

ESTUDO DOS EFEITOS DA IRRADIAÇÃO EM SANGUE TOTAL, MATRIZ
CELULAR E PLASMA USANDO ESPALHAMENTO COERENTE DE RAIOS X E
FLUORESCÊNCIA DE RAIOS X POR REFLEXÃO TOTAL

Nivia Graciele Villela Pinto

TESE SUBMETIDA AO CORPO DOCENTE DA COORDENAÇÃO DOS
PROGRAMAS DE PÓS-GRADUAÇÃO DE ENGENHARIA DA UNIVERSIDADE
FEDERAL DO RIO DE JANEIRO COMO PARTE DOS REQUISITOS
NECESSÁRIOS PARA A OBTENÇÃO DO GRAU DE DOUTOR EM CIÊNCIAS
EM ENGENHARIA NUCLEAR.

Aprovada por:

Prof. Delson Braz, D.Sc

Prof^a. Regina Cély Rodrigues Barroso, D.Sc.

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

Prof^a. Silvana Moreira, D.Sc.

Prof. Luis Fernando de Oliveira, D.Sc.

Prof. Joaquim Teixeira de Assis, D.Sc.

RIO DE JANEIRO, RJ – BRASIL

MARÇO DE 2008

PINTO, NIVIA GRACIELE VILLELA

Estudo dos efeitos da irradiação em sangue total, matriz celular e plasma usando espalhamento coerente de raios X e fluorescência de raios X por reflexão total. [Rio de Janeiro] 2008.

XVI, 116p. 29,7 cm (COPPE/UFRJ, D.Sc., Engenharia Nuclear, 2008)

Tese – Universidade Federal do Rio de Janeiro, COPPE.

1. Espalhamento Coerente de Raios X
2. Sangue
3. TXRF

I. COPPE/UFRJ II. Título (série)

*"Há homens que lutam um dia e são bons,
há outros que lutam um ano e são melhores,
há os que lutam muitos anos e são muito bons,
mas há os que lutam toda a vida e estes são imprescindíveis."*

(Bertold Brecht)

*Dedico esse trabalho
a minha abençoada família especialmente
aos meus queridos pais
Edith Villela e Iris Pereira,
pela minha educação, formação
e por sempre acreditarem em mim
agradeço ao Lucas e ao Jean,
pelo amor, carinho, incentivo e
dedicação em tempo integral.*

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus, pois sem o auxílio dessa força divina seria impossível essa caminhada. Aos meus orientadores, professor Delson Braz e a professora Regina Cely pelo incentivo, paciência e credibilidade dispensados a mim durante o período de elaboração, desenvolvimento e conclusão deste trabalho.

Ao Laboratório Nacional de Luz Síncrotron (LNLS-Campinas), Laboratório de Instrumentação Nuclear (LIN-COPPE) e a Universidade de Campinas pela oportunidade de trabalhar com equipamentos de alta tecnologia para a obtenção dos resultados essenciais a este trabalho.

A professora Silvana Moreira, da Faculdade de Engenharia Civil, Arquitetura e Urbanismo (FEC/UNICAMP-SP), pela disponibilidade das instalações de seu laboratório. Ao Dr. Carlos Pérez, LNLS/CNPq, pelo suporte e orientação oferecidos nas medidas de fluorescência no LNLS.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo apoio financeiro essencial no decorrer do estudo.

Aos amigos, pois sem o apoio deles, tudo se tornaria mais difícil. Agradeço ao Edson, Aninha, Dudu e Christiano que sempre se mostraram fiéis incentivadores.

E evidentemente a Carla, que foi de extrema competência, disposição interminável e que sempre se mostrou comprometida com todas as tarefas realizadas servindo de exemplo para muitos. Sou extremamente grata por sua ajuda na elaboração e na confecção das amostras desse trabalho.

Não poderiam estar de fora dessa lista de agradecimentos, amigos particulares, que também compartilharam dessa jornada: Martins, Lau, Cleber e Renata. Por último, mas não menos importante agradeço com muito carinho as minhas amigas Rita Lee e a Márcia Lencastre que puderam compreender a minha ausência em alguns momentos. A todos os funcionários do laboratório de Instrumentação Nuclear e a todos aqueles que contribuíram para a realização desse trabalho. Muito obrigada!

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

ESTUDO DOS EFEITOS DA IRRADIAÇÃO EM SANGUE TOTAL, MATRIZ
CELULAR E PLASMA USANDO ESPALHAMENTO COERENTE DE RAIOS X E
FLUORESCÊNCIA DE RAIOS X POR REFLEXÃO TOTAL

Nivia Graciele Villela Pinto

Março/2008

Orientador: Delson Braz
Regina Cely Rodrigues Barroso
Programa: Engenharia Nuclear

Atualmente, a investigação de efeitos biológicos radioinduzidos em sangue e hemocomponentes tem sido realizada a fim de correlacioná-los com as doses de radiação geralmente utilizadas na prática transfusional. Neste trabalho, amostras humanas de sangue total (ST), matriz celular (MC) e plasma (PL) foram irradiadas com doses de 15 a 30 Gy usando radiação gama e, em seguida, liofilizadas e pulverizadas. Possíveis variações moleculares e elementares foram avaliadas, após comparação com amostras de controle (não-irradiadas), usando as técnicas de espalhamento coerente de raios X (LAXS) e fluorescência de raios X por reflexão total usando luz síncrotron (SR-TXRF). As medidas de LAXS foram realizadas usando um difratômetro comercial, no Laboratório de Instrumentação Nuclear (LIN/COPPE) e as de SR-TXRF, foram realizadas na linha de Fluorescência de Raios X do Laboratório Nacional de Luz Síncrotron (LNLS). Para as medidas de SR-TXRF, as amostras foram submetidas à digestão ácida. Os valores médios dos parâmetros de caracterização das amostras de PL foram significativamente diferentes quando comparados com os parâmetros das amostras de ST e MC independente do valor de dose. Pode-se verificar que a idade influencia as características das amostras estudadas. Não se verificou variação significativa na concentração de Ca e, em contrapartida, o K foi o único elemento que sofreu alterações significativas para todas as amostras analisadas em função da dose. A concentração de Fe diminuiu apenas para as amostras de ST e PL. A concentração de Zn apresentou uma diminuição significativa somente para as amostras de ST.

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

STUDY OF IRRADIATION EFFECTS ON WHOLE BLOOD, FORMED
ELEMENTS AND PLASMA BY COHERENT X-RAY SCATTERING AND TOTAL
REFLECTION X-RAY FLUORESCENCE

Nivia Graciele Villela Pinto

March/2008

Advisor: Delson Braz
Regina Cely Rodrigues Barroso

Department: Nuclear Engineering

The investigation of radioinduced biological effects caused by irradiation procedures on whole blood and blood components effects are nowadays of great interest. In this study, lyophilized human samples of whole blood (ST), formed elements (MC) and plasma (PL) were irradiated with doses from 15 to 30 Gy using gamma radiation and then, lyophilized and powdered. Comparing with control samples (non irradiated), injuries were evaluated by coherent X-ray scattering (LAXS) and total reflection X-ray fluorescence using synchrotron radiation (SR-TXRF). Scattering measurements were carried out using a powder diffractometer at Nuclear Instrumentation Laboratory (LIN/COPPE). The SR-TXRF measurements were obtained at the X-Ray Fluorescence beamline at Brazilian Synchrotron Light Laboratory (LNLS). For the SR-TXRF measurements the samples demanded chemical digestion. The statistical analysis showed that the characterization parameters for PL was found significantly different comparing with ST and MC samples over the dose range. Age was positively associated with the characteristic scattering profiles for all samples. While no positive association was found for the variation of Ca contents, the variation of K content was positively associated with the dose for ST, MC and PL. On the other hand, the Fe levels decrease for ST and PL and the Zn levels decrease only in ST as the dose increases.

ÍNDICE

CAPÍTULO I - INTRODUÇÃO	1
1.1 - INTRODUÇÃO	1
1.2 – ESPALHAMENTO COERENTE DE RAIOS X.....	3
1.3 – FLUORESCÊNCIA DE RAIOS X POR REFLEXÃO TOTAL	5
1.4 - OBJETIVO.....	7
CAPÍTULO II - FUNDAMENTOS TEÓRICOS.....	9
2.1 – SANGUE.....	9
2.1.1 – COMPONENTES DO SANGUE.....	11
2.1.2 – FUNÇÃO DE ALGUNS ELEMENTOS NO ORGANISMO E OS EFEITOS DEVIDO AO AUMENTO OU REDUÇÃO EM SUAS CONCENTRAÇÕES.	13
2.1.2.1 – CÁLCIO (Ca).	13
2.1.2.2 – POTÁSSIO (K).	13
2.1.2.3 - FERRO (Fe).	14
2.1.2.4 – ZINCO (Zn).	14
2.1.2.5 – COBRE (Cu).	14
2.1.2.6 – ESTRÔNCIO (Sr).....	15
2.2 - UMA BREVE HISTÓRIA DA HEMOTERAPIA.	15
2.2.1 - PRINCIPAIS ACONTECIMENTOS.	15
2.3 – A DOENÇA DO ENXERTO CONTRA HOSPEDEIRO (DECH)	23
2.5 - ANTICOAGULANTE	26
2.6 – LIOFILIZAÇÃO	26
2.7. TÉCNICAS NUCLEARES DE MEDIDAS.	27
2.7.1 – INTERAÇÃO DA RADIAÇÃO COM A MATÉRIA.....	27
2.7.2 – ESPALHAMENTO COERENTE DE RAIOS X.....	27
2.7.3 – FLUORESCÊNCIA DE RAIOS X	31
2.7.3.1 ANÁLISE QUANTITATIVA.....	34
2.7.3.2 LIMITE DE DETECÇÃO.....	37
2.8 – LUZ SÍNCROTRON.....	38
2.9 – NOÇÕES GERAIS DE ESTATÍSTICA	40
2.9.1 – TESTE DE HIPÓTESES.....	41
2.9.2. ANÁLISE DE VARIÂNCIA (ANOVA)	42

2.9.3. TESTE DE BONFERRONI	43
2.10. BOXPLOT.....	44
CAPÍTULO III - MATERIAIS E MÉTODOS	46
3.1 – MEDIDAS DE DIFRAÇÃO DE RAIOS X.....	46
3.1.1. PREPARAÇÃO DAS AMOSTRAS	46
3.1.1.1. IRRADIAÇÃO	47
3.1.1.2. LIOFILIZAÇÃO E PULVERIZAÇÃO	50
3.1.2 – INSTRUMENTAÇÃO	51
3.1.3 - PARÂMETROS DE CARACTERIZAÇÃO	53
3.2 – MEDIDAS DE FLUORESCÊNCIA DE RAIOS-X POR REFLEXÃO TOTAL COM RADIAÇÃO SÍNCROTRON (SR-TXRF)	54
3.2.1. PREPARAÇÃO DAS AMOSTRAS	54
3.2.2 – INSTRUMENTAÇÃO	57
CAPÍTULO IV – RESULTADOS	59
4.1. DIFRAÇÃO DE RAIOS X	59
4.1.1. CARACTERIZAÇÃO DOS PERFIS DE ESPALHAMENTO	59
4.1.1.1. SANGUE TOTAL E MATRIZ CELULAR.....	62
4.1.1.2. PLASMA	63
4.1.2. ANÁLISE QUANTO À DOSE.....	65
4.1.3. ANÁLISE QUANTO À IDADE DOS DOADORES	69
4.1.3.1. SANGUE TOTAL E MATRIZ CELULAR.....	70
4.1.3.2. PLASMA.....	79
4.1.4 – AS AMOSTRAS IRRADIADAS COM 20Gy.....	85
4.2. ANÁLISE QUANTITATIVA POR FLUORÊSCENCIA DE RAIOS X POR REFLEXÃO TOTAL (TXRF)	86
4.2.1 - CÁLCULO DA SENSIBILIDADE RELATIVA	86
4.2.2 – CÁLCULO DO LIMITE DE DETECÇÃO (LD).	88
4.2.3 - VALIDAÇÃO DA METODOLOGIA.....	92
4.2.4 - ANÁLISE DOS RESULTADOS.....	93
CAPÍTULO V – CONCLUSÕES E SUGESTÕES	100
5.1 – DIFRAÇÃO DE RAIOS X	100
5.1.1 – CARACTERIZAÇÃO DOS PERFIS DE ESPALHAMENTO	100
5.1.2 – EFEITO DO PROCESSO DE IRRADIAÇÃO.....	101
5.1.3 – EFEITO DA IDADE DO DOADOR	102

5.1.3.1 – AMOSTRAS DE CONTROLE.....	102
5.1.3.2 – AMOSTRAS IRRADIADAS.....	103
5.2 – SR-TXRF.....	104
5.2.1 – AMOSTRAS DE CONTROLE.....	104
5.2.2 – AMOSTRAS IRRADIADAS.....	104
5.3 – CONSIDERAÇÕES FINAIS E SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS.....	105
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	107

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 2. 1 - Vaso sanguíneo e as diferentes linhagens celulares (ZAGO et al, 2005)....	9
Figura 2.2 - Linhagem celular (TORTORA, 2006).....	11
Figura 2. 3 -Componentes do sangue.	12
Figura 2.4 - Esquema de captação de doadores de sangue até a transfusão.	22
Figura 2. 5 – Esquema do fenômeno da difração de raios X.....	28
Figura 2. 6 – Experimento de Laue para difração de raios X.....	29
Figura 2. 7 – Perfil de difração: (a) material cristalino e (b) material amorfo.	30
Figura 2. 8 - Geometria Bragg-Bretano (WILLARD et al., 1974).....	31
Figura 2. 9 - Vista geral da estação experimental DO9B-XRF do Laboratório Nacional de Luz Síncrotron com a instrumentação.	39
Figura 2. 10 – Exemplo de gráfico <i>boxplot</i>	44
Figura 2. 11 – Exemplos de <i>boxplot</i> e distribuição de dados.	45
Figura 3. 1 – Distribuição das amostras para DRX em função da idade do doador.....	46
Figura 3. 2 - Esquema de preparação das amostras.....	47
Figura 3. 3: Fonte de cobalto-60, modelo Gammacell 220 da Nordion.	48
Figura 3. 4 - Distribuição das amostras para DRX em função da dose.....	49
Figura 3. 5 – Distribuição das amostras para DRX em função dos hemocomponentes.	49
Figura 3. 6- Amostras encaminhadas para liofilização.....	50
Figura 3. 7– Amostras de sangue pulverizadas.	51
Figura 3. 8 - Difratorômetro XRD-6000 da Shimadzu.....	52
Figura 3. 9 - Amostras de (a) sangue total, (b) matriz celular e (c) plasma colocadas nos porta-amostras.	52
Figura 3. 10 - Obtenção dos parâmetros de caracterização.....	53
Figura 3. 11 – Distribuição das amostras para SR-TXRF em função da dose.....	54
Figura 3. 12 - Distribuição das amostras em função dos hemocomponentes.....	55
Figura 3. 13 - Amostras colocadas no tubo digestor.	56
Figura 3. 14 - Arranjo experimental.	57
Figura 4. 1 - Perfil característico de amostras de sangue total (ST).....	59
Figura 4. 2 – Perfil característico de amostras de matriz celular (MC).....	60
Figura 4. 3 – Perfil característico de amostras de plasma (PL).	60
Figura 4. 4 - Comparação entre os perfis de espalhamento de ST, MC e HB.....	62
Figura 4. 5 - Comparação entre os perfis de espalhamento da albumina e do plasma... ..	64

Figura 4. 6 – Comparação dos valores médios encontrados para parâmetros de caracterização: (a) θ_2 , (b) FWHM ₂ , (c) FWHM ₁ e (d) I ₁ /I ₂	68
Figura 4. 7 - Comparação dos valores médios encontrado para todos os parâmetros de caracterização para as amostras irradiadas com 20Gy.	69
Figura 4. 8 - Representação da posição do primeiro pico para as amostras de ST de controle.	76
Figura 4. 9 - Representação da posição do primeiro pico para as amostras de ST irradiadas com 20 Gy.....	76
Figura 4. 10 - Representação da posição do primeiro pico para as amostras de MC de controle.	77
Figura 4. 11 - Representação da posição do segundo pico para as amostras de MC de controle.	77
Figura 4. 12 - Representação da posição do primeiro pico para as amostras de MC irradiadas com 15 Gy.....	78
Figura 4. 13 - Representação da posição do segundo pico para as amostras de MC irradiadas com 15 Gy.....	78
Figura 4. 14 - Representação da posição do primeiro pico para as amostras de PL de controle.	82
Figura 4. 15 - Representação da posição do primeiro pico para as amostras de PL irradiadas com 15 Gy.....	83
Figura 4. 16 - Representação da posição do segundo pico para as amostras de PL irradiadas com 15 Gy.....	83
Figura 4. 17 - Representação da posição do primeiro pico para as amostras de PL irradiadas com 20 Gy.....	84
Figura 4. 18 - Representação da posição do segundo pico para as amostras de PL irradiadas com 20 Gy.....	84
Figura 4. 19 - Curva da sensibilidade relativa (Si) para a série K.....	87
Figura 4. 20 - Curva da sensibilidade relativa (Si) para a série L.	88
Figura 4. 21 - Limite de detecção dos elementos da série K nas amostras de sangue total.	90
Figura 4. 22 - Limite de detecção dos elementos da série K nas amostras de matriz celular.	90
Figura 4. 23 - Limite de detecção dos elementos da série K nas amostras de plasma. ..	91
Figura 4. 24 – Espectro característico de uma amostra de sangue total.	94

