



**COPPE/UFRJ**

MICROTOMOGRAFIA POR FLUORESCÊNCIA DE RAIOS X UTILIZANDO  
RADIAÇÃO SÍNCROTRON EM AMOSTRAS BIOLÓGICAS

Gabriela Ribeiro Pereira

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Engenharia Nuclear, COPPE, da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Doutor em Engenharia Nuclear.

Orientador: Ricardo Tadeu Lopes

Rio de Janeiro  
Fevereiro de 2010

MICROTOMOGRÁFIA POR FLUORESCÊNCIA DE RAIOS X UTILIZANDO  
RADIÇÃO SÍNCROTRON EM AMOSTRAS BIOLÓGICAS

Gabriela Ribeiro Pereira

TESE SUBMETIDA AO CORPO DOCENTE DO INSTITUTO ALBERTO LUIZ  
COIMBRA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA DE ENGENHARIA (COPPE) DA  
UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO COMO PARTE DOS  
REQUISITOS NECESSÁRIOS PARA A OBTENÇÃO DO GRAU DE DOUTOR EM  
CIÊNCIAS EM ENGENHARIA NUCLEAR.

Examinada por:

---

Prof. Ricardo Tadeu Lopes, D.Sc.

---

Prof. Carlos Roberto Appoloni, D.Sc.

---

Prof. Edgar Francisco Oliveira de Jesus, D.Sc.

---

Profa. Inayá Corrêa Barbosa Lima, D.Sc.

---

Prof. Marcelino José dos Anjos, D.Sc.

RIO DE JANEIRO, RJ - BRASIL  
FEVEREIRO DE 2010

Pereira, Gabriela Ribeiro

Microtomografia por Fluorescência de Raios X  
Utilizando Radiação Síncrotron em Amostras Biológicas/  
Gabriela Ribeiro Pereira. – Rio de Janeiro: UFRJ/COPPE,  
2010.

X, 174 p.: il.; 29,7 cm.

Orientador: Ricardo Tadeu Lopes

Tese (doutorado) – UFRJ/ COPPE/ Programa de  
Engenharia Nuclear, 2010.

Referencias Bibliográficas: p. 98-105.

1. Fluorescência de raios X. 2. Microtomografia. 3.  
Radiação Síncrotron. I. Lopes, Ricardo Tadeu. II.  
Universidade Federal do Rio de Janeiro, COPPE,  
Programa de Engenharia Nuclear. III. Título.

Aos meus pais Vânia e Luiz,  
Aos meus irmãos Paulo e Fernando  
e ao meu marido Michel.



# AGRADECIMENTOS

A Deus pela força constante.

Ao meu marido Michel, pela compreensão, amor e carinho em todos os momentos.

Aos meus pais Vânia e Luiz pelo amor, carinho e dedicação e por estarem presentes em todos os momentos da minha vida.

Aos meus irmãos Paulo e Fernando pelo incentivo incondicional em todos os momentos.

À toda minha família pela paciência e apoio constante ao longo de todo doutorado.

Ao Prof. Ricardo Tadeu Lopes (PEN/COPPE/UFRJ) pela orientação, disponibilidade, compreensão e atenção em todos os momentos. Tornando-se muito mais do que um orientador, mas um grande amigo.

Ao Prof. Marcelino José dos Anjos (IF/UERJ) pelo incentivo e cooperação ao longo de todo trabalho.

Ao Dr. Carlos Pérez (LNLS) pela grande contribuição na realização deste trabalho junto ao Laboratório Nacional de Luz Síncrotron.

Ao Dr. Henrique Rocha (PEN/COPPE/UFRJ) pelo apoio constante na aquisição dos dados, sempre pronto para ajudar a resolver todos os imprevistos que surgiram ao longo de todo trabalho.

À todos os meus amigos, professores e alunos do LIN pela amizade e troca de conhecimentos ao longo de todo trabalho.

Ao Programa de Engenharia Nuclear da COPPE/UFRJ, pela oportunidade de realização deste trabalho.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pelo grande apoio financeiro.

E à todos que direta ou indiretamente contribuíram para a conclusão deste trabalho.

Resumo da Tese apresentada à COPPE/UFRJ como parte dos requisitos necessários para a obtenção do grau de Doutor em Ciências (D.Sc.)

## MICROTOMOGRAFIA POR FLUORESCÊNCIA DE RAIOS X UTILIZANDO RADIAÇÃO SÍNCROTRON EM AMOSTRAS BIOLÓGICAS

Gabriela Ribeiro Pereira

Fevereiro/2010

Orientador: Ricardo Tadeu Lopes

Programa: Engenharia Nuclear

Neste trabalho foi desenvolvido um sistema de microtomografia por fluorescência de raios X para estudar a distribuição elementar de ferro, cobre e zinco em tecidos biológicos na linha de Fluorescência de Raios X (XRF) do Laboratório Nacional de Luz Síncrotron (LNLS), Campinas, Brasil. Para a excitação dos elementos foi utilizado um feixe quasi-monocromático com energia de 12 keV. Os fótons de fluorescência foram detectados por um detector de HPGe, posicionado a noventa graus em relação à direção do feixe incidente, um detector cintilador rápido foi utilizado para detectar os fótons transmitidos e o feixe incidente incidente foi monitorado por uma câmara de ionização. As amostras foram rotacionadas em 180° com passos de 3° e transladadas perpendicularmente na direção do feixe com passos de 200 µm (tamanho do feixe incidente). O tempo de medida para cada ponto foi avaliado separadamente para cada amostra. A fim de estudar o desempenho do sistema, foram analisadas algumas amostras de referência e as amostras biológicas de tecido de mama, pulmão e de próstata foram caracterizadas. Todas as tomografias por fluorescência de raios X foram reconstruídas utilizando o algoritmo de retroprojeção filtrada com e sem correção de absorção. Os resultados da microtomografia por fluorescência de raios X mostraram a distribuição elementar de cobre, ferro e zinco nas amostras de referência e nas amostras de tecido biológico.

Abstract of Thesis presented to COPPE/UFRJ as a partial fulfillment of the requirements for the degree of Doctor of Science (D.Sc.)

X-RAY FLUORESCENCE MICROTOMOGRAPHY WITH SYNCHROTRON  
RADIATION IN BIOLOGICAL SAMPLES

Gabriela Ribeiro Pereira

February/2010

Advisor: Ricardo Tadeu Lopes

Department: Nuclear Engineering

In this work the X-ray fluorescence microtomography was developed to study the elemental distribution of iron, copper and zinc in biological tissues at the X-Ray Fluorescence beamline (XRF) of the Brazilian Synchrotron Light Source (LNLS), Campinas, Brazil. A quasi-monochromatic beam at 12 keV was used to excitation of the elements within the samples. The fluorescence photons have been detected by a HPGe detector, placed at 90° to the incident beam, the beam was monitored by an ionization chamber and a fast scintillator detector was used to detect the transmitted radiation. In one projection, samples were positioned in steps of 200 μm (actual beam size) perpendicularly to the beam direction covering the whole transversal section of the sample proof. Each single value in a projection is obtained by measuring the fluorescence radiation emitted by all pixels along the beam. The object is then rotated, and another projection is measured. Projections are obtained in steps of 3° until the object has completed 180°. The selected measuring for each scanned point was evaluated separately for each sample. In order to study the performance of the system, some reference samples had been analyzed and after that human biological tissues of breast, lung and prostate were characterized. All the x-ray fluorescence tomographies have been reconstructed using a filtered-back projection algorithm with and without absorption corrections. The X-Ray microfluorescence tomography results have shown the elementary distribution of copper, iron and zinc in reference samples and in biological samples.

# Índice

<b>AGRADECIMENTOS</b> .....	<b>V</b>
<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	<b>1</b>
<b>2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	<b>3</b>
2.1 Tomografia por fluorescência de raios X.....	3
2.2 Quantificação dos elementos traços Zn, Cu e Fe em tecidos biológicos.....	9
<b>3 FUNDAMENTOS TEÓRICOS</b> .....	<b>22</b>
3.1 O Tecido de Mama.....	22
3.1.1 Anatomia e Fisiologia.....	23
3.2 O Tecido de Próstata.....	24
3.2.1 Anatomia e Fisiologia.....	25
3.3 O Tecido de Pulmão.....	27
3.3.1 Anatomia e Fisiologia.....	28
3.4 Interação dos raios X com a matéria.....	30
3.4.1 Efeito Fotoelétrico.....	31
3.4.2 Espalhamento Compton.....	31
3.5 Características do Feixe Primário.....	32
3.5.1 Radiação Síncrotron.....	32
3.5.2 Cristal Multicamadas.....	35
3.6 Fluorescência de raios X.....	36
3.6.1 A Razão Salto/Absorção.....	38
3.7 Tomografia por Transmissão de Raios X (CT).....	40
3.8 Tomografia por fluorescência de raios X.....	44
<b>4 METODOLOGIA</b> .....	<b>52</b>

<b>5</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÕES .....</b>	<b>57</b>
5.1	Amostras de referência .....	58
5.2	Amostras de Tecido de Próstata .....	68
5.3	Amostras de Tecido de Mama .....	75
5.4	Imagens 3D de Tecidos de Biológicos .....	88
<b>6</b>	<b>CONCLUSÃO .....</b>	<b>95</b>
	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>98</b>
	<b>APÊNDICE .....</b>	<b>106</b>
<b>A</b>	<b>Valores do coeficiente de atenuação para diversos materiais.....</b>	<b>106</b>
A.1	A-150.....	106
A.2	Acrílico.....	108
A.3	Tecido Adiposo .....	110
A.4	Ar seco.....	112
A.5	Alanina .....	114
A.6	B100 .....	116
A.7	Bakelite.....	118
A.8	Sangue.....	120
A.9	Osso cortical.....	122
A.10	Cérebro .....	124
A.11	Tecido de mama .....	126
A.12	Pulmão.....	128
A.13	Polietileno .....	130
A.14	Tecido mole.....	132
<b>B</b>	<b>Trabalhos Publicados em Periódicos .....</b>	<b>134</b>

# 1 Introdução

Em diversos centros de pesquisa em todo o mundo existe uma tendência de buscar novas técnicas para o diagnóstico de câncer, principalmente a detecção de patologias em estágio inicial de desenvolvimento. No Brasil, as estimativas para o ano de 2010, apontam que ocorrerão quase 500.000 casos novos de câncer. Os tipos mais incidentes, à exceção do câncer de pele do tipo não melanoma, serão os cânceres de próstata e de pulmão no sexo masculino e os cânceres de mama e de colo do útero no sexo feminino, acompanhando o mesmo perfil da magnitude observada no mundo (INCa, 2009). A técnica de fluorescência de raios X vem mostrando resultados positivos na diferenciação entre tecidos saudáveis e tecidos com câncer, e pode, em um futuro próximo, se tornar uma importante ferramenta de diagnóstico clínico.

A análise por fluorescência de raios X é uma técnica de micro análise de ampla aplicação em diversas áreas da química, medicina, biologia, meio ambiente, ciência dos materiais. Ela pode ser usada para detectar e quantificar as concentrações químicas dos elementos presentes na amostra analisada. Os elementos químicos podem ser identificados porque a radiação de fluorescência emitida pelos átomos é característica da espécie química. A fluorescência de raios X também pode fornecer a informação sobre a localização do elemento dentro da amostra, sendo essa informação muito precisa em termos de análises quantitativas. Com isso a técnica de fluorescência de raios X pode ser usada para quantificar a concentração dos elementos dentro da amostra e mais do que isso, ela tem sido utilizada como um método de certificação no campo das micro análises.

As excelentes características da fonte de radiação síncrotron: alta intensidade, colimação natural, feixes de fótons monocromáticos com uma largura de banda de energia muito estreita, possibilidade de feixes bastante colimados (20  $\mu\text{m}$ ) fazem as fontes de radiação síncrotron apropriadas para aplicações tomográficas.

O objetivo deste trabalho é unir a espectrometria por fluorescência de raios X e as técnicas tomográficas para a caracterização de amostras de tecidos biológicos como mama, próstata e pulmão utilizando radiação síncrotron. Esse objetivo abrange a

implementação da técnica de microtomografia por fluorescência de raios X utilizando um feixe monocromático para obtenção da correção da absorção para obter a concentração elementar ponto a ponto no mapeamento tomográfico.

A fluorescência de raios X é usada para obter a distribuição química dos elementos enquanto que a técnica tomográfica permite a quantificação desses elementos em diversas camadas da amostra sem a necessidade de cortar a amostra e acabar inutilizando a amostra para realização de outras análises posteriores.

As técnicas de microtomografia por transmissão de raios X e microtomografia por fluorescência de raios X foram implementadas na linha de Fluorescência de Raios X (XRF) do Laboratório Nacional de Luz Síncrotron (LNLS), Campinas, Brasil.

As reconstruções das imagens por transmissão de raios X e por fluorescência de raios X foram feitas utilizando o MATLAB<sup>®</sup>. As matrizes de correção da tomografia por fluorescência de raios X foram obtidas utilizando o programa MKCORR desenvolvido por Brunetti et al (**BRUNETTI E GOLOSIO, 2001**).

A seguir, nesta tese serão apresentados uma revisão bibliográfica do estado da arte da técnica de microtomografia por fluorescência de raios X e quantificação de metais em tecidos biológicos.

No capítulo 3 apresentam-se os fundamentos teóricos necessários e utilizados para o desenvolvimento deste trabalho.

Segue, no capítulo 4 a descrição da metodologia utilizada.

No capítulo 5 serão apresentados os resultados obtidos com a microtomografia por transmissão e fluorescência de raios X nas amostras de referência e amostras de tecido de mama, próstata e pulmão em duas e três dimensões.

Finalmente, no capítulo 6 serão apresentadas às conclusões e as sugestões obtidas ao longo de todo o trabalho.



## 2 Revisão bibliográfica

### 2.1 Tomografia por fluorescência de raios X

Depois dos trabalhos de Cormack publicados em 1963 e 1964; Hounsfield, em 1968, desenvolveu um método chamado de tomografia computadorizada (computer assisted tomography) baseado na transmissão dos raios X para produzir uma imagem de uma secção transversal de uma cabeça humana (**HOUNSFIELD, 1973**). Esse método revolucionou não só a radiografia médica, mas todo o campo de ensaios não destrutivos e estimulou o desenvolvimento de outras técnicas de imagem. Entre elas, estão as técnicas baseadas na detecção da radiação espalhada inelasticamente (tomografia Compton) (**CESAREO ET AL, 2003**), na detecção da radiação espalhada elasticamente (tomografia Rayleigh) (**HARDING ET AL, 1990**), imagens de amostras muito pequenas com resolução de micrômetro (**LOPES ET AL, 2003**) e imagens por ressonância nuclear magnética (**JUNIOR E YAMASHITA, 2001**).

**CESAREO e MASCARENHAS (1989)** desenvolveram um novo tipo de tomografia baseada na detecção da fluorescência de raios X emitida por uma amostra. Neste trabalho foi utilizado um feixe colimado e policromático proveniente de um tubo de raios X. Os raios X característicos emitidos a noventa graus pela amostra foram coletados por um detector altamente colimado. A amostra foi transladada no plano x-y e com isso a distribuição elementar de uma fatia do objeto pôde ser determinada. Neste trabalho foram utilizados objetos testes feitos com uma matriz de polimetacrilato (plexiglas) e com uma solução interna contendo iodo em determinadas regiões da amostra. A reconstrução de uma seção da amostra foi feita com e sem correção da absorção e os resultados mostraram claramente a distribuição do iodo na amostra.

As características da tomografia por fluorescência segundo Cesareo e Mascarenhas são:

- Possui melhor resolução por contraste comparada a tomografia por transmissão de raios X, porque está envolvido o efeito fotoelétrico ao

invés do efeito Compton, como em geral em tomografia por transmissão. Para imagens de elementos químicos em solução, a sensibilidade dessa técnica é melhor que 0,1% para elementos de médio a alto número atômico.

- Pode ser usada para tomografias de amostras pequenas ( $< 1 \text{ cm}^3$ ), de acordo com a penetração da radiação incidente e o sinal de saída dos raios X característicos da amostra.
- Uma fonte muito intensa e colimada é necessária para irradiar um pequeno elemento de volume. Por esse motivo a radiação síncrotron se torna apropriada para esse tipo de técnica.

**HOGAN ET AL (1991)** propôs um método matemático para reconstrução dos dados por tomografia por fluorescência de raios X com correção de absorção. Esse modelo faz correções da absorção antes e depois do ponto de fluorescência. Neste trabalho Hogan compara os diferentes métodos de reconstrução. O método matemático proposto por ele consegue remover parte da degradação por absorção. A vantagem do método do Hogan é que não é necessário o feixe monocromático e a tomografia por fluorescência e transmissão de raios X são obtidas simultaneamente.

**YUASA ET AL (1997)** descreveram um algoritmo rápido para tomografia por fluorescência de raios X. A reconstrução proposta por eles envolve resolver um sistema de equações algébricas cujos dados de entrada são as projeções da tomografia por fluorescência de raios X. Eles propõem um algoritmo de reconstrução baseado no método do gradiente conjugado (CGM) com um eficiente método manipulação de dados para reduzir o tamanho de memória do computador necessária para reconstruir as imagens da tomografia em aproximadamente  $N^{1/2}$ , onde N é o número de pixels. Neste trabalho Yuasa testa o algoritmo apenas com dados simulados.

**SIMIONOVICI (2001)** além de propor a reconstrução em duas dimensões como os trabalhos anteriores, ele também propôs uma reconstrução em três dimensões. Ele fez uma comparação entre dois métodos de reconstrução. O algoritmo de reconstrução algébrica (ART) e o algoritmo de retroprojeção filtrada (FBP) e concluiu que a

retroprojeção filtrada possui uma melhor resolução para tomografia por fluorescência de raios X. No caso da aplicação em capilares preenchidos com pó mineral, ele conseguiu alcançar uma resolução de 1,2  $\mu\text{m}$  utilizando lentes focalizadoras e um feixe monocromático de 20 keV.

**SCHROER (2001)** apresenta um método de reconstrução tentando estimar a distribuição do coeficiente de atenuação para a energia de fluorescência. Esse método é testado para fantasmas numéricos e apresenta bons resultados. Uma consideração importante no método de Schroer é que para amostras com baixa densidade como amostras biológicas liofilizadas, a fluorescência secundária e outros efeitos de espalhamento são negligenciáveis.

**BRUNETTI E GOLOSIO (2001)** implementam o algoritmo proposto por **HOGAN (1991)** para a tomografia por fluorescência com correção de absorção e fazem novas simulações agora com uma amostra de referência com composição química contendo soluções padrão de Si, Ca, Fe e Sr.

**WATANABE ET AL (2001)** desenvolveram um sistema de microtomografia por fluorescência de raios X no síncrotron do Japão, utilizando um sistema de espelhos e uma câmara CCD para fazer a análise elementar em tempo real. Neste trabalho, foi analisado um objeto padrão formado por vários cilindros de espessuras diferentes contendo soluções de Ni, Cu e Fe, e impurezas de Ni, Co e Fe. Os resultados mostram uma análise qualitativa e mostram que é possível distinguir perfeitamente todos os elementos.

**MÉNEZ ET AL (2001)** descrevem um estudo de um fluido aquoso, que na verdade, são bolhas de líquido microscópicas presas em cristais. O fluido aquoso foi sintetizado em um cristal de quartzo dentro de uma cápsula de ouro a altas temperaturas e pressões. A amostra foi analisada utilizando microtomografia por fluorescência de raios X no síncrotron da França. Os resultados demonstram a possibilidade de analisar a distribuição dos metais Fe, Cu, Zn e Au na amostra sem destruir ou danificar a amostra.

**VINCZE ET AL (2002a)** fazem um estudo em objetos testes cilíndricos com uma matriz composta por poliacrilato com alguns furos que foram preenchidos com

alguns elementos terras raras (La, Pr, Sm, Gd, Dy, Er, Yb). Neste trabalho foi possível visualizar a distribuição dos elementos terras raras devido a utilização de um monocromador multicamadas (multilayer) produzindo fótons com energia de 71,5 keV.

Em **VINCZE ET AL (2002b)**, os autores investigam a distribuição de contaminantes em partículas sedimentares do porto de Nova York/Nova Jersey por microtomografia por fluorescência de raios X. O conhecimento dessa distribuição é necessário para permitir o desenvolvimento de métodos mais refinados de limpeza dos sedimentos. O tamanho das partículas é da ordem de 30-80  $\mu\text{m}$ . Devido à baixa concentração dos elementos de interesse, é então utilizado a radiação síncrotron para excitação das partículas. O feixe utilizado é monocromático em 13 keV e é utilizado um capilar para obter um feixe de 2  $\mu\text{m}$ . Os elementos detectados foram Ti, Cr, Mn, Fe, Ni e Zn.

**CHUKALINA ET AL (2002)** apresentam um método semi-quantitativo para reconstrução das imagens por microtomografia por fluorescência de raios X. O método utilizado para reconstrução bidimensional é o método de reconstrução algébrico (ART). São apresentados os resultados para uma amostra de resina que é usada como substrato em experimentos de ICP/Plasma.

Em **CESAREO ET AL (2003)**, os autores descrevem um sistema multi-tomográfico para tomografia computadorizada que usa os raios X transmitidos, espalhados e por fluorescência para fazer imagens do objeto de interesse. Os resultados mostraram que a intensidade dos fótons transmitidos é, aproximadamente, duas ordens de magnitude maior que para tomografia Compton, tomografia Rayleigh e tomografia por fluorescência de raios X. O que implica um maior tempo para aquisição da tomografia Compton e Rayleigh. Comparando os métodos eles chegaram a conclusão que:

- A tomografia por transmissão é claramente a técnica de imagem por raios X mais utilizada. Porém essa técnica possui limitações que estão relacionadas com grandes amostras que não são atravessadas por raios X ou raios gama, ou amostras que não são acessíveis de ambos os lados ou não podem ser movidas até o sistema fonte-detector. Além disso, essa técnica perde em contraste se o

material sob inspeção possui apenas materiais de número atômico similar.

- A tomografia Compton pode ser aplicada em casos em que a amostra não é acessível dos dois lados e, para imagens de parte de amostras grandes. A tomografia Compton pode dar um melhor resultado em caso de fraturas em amostras de baixa densidade.
- A tomografia por difração ou Rayleigh pode ser extremamente útil para imagens de estruturas cristalinas, e pode ser usada como um tipo de impressão digital ou para detectar contaminantes em um dado objeto, como no caso da detecção de explosivos em bagagem.
- A tomografia por fluorescência de raios X pode ser útil para identificação e mapeamento de elementos com número atômico médio a alto, em matrizes de baixa densidade e é especialmente aplicada para pequenas amostras.

**GOLOSIO ET AL (2003)** propõem uma análise elementar de um grão de um meteorito de marte (NWA817) através da combinação de três técnicas tomográficas: fluorescência de raios X, Compton e transmissão de raios X. Os resultados devido a combinação das técnicas mostraram a distribuição interna dos elementos com  $Z \geq 15$  em termos da densidade e da fração de massa. Além disso, essas técnicas fornecem uma informação global da distribuição interna espacial dos elementos leves ( $Z < 15$ ) em termos da densidade total.

**NAGHEGOLFEIZI ET AL (2003)** apresentam a aplicação da microtomografia por fluorescência de raios X em partículas combustíveis TRISO SiC usadas em reatores nucleares. Neste mesmo trabalho é feita uma comparação entre a microtomografia por transmissão e por fluorescência de raios X e os seguintes resultados são obtidos:

- A microtomografia por transmissão é mais rápida;
- A microtomografia por fluorescência de raios X tem razão sinal-ruído melhor para elementos traços;

- A tomografia por fluorescência de raios X é cem a mil vezes mais sensível a distribuição elementar que a tomografia por transmissão.
- Duas desvantagens da fluorescência de raios X são a possibilidade de sobrepor as linhas de fluorescência de raios X e de saturar o detector com uma linha de fluorescência de raios X muito intensa.

É importante ressaltar que esse trabalho do Naghegolfeizi foi o primeiro trabalho que além de mostrar a distribuição elementar, mostrou a concentração ponto a ponto na amostra. Até então, mesmo os trabalhos com dados simulados não tinham mostrado se realmente conseguiram recuperar os valores de concentração.

**TAKEDA (2005)** apresenta uma análise de amostras biológicas utilizando duas técnicas diferentes: contraste de fase e tomografia por fluorescência de raios X. A técnica de contraste de fase revela detalhes na morfologia como o câncer ou detalhes nas estruturas dos órgãos, enquanto a tomografia por fluorescência de raios X dá o mapeamento dos elementos na amostra.

**CHUKALINA ET AL (2007)** neste trabalho comparam a tomografia por fluorescência com dois setups diferentes, utilizando o colimador confocal e sem o colimador confocal. A grande vantagem encontrada com o colimador confocal é a possibilidade de analisar pequenos volumes em uma amostra grande através de um “scanning” parcial.

**FELDKAMP ET AL (2007)** desenvolveram um sistema de microtomografia por fluorescência de raios X com um tubo microfoco utilizando capilares ópticos para alcançar um feixe com espessura de 16  $\mu\text{m}$ . Neste trabalho, foram analisadas plantas liofilizadas. Os resultados mostram uma análise qualitativa dos elementos K, Ca, Fe e Rb.

**SAMBER ET AL (2008)** apresenta uma análise de uma amostra de *Daphnia magna*, que é microcrustáceo de água doce, com cerca de 1.5 mm de comprimento. O experimento de microtomografia por fluorescência de raios X foi realizado no síncrotron de HASYLAB na Alemanha e teve como característica uma energia de 20,7

keV para um feixe com 15 µm de espessura. Os resultados mostram uma análise qualitativa dos elementos Ca, Fe e Zn em três dimensões. As imagens foram reconstruídas utilizando o algoritmo de retro projeção filtrada.

**TAKEUCHI ET AL (2009a)** desenvolveram um sistema de microtomografia por fluorescência de raios X confocal no síncrotron do Japão. Neste trabalho, foram analisadas inclusões metálicas em diamantes artificiais. Com o mesmo sistema, **TAKEUCHI ET AL (2009b)** analisou um micrometeorito da antártica e uma malha de cobre. Os resultados mostram uma análise qualitativa do elemento ferro na amostra de meteorito e do cobre na malha.

## **2.2 Quantificação dos elementos traços Zn, Cu e Fe em tecidos biológicos**

O interesse pelos elementos ferro, cobre e zinco vem acompanhando o interesse mundial em investigar elementos traços em amostras de tecido. Particularmente, zinco e cobre fazem parte de reações enzimáticas oxidativas. A respeito do ferro, mudanças na sua concentração devem ser associadas à vascularização e o aumento do suprimento do sangue para o crescimento de tumores.

A bioquímica do ferro, cobre e do zinco sugere que esses metais podem ter um importante papel na carcinogenesis. Um grande número de estudos examinou a relação entre esses metais e o risco de câncer em humanos e muitas relações significantes foram encontradas (**WU ET AL, 2004**).

**WU ET AL (2004)** apresentam um estudo em plasma sanguíneo com 3000 homens e 3244 mulheres. Esse estudo indica que pessoas com alto nível de ferro ou cobre no plasma sanguíneo tem um alto risco de morrer por câncer, mas que existem diferenças entre os sexos que devem ser estudadas. Uma relação entre o nível de zinco no plasma e o risco de câncer não foi conclusiva. Os números obtidos sugerem que as concentrações de ferro, cobre e zinco no plasma podem ser uma importante causa do câncer.

A justificação fisiológica relacionada com a concentração elementar e o câncer são muitas de acordo com as várias funções dos elementos, particularmente, elementos traços. O ferro, cobre e zinco não podem ser somente associados com funções que protegem o corpo da doença, mas também com processos que facilitam a sua propagação. Por exemplo, cobre e zinco agem como catalisadores para enzimas antioxidantes que tem o papel de defender o organismos humano contra a doença. Inversamente, o cobre pode agir como catalizador para produção dos radicais hidroxil que estão relacionados com a destruição do tecido. O ferro pode estar associado com o câncer de mama porque é o regulador para a produção de sítios de suprimentos de sangue, que são aumentados em áreas de tumor de mama. O zinco é um cofator (estrutura química que é necessária para atividade de uma enzima) para o grupo de anidrases carbônicas, enzimas que estão relacionadas com a hipoxia (deficiência de oxigênio), que é um dos indicadores de prognóstico de câncer de mama (**GERAKI ET AL, 2004a**).

Esses efeitos não são exclusivos de elementos com concentração muito baixa. A diferença de potássio, que é um elemento majoritário, entre amostras de tecido saudável e doente pode ser simplesmente o resultado do fato que a composição intracelular entre esses tecidos varia e o potássio é um dos mais abundantes elementos intracelular. A necessidade de crescimento do tumor pode permitir o acúmulo de nutrientes, portanto um aumento dos níveis dos elementos principais nas proximidades da lesão é esperado.

Entretanto, é difícil determinar qual desses efeitos envolvendo esses elementos prevalece na criação, desenvolvimento ou defesa contra o câncer. Um fato é que todos os estudos de níveis dos elementos em tecido saudáveis e doentes reportam que existe um aumento na concentração para a maioria dos elementos nas células tumorais. Na literatura, consideráveis discrepâncias existem entre o nível de quantificação da concentração dos elementos, refletindo em parte as significantes dificuldades e incertezas envolvendo esse tipo de análise. Dificuldades que envolvem desde a retirada da amostra ao método de quantificação.

Durante o procedimento de suspeita de câncer, uma parte do tecido é retirada do paciente e passada para o histopatologista para a devida análise. A análise requer uma



cuidadosa preparação das amostras de tecido que serão analisados por microscopia para obter os parâmetros de prognóstico como tamanho do tumor, tipo e classe. Um parâmetro importante na classificação dos tecidos é a quantificação dos elementos constituintes da amostra. A interpretação histopatológica requer um modelo de reconhecimento especializado, isto é, requer muita perícia, que só pode ser adquirida através de muitos anos de aprendizado com base na análise qualitativa da amostra de tecido. Esse é um processo dependente do observador.

Com relação à medida de concentração elementar em amostras de tecido de mama, o aumento nas concentrações elementares para as amostras de tumor foi reportada por um amplo intervalo de elementos. Para o método de análise por ativação de nêutrons (AAN) aplicado a tecidos de mama com alguma doença e sadios, **GARG ET AL (1994)** e **NG ET AL (1997)** estudaram amostras pareadas de tecido de mama (saudável e tumoral), enquanto que **KANIAS ET AL (1994)** comparou células de tumores malignos e benignos. Uma característica indesejável dessa técnica é a destruição das amostras de tecido devido a um fluxo de nêutrons de aproximadamente  $10^{12}$  nêutrons  $\text{cm}^{-2} \text{s}^{-1}$ . Então, se uma série de medidas envolvendo algumas técnicas analíticas é necessária, como, por exemplo, utilizar a difração de raios X em adição a investigação da concentração dos elementos, a análise por ativação de nêutrons não poderá ser utilizada.

Com relação à técnica de fluorescência de raios X e de difração de raios X para analisar amostras de tecido de mama, em **GERAKI ET AL (2002)**, os autores avaliaram oitenta amostras de tecido de mama, sendo que vinte amostras foram retiradas em par, isto é, vinte amostras de tumores com vinte correspondentes amostras de tecidos sadios. As outras quarenta amostras consistem em vinte amostras de tumor e vinte amostras de tecido saudável provenientes de cirurgias de redução de mama. A análise estatística dos resultados obtidos usando a técnica de fluorescência de raios X indicou elevação nos níveis de concentração dos elementos zinco, cobre e ferro nas amostras tumorais. O efeito foi mais proeminente para cobre e ferro. Os valores obtidos por Geraki estão apresentados na Tabela 2.1.

**Tabela 2.1** – Resultados da análise de amostras de tecidos de mama de Geraki et al (2002).

<i>Média (µg/g)</i>	<i>Amostras Pareadas</i>		<i>Amostras Independentes</i>	
	<i>Saudáveis</i>	<i>tumorais</i>	<i>saudáveis</i>	<i>tumorais</i>
Fe	11,58	18,84	6,06	16,40
Cu	0,29	0,89	0,24	0,86
Zn	2,68	6,53	1,69	7,38
<i>Mediana (µg/g)</i>				
Fe	8,37	18,47	3,01	10,19
Cu	0,26	0,78	0,2	0,84
Zn	2,12	4,89	1,49	7,73

**FARQHARSON e GERAKI (2004)** apresentam um estudo das concentrações de potássio, ferro, cobre e zinco em 77 tecidos de mama, sendo 38 classificados como saudável e 39 doentes, usando a técnica de fluorescência de raios X. Os perfis de espalhamento coerente foram medidos usando difração de raios X para estimar a proporção de tecido adiposo e fibroso em cada amostra. Neste artigo eles encontraram uma maior concentração dos metais ferro, cobre e zinco, nos tecidos doentes em relação aos tecidos saudáveis. Os valores obtidos por Farquarson e Geraki estão apresentados na Tabela 2.2.

**Tabela 2.2** – Resultados da análise de amostras de tecidos de mama de Farquarson e Geraki (2004).

<i>Média (µg/g)</i>	<i>Amostras Independentes</i>	
	<i>saudáveis</i>	<i>tumorais</i>
K	163	512
Fe	8,82	17,62
Cu	0,27	0,88
Zn	2,19	6,96

**GERAKI ET AL (2004a)** apresentam novos resultados sobre a concentração de Fe, Cu, Zn e K em amostras de tecido de mama doentes e saudáveis usando a técnica de fluorescência de raios X e de difração de raios X. Foram analisadas 120 amostras incluindo 37 pareadas de tecido saudável e doente. A análise estatística das concentrações elementares dos diferentes grupos mostram que os quatro elementos são obtidos em nível elevado nas amostras de tumor. O aumento é menos pronunciado para Fe e Cu e mais para K e Zn. Os valores obtidos por Geraki estão apresentados na Tabela 2.3.

**Tabela 2.3** – Resultados da análise de amostras de tecidos de mama de Geraki et al (2004a).

<i>Mediana (µg/g)</i>	<i>Amostras Pareadas</i>		<i>Amostras independentes</i>
	<i>saudáveis</i>	<i>tumorais</i>	<i>saudáveis</i>
K	224	952	168
Fe	7,71	15,49	2,55
Cu	0,27	0,86	0,19
Zn	1,69	7,12	1,44

Neste outro trabalho, **GERAKI ET AL (2004b)** analisaram 80 amostras, sendo 20 amostras pareadas, de tecido de mama saudáveis e cancerígenas usando a técnica de fluorescência de raios X para quantificar os níveis de Fe, Cu, Zn e K. Os valores obtidos por Geraki estão apresentados na Tabela 2.4.

**Tabela 2.4** – Resultados da análise de amostras de tecidos de mama de Geraki et al (2002).

<i>Média (µg/g)</i>	<i>Amostras Pareadas</i>		<i>Amostras Independentes</i>	
	<i>saudáveis</i>	<i>tumorais</i>	<i>saudáveis</i>	<i>tumorais</i>
K	438	1112	210	1032
Fe	14,1	21,7	7,0	18,8
Cu	0,33	0,96	0,29	0,95
Zn	2,9	6,9	1,8	7,7
<i>Mediana (µg/g)</i>				
K	390	1049	264	1003
Fe	10	21,4	3,3	15,9
Cu	0,3	0,85	0,29	0,95
Zn	2,3	5,2	1,7	7,2

**RAJU ET AL (2006)** apresentam um estudo das concentrações de Cl, K, Ca, Ti, Cr, Mn, Fe, Ni, Cu, Zn, As, Se, Br, Rb e Sr para tecido de mama normal e tumor usando Emissão de Raios X Induzida por Próton (PIXE). Para os elementos Cl, Ca, Cr, Fe, Cu, Zn, As, Se, Br, Rb e Sr, os resultados indicam um aumento da concentração desses elementos no tecido cancerígeno, e para os elementos K, Ti, Ni nenhum resultado significativo foi obtido. Os valores obtidos por Raju estão apresentados na Tabela 2.5.

**Tabela 2.5** – Resultados da análise de amostras de tecidos de mama de Raju et al (2006). Os valores de concentração estão em µg/g.

Elementos	Normal	Câncer	Valor p
Cl	3999,9 ± 267,46	6815,45 ± 664,58	0,0005
K	1381,05 ± 352,25	1550,77 ± 362,89	0,4008
Ca	157,16 ± 11,81	480,25 ± 32,75	0,0117
Ti	14,38 ± 2,79	15,96 ± 2,20	0,3491
Cr	31,97 ± 7,45	52,70 ± 7,08	0,0012
Mn	18,05 ± 2,23	17,29 ± 4,91	0,3794
Fe	299,53 ± 21,22	376,32 ± 29,32	0,0084
Ni	7,44 ± 1,70	8,57 ± 2,24	0,3720
Cu	42,00 ± 6,87	60,71 ± 18,21	0,0065
Zn	56,19 ± 5,79	126,23 ± 12,72	0,0005
As	2,57 ± 1,48	4,12 ± 1,64	0,0187
Se	0,66 ± 0,08	1,32 ± 0,49	0,0340
Br	9,03 ± 2,22	16,51 ± 8,81	0,0016
Rb	12,45 ± 4,39	22,27 ± 10,02	0,0007
Sr	6,73 ± 3,78	13,71 ± 6,60	0,0019

**MAGALHÃES ET AL (2006)** mostram um estudo da distribuição elementar de P, S, Cl, K, Ca, Cr, Mn, Fe, Ni, Cu, Zn, Se, Br, Rb, Sr, I e Pb em tecidos normais e cancerígenos de cólon, mama e útero. A conclusão deste trabalho foi que para os elementos P, S, K, Ca, Fe e Cu houve um aumento da concentração nos tecidos cancerígenos. Para Zn e Br houve diminuição da concentração para os tecidos cancerígenos.

**KUBALA-KUKUS ET AL (2007)** apresentam os resultados para a análise elementar por Fluorescência de Raios X por Reflexão Total (TXRF) de 100 amostras de tecido de mama, sendo 26 câncer e 68 tumores benignos. Os elementos analisados foram P, S, Ca, Cr, Fe, Ni, Cu, Zn, Ge, Se, Rb, Pb. Os resultados obtidos por Kubala-Kukus estão apresentados na Tabela 2.6. O estudo comparativo mostrou maior

concentração dos elementos traços nas amostras de câncer.

**Tabela 2.6** – Resultados da análise de amostras de tecidos de mama de Kukus et al (2007). Os valores de concentração estão em  $\mu\text{g/g}$ .

<i>Média (<math>\mu\text{g/g}</math>)</i>	<i>Média (<math>\mu\text{g/g}</math>)</i>		<i>Mediana (<math>\mu\text{g/g}</math>)</i>	
	<i>maligno</i>	<i>benigno</i>	<i>maligno</i>	<i>menigno</i>
P	586 $\pm$ 416	236 $\pm$ 188	613	164
S	843 $\pm$ 50,9	614 $\pm$ 29	835	587
K	182 $\pm$ 23,1	72,3 $\pm$ 68,5	157	43,5
Ca	185 $\pm$ 45	63,9 $\pm$ 3,6	124	64,4
Cr	0,219 $\pm$ 0,171	0,169 $\pm$ 0,139	0,138	0,119
Fe	23,6 $\pm$ 5,17	13,3 $\pm$ 1,68	15,3	8,63
Ni	0,160 $\pm$ 0,136	0,097 $\pm$ 0,091	0,087	0,046
Cu	0,969 $\pm$ 0,134	1,2 $\pm$ 0,109	0,760	0,940
Zn	6,43 $\pm$ 0,767	5,43 $\pm$ 0,323	5,81	5,17
Ge	0,166 $\pm$ 0,099	0,137 $\pm$ 0,078	0,112	0,119
Se	0,156 $\pm$ 0,075	0,103 $\pm$ 0,049	0,144	0,074
Rb	0,257 $\pm$ 0,123	0,135 $\pm$ 0,070	0,249	0,091
Pb	0,335 $\pm$ 0,289	0,227 $\pm$ 0,195	0,171	0,170

**CARVALHO ET AL (2007)** mostram um estudo comparativo utilizando Fluorescência de Raios X por Dispersão de Energia (EDXRF), TXRF, Radiação synchrotron induzindo emissão de raios X e PIXE para analisar amostras de tecido de mama, pulmão, intestino, próstata, útero e plasma sanguíneo saudáveis e cancerígenos. Analisando os resultados obtidos, para Carvalho é obvio a importância dos elementos traços no câncer. Para amostra de mama, K, Fe, Cu, Zn, e Br tiveram um aumento significativo para o câncer em comparação com o tecido saudável. Já para as amostras de intestino, os elementos que tiveram aumento nas amostras de câncer foram Si, P, K, Ni, Cu. O Br apresentou uma redução de concentração em relação ao tecido saudável. Para as amostras de próstata os elementos com maior tendência de aumento nas amostras tumorais foram Mn, Co, Ni, Cu e Zn.

**MAJEWSKA ET AL (2007)** apresentam os resultados para a análise elementar por Fluorescência de Raios X por Reflexão Total (TXRF) para tecidos malignos e benignos de mama, pulmão e cólon. Foi encontrada diferença estatística entre tecidos cancerosos e não cancerosos de amostras pareadas para os elementos Fe e Se nas amostras de tecido de mama, Cu e Zn nas amostras de tecidos pulmonares e Zn nas amostras de tecido de cólon.

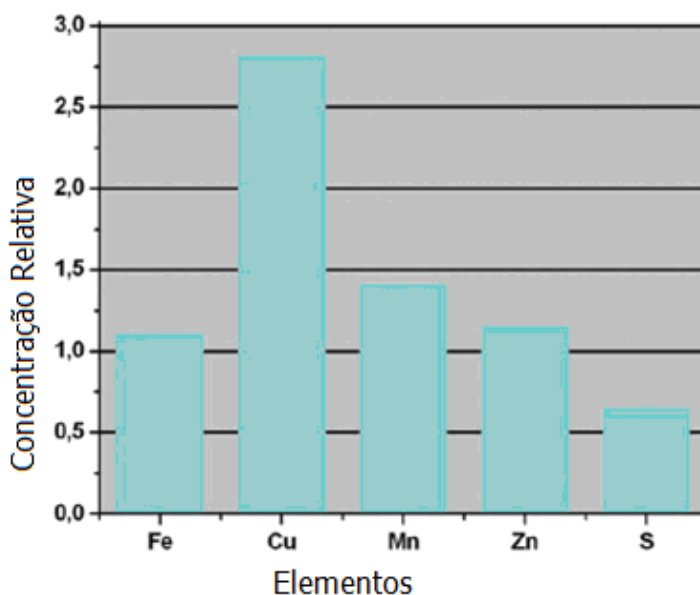
**SILVA ET AL (2008)** mostram um estudo da distribuição elementar de Ca, Fe, Cu, Zn em 26 tecidos normais e 26 tecidos cancerígenos de mama no mesmo paciente através da Fluorescência de raios X utilizando radiação síncrotron. A conclusão deste trabalho foi que para esses elementos houve um aumento na sua concentração nos tecidos cancerígenos quando comparados com os níveis de concentração nos tecidos saudáveis. Também foi observado que existe uma relação entre cobre e ferro, confirmando a hipótese de que ambos aumentam a atividade celular e o suprimento de sangue na formação de neoplasias em tecidos de mama.

**FARQHARSON ET AL (2009)** apresentam um estudo das concentrações de zinco em 59 amostras de tecidos de câncer de mama, sendo 34 com receptor para estrogênio positivo e 25 para receptor de estrogênio negativo. Foi utilizada a técnica de fluorescência de raios X utilizando radiação síncrotron para avaliar as concentrações. Neste artigo eles encontraram um nível de zinco cerca de 80% maior nos tecidos com receptor positivo para estrogênio comparado com os níveis de zinco para os tecidos com receptor negativo.

**SILVA ET AL (2009)** apresentam os resultados para a análise elementar por Fluorescência de Raios X por Reflexão Total (TXRF) de 83 amostras de tecido de mama. Os elementos analisados foram Ca, Ti, Fe, Cu e Zn. O estudo comparativo mostrou maior concentração dos elementos Ca, Fe, Cu e Zn nas amostras de tumores benignos e malignos comparadas com o tecido saudável. Mas entre os tumores, o ferro teve uma concentração mais elevada nas amostras malignas enquanto cobre, cálcio e zinco obtiveram uma concentração maior nas amostras de tumor benigno.

**KWIATEK ET AL (2007)** mostram uma análise dos tecidos de próstata

classificados como hiperplasia (HPB) utilizando radiação síncrotron. Os elementos analisados foram S, Mn, Cu, Fe e Zn. Os resultados mostraram que Mn, Cu, Fe e Zn possuem níveis mais altos na HPB comparados com tecidos saudáveis. O que não acontece para o S que possui maior concentração no tecido saudável. A Figura 2.1 mostra a razão da concentração desses elementos entre HPB e os tecidos saudáveis.



**Figura 2.1 – Gráfico com a razão da concentração entre Fe, Cu, Mn, Zn e S entre HPB e tecidos saudáveis.**

**VARTSKY ET AL (2003)** apresentam um estudo do teste Antígeno Prostático Específico (PSA) e dos níveis de zinco na próstata retirada de 28 pacientes. Foi obtido uma relação entre o nível de Zn na próstata e no nível de PSA no sangue que ajuda a diagnosticar o câncer de próstata e a HPB. A Tabela 2.7 apresenta os resultados da concentração de Zn na próstata utilizando XRF.

**Tabela 2.7 – Resultados da análise de amostras de tecidos de próstata de**



Vartsky et al (2003).

Diagnóstico	Zn ( $\mu\text{g/gm}$ )
HPB	120
HPB	58
HPB	56
HPB	111
HPB	35
HPB	7
HPB	85
HPB	92
HPB	72
HPB	69
HPB	72
HPB	173
HPB	204
HPB	157
HPB	139
HPB	329
HPB	106
Câncer	36
Câncer	15
Câncer	46
Câncer	49
Câncer	71
HPB/Câncer	46
HPB/Câncer	143
HPB/Câncer	54
HPB/Câncer	351

**ZAICHICK (2004)** apresenta os resultados de análise por ativação de nêutrons e

fluorescência por dispersão de energia, para concentração de Zn em próstata saudáveis. Foram analisadas 87 próstatas saudáveis de homens de 5 dias a 87 anos de idade. Os resultados mostraram um aumento nível de Zn para maiores de 40 anos. A Tabela 2.8 mostra os resultados obtidos por Zaichick.

**Tabela 2.8** – Resultados da concentração de Zn em próstata saudáveis obtidos por Zaichick (2004).

Idade (anos)	Média (mg/kg)
Abaixo de 1 ano	0,34 ± 0,12
2-13	6,1 ± 1,3
14-20	17,1 ± 0,8
21-30	26,4 ± 0,7
14-30	23,6 ± 1,1
31-40	35,8 ± 0,9
41-45	43,9 ± 0,3
46-50	49,4 ± 0,4
51-55	53,3 ± 0,7
56-65	61,1 ± 0,9
70-87	77,0 ± 3,9

**YAMAN ET AL (2005)** apresentam uma comparação entre a concentração de elementos traços Cd, Ni, Zn, Cu, Fe, Mg e Ca em tumores de próstata benignos e malignos utilizando espectrometria por absorção atômica. Os resultados mostram uma alta concentração de Cd nos dois tipos de tecido. Já para os elementos Ni, Zn, Fe, Cu, Mg e Ca obteve-se uma maior concentração no tumor maligno. A Tabela 2.9 mostra os resultados obtidos por Yaman.

**Tabela 2.9** – Resultados da análise de amostras de tecidos de próstata de

Yaman (2005).

Elementos	Malignos	<i>Benignos</i>
Cd (ng/g)	69 ± 29	79 ± 40
Ni (ng/g)	473 ± 310	267 ± 203
Cu (mg/kg)	0,8 ± 0,6	0,6 ± 0,2
Zn (mg/kg)	68 ± 31	47 ± 15
Fe (mg/kg)	30 ± 21	18 ± 9
Mg (mg/kg)	210 ± 144	144 ± 64
Ca (mg/kg)	1441 ± 646	787 ± 675

**PODGÓRCZYK ET AL (2008)** apresentam uma comparação entre a concentração de zinco em amostra de tecido de próstata saudável, com câncer e com HPB utilizando a técnica de fluorescência de raios X com radiação síncrotron. Os resultados mostram uma tendência a baixa concentração de zinco no câncer comparada com o tecido saudável de próstata e por outro lado, um aumento da concentração de zinco nas amostras de HPB em relação ao tecido saudável de próstata.

**SAPOTA ET AL (2009)** apresenta os resultados de uma análise por espectrometria por absorção atômica e fluorescência de raios X, para obter a concentração de Zn, Cu, Ca, Mg e Se em amostras de próstata saudável, com HPB e com câncer. Os resultados mostraram um aumento da concentração de Zn nas amostras de HPB e ao mesmo tempo uma redução da concentração de zinco em amostras de câncer. Foram analisadas 67 próstatas, sendo 27 com HPB, 29 cancer e 11 saudáveis.

## 3 Fundamentos teóricos

### 3.1 O Tecido de Mama

O câncer de mama é provavelmente o mais temido pelas mulheres, devido à sua alta frequência e, sobretudo pelos seus efeitos psicológicos, que afetam a percepção da sexualidade e a própria imagem pessoal. Ele é relativamente raro antes dos 35 anos de idade, mas acima desta faixa etária sua incidência cresce rápida e progressivamente.

Este tipo de câncer representa nos países ocidentais uma das principais causas de morte em mulheres. As estatísticas indicam o aumento de sua frequência tanto nos países desenvolvidos quanto nos países em desenvolvimento. Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), nas décadas de 60 e 70 registrou-se um aumento de 10 vezes nas taxas de incidência ajustadas por idade nos Registros de Câncer de Base Populacional de diversos continentes.

No Brasil, o câncer de mama é o que mais causa mortes entre as mulheres. De acordo com a Estimativa de Incidência de Câncer no Brasil para 2010, o número de casos novos de câncer de mama esperados no Brasil em 2010 é de 49.240, com um risco estimado de 49 casos a cada 100 mil mulheres **(INCa, 2009)**.

Entre as mulheres também há diferenças regionais. A taxa bruta para o câncer de mama no Sul (64,3%) e no Sudeste (64,5%) é praticamente o dobro da esperada para o Nordeste (30,1%) e o Centro-Oeste (37,7%) **(INCa, 2009)**.

Apesar de ser considerado um câncer de relativamente bom prognóstico, se diagnosticado e tratado oportunamente, as taxas de mortalidade por câncer de mama continuam elevadas no Brasil, muito provavelmente porque a doença ainda é diagnosticada em estádios avançados.

### 3.1.1 Anatomia e Fisiologia

Anatomicamente a mama pode ser subdividida nas seguintes estruturas:

**LOBO:** a mama humana contém de 15 a 18 lobos. Cada lobo tem um ducto principal que se abre no mamilo.

**UNIDADE DUCTAL TERMINAL:** ramos do ducto principal formam a unidade ductal terminal do lóbulo, que consiste nos ductos terminais extra e intralobular (Figura 3.1f).

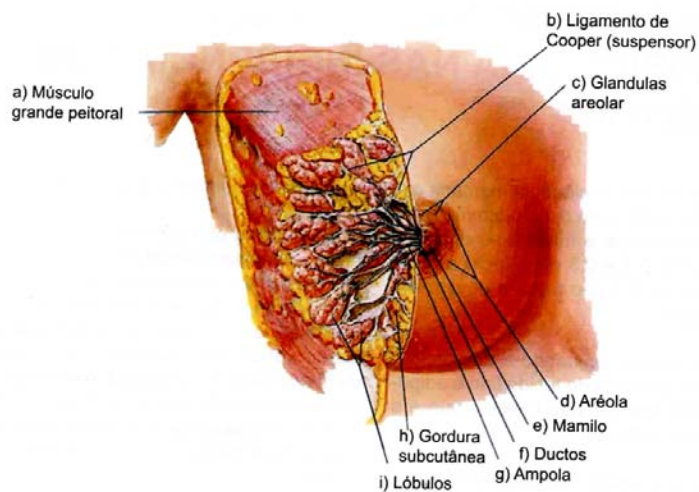
**LÓBULO:** o ducto intralobular terminal e os ductos apresentam revestimento especial, e ao perder o tecido conectivo formam um lóbulo (Figuras 3.1i e 3.2j). Em alguns textos um grupo de ductos corresponde ao Ácino. Os ductos terminais extra e intralobulares podem ser identificados por duas características:

- ✓ O ducto terminal extralobular é revestido por tecido elástico, enquanto o intralobular e os ductos não.
- ✓ O ducto terminal extralobular é coberto por células colmares, enquanto o ducto terminal intralobular contém células colóides.

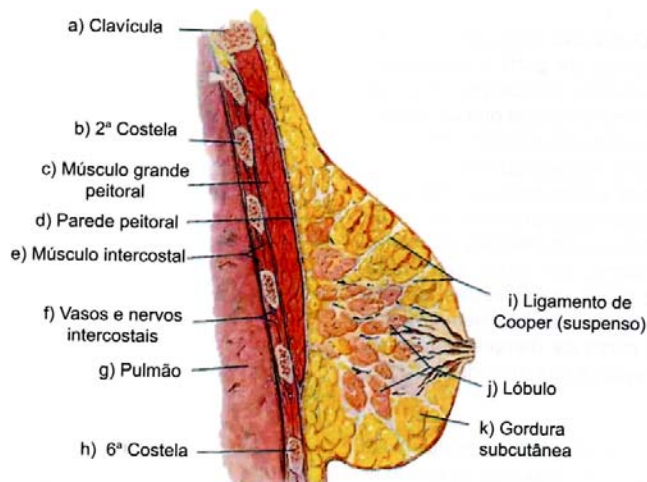
Os detalhes anatômicos são importantes, uma vez que certas doenças mamárias desenvolvem-se em localizações anatômicas específicas (**MAGALHÃES ET AL, 2005**).

As principais situações clínicas que mais frequentemente afetam a mama são:

- ✓ Carcinoma ductal em situ
- ✓ Carcinoma ductal infiltrante
- ✓ Carcinoma lobular infiltrante
- ✓ Fibroadenomas múltiplos (tumor benigno)
- ✓ Componentes de doença fibrocística (cistos, metaplasia apócrina, várias formas de adenoses e epitelioses). (tumor benigno)



**Figura 3.1** - Esquema da mama: Vista anterolateral (MAGALHÃES ET AL, 2005).



**Figura 3.2** - Esquema da mama: Vista sagital (MAGALHÃES ET AL, 2005).

## 3.2 O Tecido de Próstata

O câncer de próstata é a segunda causa de óbitos por câncer em homens, sendo superado apenas pelo de pulmão. Para 2010, estima-se a ocorrência de 52.350 casos novos para este tipo de câncer (INCa, 2009).

Em termos de valores absolutos, o câncer de próstata é o sexto tipo de câncer mais comum no mundo e o mais prevalente em homens, representando cerca de 10% do total de câncer. As taxas de incidência deste tipo de câncer são cerca de seis vezes maiores nos países desenvolvidos comparados aos países em desenvolvimento.

Mais do que qualquer outro tipo de câncer, este é considerado o câncer da terceira idade, uma vez que cerca de três quartos dos casos no mundo ocorrem a partir dos 65 anos. O aumento que vem sendo observado nas taxas de incidência pode ter sido influenciado especialmente em regiões onde o rastreamento através do teste Antígeno Prostático Específico é comum.

A mortalidade por câncer de próstata é relativamente baixa, o que reflete, em parte, seu bom prognóstico. As taxas são 2,5 maiores nos países desenvolvidos, comparado aos países em desenvolvimento em certas regiões do mundo, tendo uma razão mortalidade/ incidência variando de 0,13 na América do Norte a 0,80 na África. A sobrevida média mundial estimada em cinco anos é de 58%.

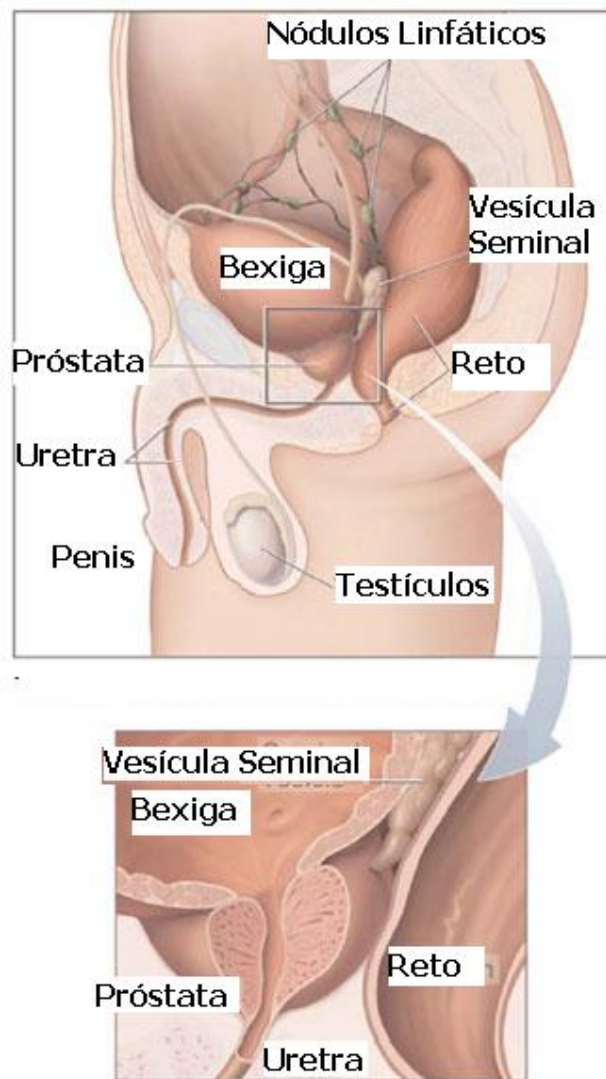
### **3.2.1 Anatomia e Fisiologia**

A próstata é uma glândula exclusiva do homem, em forma de castanha, colocada debaixo da bexiga e em frente do reto. A uretra (canal por onde sai a urina) atravessa-a pelo centro, de forma que a urina sai da bexiga atravessando a próstata. Os canais ejaculadores transportam os espermatozoides (produzidos nos testículos) e o sêmen (produzido nas vesículas seminais). Estes canais ejaculadores atravessam a próstata desde a sua parte posterior até à uretra. Através da próstata passam:

- A uretra (transporta a urina).
- Os canais ejaculadores (transportam espermatozoides e o sêmen).

Durante a infância, esta glândula é pequena, e aumenta de volume até atingir o seu volume normal durante a puberdade. No adulto, em condições normais, tem, aproximadamente as seguintes dimensões: 4 cm de largura, 2,5 cm de espessura e 3 cm

de comprimento, com peso médio de 20gr. A Figura 3.3 mostra um esquema da próstata.



**Figura 3.3 - Esquema da próstata (NCI, 2009).**

A certa altura da vida, geralmente a partir dos 40 anos, inicia-se, no interior da glândula prostática, um crescimento chamado hiperplasia benigna ou adenoma da próstata.

A próstata divide-se em 4 zonas prostáticas diferentes que possuem grande importância morfológica, funcional e patológica:



1. Estroma fibromuscular anterior: é uma zona sem glândulas que corresponde a 30% do tecido prostático total e cobre a face anterior da próstata glandular.
2. Zona periférica: constitui 70% da proporção glandular da próstata. A este nível desenvolvem-se 70- 80% dos cânceres da próstata.
3. Zona central: ocupa aproximadamente 25% da próstata glandular. Nesta zona originam-se só 10% dos cânceres da próstata.
4. Zona de transição, ou tecido pré-prostático: dispõe-se ao redor da uretra e a sua função é evitar que o sêmen passe à bexiga durante a ejaculação. Representa 5-10% da próstata a juventude. Posteriormente, a partir dos 40 anos, esta zona de transição cresce progressivamente, tendo lugar o desenvolvimento da hiperplasia benigna prostática (HBP).

As três situações clínicas que mais frequentemente afetam a próstata são:

- Hiperplasia Benigna da Próstata (HBP) – Consiste num crescimento benigno da prostata. A partir dos 40-50 anos, a próstata pode crescer rapidamente, desenvolvendo-se a hiperplasia benigna prostática, que é um tumor benigno mais comum nos homens.
- Prostatite – A prostatite deve-se ao estado inflamatório ou infeccioso da próstata.
- Carcinoma da Próstata – É o segundo caso de câncer mais freqüente em homens.

### **3.3 O Tecido de Pulmão**

O câncer de pulmão é o mais comum de todos os tumores malignos, apresentando um aumento por ano de 2% na sua incidência mundial. Em 90% dos casos diagnosticados está associado ao consumo de derivados de tabaco. No Brasil, o câncer de pulmão foi responsável por 14.715 óbitos em 2000, sendo o tipo de câncer que mais fez vítimas (INCa, 2009).

O número estimado de novos casos de câncer de pulmão no Brasil em 2010 é de 17.800 entre homens e de 9.830 nas mulheres (risco estimado de 18 casos novos a cada 100 mil homens e 10 a cada 100 mil mulheres). Sem considerar os tumores de pele não-melanoma, o câncer de pulmão em homens é o segundo mais frequente no Sul (35/100.000), Sudeste (21/100.000) e Centro-Oeste (16/100.000). Nas regiões Nordeste (9/100.000) e Norte (8/100.000) é o terceiro mais comum. Entre as mulheres, é o quarto mais frequente no Sul, Sudeste, Centro-Oeste e Norte (**INCa, 2009**).

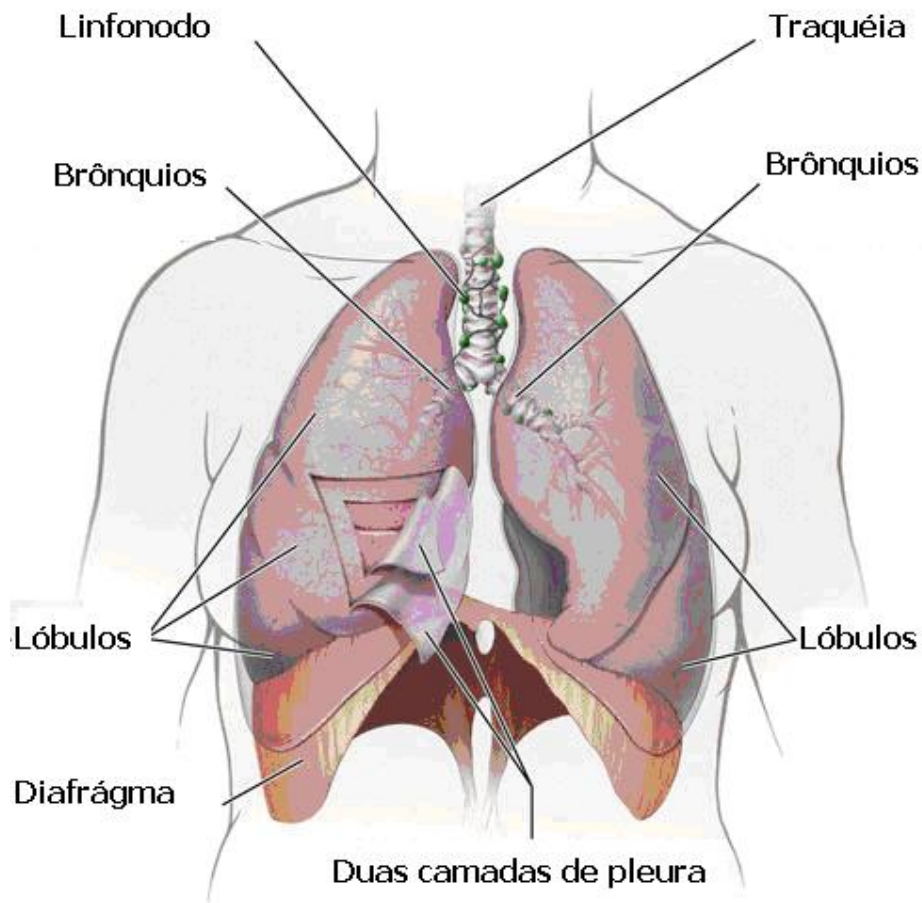
### **3.3.1 Anatomia e Fisiologia**

Os pulmões do ser humano são órgãos do sistema respiratório, responsáveis pelas trocas gasosas entre o ambiente e o sangue. São dois órgãos de forma piramidal, de consistência esponjosa medindo mais ou menos 25 cm de comprimento. Os pulmões são compostos de brônquios que se dividem em bronquíolos e alvéolos pulmonares. Os alvéolos totalizam-se em um total de 350 milhões e são estruturas saculares (semelhantes a sacos) que se formam no final de cada bronquíolo e têm em sua volta os chamados capilares pulmonares. Nos alvéolos se dão as trocas gasosas ou hematose pulmonar entre o meio ambiente e o corpo, com a entrada de oxigênio na hemoglobina do sangue (formando a oxiemoglobina) e saída do gás carbônico ou dióxido de carbono (que vem da célula como carboemoglobina) dos capilares para o alvéolo.

