



Universidade de Aveiro
2021

**Flávia Daniela Freitas
Leite**

**Avaliação da contaminação por metais através da
medida da distribuição elemental de metais pesados
em peixes Zebra**



**Flávia Daniela Freitas
Leite**

**Avaliação da contaminação por metais através da
medida da distribuição elemental de metais pesados
em peixes Zebra**

Dissertação apresentada à Universidade de Aveiro para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Engenharia Biomédica, realizada sob a orientação científica da Doutora Ana Luísa Monteiro da Silva, Professora Auxiliar do Departamento de Física da Universidade de Aveiro e da Doutora Paula Inês Borralho Domingues, Investigadora do Centro de Estudos do Ambiente e do Mar do Departamento de Biologia da Universidade de Aveiro.

Este trabalho foi parcialmente
financiado pelos projetos:
CERN/FIS-INS/0025/2017;
STRONG-2020 – 824093;
PTDC/FIS-AQM/32536/2017.

o júri

Presidente

Doutor Augusto Marques Ferreira da Silva
Professor Associado da Universidade de Aveiro

Vogal - Arguente

Doutora Alda Sofia Pessanha de Sousa Moreno
Investigadora Auxiliar do Departamento de Física da Faculdade de Ciências e Tecnologia da
Universidade Nova de Lisboa

Vogal - Orientador

Doutora Ana Luísa Monteiro da Silva
Professora Auxiliar no Departamento de Física da Universidade de Aveiro

agradecimentos

O trabalho desenvolvido contou com a ajuda de diversas pessoas e entidades, aos quais pretendo expressar o meu sincero agradecimento.

Às minhas orientadoras, Doutora Ana Luísa Monteiro da Silva e Doutora Paula Inês Borralho Domingues, pela sua orientação científica, liberdade de trabalho concedida, confiança, disponibilidade e por todos os conhecimentos transmitidos.

Agradeço aos Departamento de Física e Departamento de Biologia da Universidade de Aveiro e ao grupo de investigação i3N-Aveiro, pelas condições e materiais prestados que possibilitaram a realização deste trabalho. Agradeço também ao grupo LIBPhys-UNL pela disponibilidade do sistema M4 TORNADO para a realização das análises para o trabalho.

À Daniela Correia pelo auxílio prestado ao cuidar dos peixes-Zebra e pela partilha de conhecimentos.

À Doutora Anabela Pereira (CESAM) pela disponibilidade e auxílio na liofilização dos peixes e aos Técnicos da Oficina de Metalomecânica do Departamento de Física pela execução das peças necessárias para este trabalho.

Agradeço aos meus colegas da DRIM*team*, pela companhia, ajuda e partilha de conhecimento e pelo bom ambiente que proporcionaram ao longo deste tempo.

À Regina Oliveira por toda a ajuda que me deu na realização deste trabalho, pela companhia nas noites de escrita na FISUA e no DRIM*lab* e principalmente pela amizade ao longo destes anos.

À Patrícia Miguel Carvalho pelos ensinamentos partilhados, mas sobretudo pela paciência, força, apoio e incentivo constante. Também agradeço pela revisão linguística do documento e todos os conselhos dados ao longo deste trabalho.

Em especial, aos amigos que encontrei e permanecem comigo, me apoiam e acreditam em mim.

À família.

Muito obrigado a todos!

palavras-chave

EDXRF, imagiologia por fluorescência de raios X, Metais Pesados, Peixe Zebra, THCOBRA

resumo

A presença de metais pesados no organismo está frequentemente associada a diversas patologias, tais como, danos permanentes no sistema nervoso, distúrbios do sono e cancro. Uma das principais vias de bioacumulação é através do consumo de peixe contaminado, devido à crescente poluição dos ecossistemas marinhos. Assim, é importante estudar mecanismos de acumulação de metais pesados que nos permitam perceber a sua interação no organismo. O peixe zebra é um modelo animal com inúmeras características ótimas para estudos toxicológicos.

Neste trabalho, avaliou-se a aplicabilidade e a performance de um sistema de imagem por fluorescência de raios X (FF-EDXRF, do inglês *Full Field of view - Energy Dispersive X-Ray Fluorescence*), baseado num detetor gasoso micro-estruturado (2D-THCOBRA), na obtenção do mapeamento elemental e distribuição espacial de diferentes metais pesados (Pb, Mn, Ni e Se) em peixes Zebra com diferentes tempos de exposição a diferentes concentrações de contaminantes. Pretendeu-se também estudar a acumulação e capacidade de excreção do chumbo, pelos peixes Zebra, bem como a sua relação com o comportamento dos peixes, de modo a perceber a influência da presença do metal no organismo do peixe.

O estudo comportamental foi realizado utilizando o sistema de rastreamento Zebrabox (Viewpoint Life Sciences, Lyon, France). Para verificar a acumulação e distribuição dos metais pesados no organismo, recorreu-se a um espectrómetro de EDXRF, um espectrómetro de imagem FF-EDXRF e um sistema de radiografia digital, para aquisição de imagens morfológicas dos peixes. Para validação dos resultados obtidos utilizou-se o sistema comercial M4 TORNADO (Bruker, Alemanha).

A realização deste trabalho permitiu concluir que os sistemas utilizados são capazes de identificar e mapear a distribuição elemental dos metais pesados na zona visceral dos peixes Zebra; e que este conseguiu excretar o metal, após acumulação, no tempo de realização do ensaio crónico. Relativamente ao estudo comportamental, não foi identificada qualquer alteração do comportamento estatisticamente significativa nos peixes expostos às concentrações estudadas durante o tempo do teste.

Os resultados obtidos são promissores, destacando a capacidade do sistema para aplicações na avaliação de metais pesados em amostras biológicas.

keywords

EDXRF, X-ray fluorescence imaging, heavy metals, Zebra fish, THCOBRA

abstract

The presence of heavy metals in the human body is often associated with various pathologies, such as permanent damage to the nervous system, sleep disorders, and cancer. One of the main ways of bioaccumulation is through the consumption of contaminated fish, due to the pollution of marine ecosystems. Thus, it is important to study mechanisms of heavy metal accumulation, to understand their interaction in the body. The Zebra fish is an animal model with numerous advantageous characteristics for toxicological studies.

In this work, we evaluated the applicability and performance of a Full field- X-ray fluorescence (FF-EDXRF) imaging system, based on a micro pattern gas detector (2D-THCOBRA), to obtain the elemental mapping and spatial distribution of different heavy metals (Pb, Mn, Ni, and Se) in Zebra fish with different exposure times to different concentrations of contaminants. It was also intended to study the accumulation and excretion capacity of lead by Zebra fish, as well as its relationship with fish behaviour, aiming to understand the influence of the presence of the metal in the fish organism.

The behavioural study was performed using the Zebrabox tracking system (Viewpoint Life Sciences, Lyon, France). To verify the accumulation and distribution of heavy metals in the organism an EDXRF spectrometer, a FF-EDXRF imaging spectrometer, and a digital radiography system for morphological imaging of the fish were used. The commercial M4 TORNADO system (Bruker, Germany) was used to validate the obtained results.

This work allowed concluding the systems' capability for the identification and mapping of the elemental distribution of heavy metals in the visceral area of Zebra fish. It was also shown that the fish were able to excrete the metal, after its accumulation, during the time of the chronic test. Regarding the behavioural study, no statistically significant behaviour changes could be identified in the fish exposed to the studied concentrations during the time of the test.

The obtained results are promising, highlighting the system's capacity evaluating heavy metals in biological samples.

Publicações e comunicações no âmbito deste trabalho

Comunicações em painel

- A. L. M. Silva, **F. Leite**, P. M. S. Carvalho, J. F. C. A. Veloso; *“Elemental distribution of heavy metals in Zebra fish (Danio Rerio) with na X-ray fluorescence system based on a gaseous detector”*- Comunicação apresentada na IEEE Nuclear Science Symposium and Medical Imaging Conference, 28th International Symposium on Room-Temperature Semiconductor X-Ray and Gamma-Ray Detectors, 16 a 23 de outubro de 2021, Yokohama, Japão (Conferência *online*)

Publicações em revistas de circulação internacional com arbitragem científica

- **F. Leite**, P. M. S. Carvalho, J. F. C. A. Veloso, A. L. M. Silva; *“Analysis of zebrafish contamination with heavy metals using a FF-XRF imaging system based on a MPGD”*. Em preparação para ser submetido para publicação à revista Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy.

Índice

Publicações e comunicações no âmbito deste trabalho	i
Lista de Figuras	i
Lista de Acrónimos e Constantes	iv
Lista de Tabelas.....	v
1 Introdução	1
1.1 Enquadramento e Motivação	1
2 Modelo Animal – Peixe Zebra <i>Danio rerio</i>	4
3 Princípios Físicos associados à Espectroscopia de Raios X	7
3.1 Produção de radiação X.....	7
3.2 Interação da radiação X com a matéria	8
3.3 Espectroscopia por fluorescência de raios X	8
4 Sistema FF-XRF baseado no detetor Thick COBRA (iFlux)	16
4.1 Detetor Thick COBRA.....	17
5 Materiais e Métodos	19
A) Preparação das amostras.....	19
B) Processo de aquisição das imagens	22
6 Avaliação preliminar da distribuição de metais pesados nos peixes Zebra.....	29
7 Estudo crónico da bioacumulação do Chumbo nos peixes Zebra.....	39
8 Conclusões e Trabalho Futuro	46
Referências	47

Lista de Figuras

Figura 1 - Número de publicações de estudos que mencionam peixe Zebra.	4
Figura 2 – a) Morfologia de um peixe Zebra; b) pormenores do esqueleto de peixe Zebra.	5
Figura 3 – O espetro de Bremsstrahlung e radiação característica de um alvo de W ilustra as energias de radiação característica específicas das transições K_{α} e K_{β}	7
Figura 4 –Esquerda: exemplo de produção de radiação X característica; Direita: esquema de possíveis transições eletrónicas.....	9
Figura 5 – Representação esquemáticas de um sistema de varrimento (esquerda) e de um sistema full field (direita).....	11
Figura 6 - Relação entre as distâncias amostra-pinhole e pinhole-detetor. Esquerda: ampliação; Centro: redução; Direita: Formação de imagem invertida devido ao uso de pinhole.....	11
Figura 7 – Esquerda: Mapeamento da distribuição de Fe obtido XRF; Direita: ampliação das regiões selecionadas.....	12
Figura 8 – Comparação da distribuição elemental de Hg, Zn e Ca na zona da cabeça em larvas expostas a MeHg e controlo.	12
Figura 9 – Exemplo do Mapeamento elemental em peixe Zebra. Em cima à esquerda: acumulação de mercúrio (azul) no peixe exposto a 200 $\mu\text{g/L}$; em cima à direita: acumulação de arsénio (roxo) no peixe exposto a 300 $\mu\text{g/L}$ e em baixo: acumulação do chumbo (vermelho) no peixe exposto a 100 mg/L	14
Figura 10 – Esquerda: Representação esquemática do Sistema iFlux, com destaque para o tubo de raio X, o detetor 2D-THCOBRA, a estrutura do pinhole, a amostra e os componentes eletrónicos.; Direita: FF-XRF visto de cima.....	16
Figura 11 – Fotografia da estrutura THCOBRA, mostrando os detalhes da vista da face superior (à esquerda) e da vista da face inferior (à direita).....	17
Figura 12- Princípio de funcionamento do THCOBRA.	18
Figura 13 - Esquema do princípio de funcionamento do detetor 2D-THCOBRA.	18
Figura 14 - Desenho experimental do teste preliminar. Em cada ponto de amostragem é retirado 1 peixe por concentração.	20
Figura 15 – Desenho experimental do teste crónico com PbSO_4 . Em cada ponto de amostragem são retirados 9 peixes para imagem (3 por concentração) e 45 peixes para análise comportamental (15 por concentração).....	21
Figura 16 – Esquerda: Zebrabox; Direita: Representação esquemática das classes de ângulos efetuados pelos peixes.....	22
Figura 17 – Montagem das amostras para análise.....	23
Figura 18 – Montagem experimental para a análise da amostra com espectrómetro da Amptek.	23
Figura 19 – Montagem experimental do Sistema iFlux. Esquerda: vista de frente; Direita: vista de cima.	24
Figura 20 – Imagem da interface gráfica do Software fluoRADIX.	25
Figura 21 – OID e Ampliação. Um maior OID cria uma maior ampliação do que uma menor OID. A imagem à esquerda é maior do que a da direita porque o objeto está mais afastado do recetor de imagem.	27

Figura 22 – Montagem experimental para aquisição da imagem morfológica do peixe Zebra.	27
Figura 23 – Esquema exemplificativo dos processos realizados para o tratamento de imagem.	28
Figura 24 - Espectro de fluorescência obtido com o detetor Si(PIN) do peixe exposto a manganês.	30
Figura 25 - Espectro de fluorescência e distribuição elemental do peixe Zebra obtido com o sistema iFlux. A vermelho está representado o cálcio, a verde o manganês e a azul o zinco.	31
Figura 26 - Junção da imagem morfológica com a imagem da distribuição elemental do manganês.	31
Figura 27 – Resultados do Sistema M4 TORNADO. Direita: Espectro de fluorescência de raios X; Esquerda: mapeamentos elementais do cálcio (vermelho), zinco (azul) e manganês (verde).	32
Figura 28 - Espectro de fluorescência obtido com o detetor Si(PIN) do peixe exposto a selênio.....	32
Figura 29 - Espectro de fluorescência, distribuição elemental do peixe Zebra obtido com o sistema iFlux e posterior fusão com a imagem morfológica. A vermelho está representado o cálcio, a verde o selênio.	33
Figura 30 - Sistema M4 TORNADO. Esquerda: Espectro de fluorescência de raios X; Direita: mapeamentos elementais do cálcio (vermelho) e selênio (verde).....	34
Figura 31 - Espectro de fluorescência obtido com o detetor Si(PIN) do peixe exposto a chumbo.....	35
Figura 32 - Espectro de fluorescência, distribuição elemental do peixe Zebra obtido com o sistema iFlux e posterior fusão com a imagem morfológica. A vermelho está representado o cálcio, a verde o chumbo.....	35
Figura 33 - Sistema M4 TORNADO. Esquerda: Espectro de fluorescência de raios X; Direita: mapeamentos elementais do cálcio (vermelho) e chumbo (verde).	36
Figura 34 - Espectro de fluorescência obtido com o detetor Si(PIN) do peixe exposto a níquel.	36
Figura 35 - Sistema M4 TORNADO. Direita: Espectro de fluorescência de raios X; Esquerda: mapeamentos elementais do cálcio (vermelho) e níquel (verde).	37
Figura 36 –Esquerda: Espectro de fluorescência; Direita:Distribuição elemental do peixe Zebra obtida com o sistema iFlux. A vermelho o cálcio e a azul o zinco.....	37
Figura 37 - Representação dos resultados obtidos da análise com a Zebrabox após o peixe estar em contacto com o chumbo durante 30 dias (2ª amostragem).	40
Figura 38 - Representação dos resultados obtidos da análise com a Zebrabox após o peixe estar em contacto com o chumbo durante 30 dias e água limpa durante 30 dias (4ª amostragem).....	41
Figura 39 - Espectro de fluorescência, obtido com o detetor Si(PIN), dos peixes expostos a 545 ug/L de chumbo nas diferentes amostragens do estudo.....	43
Figura 40 - Mapeamentos elementais do cálcio (vermelho) e chumbo (verde), a) 2ª amostragem e b) 4ª amostragem.....	44

Figura 41 – Espectro de fluorescência do sistema iFlux, fotografia do peixe, distribuição elemental e perfil de intensidade do peixe Zebra exposto a 545 µg/L de chumbo durante 30 dias..... 44

Figura 42 – Esquerda: Espectro de fluorescência; Direita: Direita: Distribuição elemental do cálcio e zinco do peixe Zebra controlo da 2ª amostragem obtida com o sistema iFlux. 45

Lista de Acrónimos e Constantes

μ-EDXRF	<i>Micro Energy Dispersive X-ray Fluorescence</i> (micro fluorescência de raios-X dispersiva em energia)
CDD	<i>Charge-coupled device</i> (dispositivo de carga acoplada)
d_{pd}	Distância entre o pinhole e o detetor
D_{ap}	Distância entre a amostra e o pinhole
EDXRF	<i>Energy dispersive X-ray fluorescence</i> (fluorescência de raios-X dispersiva em energia)
FAAS	<i>Flame Atomic Absorption Spectrometry</i> (espectroscopia de absorção atômica em chama)
FF-EDXRF	<i>Full-field-Energy Dispersive X-ray fluorescence</i> (campo de visão total por fluorescência de raios X dispersiva em energia)
FF-XRF	<i>Full Field X-ray fluorescence</i> (fluorescência de raios X de campo de visão
FWHM	<i>Full Width at Half Maximum</i> (largura à meia altura)
ICP-AES	<i>Inductively coupled plasma atomic emission spectroscopy</i> (espectroscopia de emissão atômica por plasma induzido)
MCA	<i>Multichannel analyser</i> (multicanal de análise de impulsos)
MF	<i>Magnification factor</i> (fator de ampliação)
MPGD	<i>Micro Pattern Gas Detector</i> (detetor gasoso micro-estruturado)
MHSP	<i>Micro-Hole and Strip Plate</i>
OECD	<i>Organisation for Economic Cooperation and Development</i> (Organização de Cooperação e Desenvolvimento Económico)
OID	<i>Object-to-image receptor distance</i> (distância entre o objeto e o recetor de imagem)
ROI	<i>Region of Interest</i> (Região de Interesse)
RS-XRF	<i>Rapid scanning X-ray fluorescence</i> (fluorescência de raios X de varrimento rápido)
SID	<i>Source-to-image receptor distance</i> (distância entre a fonte de radiação e o recetor de imagem)
SOD	<i>Source-to-object distance</i> (distância entre a fonte de radiação e o objeto)
SWI	<i>Susceptibility weighed Imaging</i>
THCOBRA	<i>Thick Cobra</i>
XRF	<i>X-ray fluorescence</i> (fluorescência de raios X)
ZFIN	The Zebrafish Information Network

Lista de Tabelas

Tabela 1 - Concentrações utilizadas dos respectivos iões no teste preliminar	20
Tabela 2 – Parâmetros de aquisição: tensão (V) e intensidade (I) do tubo de raios-X; tempo de aquisição (t_a); ângulo entre o tubo de raios-X e o detetor (Θ); distância entre o tubo e a amostra (d_1); e distância entre a amostra e o detetor (d_2).....	24
Tabela 3 – Parâmetros de aquisição do teste preliminar: tensão (V) e intensidade (I) do tubo de raios-X; tempo de aquisição (t_a); ampliação da amostra (A); diâmetro do pinhole (d). 24	24
Tabela 4 – Parâmetros de aquisição do teste crónico: tensão (V) e intensidade (I) do tubo de raios-X; tempo de aquisição (t_a); ampliação da amostra (A); diâmetro do pinhole (d). 24	24
Tabela 5 - Parâmetros de aquisição: tensão (V) e intensidade (I) do tubo de raios-X; tempo de aquisição (t_a), por peixe; filtro utilizado.	26

1 Introdução

1.1 Enquadramento e Motivação

Os bons hábitos alimentares são cada vez mais uma preocupação do ser humano uma vez que a eles se associam vários benefícios na saúde. Neste contexto considera-se fundamental a ingestão, tanto em quantidade como em qualidade, dos nutrientes essenciais, desde as proteínas aos hidratos de carbono, gorduras e vitaminas, necessários ao bom funcionamento do organismo humano. O peixe é considerado um alimento saudável, com diversos nutrientes importantes, essencial a uma dieta equilibrada e variada, sendo uma importante fonte de proteínas e lípidos de alto valor biológico, como ácidos gordos insaturados [1]. Vários estudos indicam ligações entre o consumo de peixe e a diminuição do risco de doenças crónicas, como por exemplo, doenças cardiovasculares ou hipertensão, associadas muitas vezes ao envelhecimento e também ao aumento da mortalidade da população [2]. Além disso, o consumo de peixe assume um papel fundamental no controlo do peso e no desenvolvimento cognitivo, nomeadamente das crianças [3].

Em 2014, a Organização das Nações Unidas para a Alimentação e Agricultura destaca no seu relatório o crescente e importante papel do peixe na alimentação a nível mundial, devido ao aumento da produção pesqueira e de aquacultura e também destaca que o peixe representa quase 17% do consumo de proteína no mundo, podendo chegar aos 70% em alguns países na zona costeira e insulares [4]. Em 2018, Portugal destaca-se como o terceiro maior consumidor de peixe a nível mundial, sendo indicado um consumo de 61,5 kg por habitante num ano, um valor muito superior ao da média mundial, cerca de 22,3 kg [5].

O ser humano tem vindo a utilizar metais pesados de diferentes maneiras ao longo da história. Paralelamente diversos efeitos negativos associados a uma exposição contínua aos mesmos têm vindo a ser identificados. Devido à sua toxicidade e tendência a acumulação na água e sedimentos, quando em grandes quantidades, os metais pesados tornam-se perigosos para todos os organismos vivos.

A presença de metais pesados no organismo está frequentemente associada a determinados problemas de saúde, tais como danos nos rins, sintomas neurológicos e psicológicos (por exemplo, tremores, ansiedade, distúrbios do sono e depressão, dores de cabeça) e cancro. Em muitos casos, a exposição prolongada a doses elevadas de determinados metais pesados pode mesmo levar à morte [6]. De modo a diminuir o perigo para a saúde pública, é essencial obter a informação acerca das vias de contaminação e também dos níveis desses metais no organismo ou em determinados órgãos.

Verifica-se que o consumo de peixe contaminado é uma das maiores fontes de exposição a metais pesados [7]. Ao longo dos anos tem-se vindo a observar um aumento das concentrações de vários metais pesados, nomeadamente mercúrio, cádmio, chumbo e arsénio, em peixes. Tal resulta do aumento da concentração destes metais na água devido à exploração mineira, produção industrial ou incorreto tratamento do lixo eletrónico por exemplo, que leva ao aumento das concentrações destes metais nos tecidos dos peixes [8]. No caso do mercúrio, quando em contacto com o ser humano pode provocar efeitos no sistema nervoso, sendo especialmente perigoso para as crianças e para o seu desenvolvimento [6 – 8].

A poluição ambiental é sem dúvida um problema universal. Atividades domésticas e industriais são fontes de contaminação do sistema aquático. Como os metais pesados se bioacumulam nos animais ao longo da cadeia alimentar, a análise da concentração desses mesmos metais serve como um indicador de qualidade do ecossistema aquático em que os animais habitam.

Os metais pesados nos peixes provêm principalmente da sua alimentação, e devido à biomagnificação, maiores concentrações são encontradas no topo da cadeia alimentar. Como o Homem se encontra acima dos peixes na cadeia alimentar, este vai consumindo os peixes e a crescente bioacumulação de metais pesados no organismo torna-se muitas vezes prejudicial à sua saúde.

Tendo em conta a crescente preocupação com a contaminação por metais pesados e as suas consequências, é necessária uma apertada vigilância aos seus níveis. Além disso, o número de estudos de imagem que avaliem a distribuição elemental de metais pesados em peixes é reduzido. Neste contexto, pretende-se com o presente trabalho propor uma solução mais viável e eficiente no controlo dos contaminantes em peixes, de modo a contribuir para a melhoria da saúde da população. Para tal, será avaliada a acumulação de metais pesados em peixes Zebra, através da determinação da sua distribuição espacial. Será utilizado um sistema de imagem de campo de visão total por fluorescência de raios X em energia dispersiva (FF-EDXRF, do inglês *Full-field-Energy Dispersive X-ray fluorescence*) baseado num detetor gasoso micro-estruturado (MPGD, do inglês *Micro Pattern Gas Detector*), avaliando-se a sua aplicabilidade no estudo da distribuição elemental em peixes Zebra. Pretende mapear-se a distribuição de metais em peixes Zebra contaminados, de modo a determinar quais as regiões anatómicas onde, preferencialmente, ocorre acumulação. No futuro, esta informação poderá ser associada com parâmetros comportamentais e bioquímicos.

Diversos trabalhos reportam o uso de metais e fármacos para estudo de ecotoxicidade usando peixes como modelo animal. Em 2010, foi publicado um estudo com o objetivo de comparar a sensibilidade de peixes Zebra, em estado inicial de vida e adultos, ao Crómio(VI), um poluente que ameaça os ecossistemas aquáticos, através da sua toxicidade e análise de biomarcadores[9]. As larvas foram expostas a uma gama de concentrações compreendidas entre 0 e 120 mg/L enquanto os peixes adultos foram expostos a uma gama de concentrações de 0 a 64 mg/L. Concluiu-se que peixes em início de vida apresentavam uma menor sensibilidade do que os adultos em relação à mortalidade; e a análise de biomarcadores indicou uma possível neurotoxicidade e interferência na atividade metabólica.

Altenhofen *et al.* estudou o efeito do manganês (Mn), um metal essencial que os organismos conseguem regular internamente, mas que quando em concentrações demasiado elevadas torna-se tóxico, causando sérios problemas neurológicos [10]. Foi estudado o efeito de diferentes concentrações de $MnCl_2$ em peixes Zebra com o objetivo de avaliar a exposição a nível cognitivo e comportamental. Os resultados obtidos demonstraram que a exposição na gama dos 0,1 a 1,5 mM de $MnCl_2$ levou a alterações destes parâmetros, e.g., diminuição da distância percorrida ou do tempo em movimento, em comparação com o controlo.

