os átomos de um material. Os fótons são então dispersos por elétrons fracamente ligados aos núcleos dos átomos, segundo um ângulo θ , com uma energia E' mais baixa do que a sua energia inicial, E , dada pela equação de Compton [44, 49], que está representada na equação 3.3,

$$E' = \frac{E}{1 + \frac{E}{m_0 c^2} (1 - \cos \theta)} \quad (3.3)$$

onde $m_0 c^2$ representa a energia do elétron em repouso, que tem o valor de 511 keV [47] (o elétron pode ser considerado como livre pois o momento transferido para o mesmo excede em muito o momento do elétron no seu estado ligado [51]). Ao contrário da dispersão de Rayleigh, a dispersão de Compton é mais provável para fótons de elevada energia e materiais de baixo número atômico.

Efeito Fotoelétrico

O efeito fotoelétrico acontece quando um fóton de energia suficiente interage com um átomo, ejetando um elétron de uma camada interna do mesmo, e tendo como resultado uma lacuna. Se a energia do fóton incidente for superior à energia de ligação do elétron no átomo, então o elétron será ejetado com uma energia cinética de valor igual ao da diferença entre a energia do fóton incidente e a energia de ligação do elétron no átomo, como se pode ver na equação 3.4,

$$E_{\text{cinética}} = E - \phi, \quad (3.4)$$

onde E representa a energia do fóton incidente e ϕ corresponde ao módulo da energia de ligação do elétron no átomo. O átomo fica assim ionizado, tornando-se então possível a ocorrência de dois processos distintos [48], tal como está representado na Figura 3.4:

1. O processo de transição eletrônica para preencher a lacuna existente, resultando num excesso de energia que é posteriormente absorvido por outro elétron próximo. Este último é então ejetado do elemento ionizado, sendo designado por elétron de Auger. O processo tem o nome de efeito de Auger;

2. O processo de transição de um elétron de uma orbital mais externa para preencher a lacuna criada pelo elétron ejetado. É então emitido um fóton de raios-X com energia igual à diferença de energia entre os estados final e inicial do elétron. Este processo tem o nome de fluorescência e é o que está associado à XRF.

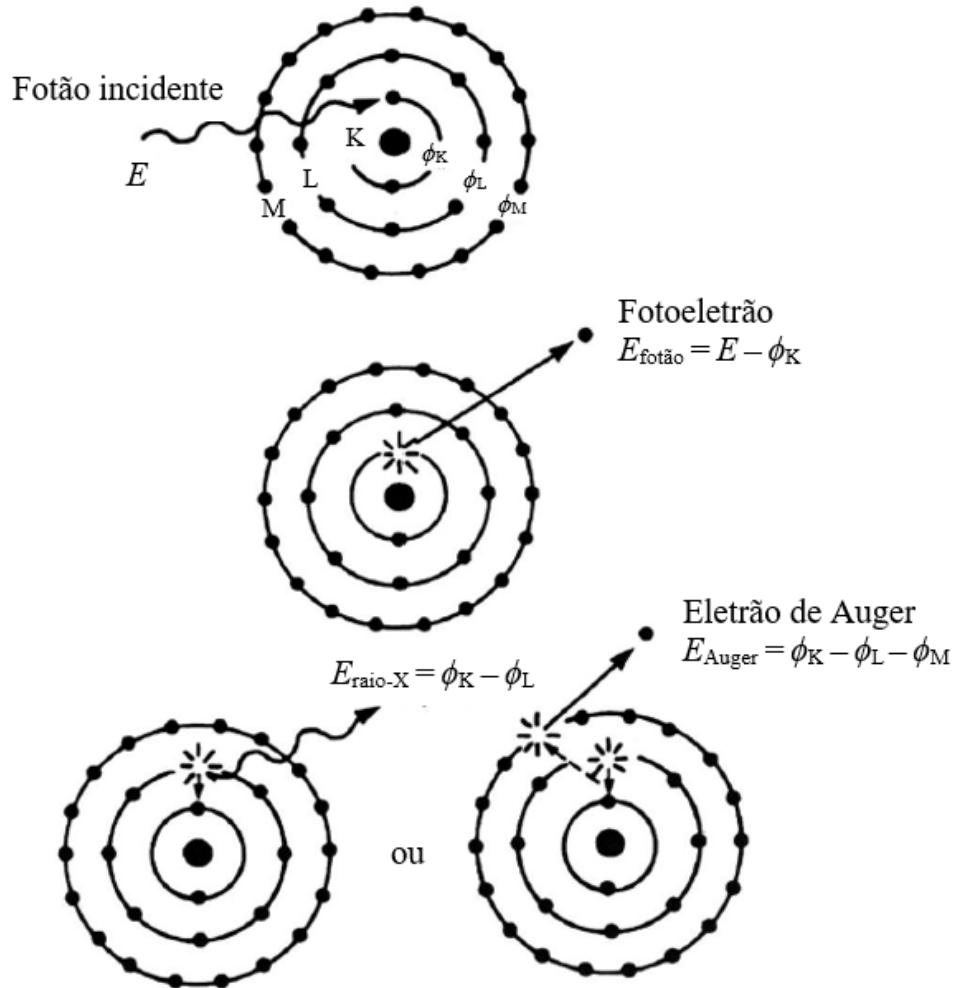


Figura 3.4: Representação do efeito fotoelétrico, com emissão de um elétron (fotoeletrão), e dos possíveis processos que se podem seguir ao mesmo: emissão de raios-X ou emissão de um elétron de Auger (adaptado de [44]).

Os processos são concorrentes: o rendimento de Auger é maior para elementos de número atômico baixo, enquanto o rendimento de fluorescência aumenta com o número atômico [44]. Na Figura 3.5 é possível observar as curvas do rendimento de fluorescência e do rendimento de Auger em função do número atômico, Z .

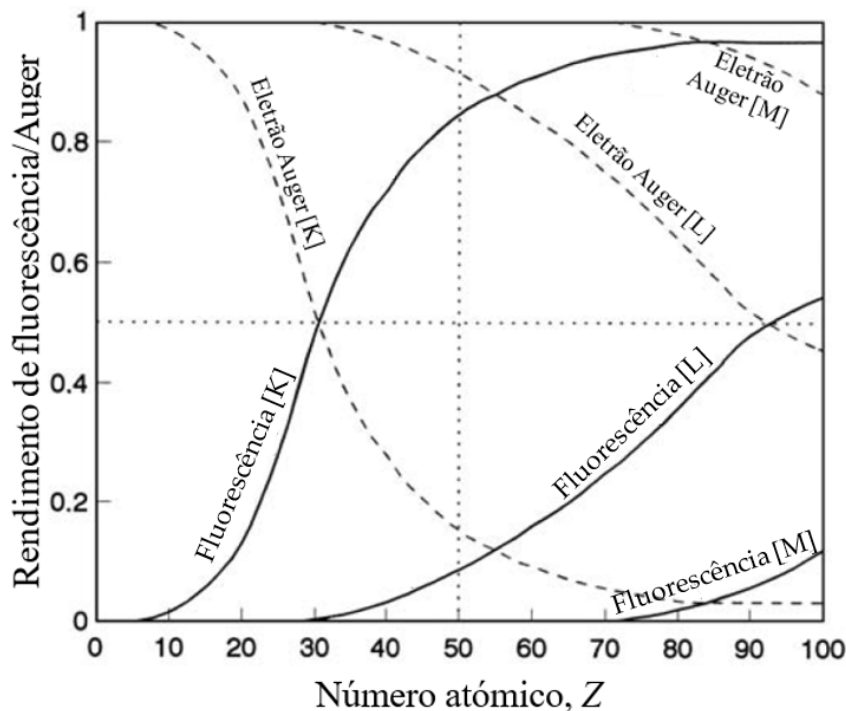


Figura 3.5: Representação do rendimento de fluorescência e do rendimento de Auger para as camadas K, L e M em função do número atômico, Z. O rendimento de fluorescência está representado com uma linha contínua, enquanto o de Auger está representado com uma linha a tracejado (adaptado de [50]).

Produção de Pares

Se os fótons incidentes se aproximarem do núcleo dos átomos, a sua energia pode ser convertida num par positrão-eletrão. No entanto, este tipo de interação não ocorre para energias inferiores a 1 MeV, pelo que não é relevante para os raios-X.

Atenuação

O conjunto dos tipos de interação descritos irá resultar na atenuação da radiação. Quando um feixe de fótons de intensidade I_0 atravessa um material de espessura x , apresentada em cm, é atenuado segundo a lei de Lambert-Beer, descrita na equação 3.5,

$$I_x = I_0 e^{-\mu x} \quad (3.5)$$

sendo μ o coeficiente linear de absorção, em cm^{-1} . Ao dividir este valor pela densidade, ρ , obtemos μ_m , como representado na equação 3.6,

$$\mu_m = \mu / \rho \quad (3.6)$$

onde ρ se encontra em g cm^{-3} , pelo que μ_m se apresenta em $\text{cm}^2 \text{g}^{-1}$ e representa o coeficiente de atenuação mássica para o material de densidade ρ . Desta forma, a equação 3.5 poder ser reescrita como

$$I_x = I_0 e^{-\mu_m \rho x} \quad (3.7)$$

com ρx em g cm^{-2} [45, 50].

3.2 Técnica de Fluorescência de Raios-X (XRF)

A identificação e quantificação dos elementos presentes numa amostra é possível pela utilização de diversas técnicas de análise de elementos químicos, nas quais se inclui a XRF, a técnica usada nesta dissertação. A mesma tem como base a ionização dos átomos da amostra para posterior emissão de fótons de raios-X por fluorescência, recorrendo a radiação eletromagnética como fonte de elevada energia. Para além deste tipo de fonte, existem outras que se destacam, em particular feixes de eletrões ou de outras partículas com energia suficiente, sendo o único requisito a superioridade da energia incidente relativamente à energia de ligação dos eletrões nos átomos da amostra [19]. No presente estudo, foi utilizado um tubo de raios-X para irradiação da amostra.

Segue-se a esta irradiação a interação dos fótons com os átomos da amostra pelos mecanismos descritos na subsecção 3.1.2, sendo que o fenómeno que permite a referida identificação e quantificação dos elementos químicos é o efeito fotoelétrico seguido do efeito de fluorescência. A partir das características da radiação emitida pela amostra, a qual é posteriormente detetada, torna-se possível conhecer os elementos químicos presentes na amostra analisada, bem como as respetivas concentrações [10,49].

Os fótons de raios-X emitidos por fluorescência apresentam energias características de cada elemento, o que permite desta forma a identificação do elemento ionizado. Posteriormente, pela aplicação de um método de quantificação, é possível proceder à determinação da concentração de cada elemento identificado.

Esta técnica tem inúmeras vantagens relativamente às restantes técnicas de análise de elementos químicos, sendo a mais importante a sua natureza não-destrutiva. Isto significa que as amostras analisadas por XRF não são destruídas devido ao processo de irradiação por raios-X [19]. Desta forma, sendo a sua integridade mantida, as amostras poderão ser posteriormente utilizadas para a realização de novas medições pela utilização desta ou de outras técnicas, ou ainda armazenadas novamente.

Outra das vantagens da técnica de XRF é o facto desta ser uma técnica de análise rápida, pois permite a determinação da composição elementar de uma amostra num curto intervalo de tempo. Além disso, os espectrómetros disponíveis em laboratório são de fácil utilização, uma vez que a instrumentação atual é acompanhada de um *software* no qual o utilizador pode configurar os parâmetros da medição, e que permite ainda o cálculo dos valores de concentração, pela utilização de um método de quantificação muito utilizado em XRF – método dos Parâmetros Fundamentais (PF), descrito na subsecção 3.3.1. Por fim, a técnica de XRF laboratorial tem um custo relativamente reduzido, quando comparada com outras técnicas utilizadas para o mesmo fim.

Os sistemas de XRF consistem principalmente em três partes: uma fonte de raios-X, um suporte para a amostra e um sistema de deteção, podendo ainda ser utilizados filtros para diminuir a radiação de fundo e/ou mecanismos óticos, sendo que estes últimos podem estar entre a fonte e a amostra, ou entre a amostra e o detetor [19].

3.2.1 Fluorescência de Raios-X Dispersiva em Energia (EDXRF)

Atualmente, existem dois tipos de espectrômetros de XRF, que se distinguem essencialmente pelos sistemas de detecção. Estes espectrômetros recorrem às técnicas de XRF Dispersiva em Comprimento de Onda (WDXRF) e XRF Dispersiva em Energia (EDXRF), respetivamente [44], sendo a última a utilizada no presente trabalho e descrita em seguida.

Na sistemas de EDXRF, é tipicamente utilizado um detetor semiconductor, que irá contar os fótons que chegam à área ativa do mesmo, discriminando-os simultaneamente de acordo com a sua energia, e guardando os resultados num analisador multicanal. O que resulta deste processo é um espectro de intensidade *vs.* energia [49].

Fonte de Raios-X

Nos sistemas de EDXRF, podem ser utilizados diferentes tipos de fontes de raios-X, sendo as mais comuns as fontes de radiação do sincrotrão, as fontes radioativas e os tubos de raios-X. Para a utilização da radiação do sincrotrão, é necessário um equipamento especializado, disponível apenas em poucas instalações [51]. As fontes radioativas, apesar de bastante utilizadas no passado, produzem um feixe de fótons demasiado reduzido para a maioria das aplicações, para além do intervalo de valores de energia dos mesmos ser pouco extenso [47]. Na realização desta dissertação foi utilizado um sistema com um tubo de raios-X, uma opção adequada para uso em laboratório, de fácil manuseamento e custo acessível, com aplicabilidade na análise de tecidos biológicos.

Na Figura 3.6 encontra-se um esquema simplificado do funcionamento de um tubo de raios-X com janela lateral. Este tipo de fonte tem como base a ionização dos átomos de um material alvo constituído por um elemento de número atómico elevado, pela utilização de um feixe de eletrões. Para tal, procede-se ao aquecimento de um filamento metálico (cátodo) com recurso a uma baixa tensão, o qual irá emitir eletrões que serão posteriormente acelerados em direção ao alvo (ânodo) pela aplicação de uma tensão elevada. Devido à interação destes eletrões com os átomos do material do alvo, serão emitidos fótons de raios-X num espectro constituído por radiação contínua e por radiação característica associada a esse material [19]. Toda esta radiação sairá do tubo por uma janela lateral constituída por um material de número atómico muito baixo, geralmente Be. É essencial que todo o tubo se encontre em vácuo, de modo a evitar a absorção de eletrões por moléculas do ar ou de outro gás.

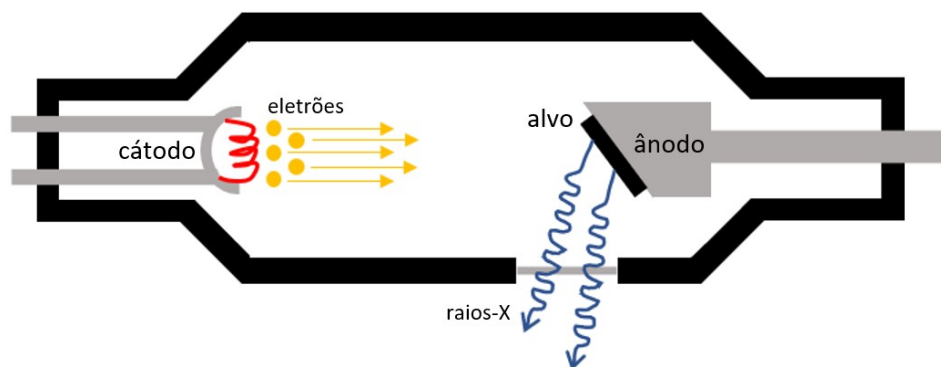


Figura 3.6: Esquema simplificado do interior de um tubo de raios-X.

Detecção de Raios-X

Após a interação dos raios-X primários (emitidos pela fonte) com os átomos da amostra, segue-se a detecção da radiação que é emitida pelos mesmos por efeito de fluorescência.

Nos sistema de EDXRF podem ser utilizados diversos sistemas de detecção, sendo os mais utilizados os detetores semicondutores [19]. Estes detetores são transdutores que convertem a energia de fótons de raios-X em impulsos de tensão. O funcionamento dos mesmos baseia-se no efeito fotoelétrico, uma vez que a interação entre os fótons de raios-X provenientes da amostra e o material do detetor liberta um determinado número de eletrões. A corrente produzida pelos mesmos é convertida num impulso de tensão, de modo a que a cada fóton incidente corresponda um impulso digital [52]. Assim, pode-se dizer que o detetor realiza a contagem dos fótons que chegam ao mesmo, discriminando-os de acordo com a sua energia.

O sinal proveniente do detetor, após passar por um pré-amplificador e um amplificador [47] é então armazenado num analisador multicanal, o qual realiza a contagem do número de impulsos e atribui a cada intervalo discreto dos mesmos um canal diferente. A cada um destes canais corresponde então um número de contagens, o que permite a obtenção de um espectro.

Um detetor é caracterizado pelos seguintes parâmetros:

- **Resolução:** capacidade de distinguir dois fótons com energias muito próximas; este parâmetro é normalmente descrito pela Largura a Meia Altura (FWHM) do pico $K\alpha$ do elemento Mn [19];
- **Sensibilidade:** capacidade de produção de um impulso para uma determinada energia;
- **Eficiência:** quantidade de fótons detetados relativamente ao número de fótons emitidos pela fonte;
- **Taxa de contagens:** razão do número de fótons detetados por unidade de tempo.

μ -XRF

A μ -XRF é um método que utiliza a técnica de EDXRF para a análise da composição elementar de regiões muito pequenas e da distribuição de elementos químicos numa superfície, o que é alcançado ao focar a radiação-X primária através de uma lente policapilar [22,53].

Uma lente policapilar é um conjunto de tubos de vidro ocos, representado na Figura 3.7, cada um com um diâmetro inferior a 2 μm , os quais permitem a focalização do feixe de fótons proveniente do tubo de raios-X através de reflexões totais sucessivas. Para que esta reflexão total aconteça é necessário que o ângulo entre a direção de propagação do fóton e a superfície do capilar seja inferior a um ângulo crítico. Caso contrário, a radiação é refratada.

Pelo facto da radiação ser focada numa área de diâmetro muito reduzido, da ordem dos μm , os espectrómetros de μ -XRF permitem a análise de múltiplos pontos sequencialmente, nomeadamente a execução de mapeamentos. Os mapeamentos correspondem à análise de pequenas áreas de forma consecutiva, de modo a ser possível a obtenção de imagens com a distribuição de cada um dos elementos detetados. Esta técnica permite assim estudar o nível de heterogeneidade da composição elementar de uma amostra [53].

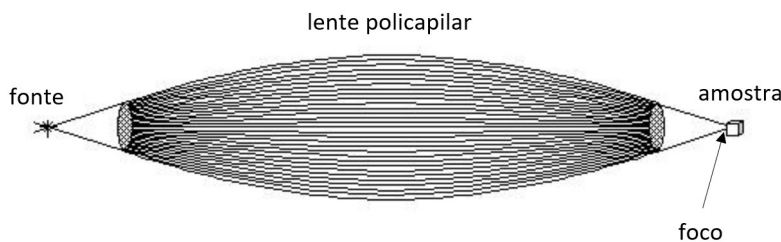


Figura 3.7: Esquema do interior de uma lente policapilar utilizada em μ -XRF para focar a radiação proveniente da fonte (adaptado de [54]).

3.3 Quantificação em EDXRF

A quantificação em Fluorescência de Raios-X Dispersiva em Energia (EDXRF) implica a aplicação de métodos empíricos e/ou teóricos para a conversão das intensidades de fluorescência medidas na concentração dos elementos a analisar. Esta conversão não é direta, uma vez que as intensidades medidas não dependem apenas das concentrações dos elementos a analisar, mas são também influenciadas pelos restantes elementos que compõem a amostra, a que se chama matriz [55].

3.3.1 Método dos Parâmetros Fundamentais

O método mais utilizado para quantificação em EDXRF é o método dos Parâmetros Fundamentais (PF). Este método baseia-se num conjunto de equações matemáticas inicialmente propostas por Sherman em 1955 [56], e melhoradas por Shiraiwa e Fujino em 1966 [57]. O método dos PF estima a composição de uma amostra desconhecida ao calcular as intensidades de fluorescência teóricas e comparando-as iterativamente com as intensidades medidas, até que ocorra uma correspondência [58,59].

A equação 3.8 representa a equação geral que permite realizar o cálculo da intensidade da fluorescência de raios-X emitida por um determinado elemento numa amostra de espessura t quando é irradiada por um feixe de raios-X policromático:

$$I_i = \frac{d\Omega}{4\pi \sin \phi_1} Q_i q_i W_i \int_{\lambda_{\min}}^{\lambda_{\text{edge}}} \tau_i(\lambda) I_0(\lambda) \frac{1 - e^{-\chi(\lambda, \lambda_i) \rho t}}{\chi(\lambda, \lambda_i)} \left(1 + \sum_j W_j S_{ij} \right) d\lambda \quad (3.8)$$

na qual I_i representa a intensidade da fluorescência de raios-X emitida pelo elemento i ; $d\Omega$ diz respeito ao ângulo sólido diferencial para a radiação emitida por fluorescência pelo elemento em causa e ϕ_1 ao ângulo de incidência da radiação primária; Q_i e q_i são, respetivamente, a sensibilidade do espectrómetro para a radiação fluorescente do elemento i , e a sensibilidade do método para o mesmo elemento; W_i corresponde à fração mássica, ou concentração, do elemento i ; $\lambda_{\min}$ e λ_{edge} são, respetivamente, o comprimento de onda mínimo, correspondente à energia máxima que se pode observar no espectro, e o comprimento de onda da descontinuidade de absorção do elemento a analisar; $\tau_i(\lambda)$ representa o coeficiente de absorção fotoelétrica do elemento i para a radiação primária de comprimento de onda λ ; $I_0(\lambda)$ diz respeito à intensidade da radiação primária; $\chi(\lambda, \lambda_i)$ é o coeficiente de atenuação mássica total da amostra para a radiação incidente (λ) e para a radiação fluorescente (λ_i); ρ corresponde à densidade da amostra,

sendo t a sua espessura; por fim, W_j representa a fração mássica, ou concentração, do elemento j pertencente à matriz da amostra, enquanto S_{ij} é o termo de aprimoramento para o elemento j da matriz, o qual pode aumentar a contribuição do elemento i [55].

Pela observação da equação 3.8, pode-se afirmar que a intensidade da radiação emitida por fluorescência é uma função complexa que depende da composição e da espessura da amostra. Os átomos dos elementos analisados e, principalmente, os átomos da matriz, irão absorver e atenuar quer a radiação primária (absorção primária), quer a radiação de fluorescência (absorção secundária). Se os elementos da matriz emitirem radiação por fluorescência com energia suficiente para ionizar os átomos dos elementos a analisar, então a intensidade da fluorescência dos mesmos será mais elevada do que seria de esperar pela energia proveniente somente da radiação primária. Estes fenómenos têm a denominação de efeitos de matriz [55].

Desta forma, é muito importante para uma realização correta do cálculo das concentrações, fornecer valores apropriados dos elementos presentes na matriz da amostra. Os parâmetros físicos necessários para o referido cálculo (coeficientes de absorção fotoelétrica, coeficientes de atenuação mássica, probabilidades de transição, rendimentos de fluorescência, etc.) estão tabelados e disponíveis para consulta, por isso, para além da espessura da amostra, para a qual existem aproximações que se podem utilizar, apenas temos de ter em conta as concentrações dos elementos da matriz [55].

Para a utilização do método dos PF, é possível realizar uma análise com ou sem padrões, sendo estes padrões correspondentes a amostras de elementos puros ou a Materiais de Referência Certificados (CRMs), sendo que os últimos devem ter uma matriz semelhante à amostra que se pretende analisar. Quando se realiza uma análise com padrões, existe uma etapa de calibração na qual se obtém uma função de resposta para cada elemento que se pretende quantificar, sendo depois analisada a amostra desconhecida. Já na análise sem padrões, ou *standardless*, a utilizada neste estudo, são utilizados valores teóricos para os vários parâmetros, ou ainda valores experimentais determinados pelos fabricantes do espectrómetro [55].

No decorrer desta dissertação, foi utilizado o método dos PF *standardless*, pois as amostras de tecido humano foram analisadas sem recurso a amostras padrão. No entanto, para determinar quais os elementos da matriz dos tecidos moles humanos e as suas concentrações foi realizado um estudo complementar de determinação da matriz que melhor se adequa a este tipo de tecido, estudo esse em que foram utilizados CRMs para validação da mesma.

Capítulo 4

Determinação da Matriz Escura dos Tecidos Humanos

4.1 Metodologia

4.1.1 Sistema de μ -XRF

Para a realização desta dissertação utilizou-se o sistema de μ -XRF M4 TORNADO, da Bruker. Este sistema permite a análise dos elementos químicos presentes num material, sendo possível realizar uma análise pontual, bem como mapeamentos que abrangem uma área escolhida pelo utilizador. O mesmo é constituído pelos seguintes componentes, representados na figura 4.1:

- **Espetrómetro:** inclui um tubo de raios-X, filtros, uma lente policapilar, um suporte para amostras e um sistema de deteção; possui ainda uma câmara para observação da área a analisar;
- **Bomba de vácuo:** permite a realização de medições em condições de vácuo, até cerca de 20 mbar; este fator possibilita a deteção de elementos de baixo número atómico;
- **Computador:** torna possível o controlo de todos os restantes componentes através de um *software* (MQuant) desenhado para esse fim, nomeadamente a escolha da área a analisar, os parâmetros do tubo de raios-X, a escolha do filtro a utilizar, o tempo de medição e o posicionamento da amostra.

O espectrómetro contém um tubo de raios-X de baixa potência (máx. 30 W) com um filamento de W como fonte de eletrões, e um ânodo de Rh como fonte primária de raios-X. Sendo um tubo de baixa potência, é arrefecido apenas por ar. A radiação emitida pela fonte poderá então interagir com um filtro, o qual irá atenuar a mesma, sendo que o grau de atenuação está dependente dos materiais do filtro e da(s) sua(s) espessura(s). Foram utilizadas duas configurações diferentes para o tubo de raios-X, cada uma em conjunto com um filtro adequado para a deteção de elementos químicos diferentes, representadas na Tabela 4.1. A configuração L foi utilizada para privilegiar a deteção dos elementos mais leves, ou seja, com $Z \leq 26$, enquanto a configuração P foi usada para os mais pesados, com Z superior a este valor. Os filtros escolhi-

dos, Al_{12.5} e AlTiCu_{100/50/25}, permitem reduzir a radiação de fundo em diferentes regiões do espectro: o primeiro na região das baixas energias, e o segundo na região até ~10 keV.

