



FMUC FACULDADE DE MEDICINA
UNIVERSIDADE DE COIMBRA

AVALIAÇÃO DA LÍNGUA NUM MODELO DE ALCOOLISMO EXPERIMENTAL

MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA DENTÁRIA

ALUNA: MARIA INÉS MIRA MARTINS SEMEDO

ORIENTADOR: MESTRE DR. RODRIGO FARINHA

Co-ORIENTADOR: PROFESSOR DOUTOR SILVÉRIO CABRITA

Coimbra, Julho de 2015

AGRADECIMENTOS

A realização desta tese não teria sido possível sem a ajuda de diversas pessoas que também colocaram muito do seu empenho, dedicação e apoio. Nomeadamente:

Ao Mestre Doutor Rodrigo Farinha por me ter esclarecido sobre algumas questões e transmitido informação imprescindível à realização do trabalho.

Ao Professor Doutor António Silvério Cabrita por todo o conhecimento transmitido e toda a disponibilidade que sempre demonstrou ao longo da realização da tese.

Ao Mestre Doutor Ricardo Cabeças que sempre me apoiou muito para além das suas obrigações e fora do seu tempo de trabalho no incansável esclarecimento de dúvidas, análise estatística dos dados e formatação da tese. Queria também agradecer pelas horas em que esteve disponível para me auxiliar na análise das amostras pela técnica de fluorescência de raios-X.

Ao Mestre Doutor Eduardo Costa pela disponibilidade que demonstrou em esclarecer dúvidas e na análise das amostras pela técnica de fluorescência de raios-X.

A todos os meus colegas e amigos agradeço pela amizade e apoio que me deram ao longo de todos estes anos.

Agradeço de um modo especial, à minha família, principalmente à minha mãe, pai e à minha avó pelo apoio incondicional, dedicação e por nunca deixarem de acreditar em mim. Tudo o que sou devo-o a eles.

Índice

Introdução	1
A Origem do Universo	1
Elementos	2
Cálcio	2
Fósforo	4
Potássio	5
Ferro	6
Silício	9
Alumínio	11
Enxofre	13
Cloro	14
Distribuição mineral no corpo	14
Alcoolismo	16
Histologia da Língua	19
Papilas Linguais	19
Objectivos	22
Materiais e Métodos	23
Fluorescência de Raio-X	25
Resultados	28

Discussão	33
Conclusões	34
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	35

Lista de Figuras

1	Superfície da língua na região próxima ao V lingual, entre as porções anterior e posterior. Estão presentes os nódulos linfóides, tonsilas linguais, glândulas e papilas. ¹⁶	21
2	Fotomicrografia e esquema de um corpúsculo gustativo. O esquema ilustra diversos tipos celulares (células basais, gustativas e de suporte) e fibras nervosas aferentes que, após estímulo, transmitirão a informação sensorial aos neurónios centrais associados à gustação. ¹⁶	21
3	Equipamento de análise por Fluorescência de Raios-X (Hitachi modelo SEA 6000VX) Fonte: imagem fotografada pelo autor.	24
4	Ilustração do local de incidência do feixe de raios-X. Fonte: imagem fotografada pelo autor.	24
5	Gráfico do espectro resultante da análise de uma amostra.	26

Lista de Tabelas

1	Média e desvio padrão dos valores obtidos nos grupos controlo e teste, com a respetiva significância estatística (valor de p).	15
2	Média e desvio padrão dos valores obtidos nos grupos controlo e teste, com a respetiva significância estatística (valor de p).	29
3	Média e desvio padrão obtidos a partir dos coeficientes entre os vários elementos e o potássio, fósforo e enxofre no grupo controlo.	31
4	Média e desvio padrão obtidos a partir dos coeficientes entre os vários elementos e o potássio, fósforo e enxofre no grupo teste.	31
5	Valores de p obtidos a partir dos coeficientes dos vários elementos com o potássio, fósforo e enxofre, entre o grupo controlo e teste.	32
6	Alteração dos elementos - Conclusão.	32

Resumo

Trezentos mil a um milhão de anos após o momento da singularidade do “Big Bang”, a expansão cósmica reduziu a energia de todos os fótons abaixo do limiar de ionização, tornando possível a formação de átomos de hidrogénio, que passam a ser a forma predominante de matéria.

Neste estudo os elementos procurados foram o cálcio, fósforo, potássio, ferro, silício, alumínio, enxofre e cloro. O corpo humano contém mais cálcio do que qualquer um dos outros minerais essenciais. Pelo menos 99% do total encontra-se nos ossos e nos dentes. A maior parte do cálcio é depositado no esqueleto sob a forma de hidroxapatite. O fósforo sob a forma de ião fosfato desempenha um papel importante na estrutura e na função de todas as células vivas. O fosfato existe nas células como um ião livre, numa concentração de alguns miliequivalentes por litro e é também parte integrante de ácidos nucleicos, nucleótidos, fosfolípidos, e algumas proteínas. O potássio é o principal catião (K^+) do fluido intracelular. O ferro é um dos elementos mais abundantes na crosta terrestre, sendo que a sua principal função é o transporte de oxigénio pela hemoglobina. O silício é o segundo elemento mais abundante na crosta terrestre e é normalmente encontrado como sílica (SiO_2) ou como silicatos, sendo este último o grupo mineral mais abundante. O alumínio é o terceiro elemento mais abundante na crosta da Terra e ocorre naturalmente no ar, água e solo. O enxofre é um nutriente essencial, disponível no solo na forma de sulfato. O gás de cloro (Cl_2) é um importante produto químico industrial. Nos Estados Unidos, na Europa, e noutras partes do mundo, vários milhões de toneladas de Cl_2 são produzidos anualmente. A sua libertação acidental na atmosfera pode causar mortalidade e morbidez significativa para os seres humanos e animais.

O consumo excessivo de álcool é um importante problema de saúde na maioria das sociedades. Além das questões sociais e de interferência na vida do doente, o alcoolismo está associado a doença hepática alcoólica, cujo espectro se situa desde as alterações sublimas, iniciais, das enzimas hepáticas, até às situações de descompensação da função

hepática, potencialmente letais, na hepatite alcoólica.

Neste estudo o grupo controlo foi mantido sem manipulação indutora de alterações, enquanto que no grupo teste, foi induzido alcoolismo experimental através da administração de uma solução de etanol a 5% que substituiu a água de bebida. De cada animal foi colhida a língua, perfazendo um total de 28 amostras. As amostras foram analisadas pela técnica de fluorescência de raios-X, que com uma energia de 15 keV tem capacidade de detetar elementos desde o sódio até ao ferro.

Abstract

Three hundred thousand to a million years ago after the “Big Bang”, the cosmic expansion reduced the energy of all the photons under the ionization threshold, making possible the formation of hydrogen atoms, which become the predominant form of matter.

In this study the target elements are calcium, phosphorus, potassium, iron, silicon, aluminum, sulfur and chlorine. The human body contains more calcium than any of the other essential minerals. At least 99% are in the bones and teeth. The biggest part of the calcium is deposited in the skeleton as hydroxyapatite. Phosphorus in the form of phosphate ion plays an important role in the structure and function of all living cells. Phosphate exists in cells as a free ion, in a concentration of a few milli-equivalents per liter and it is also an integral part of nucleic acids, nucleotides, phospholipids and some protein. Potassium is the major cation (K⁺) from the intracellular fluid. Iron is one of the most abundant elements in the earth's crust and its main function is the transport of oxygen by the hemoglobin. Silicon is the second most abundant element on Earth's crust and is normally as silica (SiO₂) or silicates (this last one is the most abundant). Aluminium is the third most abundant element on Earth's crust and occurs naturally from the air, water and soil. Sulfur is an essential nutrient, available in the soil in the form of sulfate. Chlorine gas (Cl₂) is an important industrial chemical product. In the United States, Europe and other parts of the world, several million tons of Cl₂ are produced annually. The accidental release into the atmosphere can cause significant morbidity and mortality for humans and animals. Excessive consumption of alcohol is an important health problem in most societies. In addition to social issues and interference in the patient's life, alcoholism is associated with alcoholic liver disease, whose spectrum lies from the subtle initial changes in liver enzymes to the situations of decompensated liver function, potentially lethal, in alcoholic hepatitis. In this study the control group was maintained without changes while in the test group was induced experimental alcoholism by administration of a 5% ethanol solution which replaced the drinking water. From each animal the tongue was harvested making a total of 28 samples. Samples were analyzed by fluorescence X-ray

technique, which with 15 keV energy is capable of sensing elements from sodium to iron.

Introdução

A Origem do Universo

A origem do Universo data de há aproximadamente quinze mil milhões de anos. Considera-se que todas as suas regiões devem ter estado comprimidas num ponto de densidade infinita, num dado momento do tempo, designado por instante de singularidade. O “Big Bang” corresponde à génese do espaço e do tempo. Nesta fase inicial, a temperatura era tão elevada que nenhum constituinte elementar da natureza atingia um estado de permanência. Quando a temperatura do Universo desceu, surgiu toda a diversidade de constituintes que tornou possível a nossa existência.

No primeiro milionésimo de segundo, o universo encontrava-se cheio de prótons e neutrões mergulhados num mar de neutrinos, eletrões, positrões e luz. Na fase seguinte, num período que terá durado entre dez e quinhentos segundos, a temperatura diminuiu o suficiente para que o universo primordial se comportasse como um reator de fusão nuclear de hidrogénio. Cerca de 25% da massa do universo terá passado a existir sobre a forma de hélio. Imediatamente a seguir, a densidade do universo terá diminuído tanto que seria impossível a ocorrência de interações fortes. Desta forma, os núcleos mais pesados terão sido gerados unicamente após a formação das primeiras estrelas. Trezentos mil a um milhão de anos após o momento da singularidade do “Big Bang”, a expansão cósmica reduziu a energia de todos os fotões abaixo do limiar de ionização, tornando possível a formação de átomos de hidrogénio, que passam a ser a forma predominante de matéria.

