



**INSTITUTO UNIVERSITÁRIO EGAS MONIZ**

**MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA DENTÁRIA**

**ANÁLISE ELEMENTAR DE TUMORES E OUTRAS SITUAÇÕES  
CLÍNICAS COM BASE NO MÉTODO DA FLUORESCÊNCIA DE  
RAIO-X**

Trabalho submetido por

**Sofia Paulos de Jesus Coroado Farinha**

para a obtenção do grau de Mestre em Medicina Dentária

**Outubro de 2020**



**INSTITUTO UNIVERSITÁRIO EGAS MONIZ**

**MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA DENTÁRIA**

**ANÁLISE ELEMENTAR DE TUMORES E OUTRAS SITUAÇÕES  
CLÍNICAS COM BASE NO MÉTODO DA FLUORESCÊNCIA DE  
RAIO-X**

Trabalho submetido por

**Sofia Paulos de Jesus Coroado Farinha**

para a obtenção do grau de Mestre em Medicina Dentária

Trabalho orientado por

**Prof. Doutor Carlos Zagalo**

**Outubro de 2020**

## Agradecimentos

Quero agradecer, em primeiro lugar, ao meu orientador, Professor Doutor Carlos Zagalo, pela sua prontidão, disponibilidade e simpatia na realização deste projeto, bem como pelo seu auxílio desde o primeiro dia, nomeadamente na escolha do tema de trabalho.

Em segundo lugar, quero prestar o meu sincero agradecimento a todos os professores do Instituto Universitário Egas Moniz, pelos conhecimentos que conosco partilham durante os 5 anos do Curso de Mestrado Integrado de Medicina Dentária e que constituem a base da nossa formação profissional, com uma importância sem igual e marca que são para todo o nosso futuro.

Gostaria também de agradecer aos meus pais, que sempre me apoiaram e prestaram todas as condições para que pudesse realizar a integridade deste curso com sucesso, e ao meu irmão, Ricardo, que sempre se mostrou extremamente orgulhoso por ter uma irmã futura-dentista.

À minha Tia Graça que me contactou em todas as épocas de exames desejando-me força, sorte e bom trabalho, e à minha Avó Domicilia que sempre acreditou no meu potencial, estou-lhes muito grata e, embora não possa partilhar essa gratidão com elas neste mundo, sei que estão a olhar por mim.

Aos meus amigos e colegas que me acompanharam neste percurso, o meu agradecimento especial. Ninguém caminha sozinho e a importância deles é de um peso enorme durante toda a vida académica, através da partilha de saberes, de momentos de tensão e descompressão comuns que, por esse motivo, tanto nos uniram.

Aos desafios impostos no caminho, porque me tornaram mais capaz e madura, permitindo-me conhecer melhor a mim própria e à minha vocação.



## Resumo

A espectroscopia por fluorescência de raios-X (XRF) é uma técnica não destrutiva que possibilita a análise multielementar de materiais baseando-se na radiação característica por eles emitida.

Esta técnica permite uma análise qualitativa e quantitativa de forma simples, provocando a ionização dos níveis internos dos átomos das amostras. Aquando da reorganização do átomo e retorno ao seu estado fundamental, ocorre uma libertação de energia com emissão de fótons X. A radiação emitida será característica do elemento em causa, permitindo a identificação do mesmo na amostra.

As amostras, ao serem analisadas por este método, não necessitam de preparações extensivas, podendo até não necessitar de qualquer tipo de preparação prévia. Para além disso permite a análise de um elevado número de espécimes, sendo um método que possui alta sensibilidade (Silva, Soave, Ribeiro-Silva & Poletti, 2012).

A análise amostral pode ser realizada por um método de química analítica designado por fluorescência de raios-X por dispersão de comprimento de onda (WDXRF) ou fluorescência de raios-X por energia dispersiva (EDXRF). Existem ainda subdivisões da EDXRF como é o caso da TXRF e da  $\mu$ -EDXRF que possuem certas especificidades mais adequadas para determinadas medições.

Atualmente, muitas instrumentações fazem uso da XRF porque, para além da sua colaboração para a concretização de exames na área das ciências médicas, é também de extremo interesse e utilidade em diversas outras áreas.

Esta monografia visa focar o préstimo da XRF na área da medicina no geral e da medicina dentária de forma mais concreta e específica, fazendo uma ponte para o seu contributo na oncologia e patologia oral, apresentando, portanto, dois temas que se interrelacionam, o dos fundamentos da XRF e a investigação dos elementos vestigiais pelas suas técnicas analíticas, quer em termos patológicos das lesões orais, como em termos práticos dos materiais dentários.

Palavras-chave: Fluorescência de raios-X, Patologia Oral, Medicina Dentária, Análise Elementar

## Abstract

X-ray fluorescence spectroscopy (XRF) is a non-destructive technique that allows a multi-element analysis of materials based on the characteristic radiation emitted by them. This technique allows a qualitative and quantitative analysis in a simple way, causing the ionization of the internal levels of the atoms of the samples. When the atom is reorganized and returns to its fundamental state, energy is released with the emission of X-ray photons. The emitted radiation will be characteristic of the element in question, allowing its identification in the sample.

The samples, when analysed by this method, do not require extensive preparation, and may not even need any type of prior preparation. In addition, it allows the analysis of many samples, and it is a method provided with high sensitivity (Silva, Soave, Ribeiro-Silva & Poletti, 2012).

Sample analysis can be performed by an analytical chemistry method called X-ray fluorescence by wavelength dispersion (WDXRF) or energy dispersive X-ray fluorescence (EDXRF). There are also subdivisions of EDXRF such as TXRF and  $\mu$ -EDXRF with certain specificities that makes them more specific and suitable to be applied in certain measurements.

Currently, the instruments that are based on XRF, in addition to their importance and collaboration to the medical field, are also of extreme interest and usefulness in several other areas.

The present work aims to focus on the usefulness of the XRF technique in the field of medicine in general and dentistry in particular, making note of its contribution in oncology and oral pathology presenting, therefore, two interrelated themes, the fundamentals of XRF and the investigation of trace elements by its analytical techniques, both in pathological terms of the oral lesions and in practical terms of the investigation of elements in dental materials.

Keywords: X-ray Fluorescence, Oral Pathology, Dentistry, Elemental Analysis

## Índice Geral

Resumo .....	1
Abstract.....	2
Índice Geral .....	3
Índice de Figuras .....	4
Índice de Tabelas .....	6
Lista de siglas .....	7
Introdução.....	9
Desenvolvimento.....	15
1.ENQUADRAMENTO E DESCOBERTA DOS RAIOS-X.....	15
2.FUNDAMENTOS DA FLUORESCÊNCIA DE RAIOS-X (XRF).....	22
2.1 Dispersão/Espalhamento- Ruído de fundo (background) .....	28
2.2 Enquadramento Da XRF- Contexto Histórico E Atualidade .....	30
2.3 Amostras para análise por XRF .....	34
3.PRODUÇÃO DE RAIOS-X.....	38
4.INSTRUMENTAÇÃO DE XRF .....	41
Tecnologias de Detecção de Radiação Secundária (WDXRF e EDXRF).....	41
4.1 Técnica De Fluorescência De Raios-X Por Dispersão De Comprimento De Onda (WDXR) .....	43
4.2 Técnica De Fluorescência De Raios-X Por Dispersão De Energia (EDXRF)..	46
4.3 Comparação EDXRF e WDXRF .....	49
4.4 Fluorescência de Raios-X por Reflexão Total (TXRF) .....	51
4.5 Micro-Fluorescência de Raios-X ( $\mu$ -XRF) .....	52
4.6 Sistemas Portáteis De Fluorescência De Raios-X.....	53
4.7 Comparação da XRF com outras técnicas analíticas .....	54
5.ELEMENTOS NO ORGANISMO.....	56
Elementos vestigiais (trace elements) .....	57
6.APLICAÇÕES DA FLUORESCÊNCIA DE RAIOS-X (XRF) NA MEDICINA..	59
6.1 Cancro, Outras Patologias e Lesões Tumerais.....	60
6.2 Medicina Dentária .....	67
7.CONSIDERAÇÕES FINAIS .....	81
Conclusões.....	85
Bibliografia.....	87

## Índice de Figuras

Figura 1- Whilelm Conrad Röntgen .....	15
Figura 2- Esquema simplificado de um tubo de raios-X, adaptado de Caetano, T. J. A., 2018 .....	16
Figura 3- Radiografia da mão de Ana Bertha Ludwig revelando a sombra dos ossos e do anel que usava- primeira imagem impressa de uma estrutura interna do corpo humano- adaptado de Martins, W. D., 2005.....	19
Figura 4- Mecanismo de fluorescência de raios-X adaptado Caetano, 2018 .....	23
Figura 5- Produção de raios-X característicos, adaptado de Severo, 2010. ....	24
Figura 6- Representação dos níveis de energia de um átomo, adaptado Knoll, 2010....	24
Figura 7- Transições dos elétrões, adaptado de Klockenkämper, 1997 .....	25
Figura 8- Representação do Efeito Auger .....	26
Figura 9- Rendimento de fluorescência de raios-X e do eletrão Auger vs. N.º atómico (Z) do elemento analisado, adaptado de x. As letras [K], [L] e [M] traduzem camadas onde ocorre a valência. Adaptado de Caetano, 2018 .....	27
Figura 10- Dispersão de Rayleigh. Adaptado de Costa, 2015.....	29
Figura 11- Representações da Dispersão de Compton. Adaptado de Costa, 2015.....	29

Figura 12- Representação esquemática da preparação de amostras para análise por XRF adaptado de Marguí et al., 2006 .....	37
Figura 13- Tubo de raios-X. A- ânodo; C- cátodo; W- janela. Adaptado de Beckhoff et al., 2006 .....	39
Figura 14- Representação gráfica comparativa da XRF convencional com a SR-XRF, adaptado de Uo et al., 2015 .....	41
Figura 15- Esquema dos espectrómetros EDXRF e WDXRF. Adaptado de Rousseac & Rousseac, 2013 .....	43
Figura 16- Arranjo básico do equipamento de WDXRF no qual, para a realização das medidas, o cristal analisador é girado de um ângulo $\theta$ enquanto o detetor é girado de um ângulo $2\theta$ em relação ao feixe de raios-X característicos incidente no cristal. Adaptado de Janssens, 2004 .....	44
Figura 17- Relação entre amostra, cristal analisador e detetor no círculo de Rowland. Adaptado de Beckhoff et al.,2006 .....	45
Figura 18- Sistemas EDXRF adaptado de Klockenkämper, R. 1997.....	47
Figura 19- Ângulo formado entre o detetor e o tubo de raios-X. Adaptado de Klockenkämper, R. 1997.....	48
Figura 20- Comparação da geometria do raio de excitação para XRF clássico e para TXRF adaptado de Klockenkamper, 1997 .....	52

## Índice de Tabelas

Tabela 1- Tabela elucidativa dos cristais utilizados nos espectrómetros WDXRF. Adaptada de Janssens, 2004.

..... 45

*Tabela 2- Comparação das técnicas EDXRF e WDXRF. Adaptado de Brouwer, 2010.*

..... 50

Tabela 3- Métodos de Análise de Elementos Vestigiais. Adaptado de Uo et al., 2015 . 55

## Lista de siglas

AAS- Atomic Absorbtion Spectroscopy

Al- Alumínio

Ar- Argônio

As- Arsénio

Au- Ouro

B- Boro

Ba- Bário

Be- Berílio

Bi- Bismuto

Br- Bromo

C- Carbono

Ca- Cálcio

Cd- Cádmiio

Cl- Cloro

Co- Cobalto

Cr- Cromo

Cu- Cobre

d- Distância interplanar do cristal difrator (nm)

EDXRF- Energy Dispersive X-Ray Fluorescence (Fluorescência de raios-X por energia dispersiva)

EPMA- Electron Probe Micro Analyzer (Microsonda de Eletrões)

F- Flúor

Fe- Ferro

GFAAS- Graphite Furnace Atomic Absorption

H- Hidrogénio

He- Hélio

Hf- Háfnio

Hg- Mercúrio

I- Iodo

ICP-AES- Inductively Coupled Plasma- Atomic Emission Spectroscopy (Espectroscopia de emissão atômica por plasma acoplado indutivamente)

ICP-MS- Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry (Espectroscopia de massa por plasma acoplado indutivamente)

K- Potássio

Li- Lítio

Mg- Magnésio

Mn- Manganês

Mo- Molibdénio

N- Nitrogénio

Na- Sódio

Ni- Níquel

O- Oxigénio

P- Fósforo

Pb- Chumbo

S- Enxofre

SEM/EDS- Scanning Electron Microscopy with Energy Dispersive Spectroscopy

Sr- Estrôncio

Ti- Titânio

TXRF- Total Reflection X-Ray Fluorescence (Fluorescência de raios-X por reflexão total)

U- Urânio

V- Vanádio

W- Tungsténio

WDXRF- Wavelength Dispersive X-Ray Fluorescence (Fluorescência de raios-X por dispersão de comprimento de onda)

XRF- X-Ray Fluorescence (Fluorescência de raios-X)

Z- Número Atómico

Zn- Zinco

Zr- Zircónio

$\mu$ -XRF- Micro X-Ray Fluorescence (Microfluorescência de raios-X)

$\lambda$ - Comprimento de onda

$\theta$ - Ângulo entre a radiação difratada pelo cristal e a sua superfície

## Introdução

Em 1895 Wilhelm Röntgen descobre de forma praticamente acidental os raios-X, como resultado de experiências executadas com tubos nos quais ocorria a descarga de gases rarefeitos. Apurou que, ao dispor um alvo fluorescente na vizinhança desses tubos, o alvo se tornava luminoso, mesmo depois de o tubo ter sido coberto por papel preto e que esta fluorescência se mantinha para grandes distâncias aos tubos. Röntgen designou os raios provenientes do tubo, e responsáveis por este fenómeno, por raios-X devido à sua natureza desconhecida (Martins, 2005).

Apesar da descoberta mais relevante para a origem e desenvolvimento das tecnologias baseadas em raios-X ter sido a de Röntgen a partir das suas experiências com raios catódicos, muitos outros investigadores prestaram o seu contributo para que isso se tornasse possível (Nascimento-Dias, Oliveira & Anjos, 2017).

Foi definido, nessa época, que o fenómeno-base da produção de raios-X era consequência de feixes de eletrões emitidos por um fio aquecido e atraídos por uma placa metálica com polaridade positiva, o ânodo, com relação com a placa emissora, o cátodo, ocorrendo todo este processo num recipiente com atmosfera rarefeita. O comprimento de onda dos raios-X situa-se entre os raios- $\gamma$  e a luz ultravioleta e varia de 0.01 a 10 nm, correspondendo a energias compreendidas entre os 0.125 e 125 KeV (Brouwer, 2010).

O primeiro registo “*in vivo*” realizado com recurso aos raios-X foi o da mão da esposa de Röntgen e, a partir desse fenómeno, houve excelentes repercussões e os raios-X passaram a ser amplamente utilizados, abrindo novos campos de pesquisa científica e novas aplicações tecnológicas (Martins, 2005). É isto que é aprofundado na primeira parte desta revisão de literatura.

Passa-se então, de seguida, para um analisar com mais pormenor dos conceitos relacionados com Fluorescência de raios-X (XRF), que constitui um sistema de espetrometria que tem por base a deteção da radiação X emitida a partir de átomos

excitados. É um método de análise elementar, a nível atómico, utilizando para o efeito uma fonte primária de excitação (radiação primária) que incide numa amostra permitindo a leitura dos raios-X emergentes da mesma, baseando-se num processo que consiste na ejeção dos eletrões (ionização) da camada interna da sua orbita, provocando uma condição de instabilidade, até ao posterior preenchimento da vaga por eles deixada por um outro eletrão de uma camada exterior a essa que irá restabelecer o estado de equilíbrio. Esta transição (movimentação eletrónica) é acompanhada por uma emissão de um fóton fluorescente de raios-X característico do elemento em questão, possibilitando a identificação do mesmo, através da medição da energia por este emitida, e cuja intensidade será tanto maior quanto a concentração do mesmo na amostra. Cada elemento constituinte da amostra emite raios-X com comprimentos de onda e energias específicas, e os espetros de linhas formulados permitem averiguar a composição química da amostra, expondo assim a relação existente entre a energia emitida pelo raio-X e o número atómico (Z) dos elementos presentes nos espécimes em análise (Rouessac & Rouessac, 2013).

Quando o átomo recupera a sua estabilidade, dá-se uma libertação de energia que é equivalente à diferença de energia entre as duas orbitais envolvidas (diferença entre o nível inicial e final de energia), correspondendo à passagem entre níveis. De modo a provocar a emissão do eletrão do átomo, é preciso ceder-lhe uma energia superior à sua energia de ligação, cujo valor é calculado aproximadamente a partir da teoria atómica de Bohr para o átomo de hidrogénio e das experiências de Moseley (Resnick & Eisberg, 1979).

A capacidade de detetar os elementos químicos presentes nas amostras e quantificar as suas concentrações prende-se com o facto de estes, quando expostos à irradiação por eletrões, prótons, raios-X ou gama, emitirem uma radiação de fluorescência específica e típica sua, não havendo similitude entre as radiações de radiofrequência emitidas por diferentes átomos da Tabela Periódica. A radiação eletromagnética incidente interage com a amostra, podendo ocorrer os fenómenos de absorção, emissão e espalhamento da radiação (Santos, Gama, França, Souza & Matos, 2013).

A XRF permite ainda a obtenção de informações acerca da localização superficial do elemento emissor na amostra, podendo ser utilizada não só para quantificar a

concentração de elementos presentes, podendo ainda ser empregue de modo a obter uma localização precisa dos mesmos (Nascimento-Dias et al., 2017).

O espectrómetro de XRF é composto por uma fonte de excitação, a amostra, e um detetor. Existem dois tipos *major* de espectrómetros, os WDXRF e os EDXRF, que se diferenciam maioritariamente pelo princípio de análise dos raios-X secundários emitidos.

Os princípios técnicos e experimentais da XRF foram estabelecidos durante a segunda metade dos anos 20 do século XX e a espectrometria de raios-X foi desenvolvida após a Segunda Guerra Mundial. Desde as experiências de Moseley que a XRF tem vindo a demonstrar uma evolução constante e, quando comparada com outras técnicas analíticas semelhantes, apresenta diversas vantagens, sendo uma técnica fiável que permite a irradiação de uma grande área de superfície, não dando lugar a erros como poderiam estar maioritariamente sujeitos outros métodos utilizados para os mesmos efeitos e com funções semelhantes a estes, ocorrendo também muito menos interferência das linhas de diferentes elementos com composições elementares complexas em relação a outras técnicas (Ribeiro, 2006).

A XRF possui a capacidade de medir os elementos desde o Sódio ao Urânio de forma qualitativa e quantitativa nos diversos estados da matéria com bastante precisão e reprodutibilidade. Os materiais sujeitos a análise XRF podem ser variados, desde vidros a líquidos e pinturas e até mesmo sangue, soro, saliva e muitos outros materiais, biológicos ou não.

É atualmente considerada um excelente método de análise por não provocar danos nem destruição nas amostras, sendo por isso viável para utilização em tecidos humanos e em objetos de herança cultural, valor artístico e arqueológico, podendo realizar a avaliação ainda, de amostras heterogéneas e de formas pouco regulares. Com o surgimento dos aparelhos portáteis que funcionam pela EDXRF, permite ainda realizar análises *in situ* o que pode ser uma mais-valia em muitos casos. Existem ainda diversas aplicações biomédicas que incluem estudos em dentes e materiais dentários como as resinas compostas (Navarro-Pedreño, Gomez & Mataix, 1993).

Na última parte dar-se-á destaque às aplicações da XRF, especialmente no seu contributo para a diversidade de especialidades da Medicina Dentária como a Patologia Oral. O cancro oral é atualmente uma das poucas doenças que afetam a cavidade oral com potencial de fatalidade presentes no mundo ocidental, sendo o sexto tipo de cancro com maior incidência a nível mundial. A lesão maligna mais comum na cavidade oral é o Carcinoma Espinocelular, contudo existem outros tipos de cancro como os Sarcomas, Linfomas e Melanomas que também são relevantes. Nas populações ocidentais, a região da cavidade oral mais afetada pelo cancro oral é a língua. Em Portugal a incidência do cancro oral e da orofaringe tem vindo a tomar proporções preocupantes com um aumento crescente de casos (Zini, Czerninski, & Sgan-Cohen, 2010).

O diagnóstico do cancro oral é muitas vezes tardio, fazendo com que a incidência do mesmo tenha vindo a sofrer um aumento a nível global na última década e, por isso, cabe aos profissionais de saúde, e especialmente ao Médico Dentista, estar atento a esta situação, elaborando sempre uma observação cuidada de todas as regiões da cavidade oral de forma a tentar detetar, o mais precocemente possível, a existência de qualquer tipo de lesão e, desta forma, garantir a melhoria da qualidade de vida dos pacientes proporcionando-lhes tratamentos atempados em fases precoces da instalação das patologias. Infelizmente, contudo, ainda se verifica muitas vezes que a procura de aconselhamento médico e profissional por parte dos pacientes é tardia em relação ao aparecimento de alguma lesão e à aparição de qualquer sintoma, sendo que sem sintomatologia muitos ignoram os sinais de doença (Gómez et al., 2010; Messadi, 2013).

A biópsia e posterior avaliação histológica continuam a ser o *Golden Standard* para o diagnóstico do cancro oral. Os biomarcadores essenciais para o diagnóstico e prognóstico do cancro oral são “qualquer elemento mensurável que permita demonstrar a presença de potencial maligno ou malignidade, ou prever o comportamento do tumor em relação ao tratamento” (Silva et al., 2012). Os elementos vestigiais (*trace elements*) possuem um papel importante em determinadas funções vitais do organismo e, quando expressos de forma anormal, contribuem para a formação de processos patológicos como invasão, metástases e crescimento de tumores.

O cobre, o ferro e o zinco, entre outros, podem ser encontrados em concentrações mais elevadas nos tecidos neoplásicos, sejam eles malignos ou benignos, quando comparados

com as concentrações presentes em tecidos saudáveis, possuindo o potencial de biomarcadores para o diagnóstico e prognóstico do cancro, porém o seu papel parece ainda não estar totalmente descrito na literatura (Mulware, 2012; Silva et al., 2012).

As técnicas analíticas de XRF permitem a análise destes elementos vestigiais em amostras teciduais dos indivíduos, existindo já alguns estudos que comparam os níveis dos oligoelementos em tecidos neoplásicos com os presentes em tecidos saudáveis, contudo estes estudos são principalmente realizados em tecidos como os rins, pulmões, fígado, mama e próstata (Mulware, 2013), existindo pouca variedade de estudos que apliquem a presença de determinados elementos traço e realizem a mesma comparação tecidual carcinomatosa e não carcinomatosa em tecidos da cavidade oral (Ayinampudi & Narsimhan, 2012; Shetty, Babu, Kumari, Shetty, Hegde & Karikal, 2013).

Na presente revisão de literatura destaca-se a utilização da XRF com vista a análise de amostras de tecidos biológicos por forma a investigar a influência dos elementos vestigiais no desenvolvimento de neoplasias, principalmente em processos carcinogénicos concentrando-se também na sua aplicabilidade na área da Medicina Dentária, quer a nível das diferentes especialidades, como nos diversos estudos da composição elementar de materiais dentários (Aro, Amarasiriwardena, Lee, Kim & Hu, 2000).



## Desenvolvimento

### 1. ENQUADRAMENTO E DESCOBERTA DOS RAIOS-X

A radiação-X é um tipo de radiação eletromagnética com comprimentos de onda entre os 0.005 e 10 nm, e frequências na ordem dos  $3 \times 10^8$  m/s.

Foi no ano de 1895 que Wilhelm Conrad Röntgen (Figura 1), Físico Alemão e professor na Universidade de Würzburg descobre, acidentalmente, os raios-X aquando de experiências com descargas de raios catódicos de alta tensão, num tubo de descarga, fazendo com que os eletrões emitidos pelo polo negativo (cátodo) fossem captados pelo polo positivo (o ânodo) via um fio aquecido em condições de atmosfera rarefeita (Nascimento-Dias et al., 2017).



*Figura 1- Wilhelm Conrad Röntgen*

A energia dos raios-X é controlada pela tensão (kV) aplicada entre o cátodo e o ânodo, enquanto que a intensidade do feixe de raios-X depende do número de eletrões emitidos pelo filamento que, por sua vez, depende da temperatura a que este se encontra. A temperatura do filamento irá variar com a intensidade da corrente ( $\mu\text{A}$ ) nele aplicada. Os raios-X gerados possuem um contínuo de energias iguais ou inferiores à energia inicial do eletrão, que é definida pela tensão do tubo de raios-X (kV). Quanto maior tensão, maior a energia dos eletrões emitidos, o que aumenta a capacidade de alcançar regiões dos átomos-alvo mais sujeitas à força nuclear, culminando na emissão de fotões de raios-X mais energéticos. A Figura 2 ilustra, de forma simplificada o funcionamento de um tubo de raios-X (Khalid, Khan & Anwar, 1996).