Figura 4. 25 – Espectro característico de uma amostra de matriz celular.	94
Figura 4. 26 – Espectro característico de uma amostra de plasma.	95
Figura 4. 27 – Concentrações relativas dos elementos avaliados nas amostras de (a) sangue total, (b) matriz celular e (c) plasma.....	99

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 2. 1 - Linhagem celular que constituem o sangue (ZAGO, 2005).....	10
Tabela 2. 2 - História da hemoterapia no Brasil (JUNQUEIRA et al., 2005).....	17
Tabela 2. 3 - Os hemocomponentes e suas indicações (RAZOUK et al,2004).....	18
Tabela 2. 4 - Legislação Brasileira sobre transfusão de sangue (MOURA et al 2006)..	20
Tabela 4. 1 – Valores médios encontrados para os parâmetros de caracterização para as amostras de controle.	61
Tabela 4. 2 – Valores médios encontrados para os parâmetros de caracterização para as amostras de ST, MC e HB.....	63
Tabela 4. 3 - Comparação entre os parâmetros de caracterização dos perfis de espalhamento da albumina e do plasma.	65
Tabela 4. 4 - Valores médios encontrados para os parâmetros de caracterização para as amostras irradiadas com 15Gy.	66
Tabela 4. 5 - Valores médios encontrados para os parâmetros de caracterização para as amostras irradiadas com 20Gy.	66
Tabela 4. 6 - Valores médios encontrados para os parâmetros de caracterização para as amostras irradiadas com 25Gy.	67
Tabela 4. 7 - Valores médios encontrados para os parâmetros de caracterização para as amostras irradiadas com 30Gy.	67
Tabela 4. 8 – Comparação dos parâmetros de caracterização dos perfis de amostras de sangue total em função da idade do doador – Amostras de controle.	70
Tabela 4. 9 – Comparação dos parâmetros de caracterização dos perfis de amostras de sangue total em função da idade do doador – Amostras irradiadas com 15 Gy.....	71
Tabela 4. 10 – Comparação dos parâmetros de caracterização dos perfis de amostras de sangue total em função da idade do doador – Amostras irradiadas com 20 Gy.....	71
Tabela 4. 11 – Comparação dos parâmetros de caracterização dos perfis de amostras de sangue total em função da idade do doador – Amostras irradiadas com 25 Gy.....	72
Tabela 4. 12 – Comparação dos parâmetros de caracterização dos perfis de amostras de sangue total em função da idade do doador – Amostras irradiadas com 30 Gy.....	72
Tabela 4. 13 – Comparação dos parâmetros de caracterização dos perfis de amostras de matriz celular em função da idade do doador – Amostras de controle.....	73

Tabela 4. 14 – Comparação dos parâmetros de caracterização dos perfis de amostras de matriz celular em função da idade do doador – Amostras irradiadas com 15 Gy.....	73
Tabela 4. 15 – Comparação dos parâmetros de caracterização dos perfis de amostras de matriz celular em função da idade do doador – Amostras irradiadas com 20 Gy.....	74
Tabela 4. 16 – Comparação dos parâmetros de caracterização dos perfis de amostras de matriz celular em função da idade do doador – Amostras irradiadas com 25 Gy.....	74
Tabela 4. 17 – Comparação dos parâmetros de caracterização dos perfis de amostras de matriz celular em função da idade do doador – Amostras irradiadas com 30 Gy.....	75
Tabela 4. 18 – Comparação dos parâmetros de caracterização dos perfis de amostras de plasma em função da idade do doador – Amostras de controle.	79
Tabela 4. 19 – Comparação dos parâmetros de caracterização dos perfis de amostras de plasma em função da idade do doador – Amostras irradiadas com 15 Gy.....	80
Tabela 4. 20 – Comparação dos parâmetros de caracterização dos perfis de amostras de plasma em função da idade do doador – Amostras irradiadas com 20 Gy.....	80
Tabela 4. 21 – Comparação dos parâmetros de caracterização dos perfis de amostras de plasma em função da idade do doador – Amostras irradiadas com 25 Gy.....	81
Tabela 4. 22 – Comparação dos parâmetros de caracterização dos perfis de amostras de plasma em função da idade do doador – Amostras irradiadas com 30 Gy.....	81
Tabela 4. 23 – Comparação entre os perfis de espalhamento das amostras de 20Gy. ...	85
Tabela 4. 24 - Concentração dos elementos químicos (mg/L) contidos nas soluções padrão, para determinação da sensibilidade da série K.	86
Tabela 4. 25 - Concentração dos elementos químicos (mg/L) contidos nas soluções padrão, para determinação da sensibilidade da série L.	87
Tabela 4.26 – Limites de detecção para os elementos da série K nas amostras de plasma.	89
Tabela 4.27 Valor do limite mínimo de detecção (LMD) para o elemento Pb nas amostras estudadas.	89
Tabela 4.28 – Comparação dos valores medidos e certificados da amostra de referência “Trace Elements in Natural Water” (NIST/SRM 1640) medidos por SR-TXRF.	92
Tabela 4.29 – Comparação dos valores medidos e certificados da amostra de referência "San Joaquim Soil" (NIST/SRM 2709).....	93
Tabela 4. 30 - Valores médios da concentração para amostras de sangue total.....	95
Tabela 4. 31 - Valores médios da concentração para amostras de matriz celular.	96
Tabela 4. 32 - Valores médios da concentração para amostras de plasma.....	96

Tabela 4.33 - <i>p-value</i> encontrados a partir da comparação entre as amostras de controle e as irradiadas para a concentração de Ca.	97
Tabela 4.34 - <i>p-value</i> encontrados a partir da comparação entre as amostras de controle e as irradiadas para a concentração de K.	97
Tabela 4.35 - <i>p-value</i> encontrados a partir da comparação entre as amostras de controle e as irradiadas para a concentração de Fe.	97
Tabela 4.36 - <i>p-value</i> encontrados a partir da comparação entre as amostras de controle e as irradiadas para a concentração de Zn.	98

CAPÍTULO I - INTRODUÇÃO

1.1 - INTRODUÇÃO

Com a descoberta da radioatividade e dos raios X, houve um uso indiscriminado das radiações ionizantes. Uma série de fatos chamou a atenção dos cientistas de que havia necessidade de estudos mais meticolosos dos efeitos biológicos destas radiações nos seres humanos. Observações iniciais como danos na pele, queda de cabelos em pacientes irradiados e efeitos nos descendentes após a irradiação do tecido germinativo de plantas e animais, foram constatados. No setor da saúde, a radiação ionizante encontra o seu maior emprego e, como consequência, é também onde mais são realizadas pesquisas no sentido de se obter o maior benefício com o menor risco possível.

Os benefícios advindos do uso das radiações ionizantes na saúde são incontáveis, sendo os principais: a cura de tumores através da terapia, a detecção precoce de doenças através do diagnóstico, a utilização como meio profilático na transfusão de sangue etc.

No mundo inteiro, a demanda por transfusões de sangue tem aumentado à medida que cresce o número de acidentes, violência e doenças. A busca por doadores tem-se constituído uma preocupação constante das autoridades sanitárias. A segurança de uma transfusão de sangue depende de vários fatores, tais como: o perfil epidemiológico da população na qual se faz a captação dos candidatos à doação, a seleção desses candidatos na triagem clínica e a triagem sorológica de infecções/doenças transmitidas pelo sangue (BRASIL, 1999).

A transfusão sanguínea é um processo que mesmo quando realizado dentro das normas técnicas preconizadas, envolve risco sanitário com a ocorrência potencial de incidentes transfusionais, que podem ser classificados como imediatos ou tardios. Uma reação adversa à transfusão de sangue é a doença do enxerto contra hospedeiro (DECH).

A DECH foi descrita em seres humanos por HATHAWAY et al (1965) após a transfusão de sangue fresco em duas crianças com suspeita de síndrome de imunodeficiência congênita.

A DECH é uma síndrome clínica rara e geralmente fatal caracterizada por febre, acometimento cutâneo, anorexia, náuseas, diarreia e disfunção hepática. A DECH é comumente observada nos transplantes de medula óssea (TMO), transplantes de órgãos sólidos que contenha grande quantidade de tecido linfóide e em transfusão de hemocomponentes. A única forma segura de abordagem é a profilaxia através da irradiação dos hemocomponentes. A dose inicialmente preconizada para irradiação de hemocomponentes era de 15Gy, a qual era baseada na dose para obtenção de células estimuladoras em cultura mista de linfócitos. O relato do aparecimento de DECH em um paciente submetido a transplante de medula óssea após a transfusão de hemocomponentes irradiados com 20Gy, provocando rejeição da medula transplantada, fez com que muitos centros realizassem estudos para determinação da dose segura de irradiação. Essa dose não deveria comprometer a viabilidade das células, ou acarretar mudanças nas características dos hemocomponentes (LANDI et al, 1999).

ROSEN et al (1993), utilizando cultura mista de linfócitos, compararam o crescimento de amostras não irradiadas com as amostras correspondentes que receberam doses escalonadas de irradiação gama variando de 5Gy a 50Gy e demonstraram que todas as mitoses são suspensas com doses entre 25 e 30Gy. Este resultado foi posteriormente confirmado, utilizando-se técnica mais sensível na quantificação dos linfócitos T da cultura mista, após a estimulação.

Estudos sobre a irradiação de sangue e seus componentes são realizados em vários países. Comumente a maior aplicação da irradiação de sangue está na prevenção da DECH e também em estudos investigativos dos efeitos biológicos a fim de correlacioná-los com a dose de radiação (IAEA,1997).

JANATPOUR et al (2005) descrevem que frequentemente irradia-se sangue e seus hemocomponentes com radiação gama, mas alguns centros utilizam raios X como forma alternativa de irradiação de sangue. Esta alternativa possui como vantagem o fato de ser mais barata e não depender das características físicas de um dado radioisótopo.

No entanto, os efeitos bioquímicos dos raios X nas células vermelhas (eritrócitos) não são bem caracterizados. É sabido que ocorrem mudanças na membrana dos eritrócitos, porém essas diferenças não chegam a comprometer o resultado clínico.

Este trabalho propõe avaliar a relação dose-efeito em sangue humano e seus hemocomponentes. A partir dos resultados obtidos pretende-se estabelecer a caracterização de amostras de sangue total, matriz celular e plasma a nível molecular usando a técnica de espalhamento coerente de raios X (LAXS – *Low Angle Scattering*) e a nível elementar através da técnica de fluorescência de raios X por reflexão total usando luz síncrotron (SR-TXRF).

1.2 – ESPALHAMENTO COERENTE DE RAIOS X

Nas últimas décadas, muitos autores, têm realizado medidas de perfis de espalhamento de amostras biológicas (EVANS et al, 1991; ELSHEMEY et al, 1999; DESOUKY et al, 2001; CASTRO et al, 2004; FILGUEIRAS, 2006). O crescente interesse em tais medidas deve-se à natureza característica do espalhamento coerente da radiação. O perfil de LAXS é caracterizado pela presença de um ou mais picos na direção do espalhamento, que satisfazem a Lei de Bragg. Por meio do LAXS entende-se a estrutura molecular da amostra obtendo-se uma assinatura que é característica do material em estudo. Dessa forma, LAXS de amostras biológicas, como o sangue e seus componentes, tem importância nos campos da biologia e medicina.

Em 1998, PELOW & VERGHESE apresentaram uma tabela de fatores de forma moleculares para uma série de tecidos animais, tecido mamário humano e plásticos calculados a partir de medidas de LAXS usando radiação síncrotron. ROY (1999) apresenta um estudo do estado da arte sobre a importância de medidas de LAXS e sobre o confronto dos dados experimentais obtidos por diferentes autores com os valores obtidos através das tabelas de fator de forma. Em 2002, TARTARI et al publicaram uma atualização dessas tabelas incluindo os efeitos de interferência molecular para tecido ósseo (cortical e trabecular), gordura, água e Plexiglas.

DESOUKY et al (2001) e ELSHEMEY et al (2001) apresentaram as primeiras medidas de LAXS de amostras de sangue liofilizado usando um difratômetro comercial, introduzindo o conceito dos parâmetros de caracterização dos perfis de espalhamento que serão utilizados neste trabalho. Em 2003, ELSHEMEY et al propuseram correlacionar às alterações das características de espalhamento do soro sanguíneo com a existência de cirrose e câncer de fígado. Em todos esses trabalhos, o número de amostras foi extremamente reduzido.

JOHNS & WISMAYER (2004) usaram dois difratômetros comerciais para obter a distribuição de LAXS de materiais amorfos, especificando o procedimento utilizado considerando as características do equipamento e do porta-amostras, efeitos do background e da dependência angular.

CASTRO et al (2004) publicaram medidas de espalhamento coerente de raios X usando luz Síncrotron de amostras de tecidos de mama humanos compostos por regiões saudáveis e regiões com carcinoma ductal infiltrante com o objetivo de mapear e distinguir regiões invadidas pelo câncer. CASTRO et al (2005) publicaram perfis de espalhamento inéditos para outros tecidos humanos: rim e útero.

A sensibilidade da LAXS foi previamente demonstrada na observação de mudanças estruturais em amostras de soro humano liofilizado e em amostras de sangue total, soro e hemoglobinas irradiadas com doses de 3, 6 e 9 Gy (MIKUSINKA-PLANNER, 2000; ELSHEMEY et al, 2001).

O espalhamento coerente das amostras biológicas é dominado pelo perfil da água (ELSHMEY, 2001, CASTRO, 2005), já que os tecidos biológicos são em grande parte compostos dessa substância. A remoção da água por liofilização produz espectros consideravelmente diferentes das amostras não liofilizadas. Essa técnica, também conhecida como desidratação a frio, é um eficiente processo de secagem de amostras biológicas que preserva células, enzimas, vacinas, vírus, soros, derivados sanguíneos etc. Assim, neste trabalho, usaremos amostras liofilizadas de sangue e hemocomponentes.

FILGUEIRAS (2006) mostrou que se obteve sucesso na proposta de caracterização de amostras de sangue de doadores portadores de diabetes através dos perfis de espalhamento. Embora com um número pequeno de amostras, podem-se perceber diferenças entre as médias quando o parâmetro idade foi levado em consideração.

Considerando as observações realizadas por FILGUEIRAS (2006) e a existência de legislações que estabelece o intervalo de dose ao qual o sangue e seus hemocomponentes devem ser irradiados, optou-se por estudar os efeitos decorrentes da irradiação no intervalo considerado de alta dose (15Gy a 30Gy).

1.3 – FLUORESCÊNCIA DE RAIOS X POR REFLEXÃO TOTAL

A Fluorescência de Raios X (XRF) é uma técnica de análise multielementar que se baseia na medida das intensidades dos raios X característicos emitidos pelos elementos químicos componentes da amostra, quando devidamente excitados. A Fluorescência de Raios X por Reflexão Total (TXRF - Total Reflection X-Ray Fluorescence) vem se desenvolvendo de forma bastante expressiva nos últimos anos, com grande aplicação na análise de elementos traços, na faixa de nanogramas ou ppb (partes por bilhão), em amostras líquidas; em pesquisas ligadas ao monitoramento ambiental; oceanografia; biologia; medicina; indústria e mineralogia (CANELLAS et al, 2006, LEITAO, 2005; MOREIRA et al, 2006; MELO JUNIOR, 2007; KHUDER et al, 2007; SERPA, 2007).

BELLISOLA et al. (1999) usaram a TXRF para monitorar a concentração de selênio (Se) presente no metabolismo e na excreção humana. Foram utilizadas amostras de soro, sangue e urina. Observou-se que os indivíduos pesquisados, após a ingestão de um composto de sódio e selênio, tiveram um pico de concentração de Se no sangue e soro, mas esse valor foi decrescendo lentamente. Na urina, a excreção de Se aumentou progressivamente.

AYALA et al. (1990) desenvolveram uma nova metodologia de diluição para preparação de amostras de sangue humano e constataram a determinação direta dos

níveis de elementos traço através da técnica “Total Reflection X-Ray Fluorescence” (TXRF). Identificaram os seguintes elementos: K, Ca, Ti, Cr, Fe, Ni, Cu, Zn, Pb, Rb e Sr.

LUE et al (2004) avaliaram a dificuldade associada à preparação de amostras biológicas para TXRF. Diferentes procedimentos de preparação e calibração foram analisados. A análise direta por TXRF mostrou-se um método satisfatório para a determinação de elementos traço em amostras biológicas como cérebro, líquido amniótico, soro e urina com uma qualidade analítica adequada.

O trabalho de CARVALHO et al (2001) propôs avaliar a possível influência da idade da mãe e peso do recém nascido com as concentrações de elementos traço no líquido amniótico e na placenta usando EDXRF (*Energy Dispersive X-Ray Fluorescence*) e TXRF (*Total Reflection X-Ray Fluorescence*). Os níveis encontrados de Ni e Sr no líquido amniótico foram baixos e independentes da idade da mãe e do peso da criança. O Zn, considerado um dos elementos fundamentais para a saúde do recém nascido, não apresentou diferença significativa nas amostras analisadas. Os dois únicos elementos que apresentaram estar correlacionados significativamente com a idade da mãe e peso do recém-nascido eram o Ca e o Fe.

MATSUOKA et al (2005) investigaram a otimização do modo de preparo de amostras de sangue total, soro e plasma para TXRF. Essas amostras foram diluídas apenas em água Milli-Q e depositadas em refletores. Essa técnica permitiu a melhoria na detecção de Fe e Cl, porém acarretou a destruição das células vermelhas do sangue.