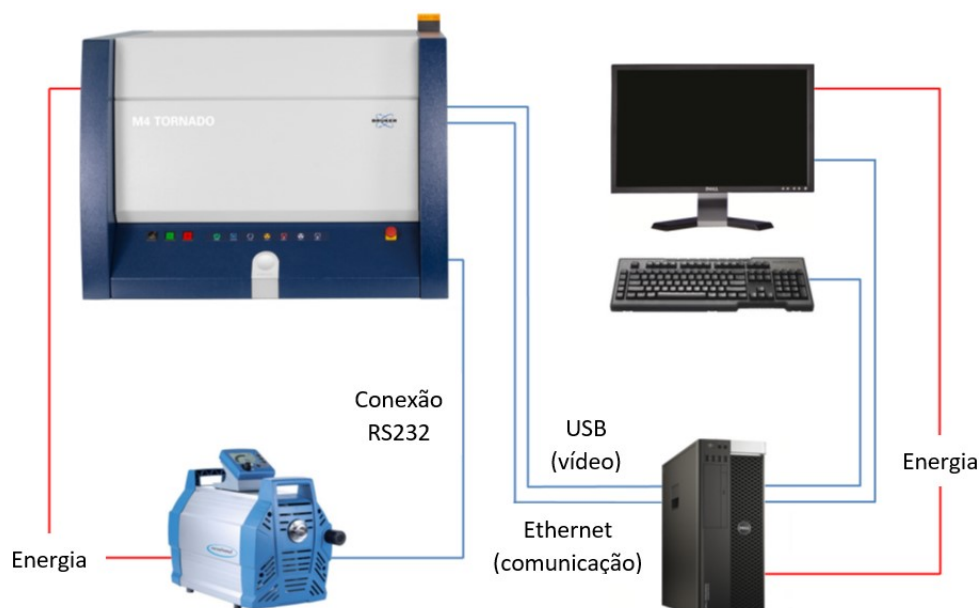


Figura 4.1: Esquema dos principais componentes do sistema M4 TORNADO e suas ligações (adaptado de [60]).

Tabela 4.1: Configurações utilizadas para o tubo de raios-X e respectivos filtros no sistema M4 TORNADO.

Configuração	U/kV	I/ μ A	Filtro	Aplicação
L	50	300	Al _{12.5} ¹	$Z \leq 26$
P	50	600	AlTiCu _{100/50/25} ²	$Z > 26$

¹ filtro de Al com 12,5 μ m de espessura

² filtro de Al, Ti e Cu com 100, 50 e 25 μ m de espessura, respetivamente

Foi utilizada uma lente policapilar para focar a radiação proveniente do tubo de raios-X num foco de 25 μ m para a energia da risca $K\alpha$ do Mo.

Para deteção da radiação utilizou-se um *Silicon Drift Detector* (SDD) com 30 mm² de área sensível e uma resolução energética de 142 eV para o pico $K\alpha$ do Mn. Para a realização das medições, procedeu-se à remoção do ar da câmara que contém as amostras até uma pressão de 20 mbar, sendo todas as medições realizadas sob estas condições.

4.1.2 Composições de Matrizes

Para a utilização do método dos Parâmetros Fundamentais (PF) como método de quantificação, é necessário associar uma matriz representativa dos elementos não detetados pelo sistema de μ -XRF ($Z < 13$), mas que se sabe estarem presentes na constituição dos tecidos – matriz escura. Considera-se a matriz como sendo o conjunto dos elementos leves que são os constituintes principais dos tecidos biológicos. De modo a determinar a matriz mais adequada para a quantificação dos tecidos humanos, testaram-se diferentes composições de matriz e os valores

obtidos para a quantificação utilizando o método dos PF foram comparados com os valores certificados de 4 Materiais de Referência Certificados (CRMs).

Para a realização deste estudo, procedeu-se então à pesquisa de valores adequados para os elementos de interesse ($Z < 13$), disponíveis em bases de dados online. Como o grande objetivo seria a escolha de uma matriz genérica, que inicialmente pudesse ter aplicação na quantificação de qualquer tecido humano, optou-se por escolher um conjunto de valores baseados na *International Commission on Radiological Protection* (ICRP) e na *International Commission on Radiation Units and measurements* (ICRU), presentes na base de dados do *National Institute of Standards and Technology* (NIST).

Durante a escolha das matrizes, verificou-se de imediato que, em todos os casos, os valores listados correspondiam à totalidade da composição elementar de cada material. Dado que o sistema utilizado deteta elementos que não estão presentes na matriz, seria incorreto utilizar valores que perfizessem um total de 100%. Este fator levou assim à normalização da matriz para que a soma das concentrações indicadas correspondesse a valores inferiores a 100%. Desta forma, os valores de cada uma das matrizes passaram a corresponder a percentagens entre 93,9% e 98,0% da composição total dos tecidos. O conjunto de todas as matrizes utilizadas neste estudo pode ser observado no Apêndice A. Com estas matrizes tornou-se então possível proceder à quantificação dos CRMs com o método dos PF.

Numa primeira fase, assumiu-se que a soma das concentrações elementares presentes na matriz com as determinadas para os elementos detetados pelo *software* M4 TORNADO seria igual à totalidade da composição dos materiais analisados. No entanto, pela falta de resultados satisfatórios na comparação dos valores obtidos com os valores certificados, optou-se por fazer uma nova tentativa sem esta assunção. Então, pôs-se a hipótese de existirem mais elementos na composição dos CRMs que não estão presentes nem na matriz nem nos espectros obtidos, o que leva a uma tentativa de quantificação diferente (a soma das concentrações poderá ser diferente de 100%). Os elementos referidos poderiam ser Na, Mg ou até Al, uma vez que os mesmos estão frequentemente presentes nos tecidos humanos. No entanto, todos eles têm limites de deteção demasiado elevados para este tipo de sistema e amostra. Foram assim analisadas novamente as várias normalizações para algumas matrizes, sendo que se escolheram para a continuação do estudo as que revelaram resultados mais significativos, representadas na Tabela 4.2, na qual se pode observar também o Z_{ef} efetivo de cada uma delas.

Tabela 4.2: Composição das matrizes mais significativas utilizadas para quantificar os CRMs e Z_{ef} efetivo das mesmas.

Nº Atómico	Elemento	Composição de Matriz/ % (m/m)					
		ICRU	ICRP	ADIPOSE	BRAIN	LUNG	TESTIS
1	H	9,61	9,92	10,8	10,2	10,0	10,1
6	C	10,55	22,06	56,8	13,8	7,9	9,4
7	N	2,47	2,36	0,7	2,1	2,2	1,9
8	O	72,37	59,87	26,4	67,6	74,0	72,8
11	Na		0,11	0,1	0,2	0,2	0,2
12	Mg		0,01				
Total		95,00	94,34	94,8	93,9	94,3	94,4
Z_{ef}		7,04	6,77	6,00	6,93	7,07	7,04

O método de quantificação utilizado foi validado por comparação com outro método quantitativo previamente estabelecido – método de calibração com padrões externos [18, 59]. Este método tem como base a construção de curvas de calibração pela utilização de diferentes CRMs, sendo as intensidades corrigidas pela utilização dos picos de dispersão da fonte de raios-X na amostra. Para esta validação foram utilizadas amostras de tecidos normais e tumorais humanos de dois órgãos distintos: ovário e próstata. Este estudo deu origem à publicação de um artigo, apresentado no Apêndice B.

4.1.3 Materiais de Referência Certificados (CRMs)

Para determinação da matriz escura mais adequada à quantificação dos tecidos humanos, foram analisados 4 CRMs. Tendo em conta a disponibilidade destes materiais, a escolha recaiu sobre os que mais se assemelhavam a tecido humano, ou seja, tecidos animais. A utilização de 4 CRMs conduz a resultados mais precisos do que se fosse usado apenas um, uma vez que envolve uma variedade de materiais, com valores certificados diferentes. Uma matriz determinada com base na análise destes materiais é assim mais adequada à quantificação que se pretende realizar, podendo até servir para quantificar amostras de outros órgãos em estudos posteriores.

Os CRMs utilizados foram Bovine Liver BCR - 185R (fígado de bovino), Oyster Tissue SRM 1566 (tecido de ostra), Bovine Muscle ERM - BB184 (músculo de bovino) e Pig Kidney ERM - BB186 (rim de porco). Aquando da sua análise, estes materiais encontravam-se em pó, tendo sido previamente reduzidos a pastilhas circulares com 1,5 cm de diâmetro pela utilização de uma prensa hidráulica de 10 toneladas (Specac) e coladas com uma mistura de heptano com filme Mylar. Na Figura 4.2 encontra-se uma fotografia de uma das pastilhas utilizadas.



Figura 4.2: Fotografia da pastilha de Oyster Tissue SRM 1566 utilizada.

A necessidade da utilização de CRMs para a determinação da matriz provém do facto de estes materiais serem acompanhados de valores de referência, ou valores certificados, validados por diversos laboratórios e técnicas, e das respetivas incertezas. Desta forma, é possível comparar os valores obtidos com o método de quantificação utilizado pela aplicação da matriz com os certificados, o que irá dar informação sobre a validade da mesma. Em alguns casos, por não terem sido determinados por um número suficiente de laboratórios ou técnicas, os valores fornecidos são apenas indicativos. Na Tabela 4.3 são apresentados os valores certificados para os 4 CRMs utilizados, sendo que os valores sem incerteza são apenas indicativos.

Tabela 4.3: Composição elementar certificada para os 4 CRMs utilizados. Os valores sem incerteza associada não são certificados, mas apenas indicativos.

Elemento	Concentração/ $\mu\text{g g}^{-1}$			
	Bovine Liver BCR - 185R	Oyster Tissue SRM 1566	Bovine Muscle ERM - BB184	Pig Kidney ERM - BB186
P		8100		
S		7600		
Cl		10000	1540	
K		9690 $\pm$ 50	15800	12000
Ca		1500 $\pm$ 200	155	2900
Mn	11,07 $\pm$ 0,29	17,5 $\pm$ 1,2	0,276 $\pm$ 0,013	7,26 $\pm$ 0,25
Fe		195 $\pm$ 34	75 $\pm$ 4	255 $\pm$ 13
Ni		1,03 $\pm$ 0,19		
Cu	277 $\pm$ 5	63 $\pm$ 3,5	2,31 $\pm$ 0,09	36,5 $\pm$ 1,8
Zn	138,6 $\pm$ 2,1	852 $\pm$ 14	146 $\pm$ 7	134 $\pm$ 5
As		13,4 $\pm$ 1,9		
Se		10,3 $\pm$ 0,9		
Br		55		
Sr		10 $\pm$ 1		

O tipo de medição escolhido para a análise dos CRMs foi o mapeamento. Foram realizados mapeamentos de três áreas distintas para cada CRM, com exceção do Bovine Muscle ERM - BB184. As áreas analisadas tinham $\approx 7 \times 5 \text{ mm}^2$, tendo sido utilizado um tamanho de pixel de 25 μm , e um tempo de medição de 10 ms/pixel. A duração total de cada mapeamento foi de cerca de 15 min. Realizaram-se dois mapeamentos por área, um para cada configuração representada na Tabela 4.1.

Quando se realiza um mapeamento, é produzido um espectro soma de todas as intensidades da área analisada, como se pode observar na Figura 4.3. Para além dos espectros, os mapeamentos produzem imagens com uma cor associada a cada elemento. Neste caso, quanto mais intensa a cor num determinado ponto, maior concentração existe desse elemento. Pelo facto de as amostras se encontrarem em pastilhas, observa-se uma distribuição mais ou menos homogénea dos elementos, como está representado na Figura 4.4, pelo que o espectro tem maior interesse do que as imagens. Ainda assim, existem heterogeneidades nas pastilhas, sendo que se observam aglomerados de determinados elementos, como é o caso do Ca e do Fe, cujos mapeamentos para o CRM de Oyster Tissue se encontram representados na Figura 4.5. Desta forma, existe uma grande vantagem na realização de mapeamentos: a análise de áreas maiores. Com este tipo de medição é possível reduzir as diferenças encontradas numa análise pontual, uma vez que esta última poderia focar-se num aglomerado e não refletir a constituição do CRM.

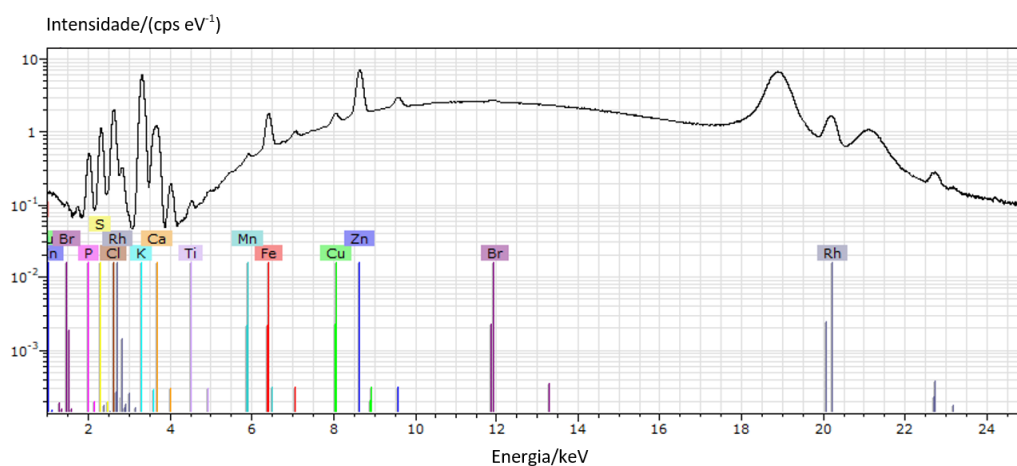


Figura 4.3: Espectro de raios-X obtido pela realização de um mapeamento com a pastilha de Oyster Tissue SRM 1566, utilizando a configuração L.

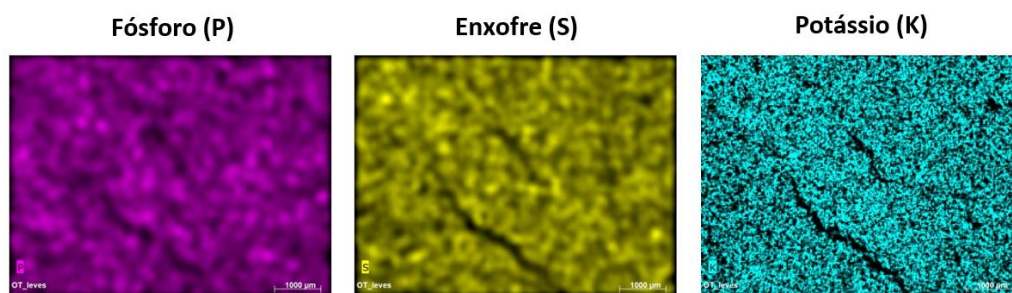


Figura 4.4: Imagens da distribuição de alguns elementos obtidas pela realização de um mapeamento com a pastilha de Oyster Tissue SRM 1566, utilizando a configuração L.

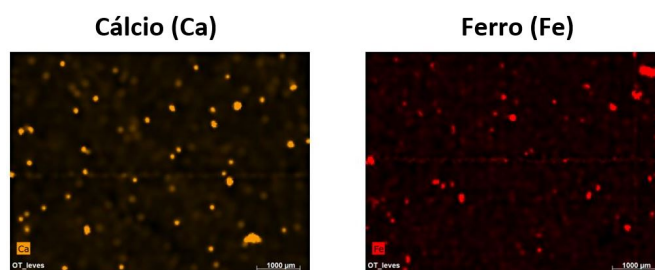


Figura 4.5: Imagens da distribuição de alguns elementos obtidas pela realização de um mapeamento com a pastilha de Oyster Tissue SRM 1566, utilizando a configuração L.

4.2 Resultados e Discussão

4.2.1 Quantificação dos CRMs

Após a análise dos CRMs, procedeu-se à sua quantificação pelo método dos PF com a utilização de cada uma das matrizes listadas no Apêndice A, tendo os resultados mais relevantes sido obtidos com as representadas na Tabela 4.2. Na Figura 4.6 apresenta-se uma imagem do painel de controlo do *software* MQuant, com a aplicação da matriz ICRP na quantificação de uma das áreas do CRM Oyster Tissue SRM 1566, e os valores obtidos para essa quantificação.

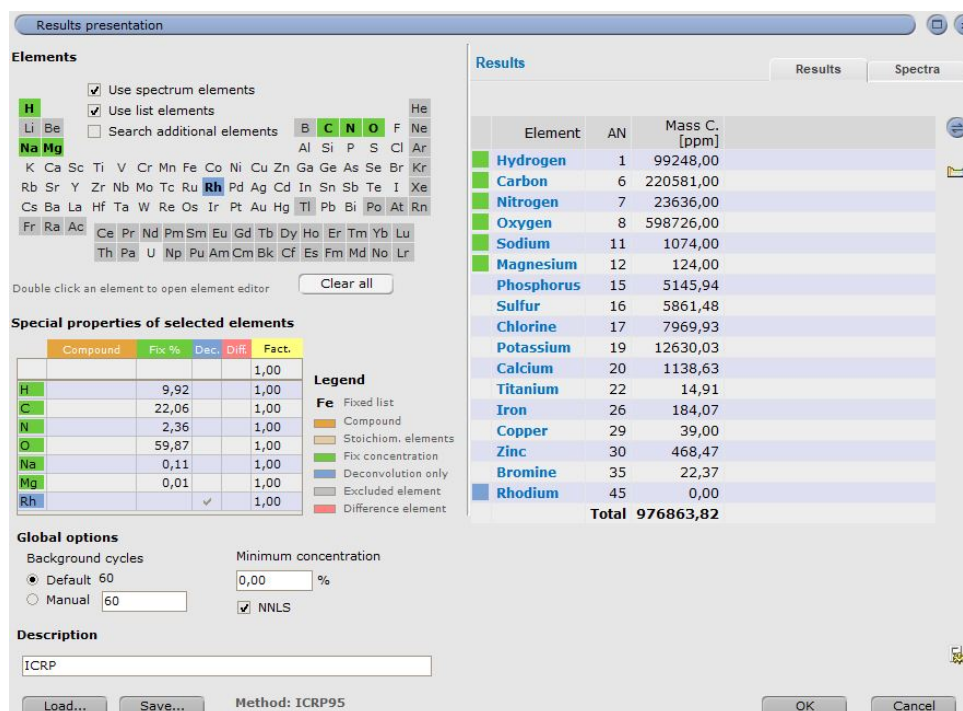


Figura 4.6: Painel de controlo do *software* MQuant com a aplicação da matriz ICRP na quantificação de uma área da pastilha de Oyster Tissue SRM 1566.

Para os CRMs Bovine Liver BCR - 185R, Oyster Tissue SRM 1566 e Pig Kidney ERM - BB186, foram realizadas as médias dos valores obtidos para a quantificação das três áreas distintas, sendo associada à mesma uma incerteza correspondente ao maior desvio em relação à média. Na Tabela 4.4 são apresentados os valores obtidos na quantificação do elemento Ca nas três áreas analisadas para cada uma das matrizes, juntamente com a média e a incerteza para cada caso.

Após a realização de todo este processo para os vários elementos e para os diferentes CRMs, foi efetuado o cálculo do desvio relativo ao valor certificado para cada caso. A Tabela 4.5 apresenta um exemplo do cálculo dos desvios em % relativamente aos valores de referência do Oyster Tissue SRM 1566. Para efeitos de escolha de matriz, foi considerado que o ideal seria existir um erro inferior a 25% para todos os elementos em todos os CRMs analisados. Assim, os diferentes intervalos estão assinalados com cores diferentes, para uma melhor identificação do nível de desvio em relação ao valor certificado. As cores e intervalos utilizados são os seguintes:

$\leq 10\%$;
 $10\% < \leq 15\%$;
 $15\% < \leq 25\%$;
 $25\% < \leq 30\%$;
 $> 30\%$.

Tabela 4.4: Valores obtidos para a concentração do elemento Ca na quantificação do CRM Oyster Tissue SRM 1566. Para cada matriz, foi calculada a média e a incerteza, sendo que a última corresponde ao maior desvio em relação à média.

Matriz	Cálcio (Ca)				
	Medição			Média	
	Área 1	Área 2	Área 3		
	Conc./ $\mu\text{g g}^{-1}$	Conc./ $\mu\text{g g}^{-1}$	Conc./ $\mu\text{g g}^{-1}$	Conc./ $\mu\text{g g}^{-1}$	Inc./ $\mu\text{g g}^{-1}$
ICRU	1166	1150	1548	1288	260
ICRP	1139	1122	1510	1257	253
ADIPOSE	895	882	1186	987	198
BRAIN	1216	1199	1613	1342	270
LUNG	1227	1210	1628	1355	273
TESTIS	1212	1195	1608	1338	270

Tabela 4.5: Cálculo dos desvios da matriz ICRP relativamente aos valores certificados do CRM Oyster Tissue SRM 1566. Cada cor representa um intervalo diferente, com os seguintes valores: $\leq 10\%$; $10\% < \leq 15\%$; $15\% < \leq 25\%$; $25\% < \leq 30\%$; $> 30\%$.

Nº Atómico		Elemento	ICRP			
			Oyster Tissue SRM 1566			
			Ref./µg g ⁻¹	Conc./µg g ⁻¹	Inc./µg g ⁻¹	Δ/%
L	15	P	8100	5116	99	37
	16	S	7600	5755	105	24
	17	Cl	10000	7838	130	22
	19	K	9690	12308	319	27
	20	Ca	1500	1257	253	16
	26	Fe	195	176	12	10
P	29	Cu	63	56	3	12
	30	Zn	852	584	50	31
	35	Br	55	16	2	71

Nas tabelas 4.6 e 4.7 estão apresentados os valores dos desvios relativos aos valores certificados dos CRMs para os elementos medidos com as configurações L e P, respetivamente. Com base nestes valores, foram analisadas as várias matrizes de um ponto de vista que permitisse a obtenção do menor desvio possível no maior número de elementos possível. Apenas se consideraram os elementos com valores certificados superiores a $20 \mu\text{g g}^{-1}$, uma vez que em valores inferiores, uma pequena variação gera desvios percentuais bastante significativos.

Tabela 4.6: Desvios relativos aos valores certificados dos CRMs para os elementos medidos com a configuração L. As abreviaturas utilizadas correspondem aos 4 CRMs: BL - Bovine Liver, BM - Bovine Muscle, PK - Pig Kidney e OT - Oyster Tissue. Cada cor representa um intervalo diferente, com os seguintes valores: $\leq 10\%$; $10\% < \leq 15\%$; $15\% < \leq 25\%$; $25\% < \leq 30\%$; $> 30\%$.

Matriz	Desvios em relação aos valores certificados/%														
	P		S	Cl			K			Ca			Fe		
	OT	OT	OT	BM ¹	PK	OT	BM ¹	PK	OT	BM ¹	PK	OT	BM ¹	PK	
ICRU	31	18	16	20	0	34	40	44	14	20	19	9	15	1	
ICRP	37	24	22	26	6	27	32	37	16	19	17	10	14	0	
ADIPOSE	54	44	42	45	30	3	0	5	34	6	8	28	9	20	
BRAIN	33	20	17	21	1	35	41	46	11	27	25	3	22	7	
LUNG	30	16	14	18	3	39	45	50	10	27	25	3	22	7	
TESTIS	31	17	15	19	2	37	43	48	11	26	24	5	20	6	

¹ Foi realizada apenas uma medição.

Tabela 4.7: Desvios relativos aos valores certificados dos CRMs para os elementos medidos com a configuração P. As abreviaturas utilizadas correspondem aos 4 CRMs: BL - Bovine Liver, BM - Bovine Muscle, PK - Pig Kidney e OT - Oyster Tissue. Cada cor representa um intervalo diferente, com os seguintes valores:  $\leq 10\%$; $10\% < \text{yellow square}$ $\leq 15\%$; $15\% < \text{orange square}$ $\leq 25\%$; $25\% < \text{purple square}$ $\leq 30\%$; $> 30\%$.

Matriz	Desvios em relação aos valores certificados/%							
	Cu			Zn				Br
	BL	OT	PK	BL	OT	BM ¹	PK	OT
ICRU	31	12	*	20	32	3	*	72
ICRP	31	12	16	21	31	4	13	71
ADIPOSE	5	29	7	3	45	16	30	77
BRAIN	41	6	24	29	26	12	7	69
LUNG	40	6	24	29	27	11	7	70
TESTIS	38	7	22	27	28	9	8	70

¹ Foi realizada apenas uma medição.

* Valor sem significado.

Devido à semelhança na composição de algumas matrizes utilizadas, nomeadamente a BRAIN, a LUNG e a TESTIS, os resultados obtidos com as mesmas foram bastante parecidos. Da mesma forma, observam-se resultados semelhantes quando se comparam as matrizes ICRU e ICRP, o que leva à conclusão de que a presença de Na e Mg na composição da matriz, por ser em pequenas concentrações, não implica mudanças significativas na quantificação das matrizes cujo componente maioritário é o oxigénio. As 5 composições referidas apresentam valores deste elemento aproximadamente entre os 60% e os 74%, sendo portanto este o componente maioritário das mesmas.

Existe, no entanto, uma matriz que difere bastante das restantes: a ADIPOSE. Esta matriz apresenta como componente maioritário o carbono, ao contrário de todas as outras, pelo que os resultados obtidos também são bastante diferentes. Numa visão geral, esta é a composição com a qual se obtiveram os resultados mais próximos dos valores certificados dos CRMs. Como se pode observar nas Tabelas 4.6 e 4.7, a ADIPOSE é a matriz com o maior número de elementos com desvios dos valores de referência abaixo de 10%. Apesar disso, nesta composição os elementos mais leves (P, S e Cl) apresentam os piores resultados, com desvios superiores a 30%. Sendo o grande objetivo da escolha da matriz a quantificação de amostras de tecido humano para comparação entre tecido normal e tumoral, os resultados referentes a estes elementos são um grande obstáculo, uma vez que, num estudo recente realizado por Machado *et al.* [59], foram encontradas diferenças significativas nos elementos P ($p = 0,006$) e S ($p = 0,002$) entre tecidos normais e tumorais da mama.

Relativamente ao Br, nenhuma das composições revelou bons resultados, apresentando todas elas desvios da ordem dos 70%. Apesar deste elemento não ser frequentemente encontrado na literatura sobre o tema, recentemente Olaiya *et al.* [42] descobriram concentrações inferiores do mesmo em tecido neoplásico da mama quando comparado com tecido normal.

Desta forma não foi possível escolher, de entre as composições selecionadas, uma matriz com desvios inferiores a 25% para todos os elementos, tornando assim necessária a procura de um compromisso entre os vários elementos presentes nos CRMs.