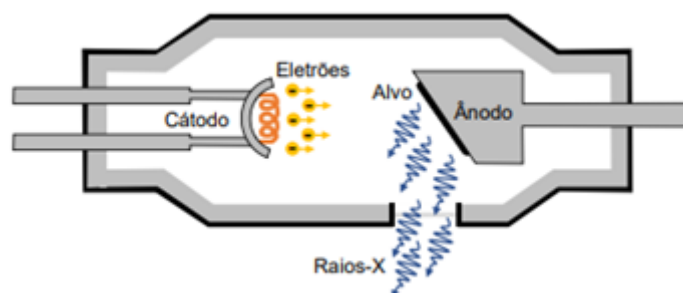


Figura 2- Esquema simplificado de um tubo de raios-X, adaptado de Caetano, T. J. A., 2018

Para atribuir a Wilhelm Conrad Röntgen o título de Pai dos Raios-X é necessário, contudo, ter em conta o papel de muitos outros físicos, matemáticos e investigadores, desde o início do século XVII, que prestaram todos os seus contributos de forma a tornar esta descoberta possível, como é o caso de Otto Von Guericke que colaborou com dois conceitos chave para esta descoberta, a produção de um vácuo eficiente e de uma corrente elétrica de onda contínua (Underwood, 1945).

No século XVII, Von Guericke fabricou a primeira bomba de ar que produzia condições de vácuo e o primeiro gerador elétrico, tendo sido posteriormente utilizados por Isaac Newton e outros investigadores, o que conduziu à possibilidade de realização da primeira transmissão de um impulso elétrico num condutor. Francis Hauksbee (1666-1713) foi o pioneiro na produção de descargas elétricas nestas condições de vácuo, resultando na emissão luz.

Já no século XIV, foram fabricadas bobinas de indução por Nicholas Joseph Callan, e por Daniel Rhümkorff (que aperfeiçoou os modelos fabricados por Callan tendo apelidado o seu instrumento de bobina de indução de Rhümkorff) possibilitando a realização de descargas elétricas possantes através de um gás, e também a emissão de luz dentro do tubo de vácuo (Guedes, 2002).

Estes avanços permitiram que um número cada vez superior de cientistas e investigadores realizassem experiências que, por sua vez, conduziram ao aperfeiçoamento dos equipamentos existentes e aprimoramento de certas técnicas. Passaram a existir bombas de vácuo mais eficazes tendo-se dado continuidade à realização de descargas elétricas em gases rarefeitos. A Bomba de Geissler, desenvolvida pelo Físico Johann Heinrich Geissler, foi a primeira bomba de vácuo de mercúrio, obtendo condições de vácuo superiores às existentes na altura, tendo sido posteriormente melhorada por Julius Plücker que propôs uma modificação possibilitando concentrar a descarga luminosa num capilar no centro do tubo, tendo observado que a descarga de luz entre os elétrodos se estendia até às paredes do vidro próxima do elétrodo negativo, sofrendo deflexão quando submetida à ação de campos magnéticos. Plücker foi o primeiro a observar raios catódicos (e a deflexão que sofriam sobre a ação de um campo magnético). Johann Hittorf realizou as mesmas experiências que Plücker mas com tubos de vácuo superior, tendo concluído que se o ar fosse removido de forma gradual do tubo, uma “luz” seria formada no cátodo provocando fluorescência nas suas paredes e cuja intensidade de cor seria diferente consoante o grau de rarefação da atmosfera do tubo, tendo verificado também que, ao interpor objetos entre o cátodo e o vidro, se formava uma sombra à sua volta, acompanhando o seu formato (Pereira, 2012).

O termo “raios catódicos” foi introduzido pela primeira vez por Eugene Goldstein tendo mostrado que estes alteravam o seu trajeto aquando da ação de campos magnéticos, não sendo emitidos em todas as direções, mas sim perpendicularmente à superfície do cátodo. William Crookes opunha-se a certas ideias de Goldstein, admitindo que os raios catódicos consistiam em moléculas carregadas eletricamente, de natureza corpuscular, as quais integravam o quarto estado da matéria (“matéria radiante”). No ano de 1878, Crookes desenvolveu os tubos de Crookes com paredes de vidro mais grossas e em formato de cabaça com um vácuo mais poderoso que os anteriores, em que os elétrodos se disponham perpendicularmente um em relação ao outro (Pereira, 2012)

Mais tarde, Philipp Lenard estudou o facto de os raios catódicos produzidos no interior do tubo de Crookes serem passíveis de ser observados no exterior do mesmo, criando os tubos de Lenard, com uma abertura pela qual deixava passar estes raios para o exterior, que tomaram o nome de raios de Lenard. Lenard afirmou que estes possuíam a capacidade

de tornarem o ar exterior eletricamente condutor, que conseguiam atingir alguns centímetros de distância quando expostos ao meio aéreo e provocavam luminescência em sais fluorescentes, bem como conseguiam sensibilizar placas fotográficas e penetrar em superfícies opacas, tendo ainda constatado que os raios tinham um menor poder de deflexão por um íman no exterior quando comparados com os raios no interior do tubo.

No ano de 1895, Perrin concluiu, através das suas experiências, que os raios catódicos possuíam carga negativa e Joseph John Thomson, no final da década de 90 do século XIX, confirmou a natureza corpuscular dos raios catódicos tendo conseguido medir a carga das partículas que os constituíam, designando-as de elétrons.

Henri Becquerel em 1896 foi outro cientista cujos trabalhos se tornaram relevantes, tendo baseado os seus estudos na radioatividade do urânio, investigando a ocorrência de fosforescência de diferentes substâncias com a produção de raios-X, tendo sido os sais de urânio umas das substâncias utilizadas (Kaye, 1923).

Röntgen não foi o primeiro a produzir raios-X, tendo sido, efetivamente, o pioneiro na documentação dos mesmos fazendo uso, sim, de raciocínios inovadores.

O que Röntgen fez foi colocar, numa sala escurecida, uma caixa totalmente coberta por papel preto (com total ausência de luz) dentro da qual instalou um tubo de vácuo de Hittorf-Crookes e, sobre este, fez emitir, com recurso a uma bobina de indução de Rhümkorff, energia elétrica de alta tensão. Röntgen notou que alguns cristais de platinocianeto de bário,  $Ba[Pt(CN)_4]$ , perto do tubo, ficavam luminescentes aquando da ocorrência de descargas. Assim, foi-lhe possível verificar a existência de fluorescência nesse ecrã com os cristais, colocado a alguns metros do equipamento. A luz fluorescente era “projetada” no ecrã, mesmo estando a uma distância de 2 metros do equipamento (distância que era muito superior à considerada para os raios catódicos percorrerem o ar). De seguida, Röntgen interpôs entre o tubo e o ecrã diversos objetos que considerava serem opacos aos raios catódicos, tendo constatado a continuação da existência de fluorescência no ecrã (Ward, 1896; Underwood, 1945; Seliger, 1995).

Repetiu estes procedimentos para objetos de diversas espessuras, expondo-os à radiação de modo a tirar ilações sobre o seu poder de penetrância, contudo foi ao colocar a sua mão entre o tubo e o ecrã, enquanto testava a capacidade do chumbo de bloquear a

radiação, que verificou que os seus ossos se projetavam no ecrã fluorescente, enquanto que os tecidos moles circundantes apareciam como meros contornos translúcidos. Assim, tendo em mente que os raios catódicos impressionavam placas fotográficas, tentou aplicar o mesmo processo de registo aos raios-X, substituindo o ecrã por uma placa fotográfica, obtendo assim a documentação da primeira dita radiografia da mão da sua mulher, Ana Bertha Ludwig (Figura 3).



*Figura 3- Radiografia da mão de Ana Bertha Ludwig revelando a sombra dos ossos e do anel que usava- primeira imagem impressa de uma estrutura interna do corpo humano- adaptado de Martins, W. D., 2005.*

O fenómeno que ocorre no tubo de raios-X (selado sob vácuo) é a emissão termiónica ou efeito Edison. No tubo estão presentes os tais constituintes referidos: ânodo e cátodo e, sob este último, é efetuada uma projeção de corrente elétrica que aquece um filamento (metal pesado) nele contido, promovendo uma excitação dos eletrões aí presentes, sendo posteriormente ejetados da superfície desse mesmo filamento. Aquando desta ocorrência, decorre outro fenómeno que consiste na aplicação de uma diferença de potencial elevada provocando, por sua vez, a aceleração dos eletrões ejetados do cátodo que, atraídos pela energia positiva, se deslocam para o ânodo. Esta colisão dos eletrões com o ânodo faz com que seja libertada energia sob a forma de calor (cerca de 99%) e de fotões (1%) designados, estes últimos, por raios-X primários (Khalid et al., 1996).

Assim, após um tempo consistente de investigação por parte do Físico Alemão, foi possível tirar diversas ilações relativamente à nova radiação descoberta, como:

- Os raios libertados tinham um poder superior de penetração aos raios catódicos de Lenard;
- Eram propagados linearmente a partir da sua fonte;

- Não sofriam reflexão, refração ou difração e não eram defletidos por ação de um campo magnético;
- Os materiais tinham um efeito transparente à sua passagem, transparência essa que variava com a densidade e espessura dos mesmos.

(Seliger, 1995; Ward, 1896).

Inicialmente, com as descobertas de Röntgen, o Físico pensou que a radiação X se tratava de um tipo de radiação que possuía propriedades bastante díspares das da radiação eletromagnética, admitindo que esta não podia ser refletida, refratada nem polarizada, bem como podia penetrar na matéria em profundidade sem com isso motivar quaisquer danos ou modificações na mesma. Mais tarde, e com o avançar dos estudos, tendo por base as descobertas de Röntgen, foi verificado que as características da radiação X são comuns às da radiação de comprimentos de onda superiores (como a radiação eletromagnética) e que doses elevadas da mesma podem, sim, causar danos nas superfícies irradiadas, nomeadamente nos tecidos biológicos.

As propriedades dos raios-X conhecidas nos dias de hoje são as seguintes:

- São invisíveis;
- São propagados como linhas estreitas à velocidade de  $3 \times 10^8$  m/s, como a luz;
- Não são afetados pelos campos elétricos e magnéticos;
- São absorvidos de forma diferente enquanto passam através de materiais de diferentes composições, densidades e grossuras;
- Podem ser refletidos, difratados, refratados e polarizados;
- Possuem a capacidade de ionizar gases;
- São capazes de afetar as propriedades elétricas dos líquidos e sólidos;
- São capazes de escurecer uma placa fotográfica;
- Conseguem libertar fotoelétrons;
- Conseguem produzir reações biológicas (danos ou mesmo morte celular e produção de mutações génicas).

(Van Grieken & Marowickz, 2001)

Röntgen foi galardoado, em 1901, com o primeiro Prémio Nobel da Física pelos seus trabalhos individuais que culminaram nesta grandiosa descoberta dos, por si denominados

“X-strahlen” (“raios-X”) cujo termo X foi atribuído pela sua natureza desconhecida. (Underwood, 1945; Ward, 1896).

Unicamente cerca de 20 anos após a experiência e descoberta de Röntgen é que se começaram, contudo, a fazer notar avanços na utilização dos raios-X, surgindo descobertas relativamente às propriedades adicionais desta radiação, alargando-se horizontes nas mais diversas áreas, nas quais se vieram mostrar de grande relevância, como no caso da Física Atômica do Século XX e, atualmente, o contributo excepcional que esta descoberta presta nos mais variados ramos da Medicina, revelando uma nova era em que as hesitações no caso de diagnósticos médicos podem ser quase totalmente corroboradas, especialmente quando aplicados em conjunto com outros meios complementares de diagnóstico. A radiologia é então hoje uma mais valia quer no diagnóstico, quer na terapia dos pacientes.

O espectro de energia pode apresentar-se de duas formas distintas, de forma contínua em função da desaceleração brusca das partículas carregadas- Efeito Bremsstrahlung- ou em função das camadas eletrônicas do material do alvo- Raios-X Característicos (Eisberg & Renick, 1978).

O Efeito Bremsstrahlung é um fenómeno de produção de radiação que acontece no tubo e que, em tradução livre, significa “energia de desaceleração”. Este termo alemão é utilizado para designar a radiação emitida em consequência da interação (deflexão e desaceleração) dos eletrões, provenientes do cátodo, com as nuvens eletrônicas dos átomos que constituem o alvo não havendo, nesse processo, colisões entre eletrões. Assim, o Efeito Bremsstrahlung é responsável pela formação dos espectros contínuos que decorrem da interação dos eletrões com o campo colombiano de átomos de elevado número atômico, levando a uma diminuição da sua energia cinética resultando na emissão da diferença de energia na forma de raios-X (Khalid et al., 1996).

## 2. FUNDAMENTOS DA FLUORESCÊNCIA DE RAIOS-X (XRF)

Um método bem estabelecido de análise elementar, quantitativa e qualitativa, de amostras é a Fluorescência de raios-X (XRF) que se fundamenta na ionização dos seus átomos por um feixe primário de raios-X, deixando-os num estado excitado. Após os movimentos que se dão entre os diversos níveis de energia, cria-se um estágio de repouso e é possível, desta forma, obter-se informações acerca da natureza e composição química que apresentam. Ou seja, baseia-se na emissão de raios-X característicos de um material ou de uma amostra excitada pelo impacto de partículas aceleradas, tais como elétrons e prótons ou raios-X de elevada energia, abrangendo uma gama de comprimentos de onda entre 11,3 e 0,02 nm, o que corresponde a energias compreendidas entre os 0,11 e os 60 keV.

O que se sucede, de forma concisa, na XRF, é que, quando um átomo é irradiado com fótons de raios-X primários, provoca a ejeção de elétrons das diferentes camadas eletrônicas, fazendo com que passem a existir “espaços livres”, lugares vagos ou vacâncias, tornando o átomo instável. Quando um elétron de um nível energético superior preenche o espaço vago estabelecido nos níveis energéticos inferiores, esse movimento eletrônico permite o restabelecimento do equilíbrio do mesmo, dando-se a libertação de energia sob a forma de fótons de raios-X (radiação secundária) durante este rearranjo. Esta energia libertada vai ser característica (raios característicos) da própria transição com singularidades para cada elemento químico envolvido que, como tal, indica a presença desse mesmo elemento na amostra em investigação visto que existem comprimentos de onda e energias específicas particulares para cada elemento (Sasaki & Bleicher, 2000).

O valor energético destes fótons de raio-X será igual à diferença de energias das orbitais de partida e de chegada:

$$E_x = E_i - E_f$$

Onde  $E_x$  corresponde à energia dos fótons de raios-X emitidos;  $E_i$  à energia de ligação do elétron na camada inicial; e  $E_f$  à energia de ligação do elétron na camada final.

O fenómeno de emissão de radiação X (radiação secundária) toma então o nome de fluorescência de raios-X e as emissões produzem espectros de linhas que permitem apurar a composição química da amostra. A emissão de raios-X de energia característica permite

também a obtenção da concentração química, dada pela intensidade do pico gerado no espectro do espécime analisado e, quando acoplados a um sistema de analisadores computacionais de multicanal, é possível obter-se a energia e distribuição espectral. O sistema de recolha de dados transforma os pulsos elétricos da detecção da fluorescência, criando um gráfico de comprimento de onda por intensidade, possibilitando a obtenção de diversas informações como as concentrações elementares da mesma e o mapeamento químico (Nascimento-Dias,2017)

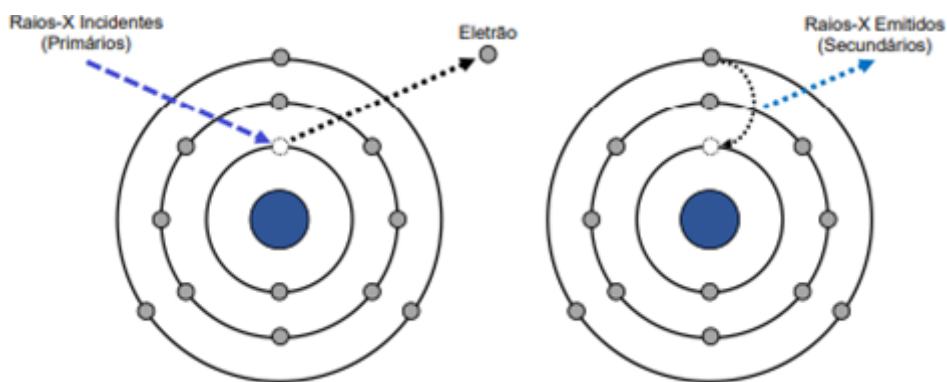


Figura 4- Mecanismo de fluorescência de raios-X adaptado de Caetano, 2018

Durante o processo de rearranjo do átomo, em que os elétrons se deslocam das camadas mais externas para as mais internas, ocorre a emissão de um fóton de raios-X que vai constituir o espectro de riscas descontínuo (Garg, Singh, Weginwar & Sagdeo, 1994).

As linhas características emitidas são identificadas pela camada para onde ocorre a transição eletrônica, assentando na seguinte notação, composta por 3 componentes:

- 1- Letra árabe maiúscula que corresponde à camada onde ocorre a libertação do átomo que deixa o espaço vazio (K, L, M, N);
- 2- Letra grega que corresponde ao nível de partida do elétron que vai ocupar o espaço livre;
- 3- Índice numérico correspondente ao subnível de partida do elétron.

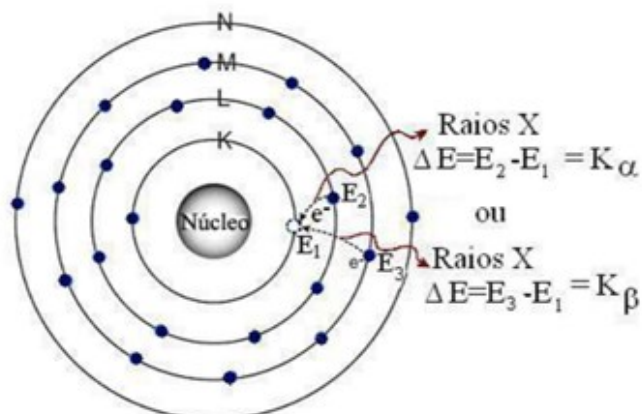


Figura 5- Produção de raios-X característicos, adaptado de Severo, 2010.

Se essa transição se dá para um nível  $n=1$ , a linha obtida no espectro de riscas denomina-se linha K, e para o nível  $n=2$  designa-se por L (geralmente a análise por espectrometria de raio-X é feita com base em riscas K e L). Seguida da letra árabe maiúscula da camada, vem então uma letra grega, que assinala a intensidade da linha, assim a linha mais intensa de uma dada série é designada por  $\alpha$ , seguida de  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$ , e assim sucessivamente. Ou seja, o nível de onde é “arrancado” o elétron determina a série detetada (série K, L, etc.) e a risca mais forte numa dada série é a  $\alpha$ , sendo procedida pela  $\beta$ ...

Devido à divisão da camada L em três subcamadas, o espectro L é mais complexo do que o espectro K, contendo pelo menos 12 linhas (Beckhoff et al., 2006; Rouessac & Rouessac, 2013; Settle, 1997; Shackley, 2011).

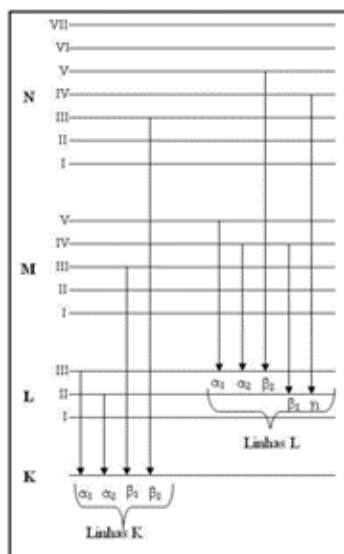


Figura 6- Representação dos níveis de energia de um átomo, adaptado de Knoll, 2010

Na prática de espectrometria de raios-X, as linhas K são utilizadas para os elementos com número atômico baixo a médio, ao passo que passamos a ter as linhas L na medição dos elementos pesados, ou mesmo as M. Desta forma os elementos mais leves, com número atômico até 25, apresentam normalmente riscas K. Os elementos com número atômico compreendido entre 25 e 57 apresentam ainda riscas L, e os elementos com número atômico igual ou superior a 57 já não apresentam geralmente a risca K, mostrando, em adição às riscas L, as riscas M (Risz & Sky-Peck, 1984).

Quando um elétron K é removido, o átomo diz-se  $K^+$ . Caso seja removido um elétron L, diz-se que ficou no estado  $L^+$ . Na ocorrência de dois elétrons serem removidos de forma simultânea, o átomo diz-se duplamente ionizado e designa-se  $KK$ . Contudo, pode também suceder ocorrer uma única transferência para o nível K, entre outras possibilidades. Os subníveis 1, 2 e 3 indicam a transição entre as subcamadas.

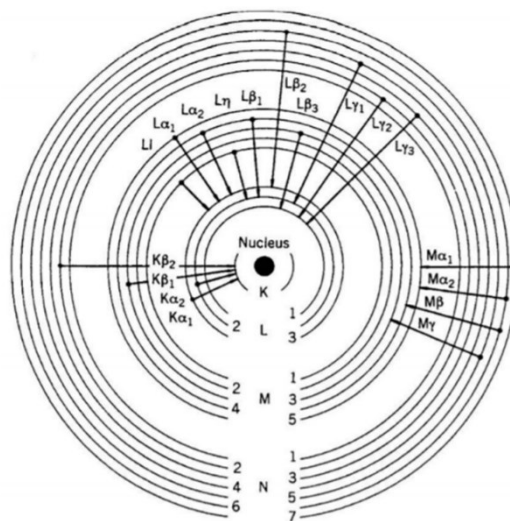


Figura 7- Transições dos elétrons, adaptado de Klockenkämper, 1997

Na interação de um fóton suficientemente energético com um átomo, ocorre transferência de energia do primeiro para os elétrons do átomo, acabando este por ser expulso. Devido às trocas de posição dos elétrons, surge uma perda do potencial de energia do átomo, energia essa que é apresentada como um fóton. A partir desse momento, ocorre um dos seguintes processos, ou o fóton de raios-X é absorvido dentro do próprio átomo, pelo efeito Auger por exemplo, ou dá-se a já referida fluorescência de raios-X. O átomo pode regressar então ao estado fundamental por uma transição não radioativa, pela qual a energia correspondente à transição do elétron do nível exterior para o inicialmente

ionizado, não é emitida para fora do átomo originando, ao invés, o “arrancamento” de um outro elétron do mesmo átomo- Efeito Auger ou Auto-Ionização- e, à semelhança do sucedido na excitação por fluorescência, o fóton possui energia igual à diferença de energia dos níveis entre os quais se deu a transição, subtraindo, neste caso, a energia de ligação do nível de onde foi extraído o segundo elétron (Klockenkämper, 1997).

O Efeito Auger ocorre então quando a energia libertada, aquando da movimentação do elétron que iria ocupar a vacância (espaço livre) deixado por um outro elétron numa camada mais interna, é absorvida por um terceiro elétron, resultando na ejeção deste último.

Um átomo excitado pode voltar a um estado de menor energia ejetando um dos seus próprios elétrons de um nível menos energético. A transição sem emissão de radiação é então denominada Efeito Auger, e os elétrons ejetados elétrons Auger. Geralmente, a probabilidade do efeito Auger ocorrer aumenta com a diminuição da diferença entre os estados de energia correspondentes, e é superior para elementos de baixo número atômico (Klockenkämper & Von Bohlen, 2014).

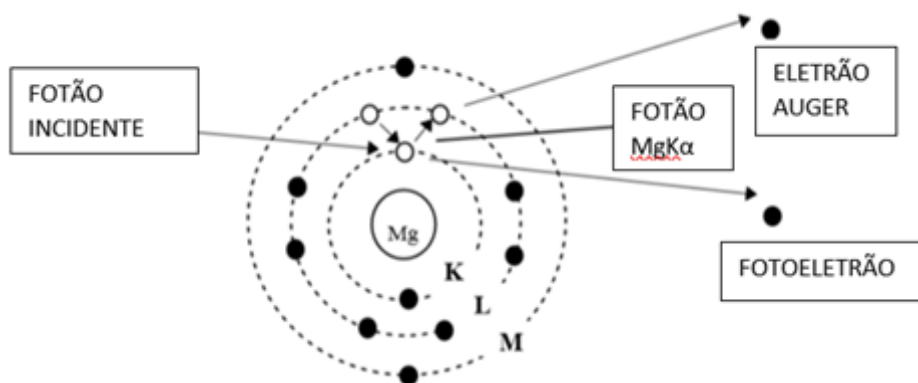


Figura 8- Representação do Efeito Auger

Como este efeito não liberta radiação-X (transição não-radiativa), não é observado diretamente no detetor. De forma a se poder efetuar uma correta análise do espectro obtido, com base neste efeito, utilizam-se valores teóricos de rendimentos de fluorescência que consistem na razão entre a probabilidade de ocorrerem transições radioativas e a soma das probabilidades de transições radioativas e não radioativas.