MARTINEZ et al. (2004) determinaram as concentrações de S, Ca, Cu, Zn, Rb e Pb em amostras de sangue de doadores escolhidos aleatoriamente que residiam na zona metropolitana do México utilizando TXRF. Observou-se que as concentrações de K e Br estavam possivelmente relacionadas com hábitos alimentares, geográficos ou fatores ambientais. Já as concentrações de S, Ca, Zn, Rb e Pb estavam dentro da faixa de valores medidos em populações de outros países.

MAGALHÃES et al. (2006) estudaram a distribuição elementar em amostras de tecidos humanos cancerosos e sadios utilizando as técnicas de EDXRF e TXRF.

Foram analisadas amostras de tecidos sadios e cancerosos de doadores alemães e portugueses. Os elementos determinados nesse estudo das amostras dos indivíduos portugueses foram: P, S, K, Ca, Fe, Cu, Zn e Cr, enquanto que nos alemães foram: P, S, K, Ca, Fe, Ni, Cu, Zn, Br, Sr, Rb e I.

Atualmente uma das técnicas modernas mais utilizadas para análise por fluorescência de raios X é utilização de luz Síncrotron. A construção de Laboratórios de Luz Síncrotron em todo mundo possibilitou uma grande variedade de aplicações em diferentes campos, tais como: ciências dos materiais, cristalografia, micro-espectroscopia, difração de raios X, fluorescência de raios X e muitos outros. (MELO JUNIOR, 2007).

Diversos trabalhos (CHEVALLIER, 1996, CARVALHO et al, 2001; YUYING, 2001; CANELAS et al, 2006; SERPA, 2006; BORGES et al, 2007) destacam a grande variedade de aplicações do uso da SR-TXRF (*Total Reflection X Ray Fluorescence using Synchrotron Radiation*) no campo da medicina, uma vez que o conhecimento da concentração de elementos traço em tecidos é de grande importância, porque esses elementos estão envolvidos em muitas funções biológicas.

1.4 - OBJETIVO

O presente estudo não se propõe à descoberta de um novo método de diagnóstico em hematologia nem a substituição de práticas nessa área, entretanto pretende-se contribuir positivamente com avanços em tais setores.

Os possíveis efeitos do processo de irradiação, no intervalo de dose geralmente usado em amostras humanas de sangue total, matriz celular e plasma para fins transfusionais serão avaliados a nível molecular e elementar. Os resultados também serão avaliados considerando a idade do doador. A fim de avaliar o efeito da irradiação, amostras de controle (não-irradiadas) também serão caracterizadas.

A avaliação dose-efeito será realizada à nível molecular através dos perfis de espalhamento característicos das amostras estudadas. Para tanto, parâmetros de

caracterização desses perfis serão introduzidos (DESOUKY, 2001; FILGUEIRAS, 2006). Os valores médios encontrados para esses parâmetros serão avaliados estatisticamente para todas as amostras e doses em função da idade do doador.

A nível elementar, as possíveis variações nas concentrações dos elementos Ca, K, Fe e Zn serão avaliadas em função da dose usando a análise quantitativa dos espectros multielementares obtidos por a SR-TXRF.

Desta forma, este trabalho tem como objetivo geral realizar a caracterização de amostras de ST, MC e PL de modo a complementar os trabalhos iniciados por FILGUEIRAS (2006) e MOTA (2008) criando um banco de dados de parâmetros de caracterização de perfis de LAXS com alto nível de significância. Pretende-se ainda usar esses dados para avaliar as possíveis variações na estrutura molecular de amostras ST, MC e PL submetidas à irradiação de altas doses (15 Gy a 30 Gy) em função da idade do doador.

Além disso, pretende-se realizar a quantificação das concentrações elementares de K, Ca, Fe e Zn em amostras de controle de ST, MC e PL e avaliar as possíveis variações em função do aumento de dose.

No próximo capítulo serão apresentados os fundamentos teóricos necessários para o bom entendimento desse trabalho. No terceiro capítulo, a metodologia utilizada para alcançar os objetivos propostos será apresentada. Os resultados serão apresentados e discutidos no quarto capítulo. As considerações finais, conclusões e sugestões para trabalhos futuros estarão no capítulo V.

CAPÍTULO II - FUNDAMENTOS TEÓRICOS

2.1 – SANGUE

O sistema circulatório constitui-se de três componentes inter-relacionados: o sangue, o coração e os vasos sanguíneos. O sangue é o único tecido conjuntivo líquido e tem três funções gerais: transporte, regulação e proteção. O sangue é constituído por três diferentes linhagens celulares: glóbulos vermelhos (eritrócitos ou hemácias); glóbulos brancos (leucócitos) e as plaquetas (trombócitos). O sangue circula continuamente através de uma rede complexa de tubos – os vasos sanguíneos - transportando produtos de um órgão para outro, a figura 2.1 mostra um vaso sanguíneo e as diferentes linhagens celulares.

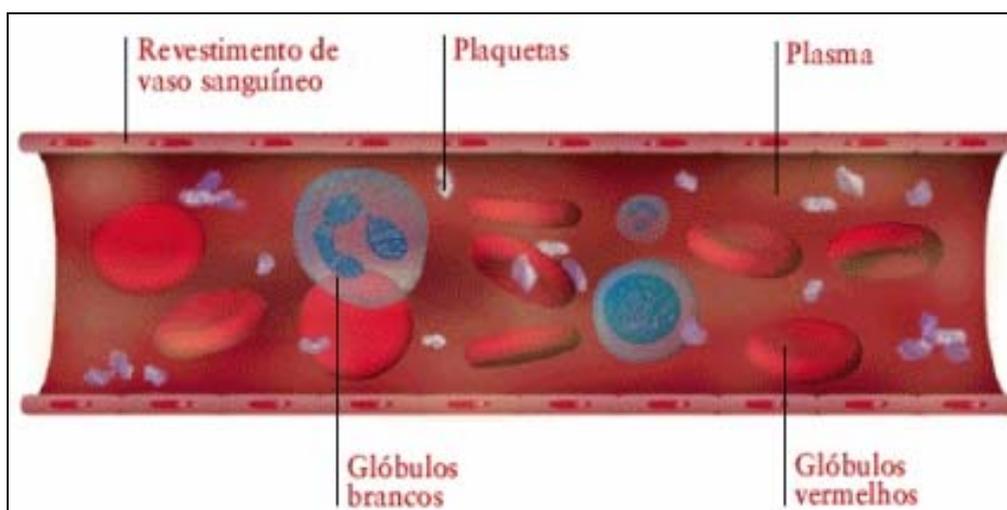


Figura 2. 1 - Vaso sanguíneo e as diferentes linhagens celulares (ZAGO et al, 2005).

Os glóbulos vermelhos ou eritrócitos são as células mais numerosas do sangue. São anucleadas (sem núcleo) e têm a forma de disco bicôncavo (pouco espessas no centro), o que lhes permite uma maior elasticidade conseguindo assim passar pelos capilares mais estreitos. Na sua constituição encontra-se um pigmento vermelho – a hemoglobina – que dá a cor ao sangue. A hemoglobina é uma proteína que contém ferro (é o ferro que confere à hemoglobina a capacidade de transportar oxigênio). Os eritrócitos têm como funções, o transporte de oxigênio dos pulmões para todas as

células e tecidos do organismo, onde o trocam por dióxido de carbono (ZAGO et al, 2005).

Os glóbulos brancos ou leucócitos são as células sanguíneas de maiores dimensões e as únicas que possuem núcleo (de diferentes formas). São menos numerosas do que os eritrócitos e consoante a presença ou ausência de granulações no citoplasma designam-se, nomeadamente, granulócitos e agranulócitos. Têm como função proteger o organismo contra certos microrganismos e agentes estranhos (ZAGO, et al, 2005).

As plaquetas ou trombócitos são fragmentos de células, sendo por isso os constituintes menores do sangue, com aproximadamente um quarto do tamanho dos glóbulos vermelhos. As plaquetas intervêm no processo de coagulação do sangue, que ocorre sempre que os vasos sanguíneos ou um tecido for danificado (OLIVEIRA,1991). A tabela 2.1 mostra resumidamente os elementos celulares que constituem o sangue e suas características e a figura 2.2 ilustra a linhagem celular que constitui o sangue.

Tabela 2. 1 - Linhagem celular que constituem o sangue (ZAGO, 2005).

NOME			CARACTERÍSTICAS
Eritrócitos (glóbulos vermelhos)			<i>Forma discoidal, bicôncavo, repleta de hemoglobina, transporta oxigênio para os tecidos.</i>
Leucócitos (glóbulos brancos)	Granulosos	Neutrófilo	<i>Forma esférica, núcleo tri lobulado; fagocitam bactérias e corpos estranhos.</i>
		Eosinófilo (acidófilo)	<i>Forma esférica, núcleo bi lobulado; participam das reações alérgicas, produzindo histamina.</i>
		Basófilo	<i>Forma esférica, núcleo irregular. Acredita-se que também participam de processos alérgicos; produzem histamina e heparina.</i>
	Agranulosos	Linfócitos (B e T)	<i>Forma esférica, núcleo também esférico; participam dos processos de defesa imunitária, produzindo e regulando a produção de anticorpos.</i>
		Monócito	<i>Forma esférica, núcleo oval ou reniforme, originam macrófagos e osteoclastos, células especializadas em fagocitar.</i>
Plaquetas (trombócitos)			<i>Forma irregular, sem núcleo, participam dos processos de coagulação do sangue.</i>

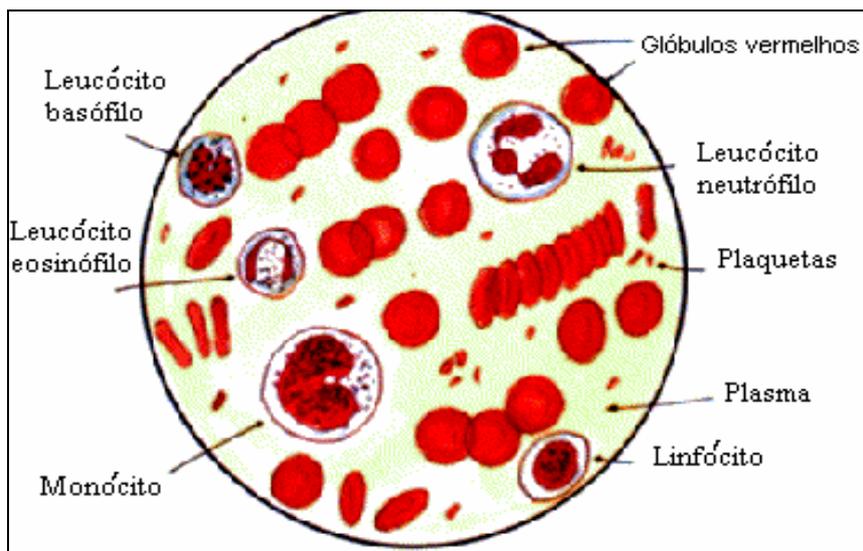


Figura 2.2 - Linhagem celular (TORTORA, 2006)

Através da circulação sangüínea, as células do organismo, em todos os tecidos, recebem sua alimentação representada por componentes de proteínas, açúcar, gordura, água e sais minerais. Também é o sangue que, retornando dos tecidos, conduz o gás carbônico e os resíduos das células do corpo, eliminando-as por meio da respiração, do suor, da urina e das fezes. O oxigênio é levado às células pelo sangue, através das moléculas de hemoglobina existentes nos glóbulos vermelhos. Além disso, praticamente todo o sistema de defesa do organismo contra doenças e os ataques de germes patogênicos está concentrado no sangue. O controle da temperatura do corpo, o equilíbrio da distribuição de água e o processo de absorção celular também estão diretamente ligados ao sangue (OLIVEIRA, 1991).

2.1.1 – COMPONENTES DO SANGUE

O sangue é um fluido mais denso e mais viscoso que a água. Sua temperatura é aproximadamente de 38°C e seu pH é levemente alcalino, variando de 7,35 a 7,45. O sangue constitui cerca de 8% do peso corporal total. O sangue total se caracteriza como o sangue coletado de um doador misturado com a solução preservativa e anticoagulante (BORDIN et al, 2007). O sangue total é composto por duas porções: os elementos figurados e o plasma sangüíneo como mostra a figura 2.3.

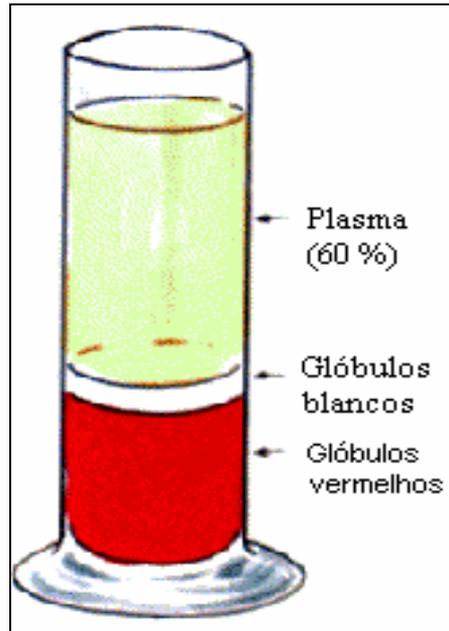


Figura 2. 3 -Componentes do sangue.

Os elementos figurados são as células e os fragmentos celulares, eritrócitos ou hemácias (glóbulos vermelhos), leucócitos (glóbulos brancos) e as plaquetas apresentados anteriormente na tabela 1. As células constituem de 30 a 55% do volume do sangue. A fração de células no sangue é denominada hematócrito. O plasma é composto primariamente de água, com aproximadamente 7% de proteínas e 2% de carboidratos e lipídeos. As substâncias nutrientes dissolvidas no plasma incluem glicose, aminoácidos, lipídeos e algumas vitaminas. Os metabólitos incluem uréia nitrogenada, creatinina, ácido úrico e bilirrubina. Muitos hormônios também estão presentes em quantidades pequenas, porém significativas (TORTORA, 2006).

O plasma é o líquido que fica sobre a camada de células resultante da centrifugação do sangue total quando coletado em tubos contendo anticoagulante. Já o soro é obtido a partir da centrifugação do sangue em tubos que não contêm anticoagulantes. Por definição, ele é destituído do fator de coagulação, mas é enriquecido com componentes celulares das plaquetas e produtos metabólicos. Basicamente, a diferença entre plasma e soro reside no fato de que o primeiro contém, além das proteínas do soro, fibrinogênio, fibrina e fatores de coagulação (LEITÃO, 2005). Globulina, albumina e fibrinogênio são proteínas geralmente encontradas no

plasma. Globulina e albumina são importantes na resposta imune do organismo. O fibrinogênio é importante no processo de coagulação sanguínea.

2.1.2 – FUNÇÃO DE ALGUNS ELEMENTOS NO ORGANISMO E OS EFEITOS DEVIDO AO AUMENTO OU REDUÇÃO EM SUAS CONCENTRAÇÕES.

Existe uma série de elementos químicos que são considerados essenciais para a vida humana e a análise quantitativa desses elementos químicos tem um papel importante na área biomédica uma vez que a alteração em suas concentrações acarreta uma interferência no metabolismo dos seres humanos (SALGADO, 2000).

2.1.2.1 – CÁLCIO (Ca).

O cálcio possui como função o fortalecimento de ossos e dentes, atividade muscular e permeabilidade celular. A maior parte do cálcio do corpo é armazenada nos ossos, mas ele também é encontrado nas células e no sangue. O excesso pode provocar pedra nos rins e insuficiência renal. Quando necessário, o cálcio desloca-se dos ossos para o sangue para manter a sua concentração sérica. No entanto, a mobilização excessiva do cálcio dos ossos acabará provocando seu enfraquecimento, podendo levar à osteoporose.

2.1.2.2 – POTÁSSIO (K).

O potássio regula o balanço dos fluidos corpóreos, atua em contrações musculares e impulsos nervosos. Vários mecanismos atuam em conjunto para manter o equilíbrio hídrico do organismo.

Embora o sódio seja o mineral mais diretamente relacionado com a hipertensão, sabe-se hoje que outros minerais podem também interferir nos níveis de pressão. Há fortes indícios de que os níveis de potássio também sejam muito importantes já que protegem contra o aumento da pressão e o acidente vascular cerebral.

A hipocalcemia é a concentração sérica baixa de potássio. Os rins normais conservam o potássio de uma forma extremamente eficaz. Desta forma, a diminuição da

concentração sérica de potássio, geralmente, indica que os rins não estão funcionando de forma regular ou que houve uma perda excessiva de potássio através do trato gastrointestinal decorrente de vômito, diarreia, uso crônico de laxante ou da presença de pólipos no cólon (SALGADO, 2000).

2.1.2.3 - FERRO (Fe).

Componente da hemoglobina e complexos enzimáticos necessários à geração de energia e ao sistema imunológico. O ferro presente no organismo é muito importante para o seu bom funcionamento. No entanto, quando em excesso, ele se torna prejudicial, sendo o fígado o seu principal depósito. O excesso de ferro no organismo é comum em pacientes que fazem transfusões regulares de sangue, como os que sofrem de anemia crônica e pacientes com hemocromatose. A anemia é uma manifestação tardia e insidiosa da carência que surge quando as reservas orgânicas esgotam-se em virtude do balanço negativo. Além disso, existe manifestação no sistema nervoso. A deficiência de ferro ocasiona uma diminuição das defesas imunitárias e, portanto, de um lado, uma menor resistência às infecções, e de outro, um risco adicional de câncer por esta menor resistência, além de alteração das estruturas epiteliais (SALGADO, 2000).