A técnica de análise por fluorescência de raios X (XRF – do inglês, *X-Ray fluorescence*) mostrou também ser uma poderosa ferramenta para identificação de metais

pesados e outros elementos em diferentes amostras, tal como amplamente reportado na literatura. Por exemplo, Peter Onuwa *et al.* [11] analisaram seis metais pesados (Cr, Mn, Ni, Cu, Zn e Mo) no couro cabeludo humano, investigando a sua acumulação em pessoas com diferentes profissões; Carvalho *et al.* [12], Machado *et al.* [13] e P.M.S. Carvalho *et al.* [14] recorreram à técnica de XRF para quantificar elementos presentes em tecidos tumorais e normais de diferentes órgãos, comparando os seus valores e concluindo que para alguns elementos se verificam alterações significativas entre tecido normal e tumoral.

Já Alonso-Hernández *et al.* [15] aplicou esta técnica na determinação da concentração de arsénio em diferentes espécies marinhas num determinado local geográfico, para assim inferir sobre a evolução da concentração ao longo do tempo. Bilo *et al.* [16] estudaram a acumulação de Pb e Zn em embriões de peixe Zebra concluindo que a análise por XRF é vantajosa na determinação de bioacumulação e que a sua aplicação em organismos de tamanho reduzido poderá ser útil.

Normalmente, os estudos são mais direcionados a determinados órgãos através da análise de biomarcadores, existindo poucos trabalhos dedicados à avaliação da distribuição elemental de metais pesados em todo o peixe. Na Universidade Nova de Lisboa, foram realizados estudos de imagem com peixes Zebra contaminados com mercúrio, arsénio e chumbo, para avaliação da sua distribuição elemental. Foi utilizado o sistema M4 TORNADO (Bruker®, Alemanha), um espectrómetro micro-EDXRF (μ -EDXRF), capaz de identificar os diferentes elementos presentes e fornecer imagens da sua distribuição no peixe [17 – 19].

Organização da dissertação

Este documento está organizado em oito capítulos. No primeiro capítulo é apresentada a motivação e enquadramento do trabalho. No segundo capítulo, são apresentados os motivos para a escolha do peixe Zebra como modelo animal. No terceiro capítulo, são descritos os princípios fundamentais da fluorescência de raios X e as vantagens de aplicação desta técnica. No quarto capítulo, é apresentado o detetor Thick COBRA e o seu princípio de funcionamento. No quinto capítulo, é apresentada a metodologia aplicada, desde a preparação das amostras, às condições de aquisição e caracterização dos diferentes sistemas utilizados. No sexto e sétimo capítulos, são apresentados os resultados obtidos para os estudos preliminar e crónico, respetivamente. No oitavo capítulo, são apresentadas as conclusões retiradas do trabalho e possíveis melhorias para um trabalho futuro.

2 Modelo Animal – Peixe Zebra *Danio rerio*

O peixe Zebra (*Danio rerio*) tem sido utilizado em diversas áreas de investigação, tais como, oncologia, evolução, genética e toxicologia [9, 20 – 23].

Alguns dos objetivos da sua utilização como modelo animal nos estudos são o conhecimento dos efeitos de diversos químicos, compreender os seus modos de ação no organismo e saber quais os riscos para o meio ambiente. Os testes realizados nos peixes Zebra podem focar-se no seu desenvolvimento, comportamento, histologia e marcadores moleculares, sendo estes realizados em diferentes estágios de vida, permitindo a monitorização dos efeitos no organismo desde a fase embrionária do peixe até à sua fase adulta.

Entre 2007 e 2018, verificou-se um crescente interesse da comunidade científica pelo peixe Zebra. É notório o aumento do número de publicações (Figura 1), mostrando a relevância do peixe Zebra como modelo animal, não só pela comunidade científica, mas também pela parte de indústrias farmacêuticas, químicas ou cosméticas.

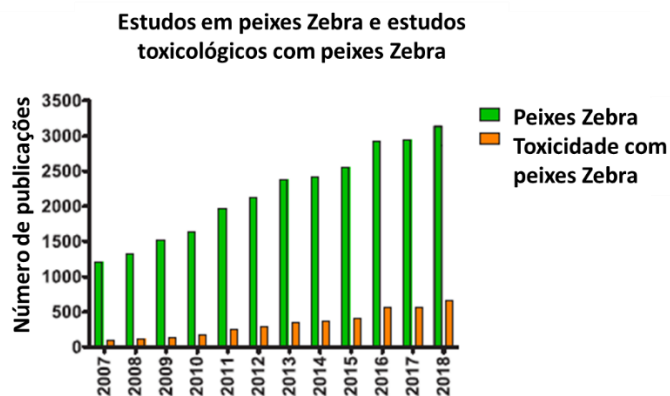


Figura 1 - Número de publicações de estudos que mencionam peixe Zebra. Adaptado de [24].

O genoma do peixe Zebra foi totalmente sequenciado e comparado com o genoma do ser humano: 70% dos genes têm um homólogo/equivalente [25]; para além disso, a informação genética está disponível em bases de dados de acesso gratuito, por exemplo, ZFIN – The Zebrafish Information Network. Este é um dos motivos que levou o peixe Zebra a ser imensamente utilizado na investigação. Para além disso, é um organismo de tamanho reduzido, mesmo em fase adulta (aproximadamente 4-5 cm de comprimento [26]), e que não necessita de aquários de grandes dimensões. Assim, é possível que um elevado número de peixes possa ser mantido no mesmo local, levando a uma redução de custos de manutenção.

Os peixes e os mamíferos apresentam semelhanças a nível anatómico e fisiológico. Possuem tecidos e órgãos em comum como cérebro, coração, intestino, rim, fígado, pâncreas e sistema nervoso, para além destes, os peixes ainda apresentam brânquias e bexiga natatória [27], como exemplificado na Figura 2. O sistema circulatório é responsável pela distribuição de oxigénio, com um coração de apenas 1 ventrículo e 1 aurícula, sendo regulado por um sistema elétrico. A oxigenação do sangue é realizada nas brânquias - a água entra pela boca, passa pelas brânquias e é expelida pelo opérculo. Possui também um sistema gastrointestinal, para ingestão de alimentos e o seu processamento, absorção e

excreção de substâncias não digeridas. O sistema reprodutivo varia consoante o sexo do peixe Zebra, apresentado testículos (macho) ou ovários (fêmea).

Devido à importância dos peixes na monitorização da poluição aquática existem diversos protocolos desenvolvidos para avaliação ecotoxicológica. Testes agudos e crónicos para diferentes estudos envolvendo peixes Zebra estão definidos em protocolos desenvolvidos pela Organização de Cooperação e Desenvolvimento Económico (OECD, do inglês *Organisation for Economic Cooperation and Development*) [28 - 29].

O peixe Zebra permite a realização de ensaios de toxicidade respeitando as normas estabelecidas e padronizadas, e que possibilitam a extrapolação dos resultados para outras espécies de vertebrados superiores, nomeadamente o Homem.

Para além da análise de biomarcadores e do comportamento de peixes Zebra expostos a compostos tóxicos, é também possível recorrer a técnicas de espectroscopia de raios X, discutidas no capítulo 3, para a avaliação da sua acumulação.

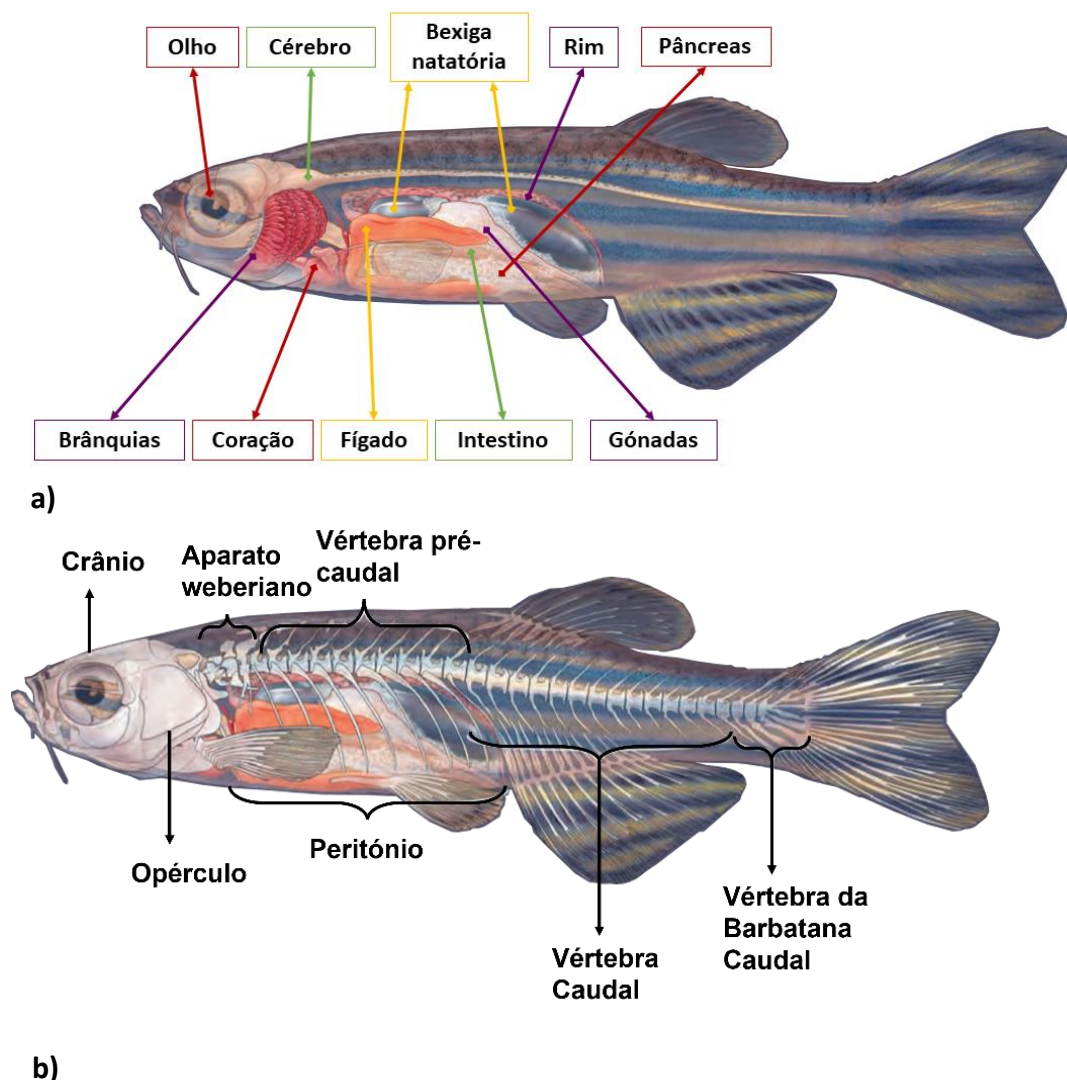


Figura 2 – a) Morfologia de um peixe Zebra; b) pormenores do esqueleto de peixe Zebra. Adaptado de [30].

Ensaio de Toxicidade

O peixe Zebra pode ser usado em diversos tipos de testes, dependendo do objetivo do estudo. Estes podem ser letais (levam à morte) ou sub-letais/crónicos (caracterizados por alterações de crescimento, desenvolvimento ou reprodução, por exemplo). Quanto ao tempo de exposição, o ensaio é classificado como agudo, quando os peixes são expostos durante um curto período de tempo a elevadas concentrações de um contaminante; ou crónico, quando os peixes são expostos a baixas concentrações, mas durante um longo período de tempo. Se nos referirmos ao modo como o contaminante é fornecido aos organismos, os ensaios dividem-se em estáticos, semi-estáticos ou de fluxo contínuo. Ensaio estático caracteriza-se pela não renovação do meio, isto é, o peixe está sempre em contato com a mesma água com que começou o ensaio; nos de fluxo contínuo, o meio está em renovação contínua. Os ensaios semi-estáticos representam um meio termo entre os ensaios estáticos e fluxo contínuo, isto é, as renovações de meio acontecem periodicamente ao longo do teste [31].

No planeamento de um ensaio toxicológico é necessária a existência de controlos para comparação, de modo a garantir que os efeitos observados estão associados à exposição do tóxico.

3 Princípios Físicos associados à Espectroscopia de Raios X

3.1 Produção de radiação X

Os raios-X são radiação eletromagnética (fotões) de alta energia, descobertos por Wilhelm Röntgen, em 1895. Röntgen verificou a presença de uma radiação desconhecida que tinha a capacidade de atravessar matéria. Os raios X têm comprimentos de onda compreendidos entre os 0,01 nm e os 10 nm e apresentam características como poder ionizante, elevado poder de penetração e é invisível ao olho humano.

O tubo de raios X é das fontes mais utilizadas para emissão de radiação contínua (*Bremsstrahlung*) e radiação X característica. Aquecendo um filamento metálico (cátodo), em vazio, através da passagem de uma corrente elétrica, são emitidos elétrons por efeito termiônico. Os elétrons, acelerados devido a uma diferença de potencial (ΔV) aplicada entre o cátodo e o ânodo, colidem com um alvo (ânodo), interagindo com os seus átomos. Deste modo, é emitida radiação contínua e raios X característicos do metal do ânodo [32].

A radiação *Bremsstrahlung* é emitida por partículas carregadas (prótons, elétrons e partículas alfa, por exemplo) que sofrem dispersão no campo elétrico do núcleo do átomo, perdendo assim energia e emitindo raios X numa gama contínua de energias. Já a radiação X característica é emitida quando um átomo é ionizado/excitado e ocorrem transições de elétrons entre as orbitais, de modo que o átomo retorne a uma configuração estável.

O espectro de emissão de um tubo de raios X com um alvo de tungstênio (W) está representado na Figura 3, onde se identificam a radiação contínua (*Bremsstrahlung*) e os picos de radiação característica do tungstênio.

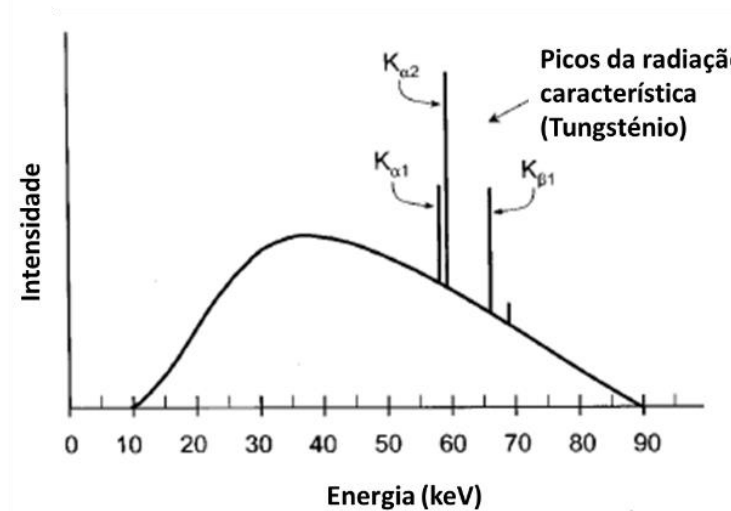


Figura 3 – O espectro de *Bremsstrahlung* e radiação característica de um alvo de W ilustra as energias de radiação característica específicas das transições K_{α} e K_{β} . Adaptado de [32].

O espectro de emissão pode ser influenciado por fatores como a corrente e tensão aplicados no tubo. Quando a corrente aplicada é aumentada, verifica-se uma maior quantidade de raios X/fotões a excitar a amostra, mas não há efeito no poder de penetração dos raios X (não altera a sua energia). Ao aumentar a tensão, verifica-se o aumento da quantidade de raios X emitidos e do poder de penetração, isto é, os fotões que

atingem a amostra são mais energéticos. As variações destes parâmetros não alteram a posição dos picos característicos, apenas os tornam mais ou menos intensos. Por outro lado, a emissão de fótons mais energéticos e em maior quantidade permite diminuir o tempo de aquisição.

3.2 Interação da radiação X com a matéria

Quando os raios X interagem com a matéria podem ocorrer fenômenos de dispersão ou de absorção, sendo a dispersão de Rayleigh, dispersão de Compton e efeito fotoelétrico os efeitos de maior importância em espectroscopia de raios-X.

Na dispersão de Rayleigh não ocorre ionização; um fóton incidente colide elasticamente com elétrons fortemente ligados ao átomo (elétrons de orbitais mais internas). Neste caso, é emitido um novo fóton com o mesmo comprimento de onda e energia que o fóton incidente, numa nova direção.

A dispersão de Compton é uma colisão inelástica, o fóton colide com um elétron das camadas externas do átomo, que é ejetado. Ao mesmo tempo, verifica-se a alteração da trajetória do fóton incidente e redução da sua energia.

Quando ocorre efeito fotoelétrico, a energia do fóton incidente é totalmente transferida/absorvida para um elétron, que é ejetado do átomo. Este fenômeno apenas ocorre quando a energia do fóton incidente for igual ou superior à energia de ligação do elétron ejetado [32]. Este fenômeno é de enorme importância para a espectroscopia de raios X, sendo que o preenchimento da lacuna pode ser acompanhado pela emissão de elétrons Auger (transição não radiativa) ou pela emissão de radiação X característica (transição radiativa), sendo esta a emissão de interesse para o trabalho.

3.3 Espectroscopia por fluorescência de raios X

A técnica de fluorescência de raios X (XRF) baseia-se na detecção de radiação X característica, emitida pelos átomos de uma amostra, quando da sua interação com radiação ionizante (e.g., raios X). Uma vez que a energia da radiação emitida é característica de cada elemento, é possível a sua identificação inequívoca.

A técnica de XRF é bastante usada como uma ferramenta de análise rápida para diversas aplicações, tais como, análise ambiental, geologia, agricultura, biomedicina, elementos do patrimônio cultural, metalurgia, entre outras [11, 33 – 36].

O processo de fluorescência de raios X pode ser representado esquematicamente conforme mostrado na Figura 4. O processo inicia-se com o efeito fotoelétrico: um fóton X interage com um elétron, preferencialmente de uma das orbitais mais internas do átomo alvo, ionizando-o. Nessa altura é criada uma lacuna na orbital do átomo de onde foi ejetado o elétron, resultando numa configuração instável para o mesmo. De modo a restaurar o equilíbrio, um elétron de uma orbital seguinte transita para preencher a lacuna, podendo ser emitido um elétron Auger ou um fóton de raio X com energia igual à diferença de energias de ligação dos elétrons nas respetivas orbitais. O fóton emitido tem uma energia que é característica de cada elemento, o que permite identificar qual o elemento de onde foi emitido. Na Figura 4 estão representadas algumas das transições eletrónicas num átomo.

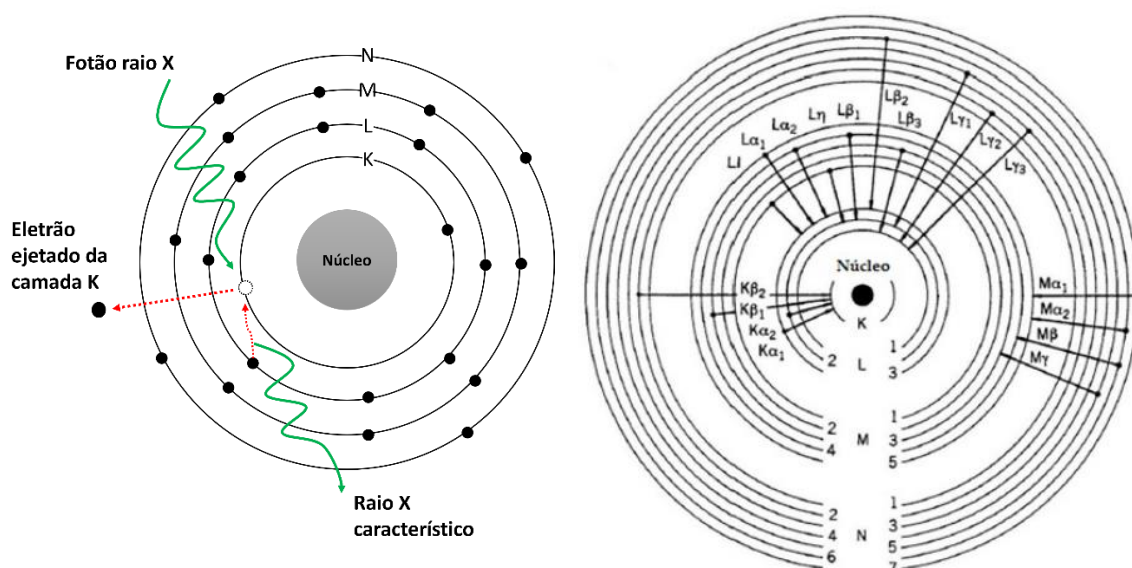


Figura 4 –Esquerda: exemplo de produção de radiação X característica; Direita: esquema de possíveis transições eletrônicas. Adaptado de [32].

No contexto do presente trabalho, utiliza-se uma fonte de raios X (tubo de raios X) para irradiar a amostra e um sistema de detecção da energia dos fótons de raio X característicos emitidos pela amostra, para a análise de amostras recorrendo à técnica de XRF. O espectro resultante apresenta a intensidade relativa da radiação emitida em função da energia detetada, o que permite a determinação da composição elemental da amostra.

As técnicas de análise por XRF apresentam diversas vantagens, tais como a identificação simultânea de vários elementos, o seu carácter não destrutivo, a simplicidade e rapidez na preparação das amostras, além de possibilitarem a análise qualitativa e quantitativa com sensibilidade na gama dos $\mu\text{g/g}$ [37].

Neste trabalho, a análise da acumulação de metais pesados em peixes zebra baseia-se na técnica de Fluorescência de raios X por dispersão de energia (EDXRF, do inglês, *Energy Dispersive X-ray Fluorescence*). Nos sistemas mais simples, de geometria planar, a amostra é diretamente ionizada/excitada pela radiação proveniente de um tubo de raios X, orientado de forma a favorecer a excitação dos elementos de uma amostra. Além disso, é possível filtrar a radiação ionizante, para reduzir a radiação de fundo ou promover a excitação de elementos de interesse.

3.3.1. Espectrômetros de fluorescência de raios X

Para determinação da composição elemental das amostras estudadas neste trabalho, usou-se um espectrômetro EDXRF baseado num detetor Si(PIN) devido à sua resolução em energia que permite distinguir elementos com energias características bastante próximas, que complementa a informação espectral obtida com o sistema iFlux que possui menor resolução em energia. O espectrômetro é composto por uma fonte de excitação, um sistema de detecção de raios X e um multicanal de análise de impulsos (MCA) para recolha e visualização dos dados. A resolução do espectrômetro é diretamente proporcional à resolução do detetor usado, comumente detetores de estado sólido, tais como detetores de deriva de silício (SDD, do inglês *Silicon Drift Detectors*), Si(PIN) e Si(Li):

a radiação incide na região de depleção formada pela junção p-n, formando-se um par elétron-lacuna; devido ao potencial aplicado, o elétron dirige-se para o ânodo e a lacuna para o cátodo do detetor. A corrente elétrica gerada no detetor é proporcional à energia da radiação incidente.

No caso dos detetores Si(PIN), os fótons de raios X interagem com os átomos de silício para criar um par elétron/lacuna. É aplicado um potencial para facilitar a recolha dos elétrons/lacunas no detetor e os impulsos gerados são contabilizados pelo MCA.

Um exemplo da aplicação de XRF com detetores semi-condutores em amostras biológicas é o de M. L. Carvalho *et al.* [38], que em 2005, publicaram um estudo com o objetivo de determinar as concentrações de elementos essenciais e tóxicos, nomeadamente, potássio (K), cálcio (Ca), ferro (Fe), cádmio (Cd), mercúrio (Hg) e chumbo (Pb), no músculo de peixes. Para isso, recorreram a dez espécies de peixe comercializado e consumido em Portugal. Para análise do conteúdo elemental nos peixes, foram utilizadas duas técnicas de análise: EDXRF com um detetor de Si(Li) e espectroscopia de absorção atômica em chama (FAAS). Apesar das vantagens da EDXRF, e.g., análise não-destrutiva, com pouca ou nenhuma preparação das amostras, os limites de deteção para alguns elementos podem ser elevados, o que impede a quantificação de concentrações muito baixas. Assim, FAAS foi também utilizada devido à elevada sensibilidade e limites de deteção, inferiores aos da EDXRF. Os resultados mostraram que K e Ca eram os elementos mais abundantes nas diferentes espécies. Metais pesados como Cr, Ni, Hg, Pb e Cd foram detetados em todas as espécies, sendo o Hg o mais abundante.

3.3.2 Imagiologia por fluorescência de raios X

Os sistemas de imagem EDXRF, para além da determinação dos elementos na amostra, permitem o mapeamento da sua distribuição nas amostras.

Os espectrómetros convencionais baseiam-se em sistemas de varrimento, em que a amostra é irradiada ponto a ponto por um feixe de raios X focado e a radiação de fluorescência emitida é registada com um detetor de raios X. Assim, obtém-se informação acerca da composição elemental em cada ponto analisado, possibilitando o mapeamento da distribuição dos diferentes elementos na amostra em estudo.