Os pulmões humanos são divididos em segmentos denominados lobos. O pulmão esquerdo possui dois lobos e o direito possui três. Os pulmões são revestidos externamente por uma membrana chamada pleura. Nos pulmões os brônquios ramificam-se profusamente, dando origem a tubos cada vez mais finos, os bronquíolos. O conjunto altamente ramificado de bronquíolos é a árvore brônquica ou árvore respiratória.

Cada bronquíolo termina em pequenas bolsas formadas por células epiteliais achatadas (tecido epitelial pavimentoso) recobertas por capilares sanguíneos, denominadas alvéolos pulmonares.

A base de cada pulmão apóia-se no diafragma, órgão músculo-membranoso que separa o tórax do abdomen, presente apenas em mamíferos, promovendo, juntamente com os músculos intercostais, os movimentos respiratórios. Localizado logo acima do estômago, o nervo frênico controla os movimentos do diafragma.

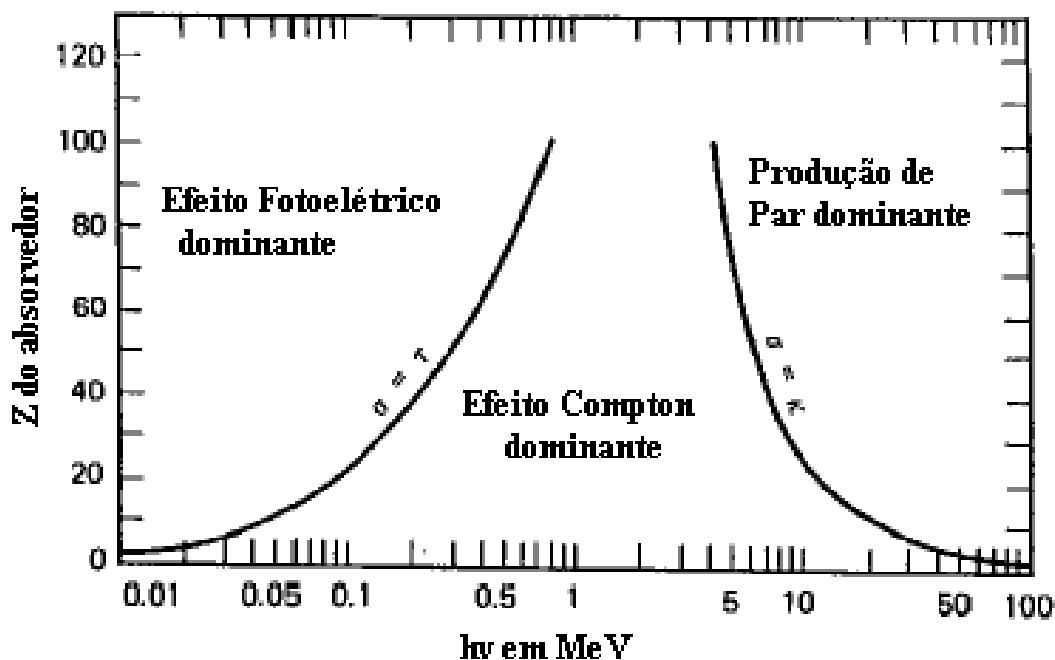


**Figura 3.4 - Esquema do pulmão (NCI, 2009).**

### 3.4 Interação dos raios X com a matéria

Diferentes fenômenos vêm sendo considerados como integrantes da base da Espectrometria de Raios X: a atenuação de raios X, tanto quanto sua deflexão e a interferência.

A atenuação de raios X deve-se à interação dos fótons com os elétrons nos orbitais ou com o núcleo dos átomos, resultando em três efeitos, que competem entre si, denominados: absorção fotoelétrica, espalhamento de raios X e produção de pares. Como mostra a Figura 3.4, o efeito fotoelétrico é predominante para energias abaixo de 100 keV, e é o mais importante efeito na espectrometria de raios X. A segunda componente mais importante para este processo é o espalhamento de raios X. A produção de pares não ocorre para energias menores do que 1,02 MeV, sendo desprezada para a espectrometria de raios X.



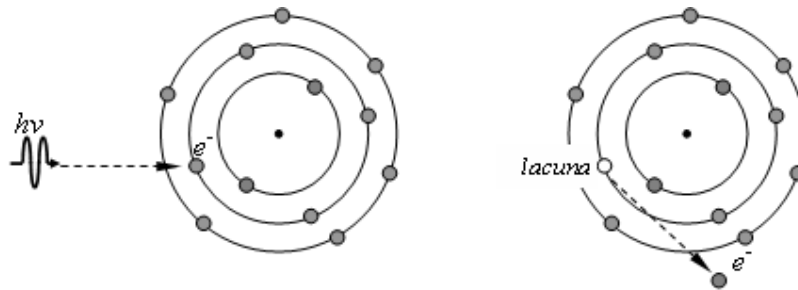
**Figura 3.4-** Efeitos predominantes para a atenuação de raios X em função do número atômico do material (Z) e da energia do fóton (hν) (ATTIX, 1986).

### 3.4.1 Efeito Fotoelétrico

O efeito fotoelétrico é caracterizado pela transferência total da energia da radiação X ou gama (que desaparece) a um único elétron orbital, que é expelido com uma energia cinética  $E_C$  bem definida,

$$E_C = h\nu - B_e \quad (3.1)$$

Onde  $h$  é a constante de Planck,  $\nu$  é a frequência da radiação e  $B_e$  é a energia de ligação do elétron orbital.



**Figura 3.5** - Desenho esquematizando a situação do efeito fotoelétrico.

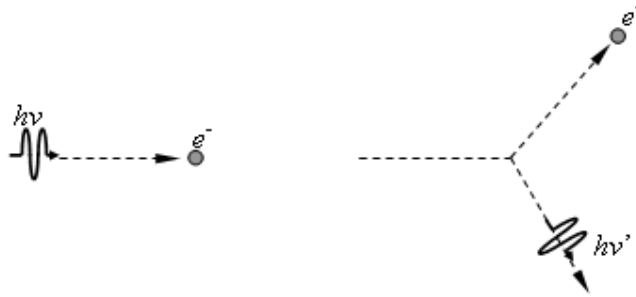
O efeito fotoelétrico é predominante para baixas energias e para elementos de número atômico elevado, pois a probabilidade aumenta com  $Z^4$  e decresce à medida que a energia aumenta.

### 3.4.2 Espalhamento Compton

O efeito Compton é um processo de interação que envolve um fóton e um elétron livre ou pouco ligado ao átomo. O fóton inicial dá origem a um novo fóton, de menor energia. A energia restante é transferida para o elétron Compton (ou de recuo) e muda de direção de propagação. Considerando que a energia e a quantidade de movimento têm de ser conservadas durante a interação, conclui-se que a energia cinética do elétron de recuo,  $E_c$ , é dada pela diferença entre a energia do fóton antes da interação (fóton incidente),  $h\nu$ , e depois da interação (fóton dispersado ou difundido),  $h\nu'$ .

$$E_e = h\nu - h\nu' \quad (3.2)$$

A energia transferida do fóton incidente para o elétron de recuo é máxima se a interação for frontal e será mínima no caso de uma interação tangencial. A probabilidade de ocorrer o efeito de Compton diminui quando a energia do fóton aumenta e aumenta com o número atômico dos materiais, sendo o elétron libertado uma partícula ionizante secundária.



**Figura 3.6** - Desenho esquematizando o espalhamento Compton.

## 3.5 Características do Feixe Primário

### 3.5.1 Radiação Síncrotron

Luz síncrotron é uma intensa radiação eletromagnética produzida por elétrons de alta energia num acelerador de partículas. A luz síncrotron abrange uma ampla faixa do espectro eletromagnético: raios X, luz ultravioleta e infravermelha, além da luz visível, que sensibiliza o olho humano, são emitidas pela fonte. (LNLS, 2009)

Uma vista geral do anel de armazenamento de elétrons do LNLS e da linha XRF é mostrada na Figura 3.7.



**Figura 3.7** - Vista geral do anel de armazenamento de elétrons do LNLS e da linha XRF.

As excelentes características da fonte de radiação síncrotron: alta intensidade, colimação natural, feixes de fótons monocromáticos com uma largura de banda de energia muito estreita, possibilidade de feixes bastante colimados (20micrometros) entre outras, fazem as fontes de radiação síncrotron apropriadas para aplicações tomográficas, principalmente a microtomografia por fluorescência de raios X.

O Laboratório Nacional de Luz Síncrotron (LNLS) esta situado em Campinas, cidade do estado de São Paulo (Brasil) e funciona desde julho de 1997 como primeira fonte de luz síncrotron existente em todo o hemisfério sul. O acelerador possui 12 dipolos e um *wiggler* multipolar híbrido. Em torno da fonte de luz síncrotron, funcionam atualmente doze linhas de luz com suas respectivas estações experimentais, de um total previsto de 24. Em três dessas linhas chegam feixes de radiação ultravioleta e em nove chegam feixes de raios X. Atualmente, as condições de trabalho da fonte síncrotron do LNLS são: 1,37 GeV, 250 mA de corrente máxima e 15 h de tempo vida. A linha de Fluorescência de Raios X, onde esse trabalho foi realizado, é o dipolo D09B do anel de armazenamento. As características desta linha estão apresentadas na Tabela 3.1.

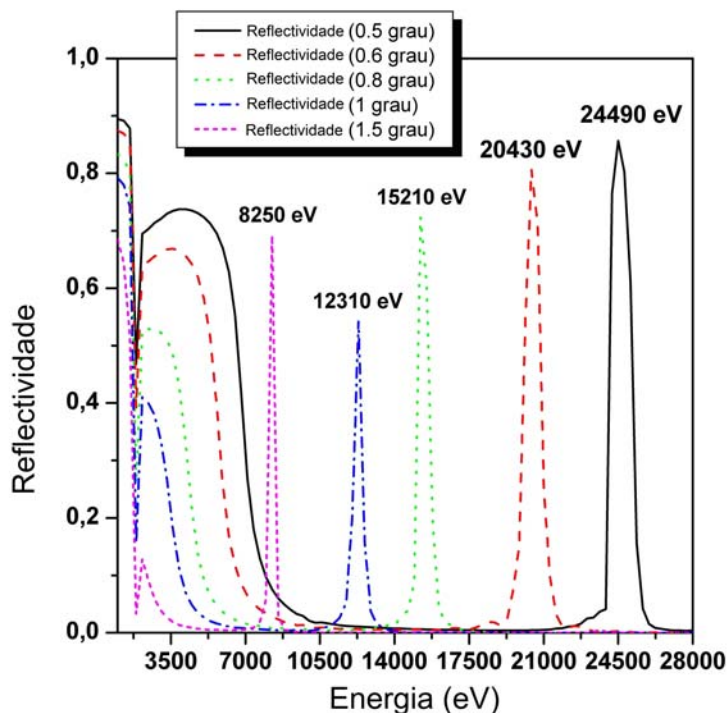
**Tabela 3.1 – Características da Linha XRF (LNLS, 2009).**

D09B – XRF (4-23 keV)	CARACTERÍSTICAS
<b>Aplicações</b>	Destinada à análise da composição química multi-elementar ( $Z > 14$ ), a níveis de traços e ultra-traços, em materiais provenientes das áreas do meio ambiente, ciências dos materiais, biológicas e geológicas, perfil de profundidade química de filmes finos e mapeamento químico a 20 $\mu\text{m}$ de resolução espacial.
<b>Fonte</b>	Ímã defletor D09B ( $15^\circ$ ), $\sigma_y = 0,222$ mm, fluxo na amostra $4 \times 10^9$ fótons/s a 8 keV.
<b>Monocromador</b>	Monocromador <i>channel-cut</i> .
<b>Cristais</b>	Si (111) ( $2d = 6,217 \text{ \AA}$ ): 4-14 keV ( $E/\Delta E = 2800$ ); Si (220) ( $2d = 3,84 \text{ \AA}$ ): 5-23 keV ( $E/\Delta E = 15000$ ).
<b>Detectores</b>	Detector de estado sólido Ge hiperpuro (resolução de 150 eV) e Si(Li) (resolução de 165 eV); fotodiodos e câmaras de ionização.
<b>Óptica</b>	Óptica capilar com 20 $\mu\text{m}$ de resolução espacial.
<b>Manuseio de amostras</b>	Câmara de vácuo com geometria de excitação convencional ( $45^\circ$ - $45^\circ$ ). Estações para experiências a incidência rasante e mapeamento 2D, ambas com controle total de posicionamento de amostras.



### 3.5.2 Cristal Multicamadas

Os cristais multicamadas fazem parte de uma nova geração de componentes ópticos de raios X baseados na difração de cristais sintéticos. Esses cristais consistem de várias e alternadas camadas de dois materiais A e B. Esses materiais devem possuir uma diferença significativa nos seus índices de refração. Na maioria das vezes são produzidos n pares de camadas formando uma estrutura com períodos uniformes  $d = t_A + t_B$  depositando alternadamente finas camadas em cima de um substrato liso. Tipicamente, n é da ordem de 10 a 200. O material A é um material de baixo Z como, por exemplo, o carbono e o silício e o material B é um material de alto Z como, por exemplo, o tungstênio e a platina. A eficiência de difração pode ser de 50 a 80% para larguras de banda de 0,005 a 0,1 (EBASHI ET AL,1991).



**Figura 3.8** – Curva de Refletividade em função da energia.

O desempenho do cristal multicamadas é influenciado principalmente pelo índice de refração dos materiais e o número e a espessura individual das camadas.

A Figura 3.8 apresenta a curva de refletividade em função da energia do cristal W-C com 75 pares de camadas, com  $\Delta E/E = 0,03$ , utilizado neste experimento.

### 3.6 Fluorescência de raios X

Pode-se dizer que o átomo está em estado excitado quando possui uma vacância na sua camada interna. Quando essa vacância é preenchida por um elétron de uma camada mais externa é emitido um fóton de raio X ou um elétron Auger fazendo com que o átomo volte ao seu estado fundamental. Este fenômeno da emissão de raios X é conhecido como fluorescência induzida de raios X ou fluorescência de raios X.

Esse fóton emitido possui energia dada pela diferença de energia dos dois níveis atômicos. Essa diferença de energia é característica do elemento atômico.

A fração da radiação incidente que leva à emissão de uma determinada linha de raios X característicos é determinada por uma probabilidade de excitação que é produto de três outras probabilidades (**LACHANCE e CLAISSE, 1994**):

$$P_{E_i} = P_{nível} \cdot P_{linha} \cdot P_{fluorescência} \quad (3.3)$$

Onde:

$P_{nível}$  é a probabilidade que a radiação incidente retire elétrons de um dado nível quântico. Pode ser o nível K,L,M,N,O,...,etc.;

$P_{linha}$  é a probabilidade que uma determinada energia seja emitida dentro de sua série. Para um elétron retirado do nível K podemos ter as seguintes transições do nível

L: K-L<sub>2</sub> e K-L<sub>3</sub>;

P<sub>fluorescência</sub> é a probabilidade de ocorrer emissão de fluorescência de raios X ao invés de elétron Auger, a partir de uma transição realizada entre dois estados quânticos.

O rendimento de fluorescência  $\omega$  é definido como a probabilidade para que o fóton produzido seja liberado do átomo sem ser reabsorvido. Assim,  $\omega$  pode ser representado como:

$$\omega = \frac{n_s}{n_p} \quad (3.4)$$

$$n_p = n_s + n_A \quad (3.5)$$

Onde:

$n_s$  é o número de fótons produzidos como fluorescência de raios X;

$n_p$  é o número de fótons que são produzidos devido às vacâncias nos níveis e subníveis atômicos;

$n_A$  é o número de fótons que são reabsorvidos dentro do átomo.

O rendimento de fluorescência para a linha K é dado pelo número de fótons  $n_K$  emitidos como fluorescência de raios X, para todas as linhas K, dividido pelo número de fótons criados  $N_K$  devido às transições entre os estados quânticos. Assim, tem-se:

$$\omega_K = \frac{n_{K-L_3} + n_{K-L_2} + \dots}{N_K} = \frac{\sum n_K}{N_K} \quad (3.6)$$

É possível obter o rendimento de fluorescência  $\omega_L$  para as linhas L tendo três

diferentes valores:  $\omega_{L1}$ ,  $\omega_{L2}$ ,  $\omega_{L3}$ .

Pode-se definir o rendimento de fluorescência de um modo geral como o número de raios X efetivamente emitidos em relação ao número de vacâncias produzidas em um dado nível.

### 3.6.1 A Razão Salto/Absorção

A probabilidade de a radiação incidente retirar elétrons de um determinado nível está fortemente ligada com a fração da radiação que é absorvida no mesmo nível (LACHANCE e CLAISSE, 1994).

$$P_{\text{nível}} = \frac{\text{absorção da radiação num nível específico}}{\text{absorção da radiação em todos os níveis}} \quad (3.7)$$

Para a linha K, tem-se:

$$P_K = \frac{r_K - 1}{r_K} \quad (3.8)$$

Onde:

$$r_K = \frac{\tau_K + \tau_{L_1} + \tau_{L_2} + \tau_{L_3} + \tau_{M_1} + K}{\tau_{L_1} + \tau_{L_2} + \tau_{L_3} + \tau_{M_1} + K} \quad (3.9)$$

$\tau_K$  é a seção de choque para o efeito fotoelétrico;

$r_K$  é a razão de salto/absorção;

$r_K$  é definida em função da seção de choque de absorção fotoelétrica;

No caso da linha L:

$$P_L = \frac{r_L - 1}{r_L} \quad (3.10)$$

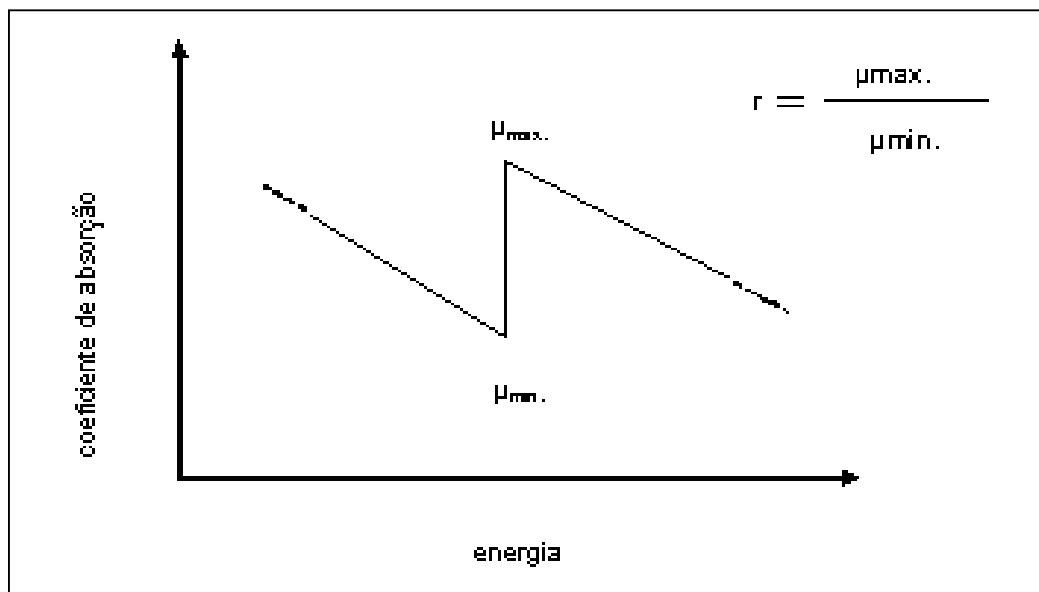
Na prática, a razão salto/absorção é calculada pela seguinte relação:

$$r = \frac{\tau_{E_{\text{absorção}}} - \Delta E}{\tau_{E_{\text{absorção}}} + \Delta E} \quad (3.11)$$

Na equação 3.11,  $\Delta E$  pode ser um valor pequeno nas proximidades de zero.

Os valores da razão salto/absorção para as linhas  $L_1$ ,  $L_2$ ,  $L_3$ ,  $M_1$ ,  $M_2$ , ... etc. são calculados da mesma forma.

Através da Figura 3.9 é possível ver o esquema representativo de uma curva de absorção fotoelétrica.

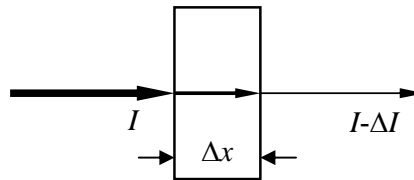


**Figura 3.9** – A razão salto/absorção.

### 3.7 Tomografia por Transmissão de Raios X (CT)

Uma fonte de radiação X monocromática produz um feixe com intensidade  $I$  e este feixe incide sobre uma lâmina de material heterogêneo de espessura  $\Delta x$ , Figura 3.10. Vamos assumir que no lado oposto da lâmina, o feixe esteja emergindo com intensidade  $I-\Delta I$ . Esta variação  $\Delta I$  é devido a interação da radiação com a lâmina (principalmente efeito fotoelétrico e Compton). Assumindo que todos os fótons possuam a mesma energia e que as probabilidades (seções de choque) para os efeitos fotoelétrico e Compton sejam respectivamente  $\tau(x)$  e  $\sigma(x)$  no ponto  $x$ , pode-se expressar matematicamente a variação da intensidade do feixe por unidade de comprimento como:

$$-\frac{\Delta I}{I} \cdot \frac{1}{\Delta x} = \tau(x) + \sigma(x) \quad (3.12)$$



**Figura 3.10** - Atenuação dos fótons de raios X quando atravessa um corpo.

Com o propósito de simplificar a determinação destas probabilidades, assume-se a determinação de um único parâmetro que represente a combinação dos dois efeitos e que indicará a atenuação média por comprimento devido aos mesmos efeitos e que receberá o nome de coeficiente de atenuação  $\mu(x)$ . Assim sendo, a equação anterior torna-se

$$-\frac{\Delta I}{I} \cdot \frac{1}{\Delta x} = \mu(x) \quad (3.13)$$

No limite, a variação infinitesimal de intensidade do feixe por comprimento será

$$\frac{1}{I} dI = -\mu(x)dx \quad (3.14)$$

Considerando que a lâmina apresentada inicialmente possua uma espessura total  $x$  e que o feixe (inicialmente com intensidade  $I_0$ ) emerge com intensidade  $I$ , pode-se integrar ambos os lados:

$$\int_{I_0}^I \frac{1}{I} dI = -\int_0^x \mu(x)dx \quad (3.15)$$

que resulta em

$$\ln \frac{I}{I_0} = -\int_0^x \mu(x)dx \quad (3.16)$$

ou ainda

$$I = I_0 \exp\left(-\int_0^x \mu(x) dx\right) \quad (3.17)$$

Na prática, tem-se os raios sendo emitidos da fonte e sendo detectados no instrumento de medida. Assim, o comprimento total  $[0,x]$  não é conhecido *a priori*, mas a expressão acima continua válida substituindo-se a integral definida por uma integral de linha como se segue:

$$I = I_0 \exp\left(-\oint_{\text{raio}} \mu(x)ds\right). \quad (3.18)$$

O termo entre parênteses, coeficiente da exponencial, é chamado de integral do raio, ou simplesmente raio-soma, por corresponder à soma de todos os coeficientes de atenuação ao longo de todo o trajeto da radiação, desde a fonte até o detector. Assim, o raio-soma pode ser determinado matematicamente por

$$\oint_{\text{raio}} \mu(x) ds = \ln \frac{I_0}{I} \quad (3.19)$$

O valor do raio-soma pode ser determinado experimentalmente tomando-se a intensidade da radiação na fonte e a medida no detector, após o corpo de prova.

Na pratica, se está interessado em determinar os coeficientes do corpo de prova em sua natureza bidimensional. Desta forma, o parâmetro  $\mu$  será função não mais de  $x$ , mas de  $x, y$ .

$$\oint_{\text{raio}} \mu(x, y) ds = \ln \frac{I_0}{I} \quad (3.20)$$

Assume-se, inicialmente, um caso bidimensional. Seja  $f(x,y)$  uma função bidimensional, onde as linhas que a cortam (em qualquer direção) são chamadas de raios, e a integral de linha ao longo destes raios são as integrais de raio ou raios-soma. Um conjunto de raios-soma, paralelos ou divergentes, forma uma projeção  $P(t)$ . No caso de raios paralelos, um raio soma contido em uma projeção pode ser descrito matematicamente por:

$$P_{\theta}(t) = \int_{AB} f(x, y) ds \quad (3.21)$$

onde  $AB$  define a linha ao longo do qual a integral será calculada,  $t$  é a posição do raio-soma dentro da projeção,  $ds$  é o passo infinitesimal ao longo do raio e  $\theta$  é a inclinação da linha  $AB$  em relação ao sistema de coordenadas  $XY$ , a partir do eixo  $y$ . Este raio  $AB$  é expresso algebricamente pela equação

$$t = x \cos \theta + y \sin \theta \quad (3.22)$$

Em outras palavras, para um dado ângulo  $\theta$ , somente as coordenadas  $x$  e  $y$  que satisfizerem a equação 3.22 é que estarão sobre a linha  $AB$ , e mais, somente os pontos  $f(x,y)$  com tais coordenadas irão contribuir com a integral de linha  $P_{\theta}(t)$ . Todo o restante



da função  $f(x,y)$  fora da linha  $AB$  não entrará no cálculo da integral para a posição  $t$  na projeção. Um artifício útil na matemática para “materializar” esta situação é o uso da “função” delta de Krönecker  $\delta(u)$ . Esta pseudofunção possui valor definido 1 quando seu argumento é 0, e é 0 no restante de seu domínio.

$$\delta(u) = \begin{cases} 1, & u = 0 \\ 0, & u \neq 0 \end{cases} \quad (3.23)$$

Assim, deseja-se separar os pontos de  $f(x,y)$  que estão sobre a linha  $AB$  – sabendo que somente as coordenadas  $x$  e  $y$  que satisfazem a equação  $x\cos\theta + y\sin\theta - t = 0$  são válidas, pode-se substituir a integral de linha pela integral dupla como segue

$$P_{\theta}(t) = \int_{AB} f(x, y) ds = \int_{-\infty-\infty}^{\infty} \int_{-\infty-\infty}^{\infty} f(x, y) \delta(x \cos \theta + y \sin \theta - t) dx dy \quad (3.24)$$

pois se  $x$  e  $y$  estão sobre  $AB \Rightarrow x\cos\theta + y\sin\theta - t = 0 \Rightarrow \delta(x\cos\theta+y\sin\theta-t) = \delta(0) = 1$  que implica em

$$\int_{-\infty-\infty}^{\infty} \int_{-\infty-\infty}^{\infty} f(x, y) \delta(x \cos \theta + y \sin \theta - t) dx dy = \iint f(x, y) dx dy \quad (3.25)$$

A função  $P_{\theta}(t)$  como função somente de  $t$  (para um dado valor fixo de  $\theta$ ) define a projeção paralela de  $f(x,y)$  para um ângulo  $\theta$ . A função bidimensional  $P_{\theta}(t)$  (com  $t$  e  $\theta$  variando) é o coeficiente da transformada de Radon de  $f(x,y)$ . Uma projeção tomada ao longo de um conjunto de raios paralelos é chamada de projeção paralela. Raios-soma divergentes também podem ser tomados para formar uma projeção. Tais projeções são chamadas de projeções de feixe em leque, uma vez que os raios-soma são divergentes, e neste caso, cada raio-soma, contido na projeção em leque, corresponderá a um ângulo  $\theta$  diferente, isto é, cada raio-soma terá uma inclinação em relação ao eixo  $y$ .

Retornando ao exemplo pratico, tinha-se que cada raio-soma era resultado da integral dos coeficientes de atenuação ao longo de um raio.

$$\oint_{\text{raio}} \mu(x, y) ds = \ln \frac{I_0}{I} \quad (3.26)$$

Torna-se bastante familiar que se  $\mu(x, y)$  é uma função bidimensional tal como  $f(x, y)$  no modelo matemático, então a integral da linha acima corresponde a um raio soma  $P_\theta(t)$ . Caso o corpo de prova seja transladado ao longo de uma trajetória perpendicular ao feixe de radiação e, a intervalos regulares deste deslocamento, levantasse os valores de  $I(t)$ , então se pode calcular os raios-soma correspondentes a cada intervalo e formar uma projeção paralela. Desta forma com a equação (3.25) podem-se obter as projeções:

$$\lambda_\theta(v) = \int_{-\infty}^{\infty} \int_{-\infty}^{\infty} dx dy \delta(x \cos \theta + y \sin \theta - v) \mu_B(x, y), \quad (3.27)$$

O lado direito da equação (3.27) é chamado de Transformada de Radon da distribuição  $\mu_B(x, y)$  e expressa a relação linear entre a função do objeto  $\mu_B(x, y)$  e os dados experimentais da projeção  $\lambda_\theta(v)$ . O problema da reconstrução é precisamente inverter a Transformada de Radon (equação 3.27) para encontrar  $\mu_B(x, y)$  a partir de um conjunto de projeções  $\lambda_\theta(v)$ .

### 3.8 Tomografia por fluorescência de raios X

A Tomografia por Fluorescência de Raios X (CTXRF) pode ser usada para investigar a distribuição dos elementos químicos dentro da amostra. Essa propriedade a torna uma ferramenta muito importante em vários campos de pesquisa como biologia, geologia ou ciências ambientais, ciência dos materiais e medicina.

As radiações de fluorescência emitidas pela amostra contêm diferentes energias, que correspondem as diferentes linhas de emissão dos diferentes elementos químicos presentes na amostra. O detector HPGe mede um espectro com essas linhas de emissão. A partir da área de cada linha de emissão será possível calcular a distribuição elementar

dentro da amostra. Essa medida corresponde à concentração do elemento ao longo do caminho do feixe. Para obter a distribuição espacial a amostra deve ser rotacionada e transladada através do feixe.

A tomografia gera uma imagem de uma fatia da amostra sem cortá-la. Com isso, a necessidade de seccionar a amostra para analisá-la é removida e o esforço para a preparação da amostra é reduzido. Já que não será preciso fazer cortes muito finos como é necessária na microfluorescência de raios X (**CHWIEJ ET AL, 2005**).

A aquisição dos dados da CTXRF gera uma matriz de dados chamada de sinograma. O sinograma consiste de um conjunto de raios soma que foram obtidos a cada ângulo de rotação da amostra. Para cada linha de emissão no espectro de fluorescência, é obtido um sinograma. O nome sinograma vem da forma da curva. A tomografia pode ser reconstruída a partir do sinograma por um algoritmo apropriado.

A complexidade da CTXRF faz com que seja necessário um algoritmo de reconstrução mais complexo que a tomografia por transmissão de raios X. A CTXRF necessita de correções de absorção. A radiação que incide na amostra sofre absorção até gerar a fluorescência na amostra, além disso, a radiação de fluorescência que é emitida dentro da amostra também sofre absorção até chegar ao detector.

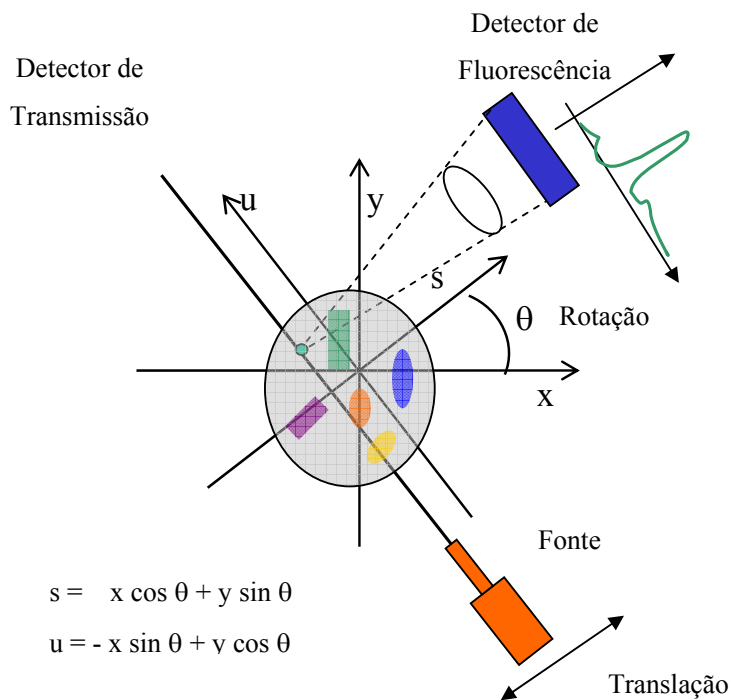
Será descrito a seguir o algoritmo de reconstrução para a CTXRF com correção para a absorção utilizado neste trabalho.

O esquema experimental da CTXRF é ilustrado na Figura 3.11. As projeções de fluorescência são obtidas colocando-se o detector a noventa graus da direção do feixe incidente. Essa localização do detector de fluorescência permite medir a radiação de fluorescência emitida pelos elementos presentes dentro da amostra. O detector de transmissão mostrado a zero grau da direção do feixe incidente, permite que os raios X transmitidos sejam medidos. Então, a densidade de absorção total pode ser encontrada usando as técnicas tomográficas convencionais (**PEREIRA, 2006**).

A amostra é basicamente dividida em uma série de *pixels* cuja dimensão do comprimento e da largura é igual ao tamanho do feixe incidente. A fluorescência de

raios X, de fato, é gerada por um elemento de volume ou “voxel”, porém assume-se que o volume total é reduzido a uma dimensão e é contido em uma fatia bidimensional da amostra.

Um único valor em uma projeção é obtido medindo-se a radiação de fluorescência de raios X emitida por todos os *pixels* ao longo do feixe. O objeto é então transladado, e outro valor é medido na projeção. Esses passos são repetidos até o objeto todo ser transladado perpendicular ao feixe, completando toda a projeção. O objeto é rotacionado, e outra projeção é medida. As projeções são medidas até o objeto completar 180° de rotação. A figura 3.11 mostra a geometria desse processo.



**Figura 3.11** - Geometria para obter as projeções de fluorescência e transmissão.

Normalmente, a fonte de raios X e o detector estão fixos, enquanto a amostra possui movimentos de rotação e translação. Entretanto, o problema da reconstrução é mais facilmente descrito em termos de uma amostra estacionária e um sistema móvel de fonte e detector. Na Figura 3.11, os dois eixos (x,y) são fixos com relação a amostra. O

eixo  $s$  e o eixo  $u$  são paralelos a direção de translação e ao feixe, respectivamente, e eles se relacionam com os eixos  $(x,y)$  por uma simples rotação.

$$s = x \cos \theta + y \sin \theta \quad u = -x \sin \theta + y \cos \theta \quad (3.28)$$

A entrada do conjunto de dados é representada pela taxa de contagens medida para um conjunto completo de passos de translação e rotação. Para cada valor de ângulo  $\theta$  e da translação  $s$  observados, os pontos da amostra que contribuem para a radiação de fluorescência de raios X são aqueles interceptados pelo feixe de raios X.

A contribuição do sinal detectado de um pequeno elemento  $du$ , ao longo do feixe, é função de:

$$dI(\theta, s) = I_0 f(\theta, s, u) p(s, u) g(\theta, s, u) du \quad (3.29)$$

onde  $I_0$  é a intensidade do feixe incidente;  $f(\theta, s, u)$  é a probabilidade de sobrevivência desde a fonte até o ponto  $u$ . Essa probabilidade está relacionada com o coeficiente de absorção  $\mu_B$  da amostra para a energia do feixe incidente como:

$$f(\theta, s, u) = \exp\left(-\int_{-\infty}^{+\infty} \mu_B(s, u') du'\right) \quad (3.30)$$

$p(s, u)du$  é a probabilidade que o fóton de fluorescência de raios X seja produzido a partir de um fóton incidente ao longo do caminho  $du$ .

$$p(s, u)du = \sigma_{ph} N_{elem} J_r w_0 du \quad (3.31)$$

onde,  $\sigma_{ph}$  é a seção de choque fotoelétrica para um determinado elemento escolhido para a energia incidente;  $N_{elem}$  é a concentração do elemento no ponto (s,u);  $J_r$  é o fator *branching*, isto é, a probabilidade que o átomo ejeje um elétron da camada de interesse em vez de um elétron de outro nível; e  $w_0$  é a fluorescência de raios X (fluorescence yield), isto é, a probabilidade que a vacância produzida por efeito fotoelétrico seja preenchida através da emissão de um fóton de fluorescência.

$g(\theta, s, u)$  é a probabilidade de um fóton de fluorescência de raios X emitido do ponto u alcançar o detector.

$$g(\theta, s, u) = \frac{1}{4\pi} \int_{\Omega_D} d\Omega \exp\left(- \int_{(s,u)}^{\det} \mu_F(l) dl\right) \quad (3.32)$$

onde  $\mu_F$  é o coeficiente de absorção da amostra para a energia de fluorescência de raios X e  $\Omega_D$  é o ângulo sólido do ponto de fluorescência de raios X até a superfície do detector.

A radiação que alcança o detector pode ser obtida pela integração ao longo do caminho du.

$$I(\theta, s) = I_0 \int_{-\infty}^{+\infty} f(\theta, s, u) p(s, u) g(\theta, s, u) du \quad (3.33)$$

Se a atenuação é pequena ( $\mu_B \approx \mu_F \approx 0$ ) e o ângulo sólido coberto pela superfície do detector varia ligeiramente de um ponto a outro da amostra, as funções  $f$  e  $g$  tornam-se:

$$f(\theta, s, u) \cong 1 \quad g(\theta, s, u) \cong g \quad (3.34)$$

$$I(\theta, s) = g \int_{-\infty}^{+\infty} p(s, u) du \quad (3.35)$$

A taxa de contagem é proporcional a Transformada de Radon da concentração do elemento químico  $N_{\text{elem}}$ , e o algoritmo de reconstrução usual da tomografia por transmissão pode ser usado. Por outro lado, quando a atenuação é relevante, os fatores de atenuação  $f$  e  $g$  precisam ser avaliados. Uma aproximação comum é determinar a distribuição dos coeficientes de absorção para a energia do feixe incidente ( $\mu_B$ ) e para a energia de fluorescência ( $\mu_F$ ) usando duas tomografias por transmissão convencionais, e calcular  $f$  e  $g$  através das equações 3.30 e 3.32. Com isso, a taxa de contagem não será mais proporcional a Transformada de Radon de  $N_{\text{elem}}$ , e os algoritmos de reconstrução devem considerar as correções para auto-absorção.

As correções para auto-absorção estão descritas a seguir e foram implementadas no algoritmo do **BRUNETTI e GOLOSIO (2001)**. O algoritmo foi dividido em duas etapas: MKCORR, algoritmo que gera a matriz de correção e SCTOMO, algoritmo que faz a retroprojeção. Neste trabalho foi utilizado MKCORR para gerar a matriz de correção e a reconstrução das tomografias por fluorescência de raios X e transmissão de raios X foram feitas utilizando o MATLAB<sup>®</sup>.

Aproximando a integral ao longo de  $u$  por uma soma discreta, a equação 3.33 pode ser expressa como:

$$I(\theta, s) = \sum_{u=-\infty}^{+\infty} I_0 f(\theta, s, u) p(s, u) g(\theta, s, u) du \quad (3.36)$$

Seguindo a idéia de **HOGAN (1991)**, pode-se considerar a contagem total como sendo a soma das contagens de todas as direções do feixe passando pelo ponto  $(s_0, u_0)$

$$I_{\text{total}}(s_0, u_0) = I(\theta_1, s_1) + I(\theta_2, s_2) + \dots + I(\theta_n, s_n) \quad (3.37)$$

Que pode ser expandida em termos de  $p$  e dos fatores de absorção  $f$  e  $g$  como

$$\begin{aligned}
I_{total}(s_0, u_0) &= \sum_{u_1} I_0 f(\theta_1, s_1, u_1) p(s_1, u_1) g(\theta_1, s_1, u_1) \\
&+ \sum_{u_2} I_0 f(\theta_2, s_2, u_2) p(s_2, u_2) g(\theta_2, s_2, u_2) \\
&+ \dots + \sum_{u_n} I_0 f(\theta_n, s_n, u_n) p(s_n, u_n) g(\theta_n, s_n, u_n).
\end{aligned} \tag{3.38}$$

Separando, nessa soma, a contribuição devido ao ponto  $(s_0, u_0)$ :

$$\begin{aligned}
I_{total}(s_0, u_0) &= I_0 f_0(\theta_1, s_1, u_1) p(s_0, u_0) g_0(\theta_1, s_1, u_1) \\
&+ I_0 f_0(\theta_2, s_2, u_2) p(s_2, u_2) g_0(\theta_2, s_2, u_2) \\
&+ \dots + I_0 f_0(\theta_n, s_n, u_n) p(s_n, u_n) g_0(\theta_n, s_n, u_n) \\
&+ \sum_{u_1 \neq u_0} I_0 f(\theta_1, s_1, u_1) p(s_1, u_1) g(\theta_1, s_1, u_1) \\
&+ \sum_{u_2 \neq u_0} I_0 f(\theta_2, s_2, u_2) p(s_2, u_2) g(\theta_2, s_2, u_2) \\
&+ \dots + \sum_{u_n \neq u_0} I_0 f(\theta_n, s_n, u_n) p(s_n, u_n) g(\theta_n, s_n, u_n).
\end{aligned} \tag{3.39}$$

Onde os índices zero nas funções  $f$  e  $g$  significam os fatores de absorção apropriados para o ponto  $(s_0, u_0)$ . Resolvendo para  $p(s_0, u_0)$ :

$$p(s_0, u_0) = \frac{I_{total}(s_0, u_0)}{I_0 \sum_{i=1}^n f_0(\theta_i, s_i, u_i) g_0(\theta_i, s_i, u_i)} + \sum (\text{outros termos}). \tag{3.40}$$

De acordo com **HOGAN (1991)**, os “outros termos” são ruídos que podem ser considerados como um artefato da retroprojeção. O ruído pode ser então removido pela convolução das projeções com um filtro adequado para retroprojeção, como por exemplo, Shepp-Logan. Com isso,  $p(s_0, u_0)$  pode ser aproximado como

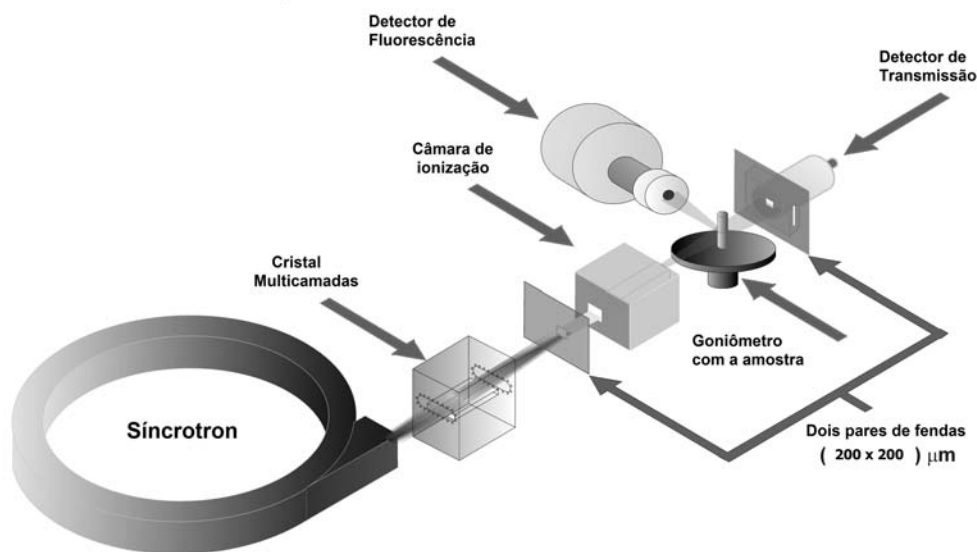
$$p(s_0, u_0) = \frac{\tilde{I}_{total}(s_0, u_0)}{I_0 \sum_{i=1}^n f_0(\theta_i, s_i, u_i) g_0(\theta_i, s_i, u_i)}, \tag{3.41}$$



Onde o símbolo  $\sim$  sobre o  $I_{\text{total}}$  representa a operação de retroprojeção filtrada. Os termos de absorção  $f_0(\theta_i, s_i, u_i)$  e  $g_0(\theta_i, s_i, u_i)$  podem ser obtidos, obtendo-se a distribuição dos coeficientes de absorção para a energia inicial do feixe e para a energia de fluorescência pela tomografia por transmissão de raios X.

## 4 Metodologia

O sistema de CTXRF foi implementado na linha de Fluorescência de Raios X (XRF) do Laboratório Nacional de Luz Síncrotron. O esquema experimental da microtomografia por fluorescência de raios X está mostrado na Figura 4.1. Para a excitação dos elementos foi utilizado um feixe quasi-monocromático com energia de 12keV,  $\Delta E/E = 0,03$  colimado com um par de fendas com dimensões de  $200 \times 200 \mu\text{m}^2$ . O cristal multicamadas é feito de W-C e possui 75 pares de camadas. A intensidade do feixe incidente foi monitorada por uma câmara de ionização colocada antes da amostra (PEREIRA, 2009a).



**Figura 4.1** – Esquema experimental.

A amostra foi colocada em um goniômetro. Esse goniômetro é posicionado sobre um motor de translação para que a amostra seja rotacionada e transladada na direção do feixe incidente. Um detector HPGe (CANBERRA Industries inc.), com resolução de 150 eV em 5,9 keV, com janela de berílio de 8,0  $\mu\text{m}$  de espessura, e uma área ativa de 30  $\text{mm}^2$ , foi posicionado a noventa graus do feixe incidente para coletar os fótons de fluorescência, enquanto os fótons transmitidos foram coletados por um detector cintilador rápido (NaI(Tl)- CYBERSTAR-Oxford anfyisk) posicionado atrás da amostra na direção do feixe incidente. O colimador do detector HPGe é de tântalo e

possui uma abertura circular com diâmetro de 2 mm. Essa geometria de detecção permite realizar medidas eficientes da fluorescência e ao mesmo tempo reduzir o espalhamento elástico e o espalhamento Compton (**PEREIRA, 2007a**).

Associado ao sistema fonte-detector de fluorescência existe o sistema eletrônico de detecção. O sistema eletrônico é constituído por um pré amplificador acoplado ao detector de fluorescência, um amplificador que recebe os pulsos vindo do pré amplificador. Os pulsos de saída do amplificador são enviados a uma placa MULTICANAL, inserida dentro de um microcomputador do tipo PC. Os pulsos obtidos pela câmara de ionização e pelo detector cintilador também são acoplados a um sistema eletrônico e são enviados ao microcomputador PC.

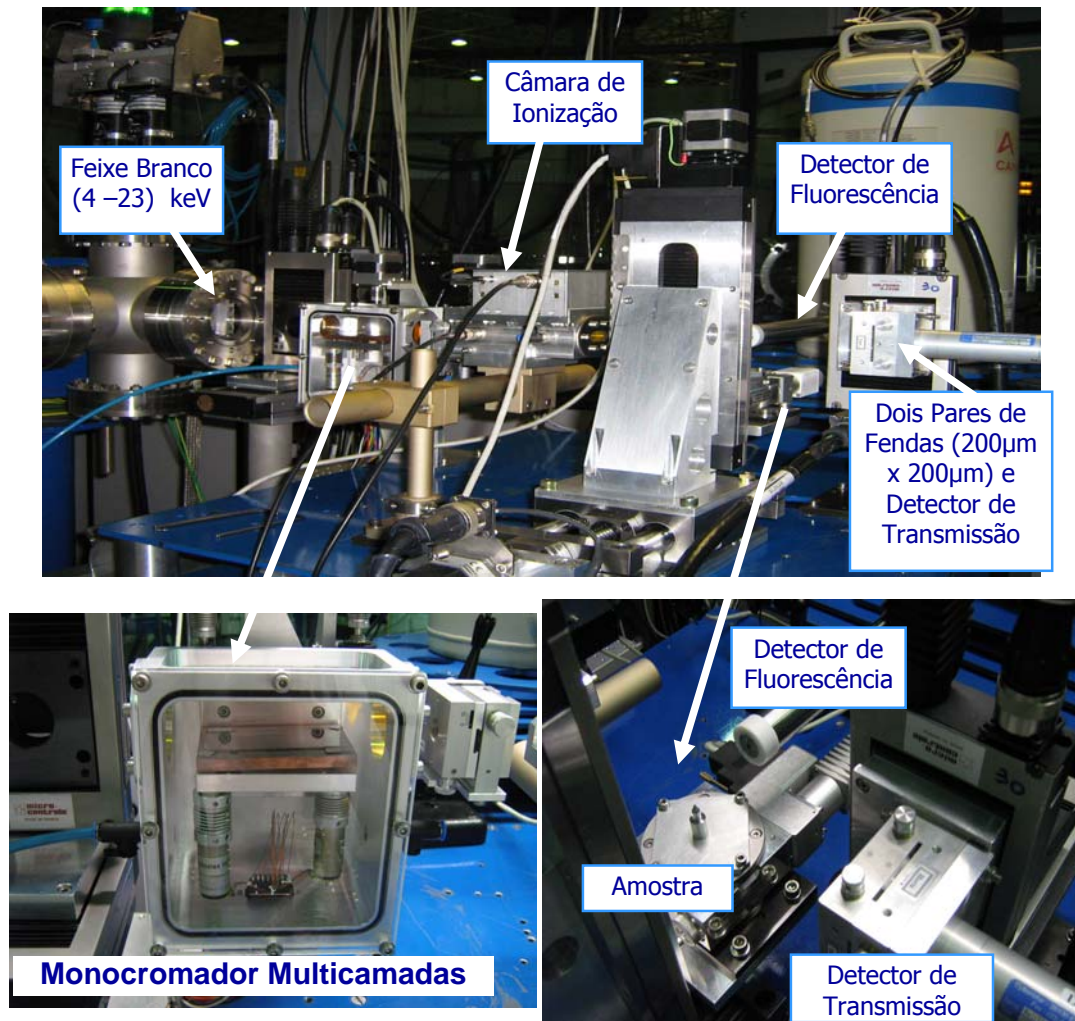
A fim de estudar o desempenho do sistema foram realizadas medidas de algumas amostras de referência feitas de polietileno e acrílico preenchidas com soluções padrão de ferro, cobre, zinco e gálio. O acrílico e o polietileno foram escolhidos devido ao seu baixo coeficiente de atenuação na faixa de energia de interesse.

Amostras de tecido biológico humano de mama, próstata e pulmão foram analisadas para verificar a eficiência do sistema na determinação da distribuição elementar nestes tipos de amostras.

As amostras de tecido de mama, próstata e pulmão foram liofilizadas antes de serem analisadas.

A qualidade da reconstrução é um compromisso entre o tempo de medição para se obter uma estatística de contagem aceitável para os picos de fluorescência e os passos necessários para transladar e rotacionar as amostras. Neste trabalho, as amostras foram rotacionadas em 180° com passos de 3° e transladadas perpendicularmente a direção do feixe com passos de 200 µm (tamanho do feixe incidente). O tempo de medida para cada ponto foi avaliado separadamente para cada amostra (**PEREIRA, 2009b**).

A Figura 4.2 apresenta uma fotografia do arranjo experimental utilizado no LNLS.



**Figura 4.2** – Fotografia do arranjo experimental.

Após os dados da microtomografia por fluorescência de raios X serem obtidos, os espectros foram analisados utilizando o software QXAS (Quantitative X-ray Analysis System) (BERNASCONI ET AL, 1996). O QXAS faz a análise dos picos de fluorescência de raios X e gera um arquivo de saída com todas as intensidades de fluorescência de raios X para cada elemento em cada raio soma.

As reconstruções das imagens por transmissão de raios X e por fluorescência de raios X foram feitas utilizando o MATLAB<sup>®</sup>. As matrizes de correção da tomografia por fluorescência de raios X foram obtidas utilizando o programa MKCORR desenvolvido por BRUNETTI e GOLOSIO (2001).

Como foi mostrado até agora, a microtomografia por fluorescência de raios X e a

tomografia por transmissão de raios X foram realizadas utilizando um feixe incidente com energia de 12 keV. Mas para implementar as correções de auto-absorção da fluorescência é preciso não só o coeficiente de atenuação para energia do feixe incidente, mas também, é preciso obter o coeficiente de atenuação para a energia da fluorescência de raios X. No caso do ferro, por exemplo, precisamos do mapeamento do coeficiente de atenuação na amostra para energia de 6,4keV, além do mapeamento do coeficiente de atenuação para a energia de 12 keV. Isso poderia ser obtido realizando na mesma posição da amostra que foi feita a tomografia a 12 keV, uma tomografia com energia do feixe incidente igual a 6,4keV. Utilizando a nossa instrumentação, com o cristal multicamadas, isso se torna inviável. Não é possível mudar a energia do feixe sem alterar a posição com que o feixe irá incidir na amostra.

Então, para resolver esse problema, foi estimado o mapa de coeficiente de atenuação para energia de fluorescência.

Foram analisados 14 compostos, utilizando os valores tabelados do **NIST (2009)**. Para cada composto, foi ajustado uma curva entre os dados tabelados na faixa de 5 a 15 keV (Dados que podem ser observados no apêndice A).

Foi calculada a razão entre os coeficientes de atenuação teóricos de 6,4 keV e 12 keV, de 8keV e 12 keV, de 8,6 keV e 12 keV e de 9,2 keV e 12 keV para cada material, correspondes, respectivamente, as energias  $K\alpha$  para ferro,  $K\alpha$  para cobre,  $K\alpha$  para zinco e  $K\alpha$  para gálio. A Tabela 4.1 apresenta os valores das razões obtidos para diversos materiais.

A matriz de coeficiente de atenuação para a energia de fluorescência foi gerada multiplicando-se a matriz de coeficiente de atenuação para 12 keV pelo valor da razão obtido na tabela para o material e energias correspondentes. Por exemplo, amostra de polietileno: a matriz de coeficiente de atenuação para 12 keV foi multiplicada por 3,16 para gerar a matriz de coeficiente de atenuação para 8,0 keV (energia do  $K\alpha$  para Cobre).

Como na tabela do NIST (2009) não estavam tabelados os valores para a próstata, foi considerado para a próstata os mesmos valores que para tecido de mama, já

que de acordo com os médicos do instituto de biologia que trabalham com o tecido de próstata, o tecido de próstata e o tecido de mama possuem características celulares muito semelhantes.

**Tabela 4.1** – Razão entre valores de coeficiente de atenuação.

MATERIAL	$\mu$ K $\alpha$ para Fe / $\mu$ 12keV	$\mu$ K $\alpha$ para Cu / $\mu$ 12keV	$\mu$ K $\alpha$ para Zn / $\mu$ 12keV	$\mu$ K $\alpha$ para Ga / $\mu$ 12keV
A150	6,02	3,17	2,58	2,13
Acrílico	6,48	3,31	2,67	2,19
Tecido adiposo	6,37	3,27	2,64	2,16
Ar seco	6,55	3,37	2,72	2,22
Alanina	6,47	3,31	2,67	2,18
B100	5,77	3,14	2,57	2,13
Bakelite	6,51	3,34	2,69	2,19
Sangue	6,39	3,36	2,72	2,23
Osso cortical	5,88	3,17	2,59	2,15
Cérebro	6,52	3,36	2,71	2,22
Mama	6,55	3,36	2,71	2,21
Pulmão	6,48	3,33	2,69	2,20
Polietileno	6,15	3,16	2,56	2,1
Tecido mole	6,37	3,29	2,66	2,18
<b>Média</b>	<b>6,32</b>	<b>3,28</b>	<b>2,66</b>	<b>2,18</b>

É interessante observar que os valores das razões não são muito diferentes, por exemplo, para o zinco os valores variam de 2,56 a 2,71, variação de 6 %. Para o cobre os valores variam de 3,14 a 3,37, variação de 7%. Para o ferro os valores variam de 5,77 a 6,55, variação de 14%.

## 5 Resultados e Discussões

A fim de verificar se o algoritmo utilizado está funcionando corretamente, uma maneira de testá-lo, foi verificar o valor do coeficiente de atenuação obtido para o acrílico e o polietileno.

O valor teórico do coeficiente de atenuação para o polietileno a 12 keV é de  $1,17\text{cm}^{-1}$ . Pode ser observado nas imagens tomográficas do padrão de polietileno (exemplo, Figuras 5.2 e 5.5) que o coeficiente de atenuação para o polietileno ficou na escala de cores entre 1,0 e  $1,5\text{cm}^{-1}$ . Faixa que compreende o valor teórico.

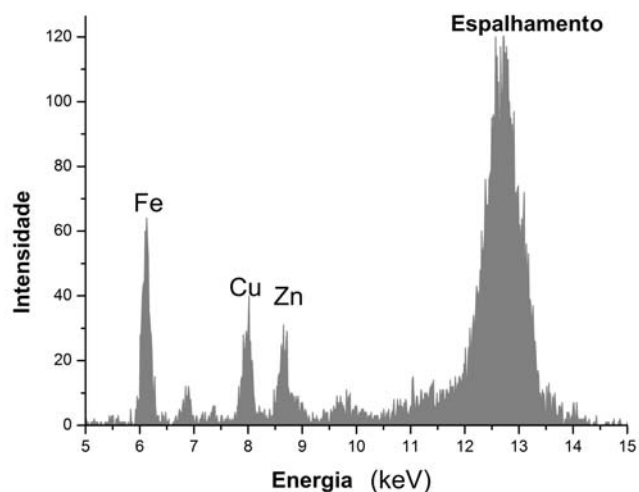
Já o valor teórico do coeficiente de atenuação para o acrílico a 12 keV é de  $2,33\text{cm}^{-1}$ , e também pode ser observado na imagem Figura 5.29, que o coeficiente de atenuação para o acrílico ficou na escala de cores entre 2 e  $2,5\text{cm}^{-1}$ , valor que também compreende o valor teórico.

Além da escala de cores, os valores foram confirmados verificando os valores numéricos obtidos para cada tomografia. O valor médio para o acrílico foi de  $2,3\text{cm}^{-1}$ , já para o polietileno, o valor médio obtido foi de  $1,3\text{cm}^{-1}$ .

Antes de cada tomografia ser iniciada, centralizamos o feixe incidente no centro da amostra para determinar os elementos traços. Um exemplo do espectro obtido para uma amostra de tecido maligno de mama é observado na Figura 5.1 (**PEREIRA, 2008**).

Nesse espectro podemos observar os elementos ferro, cobre e zinco e o espalhamento a  $90^\circ$  na amostra.

Todas as tomografias por fluorescência de raios X foram reconstruídas usando o algoritmo de retroprojeção filtrada com e sem correção para a absorção.



**Figura 5.1** Espectro de uma amostra de tumor maligno de mama (**PEREIRA, 2007b**).

A seguir serão apresentados os resultados para as amostras de referência, tecido de próstata e tecido de mama em duas dimensões e para o tecido de mama, tecido de próstata e tecido de pulmão em três dimensões. Para cada amostra serão mostrados os mapeamentos do coeficiente de atenuação a 12 keV e as tomografias por fluorescência de raios X.

## 5.1 Amostras de referência

Os resultados para as amostras de referência constituídas de polietileno estão apresentados nas Figuras 5.2 a 5.13. As amostras são constituídas por um cilindro de polietileno com diâmetro de aproximadamente dois milímetros com um cilindro interno com diâmetro de um milímetro preenchido com diferentes soluções (**PEREIRA, 2007c**). Enquanto a microtomografia por transmissão de raios X mostra a matriz de polietileno e a solução contida no cilindro interno, a microtomografia por fluorescência de raios X mostra somente aquelas regiões onde o elemento de interesse está localizado.

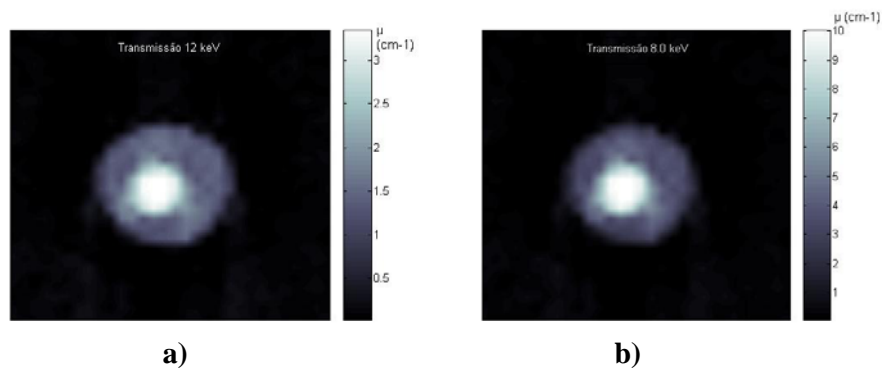
Para a amostra de referência contendo uma solução de cobre com 200  $\mu\text{g/g}$  serão apresentados as imagens da microtomografia por transmissão de raios X a 12 keV, a 8,0 keV, a matriz de correção da fluorescência e o resultado da microtomografia por fluorescência de raios X do cobre com e sem correção de absorção para mostrar todos



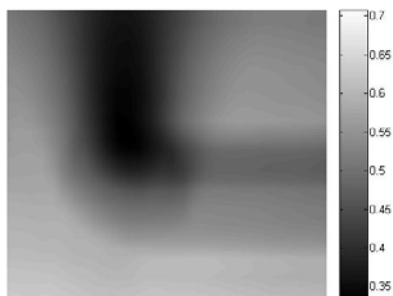
os resultados intermediários do processo. Já para os outros padrões só serão apresentados os resultados finais da microtomografia por transmissão de raios X a 12keV e os resultados da microtomografia por fluorescência de raios X para o elemento de interesse com a correção para a absorção.

***Dados da tomografia:***

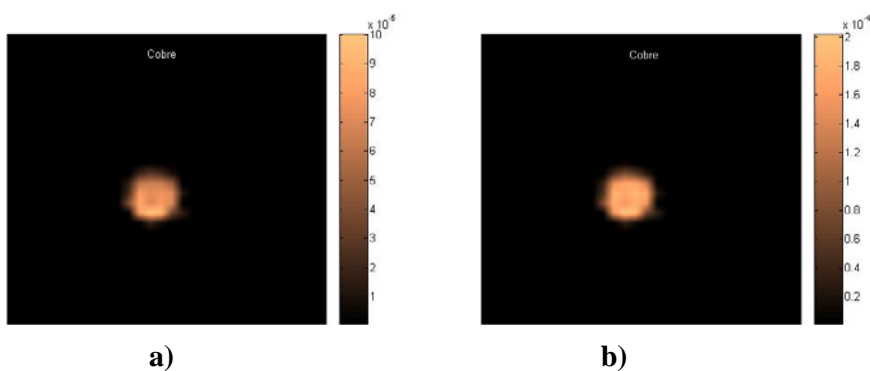
- **Amostra contendo solução padrão de Cu 200  $\mu\text{g/g}$**  – 60 projeções, 23 raios soma, tempo de aquisição para cada raio soma:  $t = 4$  segundos, passo da translação: 0,2 mm.



**Figura 5.2** – Imagem tomográfica por transmissão de raios X para a energia de 12 keV da amostra de referência de polietileno preenchida com solução padrão de Cu 200 $\mu\text{g/g}$  (Figura 5.2 a) e Estimativa da distribuição do coeficiente de atenuação para a energia de 8,0 keV para a mesma amostra (Figura 5.2 b).