Aos cerca de mil milhões de anos de existência, surge a formação de galáxias. Nestas estruturas surgem as primeiras estrelas. À medida que as estrelas vão envelhecendo,

tornam-se mais frias e perdem a sua aparência azulada, para adquirir uma tonalidade avermelhada. Nesta fase final, apresentam uma constituição ainda gasosa onde se encontra uma proporção superior de átomos e moléculas relativamente às partículas livres carregadas da época em que são jovens. Nas estrelas, a pressão gerada pelas reações nucleares, no seu interior, impede a solidificação do núcleo estelar pela enorme força da gravidade. Na realidade, as estrelas mais antigas ao esgotarem todas as reservas de combustível nuclear tornam-se pequenas estrelas sólidas (anãs) e terminam como núcleos de carbono ou oxigénio, designadas por anãs brancas. Nas estrelas com massa mais elevada, as reações nucleares continuam com a combinação de núcleos cada vez mais pesados até à produção de ferro, a partir do qual não é possível extrair mais energia do processo de fusão conducente à formação de núcleos mais pesados. Uma vez formado o núcleo de ferro, a estrela atingiu o seu destino final. O colapso gravitacional de uma estrela liberta energia suficiente para ejetar as camadas exteriores das estrelas, ricas em elementos pesados, sementes para a fase posterior da evolução do universo, os planetas.¹

Elementos

Cálcio

O corpo humano contém mais cálcio do que qualquer um dos outros minerais essenciais. Pelo menos 99% do total encontra-se nos ossos e nos dentes. A maior parte do cálcio é depositado no esqueleto sob a forma de hidroxiapatite, $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$, mas o osso também contém quantidades consideráveis de fosfato de cálcio não cristalino e carbonatos, bem como pequenas quantidades de outros sais. Estes minerais compreendem cerca de 50% da massa total do esqueleto; a massa restante consiste numa matriz orgânica de proteínas, glicoproteínas e proteoglicanos onde os sais de cálcio são depositados. O tecido ósseo encontra-se em constantemente remodelação, podendo fixar e libertar cerca de 700 mg de cálcio por dia. Nos fluidos intra e extracelulares, existe cerca de 10g de cálcio, com elevada importância na regulação de atividades vitais celulares: função nervosa e muscular, ações hormonais, hemostase e mobilidade celular. Uma vez que o cálcio está envolvido

no controlo de muitos processos, tem sido descrito como um "segundo mensageiro" que medeia as respostas celulares a uma variedade de estímulos de uma maneira análoga às ações reguladoras de nucleótidos cíclicos. A ação do cálcio parece ser mediada por uma proteína do receptor intracelular, calmodulina, que se liga a iões de cálcio quando a sua concentração aumenta em resposta a um estímulo. A calmodulina encontra-se em todos os tipos de células nucleadas. Quando o cálcio na sua forma ionizada está ligado à calmodulina, modula a atividade de uma grande variedade de enzimas, incluindo aquelas que estão envolvidas no metabolismo de nucleótidos cíclicos, fosforilação proteica, função de secreção, contração muscular, formação dos microtúbulos, metabolismo do glicogénio e no fluxo do cálcio.

A concentração sérica normal de cálcio é de cerca de 9-11 mg/dL, com uma variação diária que não excede os 3%. Estes limites estreitos são mantidos pelas ações regulatórias complexas de vitamina D, hormona paratiróide e calcitonina.

O cálcio é absorvido no duodeno e no jejuno proximal por meio de uma proteína de ligação ao cálcio sintetizado em resposta à ação do 1,25-dihidroxicolecalciferol (1,25 - dihidroxivitamina D3). A absorção é inibida por compostos que formam sais insolúveis de cálcio (oxalatos, fitatos, fosfatos) e por gordura não digerida, com formação de complexos micelares de cálcio insolúveis. Uma grande parte do cálcio ingerido não é absorvido, sendo excretado nas fezes. Uma vez absorvido, o cálcio é excretado através de várias vias. O rim excreta o cálcio quando o seu nível no sangue é superior a 7 mg/dL. Uma grande quantidade de cálcio é segregada para o lúmen intestinal e na maior parte perdido nas fezes; pequenas quantidades de cálcio também são excretadas no suor. Para um determinado indivíduo, o cálcio presente na urina permanece relativamente constante enquanto que o cálcio fecal varia amplamente em resposta à dieta, o que sugere que os níveis de cálcio são bem controlados ao nível da absorção. As dietas ricas em proteínas têm sido relatadas como causadoras de um aumento significativo na excreção de cálcio.

Os sintomas de défice de cálcio incluem distúrbios musculares como a tetanização, e distúrbios neurológicos. Estes sintomas ocorrem mais frequentemente, como resultado do défice de vitamina D, hipoparatiroidismo ou insuficiência renal, mas a privação de cálcio

também constitui uma causa. Quando os níveis plasmáticos descem, o cálcio ósseo é mobilizado, aumentando assim a sua circulação e a formação de novo osso é travada. O efeito lítico sobre o osso nas situações de carência de cálcio provoca alterações como o raquitismo nas idades pediátricas, ou a osteomalácia nos adultos.

Um factor adicional que leva à perda de mineral do osso é a relação do cálcio com o fósforo (Ca:P) na dieta. Nos animais, uma razão Ca:P de 2:1 conduz à absorção máxima de cálcio e as perdas minerais ósseas mínimas, enquanto que um elevado consumo de fosfato aumenta a perda de osso. No ser humano, a elevada ingestão de fósforo conduz a perdas fecais de cálcio. A razão Ca:P na dieta ocidental comum, aproxima-se de 1:1,2 a 1:1,5. Desconhecem-se ainda os efeitos desta relação sobre a patologia óssea.

A hipercalcémia não parece ocorrer em pessoas normais, como resultado da ingestão elevada de cálcio, porque o excesso de cálcio não é absorvido. A ingestão excessiva, no entanto, pode contribuir para elevadas concentrações séricas de cálcio que podem ser causa de hiperparatiroidismo, intoxicação por vitamina D, sarcoidose ou doença neoplásica.²

Fósforo

O fósforo sob a forma de ião fosfato desempenha um papel importante na estrutura e na função de todas as células vivas. O fosfato existe nas células como um ião livre, numa concentração de alguns miliequivalentes por litro e é também parte integrante de ácidos nucleicos, nucleótidos, fosfolípidos, e algumas proteínas. No espaço extracelular, o fosfato circula como ião livre e está presente na forma de hidroxiapatite, um componente fundamental da matriz do osso e do dente. Todas as células possuem enzimas que podem anexar fosfatos em éster ou ligações de ácido anidrido a outras moléculas. As enzimas também existem dentro e fora das células para a remoção de fosfatos a partir de moléculas que o transportam. Incluídos no último grupo de enzimas são várias as fosfatases que têm um papel importante na digestão intestinal dos alimentos.

O fosfato livre é absorvido no jejuno médio e entra na corrente sanguínea por meio da circulação porta. A regulação da absorção de fosfato é mediada pela 1,25-di-hidroxitamina D3. O fosfato participa num ciclo de regulação com este derivado ativo de vitamina D3.

Quando o nível de fosfato no soro é muito baixo, a formação de 1,25-di-hidroxitamina D3 é estimulada, no rim, provocando o aumento da absorção intestinal de fosfato.

A deposição de fosfato como hidroxapatite no osso é regulado pelos níveis das hormonas da paratiróide. A 1,25-di-hidroxitamina D3 desempenha um papel permissivo sobre a paratormona mobilizando o cálcio e o fosfato do osso.

A excreção do fosfato ocorre principalmente no rim, com 85-90% do fosfato plasmático a ser filtrado no glomérulo renal. A vitamina D3 estimula a reabsorção do fosfato, juntamente com o cálcio no túbulo proximal. A paratormona diminui a reabsorção tubular renal de fosfato. A depleção do fosfato ocorre como resultado de uma absorção intestinal ou de um desperdício excessivo através do rim. O estado de hipofosfatémia afeta a maioria dos tipos celulares. A toxicidade do fosfato é rara exceto nas situações de insuficiência renal. A absorção de fosfatos alimentares pode ser evitada pelo uso de antiácidos para ligar os fosfatos no lúmen intestinal. Isto irá resultar eventualmente na troca de concentrações de fosfato no soro em relação normal e concomitantemente num aumento de vitamina D3. Este último irá então promover a absorção de cálcio a partir do intestino, como discutido acima.²

Potássio

O potássio é o principal catião (K⁺) do fluido intracelular. Por conseguinte, as principais fontes de dieta de potássio são os materiais. O défice nutricional é extremamente raro, exceto na situação de desnutrição proteico-calórica grave. Este ião é facilmente absorvido no intestino delgado, em proporção com a quantidade presente e circula no plasma. O potássio no líquido extracelular invade todos os tecidos do corpo e pode ter efeitos profundos sobre a função de alguns órgãos, particularmente a despolarização e a contração do coração.

O rim não pode conservar o potássio de modo tão eficaz como o sódio. A conservação de sódio é à custa de potássio, um efeito mediado pela aldosterona. Assim, há uma perda obrigatória de potássio na função renal normal, e esta perda equivale a aproximadamente 40 mEq (cerca de 160 mg) por dia. Quando a ingestão de potássio desce para valores inferiores, há uma queda da concentração sérica e intracelular, e o contra-transporte de sódio passa a ser realizado sobretudo à custa de prótons (H⁺). Assim, os aumentos de concentração

de prótons intracelular, produzem uma acidose intracelular. A perda obrigatória de potássio efectuada pelos túbulos renais torna-se uma perda obrigatória de hidrogênio, uma vez que os túbulos renais conservam sódio em detrimento deste. Este fenómeno conduz a uma alcalose extracelular e acidose intracelular.

O défice de potássio ocorre com frequência no ambiente de inadequada substituição durante a administração de fluidos intravenosos para repor perdas no contexto de desidratação.