2.1.2.4 – ZINCO (Zn).

O zinco está presente em todos os tecidos, principalmente em ossos, músculos e pele, atua no sistema imunológico, regula o crescimento corpóreo, protege o fígado. O aumento em sua concentração provoca anemia, febre e distúrbios do sistema nervoso central como pode ocorrer em pacientes sofrendo hemodiálise. Entre os efeitos da deficiência de zinco se destaca a redução da função imune. Esta situação é proveniente de uma redução do número total de leucócitos, principalmente linfócitos, tornando os indivíduos que padecem da deficiência de zinco mais sujeitos à ação de diversos patógenos, além de ter um período de recuperação mais longo (SALGADO, 2000).

2.1.2.5 – COBRE (Cu).

O cobre atua em enzimas oxidantes no metabolismo energético, é ativo na síntese de hemoglobina, queratização e pigmentação de pele e cabelo. O excesso danifica o fígado e causa envenenamento (UNFER, 2006).

2.1.2.6 – ESTRÔNCIO (Sr).

O estrôncio, o cálcio e o magnésio (Mg) formam cátions divalentes nos fluidos biológicos e tem diversos graus de ligação a proteínas plasmáticas, observando-se que o Sr e o Ca competem pela ligação às proteínas no soro ou no plasma e compartilham de propriedades químicas e fisiológicas similares. Não há relatos de toxicidade por superdose de Sr em humanos (UNFER, 2006).

2.2 - UMA BREVE HISTÓRIA DA HEMOTERAPIA.

2.2.1 - PRINCIPAIS ACONTECIMENTOS.

Hemoterapia é o emprego terapêutico do sangue, que pode ser transfundido como sangue total ou como um de seus componentes (hemocomponentes) e derivados (hemoderivados). Os hemocomponentes, obtidos através de processos físicos, são:

- Concentrado de hemácias, plasma fresco congelado,
- Concentrado de plaquetas e crioprecipitado.

Já os hemoderivados são fabricados através da industrialização do plasma:

- Albumina, Imunoglobulinas
- Fatores da coagulação (Fator VII, Fator VIII, Fator IX, além dos complexos protombínicos).

A transfusão de sangue teve dois períodos: um empírico, que vai até 1900, e outro científico, de 1900 em diante. No Brasil, em 1879, um relato discutia se a melhor transfusão seria com sangue de animais para humanos ou entre seres humanos. Na era científica, os pioneiros da hemoterapia foram cirurgiões do Rio de Janeiro. Por volta de 1920 surgem os primeiros serviços organizados e de constituição bastante simples. Destaca-se, nos anos 40, no Rio de Janeiro, o STS (Serviço de Transfusão de Sangue) por ter, além da conotação assistencial, atividades científicas. No final desta década, é promovido o I Congresso Paulista de Hemoterapia, que forneceu as bases para a fundação da Sociedade Brasileira de Hematologia e Hemoterapia (SBHH), em 1950.

Em 1965 cria-se, por iniciativa do Ministério da Saúde, a Comissão Nacional de Hemoterapia, estabelecendo normas para a proteção dos doadores e receptores de sangue. Mesmo assim, chegamos em 1979 com um sistema desorganizado e desigual na qualidade dos serviços prestados (JUNQUEIRA et al., 2005)

Nos anos 80, a criação da Política Nacional do Sangue, a campanha da doação altruísta de sangue da SBHH e a Constituição de 1980 deram outra dimensão à hemoterapia brasileira. Chegamos então ao contemporâneo onde a desastrosa ocorrência da AIDS (*Acquired Immune Deficiency Syndrome*) em pacientes transfundidos obrigou a novos conceitos e cuidados. Além disso, outros fatos importantes contribuíram para a hemoterapia no País, como o conceito da hemoterapia clínica, fatores econômicos, desenvolvimento da genética molecular e biotecnologia, a terapia celular, a renovação de equipamentos, a automação e computação, os sistemas da qualidade e o interesse do hemoterapeuta por áreas científicas de ponta (JUNQUEIRA et al., 2005)

A prática transfusional no Brasil continua evoluindo como ocorre em outros países do mundo. A tabela 2.2 resume os principais acontecimentos que marcaram a evolução na prática da transfusão de sangue no Brasil.

Tabela 2. 2 - História da hemoterapia no Brasil (JUNQUEIRA et al., 2005)

Ano	Acontecimentos
1879	<i>A Tese de DSc de José V. Marcones descreve experiências empíricas realizada onde se discute se a melhor transfusão seria a do animal para o homem ou entre seres humanos. Essa tese também descreve detalhadamente a reação hemolítica aguda.</i>
1900	<i>Karl Landsteiner descobriu os grupos sanguíneos</i>
1900	<i>Profº Garcez Fróes, na Bahia, realizou a primeira transfusão de sangue usando o aparelho de agote improvisado por ele transfundido 120ml de sangue.</i>
1916	<i>A Tese de Isaura Leitão relata o caso ocorrido anteriormente na Bahia e acrescentou mais outros casos semelhantes.</i>
Pouco depois	<i>Criação de serviços especializados e o surgimento de organizações simples contando com um médico transfusionista e de um corpo de doadores universais). A utilização da seringa de Jubé.</i>
Anos 40.	<i>Surgimento de vários serviços de transfusão e criação do serviço de transfusão no Rio de Janeiro, Juiz de Fora, Salvador e em Recife.</i>
1950	<i>Consolidação das especialidades de Hematologia e Hemoterapia Criação da Sociedade Brasileira de Hemoterapia e Hematologia (SBHH).</i>
1980	<i>Presidente da SBHH, Celso Carlos de Campos Guerra estimulou e liderou diversos colegas em uma cruzada por todo o país para o fim da doação remunerada. Culminou na extinção da doação remunerada de sangue no Brasil.</i>
2002	<i>O artigo 199 da Constituição aprovada em 1988 estabeleceu que a assistência à saúde é livre à iniciativa privada, e no seu parágrafo 4 diz que a lei disporá sobre as condições e os requisitos que facilitem a remoção dos órgãos, tecidos e 206 substâncias humanas para fins de transplante, pesquisa e tratamento, bem como a coleta, processamento e transfusão de sangue e seus componentes, vedado todo tipo de comercialização. Porém apenas em 2002, a regulamentação legal deste artigo, apresentada por Sergio Arouca, foi aprovada com a proibição da doação gratificada de sangue, conceituando a remuneração dos serviços através da cobertura de custos de processamento.</i>
Atualmente	<i>A nova fronteira apresentada à hemoterapia relaciona-se a tudo aquilo que a medicina considera hoje como ciência de ponta, como a biologia molecular, a engenharia genética e terapia celular.</i>

A hemoterapia moderna baseia-se no uso seletivo dos componentes do sangue. A utilização correta dos diversos hemocomponentes, associada a um maior controle de qualidade nas diversas etapas desde a coleta até o fracionamento, tem tornado a hemoterapia mais segura e hoje muitos pacientes são beneficiados com hemoderivados em uma única doação.

Na atualidade, avanços têm sido alcançados no tratamento de infecções graves em recém-natos e pacientes imunodeprimidos com transfusões de concentrado de leucócitos. Na tabela a 2.3 são descritos de forma sucinta as principais indicações do uso do sangue e seus hemocomponentes para fins transfusionais (RAZOUK et al,2004).

Tabela 2. 3 - Os hemocomponentes e suas indicações (RAZOUK et al,2004)

Componente/Produto	Composição	Volume (ml)	Indicações
Sangue Total	<i>Hemácias; plasma; leucócitos; plaquetas</i>	500	<i>Aumento da massa eritrocitária e do volume plasmático (os leucócitos e as plaquetas são não funcionais). Plasma deficiente em fatores lábeis da coagulação.</i>
Concentrado de Hemácias	<i>Hemácias; pequeno volume de plasma; leucócitos: plaquetas</i>	250	<i>Aumento do hematócrito em anemias sintomáticas (os leucócitos e plaquetas são não funcionais)</i>
Concentrado de Hemácias lavadas	<i>Hemácias; ausência de plasma e número de leucócitos menor que 5×10^8</i>	180	<i>Aumento da massa eritrocitária com redução dos riscos de reações alérgicas a proteínas plasmáticas</i>
Concentrado de plaquetas randômicas (convencional)	<i>plaquetas, valor estimado de $0,5 \times 10^{10}$</i>	50	<i>Tratamento ou prevenção de sangramentos devido a trombocitopenias</i>
Concentrado de Plaquetas por aférese	<i>Plaquetas, valor estimado entre $2,8$ e $3,2 \times 10^{11}$; plasma; hemácias e leucócitos em quantidade mínimas</i>	300	<i>Sangramentos devido a trombocitopenias nas trombocitopatias ou tratamento quimioterápico.</i>
Plasma Fresco Congelado	<i>Plasma; todos os fatores da coagulação; complementos; isento de plaquetas</i>	220	<i>Tratamento de coagulopatias e queimados.</i>
Albumina	<i>Albumina; frações de globulinas</i>	50	<i>Expansão de volume plasmático; Hipoalbuminemia</i>
Fator VIII e Fator IX liofilizados	<i>Fator VIII e Fator IX</i>	25	<i>Hemofilia A e hemofilia B</i>

2.2.2 – A PRÁTICA TRANSFUSIONAL.

O sangue, produto humano insubstituível, é utilizado em diversas situações e doenças. Pesquisas realizadas na Europa mostram que 5% da população são doadores e o fazem de forma regular e sistemática, entretanto, a cultura brasileira tem se mostrado adversa à doação voluntária e espontânea em decorrência de mitos e tabus socialmente arraigados. Devido em parte a esses fatores, a quantidade de doadores de sangue no Brasil é de apenas 2% da população, sendo que deste quantitativo apenas 25% são doadores espontâneos e habituais. A grande maioria dos doadores é composta por homens com idade a partir dos 30 anos, pertencentes à classe econômica baixa, que doam uma vez por ano para repor o sangue utilizado por parente ou amigo. A busca por doadores tem se constituído uma preocupação constante das autoridades sanitárias (ARARIPE, 2006).

O sangue doado, portanto, depende do desprendimento do doador, que deve estar consciente de que o ato da doação de sangue não pode prejudicar sua saúde, bem como a do receptor desse sangue.

Poderão ser doadores de sangue ou hemocomponentes pessoas com idades entre 18 e 65 anos de idade. Os doadores não incluídos entre estes limites, para sua aceitação, deverão ser previamente avaliados por um médico hemoterapeuta e, no caso de menores de 18 anos, se exigirá uma autorização escrita do responsável legal. (BRASIL, 1999; BRASIL, 2004)

Todo candidato a doar sangue com fins transfusionais deverá dar previamente o consentimento escrito à doação. A segurança de uma transfusão de sangue depende de certos fatores, existindo assim legislações de referências sobre a transfusão de sangue no país (MOURA et al, 2006). A tabela 2.4 sumariza algumas legislações referentes a tal prática .

Tabela 2. 4 - Legislação Brasileira sobre transfusão de sangue (MOURA et al 2006).

Legislação de Referência	
Lei n.º 1.075/MS, de 27 de março de 1950 – DOU de 27/3/1950	<i>Dispõe sobre doação voluntária de sangue. Será consignada com louvor na folha de serviço de militar, de funcionário público civil ou de servidor de autarquia, a doação voluntária de sangue, feita a banco mantido por organismo de serviço estatal ou paraestatal, devidamente comprovada por atestado oficial da instituição.</i>
Decreto n.º 53.988, de 30 de junho de 1964	<i>Institui o Dia Nacional do Doador Voluntário de Sangue.</i>
Decreto n.º 95.721, de 11 de fevereiro de 1988. Regulamenta a Lei n.º 7.649, de 25 de janeiro de 1988	<i>Estabelece a obrigatoriedade do cadastramento dos doadores de sangue, bem como a realização de exames laboratoriais no sangue coletado, visando a prevenir a propagação de doenças</i>
Lei n.º 10.205, de 21 de março de 2001	<i>Regulamenta a coleta, processamento, estocagem, distribuição e aplicação do sangue e seus hemoderivados e dá outras providências.</i>
Resolução - RDC n.º 24, de 24 de janeiro de 2002	<i>Aprova o Regulamento Técnico com a finalidade de obter plasma fresco congelado (PFC), de qualidade, seja para fins transfusionais seja para a produção de hemoderivados.</i>
Portaria n.º 59, de 28 de janeiro de 2003	<i>A sub-rede de laboratórios do Programa Nacional de DST e Aids, no que concerne ao diagnóstico laboratorial da infecção pelo HIV, serão compostas por todos os laboratórios, públicos e conveniados ao SUS, que realizam testes sorológicos para a detecção de anticorpos anti-HIV e de antígenos do HIV, organizados hierarquicamente, de acordo com a esfera de gestão do SUS à qual pertencem.</i>
Resolução - RDC n.º 190, de 18 de julho de 2003	<i>Determina Normas Técnicas para o funcionamento dos bancos de sangue de cordão umbilical e placentário.</i>

Considerando a necessidade de constante aperfeiçoamento das ações de controle sanitário na área de medicina transfusional; o Ministro de Estado da Saúde, no uso de suas atribuições, publicou a PORTARIA GM Nº 1.136, de 09 de setembro de 1999, (BRASIL, 1999), onde é descrito o perfil dos doadores e os procedimentos que devem ser realizados tanto para a recepção como para a doação de sangue. Atualmente em vigor encontra-se a Resolução - RDC nº 153, de 14 de junho de 2004, (BRASIL, 2004), que determina o regulamento técnico para os procedimentos hemoterápicos. Essa resolução revoga as resoluções anteriores RDC nº 343, de 13 de dezembro de 2002 e a RDC nº 190, de 18 de julho de 2003.

Dependendo do motivo da transfusão, o médico pode prescrever sangue total ou um hemocomponente como, por exemplo, eritrócitos, plaquetas, fatores da coagulação sangüínea, plasma fresco congelado ou leucócitos. Sempre que possível, é realizada a transfusão apenas do hemocomponente que suprirá a necessidade específica do paciente, e não de sangue total. O sangue total, como é conhecido à unidade de sangue antes de ser fracionada, não encontra hoje quase nenhuma indicação clínica onde não possa ser substituída com eficácia por seus componentes.

A razão para isto está no fato de que conseguimos conservar melhor os hemocomponentes isoladamente. Em uma bolsa de sangue total conservada adequadamente, pouco restará da atividade funcional transcorridas poucas horas. Separadas, quando fracionadas em sistema fechado e em bolsas apropriadas, podemos armazenar plaquetas por 3 a 5 dias. Concentrados de hemáceas em conservante adequado pode ser armazenado por até 42 dias (BORDIN et al, 2007).

Os hemocomponentes liberados para o consumo somente poderão ser transfundidos quando devidamente prescritos por médico e após a realização dos exames pré-transfusoriais pelo serviço de hemoterapia responsável. Tais exames têm o objetivo básico de garantir a compatibilidade sangüínea entre o doador e o receptor (BRASIL, 1998). Desse modo, as seguintes etapas mostrada na figura 2.4 deverão ser seguidas pelo serviço de hemoterapia sempre que seja indicada uma transfusão.

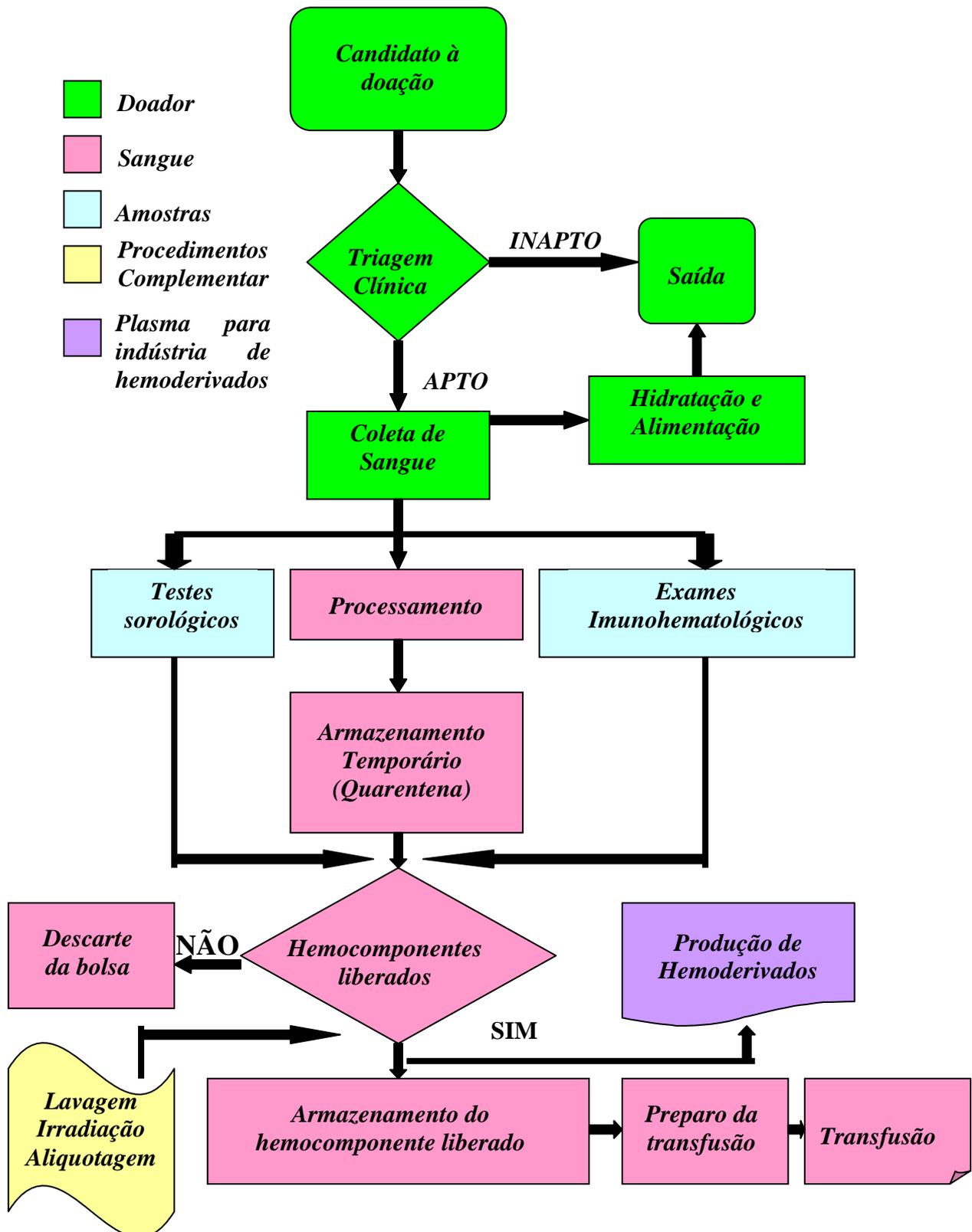


Figura 2.4 - Esquema de captação de doadores de sangue até a transfusão.