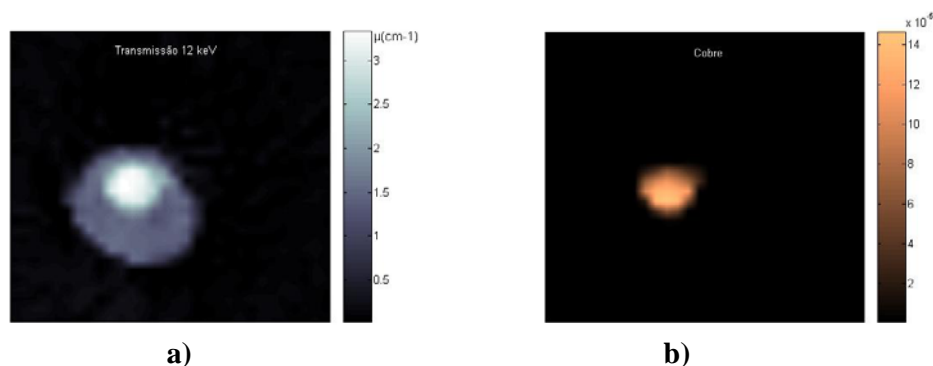
**Figura 5.3** Imagem da matriz de correção da absorção de raios X gerada a partir das matrizes de coeficientes de atenuação para 12keV e 8 keV.



**Figura 5.4** Imagem tomográfica por fluorescência de raios X do cobre sem correção de absorção (Figura 5.4 a) e Imagem tomográfica por fluorescência de raios X do cobre com correção de absorção (Figura 5.4 b) para amostra de referência de polietileno preenchida com solução padrão de Cu 200 $\mu$ g/g.

***Dados da tomografia:***

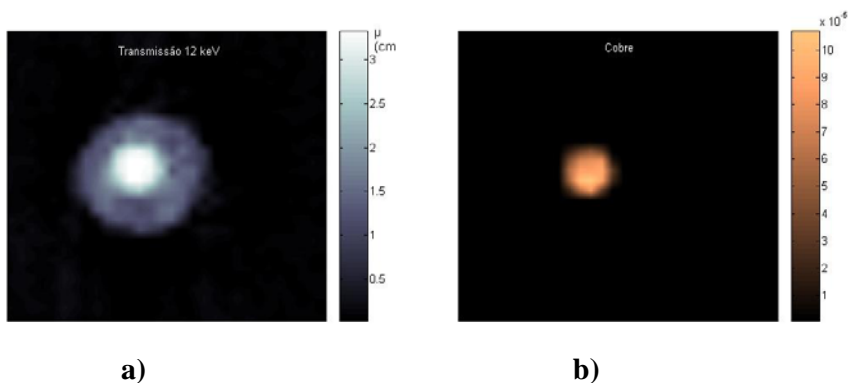
- **Amostra contendo solução padrão de Cu 150  $\mu$ g/g** – 60 projeções, 25 raios soma, tempo de aquisição para cada raio soma:  $t = 5$  segundos, passo da translação: 0,2 mm.



**Figura 5.5** Imagem tomográfica por transmissão de raios X para a energia de 12 keV da amostra de referência de polietileno preenchida com solução padrão de Cu 150 $\mu$ g/g (Figura 5.5 a) e Imagem tomográfica por fluorescência de raios X do cobre com correção de absorção para a mesma amostra (Figura 5.5 b)

***Dados da tomografia:***

- **Amostra contendo solução padrão de Cu 100  $\mu$ g/g** – 60 projeções, 23 raios soma, tempo de aquisição para cada raio soma: t = 5 segundos, passo da translação: 0,2 mm.

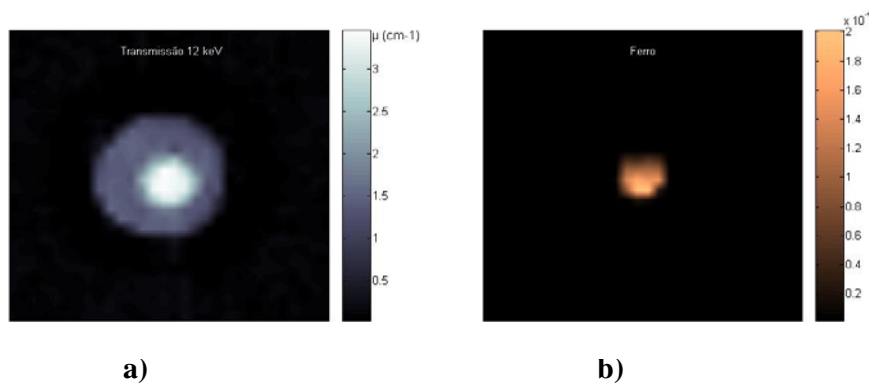


**Figura 5.6** Imagem tomográfica por transmissão de raios X para a energia de 12 keV da amostra de referência de polietileno preenchida com solução padrão de Cu 100 $\mu$ g/g (Figura 5.6 a)) e Imagem tomográfica por fluorescência de raios X do cobre com correção de absorção para a mesma amostra (Figura 5.6 b))

Analisando os resultados da tomografia por fluorescência de raios X sem correção e com correção de absorção para a soluções padrão de cobre de 200 $\mu\text{g/g}$ , pode-se perceber que com correção é obtido valor esperado da concentração. A tomografia sem correção mostra o mapeamento com um erro de mais ou menos 50% no valor da concentração que deveria ser obtido. Por exemplo, para a solução de cobre 200 $\mu\text{g/g}$ , sem correção é obtido o valor médio igual a 9E-5, que corresponde a 90E-6 (90  $\mu\text{g/g}$ ). Já com correção, é obtido o valor médio de concentração igual a 19E-5, que corresponde a 190E-6 (190  $\mu\text{g/g}$ ).

***Dados da tomografia:***

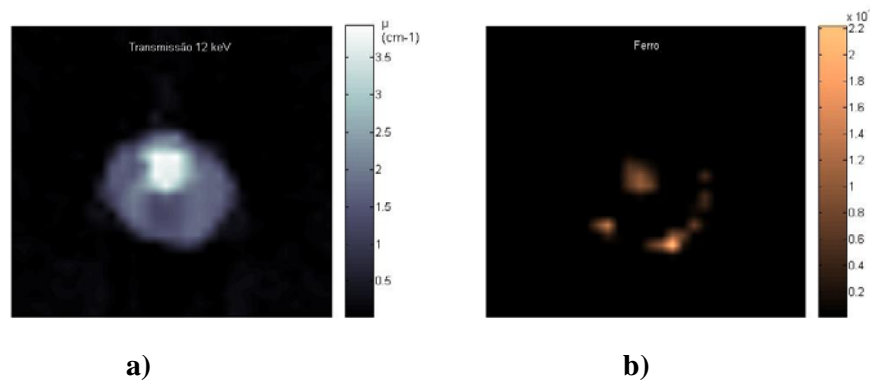
- **Amostra contendo solução padrão de Fe 200  $\mu\text{g/g}$**  – 60 projeções, 21 raios soma, tempo de aquisição para cada raio soma:  $t = 4$  segundos, passo da translação: 0,2 mm.



**Figura 5.7** Imagem tomográfica por transmissão de raios X para a energia de 12 keV da amostra de referência de polietileno preenchida com solução padrão de Fe 200 $\mu\text{g/g}$  (Figura 5.7 a) e Imagem tomográfica por fluorescência de raios X do ferro com correção de absorção para a mesma amostra (Figura 5.7 b)

**Dados da tomografia:**

- **Amostra contendo solução padrão de Fe 100 µg/g** – 60 projeções, 25 raios soma, tempo de aquisição para cada raio soma:  $t = 3$  segundos, passo da translação: 0,2 mm.

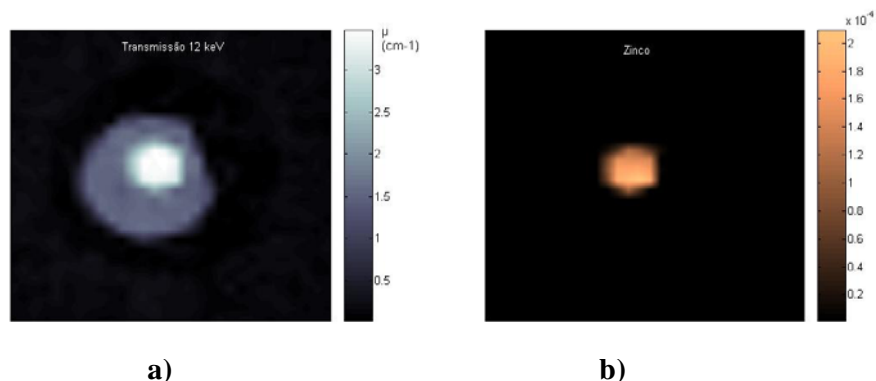


**Figura 5.8** Imagem tomográfica por transmissão de raios X para a energia de 12 keV da amostra de referência de polietileno preenchida com solução padrão de Fe 100µg/g (Figura 5.8 a) e Imagem tomográfica por fluorescência de raios X do ferro com correção de absorção para a mesma amostra (Figura 5.8 b)

Analisando os resultados da tomografia por fluorescência de raios X para as solução de ferro de 100µg/g, pode-se verificar que ocorreu uma contaminação de ferro 100µg/g na parede externa do polietileno durante a preparação da amostra de referência.

**Dados da tomografia:**

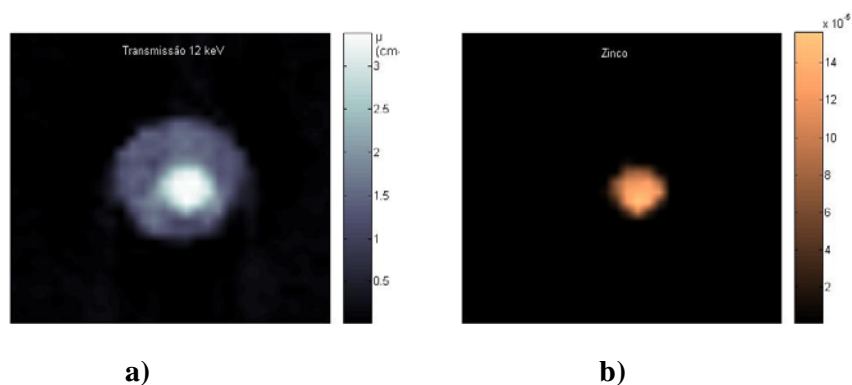
- **Amostra contendo solução padrão de Zn 200 µg/g** – 60 projeções, 23 raios soma, tempo de aquisição para cada raio soma:  $t = 5$  segundos, passo da translação: 0,2 mm.



**Figura 5.9** Imagem tomográfica por transmissão de raios X para a energia de 12 keV da amostra de referência de polietileno preenchida com solução padrão de Zn 200µg/g (Figura 5.9 a) e Imagem tomográfica por fluorescência de raios X do zinco com correção de absorção para a mesma amostra (Figura 5.9 b)

**Dados da tomografia:**

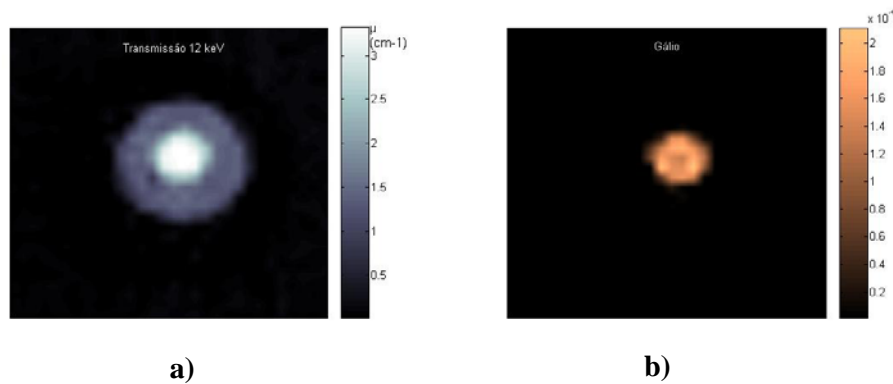
- **Amostra contendo solução padrão de Zn 150 µg/g** – 60 projeções, 24 raios soma, tempo de aquisição para cada raio soma:  $t = 4$  segundos, passo da translação: 0,2 mm.



**Figura 5.10** Imagem tomográfica por transmissão de raios X para a energia de 12 keV da amostra de referência de polietileno preenchida com solução padrão de Zn 150µg/g (Figura 5.10 a) e Imagem tomográfica por fluorescência de raios X do zinco com correção de absorção para a mesma amostra (Figura 5.10 b)

**Dados da tomografia:**

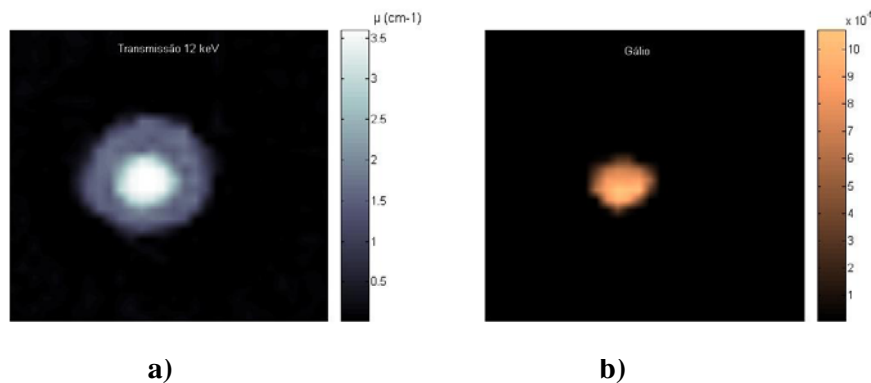
- **Amostra contendo solução padrão de Ga 200  $\mu\text{g/g}$**  – 60 projeções, 23 raios soma, tempo de aquisição para cada raio soma:  $t = 3$  segundos, passo da translação: 0,2 mm.



**Figura 5.11** Imagem tomográfica por transmissão de raios X para a energia de 12 keV da amostra de referência de polietileno preenchida com solução padrão de Ga 200 $\mu\text{g/g}$  (Figura 5.11 a) e Imagem tomográfica por fluorescência de raios X do gálio com correção de absorção para a mesma amostra (Figura 5.11 b)

**Dados da tomografia:**

- **Amostra contendo solução padrão de Ga 100  $\mu\text{g/g}$**  – 60 projeções, 25 raios soma, tempo de aquisição para cada raio soma:  $t = 4$  segundos, passo da translação: 0,2 mm.



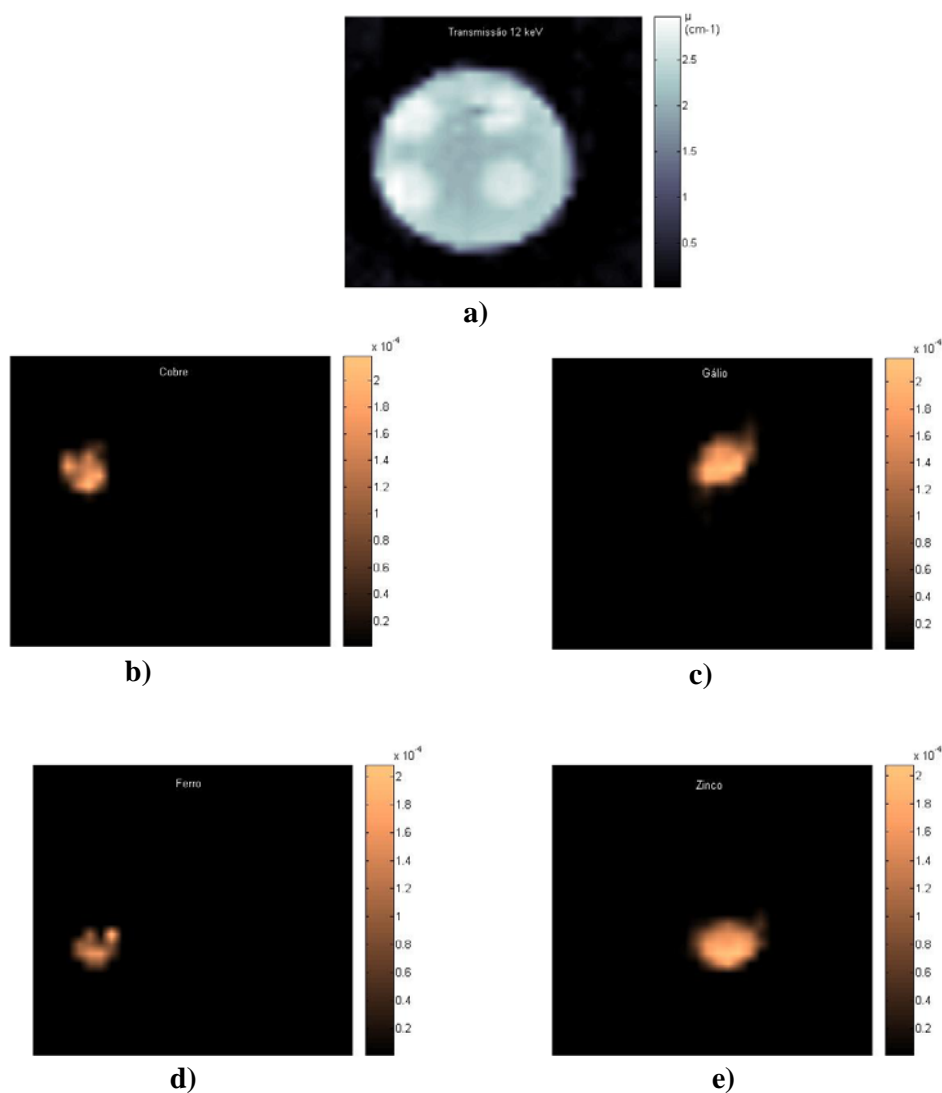
**Figura 5.12** Imagem tomográfica por transmissão de raios X para a energia de 12 keV da amostra de referência de polietileno preenchida com solução padrão de Ga 100 $\mu$ g/g (Figura 5.12 a) e Imagem tomográfica por fluorescência de raios X do gálio com correção de absorção para a mesma amostra (Figura 5.12 b)

O resultado para uma amostra de referência constituída de acrílico está apresentado na Figura 5.13. A amostra é constituída por um cilindro de acrílico com diâmetro de aproximadamente quatro milímetros com quatro cilindros internos com diâmetro de um milímetro preenchido quatro diferentes soluções (Fe 200 $\mu$ g/g, Cu 200  $\mu$ g/g, Zn 200 $\mu$ g/g, Ga 200  $\mu$ g/g). Enquanto a microtomografia por transmissão mostra a matriz de acrílico e as soluções contidas nos cilindros internos sem diferenciá-las, a microtomografia por fluorescência de raios X mostra somente aquelas regiões onde o elemento de interesse está localizado.

***Dados da tomografia:***

- **Amostra contendo solução padrão de Fe, Cu, Zn e Ga** – 60 projeções, 31 raios soma, tempo de aquisição para cada raio soma:  $t = 5$  segundos, passo da translação: 0,2 mm.





**Figura 5.13** Imagem tomográfica por transmissão de raios X para a energia de 12 keV da amostra de referência de acrílico preenchida com soluções padrão de Fe 200 $\mu$ g/g, Cu 200 $\mu$ g/g, Zn 200 $\mu$ g/g e Ga 200 $\mu$ g/g (Figura 5.13 a) e Imagem tomográfica por fluorescência de raios X do cobre (Figura 5.13 b), gálio (Figura 5.13 c), ferro (Figura 5.13 c) e zinco (Figura 5.13 d) com correção de absorção.

Analisando os resultados da tomografia por fluorescência de raios X da amostra de acrílico preenchida com soluções de ferro, cobre, zinco e gálio; pode-se perceber que foi possível identificar a localização de cada elemento separadamente o que não foi possível com a microtomografia por transmissão de raios X.

Comparando os resultados do mapeamento por fluorescência de raios X da amostra de acrílico sem correção e com correção de absorção para as soluções de ferro, cobre, zinco e gálio, pode-se perceber que o mapeamento com correção apresenta o valor esperado da concentração. Confirmando a necessidade de se utilizar o algoritmo com correção de absorção para obter o mapeamento e valor correto da concentração elementar na amostra.

A análise das amostras de referência é importante para mostrar a propriedade seletiva da técnica de tomografia por fluorescência de raios X, isto é, definindo a região de interesse de energia, pode-se obter a distribuição de cada elemento separadamente, sem a necessidade de cortar ou alterar as propriedades da amostra.

## 5.2 Amostras de Tecido de Próstata

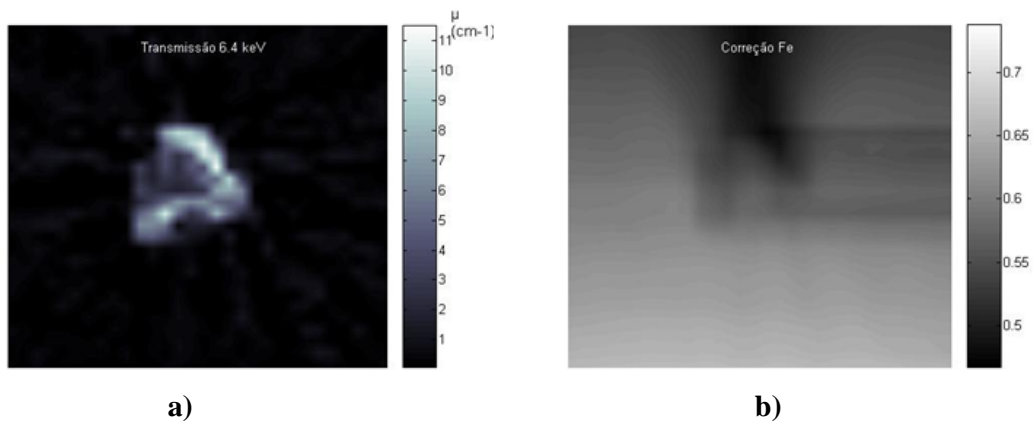
As Figuras 5.14 a 5.23, mostram os resultados das microtomografias para as amostras de hiperplasia benigna da próstata humana (HPB) da próstata de quatro pacientes.

### *Dados da tomografia:*

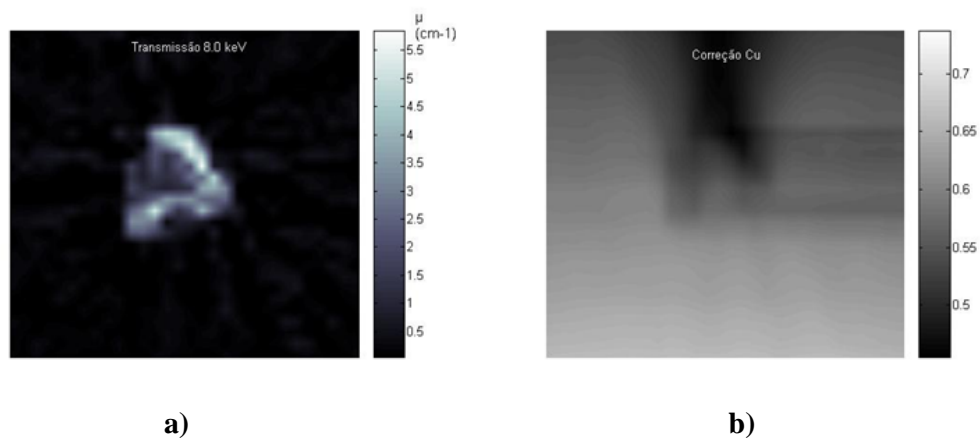
- **Amostra CJ01- HPB** – 60 projeções, 23 raios soma, tempo de aquisição para cada raio soma:  $t = 6$  segundos, passo da translação: 0,2 mm.



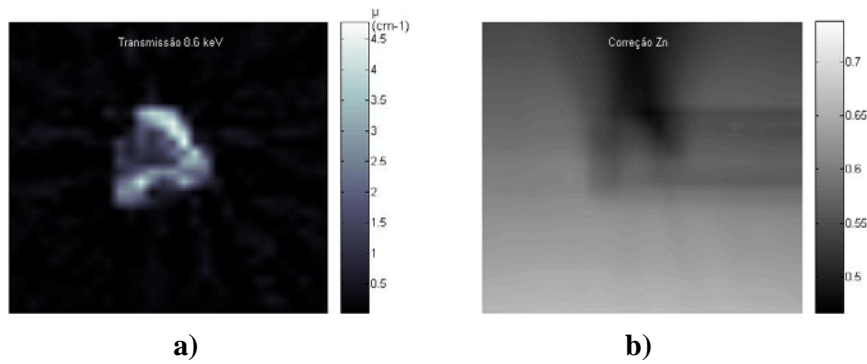
**Figura 5.14** Tomografia por transmissão de raios X a 12 keV da amostra de tecido de próstata – HPB.



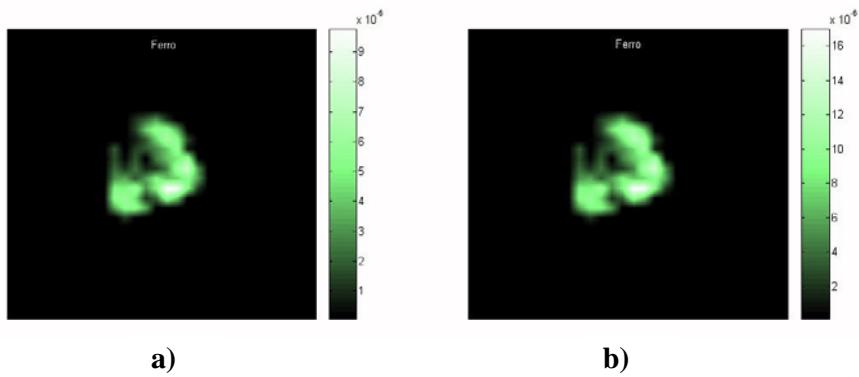
**Figura 5.15** Estimativa do coeficiente de atenuação para a energia de 6,4 keV para a amostra de tecido HPB (Figura 5.15 a) e matriz de correção de absorção do ferro para a mesma (Figura 5.15 b).



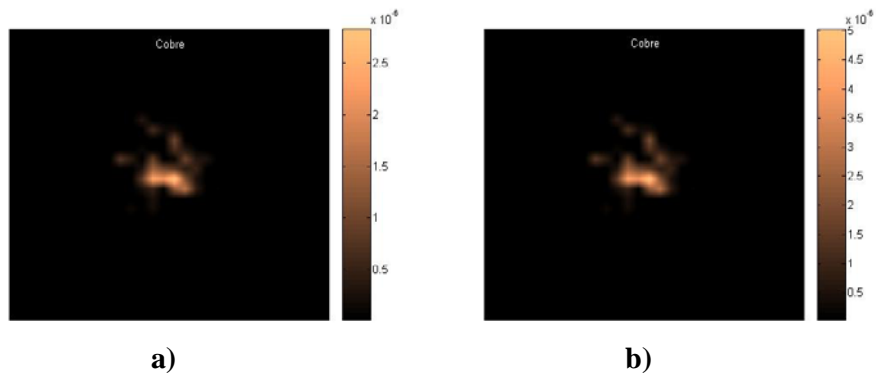
**Figura 5.16** Estimativa do coeficiente de atenuação para a energia de 8,0 keV para a amostra de tecido HPB (Figura 5.16 a) e matriz de correção de absorção do cobre para a mesma (Figura 5.16 b).



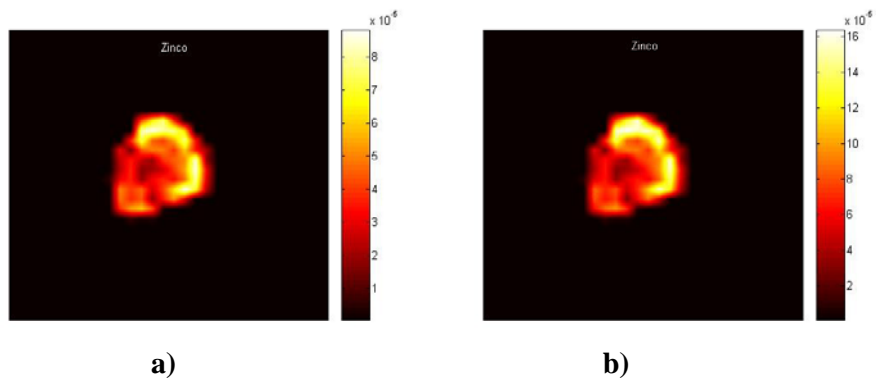
**Figura 5.17** Estimativa do coeficiente de atenuação para a energia de 8,6 keV para a amostra de tecido HPB (Figura 5.17 a) e matriz de correção de absorção do zinco para a mesma (Figura 5.17 b).



**Figura 5.18** Imagem tomográfica por fluorescência de raios X do ferro sem correção de absorção (Figura 5.18 a) e imagem tomográfica por fluorescência de raios X do ferro com correção de absorção (Figura 5.18 b) para uma amostra de próstata com HPB.



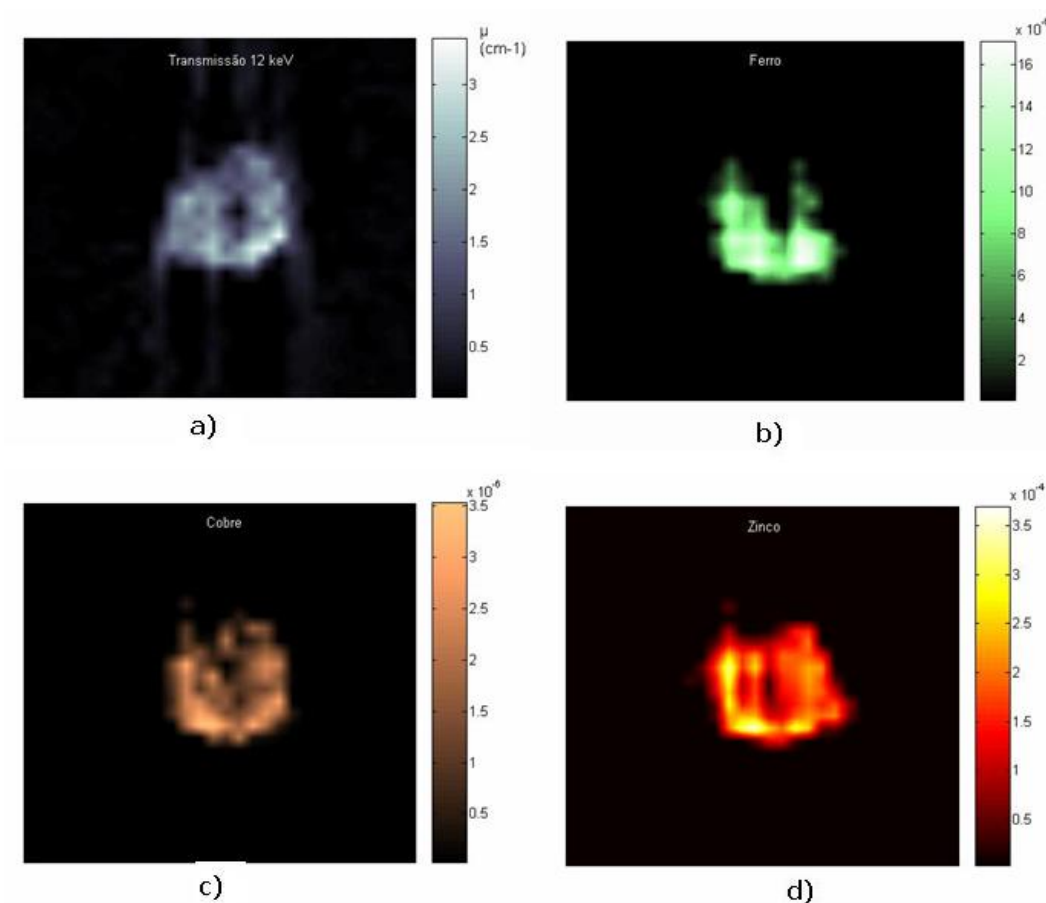
**Figura 5.19** Imagem tomográfica por fluorescência de raios X do cobre sem correção de absorção (Figura 5.19 a) e imagem tomográfica por fluorescência de raios X do cobre com correção de absorção (Figura 5.19 b) para uma amostra de próstata com HPB.



**Figura 5.20** Imagem tomográfica por fluorescência de raios X do zinco sem correção de absorção (Figura 5.20 a) e imagem tomográfica por fluorescência de raios X do zinco com correção de absorção (Figura 5.20 b) para uma amostra de próstata com HPB.

**Dados da tomografia:**

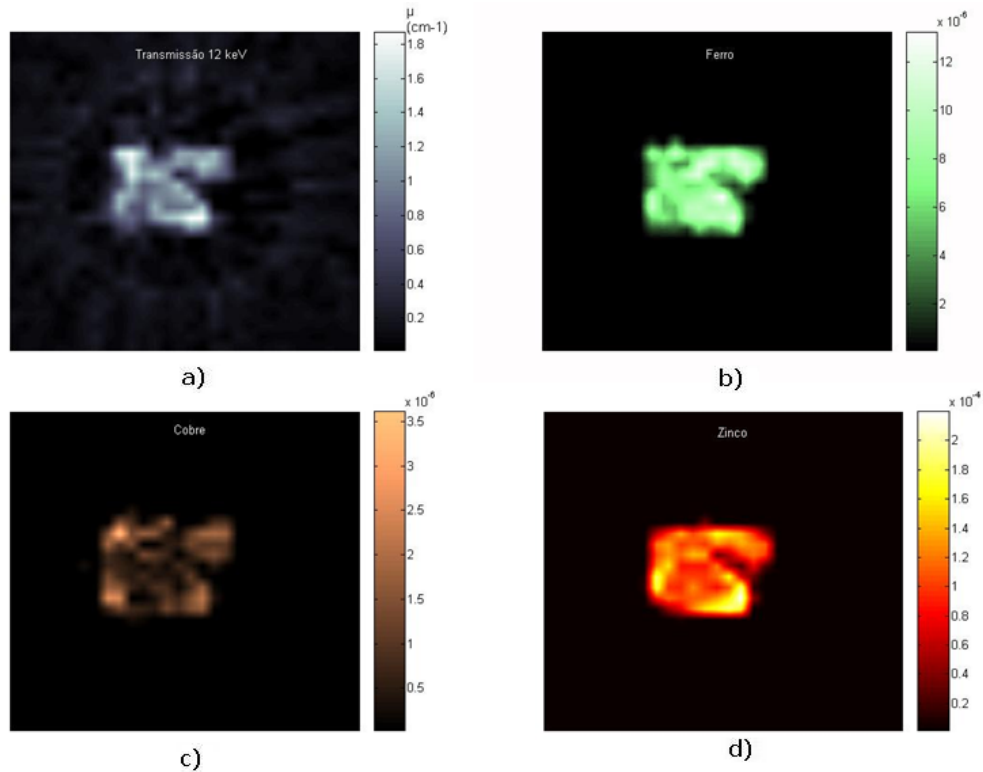
- **Amostra PR04- HPB** – 60 projeções, 22 raios soma, tempo de aquisição para cada raio soma:  $t = 4$  segundos, passo da translação: 0,2 mm.



**Figura 5.21** Imagens tomográficas da amostra de HPB. Microtomografia por transmissão de raios X a 12 keV (Figura 5.21 a), tomografia por fluorescência de raios X do ferro (Figura 5.21 b), tomografia por fluorescência de raios X do cobre (Figura 5.21 c) e tomografia por fluorescência de raios X do zinco (Figura 5.21 d).

**Dados da tomografia:**

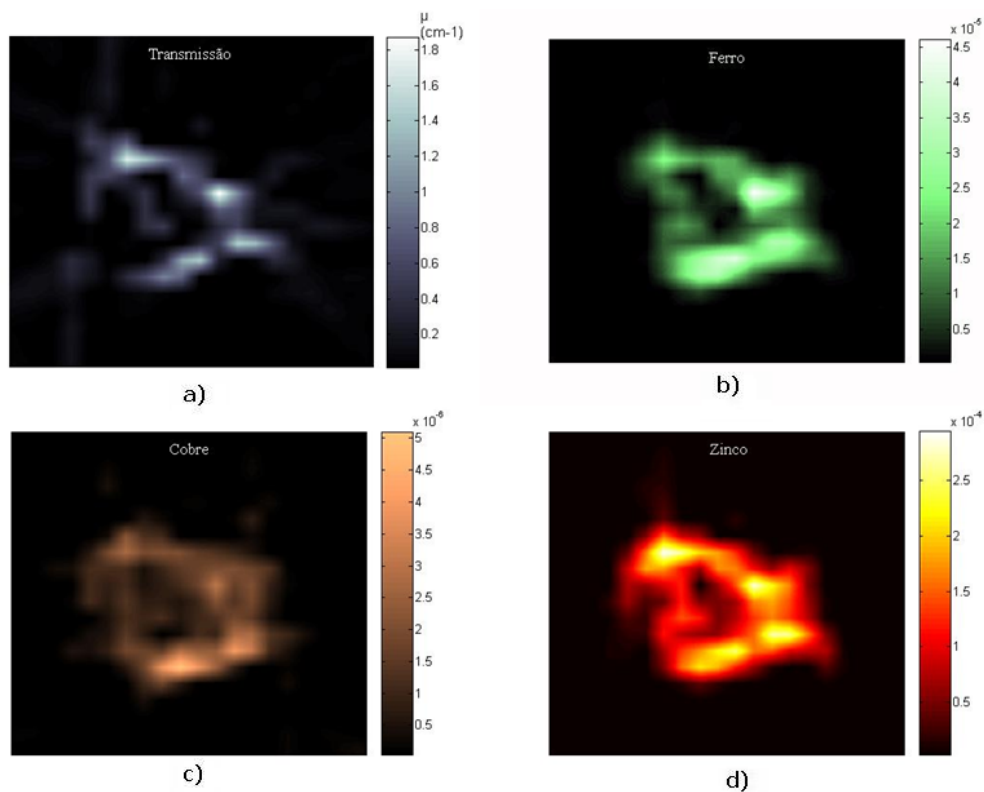
- **Amostra PR06- HPB** – 60 projeções, 21 raios soma, tempo de aquisição para cada raio soma:  $t = 7$  segundos, passo da translação: 0,2 mm.



**Figura 5.22** Imagens tomográficas da amostra de HPB. Microtomografia por transmissão de raios X a 12 keV (Figura 5.22 a), tomografia por fluorescência de raios X do ferro (Figura 5.22 b), tomografia por fluorescência de raios X do cobre (Figura 5.22 c) e tomografia por fluorescência de raios X do zinco (Figura 5.22 d).

**Dados da tomografia:**

- **Amostra PR08- HPB** – 60 projeções, 21 raios soma, tempo de aquisição para cada raio soma:  $t = 7$  segundos, passo da translação: 0,2 mm.



**Figura 5.23** Imagens tomográficas da amostra de HPB. Microtomografia por transmissão de raios X a 12 keV (Figura 5.23 a), tomografia por fluorescência de raios X do ferro (Figura 5.23 b), tomografia por fluorescência de raios X do cobre (Figura 5.23 c) e tomografia por fluorescência de raios X do zinco (Figura 5.23 d).

Os resultados para as quatro amostras de HPB mostram que a concentração de zinco é bem maior (cerca de 10 a 20 vezes) que a concentração de Fe. Mostram também, que a concentração de cobre é extremamente pequena, cerca de 3  $\mu\text{g/g}$ . Os resultados das concentrações de ferro, cobre e zinco obtidos nas três amostras de HPB estão de acordo com a literatura.



O zinco participa de muitas reações do metabolismo celular, incluindo processos fisiológicos, tais como função imune, defesa antioxidante, crescimento e desenvolvimento, atuando como um componente estrutural e funcional de várias enzimas e proteínas (LEITÃO, 2009). Estudos mostram que a próstata tem a capacidade de secretar alto nível de zinco e que a concentração deste metal está diretamente relacionada ao câncer de próstata, por isso um estudo mais aprofundado sobre o comportamento do zinco na próstata se faz necessário.

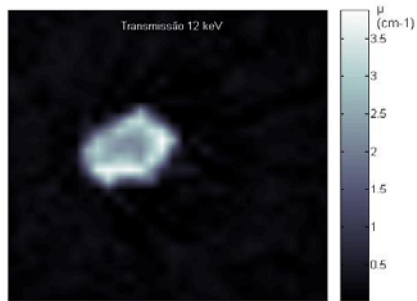
A tomografia por fluorescência de raios X conseguiu mostrar o mapeamento do ferro, cobre e zinco no tecido de próstata com HPB. Mas para poder determinar se existe uma diferença entre as concentrações de ferro, cobre e zinco e o tipo de tecido, um maior número de amostras de HPB e amostras de tecido de próstata saudável e câncer devem ser analisados.

### **5.3 Amostras de Tecido de Mama**

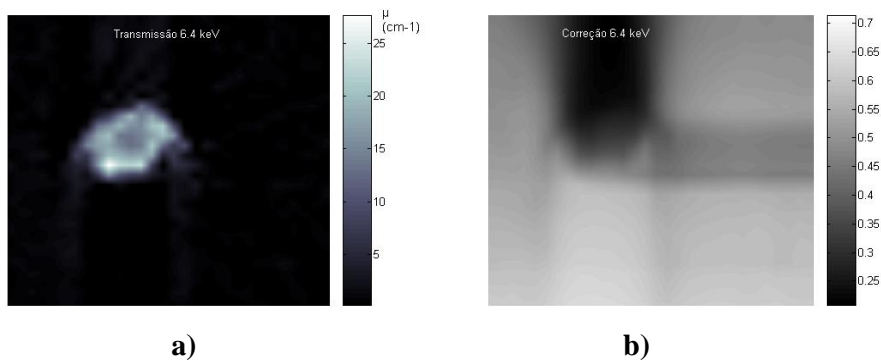
As Figuras 5.24 a 5.40, mostram os resultados das microtomografias para cinco amostras de mama pareadas, isto é, uma amostra de tumor e outra de tecido saudável do mesmo paciente.

#### ***Dados da tomografia:***

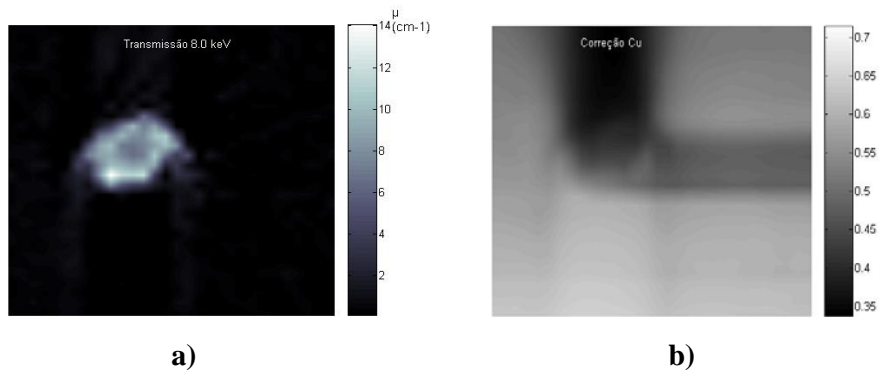
- **Amostra Ma02 - câncer de mama** – 60 projeções, 21 raios soma, tempo de aquisição para cada raio soma:  $t = 10$  segundos, passo da translação: 0,2 mm.



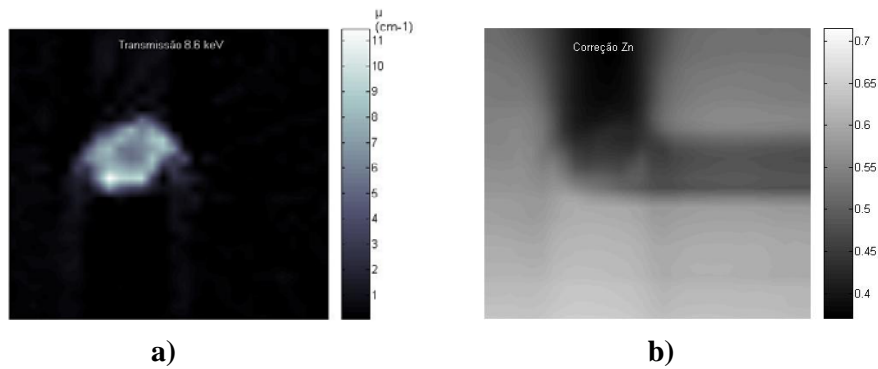
**Figura 5.24** Tomografia por transmissão de raios X a 12 keV da amostra de tecido de câncer de mama.



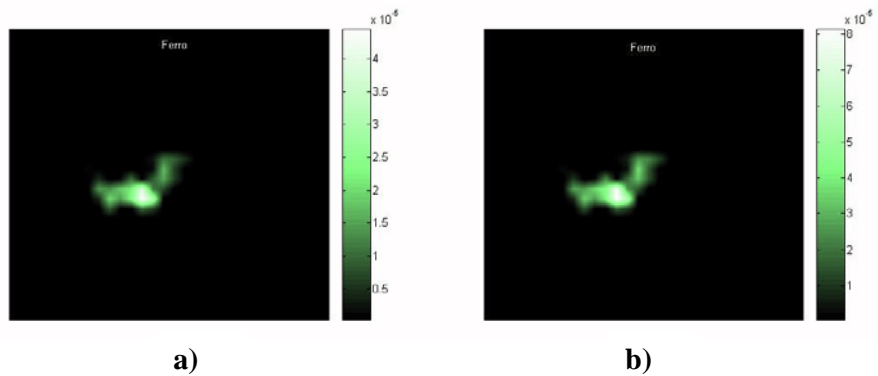
**Figura 5.25** Estimativa do coeficiente de atenuação para a energia de 6,4 keV para a amostra de tecido de câncer de mama (Figura 5.25 a) e matriz de correção de absorção do ferro para a mesma amostra (Figura 5.25 b).



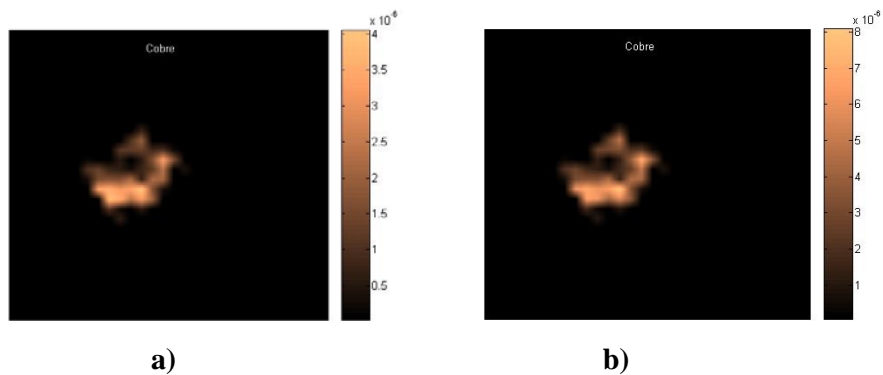
**Figura 5.26** Estimativa do coeficiente de atenuação para a energia de 8,0 keV para a amostra de tecido de câncer de mama (Figura 5.26 a) e matriz de correção de absorção do cobre para a mesma amostra (Figura 5.26 b).



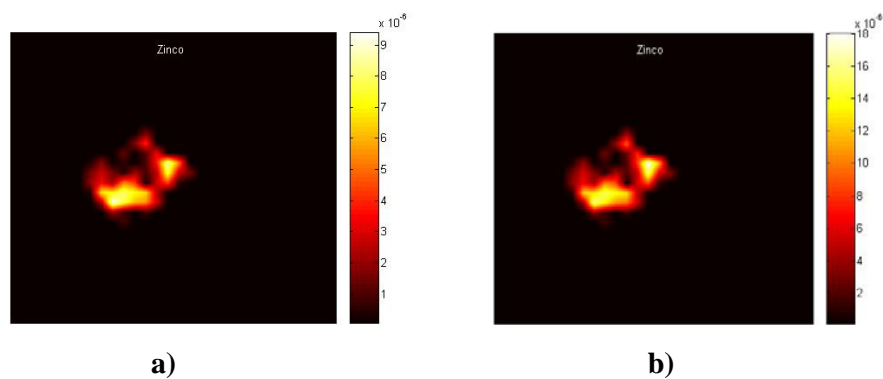
**Figura 5.27** Estimativa do coeficiente de atenuação para a energia de 8,6 keV para a amostra de tecido de câncer de mama (Figura 5.27 a) e matriz de correção de absorção do zinco para a mesma amostra (Figura 5.27 b).



**Figura 5.28** Imagem tomográfica por fluorescência de raios X do ferro sem correção de absorção (Figura 5.28 a) e imagem tomográfica por fluorescência de raios X do ferro com correção de absorção (Figura 5.28 b) para uma amostra de câncer de mama.



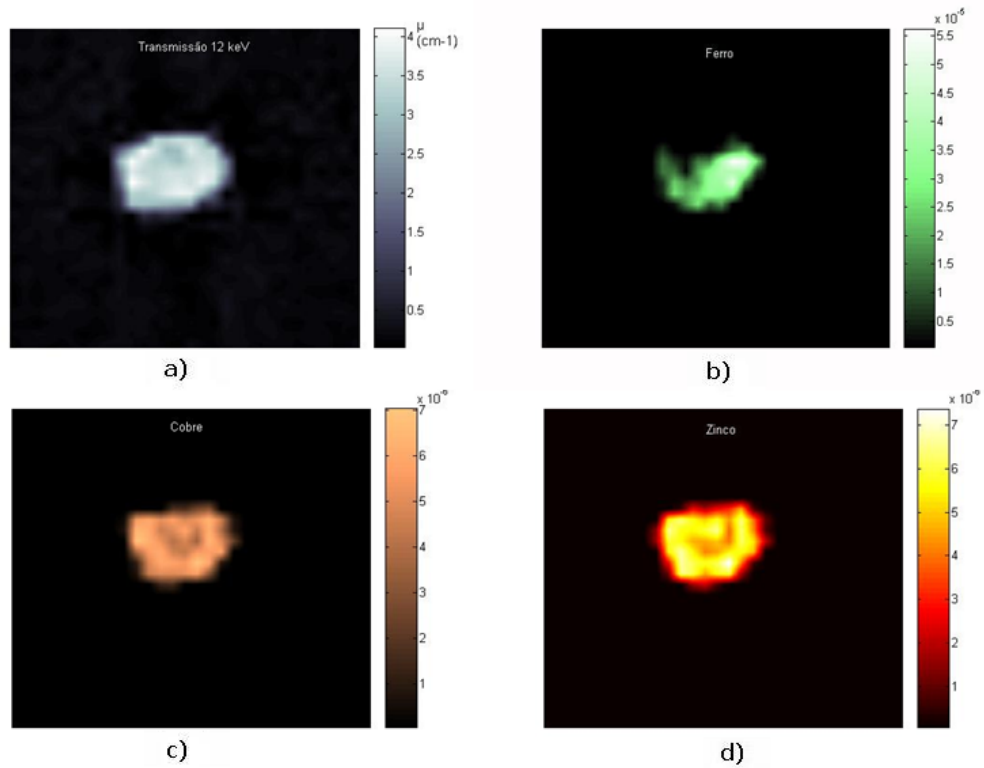
**Figura 5.29** Imagem tomográfica por fluorescência de raios X do cobre sem correção de absorção (Figura 5.29 a) e imagem tomográfica por fluorescência de raios X do cobre com correção de absorção (Figura 5.29 b) para uma amostra de câncer de mama.



**Figura 5.30** Imagem tomográfica por fluorescência de raios X do zinco sem correção de absorção (Figura 5.30 a) e imagem tomográfica por fluorescência de raios X do zinco com correção de absorção (Figura 5.30 b) para uma amostra de câncer de mama.

**Dados da tomografia:**

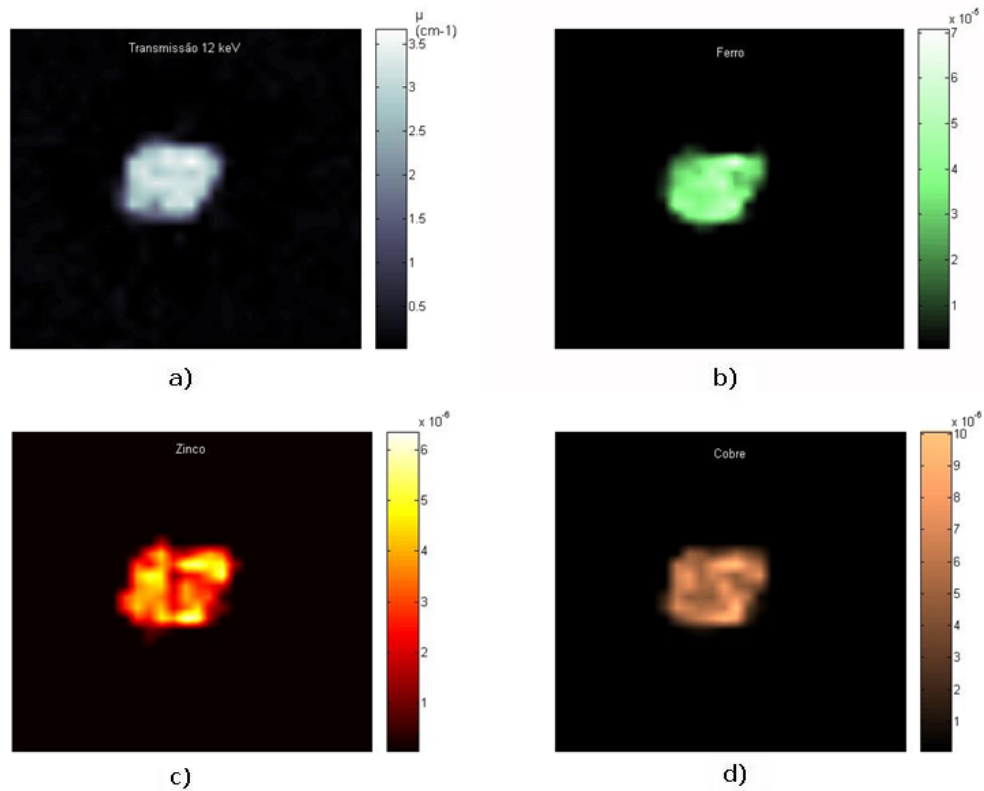
- **Amostra Ma03 – tecido saudável de mama do mesmo paciente da amostra Ma02** – 60 projeções, 18 raios soma, tempo de aquisição para cada raio soma:  $t = 10$  segundos, passo da translação: 0,2 mm.



**Figura 5.31** Imagens tomográficas de uma amostra de tecido de mama saudável. Microtomografia por transmissão de raios X a 12 keV (Figura 5.31 a), tomografia por fluorescência de raios X do ferro (Figura 5.31 b), tomografia por fluorescência de raios X do cobre (Figura 5.31 c) e tomografia por fluorescência de raios X do zinco (Figura 5.31 d).

**Dados da tomografia:**

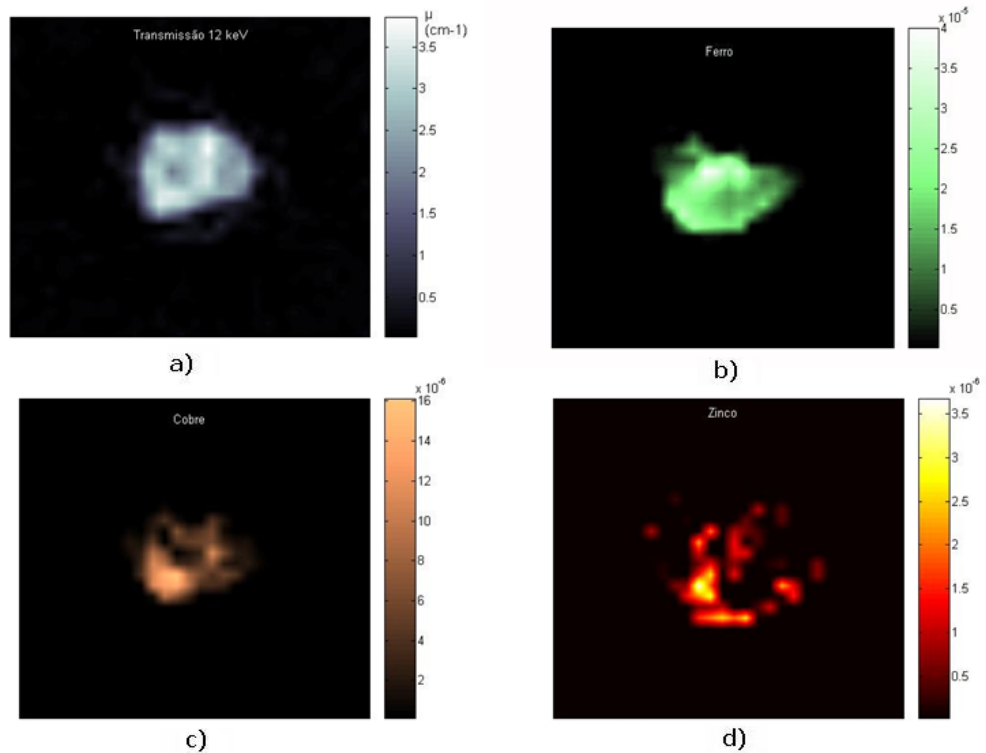
- **Amostra Ma08 - câncer de mama** – 60 projeções, 20 raios soma, tempo de aquisição para cada raio soma:  $t = 10$  segundos, passo da translação: 0,2 mm.



**Figura 5.32** Imagens tomográficas de uma amostra de câncer de mama. Microtomografia por transmissão de raios X a 12 keV (Figura 5.32 a), tomografia por fluorescência de raios X do ferro (Figura 5.32 b), tomografia por fluorescência de raios X do cobre (Figura 5.32 c) e tomografia por fluorescência de raios X do zinco (Figura 5.32 d).

**Dados da tomografia:**

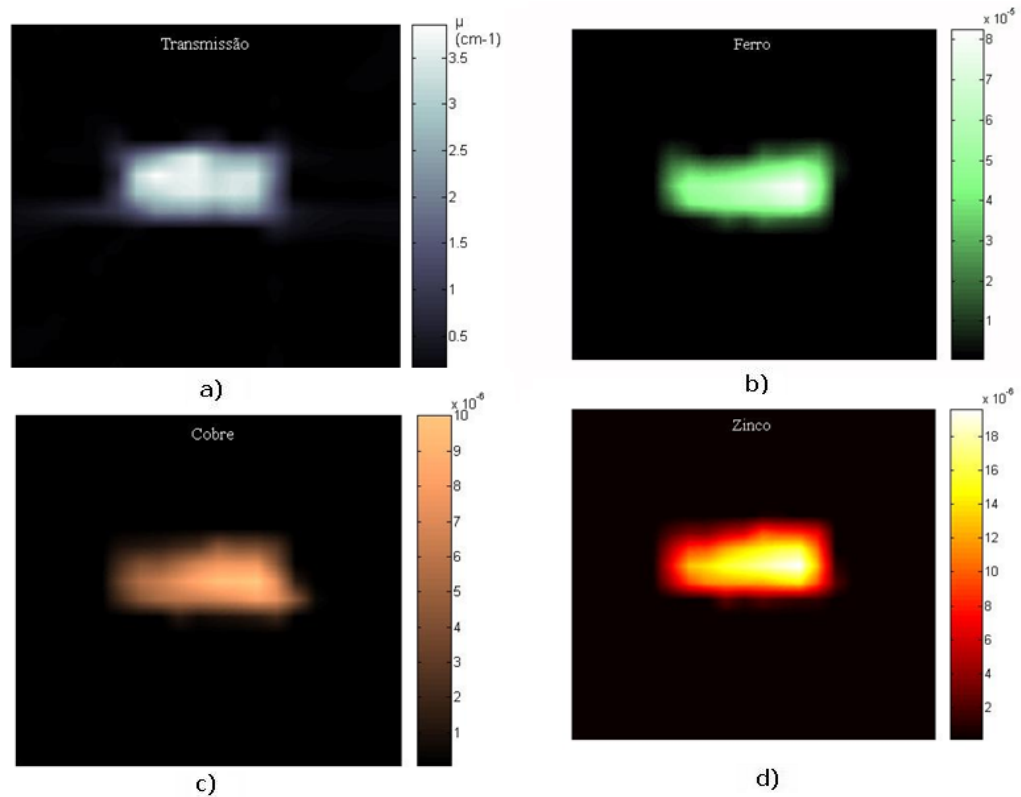
- **Amostra Ma09 – tecido saudável de mama do mesmo paciente da amostra Ma08** – 60 projeções, 21 raios soma, tempo de aquisição para cada raio soma:  $t = 10$  segundos, passo da translação: 0,2 mm.



**Figura 5.33** Imagens tomográficas de uma amostra de tecido de mama saudável. Microtomografia por transmissão de raios X a 12 keV (Figura 5.33 a), tomografia por fluorescência de raios X do ferro (Figura 5.33 b), tomografia por fluorescência de raios X do cobre (Figura 5.33 c) e tomografia por fluorescência de raios X do zinco (Figura 5.33 d).

**Dados da tomografia:**

- **Amostra Ma10 – Câncer de mama** – 60 projeções, 18 raios soma, tempo de aquisição para cada raio soma:  $t = 10$  segundos, passo da translação: 0,2 mm.

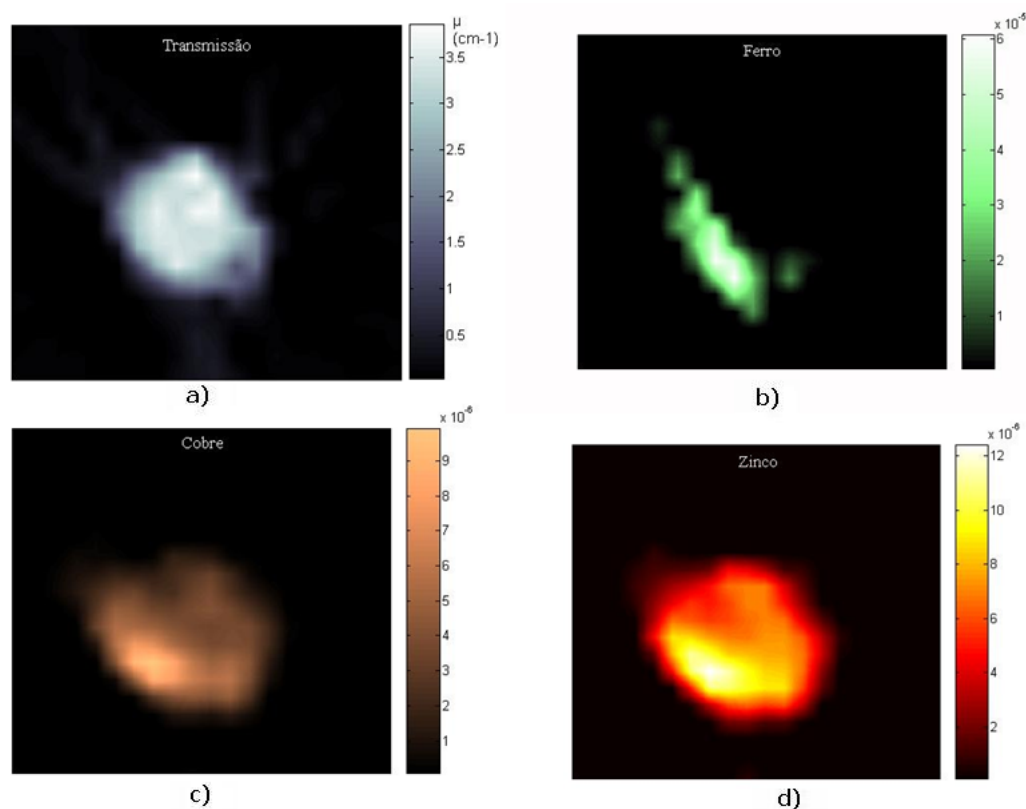


**Figura 5.38** Imagens tomográficas de uma amostra de tecido de câncer de mama. Microtomografia por transmissão de raios X a 12 keV (Figura 5.38 a), tomografia por fluorescência de raios X do ferro (Figura 5.38 b), tomografia por fluorescência de raios X do cobre (Figura 5.38 c) e tomografia por fluorescência de raios X do zinco (Figura 5.38 d).