A hipercaliémia ocorre frequentemente na insuficiência renal, quando o rim não é capaz de excretar o excesso de potássio. A hipercaliémia produz alterações eletrocardiográficas características. Os efeitos eléctricos de hipercaliémia podem ser antagonizados pelo aumento de concentrações de cálcio no soro. Na presença de hipocaliémia, o coração é sensibilizado para a estrofantina, uma substância que inibe especificamente a sódio/potássio ATPase. A toxicidade por esta substância pode ser antagonizada pelo aumento da concentração de potássio no soro.²

Ferro

O ferro é um dos elementos mais abundantes na crosta terrestre. A principal função do ferro é o transporte de oxigénio pela hemoglobina. Tanto a forma ferrosa (Fe^{2+}) como a férrica (Fe^{3+}) são altamente insolúveis em pH neutro, são necessárias proteínas de transporte de ferro.

As principais fontes de ferro na dieta são órgãos maciços, leguminosas, melão, mariscos e salsa, predominantemente no estado férrico, fortemente ligado a moléculas orgânicas. No estômago, onde o pH é inferior a 4, a forma férrica pode dissociar-se e reagir com compostos de baixo peso molecular, tais como frutose, ácido ascórbico, ácido cítrico, e aminoácidos, para formar complexos que lhe permitem manter-se solúvel a pH neutro do lúmen intestinal.

Normalmente, a perda de ferro a partir do corpo de um homem é limitado a 1 mg/d, como resultado da descamação intestinal e de outras células que contêm ferro. As mulheres menstruadas perdem ferro com o sangue menstrual. Assim, na mulher a absorção intestinal de ferro da dieta é fundamental. São ingeridos por dia cerca de 10 a 20 mg de ferro, mas menos de 10% deste valor é absorvido. Assim, sob condições normais, existe uma pequena

quantidade de ferro da dieta que é absorvido, as quantidades excretadas na urina são mínimas, e uma elevada proporção de ferro corporal total é continuamente redistribuída ao longo do corpo por vários circuitos metabólicos. A maior necessidade de ferro ocorre na infância e adolescência; as crianças nestas fases de desenvolvimento absorvem uma percentagem mais elevada de ferro dos alimentos do que os adultos. A deficiência de ferro em crianças, adolescentes e mulheres menstruadas pode ocorrer devido a uma dieta inadequada. A deficiência de ferro em homens adultos geralmente pode ser atribuída a uma hemorragia substancial.

O ferro ligado ao grupo heme é absorvido pela célula da mucosa intestinal intacto, sendo depois degradado no interior da célula epitelial. O ferro não-heme é absorvido no estado ferroso, absorvido para o interior da célula da mucosa do duodeno e jejuno proximal e rapidamente oxidada na forma férrica que se liga a uma proteína transportadora intracelular. Dentro da célula, a molécula transportadora envia o ferro para a mitocôndria e, em seguida, dependendo do estado do metabolismo do ferro do indivíduo, é distribuído em proporções específicas para apoferritina ou apotransferrina.

A apoferritina é uma molécula de aproximadamente 500.000 kda, composta por 24 subunidades idênticas de 18.000 kda. A apoferritina assimila até 4300 átomos de ferro numa única molécula para formar a ferritina, a principal proteína de armazenamento do ferro.

A apotransferrina é uma proteína de 90.000 kda que se pode ligar a dois átomos de ferro para formar a transferrina. A transferrina é a proteína transportadora de ferro no plasma.

Em condições normais no adulto, quando aproximadamente 1 mg de ferro é absorvido por dia, o transportador intracelular de ferro das células da mucosa está quase saturado. Ele transfere quantidades significativas de ferro para a apoferritina para formar ferritina e transfere a quantidade usual de ferro para as mitocôndrias. O restante é transportado através da superfície serosa para a apotransferrina.

No estado de défice de ferro, a capacidade de transportar o ferro intracelular é aumentada, e será absorvida uma maior quantidade de ferro, se disponível na dieta. Embora as mitocôndrias recebam o seu abastecimento normal de ferro, a ferritina não é formada na célula, e a maior parte do ferro é transferido para o compartimento expandido da apotransferrina no

plasma.

No caso de sobrecarga de ferro, o transportador de ferro intracelular é simplesmente diminuído em capacidade e saturado. Uma quantidade significativa da ferritina é formada no interior da célula da mucosa, e uma menor quantidade de ferro é transferido para a apotransferrina já quase saturada. O ferro preso à ferritina das células da mucosa pode ser perdido por esfoliação das mesmas. A transferência de ferro da mucosa intracelular pode ser regulada em certa medida. A hormona eritropoietina, por um mecanismo não compreendido, promove a rápida transferência do ferro da mucosa para o compartimento da transferrina no plasma.

A transferência de ferro a partir do armazenamento de ferritina (na forma férrica) forma o plasma envolvendo a redução da forma ferrosa, para que seja libertado da ferritina. O ferro é novamente oxidado na sua forma férrica para que possa ligar-se à transferrina.

O ferro é transportado para locais de armazenamento na medula óssea e, em certa medida para o fígado na forma oxidada, ligado à transferrina no plasma. Nesses locais de armazenamento, é novamente transferido para a apoferritina como uma forma de armazenamento estável, mas passível de troca. A ferritina no sistema do retículo endotelial fornece uma forma de armazenamento disponível para ferro. No entanto, a ferritina pode tornar-se desnaturada, a apoferritina perder subunidades e posteriormente agregação em micelas de hemossiderina. A hemossiderina contém uma fração maior da sua massa com o ferro do que com a ferritina e existe como partículas de coloração de ferro microscopicamente visíveis. A hemossiderina é geralmente vista em estados de sobrecarga de ferro, quando a síntese da apoferritina e a sua absorção de ferro são máximas. O ferro na hemossiderina está disponível para a formação da hemoglobina, mas a mobilização de ferro é muito mais lenta do que a partir da ferritina.

Embora a ferritina não seja encontrada no plasma, a apoferritina parece refletir a dimensão das reservas de ferro armazenado no sistema reticuloendotelial. A formação de ferritina a partir de apoferritina envolve em primeiro lugar a ligação de ferro na superfície interna do invólucro da apoferritina.

A apoferritina em seguida, atua como um ferroxidase e oxida a forma ferrosa na forma

férrica, que é então firmemente ligada à ferritina. A fim de ser libertado da ferritina, o ferro deve ser novamente reduzido.

Um defeito herdado na regulação da absorção do ferro da mucosa provoca um síndrome de sobrecarga de ferro conhecido como hemocromatose, uma das poucas situações em que há excesso de absorção. Nesta doença multissistémica, 2 ou 3 mg, em vez de 1 mg normal de ferro, é absorvido diariamente a partir do trato gastrointestinal. Ao longo de um período de 20-30 anos no sexo masculino, conduz a uma acumulação de 20-30 g de ferro, em vez do valor normal de 3-4 g. O ferro acumulado é armazenado em depósitos de hemossiderina no fígado, pâncreas, pele e articulações. Quando os depósitos de ferro total do corpo são aumentados e os depósitos de hemossiderina são generalizados, ocorre a hemossiderose. Isto pode resultar de um aumento de ingestão de ferro ou de um aumento da lise dos glóbulos vermelhos e o aumento da absorção de ferro, que acompanha a eritropoiese, no caso de um mecanismo compensatório. Quando os depósitos de hemossiderina começam a perturbar as funções celulares e dos órgãos normais, a desordem é designada hemocromatose.²

Silício

O silício é o segundo elemento mais abundante na crosta terrestre e é normalmente encontrado como sílica (SiO_2) ou como silicatos, sendo este último o grupo mineral mais abundante.

A superfície de silício é, a não ser que modificado, coberto com uma camada de alguns nm de espessura de sílica amorfa. Tal faz com que uma camada de um material amorfo de outra forma cristalina tenha um comportamento semelhante à sílica amorfa em termos de dissolução. Como um metalóide, o silício possui propriedades desejáveis aplicáveis para semicondutores e células solares, mas também é amplamente utilizado nos vidros, cerâmicas e materiais refractários e como elemento de liga para muitos tipos de aço e ligas de alumínio. Isto pode causar riscos humanos para uma ampla variedade de silício contendo partículas em pó como por exemplo em áreas ocupacionais. Um grande número de investigações sobre a estabilidade de partículas de sílica modificadas em seres humanos e as suas propriedades de dissolução foram realizados durante os últimos 60 anos. As

partículas transportadas pelo ar estão associados a efeitos adversos na saúde humana e vários estudos utilizando tanto abordagens in-vitro como in-vivo têm sido realizados para avaliar como os seres humanos podem ser afetados por, por exemplo, sílica e amianto. Estes estudos têm mostrado que a dissolução da sílica depende do pH, do tamanho de partícula, da presença de cátions e os sais e a presença de agentes complexantes. No entanto, poucos estudos têm abordado a dissolução de sílica em soluções biológicas sintéticas.

O processo de dissolução da sílica em água ocorre com a despolimerização através da hidrólise, onde o íon hidroxilo, OH⁻, atua como um catalisador e temporariamente muda o número de coordenação de átomos de silício na superfície resultando em ligações mais fracas de oxigênio para a camada subjacente do silício. Em soluções alcalinas, o início do processo é regido pela adsorção do íon hidroxilo seguido pela libertação de Si (OH)₄ em solução. Quando o pH de silício se encontra abaixo de 11 é rapidamente hidrolisado em Si (OH)₄ e OH⁻, e o íon hidroxilo é livre para repetir o processo. Este processo é deprimido em condições ácidas. Alguns íons hidroxilo também estão envolvidos na formação de Si (OH)₅⁻. Quando o pH se encontra acima de 11 o Si (OH)₄ é convertido em Si (OH)₅⁻ resultando numa solução não-saturada e uma dissolução contínua de sílica.

Foi mostrado que o alumínio reduz a solubilidade da sílica em condições alcalinas, através de diferentes mecanismos. A um pH fracamente alcalino, o Al em formas de solução carregada negativamente em locais de aluminossilicato sobre a superfície de silício, repele interações de OH⁻, diminuindo desse modo a taxa de dissolução do Si. Mesmo pequenas quantidades de Al, 40-100 mg / L, presente em solução já provou reduzir significativamente a solubilidade do Si. O alumínio hidrolisado em condições ácidas tem sido mostrado para enfraquecer as ligações Si-O em gel de sílica, aumentando assim a dissolução do silício.