4.2.2 Determinação da MatrizEnsina

Depois de analisados os resultados obtidos com as composições escolhidas, optou-se por procurar novos valores para uma matriz, de modo a diminuir os desvios relativamente aos valores certificados nos elementos mais leves, sem aumentar em demasia os restantes desvios. Após várias tentativas, encontrou-se um conjunto de valores, a que se deu o nome de MatrizEnsina, sendo a sua composição apresentada na Tabela 4.8.

Tabela 4.8: Composição da MatrizEnsina e Z efetivo da mesma.

Nº Atómico	Elemento	Composição da MatrizEnsina/ % (m/m)
1	H	10,0
6	C	22,0
7	N	3,0
8	O	60,0
Total		95,0
Z _{ef}		6,77

Os desvios relativos aos valores certificados para a MatrizEnsina podem ser observados nas Tabelas 4.9 e 4.10 para os elementos analisados com as configurações L e P, respetivamente.

Tabela 4.9: Desvios relativos aos valores certificados dos CRMs para os elementos medidos com a configuração L pela utilização da MatrizEnsina. As abreviaturas utilizadas correspondem aos 4 CRMs: BL - Bovine Liver, BM - Bovine Muscle, PK - Pig Kidney e OT - Oyster Tissue. Cada cor representa um intervalo diferente, com os seguintes valores:  ≤ 10%;  10% < ≤ 15%;  15% < ≤ 25%;  25% < ≤ 30%;  > 30%.

Matriz	Desvios em relação aos valores certificados/%														
	P	S	Cl			K			Ca			Fe			
	OT	OT	OT	BM ¹	PK	OT	BM ¹	PK	OT	BM ¹	PK	OT	BM ¹	PK	
MatrizEnsina	37	25	23	27	8	24	29	34	20	13	11	14	8	5	

¹ Foi realizada apenas uma medição.

Tabela 4.10: Desvios relativos aos valores certificados dos CRMs para os elementos medidos com a configuração P pela utilização da MatrizEnsina. As abreviaturas utilizadas correspondem aos 4 CRMs: BL - Bovine Liver, BM - Bovine Muscle, PK - Pig Kidney e OT - Oyster Tissue. Cada cor representa um intervalo diferente, com os seguintes valores:  ≤ 10%;  10% < ≤ 15%;  15% < ≤ 25%;  25% < ≤ 30%;  > 30%.

Matriz	Desvios em relação aos valores certificados/%							
	Cu			Zn				Br
	BL	OT	PK	BL	OT	BM ¹	PK	OT
MatrizEnsina	24	17	9	14	35	2	18	73

¹ Foi realizada apenas uma medição.

Com esta nova matriz, obtiveram-se resultados mais aceitáveis para os elementos mais leves. Quanto ao K, apesar dos resultados serem significativamente piores quando se faz a comparação com a composição ADIPOSE, houve uma diminuição dos desvios relativamente às

restantes matrizes. Para além disso, mantiveram-se desvios abaixo dos 25% para os elementos Ca, Fe, Cu e Zn. A única exceção foi o Zn no CRM Oyster Tissue, tendo-se observado ainda assim uma grande melhoria quando comparada com a matriz ADIPOSE. Este elemento está presente em grandes quantidades neste CRM ($852 \mu\text{g g}^{-1}$), pelo que se pode concluir que existe um limite no intervalo de concentrações no qual este tipo de matriz pode ser considerado fiável. No entanto, os valores encontrados na literatura para o Zn nos tecidos não vão além dos $101 \mu\text{g g}^{-1}$ para o cólon [28], dos $68 \mu\text{g g}^{-1}$ para a mama [31] e dos $80 \mu\text{g g}^{-1}$ para o pulmão [31], em tecido liofilizado. Posto isto, pode-se concluir que a matriz determinada é aplicável para o objetivo em causa, tendo sido obtido um bom compromisso para todos os elementos estudados, à exceção talvez do Br, cujos desvios para os valores certificados não foram considerados aceitáveis. Por este motivo, o mesmo não foi quantificado nas amostras de tecido humano estudadas.

Os valores utilizados para a MatrizEnsina são bastante semelhantes aos encontrados no estudo realizado por Heymsfield *et al.* [15], no qual foi construído um modelo elementar para a composição do corpo humano. É importante referir que o mesmo foi validado com base em medições realizadas num grupo de 20 adultos saudáveis. Este modelo consistia nos 11 elementos químicos abundantes no corpo humano (H, C, N, O, Na, Mg, P, S, Cl, K e Ca). As percentagens obtidas para os 4 constituintes principais, ou seja, os mesmos presentes na MatrizEnsina, foram as seguintes: 9,8% H, 27,3% C, 2,4% N e 55,1% O. Estes valores estão bastante próximos dos determinados no âmbito da presente dissertação. As variações observadas relativamente à matriz determinada podem ser justificadas pelo facto de esta ser uma matriz para utilização em amostras de tecido mole, o qual conterá mais água, e como tal mais oxigénio do que quando se considera a totalidade do organismo.

4.2.3 Validação do Método de Quantificação

Tendo em conta que o grande objetivo deste estudo é a comparação de tecidos normais e tumorais do mesmo indivíduo, para que se possam retirar conclusões sobre a possibilidade das variações ao nível elementar serem traduzidas na obtenção de novos biomarcadores, é necessário validar o método de quantificação utilizando a matriz determinada.

Uma vez que a determinação da MatrizEnsina foi efetuada com recurso a CRMs no formato de pastilhas, optou-se pela utilização da mesma na quantificação de amostras em formato semelhante, de modo a ser demonstrada a aplicabilidade da matriz. Para tal, foram analisadas dois pares de amostras de tecido normal e tumoral, cada par pertencente ao mesmo paciente, sendo cada um deles proveniente de um órgão diferente: ovário e próstata, respetivamente. Estas amostras eram provenientes do Departamento de Anatomia da NOVA Medical School. Foram realizadas medições de 3 áreas diferentes em cada amostra no sistema M4 TORNADO com os mesmos parâmetros utilizados na medição dos CRMs, sendo os espetros obtidos quantificados com recurso a dois métodos de quantificação diferentes: o método dos parâmetros fundamentais (PF) com a utilização da MatrizEnsina e o método dos padrões externos (PE). Como forma de validação, os resultados obtidos com ambos os métodos foram comparados, como se pode observar nas Tabelas 4.11 e 4.12.

Tabela 4.11: Comparação da concentração elementar obtida com o método dos parâmetros fundamentais (PF) utilizando a MatrizEnsina e com o método dos padrões externos (PE) em amostras de tecido normal e tumoral do ovário. A incerteza corresponde ao maior desvio em relação à média. O Δ representa a variação percentual entre o tecido tumoral e o normal, para cada método de quantificação. NQ significa não quantificado.

Elemento	Ovário					
	Concentração/ $\mu\text{g g}^{-1}$				$\Delta/\%$	
	Normal		Tumor			
	PF	PE	PF	PE	PF	PE
P	1330 $\pm$ 70	2000 $\pm$ 300	2500 $\pm$ 100	3600 $\pm$ 900	89	74
S	3300 $\pm$ 250	4800 $\pm$ 900	3100 $\pm$ 200	4600 $\pm$ 900	-6	-5
Cl	4500 $\pm$ 800	5100 $\pm$ 500	4600 $\pm$ 200	5200 $\pm$ 900	2	2
K	4300 $\pm$ 400	2900 $\pm$ 600	4900 $\pm$ 200	3000 $\pm$ 1000	12	16
Ca	1200 $\pm$ 70	NQ	900 $\pm$ 30	NQ	-25	
Ti	90 $\pm$ 10	NQ	87 $\pm$ 8	NQ	-8	
Fe	280 $\pm$ 40	420 $\pm$ 90	178 $\pm$ 8	210 $\pm$ 60	-37	-49
Ni	8,1 $\pm$ 0,7	NQ	7,3 $\pm$ 0,3	NQ	-11	
Cu	19 $\pm$ 1	18 $\pm$ 5	13 $\pm$ 1	10 $\pm$ 5	-32	-41
Zn	115 $\pm$ 6	130 $\pm$ 30	75 $\pm$ 1	90 $\pm$ 20	-35	-37
Br	NQ	110 $\pm$ 30	NQ	31 $\pm$ 8		-72

Tabela 4.12: Comparação da concentração elementar obtida com o método dos parâmetros fundamentais (PF) utilizando a MatrizEnsina e com o método dos padrões externos (PE) em amostras de tecido normal e tumoral da próstata. A incerteza corresponde ao maior desvio em relação à média. O Δ representa a variação percentual entre o tecido tumoral e o normal, para cada método de quantificação. NQ significa não quantificado.

Elemento	Próstata					
	Concentração/ $\mu\text{g g}^{-1}$				$\Delta/\%$	
	Normal		Tumor			
	PF	PE	PF	PE	PF	PE
P	900 ± 70	1600 ± 300	1300 ± 50	2200 ± 400	44	35
S	2400 ± 200	4100 ± 900	2900 ± 200	5100 ± 900	24	23
Cl	5000 ± 400	6700 ± 800	5200 ± 400	6900 ± 300	3	3
K	4300 ± 400	3400 ± 600	4300 ± 200	3500 ± 300	0,2	3
Ca	1600 ± 100	NQ	2300 ± 200	NQ	40	
Ti	140 ± 20	NQ	61 ± 9	NQ	-58	
Fe	1500 ± 200	2000 ± 400	1200 ± 200	1700 ± 500	-22	-22
Ni	74 ± 10	NQ	6 ± 1	NQ	-91	
Cu	14 ± 1	12 ± 3	13 ± 1	11 ± 3	-12	-6
Zn	112 ± 5	120 ± 20	144 ± 3	180 ± 10	29	51
Br	NQ	140 ± 20	NQ	70 ± 10		-45

Os valores obtidos pela quantificação com o método dos PF são mais precisos, uma vez que a incerteza é, no geral, inferior à que está associada ao método dos PE. Este facto deve-se provavelmente à influência dos restantes constituintes da amostra na quantificação de cada elemento, a qual é tida em conta quando se utiliza o método dos PF, mas não aquando da utilização do método dos PE.

Quanto à exatidão da quantificação, é possível observar uma correspondência entre os resultados obtidos com ambos os métodos, apesar de ocorrerem algumas discrepâncias nos elementos mais leves. No entanto, ambos os métodos revelam valores de concentração da mesma ordem de grandeza.

Para além disso, a variação entre tecido normal e tumoral não difere significativamente

para ambos os métodos em praticamente nenhum dos elementos quantificados, o que leva à conclusão de que o método dos PF com a aplicação da MatrizEnsina é fiável para a utilização na comparação de tecidos normais e tumorais humanos. Uma vez que o método dos PE foi previamente estabelecido como um método de quantificação aplicável neste tipo de amostra, a sua comparação com o novo método valida este último. Desta forma, é possível utilizar a matriz determinada na quantificação de tecidos humanos, sendo que uma grande vantagem da utilização do método dos PF é a possibilidade de quantificar elementos não presentes nos CRMs utilizados.

Capítulo 5

Análise de Amostras de Tecido Humano Incluídas em Parafina

Após a escolha da matriz escura mais adequada à quantificação dos tecidos humanos, procedeu-se à análise de amostras de tecido normal e tumoral do cólon e da mama incluídas em parafina.

5.1 Metodologia

5.1.1 Cedência de Amostras

As amostras analisadas foram cedidas pela unidade de Anatomia Patológica do Centro Hospitalar Barreiro Montijo (CHBM). Esta cedência foi precedida por um processo de autorização que foi entregue à Comissão de Ética deste mesmo Centro Hospitalar. Foram pedidas amostras de adenocarcinomas do cólon direito, esquerdo e transversal, bem como amostras de carcinomas da mama do tipo não especial, todas elas pareadas com tecido normal do mesmo órgão pertencente ao mesmo paciente. A escolha dos tipos de cancro foi feita tendo em consideração que os mesmos são os mais comuns no cólon [61] e na mama [62], respetivamente. Os cânceres colorretal – cólon, reto e ânus, por ordem de frequência – e da mama são os que possuem maiores taxas de incidência em Portugal [7], pelo que existem mais amostras disponíveis nos serviços hospitalares portugueses. Para além disso, os tipos de cancro escolhidos estão entre os casos mais frequentes de patologia tumoral no CHBM. Este pedido foi aceite pela Comissão de Ética, com a condição de as amostras serem completamente anonimizadas, de acordo com a lei de proteção de dados em vigor (Lei nº 58/2019 de 08 de agosto).

5.1.2 Descrição das Amostras

Após aprovação do pedido entregue à Comissão de Ética do CHBM, as amostras foram cedidas, sendo cerca de metade pertencente a pacientes com adenocarcinomas do cólon e as restantes a pacientes com carcinomas da mama do tipo não especial.

No total, foram disponibilizadas 20 amostras de tecido tumoral do cólon e 19 de tecido tumoral da mama, todas pareadas com as dos correspondentes tecidos normais, o que fez um total de 78 amostras. Na presente dissertação, todos os dados relativos aos pacientes foram

ocultados para salvaguardar a identidade dos mesmos, de acordo com a legislação de proteção de dados em vigor, mencionada na Secção 5.1.1.

Todas as amostras se encontravam incluídas em parafina, pois trata-se de uma forma de preservar os tecidos, preservação essa que é feita logo após a cirurgia. Este tipo de amostras está armazenado nos serviços hospitalares em número elevado, pelo que existe todo um campo de investigação em aberto pela utilização das mesmas. Para além da cedência das amostras mencionadas anteriormente, foi ainda disponibilizado um bloco branco, contendo apenas parafina, proporcionando assim a possibilidade de determinação da composição deste material.

5.1.3 Amostras de Teste

Antes da cedência das 78 amostras fornecidas, realizou-se a análise de duas amostras de teste por μ -XRF no sistema M4 TORNADO, descrito na Subsecção 4.1.1, sendo uma correspondente a um adenocarcinoma do cólon e outra a um carcinoma da mama do tipo não especial. Ambas as amostras, tais como as restantes, se encontravam incluídas em parafina, como se pode verificar pela observação da Figura 5.1.

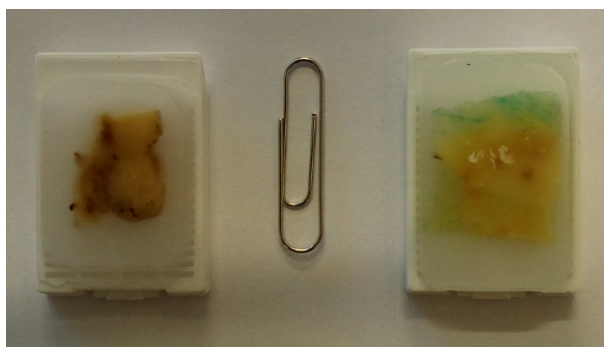


Figura 5.1: Blocos contendo as amostras de teste incluídas em parafina: à esquerda um adenocarcinoma do cólon, e à direita um carcinoma da mama do tipo não especial. No meio mostra-se um clip para escala.

Utilizando estas amostras, foi realizada uma análise pontual das diferentes regiões presentes em cada uma das mesmas, como por exemplo as mais escuras e as mais claras, de forma a tentar perceber se existiam diferenças significativas entre estas. Adicionalmente foi analisada a região contendo apenas parafina. Em cada região foram analisados 4 pontos, num total de 12 pontos por amostra, tendo cada um deles um tempo de medição de 120 s.

Foram ainda realizados dois mapeamentos por amostra, cada um utilizando uma das configurações da Tabela 4.1. Os parâmetros utilizados foram semelhantes aos das medições dos CRMs (Subsecção 4.1.3), apesar da área analisada ser bastante maior: cerca de $20 \times 20 \text{ mm}^2$, o que resultou numa média de 2,5 horas por mapeamento. Com os dados obtidos nestas medições de teste, concluiu-se que o mapeamento seria a melhor forma de realizar as medições, uma vez que permite analisar uma grande área de uma só vez, obtendo-se um espectro mais representativo das amostras.

5.1.4 Análise das Amostras Cedidas

Após a análise das amostras de teste, e determinada qual seria a melhor forma de medição para as restantes amostras, procedeu-se à análise das mesmas.

Os blocos de parafina contendo as amostras eram semelhantes aos da Figura 5.1. Para esta análise foi utilizado um tamanho de pixel menor do que na análise dos CRMs e das amostras de teste: 15 μm . A utilização de um tamanho de pixel menor permite aumentar a quantidade de pontos analisados na mesma área e consequentemente a obtenção de melhores resultados para a quantificação. Já o tempo de medição manteve-se nos 10 ms/pixel. A dimensão das áreas analisadas variou de acordo com a quantidade de tecido na amostra, já que nos blocos existiam regiões contendo apenas parafina e a sua medição não traria nenhuma informação útil sobre a composição dos tecidos.

Foram realizados dois mapeamentos por amostra, um para cada configuração apresentada na Tabela 4.1, dos quais se extraíram dois tipos de informação:

- Espetros de fluorescência de raios-X onde são visíveis as várias linhas de fluorescência correspondentes aos elementos detetados na amostra sobre um fundo contínuo;
- Imagens com a distribuição espacial de cada um dos elementos detetados na amostra.

A Figura 5.2 representa um dos espectros obtidos com uma amostra da mama, sendo possível observar os picos correspondentes a vários elementos químicos presentes na amostra, cujas energias estão assinaladas a cores diferentes.

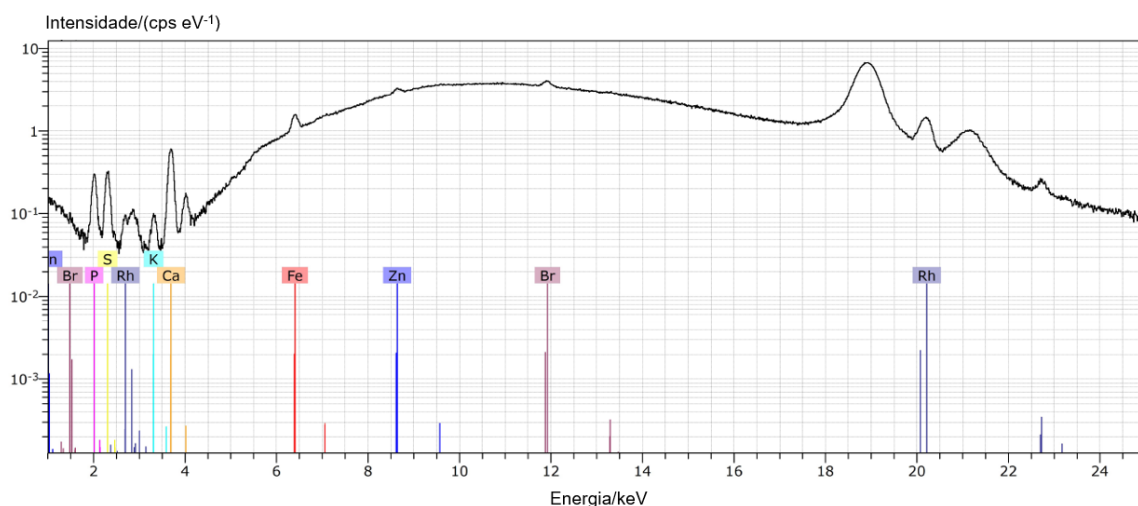


Figura 5.2: Exemplo de um espectro obtido com uma amostra correspondente ao tecido mamário, pela utilização da configuração L.

Na Figura 5.3 são apresentadas algumas imagens obtidas pela realização de um mapeamento de uma amostra do cólon. As distribuições elementares apresentadas são as correspondentes aos elementos que se destacam maioritariamente no tecido. É importante referir que outros elementos foram detetados na amostra, tais como o Ni e Cu, mas revelaram estar presentes em toda a área analisada, pelo que essas imagens não disponibilizam informação relevante.

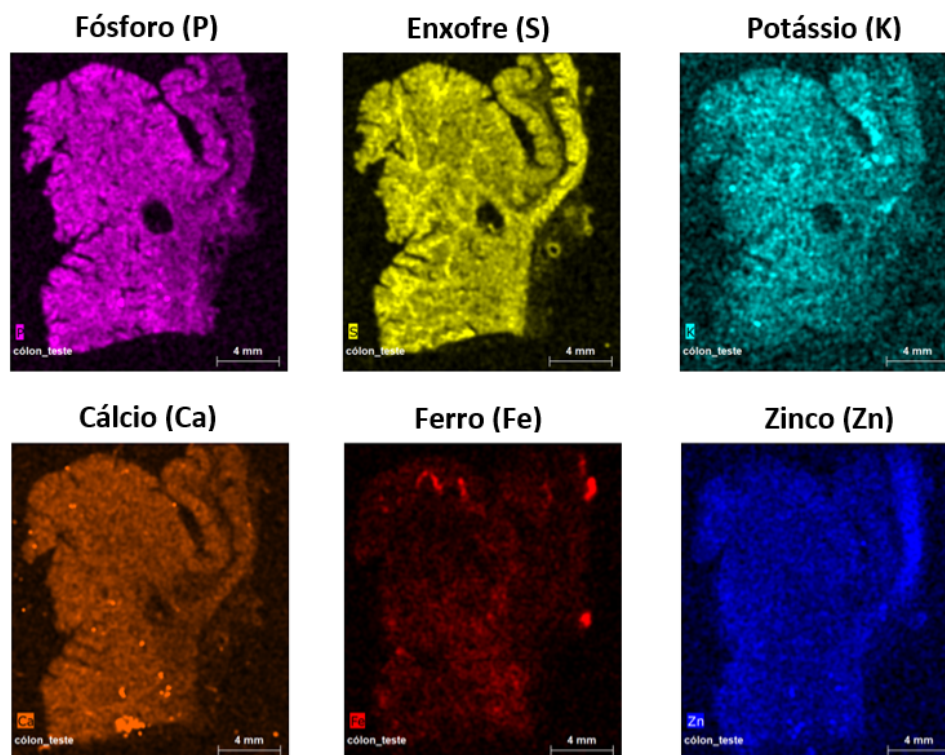


Figura 5.3: Distribuições de alguns elementos presentes numa amostra do cólon, obtidos pela realização de um mapeamento com o sistema M4 TORNADO.

5.1.5 Metodologia de Tratamento de Imagens em Ambiente R

Para proceder à quantificação das amostras de tecido humano, foi necessário fazer a escolha das áreas a quantificar, uma vez que os tecidos analisados são bastante heterogêneos. Assim, optou-se pela escolha de 3 áreas distintas em cada amostra. No entanto, uma vez que as amostras se encontram incluídas em parafina, deve ter-se em conta que, para além de todos os espaços vazios serem preenchidos por esta substância, a espessura deste material por cima do tecido varia de região para região na mesma amostra.

Para tornar possível a procura de regiões onde a influência da parafina é menor, procedeu-se a um tratamento das imagens obtidas nos mapeamentos de todas as amostras. O método utilizado teve origem numa rotina desenvolvida em ambiente R. Este método utiliza os códigos RGB dos pixéis de uma imagem, classificando-os por gradação de cores. Desta forma, torna-se possível utilizar as imagens provenientes de um mapeamento e determinar quais as regiões com maior intensidade de cor, ou seja, com maior concentração do elemento que a imagem representa.

Foram analisadas as várias possibilidades de escolha das imagens a utilizar para minimizar a influência da parafina na quantificação, discutidas na Subsecção 5.2.2, sendo numa primeira abordagem da utilização deste método preferível a escolha de imagens correspondentes à distribuição espacial de um único elemento químico nos mapeamentos realizados. Desta forma foi também possível testar a aplicabilidade do método utilizado.

5.1.6 Quantificação das Amostras

Uma vez determinada a matriz que melhor se adequa aos tecidos humanos, e as áreas de cada amostra em que a parafina exerce menor influência, procedeu-se à quantificação das amostras. Este processo foi realizado recorrendo ao método dos PF *standardless* pela utilização do *software* MQuant integrado no sistema M4 TORNADO. Na Figura 5.4 apresenta-se o painel de controlo do *software*, onde se pode observar o local onde é introduzida a informação correspondente à matriz utilizada para quantificação.

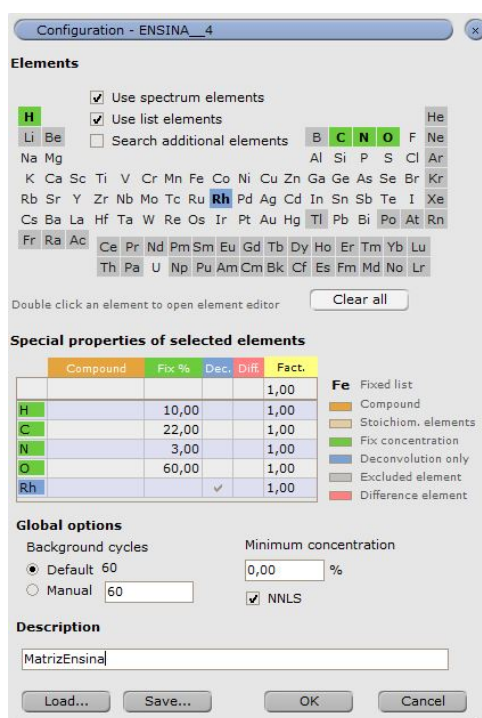


Figura 5.4: Painel de controlo do *software* MQuant, onde se introduz a informação da matriz utilizada.

Limites de Detecção e Quantificação

O Limite de Detecção (LD) é o valor mínimo de concentração de um elemento que permite que o mesmo seja detetado pelo sistema de medição. Este valor pode ser calculado com base nos valores certificados de CRMs e nos espetros obtidos com os mesmos, de acordo com a equação 5.1,

$$LD = \frac{3C_i\sqrt{N_b}}{N_p} \quad (5.1)$$

onde C_i representa a concentração do elemento i , N_b é o número de contagens correspondentes ao fundo e N_p o número de contagens correspondentes ao pico do elemento i [18,33].

Por sua vez, o Limite de Quantificação (LQ), definido como o valor mínimo de concentração de um determinado elemento para o qual pode ser realizada a quantificação, pode calcular-se como $LQ \approx 3 LD$ [63].

Dado que o CRM utilizado com um maior número de elementos com valores certificados é o Oyster Tissue SRM 1566 (Tabela 4.3), foi esse o escolhido para o cálculo dos referidos limites.

Na Tabela 5.1 estão apresentados os valores de *LD* e *LQ* para os elementos que apresentam concentrações mais elevadas no CRM Oyster Tissue SRM 1566.

Tabela 5.1: Limites de Detecção e Quantificação obtidos para o Oyster Tissue SRM 1566. A incerteza dos Limites de Detecção foi determinada como sendo o desvio em relação à média de 3 medições diferentes. A incerteza dos Limites de Quantificação foi calculada pela propagação das incertezas.

