

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE FÍSICA
GRUPO DE ESPECTROSCOPIA DE MATERIAIS
(GEM)

Trabalho de Conclusão de Curso II

Difração de raios X – Uma revisão bibliográfica acerca
das aplicações desta técnica na medicina

Área de concentração: Física médica/materiais
Aluna: Tainara Gabrieli Zandoná
Orientador: Prof. Dr. Mauricio Foschini

Uberlândia
21 de outubro de 2021

AGRADECIMENTOS

Agradeço à minha família pelo apoio de sempre e pelo exemplo de como trilhar meus próprios caminhos. Aos meus professores, por me mostrarem como chegar a lugares inimagináveis. Aos meus amigos, pelos momentos de estudo e descanso merecidos. Ao meu namorado, por acreditar em mim e por ser minha paz. À Universidade Federal de Uberlândia, pela estrutura a mim oferecida durante toda a graduação. A todos que, em algum momento, fizeram parte da minha trajetória e me moldaram ao que sou hoje.

RESUMO

As aplicações da física são inúmeras e progressivamente utilizadas nos mais diversos tratamentos e diagnósticos médicos. Desde seu descobrimento, as propriedades dos raios X foram incorporadas em exames e terapias, e, com o passar dos anos, outras possibilidades foram descobertas. Com o objetivo de discorrer acerca do desenvolvimento da técnica de difração de raios X e seus benefícios e utilizações na medicina, foi feita uma pesquisa bibliográfica visando elucidar a importância do aperfeiçoamento desta área, principalmente para melhores diagnósticos e tratamentos de doenças.

Palavras-chave:

Raios X; Difração de Raios X; Cristalografia de Macromoléculas; Radiação Síncrotron.

ABSTRACT

Physical applications are plenty and progressively used in various treatments and medical diagnosis. Since its discovery, X-rays properties have been incorporated in therapies and exams and, through the years, other possibilities have been found. In order to discuss the development of X-rays diffraction technique and its benefits and usage in medicine; a bibliographical research was accomplished aiming to enlighten the importance of improving this field, especially for better diagnosis and treatments of diseases.

Key words:

X-Rays; X-Rays Diffraction; Macromolecule Crystallography; Synchrotron Radiation.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Números de publicações em função do período obtidos na busca no site “ http://www.sciencedirect.com/ ” com as palavras chave a) “x-ray diffraction” e b) “x-ray diffraction in medicine”.....	8
Figura 2 - Arranjo atômico cúbico simples de um sólido cristalino.....	11
Figura 3 - Espalhamento do raio X incidente sob um ângulo θ em uma rede cristalina cujos planos possuem espaçamento d	11
Figura 4 - Microfotografias de cristais de vírus e proteínas. Em a) Desmodium yellow mottle virus, um vírus que ataca as plantas do gênero Desmodium e em b) Canavalina hexagonal, proteína encontrada no feijão.....	14
Figura 5 - Esquema representando as três fontes de raios X de um síncrotron. Em (a) radiação produzida por ímãs de dobra, com um único par de polos magnéticos, produzindo um leque de radiação relativamente largo no plano horizontal do anel de armazenamento. Em (b) radiação produzida pelo wiggler, com vários pares de polos, resultando em um fluxo de raios X mais intenso. Em (c) radiação produzida pelo ondulador, onde a interferência positiva dos raios X gerados aumenta a intensidade de um comprimento de onda específico, produzindo um feixe muito fino e paralelo.....	17
Figura 6 - Estrutura esquematizada do acelerador síncrotron Sirius, situado no Centro de Pesquisa em Energia e Materiais (CNPEM) em Campinas – SP.....	19

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO E MOTIVAÇÃO	7
2. OBJETIVOS	9
3. INTRODUÇÃO HISTÓRICA E FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	9
I. INTRODUÇÃO HISTÓRICA	9
II. DIFRAÇÃO DE RAIOS X E LEI DE BRAGG	10
III. CRISTALOGRAFIA DE MACROMOLÉCULAS POR DIFRAÇÃO DE RAIOS X.....	13
IV. RADIAÇÃO SINCROTRON.....	16
V. A RADIAÇÃO SINCROTRON E A COVID-19	20
4. METODOLOGIA DA PESQUISA	21
5. RESULTADOS E DISCUSSÕES	21
6. CONSIDERAÇÕES FINAIS	25
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	27

1. INTRODUÇÃO E MOTIVAÇÃO

A descoberta dos raios X ocorreu em 1895, enquanto o físico Wilhelm Conrad Röntgen estudava tubos de raios catódicos (TIPLER PAUL A., 2014). Röntgen, afim de bloquear raios visíveis provenientes do tubo, isolou-o dentro de uma caixa de papelão preto (CARUSO FRANCISCO, 2006). No entanto, ele observou um fenômeno: uma placa coberta de platinocianeto de bário, distante do tubo, estava iluminada em fluorescência. Tal fluorescência não poderia ser causada pelos raios catódicos, já que estes se propagam no ar por poucos centímetros. Além do mais, os raios viajavam em linha reta e não sofriam influência pela presença de um campo magnético e, ainda, não foi possível verificar fenômenos de refração e interferência, normalmente associados a ondas. Devido, então, a sua origem desconhecida, Röntgen deu a estes raios o nome, até então provisório, de raios X (CARUSO FRANCISCO, 2006).

Mais tarde, Röntgen verificou o poder de penetração destes raios e compreendeu que eles eram provenientes dos raios catódicos colidindo com as paredes de vidro do tubo. Os raios X, apesar de bloqueados por finas folhas metálicas, possuem poder de penetração em materiais como a madeira, por exemplo, muito maior do que qualquer outra onda eletromagnética. Foi justamente esta característica que tornou possível a utilização dos raios X na medicina, pouco tempo após a publicação do primeiro artigo de Röntgen (CARUSO FRANCISCO, 2006).

Entretanto, só por volta de 1912 foi possível a realização de difração dos raios X e, portanto, a confirmação de que os raios X são uma forma de radiação eletromagnética. Como estes raios possuem comprimento de onda da ordem de 0,1 nm, o alemão Max von Laue propôs utilizar uma estrutura cristalina como rede de difração, sob afirmação de que a distância entre os átomos de um cristal é da ordem do comprimento de onda dos raios X. Cerca de um ano mais tarde, William L. Bragg desenvolveu uma analogia simples para analisar o fenômeno de difração por um cristal. Esta técnica proposta por Bragg tornou-se importante pois, a partir dela, foi possível ser feita a caracterização precisa das estruturas de sólidos cristalinos (TIPLER PAUL A., 2014).

Atualmente, conhecimentos acerca dos raios X são de suma importância para a medicina, especialmente após a ascensão da física médica, área voltada para o conhecimento e aplicação de radiações ionizantes. Um exemplo da importância da

difração de raios X na medicina é a *Diffraction Enhanced Imaging (DEI)*, que é uma modalidade de radiografia descoberta em uma pesquisa inicialmente dedicada ao sistema monoenergético de radiografia com objetos altamente absorventes (JOHNSTON et al., 1996)(CHAPMAN et al., 1997). Nela, raios X intensos, polarizados e contínuos em uma grande faixa de energia produzidos em cíclotrons permitem uma variedade de imagens com maior qualidade (THOMLINSON, 1992)(CHAPMAN et al., 1997). Se combinada com a tomografia computadorizada, estudos mostram que a *DEI* pode resultar em imagens 3D, facilitando a visualização de microestruturas biológicas (HU et al., 2009).