O mecanismo de Fe em combinação com sílica não tem sido tão intensamente investigado como para o Al, mas tem mostrado um similar, embora mais fraco, efeito sobre a taxa de dissolução. Outros cátions, tais como Mg²⁺, Ca²⁺, Ba²⁺, Na⁺, K⁺ e Li⁺ também têm um forte efeito sobre a dissolução de partículas de sílica. Outros compostos que normalmente estão em contacto com a sílica são os ácidos orgânicos, como por exemplo ácido cítrico. O ácido cítrico aumenta tanto a dissolução do silício e do alumínio em toda a gama de pH,

embora o seu efeito diminua com a diminuição do pH.³

Alumínio

O alumínio é o terceiro elemento mais abundante na crosta da Terra (Gupta et al., 2013). O alumínio ocorre naturalmente no ar, água e solo. A mineração e o processamento do alumínio elevam o seu nível no ambiente (ATSDR, 2010). Recentes investigações sobre toxicologia ambiental revelaram que o alumínio pode apresentar uma grande ameaça para os seres humanos, animais e plantas podendo causar muitas doenças (Barabasz et al., 2002). Muitos factores, incluindo o pH da água e o teor de matéria orgânica, influenciam grandemente a toxicidade do alumínio. Com a diminuição do pH aumenta a sua toxicidade (Jeffrey et al., 1997). A mobilização de iões de alumínio tóxicos, resultantes de mudanças no pH do solo e da água causada por chuvas ácidas e aumentando a acidificação da atmosfera circundante, têm um efeito adverso sobre o meio ambiente. Este manifesta-se pela secagem das florestas, intoxicação por plantas, o declínio da cultura ou fracasso, morte de animais aquáticos, e também por vários desequilíbrios no funcionamento dos sistemas humanos e animais (Barabasz et al., 2002). Um pH da camada superficial do solo inferior a 5 (pH <5) pode levar a acidez do solo que é uma grande preocupação em torno do mundo, que afecta a produção vegetal. Devido à toxicidade do alumínio, a produção de culturas foi restringido a 67% da área total do solo ácido no mundo. O alumínio é um dos elementos mais comumente encontrados na crosta terrestre. Devido aos solos ácidos (pH <5), o silício fica lixiviado deixando para trás alumínio em forma sólida conhecido como oxihidróxidos de alumínio, tais como gibbsita e boehmite. Estas formas instáveis de descarga de alumínio fitotóxico são conhecidos como Al (OH) 63+ no solo (Ermias Abate et al., 2013). A interacção de Al³⁺ com a via apoplástica, membrana do plasma, e os alvos simplásticos conduz a uma toxicidade e desvia os processos físicos e celulares em plantas. As manifestações comuns são a inibição do crescimento radicular, a modificação celular em folhas, folhas pequenas e verdes escuras, amarelecimento e morte das folhas, clorose e necrose foliar (Gupta et al., 2013). O alumínio em altas concentrações é muito tóxico para os animais aquáticos, especialmente para a respiração branquial em organismos como o dos peixes, causando

insuficiência osmorregulatória por destruição de iões do plasma e da hemolinfa. A actividade da enzima branquial, essencial para a absorção de iões, é inibida pela forma monomérica de alumínio em peixes (Rosseland et al., 1990). Os organismos vivos em água, tais como algas e lagostim, também são afetados pela toxicidade do Al (Bezak-Mazur, 2001). O alumínio não tem nenhum papel biológico e é um metal tóxico não essencial para os microrganismos (Olaniran et al., 2013). As enzimas tais como hexoquinase, fosfodiesterase, fosfatase alcalina são inibidas por alumínio, uma vez que têm uma maior afinidade para o DNA e RNA. As vias metabólicas no organismo vivo envolvendo cálcio, fósforo, flúor e metabolismo do ferro são afetados pelo alumínio. O alumínio demonstrou ser muito prejudicial para as células nervosas, ósseas e hematopoiéticas (Barabasz1 et al., 2002).

O alumínio interfere com a maioria dos processos físicos e celulares. O mecanismo exato de absorção de alumínio pelo trato gastrointestinal não é completamente compreendido. Com base na análise da literatura científica, é difícil estabelecer um período de tempo adequado para a toxicidade de alumínio uma vez que alguns sintomas da toxicidade do alumínio podem ser detectados em segundos e outros em minutos após a exposição ao alumínio (OMS, 1997). A toxicidade ao alumínio provavelmente resulta da interação entre o alumínio e a membrana do plasma, apoplásticos e alvos simplásticos (Kochian et al., 2005). Nos seres humanos o Mg^{2+} e Fe^{3+} são substituídos por Al^{3+} , o que faz com que muitos distúrbios estejam associados com a comunicação intercelular, o crescimento celular e as funções secretoras. As alterações que são evocadas em neurónios por alumínio são semelhantes às lesões degenerativas observadas em doentes com Alzheimer. As maiores complicações da toxicidade de alumínio são efeitos de neurotoxicidade, tais como atrofia neuronal no locus ceruleus, substância negra e corpo estriado (Sohani & Meral, 2007).

O alumínio existe somente num estado de oxidação (3+) no ambiente. As principais vias de consumo de alumínio por seres humanos são por inalação, ingestão e contato dérmico e fontes de exposição a água potável, alimentos, bebidas, e drogas contendo alumínio. O alumínio está naturalmente presente nos alimentos. O alumínio e os seus compostos são absorvidos pelos seres humanos, embora a taxa à qual eles são absorvidos não foi claramente estudado. Os sintomas que indicam a presença de quantidades mais elevadas

de alumínio no corpo humano são náuseas, úlceras na boca, úlceras na pele, erupções na pele, vômitos, diarreia e dores artríticas. Estes sintomas foram, no entanto, relatados como sendo de leve e curta duração (Clayton, 1989). A exposição ao alumínio é provavelmente um fator de risco para o aparecimento da doença de Alzheimer (DA) em seres humanos, como hipótese pela OMS, 1997. A dermatite de contato e a dermatite irritante verificaram-se em pessoas que foram expostas ao alumínio no seu local de trabalho. O alumínio mostrou efeitos adversos para o sistema nervoso e resultou na perda de memória, problemas de equilíbrio e perda de coordenação (Krewski et al., 2009). As pessoas que sofrem de doenças renais têm dificuldade em eliminar o alumínio do corpo, resultando na acumulação do mesmo levando a danos ósseos e cerebrais. Alguns fatores que provavelmente apresentam um risco para o desenvolvimento de toxicidade ao alumínio são a vida em ambientes empoeirados, nutrição intravenosa de longo prazo, a função renal diminuída, hemodiálise, beber ou ingerir substâncias que são ricas em teor de alumínio, trabalhar num ambiente que contém altos níveis de alumínio. Os pacientes submetidos à diálise renal podem expor-se ao alumínio presente em dialisados contaminados e aglutinantes de fosfato. Níveis mais elevados de exposição ao alumínio pode alterar a evolução de hiperparatiroidismo secundário, que conduz a outras doenças tais como a doença óssea adinâmica induzido por alumínio e osteomalacia induzida por alumínio, ambos são caracterizados por uma baixa remodelação óssea (Andia, 1996). Algumas das outras complicações associadas à toxicidade de alumínio são problemas pulmonares, anemia, deficiência na absorção de ferro, problemas no sistema nervoso.⁴

Enxofre

O enxofre é um nutriente essencial; disponível no solo na forma de sulfato, as plantas são capazes de reduzir o enxofre inorgânico, para utilização num grande número de metabólicos primários e secundários.⁵

Devido à versatilidade do átomo de enxofre e à sua prevalência no ambiente primordial, não é surpreendente que o enxofre tenha evoluído para preencher muitas funções estruturais, catalíticas, e de regulação em biologia. O enxofre é um suporte de vida nos seguintes

processos de: redução do enxofre elementar para H₂S fornecendo uma fonte de energia a Desulfuromonas e archaea; oxidação de H₂S em enxofre elementar fornecendo uma fonte de energia a Beggiatoa; H₂S ou oxidação S⁰ para sulfato fornece uma fonte de energia em Thiobacillus e archaea; Redução de sulfato ou sulfito a H₂S fornece uma fonte de oxigénio para Desulfovibrio, arqueobactérias; A divisão de H₂S durante a fotossíntese fornece uma fonte de átomos de hidrogénio a bactérias de enxofre púrpura e verdes. O enxofre covalentemente ligado, numa ampla gama de estados de oxidação, é determinante para a estrutura e função de muitos sistemas biológicos.⁶

Cloro

O gás de cloro (Cl₂) é um importante produto químico industrial. Nos Estados Unidos, na Europa, e noutras partes do mundo, vários milhões de toneladas de Cl₂ são produzidos anualmente. A sua libertação acidental na atmosfera pode causar mortalidade e morbidez significativa para os seres humanos e animais. A exposição ao cloro leva principalmente ao edema pulmonar e doenças pulmonares restritivas e obstrutivas. Outros sintomas clínicos incluem dispneia, tosse, pneumonia, cianose, náuseas, vômitos e perda de consciência.⁷

Distribuição mineral no corpo

Deve notar-se que 96% do peso corporal é composto de quatro elementos ligados organicamente (de carbono, hidrogénio, oxigénio e azoto). Os principais cátions e aniões juntos relatam 3,5% do peso corporal, o restante compreende elementos adicionais.

As percentagens dos constituintes de macrominerais do corpo são indicados pelos dados seguintes que mostra as médias de análises de 18 novilhos de diferentes idades exclusivas do conteúdo do trato digestivo (Hogan e Nierman, 1927).