Elemento	Limite de Detecção/ $\mu\text{g g}^{-1}$	Limite de Quantificação/ $\mu\text{g g}^{-1}$
P	69 ± 2	207 ± 6
S	$27,3 \pm 0,2$	$81,8 \pm 0,6$
Cl	$18,3 \pm 0,1$	$55,0 \pm 0,2$
K	$5,4 \pm 0,1$	$16,1 \pm 0,2$
Ca	$3,0 \pm 0,3$	9 ± 1
Fe	$1,7 \pm 0,1$	$5,0 \pm 0,3$
Cu	$0,82 \pm 0,02$	$2,5 \pm 0,1$
Zn	$0,91 \pm 0,05$	$2,7 \pm 0,2$
Br	$2,2 \pm 0,2$	$6,6 \pm 0,5$

5.1.7 Análise Estatística

O *software* utilizado para análise estatística foi o OriginPro[®] 2016. Os valores obtidos para a concentração de cada um dos elementos nas amostras analisadas foram submetidos a um teste de normalidade, uma vez que é essencial para a análise estatística ter conhecimento do tipo de distribuição dos resultados que estão a ser tratados. De entre os diferentes testes disponíveis, optou-se pelo Shapiro-Wilk, por ser, de entre os mesmos, o teste de normalidade mais eficaz para populações estatísticas com ou sem distribuição normal e para qualquer tamanho amostral [64]. Pela utilização deste teste, foi possível verificar se os valores analisados estatisticamente apresentam uma distribuição normal ou não-normal.

Para a análise estatística, optou-se por realizar o mesmo teste não-paramétrico para todos os dados, agrupados por elemento. A vantagem dos testes não-paramétricos é que não requerem a normalidade das distribuições, tendo por isso menos restrições do que os testes paramétricos, e portanto mais aplicações. O teste escolhido foi o Kruskal-Wallis ANOVA, um teste não-paramétrico que tem como objetivo analisar a igualdade de medianas de conjuntos de dados diferentes. Neste caso, havendo apenas dois conjuntos de dados a comparar em cada teste, a hipótese nula (H_0) é que as medianas dos dois conjuntos amostrais são iguais, sendo a hipótese alternativa (H_a) que as mesmas são diferentes.

5.2 Resultados e Discussão

5.2.1 Bloco de Parafina

Para além das amostras com tecidos normais e tumorais do cólon e da mama, foi também analisado um bloco branco, contendo apenas parafina. No entanto, este bloco não pôde ser quantificado, uma vez que a MatrizEnsina foi determinada para quantificação de tecidos humanos e não de parafina. Sabe-se que este material é composto essencialmente por hidrocarbonetos, mas apesar disso não existe uma fórmula única para tais substâncias. Desta forma, torna-se difícil escolher uma matriz adequada para a quantificação do referido bloco, pelo que se optou por ter em conta apenas as intensidades dos elementos nos espetros.

Apesar de não ter sido possível quantificar a área analisada no bloco de parafina, pela observação dos espetros obtidos pode inferir-se que este material contém alguns elementos para além de hidrocarbonetos, com especial destaque para os elementos Ni, Cu e Zn. Como descrito na Subsecção 5.2.3, os mesmos também foram detetados nos blocos contendo tecido, sendo que os dois primeiros apresentam intensidades semelhantes às do espetro da parafina. Já o Zn tem uma intensidade notavelmente superior nos espetros das amostras de tecido.

Posto isto, é muito provável que as concentrações detetadas de Ni e Cu nos tecidos se devam à composição da parafina, uma vez que os mesmos estão completamente incluídos neste material. Quanto ao Zn, pelo facto do objetivo ser a comparação dos dois tipos de tecido (normal e tumoral), se ambos tiverem a mesma concentração deste elemento na parafina, o resultado não será alterado.

5.2.2 Escolha das Áreas a Quantificar

Devido à influência irregular da parafina nas amostras, foi necessário desenvolver uma metodologia para seleccionar as regiões de cada imagem onde o tecido está presente e a parafina tem a menor influência. Essa metodologia baseou-se na escolha de regiões onde o S estivesse em maior intensidade. Escolheu-se este elemento em detrimento de outros elementos pelas seguintes razões:

- P e Ca formam aglomerados num grande número de amostras tumorais, muito provavelmente pela presença de micro-calcificações em tecido necrótico (Figura 5.5);
- K não foi detetado em todas as amostras;
- Fe é um constituinte do sangue, pelo que está mais concentrado nos vasos sanguíneos (Figura 5.6);
- Ni, Cu e Zn aparentam ser também constituintes da parafina na qual as amostras estão incluídas, como descrito na Subsecção 5.2.1.

De seguida será explicado todo o processo realizado para a escolha das áreas a quantificar numa das amostras analisadas. Na Figura 5.7 é apresentada uma imagem de uma amostra tumoral da mama, bem como a seleção nessa mesma amostra da área mapeada pelo sistema M4 TORNADO. As áreas a quantificar estão em todos os casos contidas nesta seleção.

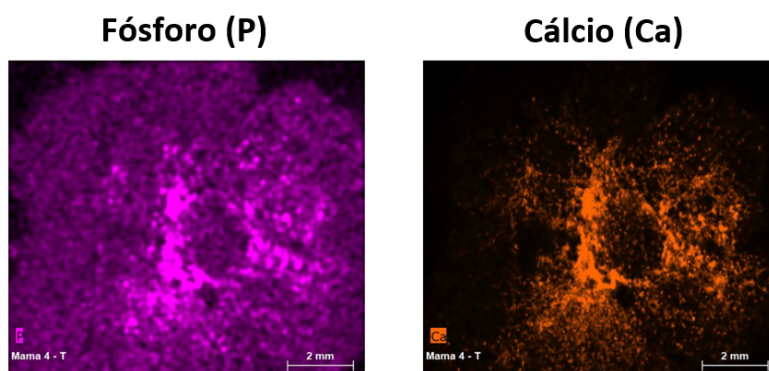


Figura 5.5: Aglomerados de P e de Ca na mesma amostra tumoral da mama. Estes aglomerados podem estar relacionados com a presença de tecido necrótico, o qual acumula estes elementos.

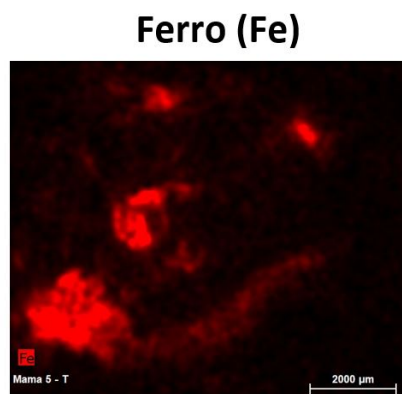


Figura 5.6: Distribuição do elemento Fe numa amostra tumoral da mama. Este tipo de distribuição aparenta estar relacionado com a presença deste elemento no sangue, pelo que tem uma maior concentração onde estão localizados vasos sanguíneos.

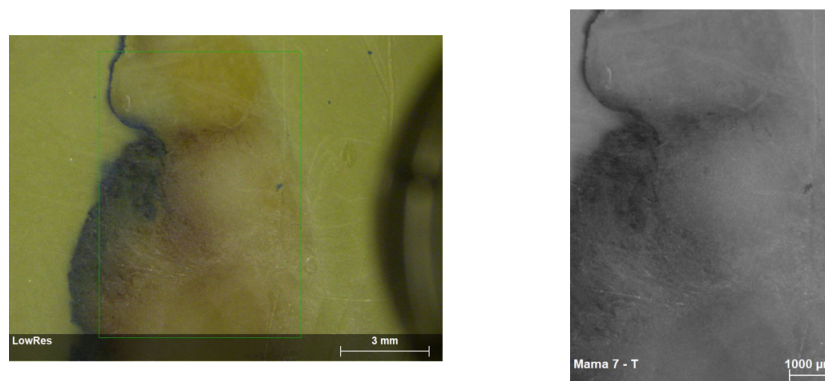


Figura 5.7: Amostra de um tumor da mama. À esquerda, uma imagem da amostra obtida com o sistema M4 TORNADO. À direita, a zona selecionada para análise por mapeamento.

Desta análise resulta um conjunto de imagens como a apresentada na Figura 5.8 à esquerda, correspondentes aos elementos presentes na amostra, das quais se escolheu para este fim a do elemento S, como já foi referido anteriormente.

A rotina desenvolvida em ambiente R procede então à divisão da imagem num número de pontos previamente definido, agrupando-os por cores e colocando-os num espaço a três dimensões, em que cada eixo representa o código R, G ou B de cada um desses pontos (Figura 5.8 à direita). Para este estudo, cada imagem foi dividida em 10 000 pontos.

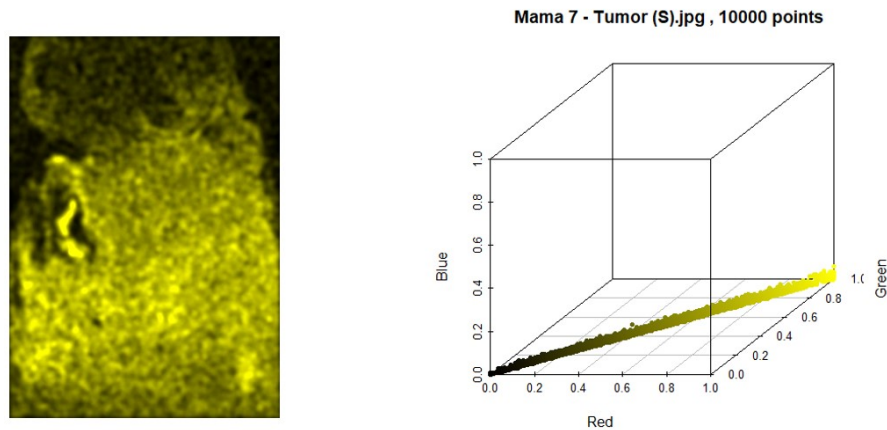


Figura 5.8: À esquerda, uma imagem correspondente ao elemento S, obtida pela realização de um mapeamento com o sistema M4 TORNADO numa amostra tumoral da mama. À direita, os 10 000 pontos dessa imagem, distribuídos pelo espaço das cores (imagem obtida pela utilização do ambiente R).

Posteriormente, estes pontos são agrupados em grupos de cores num número também determinado pelo utilizador. Cada grupo representa um conjunto de pontos cujos códigos RGB se encontram num determinado intervalo, e é representado pelos valores médios desses códigos, ou seja, por uma cor "intermédia" do conjunto das cores pelas quais é constituído, como se pode observar na Figura 5.9. Pelo facto do grande objetivo ser a determinação das regiões onde existe maior concentração do elemento (as regiões com cor mais intensa), optou-se por utilizar um número reduzido de grupos, neste caso 5, pois a divisão em mais grupos não iria revelar melhores resultados.

Na imagem da divisão por grupos, estes estão ordenados por frequência de ocorrência na imagem. Após esta divisão, é possível produzir uma tabela com os códigos RGB de cada um dos grupos de cores, bem como com a percentagem associada a cada uma dessas cores (Tabela 5.2).

Tabela 5.2: Códigos RGB que representam cada um dos grupos de cores da Figura 5.9, com as respetivas percentagens de ocorrência na mesma.

Cluster	R	G	B	%
1	0,34	0,33	0,00	18,0
2	0,84	0,84	0,01	10,6
3	0,15	0,14	0,00	24,4
4	0,51	0,51	0,00	23,4
5	0,67	0,67	0,00	23,6

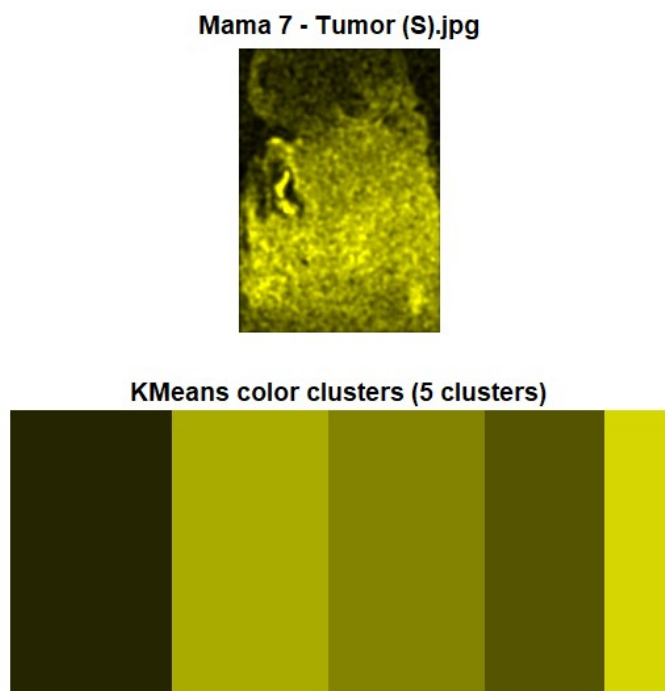


Figura 5.9: Em cima, uma imagem correspondente ao elemento S, obtida pela realização de um mapeamento com o sistema M4 TORNADO numa amostra tumoral da mama. Em baixo, divisão das cores dessa imagem em grupos, sendo que cada grupo está representado pela cor "intermédia" das cores que lhe pertencem (imagem obtida pela utilização do ambiente R).

Pela observação da tabela, segue-se a escolha de um dos grupos obtidos, com base na intensidade de cor dos mesmos. Sabe-se que nas imagens que resultam da realização dos mapeamentos, quanto mais intensa for a cor numa determinada região, maior será a concentração do elemento analisado nessa mesma região, uma vez que cada imagem contém várias tonalidades da mesma cor). A escolha faz-se pela observação da percentagem, tendo em conta a sua ordenação na imagem. Por exemplo, no caso apresentado, a cor de interesse será a última, pela que é a que apresenta uma percentagem inferior (assinalada na Tabela 5.2).

Após esta escolha da cor, existem duas formas de escolher as fronteiras das cores com maior interesse: pode-se optar por definir limites na forma retangular, ou desenhar uma "esfera" no espaço das cores com centro na tonalidade escolhida, e cujo volume depende do raio definido pelo utilizador. Por ser mais adequada para o fim em causa, escolheu-se a última opção, tendo sido definido para todas as imagens um raio de 0,25 para a esfera de cores. Esta escolha de raio deveu-se à sua aplicabilidade, uma vez que um raio de 0,2 não era o suficiente para incluir as cores mais intensas em algumas das imagens e um raio de 0,3 abrangia demasiadas cores menos intensas, resultando numa região demasiado alargada para a escolha das áreas, o que não estava em sintonia com o fim em causa.

Finalmente, pode-se proceder ao preenchimento da imagem inicial, destacando todos os pontos seleccionados com uma cor à escolha, sendo preferível que a mesma se destaque da restante imagem, como está representado na Figura 5.10.

Após todo este processo, torna-se possível então escolher as áreas a serem quantificadas com base na imagem final, num total de 3 por amostra.

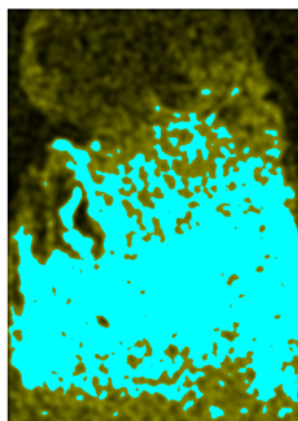


Figura 5.10: Imagem da distribuição do elemento S numa amostra tumoral da mama, preenchida pelo ambiente R, com a aplicação do método esférico.

As áreas foram então definidas no software MQuant, sendo o espectro soma resultante de cada uma quantificado pelo Método dos PF utilizando a matriz previamente escolhida. Na Figura 5.11 mostra-se a escolha das áreas após o processo descrito anteriormente.

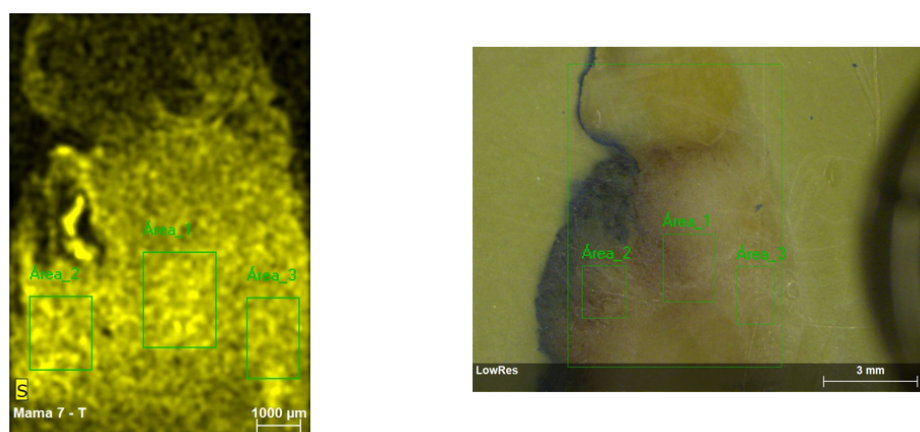


Figura 5.11: Escolha das áreas a quantificar, representadas na imagem do elemento S (à esquerda) e na imagem correspondente à amostra obtida pelo sistema M4 TORNADO (à direita).

Apesar de, no geral, o método escolhido ter facilitado bastante a escolha das áreas a quantificar, em algumas amostras a distribuição do elemento S mostrou ser mais dispersa. Uma destas distribuições é apresentada de seguida, a título de exemplo (Figura 5.12). Dado que, em certas amostras, a localização deste elemento não mostrava zonas bem definidas, a escolha das áreas por este método apresentava maior incerteza.

Durante a escolha das áreas, foi mais difícil localizar as zonas com maior quantidade de S na maioria das amostras da mama quando comparadas com as do cólon. Esta diferença deve-se possivelmente ao tipo de tecido que constitui maioritariamente os dois órgãos, sendo na mama o tecido adiposo, e no cólon o tecido conjuntivo e muscular.

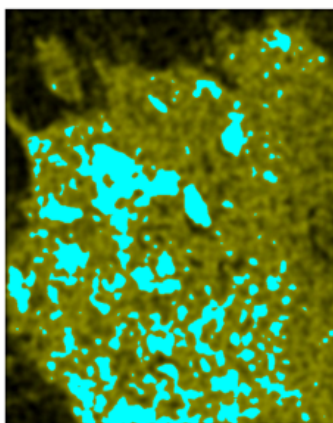


Figura 5.12: Imagem da distribuição do elemento S numa amostra tumoral da mama, preenchida pelo ambiente R, onde se evidencia a dispersão deste elemento pela amostra, o que dificulta a escolha das áreas a quantificar.

5.2.3 Quantificação das Amostras e Resultados Estatísticos

O principal objetivo desta dissertação é a comparação de tecidos humanos normais e tumorais, de forma a verificar se existem diferenças significativas na concentração de alguns elementos químicos entre estes dois tipos de tecidos, provenientes do mesmo conjunto de pacientes. Foram analisados tecidos pertencentes a dois órgãos diferentes, sendo os resultados apresentados de forma separada para cada um dos elementos, e o conjunto de todos os elementos para cada órgão estudado.

No caso do cólon, foram analisadas 20 pares normal-tumor de amostras. Pelo facto de uma das medições efetuadas ter revelado um erro no tubo de raios-X, esta amostra e o respetivo par foram excluídos da análise. Quanto à mama, o número de amostras analisado foi de 19 pares normal-tumor.

Depois de realizadas todas as medições e escolhidas as áreas a quantificar, procedeu-se à quantificação de todos os espectros correspondentes com a matriz escolhida no Capítulo 4. Apenas foram considerados os elementos com dados suficientes para análise estatística. As concentrações dos restantes elementos detetados, nomeadamente Cl e Br, encontravam-se abaixo dos limites de deteção num número significativo de amostras (mais de 50%), tendo por isso sido excluídos da análise estatística.

Para cada elemento num determinado órgão e tipo de tecido, foram construídos histogramas com a representação da frequência de cada intervalo de valores de concentração. Na Figura 5.13 são apresentados dois exemplos deste tipo de histogramas para o elemento P nas amostras do cólon. De acordo com o teste de normalidade efetuado (Shapiro-Wilk), e como também se pode verificar pela observação dos histogramas, os valores correspondentes ao tecido normal apresentam uma distribuição não-normal, enquanto o conjunto das concentrações do tecido tumoral tem uma distribuição normal. Esta diferença nas distribuições ocorre para vários elementos, não existindo no entanto um padrão para os vários conjuntos de valores, ou seja, existem casos em que ambas as distribuições são normais bem como casos em que as duas são não-normais. A existência de distribuições não-normais é a razão para a escolha do teste

não-paramétrico Kruskal-Wallis ANOVA para a análise estatística dos resultados.

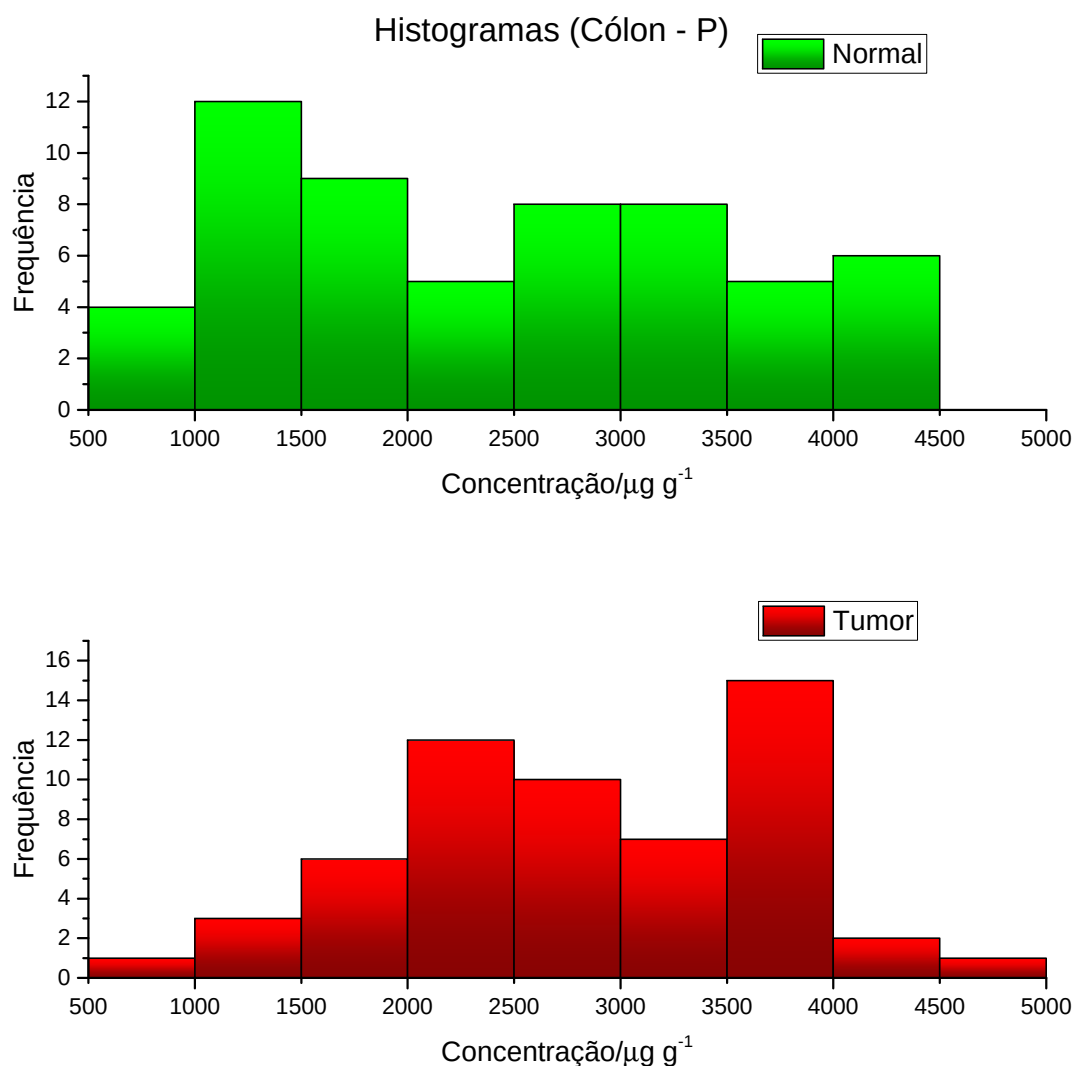


Figura 5.13: Histogramas com a representação do tipo de distribuição para o elemento P nas amostras do cólon. Nestes gráficos é possível observar o número de contagens de cada intervalo de valores de concentração, ou seja, a sua frequência de ocorrência.

As Figuras 5.14 a 5.29 mostram os diagramas de caixas com a comparação das concentrações dos elementos P, S, K, Ca, Fe, Ni, Cu e Zn nos tecidos normais e tumorais para cada órgão analisado.

Os resultados da aplicação do teste Kruskal-Wallis ANOVA estão presentes nas Tabelas 5.3 a 5.18 para todos os elementos considerados, nas quais são apresentados os valores mínimo e máximo de cada conjunto de dados, bem como a mediana. O teste estatístico utilizado compara este último valor para cada dois conjuntos de dados (normal *vs.* tumor), resultando um valor de p que, sendo inferior a 0,05 (valores assinalados a amarelo) significa que a diferença nos conjuntos de dados comparados é estatisticamente significativa. Existem ainda alguns casos em que este valor é mesmo inferior a 0,01, pelo que, nestes casos, a diferença pode ser considerada estatisticamente muito significativa. Para efeitos estatísticos, não foram considerados valores

inferiores a $1 \mu\text{g g}^{-1}$ por estarem sempre abaixo dos limites de quantificação (Tabela 5.1) nem os *outliers*.

Fósforo (P)

Nas Figuras 5.14 e 5.15 estão apresentados os diagramas de caixas contendo os resultados obtidos com a quantificação das amostras do cólon e da mama, respectivamente, para o elemento P. Por sua vez, as Tabelas 5.3 e 5.4 contêm, para cada caso correspondente, o resultado da aplicação do teste estatístico utilizado.

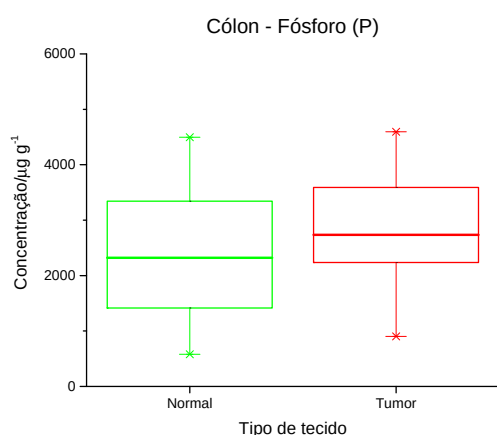


Tabela 5.3: Resultados estatísticos obtidos para o elemento P no cólon.