Na área da saúde, pesquisas feitas com luz síncroton, como as realizadas com o acelerador de partículas Sirius, no Brasil, são de suma importância para a caracterização das estruturas de proteínas e outras unidades intracelulares, etapas fundamentais para a formulação de novos medicamentos. No diagnóstico por imagem, embora os síncrotrons não sejam utilizados convencionalmente, suas características permitem medidas com melhor resolução e contraste, em tempos menores, permitindo minimizar tempos de exposição. Por estes motivos, o presente projeto visa fazer uma revisão bibliográfica acerca das aplicações dos conceitos de difração de raios X na medicina, evidenciando a importância do uso de princípios físicos nos avanços da área da saúde. Abaixo, as figuras 1a e 1b mostram o crescente número de artigos publicados, entre 1998 e 2018, envolvendo o termo difração de raio X de acordo com o site Science Direct, mostrando assim a relevância do tema proposto.

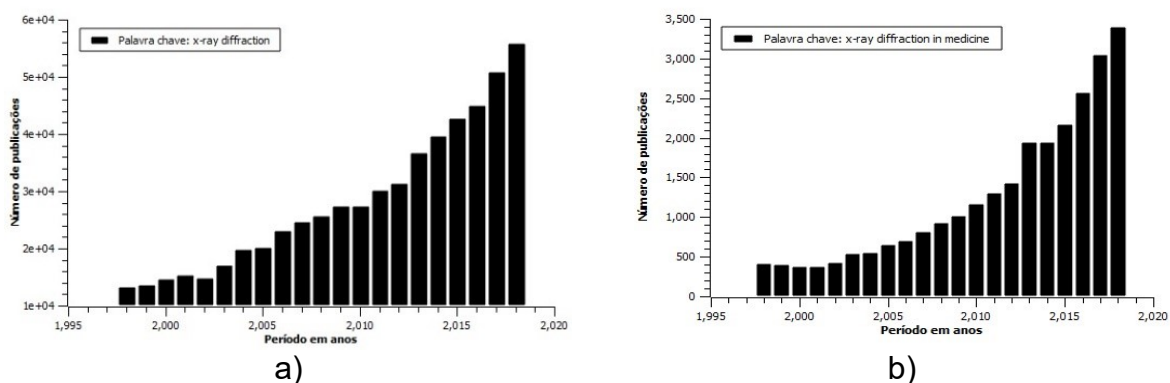


Figura 1: Números de publicações em função do período obtidos na busca no site "<http://www.sciencedirect.com/>" com as palavras chave a) "x-ray diffraction" e b) "x-ray diffraction in medicine"

2. OBJETIVOS

O objetivo geral deste projeto é reunir aplicações de conceitos físicos de difração de raios X na medicina, como na identificação de estruturas de proteínas, na fabricação de fármacos e no diagnóstico por imagem, via luz síncrotron, por exemplo, salientando o quanto a medicina moderna utiliza das inovações tecnológicas e, portanto, de teorias e estudos envolvendo a física.

3. INTRODUÇÃO HISTÓRICA E FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

I. INTRODUÇÃO HISTÓRICA

Ao falar em raios X, muito comumente pensa-se em aplicações de diagnóstico por imagem como a radiografia. De fato, a radiografia é a aplicação mais frequente, e a primeira a ser utilizada, logo após a descoberta destes raios. No entanto, uma técnica tão importante quanto é a difração de raios X, devido à qual é possível fazer o estudo de materiais a nível atômico, permitindo o conhecimento acerca de suas estruturas (SASAKI; BLEICHER, 2000).

A partir de 1857, com o aperfeiçoamento das técnicas de trabalhos com vidro e das máquinas de fazer vácuo, desenvolvidas por Johann Heinrich Geissler, começaram a surgir condições que favoreciam estudos e experimentos com os chamados tubos de raios catódicos, termo criado pelo físico Eugene Goldstein, utilizados para o conhecimento da estrutura da matéria (CARUSO FRANCISCO, 2006). Estes tubos consistiam de um tubo de vidro ligado a uma bomba de vácuo, onde uma diferença de potencial era aplicada entre dois terminais opostos, gerando uma corrente elétrica no interior do tubo (CARUSO FRANCISCO, 2006).

Desde então, diversos experimentos foram feitos utilizando esses tubos. Joseph John Thompson, por exemplo, em 1897, mediu a razão entre a carga e a massa dos raios catódicos, chegando à conclusão de que a massa das partículas contidas nesses raios seria 1836 vezes menor que a do íon de hidrogênio. Mais tarde, estas partículas ficaram conhecidas como *elétrons*. (TIPLER PAUL A., 2014).

A descoberta dos raios X se deu, igualmente, a partir de experimentos utilizando os tubos de raios catódicos, pelo alemão Wilhelm Conrad Röntgen, em 1895. Phillip Lenard, em 1894, estudou o que acontecia com os raios catódicos fora

do tubo, descobrindo que eles se propagavam por até poucos centímetros do tubo, tanto no ar quanto em outros gases, além de serem capazes de impressionar chapas fotográficas e de tornar certos materiais fluorescentes, como o platinocianeto de bário. Röntgen, então, decidiu estudar a fluorescência dos materiais. Ele introduziu o tubo em uma caixa de papelão preto, de modo que os raios de luz visível e ultravioleta seriam bloqueados e apenas os raios catódicos seriam colimados para a direção das substâncias a serem estudadas. Sem nenhuma interferência luminosa na sala, Röntgen percebeu que um cartão coberto por platinocianeto de bário havia se iluminado. No entanto, como Lenard já havia constatado, os raios catódicos se propagavam por poucos centímetros no ar, enquanto o cartão iluminado estava a uma maior distância do tubo (CARUSO FRANCISCO, 2006). Röntgen fez testes em distâncias cada vez maiores, colocando o cartão até aproximadamente dois metros do tubo, e percebeu que o efeito permanecia (MARTINS, 1998). Ele observou, ainda, que os raios produzidos no ponto onde os elétrons atingiam o tubo de vidro não sofriam deflexão na presença de um campo magnético, além de não conseguir encontrar fenômenos de reflexão e refração, comportamento normalmente observados em ondas. Por estes motivos, Röntgen chamou estes raios, até então misteriosos, de raios X. O cientista percebeu, também, que os raios X podiam atravessar objetos opacos e que todos os materiais, em certo grau, eram transparentes a estes raios. Devido a esta propriedade, os raios X começaram a ser utilizados na medicina quase que instantaneamente após a publicação do primeiro artigo de Röntgen (TIPLER PAUL A., 2014).

II. DIFRAÇÃO DE RAIOS X E LEI DE BRAGG

Segundo a teoria eletromagnética, qualquer carga elétrica produz ondas eletromagnéticas ao ser freada ou acelerada. Desta forma, pensava-se que os raios X eram ondas eletromagnéticas produzidas pelos elétrons ao colidirem com os átomos do alvo, dentro do tubo de raios catódicos (TIPLER PAUL A., 2014).