Neste trabalho foi utilizado o espectrómetro comercial M4 TORNADO (Bruker®, Alemanha), um sistema micro-XRF comercial de varrimento. Com este sistema é possível obter o espectro de intensidade, em função da energia, da área total das amostras em estudo ou de regiões de interesse, sendo possível definir vários parâmetros de aquisição, como o espaçamento entre pontos de varrimento ou tempo de aquisição por ponto. O sistema caracteriza-se pelo uso de policapilares para focagem do feixe de raios X incidente (ponto focal de 25 μm (@Mo-K α)); para deteção da radiação é utilizado um detetor SDD com área ativa de 30 mm² e uma resolução em energia de 142 eV @ 5,9 keV [36].

Apesar da resolução em energia e resolução em posição permitir a analisar amostras detalhadamente, o tempo de aquisição total para amostras de grandes dimensões pode ser muito longo. Além disso, por limitação do sistema, apenas é possível analisar amostras com dimensões até 190x160 mm², podendo surgir constrangimentos de memória.

Com o desenvolvimento da tecnologia associada a esta técnica surgem os sistemas de campo de visão total (FF-XRF, do inglês *Full Field of view X-ray fluorescence*). Estes sistemas possibilitam irradiar simultaneamente a totalidade da amostra, por um feixe de raios X amplo; a radiação de fluorescência é detetada por um detetor bidimensional com resolução em energia e em posição [39].

Na Figura 5 estão representados esquemas simples da configuração dos sistemas de imagem de EDXRF mencionados.

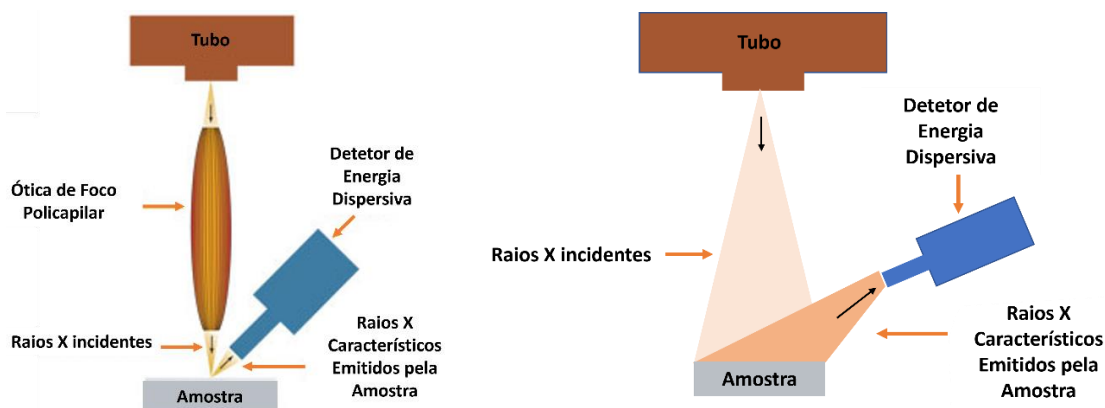


Figura 5 – Representação esquemática de um sistema de varrimento (esquerda) e de um sistema full field (direita).

Os sistemas de campo de visão total são usualmente compostos por um tubo de raios X, um detetor e um sistema óptico para formação de imagem, por exemplo uma câmara pinhole. O pinhole é um sistema óptico simples: é uma placa de metal com um orifício de pequenas dimensões, para colimar os feixes de raios X de tal maneira que apenas a radiação de fluorescência de uma determinada área da amostra possa alcançar o detetor, sendo a restante radiação atenuada/absorvida pela placa. O uso de um pinhole permite também ampliar ou reduzir a imagem no detetor, dependendo da distância entre a amostra e o pinhole, D_{ap} , e da distância entre o pinhole e o detetor, d_{pd} . Quando D_{ap} é inferior a d_{pd} , a imagem formada é ampliada; quando D_{ap} é superior a d_{pd} , a imagem é reduzida (Figura 6). Para além da ampliação é característico do pinhole a formação de imagem invertida [40].

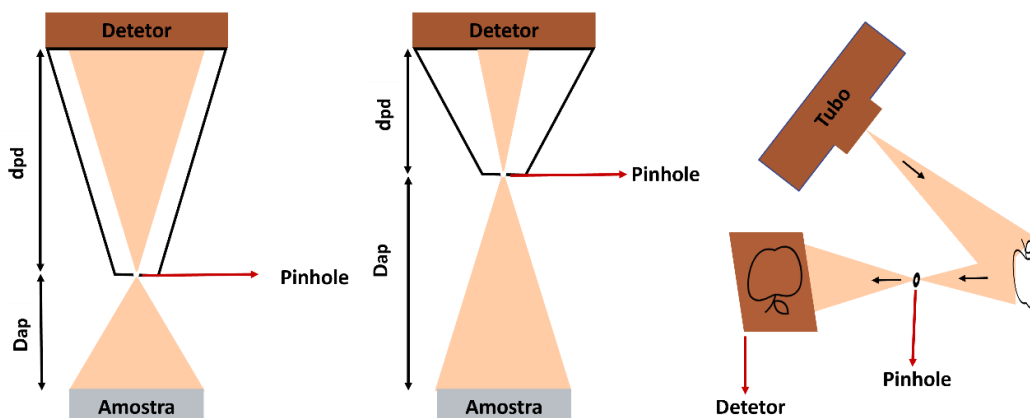


Figura 6 - Relação entre as distâncias amostra-pinhole e pinhole-detetor. Esquerda: ampliação; Centro: redução; Direita: Formação de imagem invertida devido ao uso de pinhole.

No entanto, a utilização de um pinhole apresenta desvantagens, tais como a redução do fluxo de fótons que incide no detector, o que pode ser um problema em casos com baixa taxa de contagem.

Os espectrómetros de imagem EDXRF têm sido amplamente utilizados em estudos do conteúdo elemental de tecidos biológicos, como reportado na literatura.

Em 2010, Habib *et al.* [41] realizaram um estudo com o objetivo de visualizar a deposição de ferro em segmentos do cérebro de dois cadáveres com diagnóstico de esclerose múltipla, utilizando fluorescência de raios X de varrimento rápido (RS-XRF) e *Susceptibility Weighted Imaging (SWI)*, uma técnica de imagem de ressonância magnética. As imagens de RS-XRF obtidas (Figura 7) permitem identificar a distribuição de Fe nas amostras, que coincide com a imagem obtida por SWI. Estas análises, realizadas no *Stanford Synchrotron Radiation Lightsource*, mostraram a acumulação de grandes quantidades de ferro nas amostras analisadas.

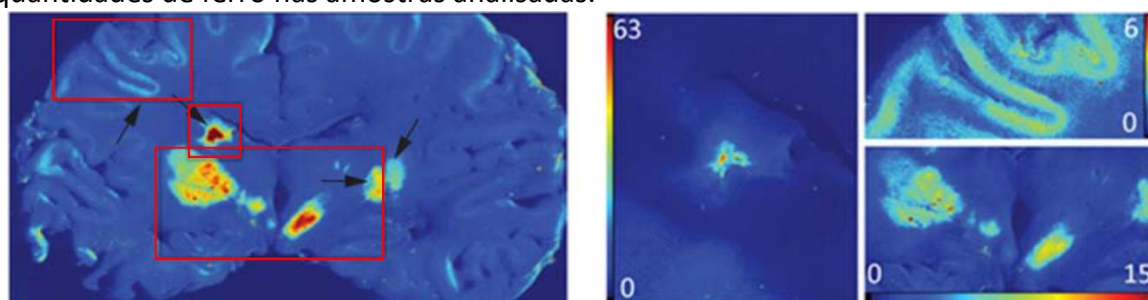


Figura 7 – Esquerda: Mapeamento da distribuição de Fe obtido XRF; Direita: ampliação das regiões selecionadas. Retirado de [41].

No ano de 2008, recorrendo à técnica de fluorescência de raios X com radiação de sincrotrão, Korbass *et al.* [42] observou as diferentes regiões de acumulação de mercúrio em larvas de peixe Zebra. A maior concentração correspondeu à zona ocular, sendo encontrado em menores concentrações também no cérebro, intestino e fígado. A exposição a 100 μM de metilmercúrio L-cisteína ocorreu durante 24 horas, utilizando larvas 3,5 dias após fertilização. Para o mapeamento da distribuição elemental foi utilizado um feixe de raios X de sincrotrão micro-focalizado de 10 μm e um detector SDD para recolha da informação dos fótons de fluorescência e assim monitorizadas as intensidades da linha $\text{L}\alpha$ do Hg e $\text{K}\alpha$ do Ca e Zn. Na Figura 8 estão apresentados resultados da análise da zona da cabeça das larvas expostas a mercúrio e controlo.

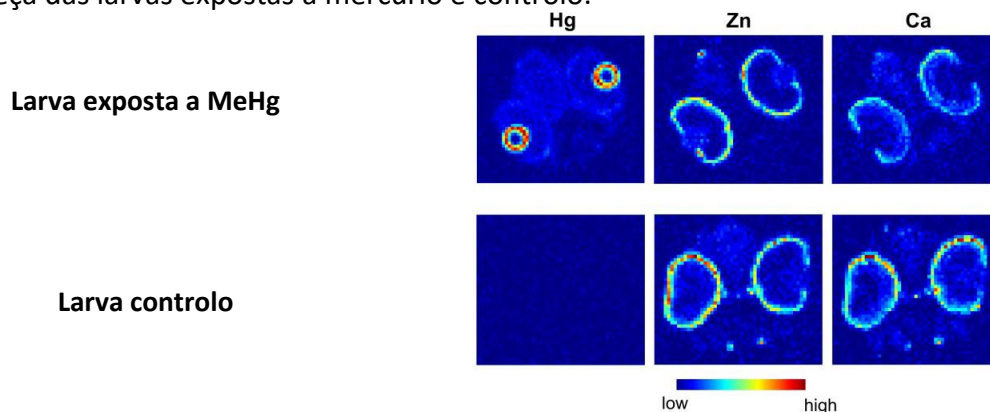


Figura 8 – Comparação da distribuição elemental de Hg, Zn e Ca na zona da cabeça em larvas expostas a MeHg e controlo. Retirado de [42].

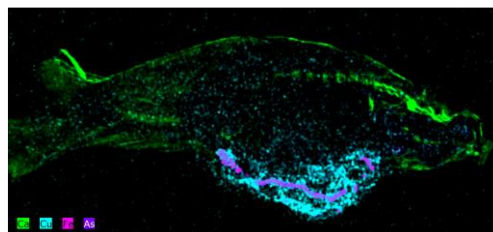
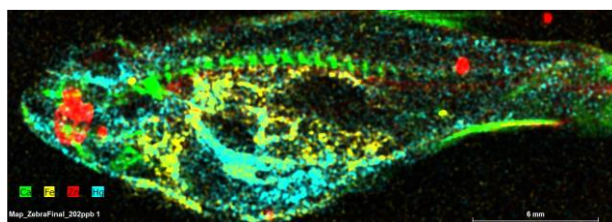
Vários estudos reportam manifestações oculares associadas à acumulação de mercúrio, desde defeitos visuais à perda de visão parcial ou total. O estudo realizado por Korbas et al. confirmou a acumulação de mercúrio na zona ocular, para além dos locais já conhecidos de acumulação. Assim, ajudou a esclarecer a influência da acumulação nos processos visuais, que não estão apenas associados a processos neurológicos, mas também com a acumulação direta de mercúrio no tecido ocular.

Em 2016 e 2017, no Laboratório de Física Atômica do Departamento de Física da Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade Nova de Lisboa foram realizados, no âmbito de teses de mestrado, estudos com peixes Zebra expostos a mercúrio, chumbo e arsénio, durante 7 dias. Os trabalhos desenvolvidos consistiram em avaliar a distribuição elemental destes metais nos respetivos peixes, através de imagem de EDXRF, recorrendo ao sistema M4 TORNADO. No âmbito destes trabalhos foram também realizadas análises EDXRF com um espectrómetro de geometria tri-axial e análises por espectroscopia de emissão atômica por plasma induzido (ICP-AES) para comparação dos resultados e avaliação do efeito da exposição ao metal pesado através da análise de biomarcadores. Para análise EDXRF, as amostras foram congeladas a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$, cortadas longitudinalmente e liofilizadas.

A estudante de mestrado Maria Silva [17] realizou um estudo com peixes Zebra expostos a cloreto de mercúrio ($[\text{HgCl}_2] = 100, 200 \text{ e } 400\text{ }\mu\text{g/L}$). Independentemente da concentração a que foram expostos, o peixe Zebra mostrou preferência acumulativa nas brânquias, cérebro e área visceral; no entanto, foram os peixes expostos a uma concentração de $200\text{ }\mu\text{g/L}$ que apresentaram maiores valores de bioacumulação, sendo a área visceral a zona de maior bioacumulação.

Tânia Liu [18] expôs os peixes a acetato de chumbo ($\text{Pb}(\text{C}_2\text{H}_3\text{O}_3)_2$) nas concentrações de 10, 20, 40 e 100 mg/L . Verificou-se uma maior bioacumulação nas brânquias e zona visceral e a maior concentração apresentou maior bioacumulação. Também se observou que os peixes expostos a 20 mg/L e 40 mg/L apresentaram maior acumulação do chumbo na zona das brânquias, enquanto nas concentrações de 10 mg/L e 100 mg/L apresentaram maior deposição na zona visceral. A acumulação do metal na zona visceral é justificada pela contribuição dos órgãos na excreção e desintoxicação.

Marta Gonçalves [19] estudou a distribuição de arsénio com concentrações de 150 e $300\text{ }\mu\text{g/L}$. Através das diversas técnicas utilizadas observou que os peixes expostos à maior concentração de As apresentaram maior bioacumulação e o local preferencial de acumulação foi a zona das vísceras.



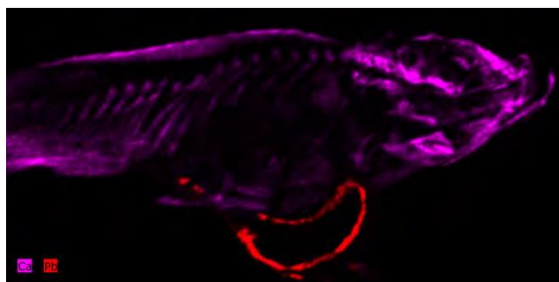


Figura 9 – Exemplo do mapeamento elemental em peixe Zebra. Em cima à esquerda: acumulação de mercúrio (azul) no peixe exposto a 200 $\mu\text{g/L}$; em cima à direita: acumulação de arsénio (roxo) no peixe exposto a 300 $\mu\text{g/L}$ e em baixo: acumulação do chumbo (vermelho) no peixe exposto a 100 mg/L . Retirado de [17–19]

Destes estudos conclui-se que os resultados obtidos do mapeamento com o sistema M4 TORNADO permitiram não só definir e identificar os tecidos alvo de acumulação, mas também avaliar e quantificar as concentrações dos metais nos diferentes tecidos. Além disso, verificou-se a preferência de acumulação dos metais pesados na zona visceral, independentemente do metal utilizado na exposição do peixe Zebra.

No laboratório de Detecção da Radiação e Imagiologia Médica (DRIM) do Departamento de Física da Universidade de Aveiro, tem vindo a ser desenvolvido um sistema FF-XRF, designado por Sistema iFluX. Este é constituído por um tubo de raios X para excitação das amostras, um pinhole e um detetor gasoso microestruturado, baseado numa estrutura THCOBRA. Esta recente geração de detetores gasosos de radiação possui excelentes propriedades para a deteção de fóton único, e por isso, nos últimos anos têm recebido uma crescente atenção para aplicações de fluorescência de raios X. Este tipo de detetores permite determinar a posição de interação de cada fóton de raio X na área sensível do detetor e a sua energia, com elevada eficiência e tempos de aquisição reduzidos, o que os torna vantajosos para uma performance rápida e eficiente para análise de imagem por EDXRF [43].

Um dos exemplos de aplicação de um sistema como o descrito é o de Silva *et al.* [44], que utilizaram um sistema de imagiologia de EDXRF baseado num detetor gasoso microestruturado para análise de um dente humano tratado com uma amálgama dentária. Foi utilizado um detetor *Micro-Hole and Strip Plate* (MHSP), um tubo de raios X com ânodo de Molibdénio e um pinhole de tungsténio com diâmetro de $100 \pm 6 \mu\text{m}$. O detetor possuía uma área ativa de $28 \times 28 \text{ mm}^2$, uma resolução em posição abaixo dos $125 \mu\text{m}$, resolução em energia de cerca de 14% FWHM para a linha $K\alpha$ do Mn e uma taxa de contagem de 0,5 MHz. O objetivo deste trabalho foi testar as capacidades do sistema através da identificação dos principais constituintes de uma amálgama dentária, zinco (Zn) e mercúrio (Hg), colocada no dente. Os resultados obtidos mostraram a aplicabilidade deste sistema, uma vez que foi possível identificar os elementos presentes e o seu mapeamento na amostra. Nas regiões à volta da cavidade da cárie foi possível identificar a presença de Hg. Também se identificou o Ca distribuído uniformemente, o que já era esperado.

Silva *et al.* [39] analisaram, em 2017, uma miniatura contemporânea Indiana, de forma a avaliar e comparar o desempenho dos dois sistemas de imagem por fluorescência de raios X, um sistema de varrimento comercial e um *full field* (FF). Numa pequena região da amostra, os resultados mostraram que o sistema comercial foi capaz de identificar quatro elementos diferentes, enquanto com o sistema FF só três elementos foram

identificados. A diferença de elementos identificados deve-se à capacidade do sistema em distinguir as energias de fluorescência dos elementos, pois o sistema de varrimento apresenta uma melhor resolução em energia que o FF (145 eV e 1000 eV, respectivamente, para a linha $K\alpha$ do Mn), o que neste caso se traduziu na não separação de dois elementos com energias de fluorescência próximas. Ao contrário do esperado, o tempo de aquisição foi menor para o μ -EDXRF, o que pode ser explicado pela baixa intensidade de excitação no sistema FF-XRF, uma vez que toda a área em análise é irradiada simultaneamente e no sistema μ -EDXRF, a potência do raio X é focada para irradiar ponto a ponto, levando a uma excitação mais eficiente. No entanto, o tempo de aquisição do FF-EDXRF pode ser diminuído, por exemplo, ao aumentar o diâmetro do pinhole (que permite a passagem de mais fótons) ou usando tubos de raios X com maior potência, o que gera mais fótons característicos por ponto da amostra por tempo.

Yamauchi *et al.* [45] desenvolveram um espectrômetro de imagem FF-XRF. As características do sistema como resolução em energia, resolução em posição, desempenho quantitativo e qualidade da imagem elemental, foram avaliadas e comparadas com as características de um espectrômetro EDXRF de varrimento comercial. O sistema FF-XRF era composto por um tubo de raios X com ânodo de Molibdênio, para excitar a amostra; um obturador de raios X para controlar o tempo de exposição; um policapilar reto para recolher a informação da posição do fóton de fluorescência; e uma câmara CCD (*charge-coupled device*) para detecção da radiação emitida. Os autores concluíram que à medida que diminuía a área de análise, o limite de detecção e sensibilidade também diminuía, no entanto, na análise de uma amostra, o sistema mostrou capacidade para adquirir imagens da distribuição elemental com a mesma qualidade que o espectrômetro de varrimento, mas em menos tempo (cerca de 10 vezes menos).

4 Sistema FF-XRF baseado no detetor Thick COBRA (iFlux)

O sistema iFlux foi desenvolvido no laboratório DRIM do Departamento de Física da Universidade de Aveiro, e é um FF-XRF constituído por um tubo de raios X, um detetor gasoso baseado numa estrutura 2D-THCOBRA e um pinhole, como representado na Figura 10.

A estrutura THCOBRA permite a deteção de cada fóton incidente, registando não só a sua energia, mas também a posição de interação. Deste modo, permite identificar os elementos constituintes de amostras em estudo e mapear a sua distribuição. A sua utilização é, portanto, muito vantajosa para imagiologia.

O detetor opera com uma mistura gasosa de Ne/CH₄ (95/5) em fluxo contínuo, sendo sensível à posição e energia dos fótons incidentes, o que permite o mapeamento da amostra. O detetor apresenta eficiência de deteção de 75% @ 5,9 keV, uma resolução em energia de 1 keV FWHM @ 5,9 keV e é possível atingir valores para a resolução em posição de 400 μm FWHM [36]. O tubo de raios X utilizado possui um ânodo de Molibdénio (5000 Apogee series, Oxford Instruments) e pode ser operado com uma voltagem e corrente máximas de 50 kV e 1mA, respetivamente; o pinhole pode ter uma abertura de 0,5 mm ou 1 mm de diâmetro e pode ser colocado a uma distância de 6 ou 12 cm da janela do detetor.

O princípio de funcionamento deste sistema assenta na irradiação de toda a amostra; os fótons de radiação característica são emitidos isotropicamente, mas ao utilizar o pinhole apenas os fótons de uma determinada área chegam efetivamente ao detetor devido ao uso de um pinhole, como demonstrado à direita na Figura 10 .

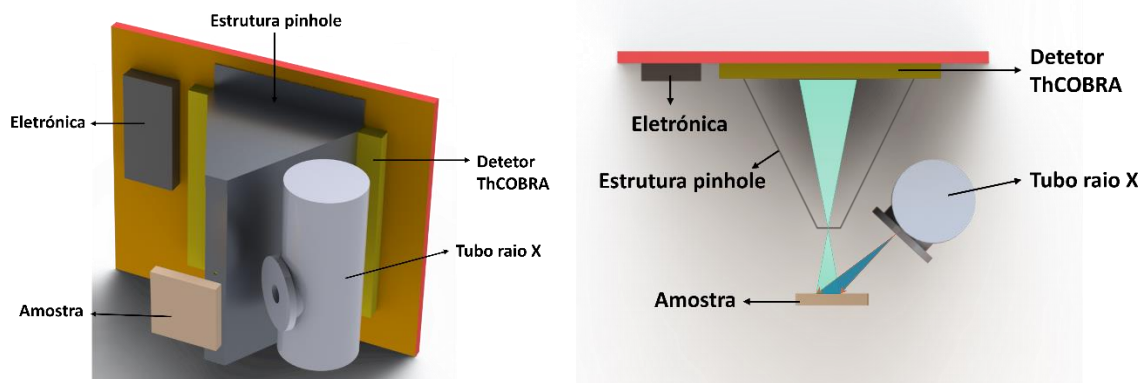


Figura 10 – Esquerda: Representação esquemática do Sistema iFlux, com destaque para o tubo de raio X, o detetor 2D-THCOBRA, a estrutura do pinhole, a amostra e os componentes eletrónicos.; Direita: FF-XRF visto de cima. Adaptado de [36].

4.1 Detetor Thick COBRA

O detetor THCOBRA é um detetor gasoso de radiação microestruturado (MPGD), introduzido por F.D. Amaro *et al.*, em 2010 [46].

A estrutura utilizada neste trabalho possui uma área ativa de $10 \times 10 \text{ cm}^2$, e permite a determinação da posição de interação e da energia de cada fóton que interage com o detetor [46 – 49]. É uma estrutura de dupla face feita de uma placa de G10 com 0,4 mm de espessura, revestida com $50 \mu\text{m}$ de cobre nas duas faces. A estrutura é constituída por buracos de 0,3 mm de diâmetro distanciados de 1 mm e organizados numa geometria hexagonal.

Na face inferior, é gravado um padrão de fitas no cobre (elétrodos): um elétrodo circular, cátodo, à volta de cada buraco, com 0,2 mm de largura; e um elétrodo com 0,2 mm de largura, que serpenteia entre as fitas dos cátodos, ânodo, como mostrado na Figura 11. A face superior do detetor também está estruturada em várias fitas em ziguezague, os tops, dispostas ortogonalmente às fitas do ânodo da face inferior [47 – 49].

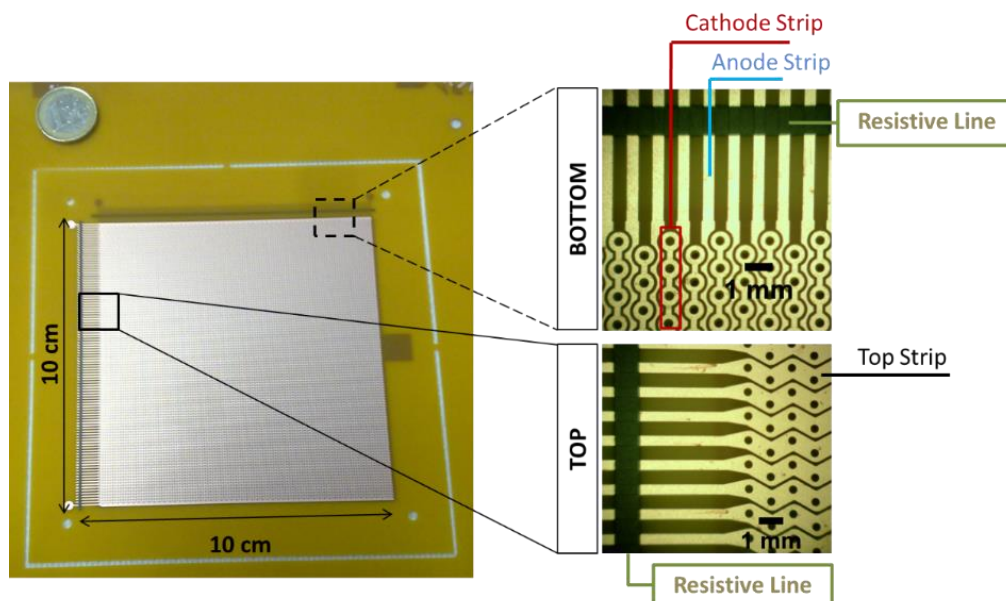


Figura 11 – Fotografia da estrutura THCOBRA, mostrando os detalhes da vista da face superior (à esquerda) e da vista da face inferior (à direita). Retirado de [35].