Cólon - P	Concentração/ $\mu\text{g g}^{-1}$			<i>p</i>
	Mín.	Mediana	Máx.	
Normal (<i>N</i> = 57)	581	2323	4495	< 0,05
Tumor (<i>N</i> = 57)	904	2736	4594	

Figura 5.14: Diagrama de caixas correspondente ao elemento P no cólon.

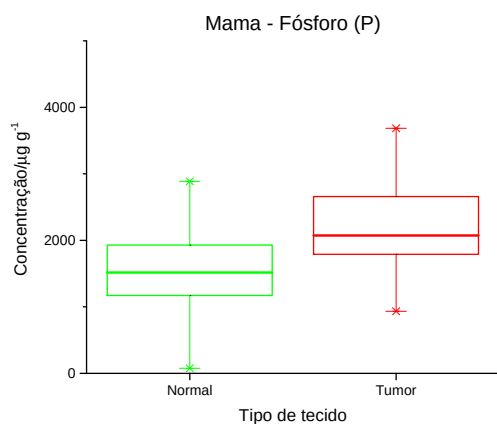


Tabela 5.4: Resultados estatísticos obtidos para o elemento P na mama.

Mama - P	Concentração/ $\mu\text{g g}^{-1}$			<i>p</i>
	Mín.	Mediana	Máx.	
Normal (<i>N</i> = 54)	77	1515	2888	< 0,01
Tumor (<i>N</i> = 55)	933	2072	3686	

Figura 5.15: Diagrama de caixas correspondente ao elemento P na mama.

A distribuição das concentrações deste elemento no tecido normal do cólon é mais ampla, observando-se por isso no diagrama correspondente um intervalo interquartil de maior amplitude do que no tecido tumoral. Já nas distribuições da mama, este intervalo não tem uma diferença tão acentuada, apesar de no diagrama correspondente a este órgão se observar uma diferença mais significativa no conjunto dos valores de concentração entre os dois tipos de tecido. Esta observação é corroborada pelo teste estatístico, o qual demonstra que existe uma di-

ferença estatisticamente significativa entre tecidos normais e tumorais tanto do cólon como da mama, mas que a mesma é mais proeminente no segundo órgão ($p < 0,05$ no cólon *vs.* $p < 0,01$ na mama). Em ambos os casos, o tecido tumoral apresenta valores nitidamente superiores aos do tecido normal.

No estudo realizado por Magalhães *et al.* [33] é possível observar resultados da mesma ordem de grandeza para este elemento no cólon, sendo que o aumento nos tecidos tumorais deste órgão é mais significativo no estudo referido. Relativamente à mama, Olaiya *et al.* [42] obtiveram valores semelhantes no tecido tumoral, embora o tecido normal tenha apresentado concentrações muito inferiores. Apesar desta diferença, o aumento no tecido neoplásico em comparação com o tecido normal é corroborado pelo referido estudo.

O P é um elemento que, em conjunto com o Ca, forma aglomerados de hidroxiapatite em algumas amostras, característicos de tecido necrótico e designados por micro-calcificações. Estas formações são típicas em tumores cancerígenos, especialmente na mama. Os resultados obtidos estão de acordo com a presença das mesmas em tecido tumoral da mama, mas também do cólon, embora em menor grau. No entanto, pelo facto de estes aglomerados se encontrarem dispersos pelo tecido e de este elemento não ter sido tido em conta na escolha das áreas a quantificar, a sua presença nestas formações pode ter influenciado os resultados obtidos. Sendo o objetivo a medição da concentração deste elemento no tecido, a possível escolha de áreas contendo micro-calcificações terá como consequência o aumento do valor medido, não representando o valor real no conjunto da amostra. No entanto, estando estes aglomerados presentes em quantidades significativas no tecido tumoral, o P poderá ser um bom elemento para distinção entre os dois tipos de tecido.

Enxofre (S)

As Figuras 5.16 e 5.17 mostram os diagramas de caixas que revelam os resultados obtidos com a quantificação das amostras do cólon e da mama, respetivamente, para o elemento S. Nas Tabelas 5.5 e 5.6 são apresentados, para cada caso correspondente, os resultado da aplicação do teste estatístico Kruskal-Wallis ANOVA.

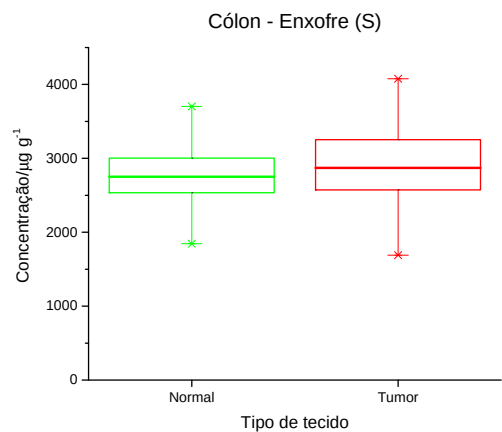


Tabela 5.5: Resultados estatísticos obtidos para o elemento S no cólon.

Cólon - S	Concentração/ $\mu\text{g g}^{-1}$			p
	Mín.	Mediana	Máx.	
Normal ($N = 55$)	1846	2752	3703	0,14
Tumor ($N = 57$)	1689	2872	4079	

Figura 5.16: Diagrama de caixas correspondente ao elemento S no cólon.

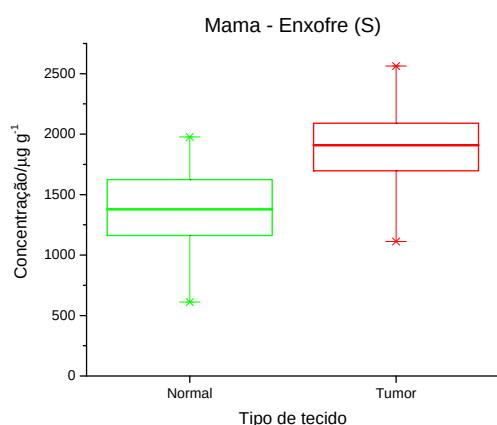


Tabela 5.6: Resultados estatísticos obtidos para o elemento S na mama.

Mama - S	Concentração/ $\mu\text{g g}^{-1}$			p
	Mín.	Mediana	Máx.	
Normal ($N = 57$)	612	1378	1977	< 0,01
Tumor ($N = 55$)	1113	1908	2563	

Figura 5.17: Diagrama de caixas correspondente ao elemento S na mama.

Nos diagramas do S, nota-se que para o cólon as duas caixas encontram-se a par, tendo no entanto uma maior dispersão dos valores de concentração no tecido tumoral. Pelo contrário, no caso da mama o conjunto das concentrações medidas está notoriamente acima das do tecido normal. Mais uma vez, estas observações são refletidas pelo teste estatístico, o qual não revela diferenças significativas nos tecidos do cólon mas quando se analisam os resultados referentes ao tecido mamário, esta diferença é bastante notória, apresentando concentrações mais elevadas nos tecidos com neoplasia.

Quanto aos tecidos do cólon, Magalhães *et al.* [33] observaram um aumento significativo deste elemento em tecidos tumorais quando comparados com tecidos normais do mesmo órgão, pelo que o presente estudo não corrobora estes resultados. Em relação ao tecido mamário, Magalhães *et al.* [33] e Olaiya *et al.* [42] chegaram à conclusão que existe uma maior concentração de S nos tecidos tumorais deste órgão, o que também se verifica nos resultados obtidos neste trabalho.

Potássio (K)

Nas Figuras 5.18 e 5.19 são apresentadas os diagramas de caixas com as distribuições das concentrações obtidas para as amostras do cólon e da mama, respetivamente, para o elemento K. As Tabelas 5.7 e 5.8 mostram em cada caso os resultados da aplicação do teste estatístico Kruskal-Wallis ANOVA.

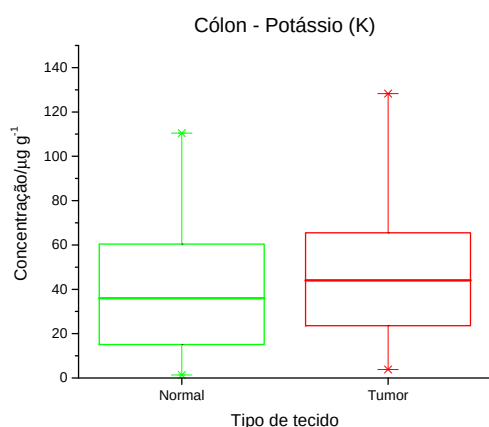


Tabela 5.7: Resultados estatísticos obtidos para o elemento K no cólon.

Cólon - K	Concentração/ $\mu\text{g g}^{-1}$			p
	Mín.	Mediana	Máx.	
Normal ($N = 43$)	1	36	110	0,27
Tumor ($N = 43$)	4	44	128	

Figura 5.18: Diagrama de caixas correspondente ao elemento K no cólon.

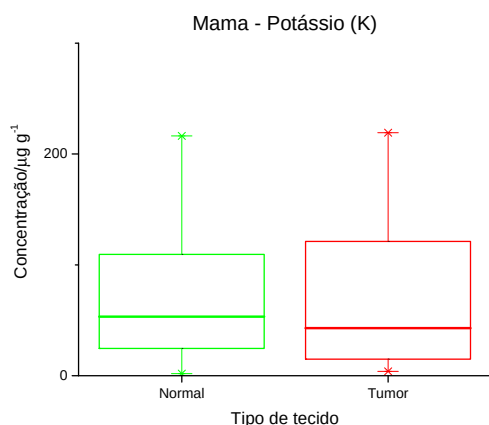


Tabela 5.8: Resultados estatísticos obtidos para o elemento K na mama.

Mama - K	Concentração/ $\mu\text{g g}^{-1}$			p
	Mín.	Mediana	Máx.	
Normal ($N = 36$)	2	53	216	0,79
Tumor ($N = 50$)	4	43	219	

Figura 5.19: Diagrama de caixas correspondente ao elemento K na mama.

O elemento K não foi detetado em todas as amostras analisadas, facto que se reflete no tamanho amostral dos resultados submetidos ao teste estatístico. Ainda assim, optou-se por incluir este elemento na análise dos resultados, uma vez que o número de amostras nas quais o mesmo se encontrava em quantidades suficientes para quantificação era bastante considerável. De qualquer forma, surgiram valores mínimos bastante reduzidos, o que altera substancialmente as medianas dos conjuntos de valores.

Pode-se inferir dos resultados obtidos que a concentração deste elemento não varia significativamente entre tecidos normais e tumorais tanto do cólon como da mama. No entanto, tendo em conta a dificuldade na deteção do mesmo nalgumas amostras, não é possível tirar conclusões definitivas sobre a possibilidade da sua utilização para distinção entre tecidos normais e tumorais de qualquer um destes órgãos.

Quando comparados estes resultados com os da literatura revista, presentes nas Tabelas 2.1 e 2.2, para as concentrações quer em tecidos normais quer em tecidos tumorais dos mesmos órgãos, verifica-se uma grande diferença, sendo os resultados desses estudos bastante superiores

aos obtidos na presente dissertação. Este facto demonstra que pode ter existido alguma dificuldade na deteção deste elemento pelo método utilizado ou que não pode ser possível comparar os valores obtidos com este tipo de amostra (tecido incluído em parafina) com os obtidos nos outros estudos com a utilização de amostras diferentes (tecido fresco, liofilizado ou digerido).

Cálcio (Ca)

As Figuras 5.20 e 5.21 representam os diagramas de caixas com os resultados obtidos para as amostras do cólon e da mama, respetivamente, para o elemento Ca. As Tabelas 5.9 e 5.10 apresentam os resultados da aplicação do teste estatístico Kruskal-Wallis ANOVA, correspondendo a primeira às amostras do cólon e a segunda às da mama.

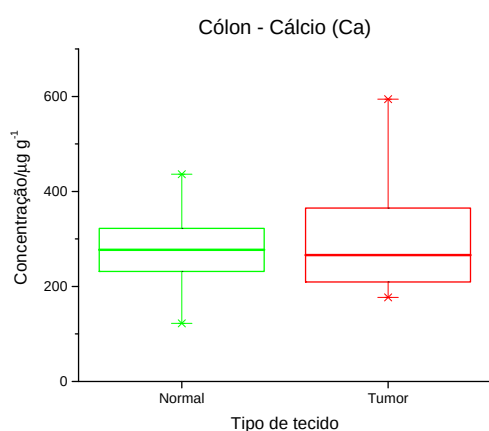


Tabela 5.9: Resultados estatísticos obtidos para o elemento Ca no cólon.

Cólon - Ca	Concentração/µg g ⁻¹			p
	Mín.	Mediana	Máx.	
Normal (N = 53)	122	277	437	0,82
Tumor (N = 47)	177	266	594	

Figura 5.20: Diagrama de caixas correspondente ao elemento Ca no cólon.

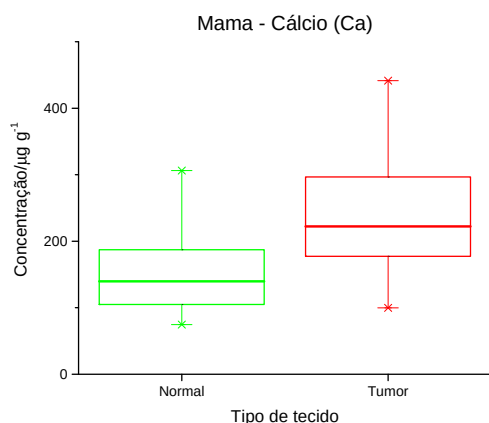


Tabela 5.10: Resultados estatísticos obtidos para o elemento Ca na mama.

Mama - Ca	Concentração/µg g ⁻¹			p
	Mín.	Mediana	Máx.	
Normal (N = 47)	75	140	306	< 0,01
Tumor (N = 46)	100	222	441	

Figura 5.21: Diagrama de caixas correspondente ao elemento Ca na mama.

Em ambos os diagramas, existe nitidamente uma maior dispersão das concentrações de Ca no tecido tumoral quando comparadas com as do tecido normal dos dois órgãos analisados. No entanto, apenas se observam diferenças estatisticamente significativas nos tecidos da mama, estando presente em concentrações significativamente superiores no tecido tumoral.

Como já foi referido aquando da análise dos resultados do P, o Ca é conhecido por formar aglomerados (micro-calcificações), principalmente em tecidos necróticos. Quando as neoplasias se encontram numa fase mais avançada, ocorre necrose dos tecidos, pelo que a presença deste elemento nos tecidos tumorais deve-se muito provavelmente à existência deste tipo de formações. Uma vez que existem mais evidências da presença das mesmas em tecidos neoplásicos da mama, os resultados obtidos estão em completa concordância com este facto. Ao contrário do que se verificou no P, o cólon não apresenta diferenças significativas para o Ca nos dois tipos de tecido.

Como no caso do P, a escolha das áreas pode ter influenciado os valores de concentração obtidos para o Ca, não representando o valor real de concentração na totalidade da amostra.

Nos estudos presentes na literatura obtidos por Drake e Sky-Peck [31], Magalhães *et al.* [33] e Silva *et al.* [10], as concentrações deste elemento são geralmente mais elevadas. No entanto, é de notar que os mesmos se observam em tecido liofilizado, pelo que se justifica o facto de serem observadas concentrações superiores.

Ferro (Fe)

Nas Figuras 5.22 e 5.23 estão representados os diagramas de caixas com as concentrações obtidas para as amostras do cólon e da mama, respetivamente, para o elemento Fe. Nas Tabelas 5.11 e 5.12 observam-se os resultados da aplicação do teste estatístico utilizado para este elemento nas amostras do cólon e da mama, respetivamente.

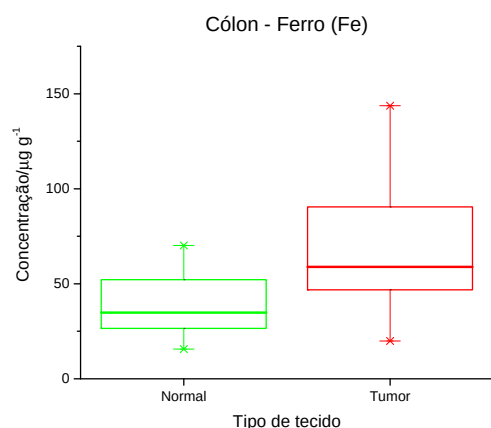


Tabela 5.11: Resultados estatísticos obtidos para o elemento Fe no cólon.

Cólon - Fe	Concentração/ $\mu\text{g g}^{-1}$			p
	Mín.	Mediana	Máx.	
Normal ($N = 43$)	16	35	70	< 0,01
Tumor ($N = 50$)	20	59	144	

Figura 5.22: Diagrama de caixas correspondente ao elemento Fe no cólon.

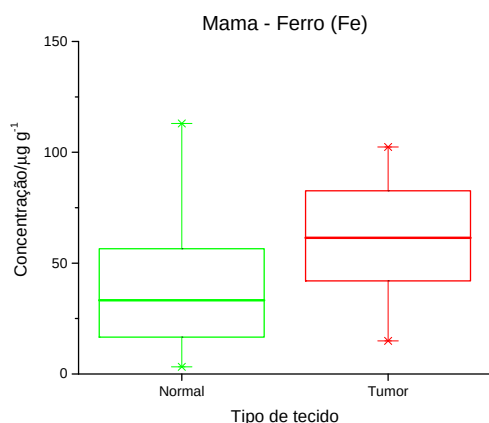


Tabela 5.12: Resultados estatísticos obtidos para o elemento Fe na mama.

Mama - Fe	Concentração/ $\mu\text{g g}^{-1}$			p
	Mín.	Mediana	Máx.	
Normal ($N = 47$)	3	33	113	< 0,01
Tumor ($N = 47$)	15	61	102	

Figura 5.23: Diagrama de caixas correspondente ao elemento Fe na mama.

Pela observação dos diagramas, conclui-se que existe uma menor dispersão dos valores de concentração medidos para o Fe no tecido normal do cólon quando comparada com a do tecido tumoral do mesmo órgão. Já na mama, as dispersões são mais semelhantes.

No que diz respeito à comparação das concentrações deste elemento nos dois tipos de tecido, a situação é idêntica para os dois órgãos analisados: existem diferenças muito significativas ($p < 0,01$) entre os tecidos normais e tumorais, verificando-se a existência de concentrações mais elevadas nos últimos.

Estes resultados podem ser justificados pelo facto do Fe ser um constituinte do sangue, estando por isso presente nos vasos sanguíneos. Sabe-se que o tecido tumoral apresenta em muitos casos microvascularizações, pelo que o facto da sua concentração ser mais elevada neste tipo de tecido está de acordo com esta evidência.

No entanto, este resultado difere de outros estudos. Mulay *et al.* [28], Drake e Sky-Peck [31] e Magalhães *et al.* [33] encontraram concentrações deste elemento superiores em tecido normal quando comparadas com o tecido tumoral do mesmo órgão.

Níquel (Ni)

As Figuras 5.24 e 5.25 apresentam a distribuição dos resultados obtidos para o elemento Ni com as várias amostras do cólon e da mama, respetivamente. Nas Tabelas 5.13 e 5.14 encontram-se os valores resultantes da aplicação do teste estatístico Kruskal-Wallis ANOVA.

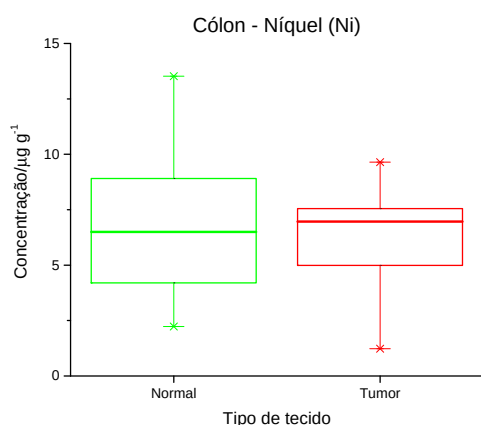


Tabela 5.13: Resultados estatísticos obtidos para o elemento Ni no cólon.

Cólon - Ni	Concentração/ $\mu\text{g g}^{-1}$			<i>p</i>
	Mín.	Mediana	Máx.	
Normal (<i>N</i> = 52)	2	6	14	0,55
Tumor (<i>N</i> = 52)	1	7	10	

Figura 5.24: Diagrama de caixas correspondente ao elemento Ni no cólon.

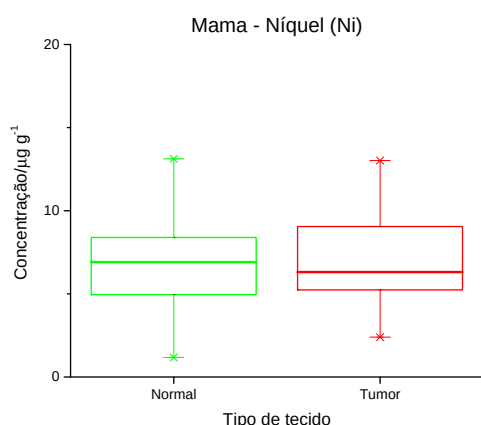


Tabela 5.14: Resultados estatísticos obtidos para o elemento Ni na mama.

Mama - Ni	Concentração/ $\mu\text{g g}^{-1}$			<i>p</i>
	Mín.	Mediana	Máx.	
Normal (<i>N</i> = 48)	1	7	13	0,93
Tumor (<i>N</i> = 57)	2	6	13	

Figura 5.25: Diagrama de caixas correspondente ao elemento Ni na mama.

Pela observação dos diagramas pode-se concluir que não existe variação significativa entre os tecidos normais e tumorais em nenhum dos órgãos. Os resultados obtidos para o Ni estão em todos os casos dentro dos mesmos valores (6 a $7 \mu\text{g g}^{-1}$). Este facto deve-se muito provavelmente à constituição da parafina, como referido na Subsecção 5.2.1, sendo os valores detetados demasiado elevados para se poder dizer que pertencem aos tecidos. Este facto pode ser corroborado pela observação das Tabelas 2.1 e 2.2, nas quais os valores deste elemento nunca são superiores a $3 \mu\text{g g}^{-1}$ em amostras de tecido liofilizado, não sendo o mesmo detetado em estudos que utilizam amostras de tecido fresco. Desta forma, pela comparação com os estudos efetuados por outros autores, pode afirmar-se que as concentrações de Ni nos tecidos do cólon e da mama são bastante inferiores às detetadas no decorrer desta dissertação, o que permite concluir que os valores detetados se devem à presença deste elemento na parafina que constitui os blocos.

Cobre (Cu)

Nas Figuras 5.26 e 5.27 estão apresentadas as distribuições dos resultados obtidos para o Cu com as várias amostras do cólon e da mama, respetivamente. As Tabelas 5.15 e 5.16 mostram os valores resultantes da aplicação do teste estatístico Kruskal-Wallis ANOVA.

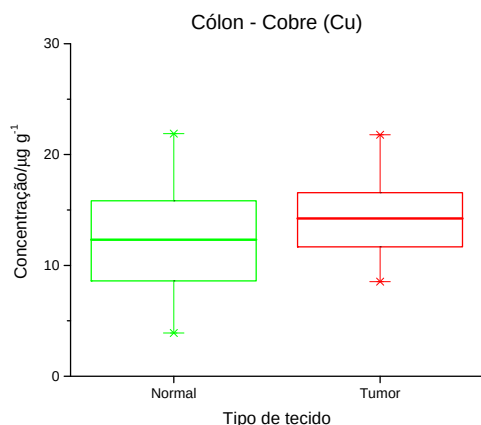


Tabela 5.15: Resultados estatísticos obtidos para o elemento Cu no cólon.

Cólon - Cu	Concentração/ $\mu\text{g g}^{-1}$			<i>p</i>
	Mín.	Mediana	Máx.	
Normal (<i>N</i> = 57)	4	12	22	< 0,05
Tumor (<i>N</i> = 53)	9	14	22	

Figura 5.26: Diagrama de caixas correspondente ao elemento Cu no cólon.

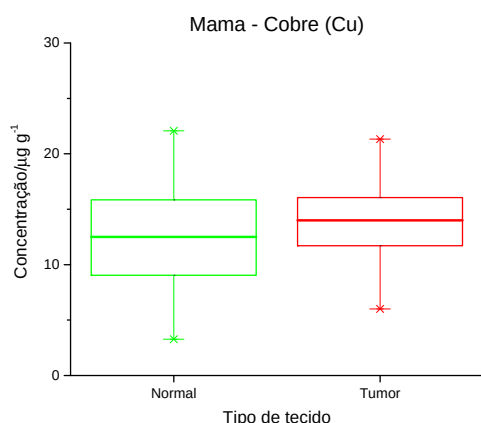


Tabela 5.16: Resultados estatísticos obtidos para o elemento Cu na mama.

Mama - Cu	Concentração/ $\mu\text{g g}^{-1}$			<i>p</i>
	Mín.	Mediana	Máx.	
Normal (<i>N</i> = 49)	3	13	22	< 0,05
Tumor (<i>N</i> = 55)	6	14	21	

Figura 5.27: Diagrama de caixas correspondente ao elemento Cu na mama.

Apesar dos valores das medianas em ambos os casos serem bastante próximos, observa-se uma diferença significativa entre tecidos normais e tumorais nos dois órgãos, sendo a sua concentração mais elevada nos tecidos neoplásicos. Pela observação dos valores mínimo e máximo em cada conjunto de resultados, pode-se concluir que existem valores muito próximos nos dois órgãos analisados. Como foi referido na Subsecção 5.2.1, o Cu é um elemento que aparece nos espectros do bloco de parafina. Ainda que não tenha sido quantificado neste material pela ausência de uma matriz adequada, os picos deste elemento no espectro têm intensidade semelhante à medida nas amostras de tecido. Como tal, é muito provável que a sua presença se deva à constituição da parafina, pelo que a partir destes resultados não é possível concluir que o Cu possa ser utilizado para a distinção dos dois tipos de tecido.

Zinco (Zn)

Nas Figuras 5.28 e 5.29 estão apresentadas as distribuições dos resultados obtidos para a quantificação do elemento Zn nas amostras do cólon e da mama, respetivamente. As Tabelas 5.17 e 5.18 apresentam os valores resultantes da aplicação do teste estatístico Kruskal-Wallis ANOVA aos valores obtidos para o referido elemento.

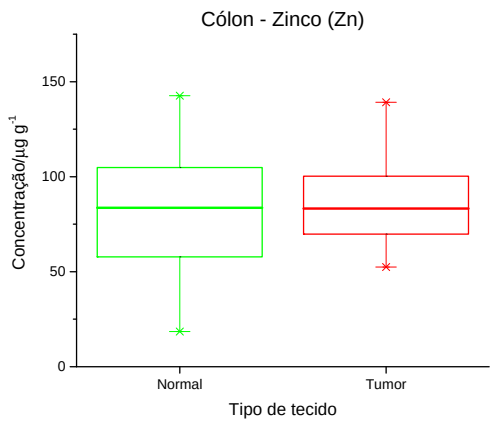


Tabela 5.17: Resultados estatísticos obtidos para o elemento Zn no cólon.