Assim que estudos envolvendo raios X demonstraram que seus comprimentos de onda seriam da ordem de 10^{-10} m, da mesma ordem que o espaçamento entre os átomos de um material sólido, Max von Laue propôs que, se os raios X de fato fossem ondas eletromagnéticas, quando estes excitassem os átomos de um cristal, fazendo

com que eles oscilassem, a radiação espalhada seria resultado da interferência de várias fontes coerentes, devido ao arranjo atômico ordenado do cristal. Em palavras mais claras: o cristal se comportaria como uma rede de difração tridimensional para os raios X (CARUSO FRANCISCO, 2006). Os primeiros experimentos foram realizados por Walter Friedrich e Paul Knipping, dois alunos de von Laue, onde um feixe de raios X incidia em um cristal e, por trás do cristal, era colocada uma chapa fotográfica. Ao verificar a chapa fotográfica, via-se um padrão de difração, o que confirmava a teoria de von Laue: os raios X possuem natureza ondulatória (SASAKI; BLEICHER, 2000).

A difração de raios X tornou-se importante para a determinação de estruturas cristalinas, especialmente após 1912, quando William Henry Bragg e William Lawrence Bragg propuseram um método simples, porém eficiente, para analisar a difração dos raios X pelos cristais (TIPLER PAUL A., 2014). A figura 2, abaixo, ilustra um arranjo cúbico simples para os átomos de um material cristalino. Nessa estrutura, os átomos funcionam como obstáculos, ou centros de espalhamento para os raios X a serem incididos.

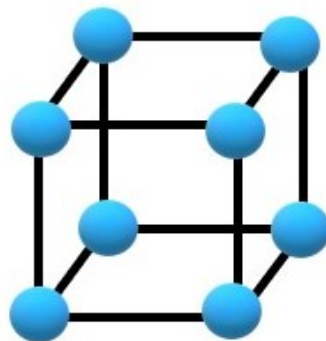


Figura 2: Arranjo atômico cúbico simples de um sólido cristalino

Os cristais são formados quando inúmeras estruturas idênticas são postas lado a lado, formando famílias de planos atômicos separadas por distâncias inferiores a um nanômetro (PICCOLI et al., [s.d.]

Quando raios X incidem sobre um conjunto de planos cristalinos, eles são espalhados pelas suas camadas eletrônicas. Os feixes refletidos por dois planos subsequentes representam o fenômeno de difração. As ondas difratadas por dois átomos sucessivos do mesmo plano estão em fase e interferem construtivamente se o ângulo de difração for igual ao ângulo de incidência, independentemente do comprimento de onda. Já as ondas difratadas por dois átomos situados em planos diferentes, como ilustrado na Figura 3, estarão em fase e, portanto, interferirão

construtivamente se a diferença entre os caminhos óticos dos planos for igual a um número inteiro do comprimento de onda (TIPLER PAUL A., 2014). Analisando trigonometricamente a Figura 3, esta condição é satisfeita se:

$$2d\sin\theta = n\lambda \quad n = 1, 2, 3 \dots \quad \text{Equação (1)}$$

A relação acima é conhecida como a Lei de Bragg e os planos relativos a $n = 1, 2, 3 \dots$ correspondem às difrações de primeira, segunda... n -ésima ordens.

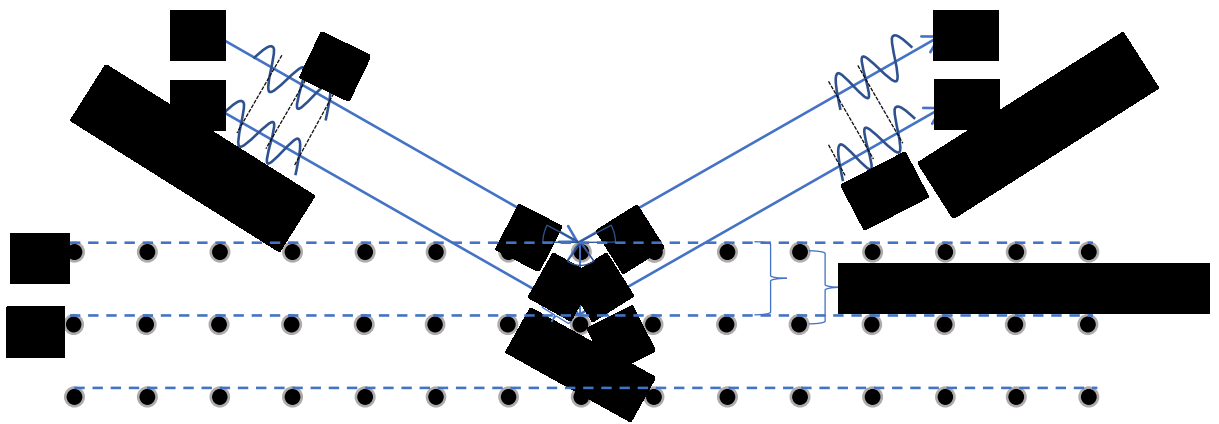


Figura 3: Espalhamento do raio X incidente sob um ângulo θ em uma rede cristalina cujos planos possuem espaçamento d .

Assim, conhecendo-se a distância entre dois planos atômicos pode-se calcular o comprimento de onda dos raios X e, vice-versa, conhecendo-se o comprimento de onda dos raios X, pode-se determinar as distâncias interatômicas de um cristal. Esta foi uma das grandes contribuições dos estudos dos raios X, pois, desta forma, as estruturas dos sólidos cristalinos puderam ser determinadas com precisão. A partir daí, surgiram diversas aplicações para a difração de raios X, como a medição da pureza de amostras e caracterização de materiais cristalinos, incluindo a cristalização de macromoléculas, como proteínas.

III. CRISTALOGRAFIA DE MACROMOLÉCULAS POR DIFRAÇÃO DE RAIOS X

Existe um ramo da ciência denominado biologia estrutural, o qual é dedicado aos estudos de como as proteínas adquirem suas estruturas e como modificações nessas estruturas podem afetar as suas funções. Uma das técnicas amplamente utilizadas por essa área é a cristalografia por difração de raios X, indicada para obter informações em alta resolução sobre as estruturas de macromoléculas biológicas (AMBROSIO; FRANCHINI, 2017).

A cristalografia é utilizada para obter dados de difração de raios X de cristais únicos a temperaturas muito baixas, por volta de 100 K (-173, 15 °C), onde o risco de danos causados pela radiação é reduzido. Esta técnica permite a visualização de modelos moleculares precisos, compostos de milhares de átomos, com separação visual da ordem de 10^{-10} m. Com base nesses estudos, utilizando a difração de raios X, centenas de milhares de estruturas biológicas foram determinadas, como a dupla hélice da molécula de DNA, diversas proteínas, vitaminas e fármacos (AMBROSIO; FRANCHINI, 2017).

O comprimento de onda de raios X utilizado para determinar a estrutura de proteínas e macromoléculas em geral é, normalmente, da ordem de 10^{-10} m. As energias correspondentes a este comprimento de onda são baixas, de aproximadamente 12 keV e cerca de 99% da radiação incidida atravessa a amostra sem interagir com os átomos. Dos fótons que de fato interagem com a amostra, apenas uma fração mínima será espalhada pelos átomos, carregando informações estruturais úteis. O restante da radiação que interage com os átomos deposita energia na amostra (via efeito fotoelétrico, espalhamento inelástico e emissão de elétron-Auger), levando à ionização e ao aquecimento desta amostra, o que danifica as moléculas de maneira irreversível. A solução encontrada para amplificar o sinal útil de espalhamento foi a utilização de cristais (AMBROSIO; FRANCHINI, 2017).