Os rendimentos destes dois processos (XRF e Efeito Auger) podem ser comparados, como se pode verificar na Figura 9. O rendimento de fluorescência para a camada K é a razão entre o número de fótons emitidos e o número de lacunas criadas em K. O rendimento da Fluorescência é o número de fótons de raios-X que são emitidos em relação ao número de vacâncias existentes, sendo dependente do número atômico ( $Z$ ) do elemento e da transição envolvida. O rendimento do Efeito de Auger é a razão entre o número de elétrons Auger emitidos e o número de vacâncias existentes. Por observação desta Figura, verifica-se uma dependência do número atômico  $Z$  (Klockenkämper & Von Bohlen, 2014).

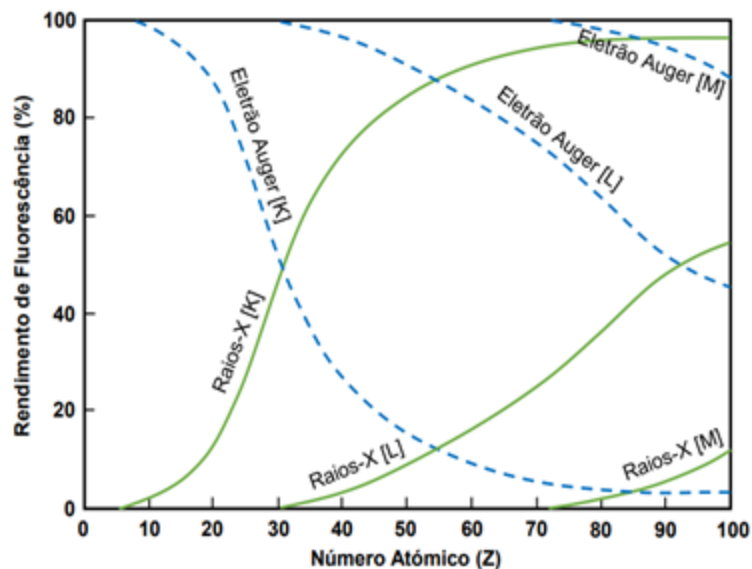


Figura 9- Rendimento de fluorescência de raios-X e do elétron Auger vs. N.º atômico ( $Z$ ) do elemento analisado, adaptado de x. As letras [K], [L] e [M] traduzem camadas onde ocorre a valência. Adaptado de Caetano, 2018

O Efeito Auger encontra-se predominantemente nos elementos leves, de baixo número atômico ( $Z < 20$ ) onde a análise espectral de raios-X não é muito eficiente. Os átomos de  $Z < 20$  possuem um menor rendimento de Fluorescência de Raios-X que os elementos de número atômico superior. A probabilidade de ocorrer emissão de um fóton de raios-X (em vez de um elétron Auger) é chamado rendimento de fluorescência de raios-X e pode ser verificado na Figura 9 como exposto anteriormente.

Assim, a fluorescência de raios-X e o Efeito Auger são efeitos mutuamente exclusivos, o que implica que os seus rendimentos somados totalizem 100%.

## 2.1 Dispersão/Espalhamento- Ruído de fundo (*background*)

Uma parte dos raios-X primários que alcança o detetor fá-lo sob a forma de ruído de fundo (*background*). Esta radiação é o resultado de fenómenos físicos de dispersão. Entende-se por espalhamento o que se sucede quando um raio-X primário incide numa amostra ocorrendo dispersão. A dispersão/espalhamento pode ser de 2 tipos, incoerente ou coerente. A probabilidade de ocorrer um ou outro relaciona-se com a energia dos fotões e com a composição química das amostras (Wobrauschek & Selin Lindgren, 2010).

A radiação X incidente na amostra pode então sofrer o fenómeno de espalhamento de Rayleigh (ou coerente) dando-se a deflexão (desvio) do fotão sem que para isso haja perda de energia do mesmo, ou o espalhamento de Compton (incoerente) em que, por outro lado, se verifica uma perda de energia aquando da deflexão do fotão, resultando num aumento do comprimento de onda.

A dispersão de Rayleigh consiste numa difusão elástica caracterizada pela interação entre o fotão incidente e os eletrões “ligados” ao átomo. Os fotões característicos do tubo de raios-X, ou seja, da radiação emitida, são difundidos pelos eletrões do átomo sem a ocorrência de ionização ou excitação. O fotão induz apenas vibração no sistema de eletrões do átomo e estes não absorvem energia, sendo a radiação reemitida com a mesma energia. Os fotões alteram a sua direção após impactarem com a amostra, sem ocorrer perda de energia, provocando o aparecimento de picos característicos do elemento do ânodo no espetro gerado. Deverá utilizar-se um filtro no feixe de radiação incidente de modo a remover os raios característicos do elemento do ânodo, caso se pretenda analisar amostras que contenham esse mesmo elemento. Uma manifestação da difusão elástica é a difração de raios-X nos cristais (Feliczaki & Melquiades, 2014).

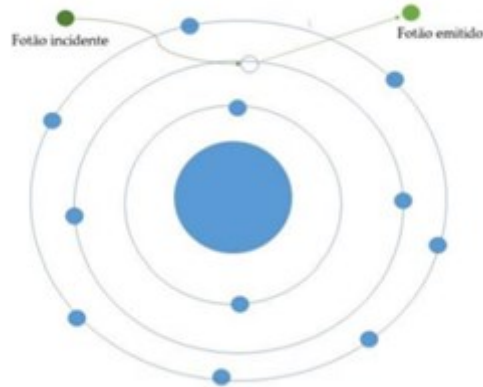


Figura 10- Dispersão de Rayleigh.  
Adaptado de Costa, 2015

O segundo tipo, também conhecido como dispersão de Compton, acontece quando ocorre uma colisão inelástica entre os fótons de raios-X incidentes e um elétron fracamente ligado ao átomo (como se de um elétron livre se tratasse) que ganha movimento quando da perda de energia do fóton derivada desta colisão, difundindo-se após esta ocorrência. Desta colisão vai resultar uma emissão de radiação de energia inferior e, normalmente, numa direção diferente da incidente. Estes fótons, poderão alcançar o detector do espectrômetro, criando picos no espectro que irão ocorrer em energias próximas às dos picos característicos do elemento que compõe o ânodo, uma vez que os fótons envolvidos provêm da excitação deste (Wobruschek & Selin Lindgren, 2010).

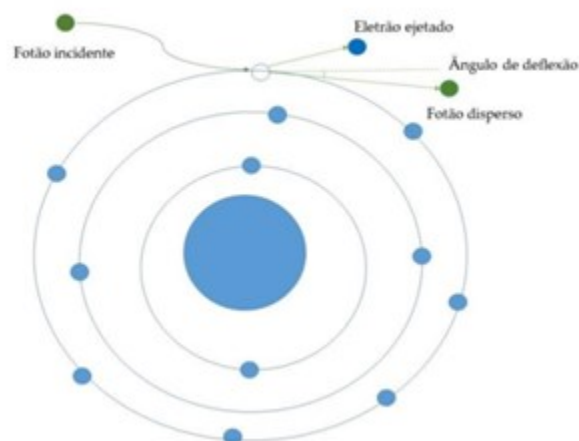


Figura 11- Representações da Dispersão de Compton. Adaptado de Costa, 2015

A intensidade do espalhamento é dependente da composição da amostra, sendo que amostras compostas maioritariamente por elementos pesados são menos suscetíveis a fenómenos de dispersão quando comparadas com amostras de baixo peso molecular (cuja composição é na sua maioria elementos leves). “Elementos mais pesados absorvem mais e dispersam menos e, por isso, o nível de *background* nos seus espectros é quase insignificante tornando-se, por outro lado, um fator limitante para a medição de elementos leves em baixas concentrações. Novamente, na prática de raios-X, isto equivale a dizer que, se a matriz é pesada, os problemas advindos do *background* são menos sentidos. No caso de matrizes leves, deve estar-se ciente do alto nível de *background* e das influências que este terá nos espectros. O espalhamento Compton aparece como uma ampla linha que acompanha as linhas K e L do elemento alvo do tubo de raios-X” (Bertin, 1970).

## 2.2 Enquadramento Da XRF- Contexto Histórico E Atualidade

Charles G. Barkla, no início do século XX, a partir da observação dos espectros característicos de raios-X, concluiu que elementos pesados irradiados com raios-X primários emitem radiação secundária de maior comprimento de onda que a desse mesmo feixe, o que não se sucede nos elementos de baixa massa atômica (Ribeiro, 2006). Foi também Barkla que demonstrou que os raios-X consistem numa forma transversa de radiação eletromagnética, como é o caso da luz visível, pelo seu potencial de serem parcialmente polarizados. No ano de 1907 em conjunto com C. A. Sadler, Barkla descobriu que a radiação secundária é homogênea e que as radiações de comprimento de onda característico eram emitidas apenas aquando da exposição de um elemento pesado à radiação de menor penetrabilidade e, conseqüentemente, menor comprimento de onda que as suas próprias emissões características. Assim, nasceu a primeira evidência de que as emissões de raios-X são monocromáticas (Ribeiro, 2006). Os elementos de baixo número atômico têm também baixa sensibilidade analítica e baixo valor de energia de emissão, portanto são mais difíceis de serem determinados por XRF (Ribeiro, 2006).

Pode dizer-se então que foi Barkla o responsável pela criação de uma ponte entre a irradiação de raios-X a uma amostra e o peso atômico dos elementos constituintes da

mesma. Esta radiação emitida, que designou por “raios característicos”, possui então um valor de comprimento de onda (e energia) único para cada elemento químico, o que significa que os elementos químicos têm o seu próprio e único espectro de emissão de raios-X, independente da temperatura, fase e das ligações químicas em que participam, como que de uma impressão digital se tratasse (Jenkins, 1999).

Contudo, foi Henry Moseley, contemporâneo de Charles Barkla, quem estabeleceu, pela primeira vez, uma relação entre a frequência e o número atômico de cada elemento estudado (característica indispensável à espectrometria de fluorescência de raios-X), encontrando assim a relação possível entre o espectro obtido e o elemento em causa, levando à conclusão de que a frequência da linha adquirida estava diretamente relacionada com o número atômico ( $Z$ ) do elemento e não com o peso atômico do mesmo (Bortoleto, 2007).

No ano de 1912, Moseley elaborou o primeiro método espectrométrico de raios-X constituído por uma fonte primária de radiação composta por um tubo catódico frio, cuja fonte de elétrons era o ar residual do tubo. O espécime a analisar seria o alvo da transferência de energia e a radiação produzida por este, após a irradiação, deslocar-se-ia por um orifício de ouro e daí seria dirigida até um cristal cuja função iria ser, por último, difratar os raios em direção ao detetor.

Desta forma Moseley conseguiu estabelecer uma relação entre o comprimento de onda de um determinado fóton de raios-X e o número atômico ( $Z$ ) do elemento excitado que, se traduz na seguinte equação (Jenkins, 1999):

$$\lambda = \frac{\alpha^2}{(Z - \sigma)^2}$$

onde  $\alpha^2$  e  $\sigma$  são constantes para uma determinada linha espectral atômica (radiação característica). Reescrevendo a equação em termos de energia (keV), vem:

$$E = \alpha^2 (Z - \sigma)^2$$

Colocando a evolução da fluorescência de raios-X numa perspetiva de publicações de literatura, verifica-se que o primeiro artigo relativamente à utilização da XRF foi publicado em 1922, destacando a sua utilização para a análise de minerais. Um ano mais

tarde foi descoberto um novo elemento da tabela periódica, o háfnio, e só alguns anos depois é que se verificou que o problema de sobreaquecimento das amostras podia ser contornado com a utilização de raios-X em vez de feixes de elétrons como fonte de excitação.

O aprimoramento da técnica de espectroscopia de raios-X foi sendo, e é nos dias que decorrem, um objetivo dos investigadores. Entre os anos de 1940 e 1960 foi possível verificar diversos avanços.

Em 1947, Friedman e Birks transformaram um aparelho de difração de raios-X num espectrómetro de raios-X. Na década de 50, como os fundamentos da XRF já eram suficientemente bem conhecidos, deu-se especial enfoque à preparação das amostras, instrumentação e interpretação dos dados, tendo sido também a altura em que se começaram a comercializar os aparelhos de análise elementar baseados na XRF (Shackley, 2011), nomeadamente os de dispersão de comprimento de onda (WDXRF) única técnica utilizada até 1966. Com o desenvolvimento dos detetores semicondutores de Si (Silício), surgiu a técnica de EDXRF, visto que passou a ser possível discriminar os feixes de raios-X em função da energia (Nascimento Filho, 1999). Os contadores Geiger, foram substituídos por detetores cintiladores devido aos segundos serem menos sujeitos ao ruído (*background*). Passou também a ser possível a medição de elementos de número atómico inferior (a partir do flúor), através do desenvolvimento de cristais com maior espaçamento interplanar, tornando esta técnica mais sensível, sendo que até à data só era possível realizar medições de escassos elementos.

Alguns dos principais avanços feitos em XRF foram:

- Aparecimento de mecanismos óticos, como os policapilares, com possibilidade micro-focagem com diâmetros tão reduzidos como 10  $\mu\text{m}$ ;
- Desenvolvimento de câmaras a cores, que produzem imagens baseadas nas emissões de raios-X com boa resolução espectral;
- A comercialização de detetores SDD (*Silicon Drift Detectors*) que não necessitam de azoto líquido para o seu arrefecimento, como acontece nos detetores Silício-Lítio (Si(Li)), possuindo uma maior área ativa, excelente resolução energética e possibilitando elevadas taxas de contagens, com menores tensões de excitação.

O aparecimento de versões da técnica de fluorescência de raios-X com grande resolução espacial como a  $\mu$ -XRF veio tornar-se uma mais valia para a análise de amostras de tamanhos muito inferiores. No início do século XXI, só era possível em instalações com sincrotrão, enquanto que, nos dias de hoje, já se encontra em diversos laboratórios e é passível de ser levada a cabo com um tubo de raios-X de baixa potência. Prevê-se que no futuro se verifique um alargamento na utilização e aplicação desta técnica ( $\mu$ -XRF) e da TXRF que é outra técnica com elevada sofisticação de instrumentação, ambas descritas mais à frente neste trabalho (Marguí, Queralt & Van Grieken, 2006).

Atualmente verifica-se uma boa disseminação da Fluorescência de Raios-X, ocupando um lugar de destaque na Comunidade Científica pelas inúmeras vantagens inerentes à sua utilização, identificando elementos químicos de forma rápida, não destrutiva, a preços acessíveis, realizando preparações simplificadas das amostras a estudar. A sua aplicabilidade é notória em diversas áreas desde a Medicina, à Geologia, Biologia, Arqueologia, entre outras como aplicações industriais, que muito frequentemente exigem técnicas analíticas que possam ser efetuadas de forma rotineira e rápida, como por exemplo para controlo de qualidade dos seus produtos, sendo ainda um método útil analítico para muitas indústrias que requeiram observação de espécimes *in situ*, possível à custa da criação de máquinas de XRF portáteis. A sua aplicação é ainda notória nas ciências forenses, na avaliação de provas *post-mortem* e *in vivo* (Santos et al., 2013).

Apesar dos desenvolvimentos alcançados na XRF, algumas limitações e desafios residem, estando principalmente relacionados com os padrões de calibração. Visto que a fluorescência emitida está de certa forma dependente dos efeitos de matriz que estão intrinsecamente relacionados com a composição química da amostra a analisar, nem sempre é exequível a preparação de padrões de calibração, o que se agrava com a necessidade de análise de amostras não-homogéneas em 2 ou 3 dimensões. Os efeitos da matriz podem impedir ou limitar a deteção de certos elementos. Outras limitações desta técnica prendem-se com o facto de a faixa elementar passível de ser analisada estar restringida aos elementos de número atómico superior ao Boro (inclusive), ou seja de número atómico superior a 5, e o facto de as referências padrão (*reference standards*) na análise quantitativa nem sempre coincidirem com matrizes desconhecidas (Shackley, 2011), o que faz com que haja a necessidade de, no futuro, se percorrer um caminho no sentido de ampliação das bases de dados (Shackley, 2011).

A XRF é, assim, uma técnica onde impera a versatilidade, podendo ser utilizada em amostras nos diversos estados da matéria sem que para isso seja necessária uma preparação extensiva das mesmas possibilitando ainda a análise de amostras de ínfimo tamanho (Santos et al., 2013).

Verifica-se ano após ano a melhoria do lido com os aparelhos de XRF, que se têm tornado cada vez mais simples, sendo até capazes de serem manuseados não só por especialistas, mas também por operadores menos qualificados.

### 2.3 Amostras para análise por XRF

Na análise por XRF é importante que o analista saiba como preparar a amostra visto que a preparação da mesma vai afetar a qualidade dos resultados obtidos e as medições a realizar.

Uma grande variedade de tipos de amostra pode ser analisada por XRF, quer se encontrem no estado sólido, líquido e até mesmo gasoso. Assim, é necessária uma ampla variedade de técnicas de preparação amostral. A literatura sobre esta temática é bastante extensa havendo diversas revisões que tratam pormenorizadamente da preparação de amostras de líquidos, água, aerossóis, polpas, *thin films*, metais ferrosos, rochas e diversos materiais de origem natural (Marguí et al., 2006).

A preparação das amostras depende do tipo de espectroscopia a ser utilizada dentro da XRF e do nível de exatidão exigido pelo estudo em causa.

A determinação da composição de espécimes no estado sólido, sem ser necessário realizar qualquer preparação, é possível para amostras tridimensionalmente homogéneas e que possuam uma superfície plana. É o caso da análise direta de metais e ligas, que têm sido um dos principais campos de aplicação da XRF. No entanto, certos materiais requerem uma etapa de pré-tratamento de modo a que atendam às condições de homogeneidade e por forma a garantir a qualidade e reprodutibilidade das medições.

A preparação da amostra é, no fundo, tão importante quanto a própria técnica analítica e influencia extremamente o resultado quantitativo final. Qualquer método de preparação deve resultar em amostras reprodutíveis e que, para uma determinada faixa de calibração, apresentem propriedades físicas semelhantes (coeficientes de atenuação de massa, densidade, tamanho de partícula e homogeneidade). A preparação inadequada da amostra pode constituir motivo de grandes erros sistemáticos, assim, devem ser consideradas como regras, no que concerne à preparação das mesmas, as seguintes premissas:

- Definir, em primeiro lugar, o propósito da análise;
- Sempre que possível evitar a preparação da amostra;
- O método de preparação a selecionar não deve introduzir erros ou contaminações adicionais;
- Sempre que possível, deve ser dada preferência a métodos mais simples de preparação de amostras físicas, como secagem, liofilização, homogeneização, pulverização e corte, em detrimento dos mais complexos;
- Amostras adequadamente preparadas devem ser homogêneas e possuir uma superfície lisa e plana;
- Todas as amostras *standard* desconhecidas devem ser apresentadas para análise de forma reprodutível e idêntica;
- Perdas de elementos (particularmente halogénios) devem ser consideradas;
- Devem ser mantidos registos cuidadosos e precisos das amostras recebidas para análise;
- Os testes estatísticos de rotina devem fazer parte de todos procedimentos laboratoriais enquadrando-se na categoria de garantia de qualidade;
- A precisão deve ser controlada usando padrões de referência.

(Marguí et al., 2006).

Dependendo da espessura efetiva da medida amostra, pode trabalhar-se sob as seguintes condições:

**Amostras infinitamente espessas:** Num ponto de espessura crítico, os raios-X secundários são excitados em profundidade e não podem alcançar a superfície, por isso um aumento adicional na espessura não resulta numa maior intensidade de raios-X característicos (o efeito de a espessura da amostra é insignificante).

**Amostras infinitamente finas:** Quando a massa por unidade de área é muito pequena (amostra fina), é possível considerar que o coeficiente de absorção de massa total da amostra como quase insignificante. Existe uma relação linear entre a intensidade da radiação e a concentração da radiação fluorescente

**Amostras de espessura intermediária:** Na maioria dos casos a disponibilidade limitada da quantidade de amostra faz com que sejamos obrigados a trabalhar em condições de "espessura intermediária". Nesses casos, a relação entre a fluorescência medida e concentração de elemento não é constante. Uma técnica particularmente útil usada para evitar erros em medições quantitativas ao trabalhar com este tipo de amostras é pesar uma massa constante de amostra para realizar as medições.

Sempre que possível, deve trabalhar-se com amostras preparadas de forma a obter um alvo infinitamente fino (os efeitos de absorção são desprezíveis e os resultados quantitativos podem ser facilmente obtidos diretamente através do pico das intensidades), ou um infinitamente espessas (os efeitos da espessura são desprezíveis, e cálculos teóricos adequados podem ser realizados de modo a obter bons resultados quantitativos de dados espectrais) (Marguí et al., 2006).

Os métodos mais comumente utilizados para preparação das amostras podem ser os ilustrados na Figura 12:

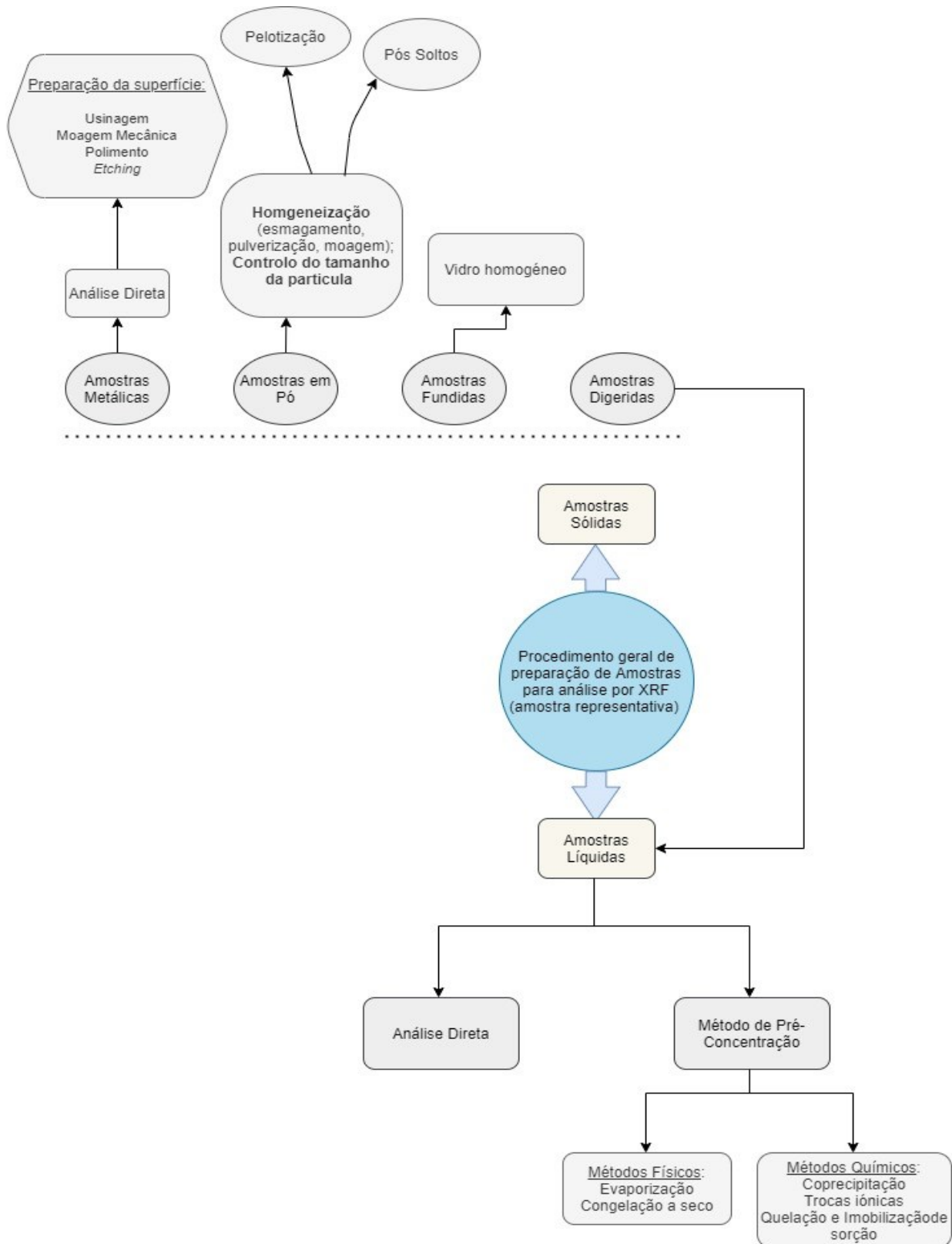


Figura 12- Representação esquemática da preparação de amostras para análise por XRF adaptado de Marguí et al., 2006

Espécimes patológicos são geralmente apresentados para análise embebidos em parafina. A parafina contém alta volatilidade e pouca temperatura de fusão, não podendo ser utilizada por EPMA ou SEM/EDS sem uma desparafinização. A XRF, por outro lado, pode ser aplicada a estas amostras sem causar danos.