Tipicamente, o Ca representa cerca de 46% e o P cerca de 29% dos minerais corporais totais. O Potássio, S, Na, Cl e Mg juntos representam cerca de 25%, enquanto que os oligoelementos essenciais constituem menos de 0,3% do total. A distribuição mineral dentro dos tecidos do corpo não é uniforme, uma vez que alguns tecidos concentram seletivamente elementos específicos. No entanto, as proporções de cada mineral, expressa em quantidade

Table 1: Média e desvio padrão dos valores obtidos nos grupos controle e teste, com a respectiva significância estatística (valor de *p*).

Elementos	Controlo
Cálcio	1,33
Fósforo	0,74
Potássio	0,19
Sódio	0,16
Enxofre	0,15
Cloro	0,11
Magnésio	0,04

de substância seca isenta de gordura corporal, são muito semelhantes entre as espécies em mamíferos e aves de capoeira adultas (Scott et al., 1982).

Cada órgão, em conformidade com a sua função, tem uma composição mineral característica, que por sua vez é muito semelhante em todos os mamíferos. No entanto, após um período de desnutrição ou de privação de água, há um forte aumento do conteúdo mineral [matéria seca isenta de gordura (OM)]. Deve notar-se que as concentrações de Na, K e Cl do corpo são constantes durante todas as fases do desenvolvimento do embrião até ao seu desenvolvimento completo, enquanto que os teores de Mg, Ca e de P no embrião são apenas uma metade da respectiva concentração no animal adulto.

O osso é o principal local de armazenamento para muitos dos elementos essenciais. Entre 80% e 85% da matéria mineral total do corpo, ou de cinzas, do corpo está localizada nos tecidos do esqueleto e consiste principalmente em sais de Ca, P e Mg. Assim, 99% do total de Ca, de 80 a 85% de P e cerca de 70% de Mg estão presentes no osso (Underwood, 1981). A glândula tireóide é o local mais específico de armazenamento, sendo que não menos do que 80% do total do corpo é normalmente encontrado lá. Ao contrário do Ca, P e Mg no osso, o I na tiroide e o Co como parte da vitamina B12, a maior parte dos minerais encontram-se distribuídos uniformemente por todo o corpo, onde estes existem em várias

combinações funcionais e em concentrações características. Estes elementos devem ser mantidos dentro de limites bastante estreitos, a integridade funcional e estrutural dos tecidos deve ser salvaguardada, a saúde e a produção otimizadas.⁸

Alcoolismo

O consumo excessivo de álcool é um importante problema de saúde na maioria das sociedades. Além das questões sociais e de interferência na vida do doente, o alcoolismo está associado a doença hepática alcoólica, cujo espectro se situa desde as alterações subclínicas, iniciais, das enzimas hepáticas; até às situações de descompensação da função hepática, potencialmente letais, na hepatite alcoólica.

O metabolismo do etanol ocorre principalmente no fígado através de duas vias. A principal via de metabolismo, utiliza desidrogenase alcoólica e acetaldéido-desidrogenase, que convertem o etanol através do acetaldéido em acetato, convertido em acetil-CoA. Nestas duas reações são produzidos NADH e H⁺. Desta forma, a ingestão de grandes quantidades de etanol aumenta a proporção de NADH / NAD⁺ intracelular. Elevadas concentrações de NADH favorecem a formação de lactato a partir de piruvato, que pode provocar acidose láctica. A diminuição da concentração de piruvato (necessário para a reação da piruvato carboxilase) inibe a gluconeogénese. Em casos graves de intoxicação etanólica, quando o glicogénio hepático está esgotado e já não está disponível para a glicogenólise, ocorre hipoglicémia. A segunda via compreende um citocromo P450 microsomal (sistema oxidante de etanol crosómico), que também produz acetaldéido.

O acetaldéido é uma molécula muito reativa e pode formar aductos com proteínas, ácidos nucleicos e outras moléculas. Parece provável que a sua capacidade de reagir com várias moléculas esteja relacionado com a causa dos efeitos tóxicos do etanol. O etanol também parece ser capaz de interpor em membranas biológicas, que se expande e aumenta o fluxo. Quando as membranas afectadas são excitáveis, isto provoca alterações do potencial de ação, modifica o transporte membranar, e também afeta a liberação de neurotransmissores.⁹

O consumo de álcool é comum nos países ocidentais. O abuso de álcool é uma

das principais causas de morte evitáveis e de patologia hepática. A doença hepática alcoólica continua a ser uma importante causa de morte em indivíduos com transtorno de abuso de álcool. Em Espanha, 4,4% da população em geral entre os 15 e 64 anos de idade consome álcool em excesso. A mortalidade relacionada com o álcool afeta desproporcionalmente os indivíduos mais jovens, o que resulta em 2,3 milhões de anos de vida potencialmente perdidos, ou cerca de 30 anos de vida perdidos por morte associada ao álcool. A associação causal entre a ingestão de álcool e a doença hepática alcoólica encontra-se bem estabelecida, mas apenas uma pequena proporção de indivíduos que bebem excessivamente desenvolvem cirrose hepática. No entanto, a doença hepática alcoólica confere um elevado risco de morte em idade precoce, especialmente em jovens e adultos de meia idade. Os dados epidemiológicos e clínicos têm indicado que o prognóstico da dependência do álcool é afetado negativamente pela comorbilidade médica, mas os marcadores precoces de má sobrevivência são escassos. Em modelos animais, a inflamação sistêmica tem sido associada ao aumento da permeabilidade intestinal, fundamental no desenvolvimento de patologia associada ao consumo de álcool. Nos seres humanos, a maioria dos estudos sobre a inflamação e a permeabilidade intestinal foram realizados em pacientes com cirrose hepática estabelecida, mas pouco se conhece sobre os doentes com doença hepática menos avançada.¹⁰

Estudos recentes indicam que o etanol no sistema digestivo liberta HMGB1 que ativa TLR4 fazendo com que o intestino liberte endotoxina LPS como produtos bacterianos que estimulam a indução de citocinas pró-inflamatórias no fígado, aumentando assim as citocinas circulantes. A inflamação sistêmica está associada a um conjunto de comportamentos de doença, incluindo a disfunção cognitiva e emocional, depressão, febre, letargia, e perturbações da memória. As células da microglia hiper-ramificadas induzidas por etanol foram implicadas na ativação induzida por álcool de vias de sinalização neuroimunes no cérebro. Em ratos, a exposição ao etanol intermitente e crônica sensibiliza as células da microglia, preparando-as para posterior ativação e aumento da expressão de citocinas pró-inflamatórias que fornecem uma evidência indireta para o papel destas células na neuroinflamação e neurotoxicidade induzida pelo álcool.¹¹

Num estudo de Ganna M. SHAYAKHMETOVA em 2014, apresentam-se os efeitos do alcoolismo crónico sobre os níveis testiculares de aminoácidos livres, as taxas de expressão do mRNA CYP3A2 e processos de fragmentação de DNA, bem como mudanças no conteúdo de colesterol e de proteínas do grupo tiol, que permite obter uma estimativa complexa dessa influência patológica nas gónadas masculinas, especialmente no metabolismo de aminoácidos, proteínas, ATP e NADPH. Os resultados deste estudo revelam mudanças profundas genómica e proteómicas a nível testicular, que sugere implicações negativas da exposição ao etanol na regulação celular da espermatogénese a longo prazo.¹²

O consumo crónico de álcool pode afetar negativamente a função do sistema nervoso central e produzir uma insuficiência na aprendizagem e na memória em animais e seres humanos. O hipocampo, uma região importante para a função de memória, pode recuperar-se de disfunção da memória causadas pela ingestão prolongada de álcool. Estudos electrofisiológicos, morfológicos e comportamentais demonstraram que as mudanças no hipocampo podem ser induzidas por ingestão crónica de álcool.¹³ O consumo de bebidas alcoólicas em excesso está ligado não apenas a patologia hepática, mas também cardíaca, hematológica e metabólica. A miopatia alcoólica é relativamente comum e apresenta vários subtipos clínicos: assintomático, agudo, crónico, hipocaliémico e associado a cardiomiopatia. São de destacar duas formas de miopatia alcoólica: a forma aguda com rabdomiólise, ocasionalmente complicada por mioglobínúria e insuficiência renal aguda; e a forma crónica, muito mais comum, que é caracterizada por fraqueza e atrofia de músculos proximais.¹⁴

Na hepatite alcoólica, a produção de citocinas inflamatórias e espécies reativas de oxigénio (ROS) desempenham um papel importante no desenvolvimento e progressão da doença hepática. O papel do etanol e a inflamação mediada por etanol na patogénese da hepatite alcoólica, em conjunto com a importância da translocação bacteriana mediada por etanol (em Gram-negativos e Gram-positivos) foi submetida a pesquisa robusta na última década. No entanto, os efeitos do metabolismo do etanol e ROS aumentada e a produção de citocinas são de modo algum limitados ao fígado. Juntamente com o aumento do conhecimento sobre as vias metabólicas importantes, através da qual o consumo de etanol leva ao desenvolvimento de hepatite alcoólica, também tem sido demonstrado que

as citocinas e lipopolissacáridos (LPS) podem induzir lesão à distância em alcoólicos, mesmo naqueles sem significativa doença hepática. Existe uma relação clara entre lesão oxidativa, inflamação e doenças associadas ao alcoolismo, tais como disfunção cerebral, doenças ósseas e musculares, alterações pulmonares, aumento da gravidade das infecções, desnutrição, e um aumento da prevalência de doenças cardiovasculares ou cancro.¹⁵

Histologia da Língua

A língua é uma massa de músculo estriado esquelético revestida por uma camada mucosa cuja estrutura varia de acordo com a região. As fibras musculares entrecruzam-se em três planos; estão agrupadas em feixes, geralmente separados por tecido conjuntivo. A camada mucosa está fortemente aderida à musculatura, porque o tecido conjuntivo da lâmina própria penetra os espaços entre os feixes musculares. A superfície ventral (inferior) da língua é lisa, enquanto que a superfície dorsal é irregular, recoberta anteriormente por uma grande quantidade de eminências pequenas denominadas papilas. O terço posterior da superfície dorsal da língua é separado dos dois terços anteriores por uma região em forma de "V". Posteriormente a essa região, a superfície da língua apresenta saliências compostas principalmente por dois tipos de agregados linfóides: pequenos grupos de nódulos e tonsilas linguais, nas quais os nódulos linfóides se agregam ao redor de invaginações da camada mucosa denominadas criptas (Figura 1).