2.3 – A DOENÇA DO ENXERTO CONTRA HOSPEDEIRO (DECH)

A doença de enxerto contra hospedeiro (DECH) passa a ser a principal preocupação após o transplante de medula óssea (TMO), de órgãos sólidos, em práticas transfusionais de sangue total, de hemácias e em alguns casos associados a transfusões de concentrados de plaquetas, plasma e granulócitos. A DECH é uma complicação que afeta principalmente os indivíduos cujo sistema imune encontra-se comprometido. Nessa reação, os tecidos do receptor (hospedeiro) são atacados pelos leucócitos do doador (enxerto). Assim, a DECH associada à transfusão tem causado uma preocupação, cada vez maior, referente às práticas atuais de transfusão em pacientes imunodeficientes e imunossuprimidos devido à alta taxa de mortalidade (VISENTAINER, 2003).

Como o tratamento contra a DECH é quase sempre ineficiente, o gerenciamento deste distúrbio precisa focalizar a prevenção para minimizar o risco de se desenvolver a doença. A prevenção visa à redução ou desativação dos linfócitos transfundidos ao doador. Os métodos atualmente disponíveis nos bancos de sangue para remover fisicamente os linfócitos T (lavagem ou filtragem) não são eficazes contra a DECH. A desativação dos linfócitos transfundidos por meio do uso da radiação dos componentes do sangue continua sendo o método mais eficiente para sua prevenção (GOES, 1999).

A DECH pode ser dividida em duas formas, baseadas no tempo de ocorrência e nas manifestações clínicas. A forma aguda ocorre de dois a três meses após o transplante e/ou a transfusão, enquanto a forma crônica manifesta-se mais tarde, 3 a 6 meses após o transplante e /ou transfusão. A DECH aguda pode ser classificada de acordo com as manifestações clínicas em graus I, II, III e IV, porém a linha divisória entre as formas aguda e crônica nem sempre é bem definida. Dermatite, hepatite e enterite são manifestações clínicas que caracterizam a DECH aguda (VISENTAINER, 2003 ; SILVA, 2005).

A irradiação de hemocomponentes com raios gama é o único método atualmente aceito para prevenir a DECH associada à transfusão. A Portaria GM N° 1.136 do

Ministério da Saúde recomenda uma dose central de 25Gy e uma dose mínima de 15Gy em qualquer ponto das unidades irradiadas para diminuir em 90% as respostas de linfócitos à mitose, sem comprometer a função de outras células do sangue. (BRASIL,1999). A Resolução - RDC nº 153, de 14 de junho de 2004 recomenda o valor dose de irradiação administrada de 25 Gy sobre o plano médio da unidade irradiada. As unidades irradiadas devem ser adequadamente rotuladas e identificadas, e o processo de irradiação deve ser validado periodicamente. (BRASIL, 2004)

Os equipamentos de telecobaltoterapia, ao contrário dos irradiadores específicos não são projetados para irradiarem sangue, sendo então necessário um tempo mais longo de exposição para a liberação da dose mínima necessária. Dependendo da taxa de dose da fonte e da dose preconizada, o tempo de exposição poderá estender-se além de 30 minutos. Nesse caso, os componentes celulares do sangue ficam expostos à temperatura ambiente da sala de telecobaltoterapia (algo em torno de 20 a 24°C). Recentemente há um crescente interesse sobre os efeitos da radiação sobre as células do sangue. Certos efeitos biológicos têm mostrado que dependem além da dose, da energia, da taxa de dose e do fracionamento da dose (GOES, 1999).

JACOBS (1998) e IAEA (1997) descrevem alguns efeitos da radiação ionizante no sangue e em alguns hemocomponentes como serão mostrados a seguir:

- **LEUCÓCITOS:**

1. Doses de 90Gy de raios X causam a diminuição de 30% do nível de leucócitos quando medidos no dia posterior à irradiação.

2. Os granulócitos são mais resistentes à radiação que os linfócitos. É sugerido 20Gy para eliminar a mitose dos linfócitos e assim prevenir a DECH sem prejudicar os granulócitos. Ao serem irradiados a 50Gy e estocados por 21 dias, há alteração nas funções dos granulócitos devido à retenção bacteriana, havendo também uma redução em 20% da produção normal de superóxidos.

3. A inativação efetiva dos linfócitos dar-se-á para valores de doses de 25 Gy. O intervalo de tempo entre a irradiação e a transfusão para uma dose de 50 Gy (redução de 95%) pode ser de no máximo de 21 dias. Para doses baixas (5Gy) que

causam uma queda nos níveis de ATP (*Adenosine triphosphate*) nos linfócitos, devem ser usados 1h após a irradiação. Os linfócitos T são mais resistentes a raios X e independem da síntese de DNA (*Desoxyribunucleic Acid*)

- **ERITRÓCITOS:**

1. Os eritrócitos em comparação com outros componentes do sangue parecem ser relativamente resistentes à irradiação. Foi observado que eritrócitos irradiados com raios X a 200Gy não houve alteração na fragilidade osmótica, porém a incubação a 37°C para 24h aumentou sua fragilidade ligeiramente.

2. Para doses de raios X no intervalo de 8,9 a 17,8Gy não se observam alterações no metabolismo. Entretanto, para doses entre 44,5 e 89 Gy observa-se um aumento no conteúdo ATP das células vermelhas.

3. Os eritrócitos irradiados com radiação gama com valor de dose de 35Gy podem ser estocados por 28 dias, irradiados com 30Gy podem ser estocados a 4°C por 42 dias, irradiados com 15 Gy podem ser estocados a 4°C por 6 dias ou a -75°C por 56 dias.

4. Os eritrócitos irradiados a 35Gy e congelados podem ser estocados por 3 a 10 meses em -80°C para transfusão, não havendo diferença entre a sobrevivência de células irradiadas e não irradiadas. Já naqueles irradiados a 30Gy e estocados por 14 dias foi observado um aumento na concentração de potássio. Entretanto, a *Food and Drug Administration* (FDA) recomenda que os eritrócitos devam ser estocados por até 28 dias.

- **PLAQUETAS:**

1. As plaquetas não são apreciavelmente afetadas quando expostas a 50Gy. Em resumo, excluindo os linfócitos, as plaquetas sustentam maior dano de irradiação que outros componentes de sangue, porém a radiação gama tem efeitos mínimos nas propriedades das plaquetas. O período de estocagem das plaquetas depende da dose.

2.5 - ANTICOAGULANTE

O anticoagulante utilizado nas amostras de sangue nesse estudo foi o EDTA (*EthyleneDiamineTetrAcetic acid*). Este é o anticoagulante largamente empregado em hematologia e oferecem as vantagens de ter preço acessível e provocar menos danos à morfologia eritrocitária e leucocitária. O EDTA é um composto orgânico que age como ligante polidentado, formando complexos muito estáveis com diversos íons metálicos. Devido a isso, é usado como preservante do sangue, pois inativa os íons de cálcio, que promovem a coagulação sanguínea. Esta habilidade de complexar e assim inativar íons metálicos é também usada como antídoto para envenenamento por chumbo. Sua fórmula molecular é $C_{10}H_{16}N_2O_8$ e sua massa molecular é igual a 292,25 g/mol. (CARVALHO et al, 1993)

2.6 – LIOFILIZAÇÃO

A liofilização é um processo de desidratação baseado no fenômeno da sublimação. Este processo tem as seguintes vantagens quando comparado com o processo convencional de secagem (BOSS, 2004):

Este método de desidratação tem como objetivo preservar a qualidade do produto. Um fator proeminente é a estrutura rígida proporcionada pelo congelamento da superfície do material onde ocorre a sublimação. Esta rigidez é importante para prevenir colapsos da matriz sólida após a secagem. O resultado é um poro que permite fácil reidratação quando se adiciona água. Outro benefício da liofilização é que o processo ocorre à baixa temperatura e há uma rápida transição de material hidratado para desidratado. Outra vantagem do processo de liofilização é o aumento da estabilidade do produto durante a estocagem, além de poder ser armazenado e transportado à temperatura ambiente. Se corretamente processado e mantido sob condições adequadas, o produto pode ser guardado por um estágio quase ilimitado de tempo enquanto mantém suas propriedades físico-químicas, biológicas e organolépticas, e ainda mantém-se disponível a qualquer momento para imediata reconstituição. Além do aumento da vida útil do produto há redução de peso e volume do produto liofilizado (BOSS, 2004).

2.7. TÉCNICAS NUCLEARES DE MEDIDAS.

2.7.1 – INTERAÇÃO DA RADIAÇÃO COM A MATÉRIA.

Há vários processos que caracterizam a interação da radiação gama ou raios X com a matéria e estes dependem essencialmente da energia da radiação e do meio material que ela atravessa. Devido ao seu caráter ondulatório, ausência de carga e massa de repouso, essas radiações podem penetrar em um material, percorrendo espessuras antes de sofrer a primeira interação. Este poder de penetração depende da probabilidade ou secção de choque de interação para cada tipo de evento que pode absorver ou espalhar a radiação incidente. A penetrabilidade dos raios X e gama são maiores que a das partículas carregadas, e a probabilidade de interação dependem muito do valor de sua energia. Os principais modos de interação, excluindo as reações nucleares, são: o efeito fotoelétrico (toda energia é transferida para um só elétron), o efeito Compton (espalhamento de fótons por elétrons com troca de momento e energia - espalhamento inelástico), efeito Rayleigh (fóton é espalhado com troca de momento, mas conservando sua energia - espalhamento elástico) e a produção de pares (TAHUATA, 2001).

2.7.2 – ESPALHAMENTO COERENTE DE RAIOS X

A amplitude Rayleigh é elástica e coerente. Portanto, é comum usar os termos elástico e coerente como sinônimos. No espalhamento elástico não há transferência de energia para graus de liberdade internos do átomo, ou seja, no referencial do centro de massa, as energias inicial e final do fóton são iguais. No espalhamento Compton, a energia do fóton espalhado difere da do fóton incidente, sendo assim um processo inelástico e o efeito também é incoerente por que pode se distinguir qual elétron é ejetado. A radiação espalhada torna-se importante, na medida em que os fótons espalhados carregam informações sobre a estrutura e o tipo de material espalhador.

O método utilizado neste estudo é o de espalhamento coerente à baixos ângulos (LAXS), onde o fóton espalhado muda sua direção de incidência mantendo a mesma energia. Para obtermos padrões de difração acentuados em cristais, as ondas espalhadas devem interagir entre si de forma construtiva. Esse fenômeno é conhecido como

interferência e ocorre quando as ondas espalhadas, por planos sucessivos de átomos em um cristal, estão em fase, ou seja, a diferença de caminho, entre os planos do cristal deve ser igual a um múltiplo inteiro do comprimento de onda. Essa condição é atendida quando um conjunto de planos desse cristal satisfaz a equação de Bragg (DESOUKY *et al.*, 2002):

$$n\lambda = 2d\sin\theta \quad (2.1)$$

onde, n corresponde a um número inteiro (ordem de difração), λ ao comprimento de onda da radiação incidente, d a distância interplanar (planos de átomos) e θ corresponde ao ângulo de incidência dos raios X medido entre o feixe incidente e os planos cristalinos como pode ser observado na figura 2.5.

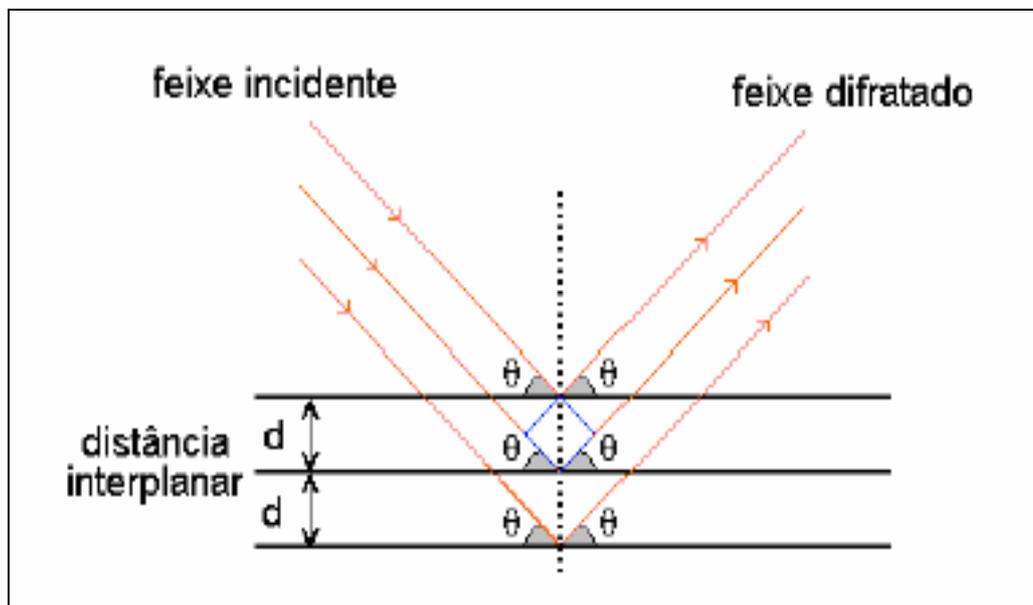


Figura 2. 5 – Esquema do fenômeno da difração de raios X.

Para obtermos padrões de difração, as ondas espalhadas devem interagir entre si de forma construtiva. A difração de raios X é uma consequência do espalhamento e de grande importância na análise microestrutural. Este método fornece informações sobre a natureza e os parâmetros do reticulado assim como detalhes a respeito das características internas dos materiais tais como a estrutura molecular, a densidade, o número atômico e as orientações dos cristais.

O primórdio do estudo da difração dos raios X em cristais se deu com Max von Laue, a partir de 1912, quando ele esteve discutindo aspectos da propagação da luz em cristais juntamente com P. P. Ewald, que estava desenvolvendo sua tese de doutorado sobre o assunto. Em 1912 Von Laue, utilizando a teoria eletromagnética da luz, previu teoricamente que os raios X podiam ser difratados pelos cristais. Em 1914, Laue montou um experimento em que o feixe de raios X incidia em um cristal, atrás da qual era colocada uma chapa metálica como mostra a figura 2.6. Verificando o filme radiográfico, Laue observou o aparecimento de um padrão de difração em que os raios X aparecem como círculos de pontos luminosos ao redor do feixe central (AMORIM, 2007).

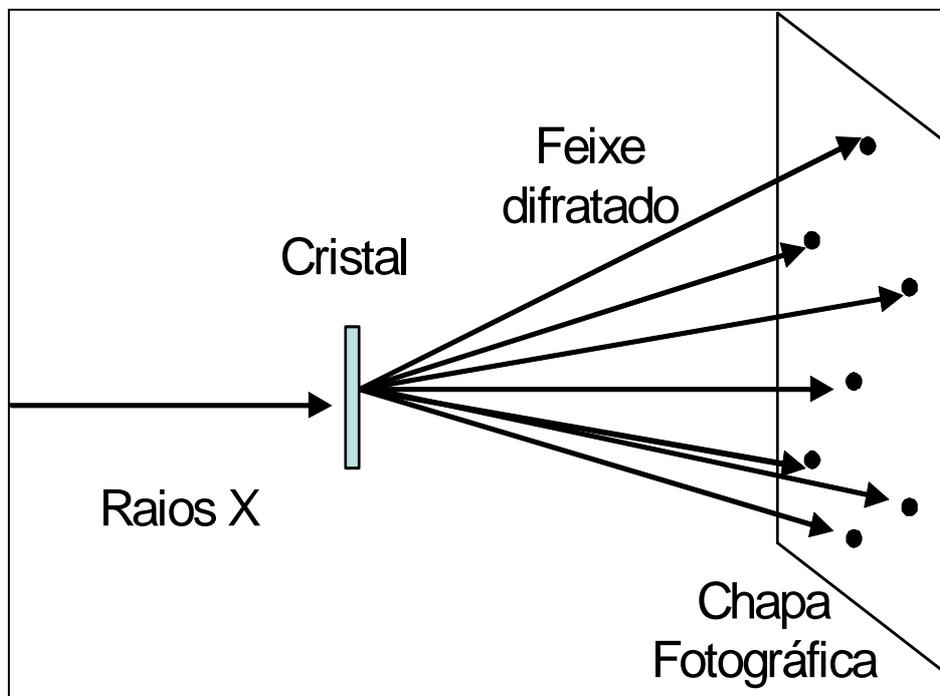


Figura 2. 6 – Experimento de Laue para difração de raios X.