Cólon - Zn	Concentração/ $\mu\text{g g}^{-1}$			<i>p</i>
	Mín.	Mediana	Máx.	
Normal (<i>N</i> = 57)	19	84	143	0,82
Tumor (<i>N</i> = 55)	52	83	139	

Figura 5.28: Diagrama de caixas correspondente ao elemento Zn no cólon.

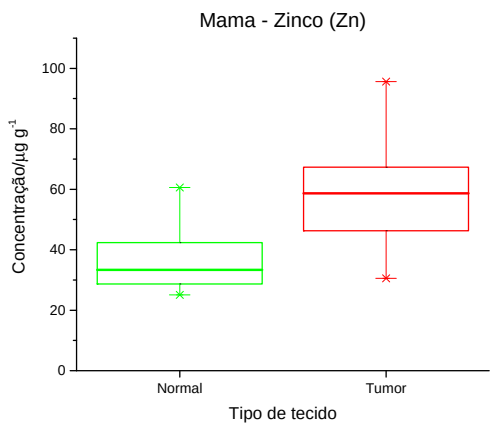


Tabela 5.18: Resultados estatísticos obtidos para o elemento Zn na mama.

Mama - Zn	Concentração/ $\mu\text{g g}^{-1}$			<i>p</i>
	Mín.	Mediana	Máx.	
Normal (<i>N</i> = 56)	25	33	61	< 0,01
Tumor (<i>N</i> = 57)	31	59	96	

Figura 5.29: Diagrama de caixas correspondente ao elemento Zn na mama.

No cólon, a distribuição de concentrações do Zn é mais ampla no tecido normal do que no tumoral. Apesar disso, não existem diferenças significativas entre os dois conjuntos de valores, sendo as medianas praticamente iguais. Em relação ao tecido mamário, verifica-se a situação inversa, havendo uma maior dispersão das concentrações no tecido tumoral, e apresentando este elemento diferenças muito significativas entre os dois tipos de tecido, sendo a sua concentração mais elevada observada no tecido com neoplasia.

Estes resultados estão em concordância com os presentes na literatura para a mama [10, 29,31,33,37–42]. Quanto ao cólon, existem resultados um pouco contraditórios. Por exemplo, Drake e Sky-Peck [31] e Majewska *et al.* [29] encontraram um aumento deste elemento em

tecidos tumorais deste órgão, enquanto Magalhães *et al.* [33] não encontraram diferenças significativas nas concentrações de Zn em tecidos normais e tumorais.

Pensa-se que o Zn é um elemento com propriedades que podem ser consideradas anti-carcinogénicas, devendo portanto estar presente em maiores concentrações em tecido normal, sendo que os resultados obtidos não corroboram esta observação. Ainda assim, há que ter em conta a presença deste elemento na parafina, o que pode ter influenciado os resultados obtidos, embora por ser considerada apenas a comparação entre os dois tipos de tecido a influência deste material seja semelhante em todas as amostras analisadas.

5.2.4 Cólon

Na Figura 5.30 estão representadas as concentrações para todos os elementos estudados em tecidos normais e tumorais do cólon. As incertezas apresentadas no gráfico foram calculadas através do desvio mediano absoluto, que corresponde à mediana dos desvios absolutos em relação à mediana do conjunto amostral [65].

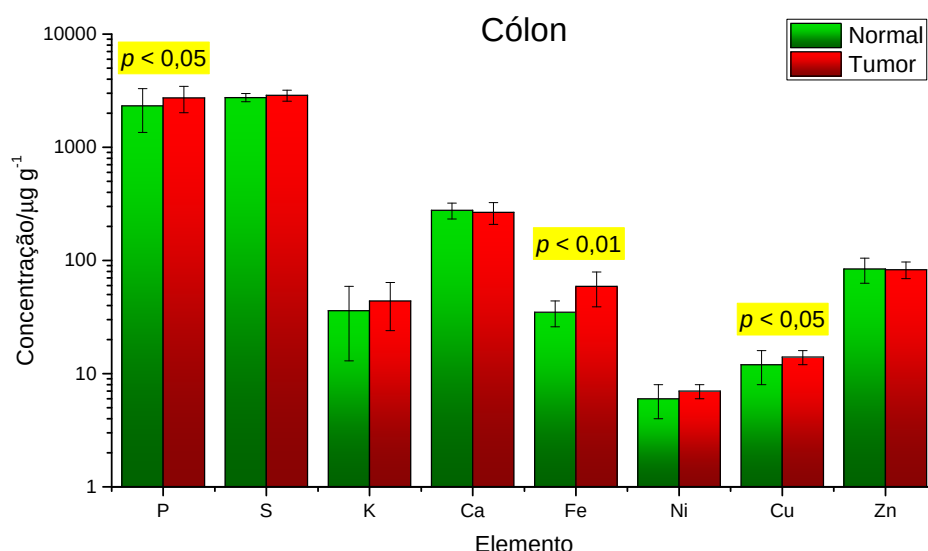


Figura 5.30: Gráfico com a representação das concentrações dos vários elementos estudados para o cólon nas amostras de tecido normal e tumoral. A amarelo estão assinalados os elementos cuja diferença entre os dois tipos de tecido é estatisticamente significativa.

É possível observar que as concentrações de P, Fe e Cu estão significativamente mais elevadas nos tecidos com patologia deste órgão, com especial destaque para o Fe, que apresenta um valor de p inferior.

Relativamente aos elementos P e Cu, estes resultados estão de acordo com os estudos realizados por Magalhães *et al.* [33,34], nos quais os mesmos apresentam concentrações superiores em tecidos do cólon com neoplasia. Apesar dos valores não serem semelhantes, encontram-se dentro da ordem de grandeza das medições efetuadas. É preciso ter em consideração que o Cu é um dos elementos presentes na parafina, material esse que não foi utilizado nas amostras dos estudos referidos, pelo que, para efeitos de conclusão da presente dissertação, este elemento

não deve ser considerado como relevante na distinção entre tecidos normais e tumorais.

Quanto ao Fe, não existem estudos que corroborem estes resultados. De facto, alguns estudos [28, 31, 33] até encontraram concentrações deste elemento superiores em tecido normal quando comparada com o tecido tumoral do mesmo órgão. Por não existir informação suficiente sobre os diferentes estádios de evolução dos tumores, não é possível comparar este resultado com o de outros estudos.

Como referido na discussão dos resultados do elemento P, apesar da presença do mesmo nas micro-calcificações poder ter influenciado os resultados através da escolha das áreas, este poderá ser considerado um possível biomarcador tumoral do cólon com base nos resultados deste estudo, apesar da diferença encontrada entre tecidos normais e tumorais não ser estatisticamente muito significativa, com um $p < 0,05$. Quanto ao Fe, pelo facto das diferenças encontradas relativamente a outros estudos serem contraditórias com a presente dissertação, será necessária a obtenção de mais resultados com um maior conjunto de amostras deste órgão. Já o Cu, pelas razões referidas, deve ser descartado como biomarcador em amostras com este tipo de parafina. Quanto aos restantes elementos, não se observaram diferenças significativas.

5.2.5 Mama

A Figura 5.31 mostra um gráfico com a comparação dos valores de concentração de todos os elementos avaliados neste estudo entre tecidos normais e tumorais da mama. A incerteza foi calculada como descrito na Subsecção 5.2.4.

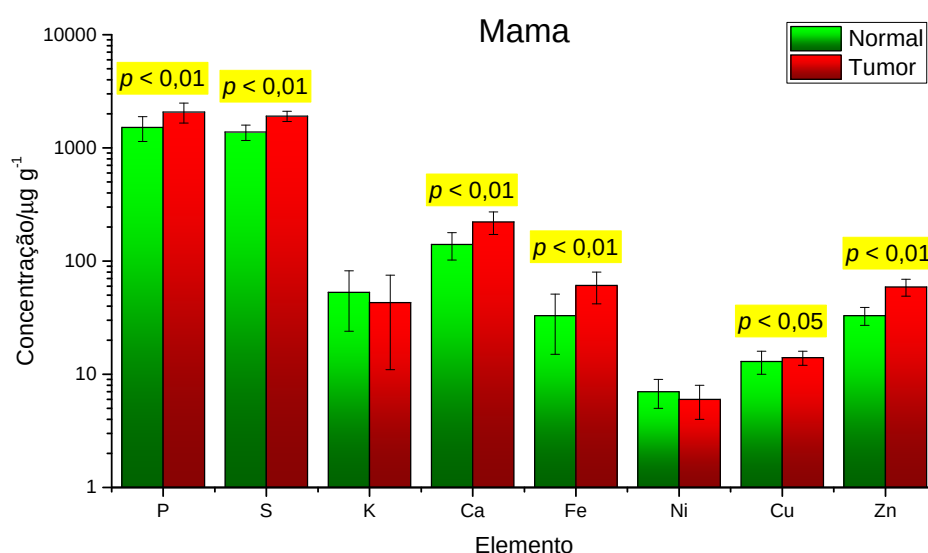


Figura 5.31: Gráfico com a representação das concentrações dos vários elementos estudados para a mama nas amostras de tecido normal e tumoral. A amarelo estão assinalados os elementos cuja diferença entre os dois tipos de tecido é estatisticamente significativa.

Neste caso, os elementos que apresentaram concentrações significativamente mais elevadas nos tumores foram P, S, Ca, Fe, Cu e Zn, sendo que o Cu teve um aumento menos significativo do que os restantes elementos referidos.

Sobre os elementos P e Ca já foi amplamente referida a circunstância de serem constituintes das micro-calcificações, formações típicas dos tecidos neoplásicos da mama. Os resultados obtidos para estes elementos corroboram por completo esta evidência. Dado estarem presentes em concentrações superiores nos tecidos tumorais, tal como concluído na presente dissertação e em vários outros estudos para o P [42] e em particular para o Ca [10, 31, 33, 37, 40, 41], estes elementos serão possíveis biomarcadores tumorais deste órgão.

Em relação ao S, tal como se verificou nos estudos [33, 42], os resultados obtidos nesta dissertação permitem chegar a conclusões idênticas quanto à sua utilidade para distinguir entre tecidos tumorais e normais da mama, tornando-se desta forma um biomarcador adequado para este fim.

Relativamente ao Fe, ao contrário do que se verificou no órgão analisado anteriormente, os resultados obtidos vão no mesmo sentido de outros já realizados [10, 29, 31, 33, 37–42], pelo que pode igualmente ser um possível biomarcador tumoral deste órgão.

O Zn, apesar de presente na composição da parafina utilizada, apresenta o mesmo tipo de comportamento que evidenciam os resultados dos estudos já referidos [10, 29, 31, 33, 37–42]. No entanto os valores retirados desses estudos são geralmente inferiores para os que utilizaram amostras de tecido fresco. Tal facto pode dever-se à presença do Zn na parafina utilizada nas amostras do presente estudo, o que explica os resultados obtidos. Apesar disto, e tendo em conta que o mais importante é a comparação das concentrações nos dois tipos de tecido, este elemento poderá ser considerado também um biomarcador adequado para sinalizar carcinomas da mama.

Como já foi discutido na Secção referente ao Cu, e nos resultados do cólon, este elemento não deve ser considerado como potencial biomarcador para amostras com este tipo de parafina, seja qual for o tecido/órgão analisado.

Os elementos K e Ni não apresentaram diferenças significativas que permitissem avaliar a sua possível utilidade como biomarcadores tumorais deste órgão.

Capítulo 6

Conclusões

O processo de determinação da matriz mais adequada é o principal obstáculo na quantificação de amostras por EDXRF, pois trata-se de um elemento essencial na análise quantitativa das amostras pelo método utilizado. No entanto, com a realização deste trabalho e determinação de uma matriz (10% H, 22% C, 3% N and 60% O) que reproduz com uma incerteza aceitável (inferior a 25%) Materiais de Referência Certificados de tecidos biológicos, foi possível utilizar o *software* do sistema de μ -XRF para realização de um estudo quantitativo de amostras de tecido humano, sendo um primeiro passo promissor neste tipo de estudo. Por ter sido validado com um método de quantificação alternativo e confiável (método dos padrões externos), mostra potencialidades para a sua utilização em estudos posteriores.

A matriz determinada foi então utilizada em amostras de tecido humano incluídas em parafina para a quantificação de elementos minoritários e traço presentes nas mesmas. Embora exista um parâmetro adicional de incerteza – a influência da parafina – a aplicação da mesma permitiu comparar tecidos normais e tumorais dos mesmos pacientes. Apesar de levantar alguns obstáculos na escolha das áreas a quantificar, a utilização de amostras incluídas em parafina abre muitas portas na obtenção de um grande número de amostras, pelo facto das mesmas se encontrarem presentes em praticamente todos os centros hospitalares. Este estudo utilizou um número bastante significativo de amostras pareadas do cólon e da mama quando comparado com a generalidade dos estudos realizados anteriormente.

Já a rotina utilizada em ambiente R permitiu fazer uma primeira abordagem interessante ao tratamento de imagens obtidas pela realização de mapeamentos no sistema M4 TORNADO, tendo-se obtido bons resultados com este tipo de abordagem, pelo que a sua utilização futura é promissora.

Relativamente ao cólon, pode-se concluir dos resultados obtidos que o P e o Fe poderão ser utilizados como biomarcadores tumorais deste órgão. Já na mama, podem considerar-se como possíveis biomarcadores tumorais os elementos P, S, Ca, Fe e Zn. Apesar de, em ambos os órgãos o Cu também se ter mostrado estatisticamente significativo na distinção dos dois tipos de tecido, o facto de aparecer no espectro da parafina com intensidades semelhantes às dos espectros dos tecidos impede a sua consideração como possível biomarcador destes tipos de neoplasia, já que a sua origem é incerta.

6.1 Trabalho Futuro

Uma das questões que deveria ser analisada em futuras investigações nesta área de estudo é a determinação de uma matriz tendo em conta a influência que a parafina exerce nos resultados finais. Para tal, além dos constituintes maioritários do corpo humano, deve considerar-se a constituição da parafina utilizada para inclusão das amostras. Desta forma, os resultados obtidos estariam mais próximos da realidade.

Outra forma de melhorar os resultados obtidos seria a determinação de uma matriz diferente para cada órgão estudado, uma vez que é evidente que os vários órgãos do corpo humano têm constituições diferentes.

O método utilizado para a escolha das áreas a quantificar pode ser melhorado pela utilização da distribuição de mais do que um elemento químico.

Quanto às amostras incluídas em parafina, os resultados obtidos nesta dissertação indicam que este tipo de estudo está longe de estar completo, já que os intervalos de valores obtidos na quantificação de cada elemento são demasiado grandes. É necessário um estudo que utilize um conjunto de amostras pareadas de cada tipo de cancro em número bastante elevado para que se possam retirar conclusões mais significativas.

Tendo como base este tipo de estudo, seria interessante em trabalhos futuros tentar averiguar a variabilidade de fatores como o sexo ou a idade dos pacientes, ou ainda tentar correlacionar o estágio de evolução dos tumores com os elementos presentes nos tecidos.

Uma das grandes vantagens da utilização da técnica de μ -XRF para distinção dos tecidos normais e tumorais é o facto de ser uma técnica que permite a obtenção de resultados num tempo relativamente curto quando comparada com outras técnicas utilizadas para o mesmo efeito. Por este motivo, a μ -XRF seria adequada para a análise de tecidos provenientes de biópsias, tornando possível a deteção de tumores cancerígenos num curto espaço de tempo.

Finalmente, para além do diagnóstico, esta técnica pode ainda permitir a obtenção de prognósticos mais objetivos, tornando possível determinar, por exemplo, o grau de infiltração do tumor, ou até saber como o mesmo está a responder aos tratamentos.

Bibliografia

- [1] World Health Organization (WHO). Cancer. (2021). [Online]. Disponível em: https://www.who.int/health-topics/cancer#tab=tab_1 (acedido em: 11/06/2021).
- [2] H. Sung, J. Ferlay, R. L. Siegel, M. Laversanne, I. Soerjomataram, A. Jemal, e F. Bray, "Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries," *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, vol. 71, n.º 3, pp. 209–249, 2021.
- [3] F. Bray, J. Ferlay, I. Soerjomataram, R. L. Siegel, L. A. Torre, e A. Jemal, "Global Cancer Statistics 2018: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries," *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, vol. 68, n.º 6, pp. 394–424, 2018.
- [4] S. Pilleron, D. Sarfati, M. Jansen-Heijnen, J. Vignat, J. Ferlay, F. Bray, e I. Soerjomataram, "Global cancer incidence in older adults, 2012 and 2035: A population-based study," *International Journal of Cancer*, vol. 144, n.º 1, pp. 49–58, 2019.
- [5] World Health Organization (WHO), *Guide to Cancer Early Diagnosis*. Geneva, Switzerland: World Health Organization, 2017.
- [6] International Agency for Research on Cancer (IARC). Cancer Today. (2021). [Online]. Disponível em: <https://gco.iarc.fr/today/online-analysis-pie> (acedido em: 21/06/2021).
- [7] International Agency for Research on Cancer (IARC). Population Fact Sheets – Portugal. (2021). [Online]. Disponível em: <https://gco.iarc.fr/today/data/factsheets/populations/620-portugal-fact-sheets.pdf> (acedido em: 21/06/2021).
- [8] National Cancer Institute (NCI). Definition of biomarker – NCI Dictionary of Cancer Terms. (2021). [Online]. Disponível em: <https://www.cancer.gov/publications/dictionaries/cancer-terms/def/biomarker> (acedido em: 22/06/2021).
- [9] N. L. Henry e D. F. Hayes, "Cancer biomarkers," *Molecular Oncology*, vol. 6, n.º 2, pp. 140–146, 2012.
- [10] M. P. Silva, D. F. Soave, A. Ribeiro-Silva, e M. E. Poletti, "Trace elements as tumor biomarkers and prognostic factors in breast cancer: a study through energy dispersive x-ray fluorescence," *BMC Research Notes*, vol. 5, n.º 1, pp. 194–205, 2012.
- [11] N. Goossens, S. Nakagawa, X. Sun, e Y. Hoshida, "Cancer biomarker discovery and validation," *Translational Cancer Research*, vol. 4, n.º 3, pp. 256–269, 2015.
- [12] M. A. Zoroddu, J. Aaseth, G. Crisponi, S. Medici, M. Peana, e V. M. Nurchi, "The essential metals for humans: a brief overview," *Journal of Inorganic Biochemistry*, vol. 195, pp. 120–129, 2019.
- [13] O. Wada, "What are Trace Elements – Their deficiency and excess states," *Japan Medical Association Journal*, vol. 47, n.º 8, pp. 351–358, 2004.

- [14] D. C. Carvalho, L. M. Coelho, M. S. M. S. F. Acevedo, e N. M. M. Coelho, "The oligoelements," em *Handbook of Mineral Elements in Food*, M. de la Guardia e S. Garrigues, Eds. John Wiley & Sons, Ltd., 2015, cap. 5, pp. 109–122.
- [15] S. B. Heymsfield, M. Waki, J. Kehayias, S. Lichtman, F. A. Dilmanian, Y. Kamen, J. Wang, e R. N. Pierson Jr., "Chemical and elemental analysis of humans in vivo using improved body composition models," *The American Journal of Physiology*, vol. 261, n.º 2 Pt. 1, pp. E190–E198, 1991.
- [16] L. Prashanth, K. K. Kattapagari, R. T. Chitturi, V. R. R. Baddam, e L. K. Prasad, "A review on role of essential trace elements in health and disease," *Journal of Dr. NTR University of Health Sciences*, vol. 4, n.º 2, pp. 75–85, 2015.
- [17] P. J. Parsons e F. Barbosa Jr., "Atomic spectrometry and trends in clinical laboratory medicine," *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy*, vol. 62, n.º 9, pp. 992–1003, 2007.
- [18] P. M. S. Carvalho, S. Pessanha, J. Machado, A. L. Silva, J. Veloso, D. Casal, D. Pais, e J. P. Santos, "Energy dispersive X-ray fluorescence quantitative analysis of biological samples with the external standard method," *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy*, vol. 174, n.º 105991, 2020.
- [19] M. Haschke, *Laboratory Micro-X-Ray Fluorescence Spectroscopy: Instrumentation and Applications*, sér. Springer Series in Surface Sciences. Switzerland: Springer International Publishing, 2014.
- [20] F. Adams, K. Janssens, e A. Snigirev, "Microscopic X-Ray Fluorescence Analysis and Related Methods with Laboratory and Synchrotron Radiation Sources," *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, vol. 13, n.º 5, pp. 319–331, 1998.
- [21] L. Finney, S. Mandava, L. Ursos, W. Zhang, D. Rodi, S. Vogt, D. Legnini, J. Maser, F. Ikpat, O. I. Olopade, e D. Glesne, "X-ray fluorescence microscopy reveals large-scale relocalization and extracellular translocation of cellular copper during angiogenesis," *Proceedings of the National Academy of Sciences of The United States of America*, vol. 104, n.º 7, pp. 2247–2252, 2007.
- [22] B. Kanngießer e M. Haschke, "Micro X-Ray Fluorescence Spectroscopy," em *Handbook of Practical X-Ray Fluorescence Analysis*, B. Beckhoff, B. Kanngießer, N. Langhoff, R. Wedell, e H. Wolff, Eds. Germany: Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 2006, cap. 7.1, pp. 433–462.
- [23] A. Mordente, E. Meucci, G. E. Martorana, e A. Silvestrini, "Cancer Biomarkers Discovery and Validation: State of the Art, Problems and Future Perspectives," em *Advances in Cancer Biomarkers*, sér. Advances in Experimental Medicine and Biology, R. Scatena, Ed. Springer, Dordrecht, 2015, vol. 867, cap. 2, pp. 9–26.
- [24] M. K. Schwartz, "Role of Trace Elements in Cancer," *Cancer Research*, vol. 35, n.º 11 pt. 2, pp. 3481–3487, 1975.
- [25] M. Yaman, "Comprehensive Comparison of Trace Metal Concentrations in Cancerous and Non-Cancerous Human Tissues," *Current Medicinal Chemistry*, vol. 13, n.º 21, pp. 2513–2525, 2006.
- [26] M. L. Carvalho, T. Magalhães, M. Becker, e A. von Bohlen, "Trace elements in human cancerous and healthy tissues: A comparative study by EDXRF, TXRF, synchrotron radiation and PIXE," *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy*, vol. 62, n.º 9, pp. 1004–1011, 2007.

- [27] National Center for Biotechnology Information. PubMed. (2021). [Online]. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov> (acedido em: 14/01/2021).
- [28] I. L. Mulay, R. Roy, B. E. Knox, N. H. Suhr, e W. E. Delaney, "Trace-Metal Analysis of Cancerous and Non-cancerous Human Tissues," *Journal of the National Cancer Institute*, vol. 47, n.º 1, pp. 1–13, 1971.
- [29] U. Majewska, D. Banaś, J. Braziewicz, S. Gózdź, A. Kubala-Kukuś, e M. Kucharzewski, "Trace element concentration distributions in breast, lung and colon tissues," *Physics in Medicine and Biology*, vol. 52, n.º 13, pp. 3895–3911, 2007.
- [30] E. Popescu e A. M. A. Stanescu, "Trace Elements and Cancer," *Modern Medicine*, vol. 26, n.º 4, pp. 169–175, 2019.
- [31] E. N. Drake II e H. H. Sky-Peck, "Discriminant Analysis of Trace Element Distribution in Normal and Malignant Human Tissues," *Cancer Research*, vol. 49, n.º 15, pp. 4210–4215, 1989.
- [32] D. von Czarnowski, E. Denkhaus, e K. Lemke, "Determination of trace element distribution in cancerous and normal human tissues by total reflection X-ray fluorescence analysis," *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy*, vol. 52, n.º 7, pp. 1047–1052, 1997.
- [33] T. Magalhães, A. von Bohlen, M. L. Carvalho, e M. Becker, "Trace elements in human cancerous and healthy tissues from the same individual: A comparative study by TXRF and EDXRF," *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy*, vol. 61, n.º 10-11, p. 1185–1193, 2006.
- [34] T. Magalhães, M. L. Carvalho, A. Von Bohlen, e M. Becker, "Study on trace elements behaviour in cancerous and healthy tissues of colon, breast and stomach: Total reflection X-ray fluorescence applications," *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy*, vol. 65, n.º 6, pp. 493–498, 2010.
- [35] M. Stepien, M. Jenab, H. Freisling, N.-P. Becker, M. Czuban, A. Tjønneland, A. Olsen, K. Overvad, M.-C. Boutron-Ruault, F. R. Mancini, I. Savoye, V. Katzke, T. Kühn, H. Boeing, K. Iqbal, A. Trichopoulou, C. Bamia, P. Orfanos, D. Palli, S. Sieri, R. Tumino, A. Naccarati, S. Panico, H. B. Bueno-de-Mesquita, P. H. Peeters, E. Weiderpass, S. Merino, P. Jakszyn, M.-J. Sanchez, M. Dorronsoro, J. M. Huerta, A. Barricarte, S. Boden, B. van Guelpen, N. Wareham, K.-T. Khaw, K. E. Bradbury, A. J. Cross, L. Schomburg, e D. J. Hughes, "Pre-diagnostic copper and zinc biomarkers and colorectal cancer risk in the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition cohort," *Carcinogenesis*, vol. 38, n.º 7, pp. 699–707, 2017.
- [36] J. T. Juloski, A. Rakic, V. V. Ćuk, V. M. Ćuk, S. Stefanović, D. Nikolić, S. Janković, A. M. Trbovich, e S. R. De Luka, "Colorectal Cancer and Trace Elements Alteration," *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*, vol. 59, n.º 126451, 2020.
- [37] S. L. Rizk e H. H. Sky-Peck, "Comparison between Concentrations of Trace Elements in Normal and Neoplastic Human Breast Tissue," *Cancer Research*, vol. 44, n.º 11, pp. 5390–5394, 1984.
- [38] M. J. Farquharson e K. Geraki, "The use of combined trace element XRF and EDXRD data as a histopathology tool using a multivariate analysis approach in characterizing breast tissue," *X-Ray Spectrometry*, vol. 33, n.º 4, pp. 240–245, 2004.
- [39] K. Geraki, M. J. Farquharson, D. A. Bradley, e R. P. Hugtenburg, "A synchrotron XRF study on trace elements and potassium in breast tissue," *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research B*, vol. 213, n.º 1, pp. 564–568, 2004.