**Dados da tomografia:**

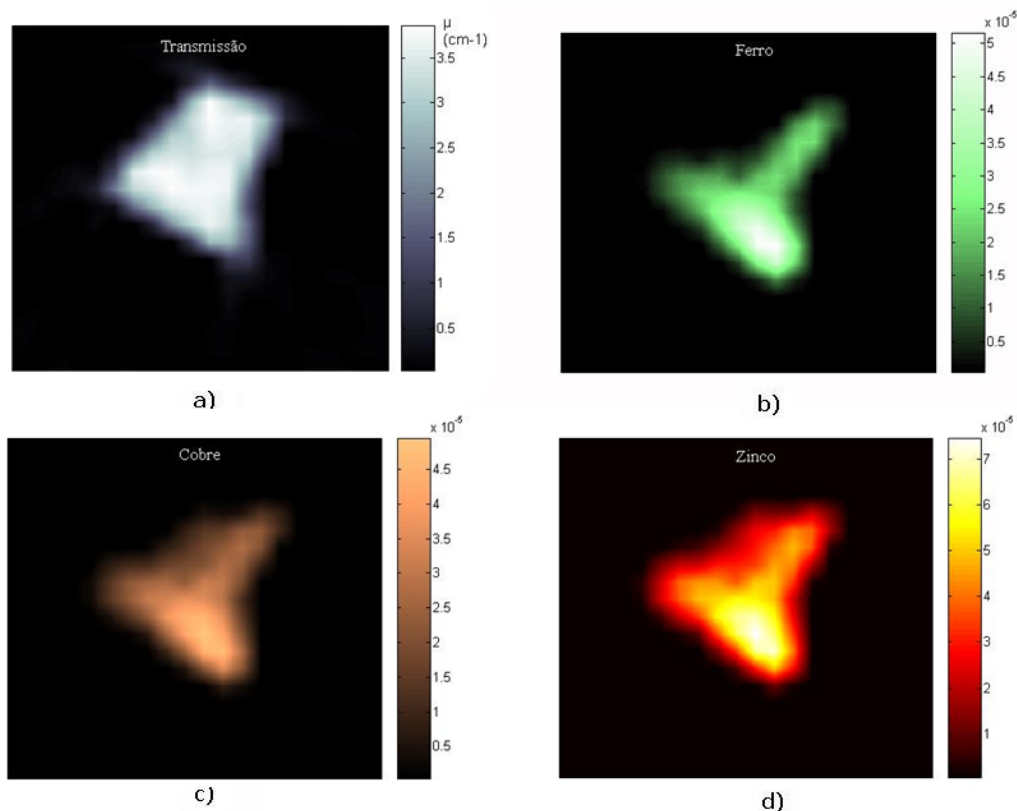
- **Amostra Ma07 – tecido saudável de mama do mesmo paciente da amostra Ma10** – 60 projeções, 20 raios soma, tempo de aquisição para cada raio soma:  $t = 13$  segundos, passo da translação: 0,2 mm.



**Figura 5.37** Imagens tomográficas de uma amostra de tecido de mama saudável. Microtomografia por transmissão de raios X a 12 keV (Figura 5.37 a), tomografia por fluorescência de raios X do ferro (Figura 5.37 b), tomografia por fluorescência de raios X do cobre (Figura 5.37 c) e tomografia por fluorescência de raios X do zinco (Figura 5.37 d).

**Dados da tomografia:**

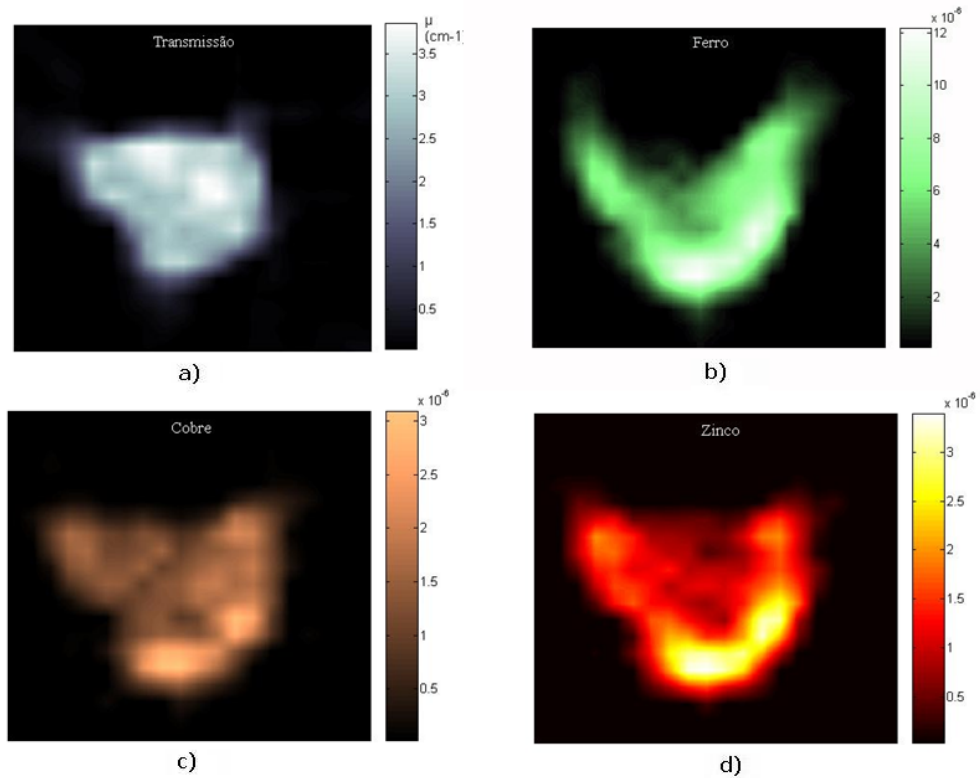
- **Amostra Ma11 – Câncer de mama**– 60 projeções, 20 raios soma, tempo de aquisição para cada raio soma:  $t = 10$  segundos, passo da translação: 0,2 mm.



**Figura 5.39** Imagens tomográficas de uma amostra de tecido de câncer de mama. Microtomografia por transmissão de raios X a 12 keV (Figura 5.39 a), tomografia por fluorescência de raios X do ferro (Figura 5.39 b), tomografia por fluorescência de raios X do cobre (Figura 5.39 c) e tomografia por fluorescência de raios X do zinco (Figura 5.39 d).

*Dados da tomografia:*

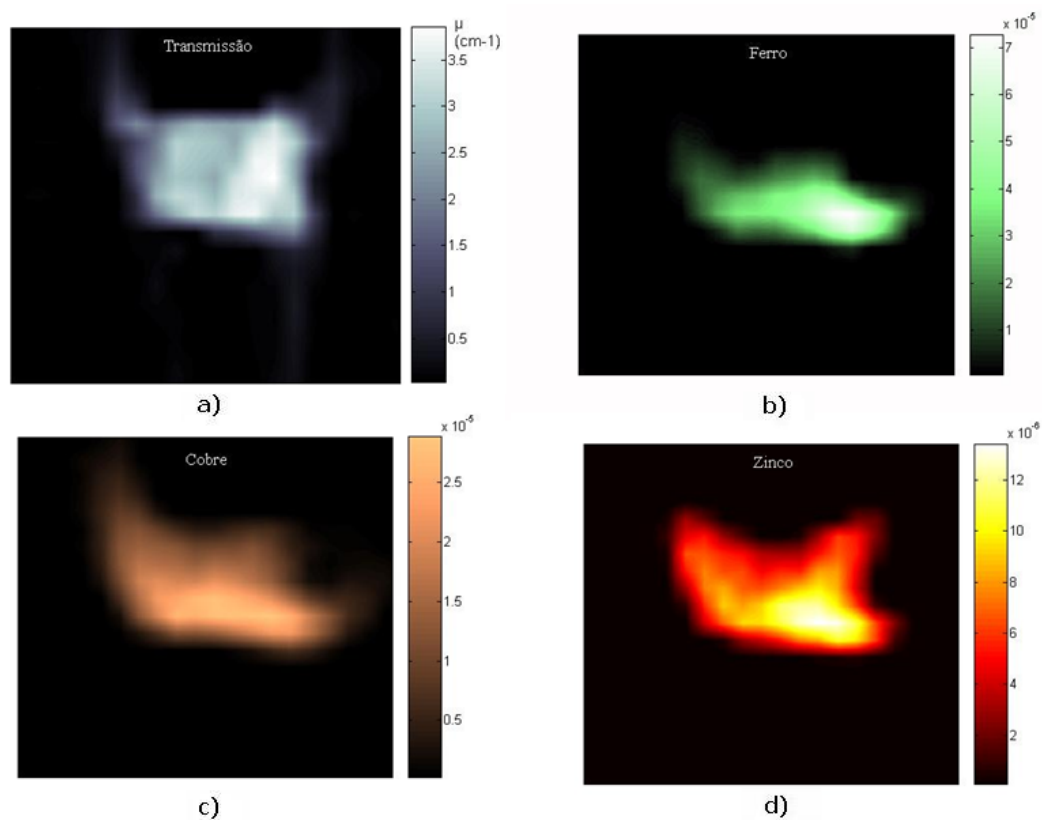
- **Amostra Ma05 – tecido saudável de mama do mesmo paciente da amostra Ma11** – 60 projeções, 23 raios soma, tempo de aquisição para cada raio soma:  $t = 10$  segundos, passo da translação: 0,2 mm.



**Figura 5.35** Imagens tomográficas de uma amostra de tecido de mama saudável. Microtomografia por transmissão de raios X a 12 keV (Figura 5.35 a), tomografia por fluorescência de raios X do ferro (Figura 5.35 b), tomografia por fluorescência de raios X do cobre (Figura 5.35 c) e tomografia por fluorescência de raios X do zinco (Figura 5.35 d).

**Dados da tomografia:**

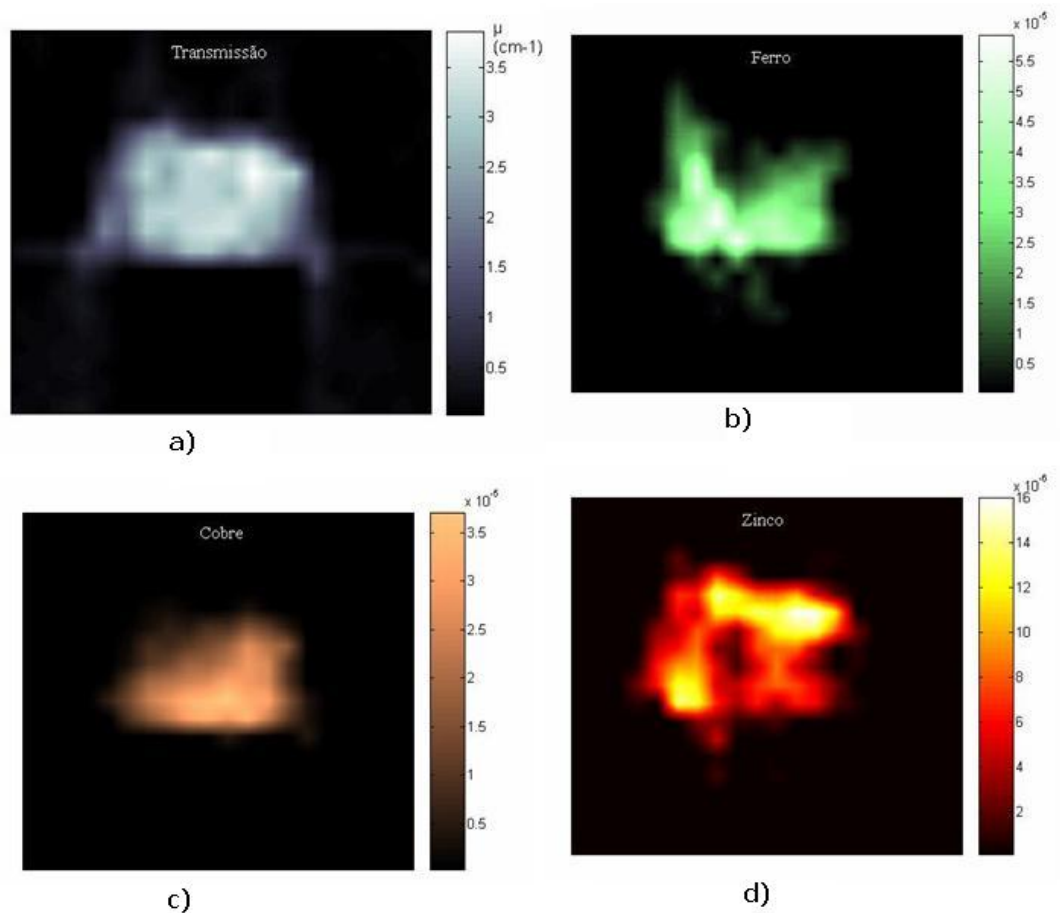
- **Amostra Ma06 – Câncer de mama**– 60 projeções, 24 raios soma, tempo de aquisição para cada raio soma:  $t = 11$  segundos, passo da translação: 0,2 mm.



**Figura 5.36** Imagens tomográficas de uma amostra de tecido de câncer de mama. Microtomomografia por transmissão de raios X a 12 keV (Figura 5.36 a), tomografia por fluorescência de raios X do ferro (Figura 5.36 b), tomografia por fluorescência de raios X do cobre (Figura 5.36 c) e tomografia por fluorescência de raios X do zinco (Figura 5.36 d).

**Dados da tomografia:**

- **Amostra Ma01 – tecido saudável de mama do mesmo paciente da amostra Ma06** – 60 projeções, 20 raios soma, tempo de aquisição para cada raio soma:  $t = 10$  segundos, passo da translação: 0,2 mm.



**Figura 5.34** Imagens tomográficas de uma amostra de tecido de mama saudável. Microtomografia por transmissão de raios X a 12 keV (Figura 5.34 a), tomografia por fluorescência de raios X do ferro (Figura 5.34 b), tomografia por fluorescência de raios X do cobre (Figura 5.34 c) e tomografia por fluorescência de raios X do zinco (Figura 5.34 d).

Analisando as imagens de tomografia por fluorescência de raios X das cinco amostras pareadas de mama, pode-se observar que a concentração de ferro é maior para as cinco amostras de tumor do que para os tecidos saudáveis. Já para cobre e zinco não houve uma coerência, para algumas amostras a concentração de cobre e zinco no tecido do câncer aumentou e para outras diminuiu. Isso não significa que não existe um comportamento para a maioria das amostras, pois o número de amostras é muito pequeno tanto pra afirmar que a concentração de ferro é sempre maior no câncer do que no tecido saudável como para afirmar que não existe um comportamento para cobre e zinco.

A razão da concentração de ferro entre o tumor e o tecido saudável foi igual a 1,45 para as amostras Ma02 e Ma03, igual a 1,75 para as amostras Ma08 e Ma09, igual a 1,60 para as amostras Ma02 e Ma03, 4,1 para as amostras Ma02 e Ma03, 1,27 para as amostras Ma02 e Ma03. Analisando um maior número de amostras pode-se verificar se existe uma faixa que caracterize a concentração de ferro em tumores malignos de amostras pareadas.

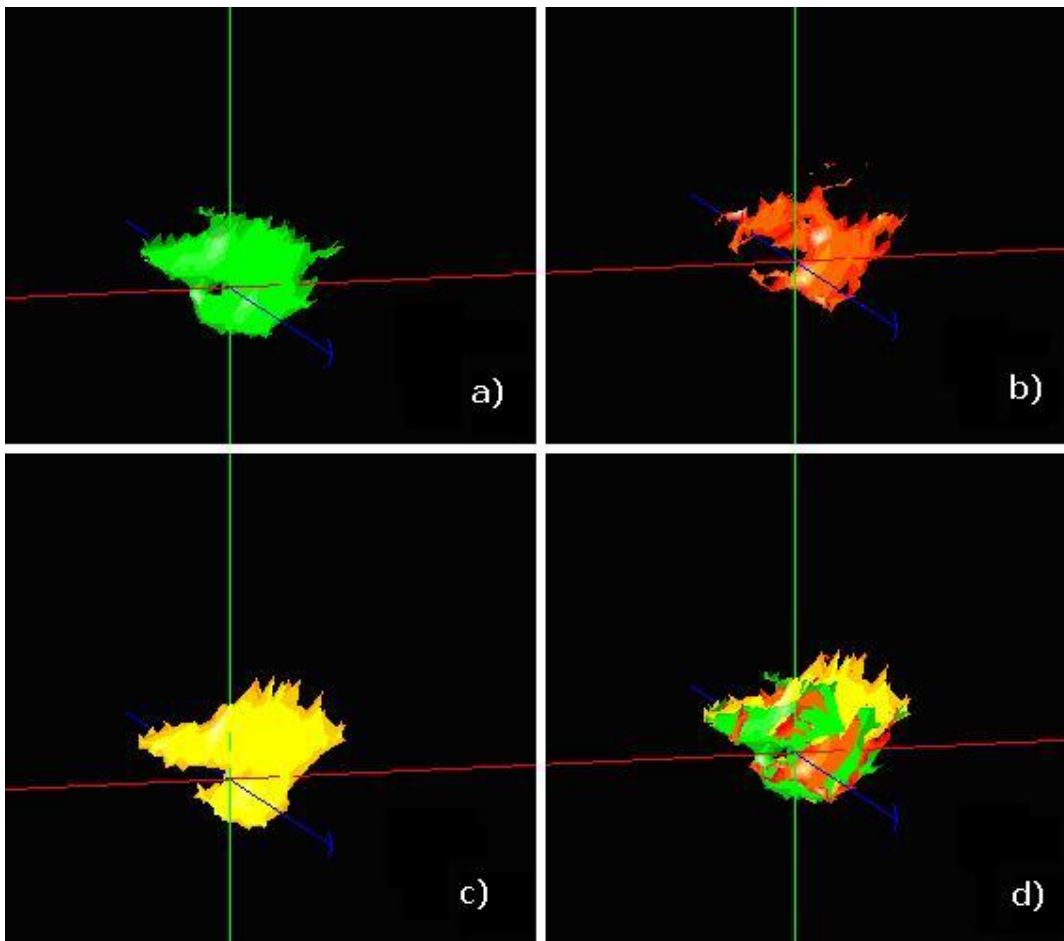
Mudanças na concentração do ferro devem ser associadas à vascularização e o aumento do suprimento do sangue para o crescimento de tumores. Além disso, o ferro é um elemento essencial para o organismo porque é parte integrante de algumas proteínas. O ferro influencia o processo de carcinogenesis porque faz um papel vital no regulamento do crescimento das células e sua diferenciação. Vários estudos mostraram que o ferro está diretamente ligado aos processos patológicos ocorridos na célula principalmente em processos carcinogênicos (MAJEWSKA, 2007). Por isso um estudo mais aprofundado do comportamento do ferro em amostras de mama com e sem câncer deve ser feito analisando um número mais significativo de amostras.

## **5.4 Imagens 3D de Tecidos de Biológicos**

As Figuras 5.41 a 5.46, mostram os resultados das microtomografias por transmissão e por fluorescência de raios X em três dimensões para quatro amostras: uma amostra de tecido de pulmão adulto saudável, outra de tecido de pulmão de um feto saudável, uma de tecido de mama saudável e outra de tecido de próstata com HBP.

Nas amostras de pulmão tanto adulto quanto do feto não foi possível fazer a reconstrução da imagem por transmissão de raios X porque o coeficiente de atenuação das amostras era muito pequeno.

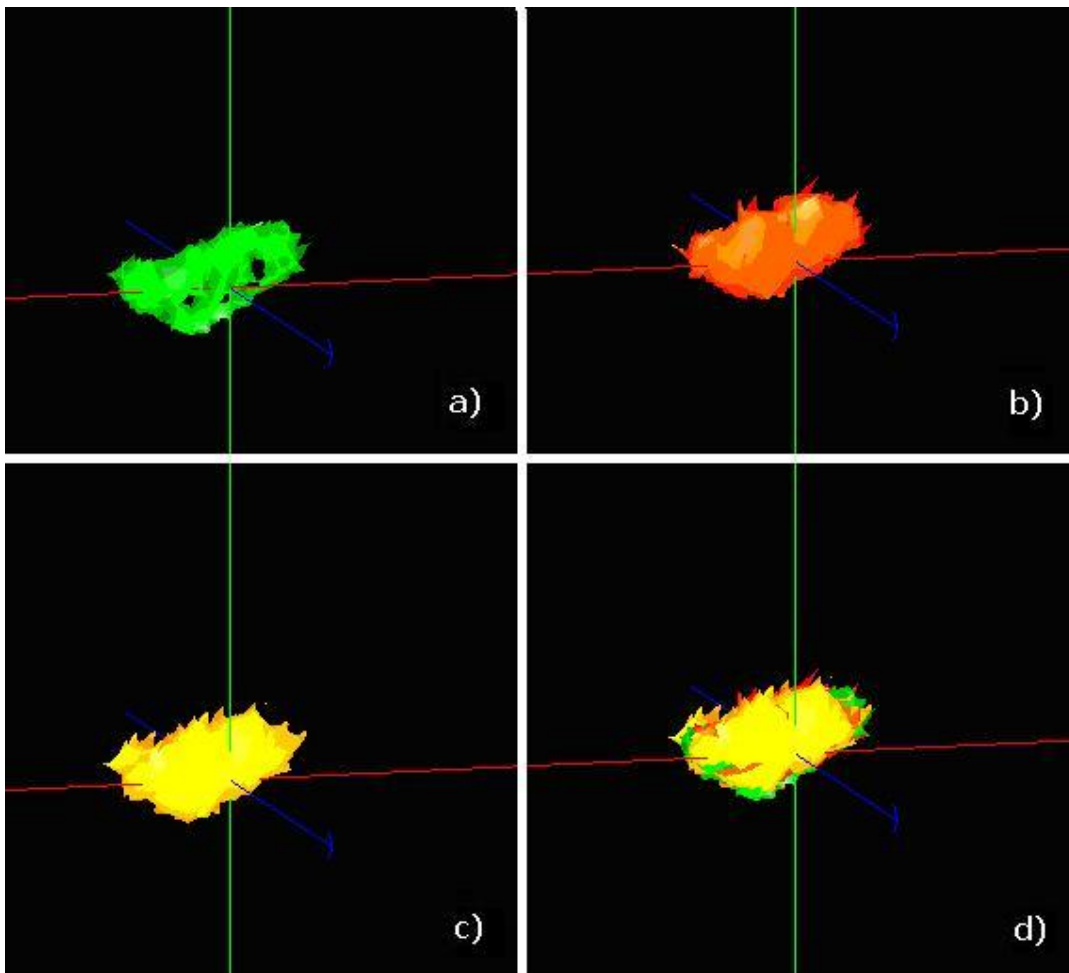
- **Amostra 3D.1 – tecido saudável de pulmão adulto** – 60 projeções, 24 raios soma, tempo de aquisição para cada raio soma:  $t = 10$  segundos, passo da translação: 0,2 mm.



**Figura 5.41** Imagens tomográficas de uma amostra de pulmão adulto. 3D microtomografia por fluorescência de raios X do ferro (Figura 5.41 a), 3D microtomografia por fluorescência de raios X do cobre (Figura 5.41 b), 3D microtomografia por fluorescência de raios X do zinco (Figura 5.41 c) e 3D microtomografia por fluorescência de raios X do ferro, cobre e zinco juntas (Figura 5.41 d).

Analisando as imagens em três dimensões da amostra de pulmão adulto pode-se perceber que as distribuições de ferro, cobre e zinco não são homogêneas e não são iguais. Esta informação pode ser melhor visualizada na Figura 5.41 d, quando colocamos os três mapeamentos tridimensionais juntos.

- **Amostra 3D.2 – tecido saudável pulmão feto** – 60 projeções, 24 raios soma, tempo de aquisição para cada raio soma:  $t = 10$  segundos, passo da translação: 0,2 mm.



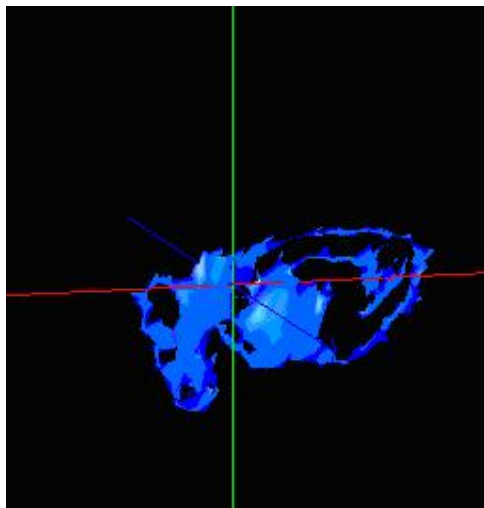
**Figura 5.42** Imagens tomográficas de uma amostra de pulmão de um feto. 3D microtomografia por fluorescência de raios X do ferro (Figura 5.42 a), 3D microtomografia por fluorescência de raios X do cobre (Figura 5.42 b), 3D microtomografia por fluorescência de raios X do zinco (Figura 5.42 c) e 3D microtomografia por fluorescência de raios X do ferro, cobre e zinco juntos (Figura 5.42



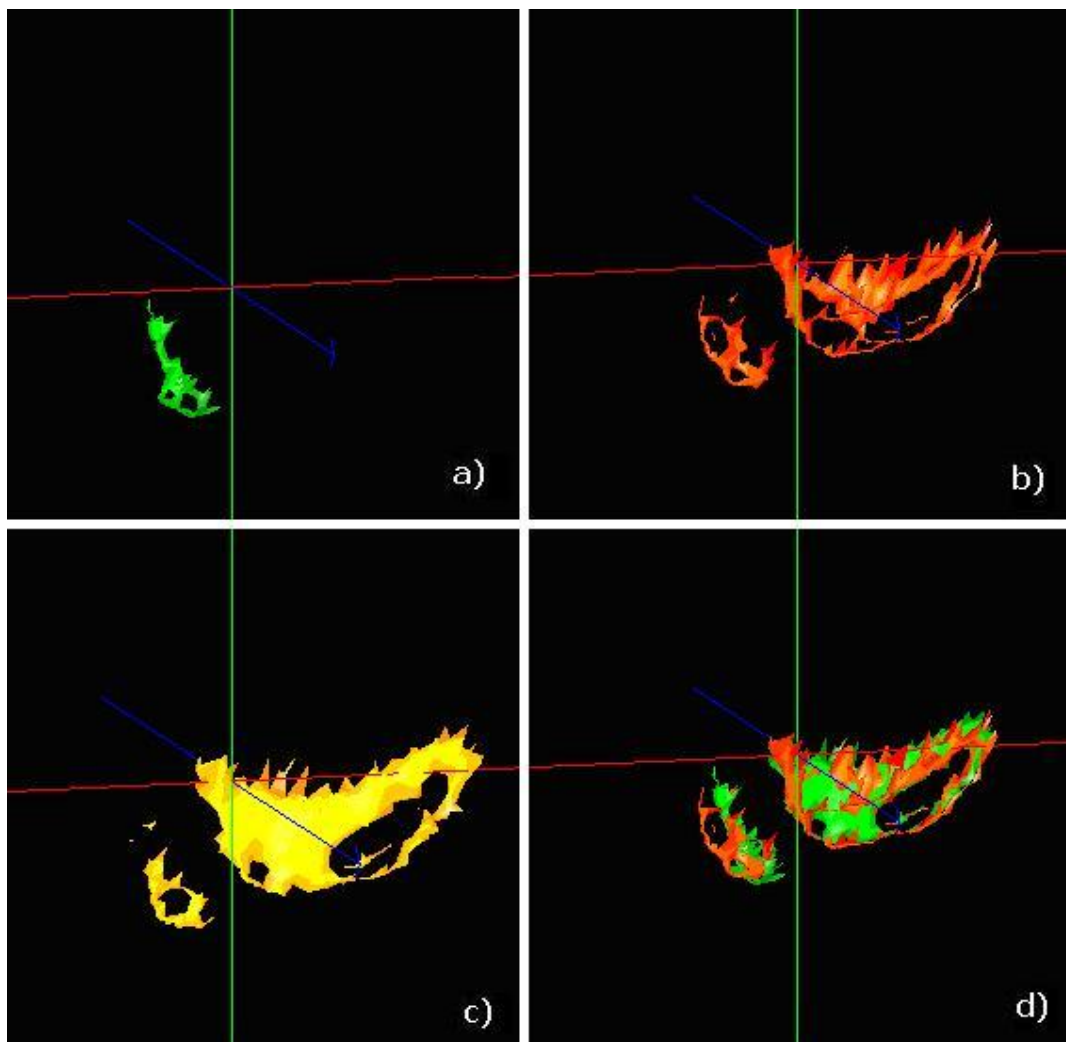
d).

Analisando as imagens em três dimensões da amostra de pulmão de feto pode-se perceber que a distribuição de cobre e zinco é homogênea, mas a distribuição do ferro mostra regiões internas do tecido onde não há concentração deste metal.

- **Amostra 3D.3 – tecido saudável de mama** – 60 projeções, 21 raios soma, tempo de aquisição para cada raio soma:  $t = 10$  segundos, passo da translação: 0,2 mm.



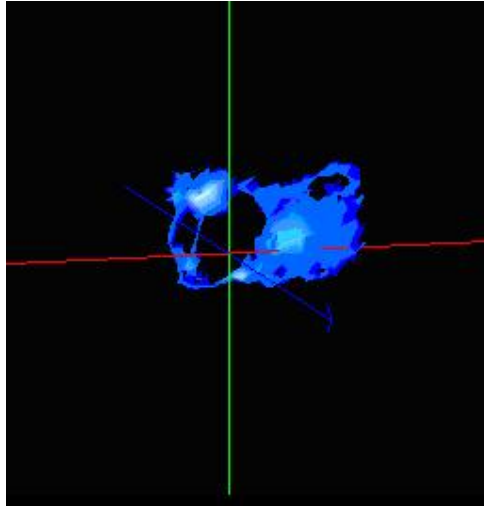
**Figura 5.43** Microtomografia por transmissão de raios X a 12 keV em três dimensões da amostra de tecido de mama saudável.



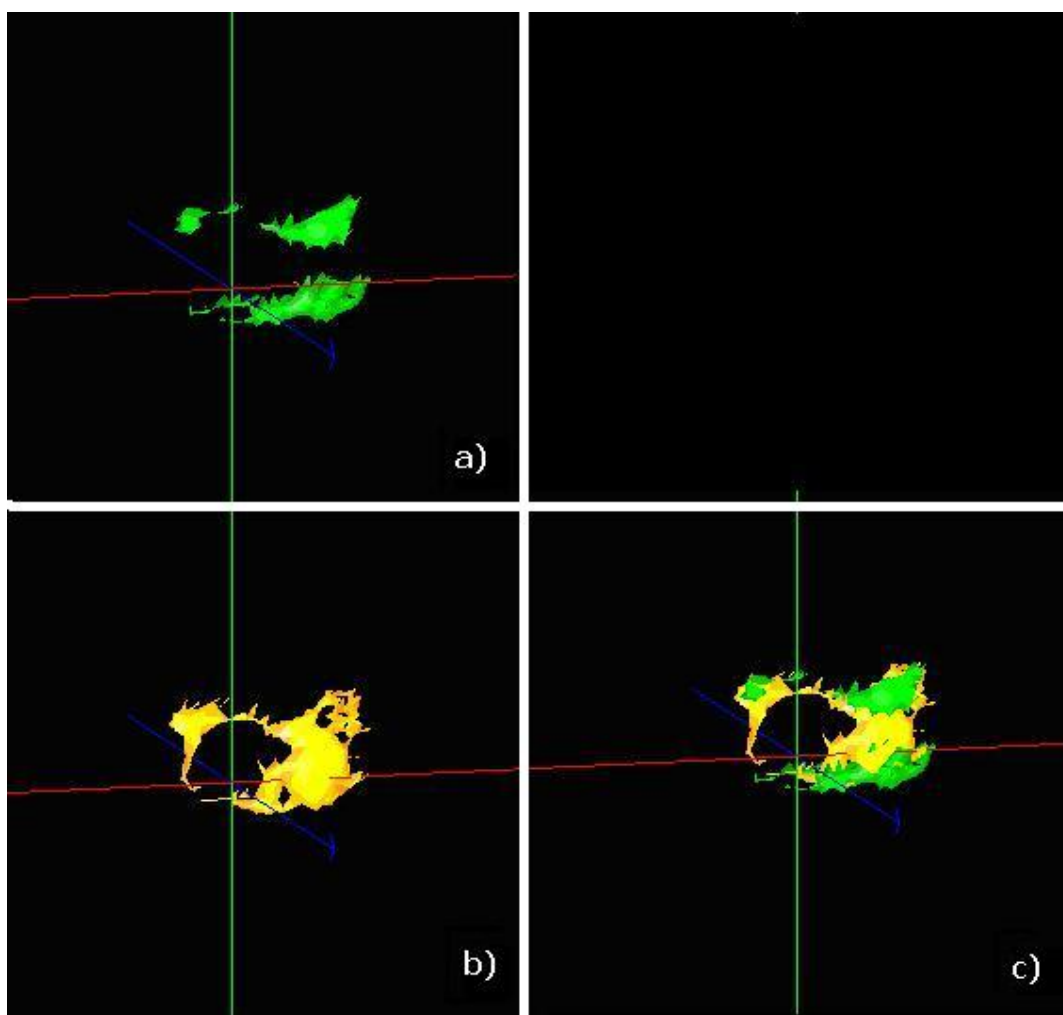
**Figura 5.44** Imagens tomográficas de uma amostra tecido saudável de mama. 3D microtomografia por fluorescência de raios X do ferro (Figura 5.44 a), 3D microtomografia por fluorescência de raios X do cobre (Figura 5.44 b), 3D microtomografia por fluorescência de raios X do zinco (Figura 5.44 c) e 3D microtomografia por fluorescência de raios X do ferro, cobre e zinco juntos (Figura 5.44 d).

Analisando as imagens em três dimensões da amostra de tecido de mama saudável pode-se perceber que é uma amostra bem irregular e que as distribuições de ferro, cobre e zinco não são homogêneas. Além disso, há uma concentração de ferro em apenas uma pequena parte da amostra.

- **Amostra 3D.4 – tecido saudável de próstata com HBP** – 60 projeções, 20 raios soma, tempo de aquisição para cada raio soma:  $t = 10$  segundos, passo da translação: 0,2 mm.



**Figura 5.45** Microtomografia por transmissão de raios X a 12 keV em três dimensões da amostra de tecido de próstata com HBP.



**Figura 5.46** Imagens tomográficas de uma amostra de próstata com HPB. 3D microtomografia por fluorescência de raios X do ferro (Figura 5.46 a), 3D microtomografia por fluorescência de raios X do zinco (Figura 5.46 b) e 3D microtomografia por fluorescência de raios X do ferro e zinco juntos (Figura 5.46 c).

Analisando as imagens em três dimensões da amostra de tecido de próstata com HPB pode-se perceber que é uma amostra bem irregular e que as distribuições de ferro, e zinco não são homogêneas. Além disso, não foi possível obter o mapeamento para o cobre porque a concentração de cobre nesta amostra é muito pequena abaixo de  $3 \mu\text{g/g}$ .

## 6 Conclusão

Os objetivos da tese foram alcançados com a implementação da microtomografia por fluorescência de raios X no Laboratório Nacional de luz Síncrotron utilizando um feixe monocromático com um cristal multicamadas, o que permitiu a obtenção das matrizes de correção da tomografia por fluorescência de raios X utilizando o programa MKCORR desenvolvido por Brunetti et al (**BRUNETTI E GOLOSIO, 2001**).

Os resultados das tomografias mostram a viabilidade da microtomografia por fluorescência de raios X e confirmam que essa técnica pode ser usada para complementar outras técnicas para caracterização de amostras (**ROCHA, 2007**). Foi possível visualizar a distribuição elementar nas amostras de referência e biológicas. O objetivo de analisar as amostras de próstata, pulmão e mama através da técnica de microtomografia por fluorescência de raios X é mostrar o mapeamento de alguns elementos dentro da amostra sem a necessidade de destruir a amostra.

Nas amostras de referência feitas de polietileno e acrílico preenchidas com soluções padrão de ferro, cobre, zinco e gálio, enquanto as imagens de microtomografia por transmissão mostraram a matriz de polietileno ou acrílico e as soluções contidas nos cilindros internos, as imagens de microtomografia por fluorescência de raios X mostram somente aquelas regiões onde o elemento de interesse está localizado. As imagens por microtomografia por fluorescência de raios X mostraram a propriedade seletiva da técnica, isto é, definindo a região de interesse de energia, pode-se obter a distribuição de um determinado elemento.

Comparando os resultados do mapeamento por fluorescência de raios X das amostras de referência sem correção e com correção de absorção para as soluções de ferro, cobre, zinco e gálio, pode-se perceber que o mapeamento com correção apresenta o valor esperado da concentração. Confirmando a necessidade de se utilizar o algoritmo com correção de absorção para se obter o mapeamento correto e o valor correto da concentração elementar na amostra.

Os resultados para as quatro amostras de HPB mostram que a concentração de zinco é bem maior (cerca de 10 a 20 vezes) que a concentração de Fe. Mostram também, que a concentração de cobre é extremamente pequena, cerca de 3 µg/g. Os resultados das concentrações de ferro, cobre e zinco obtidos nas quatro amostras de HPB estão de acordo com a literatura.

Foi possível comparar a concentração de cobre, zinco e ferro nas amostras de tecido de mama saudável e o câncer para as cinco amostras pareadas de mama e foi verificado que a concentração de ferro é maior para a amostra de câncer comparada com a concentração no tecido saudável. Já para cobre e zinco não houve uma coerência, para algumas amostras a concentração de cobre e zinco no tecido do câncer aumentou e para outras diminuiu. Isso não significa que não existe um comportamento para a maioria das amostras, pois o número de amostras é muito pequeno tanto pra afirmar que a concentração de ferro é sempre maior no câncer do que no tecido saudável como para afirmar que não existe um comportamento para cobre e zinco.

Através dos resultados apresentados a microtomografia por fluorescência de raios X se mostrou uma técnica importante e com potencial para analisar as estruturas internas das amostras biológicas como amostras de mama, próstata e pulmão. No caso do pulmão enquanto a microtomografia por transmissão de raios X não conseguiu mostrar nem a distribuição do coeficiente de atenuação, já que este era muito pequeno a microtomografia por fluorescência de raios X conseguiu mostrar a distribuição do ferro, do cobre e do zinco dentro da amostra.

A tomografia por fluorescência em três dimensões torna possível a análise de amostras específicas como micro tumores. Com essa técnica será possível verificar a distribuição de metais dentro do tumor e ao redor do tumor. Por isso uma cooperação com médicos patologistas se torna essencial na escolha de amostras específicas que possam trazer informações importantes para o diagnóstico de doenças. Em uma mesma amostra teríamos a informação da concentração no tumor e fora dele (teoricamente, células saudáveis).

Os resultados apresentados mostram que a tomografia por transmissão de raios X e a tomografia por fluorescência de raios X conseguem trazer informações importantes e complementares na caracterização de amostras de tecidos biológicos.

Nas amostras de tecido tanto de próstata quanto de mama e pulmão foi possível fazer a reconstrução dos elementos traços ferro, cobre e zinco e obter a informação da concentração elementar ponto a ponto. Mas para poder determinar se existe uma diferença entre as concentrações de ferro, cobre e zinco e o tipo de tecido, um maior número de amostras de próstata e mama devem ser analisados.

Além disso, sugiro um estudo do comportamento do coeficiente de atenuação na faixa de energia de 5 keV a 15 keV para vários materiais diferentes. Sugiro que seja feita uma avaliação estatística para saber se é possível implementar no programa de reconstrução a extrapolação do coeficiente de atenuação para energia de fluorescência de raios X para um grupo, ou grupos de materiais.

## Referências Bibliográficas

ATTIX, F.H., 1986, *Introduction to Radiological Physics and Radiation Dosimetry*. 1ed. New York, John Wiley & Sons.

BERNASCONI, G., TAJANI, A., 1996, “Quantitative X-Ray Analysis System (QXAS) Software”, Package: Documentation Version 1.2. International Atomic Energy Agency, Vienna.

BRUNETTI A., GOLOSIO B., 2001, “Software for X-ray Fluorescence and scattering Tomographic Reconstruction”, *Comput. Phys. Commun.*, v. 141, pp. 412-425.

CARVALHO M.L., MAGALHÃES T., BECKER M., von Bohlen A., 2007, “Trace elements in human cancerous and healthy tissues: A comparative study by EDXRF, TXRF, synchrotron radiation and PIXE”, *Spectrochimica Acta part B*, v.62, pp.1004-1011.

CESAREO R., MASCARENHAS S., 1989, “A New Tomographic Device Based on the Detection of Fluorescent X-rays”, *Nuclear Instruments and Methods*, v. A277, pp. 669-672.

CESAREO R., BRUNETTI A., GOLOSIO B., LOPES R.T., BARROSO R.C., CASTELLANO A., QUARTA S., DONATIVI M., 2003, “Multiple X-Ray Tomography Using Transmitted, Scattered and Fluorescent Radiation”, *DGZfP-Proceeding BB 84-CD*, Paper 8.

CHUKALINA M., SIMIONOVICI A., SNIGIREV A., SNIGIREVA I., JEFFRIES T., 2002, “Quantitative Characterization of Microsamples by X-ray Fluorescence Tomography”, *X-Ray Spectrometry*, v. 31, pp. 448-450.

CHUKALINA M., SIMIONOVICI A., ZAITSEV S., VANEGAS C.J., 2007, “Qualitative comparison of x-ray fluorescence microtomography setups: standard and confocal collimator apparatus”, *Spectrochimica Acta part B*, v. 62, pp.544-548.



CHWIEJ J., SZCZERBOWSKA-BORUCHOWSKA M., LANKOSZ M., WOJCIK S., FALKENBERG G., STEGOWSKI Z., SETKOWICZ Z., 2005, "Preparation of tissue samples for X-ray fluorescence microscopy", *Spectrochimica Acta part B*, v. 60, pp.1531-1537.

EBASHI S., KOCH M., RUBENSTEIN E., 1991, Handbook on Synchrotron Radiation, 4 ed., Elsevier Science Publishers.

FARQUARSON M.J., GERAKE K., 2004, "The Use of Combined Trace Element XRF and EDXRD Data as a Histopathology Tool Using a Multivariate Analysis Approach in Characterizing Breast Tissue", *X-Ray Spectrometry*, v. 33, pp. 240-245.

FARQUARSON M.J., AL-EBRAHEEM A., GERAKE K., LEEK R., JUBB A., HARRIS A.L., 2009, "Zinc presence in invasive ductal carcinoma of the breast and its correlation with oestrogen receptor status", *Physics in Medicine and Biology*, v. 54, pp. 4213-4223.

FELDKAMP J.M., SCHROER C.G., PATOMMEL J. et al., 2007, "Compact x-ray microtomography system for element mapping and absorption imaging", *Review of Scientific Instruments*, v. 78, pp. 073702..

GARG A.N., SINGH V., WEGINWAR R.G., SAGDEO V.N., 1994, "An Elemental Correlation study in Cancerous and Normal Breast Tissue with Successive Clinical Stages By Neutron Activation Analysis", *Biological Trace Element Research*, v.46, p. 185-202.

GERAKE K., FARQUARSON M.J., BRADLET D. A., 2002, "Concentration of Fe, Cu and Zn in Breast Tissue: a Synchrotron XRF Study", *Physics in Medicine and Biology*, v. 47, pp. 1-13.

GERAKE K., FARQUARSON M.J., BRADLET D. A., 2004a, "X-ray Fluorescence and Energy Dispersive X-ray Diffraction for the Quantification of Elemental Concentrations in Breast Tissue", *Physics in Medicine and Biology*, v. 49, pp. 1-12.

GERAKI K., FARQUARSON M.J., BRADLET D. A., 2004b, “A synchrotron XRF study on trace elements and potassium in Breast tissue”, *Nuclear Instruments and Methods*, v. B213, pp. 564-568.

GOLOSIO B., SIMIONOVICI A., SOMOGYI A., LEMELLE L., CHUKALINA M., BRUNETTI A., 2003, “Internal Elemental Microanalysis Combining x-Ray Fluorescence, Compton and Transmission Tomography”, *Journal of applied Physics*, v. 94, pp. 145-156.

HARDING G., KOSANETZKY J., NEITZEL V., 1990, “Energy-dispersive X-ray Diffraction Tomography”, *Physics in Medicine and Biology*, v.35, p.33-41.

HOGAN J. P., GONSALVES R.A., KRIEGER A.S., 1991, “Fluorescent Computer Tomography: A Model for Correction X-Ray Absorption”, *IEEE Transactions on Nuclear Science*, NS v. 38, pp.1721-1727.

INCa, 2009, disponível on line: disponível on line: [http://www.inca.gov.br/releases/press\\_release\\_view.asp?ID=2283](http://www.inca.gov.br/releases/press_release_view.asp?ID=2283), pesquisa realizada em 25/11/09.

JUNIOR E.A., YAMASHITA H., 2001, “Aspectos Básicos de Tomografia Computadorizada e Ressonância Magnética”, *Revista Brasileira de Psiquiatria*, v. 23 (Supl 1), p. 2-3.

KANIAS G.D., KOURI E., ARVANITI H., KARAIOSIFIDI H., KOUNELI S., 1994, “Trace element content in breasts with fibrocystic disease”, *Biological Trace Element Research*, v.43, p. 363-370.

KUBALA-KUKÚS A., BANÁS D., BRAZIEWICS J., GÓZDZ S., MAJEWSKA U., PAJEK M., 2007, “Analysis of elemental concentration censored distributions in breast malignant and breast benign neoplasm tissues”, *Spectrochimica Acta part B*, v. 62, pp.695-701.

KWIATEK W.M., BANÁS A., BANÁS K., CINQUE G., DYDUCH G.,

FALKENBERG G., KISIEL A., MARCELLI A., PODGÓRCZYK M., 2007, "Micro and bulk analysis of prostate tissues classified as hyperplasia", *Spectrochimica Acta part B*, v. 62, pp.707-710.

HOUNSFIELD, G.N., 1973, "Computerized transverse axial scanning (tomography)", *British Journal of Radiology*, v. 46, pp. 1016-1022.

LACHANCE,G.R., CLAISSE,F., 1994, *Quantitative X-ray Fluorescence Analysis: Theory and Application*. 1ed. New York, Wiley.

LEITÃO R.G., 2009, *Análise Multielementar de Tecidos de Próstata Usando Fluorescência de Raios X por Reflexão Total e Radiação Síncrotron*. Dissertação de MSc., COPPE/UFRJ, Rio de Janeiro, RJ, Brasil.

LNLS, 2009, disponível on line: [www.lnls.br](http://www.lnls.br), pesquisa realizada em 25/11/09.

LOPES R.T., ROCHA H.S., JESUS E.F.O., BARROSO R.C., OLIVEIRA L.F., ANJOS M.J., BRAZ D., SIMABUCO S.M., 2003, "X-ray Transmission Microtomography Using Synchrotron Radiation", *Nuclear Instruments and Methods*, v. **A505**, pp.604-607.

MAGALHÃES M.G., CASICAVA J., PEIXOTO J.E., CANELA E., 2005, Manual de técnicas mamográficas, Universidade Estadual do Rio de Janeiro.

MAGALHÃES T., von BOHLEN A., CARVALHO M.L., BECKER M., 2006, "Trace elements in human cancerous and healthy tissues from the same individual: A comparative study by TXRF and EDXRF", *Spectrochimica Acta part B*, v. 61, pp.1185-1193.

MAJEWSKA U., BANAS D., BRAZIEWICZ J., et al., 2007, "Trace element concentration distribution in breast, lung and colon tissues", *Physics in medicine and biology*, v. 52(13), pp. 3895-3911.

MÉNEZ B., SIMIONOVICI A., PHILIPPOT P., BOHIC S., GIBERT F., CHUKALINA M., 2001, " X-ray fluorescence micro-tomography of an individual fluid

inclusion using a third generation synchrotron light source”, *Nuclear Instruments and Methods*, v. B 181, pp. 749-754.

NAGHEDOLFEIZI M., CHUNG J-S., MORRIS R., ICE G.E., YUN W.B., CAI Z. and LAI B., 2003, “X-ray Fluorescence microtomography study of Trace elements in a SiC Nuclear Fuel Shell”, *Journal of Nuclear Materials*, v. 312, pp.146-155.

NCI,2009, disponível on line em: <http://www.cancer.gov>, pesquisa realizada em 25/11/2009.

NG K.H., BRADLEY D.A., LOOI L.M., 1997, “Elevated Trace Element Concentrations in Malignant Breast Tissues, *British Journal of Radiology*, v.70, p.375-382.

NIST, 2009, X-ray Mass Attenuation Coefficients, disponível on line: <http://physics.nist.gov/PhysRefData/XrayMassCoef/cover.html>, pesquisa realizada em 22/01/09.

RAJU NAGA G.J., SARITA P., RAVI KUMAR M., RAMANA MURTY G.A.V., SEETHARAMI REDDY B., LAKSHMINARAYANA S., VIJAYAN V., RAMA LAKSHMI P.V.B., SATYANARAYANA GAVARASANA, BHULOKA REDDY S., 2006, “Trace elemental correlation study in malignant and normal breast tissue by PIXE technique”, *Nuclear Instruments and Methods*, v. 247, pp. 361-367.

PEREIRA G.R., 2006, *Imagens de Distribuição Elementar por Microtomografia por Fluorescência de Raios X utilizando Radiação Síncrotron*. Dissertação de MSc., COPPE/UFRJ, Rio de Janeiro, RJ, Brasil.

PEREIRA G.R., ROCHA H.S., ANJOS M.J., FARIA P., PÉREZ C., LOPES R.T., 2007a, “X-ray fluorescence and X-ray transmission microtomography imaging system”, *Nuclear Instruments and Methods*, v. A 581, pp. 128-132.

PEREIRA G.R., ANJOS M.J., ROCHA H.S., FARIA P., PÉREZ C., LOPES R.T., 2007b, “Computed tomography and X-ray fluorescence CT of biological samples”,

*Nuclear Instruments and Methods*, v. A 580, pp. 951-954.

PEREIRA G.R., LOPES R.T., ANJOS M.J., ROCHA H.S., PÉREZ C., 2007c, “X-ray fluorescence microtomography analyzing reference samples”, *Nuclear Instruments and Methods*, v. A 579, pp. 322-325.

PEREIRA G.R., ROCHA H.S., ANJOS M.J., FARIA P.C.M.A, PÉREZ C., LOPES R.T., 2008, “Elemental Distribution Mapping on Breast Tissue Samples”, *European Journal of Radiology*, v. 68 (3), pp. S104-S108.

PEREIRA, G. R., ROCHA, H. S., CALZA, C., ANJOS, M. J., PÉREZ, C. A., LOPES, R. T., 2009a, “X-Ray fluorescence microtomography under various excitation conditions”, *X-Ray Spectrometry*, v. 38, p. 244-249.

PEREIRA, G. R., ROCHA, H. S., CALZA, C., Anjos, M. J., PÉREZ, C. A., LOPES, R. T., 2009b “Imaging System for XRF Microtomography at LNLS-Brazil.”, *IEEE Transactions on Nuclear Science*, v. 56, p. 1426-1429.

PODGÓRCZYK M., KWIATEK W. M., ZAJAC W.M., DULINSKA-LITEWKA J., WELTER E., GROLMUND D., 2008, “Zinc in n native tissues and cultured cell lines of human prostate studied by SR-XRF and XANES”, *X-Ray Spectrometry*, v. 38, pp. 557-562.

ROCHA H.S., PEREIRA G.R., ANJOS M.J., FARIA P., KELLERMANN G., PÉREZ C., TIRAO G., MAZZARO I., GILES C., LOPES R.T., 2007, “Diffraction enhanced imaging and x-ray fluorescence microtomography for analyzing biological samples”, *X-Ray Spectrometry*, v. 36, pp. 247-253.

SAMBER B. DE, EVENS R., SCHAMPHELAERE De, SILVERSMIT G. ET AL., 2008, “A combination of synchrotron and laboratory X-ray techniques for studying tissue-specific trace level metal distribution in *Daphnia magna*”, *Journal of analytical Atomic Spectrometry*, v. 23, pp. 829-839.

SAPOTA A., DARAGÓ a., TACZALSKI j., KILANOWICZ a., 2009, “ Disturbed homeostasis of zinc and other essential elements in the prostate gland dependent on the

character of pathological lesions”, *Biometals*, v. 7, n.22, pp. 1041-1049.

SCHROER C.G., 2001, “Reconstructing X-ray Fluorescence Microtomograms”, *Applied Physics Letters*, v. 79, n.12, pp.1912-1914.

SILVA M.P., TOMAL A., PÉREZ C.A., RIBEIRO-SILVA A., POLETTI M.E., 2009, “Determination of CA, Fe, Cu and Zn and their correlations in breast cancer and normal adjacent tissues”, *X-Ray Spectrometry*, v. 38, pp. 103-111.

SILVA M.P., ZUCCHI O.L.A.D., RIBEIRO-SILVA A., POLETTI M.E., 2009, “Discriminant analysis of trace elements in normal, benign and malignant breast tissues measured by total reflection X-ray fluorescence”, *Spectrochimica acta part B*, v. 64, pp. 587-592.

SIMIONOVICI A., CHUKALINA M., GÜNZLER F., SCHROER CH., SNIGIREV A., SNIGIREVA I., TÜMMLER J., WEITKAMP T., 2001, “X-ray Microtome by Fluorescence Tomography”, *Nuclear Instruments and Methods*, v. A467-468, pp. 889-892.

TAKEDA T., 2005, “Phase-contrast and fluorescent x-ray imaging for biomedical researches”, *Nuclear Instruments and Methods*, v. A 548, pp. 38-46.

TAKEUCHI A., TERADA Y., SUZUKI Y., UESUGI K., AOKI S., 2009, “Confocal full-field X-ray microscope for novel three-dimensional X-ray imaging”, *Journal of Synchrotron Radiation*, v. 16, pp. 616-621.

TAKEUCHI A., TERADA Y., UESUGI K., SUZUKI Y., 2009, “Three-dimensional X-ray fluorescence imaging with confocal full-field X-ray microscope”, *Nuclear Instruments and Methods*, article in press.

VARTSKY D., SHILSTEIN S., BERCOVICH A., HUSZAR M., BRESKIN A., CHECHIK R., KOROTINSKY S., MALNICK S.D., MORIEL E., 2003, “Prostatic zinc and prostate specific antigen: an experimental evaluation of their combined diagnostic value”, *The Journal of Urology*, v. 170, pp. 2258-2262.

VINCZE L., VEKEMANS B., JANSSENS K., FALKENBERG G., SZALÓKI I., 2002a, “X-ray Fluorescence Tomography Studies on Artificial Objects”, Hamburger Synchrotronstrahlungslabor HASYLAB am Deutschen Elektronen-Synchrotron DESY, *Jahresbericht*, disponível on line: <http://www-hasyllab.desy.de/>, pesquisa realizada em 16/04/05.

VINCZE L., VEKEMANS B., SZALÓKI I., JANSSENS K., FENG H., JONES K.W., GRIEKEN VAN, ADAMS F., 2002b, “High Resolution X-ray Fluorescence Micro-Tomography on Single Sediment Particles”, *SPIE Procs.*, v. 4503, p. 240-248.

WATANABE N., YAMAMOTO K., TAKANO H., OHIGASHI T., YOKOSUKA H., AOTA T., AOKI S., 2001, “ X-ray fluorescence microtomography with Wolter mirror system”, *Nuclear Instruments and Methods*, v. A467-468, pp. 837-840.

WEGRZYNEK D., MARKOWICZ A., BAMFORD S., CHINEA-CANO E., BOGOVAC M., 2005, “Micro-beam x-ray fluorescence and absorption imaging techniques at IAEA laboratories”, *Nuclear Instruments and Methods*, v. B 231, pp. 176-182.

WU T., SEMPOS C.T., FREUDENHEIM J.L., MUTI P., SMIT E., 2004, “ Serum Iron, Copper and Zinc Concentrations and Risk of Câncer Mortality in US Adults”, *Annals of Epidemiol*, v.14(3), p.195-201.

YAMAN M., ATICI D., BAKIRDERE S., AKDENIZ I., 2005, “ Comparison of trace elements metal concentration in malign and benign human prostate”, *Journal of Medical Chemistry*, v.48, p.630-634.

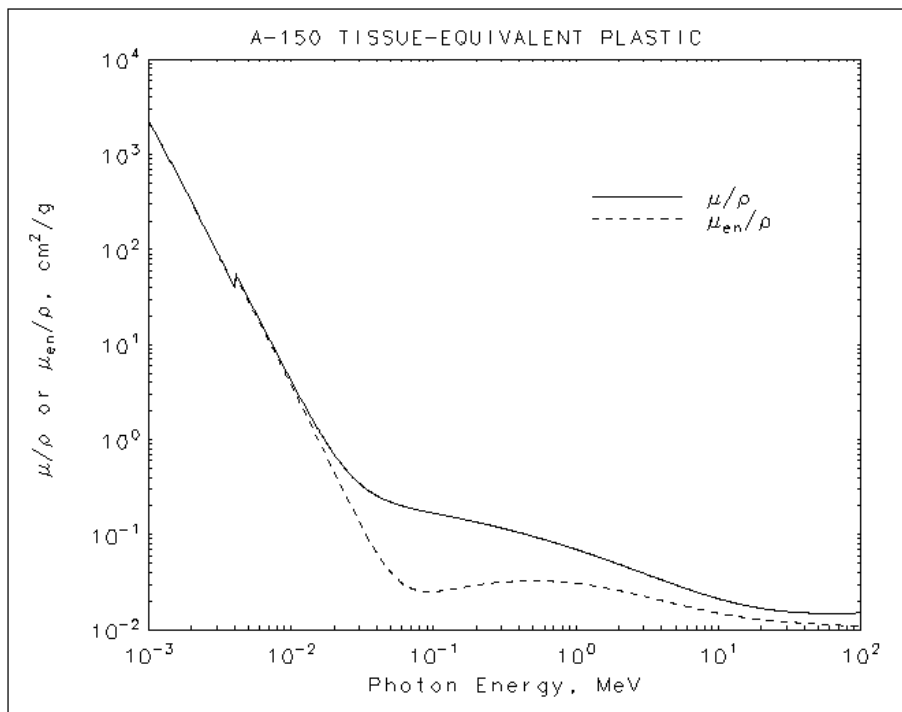
YUASA T., TAKEDA T., DILMANIAN F.A., AKIBA M., HYODO K., AKATSUDA T., ITAI Y., 1997, “Fast Algorithm for Fluorescencet X-Ray CT Reconstruction”, *Proceedings – 19<sup>th</sup> International Conference – IEEE/EMBS*, p.863-866.

ZAICHICK V., 2004, “ INAA and EDXRF applications in the age dynamics assessment of Zn content and distribution in the normal human prostate”, *Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry*, v.262, p.229-234.

# Apêndice

## A Valores do coeficiente de atenuação para diversos materiais

### A.1 A-150



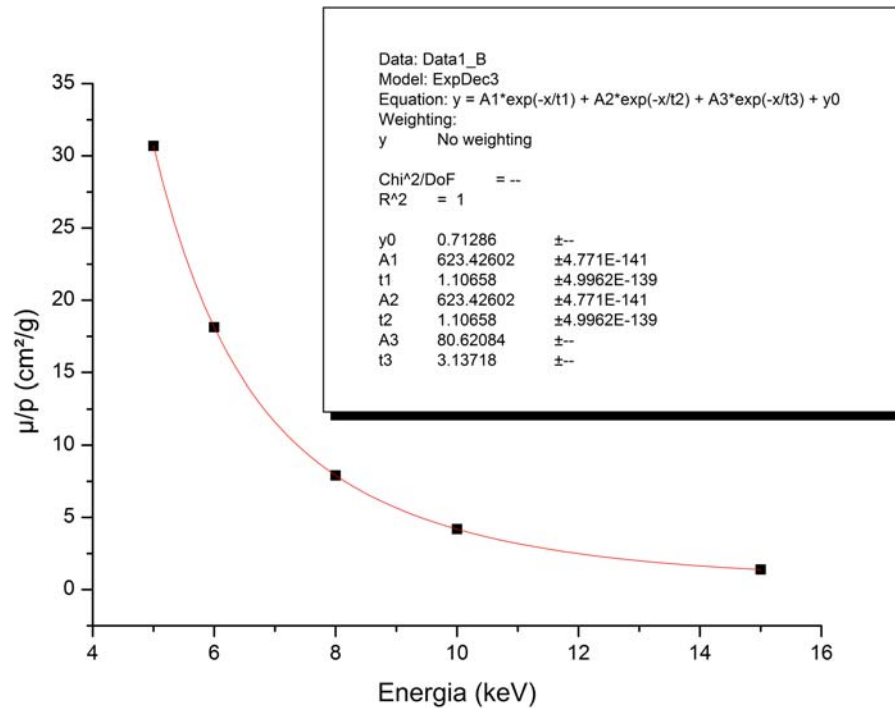
**Figura A.1** Gráfico do coeficiente de atenuação mássico para o tecido equivalente A-150 (NIST, 2009).

Densidade = 1,127 (g/cm<sup>3</sup>)

Energy (keV)	$\mu/\rho$ (cm <sup>2</sup> /g)
5	30,69
6	18,13
8	7,91
10	4,19
15	1,40



Ajuste da curva do coeficiente mássico de atenuação na região de interesse:

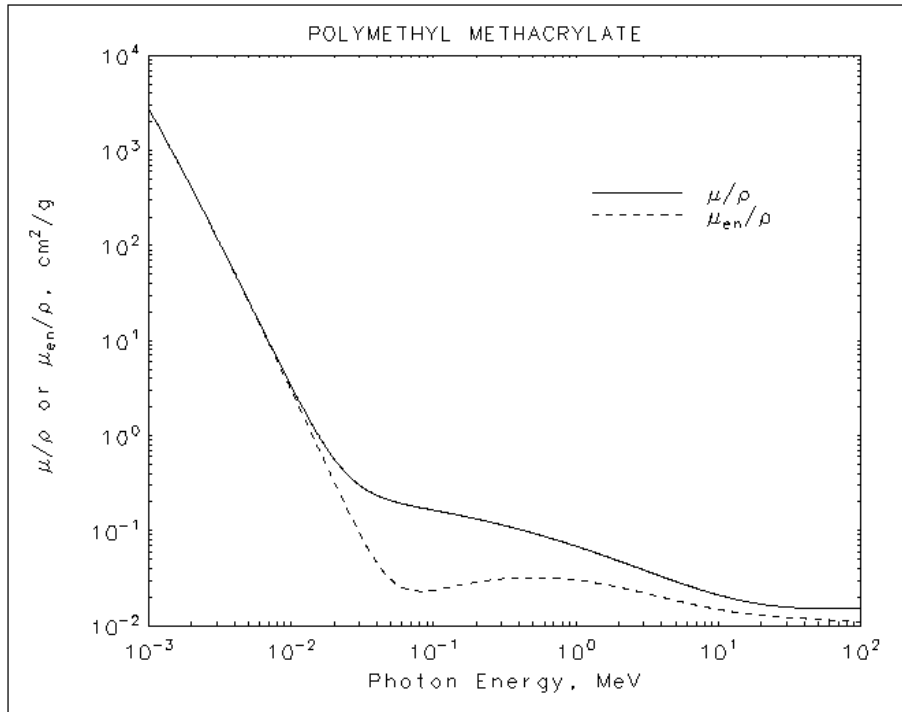


**Figura A.2** Gráfico do ajuste da curva do coeficiente de atenuação mássico para o tecido equivalente A-150.

A partir da equação, calcula-se a razão entre o coeficiente de atenuação para as energias de fluorescência de interesse.