Logo em seguida numa série de publicações da autoria dos Bragg (pai e filho), determinou-se experimentalmente o reticulado cristalino do NaCl, KCl e KI por difração de raios X (PADILHA, 2004).

A equação de Bragg é deduzida considerando-se o espaçamento interplanar uniforme. Se os arranjos dos átomos ou o espaçamento entre os planos paralelos, torna-se irregular, os padrões de difração não são bem definidos como é mostrado na figura 2.7. É o que ocorre nos líquidos e materiais amorfos (vidro, borracha, material biológico, polietileno e etc).

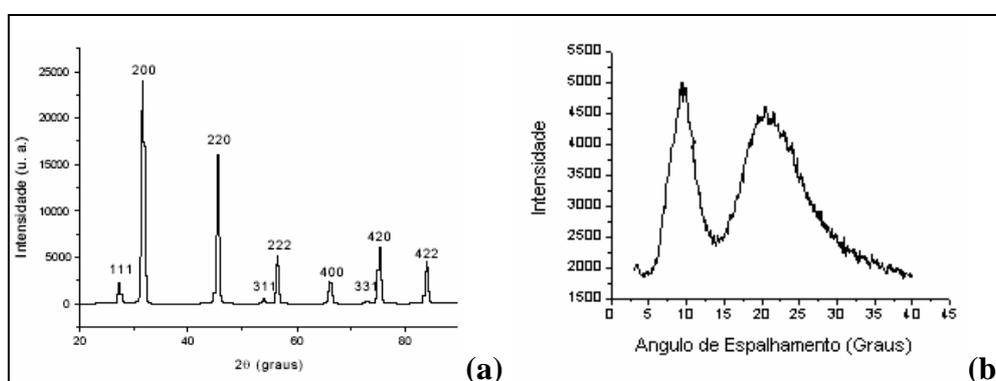


Figura 2.7 – Perfil de difração: (a) material cristalino e (b) material amorfo.

Um feixe de raios X incidindo em um cristal, em ângulos variáveis, produz um gráfico chamado de difratograma (perfil de espalhamento), como foi apresentado na figura 2.7. As intensidades são colocadas em função do ângulo de espalhamento 2θ (ângulo entre a onda incidente e a onda espalhada). Esse padrão de difração é único para cada tipo de cristal, possibilitando-se descobrir a composição de materiais através da difração de raios X. Esse processo é chamado de caracterização. Os instrumentos tradicionais de medida são o difratômetro (método do pó) e as câmaras de monocristais. (PADILHA, 2004).

Os difratômetros de raios X disponíveis no mercado são denominados pela geometria Bragg-Brentano como é mostrado na figura 2.8, onde o goniômetro acoplado aos acessórios de recepção do feixe difratado move-se com velocidade (2θ /passo) sobre o eixo P e rotaciona a amostra (P) com metade desta velocidade angular (θ /passo). O raio do círculo do goniômetro é fixo, com distâncias iguais entre o tubo de raios X e a

amostra e entre a amostra e a fenda de recepção. A partir da fonte, os raios X atravessam a fenda de divergência e irradiam a amostra. Os raios difratados em determinado ângulo 2θ convergem para a fenda de recepção. (WILLARD et al., 1974).

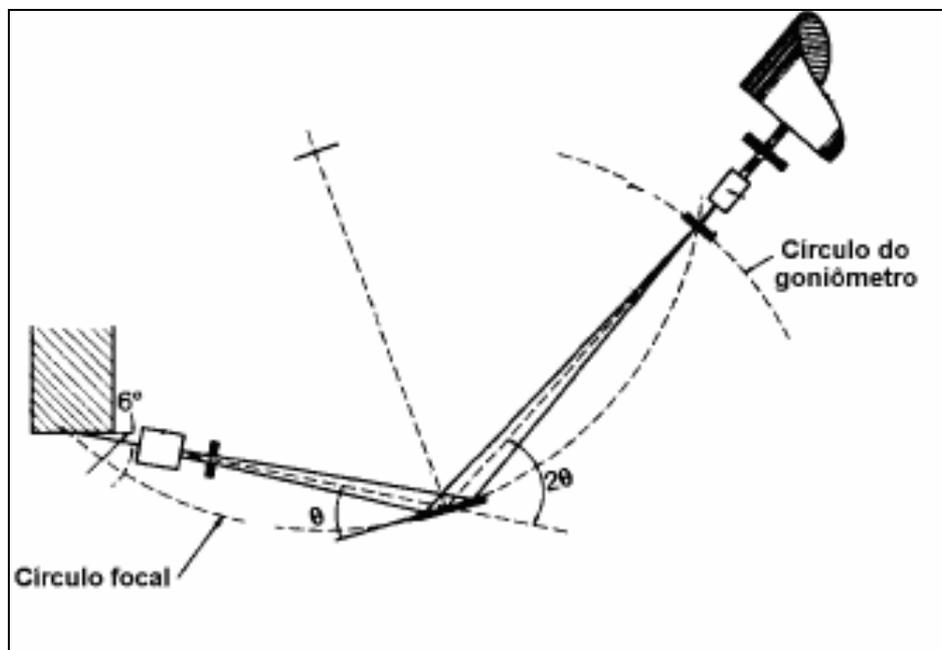


Figura 2. 8 - Geometria Bragg-Bretano (WILLARD et al., 1974).

A difração de raios X comprovou a natureza ondulatória dos raios X e a natureza periódica dos cristais. Embora tenha sido usada para explicar o padrão de interferência de raios X espalhados por cristais, o fenômeno de difração de raios X tem sido usado para estudar uma diversidade de materiais.

2.7.3 – FLUORESCÊNCIA DE RAIOS X

A técnica analítica de fluorescência de raios X (XRF) tem sido utilizada para a avaliação quali-quantitativa da composição química em vários tipos de amostras. Esta técnica, por permitir a análise de vários elementos simultaneamente de modo rápido e a baixo custo, tem um elevado potencial de aplicação em várias áreas, onde há necessidade de correlação entre os elementos essenciais e tóxicos.

A análise por XRF é um método qualitativo e quantitativo multielementar baseado na medida das intensidades dos raios X característicos emitidos pelos

elementos que constituem a amostra, quando excitada por ondas eletromagnéticas, partículas como elétrons, prótons ou íons produzidos em aceleradores de partículas, além do processo mais utilizado que é através de tubos de raios X.

Quando um átomo de uma amostra é excitado, este tende a ejetar os elétrons dos níveis interiores dos átomos e, como consequência disto, elétrons dos níveis mais externos realizam um salto quântico para preencher a vacância. Cada transição eletrônica constitui uma redução de energia para o elétron e esta energia é emitida na forma de um fóton de raios X, de energia característica bem definida para cada elemento (SERPA, 2007).

Como este processo envolve níveis de energia que são característicos de cada elemento, a radiação emitida em cada transição é também característica. Desta maneira, a energia de radiação emitida pode ser diretamente empregada para a identificação do elemento em questão. Segundo SKOOG et al (2002), como a intensidade da radiação emitida é uma função da concentração do elemento, a técnica também fornece informações quantitativas.

Para elementos leves, os métodos de fluorescência de raios X não são tão sensíveis. As dificuldades nas medidas e detecção tornam-se progressivamente maiores quando os números atômicos diminuem, em parte devido a um processo que surge competindo com o de interesse chamado emissão Auger, que reduz a intensidade da fluorescência de raios X. Algumas vezes, os raios X característicos interagem com elétrons mais externos do próprio átomo, e desse modo, ao invés de serem emitidos raios X característicos são emitidos elétrons, denominados elétrons Auger (JENKIN et al, 2000).

O desenvolvimento de detectores semicondutores capazes de discriminar raios X de energias próximas levou ao surgimento da Fluorescência de Raios X por Dispersão de Energia (EDXRF), mais prática e menos dispendiosa que a Fluorescência de Raios X por Dispersão de Comprimento de Onda (WD-XRF), permitindo a determinação da concentração de vários elementos de modo simultâneo, sem a necessidade da destruição da amostra. É utilizada principalmente para amostras sólidas de interesse agroindustrial e ambiental. Para amostras espessas tem a desvantagem de requerer métodos para

correção do efeito matriz (absorção ou reforço) dos raios X característicos, devido às interações com os elementos que compõem a amostra (FICARIS, 2004).

Uma variante da EDXRF é a técnica denominada de fluorescência de raios X por Reflexão Total (TXRF) que vem sendo bastante desenvolvida nos últimos anos. Uma das vantagens da TXRF é que a técnica não requer métodos para correção do efeito matriz, pois são utilizadas quantidades muito pequenas das amostras, as quais são depositadas em um suporte, formando um filme fino (FICARIS, 2004). Utilizamos esta técnica, nesse estudo, para calcularmos as concentrações elementares nas amostras de sangue irradiado.

Em contraste com a XRF convencional, onde o ângulo da radiação incidente está em torno de 45° , o ângulo de incidência na TXRF é pequeno, algo em torno de poucos minutos. Os fundamentos teóricos da técnica de TXRF baseiam-se nos fenômenos físicos de refração e reflexão. Um feixe de luz, ao incidir sobre uma interface entre dois meios, com índices de refração diferentes, sofre reflexão e refração. Quando refratado, o feixe irá penetrar no segundo meio, enquanto o feixe refletido retornará com um ângulo igual ao ângulo de incidência, não penetrando no segundo meio, tem-se a reflexão total quando um feixe de radiação incide em uma amostra com um ângulo menor que o ângulo crítico, assim a radiação é totalmente refletida e neste caso não há interação com o suporte da amostra e ocorre redução dos picos de espalhamento com uma significativa redução da radiação de fundo (PRANGE, 1989).

De modo resumido, pode-se afirmar que na TXRF o feixe incidente não interage com o suporte, mas atravessa todo o filme fino formado pela deposição da amostra, tanto no sentido da incidência quanto na emergência e com isto há grande probabilidade de excitar os átomos que compõem a amostra. O suporte é uma das partes mais importantes da instrumentação da TXRF porque possui duas funções: atuar como um refletor e ser um suporte para a amostra.

Quartzo e Perspex são os mais apropriados para suporte no que diz respeito à pureza e baixo espectro da radiação de fundo (PRANGE et al, 1993). Os suportes devem ser livres de impurezas, quimicamente inertes, não devem produzir pico fluorescente na região do espectro considerado e devem refletir totalmente os raios

incidentes. Os suportes para as amostras usados neste trabalho são placas retangulares (30mm x 20mm x 2mm) feitos de lucite 10 (Perspex) (SCHMITT et al, 1987).

Algumas regras devem ser seguidas, com relação ao suporte de amostra, para assegurar o uso adequado da TXRF:

- A superfície deve ser densa e uniforme.
- O material deve ser quimicamente inerte e livre de impurezas.
- Nenhum pico fluorescente do material do suporte deve ocorrer na escala de energia considerada.
- O material deve ser resistente à transferência de energia através da interface, sob condições de operação.

A TXRF vem sendo utilizada principalmente na análise de elementos traços (na faixa de ng.g^{-1}) em amostras líquidas (da ordem de μL) e em amostras sólidas (μg) precedidas por digestão química (MISTRA, 2002). Para se utilizar a técnica de TXRF, normalmente uma alíquota de 5 a 50 μl da amostra *in natura* ou digerida é colocada no centro do suporte de quartzo, germânio ou lucite e seca. Devido à diminuta espessura da amostra e alta energia dos raios X normalmente utilizados na excitação, não há a ocorrência do efeito de absorção e reforço na TXRF e, conseqüentemente, a correção para o efeito matriz não é necessária (NASCIMENTO FILHO, 1999).

2.7.3.1 ANÁLISE QUANTITATIVA

A partir do uso de filmes finos para análise, o efeito matriz, que normalmente requer correções na fluorescência de raios X convencional, não ocorre na TXRF (BOUMANS;1988, KLOCKENKÄMPER et al, 1995). Utilizar a técnica do filme fino permite um tratamento matemático simples para a análise quantitativa, quando é adicionado um padrão interno. Os elementos a serem utilizados como padrões internos não devem ocorrer nas amostras avaliadas.

A função do padrão interno é eliminar o efeito de geometria porque o filme fino formado sobre o suporte não possui geometria regular. Desta forma, a contagem obtida na irradiação da amostra depende da posição em que esta for colocada no suporte. Com a adição do padrão interno, o resultado obtido será sempre em relação a este padrão, não importando a posição da amostra (LADISICH,et al, 1994; KLOCKENKÄMPER et al, 1995). Normalmente tem-se utilizado os elementos Ge, Ga, Co e Y como padrão interno.

Desse modo, a equação básica para análise quantitativa é a relação entre a intensidade fluorescente da linha característica e a concentração de um elemento de interesse e pode ser obtida conforme a equação 2.2.

$$I_i = S_i \cdot C_i \quad (2.2)$$

Onde:

- I_i – intensidade líquida de raios X da linha característica K ou L do elemento i de interesse (cps $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$),
- S_i – sensibilidade elemental do sistema (cps.mL. μg^{-1}),
- C_i – concentração do elemento da amostra ($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$).

Através da equação 2.2 é possível fazer a relação entre a intensidade do elemento i e o padrão interno utilizado. Nesse estudo utilizou-se o Gálio (Ga):

$$\frac{I_i}{I_{Ga}} = \frac{S_i \cdot C_i}{S_{Ga} \cdot C_{Ga}} \quad (2.3)$$

$$\frac{I_i}{I_{Ga}} \cdot C_{Ga} = \frac{S_i}{S_{Ga}} \cdot C_i \quad (2.4)$$

Fazendo

$$R_i = \frac{I_i}{I_{Ga}} \cdot C_{Ga} \quad (2.5)$$

E

$$S_{R_i} = \frac{S_i}{S_{Ga}} \quad (2.6)$$

Temos:

$$R_i = S_{R_i} \cdot C_i \quad (2.7)$$

Onde:

- R_i = contagem relativa
- I_i = intensidade do elemento i na amostra (cps);
- C_i = concentração do elemento i na amostra ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)
- I_{Ga} = intensidade do padrão interno na amostra (cps);
- C_{Ga} = concentração do padrão interno na amostra ($\mu\text{g.mL}^{-1}$),
- S_i = sensibilidade do sistema para o elemento i ($\text{cps.mL} \cdot \mu\text{g}^{-1}$);
- S_{Ga} = sensibilidade do sistema para o padrão interno ($\text{cps.mL} \cdot \mu\text{g}^{-1}$),
- S_{R_i} = sensibilidade relativa para o elemento i (adimensional).

Construindo-se um gráfico de R_i x C_i , o coeficiente angular (S_i) da reta representará a sensibilidade relativa do elemento i (MELO JUNIOR, 2007). Com isto, pode-se calcular a concentração do elemento de interesse, utilizando-se a equação 2.8.

$$C_i = \frac{I_i}{I_{Ga}} \cdot \frac{C_{Ga}}{S_{R_i}} \quad (2.8)$$

Vale a pena ressaltar que existe uma alta correlação matemática entre a sensibilidade elementar e o número atômico dos elementos. Assim, com base nas sensibilidades elementares contidos na solução padrão multielementar, pode-se estimar a sensibilidade para um elemento detectado na amostra padrão e a seguir definir uma sensibilidade para um elemento detectado na amostra não contido na solução padrão. Conseqüentemente é possível estimar a sua concentração na amostra de interesse.

2.7.3.2 LIMITE DE DETECÇÃO

Em um espectro de pulsos de raios X pode-se observar uma linha aproximadamente contínua sob os picos característicos dos elementos que compõe a amostra. Esta linha decorre principalmente das interações das radiações espalhadas pela amostra com o detector e também das próprias radiações características emitidas pelos elementos. Assim, em cada pico no espectro de pulsos há uma área devida em parte à intensidade dos raios X característicos (denominada intensidade líquida) de um elemento i e o background (BG) naquela região i (NASCIMENTO FILHO, 1999).

O limite de detecção (LD) representa a menor quantidade (concentração, massa, volume, etc) que pode ser discriminada estatisticamente em relação ao *background* de uma medida. O limite de detecção LD_i (cps) para cada elemento i está diretamente relacionado com a intensidade do BG_i (cps) sob o pico desse elemento como mostra a equação 2.9. (NASCIMENTO FILHO, 1999)

$$LD = 3 \times \sqrt{\frac{I_i(BG)}{t}} \times \frac{C_{Ga}}{I_{Ga} S_{Ri}} \quad (2.9)$$

Onde:

- $I_i(BG)$ = é a intensidade do *background* por unidade de tempo (cps);
- I_{Ga} = é a intensidade da radiação fluorescente relativa ao padrão interno (cps), Gálio (Ga);
- C_{Ga} = a concentração do padrão interno ($\mu\text{g.mL}^{-1}$);
- S_{Ri} = a sensibilidade relativa (adimensional) para o elemento i e t o tempo de medida.

Normalmente, o limite de detecção é determinado para alguns elementos e depois por extrapolação (curva do limite de detecção) determina-se o limite de detecção para os elementos de interesse.

Os limites de detecção para a técnica de TXRF são melhores que os da fluorescência convencional devido, principalmente, a três fatores:

- Baixa intensidade do *background* sob os picos característicos.
- O fluxo da radiação primária disponível para a excitação da amostra é mais efetivo.
- Proximidade entre a amostra e o detector de raios X.