Moléculas individuais de proteínas podem ser levadas a formar cristais (figura 4) em determinadas condições de solubilidade chamadas de supersaturação. A supersaturação é alcançada pela adição de agentes precipitantes na solução como sais neutros ou polímeros e pela manipulação de outros parâmetros como temperatura, força iônica e pH (MCPHERSON; GAVIRA, 2014). Como as proteínas variam muito entre si em parâmetros como tamanho, forma e carga líquida, a

determinação das condições ideais para a formação dos cristais é puramente empírica (AMBROSIO; FRANCHINI, 2017). De forma geral, a cristalografia macromolecular, como um todo, é baseada em princípios, ideias e experiências, das quais ainda não existe um fundamento teórico ou uma boa base de dados para guiar os estudos e, como consequência, a técnica é majoritariamente experimental e demanda, acima de tudo, paciência, perseverança e intuição (MCPHERSON; GAVIRA, 2014).

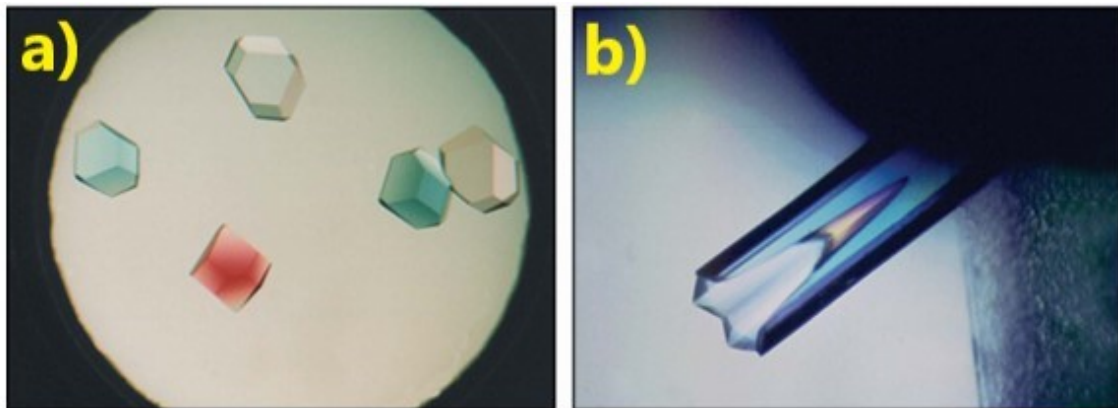


Figura 4: Microfotografias de cristais de vírus e proteínas. Em a) *Desmodium yellow mottle virus*, um vírus que ataca as plantas do gênero *Desmodium* e em b) *Canavalina hexagonal*, proteína encontrada no feijão. Fonte das imagens: (MCPHERSON; GAVIRA, 2014)

A cristalografia é utilizada por pesquisadores para identificar proteínas que possam levar a novos fármacos ou explicar o desenvolvimento de alguns tipos de câncer, por exemplo (GERAQUE, 2012). Técnicas de cristalografia têm sido importantes para a busca de fármacos eficientes contra o protozoário *Trypanosoma cruzi*, agente causador da doença de Chagas. Para tal, é necessário encontrar um remédio eficaz, que atue na relação parasita-hospedeiro de forma que, preferencialmente, mate o primeiro sem interferir no segundo (GERAQUE, 2012). Entre as estratégias utilizadas para o planejamento de novos agentes antiparasitários está a seleção de proteínas alvo dos patógenos que possam ser moduladas especificamente por pequenas moléculas, levando em conta a presença ou ausência desta proteína alvo no hospedeiro (DIAS et al., 2009). O processo de desenvolvimento de novos fármacos é dividido em duas fases: descoberta (ou fase pré-clínica) e desenvolvimento (ou fase clínica). Na fase da descoberta as pesquisas se focam na identificação de moléculas pequenas com potencial de desenvolvimento clínico. A aprovação do alvo molecular selecionado é importante por várias razões como o estabelecimento de sua relevância no processo fisiopatológico em estudo e

a caracterização do impacto de sua modulação seletiva no tratamento ou cura de patologias ou possíveis efeitos adversos em humanos (GUIDO; ANDRICOPULO; OLIVA, 2010).

Este tipo de trabalho também é importante para outras doenças, além de outras aplicações da biologia em geral, onde o objetivo é sempre identificar macromoléculas e tentar sintetizar outros compostos que se liguem aos seus alvos biológicos na tentativa de bloqueá-los para que ocorram determinadas ações desejadas, como a morte do *T. cruzi*, por exemplo (GERAQUE, 2012). Assim, o desenvolvimento das técnicas de determinação estrutural de macromoléculas, como a cristalografia de raios X contribuem essencialmente no entendimento das interações intermoleculares predominantes entre moléculas e seus receptores biológicos, bem como nos estudos de caracterização de seus mecanismos de ação (DIAS et al., 2009).

A cristalização de macromoléculas biológicas foi descoberta, historicamente, por acaso a mais de 150 anos atrás (MCPHERSON; GAVIRA, 2014). No entanto, nas últimas décadas a técnica evoluiu para uma maior racionalidade devido à melhor compreensão acerca dos processos químicos e físicos envolvidos (AMBROSIO; FRANCHINI, 2017). Atualmente a existência de robôs que fazem a manipulação dos cristais e a montagem do experimento traz grandes vantagens em relação a precisão, velocidade, miniaturização e possibilidade de trabalhar por longos períodos contínuos (GERAQUE, 2012). Os sistemas de visualização e identificação de cristais também foram automatizados e atuam não somente em microscopia de luz visível, mas também nos comprimentos de onda da faixa de ultravioleta. Ainda assim, por mais que as chances de sucesso sejam consideravelmente maiores, a metodologia de cristalização de macromoléculas continua sendo, basicamente, um processo de tentativa e erro (AMBROSIO; FRANCHINI, 2017).

As fontes originais de raios X mais utilizados em cristalografia no passado eram variantes dos tubos de raios X convencionais, ou seja, tubos em vácuo, onde a radiação é produzida pelo bombardeamento de ânodos rotatórios. Estas fontes eram usualmente o suficiente para o estudo de cristais relativamente grandes, da ordem de centenas de micrômetros, mas, ainda assim, a coleta de dados podia levar de dias a até semanas, já que os cristais precisavam ser orientados manualmente com relação à posição do feixe (AMBROSIO; FRANCHINI, 2017). A primeira estrutura da proteína lisozima foi obtida em 1967 e, para que um único conjunto completo de alta resolução fosse coletado, 14 dias consecutivos foram necessários (BLAKE et al., 1967).

O grande problema destas fontes convencionais de raios X é que elas produzem radiação em apenas um comprimento de onda, característico do material que compõe o ânodo. No início da década de 1990 foi possível contornar esta situação com a introdução de aparelhos de luz síncrotron como fontes poderosas de radiação para a difração de cristais de macromoléculas biológicas. A principal vantagem dos síncrotrons é o alto brilho e o alto grau de colimação do feixe de raio X (os raios X são polarizados linearmente), além de um espectro amplo de energias e a possibilidade de selecionar precisamente o comprimento de onda desejado (AMBROSIO; FRANCHINI, 2017).

IV. RADIAÇÃO SINCROTRON

Diversos tipos de aceleradores de partículas foram criados para estudos em física nuclear, sendo que a maioria deles pôde ser, de alguma forma, alterada para usos médicos, como os acelerados lineares utilizados em radioterapia e os cíclotrons, usados na produção de radionuclídeos emissores de pósitrons, para aplicações na medicina nuclear. Independentemente do tipo de acelerador de partículas, duas condições devem ser satisfeitas para que as partículas sejam aceleradas: essas partículas devem ser eletricamente carregadas; e um campo elétrico deve ser gerado na direção da aceleração das partículas (PODGORSAK, 2010).