Razão do $\mu$ entre 6,4 keV e 12 keV	6,02
Razão do $\mu$ entre 8,0 keV e 12 keV	3,17
Razão do $\mu$ entre 8,6 keV e 12 keV	2,58
Razão do $\mu$ entre 9,2 keV e 12 keV	2,13

## A.2 Acrílico

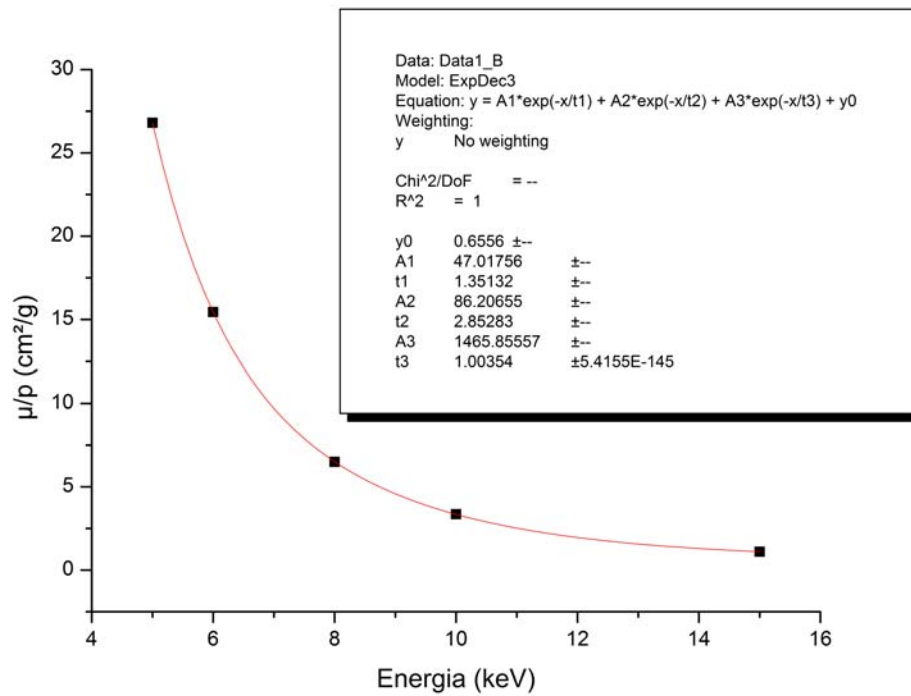


**Figura A.3** Gráfico do coeficiente de atenuação mássico para o acrílico (NIST, 2009).

Densidade = 1,190 ( $\text{g}/\text{cm}^3$ )

Energy (keV)	$\mu/\rho$ ( $\text{cm}^2/\text{g}$ )
5	26,81
6	15,45
8	6,49
10	3,36
15	1,10

Ajuste da curva do coeficiente mássico de atenuação na região de interesse:

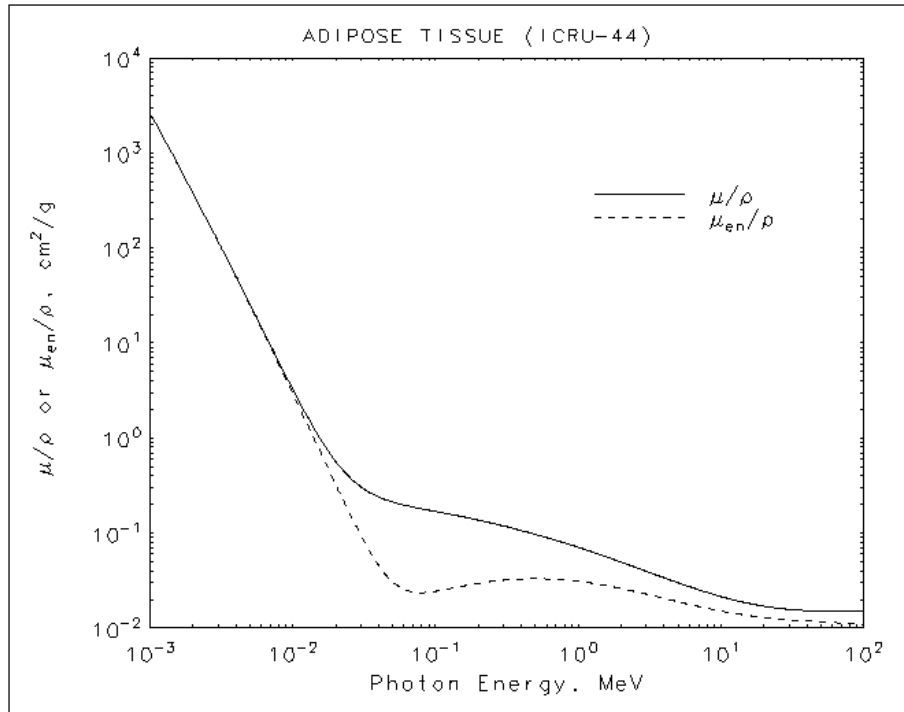


**Figura A.4** Gráfico do ajuste da curva do coeficiente de atenuação mássico para o acrílico.

A partir da equação, calcula-se a razão entre o coeficiente de atenuação para as energias de fluorescência de interesse.

Razão do $\mu$ entre 6,4 keV e 12 keV	6,48
Razão do $\mu$ entre 8,0 keV e 12 keV	3,31
Razão do $\mu$ entre 8,6 keV e 12 keV	2,67
Razão do $\mu$ entre 9,2 keV e 12 keV	2,19

### A.3 Tecido Adiposo

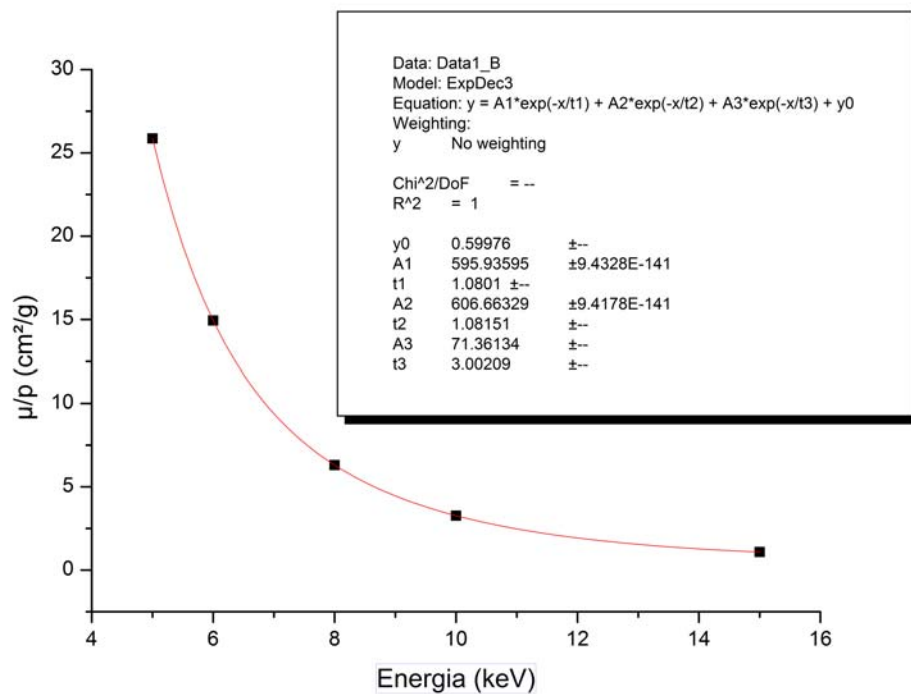


**Figura A.5** Gráfico do coeficiente de atenuação mássico para o tecido adiposo (NIST, 2009).

Densidade = 0,95 (g/cm<sup>3</sup>)

Energy (keV)	$\mu/\rho$ (cm <sup>2</sup> /g)
5	25,87
6	14,94
8	6,30
10	3,27
15	1,08

Ajuste da curva do coeficiente mássico de atenuação na região de interesse:

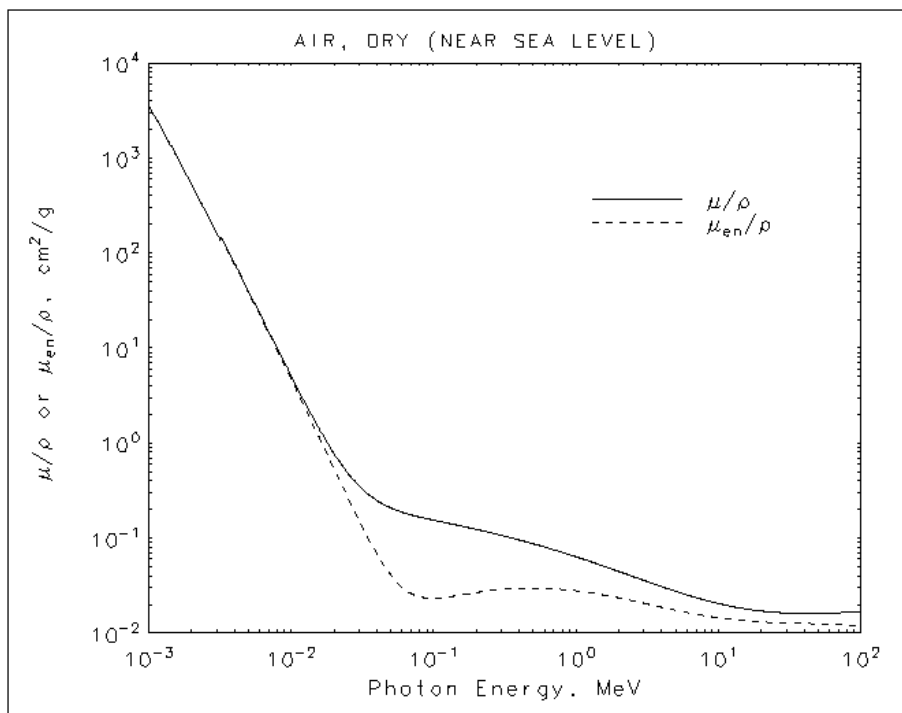


**Figura A.6** Gráfico do ajuste da curva do coeficiente de atenuação mássico para o tecido adiposo.

A partir da equação, calcula-se a razão entre o coeficiente de atenuação para as energias de fluorescência de interesse.

Razão do $\mu$ entre 6,4 keV e 12 keV	6,37
Razão do $\mu$ entre 8,0 keV e 12 keV	3,27
Razão do $\mu$ entre 8,6 keV e 12 keV	2,64
Razão do $\mu$ entre 9,2 keV e 12 keV	2,16

## A.4 Ar seco

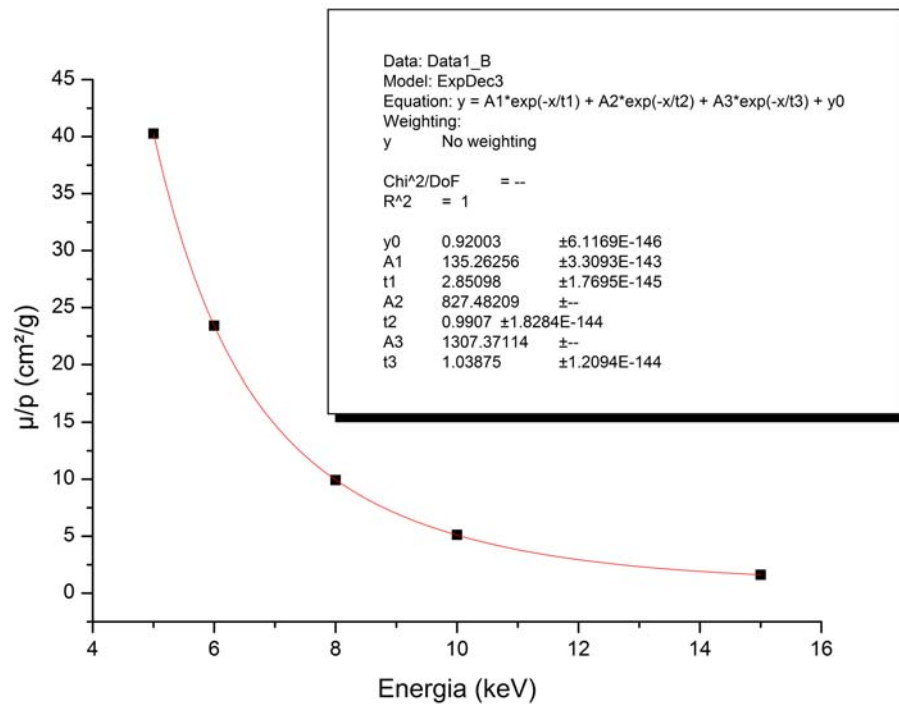


**Figura A.7** Gráfico do coeficiente de atenuação mássico para o ar seco (NIST, 2009).

Densidade = 0,0012 ( $\text{g}/\text{cm}^3$ )

Energy (keV)	$\mu/\rho$ ( $\text{cm}^2/\text{g}$ )
5	40,27
6	23,41
8	9,92
10	5,12
15	1,61

Ajuste da curva do coeficiente mássico de atenuação na região de interesse:

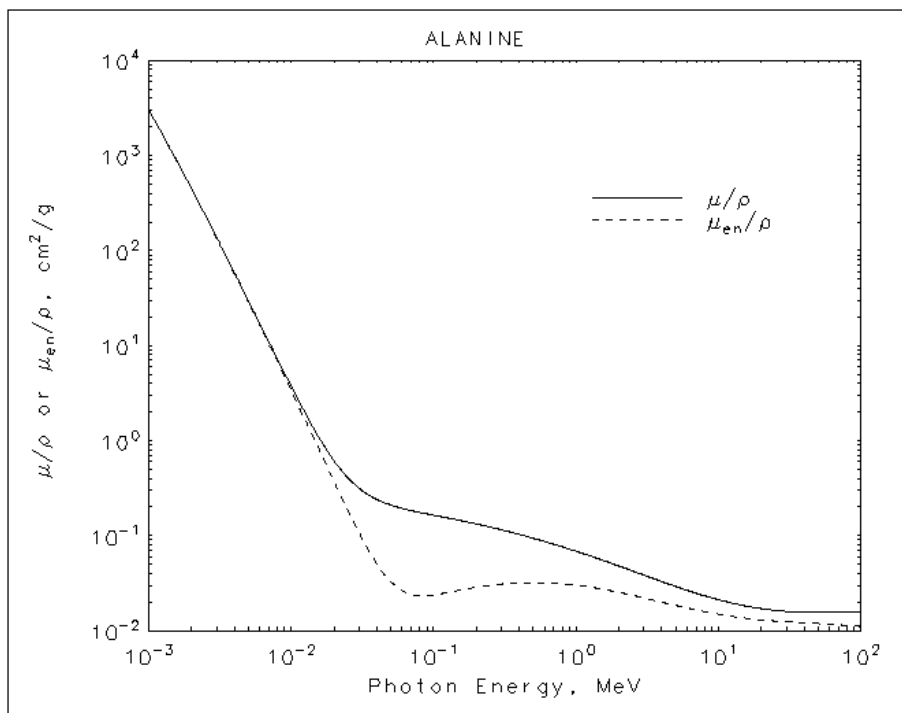


**Figura A.8** Gráfico do ajuste da curva do coeficiente de atenuação mássico para o ar seco.

A partir da equação, calcula-se a razão entre o coeficiente de atenuação para as energias de fluorescência de interesse.

Razão do $\mu$ entre 6,4 keV e 12 keV	6,55
Razão do $\mu$ entre 8,0 keV e 12 keV	3,37
Razão do $\mu$ entre 8,6 keV e 12 keV	2,72
Razão do $\mu$ entre 9,2 keV e 12 keV	2,22

## A.5 Alanina



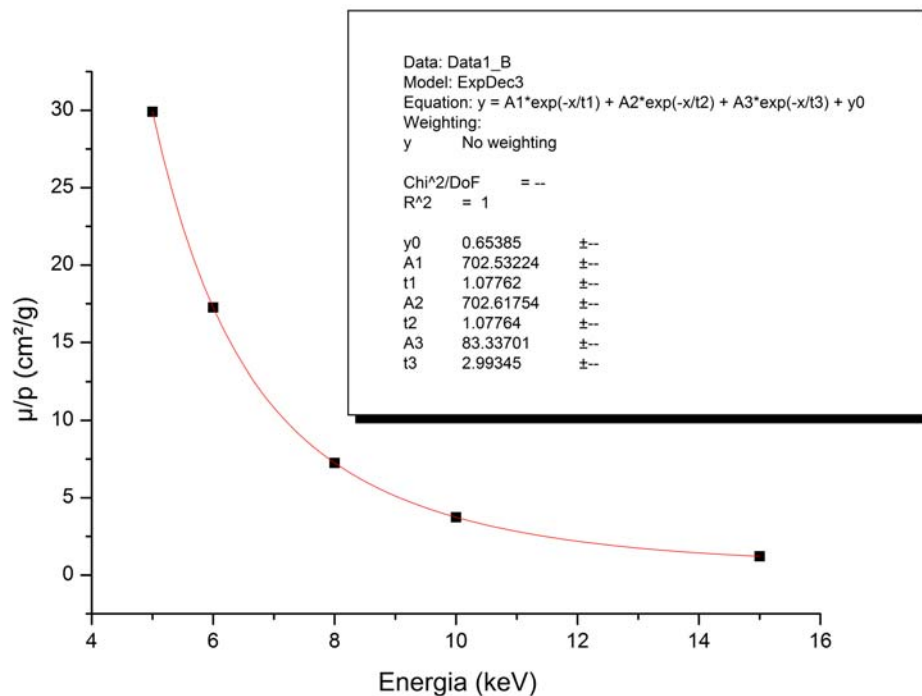
**Figura A.9** Gráfico do coeficiente de atenuação mássico para a alanina (NIST, 2009).

Densidade = 1,424 (g/cm<sup>3</sup>)

Energy (keV)	$\mu/\rho$ (cm <sup>2</sup> /g)
5	29,91
6	17,21
8	7,25
10	3,74
15	1,21



Ajuste da curva do coeficiente mássico de atenuação na região de interesse:

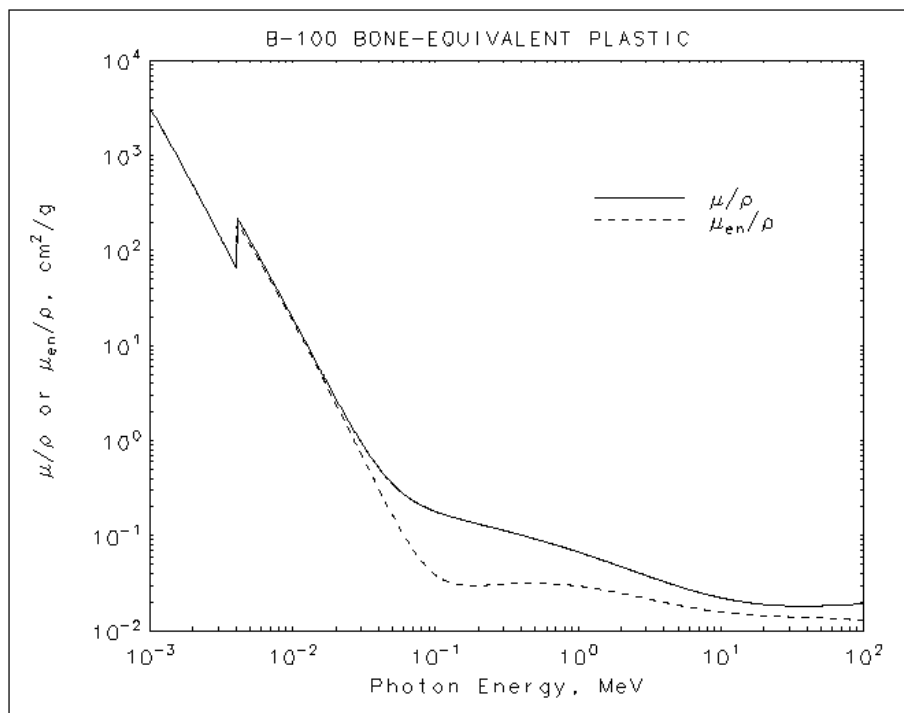


**Figura A.10** Gráfico do ajuste da curva do coeficiente de atenuação mássico para a alanina.

A partir da equação, calcula-se a razão entre o coeficiente de atenuação para as energias de fluorescência de interesse.

Razão do $\mu$ entre 6,4 keV e 12 keV	6,47
Razão do $\mu$ entre 8,0 keV e 12 keV	3,31
Razão do $\mu$ entre 8,6 keV e 12 keV	2,67
Razão do $\mu$ entre 9,2 keV e 12 keV	2,18

## A.6 B100

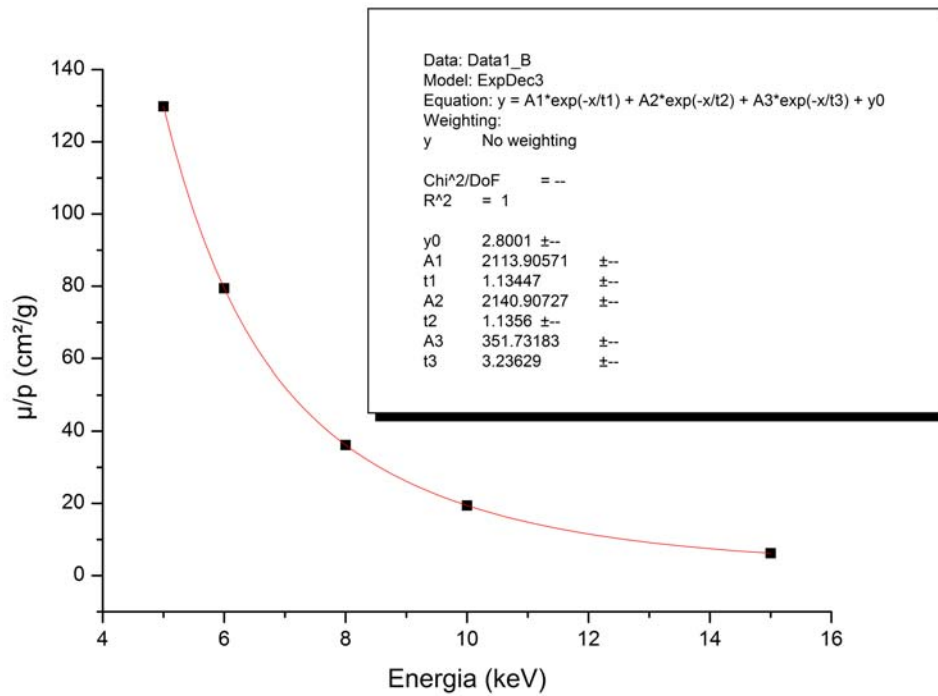


**Figura A.11** Gráfico do coeficiente de atenuação mássico para o B100 (NIST, 2009).

Densidade = 1,45(g/cm<sup>3</sup>)

Energy (keV)	$\mu/\rho$ (cm <sup>2</sup> /g)
5	129,8
6	79,42
8	36,19
10	19,44
15	6,22

Ajuste da curva do coeficiente mássico de atenuação na região de interesse:

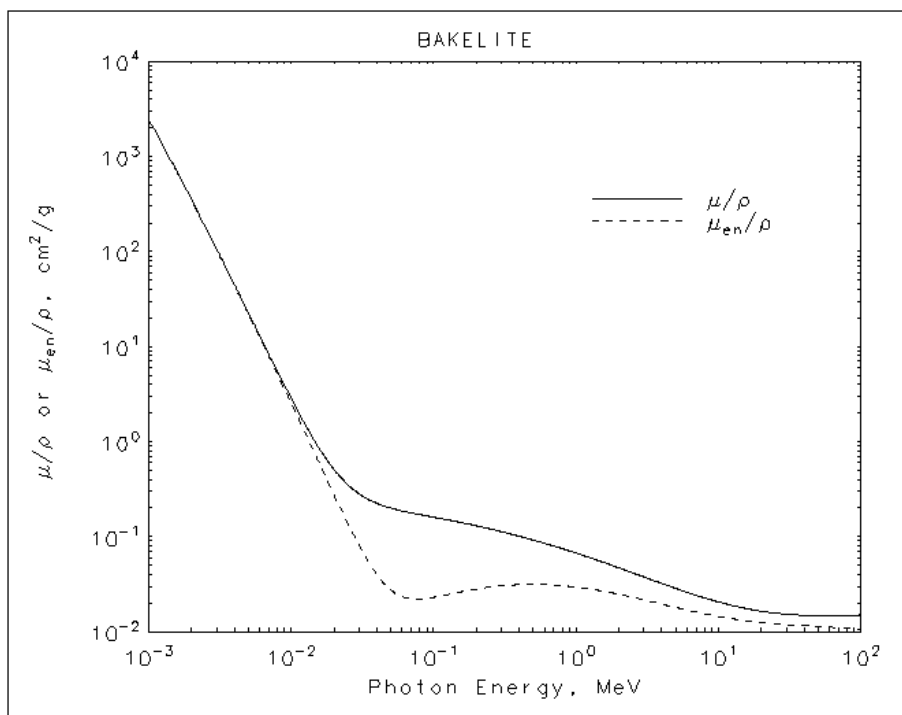


**Figura A.12** Gráfico do ajuste da curva do coeficiente de atenuação mássico para o B100.

A partir da equação, calcula-se a razão entre o coeficiente de atenuação para as energias de fluorescência de interesse.

Razão do $\mu$ entre 6,4 keV e 12 keV	5,77
Razão do $\mu$ entre 8,0 keV e 12 keV	3,14
Razão do $\mu$ entre 8,6 keV e 12 keV	2,57
Razão do $\mu$ entre 9,2 keV e 12 keV	2,13

## A.7 Bakelite

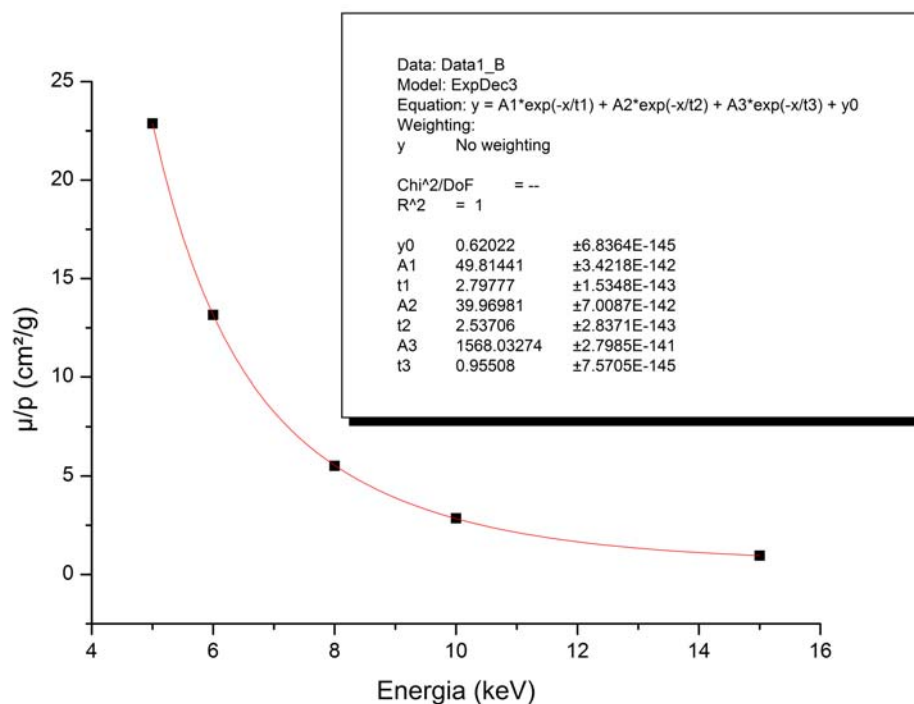


**Figura A.13** Gráfico do coeficiente de atenuação mássico para o bakelite (NIST, 2009).

Densidade = 1,25 (g/cm<sup>3</sup>)

Energy (keV)	$\mu/\rho$ (cm <sup>2</sup> /g)
5	22,88
6	13,15
8	5,52
10	2,86
15	0,95

Ajuste da curva do coeficiente mássico de atenuação na região de interesse:

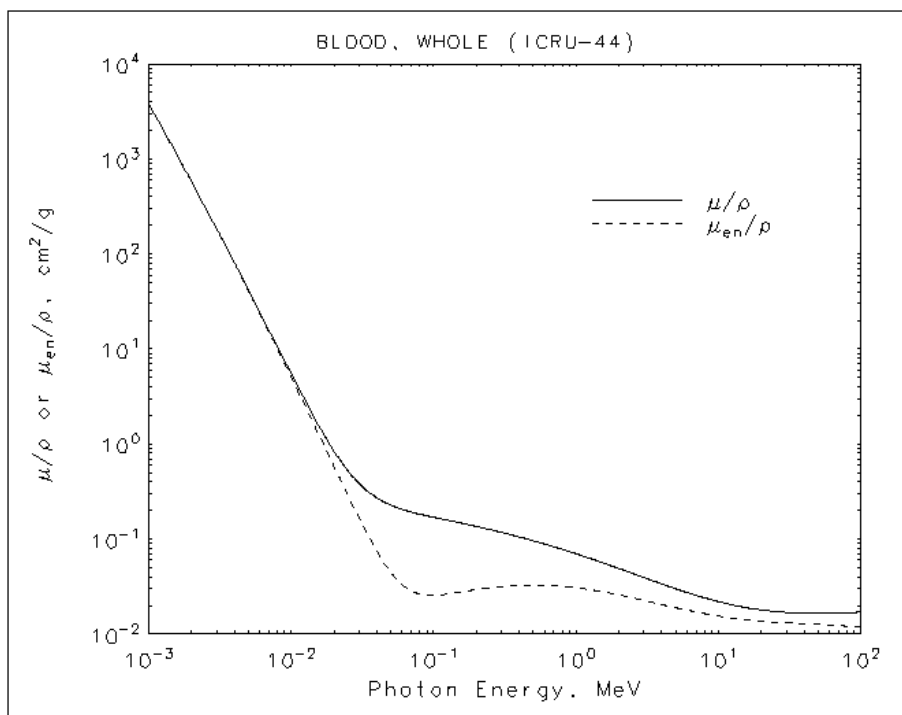


**Figura A.14** Gráfico do ajuste da curva do coeficiente de atenuação mássico para o bakelite.

A partir da equação, calcula-se a razão entre o coeficiente de atenuação para as energias de fluorescência de interesse.

Razão do $\mu$ entre 6,4 keV e 12 keV	6,51
Razão do $\mu$ entre 8,0 keV e 12 keV	3,34
Razão do $\mu$ entre 8,6 keV e 12 keV	2,69
Razão do $\mu$ entre 9,2 keV e 12 keV	2,19

## A.8 Sangue

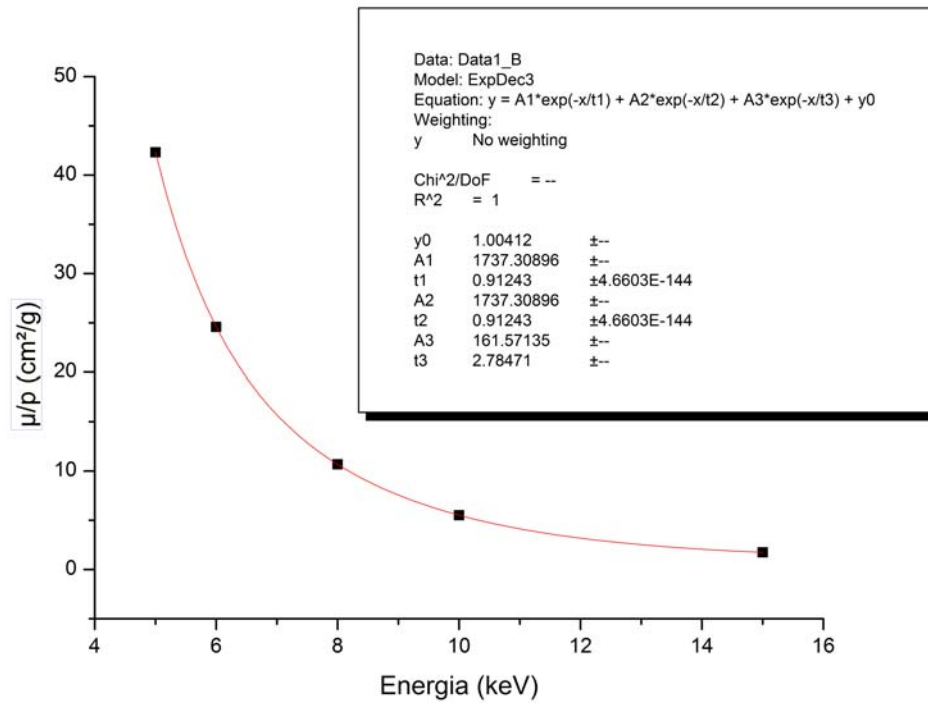


**Figura A.15** Gráfico do coeficiente de atenuação mássico para o sangue (NIST, 2009).

Densidade = 1,06 (g/cm<sup>3</sup>)

Energy (keV)	$\mu/\rho$ (cm <sup>2</sup> /g)
5	42,32
6	24,58
8	10,68
10	5,52
15	1,74

Ajuste da curva do coeficiente mássico de atenuação na região de interesse:

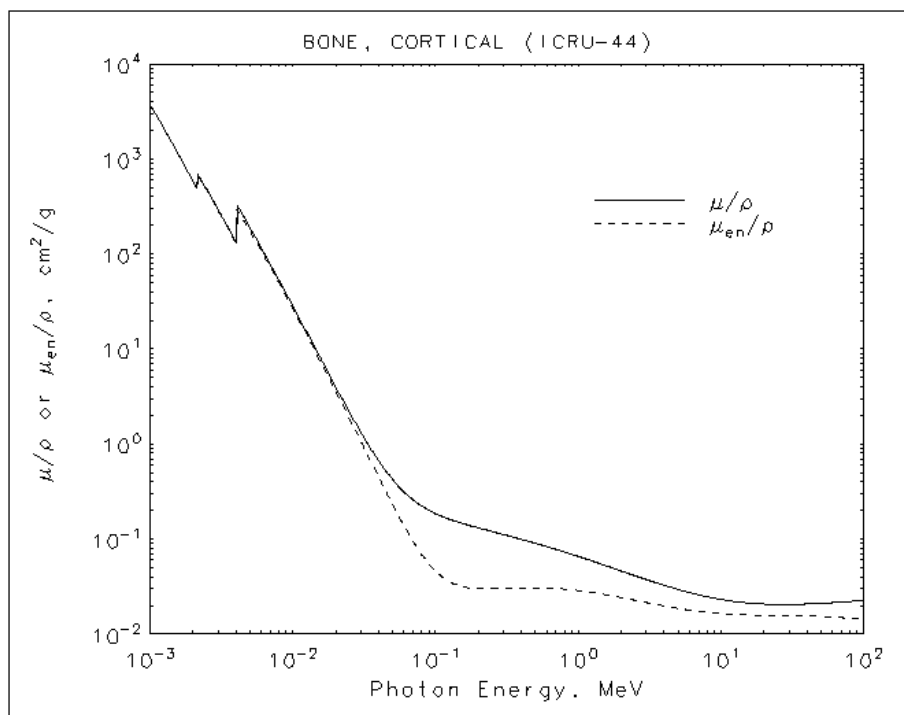


**Figura A.16** Gráfico do ajuste da curva do coeficiente de atenuação mássico para o sangue.

A partir da equação, calcula-se a razão entre o coeficiente de atenuação para as energias de fluorescência de interesse.

Razão do $\mu$ entre 6,4 keV e 12 keV	6,39
Razão do $\mu$ entre 8,0 keV e 12 keV	3,36
Razão do $\mu$ entre 8,6 keV e 12 keV	2,72
Razão do $\mu$ entre 9,2 keV e 12 keV	2,23

## A.9 Osso cortical



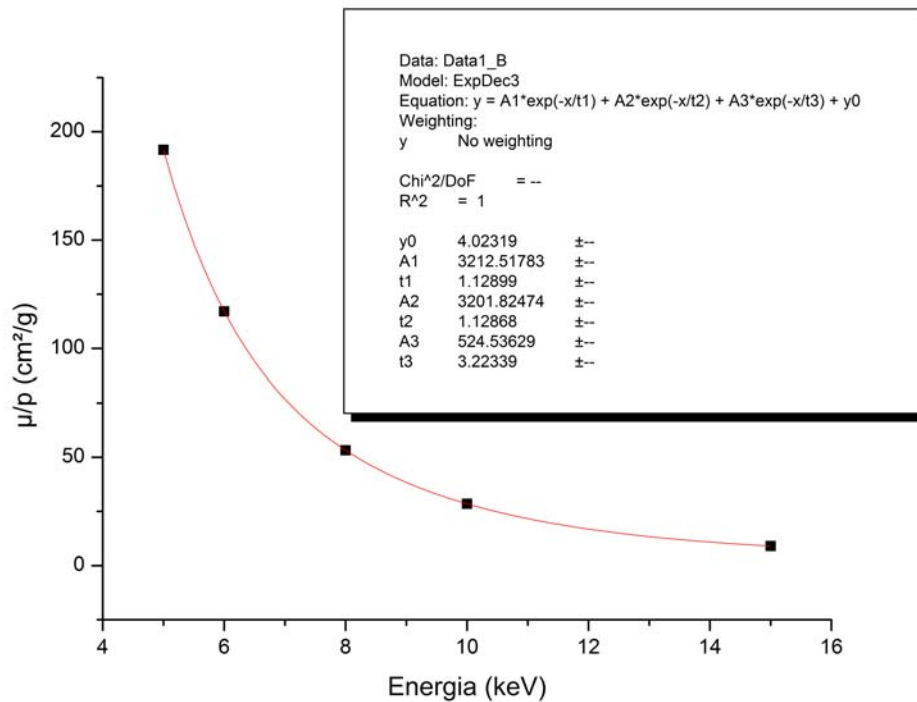
**Figura A.17** Gráfico do coeficiente de atenuação mássico para o osso cortical (NIST, 2009).

Densidade = 1,92 (g/cm<sup>3</sup>)

Energy (keV)	$\mu/\rho$ (cm <sup>2</sup> /g)
5	191,7
6	117,1
8	53,23
10	28,51
15	9,03



Ajuste da curva do coeficiente mássico de atenuação na região de interesse:

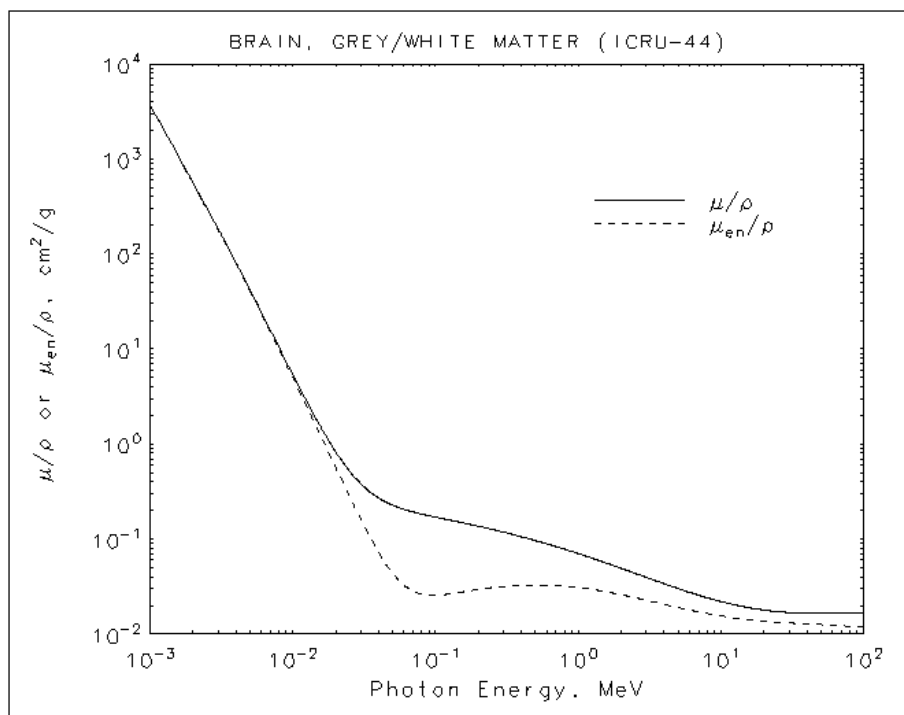


**Figura A.18** Gráfico do ajuste da curva do coeficiente de atenuação mássico para o osso cortical.

A partir da equação, calcula-se a razão entre o coeficiente de atenuação para as energias de fluorescência de interesse.

Razão do $\mu$ entre 6,4 keV e 12 keV	5,88
Razão do $\mu$ entre 8,0 keV e 12 keV	3,17
Razão do $\mu$ entre 8,6 keV e 12 keV	2,59
Razão do $\mu$ entre 9,2 keV e 12 keV	2,15

## A.10 Cérebro

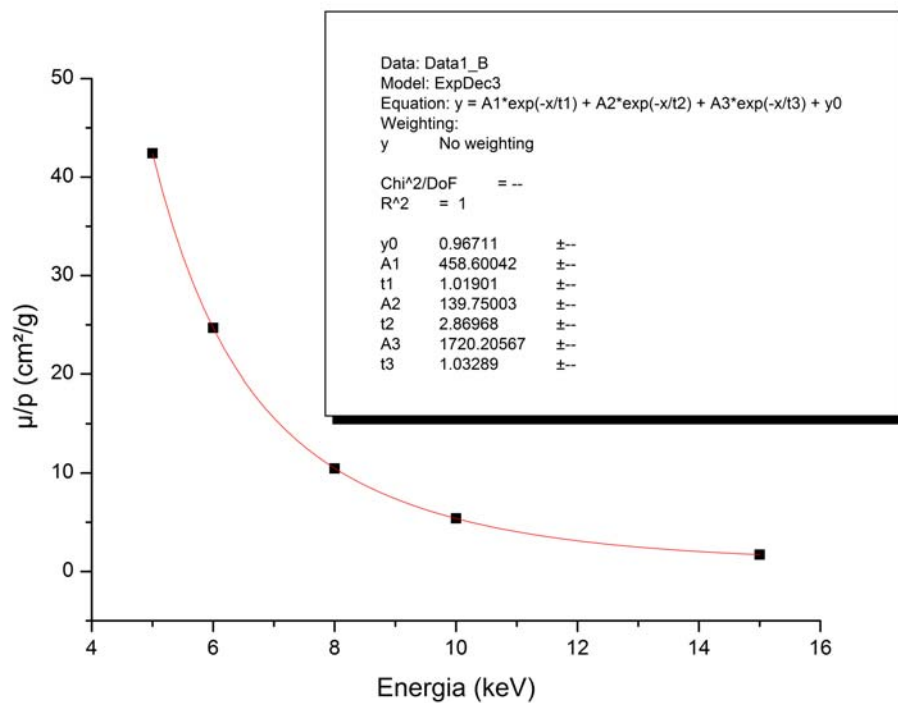


**Figura A.19** Gráfico do coeficiente de atenuação mássico para o cérebro (NIST, 2009).

Densidade = 1,04 (g/cm<sup>3</sup>)

Energy (keV)	$\mu/\rho$ (cm <sup>2</sup> /g)
5	42,42
6	24,68
8	10,47
10	5,41
15	1,71

Ajuste da curva do coeficiente mássico de atenuação na região de interesse:

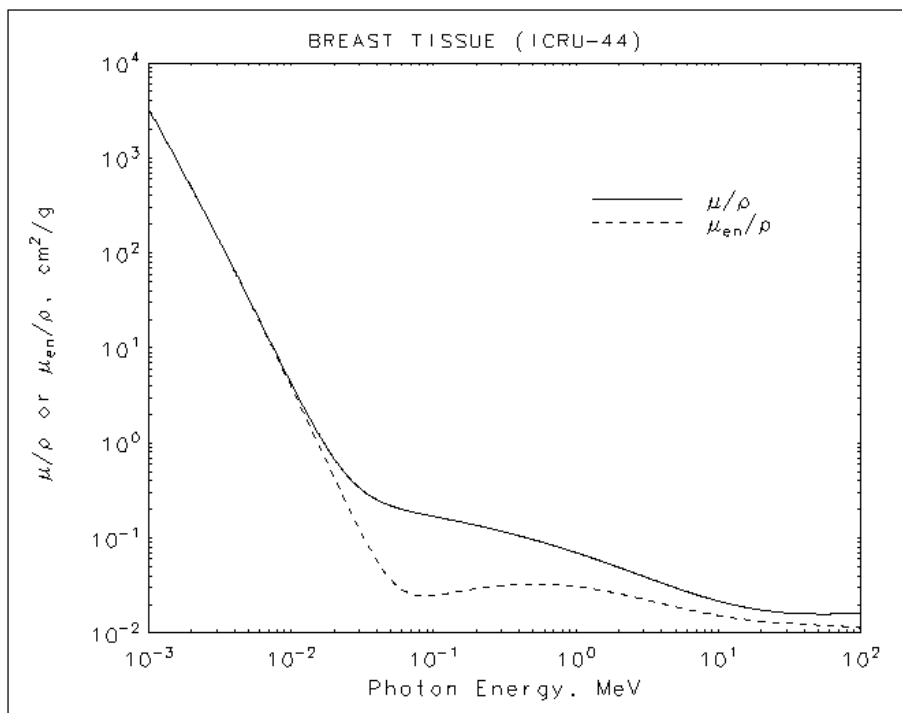


**Figura A.20** Gráfico do ajuste da curva do coeficiente de atenuação mássico para o cérebro.

A partir da equação, calcula-se a razão entre o coeficiente de atenuação para as energias de fluorescência de interesse.

Razão do $\mu$ entre 6,4 keV e 12 keV	6,52
Razão do $\mu$ entre 8,0 keV e 12 keV	3,36
Razão do $\mu$ entre 8,6 keV e 12 keV	2,71
Razão do $\mu$ entre 9,2 keV e 12 keV	2,22

## A.11 Tecido de mama

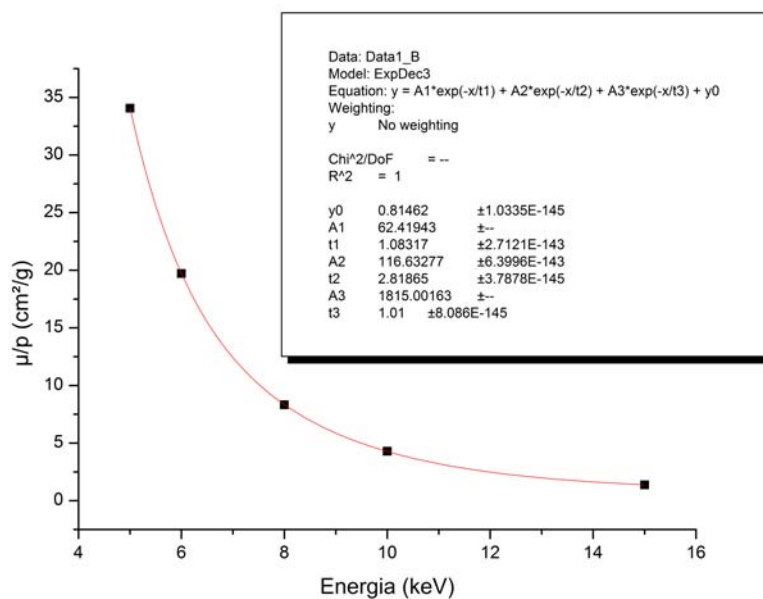


**Figura A.21** Gráfico do coeficiente de atenuação mássico para o tecido de mama (NIST, 2009).

Densidade =  $1,02 \text{ (g/cm}^3\text{)}$

Energy (keV)	$\mu/\rho$ ( $\text{cm}^2/\text{g}$ )
5	34,07
6	19,72
8	8,32
10	4,29
15	1,38

Ajuste da curva do coeficiente mássico de atenuação na região de interesse:

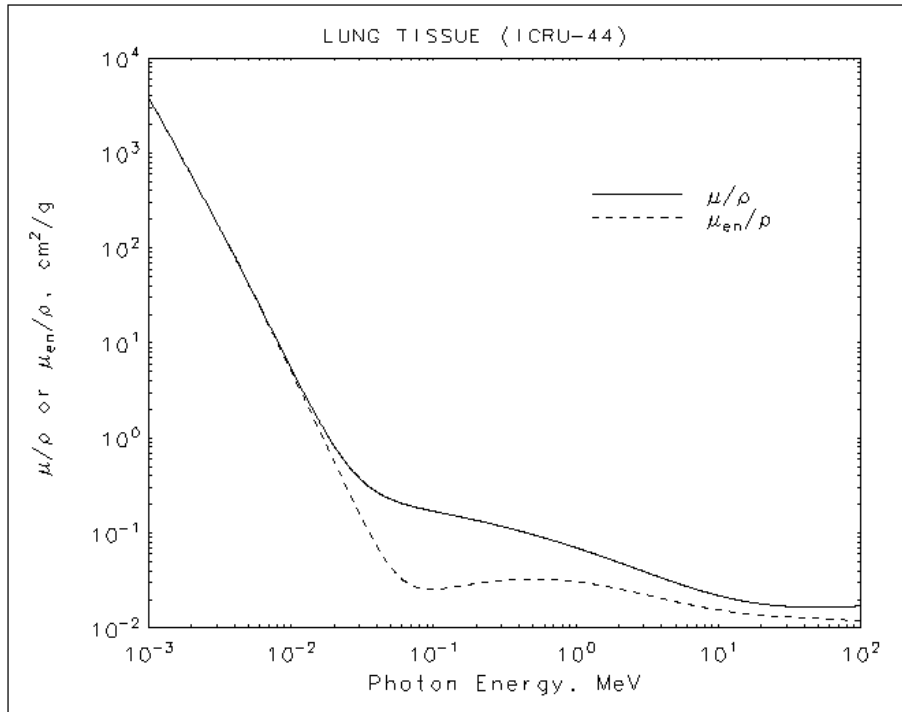


**Figura A.22** Gráfico do ajuste da curva do coeficiente de atenuação mássico para o tecido de mama.

A partir da equação, calcula-se a razão entre o coeficiente de atenuação para as energias de fluorescência de interesse.

Razão do $\mu$ entre 6,4 keV e 12 keV	6,55
Razão do $\mu$ entre 8,0 keV e 12 keV	3,36
Razão do $\mu$ entre 8,6 keV e 12 keV	2,71
Razão do $\mu$ entre 9,2 keV e 12 keV	2,21

## A.12 Pulmão

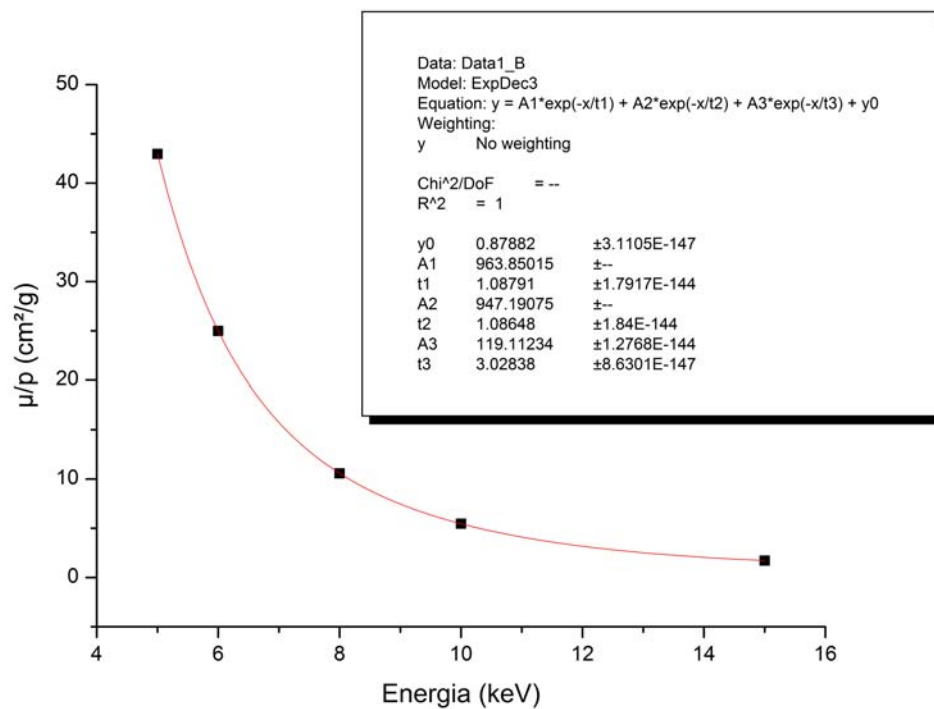


**Figura A.23** Gráfico do coeficiente de atenuação mássico para o pulmão (NIST, 2009).

Densidade = 1,05 (g/cm<sup>3</sup>)

Energy (keV)	$\mu/\rho$ (cm <sup>2</sup> /g)
5	42,96
6	24,97
8	10,58
10	5,46
15	1,72

Ajuste da curva do coeficiente mássico de atenuação na região de interesse:

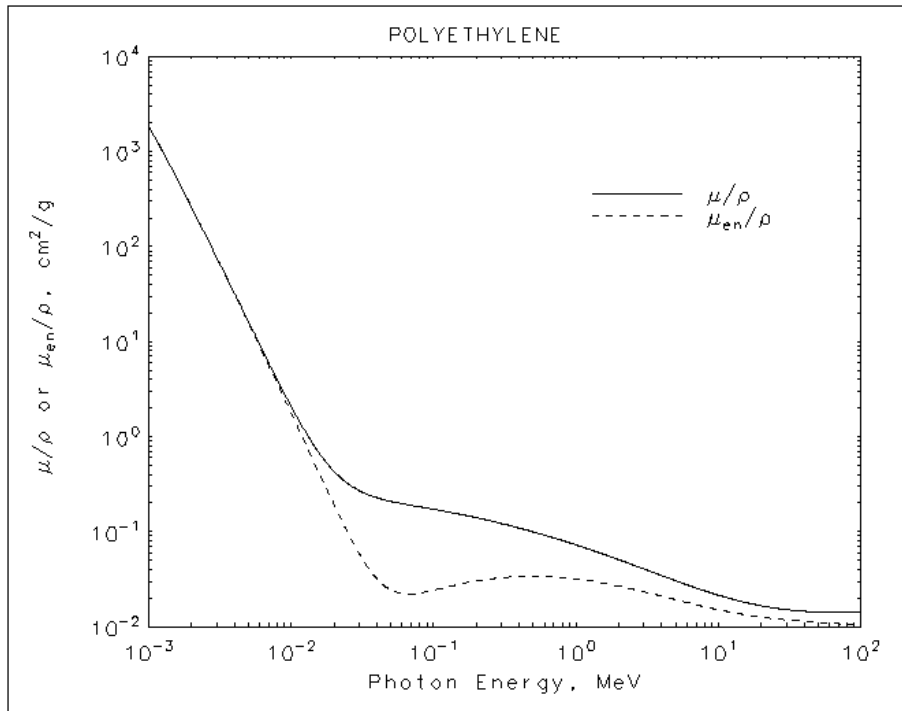


**Figura A.24** Gráfico do ajuste da curva do coeficiente de atenuação mássico para o pulmão.

A partir da equação, calcula-se a razão entre o coeficiente de atenuação para as energias de fluorescência de interesse.

Razão do $\mu$ entre 6,4 keV e 12 keV	6,48
Razão do $\mu$ entre 8,0 keV e 12 keV	3,33
Razão do $\mu$ entre 8,6 keV e 12 keV	2,69
Razão do $\mu$ entre 9,2 keV e 12 keV	2,20

## A.13 Polietileno



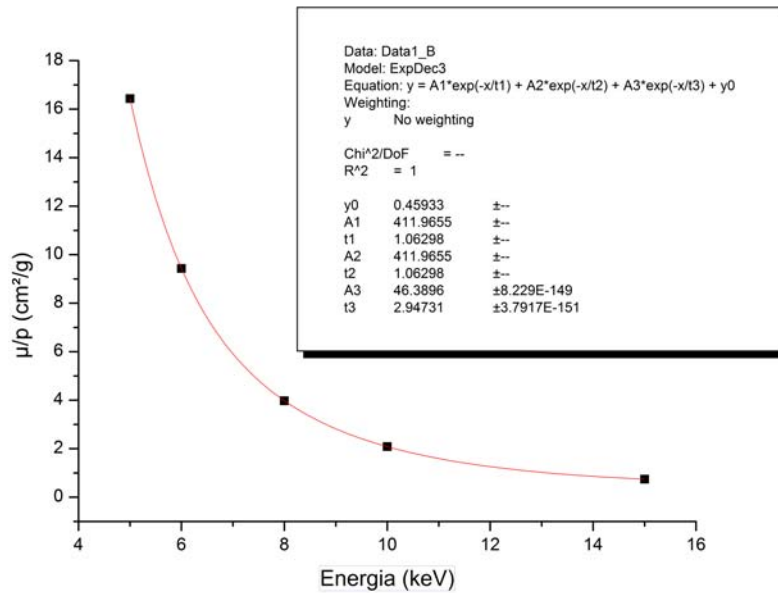
**Figura A.25** Gráfico do coeficiente de atenuação mássico para o polietileno (NIST, 2009).

Densidade = 0,93 (g/cm<sup>3</sup>)

Energia (keV)	$\mu/\rho$ (cm <sup>2</sup> /g)
5	16,43
6	9,43
8	3,97
10	2,09
15	0,74



Ajuste da curva do coeficiente mássico de atenuação na região de interesse:

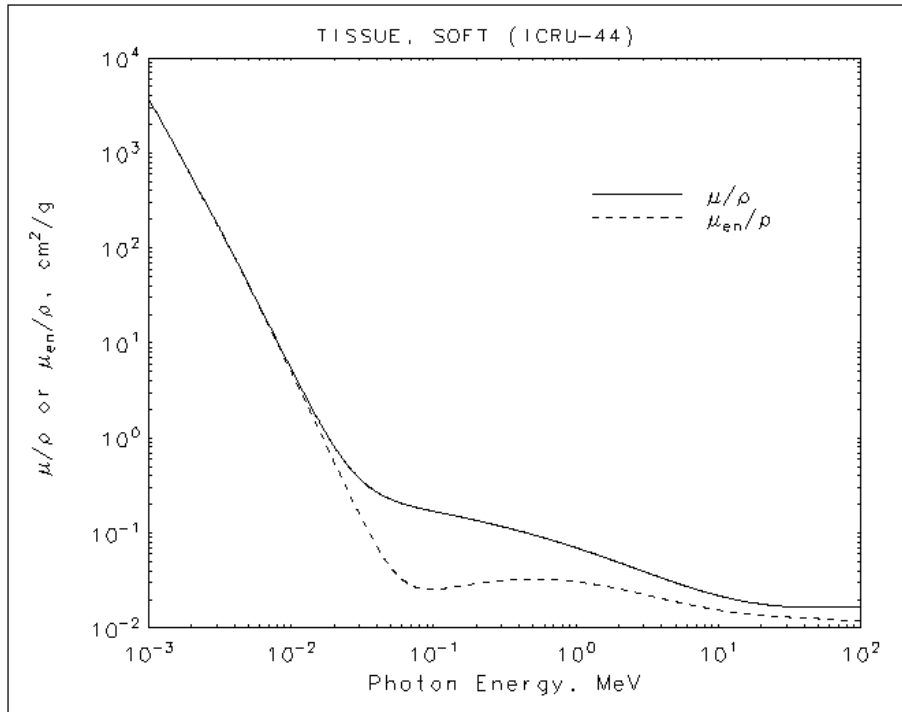


**Figura A.26** Gráfico do ajuste da curva do coeficiente de atenuação mássico para o polietileno.

A partir da equação, calcula-se a razão entre o coeficiente de atenuação para as energias de fluorescência de interesse.

Razão do $\mu$ entre 6,4 keV e 12 keV	6,15
Razão do $\mu$ entre 8,0 keV e 12 keV	3,16
Razão do $\mu$ entre 8,6 keV e 12 keV	2,56
Razão do $\mu$ entre 9,2 keV e 12 keV	2,1

## A.14 Tecido mole

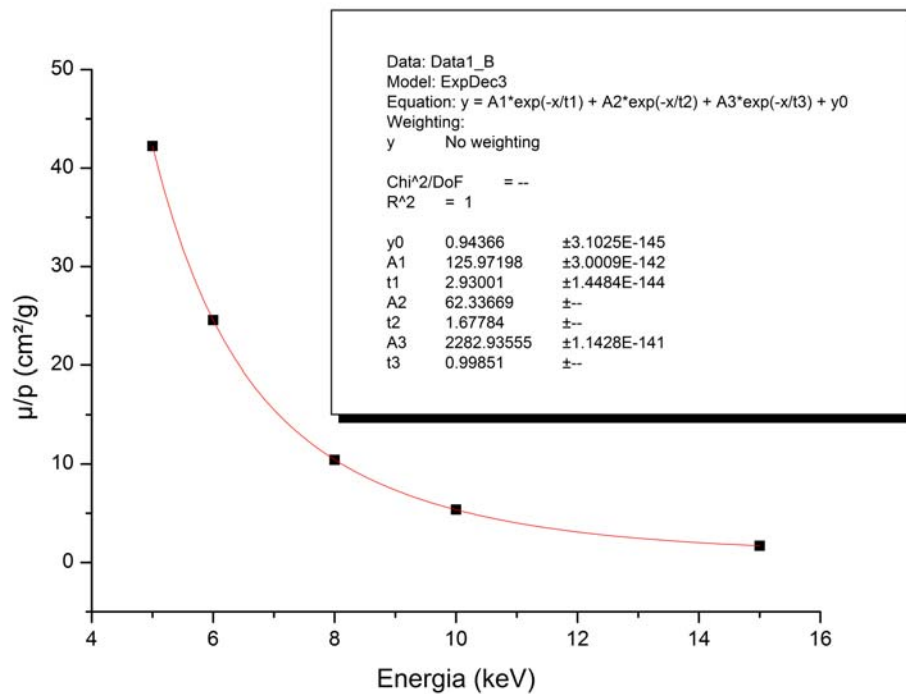


**Figura A.27** Gráfico do coeficiente de atenuação mássico para o tecido mole (NIST, 2009).

Densidade = 1,06 ( $\text{g}/\text{cm}^3$ )

Energy (keV)	$\mu/\rho$ ( $\text{cm}^2/\text{g}$ )
5	42,24
6	24,56
8	10,42
10	5,38
15	1,70

Ajuste da curva do coeficiente mássico de atenuação na região de interesse:



**Figura A.28** Gráfico do ajuste da curva do coeficiente de atenuação mássico para o tecido mole.

A partir da equação, calcula-se a razão entre o coeficiente de atenuação para as energias de fluorescência de interesse.

Razão do $\mu$ entre 6,4 keV e 12 keV	6,37
Razão do $\mu$ entre 8,0 keV e 12 keV	3,29
Razão do $\mu$ entre 8,6 keV e 12 keV	2,66
Razão do $\mu$ entre 9,2 keV e 12 keV	2,18

## **B Trabalhos Publicados em Periódicos**

# Diffraction enhanced imaging and x-ray fluorescence microtomography for analyzing biological samples<sup>†</sup>

H. S. Rocha,<sup>1</sup> G. R. Pereira,<sup>1</sup> M. J. Anjos,<sup>2</sup> P. Faria,<sup>3</sup> G. Kellermann,<sup>4</sup> C. A. Pérez,<sup>4</sup> G. Tirao,<sup>5</sup> I. Mazzaro,<sup>6</sup> C. Giles<sup>7</sup> and R. T. Lopes<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup> Laboratório de Instrumentação Nuclear – COPPE/UFRJ – RJ – Brazil

<sup>2</sup> Instituto de Física – UERJ – RJ – Brazil

<sup>3</sup> Instituto Nacional do Câncer – INCa – RJ – Brazil

<sup>4</sup> Laboratório Nacional de Luz Síncrotron – Campinas – SP – Brazil

<sup>5</sup> Facultad de Mat. Astronomía y Física (FAMAF), UNC. Córdoba, Argentina

<sup>6</sup> Laboratório de Óptica de Raios X e Instrumentação – UFPR – Curitiba – PR – Brazil

<sup>7</sup> Laboratório de Cristalografia Aplicada e Raios X – UNICAMP – Campinas – SP – Brazil

Received 3 July 2006; Revised 14 February 2007; Accepted 19 February 2007

**In this work, breast tissue samples were investigated in order to verify the distribution of certain elements by x-ray fluorescence computed tomography (XRFCT) correlated with the characteristics and pathology of each tissue observed by diffraction enhanced imaging (DEI).**

The DEI system can show details in low attenuation tissues. It is based on the contrast imaging obtained by extinction, diffraction and refraction characteristics and can improve reduction in false positive and false negative diagnoses. XRFCT allows mapping of all elements within the sample, since even a minute fluorescence signal can be detected. DEI imaging techniques revealed the complex structure of the disease, confirmed by the histological section, and showed microstructures in all planes of the sample. The XRFCT showed the distribution of Zn, Cu and Fe at higher concentration. Copyright © 2007 John Wiley & Sons, Ltd.