### 3. PRODUÇÃO DE RAIOS-X

Existem 4 tipos diferentes de fontes de raios-X:

As mais comuns:

1. Tubos de raios-X selados
2. Fontes radioativas

As menos utilizadas:

3. Raios-X formados em tubos de rotação de ânodos
4. Radiação sincrotrão

A produção de raios-X consegue-se, habitualmente, com a presença de uma ampola de vácuo (tubo de raios-X) disposta de dois elétrodos (ânodo e cátodo). O cátodo consiste num fio metálico enrolado em hélice (de forma a induzir os elétrons térmico-iônicos na ampola), colocado dentro de uma peça, também metálica, que direciona o feixe eletrónico. O ânodo é composto por uma barra metálica, geralmente cobre, que apresenta, fixada na parte voltada para o cátodo, uma pastilha de molibdénio ou tungsténio que o cobre. De modo a produzir raios-X na ampola é necessário aquecer o filamento através de uma corrente elétrica e estabelecer uma diferença de potencial elevada entre o ânodo e o cátodo (Janssens, 2004)

O sistema de excitação consiste, então, num tubo de vácuo que contém um cátodo aquecido (emissor de elétrons) e um ânodo metálico (de cobre, molibdénio, prata, etc.) ou alvo da emissão. As paredes do tubo são metálicas ou de vidro com chumbo na sua composição. Existe uma entrada no tubo de forma a poder circular água que arrefecerá o ânodo. A janela de vidro em chumbo ou de berílio é o local por onde a radiação X passa

para o exterior, sendo então colimado para limitar a divergência dos raios-X que incidem sobre a amostra (Janssens, 2004).

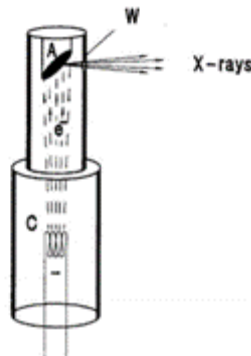


Figura 244- Tubo de raios-X. A- ânodo; C- cátodo; W- janela. Adaptado de Beckhoff et al., 2006

Os elétrons emitidos pelo cátodo são acelerados e colidem com o ânodo, gerando radiação de travagem (espectro contínuo) e linhas de raios-X características do material do ânodo (espectro descontínuo). Os elétrons que são projetados pelo cátodo são acelerados devido a um campo elétrico que é consequência da diferença de potencial (de milhares de volts) aplicada entre si e o ânodo. Como consequência deste impacto que se dá com ânodo, o feixe eletrônico é rapidamente travado sendo, parte da sua energia cinética, emitida sob a forma de um espectro de raios-X que atinge uma banda alargada de comprimentos de onda. Quanto maior o número atômico do material do ânodo, maior intensidade terá o feixe de radiação produzida no tubo. Se a quantidade de energia for suficiente, os elétrons incidentes no ânodo podem libertar um elétron de uma das camadas internas, e a lacuna será ocupada por outro elétron mais externo e dar-se-á então, o já referido regresso ao estado fundamental. A variada gama de energias dos fotões de raios-X é provocada pela desaceleração dos elétrons incidentes que podem perder desde um valor correspondente a toda a sua energia cinética máxima, até um valor mínimo ou nulo. Aquando do aumento da tensão aplicada ao tubo, verifica-se um aumento da energia total emitida, havendo um deslocamento da distribuição espectral no sentido dos menores comprimentos de onda (Beckhoff et al., 2006; Shackley, 2011).

“A potência dos raios-X pode ser configurada em diferentes níveis, desde uma fração de watt, para instrumentos de EDXRF, até vários kilowatts para WDXRF, podendo ser necessário empregar sistemas de arrefecimento da ampola, dado que a maioria da energia

é dissipada na forma de calor, especialmente nos ânodos com tubos de alta potência” (Beckhoff et al., 2006; Rouessac & Rouessac, 2013). “Para a detecção de elementos leves, deve estar disponível uma radiação de baixa energia, ou seja, 1-10 keV, enquanto que para elementos pesados é necessária uma excitação com energias elevadas até 50 keV” (Beckhoff et al., 2006; Shackley, 2011). Os tubos típicos de raios-X aplicados nos espectrômetros de fluorescência de raios-X utilizam voltagens de aceleração de 25 a 50 kV e correntes de elétrons na ordem dos 2050 mA. Para a WDXRF, frequentemente são utilizados tubos de raios-X de 3 kW enquanto que nos espectrômetros de EDXRF, dependendo da forma de excitação das amostras, os tubos utilizados variam entre os 50 e os 1000 W.

Para aplicações que requeiram níveis de energia mais potentes como os superiores a 3kW, ânodos rotatórios são preferíveis aos fixos. Nestes dispositivos, o ânodo atinge altas velocidades de rotação sendo arrefecido com um metal em água coberto pelo material desejado para o ânodo.

Num certo número de casos, as análises de raios-X também fazem uso de fontes sincrotrão (radiação sincrotrão) que é produzida por elétrons de elevada energia ou positrões que circulam num *storage ring*.

A radiação sincrotrão (SR) gera raios-X relativamente fortes (e outras ondas eletromagnéticas como radiação UV, invisível e luz infravermelha). A sua intensidade é superior à das fontes laboratoriais de raios-X. Os raios-X sincrotrão tornam possível a aplicação de raios-X monocromáticos como radiação incidente na XRF. O espectro de XRF advindo da irradiação por um continuum de raio-X mostra altos níveis de fundo que são causados pelos raios-X característicos do material alvo e da fonte de raios-X, e também os causados pelo efeito Bremsstrahlung. O fundo torna difícil a análise de elementos vestigiais com a XRF convencional. A radiação sincrotrão gera raios-X relativamente fortes e outras ondas eletromagnéticas (Janssens, 2004).

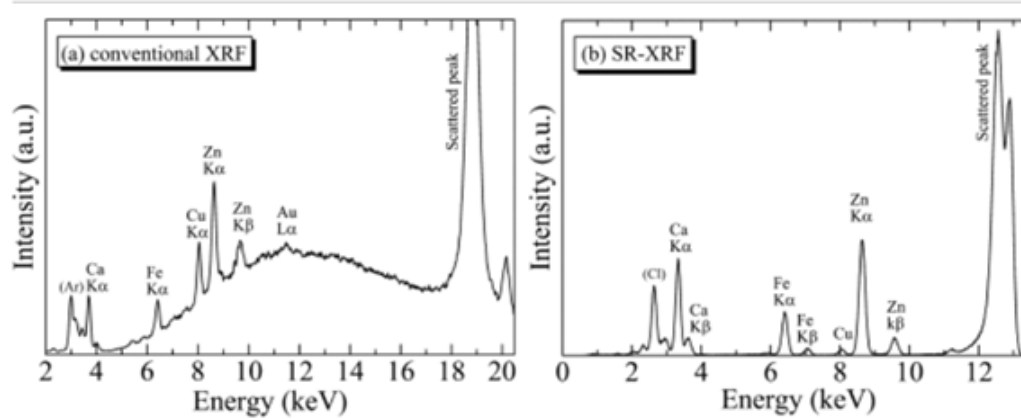


Figura 14- Representação gráfica comparativa da XRF convencional com a SR-XRF, adaptado de Uo et al., 2015

#### 4. INSTRUMENTAÇÃO DE XRF

##### Tecnologias de Detecção de Radiação Secundária (WDXRF e EDXRF)

A espectrometria de XRF utiliza, habitualmente, feixes policromáticos de fótons de curto comprimento de onda e alta energia para induzir a emissão de linhas características com maiores comprimentos de onda e, consecutivamente, menor energia na amostra a ser analisada. Os espectrómetros de raios-X modernos utilizam o poder de cristais para isolar linhas estreitas de comprimento de onda (Wavelength Dispersive XRF- raio x de comprimento de onda dispersivo- WDXRF) ou para isolar bandas estreitas de energia (Energy Dispersive XRF- EDXRF) a partir da radiação policromática produzida na amostra. “Dentro destas duas categorias podem existir diversas configurações, fontes de raios-X e tecnologias de deteção. Nos instrumentos EDXRF, todo o espectro emitido pela amostra incide num detetor que regista a energia de cada fóton, enquanto que na WDXRF, os sistemas funcionam com base no princípio da difração de Bragg” (Beckhoff et al., 2006; Rouessac & Rouessac, 2013; Settle, 1997; Shackley, 2011).

Desta forma, é possível identificar os elementos presentes pela relação feita entre o comprimento de onda emitido e o número atómico, sendo a concentração dos mesmos determinada pela intensidade das linhas características, possibilitando a identificação de

materiais com base na sua composição química. Como a relação entre comprimento de onda de emissão e o número atômico é conhecida, o isolamento de linhas características individuais permite a identificação exclusiva de um determinado elemento e as concentrações elementares podem ser estimadas a partir das intensidades das linhas características (Janssens, 2004).

O sistema EDXRF utiliza cristais semicondutores que recebem a totalidade do espectro emitido pela amostra e, por um processo de ionização, os raios-X característicos são convertidos em impulsos elétricos. O material mais utilizado na composição dos cristais de detecção é o silício Si(Li) de forma a compensar pequenos níveis de impurezas que possam estar presentes. Cristais de germânio de elevada pureza (HPGe) também podem ser utilizados, contudo Si(Li) foi o primeiro material usado nos detetores de EDXRF e continua a ser, atualmente, a escolha mais comum (Beckhoff et al., 2006; Shackley, 2011).

Por outro lado, nos sistemas de dispersão por comprimento de onda, WDXRF, os raios-X advindos da amostra dispersam-se em todas as direções e, assim, é colocado um dispositivo de difração, geralmente um cristal de análise, com um espaçamento de rede específico, na direção desses mesmos raios, de modo a detetar a radiação característica. Tudo isto é possível pela existência de um goniómetro ligado ao detetor, proporcionando diferentes ângulos para os diversos analitos. Assim, “a radiação emitida por um determinado elemento incide nos cristais de análise num ângulo específico e, pela lei de Bragg, essa mesma radiação reflete-se no cristal com o mesmo ângulo”. Apenas os raios-X que satisfazem a lei de Bragg são refletidos permitindo calcular o comprimento de onda específico para determinado elemento, dependendo do ângulo entre a amostra e o detetor e dos espaçamentos interplanares atômicos do cristal (Rouessac & Rouessac, 2013).

A instrumentação WDXRF é quase exclusivamente utilizada para análises rotineiras (altamente fiáveis) de materiais, por exemplo, em laboratórios industriais com vista a realização de controlos de qualidade. Dentro do campo da EDXRF existem várias formas além da convencional, cada qual com o objetivo de otimizar as medições elementares, sendo elas denominadas de Fluorescência de raios-X por reflexão total (TXRF- Total X-Ray Fluorescence) e fluorescência com microfeixe ou microfluorescência de raios-X ( $\mu$ -XRF- Micro X-Ray Fluorescence), baseadas no confinamento espacial do feixe primário de raios-X (Janssens, 2004).

É possível então enunciar dois tipos principais de tecnologia utilizada nos espectrômetros de fluorescência de raios-X, os WDXRF e os EDXRF, que diferem no que concerne aos sistemas que possuem para detecção da energia emitida pelos elementos excitados da amostra (Shackley, 2011).

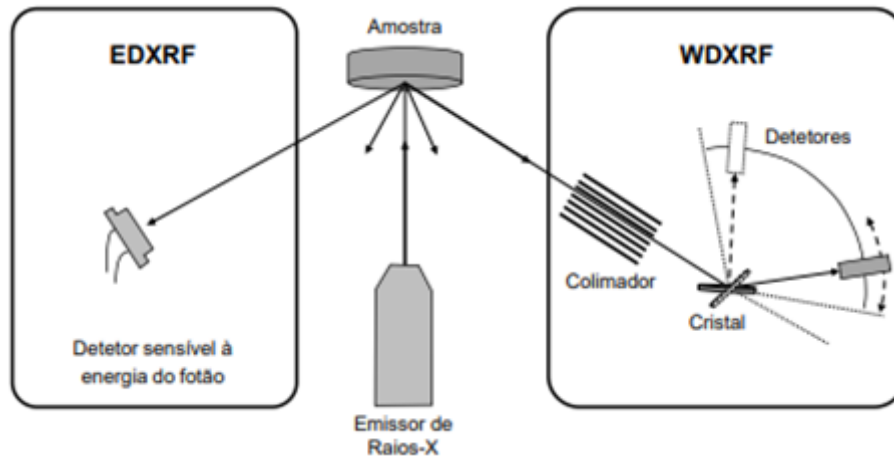


Figura 15- Esquema dos espectrômetros EDXRF e WDXRF. Adaptado de Rousseac & Rousseac, 2013.

#### 4.1 Técnica De Fluorescência De Raios-X Por Dispersão De Comprimento De Onda (WDXR)

A técnica de WDXRF descreve a dispersão da radiação numa rede cristalina e baseia-se na Lei de Bragg. Nesta técnica são utilizados cristais difratores e um detetor proporcional utilizado para energias na faixa de 1 a 15 keV ou um cintilador sólido [NaI(Tl)] utilizado para energias entre os 15 e os 100 keV. Esses cristais unitários com espaço interplanar conhecido ( $d$ ) são utilizados de forma a dispersar o feixe policromático colimado que advém da amostra e o qual possui comprimentos de onda característicos. Um dado comprimento de onda irá difratar num ângulo específico, dado pela lei de Bragg, descrita pela seguinte equação:

$$n \cdot \lambda = 2 \cdot d \cdot \sin \theta$$

Onde  $n = n^\circ$  inteiro positivo;  $d$  = distância interplanar do cristal (nm);  $\theta$  = ângulo entre a radiação difratada pelo cristal e a sua superfície.

“Quando a condição de Bragg é satisfeita, tem-se um pico no sinal do detetor e um espectro característico é obtido com um sistema de fluorescência por dispersão de

comprimento de onda. Para que a Lei de Bragg seja satisfeita, pode fazer-se variar o comprimento de onda quanto ao ângulo durante a experiência” (Janssens, 2004).

Com vista a realização de análises qualitativas e quantitativas, utilizam-se vários detetores ou um detetor móvel para captar os comprimentos de onda característicos de cada elemento, obtendo-se, assim, um espectro (Intensidade vs.  $2\theta$ ). “Os detetores utilizados nos espectrómetros de WDXRF são geralmente contadores que consistem em câmaras de ionização com uma substância (normalmente um gás), que se ioniza quando partículas carregadas a atravessam. Os iões são atraídos por um campo elétrico, presente entre o cátodo e o ânodo do contador. O número total de cargas obtido, resultante da ionização, provoca um impulso proporcional à energia da radiação incidente” (Beckhoff et al., 2006; Shackley, 2011). Um goniómetro é usado para manter a relação  $\theta$ - $2\theta$  entre a amostra e o cristal analisador. Diversos cristais são implementados de modo a ser efetuada a análise de diversos elementos. Cada equipamento faz uso, geralmente, de 4 a 6 cristais diferentes com espaços interplanares distintos e 2 colimadores para que se obtenha um longo intervalo de análise (Rouessac & Rouessac, 2013).

A separação dos fótons de raios-X faz-se pela rotação do cristal analisador, não sendo então necessária a presença de um detetor de alta resolução que faça a discriminação dos comprimentos de onda ou das energias dos raios-X emitidos pelos vários elementos da amostra. É preferível um detetor proporcional ou cintilador sólido em detrimento de um detetor Geiger-Muller (Nascimento Filho, 1999). Os equipamentos por WDXRF por distribuição sequencial possuem também uma estrutura rotacional denominado goniómetro que seleciona os ângulos do cristal e do detetor.

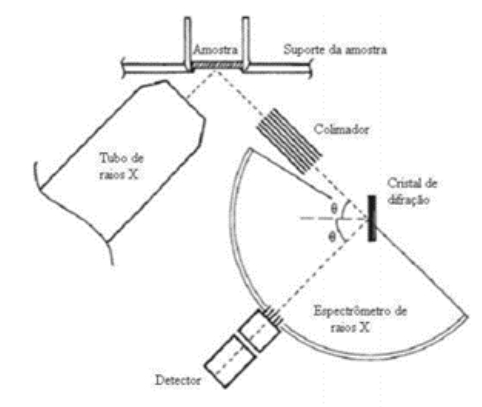


Figura 16- Arranjo básico do equipamento de WDXRF no qual, para a realização das medidas, o cristal analisador é girado de um ângulo  $\theta$  enquanto o detetor é girado de um ângulo  $2\theta$  em relação ao feixe de raios-X característicos incidente no cristal. Adaptado de Janssens, 2004

Tabela 1- Tabela elucidativa dos cristais utilizados nos espectrómetros WDXRF.  
Adaptada de Janssens, 2004.

Cristal	Plano	2d (Å)	Linha - K	Linha L
Fluoreto de Lítio (LiF)	( 220 )	2,848	>Ti	> La
Fluoreto de Lítio (LiF)	( 200 )	4,028	>K	> Cd
Pentaeritritol (PET)	( 002 )	8,742	Al-K	-
LSMs	-	50-120	Be-F	-

“De modo a manter uma relação geométrica correta entre amostra, cristal analisador e detetor em toda a gama de ângulos difratados, é necessário manter todos os três componentes no círculo de Rowland (Figura 17) o que é conseguido à custa de um goniómetro mecânico que movimenta o cristal e o detetor de modo a que se mantenham as condições de difração corretas" (Beckhoff et al., 2006; Shackley, 2011).

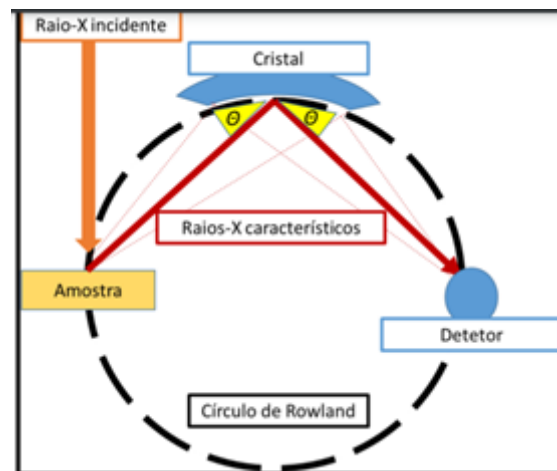


Figura 17- Relação entre amostra, cristal analisador e detetor no círculo de Rowland. Adaptado de Beckhoff et al.,2006.

O método de WDXRF é prático pelo facto de a preparação das amostras ser simples e não requerer muito tempo, permitindo medições diretas, sendo passível de ser utilizado em estudos para deteção de impurezas metais em produtos farmacêuticos, por exemplo (Figueiredo, Fernandes, Costa, Gonçalves & Brito, 2016).

As vantagens mais notórias desta técnica são as seguintes:

- Realiza análises de amostras de ínfimo tamanho;
- Pode ser aplicada a uma grande quantidade de materiais sólidos, naturais ou sintéticos, incluindo minerais, vidros, esmalte dos dentes, semicondutores, cerâmicas, metais, entre outros;
- Possui maior resolução e sensibilidade na detecção dos elementos vestigiais que a EDXRF

(Beckhoff et al., 2006; Shackley, 2011)

E as suas desvantagens:

- Não deteta elementos com número atômico inferior a 5 (Boro), impossibilitando a detecção de vários elementos importantes (Ex. Hidrogénio, Lítio e Berílio);
- Alguns picos apresentam sobreposições significativas (Ex. Vanádio-K $\alpha$  e Titânio-K $\beta$ );
- Ao contrário da EDXRF, não possibilita a distinção entre os estados de valência dos elementos, havendo a necessidade de recorrer a outras técnicas complementares para obtenção desse tipo de informações, bem como não permite determinar os isótopos de um elemento;
- Devido ao elevado peso das partes que compõem os espectrómetros de WDXRF, não existem espectrómetros portáteis disponíveis.

#### **4.2 Técnica De Fluorescência De Raios-X Por Dispersão De Energia (EDXRF)**

A técnica de EDXRF foi desenvolvida nos finais da década de 60 e início da década de 70, com o surgimento dos detetores semicondutores. Na EDXRF as radiações características de todos os elementos de uma amostra são registadas por um detetor, produzindo um pulso elétrico cuja amplitude será proporcional à energia da radiação emitida pela amostra. Com a ajuda de um sistema analisador multicanal consegue fazer-

se a separação dos pulsos pela amplitude dos mesmos, obtendo-se um espectro em função da energia de radiação incidente nesse mesmo detector. De forma dissimilar à WDXRF, a EDXRF não é constituída por partes móveis, sendo um sistema em que o próprio detector funciona como agente dispersivo da energia da radiação. A resolução desta técnica depende do detector que se utiliza, variando no geral de 150 a 600 eV (Janssens, 2004). A amostra localiza-se no centro dos eixos a uma distância fixa do detector e da fonte de radiação, quer gama ou radiação X.

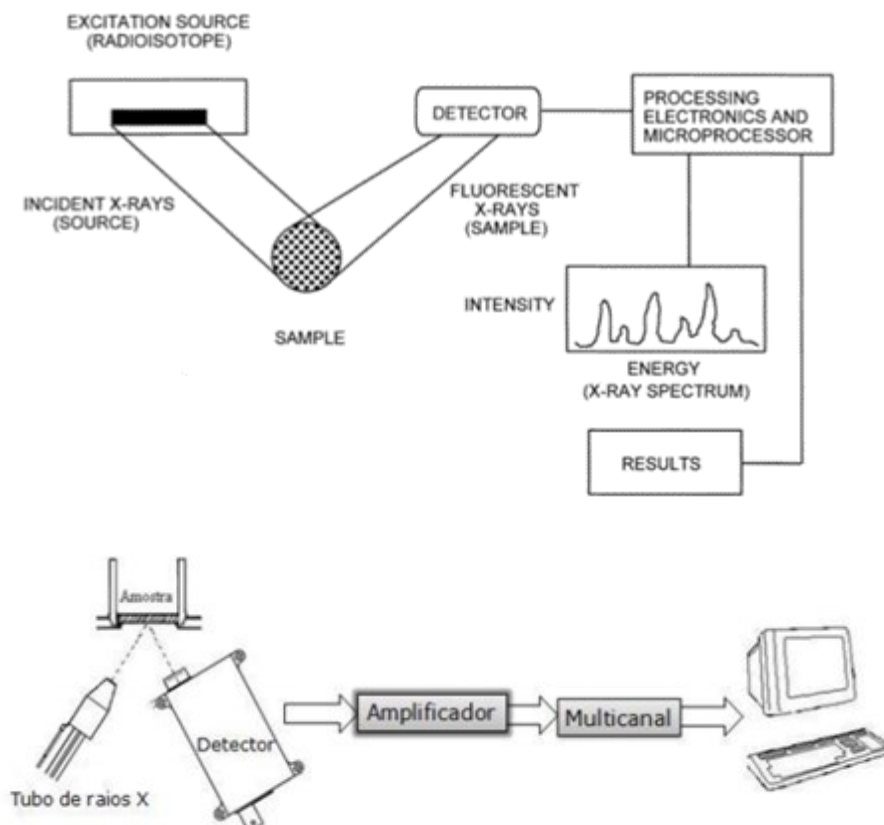


Figura 18- Sistemas EDXRF adaptado de Klockenkämper, R. 1997

A tensão, a corrente do tubo de raios-X, ou a atividade da fonte da excitação são alguns parâmetros que podem afetar as medições EDXRF. Quando a amostra absorve radiação, a intensidade dos picos pode aumentar ou diminuir. Quanto menor o caminho percorrido pelos raios-X em direção à amostra, menos provável será a ocorrência de erros na interpretação dos dados do espectro que serão, por sua vez, de mais fácil interpretação.

Os raios-X característicos emitidos pela amostra podem sofrer interações com o ambiente antes de atingirem o detetor e, assim, as linhas características de baixa energia são de complicada determinação. É importante que o tubo de raios-X e o detetor sejam colocados o mais próximo possível da amostra para evitar perdas por absorção da radiação aérea. O semicondutor Si(Li) é o que apresenta melhor resolução, motivo pelo qual é o mais utilizado nesta técnica (Knoll, 2010)

Uma forma de diminuição da absorção dessa radiação é a colocação do detetor num ângulo entre 30° e 60° relativamente ao tubo de raios-X. O ângulo de incidência do detetor usado geralmente é de 45°, ocorrendo refração do feixe incidente (Nascimento Filho, 1999)

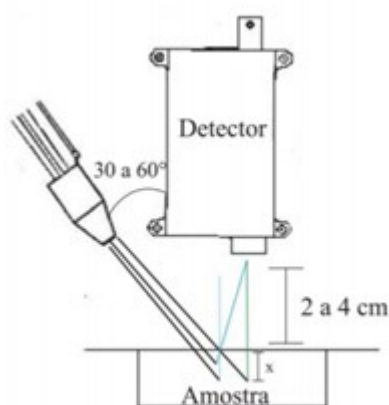


Figura 19- Ângulo formado entre o detetor e o tubo de raios-X. Adaptado de Klockenkämper, R. 1997

É um método de análise simples, não destrutiva, o material analisado pode ter formas diversas e estados diferentes, sendo independente da estrutura química; a preparação das amostras é fácil e o sistema está preparado para amostras de várias formas e tamanhos e sem grandes perigos de contaminação; possuem a capacidade de análise de diversos elementos em simultâneo e de elementos até uma concentração de 1ppm. O espectrómetro de raios-X, para análise elementar de uma dada amostra, é composto por duas partes fundamentais: o sistema de produção de raios-X e o sistema de deteção de radiação característica (Cateano, 2018).