O limite de detecção para os elementos de número atômico abaixo de 13 (Al) é afetado pelo baixo rendimento de fluorescência e outras limitações, como baixo valor para o efeito fotoelétrico, absorção dos raios X característicos pela janela de Berílio (Be) e pelo ar contido entre a amostra e o detector (HPGe). Trabalhando sob vácuo e com detector sem janela de Be, alguns autores têm obtido limites de detecção de 10 ng (0,2 ppm) para oxigênio e 800 pg (16 ppb) para magnésio utilizando SR-TXRF (MELO JUNIOR, 2007).

2.8 – LUZ SÍNCROTRON

A luz Síncrotron é a radiação eletromagnética emitida quando partículas carregadas com velocidade relativística são submetidas à aceleração radial. A circulação de corrente em anéis de armazenamento de alta energia emite feixes pulsados de luz tipicamente polarizados.

A associação de luz Síncrotron à TXRF possibilita que sejam atingidos limites de detecção mais baixos do que quando se utiliza um tubo de raios X de alta potência. As vantagens de se utilizar este tipo de radiação são as seguintes:

- O alto brilho espectral de um feixe de Síncrotron resulta em raios X primários com intensidades de 3 a 5 vezes maiores que as obtidas com tubos convencionais de raios X.
- Uma vez que a luz Síncrotron cobre uma larga faixa de energia no espectro de raios X, torna-se altamente adequada para tunelamento de energia. Utiliza-se um

crystal de multicamadas para a seleção de uma faixa particular de energia, a qual pode facilmente ser ajustada para otimizar a energia de excitação dos elementos desejados.

- O “background” espectral já reduzido pela TXRF, pode ser reduzido ainda mais devido à polarização da luz síncrotron.

O projeto de construir no Brasil uma fonte de luz Síncrotron é hoje reconhecido como vitorioso. O Laboratório Nacional de Luz Síncrotron (LNLS), instalado em Campinas, como mostra a figura 2.9, é o único deste gênero existente no Hemisfério Sul. Para a realização desse projeto foi utilizada a Fluorescência de Raios X por Reflexão Total com Radiação Síncrotron (SR-TXRF), no Laboratório Nacional de Luz Síncrotron (LNLS), em Campinas.

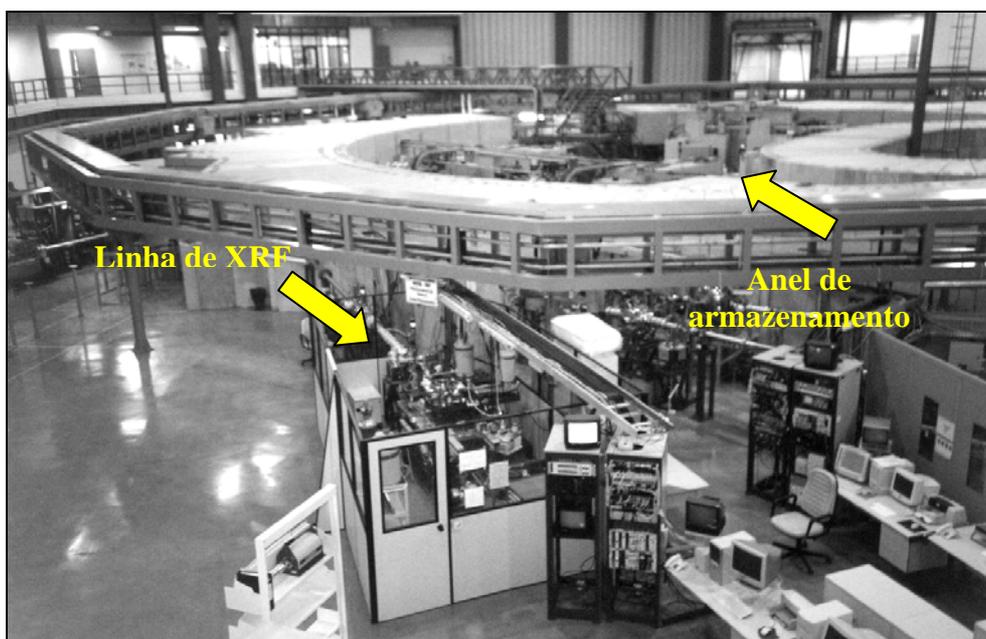


Figura 2. 9 - Vista geral da estação experimental DO9B-XRF do Laboratório Nacional de Luz Síncrotron com a instrumentação.

Através do desenvolvimento da SR TXRF em diferentes centros de pesquisa, foi possível perceber que ela possui as seguintes vantagens:

- Alta sensibilidade;
- Pequena quantidade de amostra necessária para a análise;

- Aplicação multielementar (do Na até os elementos do final da tabela periódica, podem ser medidos, levando em consideração as características do arranjo experimental de cada centro de pesquisa);
- Rápida obtenção de resultados;
- Várias áreas de aplicação: geologia, indústria, medicina, etc.

2.9 – NOÇÕES GERAIS DE ESTATÍSTICA

Muito do conhecimento que a humanidade acumulou ao longo dos anos foi adquirido através da experimentação. A experimentação, no entanto, só se difundiu como técnica sistemática de pesquisa há pouco mais de um século quando foi formalizada através da estatística. A estatística ajuda a tomar decisões com informações incompletas. Nem sempre é possível compreender o significado dos dados disponíveis por simples inspeção de seus valores numéricos. Entretanto, o sucesso da decisão dependerá da habilidade em compreender as informações contidas nesses dados.

Toda análise de dados quantitativos devem se iniciar com o cálculo de estatística descritiva (médias e desvios padrões) que permitem se ter à noção do que a análise irá revelar. A estatística descritiva é um ramo da estatística que aplica várias das muitas técnicas usadas para sumarizar um conjunto de dados. De certa forma estamos tentando descrever ou sumarizar as características dos dados que pertencem a esse conjunto.

A média e o desvio padrão descrevem a amostra, são, portanto estatísticas descritivas, mas pra quem busca conhecimento científico, pouco importa a informação de que alguns indivíduos submetidos a certo tratamento obtiveram melhores resultados que outros. O que interessa saber é se determinado tratamento dá resultado melhor. Por isso em certas circunstâncias, é perfeitamente razoável fazer inferência, isto é, dar informação para o todo com base no conhecimento de parte. Assim inferência estatística pode ser definida como o processo que consiste em utilizar os resultados de uma amostra para tirar conclusões gerais de uma ou mais características de uma população (CANCHO, 2004).

Mas qual critério deverá ser usado para poder afirmar que o que foi observado na amostra pode ou não ser verdadeiro para toda população? O critério nesses casos são dados por testes estatísticos. Esses testes associarão à inferência determinado nível de significância ou um p-valor.

2.9.1 – TESTE DE HIPÓTESES

O teste de uma hipótese estatística é talvez a área mais importante da teoria de decisão. Em todo problema de teste de hipóteses, duas hipóteses complementares são consideradas. A hipótese nula, sendo representada por H_0 , pois ela expressa que não há mudança. A outra hipótese, que será aceita caso H_0 seja rejeitada, é denominada hipótese alternativa e é denotada por H_1 . São mutuamente excludentes, ou seja, rejeitar H_0 significa aceitar H_1 e *vice-versa*.

O procedimento de tomada de decisão em um teste de hipóteses pode resultar em dois tipos de conclusões incorretas. Ao tomar uma decisão a favor ou contra uma hipótese existem dois tipos de erros que você pode cometer. Pode-se rejeitar a hipótese nula quando de fato ela é verdadeira (erro tipo I) ou falhar em rejeitar H_0 quando de fato ela é falsa (erro tipo II).

Estes dois tipos de erro estão de tal forma relacionada que, ao reduzir-se a probabilidade de ocorrência de um deles, aumenta-se automaticamente a probabilidade de ocorrência do outro. De modo geral, controla-se apenas o erro tipo I através do nível de significância (representado por α), que consiste na probabilidade máxima de ocorrência do erro tipo I. O grau de confiança ($1 - \alpha$) expressa a confiabilidade de se ter tomado a decisão correta ao rejeitar-se uma hipótese nula. A proporção do erro tipo II é representada por β . O poder do teste ($1 - \beta$) é a probabilidade de rejeitar uma hipótese nula quando esta é falsa e a hipótese alternativa é correta, e decresce rapidamente quando a hipótese alternativa aproxima-se da hipótese nula (LAPPONI, 1997).

Uma forma de aumentar o poder do teste (ou reduzir β), mantendo-se α constante, é aumentar o tamanho amostral. Outro enfoque importante é o *p-value*, que é a probabilidade de observar resultados tão extremos quanto os obtidos se a hipótese nula for verdadeira. A idéia é que se o p-valor for grande ele fornece evidência de que H_0 é

verdadeira, enquanto que um p-valor pequeno indica que existe evidência nos dados contra H_0 isto é, maior é o suporte dado a H_1 . As seguintes interpretações de p-valores (P) podem ser úteis:

- $P \geq 0,10 \Rightarrow$ Não existe evidência contra H_0
- $P < 0,1 \Rightarrow$ Fraca evidência contra H_0
- $P < 0,05 \Rightarrow$ Evidência significativa
- $P < 0,01 \Rightarrow$ Evidência altamente significativa
- $P < 0,001 \Rightarrow$ Evidência extremamente significativa

Normalmente considera-se o valor p igual a 0,05 como o patamar para avaliar a hipótese nula. Se o valor p for inferior a 0,05 podemos rejeitar a hipótese nula. Em caso contrário, não temos evidência que nos permita rejeitar a hipótese nula (o que não significa automaticamente que seja verdadeira). Em situações de maior exigência é usada um valor p inferior a 0,05.

2.9.2. ANÁLISE DE VARIÂNCIA (ANOVA)

O objetivo real do procedimento ANOVA é um teste de hipótese de médias de duas ou mais populações. A comparação se faz por meio do teste F. A análise de variância é uma extensão do teste t de Student que compara apenas duas médias por teste. O teste t pode ser dividido quando: os grupos são independentes (ou seja, quando foi feito um experimento inteiramente ao acaso) ou quando os dados são pareados (ou seja, quando foi feito um experimento em blocos, cada unidade tomada como um bloco). Contudo, a ANOVA permite que o pesquisador compare qualquer número de médias e sua finalidade é determinar se existe uma diferença significativa entre as médias grupais.

Para realizar o teste ANOVA, subdivide-se a variação total das medidas de resultado em duas partes, uma que pode ser atribuída as diferenças entre os grupos e outra que decorre de variações inerentes aos grupos. A variação total é representada pela soma total dos quadrados (STQ). A variação entre os grupos é chamada de Soma dos quadrados entre os grupos (SQE). A variação dentro do grupo é chamada de soma dos

quadrados dentro dos grupos (SQD). Se cada uma dessas somas for dividida por seus correspondentes graus de liberdade, obtêm-se três termos quadráticos de média: MTQ, MQE e MQD que fornecem estimativas da variância inerentes aos dados.

O teste ANOVA compara o teste F, que é a razão entre MQE e MQD, ou seja, é a média dos quadrados entre os grupos divididos pela média dos quadrados dentro do grupo, com o teste $F_{\text{crítico}}$ que representa uma distribuição F com $(c - 1)$ e $(n - c)$ graus de liberdade. Então, se $F > F_{\text{crítico}}$, rejeitar H_0 que corresponde a hipótese a qual as médias são iguais, caso contrário, não rejeitar (aceitar) H_0 . No mercado existem vários pacotes de softwares que calculam o p-valor, que é a probabilidade de valor tão grande, ou maior que o obtido, ocorrer por puro acaso sob a hipótese de que as médias são iguais. Logo basta comparar o p-valor com o nível de significância estabelecido. E sempre que o p-valor for menor que o nível de significância a hipótese de que as médias são iguais (H_0) deverá ser rejeitada (GIRÓLAMO, 2005 e VIEIRA, 2006).

2.9.3. TESTE DE BONFERRONI

A ANOVA é apenas o primeiro passo na análise dos dados obtidos experimentalmente. O passo seguinte consiste no exame das médias dos diferentes grupos analisados e das diferenças entre elas. O *teste de Bonferroni* é um teste estatístico usado quando se deseja realizar comparações múltiplas de médias para diferentes grupos, sem aumentar o erro do teste.

O teste de Bonferroni é baseado nas exigências impostas do teste de diferença mínima significativa LSD (*Least Significant Difference*). Esse teste propõe que quando a avaliação das médias pela ANOVA indicar que existem diferenças significativas então, a diferença mínima entre as médias deve ser calculada. Assim, sempre que o valor absoluto da diferença entre duas médias for igual ou superior à diferença mínima significativa, as médias devem ser consideradas estatisticamente diferentes ao nível estabelecido de significância (VIEIRA, 2006).

2.10. BOXPLOT

O *boxplot* é um tipo de representação gráfica, em que se realçam algumas características da amostra, fornecendo uma idéia da posição central, dispersão, assimetria, cauda e dados discrepantes.

O conjunto dos valores da amostra compreendidos entre o 1º e o 3º *quartis*, que vamos representar por Q1 e Q3, é representado por um retângulo (caixa) com a mediana indicada por uma barra vertical. A largura do retângulo não dá qualquer informação. Consideram-se seguidamente duas linhas que unem os meios dos lados do retângulo com os extremos da amostra. Para obter esta representação, começa por se recolher da amostra, informações sobre 5 números, que são: os 2 extremos (mínimo e máximo), a mediana e o 1º e 3º *quartis*. A posição central dos valores é dada pela mediana e a dispersão $d = Q3 - Q1$. As posições relativas Q1, Me e Q3 dão uma noção da simetria da distribuição. Os comprimentos das caudas são dados pelas linhas que vão do retângulo aos valores mais afastados que não sejam *outliers* e pelos próprios *outliers*. A figura 2.10 apresenta o aspecto da representação do diagrama de extremos e quartis (LEVIN, 1987).

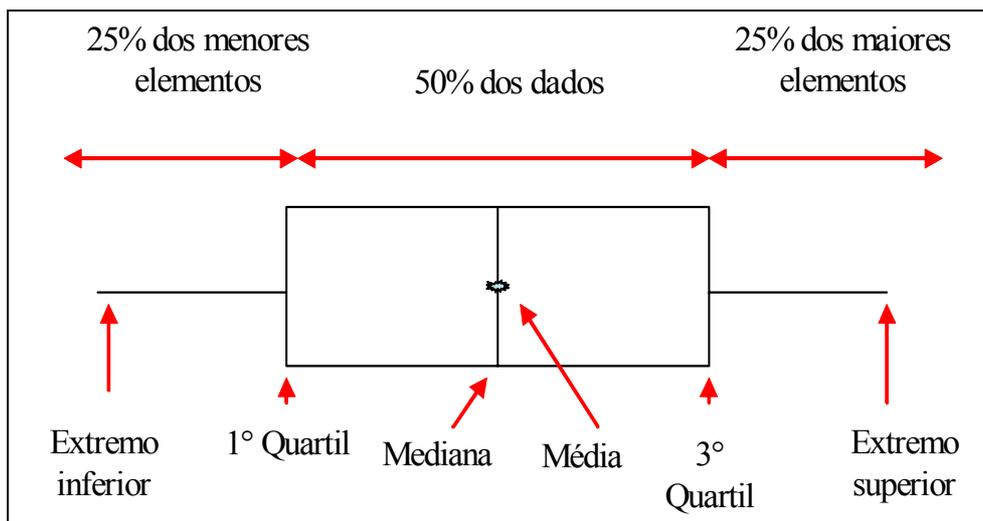


Figura 2. 10 – Exemplo de gráfico *boxplot*

Existem fundamentalmente 3 características, que nos dão idéia da simetria ou enviesamento e da sua maior ou menor concentração: distância entre a linha indicadora

da mediana e os lados do retângulo; comprimento das linhas que saem dos lados dos retângulos e comprimento da caixa. A figura 2.11 mostra exemplos de boxplot, correspondentes a tipos diferentes de distribuição de dados.

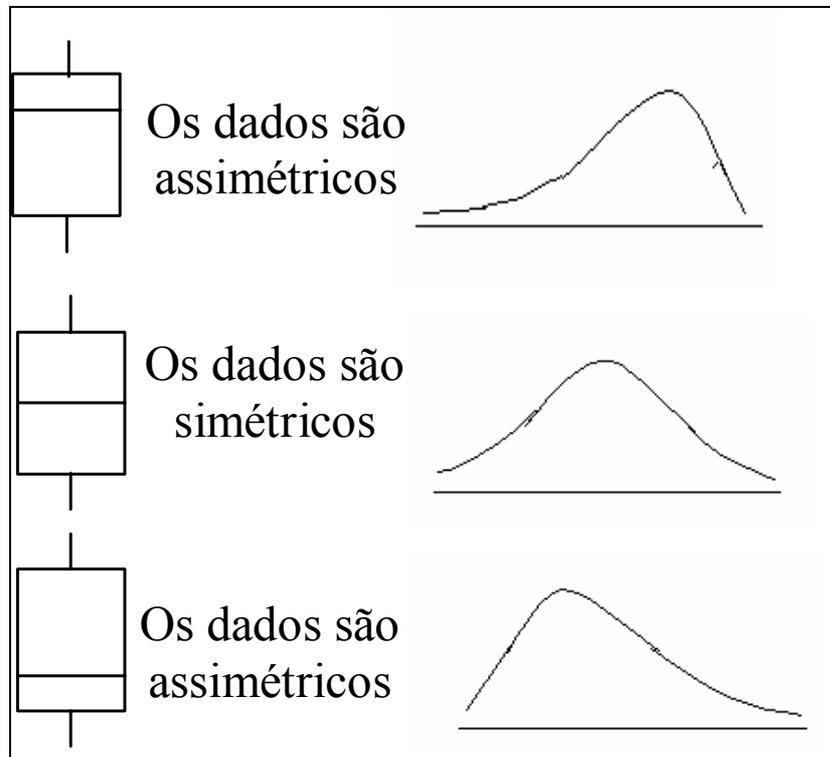


Figura 2. 11 – Exemplos de *boxplot* e distribuição de dados.