Os síncrotrons são máquinas que aceleram partículas carregadas a velocidades relativísticas e energia da ordem de até GeV (giga elétron-volts). Estas partículas, usualmente elétrons, após aceleradas, são mantidas em órbitas estáveis por várias horas em uma câmara de vácuo ultra alto nos chamados “anéis de armazenamento”. A trajetória circular fechada das partículas nos anéis é guiada pelo uso de uma sucessão de eletroímãs, também chamados de ímãs de dobra (DAUTER, 2005).

Sabe-se que partículas carregadas submetidas a grandes acelerações normais à sua velocidade emitem radiação eletromagnética (PETROFF, 2017). Desta forma, sempre que as partículas são desviadas pelo campo magnético dos ímãs e forçadas a fazer uma curva, ou seja, sempre que sofrem uma aceleração centrípeta, elas emitem radiação eletromagnética em um amplo leque de energia (DAUTER, 2005). Esta radiação é chamada de luz síncrotron e, dependendo da energia das partículas, a radiação produzida pode chegar a energias de até MeV (mega elétron-

volts) ou GeV (giga elétron-volts) (PETROFF, 2017), compreendendo, assim, um amplo espectro, desde o infravermelho até os raios X (MUKAI et al., 2014). Como a luz síncrotron não é emitida em todas as direções, mas sim na direção tangente à curva feita pelos elétrons, ao redor do acelerador são instaladas estações de pesquisas, conhecidas como linhas de luz, as quais focalizam e acondicionam a luz síncrotron para que ela seja usada para iluminar as amostras que estejam sendo analisadas.

Além disso, os anéis de armazenamento podem ser equipados com dispositivos de inserção chamados de *wigglers* e de onduladores, que nada mais são do que ímãs multipolares onde as partículas carregadas se chocam múltiplas vezes entre polos magnéticos alternados, produzindo um feixe de radiação ainda mais intenso do que o produzido pelos ímãs de dobra (DAUTER, 2005). Abaixo, a figura 5 ilustra o princípio destes três tipos de fontes de radiação:

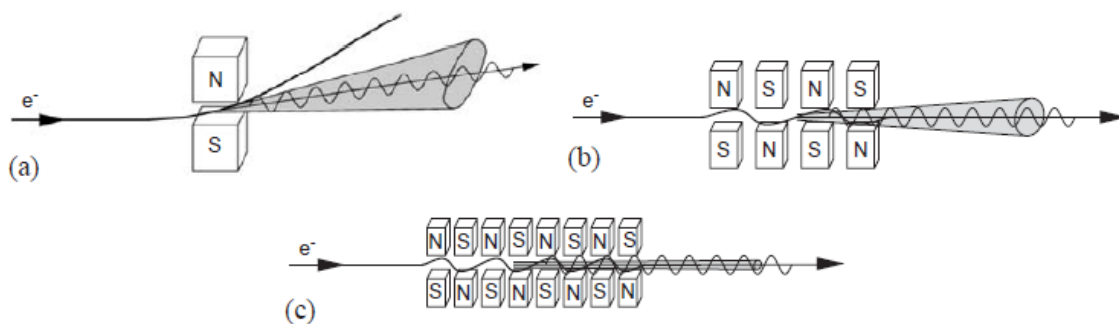


Figura 5: Esquema representando as três fontes de raios X de um síncrotron. Em (a) radiação produzida por ímãs de dobra, com um único par de polos magnéticos, produzindo um leque de radiação relativamente largo no plano horizontal do anel de armazenamento. Em (b) radiação produzida pelo wiggler, com vários pares de polos, resultando em um fluxo de raios X mais intenso. Em (c) radiação produzida pelo ondulador, onde a interferência positiva dos raios X gerados aumenta a intensidade de um comprimento de onda específico, produzindo um feixe muito fino e paralelo.

Fonte da imagem: (DAUTER, 2005)

A tecnologia dos síncrotrons evoluiu até a quarta geração. A primeira geração foi marcada pelo uso da radiação síncrotron de maneira secundária, chamada de “modo parasítico”, já que os aceleradores inicialmente foram construídos para a física nuclear ou de partículas. Os fótons produzidos nestes aceleradores possuíam brilho de cerca de 10^{12} fótons/seg/mm²/mrad², o que já apresentava uma grande melhora, se comparado aos tubos de raio X convencionais, com brilho na ordem de 10^8 (PETROFF, 2017). A segunda geração começou a utilizar os aceleradores como fontes dedicadas à luz síncrotron, de forma que anéis de armazenamento foram fabricadas especificamente para este fim. A utilização dos *wigglers* e onduladores nos

anéis de armazenamento começou a ser inserida a partir da segunda geração (THOMPSON et al., 2009). A terceira geração foi baseada na utilização dos dispositivos de inserção e na baixa emitância (produto do tamanho pela divergência do feixe), cerca de alguns nanômetros.radianos (nm.rad), para otimização do brilho da radiação produzida. O brilho alcançou ordens de 10^{20} nas primeiras instalações da terceira geração. A partir daí, inúmeras possibilidades foram alcançadas para estudos de diversas áreas, como a biologia estrutural, a paleontologia, estudo de materiais em condições extremas, entre outros (PETROFF, 2017). A quarta geração utiliza anéis de armazenamento de emitância menor ainda, da ordem de 100 pm.rad (picômetros.radianos), que permitem atingir brilho de até 10^{22} fótons/seg/mm²/mrad². (THOMPSON et al., 2009) Na quarta geração também estão presentes os lasers de raio X de elétrons livres, que consiste em aceleradores lineares de alta energia (entre 8 e 20 GeV) e onduladores muito longos (de 100 a 150 metros). Esses lasers são um novo tipo de fonte de raios X, complementares à radiação síncrotron, mas com intensidade de pico cerca de 10 ordens de grandeza maior (PETROFF, 2017).

O Sirius, acelerador síncrotron brasileiro desenvolvido no Centro Nacional de Pesquisa em Energia e Materiais (CNPEM), na cidade de Campinas, se enquadra na quarta geração de aceleradores, possuindo emitância muito pequena, de 200 pm.rad e brilho na faixa de 10^{22} fótons/seg/mm²/mrad², sendo uma das fontes de radiação síncrotron mais brilhantes do mundo (PETROFF, 2017). A figura 6 mostra um esquema do projeto do Sirius e indica as partes principais da sua estrutura, as quais serão comentadas logo abaixo.