Papilas Linguais

As papilas são elevações do epitélio oral e da lâmina própria que assumem diversas formas e funções. Existem quatro tipos (Figura 1): filiformes, fungiformes, foliadas e caliciformes ou circunvaladas. As **papilas filiformes** têm um formato cônico alongado, são numerosas e estão sobre toda a superfície dorsal da língua; têm a função mecânica de fricção. O seu epitélio de revestimento, que não contém corpúsculos gustativos, é queratinizado. As **papilas fungiformes** assemelham-se a cogumelos, tendo uma base estreita e uma porção superior mais superficial dilatada e lisa. Essas papilas, que contêm poucos corpúsculos

gustativos na sua superfície superior, estão irregularmente distribuídas entre as papilas filiformes. As **papilas foliadas** são pouco desenvolvidas em humanos, porém encontradas em macacos e coelhos. Elas consistem em duas ou mais rugas paralelas separadas por sulcos na superfície dorso lateral da língua, contendo muitos corpúsculos gustativos. As **papilas caliciformes** ou **circunvaladas** são 7 a 12 estruturas circulares grandes, cujas superfícies achatadas se estendem acima das outras papilas. Elas estão distribuídas na região do V lingual, na parte posterior da língua. Numerosas glândulas serosas (glândulas de von Ebner) secretam o seu conteúdo no interior de uma profunda depressão que circunda cada papila. Esse arranjo similar a um fosso possibilita um fluxo contínuo de líquido sobre uma grande quantidade de corpúsculos gustativos ao longo das superfícies laterais dessas papilas. Este fluxo é importante na remoção de partículas de alimentos adjacentes aos corpúsculos gustativos, para que eles possam receber e processar novos estímulos. As glândulas serosas também secretam uma lipase que provavelmente previne a formação de uma camada hidrofóbica sobre os corpúsculos gustativos, o que poderia prejudicar a sua função. Além deste papel local, a lipase lingual tem um papel ativo no estômago e pode digerir até 30% dos triglicerídios da dieta. Outras glândulas salivares menores de secreção mucosa dispersas pela cavidade oral atuam da mesma maneira que as glândulas serosas associadas às papilas circunvaladas, auxiliando a função dos corpúsculos gustativos encontrados noutras partes da cavidade oral, como, por exemplo, na porção anterior da língua.¹⁶

As papilas fungiformes e circunvaladas apresentam na espessura do seu revestimento epitelial, terminações sensitivas diferenciadas, de forma ovoide, os **corpúsculos gustativos**. Estas formações são compostas por cerca de 50-90 células que se dispõem como os gomos de uma laranja (Figura 2), apresentando no seu conjunto uma câmara gustativa central, de localização apical. A porção basal do corpúsculo gustativo contacta com um terminal nervoso, extensão dos gânglios sensoriais do nervo facial e do glossofaríngeo.¹⁷

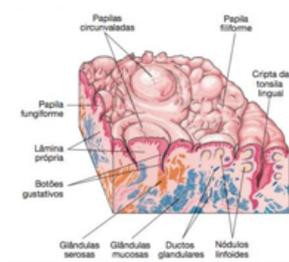


Figure 1: Superfície da língua na região próxima ao V lingual, entre as porções anterior e posterior. Estão presentes os nódulos linfóides, tonsilas linguais, glândulas e papilas.¹⁶

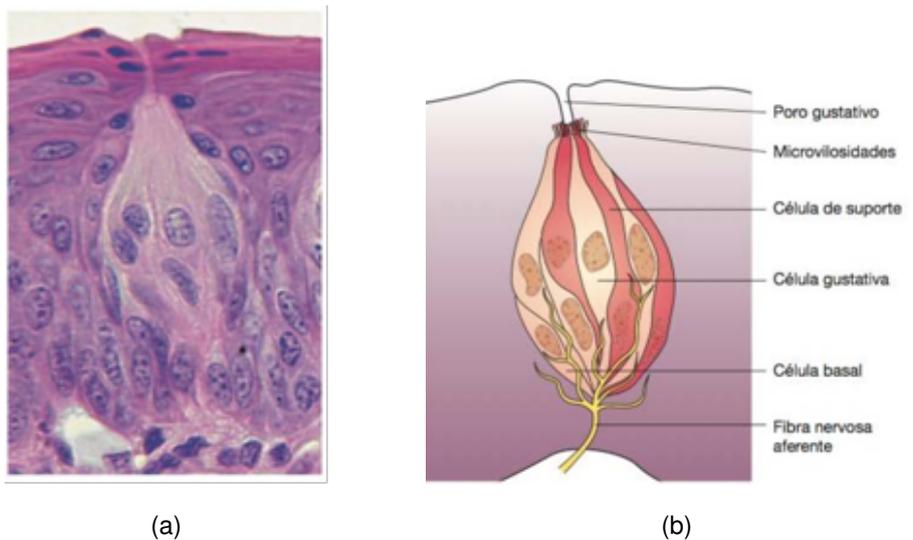


Figure 2: Fotomicrografia e esquema de um corpúsculo gustativo. O esquema ilustra diversos tipos celulares (células basais, gustativas e de suporte) e fibras nervosas aferentes que, após estímulo, transmitirão a informação sensorial aos neurónios centrais associados à gustação.¹⁶

Objetivos

O objetivo do presente trabalho é procurar reconhecer os efeitos sobre a composição atômica, nomeadamente em relação aos elementos químicos alumínio, enxofre, cloro, potássio, cálcio e ferro na língua num modelo de alcoolismo experimental.

Materiais e Métodos

Para o desenvolvimento deste trabalho, utilizou-se uma amostra de 20 ratos Wistar machos com 8 semanas de idade no início do estudo e mantidos nas condições padrão de manutenção e manipulação, de acordo com a legislação em vigor.

Os animais foram divididos aleatoriamente em dois grupos (n=7 em cada grupo). O período experimental decorreu durante 4 semanas para os dois grupos: Grupo I: constitui o grupo controlo, mantido sem manipulação indutora de alterações.

Grupo II: constitui o grupo teste, ao qual foi induzido alcoolismo experimental através da administração de uma solução de etanol a 5% que substituiu a água de bebida. No final do período experimental, todos os animais foram sacrificados por sobredosagem anestésica. Foi realizada uma necrópsia completa com recolha de todos os órgãos e que permitiu excluir a presença de patologia não induzida. De cada animal foi colhida a língua, perfazendo um total de 28 amostras.

As amostras foram analisadas pela técnica de fluorescência de raios-X (Hitachi modelo SEA 6000VX, Figura 3). Em cada amostra foi escolhido um local onde se fez-se incidir o feixe de raio-X colimado (com uma área de 0,5x0,5mm, Figura 5), com energia de 15 keV e com tempo de exposição de 200s em cada uma das amostras. A energia de 15 keV tem capacidade de detetar elementos desde o sódio até ao ferro. Utilizou-se o gás inerte hélio (He) para que interferências relativas ao ar atmosférico, especificamente do gás árgon (Ar), fossem anuladas.



Figure 3: Equipamento de análise por Fluorescência de Raios-X (Hitachi modelo SEA 6000VX) Fonte: imagem fotografada pelo autor.

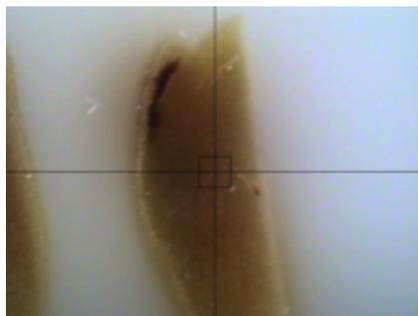


Figure 4: Ilustração do local de incidência do feixe de raios-X. Fonte: imagem fotografada pelo autor.

Fluorescência de Raio-X

A gama da radiação de raios-X é a região que compreende os comprimentos de onda entre 10^{-2} e 10 nm, tendo energias muito superiores ao visível. Esta radiação energética está associada a transições eletrônicas nas camadas internas de um átomo.¹⁸

Em 1895, Rontgen descobriu os raios-X e obteve a primeira radiografia da história à mão da sua esposa. Em 1911, Barkla verificou que quando um elemento é estimulado por raios-X de energia adequada, é emitida uma radiação específica e característica desse mesmo elemento. Apenas nos anos 40, este tipo de radiação foi reconhecida como útil na identificação de elementos. Esta técnica teve que aguardar pelo desenvolvimento tecnológico e de instrumentação até ser considerada eficaz. (19)

Um determinado elemento pode ser ionizado caso seja irradiado com uma radiação de energia adequada. Um fóton tenderá a arrancar um elétron, o mais próximo possível do núcleo deixando deste modo uma lacuna no seu lugar, caso tenha energia suficiente. Esta lacuna, pode ser preenchida por elétrons da camada seguinte ou mesmo de camadas mais afastadas. Estas transições originam, deste modo, a emissão de raios-X "característicos". As lacunas que vão sendo criadas e, posteriormente, serão preenchidas desde a camada mais próxima do núcleo, até à mais afastada de modo a que o ião esteja novamente no estado fundamental.^{19,20}

A técnica de análise por Fluorescência de Raios-X (XRF) permite identificar praticamente todos os elementos presentes na tabela periódica. Os elementos que tenham um número atómico inferior a 11 (sódio) apresentam energias de emissão de raios-X característico inferiores a 1 keV, não detetáveis na maioria dos equipamentos. Esta técnica, quando comparada a outras técnicas de identificação, é rápida e tem custos reduzidos (Figura ??). As vantagens principais deste método de identificação são o facto de não ter potencial destrutivo, não ser necessário tratamento prévio de amostra, ser seguro, simples, permitir a identificação de vários elementos numa só determinação e permitir a utilização de amostras sólidas, líquidas e gasosas. As desvantagens da técnica de Fluorescência de Raios-X assentam no facto de a interpretação dos espectros bem como a quantificação da abundância