As vantagens mais notórias desta técnica analítica são:

- Aquisição de espectros elementares completos em poucos segundos;
- Os softwares disponíveis atualmente possibilitam a fácil identificação dos picos elementares, tornando a EDXRF uma ferramenta útil na investigação de amostras de constituição desconhecida;
- Realização de estudos semiquantitativos;
- Análises de baixo custo.

(Beckhoff et al., 2006; Shackley, 2011)

E as principais desvantagens:

- Probabilidade de ocorrência de sobreposição de picos de energia, especialmente de níveis de energia diferentes (K, L e M) de elementos diferentes (Ex. existem sobreposições próximas entre o manganês- $K\alpha$  e o cromo- $K\beta$ , ou o titânio  $K\alpha$  e várias linhas L do bário- escrever só no bloquinho de notas) o que faz com que haja necessidade de aplicação de métodos de separação de picos, podendo também, o utilizador, no contexto da análise amostral, decidir qual é o elemento que faz mais sentido;
- A EDXRF é pouco utilizada para a análise química mas, ainda assim, a resolução dos detetores tem evoluído ao longo dos anos;
- As múltiplas massas de um elemento (isótopos), não podem ser determinadas pela EDXRF.

(Beckhoff et al., 2006)

### 4.3 Comparação EDXRF e WDXRF

A primeira diferença entre ambos reside na faixa de números atômicos detetada por cada equipamento. A faixa de EDXRF compreende os elementos do Sódio ao Urânio e a WDXRF do Berílio ao Urânio (podendo variar com as características de cada equipamento, por exemplo com os cristais utilizados ou o tipo de detetor). A maior diferença entre a WDXRF e a EDXRF é a resolução em energia dos picos detetados. Os instrumentos baseados em WDXRF podem apresentar resolução entre 15 e 150 eV dependendo da configuração, enquanto os instrumentos de EDXRF apresentam resolução

de valores que rondam os 150 eV que está também relacionada com o tipo de detetor empregue.

A WDXRF possui uma resolução superior à EDXRF e no caso da primeira a radiação de fundo está diretamente relacionada com a quantidade de radiação contínua que alcança a zona de interesse, e a largura é determinada pela resolução. No caso da EDXRF utilizam-se filtros ou alvos secundários com o objetivo de diminuir a quantidade de radiação contínua na região de interesse também dependente da resolução, produzindo uma maior intensidade do pico para excitar o elemento de interesse.

A eficiência da fonte está relacionada com a potência necessária para fazer com que o sistema trabalhe de forma otimizada. Uma potência maior significa maior consumo de energia e um maior desgaste do espectrómetro, tornando o processo mais dispendioso. No sistema de WDXRF a intensidade do feixe é reduzida no processo de excitação da amostra (no dispositivo de difração e durante o percurso da amostra até o detetor) enquanto que no caso da EDXRF, a intensidade é reduzida nos filtros, nos alvos secundários e na excitação da amostra. A sensibilidade dos sistemas de EDXRF é razoável para elementos leves e elevada para elementos pesados. Os custos relacionados com os equipamentos são baixos e o consumo energético ronda os 5 a 1000 W, não possuindo partes móveis. A WDXRF possui uma alta sensibilidade para medições de elementos leves e razoável para elementos pesados, realizando uma análise sequencial ou simultânea (dependente do aparelho) geralmente mais demorada quando comparada com a EDXRF, tendo também custos mais elevados e consumo energético na ordem dos 200 a 4000 W, possuindo como partes móveis o cristal e o goniómetro como se pode observar na Tabela 2.

Tabela 2- Comparação das técnicas EDXRF e WDXRF. Adaptado de Brouwer, 2010.

	EDXRF	WDXRF
<b>Gama de Elementos</b>	Sódio (Na) – urânio (U)	Berílio (Be) – urânio (U)
<b>Resolução (Mn - K<math>\alpha</math>)</b>	~150 eV	~15 – 150 eV
<b>Sensibilidade</b>	Razoável para elementos leves. Alta para elementos pesados.	Alta para elementos leves. Razoável para elementos pesados.
<b>Análise</b>	Análise simultânea multielementos. Obtém um espectro com vários elementos em segundos.	Análise sequencial ou simultânea multielementos (dependente do aparelho); geralmente mais demorada, comparando com EDXRF.
<b>Custo de Equipamento</b>	Baixo	Elevado
<b>Consumo Energético</b>	5 – 1000 W	200 – 4000 W
<b>Partes Móveis</b>	Não tem	Cristal e Goniómetro

#### **4.4 Fluorescência de Raios-X por Reflexão Total (TXRF)**

“A EDXRF tem sido amplamente utilizada desde o aparecimento dos detetores de estado sólido (Ge(Li) e Si(Li)), devido à sua versatilidade no que respeita ao carácter de análise multielementar, rapidez e baixo custo por análise. No entanto, quando se torna necessário aumentar a sensibilidade da análise para detecção de valores inferiores ao ng, é necessário garantir que o sinal de fluorescência obtido dos elementos se distinga inequivocamente do fundo no espectro de raios-X” (Almeida, 2007). A redução do fundo nos espectros é o principal objetivo quando se procura o melhoramento deste tipo de técnicas, contribuindo para a evolução das mesmas.

Nesta técnica os fótons que não são absorvidos são totalmente refletidos o que reduz a difusão da radiação. Assim, a TXRF assenta nos mesmos fundamentos da EDXRF, sendo uma variante desta e cuja diferença fundamental reside no ângulo de incidência da radiação X relativamente à superfície do espécime. Esta técnica apresenta grandes vantagens face à XRF clássica como o facto de fazer a análise unicamente de camadas finas das amostras o que se traduz numa diminuição dos efeitos da excitação secundária (intensificação), que não se fazem sentir. As intensidades relativas não dependem da composição da amostra, não manifestando os efeitos de matriz. Nos equipamentos desta técnica, o detetor encontra-se muito próximo da amostra em análise, permitindo que a radiação emitida pela amostra seja detetada com grande eficiência e reduzido ruído de fundo (Knöchel, 1990).

“O ângulo de incidência do feixe de radiação primária (ângulo formado entre o feixe e o plano de suporte da amostra), para a EDXRF convencional, é de cerca de 45° enquanto que para TXRF é de poucos minutos de arco de modo a ser inferior ao ângulo crítico a que ocorre a reflexão total” (Almeida, 2007).

O que os espécimes a serem analisados pela TXRF têm em comum é a forma como são colocados sobre o suporte, visto que têm obrigatoriamente de formar depósitos finos sobre os refletores, e só desta forma é que os efeitos de matriz podem ser desprezados, garantido que a amostra não contribua de forma substancial para a difusão da radiação primária e conseqüente aumento do ruído de fundo.

É atualmente muito utilizada na análise direta de amostras líquidas, soluções e suspensões, sendo também empregue em estudos de amostras sólidas quando

previamente preparadas como suspensões. Para a análise de metais e ligas, basta friccioná-las nos suportes refletores. “Existe outro tipo de amostras para o qual a técnica de TXRF é bastante adequada que são os micrótomos de tecidos biológicos” (Almeida, 2007). A técnica mostrou ser especialmente eficaz em análises de elementos vestigiais em sangue, soro, líquido amniótico e para microanálises de tecidos de órgãos, cabelos e dentes.

A grande desvantagem desta técnica reside na exigência de *thin films* amorfos (sem estruturas cristalinas) havendo a necessidade de preparação de soluções.



Figura 20- Comparação da geometria do raio de excitação para XRF clássico e para TXRF adaptado de Klockenkamper, 1997

#### 4.5 Micro-Fluorescência de Raios-X ( $\mu$ -XRF)

Na XRF convencional uma grande superfície de amostra é necessária para análise e assim, no início dos anos 80, foi desenvolvida uma fonte de raios-X microfocados. A  $\mu$ -XRF é o método de escolha para a análise elementar de amostras não homogêneas ou de formato irregular, bem como pequenas amostras ou mesmo inclusões. A diferença principal reside no facto de que a  $\mu$ -XRF possui um nível de resolução espacial na ordem dos  $\mu\text{m}$ .

A disponibilidade de feixes de radiação altamente intensos a partir de fontes de sincrotrão aumentou o interesse na utilização de feixes microscópicos de raios-X

A primeira configuração de um equipamento de microfios de raios-X foi descrita por Horowitz e Howell (1972) e, desde aí, os equipamentos de  $\mu$ -XRF têm-se desenvolvido rapidamente e o número de aplicações encontra-se também em crescimento.

#### 4.6 Sistemas Portáteis De Fluorescência De Raios-X

A instrumentação por XRF pode ser dividida em espectrómetros de laboratório e portáteis. Uma vantagem notória dos segundos é o facto de poderem ser utilizados *in situ*, enquanto que os primeiros possuem geralmente mais sensibilidade na análise de amostras (sendo os limites típicos por volta dos 10mg/kg) apresentam, contudo, a desvantagem associada às grandes dimensões que lhes são características. Desta forma, certas análises de determinados analitos estão condicionadas pelo facto de não poderem ou deverem ser movidas como é o caso de determinados objetos arqueológicos, artísticos e culturais. (Nascimento-Dias, 2017).

Os sistemas portáteis de XRF possuem, inegavelmente, uma menor sensibilidade e resolução que os instrumentos laboratoriais, todavia são também assentes nos mesmos princípios que a XRF laboratorial, como o facto de ser uma técnica não destrutiva (Nascimento-Dias, 2017). A vantagem de poderem ser utilizados *in situ* reside fundamentalmente na sua praticidade, apresentado também algumas contrapartidas como a “contaminação” atmosférica nos resultados dos espectros adquiridos. O Argónio (Ar), por exemplo, aparece como se fizesse parte da amostra pois o mesmo é excitado e contabilizado pelo detetor, interferências que, no caso de um sistema laboratorial, poderiam ser removidas à custa da utilização de métodos de análise em vácuo. Assim torna-se complicada a deteção de elementos leves devido à absorção de raios-X de baixa energia pelo ar e pela janela do detetor.

É importante salientar que, independentemente das características de cada espectrómetro e das limitações que apresentam e que lhes são intrínsecas, cabe ao analisador determinar que escolha lhe é mais proveitosa para o tipo de análise que vai realizar (Nascimento-Dias, 2017).

#### 4.7 Comparação da XRF com outras técnicas analíticas

A XRF, como já foi enunciado, é uma técnica versátil e rápida que promove a análise de uma grande variedade de amostras. É útil e econômica na medida que os maiores custos residem no *hardware*. Os instrumentos não contêm muitas partes móveis, necessitando de pouca manutenção e, no seu uso convencional, consomem apenas nitrogênio líquido (os que necessitam de arrefecimento) e eletricidade (Caetano, 2018).

Para a avaliação, quer qualitativa quer quantitativa, dos elementos em espécimes biológicos, médicos e ambientais, podem pôr-se em prática diversos métodos analíticos. A AAS (Espectroscopia de Absorção Atômica), a ICP-AES (Espectroscopia de Emissão Atômica por Plasma Acoplado Indutivamente) e a ICP-MS (Espectroscopia De Massa Com Plasma Acoplado Indutivamente) são as mais comumente utilizadas para análise elementar de amostras nestas áreas, executando análises com elevada sensibilidade (ppm-ppb), contudo, as mesmas necessitam de ser solubilizadas pré-análise. Essa solubilização pode ser elaborada, por exemplo, através da imersão num ácido, dificultando o processo de análise elementar, tendo em conta que este procedimento diminui a concentração dos elementos vestigiais (*trace elements*) alvo, tendo em conta que aquando do processo de solubilização ocorre uma perda da qualidade do espécime, perdendo-se também alguma informação acerca do mesmo. As amostras a analisar no ramo da biologia e medicina são, muitas vezes, restritas na quantidade, pelo que devem tentar preservar-se ao máximo em vez de entrar por processos que interfiram de tal forma com a sua constituição (Uo, Waga & Sugiyama, 2015). A ICP-MS é uma técnica que pode abranger limites de deteção inferiores aos da XRF. No que concerne à velocidade de análise, é tão ou mais rápida quando comparada com a XRF, apresentando níveis de precisão muito elevados. As técnicas de ICP exigem, contudo, grandes quantidades de Árgon puro no estado gasoso, o que as torna técnicas excessivamente onerosas (Beckhoff et al., 2006; Harris, 2010; Shackley, 2011).

A espectroscopia por energia dispersiva (EDS) e a microsonda de sonda de elétrons (EPMA) são, de igual forma, muito utilizadas nestes campos de estudos, sendo populares na análise micro elementar, providenciando ainda imagens microscópicas eletrônicas e imagens de distribuições elementares apresentam, no entanto, elas também, as suas desvantagens, pois é necessário que os espécimes contenham eletrocondutividade (ou um

revestimento eletrocondutor) e que sejam mantidos sob um elevado vácuo durante as observações e, para que isso aconteça, espécimes molhados (células ou tecido molhado) são requeridos. A verdade é que espécimes com pouca resistência a altas temperaturas (por exemplo tecidos embebidos em parafina) são difíceis de analisar por esta via. Em adição, há a possibilidade de a irradiação eletrônica poder causar danos nas amostras pelo que é necessário que sejam manuseadas por operadores bem treinados, especialmente quando de espécimes raros se trata a análise (Uo et al., 2015).

Os limites de detecção na espectroscopia de absorção atômica com forno de grafite (GFAAS) são muito inferiores aos da XRF, porém as análises por estes métodos podem mostrar interferências da matriz. A GFAAS, para além de ser uma técnica destrutiva, é também relativamente lenta pois analisa os elementos um a um (Uo et al., 2015).

*Tabela 3- Métodos de Análise de Elementos Vestigiais.  
Adaptado de Uo et al., 2015*

	Name of analysis methods
Destructive analysis	AAS (atomic absorption spectroscopy) ICP-AES (inductively coupled plasma-atomic emission spectroscopy) ICP-MS (inductively coupled plasma-mass spectroscopy)
Semi-destructive	LA-ICP-MS (laser abrasion ICP-MS) SIMS (secondary ion mass spectroscopy)
Non-destructive	EDS (energy dispersive X-ray spectroscopy) WDS (wavelength dispersive X-ray spectroscopy) XRF (X-ray fluorescence spectroscopy) NAA (neutron activation analysis) PIXE (particle induced X-ray emission spectroscopy)

Assim sendo, a utilização de técnicas de fluorescência de raios-X apresenta vantagens em relação a outras técnicas por diversos motivos:

- A irradiação de raios-X e a sua detecção por fluorescência podem ser realizadas em meio aéreo, e a evacuação da câmara de amostra não é necessária, como ocorre na microscopia eletrônica;
- Não provoca danos nas amostras sendo adequada para amostras biológicas escassas;
- Não há requerimentos específicos para a condição das amostras (no geral) não requerendo, muitas vezes, um pré-tratamento dos espécimes;

## 5. ELEMENTOS NO ORGANISMO

Os elementos presentes no organismo podem dividir-se em elementos major, minor e oligoelementos ou elementos vestigiais. Dos 118 (atualização 2020) elementos presentes na tabela periódica, 11 representam 99.5% do número total de átomos presentes no organismo humano. Desses 11 elementos, 4 - carbono (C), oxigénio (O), hidrogénio (H) e nitrogénio (N) – são considerados elementos *major* e constituem cerca de 96% dos elementos do corpo humano; os outros 3,5% são constituídos pelo sódio (Na), potássio (K), cálcio (Ca), magnésio (Mg), fósforo (P), enxofre (S) e cloro (Cl). Os restantes átomos presentes no corpo humano são os considerados elementos vestigiais ou oligoelementos (*trace elements*), definidos em biologia como elementos necessários em quantidades muito reduzidas para um adequado crescimento e desenvolvimento fisiológico do organismo, sendo estes o ferro (Fe), zinco (Zn), cobre (Cu), iodo (I), flúor (F), manganês (Mn), cobalto (Co), molibdénio (Mo), selénio (Se), crómio (Cr), vanádio (V), silício (Si), níquel (Ni) e arsénio (As) (Underwood, 2012).

“Os elementos mais abundantes estão envolvidos em ligações covalentes, em manutenções eletrolíticas e são importantes constituintes dos tecidos, enquanto que os oligoelementos desempenham diversos processos metabólicos” (Wada, 2004).

## Elementos vestigiais (*trace elements*)

Os elementos vestigiais podem ser divididos em três grupos conforme a sua importância nutricional para o organismo humano:

- Elementos essenciais: Iodo (I), zinco (Zn), selênio (Se), cobre (Cu), molibdênio (Mo), cromo (Cr), bromo (Br), ferro (Fe)
- Elementos provavelmente essenciais: Manganês (Mn), silício (Si), níquel (Ni), boro (B), vanádio (V)
- Elementos potencialmente tóxicos (podendo alguns, em concentrações extremamente baixas ter funções essenciais): chumbo (Pb), flúor (F), cádmio (Cd), mercúrio (Hg), alumínio (Al), arsênio (As), lítio (Li), estanho (Sn)

(Classificação dos *trace elements* pela OMS)

### Elementos Essenciais Ao Metabolismo Celular:

Um elemento químico classifica-se essencial se o seu fornecimento ao organismo em doses inferiores a um determinado valor considerado, ou mesmo a falta de fornecimento desse elemento em questão, provocar disfunções metabólicas e deficiências funcionais, impedindo o organismo de completar o seu ciclo vital ou até mesmo o seu crescimento. Considera-se elemento essencial aquele que é necessário ao organismo de tal forma que o seu efeito não pode ser conseguido por nenhum outro, estando diretamente envolvido nos seus processos metabólicos (Annuniação, 2008).

São estes elementos, aqueles que se encontram na maior parte dos tecidos e fluidos corporais como é o caso do P, S, Cl, K, Ca, Cr, Mn, Fe, Ni, Cu, Zn, Se, Br, Rb e Sr (*Trace elements in human nutrition and health*, 1996).

Os elementos essenciais, em determinadas quantidades podem, também eles, constituir um potencial tóxico para o organismo.

### Elementos Não Essenciais/ Tóxicos:

Um elemento designa-se como tóxico quando presente em doses superiores a um determinado valor impede ou lesa o desenvolvimento e as funções metabólicas do organismo. Os efeitos tóxicos num sistema biológicos não são desencadeados, por si só, pela presença de um agente químico mas sim se esse agente, ou os produtos da sua degradação metabólica, envolvidos nos processos de biotransformação, atingirem determinados locais do organismo numa determinada concentração, por um determinado período de tempo que possa ser considerado suficiente para a produção de manifestações tóxicas.

Não só o fator tempo e local contribui para tal, como é importante ter em conta as características do próprio elemento, de que agente químico se trata especificamente, os efeitos que produz, e dose necessária para o efeito. Fatores do indivíduo são também relevantes relativamente à sua relação com os agentes químicos. É importante notar que todos os elementos químicos podem ser considerados tóxicos quando em concentrações superiores às necessárias pelo organismo (Navarro-Pedreño et al., 1993).

As principais determinantes da toxicidade dos elementos baseiam-se nos seguintes pontos:

- Substituição dos metais nos centros ativos das enzimas;
- Ligação a radicais das enzimas e outras moléculas biológicas modificando a estrutura e reatividade das mesmas;
- Substituição de grupos ou moléculas biológicas;
- Formação de precipitados com metais de enzimas ou outros grupos envolvidos no metabolismo;
- Catalisação e decomposição de metabolitos essenciais;
- Combinação com membranas com alteração da sua permeabilidade;
- Substituição de elementos com funções eletroquímicas.

Os elementos não essenciais são, por exemplo, o Co, As, Cd, Hg, Pb e U. São considerados metais não essenciais, dado que não se conhece nenhuma função metabólica dos mesmos, sendo tóxicos mesmo em baixas concentrações.

Uma composição equilibrada de elementos vestigiais no corpo humano é essencial para o bom funcionamento do mesmo, de forma a que lhe seja possível cumprir funções metabólicas necessárias, existindo uma correlação entre o desequilíbrio destes elementos, quer por excesso quer por defeito, com estados de patologia (Silva et al., 2012).

## 6. APLICAÇÕES DA FLUORESCÊNCIA DE RAIOS-X (XRF) NA MEDICINA

Com a evolução do conhecimento científico e tecnológico, a XRF tem vindo a ser cada vez mais aplicada em análises elementares nas mais distintas áreas, sendo uma técnica muito promissora que proporciona a obtenção de resultados eficientes e análises fiáveis contribuindo para a investigação médica, permitindo caminhar no sentido de novas descobertas bem como testar novos conceitos. (Nascimento-Dias, 2017).

Os tecidos humanos são compostos por diversos tipos de minerais e elementos que atuam como agentes catalíticos ou como elementos estruturais. Muitos materiais metálicos e inorgânicos são utilizados na área da Medicina, particularmente na Medicina Dentária. As análises de amostras nestas áreas estão, muitas vezes, condicionadas por fatores como a humidade que lhes é característica apresentando, muitas delas, uma insuficiente resistência ao calor. A análise destes espécimes em termos de quantificação, distribuição e estado químico pela XRF pode providenciar-nos importantes informações (Uo et al., 2015).

A mucosa oral é exposta a um variado número de “objetos estranhos” aquando da prática das funções biológicas como a alimentação, e não só, por exemplo numa visita ao Médico Dentista, pode entrar em contacto com diversos materiais como os utilizados para a realização de restaurações. A cavidade oral está também sujeita ao contacto com outros sistemas orgânicos, como é o caso do sistema respiratório via partículas em circulação nos canais que lhes são comuns. Muitas vezes este contacto, em certas condições, pode proporcionar o desenvolvimento de lesões patológicas que é importante estudar (Uo et al., 2015).

## **6.1 Cancro, Outras Patologias e Lesões Tumorais**

Os mecanismos reguladores do organismo exercem um estrito controlo sobre os processos de divisão celular, contudo, por vezes, certas células respondem de uma forma diferente aos sinais que lhes são transmitidos, multiplicando-se sem cessar, tomando o nome de células cancerosas, que são habitualmente destruídas pelo sistema imunitário de defesa organismo. Por vezes, porém, ocorre a formação de tumores quando o sistema imunitário falha, permitindo a divisão celular descontrolada. Os tumores não apresentam, todos eles, carácter maligno sendo até, na sua maioria, benignos, não infiltrando as células vizinhas nem formando metástases. O cancro é considerado quando os tumores atingem o carácter de malignização (Geraki, Farquharson & Bradley, 2003).

### ***Elementos vestigiais e o seu papel no cancro***

Na atualidade a abordagem terapêutica aos diferentes tipos de cancro é feita com base em fatores preditivos e fatores de prognóstico que estão estabelecidos para a patologia em si. Estes fatores podem atuar como biomarcadores tumorais.

Mesmo que os elementos vestigiais constituam apenas uma pequena parte dos tecidos vivos, eles são de extrema importância para os processos vitais (Silva, Tomal, Perez, Ribeiro-Silva & Poletti, 2009). Alguns metais, normalmente presentes em enzimas, proteínas e membranas celulares, são essenciais para a função fisiológica normal do organismo. Contudo, quando se expressam de forma anormal, parecem contribuir para o desenvolvimento de diversos processos patológicos, como o crescimento tumoral (Prasad & Oberleas, 1976).

Certos elementos como o cálcio, o ferro, o cobre e o zinco, entre outros, podem ser encontrados em concentrações muito superiores em determinados tipos de tecidos neoplásicos (malignos e benignos) quando comparados com tecidos normais e isto é o que a XRF possibilita analisar, a relação dos mesmos com o processo de carcinogénese (Silva et al., 2012).

O estudo das concentrações elementares em relação a um número específico de patologias, como é o caso do cancro da mama, tem-se tornado uma área ativa de pesquisa

e investigação devido ao papel que estes elementos desempenham nos processos bioquímicos e fisiológicos do organismo. Relativamente a este tipo de cancro, Majewska et al. reportou diferenças nas concentrações elementares entre tumores benignos e malignos (Geraki et al, 2003) encontrando um aumento de potássio e zinco relativamente às concentrações de ferro e cobre. Silva et al. reportaram que o tumor da mama com presença do elemento cobre estava mais relacionado com a não sobrevivência dos pacientes (Magalhes, Becker, Carvalho & Von Bohlen, 2008).