O princípio de funcionamento do detetor THCOBRA está ilustrado na Figura 12. Os fótons de raios X incidentes interagem com o gás, levando à sua ionização e consequente produção de pares ião-eletrão (nuvem primária de eletrões).

Esses eletrões são direcionados para os buracos da estrutura devido à ação de um campo elétrico fraco aplicado na região de deriva. Nos buracos é gerado um campo elétrico elevado pela aplicação de uma diferença de potencial entre os tops e o cátodo, concentrando os eletrões nos buracos e induzindo um primeiro estágio de multiplicação de carga. Depois de escapar dos buracos, os eletrões são novamente acelerados em direção aos ânodos (por aplicação de uma diferença de potencial adequada entre os ânodos e o cátodo), onde são novamente multiplicados perto da vizinhança das fitas dos ânodos (segunda avalanche) [46 – 48].

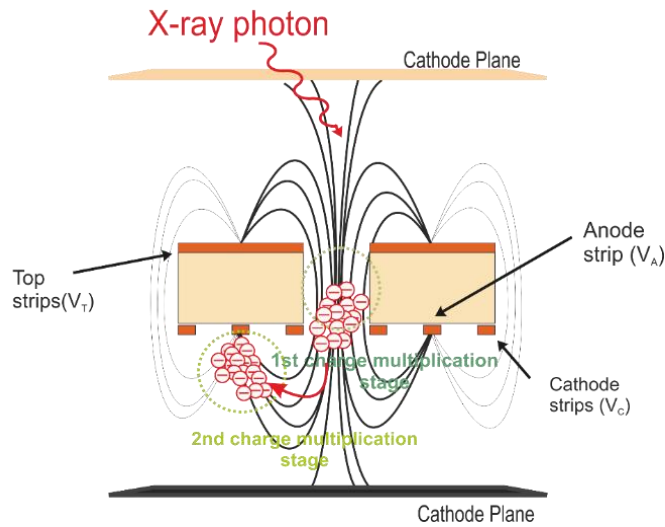


Figura 12- Princípio de funcionamento do THCOBRA. Retirado de [48].

Para a determinação da posição de interação e da energia dos fótons incidentes são usadas duas fitas resistivas (ver Figura 11), uma para cada dimensão (X e Y). Uma conecta as fitas do ânodo (face inferior) e a outra as fitas top (face superior) da estrutura. A cargas induzidas nos ânodos e nas fitas top são lidas nas duas extremidades de cada fita resistiva; a posição de interação é determinada de acordo com o princípio resistivo de divisão de carga. Ao extremo mais perto da fita resistiva chegará um sinal de maior amplitude do que ao outro extremo [47 – 49]. Assim, através da razão entre as amplitudes é possível determinar as coordenadas cartesianas X e Y da posição de interação de cada fóton incidente [35]:

$$X = k \frac{X_1}{X_1 + X_2} \quad \text{Equação 1}$$

$$Y = k \frac{Y_1}{Y_1 + Y_2} \quad \text{Equação 2}$$

X_1 e X_2 são as amplitudes dos sinais de carga detetados na direção X; Y_1 e Y_2 são as amplitudes dos sinais de carga detetados na direção Y; e k representa um fator de calibração. Somando as amplitudes dos sinais de carga detetados numa direção, X ou Y, é possível determinar a energia do fóton que interage com o detetor [35]. Um esquema do princípio de funcionamento do 2D-THCOBRA é mostrado na Figura 13.

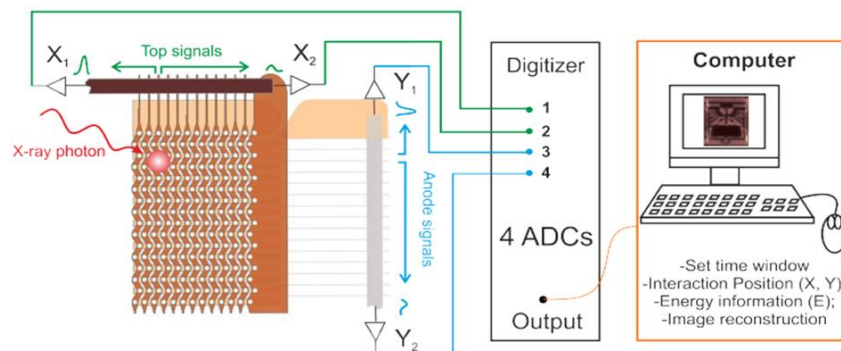


Figura 13 - Esquema do princípio de funcionamento do detetor 2D-THCOBRA. Retirado de [35].

5 Materiais e Métodos

A) Preparação das amostras

1 Bioensaios de Exposição

Durante este trabalho realizaram-se dois bioensaios de exposição em peixes Zebra: um estudo/teste preliminar, com diferentes metais e concentrações para verificar quais as melhores abordagens nas diversas metodologias de análise usadas no trabalho; e um estudo crónico para avaliação da acumulação e do efeito comportamental/reação do peixe Zebra a um metal (Pb) a diferentes concentrações. Tanto no ensaio preliminar como no estudo crónico foram realizadas análises com um espectrómetro de fluorescência de raios X por dispersão em energia baseado num detetor Si(PIN), foram adquiridas imagens morfológicas utilizando um detetor de imagem de raios X comercial CMOS (*Hamamatsu*) e foi também realizada análise com o Sistema iFlux. Paralelamente, analisaram-se as mesmas amostras no sistema comercial micro-XRF M4 TORNADO (Bruker, Alemanha) para validação dos resultados obtidos. No teste crónico, foi ainda realizado um estudo comportamental para avaliação da atividade locomotora e do comportamento timotático dos peixes, com o objetivo de verificar a existência de alterações comportamentais causadas pela absorção/acumulação do metal em questão no organismo do peixe.

2 Cultura de peixes Zebra

Os peixes Zebra foram gerados e cresceram no biotério de peixes Zebra do Departamento de Biologia da Universidade de Aveiro, onde foram mantidos sob condições controladas num sistema de recirculação da ZebTEC e alimentados duas vezes ao dia. A condutividade do meio é mantida a $800 \pm 50 \mu\text{S cm}^{-1}$ e o pH a $7,5 \pm 0,5$. O teor de oxigénio dissolvido é mantido a 95% de saturação e a temperatura, a 27 ± 1 °C. O biotério tem um fotoperíodo controlado de 12 horas de luz e 12 horas de escuro. Na fase adulta, os peixes são alimentados uma vez por dia com alimento comercial Gemma Micro 500. Peixes Zebra adultos, com cerca de 8 e 10 meses, foram selecionados para os ensaios.

3 Exposição dos peixes Zebra

Teste preliminar

No teste preliminar foram testados 4 compostos diferentes: Nitrato de Níquel Hexa-hidratado ($\text{Ni}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$), pó de Selénio metálico (Se), Sulfato de Chumbo (PbSO_4) e Sulfato de Manganês Mono-hidratado ($\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$). Para cada um dos compostos, foram preparadas as respetivas soluções stock por dissolução em água do sistema dos peixes Zebra e por diluição foram preparadas as soluções a utilizar no ensaio.

Foram utilizados 27 peixes Zebra para o teste preliminar: 3 no grupo controlo, que apenas esteve em contacto com água não contaminada, e 24 expostos aos contaminantes. Para cada metal estudado, dois grupos de 3 peixes foram expostos a diferentes concentrações, apresentadas na Tabela 1.

As concentrações utilizadas foram consideradas tendo em conta valores reportados em artigos que apresentavam algum efeito da acumulação de metais nos peixe Zebra [10, 50 – 52].

Tabela 1 - Concentrações utilizadas dos respetivos iões no teste preliminar.

	Ni	Se	Pb	Mn
Concentração do ião (mg/L)	2,3	5,3	1	27,3
	6,8	15,8	3	82

Os peixes estiveram expostos durante 12 dias sob condições semi-estáticas, em que o meio era renovado a cada cinco dias. Durante este período de ensaio, existiram 3 pontos de amostragem, ao fim de 5, 10 e 12 dias de exposição, respetivamente. Em cada ponto de amostragem foi retirado um peixe de cada concentração que foi imediatamente eutanasiado com uma concentração letal de anestésico e de seguida guardado numa arca a -80°C para posterior análise. O desenho experimental deste teste preliminar está representado na Figura 14.

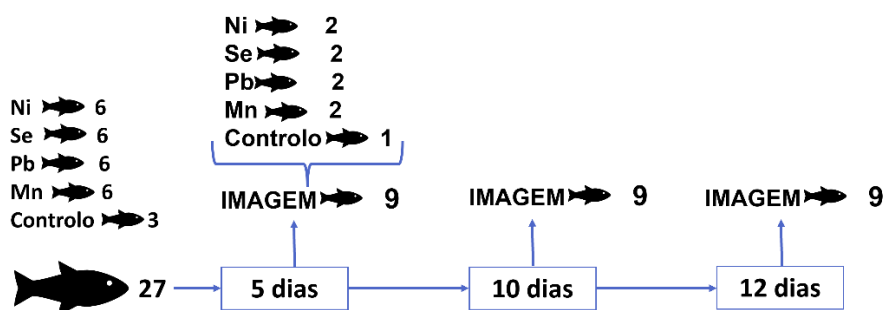


Figura 14 - Desenho experimental do teste preliminar. Em cada ponto de amostragem é retirado 1 peixe por concentração.

Teste Crónico

Para o teste crónico, foi usado sulfato de chumbo (PbSO_4); as soluções stock foram preparadas por dissolução de PbSO_4 na água do sistema dos peixes Zebra e usadas para preparar as soluções teste do ensaio.

Os peixes Zebra foram expostos a três concentrações de sulfato de chumbo – $0 \mu\text{g/L}$, $54,5 \mu\text{g/L}$ e $545 \mu\text{g/L}$ – durante um mês. Posteriormente foram colocados em contacto com água limpa também durante um mês, sob condições semi-estáticas. Estas concentrações foram escolhidas tendo em conta resultados obtidos em trabalhos anteriores, como por exemplo, Thi *et al.* [53], que reportou alterações comportamentais ao fim de 7 dias aquando de uma exposição crónica a PbCl_2 .

Este ensaio teve como objetivo, numa primeira fase, verificar se as concentrações usadas afetavam o comportamento e se havia acumulação preferencial em alguma zona ou órgão do peixe Zebra. Numa segunda fase, averiguou-se se, quando colocado em água limpa, o peixe conseguia recuperar e/ou excretar o metal anteriormente acumulado.

Para tal, foi preparado um desenho experimental para um ensaio deste tipo, esquematizado na Figura 15. Ao longo de dois meses, houve 4 pontos de amostragem: o primeiro e o segundo ao fim 15 e 30 dias em contacto com a água contaminada com sulfato de chumbo, respetivamente (a cinza na Figura 15); o terceiro e quarto pontos de amostragem após 15 e 30 dias em contacto com a água limpa, respetivamente, após terem estado os 30 dias na água contaminada. O ensaio foi realizado utilizando um total de 81

peixes (27 peixes por concentração), em cada ponto de amostragem foram retirados 9 peixes (3 peixes por concentração) para serem liofilizados e de seguida utilizados para análise elemental e mapeamento dos metais pesados. Para a realização do estudo comportamental foram utilizados 45 peixes (15 peixes por concentração), que no final da análise voltavam para o ensaio.

A temperatura e o fotoperíodo foram similares aos das condições de cultura; durante o ensaio o meio foi renovado a cada quatro dias de forma a manter constantes as concentrações de exposição e os parâmetros de qualidade da água.

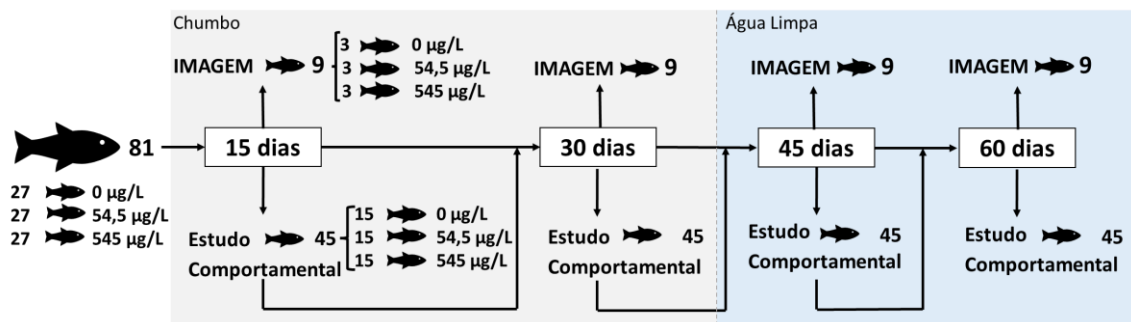


Figura 15 – Desenho experimental do teste crónico com $PbSO_4$. Em cada ponto de amostragem são retirados 9 peixes para imagem (3 por concentração) e 45 peixes para análise comportamental (15 por concentração).

4 Estudo Comportamental

Atividade Locomotora e Comportamento Timotático

Quinze peixes por concentração foram transferidos individualmente para um pequeno aquário com $8 \times 13 \text{ cm}^2$ (L x C). O aquário foi colocado no sistema de rastreamento Zebrabox (Viewpoint Life Sciences, Lyon, France) (Figura 16) e o peixe ficou a aclimatar-se na luz durante 2 minutos. De seguida, o seu movimento foi gravado durante 4 minutos. Durante este período, foi realizado um ciclo de luz/escuro de 2 minutos para estimulação/inibição do movimento do peixe. A distância total percorrida pelo peixe foi calculada para cada parte do ciclo. Foram considerados dois tipos de movimento: velocidade média (atividade normal) para movimentos abaixo dos 40 mm/s e velocidade elevada (hiperatividade) para movimentos acima dos 40 mm/s.

Também os ângulos da trajetória dos peixes foram gravados e classificados em 8 classes, como representado na Figura 16, à direita. Os ângulos foram calculados pelo vetor de direção de natação dos peixes e curvas realizadas. Ângulos de baixa amplitude (classes 4 e 5) indicam movimentos diretos, enquanto ângulos de grande amplitude (classes 1, 2, 7 e 8) indicam movimentos com mudanças significativas de direção e sugerem um comportamento errático de natação, servindo de indicador de stress. Ângulos de amplitude média (classes 3 e 6) indicam viragens de percurso médias.

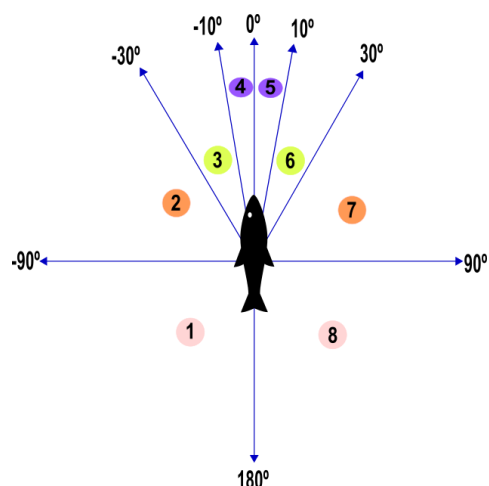


Figura 16 – Esquerda: ZebraBox; Direita: Representação esquemática das classes de ângulos efetuados pelos peixes.

No protocolo utilizado na ZebraBox, foram definidas duas zonas de monitorização: uma zona interna e uma zona externa, permitindo a análise da tendência de nadar próximo das bordas do aquário, como medida do comportamento timotático. Tendo em conta que a distância nadada na zona externa também consta na distância total percorrida, para analisar a tendência de nadar perto das bordas, a percentagem de distância nadada nesta zona foi calculada dividindo a distância percorrida na zona externa pela distância total e multiplicando por 100.

5 Análise Estatística

O programa OriginPro 8.5 (OriginLab Corporation, Northampton, MA, USA) foi utilizado para realizar análise estatística *one-way ANOVA* – análise unidirecional de variância. Com esta análise pretendeu-se determinar se há diferenças estatisticamente significativas entre as médias dos grupos independentes. Quando existe esta diferença significativa é realizado um teste de Tukey que permite identificar entre quais grupos é a diferença. Para deduzir as diferenças significativas foi considerado um nível de significância de 0,05.

B) Processo de aquisição das imagens

1 Preparação dos peixes Zebra

Foram usados diferentes tipos de instrumentação para identificar a presença de contaminantes nos peixes, e determinar a sua distribuição espacial. Para a realização das análises nos peixes Zebra, procedeu-se à preparação destes. Depois de estarem na arca a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ são liofilizados por cerca de 56 horas. O processo de liofilização é usado para preservar material biológico removendo a água da amostra (desidratação) por sublimação, mantendo a sua estrutura biológica. Posteriormente, o peixe Zebra liofilizado é colado a uma folha de Mylar, colada num suporte. As amostras foram devidamente identificadas com as concentrações a que foram expostas e qual o ponto de amostragem correspondente, como se verifica na Figura 17.

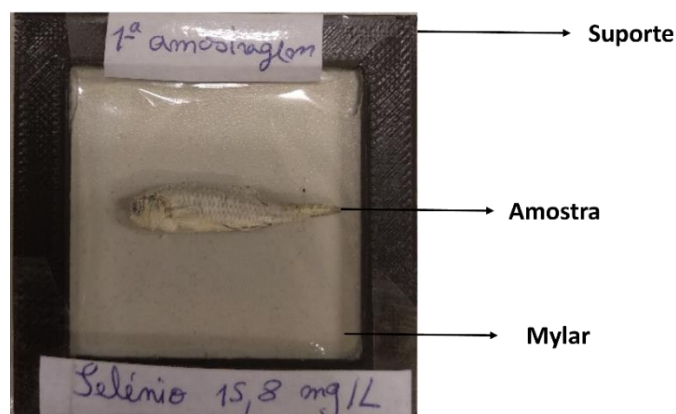


Figura 17 – Montagem das amostras para análise.

2 Análise Elemental

Espetrómetro de EDXRF

Para a análise elemental dos contaminantes existentes no peixe Zebra usando um espectrômetro de fluorescência de raios X, utilizou-se um tubo de raio X (5000 Apogee series, Oxford Instruments) que irradiou todo o peixe ao mesmo tempo, o detector XR-100CR Si(PIN) da Amptek® com o amplificador (modelo PX2CR) e o MCA 8000A, sensível à energia e com uma resolução em energia na gama dos 139-190 eV FWHM @5,9 keV [54]. Com este detector, foi possível obter espectros de energia correspondentes às energias características emitidas pelo peixe Zebra em estudo e determinar os elementos presentes bem como inferir acerca da sua concentração relativa.

Na Figura 18 está representada a montagem experimental para a aquisição destes dados e na Tabela 2 estão apresentados os parâmetros utilizados. Estes parâmetros são escolhidos de modo a garantir que a energia e intensidade da radiação ionizante são suficientes para excitar os elementos todos da amostra e assim ocorrer fluorescência. Se a tensão aplicada não for suficiente para excitar um determinado elemento, este não irá aparecer no espectro, o que poderá levar a conclusões incorretas sobre a constituição da amostra.

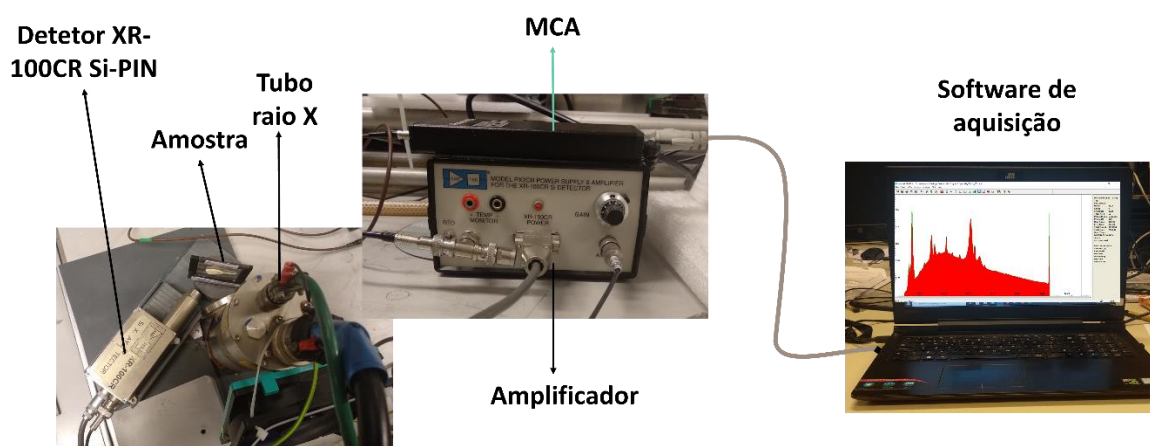


Figura 18 – Montagem experimental para a análise da amostra com espectrômetro da Amptek.

Tabela 2 – Parâmetros de aquisição: tensão (V) e intensidade (I) do tubo de raios-X; tempo de aquisição (t_a); ângulo entre o tubo de raios-X e o detetor (θ); distância entre o tubo e a amostra (d_1); e distância entre a amostra e o detetor (d_2).

	V (V)	I (μ A)	t_a (min)	θ (°)	d_1 (cm)	d_2 (cm)
Teste Preliminar	45 kV	7	10	50°	3	3,5
Teste Crônico			40			

Sistema iFlux – Espectrómetro de imagem de EDXRF

Com o sistema FF-XRF foi possível adquirir imagens da distribuição elemental dos peixes Zebra. Na Figura 19 está representada a montagem experimental para as aquisições e nas Tabelas 3 e Tabela 4, os parâmetros associados a cada aquisição do respetivo teste.

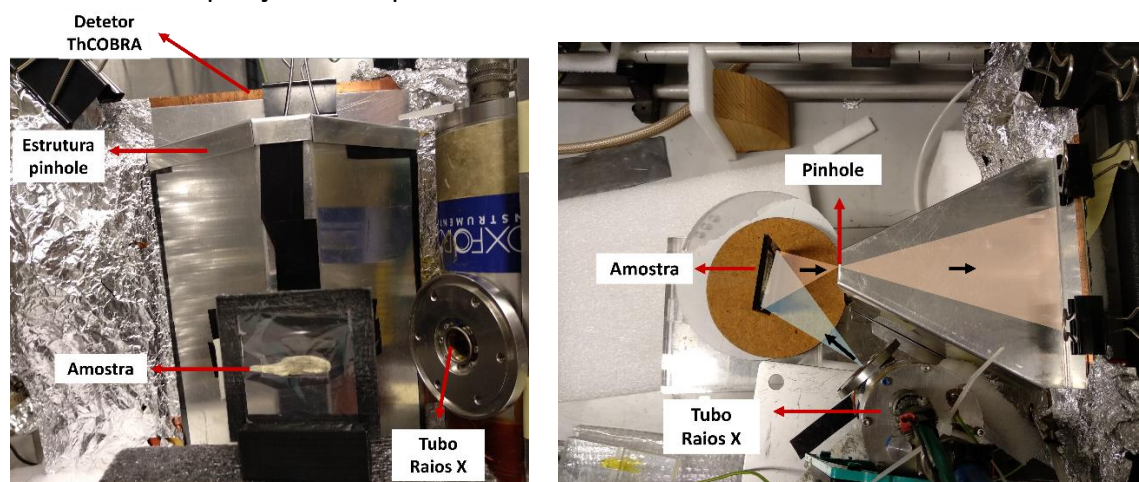


Figura 19 – Montagem experimental do Sistema iFlux. Esquerda: vista de frente; Direita: vista de cima.

Tabela 3 – Parâmetros de aquisição do teste preliminar: tensão (V) e intensidade (I) do tubo de raios-X; tempo de aquisição (t_a); ampliação da amostra (A); diâmetro do pinhole (d).

	V (V)	I (μ A)	t_a (min)	A	d (μ m)
Se	40	336	105	5,2	500
Pb	45	362	90	6	500
Ni	45	455	90	6	500
Mn	45	450	120	6	500
Controlo	45	600	85	4,8	500

Tabela 4 – Parâmetros de aquisição do teste crônico: tensão (V) e intensidade (I) do tubo de raios-X; tempo de aquisição (t_a); ampliação da amostra (A); diâmetro do pinhole (d).