- [40] M. E. Poletti, O. D. Gonçalves, C. A. Pérez, e S. D. Magalhães, "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*, vol. 71, n.º 3, pp. 975–976, 2004.
- [41] M. P. Silva, D. M. Silva, A. L. C. Conceição, A. Ribeiro-Silva, e M. E. Poletti, "Role of Ca, Fe, Cu and Zn in breast cancer: study by X-ray fluorescence techniques and immunohistochemical analysis," *X-Ray Spectrometry*, vol. 42, n.º 4, pp. 303–311, 2013.
- [42] D. O. Olaiya, O. I. Alatise, O. O. Oketayo, O. E. Abiye, E. I. Obianjunwa, e F. A. Balogun, "Trace Element Analysis of Cancerous and Non-cancerous Breast Tissues of African Women in outhwest Nigeria Using Particle-Induced X-ray Emission Technique," *Breast Cancer: Basic and Clinical Research*, vol. 13, n.º 4, pp. 1–6, 2019.
- [43] M. Alonso e E. J. Finn, *Física – Um Curso Universitário, Volume II – Campos e Ondas*, 9ª ed. São Paulo, Brasil: Editora Edgard Blücher, Ltda, 2002.
- [44] K. Janssens, "X-ray Fluorescence Analysis," em *Handbook of Spectroscopy*, 1ª ed., G. Gauglitz e T. Vo-Dinh, Eds. Weinheim, Germany: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2003, cap. 11, pp. 365–420.
- [45] E. P. Bertin, *Principles and Practice of X-Ray Spectrometric Analysis*, 2ª ed. New York, USA; London, UK: Plenum Press, 1975.
- [46] J. Cant, "Iterative reconstruction for mobile chest tomosynthesis," Tese de Doutorado, Documento entregue com o objetivo de obter o Grau de Doutor em Universiteit Antwerpen, 2017.
- [47] R. Cesareo, "X-Ray Fluorescence Spectrometry," em *Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry*, 2ª ed. Weinheim, Germany: Wiley-VHC Verlag GmbH & Co. KGaA, 2010, pp. 595–631.
- [48] R. Jenkins, *X-Ray Fluorescence Spectrometry*, 2ª ed. New York, USA: John Wiley & Sons, Inc., 1999.
- [49] K. Janssens, "X-ray based methods of analysis," em *Comprehensive Analytical Chemistry*, 1ª ed., K. Janssens e R. van Grieken, Eds. Elsevier B. V., 2004, vol. 42, cap. 4, pp. 129–226.
- [50] R. Klockenkämper, "Fundamentals of X-Ray Fluorescence," em *Total-reflection X-Ray Fluorescence Analysis and Related Methods*, 2ª ed., R. Klockenkämper e A. von Bohlen, Eds. Hoboken, New Jersey, USA: John Wiley & Sons, Inc., 2014, cap. 1, pp. 1–78.
- [51] A. A. Markowicz, "X-Ray Physics," em *Handbook of X-Ray Spectrometry – Second Edition, Revised and Expanded*, 2ª ed., R. E. Van Grieken e A. A. Markowicz, Eds. New York, USA; Basel, Switzerland: Marcel Dekker, Inc., 2001, cap. 1, pp. 1–94.
- [52] R. Jenkins, "X-Ray Fluorescence Spectrometry," em *Handbook of Analytical Techniques*, H. Günzler e A. Williams, Eds. WILEY-VCH Verlag GmbH, 2001, cap. 23, pp. 753–766.
- [53] M. I. Mazuritskiy, A. M. Lerer, S. K. Kulov, e D. G. Samkanashvili, "On the Surface Structure of Microchannel Plates and the Excitation of X-Ray Fluorescence in Hollow Microcapillaries," *Journal of Surface Investigation: X-ray, Synchrotron and Neutron Techniques*, vol. 13, n.º 3, pp. 499–507, 2019.
- [54] University of Albany. Polycapillary Optics. (2021). [Online]. Disponível em: https://www.albany.edu/x-ray-optics/polycapillary_optics.htm (acedido em: 15/07/2021).

- [55] R. Sitko e B. Zawiska, "Quantification in X-Ray Fluorescence Spectrometry," em *X-Ray Spectroscopy*, S. K. Sharma, Ed. InTech, 2012, cap. 8, pp. 137–162.
- [56] J. Sherman, "The theoretical derivation of fluorescent X-ray intensities from mixtures," *Spectrochimica Acta*, vol. 7, n.º 1, pp. 283–306, 1955.
- [57] T. Shiraiwa e N. Fujino, "Theoretical Calculation of Fluorescent X-Ray Intensities in Fluorescent X-ray Spectrochemical Analysis," *Japanese Journal of Applied Physics*, vol. 5, n.º 10, pp. 886–899, 1966.
- [58] S. Pessanha, C. Fonseca, J. P. Santos, M. L. Carvalho, e A. A. Dias, "Comparison of standard-based and standardless methods of quantification used in X-ray fluorescence analysis: Application to the exoskeleton of clams," *X-Ray Spectrometry*, vol. 47, n.º 2, pp. 108–115, 2018.
- [59] J. Machado, P. M. Carvalho, A. Félix, D. Doutel, J. P. Santos, M. L. Carvalho, e S. Pessanha, "Accuracy improvement in XRF analysis for the quantification of elements ranging from tenths to thousands $\mu\text{g g}^{-1}$ in human tissues using different matrix reference materials," *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, vol. 35, n.º 12, pp. 2920–2927, 2020.
- [60] Bruker Nano GmbH, *M4 TORNADO – High performance Micro-XRF spectrometer*. Berlin, Germany: Bruker Nano GmbH, 2015.
- [61] M. Xu, Y. Kuang, M. Wang, X. Han, e Q. Yang, "A microRNA expression signature as a predictor of survival for colon adenocarcinoma," *Neoplasma*, vol. 64, n.º 1, pp. 56–69, 2017.
- [62] H.-P. Sinn e H. Kreipe, "A Brief Overview of the WHO Classification of Breast Tumors, 4th Edition, Focusing on Issues and Updates from the 3rd Edition," *Breast Care*, vol. 8, n.º 2, pp. 149–154, 2013.
- [63] A. N. Kadachi e M. A. Al-Eshaikh, "Limits of detection in XRF spectroscopy," *X-Ray Spectrometry*, vol. 41, n.º 5, pp. 350–354, 2012.
- [64] N. M. Razali e Y. B. Wah, "Power comparisons of Shapiro-Wilk, Kolmogorov-Smirnov, Lilliefors and Anderson-Darling tests," *Journal of Statistical Modeling and Analytics*, vol. 2, n.º 1, pp. 21–33, 2011.
- [65] P. J. Huber, *Robust Statistics*. United States of America: John Wiley & Sons, Inc., 1981.

Apêndices

Apêndice A

Matrizes de Tecido Humano

As matrizes testadas para determinação da matriz mais adequada para a quantificação dos tecidos humanos estão listadas na Tabela A.1. As composições originais são provenientes da base de dados do *National Institute of Standards and Technology* (NIST) e as siglas utilizadas são as seguintes:

- **ICRU** – composição de 4 componentes para tecido mole da *International Commission on Radiation Units and measurements* (ICRU);
- **A-150** – composição de plástico A-150 equivalente a tecido;
- **ICRP** – composição de tecido mole da *International Commission on Radiological Protection* (ICRP);
- **ADIPOSE** – composição de tecido adiposo da ICRP;
- **BRAIN** – composição de tecido cerebral da ICRP;
- **LUNG** – composição de tecido pulmonar da ICRP;
- **MS20** – composição do substituto de tecido MS20;
- **MSKELETAL** – composição de músculo esquelético da ICRP;
- **MSTRIATED** – composição de músculo estriado da ICRP;
- **MWSUCROSE** – composição de líquido equivalente a músculo, com sacarose;
- **MWOSUCROSE** – composição de líquido equivalente a músculo, sem sacarose;
- **SKIN** – composição de pele da ICRP;
- **TESTIS** – composição de tecido testicular da ICRP.

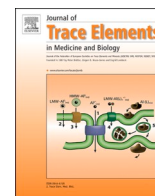
Tabela A.1: Matrizes testadas para determinação da matriz mais adequada para a quantificação dos tecidos humanos.

Matriz	Elemento/% (m/m)							Total/%	Z _{ef}
	H	C	N	O	F	Na	Mg		
ICRU (98)	9,9149	10,8780	2,5480	74,6591				98,0000	7,04
ICRU (97)	9,8137	10,7670	2,5220	73,8973				97,0000	7,04
ICRU (96,5)	9,7631	10,7115	2,5090	73,5164				96,5000	7,04
ICRU (96)	9,7125	10,6560	2,4960	73,1355				96,0000	7,04
ICRU (95)	9,6113	10,5450	2,4700	72,3737				95,0000	7,04
A-150 (98)	9,9300	75,9990	3,4356	5,1270	1,7074			96,1990	5,68
A-150 (96)	9,7274	74,4480	3,3655	5,0223	1,6725			94,2357	5,68
ICRP (98)	10,2383	22,7546	2,4382	61,7633		0,1107	0,0127	97,3179	6,77
ICRP (97)	10,1338	22,5224	2,4134	61,1331		0,1096	0,0126	96,3249	6,77
ICRP (96)	10,0293	22,2902	2,3885	60,5028		0,1085	0,0125	95,3318	6,77
ICRP (95)	9,9248	22,0581	2,3636	59,8726		0,1074	0,0124	94,3388	6,77
ADIPOSE (98)	11,2	58,6	0,7	27,2		0,1		97,8	6,00
ADIPOSE (97)	11,1	58,0	0,7	27,0		0,1		96,8	6,00
ADIPOSE (96,5)	11,0	57,7	0,7	26,8		0,1		96,3	6,00
ADIPOSE (96)	10,9	57,4	0,7	26,7		0,1		95,8	6,00
ADIPOSE (95)	10,8	56,8	0,7	26,4		0,1		94,8	6,00
BRAIN (98)	10,5	14,2	2,2	69,8		0,2		96,8	6,93
BRAIN (97,5)	10,4	14,1	2,1	69,4		0,2		96,3	6,93
BRAIN (97)	10,4	14,1	2,1	69,1		0,2		95,8	6,93
BRAIN (96,5)	10,3	14,0	2,1	68,7		0,2		95,3	6,93
BRAIN (96)	10,3	13,9	2,1	68,4		0,2		94,8	6,93
BRAIN (95)	10,2	13,8	2,1	67,6		0,2		93,9	6,93
LUNG (98)	10,3	8,1	2,3	76,3		0,2		97,2	7,07
LUNG (97)	10,2	8,1	2,2	75,6		0,2		96,2	7,07
LUNG (96)	10,1	8,0	2,2	74,8		0,2		95,2	7,07
LUNG (95)	10,0	7,9	2,2	74,0		0,2		94,2	7,07
MS20 (98)	7,9568	57,1773	1,7442	18,2653		12,7681		97,9118	6,64
MS20 (96)	7,7944	56,0104	1,7086	17,8926		12,5076		95,9136	6,64
MSKELETAL (98)	10,0	14,0	3,3	69,6		0,1		97,0	6,96
MSKELETAL (96)	9,8	13,7	3,3	68,2		0,1		95,0	6,96
MSTRIATED (98)	10,0060	12,0661	3,4334	71,5135		0,0981		97,1171	7,00
MSTRIATED (96)	9,8018	11,8198	3,3634	70,0541		0,0961		95,1351	7,00
MWSUCROSE (98)	9,6269	15,3090	3,4742	69,5899				98,0000	6,96
MWSUCROSE (96)	9,4305	14,9965	3,4033	68,1697				96,0000	6,96
MWOSUCROSE (98)	9,9930	11,7657	3,4742	72,7672				98,0000	7,01
MWOSUCROSE (96)	9,7890	11,5256	3,4033	71,2821				96,0000	7,01
SKIN (98)	9,8	20,0	4,1	63,2		0,2		97,31	6,85
SKIN (96)	9,6	19,6	4,0	61,9		0,2		95,33	6,85
TESTIS (98)	10,4	9,7	2,0	75,1		0,2		97,31	7,04
TESTIS (97)	10,3	9,6	1,9	74,3		0,2		96,32	7,04
TESTIS (96)	10,2	9,5	1,9	73,5		0,2		95,33	7,04
TESTIS (95)	10,1	9,4	1,9	72,8		0,2		94,34	7,04

Apêndice B

Artigo Publicado

No decorrer desta dissertação, foi publicado um artigo tendo como tema a determinação de uma matriz adequada para a quantificação dos tecidos humanos analisados por EDXRF. O artigo é apresentado de seguida.



Analysis of human tissues using Energy Dispersive X Ray Fluorescence – Dark matrix determination for the application to cancer research

Ana Ensina^a, Patrícia M. Carvalho^{a,b}, Jorge Machado^{a,b}, Maria Luísa Carvalho^{a,b},
Diogo Casal^{b,c}, Diogo Pais^{b,c}, José Paulo Santos^{a,b}, António A. Dias^{a,b}, Sofia Pessanha^{a,b,*}

^a Physics Department, NOVA School of Science and Technology, NOVA University Lisbon, 2829-516, Caparica, Portugal

^b LIBPhys - Laboratory for Instrumentation, Biomedical Engineering and Radiation Physics, Portugal

^c Anatomy Department, NOVA Medical School, NOVA University Lisbon, 1169-056, Lisbon, Portugal

ARTICLE INFO

Keywords:

EDXRF
Dark matrix
Cancer
Prostate
Ovary

ABSTRACT

Background: X ray Fluorescence has been essayed as a suitable technique for the elemental quantification of trace element in human tissues, namely comparison of normal and cancerous tissue. However, accurate results depend on a robust quantification approach, namely correct evaluation of the samples' dark matrix.

Methods: In order to determine the most suitable dark matrix composition for the quantification of such samples using the Fundamental Parameter approach, we have measured several Certified Reference Materials and essayed different dark matrix compositions to achieve the most accurate results. The resulting dark matrix was then applied to normal and tumor ovarian and prostate tissue samples, and the obtained results were compared with the ones obtained with a comparative method using external standard calibration curves.

Results: Using a dark matrix composed of 10 % - H, 22 % - C, 3 % - N and 60 % - O yielded the best compromise in accuracy for the light and heavy elements. For the reduced sample size and conditions of this study, for both organs, the concentrations of transition metals decrease in tumor tissues, while the concentration of lighter elements, P and Cl, increases. On the other hand, there are elements that showed different behavior between the two types of tissue, namely Zn and S, that increase in prostate tumor tissue and decrease in ovarian tissue.

Conclusion: An increase in precision was one of the improvements found with the newly developed method, as the FP-approach contemplates matrix effects and the influence of other elements in the analytes' quantification. Additionally, the determined dark matrix can be employed in any tissue analysis application by means of EDXRF.

1. Introduction

About 99 % of the weight of the average human body is composed of four main elements (H, O, C and N). The remaining is made up of essential (Na, K, Mg, Ca, Cl, P, S) and trace (Mn, Fe, Cu, Zn, Se) elements [1]. Physiochemical properties of trace metals govern their uptake, intracellular distribution, and the binding of the metal compounds in biological systems, mainly by interfering with cellular redox regulation and production of oxidative stress, which causes oxidative DNA damage or trigger signaling cascades that may lead to stimulation of malignant growth [2–4]. Inadequate concentrations or lack of trace elements as enzyme cofactors may expose individuals to carcinogenic stress [5]. On the other hand, trace metals form core structures of the superoxide dismutase (SOD), an important antioxidant enzyme for cellular protection from reactive oxygen species (ROS), and also involved in DNA

repair [6].

Considering these implications, the understanding of the mechanisms of assimilation of trace elements might be indicative of the genesis or progression of cancer [7], and the quantification of these elements could constitute a pioneering alternative method of diagnosis if implemented *in vivo*.

The Energy Dispersive X-ray Fluorescence technique (EDXRF) could be the tool for this innovative method as it constitutes the ideal compromise for a non-destructive, of simple instrumentation and good sensitivity technique for the elements of interest ($Al = 13 < Z < 83 = Bi$). For these reasons, this technique has already been tested in research regarding to the characterization of tissues [4,8–11]. Yet, there is always a great impairment to statistically significant conclusions: the extremely reduced number of samples, as well as constraints pertaining to the accuracy of the quantification methods.

* Corresponding author at: Physics Department, NOVA School of Science and Technology, NOVA University Lisbon, 2829-516, Caparica, Portugal.

E-mail address: sofia.pessanha@fct.unl.pt (S. Pessanha).

<https://doi.org/10.1016/j.jtemb.2021.126837>

Received 16 April 2021; Received in revised form 24 June 2021; Accepted 5 August 2021

Available online 8 August 2021

0946-672X/© 2021 Elsevier GmbH. All rights reserved.

Accurate quantitative determinations in EDXRF spectrometry require the use of suitable empirical and/or theoretical methods to convert the fluorescent intensities of the spectra into the concentration of the analyte [12]. This conversion is not straightforward as the measured intensities are strongly influenced by the surrounding elements of the sample, the matrix, resulting in absorption and enhancement effects. A commonly used approach to overturn the estimation of matrix effects is the comparative method, in which the analyte's peak intensities with [13] or without [14,15] correction of the scattering peaks of the X-ray tube are compared with a set of Certified Reference Materials (CRMs) and elemental calibration curves are built. This approach, however, has limitations. On the one hand, it is limited by the quantity of available CRMs and by the elements present in each CRM, as the strength and reliability of the obtained curves is dependent on the number of data points used. On the other hand, the accuracy of the results is also dependent on the concentration range, for each element, within which the calibration curve is valid. Curation of existent references on the use of PIXE (particle induced x ray emission) in the analysis of human tissues performed by Mulware [16] showed that essential and non-essential elements can be present in very different ranges of concentrations in different organs. Calcium, for example, can be present in 120–150 $\mu\text{g.g}^{-1}$ in breast and kidney, respectively, whilst reaching more than 3000 $\mu\text{g.g}^{-1}$ in testicular tissue. While potassium has been found in concentrations of 3100 $\mu\text{g.g}^{-1}$ in breast and below 200 $\mu\text{g.g}^{-1}$ in kidney, thyroid, and testicular tissue.

It is, therefore, crucial to find a standardless approach to quantification, such as the Fundamental Parameter method (FP), for EDXRF. This method estimates a composition for the unknown sample (both trace elements and matrix) by calculating the theoretical fluorescence intensities and iteratively comparing them with the measured ones, until a correspondence is obtained [17]. This procedure is greatly complicated when the elements that compose the matrix are not detectable by EDXRF, increasing the uncertainty in the estimation of the matrix of the sample. This way, this so-called dark matrix, composed of the main elements present in biological matrices (typically H, C, O and N) that are not visible in an EDXRF spectrum, significantly influences how the remaining elements of interest are detected.

Rindby [18] developed the XRFAES (X-ray Fluorescence Automatic Evaluation System) package, a FP-based software for the evaluation of XRF spectra. This package was used by Magalhães et al. [8] in the analyses of normal and carcinoma tissues with EDXRF and reported increased or constant levels of Fe and Cu and decreased levels of Zn. For this study, samples were freeze-dried, powdered, and pelletized and the FP-method was applied for quantification. Additionally, the FP approach can take advantage of CRMs, and an analysis employing a CRM of similar composition as the unknown material allows the achievement of better results than those obtained by using a very different CRM. Pascolo et al. [19] used bovine liver SRM 1577b for the calibration of the X-ray Fluorescence spectra to perform quantitative determinations in ovarian tissues.

In this work, we aim at determining the most suitable dark matrix composition (DMC) for the analysis and quantification of biological samples. We have systematically experimented our DMC recommendations with several compositions of C, N, O and H (and Na and Mg), and applied them to the quantification of four biological CRMs. The resulting DMC was then applied to human tissues samples and the obtained results compared against the ones obtained with an external standard calibration curve for quantification.

2. Materials and methods

2.1. Dark matrix compositions (DMC)

In order to determine the most suitable DMC for the analysis and quantification of biological samples, we have tested several configurations with different compositions of C, N, O and H (and also of Na and

Mg) (Table 1). The chosen dark matrix compositions were based on the International Commission on Radiological Protection (ICRP) composition for soft tissue, for adipose tissue, for brain and lung tissue, and the four component International Commission on Radiation Units and measurements (ICRU) composition for soft tissue [20]. The average atomic number for the chosen dark matrices ranged between $6 < Z < 7.07$.

2.2. Certified reference materials (CRMs)

For the evaluation of the accuracy of the quantification obtained with the different DMCs, four animal tissue CRMs were measured and evaluated: Oyster tissue SRM 1566, Bovine muscle ERM BB184, Pig kidney ERM - BB186, and Bovine liver BCR- 185R. The CRMs powder was pressed into circular pellets with 1.5 cm diameter and 1 mm thickness, by a 10 ton hydraulic press (Specac), and glued (heptane mixture) on Mylar film. Table 2 describes the used CRMs, values without uncertainty are not certified.

2.3. Micro-Energy Dispersive X-Ray Fluorescence system (μ -EDXRF)

The μ -EDXRF system used in this work is the M4 Tornado – Bruker (Germany). The X-ray tube is a micro-focus side window low-power rhodium tube. A polycapillary lens was used to obtain a spot size down to 25 μm for Mo-K α . Detection of fluorescence radiation was performed by an energy dispersive silicon drift detector with 30 mm^2 sensitive area and energy resolution of 142 eV for Mn-K α . Two different configurations of the X-ray tube and filters were used to better explore the capabilities for lighter (50 kV, 300 μA , 12.5 μm Al filter) and heavier elements (50 kV, 600 μA , combination of 100/50/25 μm Al/Ti/Cu filter). All measurements were performed under 20 mbar vacuum conditions. Samples were analyzed as pellets and to assure a representative analysis, that overcomes pellet heterogeneity, area acquisition was performed. This way, the sum spectrum of the entire analyzed area was used. Mappings were performed in 3 different $\approx 7 \times 5 \text{ mm}^2$ areas, using a step size of 25 μm and a time per step of 10 ms/pixel.

2.3.1. Quantification approach – Fundamental Parameters

For this standardless approach, MQuant, an in-built software of the M4 TORNADO system, was used. This software allows spectra deconvolution, peak fitting, and quantification using the Fundamental Parameters (FP) method based on the Sherman's equation [21]. For each acquired spectra of CRM (Table 2) the five different dark matrix compositions (Table 1) were essayed, and the accuracy was determined. The Limits of Detection (LoD) and Limits of Quantification (LoQ) obtained for Oyster Tissue SRM 1566 using this deconvolution software are presented in Table 3. The LoD was determined according to eq. 1 [22] and the LoQ has been calculated considering that $\text{LoQ} \approx 3\text{LoD}$ [22].

$$\text{LoD} = \frac{3C_i\sqrt{Nb_i}}{Np_i} \quad (1)$$

Table 1

Matrix compositions (w/w%) based on the International Commission on Radiological Protection (ICRP) composition for soft tissue, for ADIPOSE tissue, for BRAIN and LUNG tissue, and the four component International Commission on Radiation Units and measurements (ICRU) composition for soft tissue.

Element	Matrix				
	ICRU	ADIPOSE	BRAIN	LUNG	ICRP
H	9.61	10.8	10.2	10.0	9.92
C	10.54	56.8	13.8	7.9	22.06
N	2.47	0.7	2.1	2.2	2.36
O	72.37	26.4	67.6	74.0	59.87
Na		0.1	0.2	0.2	0.11
Mg					0.012

Table 2

Certified elemental composition ($\mu\text{g.g}^{-1}$) for the used CRMs. Values without uncertainty are not certified.

	Oyster tissue SRM 1566	Bovine muscle ERM BB184	Pig kidney ERM - BB186	Bovine liver BCR- 185R
P	8100			
S	7600			
Cl	10,000	1540		
K	9690 $\pm$ 50	15,800	12,000	
Ca	1500 $\pm$ 200	155	2900	
Mn	17.5 $\pm$ 1.2	0.276 $\pm$ 0.013	7.26 $\pm$ 0.25	11.07 $\pm$ 0.29
Fe	195 $\pm$ 34	75 $\pm$ 4	255 $\pm$ 13	
Ni	1.03 $\pm$ 0.19			
Cu	63 $\pm$ 3.5	2.31 $\pm$ 0.09	36.5 $\pm$ 1.8	277 $\pm$ 5
Zn	852 $\pm$ 14	146 $\pm$ 7	134 $\pm$ 5	138.6 $\pm$ 2.1
As	13.4 $\pm$ 1.9			
Se	10.3 $\pm$ 0.9			
Br	55			
Sr	10 $\pm$ 1			

Table 3

Limits of Detection and Limits of Quantification ($\mu\text{g.g}^{-1}$) obtained for Oyster Tissue SRM 1566 using the MQuant deconvolution software. Uncertainty of LoD was determined as the deviation to the mean of three measurements, uncertainty of LoQ was determined by propagation of the uncertainties.

	Limit of Detection	Limit of Quantification
P	69 $\pm$ 2	207 $\pm$ 4
S	27.3 $\pm$ 0.2	81.8 $\pm$ 0.4
Cl	18.3 $\pm$ 0.1	54.9 $\pm$ 0.6
K	5.4 $\pm$ 0.1	16.1 $\pm$ 0.3
Ca	3.0 $\pm$ 0.2	8.9 $\pm$ 0.6
Fe	1.7 $\pm$ 0.1	5.0 $\pm$ 0.3
Cu	0.82 $\pm$ 0.02	2.5 $\pm$ 0.1
Zn	0.91 $\pm$ 0.03	2.7 $\pm$ 0.1
Br	2.2 $\pm$ 0.1	6.6 $\pm$ 0.3

where for the element i , C_i is the concentration present in Oyster Tissue SRM 1566, N_{b_i} is the counting rate for the background, and N_{p_i} is the counting rate of the corresponding peak in the EDXRF spectrum for this CRM.

2.3.2. Quantification approach – external standard calibration curve

For this quantification approach, calibration curves of the concentration of a given element as a function of the K_{α} peak integral divided by the scattering peaks ratio were built. In a previous publication by Machado et al. [13] we have demonstrated that by correcting the intensity of the characteristic peaks, other CRMs with similar mean-Z can be used, increasing the accuracy of the method. This way, plant CRMs were used, in addition to the tissue CRMs, to build more robust calibration curves. For this approach, the same spectra were analyzed using the advanced spectra processing tools of ROOT [23]: a fit function composed of a sum of gaussian functions was fitted to each spectrum by χ^2 minimization techniques. Accuracy, LoD and LoQ for this methodology are also discussed in Machado et al. [13]. Validation of the method for Oyster Tissue SRM 1566 is presented in Table 4.