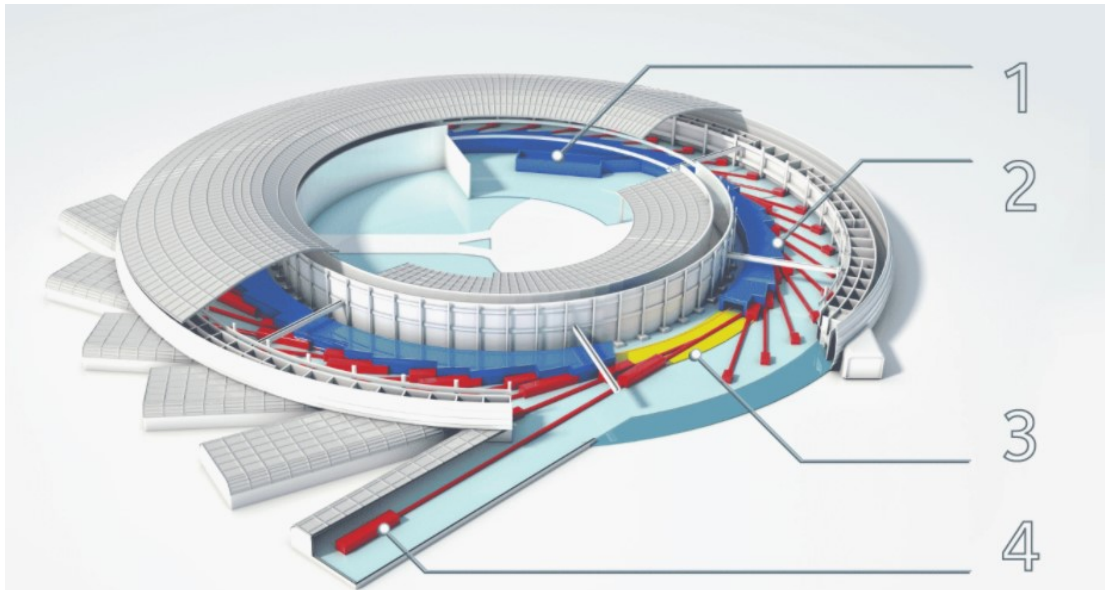


Figura 6: Estrutura esquematizada do acelerador síncrotron Sirius, situado no Centro de Pesquisa em Energia e Materiais (CNPEM) em Campinas – SP. Imagem disponível em: <https://www.inls.cnpem.br/sirius/como-funciona-o-sirius/>

Na figura 6 acima, número 1 indica o acelerador linear Linac. Primeiramente, um equipamento chamado canhão de elétrons emite estas partículas a partir do aquecimento de uma liga metálica. A seguir os elétrons são acelerados por campos eletrostáticos para então serem injetados no Linac. No acelerador linear, os elétrons provenientes do canhão começam a ganhar energia ao serem acelerados até uma velocidade próxima à da luz. Em seguida, o feixe de elétrons é transferido para o acelerador injetor, ou *booster* (MUKAI et al., 2014).

O booster, indicado na figura 6 pelo número 2, é um acelerador circular com função de aumentar a energia dos elétrons provenientes do Linac. Nele, as partículas dão cerca de 600 mil voltas por segundo. No booster os campos magnéticos dos ímãs são incrementados de maneira sincronizada enquanto interagem com uma cavidade de radiofrequência que fornece energia ao feixe a cada volta. Desta forma, os elétrons têm sua energia aumentada até alcançarem a energia necessária para serem transferidos para o acelerador principal, ou anel de armazenamento (MUKAI et al., 2014).

O anel de armazenamento é apontado pelo número 3 e nele os elétrons são mantidos circulando em órbitas estáveis por horas a fio com o auxílio de ímãs. No anel de armazenamento os elétrons passam por dipolos, *wigglers* e onduladores, utilizados para curvar a trajetória dos elétrons. Sempre que os elétrons são desviados

por campos magnéticos e forçados a fazerem uma curva eles produzem luz síncrotron, a qual é emitida na direção tangente à curva feita pelas partículas e então direcionada para as estações de pesquisa, chamadas de linhas de luz (MUKAI et al., 2014).

Por fim, as linhas de luz estão indicadas pelo número 4 na figura 6, e elas funcionam como se fossem microscópios complexos que condicionam e focalizam a luz síncrotron até as amostras dos materiais a serem estudados, de forma a revelar informações importantes sobre eles. No entanto, antes de chegar à amostra, a radiação síncrotron precisa ter seu espectro filtrado de acordo com o experimento para o qual ela será designada. Essa filtragem é feita por dispositivos chamados monocromadores, que permitem a seleção específica do comprimento de onda desejado, seja ele referente à faixa do infravermelho, ultravioleta ou raios X. A partir da maneira como a luz síncrotron é refletida, espalhada ou absorvida pelos átomos do material é possível avaliar as moléculas que o constituem, seus estados químicos, propriedades elétricas e magnéticas, entre outras características. Como as fontes de síncrotron comportam diversas linhas de luz, nelas são realizados vários experimentos utilizando técnicas diferentes, como espalhamento dos raios X, espectroscopia do infravermelho ao raio X, tomografia, cristalografia por difração de raios X, entre outras (MUKAI et al., 2014).

V. A RADIAÇÃO SINCROTON E A COVID-19

Com a ajuda do Sirius, em setembro de 2020, detalhes inéditos da reprodução do Sars-Cov-2, vírus causador da COVID-19, foram descobertos por pesquisadores do Instituto de Física da USP de São Carlos. Na época, a primeira estação de pesquisa montada ainda estava em fase de testes, quando o grupo levou a ela cerca de 200 cristais de proteínas do Sars-Cov-2 para serem analisados. O objetivo era encontrar possíveis alvos para interromper o ciclo de vida do vírus a partir da sua ligação com outras moléculas, o que pode ser usado para a geração de novos medicamentos (G1, 2020).

Quando o vírus entra em contato com uma célula, ele a “sequestra” e utiliza sua maquinaria para se replicar. Como explicado por Glaucius Oliva, coordenador do grupo de pesquisadores da USP:

“Ele (Sars-Cov-2) não faz um vírus pronto para infectar outras células, ele faz suas proteínas em um único bloco, que chamamos de poliproteína. Uma parte desse bloco é a protease, e a função dela é transformar esta poliproteína em suas partes que, ao se juntarem, podem reproduzir muitas cópias do genoma viral e das proteínas do envelope e assim gerar novos vírus, que são capazes de infectar outras células. O objetivo é parar este processo logo no início da ação da protease e assim impedir a produção de novos vírus nas células infectadas”.

A partir dos estudos, os pesquisadores conseguiram obter informações sobre as formas intermediárias que a principal protease do Sars-Cov-2 (chamada de Mpro) apresenta ao longo do seu ciclo de maturação dentro das células, algo fundamental no desenvolvimento de novas estratégias antivirais (LNLS, 2021).

Com estes e outros dados coletados, a equipe continua trabalhando na busca por moléculas que possam servir como inibidoras das proteases mais importantes na replicação do Sars-Cov-2 (LNLS, 2021).

4. METODOLOGIA DA PESQUISA

Esta pesquisa é uma análise qualitativa baseada em revisão bibliográfica, ou seja, em trabalhos já existentes de diversos autores e sua sequência cronológica de eventos. Desta forma, foi necessário pesquisar e compilar livros e trabalhos científicos que dizem respeito à difração de raios X e, a partir de suas leituras, interpretações e comparações, foi desenvolvida a crítica presente no índice resultados e discussões.

Para tal, foi feita a pesquisa de artigos e livros de forma a criar uma sequência cronológica de eventos sobre o desenvolvimento da técnica de difração de raios X e suas aplicações. A partir disso, seguiu-se um critério de seleção baseado em trabalhos mais atuais acerca do uso da difração de raios X na medicina, mais especificamente em cristalografia macromolecular e desenvolvimento de fármacos.

5. RESULTADOS E DISCUSSÕES

A cristalização de macromoléculas se tornou uma técnica notória por volta da década de 1920 com a cristalização da insulina e, logo após, com a demonstração de que enzimas poderiam ser obtidas a partir da cristalização de proteínas. Após a

descoberta dos raios X, suas aplicações rapidamente foram incorporadas na medicina e, com os avanços dos estudos, tornou-se cada vez mais claro que o campo de atuação dos raios X era muito mais amplo do que apenas para fins diagnósticos e/ou terapêuticos. No final dos anos 1930, a cristalização de macromoléculas se tornou cada vez mais importante como consequência da utilização dos raios X em processos biológicos. É devido à difração de raios X que hoje conhecemos precisamente a estrutura de diversas moléculas, vitaminas, proteínas e agentes patogênicos e é por meio deste conhecimento que inúmeros fármacos foram e continuarão a ser desenvolvidos.