## GENERAL INTRODUCTION

The increasing number of breast cancer cases<sup>1</sup> has led researchers to develop new diagnosis techniques. One of the problems faced by pathologists is false positive and false negative diagnoses.<sup>2</sup>

The increase of the mortality rate in Brazil due to breast cancer was a decisive factor in the choice of the investigated samples. The choice also reflects the tendency world over to find diagnostic techniques for cancer and other diseases.

The late diagnosis can make the treatment of cancer difficult or delay it, reducing the possibilities of cure. The difficulties encountered in the analysis of breast samples are due to imperfections in the process of development of histological sections that can hide the pathology in the primary development stage and the low attenuation of the tissues, which make the process difficult, limiting the diagnosis in non-initial pathology development.

New types of radiographies based on attenuation, refraction and scattering properties were developed to investigate samples with low attenuation contrast between adjacent tissues or interfaces. These samples are difficult to investigate or can not be investigated with conventional radiography techniques.<sup>3</sup> There are two basic ways of

describing setups, which use phase contrast (PHC) and refraction of x-ray beyond attenuation contrast. Setups based on interferometers or free propagation techniques (PHC) and techniques based on analyzer crystals, e.g. diffraction enhanced imaging–(DEI) can be used. The first setup observes phase shift map of the sample and the last one observes the refraction gradient and ultrasmall angle scatter properties (extinction) beyond attenuation.

The PHC can use an interferometer or free propagation method to observe properties of the wave's phase as a consequence of interaction with the sample. When an interferometer is used, one path of x-ray beam interact with the sample while the other path supplies the reference wave. The interference between both waves gives rise to contrast phase in the detector. In the other case, the PHC observes the phase change of the high coherence x-ray plane wave or high coherence x-ray fan beam, after interacting with the sample.

The amount of the phase shift is determined by the refractive index of the sample. The refractive index  $n$  for x-rays is complex and is given by the equation  $n = 1 - \delta + i\beta$ , where  $\delta$ , the refractive index decrement is responsible for the x-ray phase shift, and  $\beta$  is the imaginary part of  $n$  which is related to the x-ray absorption. The  $\delta$  is given by  $\delta \cong \lambda^2 N_e r_e / (2\pi)$ , Where  $N_e$  is the electron density and  $r_e$  is the classic radius and  $\beta = \mu\lambda/4\pi$ . For x-rays with wavelength  $\lambda \approx 1 \text{ \AA}$  in structures consisting of carbonic compounds, the value of  $\delta$  is on the order of  $10^{-6}$ .<sup>4</sup> The amount of x-ray phase shift can be calculated from the

\*Correspondence to: R. T. Lopes, Laboratório de Instrumentação Nuclear–COPPE/UFRJ, P.O Box: 21941-972, zip code:68.509 Riode Janeiro-RJ, Brazil. E-mail: rlopes@con.ufrj.br

<sup>†</sup>Paper presented as part of a special issue of papers from the 2006 European X-ray Spectrometry Conference, Paris, France, 19–23 June, Part 4.

equation:  $\varphi = -2\pi \int \frac{\delta(l)dl}{\lambda}$ , where the integral is over the ray path ( $l$ ).<sup>5-6</sup> Given that the samples have different electron density, different tissues generate different x-ray phase changes. The refraction contrast can be 1000 times greater than the attenuation contrast for the infiltrating ductal carcinoma (IDC) in the breast.<sup>7</sup>

The real and imaginary parts have very different dependences on photon energy; in the regime where the photoelectric effect dominates and is far from absorption edges,  $\beta \propto E^{-4}$  while  $\delta \propto E^{-2}$ . As a consequence, the values of  $\delta$  can be three orders of magnitude larger than  $\beta$ . X-rays passing through regions with different  $\delta$  values are subjected to phase shifts that correspond to being refracted. These changes, which can originate from the purely geometrical effect of the shape of the object or, for instance, from the local homogeneity defects of the object, cannot often be visualized using absorption imaging techniques.<sup>8</sup>

DEI techniques use an analyzer crystal to select refraction and diffraction contrasts of x-rays beyond attenuation contrast. This technique was first developed by Chapman and coworkers<sup>9-10</sup> and has been used in our work to observe small details in breast tissue samples. These images were compared with histological sections and the specific location was analyzed by fluorescence methods.

The excellent properties of synchrotron radiation sources, such as the possibility of setting a specific energy (monochromatic beam); high coherency beam; high photon flux; broad energy spectrum and natural collimation allow the use of x-ray fluorescence computed tomography (XRFCT) techniques. In many studies, it is necessary to analyze the elemental distribution in biological tissue in a detailed manner.

The fluorescence mapping of iron, copper and zinc can be very important in diagnosis, because the biochemistry of these elements suggests that these metals may play an important role in carcinogenesis.<sup>11</sup>

However, until now, the evidence for linking iron, copper and zinc to cancer is far from being conclusive<sup>12</sup> and further research is needed. Using x-ray fluorescence tomography, the elemental map can be obtained without sample preparation.

This research uses DEI characteristics to analyze two breast tissue samples and XRFCT to analyze the samples distribution map of iron, copper and zinc in specific areas of the samples.

## DIFFRACTION ENHANCED IMAGING

### Introduction

A new type of radiography based on attenuation, refraction gradient and ultrasmall angle scatter properties (extinction)<sup>13</sup> can be used to investigate samples with low attenuation contrast between adjacent tissues or interfaces.

The DEI technique uses an analyzer crystal to select the refracted x-ray beam after it has interacted with the sample. For different angular positions of the analyzer crystal, deviated photons can be detected separately from those which were simply transmitted by the sample.

Analyzer crystals in Bragg diffraction after transmission of the beam through the specimen can be used for two

purposes: magnification of the image or detection of small angular deviations. When using the analyzer for detecting small angular deviations, in the case when small deviations of the incoming x-ray beam have to be detected owing to sharp variations of phase, it is necessary to adopt geometry with a less grazing incident beam, or even an asymmetrical geometry with the incoming beam at a larger angle with the diffracted beam. As a consequence, the acceptance is much narrower and at a certain Bragg angle, the deviated beams are not diffracted at all, while for a slightly different angular position, only the deviated beams are visible. This is the basis of the DEI.<sup>9-10,14-16</sup>

The angular acceptance band of the analyzer is determined by the width of the rocking curve (RC), i.e. the intensity curve that is obtained by rocking the analyzer crystal around the Bragg angle with no sample in the beam. The rocking curve full width at half-maximum (FWHM) is typically on the order of 1–100  $\mu$ rad, and thus comparable with the tiny deviation produced in the sample.<sup>17</sup>

DEI techniques yield three images depicting separately the effects of refraction, ultrasmall angle scatter, and attenuation by the object.<sup>18-19</sup> With two images acquired, one on each side of the rocking curve of the analyzer, an appropriate algorithm permits the calculation of two new images: the apparent absorption ( $I_R$ ) and the refraction maps of the object ( $\Delta\theta_Z$ ).

Another image can be obtained to observe the extinction effects by setting the analyzer at the sharp peak of the rocking curve (at the top position). Although this 'Top' image includes some refractive index and attenuation effect, it has an important advantage over the apparent absorption image in that it does not suffer from the additional image noise caused by image addition and subtraction procedures.

The refraction image can be obtained by applying Eqn 1 pixel-by-pixel, assuming there is no significant effect from small angle scattering. Intensity of the x-rays, transmitted through the sample and then diffracted by analyzer, is measured with the analyzer tuned to opposite sides of the rocking curve to take images of low ( $\theta_L$ ) and high angle ( $\theta_H$ ).<sup>20</sup> Applying Eqn 1 and 2 pixel-by-pixel to the low and high angle images,<sup>10,21-22</sup> it is possible to obtain the refraction images ( $\Delta\theta_Z$ ) and apparent absorption images ( $I_R$ )

$$\Delta\theta_Z = \frac{I_H R(\theta_L) - I_L R(\theta_H)}{I_L \left(\frac{dR}{d\theta}\right)(\theta_H) - I_H \left(\frac{dR}{d\theta}\right)(\theta_L)} \quad (1)$$

$$I_R = \frac{I_L \left(\frac{dR}{d\theta}\right)(\theta_H) - I_H \left(\frac{dR}{d\theta}\right)(\theta_L)}{R(\theta_L) \left(\frac{dR}{d\theta}\right)(\theta_H) - R(\theta_H) \left(\frac{dR}{d\theta}\right)(\theta_L)} \quad (2)$$

The Top, apparent absorption and refraction images allow a better visualization of the low attenuation interface of the breast tissue sample and this new type of visualization can improve the biomedical researches on breast cancer diagnosis.

Towards continuing this biomedical research with human tissue, more studies must be carried out so that this technique can lead to an improved method of better diagnosis.

**Methods**

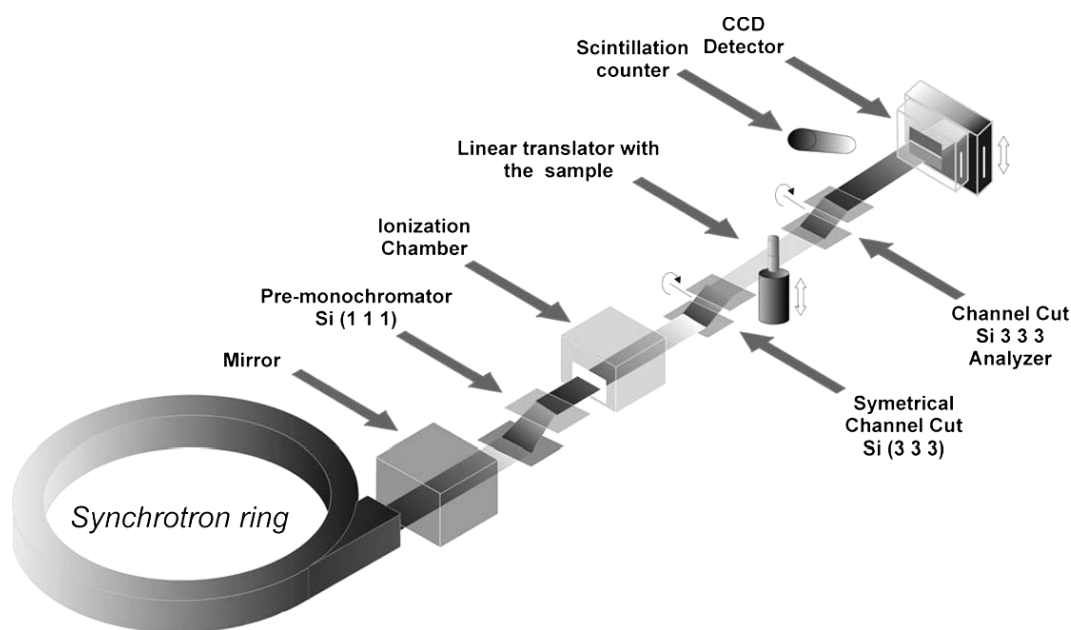
The system was set up in a high-resolution diffraction beam line (D10A-XRD2) at the Brazilian Synchrotron Light Source (LNLS) with a setup using a Si(111) monochromator and two channel cut Si(333) crystals,<sup>23–26</sup> as shown in Fig. 1. The monochromator was adjusted to 10.7 keV and the beamline x-ray mirror was set in an unfocused position with the lowest possible vertical divergence. The first channel cut Si(333) set in a Bragg condition was used to reduce the vertical divergence of the beam. The second channel cut was used as the analyzer. The measured RC width (FWHM) of the incident beam on the sample was about 113  $\mu$ rad and the rocking curve of the analyzer was about 6  $\mu$ rad in the vertical plane. The RC of the whole system is the convolution of the analyzer reflectivity with the light leaving the monochromator<sup>27</sup> and the first channel cut. A direct conversion water-cooled CCD camera of 1242  $\times$  1152 pixel<sup>2</sup> of 22.5  $\times$  22.5  $\mu$ m<sup>2</sup> each was positioned in front of the incident

beam after the analyzer crystal. The sample and the detector were positioned in a high-precision linear translator with a resolution of 1  $\mu$ m. The incident beam of the sample had a width of 25 mm and a height of 2 mm. Images were taken in scan mode. All the samples were positioned in a closed Mylar cylinder to keep the samples fresh. The samples had approximately 2 mm thickness, 15 mm height and 20 mm width.

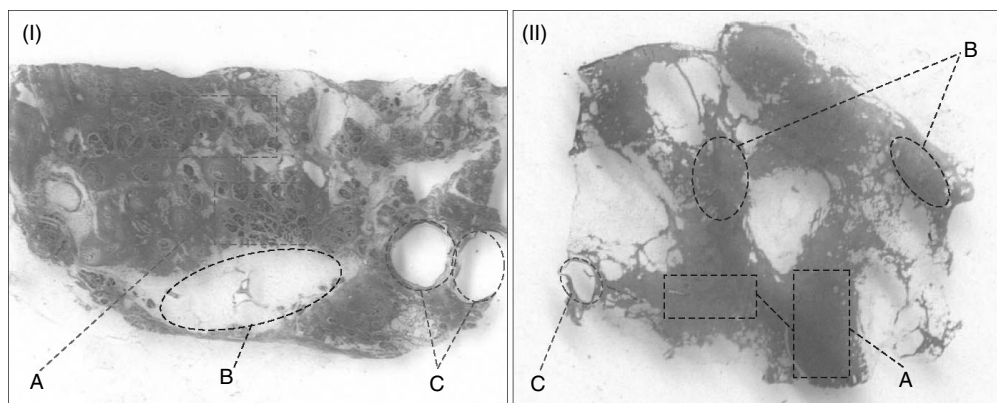
Three images were taken, one at the Top and two on opposite sides of the rocking curve at the same angle. The two last images are used to obtain the refraction and apparent absorption images through mathematical processing using Eqn 1 and 2 implemented in MatLab Software® script with the image processing toolbox.

**Results and discussions**

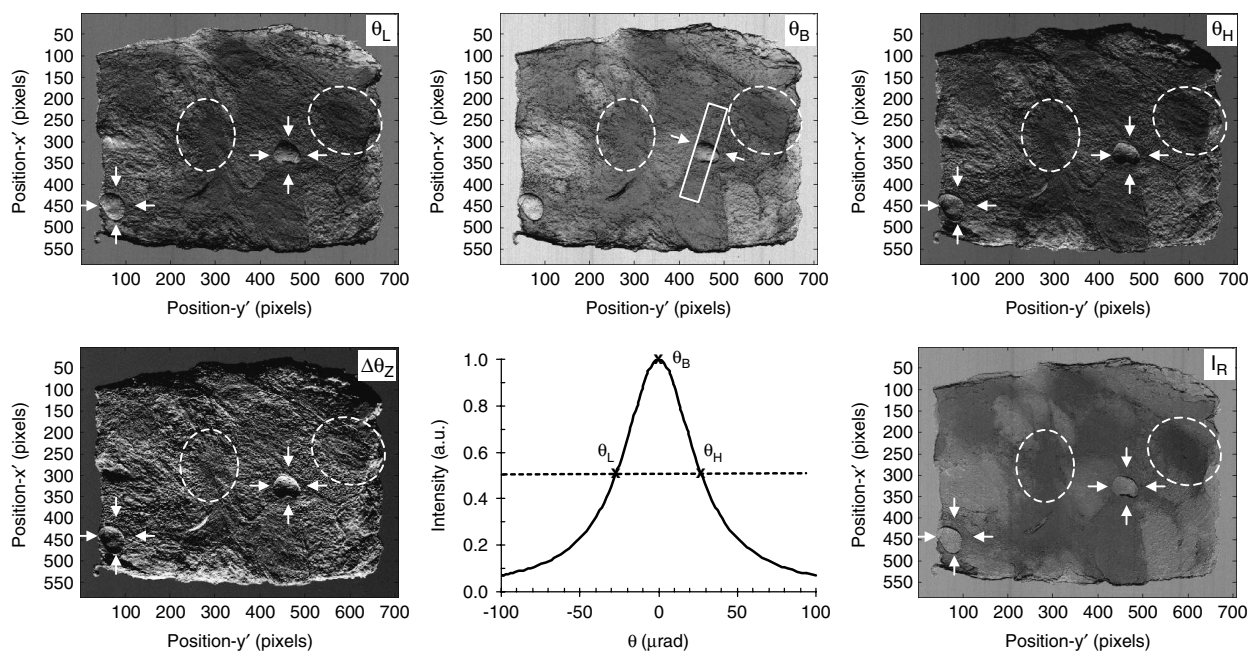
Two breast tissue samples were examined to observe details of ductal carcinoma structures. Figure 2 shows images of



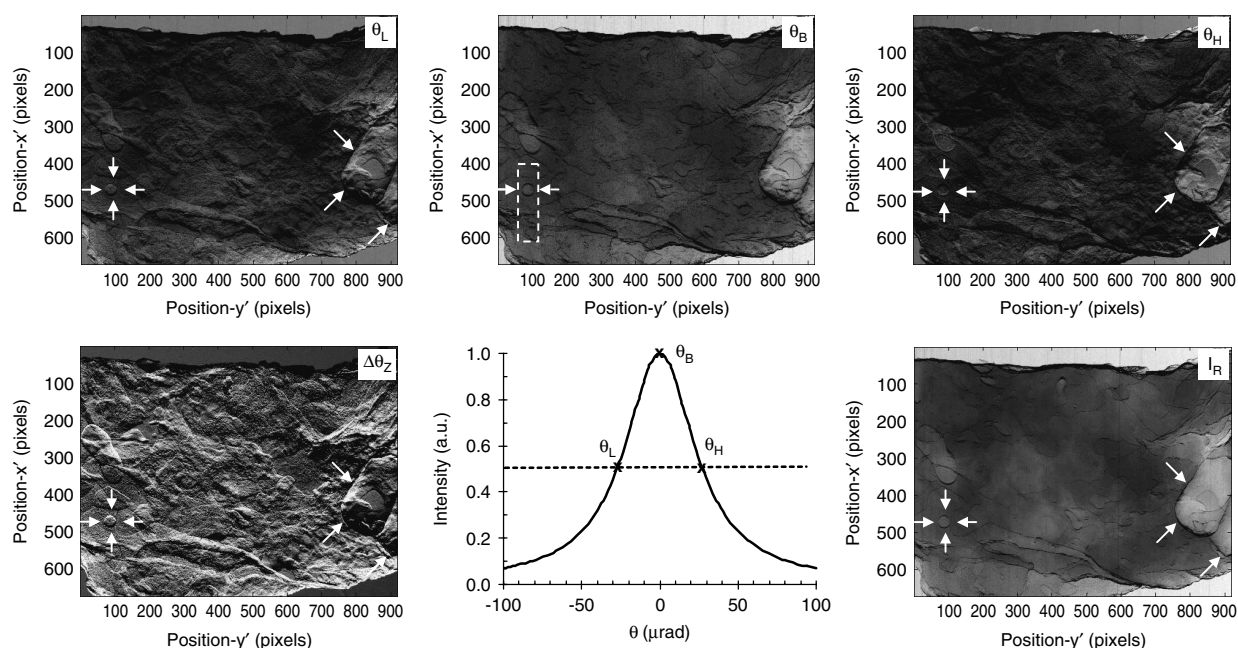
**Figure 1.** The experimental arrangement for an x-ray diffraction enhanced microtomography measurement using a monochromatic beam.



**Figure 2.** Images of histological section (Hematoxylin-eosin stain) of (I) breast cancer (8613) where (A) is the normal lobular breast parenchyma (dark rose), (B) is the adipose tissue and (C) are cysts. In Fig. (II) breast cancer (8283) after chemotherapy reduction where (A) is the atrophic breast parenchyma without tumor, (B) is the microscopic residual tumor within dense connective tissue and (C) is a cyst.



**Figure 3.** DEI images of another breast tissue (8613) at low ( $\theta_L$ ), high ( $\theta_H$ ) and Top ( $\theta_B$ ) acquisition of the RC and images of refraction contrast ( $\Delta\theta_Z$ ) and apparent absorption contrast ( $I_R$ ) obtained with the DEI mathematical processing. The cysts are marked with arrows. XRFCT slice position was marked with arrows and the fragment sample is marked with dot line rectangle in  $\theta_B$  position image.



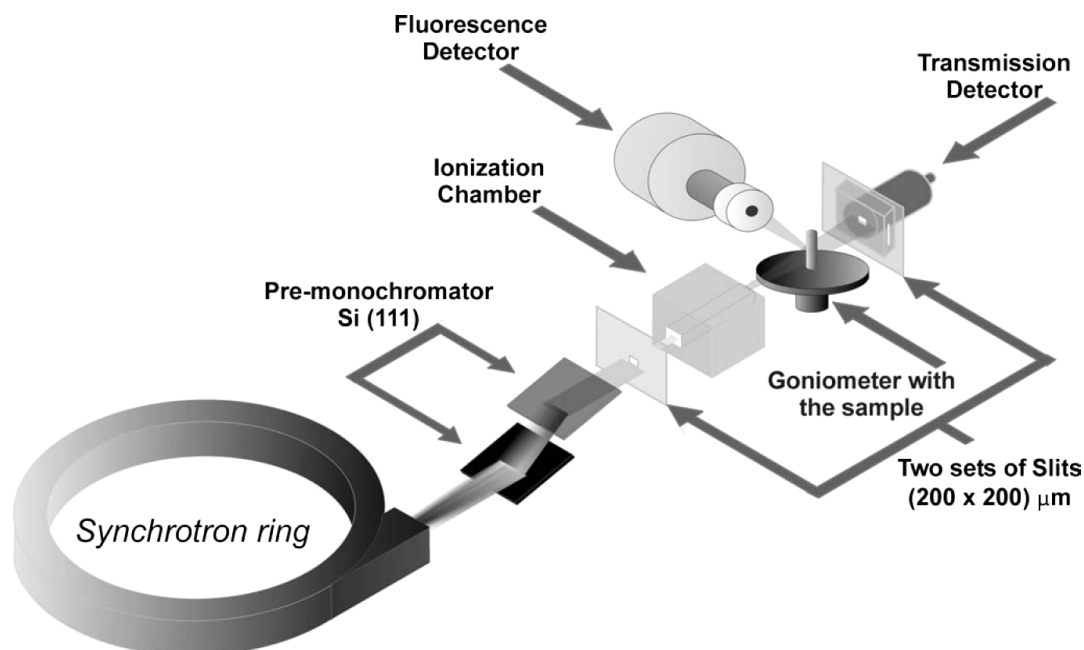
**Figure 4.** DEI images of breast tissue (8283) at low ( $\theta_L$ ), high ( $\theta_H$ ) and Top ( $\theta_B$ ) acquisition of the RC and images of refraction contrast ( $\Delta\theta_Z$ ) and apparent absorption contrast ( $I_R$ ) obtained with the DEI mathematical processing. XRFCT slice position was marked with arrows and the fragment sample was marked with line in  $\theta_B$  position image.

a histological section of breast cancer (8613) and breast cancer after chemotherapy reduction (8283). In Fig. 2(I) of the histological section, it was possible to identify the normal lobular breast parenchyma (A), adipose tissue (B) and cysts (C). In Fig. 2(II) of the histological section, it was possible to identify the dense, fibrous, connective tissue with atrophic breast parenchyma without tumor (A), the microscopic residual tumor within dense connective tissue (B) and cyst (C).

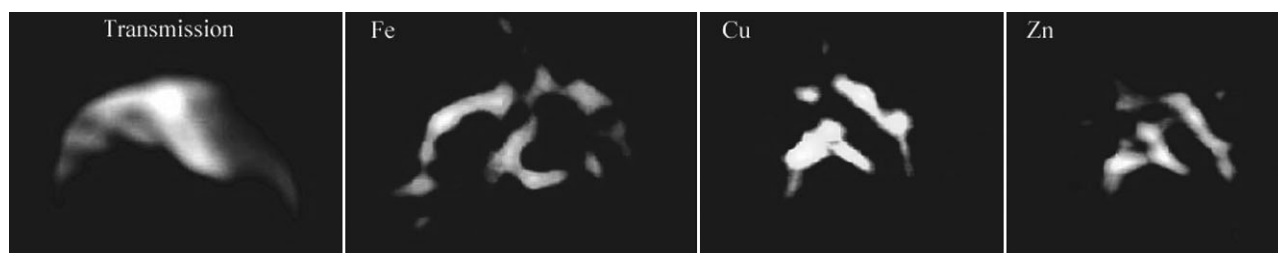
Figures 3 and 4 show DEI images of breast tissue (8613) at low ( $\theta_L$ ), high ( $\theta_H$ ) and top ( $\theta_B$ ) acquisition of the RC and images of refraction contrast ( $\Delta\theta_Z$ ) and apparent absorption contrast ( $I_R$ ) obtained with DEI mathematical processing.

In Figs 3( $\theta_B$ ) and 4( $\theta_B$ ) the location of the removed tissue fragment was marked (dotted line rectangle) to obtain the XRFCT in order to observe the elemental distribution map. DEI images allow the observation of some structures in thick samples. It was possible to observe cysts, which was





**Figure 5.** The experimental arrangement for an x-ray fluorescence microtomography measurement using a monochromatic beam.



**Figure 6.** Images of transmission and XRFCT of Fe, Cu and Zn (8283).

confirmed by observation in the histological section (right side Fig. 2(I)) and the initial cyst was of approximately  $790\ \mu\text{m}$  (left side). The initial cyst cannot be seen in the plane of the histological section.

In Fig. 3 it was possible to observe (dotted line ellipse) the microscopic residual tumor within dense connective tissue and the cyst, which can not be seen in the plane of the histological section in Fig. 2(II).

The diffraction, refraction and apparent absorption images allow a better visualization of low attenuation interface of the thick breast tissue sample and can be opened to new approach in biomedical research.

Towards continuing this biomedical research with human tissue, more studies must be carried out done in order to conclude that this technique can lead to a improved method for better diagnosis that are more precise, especially in initial stages.

## X-RAY FLUORESCENCE MICROTOMOGRAPHY

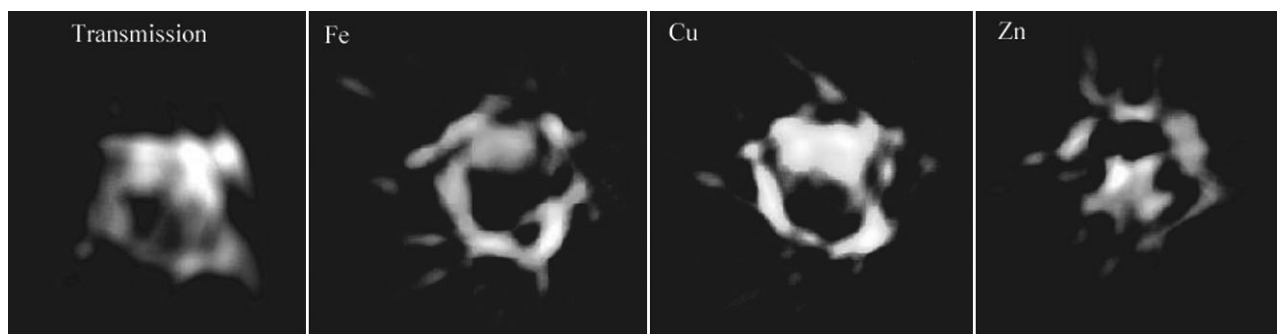
### Introduction

One of the most sensitive methods for detecting trace elements in breast tissue samples is the x-ray fluorescence (XRF) technique.<sup>28</sup> This technique requires sample preparation such as planar mode. The preparation is not limited to cutting the sample. The samples need to be prepared to be cut. The

micro XRF requires ultrafine and accurate slices (approximately 15 microns) and without sample preparation, this cut cannot be done. Typically, the samples are embedded or fixed in paraffin. The most suitable samples for topographic and quantitative elemental analysis with the use of  $\mu$ -SRXRF technique seem to be fresh tissue samples, cut using cryomicrotome and then freeze-dried.<sup>29</sup> The XRFCT does not require this kind of sample preparation; it is not necessary to cut the sample to analyze the tomographic plane.

Another technique that can give diagnostic information on breast tissue samples is transmission tomography. This technique has been used in nondestructive testing for investigating the internal structure of samples.<sup>30</sup> With the advent of intense synchrotron radiation sources, the resolution of the tomography was improved into the micrometer regime.<sup>31</sup> Although transmission tomography provides information about the distribution of attenuation coefficients, the technique cannot give any information about the distribution of trace elements.

The XRF associated with tomographic techniques can supply important information about a sample's chemical properties and produce high contrast. Transmission tomography is not able to give this information. XRF tomography is based on detection of photons from fluorescent emission from the elements in the sample. These photons are acquired by an energy dispersive detector, placed at  $90^\circ$  to the incident



**Figure 7.** Images of transmission and XRFCT of Fe, Cu and Zn (8613).

beam direction, and as additional information, a transmission tomography is used for sample characterization.<sup>32</sup> If the attenuation within the sample is small, then the fluorescence intensity of a certain atomic level is proportional to the concentration of the element  $\rho_i(x, y)$  and the usual algorithms of transmission microtomography can be used to recover  $\rho_i(x, y)$ . In Eqn 3,  $\lambda_F$  is the experimental projection,  $I_0$  is the intensity of the incident beam and  $I_{iv}$  is the intensity of the fluorescence from the  $\nu$ -line of element  $i$ .

$$\lambda_F = \frac{I_{iv}}{I_0} \propto \iint dx dy \rho_{iv}(x, y) \quad (3)$$

## Methods

This work presents the development of a system to study fluorescence microtomography at the x-ray fluorescence facility (D09B-XRF) at the Brazilian Synchrotron Light Laboratory (LNLS), Campinas, Brazil. A monochromatic beam (9.8 keV) collimated to a  $200 \times 200 \mu\text{m}^2$  area with a set of slits was used for excitation of the elements within samples. The intensity of the incident beam was monitored with an ionization chamber placed in front of it, before the sample. A schematic presentation of the experimental setup for an XRF microtomography using a monochromatic beam is shown in Fig. 5.

The sample was placed on a high-precision goniometer and on translation stages, in order to allow rotating as well as translating it perpendicularly to the beam. The fluorescence photons were collected with an energy dispersive HPGe detector (CANBERRA Industries inc.) placed at  $90^\circ$  to the incident beam, while transmitted photons were detected with a fast NaI (Tl) scintillation counter (CYBERSTAR-Oxford anfyfik) placed behind the sample along the beam direction. This detector geometry allows reducing elastic and Compton x-ray scattering from the sample because of the high linear polarization of the incoming beam in the plane of the storage ring, thus improving the signal-to-background ratio for the detection of trace elements.<sup>33</sup>

The quality of the reconstruction is a compromise between the measuring time required for an acceptable counting statistic of the XRF peaks and the step size necessary to linearly move and rotate the samples. In one projection, samples were positioned in steps of  $200 \mu\text{m}$  (actual beam size) perpendicular to the beam direction, covering the entire cross section of the sample. Each single value in a projection is obtained by measuring the fluorescence radiation emitted by all the pixels along the beam.<sup>34</sup> The object is then rotated, and another projection is measured. Projections are obtained

in steps of  $3^\circ$  until the object has completed  $180^\circ$ . The selected measuring time was two seconds for each scanned point.

The XRF microtomographies were performed on one sample of each type of human breast tissue (breast cancer and breast cancer after chemotherapy reduction). The condition of the tissues (breast cancer and breast cancer after chemotherapy reduction) was identified by the pathologist who made the samples available. The tissues for XRFCT were cut in cylindrical form with 1.5–2 mm thickness by 4–5 mm of height and were stored in 10% formaldehyde before being analyzed.

All tomographies were reconstructed using an in-house program with the back projection algorithm and a Ram-Lak filter. The reconstruction program was developed in C and does not use standard libraries.

## Results and discussions

All the transmission and fluorescence computed tomographies were reconstructed using a filtered back projection algorithm. Despite the self-absorption inside the samples, we have obtained good results. The fluorescence tomography images are qualitative in character because of this self-absorption.

The results of the transmission and fluorescence CT in the two diseased human breast tissue samples are shown in Figs 6 and 7. The position of the analysis is as marked in the Figs 3( $\theta_B$ ) and 4( $\theta_B$ ) with a dotted line rectangle.

The image on the left side of Figs 6 and 7 shows the transmission microtomography and the others show the reconstructed XRF microtomographies of Fe, Cu and Zn. The radial streak effects in Fig. 6 and 7 are because of the low counting statistic in each projection. The images were not processed.

In Fig. 6, Cu and Zn seem to generate similar distributions, but in Fig. 7, Fe and Cu show similar behavior. Probably the difference between the distribution is due to the presence of an initial cyst in the sample in Fig. 7. The tomographic projection shown in Fig. 7 reveals the presence of Zn only in the inner initial cyst.

## CONCLUSION

DEI imaging techniques allow revealing the complex structure of the disease, confirmed by the histological section, and can show microstructures in all planes of the sample. The Top and refraction images are especially appropriate

for showing, with high contrast, structures in thick samples. The refraction, apparent absorption and Top imaging (extinction contrast) can improve information for pathologists to reduce false positive and false negative diagnoses. More studies must be done with a larger statistical value to quantify the possibility of reducing false positive and false negative diagnoses.

By analyzing the XRFCT of the breast sample fragments, it was possible to visualize the elemental distribution of iron, copper and zinc, but it is necessary to correct the absorption to get the concentration of these elements in the samples and correct the fluorescence mapping. However, it can be seen that there may be a larger zinc concentration inside an initial cyst.

It will be necessary to measure more samples and quantify the difference in concentration in one sample and between normal and abnormal tissues to use the XRF microtomography as an analytic tool to analyze biological tissues.

The better definition of the interfaces in XRF images was striking and the spatial resolution of the system can be optimized as a function of the application. The experimental set up at XRF-LNLS has shown to be very promising and this effort at implementing XRF microtomography was justified by the high quality of the images obtained.

### Acknowledgements

This work was partially supported by the National Council for Scientific and Technological Development (CNPq), Rio de Janeiro State Research Foundation (FAPERJ), Brazilian Synchrotron Light Laboratory (LNLS) and Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET).

### REFERENCES

- Allonzi AM, Noia ALC, Martins LFL, Thuler LCS, Santos MO, Alvez MRD, Rebelo MS, Szklo M, Goldfarb R, Figueiredo V. *Atlas de Mortalidade por câncer no Brasil 1979–1999*. INCA: Rio de Janeiro, 2002; 412 (In Portuguese).
- Fitzgerald R. *Phys. Today* 2000; **53**: 23.
- Pisano D, Johnston E, Chapman D, Geradts J, Lacocca MV, Livasy CA, Washburn DB, Sayers DE, Zhong Z, Kiss MZ, Thomlinson W. *Radiology* 2000; **214**: 895.
- Bushuev VA, Ingal VN, Beliaevskaya EA. *Crystallogr. Rep.* 1998; **43**: 538.
- Momose A. *Nucl. Instrum. Methods Phys.* 1995; **A 352**: 622.
- Wilkins SW, Gureyev TE, Gao D, Pogany A, Stevenson AW. *Nature* 1996; **384**: 335.
- Wu X, Liu H. *Med. Phys.* 2004; **31**: 997.
- Bravin A. *J. Phys. D: Appl. Phys.* 2003; **36**: A24.
- Chapman D, Thomlinson W, Arfelli F, et al. *Rev. Sci. Instrum.* 1995; **67**(CD Suppl): [doi:10.1063/1.1147502].
- Chapman D, Thomlinson W, Johnston R, et al. *Phys. Med. Biol.* 1997; **42**: 2015.
- Geraki K, Farquharson MJ, Bradley DA. *Phys. Med. Biol.* 2004; **49**: 1.
- Wu T, Sempos CT, Freudenheim JL, et al. *Ann. Epidemiol.* 2004; **14**(3): 195.
- Hasnah M, Oltulu O, Zhong Z, Chapman D. *Rev. Sci. Instrum.* 2002; **73**: 1657 [doi: 10.1063/1.1445831].
- Lagomarsino S, Cedola A. X-ray microscopy and nanodiffraction. In *Encyclopedia of Nanoscience and Nanotechnology*, Vol. 10, American Scientific Publishers: Stevenson Ranch, CA, USA, 2004; 681.
- Ingal VN, Beliaevskaya EA. *J. Phys. D: Appl. Phys.* 1995; **28**: 2314.
- Davis TJ, Gao D, Gureyev TE, Stevenson AW, Wilkins SW. *Nature* 1995; **373**: 595.
- Menk RH, Rigon L, Arfelli F. *Nucl. Instrum. Methods Phys. Res. A.* 2005; **548**: 213.
- Khelashvili G, Brankov JG, Chapman D, Anastasio MA, Yang Y, Zhong OZ, Wernick MN. *Phys. Med. Biol.* 2006; **51**: 221 [doi:10.1088/0031-9155/51/2/003].
- Wernick MN, Wirjadi O, Chapman D, Zhong OZ, Galatsanos N, Yang Y, Brankov JG, Oltulu O, Anastasio MA, Muehleman C. *Phys. Med. Biol.* 2003; **48**: 3875 [doi:10.1088/0031-9155/48/23/006].
- Dilmanian F, Zhong Z, Ren B, Wu X, Chapman L, Orion I, Thomlinson W. *Phys. Med. Biol.* 2000; **45**: 933 [doi:10.1088/0031-9155/45/4/309].
- Zhong Z, Thomlinson W, Chapman D, Sayers D. *Nucl. Instrum. Methods Phys. Res. A.* 2000; **A 450**: 556 [doi:10.1016/S0168-9002(00)00308-9].
- Rigon L, Besch H, Arfelli F, et al. *J. Phys. D: Appl. Phys.* 2003; **36**: A107 [doi:10.1088/0022-3727/36/10A/322].
- Giles C, Hönnicke MG, Lopes RT, Rocha HS, Gonçalves OD, Mazzaro I, Cusatis C. *J. Synchrotron Radiat.* 2003; **10**: 421.
- Rocha HS, Lopes RT, Valiante PM, Tirao G, et al. *Nucl. Instrum. Methods Phys. Res. A.* 2005; **548**: 175 [doi:10.1016/j.nima.2005.03.086].
- Hönnicke M, Foerster LA, Navarro-Silva MA, Menk RH, et al. *Nucl. Instrum. Methods Phys. Res. A.* 2005; **548**: 207 [doi:10.1016/j.nima.2005.03.091].
- Rocha HS, Lopes RT, Pessôa LM, Hönnicke MG, et al. *Nucl. Instrum. Methods Phys. Res. A.* 2005; **548**: 228 [doi:10.1016/j.nima.2005.03.094].
- Connor DM, Sayers D, Sumner DR, Zhong Z. *Nucl. Instrum. Methods Phys. Res. A.* 2005; **548**: 234.
- Farquharson MJ, Geraki K. *X-Ray Spectrom.* 2004; **33**: 240 [doi: 10.1002/xrs.684].
- Chwiej J, Sczerbowska-Boruchowska M, Lankosz M, et al. *Spectrochim. Acta, Part B* 2005; **60**: 1531.
- Braz D, Motta LMG, Lopes RT. *Appl. Radiat. Isot.* 1999; **50**: 661.
- Lopes RT, Rocha HS, Jesus EFO, Barroso RC, et al. *Nucl. Instrum. Methods Phys. Res. A.* 2003; **A 505**: 604 [doi:10.1016/S0168-9002(03)01157-4].
- Cesareo R, Mascarenhas S. *Nucl. Instrum. Methods* 1989; **A 277**: 669 [doi:10.1016/0168-9002(89)90802-4].
- Naghedolfeizi M, Chung J-S, Morris R, Ice GE, Yun WB, Cai Z, Lai B. *J. Nucl. Mater.* 2003; **312**: 146.
- Hogan JP, Gonsalves RA, Krieger AS. *IEEE Trans. Nucl. Sci.* 1991; **38**: 1721.

# X-ray fluorescence microtomography analyzing reference samples

G.R. Pereira<sup>a</sup>, R.T. Lopes<sup>a,\*</sup>, M.J. Anjos<sup>b</sup>, H.S. Rocha<sup>a</sup>, C.A. Pérez<sup>c</sup>

<sup>a</sup>Laboratório de Instrumentação Nuclear—LIN-COPPE/UFRJ, Brazil

<sup>b</sup>Physics Institute—UERJ, Brazil

<sup>c</sup>Brazilian Synchrotron Light Laboratory—LNLS, Brazil

Available online 6 April 2007

## Abstract

The X-ray fluorescence microtomography (XRFCT) is a non-destructive technique to complement other techniques used for samples characterization. The common techniques provide only information on the attenuation coefficients (transmission microtomography) or electronic density (Compton microtomography) and no information on the distribution of the elements inside of the sample can be obtained in these cases. XRFCT is based on the detection of fluorescence photons emitted by the elements in the sample. As the energy of photons of fluorescence has a particular value for each element, it is possible to obtain the distribution of all the elements in a sample, since that a minimum of fluorescence signal is detected. The experiments were performed at the X-ray fluorescence beamline (D09B-XRF) of the Brazilian Synchrotron Light Source (LNLS), Campinas, Brazil. A monochromatic beam and a white beam was used for the excitation of the elements and the fluorescence photons have been detected by a HPGe detector, placed at 90° to the incident beam. The beam was monitored by an ionization chamber and a fast scintillator detector was used to detect the transmitted radiation. In order to study the performance of the system, some reference samples made of polyethylene filled with standard solutions were analyzed, and some tissues of human breast (normal tissue, benign tumor and malignant tumor) have been analyzed in order to verify the efficiency of the system in determination of the elemental distribution in these kinds of samples. All the tomographic images were reconstructed using a filtered-back projection algorithm. In the breast tissue samples, the elements of higher concentration were Zn, Cu and Fe.

© 2007 Elsevier B.V. All rights reserved.

PACS: 87.59.Fm; 07.85.Qe; 87.64.Ni

Keywords: X-ray fluorescence; Microtomography; Reference samples

## 1. Introduction

Since tomographic techniques were developed, transmission tomography has been used in nondestructive testing for investigating the internal structure of samples [1] and with the advent of intense synchrotron radiation sources; the resolution of the tomography was improved into  $\mu\text{m}$  regime [2]. Although the transmission tomography provides information about the distribution of the attenuation coefficients, the technique cannot give any information about elemental distribution.

Other complementary tomographic techniques have been developed based on the detection of the scattered [3] and fluorescent photons [4] in order to get some properties

that also depend upon the distribution of individual elements within the sample. The X-ray fluorescence associate with tomographic techniques can supply important information of the sample chemical properties and to produce high contrast in conditions where transmission tomography is not adjusted.

One of the drawbacks of fluorescence tomography is the reconstruction calculation that is more complex than transmission tomography's algorithm [5]. Hogan et al. [6] proposed adapting one of the algorithms used in X-ray transmission tomography. The simplest algorithm is based on the classical back projection algorithm used in transmission tomography. An algorithm more accurate applies corrections for absorption before and after the fluorescence point.

XRFCT uses the photons emitted from the elements in a sample and allows one to obtain spatial maps in terms of

\*Corresponding author. Tel.: +55 212 562 7308; fax: +55 212 562 8444.  
E-mail address: [ricardo@lin.ufrj.br](mailto:ricardo@lin.ufrj.br) (R.T. Lopes).

the chemical composition of the object. If the attenuation inside the sample is small then the fluorescence intensity of a certain atomic level is proportional to the concentration of the element  $\rho_{iv}(x,y)$  and so the usual algorithms of transmission microtomography can be used to recover  $\rho_{iv}(x,y)$ . In equation below,  $I_0$  is the intensity of the incident beam and  $I_{iv}$  is the intensity of the fluorescence from the  $v$ -line of the element  $i$ .

$$\lambda_F = \frac{I_{iv}}{I_0} \propto \int \int dx dy \rho_{iv}(x,y).$$

This paper presents a development of a setup to study XRFCT of some reference samples made of polyethylene filled with a standard solution and some breast tissue samples at the XRF fluorescence beamline of the Brazilian Synchrotron Light Source facility (LNLS), Campinas, Brazil.

## 2. Methods

This work presents a development of a system to study fluorescence microtomography at the X-ray Fluorescence Facility (D09B-XRF) at the Brazilian Synchrotron Light Laboratory (LNLS), Campinas, Brazil. A monochromatic beam (9.8 and 10.7 keV) collimated to a  $200 \times 200 \mu\text{m}^2$  area with a set of slits, and a white beam (4–23 keV) collimated to a  $100 \times 100 \mu\text{m}^2$  area with a set of slits, were used to sample excitation. The intensity of the incident beam was monitored with an ionization chamber placed in front of it, before the sample. A schematic of the experimental setup for an XRFCT using a monochromatic beam is shown in Fig. 1.

The sample was placed on a high precision goniometer and translation stages that allow rotating as well as translating it perpendicular to the beam. The fluorescence photons were collected with an energy dispersive HPGC detector (CANBERRA Industries Inc.) placed at  $90^\circ$  to the incident beam, while transmitted photons were detected with a fast NaI (Tl) scintillation counter (CYBERSTAR-Oxford anfyisik) placed behind the sample on the beam direction. This detector geometry allows reducing the

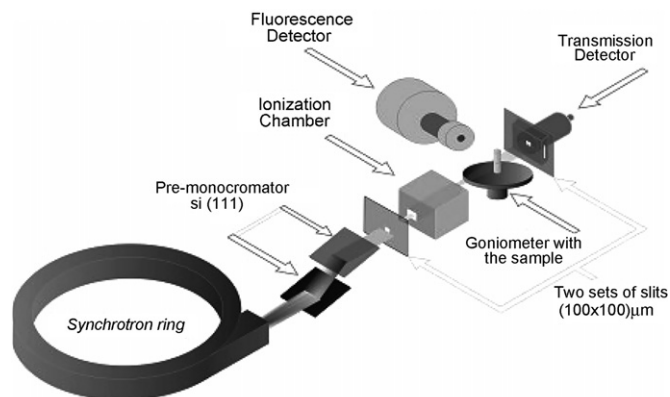


Fig. 1. The experimental arrangement for an X-ray fluorescence microtomography measurement using a monochromatic beam.

elastic and Compton X-ray scattering from the sample due to the high linear polarization of the incoming beam in the plane of the storage ring, thus improving the signal-to-background ratio for the detection of trace elements [7].

In order to study the performance of the system, some reference samples made of polyethylene filled with a standard solution of copper were analyzed, and some tissues of human breast (normal tissue, benign tumor and malignant tumor) have been analyzed in order to verify the efficiency of the system in determination of the elemental distribution in these kinds of samples. All the tomographic images were reconstructed using a filtered-back projection algorithm.

## 3. Results and discussions

The test samples are made of a polyethylene cylinder with 2 mm diameter with an internal cylinder with 1 mm diameter filled a standard solution of copper. Analyzing the images, it can be seen that while the transmission images show the polyethylene matrix and the internal cylinder, the X-ray fluorescence images show only those regions where the elements of interest (copper) were localized.

The results for the test samples made of polyethylene using a white beam, a monochromatic beam at 10.7 keV and a monochromatic beam at 9.8 keV are shown in Figs. 2, 3 and 4, respectively. In the figures, the left image shows the XRFCT and the right shows the XRFCT of copper.

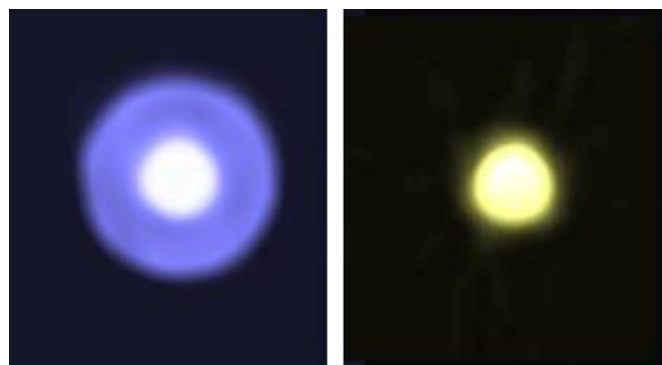


Fig. 2. Tomographic images using a white beam (left: transmission microtomography; right: X-ray fluorescence microtomography of Cu).

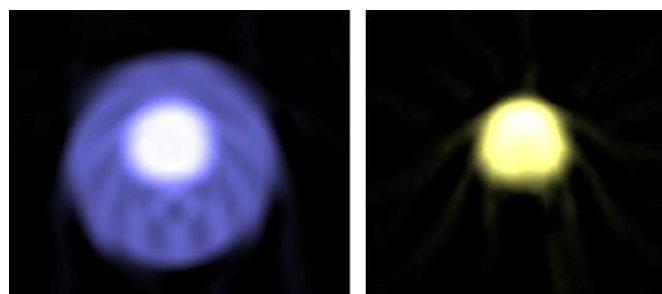


Fig. 3. Tomographic images using a monochromatic beam at 10.7 keV (left: transmission microtomography; right: X-ray fluorescence microtomography of Cu).



Analyzing the test samples images, it can be observed that the images do not have differences; the images have the same characteristics. The biggest advantage of the analysis with a monochromatic beam is the possibility determining the attenuation coefficients for the fluores-

cence energy and for beam energy and with these coefficients one can make the absorption corrections and accurately determine the concentration in each point of the sample.

The human breast tomographic images were done with a white beam. The results of these images are shown in Fig. 5. The results of the transmission tomography for normal tissue are shown in image (a). In images (b–d), we have shown the fluorescence tomography images in normal tissue for iron, copper and zinc, respectively. The results for benign and malignant tumor are shown in images (e) until (l). In images (e)–(i), we have the transmission tomography images for malignant tumor and benign tumor, respectively, and the other images show the fluorescence tomography images for iron, copper and zinc in the tumor samples.

An in-house program was developed to put the different fluorescence tomography images for the same sample together, and the results of normal breast tissue sample

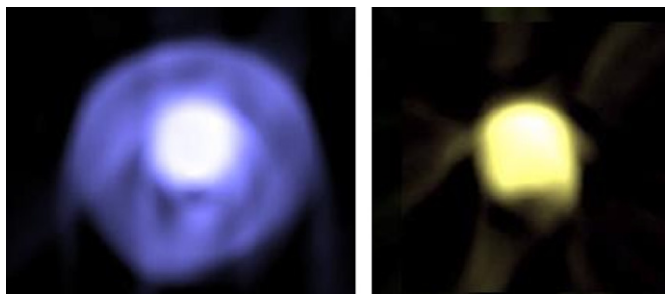


Fig. 4. Tomographic images using a monochromatic beam at 9.8 keV (left: transmission microtomography; right: X-ray fluorescence microtomography of Cu).

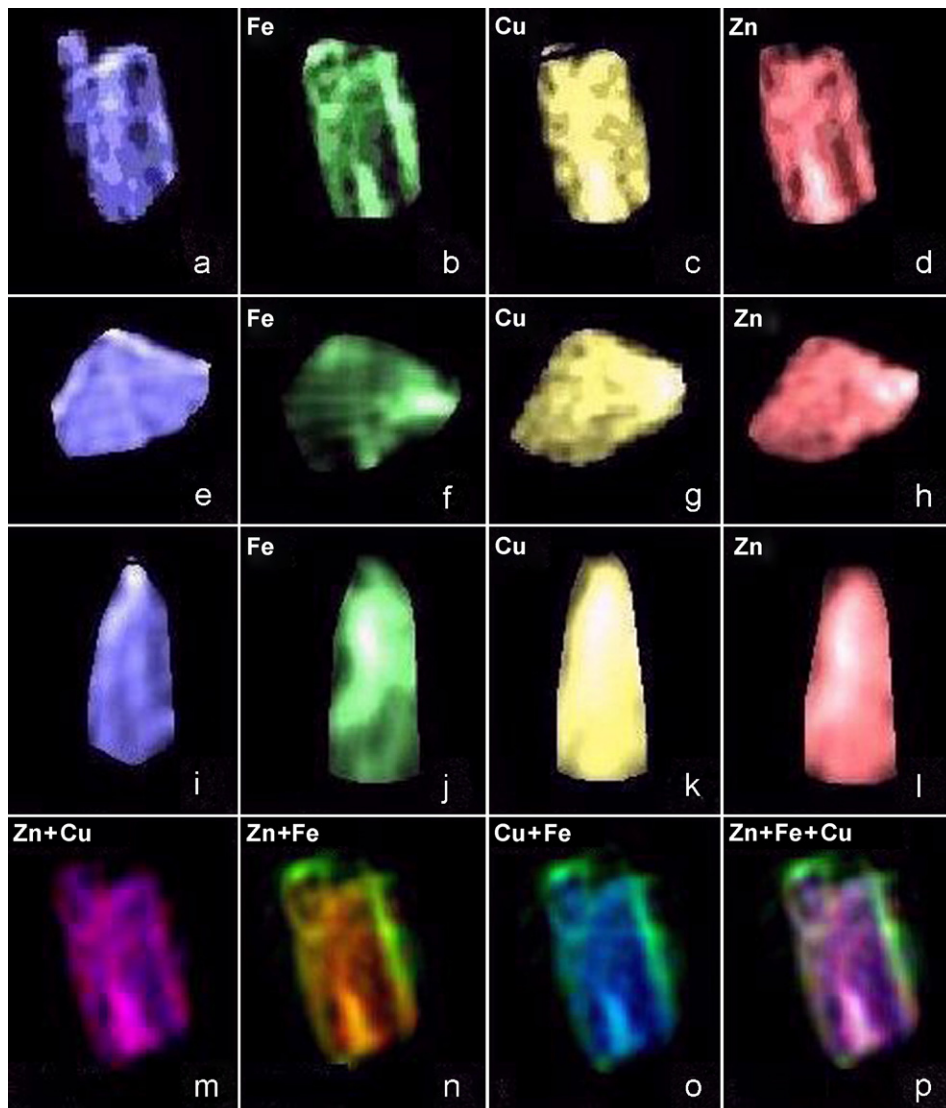


Fig. 5. Tomography images of the breast tissue samples.

can be visualized in images (m), (n), (o) and (p). The elements zinc, iron and green are represented in red, green and blue, respectively. The image (m) shows the combination of both zinc and copper fluorescence tomography image at the normal breast tissue sample, and the other images show all possible combinations.

#### 4. Conclusions

XRFCT is a powerful technique that can be used to characterize some samples bioscience, medicine, and geophysics.

It was possible to visualize the elemental distribution on the test samples, and on breast tissue samples but to use the XRFCT as an analytic tool to analyze biological tissues, it will be necessary to measure more samples and quantify the difference in concentration in one sample and between normal and abnormal tissues.

The better definition of the interfaces in X-ray fluorescence images was notorious and the spatial resolution of the system can be optimized as a function of the application.

The experimental setup at XRF-LNLS have shown to be very promising and this effort on implementing the

XRFCT was justified by the high quality of the images obtained.

#### Acknowledgments

This work was partially supported by Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ) and LNLS (Projects XRF-2938/04 and XRF-3468/04).

#### References

- [1] D. Braz, L.M.G. da Motta, R.T. Lopes, *Appl. Radiat. Isotopes* 50 (1999) 661.
- [2] R.T. Lopes, H.S. Rocha, E.F.O. Jesus, R.C. Barroso, L.F. Oliveira, M.J. Anjos, D. Braz, S.M. Simabuco, *Nucl. Instr. and Meth. A* 505 (2003) 604.
- [3] R.C. Barroso, R.T. Lopes, E.F.O. de Jesus, L.F. Oliveira, *Nucl. Instr. and Meth. A* 471 (1998) 75.
- [4] R. Cesareo, S. Mascarenhas, *Nucl. Instr. and Meth. A* 277 (1989) 669.
- [5] A. Brunetti, B. Golosio, *Comput. Phys. Commun.* 141 (2001) 412.
- [6] J.P. Hogan, R.A. Gonsalves, A.S. Krieger, *IEEE Trans. Nucl. Sci.* NS-38 (1991) 1721.
- [7] M. Naghedolfeizi, J.-S. Chung, R. Morris, G.E. Ice, W.B. Yun, Z. Cai, B. Lai, *J. Nucl. Mater.* 312 (2003) 146.

# Computed tomography and X-ray fluorescence CT of biological samples

G.R. Pereira<sup>a</sup>, M.J. Anjos<sup>b</sup>, H.S. Rocha<sup>a</sup>, P. Faria<sup>c</sup>, C.A. Pérez<sup>d</sup>, R.T. Lopes<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup>Nuclear Instrumentation Laboratory (LIN), COPPE, UFRJ, P.O. Box 68509, 21941-972 Rio de Janeiro, Brazil

<sup>b</sup>Physics Institute—UERJ, Brazil

<sup>c</sup>Instituto Nacional do Câncer, Brazil

<sup>d</sup>Brazilian Synchrotron Light Laboratory, Brazil

Available online 13 July 2007

## Abstract

Transmission microtomography ( $\mu$ CT) and X-ray fluorescence microtomography (XRF $\mu$ CT) are complementary and noninvasive techniques used for sample characterization.  $\mu$ CT provide information on the attenuation coefficients, while XRF $\mu$ CT can provide the distribution of all elements in a sample. XRF $\mu$ CT is a noninvasive technique, based on the detection of X-ray fluorescence emitted by the elements in the sample, and it is used to complement other techniques for sample characterization. The experiments were performed at the X-Ray Fluorescence (XRF) beamline of the Brazilian Synchrotron Light Laboratory (LNLS), Campinas, Brazil. A monochromatic beam of 9.8 keV was used for excitation of the elements within samples and the fluorescence photons were detected by an HPGe detector. The incident beam was monitored by an ionization chamber and a fast scintillator detector was used to detect the transmitted radiation. In this work, several intestine and breast tissue samples were investigated in order to verify the concentration of some elements correlated with the characteristics and pathology of each tissue observed by transmission  $\mu$ CT. All XRF $\mu$ CT were reconstructed using a filtered back-projection algorithm. In those samples the elements Zn, Cu, and Fe were observed.

© 2007 Elsevier B.V. All rights reserved.

PACS: 07.85.Yk; 87.59.Fm; 78.70.En

Keywords: X-ray fluorescence; Microtomography; Synchrotron radiation; Biological samples

## 1. Introduction

Since tomographic techniques were developed transmission tomography has been used in noninvasive testing for investigating the internal structure of samples [1], and with the advent of intense synchrotron radiation sources the resolution of the tomography was improved to the  $\mu$ m regime [2]. Although transmission tomography provides information about the distribution of the attenuation coefficients, the technique cannot give any information about the distribution of trace elements within the samples.

Other complementary tomographic techniques have been developed based on the detection of scattered [3] and fluorescent photons [4] in order to get some properties that also depend on the distribution of individual elements within the sample. The X-ray fluorescence associated with

tomographic techniques can supply important information about a sample's chemical properties and produce high contrast. Transmission tomography is not able to give this information.

X-ray fluorescence tomography is based on detection of photons from the fluorescent emission from the elements in the sample. These photons are acquired by an energy-dispersive detector, placed at 90° to the incident beam direction. A value in a projection is obtained by measuring the fluorescence radiation emitted by all pixels along the beam. The sample is translated and another value is measured in the projection. These steps are repeated until the whole sample passes through the beam, completing the projection. The sample is rotated and another projection is measured. The projections are measured until the sample rotates 180°.

The data acquisition of the X-ray fluorescence microtomography (XRF $\mu$ CT) results in a bi-dimensional raw data called sinogram. A sinogram consists of the line scans

\*Corresponding author. Tel.: +55 21 2562 7308; fax: +55 21 2562 8444.  
E-mail address: [ricardo@lin.ufrj.br](mailto:ricardo@lin.ufrj.br) (R.T. Lopes).



that were taken for every rotational angle. For each emission line of the fluorescence spectrum there is a separate sinogram. In general, a sinogram plots the property measured by the setup over the direction perpendicular to the beam and the angle of rotation. The tomogram, which is a two-dimensional slice across the sample, can be reconstructed from the sinogram by an appropriate algorithm.

If the attenuation within the sample is small, then the fluorescence intensity of a certain atomic level is proportional to the concentration of the element  $\rho_i(x,y)$  and the usual algorithms of transmission microtomography ( $\mu$ CT) can be used to recover  $\rho_i(x,y)$ . In Eq. (1),  $\lambda_F$  is the experimental projection,  $I_0$  is the intensity of the incident beam and  $I_{iv}$  is the intensity of the fluorescence from the  $v$ -line of the element  $i$ :

$$\lambda_F = \frac{I_{iv}}{I_0} \propto \iint dx dy \rho_{iv}(x,y). \quad (1)$$

The increase in the mortality rate in Brazil due to cancer was a decisive factor in the choice of the investigated samples. The choice also reflects the world tendency to find diagnostic techniques for cancer and other diseases. The fluorescence mapping of iron, copper and zinc can be very important in diagnostics, because the biochemistry of these elements suggests that these metals may play an important role in carcinogenesis. However, the evidence linking iron, copper and zinc to cancer is far from conclusive and further research is needed [5]. Using X-ray fluorescence tomography the elemental map can be obtained without sample preparation.

This paper presents a development of a setup to study XRF  $\mu$ CT of biological samples at the XRF fluorescence beam line of the Brazilian synchrotron light source facility (LNLS), Campinas, Brazil.

## 2. Experiment

This work presents the development of a system to study fluorescence  $\mu$ CT at the X-Ray Fluorescence Facility (D09B-XRF) at the Brazilian Synchrotron Light Laboratory (LNLS), Campinas, Brazil. A monochromatic beam (9.8 keV)

collimated to a  $200 \times 200 \mu\text{m}^2$  area with a set of slits was used for excitation of the elements within samples. The intensity of the incident beam was monitored with an ionization chamber placed in front of it, before the sample. A schematic of the experimental setup for an XRF  $\mu$ CT using a monochromatic beam is shown in Fig. 1.

The sample was placed on a high-precision goniometer and on translation stages, in order to allow rotating as well as translating it perpendicularly to the beam. The fluorescence photons were collected with an energy-dispersive HPGGe detector (CANBERRA Industries Inc.) placed at  $90^\circ$  to the incident beam, while transmitted photons were detected with a fast NaI (TI) scintillation counter (CYBERSTAR-Oxford anfyisik) placed behind the sample along the beam direction. This detector geometry allows reducing the elastic and Compton X-ray scattering from the sample due to the high linear polarization of the incoming beam in the plane of the storage ring, thus improving the signal to background ratio for the detection of trace elements [6].

The quality of the reconstruction is a compromise between the measuring time required for an acceptable counting statistic of the X-ray fluorescence peaks and the step size necessary to linearly move and rotate the samples. In one projection, samples were positioned in steps of  $200 \mu\text{m}$  (actual beam size) perpendicularly to the beam direction, covering the entire cross-section of the sample.

Each single value in a projection is obtained by measuring the fluorescence radiation emitted by all pixels along the beam [7]. The object is then rotated and another projection is measured. Projections are obtained in steps of  $3^\circ$  until the object has completed  $180^\circ$ . The selected measuring time was 2 s for each scanned point.

A paper filter was first analyzed and used as a test sample. One piece of the filter was impregnated with a solution containing 500 ppm of zinc, while the other remained untouched. Both pieces of paper filter were rolled up until it reached a cylindrical shape. The paper filter thickness was approximately  $130 \mu\text{m}$ .