As justificações fisiológicas para relacionar as concentrações elementares ao cancro são múltiplas, de acordo com as várias funções elementares, particularmente dos elementos vestigiais. É de elevado interesse o estudo de elementos específicos pois podem estar associados a funções de proteção do organismo contra doenças e, por outro lado, permitirem a propagação das mesmas. Por exemplo, o cobre e o zinco atuam como catalisadores para enzimas antioxidantes (superóxido dismutase) que desempenham um papel importante na defesa do organismo contra certas patologias. Por outro lado, o cobre (e o ferro) podem atuar também como catalisadores da produção de radicais hidroxilo relacionados com a destruição tecidual. O ferro pode ser associado ao cancro da mama porque é o maior regulador da criação de locais de abastecimento sanguíneos, algo que aumenta nas áreas tumorais deste tecido. O zinco é um cofator do grupo das anidrases carbónicas, enzimas que estão relacionadas com a hipoxia que, por sua vez, é um indicador do prognóstico do cancro da mama. A diferença entre os níveis de potássio entre os tecidos saudáveis e malignos, pode ser, contudo, simplesmente o resultado do facto de a composição intracelular variar e o potássio ser um dos mais abundantes elementos intracelulares (Geraki et al., 2003).

Como já foi referido anteriormente, muitos elementos têm funções fisiológicas essenciais (participando nos processos biológicos pela ativação, inibição ou promoção de reações enzimáticas) podendo até ter propriedades anti carcinogénicas, outros são tóxicos, mutagénicos ou carcinogénicos, sendo que uma composição química estável é um dos fatores mais relevantes e necessários para o funcionamento normal do organismo. As técnicas de instrumentação por XRF abriram horizontes no que concerne à deteção de elementos vestigiais a níveis ínfimos (Sudarshan, Ram, Majumdar, Maity, Ray & Chakraborty, 2011). O conhecimento dos valores de concentração dos elementos vestigiais nos tecidos humanos providencia um melhor entendimento do papel dos mesmos no desenvolvimento de determinadas patologias. Amostras de tecidos

patológicos contêm, algumas vezes, corpos estranhos na forma sólida, quer calcificados quer precipitados, que se mostram de extrema relevância para a tomada de um diagnóstico e a XRF é capaz de os detetar de forma não destrutiva (Uo et al, 2015). As comparações de elementos vestigiais em tecidos cancerígenos com amostras de tecidos normais em pacientes com cancro podem dar-nos indicações de reações de elementos intercambiáveis e informações à cerca de possíveis alterações no metabolismo celular, sendo desejável proceder à análise da distribuição desses elementos em tecidos malignos e saudáveis de variados órgãos humanos (Benninghoff, Von Czarnowsk, Denkhau & Lemke, 1997).

Abnet et al. realizaram medições de XRF para determinar a presença dos elementos Cu, Fe, Ni, S e Zn em secções simples de 5 mm de espessura de biópsia esofágica fixada em formalina e embebida em parafina. Kwiatek et al. exibiram as diferenças presentes entre as concentrações elementares de Co, Fe, Mn, Ni e Zn em partes cancerosas e saudáveis de tecido da próstata. A investigação de tecidos patológicos em doenças neurodegenerativas (Alzheimer, Parkinson, etc.) foi levada a cabo por IdeEktessabi e Rabionet. Custodio et al. realizaram um estudo comparativo utilizando a EDXRF para determinação da concentração dos oligoelementos na placenta e membranas humanas. Gresits e Konczoi empregaram a EDXRF de forma a estudar a concentração de oligoelementos em *Mycobacterium fortuitum*. Além disso, Waern et al. estudaram a distribuição intracelular de metais de transição em células de pulmão de hamster tratadas com metalocenos antitumorais em que os elementos Mo, Nb, Ti e V foram determinados por  $\mu$ -SRXRF. Zaichick et al. encontraram elevados níveis de prata, cobalto, mercúrio, iodina e rubídio em nódulos malignos e Baltaci et al. encontraram variações nos níveis de zinco e selénio em tecidos da tiróide (Citado de Marguí et al., 2006).

Para além dos elementos potencialmente ligados aos processos de desenvolvimento cancerígeno, estudos como o de Brito et al. (2014) confirmaram que a exposição ao chumbo (Pb) está associada ao aumento da mortalidade, podendo também estar relacionada com a diminuição da massa óssea e a da qualidade da mesma podendo levar a um quadro de osteoporose.

Uma poderosa ferramenta para análise de amostras biológicas massa-limitadas é a TXRF. No caso de métodos diretos, o material biológico é colocado no prato de quartzo e medido com ou sem uma digestão preliminar. As notórias vantagens deste método são a

possibilidade mínima de contaminação que apresenta, a rapidez e a possibilidade de evitar a diluição das amostras (Szoboszlai, Réti, Budai, Szabó, Kralovánszky & Zárav, 2008).

No IUEM (Instituto Universitário Egas Moniz) existe um Laboratório de WDXRF (WDXRFLab) que, entre outras aplicações, permite determinar as concentrações elementares de tecidos saudáveis e tecidos patológicos, bem como relacionar a exposição ambiental a determinados poluentes que possam estar ligados à mortalidade na população portuguesa.

### ***Elementos vestigiais e a Patologia Oral***

O cancro oral é classificado como “o conjunto de tumores malignos que afeta qualquer parte da cavidade oral, desde os lábios até à garganta”. As suas localizações mais frequentes são o pavimento da boca, o bordo lateral da língua e o palato mole. É o sexto cancro mais comum em todo o mundo, sendo mais frequente no sexo masculino a partir da 4ª década de vida. (Warnakulasuriya, 2009). O cancro oral consiste no crescimento incontrolável das células da cavidade oral, acabando por invadir e danificar os tecidos adjacentes. O carcinoma com maior incidência é o Espinocelular (carcinoma das células escamosas- 95%), que surge através de diversas etapas de carcinogénese de lesões pré-malignas, possam ocorrer outro tipo de lesões (5%) como sarcomas, adenocarcinomas (nas glândulas salivares) e linfomas. A taxa de incidência destas lesões, segundo a OMS, está a aumentar e prevê-se a continuidade desse aumento nas próximas décadas (Bettendorf, Piffko & Bankfalvi, 2004).

Os fatores de risco associados com o cancro oral, nomeadamente com o Carcinoma Espinocelular estão muitas vezes relacionados com o consumo de álcool, tabaco e noz de areca, inflamações crónicas e infeções virais (como o HPV). As lesões pré-malignas podem desenvolver-se e transformar-se em lesões cancerosas mesmo em indivíduos em que a idade não consiste num fator de risco (de idade inferior a 30 anos) (Khurshid, Zafar, Khan, Najeeb, Slowey & Rehman, 2018).

O diagnóstico precoce é de extrema importância para que se detetem eficazmente sinais suspeitos possibilitando a implementação de medidas ainda numa fase assintomática. O

Médico Dentista desempenha um papel crucial na sua deteção precoce, Holmes et al. (2003) chegaram à conclusão de que um carcinoma oral assintomático é mais facilmente detetado numa consulta de Medicina Dentária do que numa consulta de Clínica Geral.

A verdade é que no panorama da literatura atual no que concerne a Medicina Oral, não existem muitos estudos que relatem a ligação dos elementos vestigiais e os mais diversos tipo de patologias orais. A maioria dos estudos existentes é realizada em grupos compostos por indivíduos asiáticos, sendo que na Ásia é comum o consumo da noz de areca (*betel quid*) que está diretamente relacionado com estas patologias. Isto complica a extrapolação dos resultados para a realidade Europeia.

A biópsia e análise histopatológica convencional são considerados ainda o *Golden Standard* no diagnóstico das lesões da cavidade oral, pré-malignas e malignas. A análise histopatológica, como exame clínico, manifesta algumas limitações que podem ser ultrapassadas com o uso da XRF, nomeadamente no que concerne à deteção de biomarcadores elementares (Mehrotra & Gupta, 2011; Nair, Pruthy, Pawar & Chaturvedi, 2012).

Em aplicações biomédicas a técnica XRF é utilizada para apoiar as previsões de risco de cancro e acompanhar o estado das doenças:

A Leucoplasia Oral consiste numa placa branca não destacável que atinge principalmente a língua, a mucosa jugal e o assoalho da boca, que ocorre geralmente entre a quinta, sexta e sétima décadas de vida. É a lesão potencialmente maligna mais frequente da cavidade oral. O seu diagnóstico é um processo complexo devido à diversidade de aspetos que pode tomar clinicamente e pela ausência de sintomatologia que lhe é característica. O potencial de malignizar varia de acordo com o tipo e localização e com a frequência da exposição aos fatores de risco e ainda relativamente à presença histológica de hiperqueratose (Francisco, 2011).

A Fibrose Submucosa é, por sua vez, uma doença crónica progressiva que também apresenta potencial de malignização, afetando a cavidade oral e a orofaringe. Nos pacientes com esta condição há um risco mais elevado de desenvolverem cancro oral.

Num estudo levado a cabo por Sudarshan et al. (2011), a EDXRF foi utilizada como forma de descobrir se esta seria uma boa técnica para análise dos elementos vestigiais nas

referidas patologias, tendo sido confirmada a sua eficácia na determinação dos elementos vestigiais nos tecidos patológicos analisados.

Num estudo preconizado por Khanna et al. (2013) foram comparadas as concentrações dos elementos Cu, Zn, Se e Mo no soro sanguíneo de pacientes diagnosticados com Carcinoma das Células Escamosas e Fibrose Submucosa, com as de pacientes saudáveis (constituintes de um grupo controlo). Foi-lhes possível concluir que os níveis séricos de Cu nos grupos da lesão pré-maligna e do cancro oral eram superiores aos do grupo controlo. O aumento de Cu no soro pode ser relativo aos elevados níveis desse elemento presentes na noz de areca. O rácio Cu/Zn foi também investigado, devido ao seu potencial como biomarcador de diagnóstico e prognóstico em determinados tipos de cancro (ex. cancro da mama). Porém, nesse estudo, não se obteve significância estatística que comprovasse a utilidade da relação Cu/Zn no cancro oral. As concentrações de Se e Mo no grupo de controlo foram superiores às encontradas nos grupos de Fibrose Submucosa e de Carcinoma das Células Escamosas, confirmando o provável papel de ambos estes elementos na prevenção das lesões cancerígenas (Marques, 2013).

“Noutro estudo, muito semelhante ao anterior, Shetty et al. (2013) confirmam o aumento da concentração do elemento Cu, e conseqüente diminuição de Zn sérico nos pacientes diagnosticados com lesões pré-malignas e malignas, confirmando a teoria de Nayak (2010) de que as células cancerígenas possuem importadores desregulados de Zn, provocando o aumento dos níveis desse elemento no tecido carcinomatoso. A relação Cu/Zn foi também avaliada, revelando um valor mais elevado nos grupos com lesões patológicas, apresentando-se então como um possível biomarcador para o cancro oral” (Marques, 2013).

Poh et al. (2006) efetuaram um número de 122 biópsias em pacientes portadores de neoplasias orais, concluindo que havia uma correlação entre as zonas com menos fluorescência (margens da neoplasia) e a alteração molecular (perda de heterogeneidade) das amostras. Os autores apuraram que a remoção de tecido adjacente à zona de tecido neoplásico, com uma margem de segurança de 1 cm, é ainda motivo de falhas devido ao elevado risco de cancerização de campo que surge em muitos pacientes, o que se traduz numa superior taxa de recorrência das lesões. De Veld et al. (2003) expuseram que a diferenciação entre tecido saudável e alterado do mesmo paciente nem sempre é bem definida pois as variações espectroscópicas sucedem também no tecido adjacente ao alterado. Poder-se-ia ultrapassar este problema se a classificação não dependesse de

forma tão significativa da aparência da mucosa que aparenta, à primeira vista, estar saudável, mas sim a partir de uma base de dados de mucosa saudável de um elevado grupo de voluntários. Para Müller et al. (2003), o que dificulta é a variedade tecidual da mucosa oral queratinizada ou não, diferindo em cada região avaliada. Segundo Schwarz et al. (2009) o processo carcinogénico que se desenrola na cavidade oral, as alterações bioquímicas e estruturais no tecido epitelial e no estroma, podem alterar as propriedades óticas dos tecidos displásicos e neoplásicos.

Os elementos vestigiais detetados no Carcinoma das Células Escamosas da Cavidade Oral, num estudo deste ano, 2020, realizado por Archanjo et al., foram magnésio, fósforo, enxofre, cloro, potássio, cálcio crómio, manganês, ferro, zinco, cobalto, níquel, cobre, arsénio e bromo. A presença do elemento magnésio foi associada com o tabagismo e encontrada em amostras de indivíduos que tinham sido fumadores, não tendo sido encontrado este elemento nos que nunca o tinham sido. O arsénio e o bromo estavam presentes em valores mais elevados em indivíduos com hábitos tabágicos, quer no presente, quer no passado. Demonstraram também a associação do crómio a um historial de tabagismo, não estando presente em tecidos cancerosos de indivíduos que nunca tinham sido fumadores. O cloro mostra uma associação entre o consumo atual de tabaco e a sua presença nos tecidos analisados, constando unicamente nos tecidos de indivíduos com hábitos tabágicos presentes no momento. O níquel, por outro lado, apresentou-se em algumas amostras de tumor de pacientes que não consomem tabaco na atualidade.

A associação que fizeram entre os elementos e o prognóstico do cancro destes pacientes foi a seguinte, em primeiro lugar, existe uma forte associação entre o manganês e a recorrência deste tipo de cancro (40% nos 12 meses após a cirurgia) quando apenas 16,8% dos pacientes sem a deteção desse elemento nas amostras analisadas sofreram o relapso desta patologia. A presença de cloro é um fator protetor contra a recidiva sendo que, nos 18 meses após a cirurgia, pacientes sem este elemento na análise amostral mostraram uma maior recorrência da doença. Este estudo permitiu aos autores fazerem uma ponte entre alguns elementos vestigiais e o prognóstico e sobrevivência dos pacientes.

O fumo dos cigarros contém inúmeras substâncias e compostos químicos, alguns deles encontrados nos tecidos tumorais utilizados neste estudo, sendo importante fazer uma ponte entre o consumo do tabaco, e mesmo do “*smokeless tobacco*” (tabaco sem fumo), pelo papel primordial que as suas substâncias provocam no desenvolvimento e

prognóstico das lesões tumorais. Chen et al. (19) demonstraram um aumento do elemento cobre em fumadores, o que constitui um maior risco de desenvolver cancro oral.

É importante mencionar que ambos, o cobre e o zinco, possuem um papel importante no cancro da cabeça e do pescoço. Em adição, a correlação entre o consumo de tabaco e os elementos crómio e manganês foi associada à recorrência e não-recorrência, respetivamente, do mesmo cancro descrito anteriormente. Khlif et al. e Yuan et al. reportaram um aumento de crómio e níquel no sangue de pacientes com cancro da cabeça e do pescoço, com concentrações mais elevadas em indivíduos fumadores. Certos estudos mostram que o crómio, em baixas concentrações, pode ser utilizado para fins medicinais e está envolvido no metabolismo dos hidratos de carbono, lípidos e proteínas, mas é preciso ter atenção visto que se torna tóxico e carcinogénico em quantidades suficientemente elevadas. Estes elementos, nomeadamente o crómio, e a sua associação com o cancro da cabeça e do pescoço, bem como a sua relação com os fatores de prognóstico e sobrevivência, devem ser estudados daqui para a frente de forma a conseguir-se informações mais conclusivas da sua inter-relação. De qualquer forma, os estudos apontam para uma evidência consistente na relação entre os hábitos tabágicos, mantidos mesmo após o diagnóstico de cancro da cabeça e pescoço, com as mais baixas taxas de sobrevivência e as mais altas taxas de recorrência desta doença.

O papel do Médico Dentista é de elucidar o paciente que se encontre numa situação similar à descrita para os riscos do uso de substâncias como o tabaco e o álcool (que também contribui negativamente, especialmente se o uso for concomitante), pois os hábitos deletérios, especialmente quando somados uns aos outros, e a uma dieta desequilibrada, provocam uma perturbação no nível dos elementos necessários para o funcionamento normal do organismo, aumentando as concentrações de metais tóxicos e perigosos para a saúde.

## **6.2 Medicina Dentária**

É possível obter análises sensíveis multielementares dos materiais dentários recorrendo à técnica de XRF pelo facto de esta ser completamente, ou quase completamente, não-destrutiva, cobrindo uma alta faixa dinâmica de valores nos espetros, possibilitando uma visão relevante de relance dos principais elementos vestigiais em aplicações biomédicas.

A técnica mais utilizada para tal, dentro da XRF, é a por Energia Dispersiva (EDXRF) por ser a mais rápida e versátil, tendo já mostrado o seu potencial ao nível da utilização em Medicina Dentária ao nível dos mais diversos materiais dentários. Contudo, as amostras submetidas para análise nestas áreas são muitas vezes grossas e passam pelo chamado “efeito matriz”, que promove uma diminuição na intensidade de auto absorvência da fluorescência de raios-X perante a amostra, complicando qualquer tentativa de análise quantitativa pela XRF, o que significa que a intensidade da radiação emergente deixa de ser proporcional à concentração elementar. Assim, é necessário algum cuidado na realização de análises quantitativas, fazendo uso de materiais de referência ou *standards* com composição e estrutura similar à da amostra a analisar, de forma a tornar mais fidedigno o *approach* a esta. Isto nem sempre é possível para a análise de materiais dentários pela falta de materiais de referência certificados e também devido à informação dada pelo fabricante de determinados materiais ser escassa em muitos casos devido ao segredo de fabrico, existindo apenas *standards* mais ou menos aproximados (Valkovic, 1980).

### 6.2.1 Dentisteria

A lesão de cárie é conhecida como a doença que ocorre nos tecidos duros dos dentes devido à ação de microorganismos, e o seu diagnóstico é feito principalmente recorrendo a radiografias dentárias que são eficientes na exibição da localização e da abrangência das mesmas, especialmente em casos de cáries interproximais cujo diagnóstico visual e tátil se torna mais desafiante.

A técnica de análise por XRF pode prestar o seu contributo no recente, e em evolução, conceito de *Dentisteria Minimamente Invasiva*, que consiste em remover de forma menos traumática possível o tecido cariado, preservando o máximo de volume dentário possível. Assim é necessário que se possua uma noção muito clara e exata da porção cariada dos dentes, para que não se parta para a remoção de material em excesso, para além do contaminado. As lesões de cárie são detetadas maioritariamente através de um diagnóstico visual e tátil com recurso a raios-X convencionais, contudo, pode verificar-se, na área desmineralizada, um decréscimo no ião Cálcio, demonstrado a afetação dos tecidos pela lesão, algo que pode ser observado recorrendo à XRF. Hiraishi et al. (2003)

verificaram o conteúdo de Cálcio presente em superfícies dentárias desmineralizadas. Tecnicamente o que se pensaria usar seria a técnica de microrradiografia por ser o *standard* em casos de desmineralização. Porém, os tecidos dentários contêm um teor mineral muito elevado, bem como uma componente orgânica, que afetam de certa forma a transmissão de raios-X por esta via, sendo então preferível a utilização de microscopia de XRF nestes casos, de modo a obter-se valores mais fiáveis relativos ao conteúdo deste íão na superfície dentária, apurando relativamente ao nível de desmineralização da mesma (Uo et al., 2015).

### **6.2.2 Medicina Dentária Forense**

As resinas restauradoras possuem composições elementares distintas, fator que proporciona a determinação da marca e, mesmo dentro da marca em que se inserem, o tipo de resina que são de forma detalhada, através da análise dos seus componentes. Uma das características das resinas é a sua resistência e sobrevivência a condições extremas, como a cremação por exemplo, havendo pouca alteração da sua composição elementar, o que contribui positivamente para as ciências forenses, mostrando-se uma ferramenta muito útil na identificação de vítimas, fornecendo mais um fator de certeza para este campo de atuação. A XRF pode ser também uma mais-valia nomeadamente através da utilização de instrumentos portáteis devido ao potencial de serem transportados ao local desejado para realização das análises.

A identificação de vítimas através dos registos dentários é um método bem estabelecido e talvez o preferencial para identificação de corpos em diversos graus de decomposição. A dentição humana é uma das estruturas mais resilientes do corpo humano, podendo sobreviver a condições extremas, servindo como excelente ferramenta de distinção inter-individual, pois cada pessoa apresenta uma combinação única de dentes restaurados, não restaurados, perdidos, cariados, entre outras características que a tornam tão singular como uma impressão digital (Bush, Miller, Norrlander & Bush, 2008).

Assim, o conhecimento dos materiais restauradores usados nos pacientes como a marca e tipo específico de material utilizado, nomeadamente através do preenchimento cuidado do diário clínico dos pacientes pelo Médico Dentista, bem como através da realização de radiografias intra-orais com alguma frequência, constitui uma mais-valia na identificação

das vítimas. No caso de vítimas incineradas a identificação das mesmas fica comprometida tendo em conta que todo o conteúdo orgânico é destruído, deixando apenas ossos e dentes. Devido às alterações que são induzidas nos tecidos, o esmalte irá fraturar deixando a dentina livre da sua coroa clínica e, pelo encolhimento que a estrutura dentária sofre, os materiais restauradores, as resinas neste caso, vão ser dissociadas impossibilitando a tradicional identificação via registos radiográficos ou até mesmo através de modelos de estudo do paciente. Logo, tudo o que resta para identificação é a parte não biológica como materiais que consigam sobreviver a elevadas temperaturas. As resinas compostas não só sobrevivem a temperaturas extremas como preservam o potencial de serem distinguidas pela marca, sendo a sua parte inorgânica a que vai possuir esta resistência (Bush, Miller, Prutsman-Pfeiffer & Bush, 2007).

É nestes casos que a XRF vem prestar o seu auxílio como no estudo realizado por Bush et al. em 2007, que fizeram recurso a um espectrómetro de XRF portátil. Este aparelho não conseguia detetar o silano e o oxigénio presente nas resinas que analisaram, contudo os elementos adicionados com o objetivo de munir as resinas de radiopacidade eram facilmente detetados (Ba, Sr, Zr, Yb), sendo essa combinação de elementos suficiente para fornecer as informações desejadas, identificando a resina por marca, mostrando que as limitações da espectrometria portátil de XRF não interferem com o resultado destes estudos, visto que SiO<sub>2</sub> é comum a todas as marcas de resina, não sendo então necessária a sua deteção. Nesse estudo foram colocadas restaurações a resina em dentes específicos de cadáveres, utilizando depois a técnica analítica XRF quer para detetar a localização das resinas nos mesmos quando sujeitos apenas a algum grau de decomposição (e não cremados nem incinerados) e também para as distinguir por nome comercial (quer no campo, quer na morgue). Posteriormente procederam à análise das partículas restantes após incineração dos corpos. Na fase final, essas partículas foram ainda processadas (através de um método de trituração) de modo a testar uma situação de extrema dificuldade de deteção com a qual os odontologistas forenses se poderiam deparar na prática da sua profissão, sendo também analisadas via XRF. As 3 partes desse estudo expuseram a versatilidade da XRF, comparando-a até com a SEM/EDS, técnica que já tinha sido usada pelos mesmos autores para um fim semelhante, tendo concluído que, apesar de os fragmentos poderem ser analisados por ambas as técnicas, a XRF apresenta-se mais vantajosa por realizar análises rápidas (6-10 segundos) sem a introdução da

amostra numa câmara de vácuo, poupando tempo a toda a equipa forense, e revelando elevada precisão nas medições, mesmo quando amplamente destruídas.

É importante acrescentar que outros tipos de materiais utilizados na prática dentária como coroas e espigões também são resistentes a altas temperaturas, podendo prestar um nível ainda mais elevado de certezas aquando da realização destas investigações.

### 6.2.3 Branqueamento Dentário

Os procedimentos de branqueamento dentário têm vindo a tornar-se uma prática cada vez mais comum, desde o seu aparecimento em 1989 (contudo já tinham sido descritos em 1848 com a utilização de ácido oxálico). Os agentes branqueadores são compostos por peróxido de hidrogénio ou peróxido de carbamida (que se decompõe em ureia e, por sua vez, em peróxido de hidrogénio). O peróxido de hidrogénio é um agente que oxida as macromoléculas orgânicas, resultando na destruição das suas longas cadeias orgânicas, em cadeias mais pequenas descoloradas (Silveira, Godinho, Mata, Carvalho & Pessanha, 2015). Relativamente ao branqueamento dentário, muitos estudos são conduzidos no sentido de averiguar a relação dos agentes branqueadores com a composição elementar dentária, nomeadamente relativamente ao conteúdo iónico, sendo que alguns autores descrevem a ocorrência de efeitos adversos ao branqueamento, como aumento da rugosidade da estrutura dentária, diminuição da dureza e mudanças na morfologia superficial e matriz dentária, havendo também referências à perda do ião cálcio mesmo quando o tempo de tratamento é considerado o adequado (Silveira et al., 2015). Há estudos que não reportam quaisquer efeitos nocivos no esmalte, enquanto outros relatam mudanças reversíveis ou ainda benéficas relacionadas com o uso destes agentes branqueadores (Sorozini, Dos Santos, Silva, Dos Anjos & Perez, 2017).