	V (V)	I (μ A)	t_a (min)	A	d (μ m)
2ª amostragem	50	981	50	6	500
Controlo 2	45	550	120	4	500

Para processamento da imagem e visualização dos resultados deste sistema de imagiologia por EDXRF, foi utilizado o software fluoRADIX (desenvolvido em Matlab® pelo grupo DRIM do Departamento de Física da Universidade de Aveiro). O software permite

visualizar o espectro de fluorescência associado à amostra (retângulo azul na Figura 20); observar a imagem crua da amostra, isto é, a imagem que representa a distribuição de intensidades da radiação no plano do detetor, sem discriminar energias, i.e., todos os fótons incidentes no detetor estão representados nesta imagem (quadrado verde na Figura 20); selecionar uma determinada região de interesse (ROI, do inglês Region Of Interest) de energia no espectro e representar a imagem correspondente da amostra considerando apenas os fótons com energia dentro dessa ROI, de modo a obter a imagem da distribuição espacial individual dos elementos na amostra (retângulo vermelho na Figura 20).

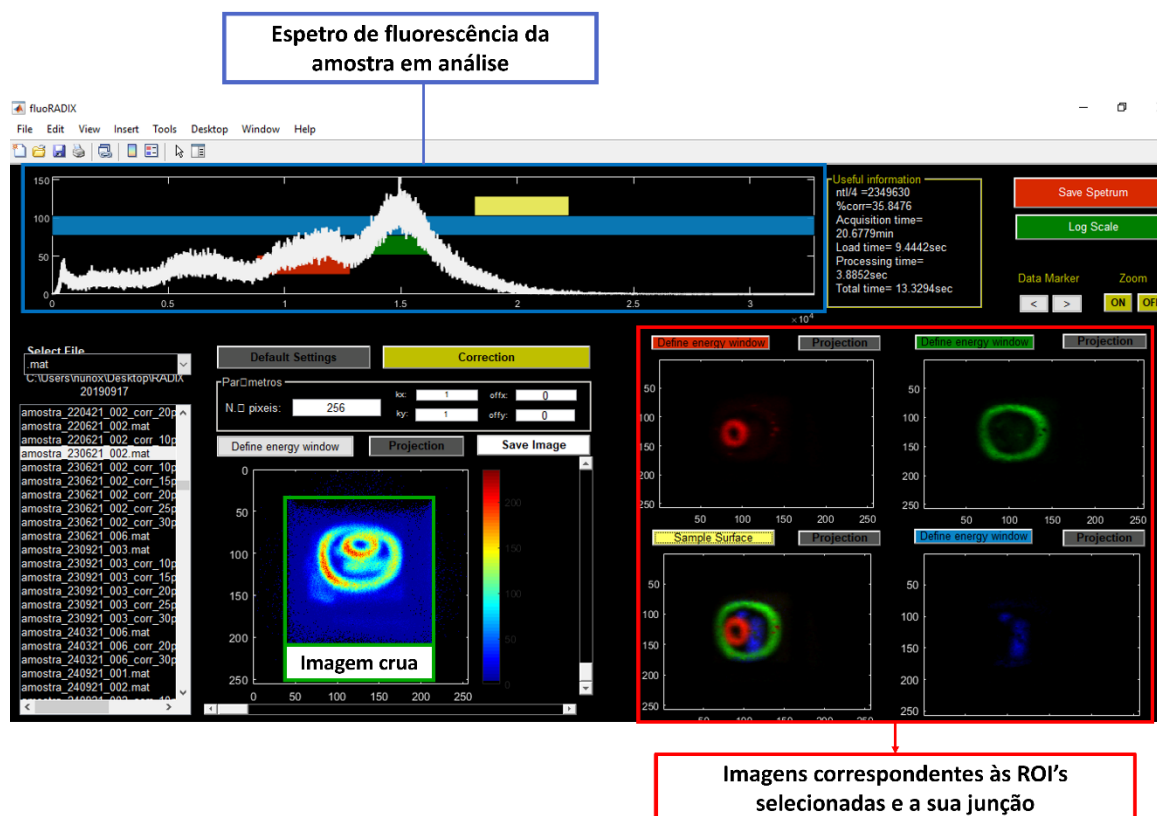


Figura 20 – Imagem da interface gráfica do Software fluoRADIX.

M4 TORNADO

A utilização de um espectrómetro μ -EDXRF comercial serve como forma de validação/comparação dos resultados obtidos com o sistema experimental iFlux. Utilizou-se o sistema M4 TORNADO (Bruker®, Alemanha), do laboratório de Física Atômica da Universidade NOVA de Lisboa.

As análises elementais dos peixes Zebra ocorreram a vácuo (20 mbar); o tamanho do pixel foi definido em 35 μ m, sendo irradiado cada pixel durante 10 ms; o tubo raio X foi operado a 50 kV e 399 μ A; foi utilizada uma combinação de filtros de 100 μ m Al/50 μ m Ti/25 μ m Cu. Como neste sistema a amostra é irradiada ponto a ponto, tem-se informação do espectro de energia a cada 35 μ m. Os parâmetros de aquisição são apresentados na Tabela 5, tendo sido aplicados em todas as análises.

Tabela 5 - Parâmetros de aquisição: tensão (V) e intensidade (I) do tubo de raios-X; tempo de aquisição (t_a), por peixe; filtro utilizado.

V (V)	I (μ A)	t_a (min)	Filtro
50	399	≈ 80	100 μ m Al/50 μ m Ti/25 μ m Cu

3 Aquisição Imagem Morfológica

Foram adquiridas imagens anatômicas dos vários peixes Zebra para posteriormente fundir as mesmas com as imagens da distribuição elemental obtidas por fluorescência de raios X. Assim foi possível avaliar/determinar de forma mais precisa a região de acumulação preferencial dos metais estudados.

As imagens morfológicas dos peixes zebra foram adquiridas com um sistema de radiografia digital, composto por um tubo de raios X (*Castellini Victory X 50*), usado habitualmente nas clínicas médico-dentárias, e um detetor de imagem de raios X baseado na tecnologia CMOS, da *Hamamatsu*[®](S11685-12). Os raios X emitidos pelo tubo interagem com o objeto e apenas os que são transmitidos pelo mesmo chegam ao detetor de raios X.

A formação de imagem baseia-se na diferente atenuação da radiação por parte do objeto a ser analisado, sendo criado um contraste devido às diferentes intensidades da radiação que chega ao recetor de imagem. Materiais mais densos ou com maior espessura absorvem mais a radiação, logo a intensidade da radiação que chega ao recetor é menor, enquanto materiais menos densos e de menor espessura fazem com que chegue radiação mais intensa ao recetor devido à menor absorção da radiação.

Existem alguns fatores que influenciam a formação de imagem, sendo os principais a corrente e tensão aplicadas, e o tempo de exposição. No entanto, fatores secundários também influenciam a formação de imagem, como por exemplo, o tamanho do ponto focal, a distância entre a fonte de radiação e o recetor de imagem, SID (*source-to-image receptor distance*), que afeta a quantidade de radiação que chega ao objeto e ao recetor de imagem ou a distância entre o objeto e o recetor de imagem, OID (*object-to-image receptor distance*). Estas distâncias estão diretamente relacionadas com a ampliação da imagem (MF – *magnification factor*) através da seguinte equação:

$$MF = \frac{SID}{SOD} \quad \text{Equação 3}$$

SOD (*source-to-object distance*) é a distância da fonte de radiação ao objeto e é expressa por:

$$SOD = SID - OID \quad \text{Equação 4}$$

Na Figura 21, está representada a influência das distâncias na formação de imagem.

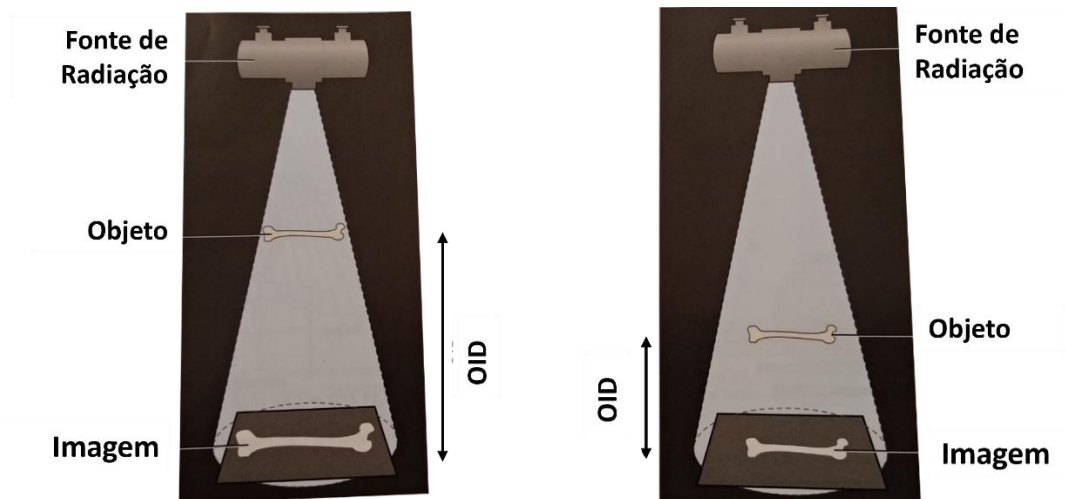


Figura 21 – OID e Ampliação. Um maior OID cria uma maior ampliação do que uma menor OID. A imagem à esquerda é maior do que a da direita porque o objeto está mais afastado do recetor de imagem. Adaptado de [55].

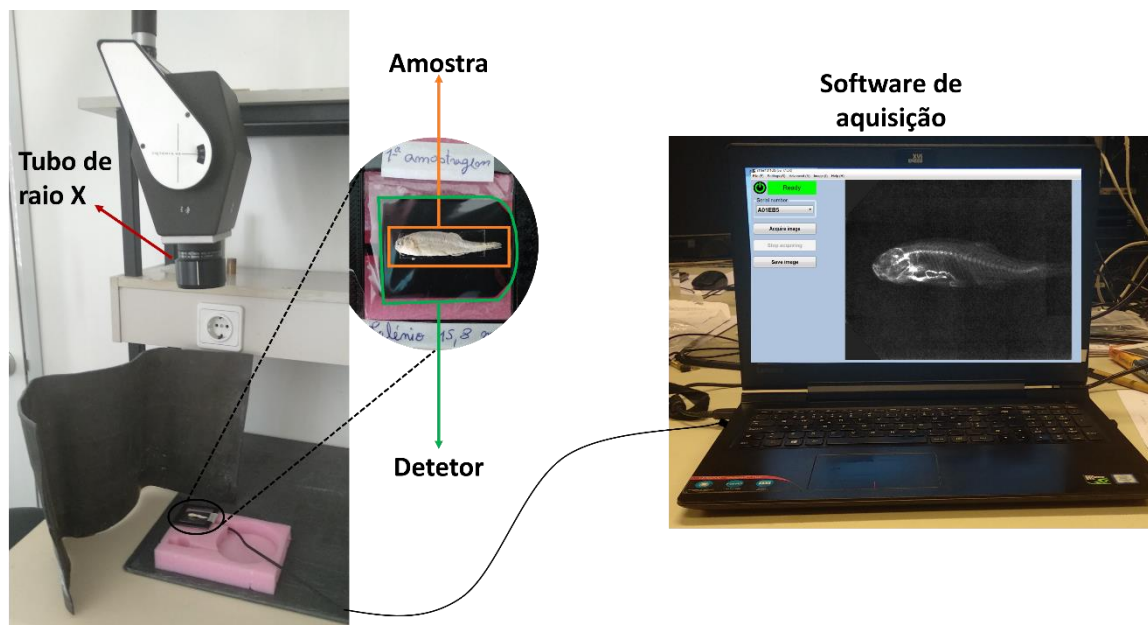


Figura 22 – Montagem experimental para aquisição da imagem morfológica do peixe Zebra.

Para todas as imagens adquiridas, o detector estava a uma distância de cerca de 48 cm do ponto focal do tubo e tinha um tempo de exposição de 1 ms.

4 Processamento de imagem

As imagens de fluorescência visualizadas pelo fluoRADIX apresentam muitas vezes algum ruído de fundo (não correspondendo a fótons da fluorescência do objeto a ser analisado, ou não esperados na ROI selecionada). É também notória a sua pixelização, muitas vezes devida à baixa estatística da imagem. Para ultrapassar estas limitações criou-se um algoritmo de pós-processamento de imagem, em Matlab®, com o objetivo de remover o ruído de fundo das imagens e suavizar a pixelização. Na Figura 23, é apresentado um esquema do processamento de imagem aplicado. No exemplo apresentado, observa-

se, na imagem original, o ruído de fundo que não corresponde à ROI selecionada. Ao aplicar o algoritmo foi possível remover o fundo, como representado na imagem reconstruída, passo 5.

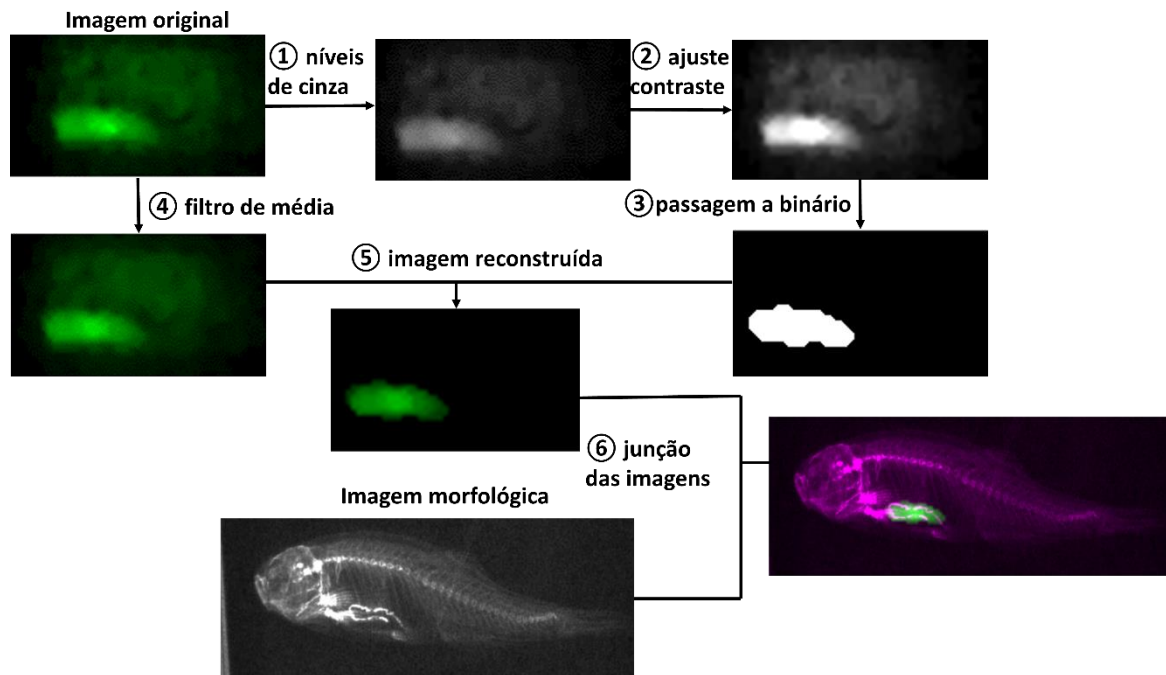


Figura 23 – Esquema exemplificativo dos processos realizados para o tratamento de imagem.

O algoritmo desenvolvido segue os seguintes passos:

- 1- Conversão da imagem original para uma imagem em escala de cinzentos;
- 2- Aplicação de um ajuste de contraste para evidenciar zonas com pixéis mais intensos, que corresponderá à zona de interesse;
- 3- Conversão para binário (passagem da imagem em escala de cinza para preto e branco, isto é, é criada uma matriz de pixéis de valor igual a 1 na zona de interesse e a 0 na zona envolvente), criando-se uma máscara;
- 4- Aplicação de um filtro de média na imagem original, de forma a suavizar e diminuir a pixelização;
- 5- Reconstrução da imagem sem ruído, multiplicando a máscara pela imagem original filtrada.
- 6- Fusão da imagem morfológica com a imagem da distribuição elemental do metal em análise, utilizando uma função pré-definida e sendo os tamanhos das imagens ajustados previamente.

6 Avaliação preliminar da distribuição de metais pesados nos peixes Zebra

De forma a avaliar a performance global e capacidade dos vários sistemas de aquisição para detetar as energias características dos metais pesados utilizados, bem como estabelecer os parâmetros de aquisição ótimos dos mesmos, nomeadamente, o tempo de aquisição, posicionamento das amostras, ou tensão e corrente do tubo raio X, realizou-se um estudo preliminar agudo, no qual, peixes zebra, foram expostos a uma concentração relativamente elevada de diferentes metais pesados. Este estudo permitiu também avaliar a eficácia da acumulação dos mesmos metais nos peixes Zebra para diferentes concentrações e tempos de exposição e identificar os locais de maior acumulação desses mesmos metais no peixe, de uma forma preliminar.

Assim, neste capítulo, serão apresentados e discutidos os resultados obtidos no teste preliminar com a técnica de fluorescência de raios X. Como já mencionado no capítulo 5, para avaliação da identificação e distribuição dos diferentes elementos presentes no peixe Zebra, foram realizados estudos com recurso a um detetor de Si(PIN) e um detetor gasoso baseado numa estrutura Thick COBRA. Para além disso, foram feitas aquisições das imagens morfológicas para melhor identificar o local de acumulação dos metais pesados testados. Os resultados obtidos com os detetores foram posteriormente validados com um espectrómetro comercial μ -EDXRF, o M4 TORNADO (Bruker, Alemanha).

No teste preliminar foram utilizados 4 metais pesados: Se, Pb, Ni e Mn (conforme descrito com maior detalhe no capítulo 5 – desenho experimental do teste preliminar). Apresentam-se neste capítulo os resultados das análises a peixes expostos a 82 mg/L de manganês durante 12 dias; a 15,8 mg/L de selénio durante 5 dias; a 3 mg/L de chumbo durante 10 dias; e a 6,8 mg/L de níquel durante 5 dias.

De modo geral, verificou-se que, em todos os peixes analisados com o espectrómetro de EDXRF, que o cálcio (Ca) é o elemento com maior intensidade. Também o zinco (Zn) foi identificado em todos os peixes Zebra analisados. Os mesmos resultados foram obtidos com o sistema iFlux e o M4 TORNADO.

Nas imagens de distribuição elemental, verificou-se que o Ca está espalhado uniformemente por todo o peixe, devido à sua presença no esqueleto ósseo e barbatanas; e ainda que o Zn se encontra em maior concentração no olho. Para além disso, detetou-se uma acumulação predominante dos metais pesados na zona visceral (i.e., sistema gastrointestinal e rins).

Manganês

Entre as 3 amostragens o peixe exposto durante 12 dias foi o que apresentou uma acumulação mais evidente. Apesar de ao fim de 5 dias já se verificar alguma acumulação, esta não é tão evidente como ao fim dos 12 dias. Por isso, optou-se por apresentar uma análise mais detalhada desta amostragem.

Na Figura 24 está representado o espectro obtido com o detetor de Si(PIN), onde é bastante visível o pico correspondente à energia de fluorescência das transições K do manganês (5,90 keV para a linha $K\alpha$ e 6,49 keV para a $K\beta$), o que revela a acumulação deste metal no peixe. O espectro obtido com o sistema M4 TORNADO confirma a acumulação com o seu pico a sobressair no espectro da Figura 27.

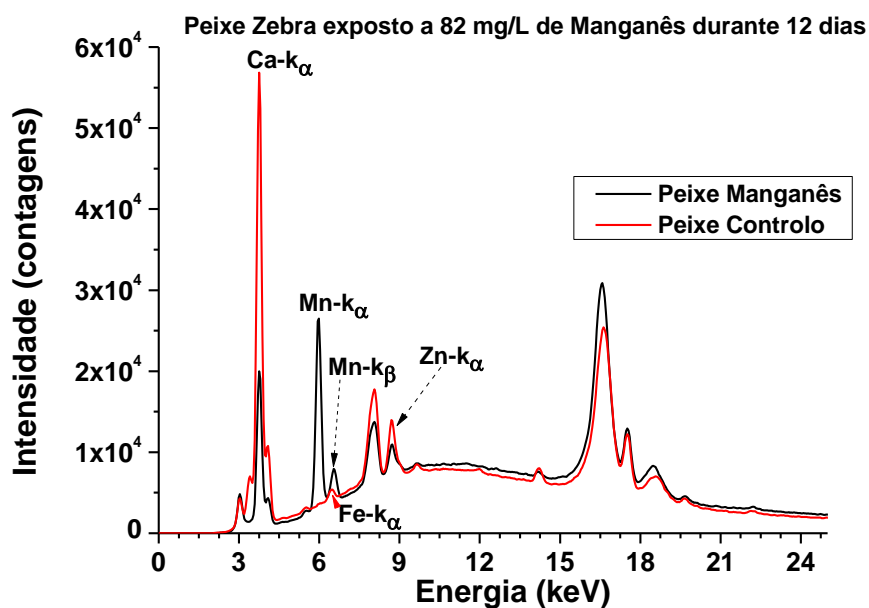


Figura 24 - Espectro de fluorescência obtido com o detetor Si(PIN) do peixe exposto a manganês.

Após a confirmação da presença deste metal com o detetor de Si(PIN), procedeu-se à análise do peixe com o sistema iFlux, para mapeamento da distribuição dos elementos identificados. Na Figura 25 estão representadas as distribuições espaciais individuais do cálcio, manganês e zinco na amostra e as distribuições elementais conjuntas do cálcio com o manganês e do cálcio com o zinco. Verifica-se que a distribuição do cálcio é mais ou menos uniforme no corpo do peixe, enquanto o manganês se concentrou mais numa pequena área da zona visceral. O zinco apresentou maior acumulação na zona ocular do animal. Também na Figura 25, é apresentada a imagem crua que representa a distribuição de intensidades da radiação no plano do detetor. Verificou-se que a zona da cabeça está mais intensa o que justifica a maior intensidade de vermelho na distribuição do cálcio nessa zona.

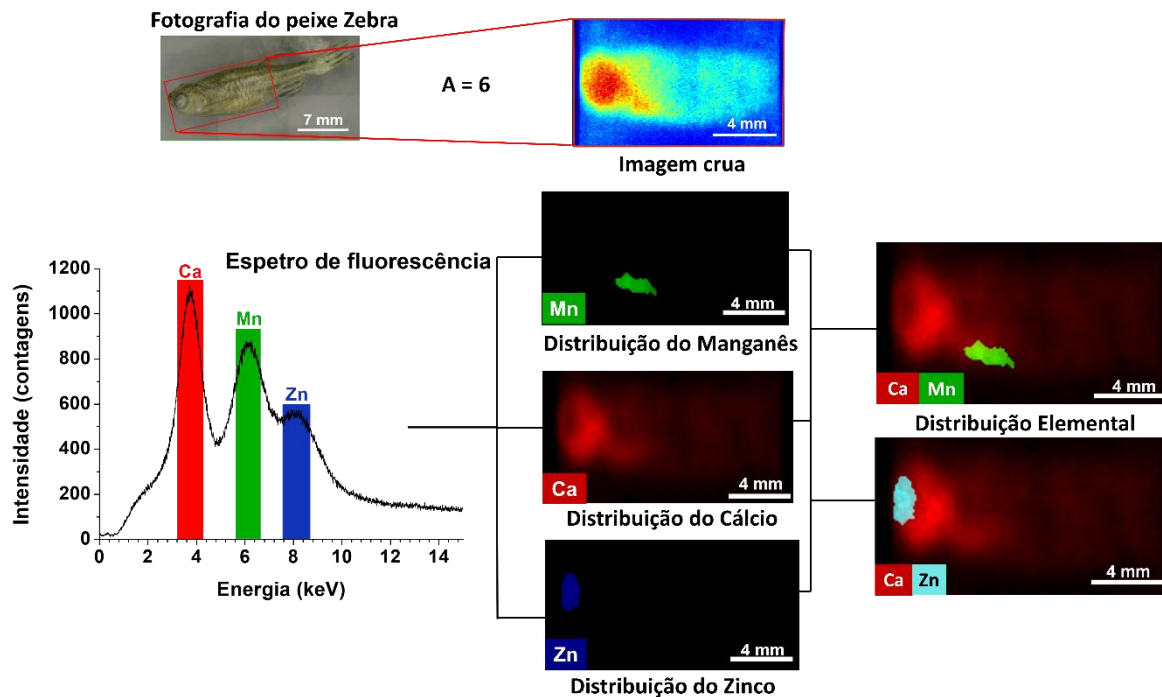


Figura 25 - Espectro de fluorescência e distribuição elemental do peixe Zebra obtido com o sistema iFlux. A vermelho está representado o cálcio, a verde o manganês e a azul o zinco.