As a second part of the experiments, X-ray fluorescence microtomographies were performed on human intestine

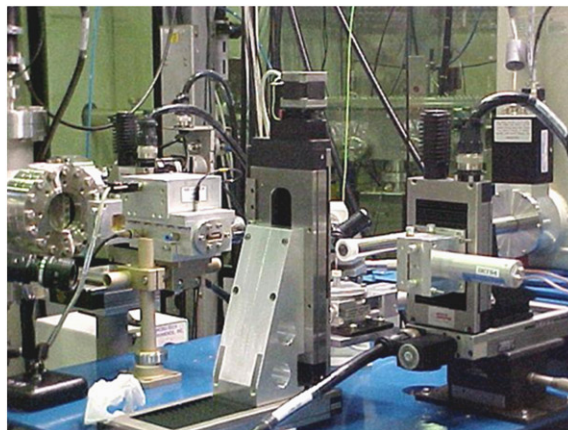
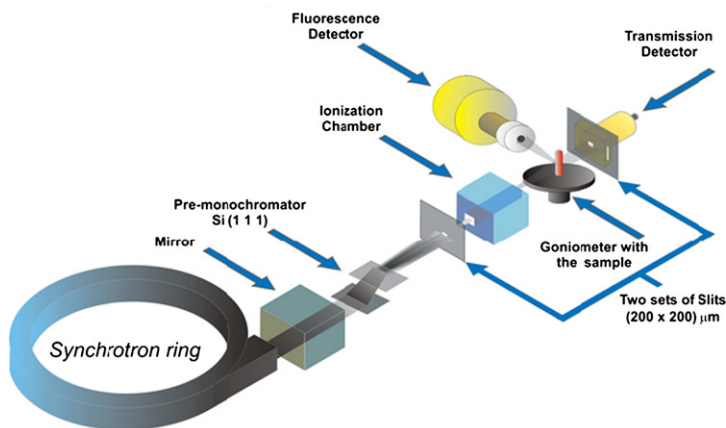


Fig. 1. The experimental arrangement for an X-ray fluorescence microtomography measurement using a monochromatic beam and picture.

and breast tissue. The component tissues were identified visually by the pathologist who made the sample available. The tissues for XRF $\mu$ CT were cut in cylindrical form with 1.5–2 mm thickness by 4–5 mm of height and were frozen and dried before being analyzed.

### 3. Results and discussion

All tomographies were reconstructed using a filtered back-projection algorithm. Despite the self-absorption

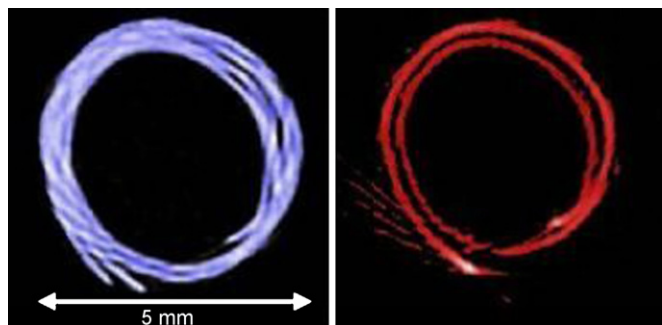


Fig. 2. Tomography images of paper filter (left: transmission and right: X-ray fluorescence).

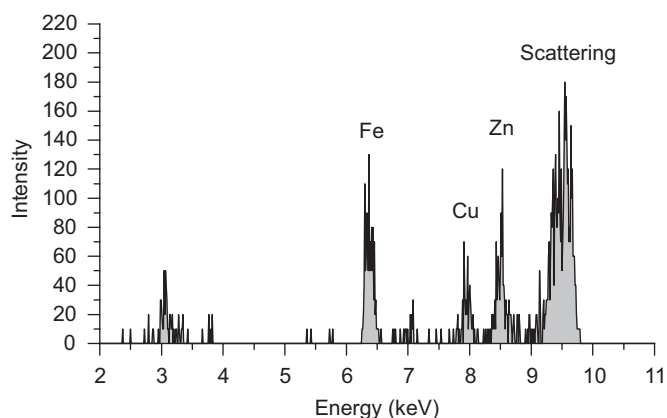


Fig. 3. Fluorescence spectrum from the breast cancer sample.

inside the samples, we have obtained good results. The fluorescence tomography images are qualitative in character because of this self-absorption.

The transmission and fluorescence X-ray tomography of the test sample is shown in Fig. 2. As it was already mentioned, while transmission tomography shows all layers of the filter, fluorescence tomography shows only those regions where the element of interest (Zn) was located. These tomographies show the viability of fluorescence  $\mu$ CT and confirm that this technique can be used to complement other techniques for sample characterization.

Before the tissues tomographic measurements were initiated, the X-ray beam was centered on each tissue sample to determine the detectable trace elements. The measured fluorescence spectrum from the breast cancer is shown in Fig. 3.

The results of the transmission and fluorescence transmission  $\mu$ CT in two diseased human breast tissue samples are shown in Fig. 4. The breast tissues samples are breast cancer and breast cancer after chemotherapy reduction. While the first line shows the reconstructed images of Fe, Cu and Zn in the breast cancer sample, the second line shows the behavior of these elements in the breast cancer sample after chemotherapy reduction. The tomographic reconstruction of the elements shown in the breast cancer sample reveals the presence only of Zn in the inner initial cyst.

Fig. 5 shows the tomographic images of human intestine tissue samples. In the first line the reconstructed tomography of a malignant intestine tissue tumor for transmission tomography, and fluorescence tomography for iron, copper and zinc can be seen. The second line shows the reconstructed elemental maps of Fe, Cu and Zn in a healthy intestine tissue tumor.

### 4. Conclusion

Analyzing the XRF $\mu$ CT of the tissue sample fragments, it was possible to see the elemental distribution of iron, copper and zinc, but it is necessary to correct the

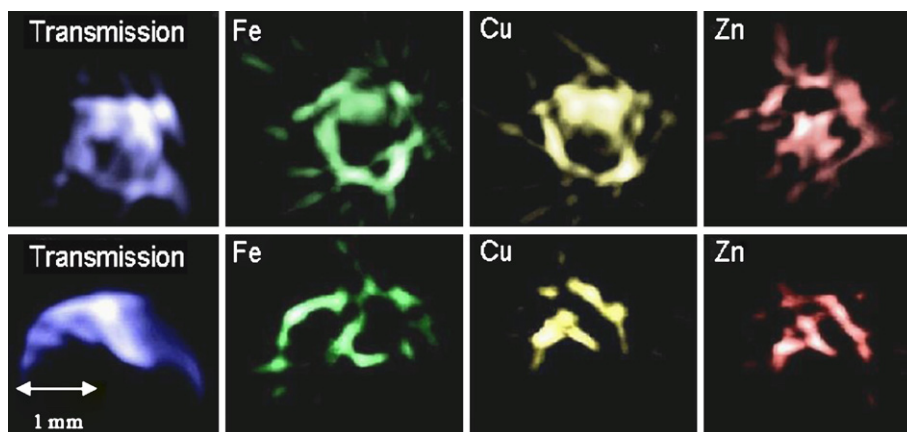


Fig. 4. Tomography images of human breast tissue samples.

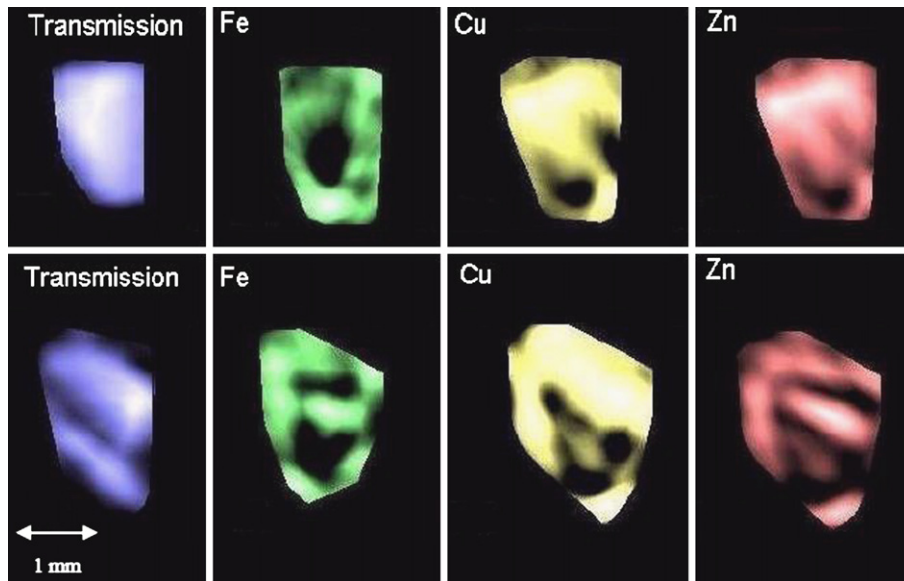


Fig. 5. Tomography images of human intestine tissue samples.

absorption to obtain the concentration of these elements in the samples and correct the fluorescence mapping. However, it can be seen that there may be a larger zinc concentration inside an initial cyst in the breast cancer sample.

The better definition of the interfaces in X-ray fluorescence images was striking and the spatial resolution of the system can be optimized as a function of the application. The experimental setup at XRF-LNLS has shown to be very promising and this effort to implement X-ray fluorescence microtomography was justified by the high quality of the images obtained.

#### Acknowledgments

This work was partially supported by Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de

Janeiro (FAPERJ) and Laboratório Nacional de Luz Síncrotron (LNLS).

#### References

- [1] D. Braz, L.M.G. da Motta, R.T. Lopes, *Appl. Radiat. Isotopes* 50 (1999) 661.
- [2] R.T. Lopes, H.S. Rocha, E.F.O. Jesus, R.C. Barroso, L.F. Oliveira, M.J. Anjos, D. Braz, S.M. Simabuco, *Nucl. Instr. and Meth. A* 505 (2003) 604.
- [3] R.C. Barroso, R.T. Lopes, E.F.O. de Jesus, L.F. Oliveira, *Nucl. Instr. and Meth. A* 471 (1998) 75.
- [4] R. Cesareo, S. Mascarenhas, *Nucl. Instr. and Meth. A* 277 (1989) 669.
- [5] T. Wu, C.T. Sempos, J.L. Freudenheim, et al., *Ann. Epidemiol.* 14 (3) (2004) 195.
- [6] M. Naghedolfeizi, J.-S. Chung, R. Morris, G.E. Ice, W.B. Yun, Z. Cai, B. Lai, *J. Nucl. Mater.* 312 (2003) 146.
- [7] J.P. Hogan, R.A. Gonsalves, A.S. Krieger, *IEEE Trans. Nucl. Sci.* NS-38 (1991) 1721.



# X-ray fluorescence and X-ray transmission microtomography imaging system

Gabriela R. Pereira<sup>a,\*</sup>, Henrique S. Rocha<sup>a</sup>, Marcelino J. Anjos<sup>b</sup>, Paulo Faria<sup>c</sup>,  
Carlos A. Pérez<sup>d</sup>, Ricardo T. Lopes<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Nuclear Instrumentation Laboratory - COPPE/UFRJ, Rio de Janeiro, Brazil

<sup>b</sup>Physics Institute - UERJ, Rio de Janeiro, Brazil

<sup>c</sup>Brazilian National Cancer Institute, Rio de Janeiro, Brazil

<sup>d</sup>Brazilian Synchrotron Light Laboratory, São Paulo, Brazil

Available online 27 July 2007

## Abstract

An X-ray Transmission Microtomography (CT) system combined with an X-ray Fluorescence Microtomography (XRFCT) system was implemented in the Brazilian Synchrotron Light Source (LNLS), Campinas, Brazil. The main aim of this work is to determine the elemental and absorption distribution map in breast tissue samples. The experiments were performed at the X-Ray Fluorescence beamline (D09B-XRF) of the Brazilian Synchrotron Light Source (LNLS), Campinas, Brazil. A quasi-monochromatic beam produced by a multilayer monochromator was used as an incident beam. The fluorescence photons were acquired with an energy dispersive HPGe detector (CANBERRA Industries Inc.) placed at 90° to the incident beam, while transmitted photons were detected with a fast Na(Tl) scintillation counter (CYBERSTAR Oxford Danfysik) placed behind the sample in the beam direction. All the tomographic images were reconstructed using a filtered-back projection algorithm.

© 2007 Elsevier B.V. All rights reserved.

PACS: 07.85.Qe; 87.59.Fm; 78.70.En

Keywords: X-ray fluorescence; Microtomography; Synchrotron radiation; Breast tissue

## 1. Introduction

Fluorescence tomography can be used to investigate the distribution of the chemical elements inside a sample. This makes it a powerful tool for several fields of research, like biology, archeology and medicine.

In fluorescence microtomography an X-ray beam is used for the excitation of the elements inside the sample and the fluorescence from one or more elements is measured [1]. At each projection angle the line integral of the fluorescence along the beam inside the sample is measured. A single tomographic slice is collected by translating and rotating the sample on a 2-D grid [2]. The spatial resolution of this technique is limited only by the size of the focused X-ray beam, which can be less than 1 μm. The data acquisition of

the X-ray fluorescence microtomography results in a bi-dimensional raw data called sinogram. A sinogram consists of the line scans that were taken for every rotational angle. For each emission line of the fluorescence spectrum there is a separate sinogram. In general, a sinogram plots the property measured by the setup over the direction perpendicular to the beam and the angle of rotation. The tomogram which is a two-dimensional slice across the sample can be reconstructed from the sinogram by an appropriate algorithm. A significant requirement of the method is that the absorption of the fluorescent X-rays within the sample must be small. The elements that can be measured are therefore a strong function of the bulk composition and size of the sample.

In this work, we use a new generation of X-ray optical components to obtain a quasi-monochromatic beam at 12 keV. Sometimes referred to as layered synthetic microstructures (LSM) or simply as multilayers, these optical

\*Corresponding author.

E-mail address: [gpereira@con.ufrj.br](mailto:gpereira@con.ufrj.br) (G.R. Pereira).



components consist of layered depositions of materials A and B, having a significant difference in their indices of refraction. Most commonly,  $n$  layer pairs are fabricated to form a structure of uniform period by depositing alternating thin layers on top of a smooth substrate. Material A is a low- $Z$  material such as carbon or silicon and B is a high- $Z$  material such as tungsten or platinum. The efficiency of diffraction can be as high as 50–80% over bandwidths  $\Delta E/E$  of 0.005–0.1, making feasible a new class of high-power, large bandwidth X-ray optics [3].

The choice for analyzing breast tissue samples was made in accordance with the world tendency to find diagnostic techniques for cancer. Breast cancer warrants attention because it is the most common cancer and the leading cause of cancer related deaths in women throughout the world.

In recent years, there has been growing interest in understanding the exact role played by trace elements in several diseases. The biological function of some metal ions in combination with an investigation of element distribution patterns in malignant and in normal human tissues of cancer patients can give some indication of the effect of metal ions on carcinogenesis [4]. Both excess and deficiency of trace elements have been associated with many diseases including cancer. Even though extensive work has been carried out to find an association between trace elements and cancer, and to understand the mechanisms involved in carcinogenesis, no definite conclusions have been drawn so far [5].

In this work human breast tissues samples have been analyzed in order to verify the efficiency of the system in the determination of the elemental distribution in this kind of samples.

## 2. Experiment

This work presents the development of a system to study fluorescence microtomography at the X-Ray Fluorescence Facility (D09B-XRF) at the Brazilian Synchrotron Light

Laboratory (LNLS), Campinas, Brazil. A white beam (4–23 keV), a monochromatic beam produced by a Si (111) at 9.8 keV and a quasi-monochromatic beam produced by a multilayer monochromator at 12 keV,  $\Delta E/E = 0.03$  collimated to a  $200 \times 200 \mu\text{m}^2$  area with a set of slits, were used for excitation of the elements within the samples. The crystal multilayer monochromator is made of W-C and has 75 layer pairs.

The intensity of the incident beam was monitored with an ionization chamber placed in front of it, before the sample. A schematic rendering of the experimental setup for an X-ray fluorescence microtomography using a multilayer monochromatic beam is shown in Fig. 1. The setup using white beam is the same setup as in Fig. 1 but without the multilayer crystal and to obtain the monochromatic setup we replace the multilayer system with a crystal of Si(111).

The sample was placed on a high precision goniometer and on translation stages, in order to allow rotating as well as translating it perpendicularly to the beam. The fluorescence photons were acquired with an energy dispersive HPGe detector (CANBERRA Industries Inc.) placed at  $90^\circ$  to the incident beam, while transmitted photons were detected with a fast NaI (Tl) scintillation counter (CYBERSTAR-Oxford Danfysik) placed behind the sample along the beam direction. This detector geometry allows reducing the elastic and Compton X-ray scattering from the sample due to the high linear polarization of the incoming beam in the plane of the storage ring, thus improving the signal to background ratio for the detection of trace elements [6].

The quality of the reconstruction is a compromise between the measuring time required for an acceptable counting statistic of the X-ray fluorescence peaks and the step size necessary to linearly move and rotate the samples. In one projection, samples were positioned in steps of  $200 \mu\text{m}$  (actual beam size) perpendicularly to the beam direction, covering the entire cross-section of the sample.

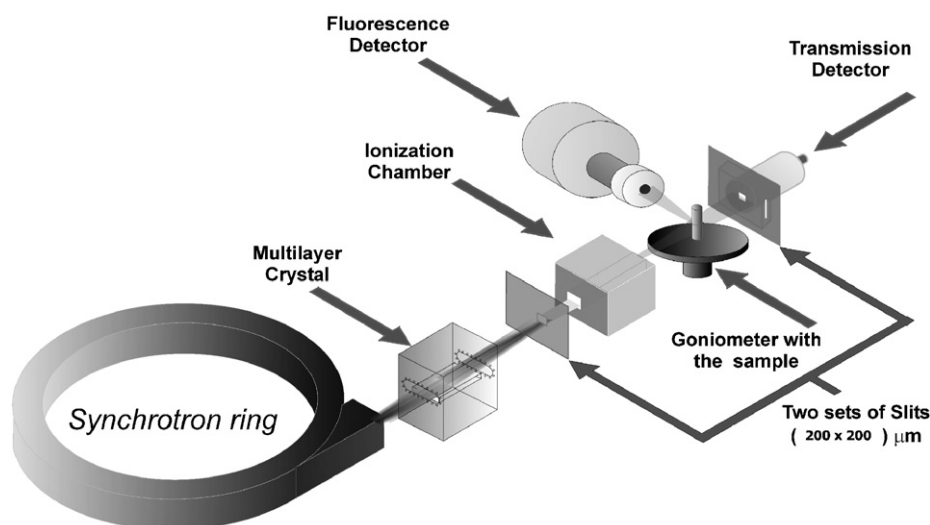


Fig. 1. The experimental arrangement for an X-ray fluorescence microtomography measurement using a multilayer crystal.

Each single value in a projection is obtained by measuring the fluorescence radiation emitted by all pixels along the beam. The object is then rotated, and another projection is measured. Projections are obtained in steps of  $3^\circ$  until the object has completed  $180^\circ$ . The selected measuring time was 2 s for each scanned point.

X-ray fluorescence microtomographies were performed on human breast tissue samples. Malignant breast tumor (ductal carcinoma), benign breast tumor and healthy tissues were analyzed. The component tissues were identified by the pathologist who made the sample available. The tissues were cut in cylindrical form with 1.5–2.0 mm thickness by 4.0–5.0 mm height and were frozen and dried before being analyzed.

### 3. Results and discussions

All tomographies were reconstructed using a filtered back projection algorithm. Despite the self-absorption in the samples, we obtained good results. The fluorescence tomography images are qualitative in character because of this self-absorption.

The transmission and fluorescence X-ray tomography of a test sample is shown in Fig. 2. The test sample is made of a polyethylene cylinder with 2 mm diameter, with an internal cylinder with 1 mm diameter filled with a standard solution of copper.

Analyzing the images it can be seen that while the transmission images (on the left side of the image) show the

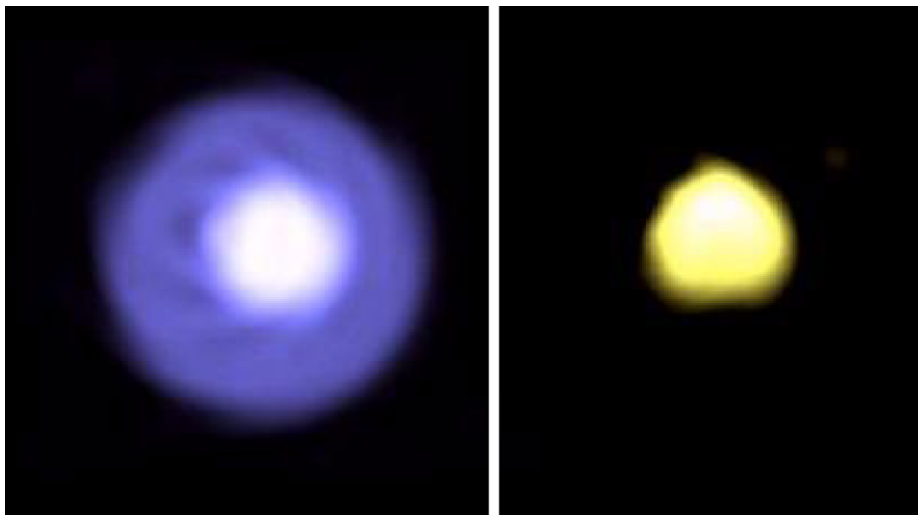


Fig. 2. Tomographic images using a quasi monochromatic beam at 12 keV (left: Transmission microtomography; right: X-ray fluorescence microtomography of Cu).

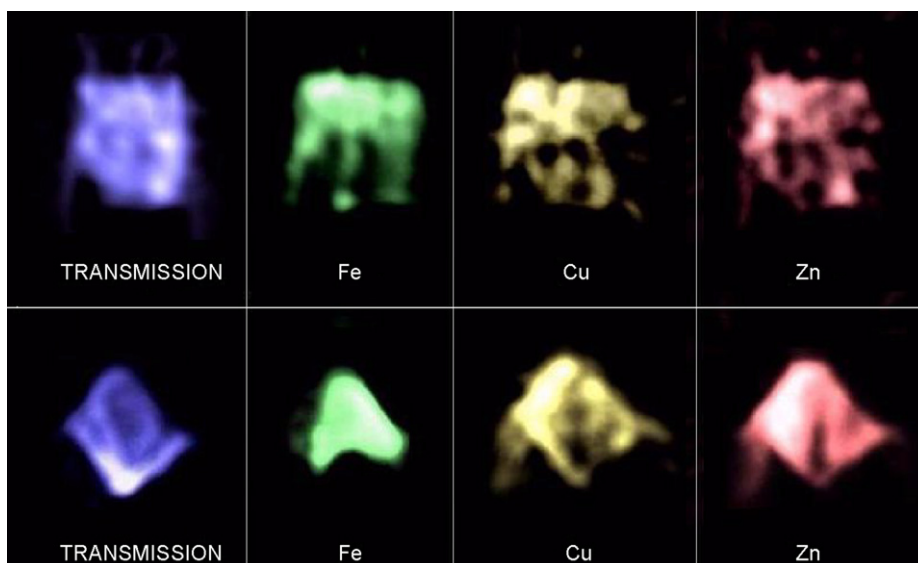


Fig. 3. Tomographic images of human breast tissue sample (first line: healthy breast tissue; second line: ductal carcinoma).

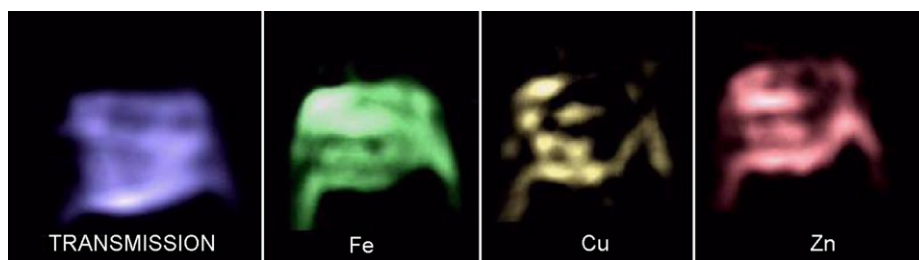


Fig. 4. Tomographic images of human benign breast tumor sample.

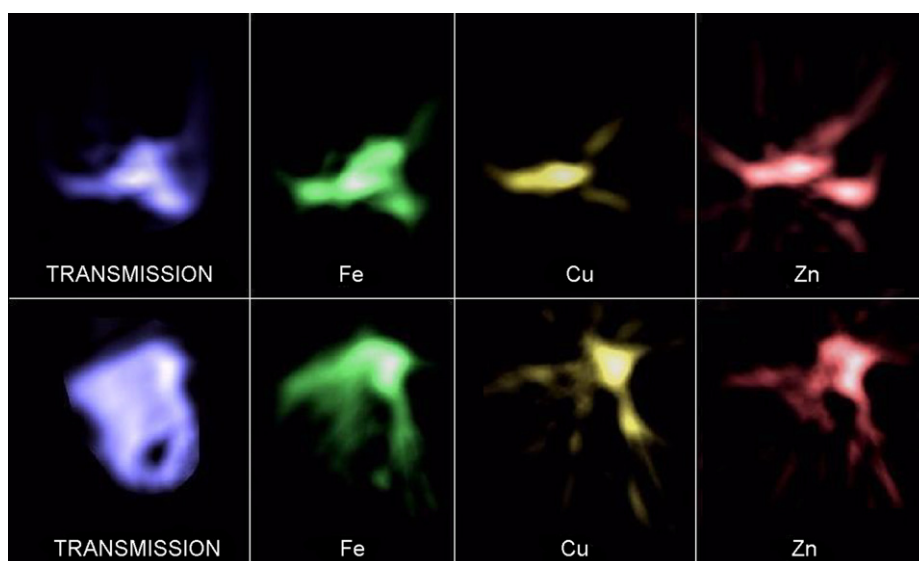


Fig. 5. Tomographic images of human breast tissue sample (first line: healthy breast tissue; second line: ductal carcinoma).

polyethylene matrix and the internal cylinder, the X-ray fluorescence images show only those regions where the elements of interest (copper) were localized. These tomographies show the viability of fluorescence microtomography and confirm that this technique can be used to complement other techniques for sample characterization.

The results of the tomographies in human breast tissue for three different patients are shown in Figs. 3–5.

Fig. 3 shows the transmission image and the reconstructed images of Fe, Cu and Zn in a healthy tissue (line 1) and in a ductal carcinoma (line 2) for the same patient. A flaw in the iron distribution can be seen (line 2), which is probably due to the self-absorption of iron in the ductal carcinoma sample.

Fig. 4 shows the tomographies of a benign breast tumor of another patient. Analyzing the fluorescence mapping, it can be observed that this sample has a bigger concentration of iron and zinc and a smaller concentration of copper.

For the last patient, Fig. 5 shows the transmission image and the reconstructed images of Fe, Cu and Zn in a healthy tissue (line 1) and in a ductal carcinoma (line 2). Flaws can be seen in the iron, copper and zinc distribution in the ductal carcinoma sample (line 2). Those flaws are probably

due to the self-absorption of these elements in the sample. The tomographic reconstruction of the elements shown in the healthy tissue sample (line 1) reveals a bigger concentration of iron and zinc and a smaller concentration of copper.

The radial streak effects that can be visualized in tomographic reconstructions are because of the low counting statistics in each projection. The images were not processed.

#### 4. Conclusion

Analyzing the XRFCT of the breast sample fragments, it was possible to visualize the elemental distribution of iron, copper and zinc, but it is necessary to correct the absorption to get the concentration of these elements in the samples and correct the fluorescence mapping.

It will be necessary to measure more samples and quantify the difference in concentration in one sample and between normal and abnormal tissues to use the X-ray fluorescence microtomography as an analytic tool to analyze biological tissues.

The radial streak effects that can be visualized in tomographic reconstructions are because of the low

counting statistic in each projection. The images were not processed.

The better definition of the interfaces in X-ray fluorescence images was striking and the spatial resolution of the system can be optimized as a function of the application. The experimental set up at XRF-LNLS has shown to be very promising and this effort at implementing X-ray fluorescence microtomography was justified by the high quality of the images obtained.

#### Acknowledgments

This work was partially supported by the National Council for Scientific and Technological Development (CNPq), Rio de Janeiro State Research Foundation

(FAPERJ) and Brazilian Synchrotron Light Laboratory (LNLS).

#### References

- [1] R. Cesareo, S. Mascarenhas, Nucl. Instr. and Meth. A 277 (1989) 669.
- [2] J.P. Hogan, R.A. Gonsalves, A.S. Krieger, IEEE Trans. Nucl. Sci. NS-38 (1991) 1721.
- [3] G. Brown, D.E. Moncton, Handbook on Synchrotron Radiation, vol. 3, Elsevier Science Publishers, Amsterdam, 1991, pp. 129–139.
- [4] G.J. Naga Raju, P. Sarita, et al., Nucl. Instr. and Meth. B 247 (2006) 361.
- [5] T. Wu, C.T. Sempos, J.L. Freudenheim, et al., Ann. Epidemiol. 14 (3) (2004) 195.
- [6] M. Naghedolfeizi, J.-S. Chung, R. Morris, G.E. Ice, W.B. Yun, Z. Cai, B. Lai, J. Nucl. Mater. 312 (2003) 146.





## Elemental distribution mapping on breast tissue samples

G.R. Pereira<sup>a</sup>, H.S. Rocha<sup>a</sup>, M.J. Anjos<sup>a,b</sup>, P.C.M.A. Farias<sup>c</sup>,  
 C.A. Pérez<sup>d</sup>, R.T. Lopes<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> *Laboratório de Instrumentação Nuclear – LIN-COPPE/UFRJ, RJ, Brazil*

<sup>b</sup> *Instituto de Física - UERJ, RJ, Brazil*

<sup>c</sup> *Departamento de Ciências Exatas – UEFS, BA, Brazil*

<sup>d</sup> *Laboratório Nacional de Luz Síncrotron – LNLS, SP, Brazil*

Received 15 April 2008; accepted 28 April 2008

### Abstract

The main of this work is to determine the elemental and absorption distribution map in breast tissue samples by X-ray fluorescence and X-ray transmission microtomography. The experiments were performed at the X-ray fluorescence beamline (D09B-XRF) in the Brazilian Synchrotron Light Source (LNLS), Campinas, Brazil. A quasi-monochromatic beam produced by a multilayer monochromator was used as an incident beam. The sample was placed on a high precision goniometer and translation stages that allow rotating as well as translating it perpendicularly to the beam. The fluorescence photons were collected with an energy dispersive HPGe detector placed at 90° to the incident beam, while transmitted photons were detected with a fast Na(Tl) scintillation counter ( ) placed behind the sample on the beam direction. All the tomographic images were reconstructed using a filtered-back projection algorithm. In the breast tissue samples, it was possible to determine the distribution of Zn, Cu and Fe in healthy tissue and tumor.

© 2008 Elsevier Ireland Ltd. All rights reserved.

*Keywords:* X-ray fluorescence; Microtomography; Breast tissue

### 1. Introduction

The purpose of this work is to analyze healthy breast tissue and tumor of the same patient by X-ray Transmission Microtomography (CT) and X-ray Fluorescence Microtomography (XRFCT) in order to determine the absorption distribution map and the elemental distribution map of iron, copper and zinc.

The increase of the mortality rate in Brazil due to breast cancer was a decisive factor in the choice of the investigated samples. The choice also reflects the world tendency to find diagnostic techniques for cancer and other diseases.

The fluorescence mapping of iron, copper and zinc can be very important in diagnoses, because the biochemistry of these elements suggests that these metals may play an important role in carcinogenesis [1].

However, until now the evidence, linking iron, copper and zinc to cancer is far from being conclusive [2] and further

research is needed. Using XRFCT the elemental map can be obtained without sample preparation.

The X-ray fluorescence associated with tomographic techniques can supply important information about a sample's chemical properties and produce high contrast.

X-ray fluorescence tomography is based on detection of photons from fluorescent emission from the elements in the sample. These photons are acquired by an energy dispersive detector, placed at 90° to the incident beam direction, and as additional information, a transmission tomography is used for sample characterization [3].

In this work, it was used a new generation of X-ray optical components to obtain a quasi-monochromatic beam at 12 keV to the excitation of the elements inside of the sample. Sometimes referred to as layered synthetic microstructures (LSM) or simply as multilayers, these optical components consist of layered depositions of materials A and B, having a significant difference in their indices of refraction. Most commonly,  $n$  layer pairs are fabricated to form a structure of uniform period by depositing alternating thin layers on top of smooth substrate. Material A is low-Z material such as carbon or silicon and B is a high-Z material such as tungsten or platinum. The efficiency of diffraction

\* Corresponding author. Tel.: +55 21 2562 7308; fax: +55 21 2562 8444.  
 E-mail address: ricardo@lin.ufrj.br (R.T. Lopes).

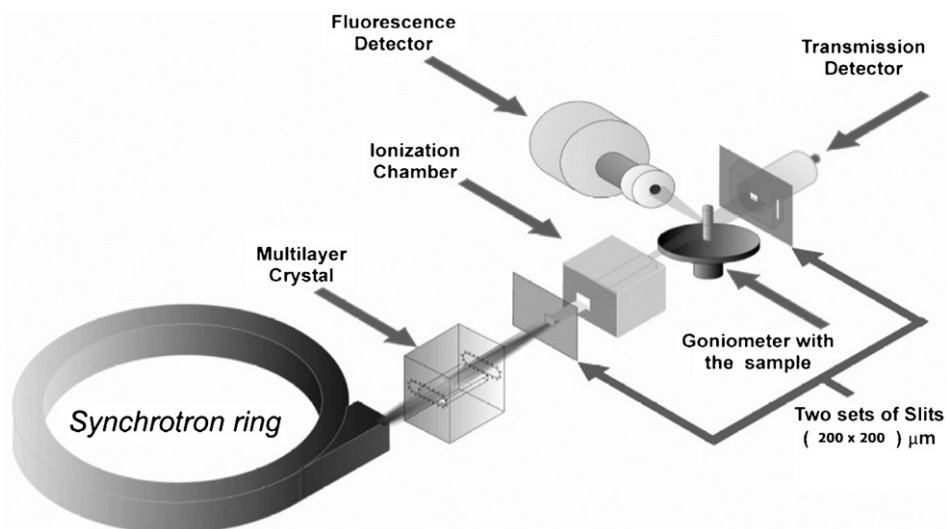


Fig. 1. The experimental arrangement for an X-ray fluorescence microtomography measurement using a quasi-monochromatic beam.

can be as high as 50–80% over bandwidths  $\Delta E/E$  of 0.005–0.1, making feasible a new class of high-power, large bandwidth X-ray optics [4].

The data acquisition of the X-ray fluorescence microtomography results in a bi-dimensional raw data called sinogram. A sinogram consists of the line scans that were taken for every rotational angle. For each emission line of the fluorescence spectrum there is a separate sinogram. In general, a sinogram plots the property measured by the setup over the direction perpendicular to the beam and the angle of rotation. The tomogram which is a two dimensional slice across the sample can be reconstructed from the sinogram by an appropriate algorithm.

This paper presents a development of a X-ray fluorescence microtomography setup to study breast tissue samples using two different algorithms for reconstructed the images: the common algorithm used in CT – filtered-back projection algorithm, and Brunetti's algorithm – filtered-back projection algorithm with absorption corrections [5].

## 2. Methods

This work presents a development of a system to study fluorescence microtomography at the X-ray Fluorescence Facility (D09B-XRF) in the Brazilian Synchrotron Light Laboratory (LNLS), Campinas, Brazil.

A quasi-monochromatic beam produced by a multilayer monochromator at 12 keV,  $\Delta E/E=0.03$  collimated to a  $200 \mu\text{m} \times 200 \mu\text{m}$  area with a set of slits, was used to sample excitation. The crystal monochromator is made of W-C and it has 75 layer pairs.

The intensity of the incident beam was monitored with an ionization chamber placed in front of it, before the sample. A schematic of the experimental setup for an X-ray fluorescence microtomography using a monochromatic beam is shown in Fig. 1.

The sample was placed on a high precision goniometer and translation stages that allow rotating as well as translat-

ing it perpendicularly to the beam. The fluorescence photons were collected with an energy dispersive HPGe detector (CANBERRA Industries inc.) placed at  $90^\circ$  to the incident beam, while transmitted photons were detected with a fast NaI (TI) scintillation counter (CYBERSTAR-Oxford anfyisk) placed behind the sample on the beam direction. This detector geometry allows reducing the elastic and Compton X-ray scattering from the sample due to the high linear polarization of the incoming beam in the plane of the storage ring, thus improving the signal to background ratio for the detection of trace elements [6].

The quality of the reconstruction is a compromise between the measuring time required for an acceptable counting statistic of the X-ray fluorescence peaks and the step size necessary to linearly move and rotate the samples. In one projection, samples were positioned in steps of  $200 \mu\text{m}$  (actual beam size) perpendicularly to the beam direction covering the whole transversal section of the sample proof.

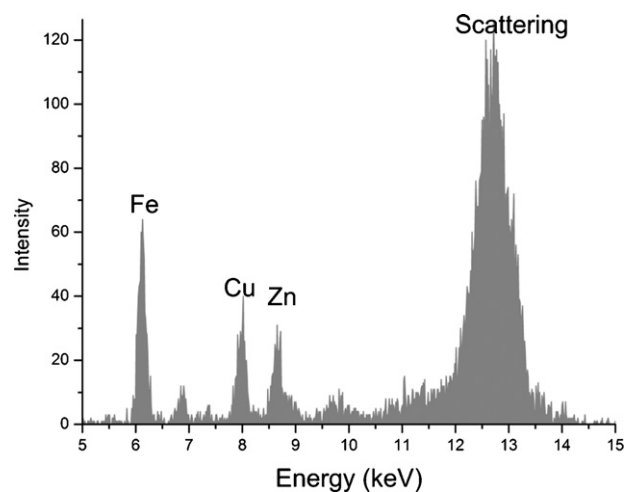


Fig. 2. An X-ray fluorescence spectrum from the breast cancer sample.

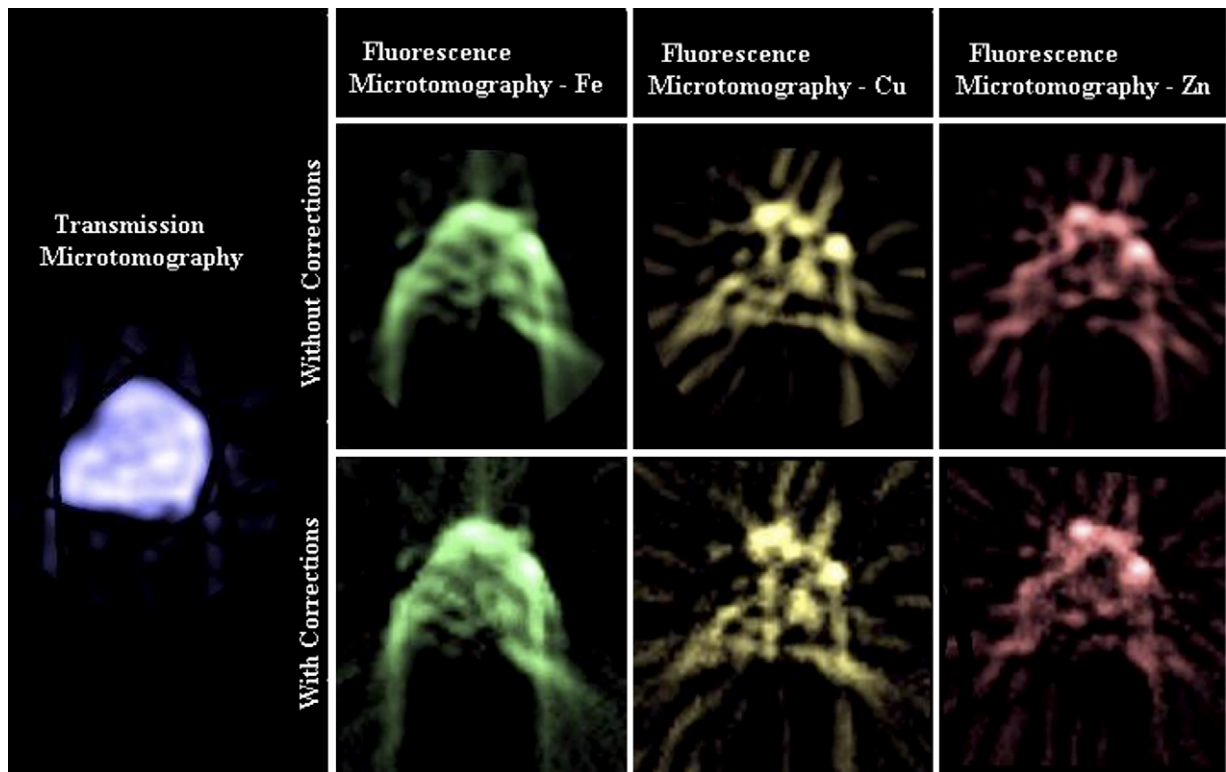


Fig. 3. Tomographic images of the healthy breast tissue sample.

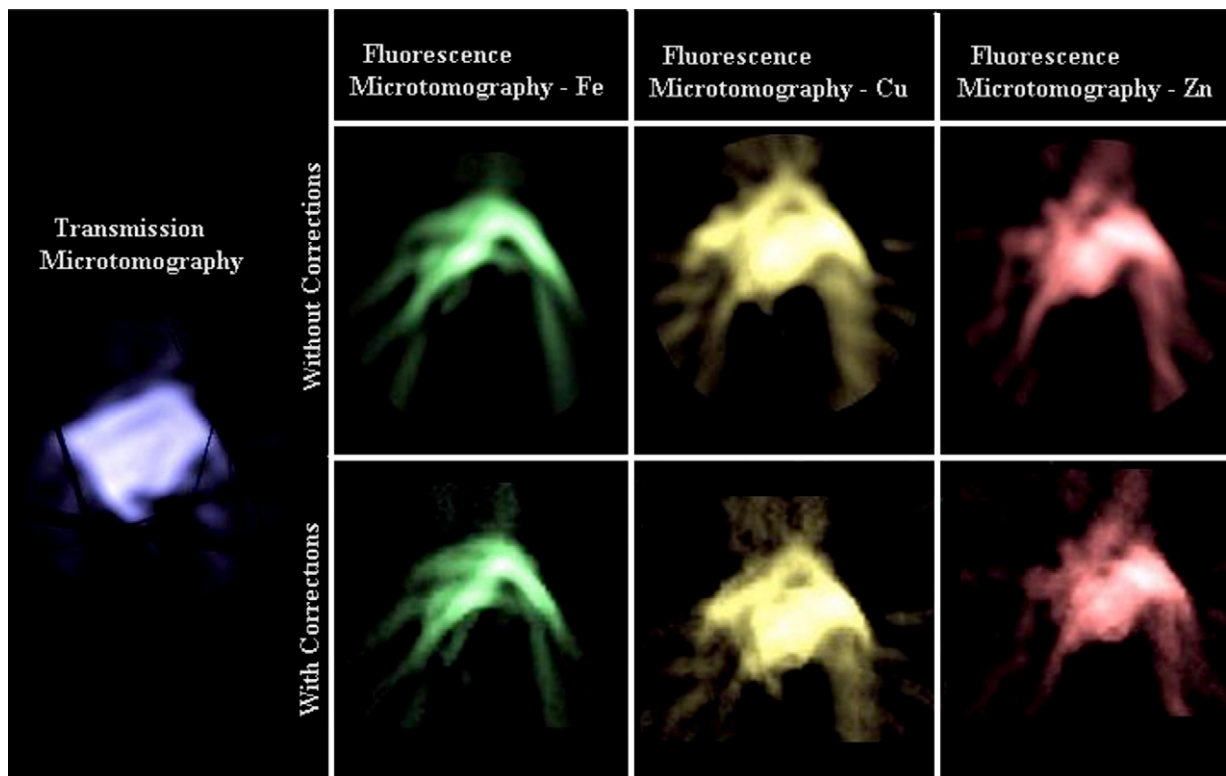


Fig. 4. Tomographic images of the breast cancer sample.

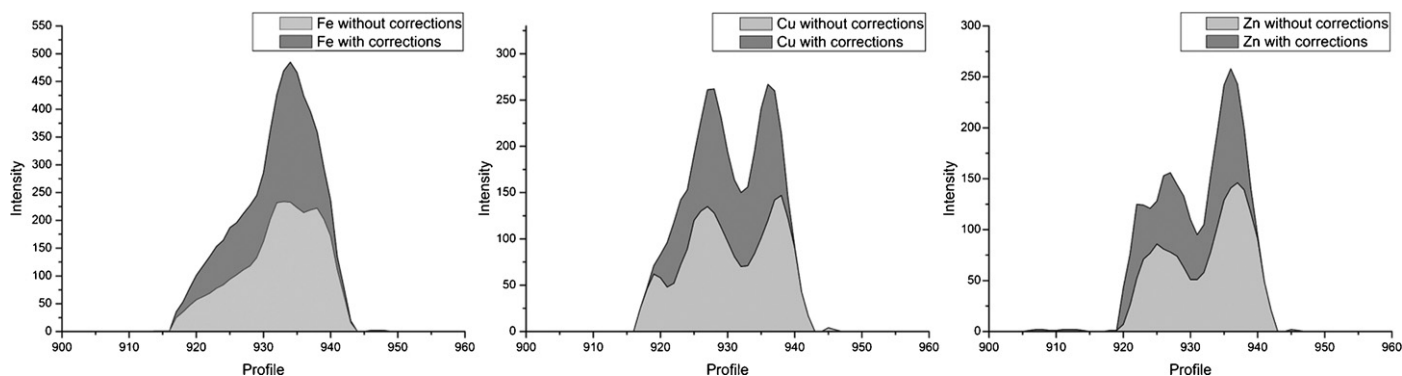


Fig. 5. Profiles of Fe, Cu and Zn images in the healthy breast tissue sample.

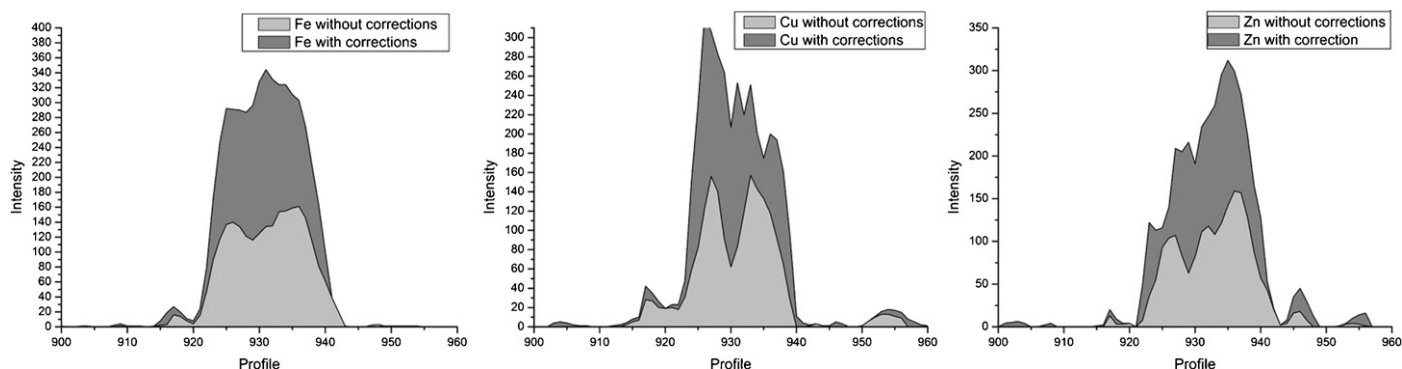


Fig. 6. Profiles of Fe, Cu and Zn images in the breast cancer sample.

Each single value in a projection is obtained by measuring the fluorescence radiation emitted by all pixels along the beam. The object is then rotated, and another projection is measured. Projections are obtained in steps of  $3^\circ$  until the object has completed  $180^\circ$ . The selected measuring time was 2 s for each scanned point.

The X-ray fluorescence microtomographies were performed on one sample of each type of human breast tissue (healthy breast tissue and breast cancer). The condition of the tissues was identified by the pathologist who made the samples available. The tissues for XRFCT were cut in cylindrical form with 1.5–2 mm thickness by 4–5 mm of height and were frozen dried before being analyzed.

In this work human breast tissues samples have been analyzed in order to determine the absorption distribution map and the elemental distribution map of iron, copper and zinc.

### 3. Results and discussions

All tomographies were reconstructed using a filtered-back projection algorithm and the XRFCT images also were reconstructed using Brunetti's algorithm [5].

Before the tissues tomographic measurements were initiated, the X-ray beam was centered on each tissue sample to determine the detectable trace elements. The measured X-ray fluorescence spectrum from the breast cancer is shown in Fig. 2.

The results of the transmission and fluorescence  $\mu$ CT in the two human breast tissue samples are shown in Figs. 3 and 4. The breast tissues samples are normal breast tissue and breast

cancer, respectively. The first column shows the X-ray transmission microtomography image and the others show the X-ray fluorescence microtomography images. While the first line shows the reconstructed images of Fe, Cu and Zn with the filter-back projection algorithm without absorption corrections, the second line shows the behavior of these elements using the filter-back projection algorithm with absorption corrections.

Analyzing the X-ray fluorescence images, it can be observed that the reconstructed images with absorption corrections and without absorption corrections have the same characteristics.

Figs. 5 and 6 show profiles of Fe, Cu and Zn images in healthy breast tissue and breast cancer, respectively. Analyzing the profiles, it can be observed a quantitative difference using the algorithm with absorption corrections and algorithm without absorption corrections.

The tomographic reconstruction of Fe, Cu and Zn showed in the healthy tissue and breast cancer sample reveals that the concentration of these metals is bigger in the tumor than in the healthy tissue for the same patient. It can be observed comparing the intensity of the distribution maps for each element.

The radial streak effects that can be visualized in tomographic reconstructions are because of the low counting statistic in each projection. The images were not processed.

### 4. Conclusions

XRFCT is a powerful technique that can be used to characterize some samples on bioscience and medicine.

Comparing the X-ray fluorescence images reconstructed with different algorithms, it can be observed that they have the same characteristics. But analyzing the profiles, it can be seen that there is a big difference in intensity between the algorithm without absorption corrections and the algorithm with absorption corrections.

The concentration of Fe, Cu and Zn is bigger in the tumor than in the healthy tissue for the same patient that can be seen analyzing the intensity of the distribution maps of these metals.

It will be necessary to measure more samples and quantify the difference in concentration in one sample and between normal and abnormal tissues to use the X-ray fluorescence microtomography as an analytic tool to analyze biological tissues.

The radial streak effects that can be visualized in tomographic reconstructions are because of the low counting statistic in each projection. The images were not processed.

The experimental set up at XRF-LNLS had showed to be very promising and this effort on implement the X-ray fluorescence microtomography was justified by the high quality of the images obtained.

#### Acknowledgements

This work was partially supported by Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Fundação

de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ) and LNLS (Project XRF-5827).

#### Conflict of interest

All authors declare that they have no conflicts of interest.

#### References

- [1] Rocha HS, Pereira GR, Anjos MJ, et al. Diffraction enhanced imaging and X-ray fluorescence microtomography for analyzing biological samples. *X-Ray Spectrom* 2007;36:247–53.
- [2] Wu T, Sempos CT, Freudenheim JL, et al. Serum iron, copper and zinc concentrations and risk of cancer mortality in US adults. *Ann Epidemiol* 2004;14:195–201.
- [3] Pereira GR, Conceição SC, Lopes RT, et al. Elemental distribution in breast tissue samples using X-ray fluorescence microtomography. *J Radioanal Nucl Chem* 2006;269:469–73.
- [4] Brown G, Moncton DE. *Handbook on synchrotron radiation*, vol. 3. Elsevier Science Publishers; 1991. p. 129–39.
- [5] Brunetti A, Golosio B. Software for X-ray fluorescence and scattering tomographic reconstruction. *Comput Phys Commun* 2001;141:412–25.
- [6] Peponi G, Strelis C, Wobruschek P, Zamini S, Zöger N, Falkenberg G. Comparison of synchrotron radiation total reflection X-ray fluorescence excitation–detection geometries for samples with differing matrices. *Spectrochim Acta B* 2003;58:2139–44.



# X-Ray fluorescence microtomography under various excitation conditions<sup>†</sup>

G. R. Pereira,<sup>a\*</sup> H. S. Rocha,<sup>a</sup> C. Calza,<sup>a</sup> M. J. Anjos,<sup>b</sup> C. A. Pérez<sup>c</sup> and R. T. Lopes<sup>a</sup>

The main goal of this work is two-fold: (1) to compare three different excitation conditions in x-ray fluorescence microtomography (XRFT) in the analysis of reference samples, and (2) to determine the elemental distribution map for breast tissue samples, in order to verify concentrations of certain elements correlated with characteristics and pathology, using x-ray transmission microtomography (CT).

The experiments were performed at the X-Ray Fluorescence Facility (D09B-XRF) of the Brazilian Synchrotron Light Laboratory (LNLS), Campinas, Brazil. In this work, a multilayer monochromator with photon energies near 12 keV, a monochromatic beam at 9.8 keV using a Si (111) crystal, and the white beam were used for elements excitation of elements inside the sample. The sample was placed on a high-precision goniometer and translation stages, which allowed for rotation as well as translation perpendicular to the beam. Fluorescence photons were collected by means of an energy dispersive HPGe detector placed at 90° to the incident beam, while transmitted photons were detected with a fast Na(Tl) scintillation counter, placed behind the sample, in the direction of the incoming beam. Transmission CT images were reconstructed using a filtered back-projection algorithm, and XRFT images were reconstructed using a filtered back-projection algorithm with absorption correction. Copyright © 2009 John Wiley & Sons, Ltd.

## General Introduction

X-ray fluorescence analysis is a microanalysis technique generally applied in several fields of research, for instance, chemistry, medicine, biology, and archaeology among others.<sup>[1–3]</sup> In this work, x-ray fluorescence, combined with tomographic techniques, is used to analyze reference samples and biological samples.

The main advantage of x-ray fluorescence microtomography (XRFT) is that it is a nondestructive technique. Following analysis using this technique, samples may be analyzed with others techniques, such as x-ray diffraction.<sup>[4]</sup> In addition, in contrast to micro XRF analysis, XRFT does not require sample preparation, such as planar mode. Micro XRF requires that samples be embedded/fixated in paraffin, in order to achieve ultra fine accurate slices (of approximately 15 microns). XRFT, on the other hand, does not require this sort of sample preparation; it is not necessary to cut the sample to analyze the tomographic plane.

X-ray transmission computed tomography is a well established diagnostic technique in medicine. It is nondestructive and allows for the reconstruction of cross-section images of samples from sets of 'radiographic' measurements taken at different angles. This technique is performed by aligning an x-ray source and an x-ray detector at opposite sides of a sample. The detector records the portion of the radiation, emitted by the x-ray source, which crosses the sample without interacting with it. The reconstructed image represents a map of the cross section in terms of the linear attenuation coefficient of the material, which is a function of the mean atomic number (Z) and/or density in each single volume element (voxel).

X-ray fluorescence tomography is based on the detection of fluorescence emissions from elements in samples. These photons are collected with an energy dispersive detector, which is placed at 90° from the incident beam. A value in a projection is obtained by measuring the fluorescence radiation emitted by all pixels along the beam. The sample is translated, and another value is measured

in the projection. These steps are repeated until the whole sample passes through the beam, completing the projection. The sample is rotated, and another projection is measured. The projections are measured until the sample has been rotated 180°.<sup>[5–9]</sup>

Data acquisition of x-ray fluorescence microtomography results in bidimensional image representations, called sinograms. A sinogram consists of line scans taken at every rotational angle. For each emission line of the fluorescence spectrum, there is a separate sinogram. In general, a sinogram plots the property measured by the setup over the direction perpendicular to the beam and the angle of rotation. The tomogram, which is a two-dimensional slice across the sample, can be reconstructed from the sinogram by applying the appropriate algorithm.

X-ray transmission and x-ray fluorescence images were reconstructed using an inhouse program, developed using MATLAB, applying a filtered back-projection algorithm. Matrix absorption corrections were obtained using MKCORR, a program developed by Brunetti and Golosio.<sup>[8]</sup>

An increase in the mortality rate in Brazil due to cancer was a decisive factor in the choice of investigated samples. In recent

\* Correspondence to: G. R. Pereira, Nuclear Instrumentation Laboratory (LIN), COPPE, UFRJ, P.O. Box 68509, 21941-972 Rio de Janeiro, Brazil. E-mail: gabriela@lin.ufrj.br

† Article presented as part of a collection of papers from the European Conference on X-Ray Spectrometry (EXRS 2008). Cavtat, Dubrovnik, Croatia, 16–20 June 2008.

a Nuclear Instrumentation Laboratory (LIN), COPPE, UFRJ, P.O. Box 68509, 21941-972 Rio de Janeiro, Brazil

b Physics Institute - UERJ, Rio de Janeiro, Brazil

c Brazilian Synchrotron Light Laboratory, Campinas, São Paulo, Brazil

years, there has been growing interest in understanding the exact role played by trace elements in several diseases.<sup>[10–12]</sup> Information on the biological function of certain metal ions, in conjunction with data from an investigation on element distribution patterns in malignant and normal human tissues of cancer patients, provides some indication of the effect of metal ions on carcinogenesis.<sup>[13]</sup> Both excess and deficiency of trace elements have been associated with many diseases, including cancer. Although extensive work has been carried out to discover an association between trace elements and cancer, and to understand the mechanisms involved in carcinogenesis, no definite conclusions have been drawn so far.<sup>[4]</sup>

This paper presents the development of a setup to study x-ray fluorescence microtomography of reference samples, polyethylene filled with a standard solution, and of breast tissue samples, at the XRF facility at the Synchrotron Light Laboratory (LNLS), Campinas, Brazil.

## Methods

This work presents the development of a system to study fluorescence microtomography at the X-Ray Fluorescence Facility (D09B-XRF) at the Brazilian LNLS, Campinas, Brazil. A white beam (4–23 keV), a monochromatic beam produced by a Si (111) monochromator at 9.8 keV, and a quasimonochromatic beam, produced by a multilayer monochromator at 12 keV,  $\Delta E/E = 0.03$  collimated to a  $200 \times 200 \mu\text{m}^2$  area with a set of slits, were used for sample excitation. The crystal multilayer monochromator consists of a 75 d-periods of W/C layers.

The intensity of the incident beam was monitored with an ionization chamber placed before the sample. A schematic of the experimental setup for x-ray fluorescence microtomography, using the multilayer monochromator crystal, is shown in Fig. 1. The setup using a white beam is the same as the one portrayed in Fig. 1, without the multilayer crystal. In order to obtain the monochromatic setup, we changed the multilayer sample by the Si (111) monochromator.

The sample was placed on a high-precision goniometer and translation stages, which, respectively, allow rotation as well as translation perpendicular to the beam. X-ray fluorescence intensity was collected with an energy dispersive HPGe detector (CANBERRA Industries inc.), placed at  $90^\circ$  to the incident beam. This geometry reduces elastic and Compton x-ray scattering from the sample, due to a high degree of linear polarization of the incoming beam at

the storage ring plane, thus improving the signal-to-background ratio for trace element detection<sup>[14]</sup>. The transmitted intensity was detected with a fast NaI (TI) scintillation counter (CYBERSTAR-Oxford anfyfik), placed behind the sample, parallel to the beam. This geometry reduces elastic and Compton x-ray scattering from the sample, due to a high degree of linear polarization of the incoming beam at the storage ring plane, thus improving the signal-to-background ratio for trace element detection.<sup>[14]</sup>

The quality of the reconstruction appears as a compromise between the measuring time required for an acceptable counting statistic of x-ray fluorescence peaks and the step size required to linearly move and rotate the samples. In one projection, samples were positioned in steps of  $200 \mu\text{m}$  (actual beam size) perpendicular to the beam, covering the whole transversal section of the sample proof. The number of translations was about 20, depending on the sample.

Each single value in a projection is obtained by measuring the fluorescence radiation emitted by all pixels along the beam. The object is then rotated, and another projection is measured. Projections were obtained in  $3^\circ$  steps, until the object had rotated a full  $180^\circ$ . The number of rotations was 60. The selected measuring time was 10 s for each scanned point.

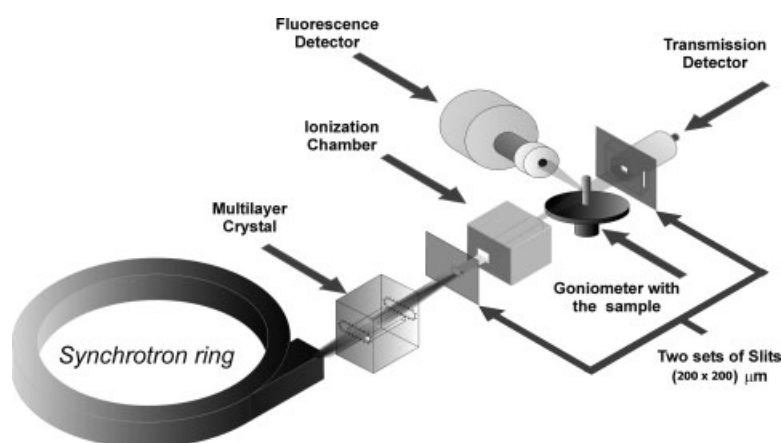
A reference sample, made of polyethylene filled with a standard solution of copper, was first analyzed and used as a test sample. Specifically, the sample was comprised of a polyethylene cylinder 2 mm on diameter, containing an internal cylinder 1 mm in diameter filled with a standard solution of copper, 100 ppm.

As a second part of the experiments, x-ray fluorescence microtomographies were performed on human breast tissue samples. Malignant breast tumor (ductal carcinoma) and healthy tissues were analyzed. The component tissues were identified by the pathologist who made the samples available. The tissues, of 1–2 mm thickness, were frozen and dried prior to analysis.

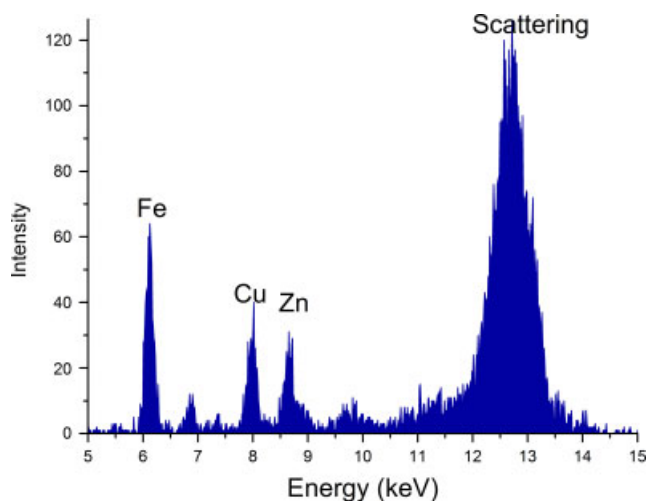
## Results and Discussions

Before tomographic measurements on the tissues were initiated, the x-ray beam was centered on each tissue sample, in order to determine the detectable trace elements. The selected measuring time was 180 s. A measured fluorescence spectrum from breast cancer tissue is shown in Fig. 2.

Results for the reference samples made of polyethylene, using a white beam, a monochromatic beam at 9.8 keV, and a



**Figure 1.** The experimental arrangement for an x-ray fluorescence microtomography measurement using a quasimonochromatic beam.

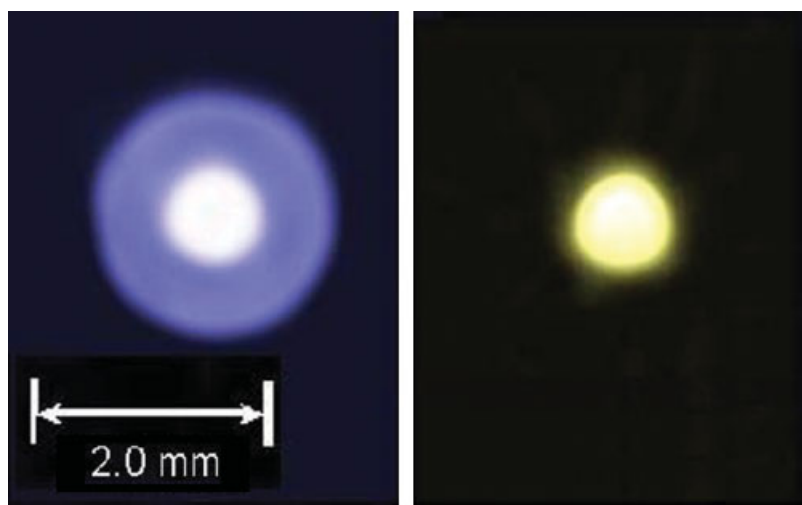


**Figure 2.** An x-ray fluorescence spectrum from the breast cancer tissue sample.

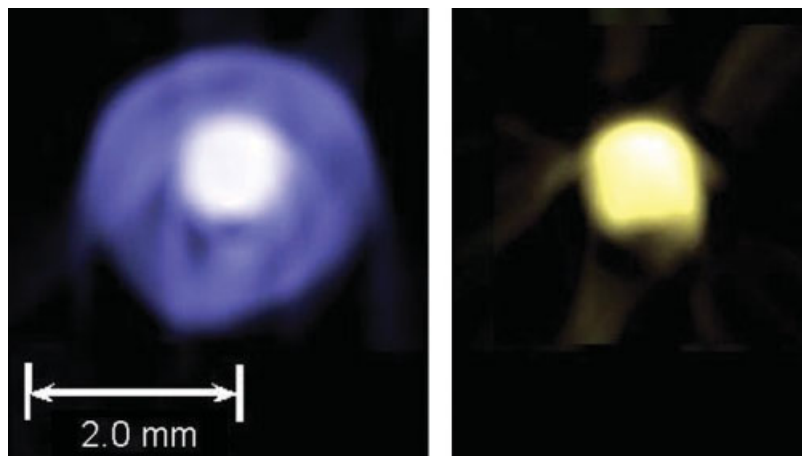
quasimonochromatic beam at 12 keV, are shown in Figs 3, 4, and 5, respectively.