Ben-Amar et al. conduziram um estudo *in vitro* em que avaliaram os efeitos do gel de branqueamento *Opalescence* em ambulatório (10% peróxido de carbamida), e concluíram que o branqueamento provocava corrosão do esmalte, podendo levar a alterações nas propriedades mecânicas do mesmo, como alterações na resistência da superfície do esmalte à abrasão (Silveira et al., 2015). Cakir et al., em 2011 mostraram algumas mudanças unicamente nos valores do ião cálcio para o branqueamento em ambulatório, sem afetação dos valores de fósforo.

O estudo realizado por Moreira, R. et al. (2013) baseou-se na utilização da EDXRF de forma a mensurar a concentração dos elementos inorgânicos presentes no esmalte de dentes bovinos utilizando peróxido de hidrogénio a 38% pela técnica *in office* (Opalescence Xtra Boost - Ultradent, USA), comparando com grupos controlo não submetidos a este agente, tendo determinado que este agente não era capaz de desmineralizar as amostras examinadas. Al-Salehi et al. observaram mudanças no rácio Ca/P de amostras branqueadas em dentes bovinos (incisivos) com soluções libertadoras de Ca. Contudo, os dentes de bovino, apesar de similares aos humanos, possuem um substrato diferente, o que pode impossibilitar a comparação fidedigna de uns com outros.

Estudos como o de Silveira et al. (2015), que foi executado com base na utilização da  $\mu$ -EDXRF, conferiu os efeitos dos agentes branqueadores quando utilizados em ambulatório e *in office*, face ao conteúdo inorgânico e elementos vestigiais, comparando esses valores antes e após realização do branqueamento dentário, seguindo as instruções do fabricante. Esse estudo *in vitro* demonstrou que não existiam diferenças significativas nos elementos da matriz de hidroxiapatite. A única diferença pré e pós tratamento foi a diminuição do elemento vestigial ferro que está relacionado com o escurecimento dentário.

A  $\mu$ -EDXRF foi também posta em prática por Pessanha et al. (2017), de modo a verificar a profundidade de desmineralização do esmalte provocada por um uso extensivo de produtos branqueadores *Over-The-Counter* (OTC). Estes produtos OTC não necessitam de ser utilizados com supervisionamento do Médico Dentista possuindo muitas vezes concentrações dos agentes ativos branqueadores superiores às permitidas. Os investigadores concluíram que a técnica utilizada foi eficaz na deteção da desmineralização do esmalte provocada pelos agentes branqueadores, podendo detetar - se uma desmineralização muito superficial (na ordem dos 25  $\mu$ m), contudo afirmaram que os resultados obtidos apontam para uma desmineralização completa do esmalte aprismático quando estes produtos são utilizados de uma forma “abusiva”.

O que importa é que os efeitos deletérios destes agentes na superfície dentária não são considerados relevantes quando usados conforme as instruções do fabricante e com a supervisão de um Médico Dentista, na medida que a perda de tecidos e da qualidade dos mesmos, para além de ser transitória, quando verificável, não se compara aos “estragos” provocados por bebidas gaseificadas, por exemplo. É de notar que os estudos apresentam as suas variações sejam elas relativas ao tempo de utilização, tipo de produtos e tipo de

dentos analisados, o que pode influenciar os resultados obtidos nuns e nos outros (Sorozini et al., 2017).

#### 6.2.4 Endodontia

Os cimentos obturadores endodônticos (*sealers*), à semelhança das resinas restauradoras, são formados por partículas minerais embebidas numa matriz orgânica. Estes cimentos são aplicados no canal radicular e devem apresentar uma boa tolerância tecidual, que depende de ambos os seus componentes orgânicos e inorgânicos. Os cimentos endodônticos apresentam uma biocompatibilidade clinicamente aceitável, porém, alguns aspetos da sua composição não estão ainda completamente estudados e compreendidos, sendo necessário, e uma mais-valia, o caminhar no sentido da realização de investigações mais aprofundadas dos mesmos, no sentido de investigar a composição dos elementos que os constituem e diversas outras características importantes como as interações que estabelecem com os tecidos. Desta forma, é importante ter em conta que dinamizar o tipo de estudos realizados a estes cimentos é imperativo, tendo sido já provada a eficiência das técnicas de fluorescência de raios-X para determinação dos constituintes de resinas e materiais restauradores com ligas metálicas (até de um ponto de vista das ciências forenses), o mesmo deve ser implementado na endodontia por forma a tirar mais ilações à cerca do *modus operandi* dos cimentos e outros materiais endodônticos, bem como das técnicas utilizadas e relação dos materiais com a estrutura dentária (Suciu, Preoteasa, Preoteasa, Chiojdeanu, Constantinescu, Dimitriu & Bodnar, 2015).

Um facto que torna as técnicas de XRF vantajosas é o facto de as amostras poderem ser examinadas no estado semi-sólido/líquido, como referido anteriormente, o que é ideal para este tipo de materiais dentários.

Um estudo pioneiro, conduzido por Suciu et al. (2015), comparou 3 diferentes tipos de cimentos existentes no mercado tendo como objetivo demonstrar o potencial dos espectrómetros portáteis de XRF e tomar conhecimento dos principais constituintes nesses 3 tipos de cimentos, verificando o potencial de toxicidade de elementos neles presentes.

O espectro de raios-X evidenciou regularidades para os elementos a partir de Ca ( $Z=20$ ). Elementos com número atómico inferior não foram visíveis no espectro, produzindo linhas

ocasionais que não admitiram nenhum tipo de avaliação quantitativa por serem muito fracas e também devido à baixa sensibilidade do detetor. Todos os 3 cimentos endodônticos continham metais muito pesados (como o bismuto e o tungstênio) cujo objetivo seria, provavelmente, providenciá-los de uma elevada radio-opacidade para poderem contrastar com os tecidos duros dentários nas análises radiográficas. Em comparação com as resinas compostas, a radiopacidade providenciada pelo metal pesado nos cimentos é bem superior porque os materiais restauradores são utilizados a um nível mais superficial da estrutura dentária relativamente aos cimentos. Os metais pesados detetados nos cimentos podem constituir um potencial de toxicidade. O Bismuto (Bi) partilha propriedades físicas com o Pb e o Sn, sendo o bismuto menos tóxico que estes. O bismuto não é bioacumulativo, possui baixa solubilidade no sangue e é facilmente removido na urina, não apresentando potencial carcinogénico, mutagénico ou teratogénico em testes efetuados em animais. O tungstato de cálcio ( $\text{CaWO}_4$ ), presente num dos cimentos, é um mineral importante que contém tungstênio. O tungstênio (W) interfere com o metabolismo do Mo e do Cu, sendo algo tóxico ainda que a baixos níveis, necessitando de mais estudos que abordem esta relação.

Um desafio ao tratamento endodôntico canalar pode ser a existência de calcificações pulpares. O complexo dentina-polpa atua como uma única entidade e a deposição de tecido mineralizado na câmara pulpar pode ser de origem fisiológica, como a formação de dentina secundária e esclerótica, que ocorre durante toda a vida, podendo também surgir na forma de dentina reacional, calcificações pulpares em função do envelhecimento (embora possam estar presentes em todas as faixas etárias), ou em resposta a agressões como lesões de cárie ou traumatismos. Estas calcificações pulpares podem selar por completo a câmara pulpar e complicar o tratamento endodôntico, sendo geralmente achados-clínicos em radiografias de rotina, estando em forte associação com restaurações profundas ou lesões dentárias repetidas que provocam danos no tecido pulpar. A frequência de ocorrência não está bem definida, mas aceita-se que uma ou mais calcificações estejam presentes em 50% de todos os dentes. Com esta significativa prevalência torna-se impreterível o conhecimento das formas de desenvolvimento das calcificações bem como a composição precisa das mesmas. Um estudo efetuado por Berès et al. (2016) teve como objetivo investigar as propriedades físico-químicas dos tecidos mineralizados do dente, elucidando a origem patológica das calcificações pulpares

(pedras pulpares). Para isso observaram zonas cariadas e sãs de dentina de 8 dentes cariados e com indicação para exodontia, e 5 dentes com necessidade de tratamento endodôntico, dos quais recolheram 6 pedras pulpares. A utilização da XRF permitiu a obtenção da composição elementar que identificou os elementos P, Ca, Cu, Zn e Sr na dentina e nas pedras pulpares, sendo que os elementos Zn e Cu apresentaram concentrações superiores nas calcificações pulpares e na dentina cariada quando comparadas com as observadas na dentina saudável. Assim, os investigadores concluíram que as células pulpares produzem quantias anormalmente altas de Zn e Cu, desenvolvendo matrizes mineralizadas. Estas concentrações aumentadas de Zn e Cu podem estar relacionadas com a atividade da enzima superóxido dismutase (SOD), aparecendo em contexto inflamatório (Berès, Isaac, Mouton, Rouzière, Berdal, Simon, & Dessombz, 2016).

### **6.2.5 Reabilitação Oral**

Uma investigação que pode provar algum contributo na área da reabilitação oral foi a de Rauf et al. (2016), que utilizaram a XRF, entre outras técnicas, para analisar a composição das cerâmicas para próteses dentárias. Certas características como a boa estabilidade de cor, biocompatibilidade, capacidade em mimetizar a aparência dos dentes naturais, boa resistência e fácil tratamento são o que se pretende na escolha destes materiais. Assim, para determinar a composição dos materiais baseados em cerâmicas acordando com as características dos dentes naturais, foi realizada uma identificação da composição de um material bio-cerâmico e da composição de dentes humanos pela XRF, concluindo que a cerâmica mais semelhante aos dentes naturais é a que apresenta um rácio 1:1:1:1 (feldspato: quartzo: caulino: casca de ovo).

Um estudo comparativo das características dos elastómeros utilizados nas impressões dentárias por Gradinaru et al. (2020), teve como objetivo estabelecer a precisão e exatidão desses materiais através de, entre outras técnicas utilizadas, uma análise estrutural por XRF de forma a identificar as diferenças que possam ser significativas nas características destes materiais o que pode ser benéfico na escolha do material correto dependendo dos requisitos de cada caso.

## **6.2.6 Implantologia**

Os implantes dentários têm-se tornado na primeira opção de escolha para reabilitações que visem a reposição de peças dentárias, quer por parte dos Médicos-Dentistas quer por parte dos pacientes, que cada vez são mais exigentes. As vantagens apresentadas com o tratamento de reposição dentária através de próteses sobre implantes são diversas, em especial a preservação biológica dos dentes adjacentes ao espaço protético, a preservação da estrutura óssea remanescente do rebordo alveolar e a estética.

A degradação da superfície implantar e a libertação e formação de partículas como um mecanismo catalisador de inflamação é um conceito emergente na Medicina Dentária que pode colaborar para a explicação da patogénese da periimplantite.

Dentro das tecnologias mais utilizadas para determinação da composição dos implantes, grande parte delas são baseadas na análise por EDXRF. Apesar de a WDXRF também poder ser utilizada, não é tão mencionada nos estudos de implantes (Gonçalves, Egito, Castro, Groisman, Basílio & da Penha Jr, 2019).

No estudo de Gonçalves et al. (2019) é feita uma tentativa de compreensão dos problemas relacionados com a análise elementar de implantes comparando análises realizadas por diferentes instrumentos, incluindo a XRF. Nesse estudo, os autores referem que as falhas nos implantes podem estar relacionadas com diversos fatores como os relacionados com o paciente (higiene oral, hábitos tabágicos, consumo de álcool, osteoporose, diabetes), os fatores biológicos (qualidade e quantidade de osso, infeção adjacente, gengivite e integridade vascular), mas também pode estar relacionado com o implante em si (biocompatibilidade, topografia da superfície, contaminação da superfície, geometria) ou fatores relacionados com a cirurgia (existência de trauma, contaminação durante o ato cirúrgico, posicionamento impróprio) ou até mesmo um diagnóstico inicial mal elaborado. Os autores referem ainda que a superfície dos implantes ser de Titânio é um requisito essencial para a osteointegração.

Foi também conduzida uma investigação por Severo et al. em 2016, em implantes feitos com pinos de titânio por EDXRF de forma a perceber se a pureza dos mesmos influenciava a resposta negativa dos tecidos e a consequente falta de osteointegração que

apresentavam, tendo sido possível concluir que a falta de osteointegração não se devia a impurezas presentes mas sim a fatores relacionados com higiene do campo cirúrgico, a sobrecarga de força sobre o implante, presença de infecções e fixação insatisfatória na instalação e técnica cirúrgica inadequada. O resultado das análises dos pinos demonstrou que possuem grande pureza em Ti (99%) e os elementos considerados como impurezas (Ca, Cr, Fe, Ni e W) foram evidenciados em níveis vestigiais (Severo, Comunian & De Oliveira, 2016).

Atualmente, apesar de os implantes apresentarem no geral uma boa biocompatibilidade, a corrosão dos metais é um fenômeno esperado na sua vida útil devido à presença de íons no fluido salivar e, por esse motivo, os processos eletroquímicos podem aparecer na superfície do metal logo após a sua implantação. O estudo da corrosão dos implantes é importante para compreender as interações químicas e físicas entre estes e o ambiente biológico em que se inserem.

Um estudo indireto realizado por Abraham et al., em 2014 teve como objetivo verificar a corrosão dos implantes dentários através da análise da concentração elementar de metais presentes nos fluídos orais expostos à corrosão, pela técnica de TXRF. A degradação da superfície do implante liberta materiais que podem constituir um risco de toxicidade e, desta forma, o estudo contribuiu também para o conhecimento da corrosão do implante em relação ao seu ambiente biológico. Os metais analisados por esta via foram Ti, Al e V na saliva e no fluido crevicular, mostrando que a presença de íons Ti está mais concentrada no fluido crevicular que na saliva, enquanto os elementos V e Al mantiveram as suas concentrações sem diferenças significativas em todos os fluídos orais. O Ti na saliva exposta à corrosão dos implantes não era muito elevado o que mostra que os íons libertados pelos implantes são incorporados no organismo pelo fluido crevicular e metabolizados nos órgãos, não chegando a atingir as glândulas salivares. Os elementos V e Al não são muito relevantes pois apresentam-se como componentes minor dos implantes e muitos autores reportaram que se libertam com menos velocidade do que o Ti (Okazi & Gotoh, 2005).

O objetivo é que no futuro possamos constatar um decréscimo de falhas associadas à colocação de implantes e a XRF proporciona bons meios analíticos para que tal possa acontecer.

### **6.2.6 Relação Dentes-Ambiente e Composição Elementar dos Tecidos Dentários**

Devido às características que os tecidos dentários apresentam, a sua composição elementar proporciona uma boa perspectiva acerca da interação ser humano-ambiente. Como os dentes acumulam neles metais pesados advindos da poluição atmosférica e dos contactos com diversas substâncias, bem como elementos derivados da alimentação, esta apreciação possibilita a avaliação dos padrões nutricionais e dietéticos, da existência de hábitos tabágicos, da exposição e habitação em áreas poluídas, e ainda de possíveis restaurações dentárias presentes em boca e a distinção entre sexo e faixa etária de diferentes indivíduos.

Baranowska et al. (2014) investigaram, recorrendo à XRF, os dentes de populações altamente expostas à poluição ambiental comparando-os com os de áreas menos poluídas, ambas na Polónia, concluindo que havia uma direta relação entre a concentração dos elementos Zn, S e Pb nos espécimes associados a áreas de maior poluição, verificando-se também uma maior quantidade de Zn e Pb nos dentes de fumadores quando comparados com os de não fumadores. Conteúdos superiores de Zn e S foram encontrados em amostras de habitantes de zonas marcadas pela atividade da indústria metalúrgica onde os níveis de poluição são superiores. Estas concentrações elementares foram determinadas em incisivos, pré-molares e molares. Os níveis mais elevados de Mg, Zn, Fe, Pb, Na e K e os níveis mais baixos de Sr foram encontrados nos incisivos, enquanto que os molares apresentaram as concentrações mais altas de S, Al, Sr e as mais baixas de Na, K, Pb, Cu e Fe. Nos dentes posteriores analisados verificou-se que o conteúdo de Mg, Zn, Sr, Cu e Fe era aproximadamente o mesmo quer para os molares, quer para os pré-molares.

Num estudo anterior de Baranowska et al., datado de 2004, os autores verificaram que, dos dentes por eles analisados, nos pertencentes a indivíduos do sexo feminino foram encontradas concentrações um pouco superiores de Al, o que se pode dever à utilização de cosméticos como batons labiais. Uma concentração superior de Pb e Fe foi analisada nos dentes de indivíduos do sexo masculino. O nível mais elevado de Pb foi encontrado nas amostras de pessoas entre os 36 e os 60 anos o que se pode relacionar com a exposição a esses metais nos locais de trabalho das mesmas (até este estudo, a correlação entre as concentrações de Pb e a idade tinha sido monitorizada em ossos mas não em dentes).

Análises através através da WDXRF demonstraram a sua eficácia na manifestação das diferenças entre a quantidade de determinados elementos (como o Al, Pb e o Fe) pertencentes a indivíduos de diferentes sexos, bem como diferenças na concentração elementar relacionadas com a idade dos indivíduos, nomeadamente dos elementos Mg, Fe, Cu, Sr e Pb (Suciu et al., 2015).

Carvalho et al. (2007) avaliaram dentes humanos da Idade Média para mostrar que os elementos Ba, Fe, Mn e Pb constituintes do solo se difundiram na estrutura dentária.

### **6.2.7 Pigmentação Dentária**

O café é a bebida mais popular no mundo inteiro, mas o seu papel na erosão dentária é ainda pouco claro com poucos estudos a investigarem o seu efeito nas estruturas dentinárias e no esmalte. Sabe-se que o seu consumo previne a doença periodontal e as lesões de cárie. As manifestações que pode ter, contudo, na estrutura dentária, não são positivas, podendo interferir na opalescência e não só como afetar as estruturas subjacentes (Manno et al., 2018)

O mecanismo de erosão que o café provoca na estrutura dentária ainda não é totalmente conhecido e, um estudo de 2018, por Manno et al. (2018) foi empregue de forma a determinar as mudanças estruturais induzidas nos dentes e a formação da pigmentação provocada pela ingestão desta bebida. Sabe-se que a estrutura da hidroxiapatite é constituída maioritariamente pelos elementos Cálcio e fósforo (Ca e P). O esmalte, sendo formado maioritariamente por hidroxiapatite e constituindo a camada mais externa do dente, está sujeito à ação nociva do café que afeta o seu conteúdo mineral. Sendo que a descalcificação é o primeiro passo na destruição do esmalte, as variações de Ca e P, examinadas por técnicas de espectroscopia e microscopia, podem servir como marcadores da erosão dentária. O café possui um pH baixo o que pode induzir a redução das concentrações destes elementos (Ca e P) sequestrando-os.

Uma técnica espectroscópica utilizada nesse estudo de Manno et al. foi a XRF, de forma a adquirir informações sobre os componentes presentes na dentina, devido ao elevado poder de penetração em profundidade característico desta técnica. Em combinação com outras técnicas, como Laser-induced Breakdown Spectroscopy (LIBS) é possível adquirir

medidas exatas da superfície (esmalte) e em profundidade (dentina), a cerca de 10-20  $\mu\text{m}$  de profundidade de penetração, dos dentes que sofram alterações biológicas, como o efeito do café. O que reportaram é que o café provoca uma perda do conteúdo mineral nos dentes induzida pela pigmentação superficial do esmalte que resulta na erosão da estrutura da dentina subjacente.

Em suma, este estudo concluiu que o café promove então uma perda da fase mineral dos dentes, desmineralizando certas áreas, criando espaços entre os prismas de esmalte e os túbulos dentinários, o que pode ser comprovado pela análise elementar e pela diminuição do rácio Ca/P e, por isso, não só provoca uma pigmentação extrínseca (relacionada com a elevada concentração de metais contidos no café) como atinge e afeta as estruturas internas (como a dentina), cujo nível de destruição vai também ser compatível com diversos fatores como a fragilidade dos dentes pelo envelhecimento, por exemplo. Este estudo foi importante pois desafiou alguns estudos que consideraram o café como fator de pigmentação unicamente do esmalte, revelando que a pigmentação que provoca compromete também a camada íntima de dentina subjacente.

Alguns outros estudos como o de Caneppele et al. (2012) fizeram também uma ponte entre a erosão da dentina e sua ligação com bebidas acídicas através da EDXRF. No artigo publicado por estes autores mostraram que a erosão após a exposição a essas bebidas não estava relacionada com pH da bebida, sugerindo que este não pode ser usado para prever o potencial erosivo. Ehlen et al. (2008) também não descobriu nenhuma relação entre o pH das bebidas e o grau de erosão. Estudos anteriores observaram que o potencial erosivo de uma bebida cítrica não está unicamente relacionado com o pH e com a concentração de ácido cítrico, mas também com o baixo grau de saturação em relação à hidroxiapatite e à fluorapatite e a presença do citrato, substância que provoca a quelação do cálcio da saliva e dos dentes. Estes fatores têm importância na medida que podem afetar o potencial erosivo de uma solução. Este estudo expõe o dente à ação destas bebidas por um determinado período, sem considerar a taxa de consumo, os movimentos que ocorrem aquando da sua ingestão, a ação neutralizante e remineralizante da saliva, o que pode levar a uma erosão mais exacerbada. Os resultados do EDXRF apresentaram uma diminuição do fósforo dos grupos imersos em determinadas bebidas investigadas nesse estudo, bem como no teor de cálcio entre a superfície de referência e a superfície que sofreu erosão. Não houve, contudo, correlação entre o pH das bebidas e o seu potencial erosivo.

## 7. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os métodos de XRF abordados nesta revisão bibliográfica demonstram ser de grande utilidade para a análise elementar de espectros secundários emitidos pelas amostras, permitindo averiguar a sua composição elementar, quer de uma forma qualitativa (através das linhas características do espectro) como quantitativas (concentração de determinada substância), visto que os átomos dos elementos químicos emitem linhas características individuais e únicas (Motevich, Strekal, Papko, Glebovich, Shulha, & Maskevich, 2015). Como já foi constatado, os átomos excitados projetam um raio-X típico decorrendo do facto de as suas camadas mais internas ficarem ionizadas quando expostas a uma quantidade de energia de radiação suficiente para a produção desse fenómeno.

A XRF é uma técnica com eficácia comprovada na análise de uma grande variedade de materiais. As suas principais vantagens residem na facilidade e baixo custo da preparação das amostras, no facto de ser uma técnica não-destrutiva e a relativa facilidade de funcionamento com os espectrómetros de XRF que possuem alta sensibilidade. As amostras podem ser analisadas nos mais diversos estados da matéria, tendo utilidade para um número muito extenso de aplicações nas mais diversas áreas, possuindo até um sistema de instrumentos portáteis que podem ser postos em prática nos casos em que o transporte das amostras represente uma situação delicada e as comprometa de algum modo, sendo um método multidisciplinar e versátil valioso para a análise elementar.

O espectro característico de raios-X pode ser obtido pelas técnicas WDXRF ou EDXRF. Os espectrómetros que utilizam o sistema de dispersão de comprimentos de onda foram introduzidos no início dos anos 50 e os sistemas EDXRF quase duas décadas depois. Na atualidade existem milhares de exemplares WDXRF disponíveis comercialmente. Alguns equipamentos mais modernos conseguem fazer medições elementares a partir do elemento Boro ( $Z=5$ ). Possuem também, um e outro, capacidade de testar diversas amostras, sendo precisos e de alta sensibilidade, especialmente o WDXRF. A EDXRF é um bom método para a análise de uma grande quantidade de tecidos humanos, mas é necessário, contudo, ter em conta que as amostras podem sofrer contaminação aquando da sua preparação, associada ou não à técnica EDXRF (Carvalho, Brito & Barreiros, 1997).

A análise por XRF tem a capacidade de detetar variados elementos simultaneamente em concentrações muito baixas, sendo uma ferramenta de extrema conveniência para o estudo de elementos vestigiais superior em diversos aspetos a outras técnicas de espectroscopia, como num dos factos mais marcantes, não provocar destruição nas amostras.

Os elementos vestigiais têm tido especial enfoque no que concerne ao seu papel na biologia e ciências biomédicas, ciências ambientais, geologia, arqueologia e ciência dos materiais. Desvios da normalidade dos níveis dos diferentes elementos vão resultar, de forma geral, no aparecimento de doenças ou numa maior predisposição e risco para tal. A utilização da XRF nas análises médicas é promissora devido à sua rapidez, precisão e elevada reprodutibilidade na estima do conteúdo elementar (Motevich et al., 2015).

Diversos estudos mostraram que as alterações dos constituintes elementares integram um marcador de diferentes patologias, incluindo as pré-malignas e malignas. As relações estabelecidas entre certos elementos químicos com tipos específicos de cancro têm vindo a ser estudadas por bastante tempo. Sabe-se que as concentrações de zinco e o rácio cobre/zinco diferem em pacientes saudáveis e em pacientes com lesões cancerosas, enquanto o papel do ferro ainda tem vindo a ser sujeito a várias revisões. Dentro da vertente do cancro oral, os biomarcadores permitem a implementação de terapêuticas personalizadas para cada tipo de lesão, evitando tratamentos desnecessários que podem deteriorar a qualidade de vida do paciente.