A cristalografia por difração de raios X, apesar de precisa e eficiente, demanda tempo, paciência e experiência, pois como salientado por (MCPHERSON; GAVIRA, 2014) e (AMBROSIO; FRANCHINI, 2017), a cristalização de macromoléculas envolve a manipulação de parâmetros físico-químicos como temperatura, pH e força iônica de forma que estas condições não alterem significativamente o estado natural das macromoléculas. Porém, como proteínas, por exemplo, variam muito entre si em tamanho, forma e carga, alcançar as condições ideais para ocorrer a cristalização da macromolécula, embora os muitos avanços tecnológicos, continua sendo, basicamente, uma relação de tentativas e erros, principalmente porque a aplicação desta técnica e a qualidade da imagem final são absolutamente dependentes da qualidade e tamanho dos cristais para que sejam coletadas intensidades acuradas de difração, ou seja: um bom cristal é o elemento-chave de todo o processo. Ainda hoje não existe uma teoria fundamentada ou uma boa base de dados para guiar os esforços dos pesquisadores, embora o conhecimento esteja sendo acumulado a partir das várias tentativas de cristalização, sejam elas de sucesso ou não. Atualmente, a existência de novas tecnologias disponíveis, como a luz síncrotron, diminuiu a necessidade de grande número de amostras de cristais para serem utilizados na técnica, mas, ainda assim, estes cristais precisam ser estáveis e de alta qualidade.

Outro fator de grande interferência para a cristalografia por difração de raios X é a sensibilidade dos cristais macromoleculares. Estes cristais, quando comparados a cristais de moléculas convencionais, possuem tamanho limitado, quebram muito facilmente e se desmancham se desidratados. Acima de tudo, apresentam alta sensibilidade à temperatura. Devido a isso, a técnica é feita sob temperaturas de aproximadamente $-173\text{ }^{\circ}\text{C}$, o que reduz os danos causados aos cristais. Ainda assim,

como explicado por (MCPHERSON; GAVIRA, 2014), os cristais sofrem danos permanentes após exposição prolongada à radiação.

A importância de avanços tecnológicos que possibilitem o entendimento do funcionamento de vias bioquímicas, alvos moleculares, metabolismo e mecanismos ligados ao aparecimento e desenvolvimento de doenças, tal qual a cristalografia macromolecular, é evidenciada por (GUIDO; ANDRICOPULO; OLIVA, 2010), uma vez que estas inovações tornam possível a descoberta e o desenvolvimento de fármacos e inovações terapêuticas – processo longo, complexo e de alto custo – que aumentam a qualidade de vida de populações pelo mundo.

Quando o alvo biológico para a produção de um fármaco é selecionado (RNA, DNA ou proteína, por exemplo), sua estrutura tridimensional pode já ser conhecida ou não. Para (GUIDO; ANDRICOPULO; OLIVA, 2010), é neste ponto que a evolução das técnicas de cristalografia por difração de raios X contribui intensamente, visto que os avanços destes campos de pesquisa têm proporcionado um aumento considerável na quantidade de alvos moleculares com suas estruturas 3D disponíveis em um banco de dados chamado de Banco de Dados de Proteínas (ou PDB – *Protein Data Bank*) e, uma vez que as estruturas já são conhecidas, o processo para desenvolver um novo fármaco é acelerado.

Segundo (DIAS et al., 2009), a busca por novos fármacos para o que chamamos de doenças tropicais negligenciadas (DTN), como a doença de Chagas, malária, tripanossomíase africana, e esquistossomose, por exemplo, tende a nunca cessar, uma vez que os parasitas acabam desenvolvendo resistência aos quimioterápicos utilizados mais frequentemente e, como descrito por (GUIDO; ANDRICOPULO; OLIVA, 2010), mesmo as opções farmacológicas já disponíveis muitas vezes são insuficientes e apresentam problemas como baixa eficácia e toxicidade elevada. Dentre as DTN, a doença de Chagas, para (DIAS et al., 2009), é a mais negligenciada, já que a produção de medicamentos segue uma tendência de mercado, onde a América do Norte, Europa e Japão são os maiores produtores, responsáveis, juntos, por cerca de 87% da produção de fármacos e a América Latina é responsável por apenas 5% desta produção, sendo outras regiões mais pobres do planeta responsáveis por valores insignificantes ou, até mesmo, nulos. Embora nas últimas décadas as pesquisas por novos medicamentos para a doença de Chagas

tenham evoluído significativamente, principalmente após o sequenciamento dos genomas do *Trypanosoma cruzi*, protozoário causador da doença, segundo (GUIDO; ANDRICOPULO; OLIVA, 2010), o cenário continua sendo escasso pela falta de inovações em programas de pesquisa e desenvolvimento de fármacos no que diz respeito às doenças tropicais negligenciadas. No cenário do Brasil, iniciativas têm sido executadas para inserir o país em uma perspectiva cada vez mais científica e tecnológica. Dentre elas, está o Laboratório Nacional de Luz Sincrotron (LNLS), do CNPEM, em Campinas, do qual faz parte o Sirius.

O Sirius, maior e mais complexo centro de pesquisa brasileiro, possui grandes aplicações e impacto sobre o desenvolvimento e conhecimento de materiais. Para (MUKAI et al., 2014), os desafios enfrentados pelo mundo em áreas de saúde, energia, meio ambiente e alimentação exigem tecnologias científicas cada vez mais sofisticadas e ações multidisciplinares envolvendo áreas como nano e biotecnologias são indispensáveis já que a solução que estes desafios demandam, muitas vezes, está na escala dos átomos e das moléculas. Assim, para o desenvolvimento de novos e melhores fármacos e vacinas, materiais mais leves e resistentes, equipamentos de iluminação mais eficientes e econômicos, fontes de energia renováveis e menos poluentes, por exemplo, é necessário saber como as coisas funcionam em escala atômica. Para isto, equipamentos de luz sincrotron, como o Sirius, são a melhor opção, uma vez que funcionam como microscópios grandes e aprimorados que permitem enxergar diversos materiais, sejam eles orgânicos ou não.

Em tempos de pandemia, como a que vivemos atualmente, quando o mundo todo se volta para a solução de um problema de saúde comum, equipamentos de radiação sincrotron, como o Sirius, são amplamente utilizados na busca de parâmetros e moléculas que possam indicar maneiras de inativar o vírus, como é o caso do Sars-Cov-2. Assim, a cristalografia molecular é crucial e faz parte dos primeiros passos de pesquisas visando desenvolver novos fármacos e vacinas, ou até mesmo para testar a eficiência de algum medicamento já existente. Levando em conta que a busca por medicamentos mais eficientes e menos nocivos, para as mais variadas doenças, tende a aumentar cada vez mais, avanços na área de cristalografia de macromoléculas por difração de raios X são necessários e a tornam uma das técnicas mais importantes e com mais aplicações do futuro; com atenção especial ao Brasil, com a futura utilização total das estações de pesquisa do Sirius.