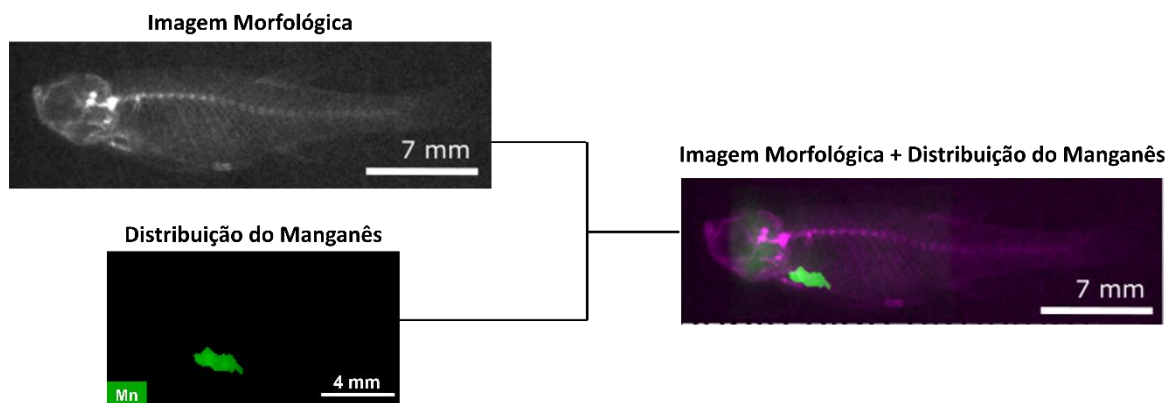


Figura 26 - Junção da imagem morfológica com a imagem da distribuição elemental do manganês.

Na Figura 26 está representada a fusão da imagem morfológica com a imagem da distribuição do manganês, onde é possível visualizar o local de acumulação do metal. Neste caso, verifica-se que a acumulação ocorre na zona visceral, próximo da cabeça.

Na Figura 27 são apresentadas as imagens obtidas com o sistema de validação. Nestas imagens é comprovada a distribuição do cálcio ao longo de todo o peixe e a preferência de acumulação do zinco no olho, mas também ao longo das riscas do peixe Zebra, como está reportado em [42]. Quanto à acumulação do manganês, é validada a sua acumulação preferencial na zona visceral junto do opérculo/brânquias, porém observa-se uma distribuição do metal por todo o peixe. Tanto a distribuição do zinco como do manganês pelo corpo do peixe apresentam uma intensidade muito mais baixa, o que dificultou a sua deteção no sistema iFlux e no algoritmo de processamento de imagem, que levou à sua ausência nas imagens de distribuição da Figura 25.

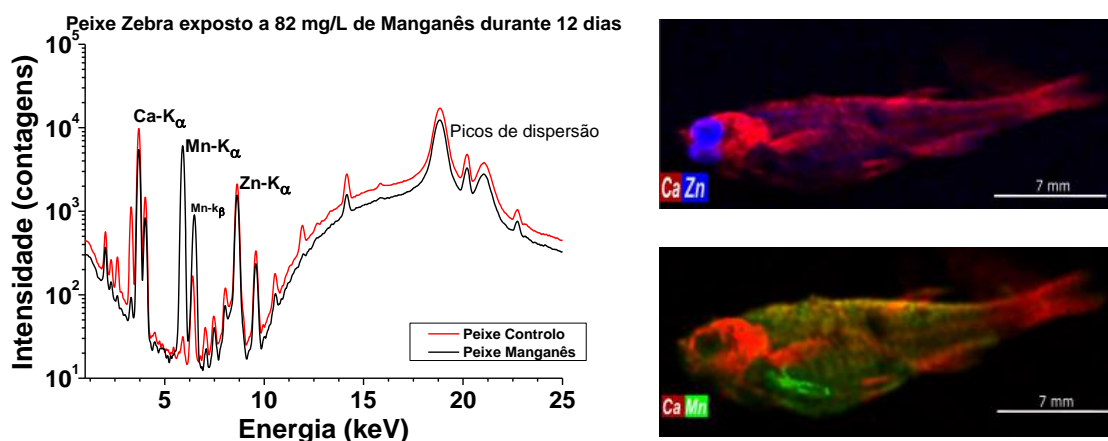


Figura 27 – Resultados do Sistema M4 TORNADO. Direita: Espectro de fluorescência de raios X; Esquerda: mapeamentos elementais do cálcio (vermelho), zinco (azul) e manganês (verde).

Selênio

No caso do selênio, verificou-se aquando da preparação das soluções, uma dificuldade na dissolução do metal. Logo no início do teste, foi visível a precipitação do selênio no fundo do aquário o que proporcionou a ingestão de pequenas partículas pelos peixes Zebra. Apesar do teste ter a duração de 12 dias, a acumulação do selênio foi logo bastante visível ao fim de 5 dias, como mostrado de seguida.

Na análise elemental do peixe zebra com o detetor de Si(PIN) destacou-se a presença dos picos característicos das transições K do selênio (11,22 keV para a linha $K\alpha$ e 12,49 keV para a $K\beta$), contrariamente ao peixe controlo, como se observa na Figura 28. No espectro obtido com o sistema iFlux, na Figura 29, não se destaca nenhum pico correspondente à energia de fluorescência deste metal: No entanto, se se seleccionar a gama de energias correspondente, verifica-se a acumulação do metal na zona da barriga do peixe. Também na imagem crua é visível uma maior intensidade nessa área.

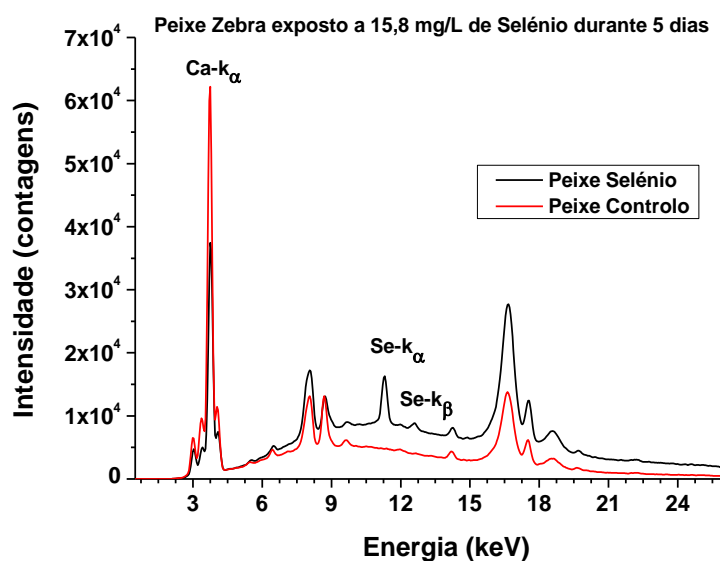


Figura 28 - Espectro de fluorescência obtido com o detetor Si(PIN) do peixe exposto a selênio.

Analisando a imagem morfológica, na Figura 29, verificou-se um resultado interessante. É claramente observável uma região de alta densidade (realçada pelo círculo vermelho) que se refere a uma elevada acumulação na zona visceral. Isto deve-se ao facto do selénio não se ter dissolvido totalmente na água, o que pode significar que o peixe ingeriu pequenas partículas metálicas que se acumularam na zona intestinal, as quais não foram excretadas durante o período de exposição.

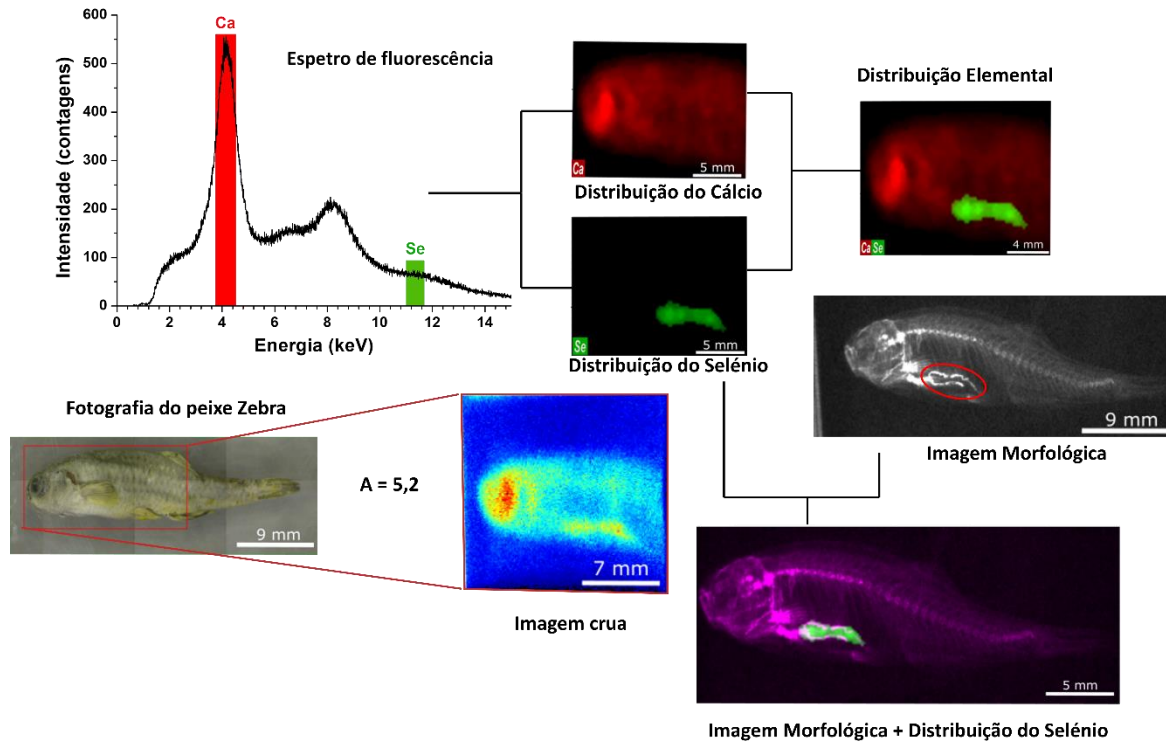


Figura 29 - Espetro de fluorescência, distribuição elemental do peixe Zebra obtido com o sistema iFlux e posterior fusão com a imagem morfológica. A vermelho está representado o cálcio, a verde o selénio.

A imagem adquirida com o M4 TORNADO, Figura 30, confirma a preferência de acumulação do selénio na zona visceral, validando os resultados obtidos com o sistema iFlux. No espectro de fluorescência é bastante visível a presença do selénio, tendo o seu pico uma intensidade semelhante à do cálcio, o que não se verificou com o detetor de Si(PIN). Isto pode dever-se ao facto da excitação da amostra ponto a ponto, conseguida com o M4 TORNADO, proporcionar uma maior eficiência de excitação do que a excitação de toda a amostra, método utilizado pelo Si(PIN); e também devido à diferente geometria de posicionamento dos sistemas.

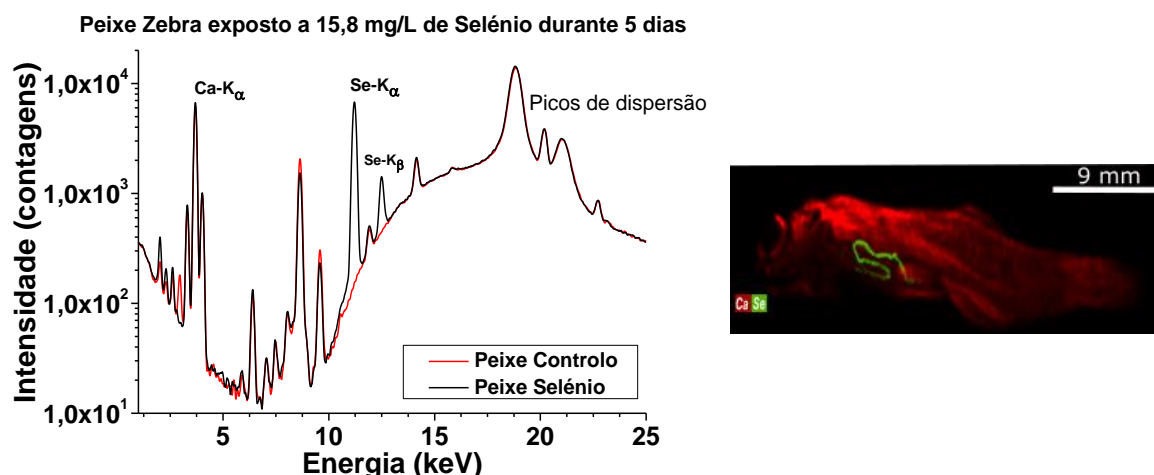


Figura 30 - Sistema M4 TORNADO. Esquerda: Espectro de fluorescência de raios X; Direita: mapeamentos elementais do cálcio (vermelho) e selénio (verde).

Chumbo

Para o peixe exposto a chumbo, verificou-se uma distribuição elemental semelhante nas 3 amostragens. Portanto, realizou-se uma análise mais detalhada num ponto intermédio, exposição durante 10 dias.

Na Figura 31, apresenta-se o espectro de fluorescência de um peixe zebra exposto a chumbo, obtido com o detetor de Si(PIN). Em comparação com o controlo, é visível a existência de dois picos, de baixa intensidade, correspondente às energias das transições L do chumbo (10,55 keV para a linha L α e 12,61 keV para a L β). Apesar da baixa intensidade dos picos, foi possível mapear a distribuição elemental do chumbo com o sistema iFlux, como demonstrado na Figura 32. Através da fusão da imagem de distribuição do chumbo no peixe com a imagem morfológica, verificou-se a acumulação deste metal na área visceral. São também apresentadas a imagem crua e o mapa de distribuição do cálcio, onde é notória a reduzida acumulação de Ca na zona do opérculo, como expectável. A capacidade de observação desta falta de cálcio nesta zona é um indicador da boa ou má resolução em posição do detetor.

Na Figura 33 apresentam-se a imagem do mapeamento e o espectro de fluorescência, obtidos com o M4 TORNADO. Estes resultados confirmam a acumulação de chumbo no peixe zebra.

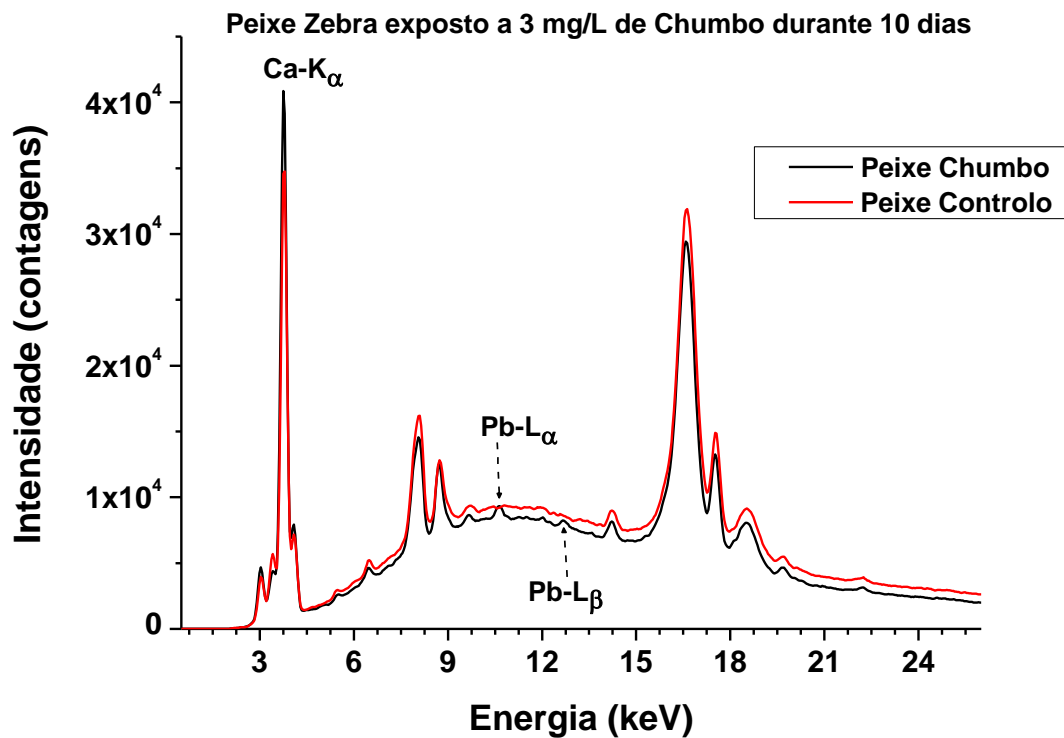


Figura 31 - Espectro de fluorescência obtido com o detector Si(PIN) do peixe exposto a chumbo.

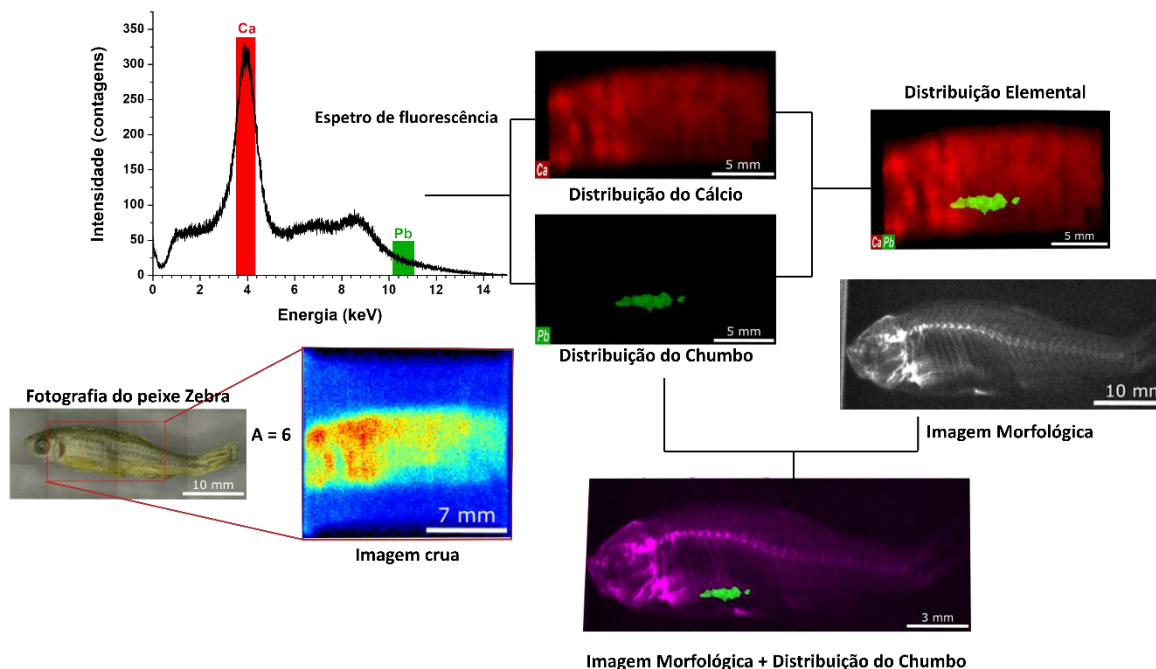


Figura 32 - Espectro de fluorescência, distribuição elemental do peixe Zebra obtido com o sistema iFlux e posterior fusão com a imagem morfológica. A vermelho está representado o cálcio, a verde o chumbo.

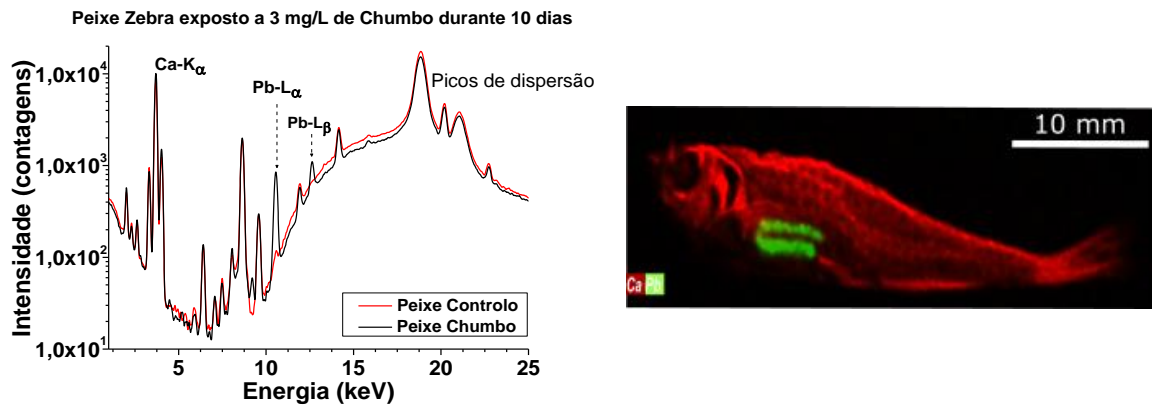


Figura 33 - Sistema M4 TORNADO. Esquerda: Espectro de fluorescência de raios X; Direita: mapeamentos elementais do cálcio (vermelho) e chumbo (verde).

Níquel

Os peixes Zebra expostos a níquel durante 5 dias apresentaram uma preferência de acumulação enquanto ao fim de 10 dias isso não se verificou. Devido à morte de um dos peixes não se conseguiu uma amostra para análise para o tempo de exposição mais longo.

Os resultados da análise do peixe Zebra exposto a níquel apresentam-se nas Figura 34 e Figura 35. No espectro de fluorescência obtido com o detetor Si(PIN), Figura 34, verifica-se que o pico correspondente à energia de fluorescência da transição $K\alpha$ do níquel (7,478 keV) é muito pouco intenso. Associado ao facto da pequena intensidade relativa do metal e da energia de fluorescência ser muito próxima da do zinco (8,638 keV para a linha $K\alpha$), o sistema iFlux não tem resolução em energia suficiente para separar estes dois elementos, pelo que quando se analisou este peixe, não foi possível mapear corretamente o metal. No entanto, com o sistema M4 TORNADO, verificou-se acumulação de níquel na zona visceral (Figura 35).

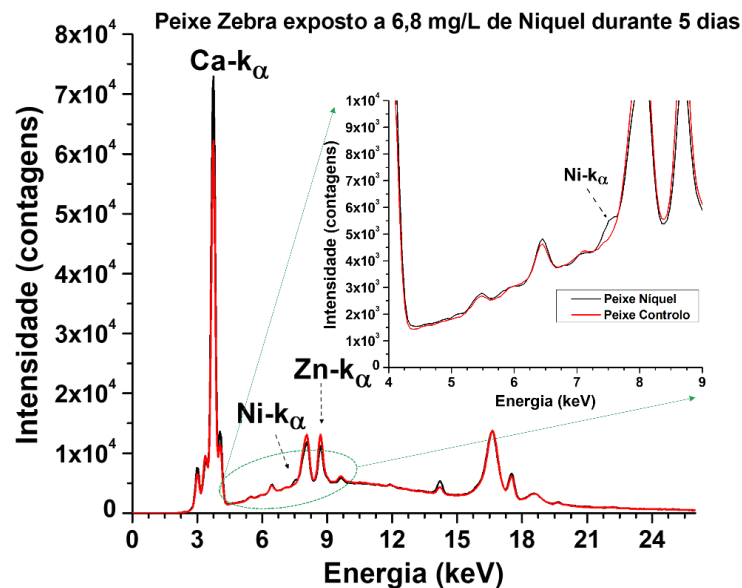


Figura 34 - Espectro de fluorescência obtido com o detetor Si(PIN) do peixe exposto a níquel.

Peixe Zebra exposto a 6,8 mg/L de Níquel durante 5 dias

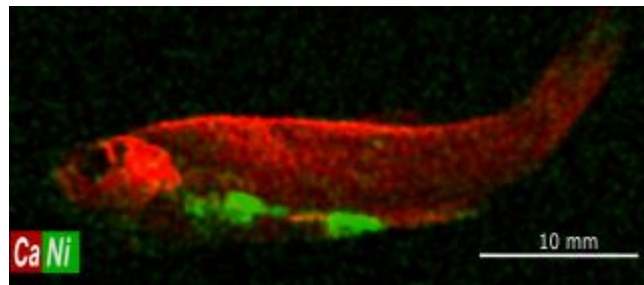
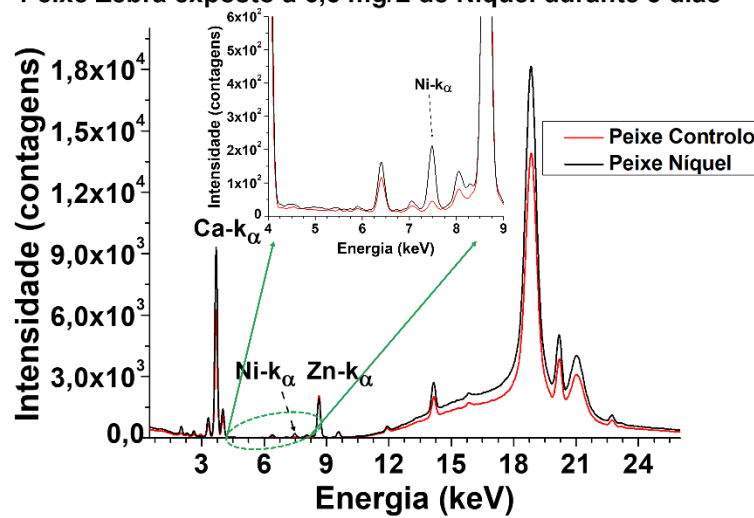


Figura 35 - Sistema M4 TORNADO. Em cima: Espectro de fluorescência de raios X; Em baixo: mapeamentos elementais do cálcio (vermelho) e níquel (verde).

Controlo

No peixe Zebra pertencente ao grupo controlo, verificamos novamente no espectro de fluorescência da Figura 36 a maior intensidade dos elementos cálcio e zinco; tal como nos peixes expostos, a distribuição do zinco é observada no olho. Da seleção de gamas de energias correspondentes aos metais analisados não foi encontrada nenhuma acumulação, tanto nas aquisições com o detetor de Si(PIN), com o sistema iFlux ou com o TORNADO, como esperado.