2.4. Human tissues samples

For the evaluation of the chosen dark matrix, human tissue samples were also analyzed with μ -EDXRF and the quantification compared with a previously tested approach based on the external standard method [13]. Samples were collected from two deceased patients donated through the Corpses Donation Office at the Department of Anatomy of NOVA Medical School (NMS) for research and teaching purposes. Excision of the tumors and corresponding normal tissues was based on macroscopic inspection of morphological features by an expert anatomist and surgeon. Two sets of paired samples (normal and tumor tissue)

Table 4

Obtained quantification for Oyster Tissue SRM 1566 ($\mu\text{g.g}^{-1}$) and deviation to the certified value $|\Delta|$ using the external standard calibration curve.

Element	Obtained value	$ \Delta $ %
P	6000 $\pm$ 1000	26
S	7000 $\pm$ 2000	3
Cl	8000 $\pm$ 1000	18
K	9700 $\pm$ 1500	1
Ca	500 $\pm$ 500	63
Fe	200 $\pm$ 40	5
Cu	70 $\pm$ 14	3
Zn	900 $\pm$ 200	1
Br	70 $\pm$ 20	29
Sr	7 $\pm$ 6	36

were obtained from each patient corresponding to prostate and ovarian tissues. Samples were lyophilized using a Modulyo Freeze Dryer system (Edwards, UK) operated at -60°C and 20 Pa for two days. The lyophilized samples were powdered in a mechanical mill and in a pestle and mortar. The obtained powder (0.49–0.57 g) was pressed into pellets, similarly to the CRMs, glued (heptane mixture) onto a Mylar film and placed on a sample holder. The methodology is further explained in Carvalho et al. [14]. The comparison of the spectra obtained for normal and tumor ovary tissue using the heavy metal configuration of the μ -EDXRF is presented in Fig. 1.

3. Results and discussion

3.1. Dark matrix determination

Figs. 2 and 3 present the obtained deviations (in %) between the calculated and the certified value of the elemental composition of the four analyzed animal tissue CRMs, for the different DMCs. The threshold, corresponding to 25 % deviation, is also marked. As was expected, due to the similarity of the compositions of H, C, N, O and Na, using BRAIN or LUNG matrix retrieved identical results. Moreover, the obtained results are similar to the ones obtained using ICRU and ICRP matrices, meaning that the presence of Na and Mg in such low amounts does not imply significant changes in the quantification of matrices whose major component is oxygen (60–74 %). The matrix presenting a dramatically different composition, ADIPOSE, with carbon (56.8 %) as a major component also presented different results. As can be seen for the elements marked with asterisk, except for the lighter elements, this was the matrix with the most accurate quantification of the CRMs. Conversely, the quantification of P, S, and Cl presented poor results, with a deviation from the certified value always above 30 %. This is a major constraint as recent results comparing breast and endometrium tissues revealed significant differences in the P ($p = 0.006$ for breast and $p = 0.04$ for endometrium) and S ($p = 0.002$ for breast and $p = 0.003$ for endometrium) composition between normal and tumor tissue [13]. Regarding Br, none of the studied matrices rendered a suitable result,

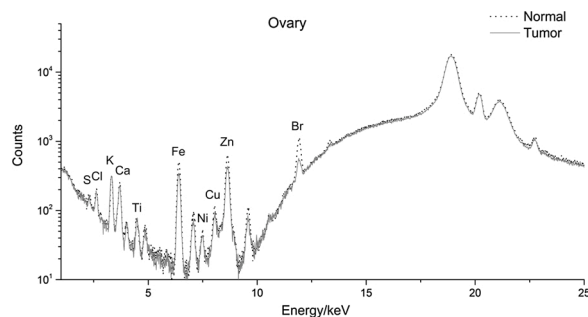


Fig. 1. Comparison of the spectra obtained for normal and tumor Ovary tissue using the heavy elements configuration of the μ -EDXRF spectrometer.

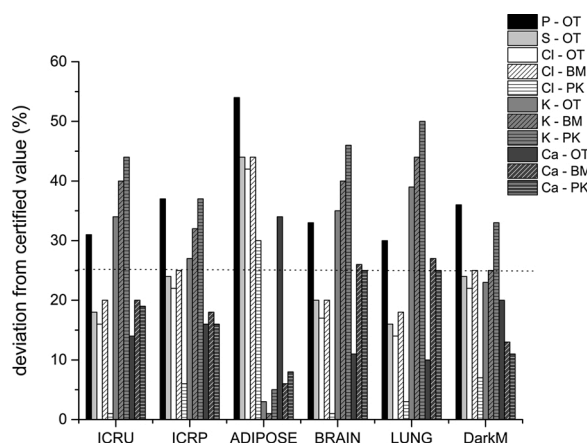


Fig. 2. Deviation to the certified value ($|\Delta|$ %) for elements P, S, Cl, K and Ca obtained for each CRMs (OT – Oyster Tissue SRM 1566, BM – Bovine Muscle ERM BB184, PK – Pig Kidney ERM BB186, BL – Bovine Liver BCR 185R), using the different matrix compositions.

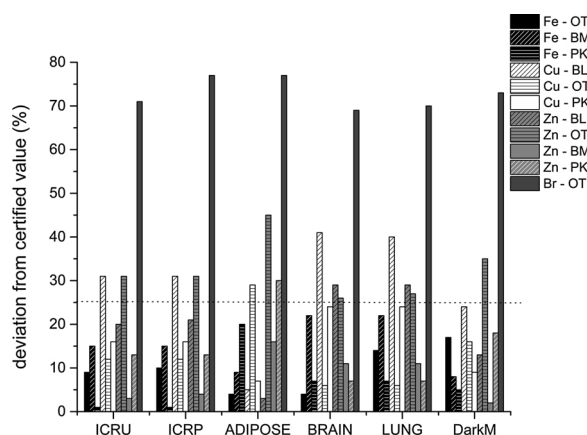


Fig. 3. Deviation to the certified value ($|\Delta|$ %) for elements Fe, Cu, Zn and Br obtained for each CRMs (OT – Oyster Tissue SRM 1566, BM – Bovine Muscle ERM BB184, PK – Pig Kidney ERM BB186, BL – Bovine Liver BCR 185R), using the different matrix compositions.

with deviations in the obtained concentration around 70 %. Although this was not an element frequently found in the reviewed literature, according to Olaiya et al. [24] this element was found in lower concentrations of malignant tumor breast tissue, when compared to normal one.

Taking into account these findings, a new matrix composition was set, in order to reach a compromise between the amounts of C and O, and to obtain deviations below 25 % for most elements. The most suitable composition, named DarkM, was found to be 10 % - H, 22 % - C, 3 % - N and 60 % - O, and the results obtained are also presented in Figs. 2 and 3. As can be seen, more acceptable results are now obtained for the lighter elements, with deviations below 25 % for Ca, Fe, Cu, and Zn. The exception would be Zn in Oyster tissue, but even so, great improvement was obtained when comparing with the ADIPOSE matrix. This is also an element present in relatively high amount ($852 \mu\text{g.g}^{-1}$ Zn in Oyster Tissue) meaning that there is a limitation in the concentration range in which these matrices can be considered accurate. However, according to the available literature, expected values for Zn range from less than $25 \mu\text{g.g}^{-1}$ in uterine tissue [25], from 0.1 to $144 \mu\text{g.g}^{-1}$ in breast [26–28], from 40 to $100 \mu\text{g.g}^{-1}$ in colon [3], from 60 to $80 \mu\text{g.g}^{-1}$ in lung [3] and up to $170 \mu\text{g.g}^{-1}$ in prostate [29]. This way, the obtained matrix can be considered suitable and within a good compromise for all the studied elements. Regarding Br, the deviation to the certified value could not be

considered suitable for implementation.

3.2. Comparison between quantification approaches

The determined dark matrix was employed in the quantification and comparison of normal and tumor samples belonging to prostate and ovarian tissues. For comparison and validation, the obtained results were compared with the results obtained with the external standard calibration curve approach, Tables 5 and 6. The first conclusion to be drawn from the results is that the Fundamental Parameter (FP) approach quantification of the same three spectra rendered much more precise results, as the uncertainty is much lower (deviation to the mean of the three values) than the one corresponding to external standard approach. This is likely due to the influence that other elements have in the analyte quantification that is taken into calculation when using the FP-approach, while using a calibration curve does not take matrix effects into consideration. When comparing the accuracy of the measurements, we can observe an overall satisfactory correspondence between results, with overlapping bar chart for the elements Cl, Fe, Cu, and Zn. Some discrepancies occur in some samples for the lighter elements, P, S, and K. This was also expected since matrix effects are more relevant and affect highly lighter elements due to self-absorption effects. Taking into account the validation presented in Figs. 2 and 3 for the FP-approach, and Table 4 for the calibration curve approach, we can conclude that the values obtained for K and S must be closer to the real value when using the external standard approach (with deviation for the certified values of Oyster Tissue 1556 of 3 % and 1 %, respectively). Regarding P, the values are sometimes discrepant between methods, which could also be expected since this element presents deviation to the certified value over 26 % for both methods. Nonetheless, both methods retrieved values within the same order of magnitude. Regarding Ca, the validation results with the external standard approach were not considered suitable (over 60 % deviation to the certified value). This way, only the results obtained with the FP-approach are presented. Similarly, being this a major disadvantage of the external standard approach, due to lack of information in the CRMs for the construction of calibration curves for the elements Ti and Ni, only the FP-approach can be considered. Conversely, regarding Br, as the FP-approach was not considered suitable for the determination of this element (70 % deviation to the certified value), we

Table 5

Comparison of the elemental concentration ($\mu\text{g.g}^{-1}$) of Normal and Tumor Ovary tissue with two quantification approaches. $\Delta\%$ corresponds to the variation between normal and tumor tissue.

	Ovary					
	Normal		Tumor		Δ	
	FP	ES	FP	ES	FP	ES
P	1330 ± 70	2000 ± 300	2500 ± 100	3600 ± 900	89 %	74 %
S	3300 ± 250	4800 ± 900	3100 ± 200	4600 ± 900	−6 %	−5 %
Cl	4500 ± 800	5100 ± 500	4600 ± 200	5200 ± 900	2 %	2 %
K	4300 ± 400	2900 ± 600	4900 ± 200	3000 ± 1000	12 %	16 %
Ca	1200 ± 70	NQ	900 ± 30	NQ	−25 %	
Ti	90 ± 10	NQ	87 ± 8	NQ	−8 %	
Fe	280 ± 40	420 ± 90	178 ± 8	210 ± 60	−37 %	−49 %
Ni	8.1 ± 0.7	NQ	7.3 ± 0.3	NQ	−11 %	
Cu	19 ± 1	18 ± 5	13 ± 1	10 ± 5	−32 %	−41 %
Zn	115 ± 6	130 ± 30	75 ± 1	90 ± 20	−35 %	−37 %
Br	NQ	110 ± 30	NQ	31 ± 8		−72 %

Table 6

Comparison of the elemental concentration ($\mu\text{g.g}^{-1}$) of Normal and Tumor Prostate tissue with two quantification approaches. $\Delta\%$ corresponds to the variation between normal and tumor tissue.

	Prostate					
	Normal		Tumor		Δ	
	FP	ES	FP	ES	FP	ES
P	900 $\pm$ 70	1600 $\pm$ 300	1300 $\pm$ 50	2200 $\pm$ 400	44 %	35 %
S	2400 $\pm$ 200	4100 $\pm$ 900	2900 $\pm$ 200	5100 $\pm$ 900	24 %	23 %
Cl	5000 $\pm$ 400	6700 $\pm$ 800	5200 $\pm$ 400	6900 $\pm$ 300	3 %	3 %
K	4300 $\pm$ 400	3400 $\pm$ 600	4300 $\pm$ 200	3500 $\pm$ 300	0.2 %	3 %
Ca	1600 $\pm$ 100	NQ	2300 $\pm$ 200	NQ	40 %	
Ti	140 $\pm$ 20	NQ	61 $\pm$ 9	NQ	-58 %	
Fe	1500 $\pm$ 200	2000 $\pm$ 400	1200 $\pm$ 200	1700 $\pm$ 500	-22 %	-22 %
Ni	74 $\pm$ 10	NQ	6 $\pm$ 1	NQ	-91 %	
Cu	14 $\pm$ 1	12 $\pm$ 3	13 $\pm$ 1	11 $\pm$ 3	-12 %	-6 %
Zn	112 $\pm$ 5	120 $\pm$ 20	144 $\pm$ 3	180 $\pm$ 10	29 %	51 %
Br	NQ	140 $\pm$ 20	NQ	70 $\pm$ 10		-45 %

could only establish a comparison with the values determined with the external standard approach.

3.3. Comparison of normal and cancerous human tissues

Although the accuracy of the method is a main goal when analyzing tissue samples, the main purpose of the investigation is to compare tumor and normal tissue from the same individual in order to gauge elemental variations that could translate into biomarkers. Figs. 4 and 5 compare the quantitative results obtained for sample Normal ovarian tissue, Tumor ovarian tissue, Normal prostate tissue and Tumor prostate tissue, with the Fundamental parameter approach. Despite some differences in the absolute value determined, as discussed in Section 3.2. The variation behavior is similar for both quantitative approaches. Similarly, the uncertainty is smaller with the FP-method, attesting to the higher precision of the method. Regarding the transition metals, Zn presents different behavior for prostate, increasing in cancerous tissue while decreasing for cancerous tissue in ovarian samples (Tables 5 and 6). Similar results were determined by Banas et al. [30] with a

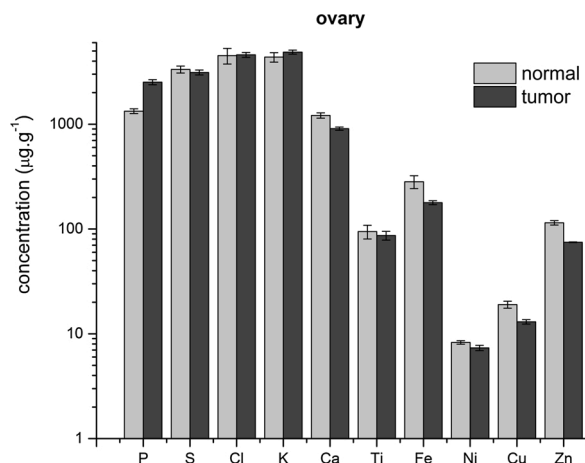


Fig. 4. Comparison of the elemental concentration ($\mu\text{g.g}^{-1}$) of Normal and Tumor Ovary tissue.

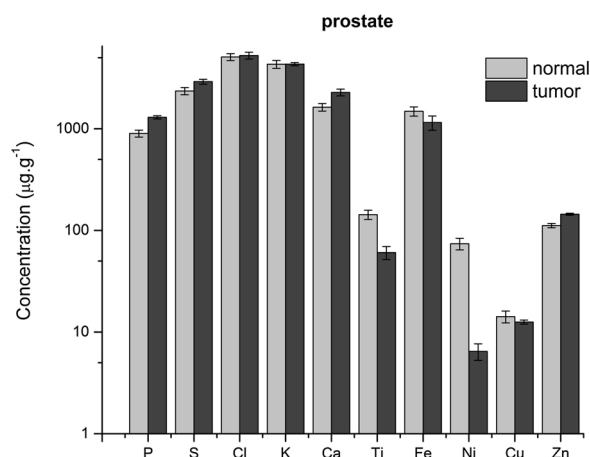


Fig. 5. Comparison of the elemental concentration ($\mu\text{g.g}^{-1}$) of Normal and Tumor Prostate tissue.

significant increase of Zn in prostatic cancerous tissue. This element was also reported relevant in the comparison performed by Leitão et al. [31] of prostatic tissue. However, they have determined a significant decrease of this element in cancerous tissue. Contradictory views have been expressed regarding the role of Zn in carcinogenesis. Some studies [30,32] emphasize the fact that Zn deficiency causes cancers, whereas others [16,31,33] highlight that Zn is involved in tumor growth and development of neoplastic transformation. Our conflicting observations, together with the different results obtained for breast, kidney, stomach, and testis by Mulware et al. [16] also suggest that the role of Zn in different organs may be diverse. Regarding Fe and Cu, they present similar behavior for both organs, decreasing in tumor tissue, being the decrease more pronounced for ovarian samples (Tables 5 and 6). Concomitant behavior between these two elements has also been reported in breast [27], kidney and stomach, but not for testis [16]. The role of Fe in prostate cancerous tissue has also presented conflicting results. According to the findings of Kwiatek et al. [29], the increase or decrease of Fe in prostate tissues may be related with the Gleason score stage, decreasing in a lower score and increasing in a higher score. According to Benninghoff et al. [2], Fe presented variable mass fraction in malignant *versus* normal colon tissue, but although no significant accumulation was established, a correlation of this element with the presence of Cr, Mn, and Co was determined. These elements, however, were not evaluated in this study. The oxidation state of Fe can also play a role in the type of cancer, as was shown by variations in Fe^{2+} and Fe^{3+} content between high-grade ovarian serous carcinoma, endometroid cystadenocarcinoma and borderline serous ovarian tumor [34]. Br and Ti also decreased in the tumor tissue, the latter more pronouncedly in prostate (Tables 5 and 6). The decrease of Br is in agreement to the behavior determined by Carvalho et al. [4] for prostate samples, whereas an increase of this element was verified for uterine samples. Regarding Ti, although its evaluation in human cancerous tissue is scarce, there is evidence of decrease in breast tumor tissue when compared to normal one [35].

Regarding the light elements, S and Ca followed the tendency of Zn, decreasing in ovarian and increasing in prostate tumor tissue (Tables 5 and 6). P and K increased in both organs with a higher increase in Ovary, similarly to what was determined for prostate by Kwiatek et al. [29] in different grades of Gleason score; in breast and uterus tissues by Machado et al. [13], using similar methodology; and in colon samples by Benninghoff et al. [2], using a TXRF apparatus.

Cl presented very slight variation between normal and tumor tissues, similarly to what was found for breast tissue [27] and prostate tissue with different grades of Gleason score [29]. Regarding this classification and the results obtained by Kwiatek et al. [29] and by Banas et al. [30], the decrease of Fe in tumor tissue together with a modest increase of K

and Cl, might be indicative of tissue with Gleason score of 3.

4. Conclusion

In this work, we take a step further for the achievement of a more accurate approach to quantify trace elements in biological matrices. In order to accomplish this, we have systematically experimented with several compositions of C, N, O and H (and also Na and Mg), for the determination of a dark matrix suitable for different tissue CRMs. The achieved matrix, DarkM, that presented a good compromise in accuracy for the light and heavy elements was found to be composed of 10 %H, 22 %C, 3 %N and 60 %O. This quantification approach, applying the Fundamental Parameters (FP) method using DarkM as matrix, was compared with a previously established quantification approach based on the construction of calibration curves, using CRMs, with the intensities corrected using the scattering peaks of the X-ray source in the sample. An increase of precision was one of the improvements found with the newly developed method, as the FP-approach contemplates matrix effects and the influence of other elements in the analytes' quantification. Moreover, elements present in the sample but not present in the CRMs can also be quantified. As a case study to implement the quantification approach, normal and tumor prostate and ovary tissues were evaluated and compared. The obtained results show that, for the reduced sample size and conditions of this study, there are different behaviors between the two types of tissue regarding the elemental concentrations. Zn and S increase in tumor prostate tissue and decrease in ovary tissue, while K increases in ovary tissue but not meaningfully in prostate tissue. For both organs, the concentrations of transition metals decrease in tumor tissues, while the concentration of lighter elements, P and Cl, increases. Published reports are mainly pertaining to breast and colon cancer, most likely because these are within the ones with higher incidence, so our findings can be both conflicting and in agreement with literature. Moreover, there can be other pathologies that can give rise to elemental differences found in the studied tissues, or even the risk of a misdiagnosis. This emphasizes the need for increased sampling, so that significant conclusions can be drawn in the future. Nevertheless, regardless of the number of samples, the accuracy of quantification is still a bottleneck in cancer research applications of X-ray spectroscopy, and the determination of a suitable dark matrix for routine analysis is a foothold in that direction.

Author statement

Ana Ensina – Formal analysis, data curation, writing original draft, writing review and editing

Patrícia M. Carvalho – formal analysis, writing original draft, writing review and editing

Jorge Machado – software

Maria Luísa Carvalho – data curation

Diogo Casal – data curation, writing original draft

Diogo Pais – supervision, writing review and editing

José Paulo Santos – supervision and writing original draft

António A. Dias – conceptualization and methodology

Sofia Pessanha – conceptualization, writing original draft, writing review and editing

Declaration of Competing Interest

There is no conflict of interest

Acknowledgements

This work was supported by Fundação para a Ciência e Tecnologia (FCT) (Portugal) through the research center grant UID/FIS/ 04559/2020 to LIBPhys-UNL from the FCT/MCTES/PIDDAC, Portugal. Patrícia M. S. Carvalho acknowledges the support of FCT (Portugal) under contract No. PD/BD/128324/2017.

References

- [1] M.A. Zoroddu, J. Aaseth, G. Crisponi, S. Medici, M. Peana, V.M. Nurchi, J. Inorg. Biochem. 195 (2019) 120–129.
- [2] L. Benninghoff, D. Von Czarnowski, E. Denkhaus, K. Lemke, Spectrochim. Acta - Part B At. Spectrosc. 52 (1997) 1039–1046.
- [3] E.N. Drake, H.H. Sky-Peck, Cancer Res. 49 (1989) 4210–4215.
- [4] M.L. Carvalho, T. Magalhães, M. Becker, A. von Bohlen, Spectrochim. Acta - Part B At. Spectrosc. 62 (2007) 1004–1011.
- [5] M. Yaman, Curr. Med. Chem. 13 (2006) 2513–2525.
- [6] D.S. Auld, BioMetals 14 (2001) 271–313.
- [7] M.K. Schwartz, Cancer Res. 35 (1975) 3481–3487.
- [8] T. Magalhães, A. von Bohlen, M.L. Carvalho, M. Becker, Spectrochim. Acta - Part B At. Spectrosc. 61 (2006) 1185–1193.
- [9] K. Geraki, M.J. Farquharson, D.A. Bradley, Phys. Med. Biol. 47 (2002) 2327–2339.
- [10] M.E. Poletti, O.D. Gonçalves, C.A. Pérez, S.D. Magalhães, Radiat. Phys. Chem. 71 (2004) 975–976.
- [11] M.J. Farquharson, K. Geraki, X Ray Spectrom. 33 (2004) 240–245.
- [12] R. Sitko, B. Zawiska, in: S.K. Sharma (Ed.), X Ray Spectroscopy, InTech Open, 2012, pp. 137–162.
- [13] J. Machado, P.M. Carvalho, A. Félix, D. Doutel, J.P. Santos, M.L. Carvalho, S. Pessanha, J. Anal. At. Spectrom. 35 (2020) 2920–2927.
- [14] P.M.S. Carvalho, S. Pessanha, J. Machado, A.L. Silva, J. Veloso, D. Casal, D. Pais, J. P. Santos, Spectrochim. Acta - Part B At. Spectrosc. 174 (2020), 105991.
- [15] S. Fruncillo, M. Trande, C.F. Blanford, A. Astegno, L.S. Wong, Anal. Chem. 91 (2019) 11502–11506.
- [16] S.J. Mulware, J. Biophys. 2013 (2013), 192026.
- [17] M. Mantler, N. Kawahara, Rigaku J. 21 (2004) 17–25.
- [18] A. Rindby, X Ray Spectrom. 18 (1989) 113–118.
- [19] L. Pascolo, I. Venturin, A. Gianoncelli, R. Bortul, G. Zito, E. Giolo, M. Salomé, D. E. Bedolla, M. Altissimo, M. Zweyer, G. Ricci, Reprod. Biomed. Online 37 (2018) 153–162.
- [20] J.H.H. S.M. Seltzer, Material Constants and Composition for Compounds and Mixtures, National Institute of Standards and Technology, 1996.
- [21] J. Sherman, Spectrochim. Acta 7 (1955) 283–306.
- [22] E. Marguí, R. van Grieken, X-ray Fluorescence Spectrometry and Related Techniques: an Introduction, Momentum Press, New York, 2013.
- [23] I. Antcheva, M. Ballintijn, B. Bellenot, M. Biskup, R. Brun, N. Buncic, P. Canal, D. Casadei, O. Couet, V. Fine, L. Franco, G. Ganis, A. Gheata, D.G. Maline, M. Goto, J. Iwaszkiewicz, A. Kreshuk, D.M. Segura, R. Maunder, L. Moneta, A. Naumann, E. Offermann, V. Onuchin, S. Panacek, F. Rademakers, P. Russo, M. Tadel, Comput. Phys. Commun. 180 (2009) 2499–2512.
- [24] D.O. Olaiya, O.I. Alatis, O.O. Oketayo, O.E. Abiye, E.I. Obianjunwa, F.A. Balogun, Breast Cancer Basic Clin. Res. 13 (2019) 1–6.
- [25] M. Nasiadek, T. Krawczyk, A. Sapota, Hum. Exp. Toxicol. 24 (2005) 623–630.
- [26] M.P. Silva, D.F. Soave, A. Ribeiro-silva, M.E. Poletti, BMC Res. Notes 5 (2012) 194–205.
- [27] A.N. Garg, V. Singh, R.G. Weginwar, V.N. Sagdeo, Biol. Trace Elem. Res. 46 (1994) 185–202.
- [28] N. Cabré, F. Luciano-Mateo, M. Arenas, M. Nadal, G. Baiges-Gaya, A. Hernández-Aguilera, I. Fort-Gallifa, E. Rodríguez, F. Riu, J. Camps, J. Joven, J.L. Domingo, Breast 42 (2018) 142–149.
- [29] W.M. Kwiatak, A. Banaś, M. Gajda, M. Galka, B. Pawlicki, G. Falkenberg, T. Cichocki, J. Alloys. Compd. 401 (2005) 173–177.
- [30] A. Banas, W.M. Kwiatak, K. Banas, M. Gajda, B. Pawlicki, T. Cichocki, J. Biol. Inorg. Chem. 15 (2010) 1147–1155.
- [31] R.G. Leitão, A. Palumbo, P.A.V.R. Souza, G.R. Pereira, C.G.L. Canellas, M.J. Anjos, L.E. Nasciutti, R.T. Lopes, Radiat. Phys. Chem. 95 (2014) 62–64.
- [32] V.K. Shukla, T.K. Aduka, S.P. Singh, C.P. Mishra, R.N. Mishra, J. Surg. Oncol. 84 (2003) 31–35.
- [33] J. Wood, P.M. Suter, R.M. Russel, Amer. J. Clin. Nutr. 62 (1995) 493–505.
- [34] D.M. Krauze, M. Grzelak, P. Wróbel, G. Veronesi, H. Castillo, L. Chmura, D. Adamek, R. Jach, M. Lankosz, J. Anal. At. Spectrom. 33 (2018) 1638–1644.
- [35] M. Piacenti da Silva, O.L.A.D. Zucchi, A. Ribeiro-Silva, M.E. Poletti, Spectrochim. Acta B 64 (2009) 587–592.