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os raios X, logo após descobertos, tiveram aplicações diagnósticas e terapêuticas que são amplamente utilizadas até hoje. Desde então, maneiras mais seguras de utilizá-los na medicina têm sido estabelecidas, além de aplicações em outras áreas de interesse. Com o desenvolvimento de técnicas como a cristalografia por difração de raios X, por exemplo, um leque de possibilidades se abriu para o entendimento do funcionamento de doenças causadas pelos mais diversos agentes etiológicos e para a descoberta de tecnologias como novos fármacos, materiais mais resistentes, fontes de energia renováveis, ente outros.

Desde que surgiu, a cristalografia por difração de raios X se tornou promissora e eficaz, apesar da dificuldade de se conseguir boas amostras e, embora diversos avanços tenham sido feitos neste quesito, como a melhora nos equipamentos de raios X utilizados e, posteriormente, a utilização de sincrotrons; a existência de robôs que posicionem os cristais e montem o experimento (processos antes feitos à mão) e a existência de um banco de dados cada vez maior contendo informações sobre moléculas já estudadas; ainda hoje a técnica necessita de cuidado, intuição, paciência e experiência para atingir um bom resultado. Como as demandas para o uso da cristalografia são cada vez maiores e amplificadas, ainda, por eventos como a pandemia da COVID-19 que presenciamos atualmente, é imprescindível que a técnica continue evoluindo e obtendo melhores e mais amplos resultados, uma vez que situações como esta, principalmente, evidenciam o quão atual e necessário é a cristalografia de macromoléculas e o quão vantajoso é a difração de raios X para avanços da medicina.

No entanto, é necessário que haja investimento por parte de empresas para que a pesquisa e o desenvolvimento de novos fármacos evoluam no país, uma vez que temos a tecnologia e grupos especializados em cristalografia para isto. O grande problema, neste cenário, é que existem empresas estrangeiras muito influentes na indústria de medicamentos e várias empresas nacionais pequenas e sem grande importância exterior. Somado a isso, há o fato de que o Brasil tem grande interesse em medicamentos genéricos, principalmente destinados para os programas de saúde pública e, mesmo o país sendo um dos maiores consumidores do mercado farmacêutico mundial, isto tira o interesse de investimento tanto de empresas internacionais quanto nacionais. Portanto, para que a técnica de cristalografia

macromolecular, juntamente com o Sirius, seja utilizada de forma abrangente no que diz respeito à pesquisa e ao desenvolvimento de novos medicamentos é preciso que haja o interesse das iniciativas privadas e públicas em realizar parcerias e em conjunto utilizar este grande centro de pesquisa brasileiro de forma que os resultados sejam favoráveis para ambas as perspectivas.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AMBROSIO, A. L. B.; FRANCHINI, K. G. Cristalografia macromolecular: a biologia sob a ótica dos raios X. **Ciência e Cultura**, v. 69, n. 3, p. 29–36, jul. 2017. <https://doi.org/10.21800/2317-66602017000300009>

BLAKE, C. C. F. et al. Crystallographic studies of the activity of hen egg-white lysozyme. **Proceedings of the Royal Society of London. Series B. Biological Sciences**, v. 167, n. 1009, p. 378–388, 18 abr. 1967. <https://doi.org/10.1098/rspb.1967.0035>

CARUSO FRANCISCO, O. V. **Física Moderna - Caruso e Oguri.pdf**. 2ª ed. [s.l.] Elsevier, 2006.

CHAPMAN, D. et al. Diffraction enhanced x-ray imaging. **Physics in Medicine and Biology**, v. 42, n. 11, 1997. <https://doi.org/10.1088/0031-9155/42/11/001>

DAUTER, Z. Efficient use of synchrotron radiation for macromolecular diffraction data collection. **Progress in Biophysics and Molecular Biology**, v. 89, n. 2, p. 153–172, out. 2005. <https://doi.org/10.1016/j.pbiomolbio.2004.09.004>

DIAS, L. C. et al. Quimioterapia da doença de Chagas: estado da arte e perspectivas no desenvolvimento de novos fármacos. **Química Nova**, v. 32, n. 9, p. 2444–2457, 2009. <https://doi.org/10.1590/S0100-40422009000900038>

G1. Superlaboratório Sirius ajuda a revelar detalhes inéditos da reprodução do vírus da Covid-19. Disponível em: <<https://g1.globo.com/sp/campinas-regiao/noticia/2021/07/20/superlaboratorio-sirius-ajuda-revelar-detalhes-ineditos-da-reproducao-do-virus-da-covid-19.ghtml>>. Acesso em: 14 set. 2021.

GERAQUE, E. **A essência das moléculas.** Disponível em: <<https://revistapesquisa.fapesp.br/a-essencia-das-moleculas/>>.

GUIDO, R. V. C.; ANDRICOPULO, A. D.; OLIVA, G. Planejamento de fármacos, biotecnologia e química medicinal: aplicações em doenças infecciosas. **Estudos Avançados**, v. 24, n. 70, p. 81–98, 2010. <https://doi.org/10.1590/S0103-40142010000300006>

HU, C. et al. Information extraction and CT reconstruction of liver images based on diffraction enhanced imaging. **Progress in Natural Science**, v. 19, n. 8, p. 955–962, 2009. <https://doi.org/10.1016/j.pnsc.2008.06.031>

JOHNSTON, R. E. et al. Mammographic phantom studies with synchrotron radiation. **Radiology**, 1996. <https://doi.org/10.1148/radiology.200.3.8756911>

LNLS. Publicado o primeiro estudo com dados coletados no Sirius. Disponível em: <<https://www.lnls.cnpem.br/noticias/publicado-o-primeiro-estudo-com-dados-coletados-no-sirius/>>. Acesso em: 14 set. 2021.

MARTINS, R. D. A. A Descoberta dos Raios X: O Primeiro Comunicado de Rontgen. **Revista Brasileira de Ensino de Física**, v. 20, n. 4, 1998.

MCPHERSON, A.; GAVIRA, J. A. Introduction to protein crystallization. **Acta Crystallographica Section F Structural Biology Communications**, v. 70, n. 1, p. 2–20, 1 jan. 2014. <https://doi.org/10.1107/S2053230X13033141>

MUKAI, A. H. C. et al. **Projeto Sirius: a nova fonte de luz síncrotron brasileira**. Campinas: Centro Nacional de Pesquisa em Energia e Materiais - CNPEM, 2014.

PETROFF, Y. Radiação de Síncrotron no Brasil UVX e Sirius. **Ciência e Cultura**, v. 69, n. 3, p. 18–22, jul. 2017. <https://doi.org/10.21800/2317-66602017000300007>

PICCOLI, R. et al. **A importância da utilização da difração de raios X na caracterização de argilas**. [s.l.: s.n.].

PODGORSK, E. B. **Biological and Medical Physics Biomedical Engineering, Physics for Medical Physicist**. 2ª edição ed. [s.l.] Springer, 2010. <https://doi.org/10.1007/978-3-642-00875-7>

SASAKI, J. M.; BLEICHER, L. **Introdução à Difração De Raios X Em Cristais**, 2000.

THOMLINSON, W. Medical applications of synchrotron radiation. **Nuclear Inst. and Methods in Physics Research, A**, v. 319, n. 1–3, 1992. [https://doi.org/10.1016/0168-9002\(92\)90569-P](https://doi.org/10.1016/0168-9002(92)90569-P)

THOMPSON, A. et al. **X-ray data booklet**. 3ª ed. [s.l.] Lawrence Berkeley National Laboratory, 2009.

TIPLER PAUL A., L. R. A. **Física Moderna**. 6ª ed. [s.l.] LTC, 2014.