In the figures, the image on the left shows x-ray transmission microtomography and that on the right shows x-ray fluorescence microtomography of copper, reconstructed with a filtered back-projection algorithm without absorption correction. Analysis reveals that the transmission images show the polyethylene matrix and the internal cylinder, while the fluorescence images show only those regions where the elements of interest (copper) were localized. These tomographies show the viability of fluorescence microtomography and confirm that this technique can be used to complement other techniques for sample characterization.

Analyzing the test sample images, it can be observed that the images have the same characteristics. Using a white beam, images are obtained with superior statistical values, fewer radial artifacts, and within shorter acquisition times, in comparison with the other beam excitation modes. However, it is not possible to calculate the exact value of the absorption coefficient of the sample using a white beam. This value is essential to the calculation of matrix absorption corrections and to the measurement of element concentrations inside the sample. The main advantage of analyzing with a monochromatic beam or a quasimonochromatic

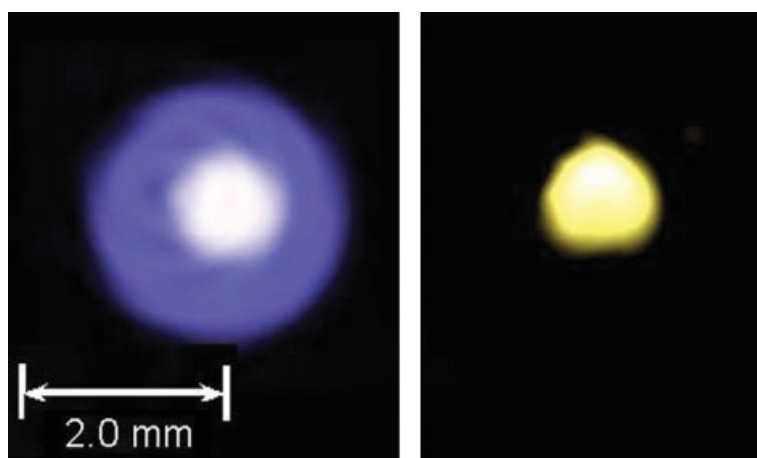


**Figure 3.** Tomographic images using a white beam (left: Transmission microtomography; right: X-ray fluorescence microtomography of Cu).

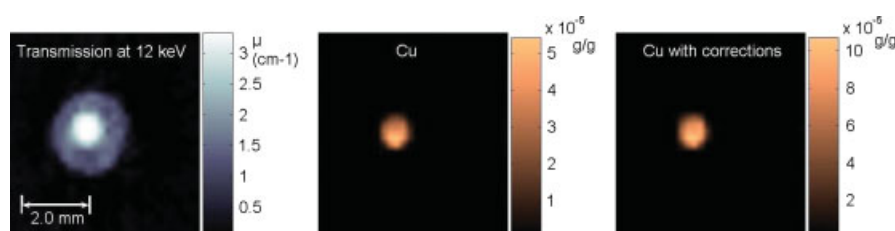


**Figure 4.** Tomographic images using a monochromatic beam at 9.8 keV (left: Transmission microtomography; right: X-ray fluorescence microtomography of Cu).





**Figure 5.** Tomographic images using a quasimonochromatic beam at 12 keV (left: Transmission microtomography; right: X-ray fluorescence microtomography of Cu).



**Figure 6.** Tomographic images using a quasimonochromatic beam at 12 keV (left: Transmission microtomography; middle: X-ray fluorescence microtomography of Cu without absorption corrections; right: X-ray fluorescence microtomography of Cu with absorption correction).

beam is the possibility of determining attenuation coefficients for fluorescence energy and beam energy. Moreover, with these coefficients it is possible to make absorption corrections and accurately determine concentrations at each point of the sample. The advantage of the quasimonochromatic beam at 12 keV over the monochromatic beam at 9.8 keV is higher photon flux. In comparison with the monochromatic beam at 9.8 keV, images using a quasimonochromatic beam at 12 keV are obtained with better statistical values, fewer radial artifacts, and within shorter measuring times. Analysis of test sample images reveals that, although the images have the same characteristics, they do have differences. Figure 4 shows a less homogeneous structure because of the artifacts; this image was obtained using a monochromatic beam at 9.8 keV. In Fig. 5, the less spherical Cu distribution is because the polyethylene samples are not exactly cylindrical; there was some difficulty in the fabrication of the samples.

Radial streak effects visualized in tomographic reconstructions are due to low counting statistics in each projection. The images were not processed.

The result for the reference sample reconstructed with a filtered back-projection algorithm, with absorption correction, is shown in Fig. 6. On the left, Fig. 6 portrays x-ray transmission microtomography, and in the middle and on the right side, it shows x-ray fluorescence microtomography of copper without, and with, absorption correction, respectively. Upon first sight, it is extremely difficult to attest to the influence of absorption correction. However, upon analyzing the concentrations, it is possible to confirm that the influence is significant. It can be verified that there is a considerable difference in concentrations between images reconstructed with absorption correction and those without absorption correction, even if the sample is

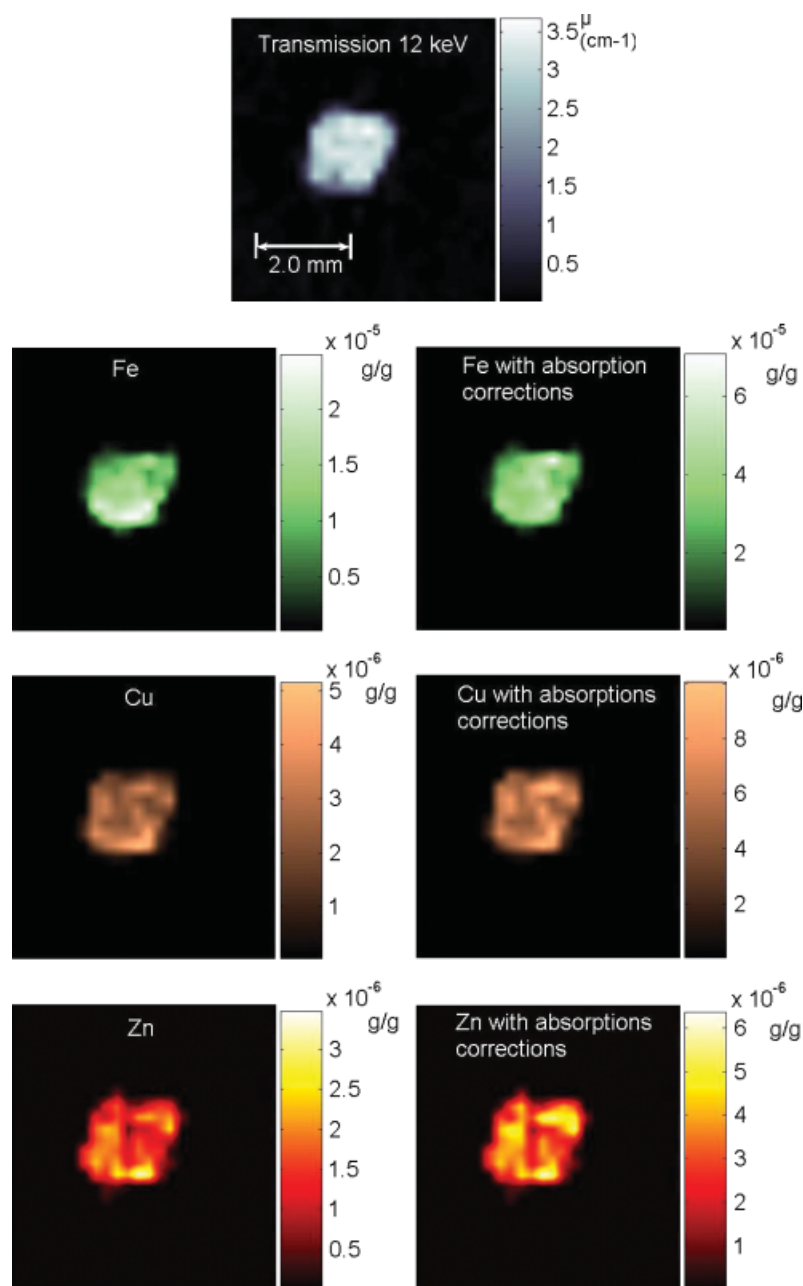
small. X-ray fluorescence microtomography, reconstructed with absorption correction, shows a mean value of concentration of about 100 ppm, whereas x-ray fluorescence microtomography, reconstructed without absorption correction, shows a mean value of only about 40 ppm, which is 60% less than the real value.

X-ray fluorescence microtomographies were performed on human breast tissue samples. Malignant breast tumor (ductal carcinoma) and healthy tissues from the same patient were analyzed. The pathologist who made the samples available identified the component tissues. The tissues were cut into cylinders 1.5–2.0 mm thick and 4.0–5.0 mm high, and frozen and dried prior to analysis.

Results for a breast tissue samples are portrayed in Figs 7 and 8. Figure 7 shows the results for the breast cancer sample, while Fig. 8 shows the results for the healthy tissue. Figure 8 reveals that there is a lower concentration of zinc in the healthy tissue sample, and that the distribution is not homogenous; there are many regions without zinc.

Analysis of the breast tissue images reveals that both samples have a higher concentration of iron than copper and zinc for this patient. However, the concentration of iron is higher in the cancer sample than in the healthy sample. The mean concentration of iron is about 30 μg/g. Comparing the mean value for healthy tissue with the mean value for cancer tissue from the same patient reveals that the mean value for iron is 40% greater in the cancer sample whereas there is no significant difference for copper.

Although trace elements Fe, Cu, and Zn are extremely common, assessment of their amounts is crucial for disease diagnostics. Both excess and deficiency of trace elements have been associated with many diseases including cancer. This knowledge begs further research, including analysis and quantification of element



**Figure 7.** X-ray fluorescence and transmission microtomography of the breast cancer tissue sample reconstructed with back-projection algorithm with absorption corrections.

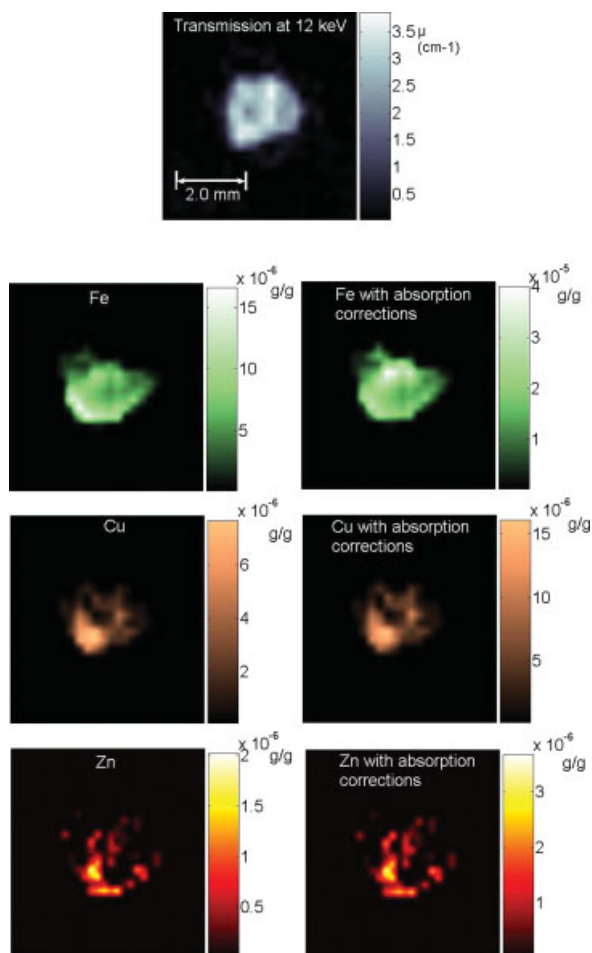
concentrations in more samples, and analysis and comparison of biological tissues (both normal and abnormal) by means of x-ray fluorescence microtomography. Pathologist–oncologist cooperation would be most advantageous for future research in this area.

## Conclusion

Analysis of images of reference samples reveals that the images have the same characteristics. The advantage of the quasi-monochromatic beam at 12 keV is higher photon flux than that of the monochromatic beam at 9.8 keV. Using a quasimonochromatic beam at 12 keV, an image with superior statistical value, fewer

radial artifacts, and within a shorter measuring time is obtained, in comparison with using the monochromatic beam at 9.8 keV.

X-ray fluorescence microtomography of breast tissue samples allowed for visualization of elemental distributions of iron, copper, and zinc. Moreover, it was verified that the use of an algorithm with absorption correction is essential to the acquisition of corrected concentration values. Analysis of the biological samples utilized led to the discovery of higher concentrations of iron and zinc in the cancerous sample than in the healthy sample. This knowledge begs further research including analysis and quantification of element concentrations in more samples and analysis and comparison of biological tissues (both normal and abnormal) by means of x-ray fluorescence microtomography.



**Figure 8.** X-ray fluorescence and transmission microtomography of the healthy breast tissue sample reconstructed with back-projection algorithm with absorption corrections.

The superior definition of interfaces in x-ray fluorescence images was striking; furthermore, spatial resolution of the system can be optimized as a function of the application. For this work, a spatial resolution of 200  $\mu\text{m}$  was used. However, using capillary optics,

a spatial resolution of up to 20  $\mu\text{m}$  is possible to achieve. The experimental setup at XRF-LNLS proved promising. The efforts to implement x-ray fluorescence microtomography, as outlined in this paper, were justified by the high quality of images obtained.

### Acknowledgements

This work was partially supported by the National Council for Scientific and Technological Development (CNPq), the Rio de Janeiro State Research Foundation (FAPERJ). This work has been supported by the Brazilian Synchrotron Light Laboratory (LNLS) under proposal D09B–XRF-7049.

### References

- [1] C. Calza, M. J. Anjos, M. I. M. S. Bueno, S. M. F. Mendonça de Souza, A. Brancaglion Jr, T. A. Lima, R. T. Lopes, *X-Ray Spectrom.* **2007**, *36*, 348.
- [2] M. J. Farquarson, K. Geraki, *X-Ray Spectrom.* **2004**, *33*, 240.
- [3] J. Chwiej, M. Szczerbowska-Boruchowska, M. Lankosz, S. Wojcik, G. Falkenberg, Z. Stegowski, Z. Setkowicz, *Spectrochim. Acta, Part B* **2005**, *60*, 1531.
- [4] H. S. Rocha, G. R. Pereira, M. J. Anjos, P. Faria, G. Kellerman, C. A. Pérez, G. Tiraio, I. Mazzaro, C. Giles, R. T. Lopes, *X-Ray Spectrom.* **2007**, *36*, 247.
- [5] R. Cesareo, S. Mascarenhas, *Nucl. Instrum. Methods A* **1989**, *277*, 669.
- [6] J. P. Hogan, R. A. Gonsalves, A. S. Krieger, *IEEE Trans. Nucl. Sci.* **1991**, *38*, 1721.
- [7] G. R. Pereira, S. C. Conceição, R. T. Lopes, M. J. Anjos, L. F. Oliveira, H. S. Rocha, C. A. Pérez, *J. Radioanal. Nucl. Chem.* **2006**, *269*, 469.
- [8] A. Brunetti, B. Golosio, *Comput. Phys. Commun.* **2001**, *141*, 412.
- [9] G. R. Pereira, R. T. Lopes, M. J. Anjos, H. S. Rocha, C. A. Pérez, *Nucl. Instrum. Methods A* **2007**, *579*, 322.
- [10] A. Kubala-Kukús, D. Banás, J. Braziewicz, S. Gózdź, U. Majewska, M. Pajek, *Spectrochim. Acta, Part B* **2007**, *62*, 695.
- [11] W. M. Kwiatek, A. Banás, K. Banás, G. Cinque, G. Dyduch, G. Falkenberg, A. Kisiel, A. Marcelli, M. Podgórczyk, *Spectrochim. Acta, Part B* **2007**, *62*, 707.
- [12] T. Magalhães, A. Von Bohlen, M. L. Carvalho, M. Becker, *Spectrochim. Acta, Part B* **2006**, *61*, 1185.
- [13] G. J. Naga Raju, P. Sarita, M. Ravi Kumar, G. A. V. Ramana Murty, B. Seetharami Reddy, S. Lakshminarayana, V. Vijayan, P. V. B. Rama Lakshmi, Gavarasana Satyanarayana, S. Bhuloka Reddy, *Nucl. Instrum. Methods B* **2006**, *247*, 361.
- [14] M. Naghedolfeizi, J.-S. Chung, R. Morris, G. E. Ice, W. B. Yun, Z. Cai, B. Lai, *J. Nucl. Mater.* **2003**, *312*, 146.

# Imaging System for XRF Microtomography at LNLs-Brazil

Gabriela R. Pereira, Henrique S. Rocha, Cristiane Calza, Marcelino J. Anjos, Carlos A. Pérez, and Ricardo T. Lopes

**Abstract**—An X-ray Transmission Microtomography (CT) system combined with an X-ray Fluorescence Microtomography (XRFCT) system was implemented in the Brazilian Synchrotron Light Laboratory (LNLs), Campinas, Brazil. The main of this work is to determine the elemental distribution map in reference samples and breast tissue samples in order to verify the concentration of some elements correlated with characteristics and pathology of each tissue observed by the transmission CT. The experiments were performed at the X-Ray Fluorescence beamline (D09B-XRF) of the Brazilian Synchrotron Light Laboratory, Campinas, Brazil. A quasi-monochromatic beam produced by a multilayer monochromator was used as an incident beam. The sample was placed on a high precision goniometer and translation stages that allow rotating as well as translating it perpendicularly to the beam. The fluorescence photons were collected with an energy dispersive HPGc detector placed at 90° to the incident beam, while transmitted photons were detected with a fast Na(Tl) scintillation counter placed behind the sample on the beam direction. The CT images were reconstructed using a filtered-back projection algorithm and the XRFCT were reconstructed using a filtered-back projection algorithm with absorption corrections.

**Index Terms**—Biological tissues, fluorescence, synchrotron radiation, tomography.

## I. INTRODUCTION

**I**N X-Ray fluorescence microtomography (XRFCT) an X-ray beam is used for the excitation of the elements inside of the sample and the fluorescence from one or more elements is measured [1]. At each projection angle the line integral of the fluorescence along the beam inside the sample is measured. A single tomographic slice is collected by translating and rotating the sample on a 2-D grid [2]. The spatial resolution of this technique is limited only by the size of the focused X-ray beam, which can be less than 1 micrometer. The data acquisition of the X-ray fluorescence microtomography results in a bi-dimensional raw data called sinogram. A sinogram consists of the line scans that were taken for every rotational angle. For each

emission line of the fluorescence spectrum there is a separate sinogram. In general, a sinogram plots the property measured by the setup over the direction perpendicular to the beam and the angle of rotation. The tomogram which is a two dimensional slice across the sample can be reconstructed from the sinogram by an appropriate algorithm. A significant requirement of the method is that the absorption of the fluorescence X-rays within the sample must be small. The elements that can be measured are therefore a strong function of the bulk composition and size of the sample.

In this work, it uses a new generation of X-ray optical components to obtain a quasi-monochromatic beam at 12 keV. Sometimes referred to as layered synthetic microstructures (LSM) or simply as multilayers, these optical components consist of layered depositions of materials A and B, having a significant difference in their indices of refraction. Most commonly,  $n$  layer pairs are fabricated to form a structure of uniform period by depositing alternating thin layers on top of smooth substrate. Material A is low-Z material such as carbon or silicon and B is a high-Z material such as tungsten or platinum. The efficiency of diffraction can be as high as 50 to 80% over bandwidths  $\Delta E/E$  of 0.005 to 0.1, making feasible a new class of high-power, large bandwidth X-ray optics [3].

The choice for analyzing breast tissue samples was accomplished with the world tendency to find diagnostic techniques for cancer. The breast cancer warrants attention because breast cancer is the most common cancer and the leading cause of cancer related deaths in women throughout the world.

In recent years, there has been growing interest in understanding the exact role played by trace elements in several diseases. The biological function of some metal ions in combination with an investigation of element distribution patterns in malignant and in normal human tissues of cancer patients can give some indication of the effect of metal ions on carcinogenesis [4]. Both excess and deficiency of trace elements have been associated with many diseases including cancer. Even though extensive work has been carried out to find an association between trace elements and cancer, and to understand the mechanisms involved in carcinogenesis, no definite conclusions are drawn so far [5].

In this work reference samples and breast tissue samples have been analyzed to verify the concentration of some elements correlated with characteristics and pathology of each tissue observed by X-ray transmission microtomography (CT).

## II. EXPERIMENT

This work presents a development of a system to study fluorescence microtomography at the X-Ray Fluorescence Facility

Manuscript received June 05, 2008; revised nulldate. Current version published June 17, 2009. This work was supported in part by the National Council for Scientific and Technological Development (CNPq), Rio de Janeiro State Research Foundation (FAPERJ) and Brazilian Synchrotron Light Laboratory (LNLs).

G. R. Pereira, H. S. Rocha, C. Calza, and R. T. Lopes are with Nuclear Instrumentation Laboratory—COPPE/UFRJ C.P. 68509, Ilha do Fundão, 21941-972 Rio de Janeiro, RJ, Brazil (e-mail: ricardo@lin.ufrj.br).

M. J. Anjos is with Physics Institute—UERJ, Rio de Janeiro, RJ, Brazil.

C. A. Pérez is with Brazilian Synchrotron Light Laboratory—Campinas, SP, Brazil.

Color versions of one or more of the figures in this paper are available online at <http://ieeexplore.ieee.org>.

Digital Object Identifier 10.1109/TNS.2008.2010938

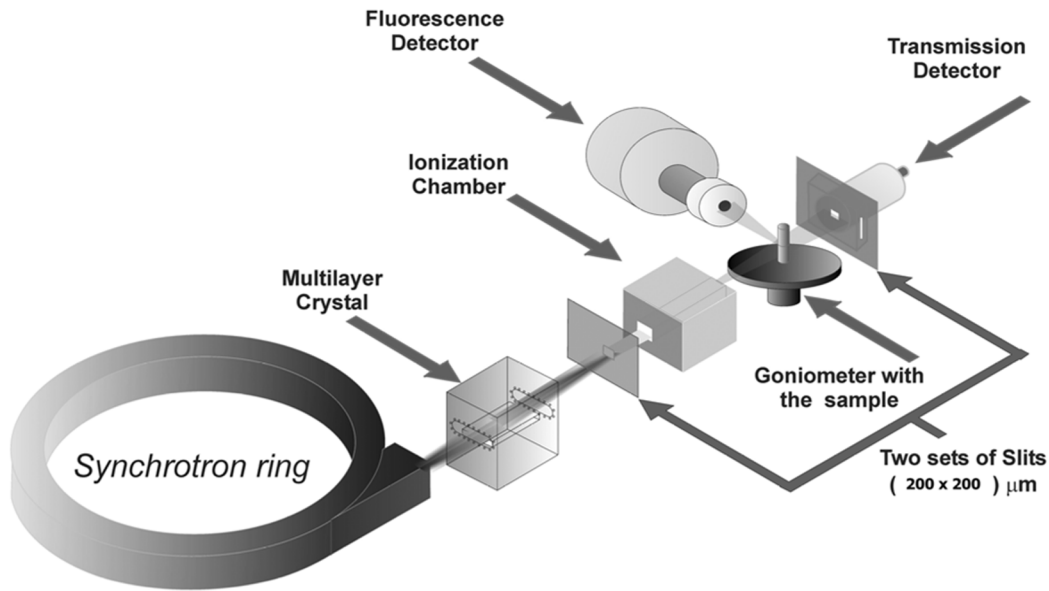


Fig. 1. The experimental arrangement for an X-ray fluorescence microtomography measurement.

(D09B-XRF) at the Brazilian Synchrotron Light Laboratory (LNLS), Campinas, Brazil. A quasi-monochromatic beam produced by a multilayer monochromator at 12 keV,  $\Delta E/E = 0.03$  collimated to a  $200 \mu\text{m} \times 200 \mu\text{m}$  area with a set of slits, was used to sample excitation. The crystal monochromator is made of W-C and it has 75 layer pairs.

The intensity of the incident beam was monitored with an ionization chamber placed in front of it, before the sample. A schematic of the experimental setup for an X-ray fluorescence microtomography using a multilayer monochromatic beam is shown in Fig. 1.

The sample was placed on a high precision goniometer and translation stages that allow rotating as well as translating it perpendicularly to the beam. The fluorescence photons were collected with an energy dispersive HPGc detector (CANNBERA Industries inc.) placed at  $90^\circ$  to the incident beam, while transmitted photons were detected with a fast NaI (TI) scintillation counter (CYBERSTAR-Oxford anfyisk) placed behind the sample on the beam direction. This detector geometry allows reducing the elastic and Compton X-ray scattering from the sample due to the high linear polarization of the incoming beam in the plane of the storage ring, thus improving the signal to background ratio for the detection of trace elements [1].

The quality of the reconstruction is a compromise between the measuring time required for an acceptable counting statistic of the X-ray fluorescence peaks and the step size necessary to linearly move and rotate the samples. In one projection, samples were positioned in steps of  $200 \mu\text{m}$  (actual beam size) perpendicularly to the beam direction covering the whole transversal section of the sample proof.

Each single value in a projection is obtained by measuring the fluorescence radiation emitted by all pixels along the beam. The object is then rotated, and another projection is measured. Projections are obtained in steps of  $3^\circ$  until the object has completed  $180^\circ$ . The selected measuring time was 5 s for each scanned point.

A reference sample made of polyethylene filled with a standard solution of copper was first analyzed and used as a test sample. The test sample is made of a polyethylene cylinder with two millimeters diameter with an internal cylinder with one millimeter diameter filled a standard solution of copper 100 parts per million (100 ppm)[2].

As a second part of the experiments, X-ray fluorescence microtomographies were performed on human breast samples. The component tissues were identified by the pathologist who made the sample available. The tissues have 1.5 to 2 mm thickness and were frozen and dried before being analyzed.

The X-ray transmission images were reconstructed using a filtered-back projection algorithm and the X-ray fluorescence tomography images were reconstructed using a filtered-back projection algorithm with absorption corrections.

### III. RESULTS AND DISCUSSIONS

Before the tissues tomographic measurements were initiated, the X-ray beam was centered on each tissue sample to determine the detectable trace elements. A measured fluorescence spectrum from a breast cancer is shown in Fig. 2.

The result for the test sample made of polyethylene is shown in Fig. 3–5.

The image in Fig. 3 shows the X-ray transmission microtomography, while Figs. 4 and 5 show the X-ray fluorescence microtomography of copper without absorption corrections and with absorption corrections, respectively. It can be observed analyzing the images that while the X-ray transmission tomography shows the polyethylene matrix and the internal cylinder with copper solution, the X-ray fluorescence tomographies show only those regions where the elements of interest were localized, in this case copper. Comparing now, the X-ray fluorescence images, it can be verified that there is a bigger difference between reconstructed images with absorption corrections and without absorption corrections even if the sample is small.

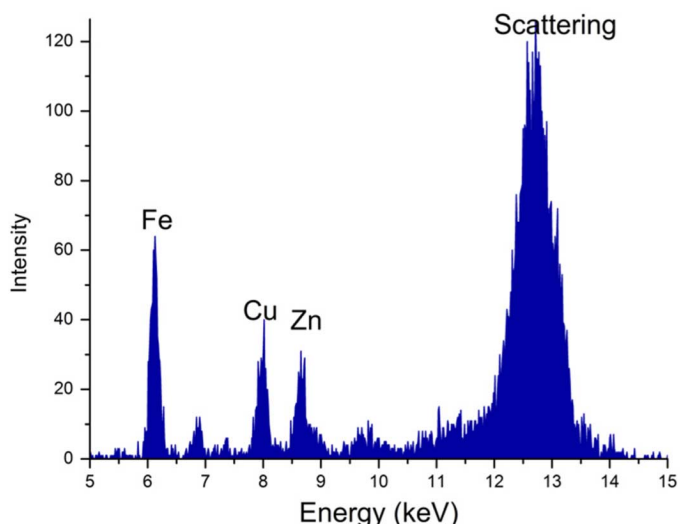


Fig. 2. An X-ray fluorescence spectrum from the breast cancer sample.

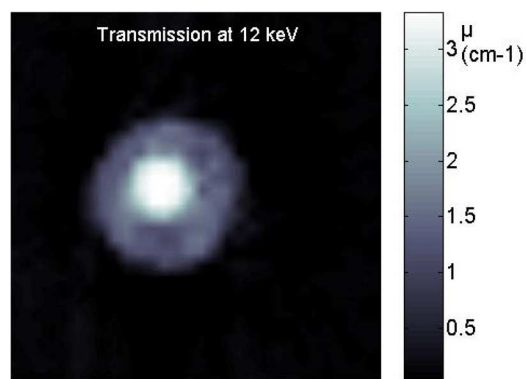


Fig. 3. X-ray transmission microtomography of the reference sample made of polyethylene filled with a standard solution of copper.

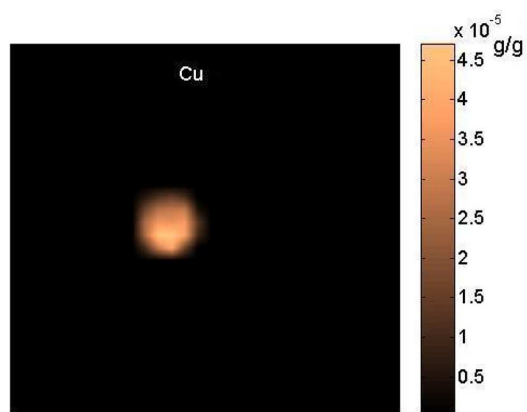


Fig. 4. X-ray fluorescence microtomography of the reference sample made of polyethylene filled with a standard solution of copper (100 ppm) reconstructed with back-projection algorithm without absorption corrections.

It is important to verify that only the XRFCT reconstructed with absorption corrections shows the corrected concentration about 100 ppm. The XRFCT reconstructed without absorption corrections shows a mean value about 40 ppm, that is sixty percent less than the real value.

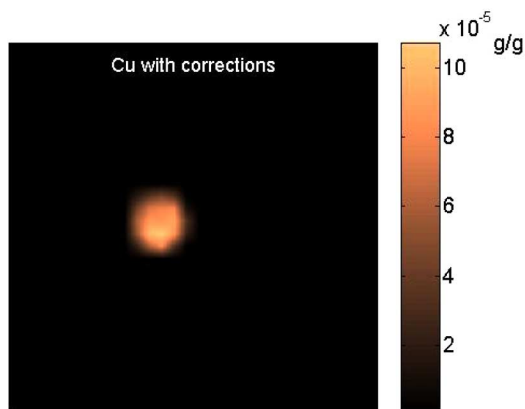


Fig. 5. X-ray fluorescence microtomography of the reference sample made of polyethylene filled with a standard solution of copper (100 ppm) reconstructed with back-projection algorithm with absorption corrections.

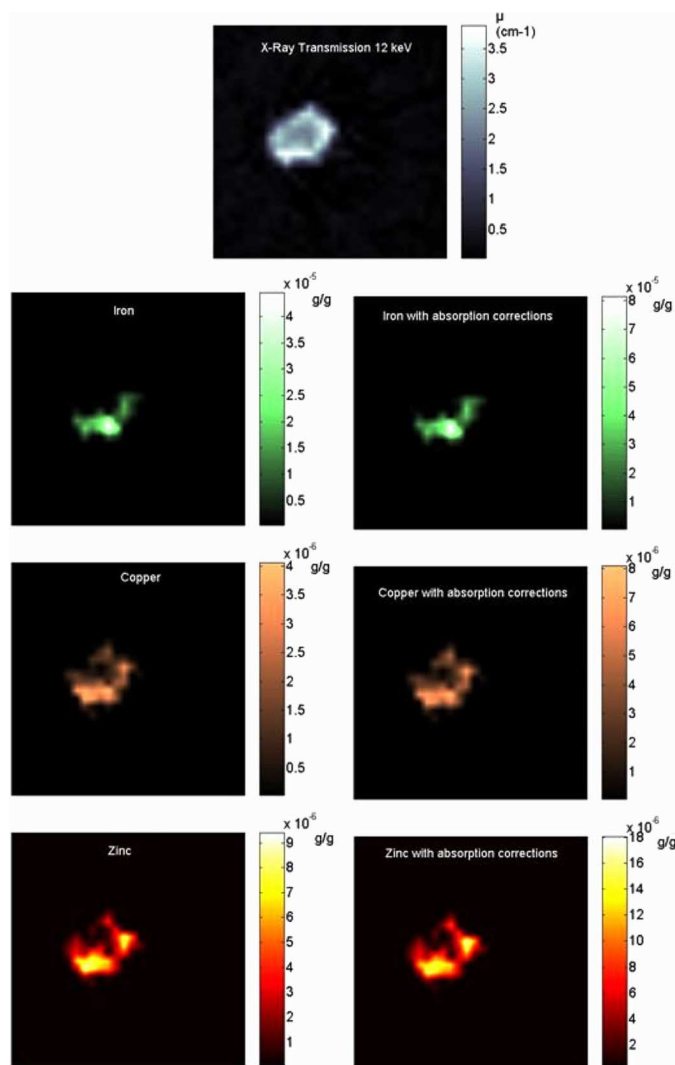


Fig. 6. X-ray fluorescence and transmission microtomography of the breast cancer sample reconstructed with back-projection algorithm with absorption corrections.

X-ray fluorescence microtomographies were performed on human breast tissue samples. Malignant breast tumor (ductal



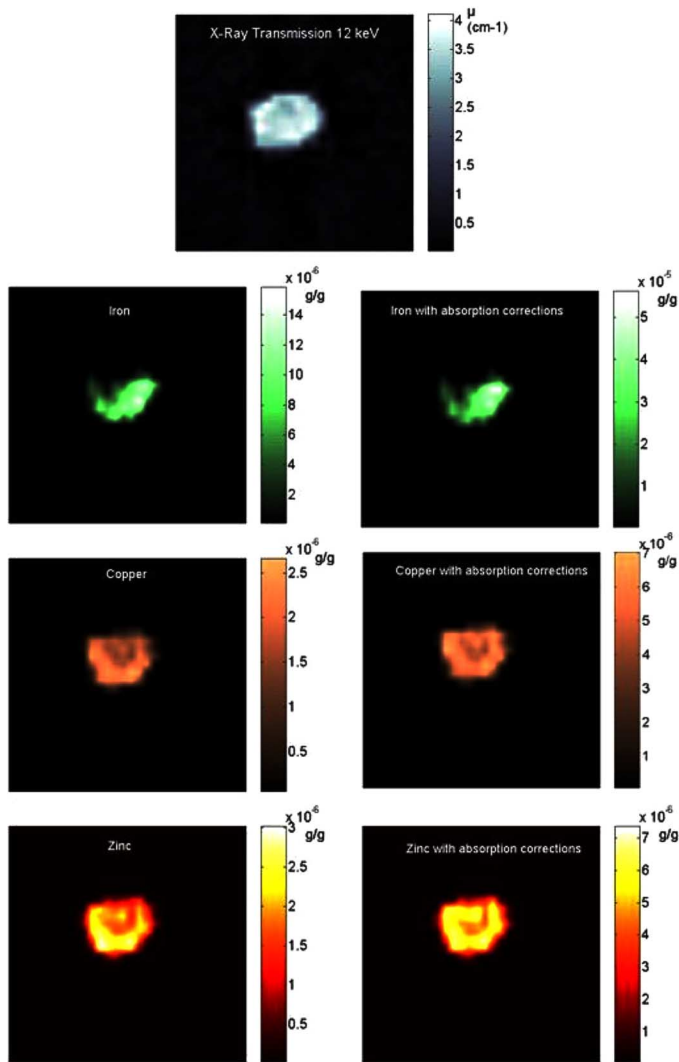


Fig. 7. X-ray fluorescence and transmission microtomography of the healthy breast sample reconstructed with back-projection algorithm with absorption corrections.

carcinoma) and healthy tissues were analyzed for the same patient. The component tissues were identified by the pathologist who made the sample available. The tissues were cut in cylindrical form with 1.5 mm to 2.0 mm thickness by 4.0 mm to 5.0 mm of height and were frozen and dried before being analyzed.

The result for a breast samples are shown in Figs. 6 and 7. Fig. 6 shows the results for breast cancer sample while Fig. 7 shows the results for healthy tissue.

Analyzing the images, it can be observed that the two samples have a bigger concentration of iron comparing with the concentration of copper and zinc and for this patient, the concentration of iron and zinc is bigger in the cancer sample than in the healthy sample.

The mean concentration of iron is about  $50 \mu\text{g/g}$ , for copper the mean concentration is about  $6 \mu\text{g/g}$  and for zinc is about

$7 \mu\text{g/g}$  in healthy tissue. Comparing these mean values for healthy tissue with the mean values for cancer tissue for the same patient, it can be seen that for iron the mean value is forty percent greater in cancer sample, for copper there is no significant difference and for zinc the mean concentration doubling in cancer sample. These results are in accordance with the literature [4]. But it is necessary to measure more samples and quantify the difference in concentration in one sample and between normal and abnormal tissues to use the X-ray fluorescence microtomography as an analytic tool to analyze biological tissues.

The radial streak effects that can be visualized in tomographic reconstructions are because of the low counting statistic in each projection. The images were not processed.

#### IV. CONCLUSION

Analyzing the XRFCT of the breast sample fragments, it was possible to visualize the elemental distribution of iron, copper and zinc, and it is verified that it is very important to use the algorithm with absorption corrections to get the corrected value of concentration.

For these samples, the concentration of iron and zinc is bigger in the cancer sample than in the healthy sample.

It will be necessary to measure more samples and quantify the difference in concentration in one sample and between normal and abnormal tissues to use the X-ray fluorescence microtomography as an analytic tool to analyze biological tissues.

The better definition of the interfaces in X-ray fluorescence images was striking and the spatial resolution of the system can be optimized as a function of the application. The experimental set up at XRF-LNLS has shown to be very promising and this effort at implementing X-ray fluorescence microtomography was justified by the high quality of the images obtained.

#### REFERENCES

- [1] G. R. Pereira, R. T. Lopes, M. J. Anjos, H. S. Rocha, and C. A. Pérez, "X-ray fluorescence microtomography analyzing reference samples," *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research A*, vol. 579, pp. 322–325, 2007.
- [2] J. P. Hogan, R. A. Gonsalves, and A. S. Krieger, "Fluorescent computer tomography: A model for correction of X-ray absorption," *IEEE Trans. Nucl. Sci.*, vol. 38, pp. 1721–1727, 1991.
- [3] G. Brown and D. E. Moncton, *Handbook on Synchrotron Radiation*. : Elsevier Science Publishers, 1991, vol. 3, pp. 129–139.
- [4] G. J. N. Raju *et al.*, "Trace elemental correlation study in malignant and normal breast tissue by PIXE technique," *Nucl. Instr. and Meth. B*, vol. 247, pp. 361–367, 2006.
- [5] H. S. Rocha, G. R. Pereira, M. J. Anjos, P. Faria, G. Kellermann, C. A. Pérez, G. Tiraio, I. Mazzaro, C. Giles, and R. T. Lopes, "Diffraction enhanced imaging and X-ray fluorescence microtomography for analyzing biological samples," *X-Ray Spectrometry*, vol. 36, pp. 247–253, 2007.
- [6] M. Naghedolfeizi *et al.*, "X-ray fluorescence microtomography study of trace elements in a SiC nuclear fuel shell," *Journal of Nuclear Materials*, vol. 312, pp. 146–155, 2003.



Contents lists available at ScienceDirect

# Applied Radiation and Isotopes

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/apradiso](http://www.elsevier.com/locate/apradiso)

## Biological tissues analysis by XRF microtomography

G.R. Pereira<sup>a</sup>, H.S. Rocha<sup>a</sup>, C. Calza<sup>a</sup>, M.J. Anjos<sup>b</sup>, C.A. Pérez<sup>c</sup>, R.T. Lopes<sup>a,\*</sup><sup>a</sup> Nuclear Instrumentation Laboratory (LIN), COPPE, UFRJ, P.O. Box 68509, 21941-972 Rio de Janeiro, Brazil<sup>b</sup> Physics Institute—UERJ, Brazil<sup>c</sup> Brazilian Synchrotron Light Laboratory, Brazil

### ARTICLE INFO

#### Keywords:

X-ray fluorescence  
Microtomography  
Synchrotron radiation  
Biological samples

### ABSTRACT

The main of this work is to determine the elemental distribution in breast and prostate tissue samples in order to verify the concentration of some elements correlated with characteristics and pathology of each tissue observed by the X-ray transmission microtomography ( $\mu$ CT). The experiments were performed at the X-ray fluorescence beamline of the Brazilian Synchrotron Light Laboratory. The  $\mu$ CT images were reconstructed using a filtered-back-projection algorithm and the XRF microtomographies were reconstructed using a filtered-back-projection algorithm with absorption corrections.

© 2009 Elsevier Ltd. All rights reserved.

### 1. Introduction

Since tomographic techniques were developed, X-ray transmission tomography has been used in noninvasive testing for investigating the internal structure of samples (Braz et al., 1999) and with the advent of intense synchrotron radiation sources; the resolution of the tomography was improved into  $\mu$ m regime (Lopes et al., 2003). Although the transmission tomography provides information about the distribution of the attenuation coefficients, the technique cannot give any information about the distribution of trace elements within the samples.

Other complementary tomographic techniques have been developed based on the detection of the scattered (Barroso et al., 1998) and fluorescence photons (Pereira et al., 2007) in order to get some properties that also depend upon the distribution of individual elements within the sample. The X-ray fluorescence (XRF) associated with tomographic techniques can supply important information about a sample's chemical properties and produce high contrast. X-ray transmission tomography is not able to give this information.

X-ray fluorescence tomography is based on detection of photons from the fluorescence emission from the elements in the sample. These photons are acquired by an energy dispersive detector, placed at  $90^\circ$  to the incident beam direction. A value in a projection is obtained by measuring the fluorescence radiation emitted by all pixels along the beam. The sample is translated and another value is measured in the projection. These steps are repeated until the whole sample pass through the beam, completing the projection. The sample is rotated and another

projection is measured. The projections are measured until the sample rotated  $180^\circ$ .

The data acquisition of the X-ray fluorescence microtomography results in a bi-dimensional raw data called sinogram. A sinogram consists of the line scans that were taken for every rotational angle. For each emission line of the fluorescence spectrum there is a separate sinogram. In general, a sinogram plots the property measured by the setup over the direction perpendicular to the beam and the angle of rotation. The tomogram which is a two-dimensional slice across the sample can be reconstructed from the sinogram by an appropriate algorithm.

The increase of the mortality rate in Brazil due to cancer was a decisive factor in the choice of the investigated samples. The choice also reflects the world tendency to find diagnostic techniques for cancer and other diseases. The fluorescence mapping of iron, copper and zinc can be very important in diagnostics, because the biochemistry of these elements suggests that these metals may play an important role in carcinogenesis. However, the evidence linking iron, copper and zinc to cancer is far from conclusive and further research is needed (Wu et al., 2004). Using X-ray fluorescence tomography the elemental map can be obtained without sample preparation.

This paper presents a development of a setup to study X-ray fluorescence microtomography of biological samples at the X-ray fluorescence beam line of the Brazilian Synchrotron Light Laboratory Facility (LNLS), Campinas, Brazil.

### 2. Experiment

This work presents the development of a system to study X-ray fluorescence microtomography at the X-ray fluorescence facility (D09B-XRF) at the Brazilian Synchrotron Light Laboratory (LNLS),

\* Corresponding author. Tel.: +55 21 2562 7308; fax: +55 21 2562 8444.  
E-mail address: [Ricardo@lin.ufrj.br](mailto:Ricardo@lin.ufrj.br) (R.T. Lopes).



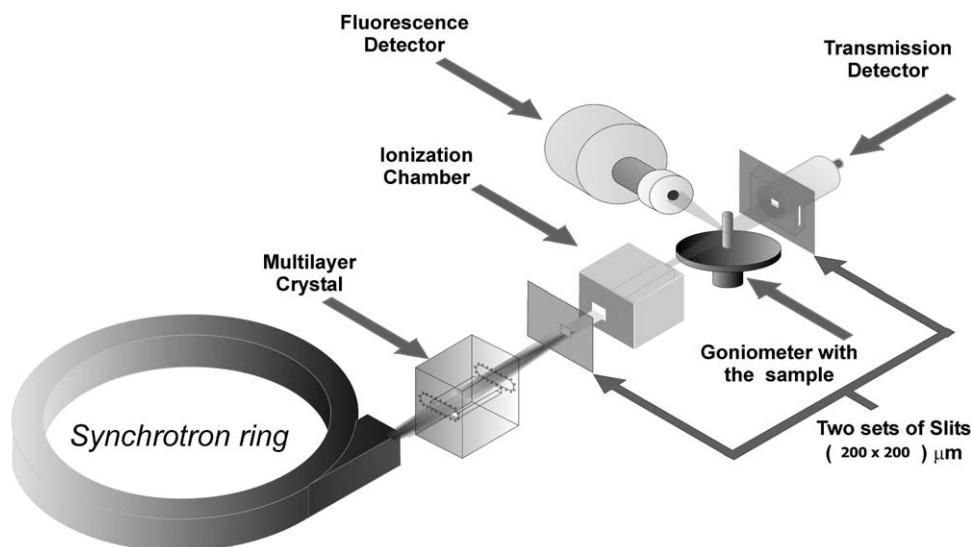


Fig. 1. The experimental arrangement for an X-ray fluorescence microtomography measurement using a monochromatic beam and picture.

Campinas, Brazil. A quasi-monochromatic beam produced by a multilayer monochromator at 12 keV,  $\Delta E/E=0.03$  collimated to a  $200\ \mu\text{m} \times 200\ \mu\text{m}$  area with a set of slits, was used to sample excitation. The crystal monochromator is made of W-C and it has 75 layer pairs.

The intensity of the incident beam was monitored with an ionization chamber placed in front of it, before the sample. A schematic of the experimental setup for an X-ray fluorescence microtomography using a multilayer monochromatic beam is shown in Fig. 1.

The sample was placed on a high precision goniometer and translation stages that allow rotating as well as translating it perpendicularly to the beam. The fluorescence photons were collected with an energy dispersive HPGe detector (CANBERRA Industries inc.) placed at  $90^\circ$  to the incident beam, while transmitted photons were detected with a fast NaI (TI) scintillation counter (CYBERSTAR-Oxford anfyisik) placed behind the sample on the beam direction. This detector geometry allows reducing the elastic and Compton X-ray scattering from the sample due to the high linear polarization of the incoming beam in the plane of the storage ring; thus improving the signal to background ratio for the detection of trace elements (Naghedolfeizi, 2003).

The quality of the reconstruction is a compromise between the measuring time required for an acceptable counting statistic of the X-ray fluorescence peaks and the step size necessary to linearly move and rotate the samples. In one projection, samples were positioned in steps of  $200\ \mu\text{m}$  (actual beam size) perpendicularly to the beam direction covering the whole transversal section of the sample proof.

Each single value in a projection is obtained by measuring the fluorescence radiation emitted by all pixels along the beam. The object is then rotated, and another projection is measured. Projections are obtained in steps of  $30^\circ$  until the object has completed  $180^\circ$ . The selected measuring time was 5 s for each scanned point.

A reference sample made of polyethylene filled with a standard solution of copper was first analyzed and used as a test sample. The test sample is made of a polyethylene cylinder with 2 mm diameter with an internal cylinder with 1 mm diameter filled a standard solution of copper 100 parts per million (100 ppm) (Pereira et al., 2007).

As a second part of the experiments, XRF microtomographies were performed on human prostate and breast tissue samples. The component tissues were identified by the pathologist who made the sample available. The tissues were cut in cylindrical form with 1.5–2.0 mm thickness by 4.0–5.0 mm of height and were frozen and dried before being analyzed.

The X-ray transmission images were reconstructed using a filtered-back-projection algorithm and the X-ray fluorescence tomography images were reconstructed using a filtered-back-projection algorithm with absorption corrections.

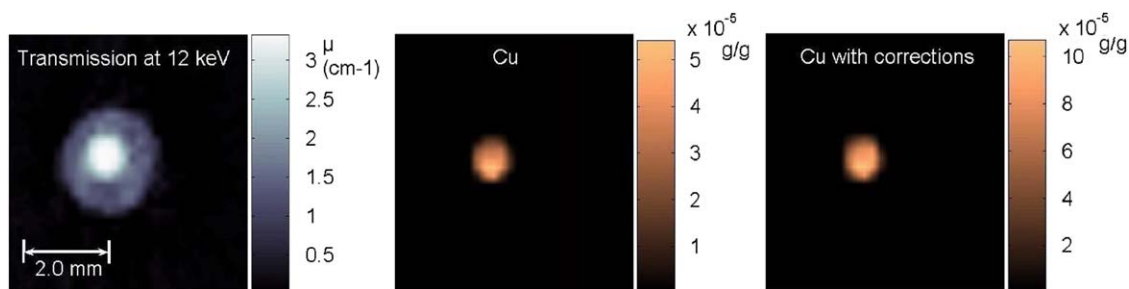
### 3. Results and discussion

The result for the reference sample made of polyethylene is shown in Fig. 2.

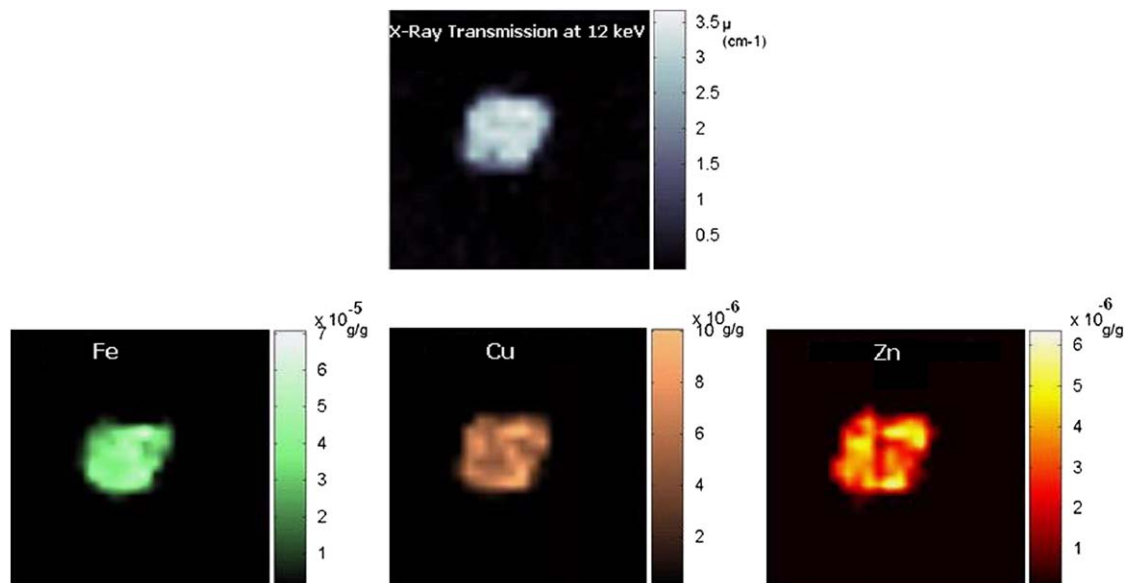
The image in Fig. 2 shows in the left side the X-ray transmission microtomography, and in the middle side and in the right side, the image shows the XRF microtomography of copper without absorption corrections and with absorption corrections, respectively. It can be observed analyzing the images that while the X-ray transmission tomography shows the polyethylene matrix and the internal cylinder with copper solution, the X-ray fluorescence tomographies show only those regions where the elements of interest were localized, in this case copper. These tomographies show the viability of fluorescence microtomography and confirm that this technique can be used to complement other techniques for sample characterization.

Comparing now, the X-ray fluorescence images, it can be verified that there is a bigger difference between reconstructed images with absorption corrections and without absorption corrections even if the sample is small. It is important to verify that only the XRF microtomography reconstructed with absorption corrections shows the corrected concentration of about 100 ppm. The XRF microtomography reconstructed without absorption corrections shows a mean value of about 40 ppm, which are 60 percent less than the real value.

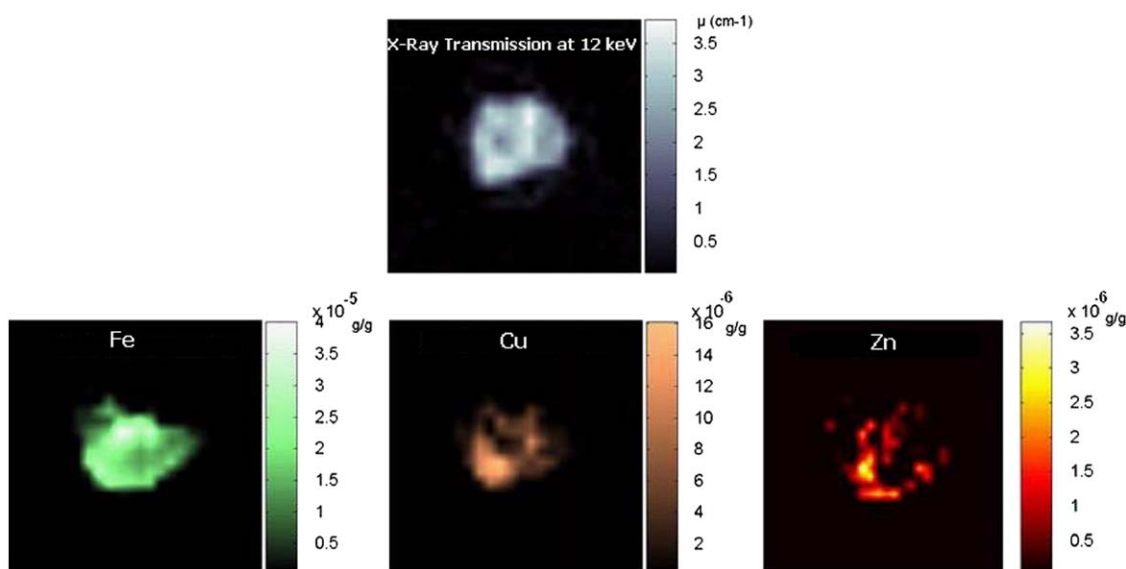
X-ray fluorescence microtomographies were performed on human prostate and human breast tissue samples. It was analyzed two prostate samples with HPB, one malignant breast tumor sample (ductal carcinoma) and one healthy breast tissue sample



**Fig. 2.** Tomographic images using a quasi-monochromatic beam at 12 keV (left: transmission microtomography; middle: X-ray fluorescence microtomography of Cu without absorption corrections and right: X-ray fluorescence microtomography of Cu with absorption correction).



**Fig. 3.** X-ray fluorescence and transmission microtomography of a breast cancer sample reconstructed with back-projection algorithm with absorption corrections.



**Fig. 4.** X-ray fluorescence and transmission microtomography of a healthy breast tissue sample reconstructed with back-projection algorithm with absorption corrections (this sample is from the same patient that the sample in Fig. 3).

for the same patient. The result for a breast samples are shown in Fig. 3 and 4. Fig. 3 shows the results for breast cancer sample while Fig. 4 shows the results for healthy tissue. Fig. 4 show that there is a small concentration of zinc in healthy tissue sample and

the distribution is nonhomogenous, there are many regions without zinc.

Analyzing the breast tissue images, it can be observed that the two samples have a bigger concentration of iron comparing with

the concentration of copper and zinc and for this patient; the concentration of iron is bigger in the cancer sample than in the healthy sample. The mean concentration of iron is about  $30 \mu\text{g/g}$ . Comparing these mean values for healthy tissue with the mean values for cancer tissue for the same patient, it can be seen that for iron the mean value is 40 percent greater in cancer sample and that for copper there is no significant difference. But it is necessary to measure more samples and quantify the difference in concentration in one sample and between normal and abnormal tissues to use the X-ray fluorescence microtomography as an analytic tool to analyze biological tissues.

The result for human prostate samples is shown in Fig. 5 and 6. The microtomographies images show the results for HPB for two different patients.

Analyzing the XRF microtomographies of human prostate tissue sample fragments, it was possible to see the elemental distribution of iron, copper and zinc. In Fig. 6, it can be seen that

there is a flaw in the Fe fluorescence distribution image. These tissues have a less concentration of copper and iron than zinc. The mean concentration of zinc in the HPB samples is about 150–200 ppm.

The radial streak effects that can be visualized in tomographic reconstructions are because of the low counting statistic in each projection. The images were not processed.

#### 4. Conclusion

The reference sample shows the viability of fluorescence microtomography and confirms that this technique can be used to complement other techniques for sample characterization. Analyzing these images, it is verified that it is very important to use the algorithm with absorption corrections to get the corrected value of concentration.

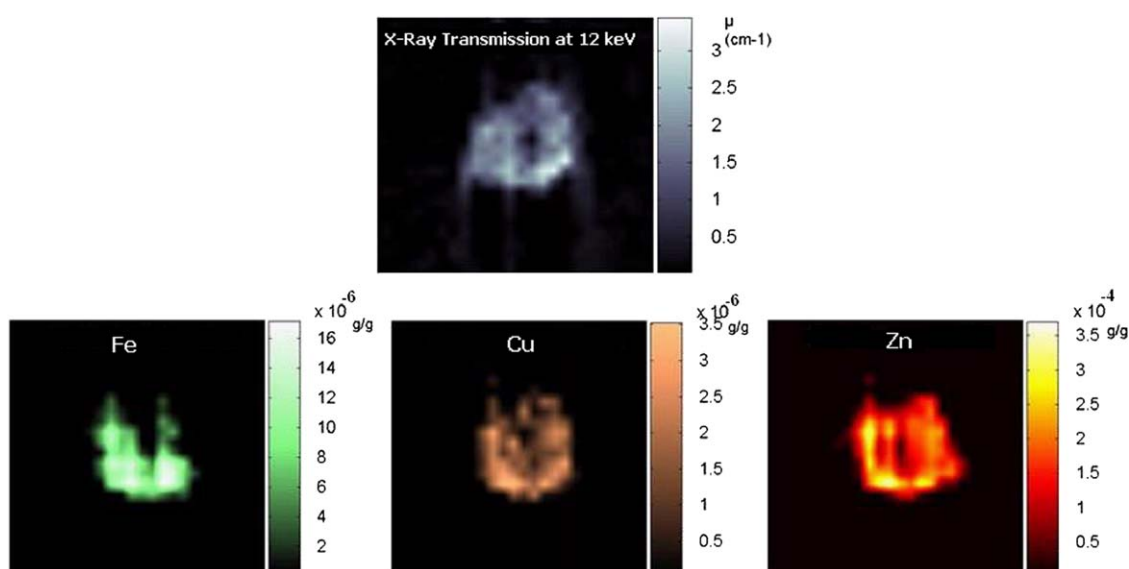


Fig. 5. X-ray fluorescence and transmission microtomography of a human prostate HPB sample reconstructed with back-projection algorithm with absorption corrections.

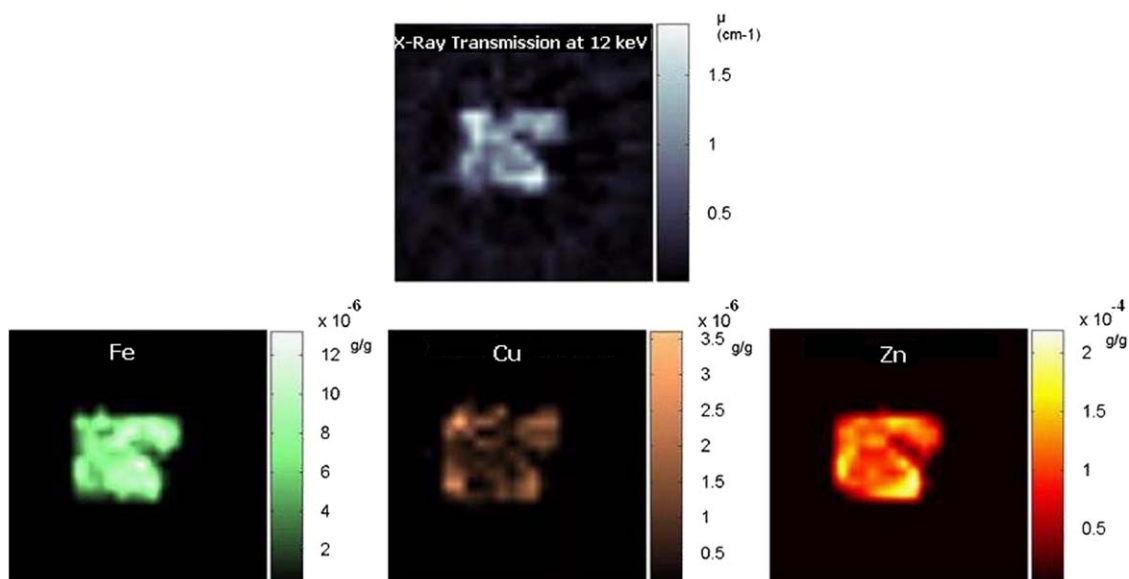


Fig. 6. X-ray fluorescence and transmission microtomography of a human prostate HPB sample reconstructed with back-projection algorithm with absorption corrections.

Analyzing the XRF microtomography of the breast tissue samples, it was verified that it was possible to visualize the elemental distribution of iron, copper and zinc, and for these samples, the concentration of iron and zinc is bigger in the cancer sample than in the healthy sample. For prostate tissue samples with HPB, it was verified that these tissues have a less concentration of copper and iron than zinc.

It will be necessary to measure more samples and quantify the difference in concentration in one sample and between normal and abnormal tissues to use the X-ray fluorescence microtomography as an analytic tool to analyze biological tissues.

The better definition of the interfaces in X-ray fluorescence images was striking and the spatial resolution of the system can be optimized as a function of the application. The experimental setup at XRF-LNLS has shown to be very promising and this effort at implementing X-ray fluorescence microtomography was justified by the high quality of the images obtained.

## Acknowledgments

This work was partially supported by the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), the Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ) and the Laboratório Nacional de Luz Síncrotron (LNLS).

## References

- Braz, D., da Motta, L.M.G., Lopes, R.T., 1999. *Appl. Radiat. Isot.* 50, 661.
- Barroso, R.C., Lopes, R.T., de Jesus, E.F.O., Oliveira, L.F., 1998. *Nucl. Instrum. Methods A* 471, 75.
- Lopes, R.T., Rocha, H.S., Jesus, E.F.O., Barroso, R.C., Oliveira, L.F., Anjos, M.J., Braz, D., Simabuco, S.M., 2003. *Nucl. Instrum. Methods A* 505, 604.
- Naghedolfeizi, M., Chung, J-S., Morris, R., Ice, G.E., Yun, W.B., Cai, Z., Lai, B., 2003. *J. Nucl. Mater.* 312, 146.
- Pereira, G.R., Lopes, R.T., Anjos, M.J., Rocha, H.S., Pérez, C.A., 2007. *Nucl. Instrum. Methods A* 579, 322.
- Wu, T., Sempos, C.T., Freudenheim, J.L., et al., 2004. *Ann. Epidemiol.* 14 (3), 195–201.