As alterações das mucosas aquando da presença de patologias orais, e a sua deteção atempada pelo médico dentista são de extrema influência na resolução destes problemas que, em fases mais tardias de deteção, são muitas vezes mais difíceis de tratar com sucesso. A evolução de certas patologias pode constituir um quadro de extrema gravidade que coloca em risco a vida dos nossos pacientes. É importante que como médicos dentistas não nos esqueçamos do nosso papel como “médicos propriamente ditos”, reconhecendo a capacidade que temos de detetar patologias no interior da cavidade oral mais do que qualquer outro tipo de médico, porque é a zona com a qual estabelecemos um estrito contacto no dia-a-dia da nossa prática clínica.

Os dentes podem mostrar-se como ótimos meios de estudo dos indivíduos a que pertencem, revelando dados elementares que podem estar associados ao sexo, faixa etária, tipo de área de residência ou de trabalho (por ex. indivíduos que trabalham em fábricas

de certos materiais têm maior tendência a acumular metais específicos nos tecidos dentários) e muitas outras informações importantes colaborando até para a identificação de vítimas no âmbito da Medicina Dentária Forense.

É importante que se continue a caminhar no sentido do desbloqueio de mais informações, com a realização de um maior número de investigações nas áreas da Patologia Oral e Medicina Dentária. O trabalho futuro a desenvolver no aprimoramento da técnica XRF refletir-se-á na minimização das limitações anteriormente enunciadas e no desenvolvimento de *softwares* cada vez mais avançados e sofisticados.



## Conclusões

Através do impacto da descoberta dos raios-X e, subsequentemente da XRF, foi possível uma grande evolução em diversas áreas de estudos e investigações. A XRF, na atualidade, já se encontra bem disseminada na comunidade científica, havendo todos os anos um relato dos avanços que foram conseguidos nesse mesmo ano, que permitem acompanhar a sua evolução bem como os trabalhos que mais contribuíram para tal.

Um dos objetivos desta revisão foi realizar uma ligação entre a XRF e as suas utilizações na Medicina Dentária e na Patologia Oral. É de notar que existem diversos ramos de aplicação da XRF dentro da Medicina, todavia foi feita uma tentativa de referir especialmente as patologias da cavidade oral, que ainda não foram exaustivamente estudadas e analisadas por estas técnicas e assim, por este motivo, o último capítulo desta dissertação não é tão extenso pois a literatura referente a esse tema é algo limitada.

É importante que se realizem estudos que estabeleçam relações mais certas entre a composição elementar e este tipo de patologias pois o diagnóstico precoce do cancro oral continua a ser a melhor forma de prevenção, e a correlação entre as concentrações elementares em diferentes tecidos humanos podem ser um método poderoso neste tipo de investigações clínicas em tecidos biológicos e não biológicos. Assim, pelas vantagens referentes a esta técnica, esperam-se perspectivas futuras na investigação e aplicação clínica no âmbito da Medicina Dentária e Medicina Oral.



Bibliografia

Abraham, J. A., Sánchez, H. J., Grenón, M. S., & Pérez, C. A. (2014). TXRF analysis of metals in oral fluids of patients with dental implants. *X-Ray Spectrometry*, 43(4), 193-197.

Almeida, T. M. R. M. D. (2007). Estudo da distribuição de elementos vestigiais em tecidos humanos saudáveis e com carcinoma por espectrometria de raios-X.

Archanjo, A. B., de Assis, A. L., de Oliveira, M. M., Mendes, S. O., Borçoi, A. R., Maia, L. L., Souza, R. P., Cicco, R., Saito, K. C., Kimura, E. T., Carvalho, M. B., Nunes, F. D., Tajara, E. H., Santos, M. D., Nogueira, B. V., Trivilin, L. O., Pinheiro, C. J. & Álvares-da-Silva, A. M. (2020). Elemental characterization of oral cavity squamous cell carcinoma and its relationship with smoking, prognosis and survival. *Scientific Reports*, 10(1), 1-10. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-67270-5>

Aro, A., Amarasiwardena, C., Lee, M. L., Kim, R., & Hu, H. (2000). Validation of K x-ray fluorescence bone lead measurements by inductively coupled plasma mass spectrometry in cadaver legs. *Medical Physics*, 27(1), 119-123.

Ayinampudi, B. K., & Narsimhan, M. (2012). Salivary copper and zinc levels in oral pre-malignant and malignant lesions. *Journal of oral and maxillofacial pathology JOMFP*, 16(2), 178-82. <https://doi.org/10.4103/0973-029X.98452>

Baranowska, I., Barchanski, L., Bak, M., Smolec, B., & Mzyk, Z. (2004). X-ray fluorescence spectrometry in multielemental analysis of hair and teeth. *Polish Journal of Environmental Studies*, 13(6), 639-646.

Beckhoff, B., Kanngießler, habil. B., Langhoff, N., Wedell, R., & Wolff, H. (Eds). (2006). *Handbook of Practical X-Ray Fluorescence Analysis*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg. <https://doi.org/10.1007/978-3-540-36722-2>

Benninghoff, L., Von Czarnowski, D., Denkhaus, E., & Lemke, K. (1997). Analysis of human tissues by total reflection X-ray fluorescence. Application of chemometrics for diagnostic cancer recognition. *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy*, 52(7), 1039-1046.

Berès, F., Isaac, J., Mouton, L., Rouzière, S., Berdal, A., Simon, S., & Dessombz, A. (2016). Comparative physicochemical analysis of pulp stone and dentin. *Journal of Endodontics*, 42(3), 432-438.

Bertin, E. P. (1970). Principles and practice of X-ray spectrometric analysis. Heyden and Son.

Bettendorf, O., Piffko, J., & Bankfalvi, A. (2004). Prognostic and predictive factors in oral squamous cell cancer: important tools for planning individual therapy? *Oral oncology*, 40(2), 110-119.

Bortoleto, G. G. (2007). Desenvolvimento de métodos analíticos usando espectrometria de raios X e quimiometria.

Brito, J. A., Costa, I. M., e Silva, A. M., Marques, J. M., Zagalo, C. M., Cavaleiro, I. I., Fernandes, T. A. & Gonçalves, L. L. (2014). Changes in bone Pb accumulation: cause and effect of altered bone turnover. *Bone*, 64, 228-234.

Brouwer, P. (2010). Theory of XRF (3rd ed.). Almelo, The Netherlands: PANalytical B.V. Amelo, The Netherlands.

Bush, M. A., Miller, R. G., Norrlander, A. L., & Bush, P. J. (2008). Analytical survey of restorative resins by SEM/EDS and XRF: databases for forensic purposes. *Journal of forensic sciences*, 53(2), 419-425.

Bush, M. A., Miller, R. G., Prutsman-Pfeiffer, J., & Bush, P. J. (2007). Identification through X-ray fluorescence analysis of dental restorative resin materials: a

comprehensive study of noncremated, cremated, and processed-cremated individuals. *Journal of forensic sciences*, 52(1), 157-165.

Caetano, T. J. A. (2018). Estudo de Otimização da Técnica XRF para Identificação de Ligas Metálicas em Partículas de Motores (Doctoral dissertation).

Cakir, F. Y., Korkmaz, Y., Firat, E., Oztas, S. S., & Gurgan, S. (2011). Chemical analysis of enamel and dentin following the application of three different at-home bleaching systems. *Operative dentistry*, 36(5), 529-536.

Caneppele, T. M. F., Jeronymo, R. D. I., Di Nicoló, R., Araújo, M. A. M. D., & Soares, L. E. S. (2012). In Vitro assessment of dentin erosion after immersion in acidic beverages: surface profile analysis and energy-dispersive X-ray fluorescence spectrometry study. *Brazilian dental journal*, 23(4), 373-378.

Carvalho, M. L., Brito, J., & Barreiros, M. A. (1998). Study of trace element concentrations in human tissues by EDXRF spectrometry. *X-Ray Spectrometry: An International Journal*, 27(3), 198-204.

Carvalho, M. L., Marques, A. F., Marques, J. P., & Casaca, C. (2007). Evaluation of the diffusion of Mn, Fe, Ba and Pb in Middle Ages human teeth by synchrotron microprobe X-ray fluorescence. *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy*, 62(6-7), 702-706.

Costa, A. C. D. (2015). Otimização da técnica de micro Fluorescência de Raios-X para o estudo de ossos (Doctoral dissertation).

De Veld, D. C., Skurichina, M., Witjes, M. J., Duin, R. P., Sterenborg, D. J., Star, W. M., & Roodenburg, J. L. (2003). Autofluorescence characteristics of healthy oral mucosa at different anatomical sites. *Lasers in Surgery and Medicine: The Official Journal of the American Society for Laser Medicine and Surgery*, 32(5), 367-376.

Ehlen, L. A., Marshall, T. A., Qian, F., Wefel, J. S., & Warren, J. J. (2008). Acidic beverages increase the risk of in vitro tooth erosion. *Nutrition Research*, 28(5), 299-303.

Eisberg, R. M., & Resnick, R. (1978). *Física cuántica: átomos, moléculas, sólidos y partículas*. Limusa.

Figueiredo, A., Fernandes, T., Costa, I. M., Gonçalves, L., & Brito, J. (2016). Feasibility of wavelength dispersive X-ray fluorescence spectrometry for the determination of metal impurities in pharmaceutical products and dietary supplements in view of regulatory guidelines. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*, 122, 52-58.

Feliczaki, R. M., & Melquiades, F. L. (2014). Simulação De Fluorescência De Raios X Em Amostras De Solo Com Influência De Umidade. *Revista Brasileira de Física Tecnológica Aplicada*, 1(1).

Francisco, A. L. N. (2011). Espectroscopia de fluorescência para detecção de lesões potencialmente malignas e carcinoma epidermóide da cavidade oral= estudo prospectivo.

Garg, A. N., Singh, V., Weginwar, R. G., & Sagdeo, V. N. (1994). An elemental correlation study in cancerous and normal breast tissue with successive clinical stages by neutron activation analysis. *Biological Trace Element Research*, 46(3), 185-202.

Geraki, K., Farquharson, M. J., & Bradley, D. A. (2003). X-ray fluorescence and energy dispersive x-ray diffraction for the quantification of elemental concentrations in breast tissue. *Physics in Medicine & Biology*, 49(1), 99.

Gómez, I., Warnakulasuriya, S., Varela-Centelles, P. I., López-Jornet, P., SuárezCunqueiro, M., Diz-Dios, P., & Seoane, J. (2010). Is early diagnosis of oral cancer a feasible objective? Who is to blame for diagnostic delay? *Oral diseases*, 16(4), 333–42. <https://doi.org/10.1111/j.1601-0825.2009.01642.x>

Gonçalves, O. D., Egito, M., Castro, C., Groisman, S., Basílio, M., & da Penha Jr, N. L. (2019). About the elemental analysis of dental implants. *Radiation Physics and Chemistry*, 154, 53-57.

Gradinaru, I., Ciubotaru, B. I., Zaltariov, M. F., & Cazacu, M. (2020, June). Comparative Study on the Characteristics of Silicone Elastomers used in Dental Impression Techniques. In *IOP Conference Series: Materials Science and Engineering* (Vol. 877, No. 1, p. 012036). IOP Publishing.

Guedes, M. V. (2002). Uma bobina de Ruhmkorff. *Electricidade*; 392: 6

Hiraishi, N., Kitasako, Y., Nikaido, T., Foxton, R. M., Tagami, J., & Nomura, S. (2003). Evaluation of active and arrested carious dentin using a pH-imaging microscope and an X-ray analytical microscope. *Operative dentistry*, 28(5), 598-604.

Holmes, J. D., Dierks, E. J., Homer, L. D., & Potter, B. E. (2003). Is detection of oral and oropharyngeal squamous cancer by a dental health care provider associated with a lower stage at diagnosis?. *Journal of oral and maxillofacial surgery*, 61(3), 285-291.

Janssens, K. (2004). *X-ray based methods of analysis* (Vol. 42, pp. 129-226). Amsterdam: Elsevier BV.

Jenkins, R. (1999). *X-ray fluorescence spectrometry* (Vol. 2). New York: Wiley.

Kaye, G. W. C. (1923). *X Rays*. London, Longmans, Green and Co.

Khalid, A., Khan, A. T., & Anwar, M. S. (1996). X-Ray Fluorescence (XRF) spectrometry for materials analysis and “discovering” the atomic number. *Journal of Physics*, 64, 335-338.

Khanna, S., Udas, A. C., Kumar, G. K., Suvarna, S., & Karjodkar, F. R. (2013). Trace elements (copper, zinc, selenium and molybdenum) as markers in oral sub mucous

fibrosis and oral squamous cell carcinoma. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*, 27(4), 307-311.

Khurshid, Z., Zafar, M. S., Khan, R. S., Najeeb, S., Slowey, P. D., & Rehman, I. U. (2018). Role of salivary biomarkers in oral cancer detection. In *Advances in clinical chemistry* (Vol. 86, pp. 23-70).

Klockenkämper, R. (1997). Total-reflection X-ray fluorescence analysis. *Chemical Analysis Monograph Series*.

Klockenkämper, R., & Von Bohlen, A. (2014). *Total-reflection X-ray fluorescence analysis and related methods*. John Wiley & Sons.

Knöchel, A. (1990). TXRF, PIXE, SYXRF; Principles, critical comparison and applications. *Fresenius' Journal of Analytical Chemistry*, 337(6), 614-621.

Knoll, G. F. (2010). *Radiation detection and measurement*. John Wiley & Sons.

Magalhaes, T., Becker, M., Carvalho, M. L., & Von Bohlen, A. (2008). Study of Br, Zn, Cu and Fe concentrations in healthy and cancer breast tissues by TXRF. *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy*, 63(12), 1473-1479.

Manno, S. H., Manno, F. A., Ahmed, I., Ahmed, R., Shu, L., Li, L., ... & Cheng, S. H. (2018). Spectroscopic examination of enamel staining by coffee indicates dentin erosion by sequestration of elements. *Talanta*, 189, 550-559.

Marguí, E., Queralt, I., & Hidalgo, M. (2009). Application of X-ray fluorescence spectrometry to determination and quantitation of metals in vegetal material. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 28(3), 362-372.

Marguí, E., Queralt, I., & Van Grieken, R. (2006). Sample preparation for X-ray fluorescence analysis. *Encyclopedia of Analytical Chemistry: Applications, Theory and Instrumentation*, 1-25.

Marques, A. L. (2013). Caracterização elementar das alterações em tecidos carcinomatosos da cavidade oral por técnica de fluorescência de raio-x por dispersão em comprimento de onda (Doctoral dissertation).

Martins, W. D. (2005). Wilhelm Conrad Roentgen e a Descoberta dos Raios-X. *Archives of Oral Research*, 1(3).

Mehrotra, R., & Gupta, D. K. (2011). Exciting new advances in oral cancer diagnosis: avenues to early detection. *Head & neck oncology*, 3(1), 1-9.

Messadi, D. V. (2013). Diagnostic aids for detection of oral precancerous conditions. *International journal of oral science*, 5(2), 59–65. <https://doi.org/10.1038/ijos.2013.24>

Motevich, I. G., Strekal, N. D., Papko, N. M., Glebovich, M. I., Shulha, A. V., & Maskevich, S. A. (2015). Application of x-ray fluorescence analysis to determine the elemental composition of tissues from different ovarian neoplasms. *Journal of Applied Spectroscopy*, 82(1), 98-103.

Müller, M. G., Valdez, T. A., Georgakoudi, I., Backman, V., Fuentes, C., Kabani, S., Laver, N., Wang, Z., Dasari, R. R., Shapshay, S. M. & Feld, M. S. (2003). Spectroscopic detection and evaluation of morphologic and biochemical changes in early human oral carcinoma. *Cancer: Interdisciplinary International Journal of the American Cancer Society*, 97(7), 1681-1692.

Mulware, S. J. (2012). Trace elements and carcinogenicity: a subject in review. *3 Biotech*, 3(2), 85–96. <https://doi.org/10.1007/s13205-012-0072-6>

Mulware, S. J. (2013). Comparative Trace Elemental Analysis in Cancerous and Noncancerous Human Tissues Using PIXE. *Journal of Biophysics*, 2013, 8.

Nair, D. R., Pruthy, R., Pawar, U., & Chaturvedi, P. (2012). Oral cancer: Premalignant conditions and screening-an update. *Journal of cancer research and therapeutics*, 8(6), 57.

Nascimento-Dias, B. L., Oliveira, D. F., & Anjos, M. J. (2017). A utilização e a relevância multidisciplinar da fluorescência de raios X. *Revista Brasileira de Ensino de Física*, 39(4).

Nascimento Filho, V. F. (1999). Técnicas analíticas nucleares de fluorescência de raios X por dispersão de energia (EDXRF) e por reflexão total (TXRF). *Piracicaba: Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz*.

Navarro-Pedreño, J., Gomez, I., & Mataix, J. (1993). Ciclos biogeoquímicos de oligoelementos metálicos. *IN Mas A, Azcue JM eds. Metales en sistemas biológicos. Editorial PPU (Barcelona)*, 297-324.

Nayak, A. G., Chatra, L., & Shenai, P. (2010). Analysis of copper and zinc levels in the mucosal tissue and serum of oral submucous fibrosis patients. *World J Dent*, 1(2), 75-8.

Okazaki, Y., & Gotoh, E. (2005). Comparison of metal release from various metallic biomaterials in vitro. *Biomaterials*, 26(1), 11-21.

Pereira, A. M. R. (2012). Estudo do impacto da descoberta dos raios-x e das suas aplicações médicas em portugal (Doctoral dissertation).

Pessanha, S., Coutinho, S., Carvalho, M. L., Silveira, J. M., & Mata, A. (2017). Determination of demineralization depth in tooth enamel exposed to abusive use of whitening gel using micro-Energy Dispersive X ray Fluorescence. *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy*, 138, 8-13.

Poh, C. F., Zhang, L., Anderson, D. W., Durham, J. S., Williams, P. M., Priddy, R. W., Berean, K. W., Ng, S., Tseng, O. L., MacAulay, C. & Rosin, M. P. (2006). Fluorescence visualization detection of field alterations in tumor margins of oral cancer patients. *Clinical Cancer Research*, 12(22), 6716-6722.

Prasad, A. S., & Oberleas, D. (1976). *Trace elements in human health and disease* (No. 616.399 T7/2 v.).

Rauf, N., Tahir, D., & Arbiansyah, M. (2016, March). Structural analysis of bioceramic materials for denture application. In *AIP Conference Proceedings* (Vol. 1719, No. 1, p. 030030). AIP Publishing LLC.

Resnick, R., & Eisberg, R. (1979). *Física quântica: átomos, moléculas, sólidos, núcleos e partículas*. Editora Campus, 29.

Ribeiro, J. L. B. (2006). *Estudo Das Interações Rocha-Fluido Em Arenitos Inconsolidados Com Simuladores Físicos Utilizando Tomografia Computadorizada E Microfluorescência De Raios X Por Luz Síncrotron* (Doctoral Dissertation, Universidade Federal Do Rio De Janeiro).

Rizk, S. L., & Sky-Peck, H. H. (1984). Comparison between concentrations of trace elements in normal and neoplastic human breast tissue. *Cancer research*, 44(11), 5390-5394.

Rouessac, F., & Rouessac, A. (2013). *Chemical analysis: modern instrumentation methods and techniques*. John Wiley & Sons.

Santos, E. S., Gama, E. M., França, R. S., Souza, A. S., & Matos, R. P. (2013). Espectrometria de Fluorescência de Raios-X na determinação de espécies químicas. *Enciclopédia biosfera*, 9(17), 3413-3432.

Sasaki, J. M., & Bleicher, L. (2000). Introdução à difração de raios-X em cristais. *Apostila de raios-X*.

Schliephake, H. (2003). Prognostic relevance of molecular markers of oral cancer--a review. *International Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*, 32(3), 233–245.

Schwarz, R. A., Gao, W., Redden Weber, C., Kurachi, C., Lee, J. J., El-Naggar, A. K., ... & Gillenwater, A. M. (2009). Noninvasive evaluation of oral lesions using depth-sensitive optical spectroscopy. *Cancer*, 115(8), 1669-1679.

Seliger, H.H. (1995). Wilhelm Conrad Röntgen and the glimmer of light. *Phys Today*; 48 (11): 25-31

Settle, F. A. (1997). Handbook of instrumental techniques for analytical chemistry, Volume 1. (F. A. Settle, Ed) (p 995). Prentice Hall PTR.

Severo, G. G. (2010). Utilização da fluorescência de raios x por dispersão de energia no estudo da pureza de implantes odontológicos de titânio.

Severo, G. G., Comunian, C. R., & De Oliveira, A. H. (2016). Estudo da qualidade de pinos de titânio para implantes odontológicos utilizando a fluorescência de raios x por dispersão de energia. *Revista Naval de Odontologia*, 43(1).

Shackley, M. S. (2011). An Introduction to X-Ray Fluorescence (XRF) Analysis in Archaeology. <https://doi.org/10.1007/978-1-4419-6886-9>

Shetty, S. R., Babu, S., Kumari, S., Shetty, P., Hegde, S., & Karikal, A. (2013). Role of Serum Trace Elements in Oral Precancer and Oral Cancer - a Biochemical Study. *Journal of Cancer Research and Treatment*, 2013 1 (1), pp 1-3, 1(1), 1–3. <https://doi.org/10.12691/jcrt-1-1-1>

Silva, M. P., Soave, D. F., Ribeiro-Silva, A., & Poletti, M. E. (2012). Trace elements as tumor biomarkers and prognostic factors in breast cancer: a study through energy dispersive x-ray fluorescence. *BMC Research Notes*, 5(1), 194.

Silva, M., Tomal, A., Pérez, C. A., Ribeiro-Silva, A., & Poletti, M. E. (2009). Determination of Ca, Fe, Cu and Zn and their correlations in breast cancer and normal adjacent tissues. *X-Ray Spectrometry*, 38(2), 103–111. <https://doi.org/10.1002/xrs.1126>

Silveira, J., Godinho, J., Mata, A., Carvalho, M. L., & Pessanha, S. (2015). Assessment of teeth elemental content using  $\mu$ -EDXRF: effects by in-office and at-home bleaching products. *X-Ray Spectrometry*, 44(1), 3-6.

Sorozini, M., Dos Santos, R. S., Silva, E. M., Dos Anjos, M. J., & Perez, C. R. (2017). Assessment of Ca and P content variation in enamel during an eight-week bleaching protocol using energy dispersive X-ray fluorescence. *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy*, 131, 93-98.

Suciu, I., Preoteasa, E. S., Preoteasa, E. A., Chiojdeanu, C., Constantinescu, B., Dimitriu, B., Perlea, P., Iliescu, A. A. & Bodnar, D. (2015). Standardless X-ray fluorescence analysis of endodontic sealers using a portable spectrometer. *Rom. Journ. Phys*, 60(3-4), 528-548.

Sudarshan, M., Ram, S. S., Majumdar, S., Maity, J. P., Ray, J. G., & Chakraborty, A. (2011). Energy-dispersive X-ray fluorescence—A tool for interdisciplinary research. *Pramana*, 76(2), 241-247.

Szoboszlai, N., Réti, A., Budai, B., Szabó, Z., Kralovánszky, J., & Zárny, G. (2008). Direct elemental analysis of cancer cell lines by total reflection X-ray fluorescence. *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy*, 63(12), 1480-1484.

Underwood, E. A. (1945). Wilhelm Conrad Röntgen (1845–1923) and the early development of radiology.

- Underwood, E. (2012). *Trace elements in human and animal nutrition*. Elsevier.
- Uo, M., Wada, T., & Sugiyama, T. (2015). Applications of X-ray fluorescence analysis (XRF) to dental and medical specimens. *Japanese Dental Science Review*, 51(1), 2-9.
- Valkovic, V. (1980). *Analysis of biological material for trace elements using X-ray spectroscopy*. CRC press.
- Van Grieken, R., & Markowicz, A. (Eds.). (2001). *Handbook of X-ray Spectrometry*. CRC press.
- Wada, O. (2004). What are Trace Elements? — Their deficiency and excess states. *Jpn Med Assoc J*, 47(5), 351.
- Ward, H. S. (1896). *Practical Radiography: a Hand-book of the Applications of the X-rays*. Pub. for the Photogram, Limited, Dawbarn & Ward, Limited.
- Warnakulasuriya, S. (2009). Causes of oral cancer—an appraisal of controversies. *British dental journal*, 207(10), 471-475.
- Wobruschek, P., & Strelci, C. & Selin Lindgren, E. (2010) Energy Dispersive, X-ray Fluorescence Analysis. *Encyclopedia of Analytical Chemistry: Applications, Theory and Instrumentation*. Chichester: John Wiley & Sons Ltd, 13315-13327.
- Zini, A., Czerninski, R., & Sgan-Cohen, H. D. (2010). Oral cancer over four decades: epidemiology, trends, histology, and survival by anatomical sites. *Journal of oral pathology & medicine: official publication of the International Association of Oral Pathologists and the American Academy of Oral Pathology*, 39(4), 299–305. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0714.2009.00845.x>