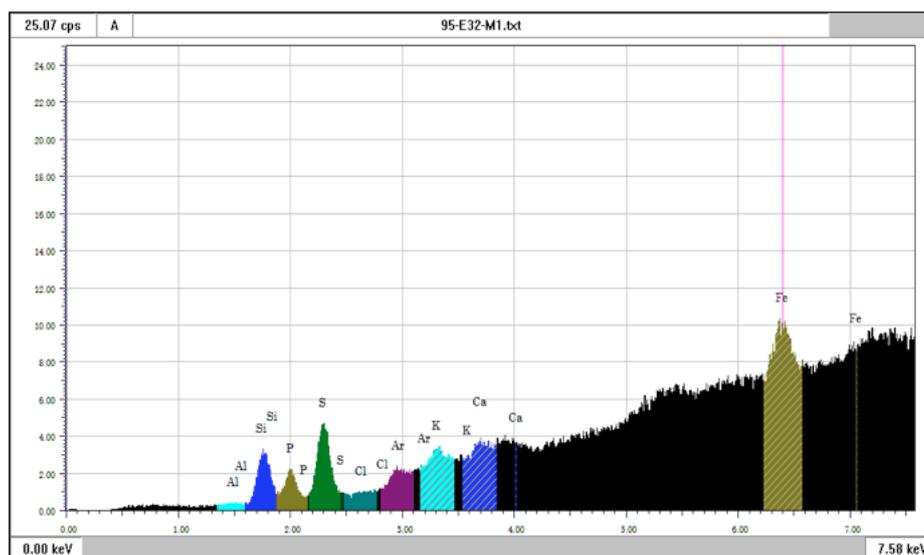


Figure 5: Gráfico do espectro resultante da análise de uma amostra.

de cada elemento, ser bastante complexo. Nesta interpretação há que ter em consideração a presença constante da radiação de fundo, que consiste na emissão de radiação pelos elementos constituintes do equipamento, da fonte de raios-X e plataformas de colocação de amostra. É também impossível determinar quantitativamente amostras irregulares e que apresentem uma distribuição elementar heterogénea.²¹

A análise estatística foi feita com o programa estatístico R. O programa R é uma aplicação de distribuição livre dedicado á estatística computacional e gráfica. Este programa utiliza a linguagem R (o mesmo nome do programa), derivada da linguagem S criada no laboratórios Bell, pertencendo actualmente á Lucent Technologies. O R fornece várias recursos estatísticos (modelos lineares, modelos não lineares, testes estatísticos, análises de séries no tempo, “clustering”,...), ferramentas gráficas e programação orientada a objectos, podendo ser estendido através da instalação de módulos.

As funções utilizadas no programa R para o cálculo da média e do desvio padrão foram a função `mean()` e a função `sd()`, respectivamente. A função `mean()` calcula uma média aritmética a partir de um vetor que recebe como argumento, implementando a (equação 1), onde μ é a média, n o número de amostras e n_i amostra de índice i . A função `sd()` calcula o desvio padrão de um vetor que recebe como argumento, implementado a equação

(equação 2), onde σ é o desvio padrão, N o número da amostra, μ a média e x_i a amostra de índice i .

$$\mu = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n n_i \quad (1)$$

$$\sigma = \sqrt{\frac{1}{N} \sum_{i=1}^N (x_i - \mu)^2} \quad (2)$$

Para calcular os teste *t*-Student, utilizou-se a função `ttest()`. Esta função recebe dois vectores como argumentos, mantendo-se as opções por defeito que são: teste de duas caudas, correcção de *Welch* para a não homogeneidade da variância e intervalo de confiança de 95%. O teste *t* de *Welch* é definido pela seguinte fórmula:

$$t = \frac{\bar{X}_1 - \bar{X}_2}{\sqrt{\frac{s_1^2}{N_1} + \frac{s_2^2}{N_2}}} \quad (3)$$

onde \bar{X} é a média da amostra, s^2 é a variância da amostra e N o tamanho da amostra.

Resultados

O valor médio das contagens descrito de forma sucinta na Tabela 2 foi o que se descreve de seguida. O valor médio por segundo para o Al foi de $0,49 \pm 0,42$ no grupo controlo e de $0,22 \pm 0,50$ no grupo teste, não evidenciado uma diferença estatisticamente significativa. O P mostrou um valor médio de contagens por segundo de $28,53 \pm 7,65$ no grupo controlo, diminuindo para $17,39 \pm 9,88$, evidenciando uma diferença estatisticamente significativa ($p=0,0006$). O S mostrou um valor médio de contagens por segundo de $75,18 \pm 18,84$ no grupo controlo, diminuindo para $60,22 \pm 10,79$, evidenciando uma diferença estatisticamente significativa ($p=0,0090$). O valor médio das contagens por segundo para o Cl foi de $1,39 \pm 2,90$ no grupo controlo e de $7,65 \pm 15,28$ no grupo teste, evidenciado uma diferença estatisticamente significativa ($p=0,0481$). O K mostrou um valor médio de contagens por segundo de $27,68 \pm 31,99$ no grupo controlo, diminuindo para $14,43 \pm 6,78$, não evidenciando uma diferença estatisticamente significativa. O Ca obteve um valor médio de contagens por segundo de $30,25 \pm 7,08$ no grupo de controlo e $29,98 \pm 3,80$ no grupo de teste, não evidenciado uma diferença estatisticamente significativa. Por último o Fe obteve os valores de $48,94 \pm 15,46$ no grupo de controlo e $44,80 \pm 6,82$ no grupo de teste, não evidenciado uma diferença estatisticamente significativa.

O valor médio dos rácios descrito de forma sucinta na Tabela 3 foi o que se descreve de seguida. O rácio médio do valor médio das contagens por segundo entre Al/K foi de $0,01 \pm 0,027$ no grupo de controlo e de $0,03 \pm 0,059$ no grupo de teste, não evidenciado uma diferença estatisticamente significativa. O rácio médio do valor médio das contagens por segundo entre P/K foi de $1,32 \pm 1,499$ no grupo de controlo e de $1,31 \pm 0,652$ no grupo

Table 2: Média e desvio padrão dos valores obtidos nos grupos controlo e teste, com a respetiva significância estatística (valor de p).

Elementos	Controlo	Teste	valor de p
Al	0,49 \pm 0,420	0,22 \pm 0,502	0,0575
P	28,53 \pm 7,655	17,39 \pm 9,88	0,0006
S	75,18 \pm 18,840	60,22 \pm 10,79	0,0090
Cl	1,39 \pm 2,900	7,65 \pm 15,28	0,0481
K	27,68 \pm 31,991	14,43 \pm 6,78	0,0818
Ca	30,25 \pm 7,088	29,98 \pm 3,80	0,4501
Fe	48,94 \pm 15,461	44,80 \pm 6,82	0,1885

de teste, não evidenciado uma diferença estatisticamente significativa. O rácio médio do valor médio das contagens por segundo entre S/K no grupo de controlo foi de $0,32 \pm 4,031$ e no grupo de teste foi de $7,07 \pm 8,362$, não evidenciado uma diferença estatisticamente significativa. O rácio médio do valor médio das contagens por segundo entre Cl/K foi de $0,44 \pm 0,444$ no grupo de controlo e de $2,70 \pm 6,802$ no grupo de teste, não evidenciado uma diferença estatisticamente significativa. O rácio médio do valor médio das contagens por segundo entre Ca/K no grupo de controlo foi de $0,95 \pm 1,783$ e no grupo de teste foi de $3,33 \pm 3,483$, mostrando uma subida estatisticamente significativa ($p=0,0495$). O rácio médio do valor médio das contagens por segundo entre Fe/K no grupo de controlo foi de $0,39 \pm 2,978$ e no grupo de teste foi de $5,02 \pm 5,072$, não evidenciado uma diferença estatisticamente significativa. Relativamente ao rácio entre médio do valor médio das contagens por segundo entre Al/P no grupo de controlo foi de $0,02 \pm 0,017$ e no grupo de teste foi de $0,02 \pm 0,054$, não evidenciado uma diferença estatisticamente significativa. O rácio entre médio do valor médio das contagens por segundo entre S/P no grupo de controlo foi de $2,95 \pm 1,508$ e no grupo de teste foi de $6,11 \pm 7,187$, evidenciado uma diferença estatisticamente significativa ($p=0,0384$). O rácio entre médio do valor médio das contagens por segundo entre Cl/P no grupo de controlo foi de $0,93 \pm 0,980$ e no grupo de teste foi de $0,99 \pm 0,564$, não

evidenciado uma diferença estatisticamente significativa. O rácio entre médio do valor médio das contagens por segundo entre K/P no grupo de controlo foi de $0,05 \pm 0,107$ e no grupo de teste foi de $2,29 \pm 5,327$, mostrando uma subida estatisticamente significativa ($p=0,0414$). O rácio entre médio do valor médio das contagens por segundo entre Ca/P no grupo de controlo foi de $1,29 \pm 0,977$ e no grupo de teste foi de $3,02 \pm 3,343$, evidenciado mostrando uma subida estatisticamente significativa ($p<0,0224$). O rácio entre médio do valor médio das contagens por segundo entre Fe/P no grupo de controlo foi de $1,93 \pm 1,065$ e no grupo de teste foi de $4,62 \pm 5,507$, mostrando uma subida estatisticamente significativa ($p=0,0250$).