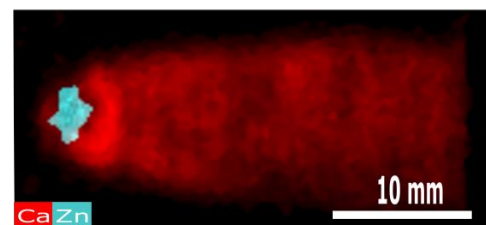
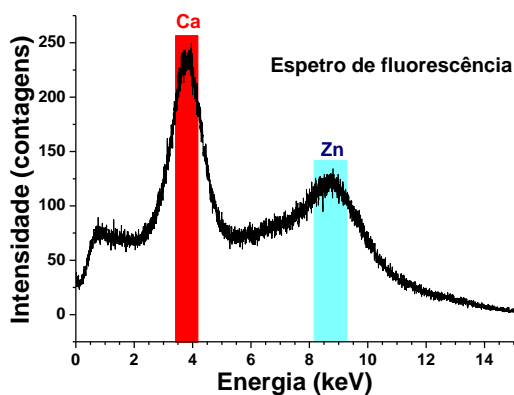


Figura 36 –Esquerda: Espectro de fluorescência; Direita: Distribuição elemental do peixe Zebra obtida com o sistema iFlux. A vermelho o cálcio e a azul o zinco.

Com o estudo preliminar foi possível testar diferentes metais e observar a sua acumulação no peixe Zebra ao longo de 12 dias. Conseguiu-se ainda avaliar a capacidade do sistema iFlux para detetar os metais e verificar em que zonas do peixe ocorreu a sua acumulação. Verificou-se que todos os peixes analisados apresentaram uma acumulação na zona visceral, justificada pela função de desintoxicação e excreção de xenobióticos (os metais) dos órgãos constituintes.

Mostrou-se assim a aplicabilidade do sistema na identificação e mapeamento da distribuição elemental de todos os metais em estudo, exceto o níquel.

O espectrómetro de EDXRF com um detetador de Si(PIN) foi adequado para a identificação dos elementos presentes nos peixes, tendo sido detetados todos os metais estudados, mesmo quando em quantidades reduzidas, como se comprovou no caso do níquel.

O espectrómetro M4 TORNADO permitiu validar os resultados obtidos, corroborando as conclusões retiradas das aquisições dos outros dois sistemas, especialmente no que diz respeito à zona anatómica de acumulação dos metais. Além disso, permitiu identificar inequivocamente os elementos presentes nos peixes e a sua distribuição. No caso do zinco, verificou-se a sua presença não só no olho, como observado com o sistema iFluX, mas também ao longo das riscas.

O teste preliminar permitiu definir o metal a utilizar na continuação deste trabalho: um estudo crónico que i) avalia a capacidade do peixe Zebra em acumular e de seguida excretar o metal, e ii) avaliar possíveis alterações no comportamento do peixe. Dos 4 metais estudados, verificou-se que o níquel não poderia ser escolhido, uma vez que a sua acumulação foi muito reduzida e o sistema experimental não o conseguiu identificar; o selénio foi excluído devido à sua precipitação que levou a uma consequente ingestão de pequenas partículas, inviabilizando o estudo, pois um peixe poderia ingerir mais partículas que outro, refletindo-se numa maior acumulação quando expostos à mesma concentração do metal.

Foi então selecionado o chumbo para o estudo crónico, visto que este é um metal perigoso para a saúde humana, com elevado nível de toxicidade, e de acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS), em 2019, foi responsável por cerca de 900 000 mortes [56]. Além disso existem diversos estudos sobre contaminação por chumbo, o que permite associar os resultados obtidos com os já existentes na literatura.

7 Estudo crónico da bioacumulação do Chumbo nos peixes Zebra

O estudo crónico teve como objetivo avaliar a capacidade do peixe Zebra para acumular e excretar o chumbo, ao longo do tempo e também estudar a influência do metal no comportamento do peixe. Dois conjuntos de peixes Zebra foram expostos, durante 30 dias, a duas concentrações de chumbo; e de seguida a 30 dias em água limpa, conforme descrito no desenho experimental apresentado no capítulo 5. Durante este período, foi avaliado o comportamento do peixe com recurso à Zebrabox em quatro pontos de amostragem: ao fim de 15, 30, 45 e 60 dias. Neste trabalho, foram analisados os dados correspondentes à 2ª e 4ª amostragens, que correspondem ao momento onde se esperava uma maior acumulação, devido ao maior tempo de exposição ao chumbo, e onde possivelmente se verificou excreção do metal.

Na Figura 37 apresentam-se os resultados obtidos para a 2ª amostragem. No gráfico 1 está representada a distância total percorrida para o ciclo de luz e escuro. No ciclo de luz, observamos uma diminuição da atividade locomotora com o aumento da concentração de chumbo. Já no ciclo de escuro, verifica-se também uma diminuição da distância percorrida relativamente ao controlo, mas quando comparadas as concentrações verifica-se um valor percorrido semelhante. Com a análise estatística não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas entre os peixes expostos a chumbo e o controlo, nem entre os peixes expostos a diferentes concentrações do metal. No gráfico 2 apresenta-se a análise do comportamento timotático do peixe. Verifica-se, em ambos os ciclos, que existe uma preferência de natação próxima das bordas do aquário devido à elevada percentagem de movimento registada nessa zona. Relativamente à análise estatística não se verificaram diferenças estatisticamente significativas em comparação com os controlos. Apenas no ciclo escuro se verificou a existência de diferenças significativas entre os peixes expostos a concentrações de 54,5 µg/L e 545 µg/L. Nos gráficos 3 e 4 são mostradas as percentagens das distâncias percorridas a velocidades média e rápida, respetivamente. Observa-se para os dois ciclos a predominância de movimentos rápidos. No ciclo escuro, com o aumento da concentração de chumbo diminuiu a distância percorrida a uma velocidade média, o que se traduz num aumento na distância percorrida a velocidade rápida. Novamente nenhum destes valores apresentou diferenças estatisticamente significativas. Nos gráficos 5 e 6 são apresentadas as percentagens dos movimentos correspondentes à classe de ângulos 4+5, que indicam movimentos sem grandes mudanças de direção, e à classe de ângulos 1+8, que indicam movimentos em zigzag, um possível indicador de stress. Tanto no ciclo de luz como no de escuro, verificaram-se valores similares para a classe 4+5, bem como a sua predominância em relação aos movimentos pertencentes à classe 1+8.

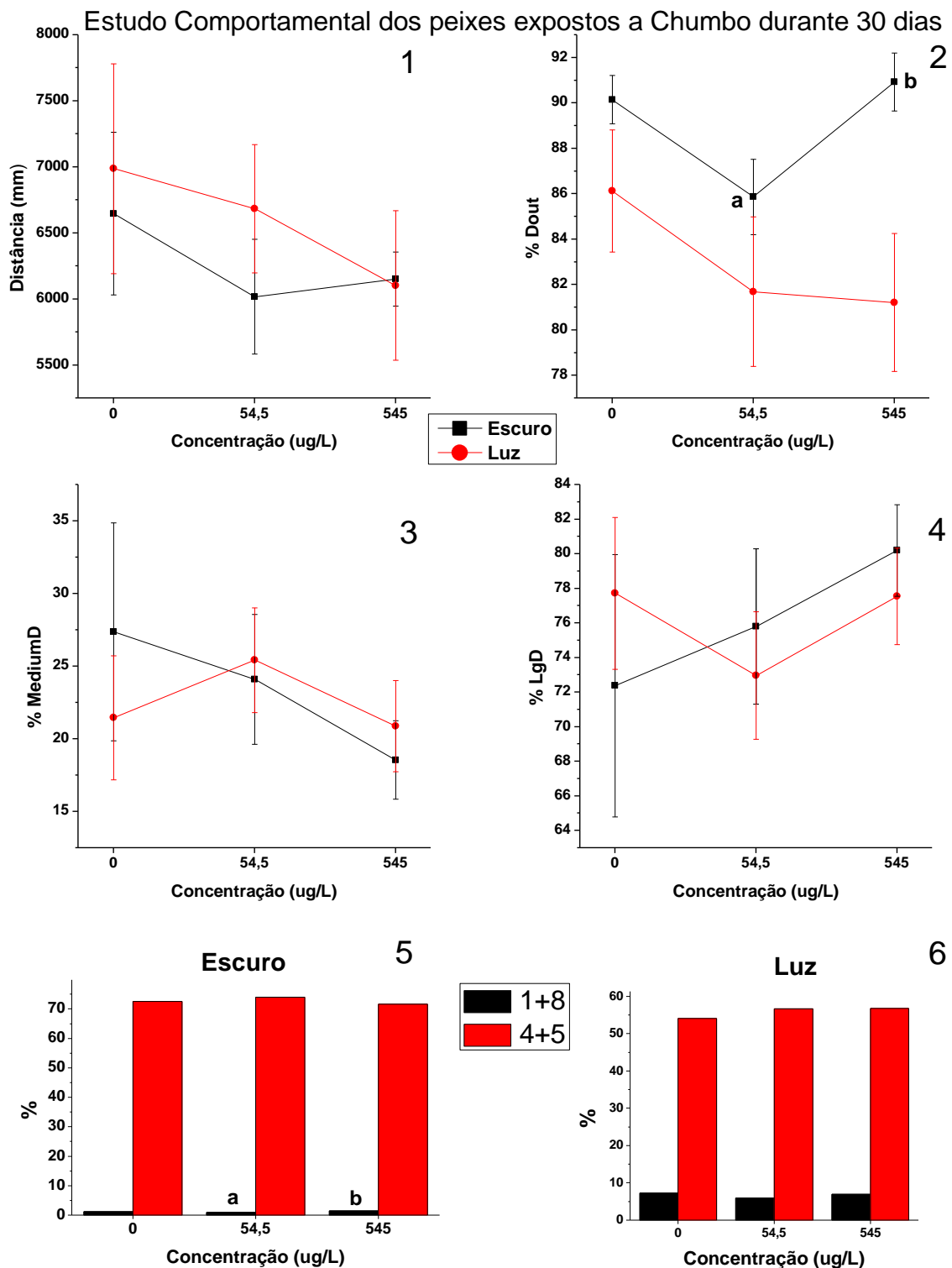


Figura 37 - Representação dos resultados obtidos da análise com a Zebabox após o peixe estar em contacto com o chumbo durante 30 dias (2ª amostragem). 1 – Distância total percorrida (mm) pelo peixe nos ciclos de luz e escuro; 2 - % da distância percorrida numa zona específica; 3 – % de distância percorrida a uma velocidade < 40 mm/s; 4 – % de distância percorrida a uma velocidade > 40 mm; 5 e 6 - % da frequência angular para o escuro e luz, respetivamente (a e b representam diferenças estatisticamente significativas entre as concentrações). As barras de erro representam o maior desvio à média para as respetivas concentrações.

Estudo Comportamental dos peixes expostos a Chumbo durante 30 dias e a Água Limpa durante 30 dias

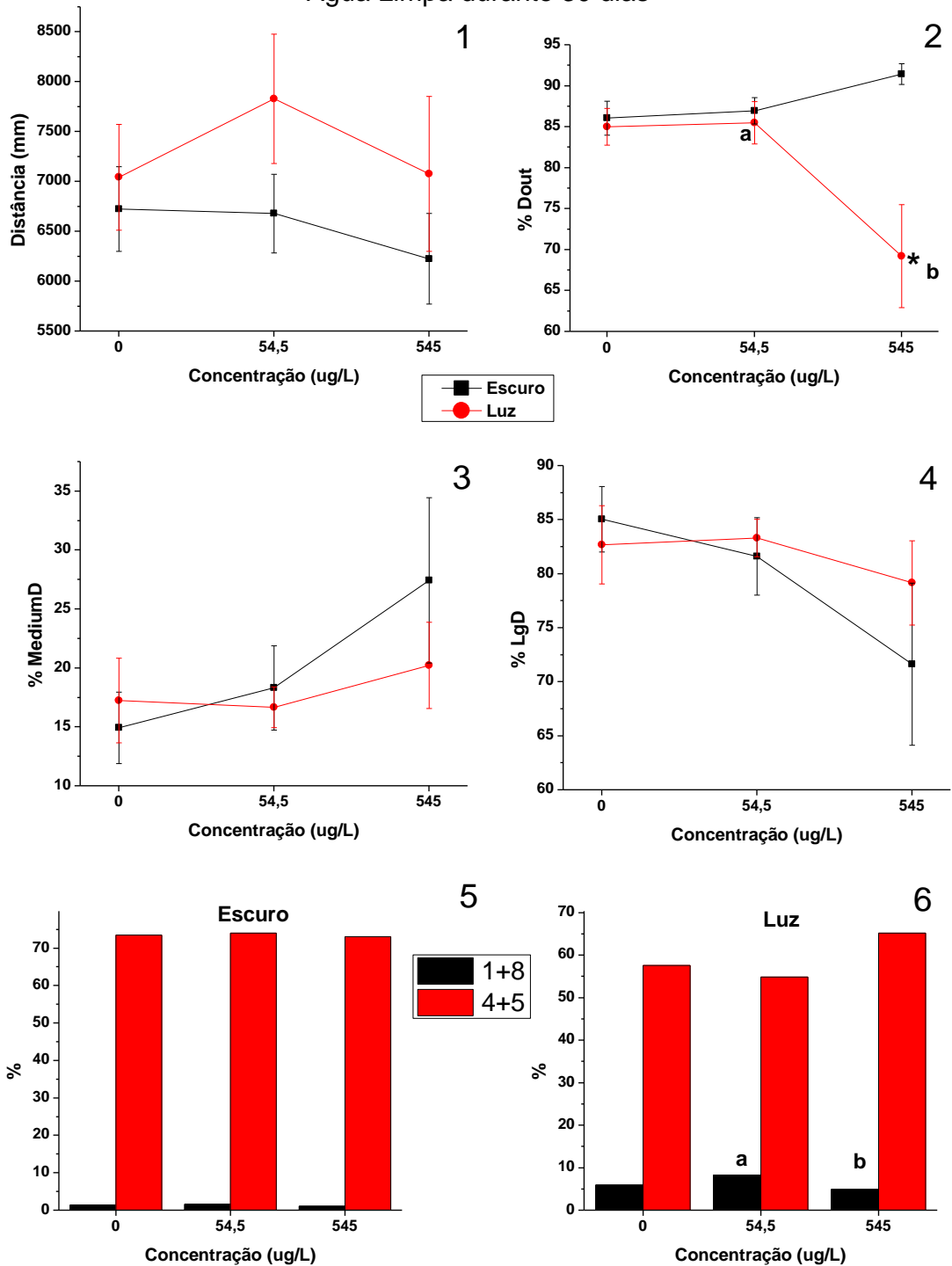


Figura 38 - Representação dos resultados obtidos da análise com a Zebrabox após o peixe estar em contacto com o chumbo durante 30 dias e água limpa durante 30 dias (4ª amostragem). 1 – Distância total percorrida (mm) pelo peixe nos ciclos de luz e escuro; 2 – % da distância percorrida numa zona específica; 3 – % de distância percorrida a uma velocidade < 40 mm/s; 4 – % de distância percorrida a uma velocidade > 40 mm; 5 e 6 - % da frequência angular para o escuro e luz, respetivamente (* representa diferenças estatisticamente significativas com o controlo; a e b representam diferenças estatisticamente significativas entre as concentrações). As barras de erro representam o maior desvio à média para as respetivas concentrações.

Na Figura 38 estão representados os resultados obtidos para a 4ª amostragem. No gráfico 1, observou-se que o grupo de peixes expostos a 54,5 µg/L apresentou a maior distância percorrida no ciclo de luz; e que o peixe controlo e os peixes expostos a 545 µg/L percorreram distâncias semelhantes. No ciclo escuro, observou-se que o aumento da concentração de chumbo levou a uma diminuição da distância, sendo mais acentuada para a concentração de 545 µg/L. No gráfico 2, continua a verificar-se a preferência do peixe em nadar próximo das bordas. No entanto, para o ciclo de luz, observaram-se diferenças estatisticamente significativas para os peixes expostos à concentração de 545 µg/L, sendo visível no gráfico a descida mais acentuada para esta percentagem. Este resultado contrasta com o ciclo de escuro, onde esta concentração apresentou a maior percentagem. Dos gráficos 3 e 4, continua a verificar-se a preferência por movimentos rápidos, mas no ciclo escuro, essa preferência diminuiu com o aumento da concentração. Os gráficos 5 e 6 apresentam o mesmo padrão da 2ª amostragem, ou seja, não existiram elevadas percentagens que indicassem movimentos de stress e a maioria dos movimentos correspondem a movimentos sem grandes mudanças de direção.

Na 2ª amostragem, verificou-se a redução da atividade locomotora na distância total percorrida com o aumento da concentração. Thi *et al.* também referem uma diminuição da distância total percorrida em todas as concentrações de PbCl₂ utilizadas no seu estudo em relação ao controlo, concluindo que a exposição crónica a baixas concentrações de chumbo poderia alterar o comportamento do peixe Zebra adulto [53]. Li *et al.* realizou também estudos comportamentais com peixes Zebra expostos a chumbo e observou o aumento da distância total percorrida com o aumento da concentração a que o peixe foi exposto [57].

No ano de 2012, Chen *et al.* [58] realizaram estudos comportamentais em larvas de peixe Zebra com acetato de chumbo. Verificou-se um aumento da velocidade de natação sob condições de escuro, o que vai ao encontro dos resultados obtidos (Figura 37, gráfico 3), uma vez que se observou para o período de escuro o aumento da distância percorrida por movimentos de velocidade elevada. Neste mesmo estudo, verificou-se o decréscimo da velocidade para as condições de luz com o aumento da concentração. No presente trabalho este comportamento apenas se verificou para a menor concentração de chumbo. No entanto, para a maior concentração utilizada, a velocidade voltou a aumentar, até valores comparáveis com os do nível de controlo.

Os resultados da 2ª amostragem indicam que o chumbo pode ter tido alguma influência no comportamento dos peixes, nomeadamente na distância percorrida, no entanto, estes efeitos não foram suficientemente pronunciados para a existência de diferenças estatisticamente significativas. Posto isto, não podemos concluir sobre uma possível recuperação na atividade locomotora dos peixes na 4ª amostragem.

Apesar dos resultados inconclusivos, a verificação da tendência da diminuição de distância percorrida poderá indicar uma depressão na função locomotora ou hipoatividade dos peixes; esta alteração na atividade locomotora pode ter consequências a nível populacional e em última instância do ecossistema pois pode condicionar importantes funções fisiológicas tais como a capacidade de fuga a predadores, o ritual de reprodução ou a capacidade de alimentação.

A ausência de diferenças estatisticamente significativas pode dever-se ao facto das concentrações utilizadas serem demasiado baixas para se verificar alterações neste

período de teste; o ciclo de aclimação na Zebrabox ser reduzido, isto é, aquando o início da estimulação do ciclo escuro/luz os peixes poderão ainda estar agitados com a mudança de aquário o que influencia os resultados obtidos; também as condições durante a exposição podem ter influenciado os resultados, uma vez que na sala de teste existia a entrada e saída de pessoas que pode ter stressado os peixes e ter escondido efeitos subtis do chumbo nestas concentrações; ainda os parâmetros analisados podem não ter sido os mais indicados. Para além disso, existe sempre a variabilidade dos dados, pois cada peixe pode reagir de forma diferente e não ser encontrado um padrão de efeitos.

Análise por fluorescência de raios X

Na Figura 39 está representado o espectro de fluorescência obtido com o detetor Si(PIN) para as análises dos 4 pontos de amostragem do estudo para os peixes expostos a 545 µg/L de chumbo. Os resultados apresentados permitem concluir que ao fim de 30 dias ocorreu acumulação de chumbo, sendo também visível a existência de alguma acumulação ao fim de 15 dias, destacando-se o pico característico da transição $L\alpha$ do chumbo (10,55 keV). Nas análises da 3ª e 4ª amostragens, correspondentes ao período em que o peixe esteve em contacto com água limpa, ao fim de 15 dias já não se verifica acumulação, que é posteriormente confirmada pela ausência de acumulação ao fim de 30 dias em água limpa. Estes resultados são confirmados pelas imagens da distribuição elemental obtidas com o M4 TORNADO, na Figura 40. É visível na imagem da distribuição elemental do peixe da 2ª amostragem a acumulação do chumbo na zona visceral (tal como no teste preliminar); na imagem da distribuição elemental do peixe da 4ª amostragem não se identifica qualquer região de acumulação de chumbo.

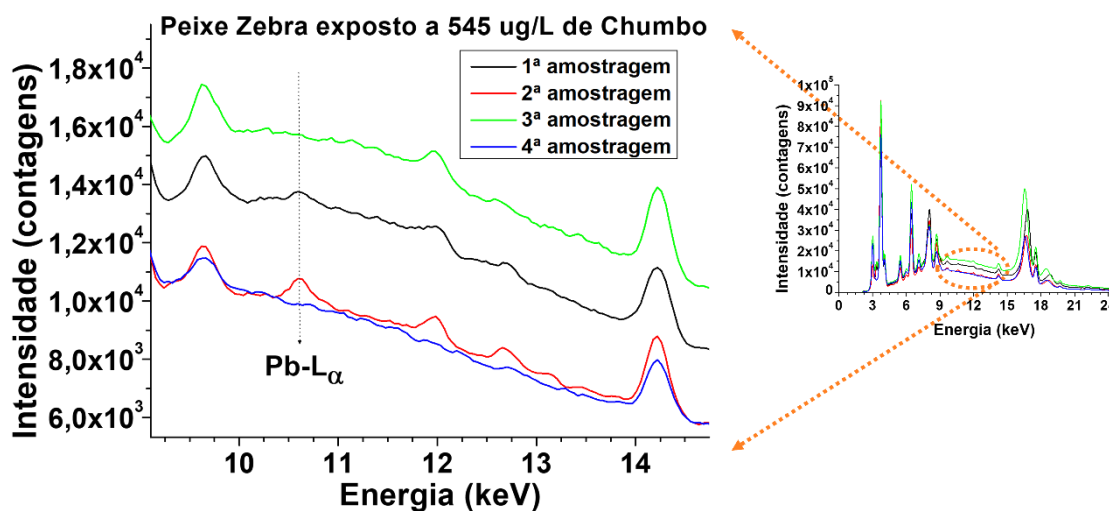


Figura 39 - Espectro de fluorescência, obtido com o detetor Si(PIN), dos peixes expostos a 545 µg/L de chumbo nas diferentes amostragens do estudo.

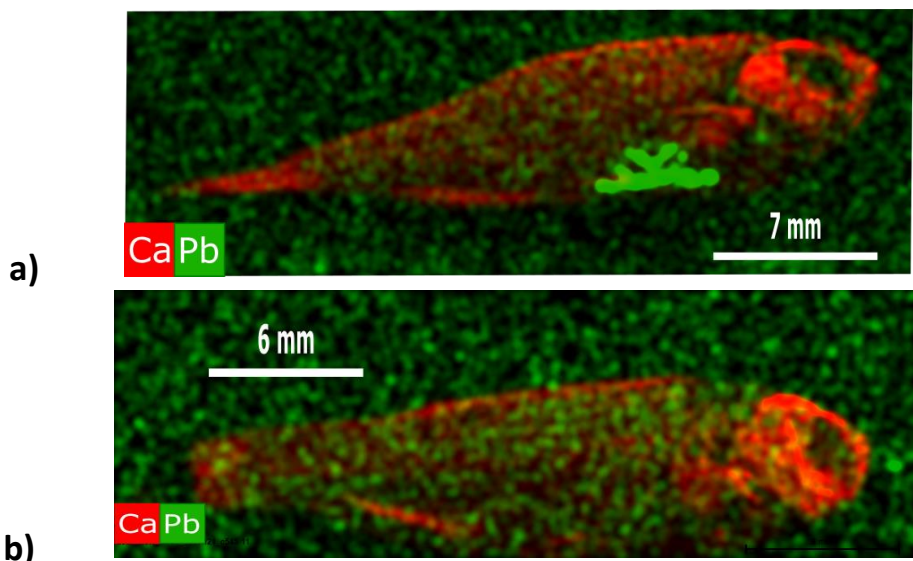


Figura 40 - Mapeamentos elementais do cálcio (vermelho) e chumbo (verde), a) 2ª amostragem e b) 4ª amostragem.

As análises utilizando o sistema iFlux permitem deduzir a acumulação de chumbo através da observação do perfil de intensidades, obtido ao selecionar uma secção do mapa de distribuição elemental individual. Na parte inferior da Figura 41 é apresentada a distribuição elemental da seleção correspondente à ROI do chumbo e o respetivo perfil de intensidade. É observável um pico de elevada intensidade, correspondente à região evidenciada pelo círculo branco.