O rácio entre médio do valor médio das contagens por segundo entre Al/S no grupo de controle foi de $0,02 \pm 0,005$ e no grupo de teste foi de $0,00 \pm 0,009$, não evidenciado uma diferença estatisticamente significativa. O rácio entre médio do valor médio das contagens por segundo entre P/S no grupo de controle foi de $4,06 \pm 0,474$ e no grupo de teste foi de $0,29 \pm 0,138$, não evidenciado uma diferença estatisticamente significativa. O rácio entre médio do valor médio das contagens por segundo entre Cl/S no grupo de controle foi de $5,08 \pm 0,381$ e no grupo de teste foi de $0,25 \pm 0,114$, não evidenciado uma diferença estatisticamente significativa. O rácio entre médio do valor médio das contagens por segundo entre K/S no grupo de controle foi de $0,87 \pm 0,226$ e no grupo de teste foi de $0,13 \pm 0,249$, não evidenciado uma diferença estatisticamente significativa. O rácio entre médio do valor médio das contagens por segundo entre Ca/S no grupo de controle foi de $2,83 \pm 0,322$ e no grupo de teste foi de $0,51 \pm 0,106$, não evidenciado uma diferença estatisticamente significativa. O rácio entre médio do valor médio das contagens por segundo entre Fe/S no grupo de controle foi de $2,75 \pm 0,185$ e no grupo de teste foi de $0,77 \pm 0,193$, evidenciado uma diferença estatisticamente significativa ($p=0,0195$).

Quando se analisa a correlação entre os átomos identificados verifica-se que o coeficiente entre o Al e o K é de 0,316 , entre o P e o K é de 0,219 , entre o S e o K é de 0,095 , entre o Cl e o K é de 0,058 , entre o Ca e o K é de 0,049 , entre o Fe e o K é de 0,060 , entre o Al e o S é de 0,132 , entre o P e o S é de 0,078 , entre o Cl e o S é de 0,135 , entre o K e o S é de 0,263 , entre o Ca e o S é de 0,355 , entre o Fe e o S é de 0,019 , entre o Al e o P é de 0,335 , entre o S e o P é de 0,038 , entre o Cl e o P é de 0,422 , entre o K e o P é de 0,041 , entre o

Ca e o P é de 0,022 , entre o Fe e o P é de 0,025 (Tabela 4).

Table 3: Média e desvio padrão obtidos a partir dos coeficientes entre os vários elementos e o potássio, fósforo e enxofre no grupo controle.

Elementos	/K	/P	/S
Al	0,01 ± 0,027	0,02 ± 0,017	0,02 ± 0,005
P	1,32 ± 1,499	-	4,06 ± 0,474
S	0,32 ± 4,031	2,95 ± 1,508	-
Cl	0,44 ± 0,444	0,93 ± 0,980	5,08 ± 0,381
K	-	0,05 ± 0,107	0,87 ± 0,226
Ca	0,95 ± 1,783	1,29 ± 0,977	2,83 ± 0,322
Fe	0,39 ± 2,978	1,93 ± 1,065	2,75 ± 0,185

Table 4: Média e desvio padrão obtidos a partir dos coeficientes entre os vários elementos e o potássio, fósforo e enxofre no grupo teste.

Elementos	/K	/P	/S
Al	0,03 ± 0,059	0,02 ± 0,054	0,00 ± 0,009
P	1,31 ± 0,652	-	0,29 ± 0,138
S	7,07 ± 8,362	6,11 ± 7,187	-
Cl	2,70 ± 6,802	0,99 ± 0,564	0,25 ± 0,114
K	-	2,29 ± 5,327	0,13 ± 0,249
Ca	3,33 ± 3,483	3,02 ± 3,343	0,51 ± 0,106
Fe	5,02 ± 5,072	4,62 ± 5,507	0,77 ± 0,193

Table 5: Valores de p obtidos a partir dos coeficientes dos vários elementos com o potássio, fósforo e enxofre, entre o grupo controlo e teste.

Elementos	/K	/P	/S
Al	0,3166	0,1321	0,3352
P	0,2197	-	0,0384
S	0,0957	0,0782	-
Cl	0,0589	0,1358	0,4225
K	-	0,2638	0,0414
Ca	0,0495	0,3551	0,0224
Fe	0,0607	0,0195	0,0250

Table 6: Alteração dos elementos - Conclusão.

Elementos	Controlo	Teste
Al	Normal	↓
P	Normal	↓
S	Normal	↓
Cl	Normal	↑
K	Normal	↓
Ca	Normal	↓
Fe	Normal	↓

Discussão

O Fósforo está diminuído no tecido do grupo teste, o que pode indicar uma alteração funcional com a sua utilização. No meio celular o fósforo está implicado na constituição de varias moléculas, como por exemplo o ATP. Se há redução dos compostos com fósforo, como por exemplo o ATP devemos tentar perceber, se existe perda de moléculas de natureza proteica, tendo este átomo no grupo prostético. Seria interessante fazer um estudo proteómico para avaliar a sua presença. Poderá haver uma redução dos compostos com fósforo (por exemplo, fosfolípidos).

O Potássio está diminuído no grupo teste nos tecidos, o que deve ser entendido como provavelmente uma diminuição do potássio intracelular. Esta redução pode estar associada a vários tipos de ações como por exemplo a ação de retirar potássio da célula ou dificultar a sua mobilidade entre o meio intracelular e extracelular. É importante fazer um estudo de fisiologia celular. Observamos algumas alterações entre os átomos estudados, o que nos parece muito significativo em termos de estrutura e função, e podendo ser indicadores de que a ação do etanol possa interferir de forma significativa em termos estruturais e funcionais na língua. Seria interessante perceber se estas alterações estruturais e funcionais podem interferir com a incidência de lesões neoplásicas ou outros.

O Enxofre é parte da composição dos compostos orgânicos e inorgânicos. Está presente na cistina e cisteína, que são aminoácidos do grupo SH. Poderá verificar-se uma redução de proteínas que contêm enxofre. Seria interessante controlar e verificar através do estudo da proteómica, a identificação e quantificação.

Conclusões

Este estudo provou de um modo claro e objetivo que as causas desta etiologia estudada leva a alterações estruturais e elementais na topografia estudada (língua). É de facto interessante escrever que podemos identificar alterações elementais e provavelmente moleculares que antecedem as alterações morfológicas e histológicas. É necessário aprofundar este estudo com estudos moleculares de proteómica e de genómica, procurando relacionar a ação estrutural, elemental e com aspetos funcionais genéticos que antecedem as alterações morfológicas, e que provavelmente, correspondem a uma etapa temporal em que se pode ter uma ação preventiva e em que as alterações estão numa fase de reversibilidade.

Referências Bibliográficas

- [1] Quintas Alexandre, *Bioquímica - Organização Molecular da Vida*. LIDEL, 2008.
- [2] R. K. Murray, D. Granner, P. Mayes, and V. Rodwell, *Harper's biochemistry*. Englewood Cliffs, New Jersey, 1990.
- [3] G. Herting, T. Jiang, C. Sjöstedt, and I. Odnevall Wallinder, "Release of Si from Silicon, a Ferrosilicon (FeSi) Alloy and a Synthetic Silicate Mineral in Simulated Biological Media," *PLoS ONE*, vol. 9, no. 9, p. e107668, 2014.
- [4] M. Jaishankar, T. Tseten, N. Anbalagan, B. B. Mathew, and K. N. Beeregowda, "Toxicity, mechanism and health effects of some heavy metals," *Interdisciplinary Toxicology*, vol. 7, no. 2, pp. 60–72, 2014.
- [5] A. Calderwood, R. J. Morris, and S. Kopriva, "Predictive sulfur metabolism," *Frontiers in Plant Science*, vol. 5, no. November, pp. 1–10, 2014.
- [6] A. J. L. Cooper, "Regulatory Roles in Biology," vol. 19, no. 8, pp. 12789–12813, 2014.
- [7] C. Li, Z. Weng, S. F. Doran, R. K. Srivastava, F. Afaq, S. Matalon, and M. Athar, "Chlorine induces the unfolded protein response in murine lungs and skin," *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, vol. 49, no. 2, pp. 197–203, 2013.
- [8] L.R. McDowell, *Minerals in Animal and Human Nutrition*, vol. 992. Amsterdam, The Netherlands: Elsevier Science B.V, 2003.
- [9] H. Bioquímica, *HARPER Bio química ilustrada*.
- [10] D. Fuster, A. Sanvisens, F. Bolao, P. Zuluaga, I. Rivas, J. Tor, and R. Muga, "Markers of Inflammation and Mortality in a Cohort of Patients With Alcohol Dependence," *Medicine*, vol. 94, no. 10, p. e607, 2015.
- [11] F. T. Crews and R. P. Vetreno, "Mechanisms of neuroimmune gene induction in alcoholism," *Psychopharmacology*, 2015.

- [12] G. M. Shayakhmetova, L. B. Bondarenko, A. V. Matvienko, and V. M. Kovalenko, "Chronic alcoholism-mediated metabolic disorders in albino rat testes," *Interdisciplinary Toxicology*, vol. 7, no. 3, pp. 165–172, 2014.
- [13] R. Xu, S. R. Duan, J. W. Zhao, and C. Y. Wang, "Changes in expression of BDNF and its receptors TrkB and p75NTR in the hippocampus of a dog model of chronic alcoholism and abstinence," vol. 00, pp. 1–8, 2015.
- [14] A. P. J. Ferrari, "ESTUDO HISTOQUÍMICO DO MÚSCULO ESQUELÉTICO NO ALCOOLISMO CRÔNICO,"
- [15] E. González-Reimers, "Alcoholism: A systemic proinflammatory condition," *World Journal of Gastroenterology*, vol. 20, no. 40, p. 14660, 2014.
- [16] L. C. Junqueira, *Histologia Básica, Texto e Atlas*. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan, 12^o edição ed., 2013.
- [17] C. Gonçalves, *Histologia: texto e imagens - Histologia, Histogênese, Organogênese*. Coimbra: Coimbra University Press, 3^a edition ed., 2010.
- [18] R. D. Braun, *Introduction to instrumental analysis*. McGraw-Hill International Editions, 1987.
- [19] Birks; L.S., "X - ray Spectrochemical analysis," 1959.
- [20] A. Moreno, "Non-Destructive Characterization of Artworks in Paper Support Using Spectroscopic Techniques Non-Destructive Characterization of Artworks in Paper Support Using Spectroscopic Techniques," 2013.
- [21] G. L. Clark, *Physical Methods in Chemical Analysis, Volume 3*. New York: Academic Press Inc. Publishers, 1956.