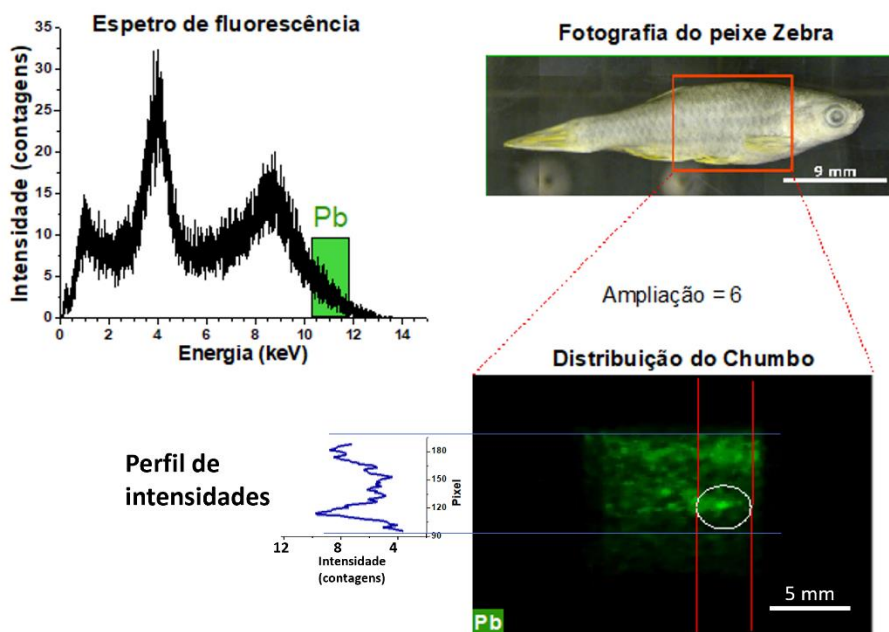


Figura 41 – Espectro de fluorescência do sistema iFlux, fotografia do peixe, distribuição elemental e perfil de intensidade do peixe Zebra exposto a 545 µg/L de chumbo durante 30 dias.

O espectro de fluorescência e a distribuição elemental do cálcio de um peixe Zebra correspondente ao grupo controlo da 2ª amostragem são apresentados na Figura 42. É observada a maior intensidade dos elementos cálcio e zinco e como esperado a ausência do pico correspondente à gama de energias do chumbo e mesmo quando se seleciona essa gama de energias a distribuição elemental do chumbo não mostrou nenhuma acumulação. Estas imagens da distribuição elemental não apresentam grande resolução em posição, não se conseguindo distinguir, no caso do zinco, a sua acumulação maioritária no olho, como se observou nos exemplos mostrados anteriormente e como se verificou na imagem adquirida com o sistema M4 TORNADO.

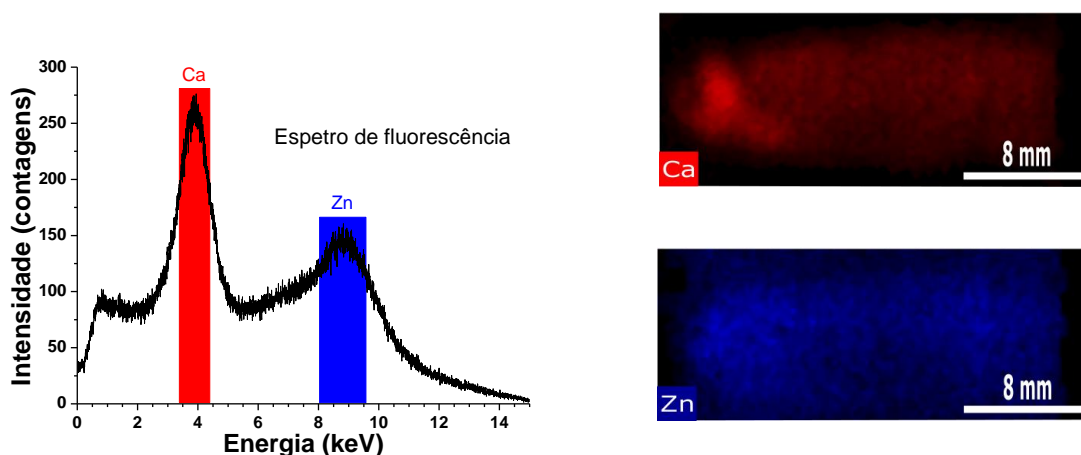


Figura 42 – Esquerda: Espectro de fluorescência; Direita: Distribuição elemental do cálcio e zinco do peixe Zebra controlo da 2ª amostragem obtida com o sistema iFlux.

Na natureza, o que pode acontecer, é a exposição a metais pesados em maiores concentrações e por mais tempo. Por exemplo, um determinado lugar pode estar contaminado e o peixe ter contacto com esse local durante algum tempo e de seguida nadar para outro local não contaminado. Neste cenário, seria importante avaliar se o peixe posteriormente teve capacidade para excretar o metal e se não existem consequências relevantes no seu comportamento. É com base neste pensamento que surge o desenho experimental deste teste crónico.

Concluiu-se que ao fim de 30 dias, o peixe Zebra apresentava acumulação do chumbo na zona visceral na concentração de 545 µg/L. Dos resultados obtidos pelos diferentes métodos, verificou-se que rapidamente o peixe excretou o metal: ao fim de 15 dias em contacto com água limpa já não havia sinais da acumulação, o que se verificou também para as análises realizadas nos peixes que estiveram 30 dias em contacto com água limpa.

Apesar do tempo de exposição de 30 dias, não se verificou a acumulação de chumbo num órgão específico, o que está de acordo, por exemplo, com o trabalho de Zhang *et al.* [59]. Para uma melhor compreensão do processo de acumulação deveria aumentar-se o tempo de exposição do peixe ao metal ou as concentrações utilizadas.

8 Conclusões e Trabalho Futuro

Com este trabalho pretendeu-se avaliar: i) a bioacumulação de metais pesados no organismo do peixe Zebra e, ii) a aplicabilidade de um sistema de imagem EDXRF (sistema iFlux) para o mapeamento da distribuição dos metais pesados em peixes. As amostras dos peixes foram analisadas pela técnica de EDXRF em três sistemas: um espectrómetro de EDXRF, um espectrómetro de imagem de EDXRF e pelo sistema comercial M4 TORNADO. Os resultados obtidos pelo espectrómetro de EDXRF, permitiram identificar os elementos presentes no peixe Zebra, nomeadamente os metais a que estiveram expostos, por sua vez, o espectrómetro de imagem permitiu o mapeamento da distribuição dos metais pesados no peixe e com a posterior fusão da imagem da distribuição com a imagem morfológica, foi possível determinar a zona de acumulação. Tanto a identificação dos elementos presentes na constituição do peixe Zebra como a sua distribuição elemental foram validados com o sistema comercial.

Relativamente ao estudo preliminar realizado com os metais Pb, Mn, Ni e Se, todos os metais testados apresentaram uma distribuição semelhante no peixe, sempre na zona visceral e com o aumento do tempo de exposição do peixe verificou-se a tendência de maior acumulação.

No que diz respeito ao teste crónico realizado com Pb, foi possível observar a capacidade de excreção do peixe Zebra para as condições deste estudo, isto é, para exposição de 30 dias a chumbo seguidos de mais 30 dias em contacto com água limpa. Relativamente ao estudo comportamental realizado no teste crónico não foi possível retirar conclusões devido à falta de significância estatística dos resultados obtidos. Esta ausência de alteração comportamental poderá ser justificada pela não acumulação de chumbo no cérebro, ao contrário do esperado por Zhang *et al.* [59] e também pelo curto período de tempo a que o peixe esteve exposto quando comparado com os cenários possíveis no ecossistema, em que o peixe pode estar meses em contacto com o meio contaminado e/ou em concentrações superiores às utilizadas neste trabalho. O sistema iFlux mostrou ser capaz de ser aplicado a análises com amostras biológicas, nomeadamente permitindo o mapeamento dos elementos presentes em peixes zebra.

Um dos estudos preliminares que também se poderá fazer é uma análise à água contaminada e verificar ao fim de quanto tempo a concentração do composto sofre uma redução considerável permitindo assim determinar o intervalo de tempo entre mudanças de meio e poder manter uma exposição a uma concentração constante.

Relativamente à acumulação em órgãos específicos, a análise poderá passar por uma individualização dos respetivos órgãos e também pela realização de estudos com biomarcadores. Para a verificação de efeitos notórios a nível comportamental com estas concentrações, o ensaio deverá passar por uma exposição mais prolongada; ou para o mesmo tempo de exposição utilizar concentrações mais elevadas.

Apesar de não ser discutido neste documento, foram realizadas aquisições com um pinhole de maior diâmetro que permitia que mais fotões chegassem ao detetor, no entanto, a resolução em posição era pior para este caso, não se conseguindo por vezes distinguir regiões anatómicas. Para uma melhor resolução, a solução passaria pela utilização de um pinhole de menor diâmetro apesar de aumentar o tempo de aquisição. Também a utilização de um gás nobre mais pesado aumentaria a eficiência de deteção do sistema.

Referências

- [1] H. Belitz, W. Grosch, e P. Schieberle, «Food Chemistry», em *Encyclopedia of Microbiology*, 4th ed., Berlin: Springer, 2009, pp. 617–639.
- [2] A. Afshin *et al.*, «Health effects of dietary risks in 195 countries, 1990–2017: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2017», *Lancet*, vol. 393, n. 10184, pp. 1958–1972, 2019, doi: 10.1016/S0140-6736(19)30041-8.
- [3] E. K. Lund, «Health benefits of seafood; Is it just the fatty acids?», *Food Chem.*, vol. 140, n. 3, pp. 413–420, 2013, doi: 10.1016/j.foodchem.2013.01.034.
- [4] «Report highlights growing role of fish in feeding the world». <http://www.fao.org/news/story/pt/item/232037/icode/> (acedido Jul. 12, 2020).
- [5] «How much fish do we consume? First global seafood consumption footprint published», 2018. <https://ec.europa.eu/jrc/en/news/how-much-fish-do-we-consume-first-global-seafood-consumption-footprint-published> (acedido Jul. 12, 2020).
- [6] L. Järup, «Hazards of heavy metal contamination», *Br. Med. Bull.*, vol. 68, pp. 167–182, 2003, doi: 10.1093/bmb/ldg032.
- [7] «Mercury and health», 2017. <https://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/mercury-and-health> (acedido Jul. 12, 2020).
- [8] M. I. Castro-González e M. Méndez-Armenta, «Heavy metals: Implications associated to fish consumption», *Environ. Toxicol. Pharmacol.*, vol. 26, n. 3, pp. 263–271, 2008, doi: 10.1016/j.etap.2008.06.001.
- [9] I. Domingues, R. Oliveira, J. Lourenço, C. K. Grisolia, S. Mendo, e A. M. V. M. Soares, «Biomarkers as a tool to assess effects of chromium (VI): Comparison of responses in zebrafish early life stages and adults», *Comp. Biochem. Physiol. - C Toxicol. Pharmacol.*, vol. 152, n. 3, pp. 338–345, 2010, doi: 10.1016/j.cbpc.2010.05.010.
- [10] S. Altenhofen, M. T. Wiprich, L. R. Nery, C. E. Leite, M. R. M. R. Vianna, e C. D. Bonan, «Manganese(II) chloride alters behavioral and neurochemical parameters in larvae and adult zebrafish», *Aquat. Toxicol.*, vol. 182, pp. 172–183, 2017, doi: 10.1016/j.aquatox.2016.11.013.
- [11] P. O. Onuwa, L. A. Nnamonu, I. S. Eneji, e R. Sha’Ato, «Analysis of Heavy Metals in Human Scalp Hair Using Energy Dispersive X-Ray Fluorescence Technique», *J. Anal. Sci. Methods Instrum.*, vol. 02, n. 04, pp. 187–193, 2012, doi: 10.4236/jasmi.2012.24029.
- [12] M. L. Carvalho, T. Magalhães, M. Becker, e A. Von Bohlen, «Trace elements in human cancerous and healthy tissues : A comparative study by EDXRF , TXRF , synchrotron radiation and PIXE», *Spectrochim. Acta - Part B At. Spectrosc.*, vol. 62, pp. 1004–1011, 2007, doi: 10.1016/j.sab.2007.03.030.
- [13] J. MacHado *et al.*, «Accuracy improvement in XRF analysis for the quantification of elements ranging from tenths to thousands µg g⁻¹ in human tissues using different matrix reference materials», *J. Anal. At. Spectrom.*, vol. 35, n. 12, pp. 2920–2927, 2020, doi: 10.1039/d0ja00307g.
- [14] P. M. S. Carvalho *et al.*, «Energy dispersive X-ray fluorescence quantitative analysis of biological samples with the external standard method», *Spectrochim. Acta - Part B At. Spectrosc.*, vol. 174, n. October, p. 105991, 2020, doi: 10.1016/j.sab.2020.105991.
- [15] C. M. Alonso-hernández, M. Gómez-batista, M. Díaz-asencio, J. Estévez-alvares, e R. Padilla-alvares, «Total arsenic in marine organisms from Cienfuegos bay (Cuba)», *Food Chem.*, vol. 130, pp. 973–976, 2012, doi: 10.1016/j.foodchem.2011.07.087.
- [16] F. Bilo *et al.*, «Total reflection X-Ray fluorescence spectroscopy to study Pb and Zn accumulation in zebrafish embryos», *X-Ray Spectrom.*, n. 44, pp. 124–128, 2015, doi: 10.1002/xrs.2588.
- [17] M. Silva, «Determinação da concentração de mercúrio , e outros elementos traço , em tecidos de peixe-zebra (Danio rerio)», Faculdade de Ciências e Tecnologias - Universidade NOVA de Lisboa, 2016.
- [18] T. W. Liu, «Determinação da concentração de Chumbo, e outros elementos traço, em tecidos dos peixes-zebra (Danio rerio)», Faculdade de Ciências e Tecnologia - Universidade NOVA de Lisboa, 2017.
- [19] M. P. Gonçalves, «Determinação da concentração de arsénio, e outros elementos traço, em tecidos dos peixes-zebra (Danio rerio)», Faculdade de Ciências e Tecnologia - Universidade NOVA de Lisboa, 2017.
- [20] M. Hason e P. Bartůněk, «Zebrafish models of cancer-new insights on modeling human cancer in a non-mammalian vertebrate», *Genes (Basel)*, vol. 10, n. 11, pp. 1–30, 2019, doi: 10.3390/genes10110935.
- [21] A. P. Singh e C. Nüsslein-Volhard, «Zebrafish stripes as a model for vertebrate colour pattern formation», *Curr. Biol.*, vol. 25, n. 2, pp. R81–R92, 2015, doi: 10.1016/j.cub.2014.11.013.
- [22] D. M. Parichy, «Evolution of danio pigment pattern development», *Heredity (Edinb)*, vol. 97, n. 3, pp. 200–210, 2006, doi: 10.1038/sj.hdy.6800867.
- [23] P. Huang, Z. Zhu, S. Lin, e B. Zhang, «Reverse Genetic Approaches in Zebrafish», *J. Genet. Genomics*, vol. 39, n. 9, pp. 421–433, 2012, doi: 10.1016/j.jgg.2012.07.004.
- [24] S. Cassar *et al.*, «Use of Zebrafish in Drug Discovery Toxicology», *Chem. Res. Toxicol.*, vol. 33, n. 1, pp. 95–118, 2020, doi: 10.1021/acs.chemrestox.9b00335.
- [25] K. Howe *et al.*, «The zebrafish reference genome sequence and its relationship to the human genome», *Nature*,

- vol. 496, n. 7446, pp. 498–503, 2013, doi: 10.1038/nature12111.
- [26] «Brachydanio rerio - Zebra “Danio”». <https://www.seriouslyfish.com/species/danio-rerio/> (acedido Set. 14, 2021).
- [27] A. L. Menke, J. M. Spitsbergen, A. P. M. Wolterbeek, e R. A. Woutersen, «Normal anatomy and histology of the adult zebrafish», *Toxicol. Pathol.*, vol. 39, n. 5, pp. 759–775, 2011, doi: 10.1177/0192623311409597.
- [28] «OECD Guidelines for the Testing of Chemicals». https://www.oecd-ilibrary.org/environment/test-no-250-easzy-assay-detection-of-endocrine-active-substances-acting-through-estrogen-receptors-using-transgenic-tg-cyp19a1b-gfp-zebrafish-embryos_0a39b48b-en?_ga=2.94297565.1552688454.1633906161-229195518.1633 (acedido Out. 10, 2021).
- [29] OECD TG 230, «Test No. 230: 21-Day Fish Assay: A short-term screening for estrogenic and androgenic activity, and aromatase inhibition», *OECD Ser. Test. Assess.*, n. September, pp. 1–38, 2009, [Em linha]. Disponível em: https://www.oecd-ilibrary.org/environment/test-no-230-21-day-fish-assay_9789264076228-en.
- [30] M. Rössler, *Danio rerio: Illustrating a widely used biological model organism in the times of advanced imaging techniques*, n. March. 2017.
- [31] D. J. Hoffman, B. A. Rattner, J. G. Allen Burton, e J. John Cairns, *Handbook of Ecotoxicology*, Second Edi. Lewis Publishers, 2002.
- [32] J. T. Bushberg, J. A. Seibert, E. M. Leidholt Jr, e J. M. Boone, *The Essential Physics of Medical Imaging*, 2.^a ed. Lippincott Williams & Wilkins, 2002.
- [33] A. V. d. J. Manguze *et al.*, «Simultaneous Zinc and selenium biofortification in rice. Accumulation, localization and implications on the overall mineral content of the flour», *J. Cereal Sci.*, vol. 82, n. May, pp. 34–41, 2018, doi: 10.1016/j.jcs.2018.05.005.
- [34] P. Bachioga *et al.*, «Benchtop and Handheld Energy-Dispersive X-Ray Fluorescence (EDXRF) as Alternative for Selenium Concentration Measurement in Biofortified Broccoli Seedling», *Food Anal. Methods*, vol. 12, n. 7, pp. 1520–1527, 2019, doi: 10.1007/s12161-019-01489-5.
- [35] A. L. M. Silva, M. L. Carvalho, K. Janssens, e J. F. C. A. Veloso, «A large area full-field EDXRF imaging system based on a THCOBRA gaseous detector», *J. Anal. At. Spectrom.*, vol. 30, n. 2, pp. 343–352, 2015, doi: 10.1039/c4ja00301b.
- [36] P. M. S. Carvalho *et al.*, «Elemental mapping of Portuguese ceramic pieces with a full-field XRF scanner based on a 2D-THCOBRA detector», *Eur. Phys. J. Plus*, vol. 136, n. 4, 2021, doi: 10.1140/epjp/s13360-021-01422-y.
- [37] «What is X-ray Fluorescence Spectroscopy (XRF)». https://www.horiba.com/en_en/x-ray-fluorescence-spectroscopy-xrf/ (acedido Set. 07, 2021).
- [38] M. L. Carvalho, S. Santiago, e M. L. Nunes, «Assessment of the essential element and heavy metal content of edible fish muscle», *Anal. Bioanal. Chem.*, vol. 382, n. 2, pp. 426–432, 2005, doi: 10.1007/s00216-004-3005-3.
- [39] A. L. M. Silva *et al.*, «Elemental mapping in a contemporary miniature by full-field X-ray fluorescence imaging with gaseous detector vs. scanning X-ray fluorescence imaging with polycapillary optics», *Spectrochim. Acta - Part B At. Spectrosc.*, vol. 129, pp. 1–7, 2017, doi: 10.1016/j.sab.2016.12.006.
- [40] A. L. M. Silva, C. D. R. Azevedo, C. A. B. Oliveira, J. M. F. Dos Santos, M. L. Carvalho, e J. F. C. A. Veloso, «Characterization of an energy dispersive X-ray fluorescence imaging system based on a Micropattern Gaseous Detector», *Spectrochim. Acta - Part B At. Spectrosc.*, vol. 66, n. 5, pp. 308–313, 2011, doi: 10.1016/j.sab.2011.03.002.
- [41] C. A. Habib, W. Zheng, E. M. Haacke, S. Webb, e H. Nichol, «Visualizing Iron Deposition in Multiple Sclerosis Cadaver Brains Visualizing Iron Deposition in Multiple Sclerosis Cadaver Brains», em *6th International Conference on Medical Applications of Synchrotron Radiation*, 2010, vol. 78, n. July, doi: 10.1063/1.3478203.
- [42] M. Korbass, S. R. Blechinger, P. H. Krone, I. J. Pickering, e G. N. George, «Localizing organomercury uptake and accumulation in zebrafish larvae at the tissue and cellular level», *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 105, n. 34, pp. 12108–12112, 2008, doi: 10.1073/pnas.0803147105.
- [43] J. F. C. A. Veloso e A. L. M. Silva, «Gaseous detectors for energy dispersive X-ray fluorescence analysis», *Nucl. Instruments Methods Phys. Res. Sect. A Accel. Spectrometers, Detect. Assoc. Equip.*, vol. 878, n. September 2017, pp. 24–39, 2018, doi: 10.1016/j.nima.2017.09.011.
- [44] A. L. M. Silva, R. Figueroa, A. Jaramillo, M. L. Carvalho, e J. F. C. A. Veloso, «Performance of a gaseous detector based energy dispersive X-ray fluorescence imaging system: Analysis of human teeth treated with dental amalgam», *Spectrochim. Acta - Part B At. Spectrosc.*, vol. 86, pp. 115–122, 2013, doi: 10.1016/j.sab.2013.03.005.
- [45] A. Yamauchi, M. Iwasaki, K. Hayashi, e K. Tsuji, «Evaluation of full-field energy dispersive X-ray fluorescence imaging apparatus and super resolution analysis with compressed sensing technique», *X-Ray Spectrom.*, vol. 48, n. 6, pp. 644–650, 2019, doi: 10.1002/xrs.3055.
- [46] F. D. Amaro, C. Santos, J. F. C. A. Veloso, A. Breskin, R. Chechik, e J. M. F. Dos Santos, «The thick-COBRA: A new gaseous electron multiplier for radiation detectors», *J. Instrum.*, vol. 5, n. 10, 2010, doi: 10.1088/1748-0221/5/10/P10002.
- [47] A. L. M. Silva *et al.*, «X-ray imaging detector based on a position sensitive THCOBRA with resistive line», *J. Instrum.*, vol. 8, n. 5, 2013, doi: 10.1088/1748-0221/8/05/P05016.
- [48] L. F. N. D. Carramate, A. L. M. Silva, C. D. R. Azevedo, D. S. Covita, e J. F. C. A. Veloso, «THCOBRA X-ray imaging

- detector operating in Ne/CH₄», *J. Instrum.*, vol. 10, n. 1, 2015, doi: 10.1088/1748-0221/10/01/P01003.
- [49] L. F. N. D. Carramate *et al.*, «THCOBRA X-ray imaging detector operating in pure Kr», *J. Instrum.*, vol. 12, n. 5, 2017, doi: 10.1088/1748-0221/12/05/T05003.
- [50] N. V. Dolgova *et al.*, «Distribution of selenium in zebrafish larvae after exposure to organic and inorganic selenium forms», *Metallomics*, vol. 8, n. 3, pp. 305–312, 2016, doi: 10.1039/c5mt00279f.
- [51] D. D. Nabinger *et al.*, «Nickel exposure alters behavioral parameters in larval and adult zebrafish», *Sci. Total Environ.*, vol. 624, pp. 1623–1633, 2018, doi: 10.1016/j.scitotenv.2017.10.057.
- [52] C. B. Singh e B. A. Ansari, «Toxicity of two heavy metals Lead and Cobalt on Zebrafish, *Danio rerio*», *Sch. Acad. J. Biosci. (SAJB)*, vol. 5, n. 9, pp. 682–687, 2017, doi: 10.21276/sajb.2017.5.9.17.
- [53] N. H. B. Thi *et al.*, «Chronic exposure to low concentration lead chloride-induced anxiety and loss of aggression and memory in zebrafish», *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 21, n. 5, p. 1844, 2020, doi: 10.3390/ijms21051844.
- [54] «XR-100CR Si-PIN X-Ray Detector». <https://www.amptek.com/internal-products/xr-100cr-si-pin-x-ray-detector> (accedido Out. 10, 2021).
- [55] J. N. Johnston e T. L. Fauber, «Radiographic Exposure Technique», em *Essentials of Radiographic Physics and Imaging*, Second Edi., Missouri: Elsevier, 2016, pp. 117–138.
- [56] WHO, «Lead poisoning», 2021. <https://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/lead-poisoning-and-health> (accedido Out. 26, 2021).
- [57] X. Li, B. Zhang, N. Li, X. Ji, K. Liu, e M. Jin, «Zebrafish neurobehavioral phenomics applied as the behavioral warning methods for fingerprinting endocrine disrupting effect by lead exposure at environmentally relevant level», *Chemosphere*, vol. 231, pp. 315–325, 2019, doi: 10.1016/j.chemosphere.2019.05.146.
- [58] J. Chen *et al.*, «Developmental lead acetate exposure induces embryonic toxicity and memory deficit in adult zebrafish», *Neurotoxicol. Teratol.*, vol. 34, n. 6, pp. 581–586, 2012, doi: 10.1016/j.ntt.2012.09.001.
- [59] Y. Zhang, J. Feng, Y. Gao, X. Liu, L. Qu, e L. Zhu, «Physiologically based toxicokinetic and toxicodynamic (PBTK-TD) modelling of Cd and Pb exposure in adult zebrafish *Danio rerio*: Accumulation and toxicity», *Environ. Pollut.*, vol. 249, pp. 959–968, 2019, doi: 10.1016/j.envpol.2019.03.115.