CAPÍTULO III - MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 – MEDIDAS DE DIFRAÇÃO DE RAIOS X

3.1.1. PREPARAÇÃO DAS AMOSTRAS

As amostras de sangue doadas pelo Laboratório de Análises Clínicas Dr. Eliel de Figueiredo no Rio de Janeiro foram acondicionadas em tubos contendo o anticoagulante EDTA. As amostras utilizadas nesse estudo foram autorizadas pelo titular, respeitando a condição de que a identidade dos doadores não seria fornecida. Após a coleta, as amostras foram acondicionadas em geladeira a uma temperatura 4°C.

Neste trabalho, as amostras foram divididas em sangue total e os seguintes hemocomponentes: plasma e elementos figurados (matriz celular). O conjunto total de amostras (n=644) foi dividido em dois grupos em função da idade do doador. Esses grupos estão assim definidos: adultos (18-65anos) e idosos (>65anos). Essa separação levou em consideração o intervalo de idades para que as pessoas possam ser candidatos a doadores, conforme estabelece as legislações vigentes (BRASIL,1999; BRASIL, 2004). No grupo de adultos, a maior concentração dos doadores está compreendida na faixa etária de 40 a 65 anos. Essa distribuição é uma boa representação do perfil de possíveis doadores espontâneos e habituais. A figura 3.1 apresenta a distribuição de amostras em função da idade dos doadores.

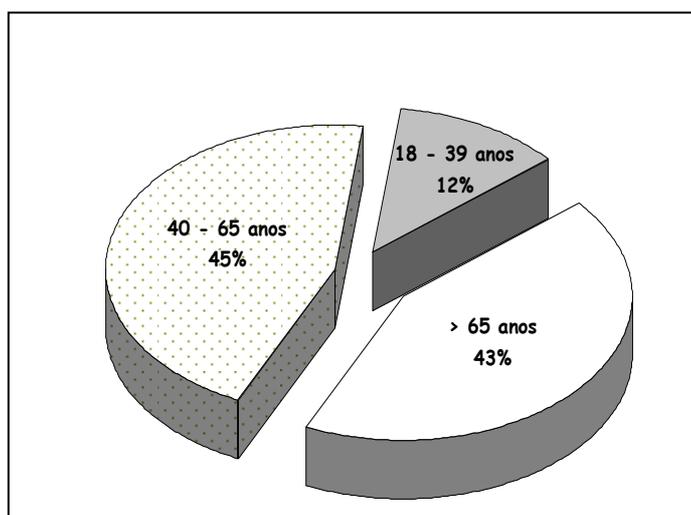


Figura 3. 1 – Distribuição das amostras para DRX em função da idade do doador.

Todos os procedimentos utilizados na preparação das amostras serão apresentados a seguir, porém a figura 3.2 mostra simplificada todas as etapas de preparação.

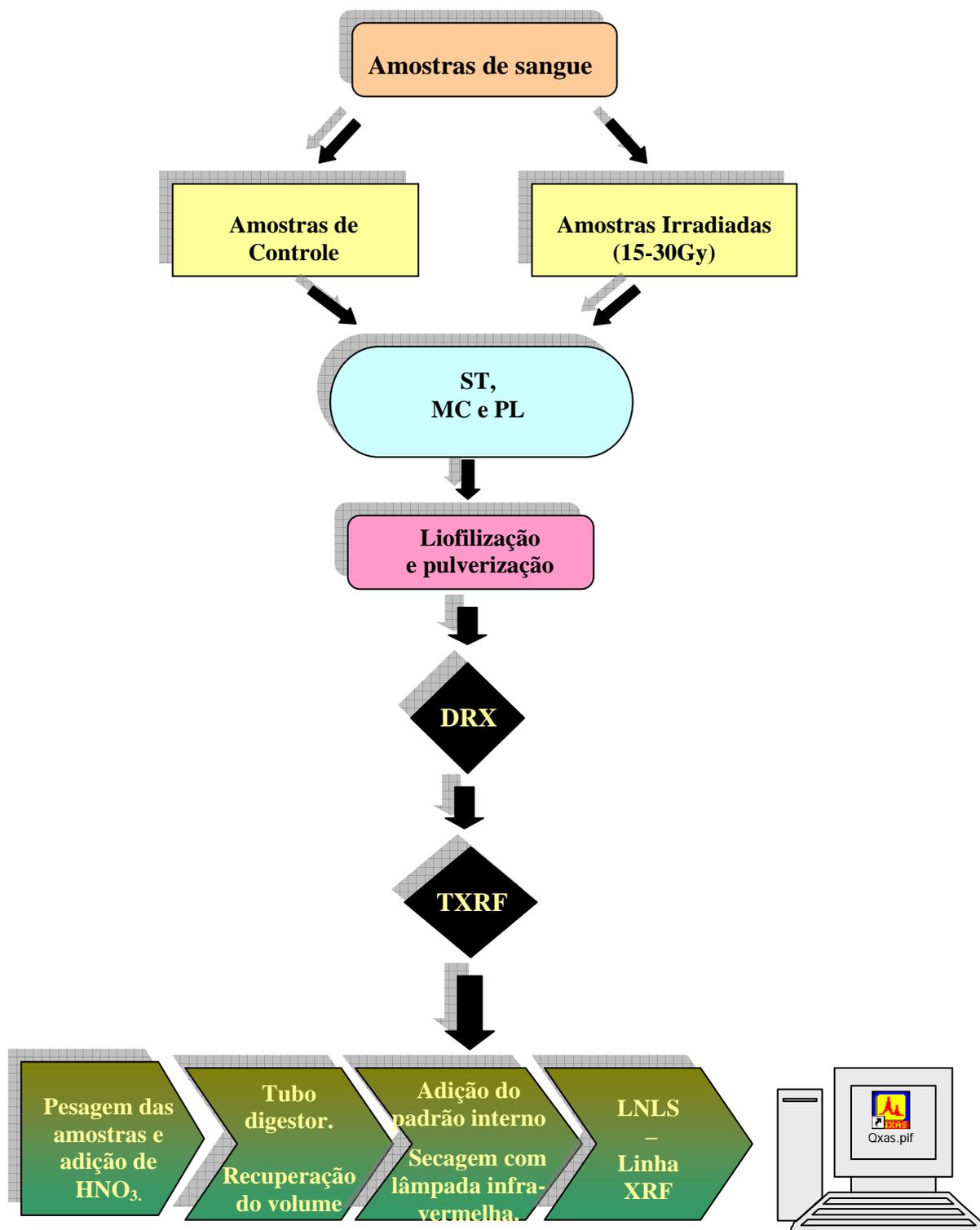


Figura 3. 2 - Esquema de preparação das amostras.

3.1.1.1. IRRADIAÇÃO

Após essa separação, os grupos foram submetidos à irradiação em um irradiador Gammacell 220 Excel fabricado pela Nordion do Canadá (figura 3.3) instalado no Laboratório de Instrumentação Nuclear (LIN/COPPE) equipado com fonte de Cobalto 60 que emite radiação gama com uma atividade de 12000 Ci, estimada em dezembro de 1999 (ALMEIDA, 2006). A taxa de dose utilizada foi de aproximadamente 50Gy/min com dose de trânsito de 4Gy. Para se obter as doses médias absorvidas foram feitos os cálculos em função do tempo de exposição necessária levando-se em consideração o decaimento da fonte de Cobalto 60 e o controle de tempo realizado automaticamente pelo próprio irradiador.



Figura 3. 3: Fonte de cobalto-60, modelo Gammacell 220 da Nordion.

As amostras foram então divididas em dois grandes grupos: amostras de controle (não irradiadas) e irradiadas. O grupo de amostras irradiadas foi sub-dividido em função da dose: 15 Gy, 20 Gy, 25 Gy e 30Gy. O intervalo de dose foi escolhido de acordo com legislação vigente (BRASIL, 1999; BRASIL, 2004) sobre a irradiação de sangue. A figura 3.4. apresenta a distribuição das amostras em função da dose de irradiação.

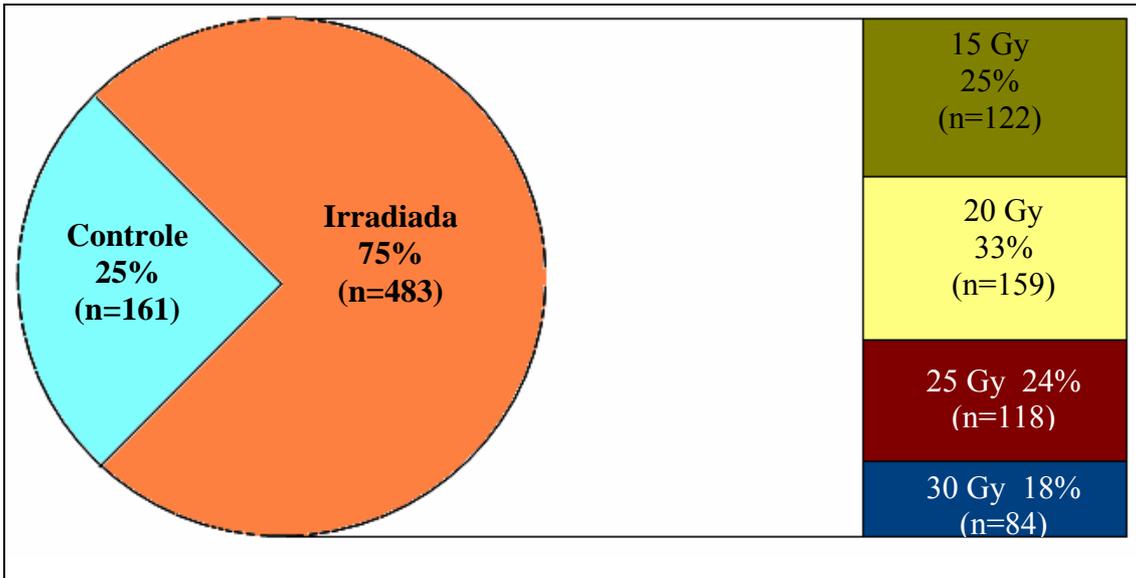


Figura 3. 4 - Distribuição das amostras para DRX em função da dose.

Após a irradiação, o conjunto total de amostras foi dividido em sangue total, plasma e elementos figurados (matriz celular). Para realizar a separação do plasma da matriz celular, as amostras ficaram em repouso e assim, devido à gravidade, os mais pesados, se depositaram no fundo do tubo; enquanto que o plasma, mais leve, ficou sobrenadante. O plasma e os elementos figurados foram retirados dos tubos por aspiração utilizando uma pipeta. A distribuição das amostras em função dos hemocomponentes é mostrada na figura 3.5.

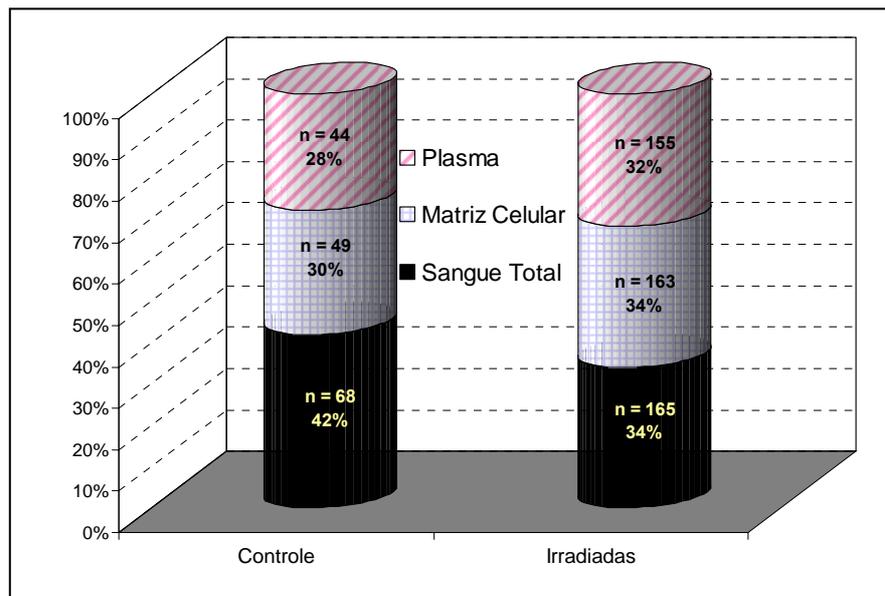


Figura 3. 5 – Distribuição das amostras para DRX em função dos hemocomponentes.

3.1.1.2. LIOFILIZAÇÃO E PULVERIZAÇÃO

Em seguida as amostras de sangue total, matriz celular e plasma, devidamente identificadas, foram colocadas em vidro de relógio e encaminhadas ao liofilizador como mostra a figura 3.6. Todas as amostras foram liofilizadas por um período de 48 horas a uma temperatura de -60°C e uma pressão de -780mmHg , no liofilizador disponível no Laboratório de Instrumentação Nuclear (LIN/COPPE).

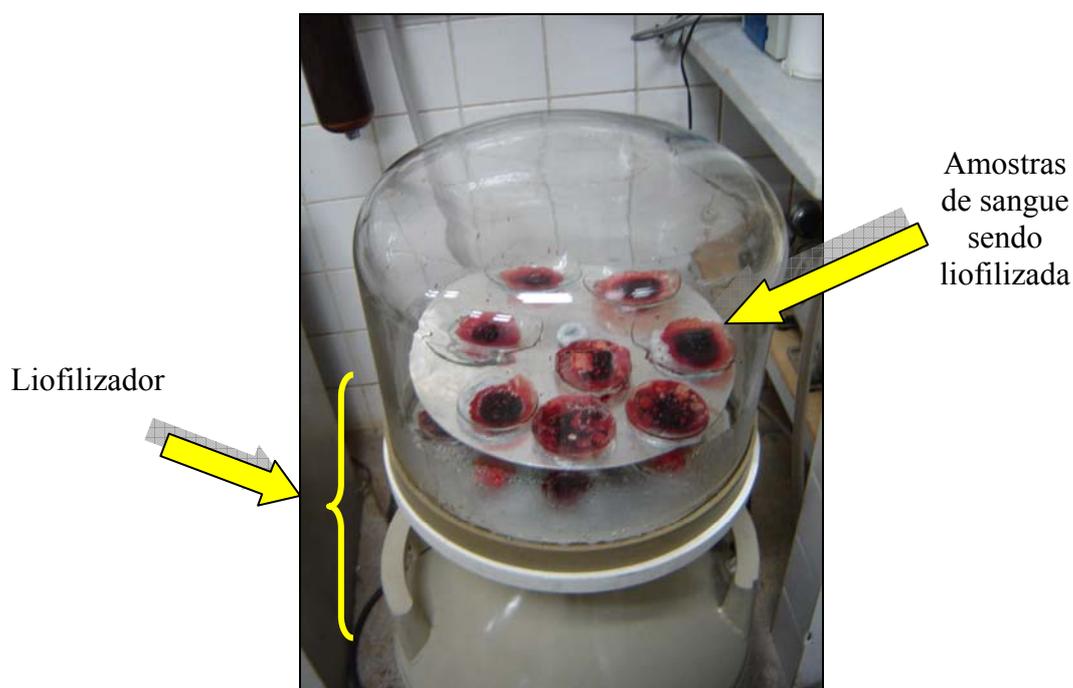


Figura 3. 6- Amostras encaminhadas para liofilização.

Posteriormente, já liofilizadas, as amostras foram pulverizadas utilizando-se um cadinho de porcelana e um pistilo. Uma vez transformada em pó, como é mostrado na figura 3.7, as amostras foram acondicionadas em frascos apropriados e mantidos em geladeira até a realização das medidas de difração de raios X.



Figura 3. 7– Amostras de sangue pulverizadas.

3.1.2 – INSTRUMENTAÇÃO

O difratômetro utilizado foi o XRD-6000 da Shimadzu disponível no Laboratório de Instrumentação Nuclear (LIN/COPPE). Este equipamento é composto por três partes principais: a unidade principal ou câmara de análise, o sistema de processamento de resfriamento do tubo de raios X e o sistema de processamento de dados (microcomputador e programas de operação do equipamento).

Os perfis de difração foram obtidos com fendas de divergência e espalhamento de $0,5^\circ$ (antes e depois do porta-amostra), fenda de recepção de 0,15 mm antes do cristal. Todas as medidas foram realizadas em geometria θ - 2θ utilizando um feixe de raios X altamente colimado de 8,047 keV (K_α Cu) com tensão de 40,0 kV e corrente de 30,0 mA. Os perfis de difração foram obtidos no intervalo de 5° a 35° com passo angular de $0,050^\circ \pm 0,001^\circ$ a cada 3 segundos. A intensidade da radiação espalhada foi coletada por um detector cintilador de iodeto de sódio (NaI) com um monocromador analisador de grafite antes do detector. Todo o sistema de aquisição e análise de dados é feito pelos programas de operação dedicados do equipamento. A figura 3.8 mostra o difratômetro e seus principais componentes.

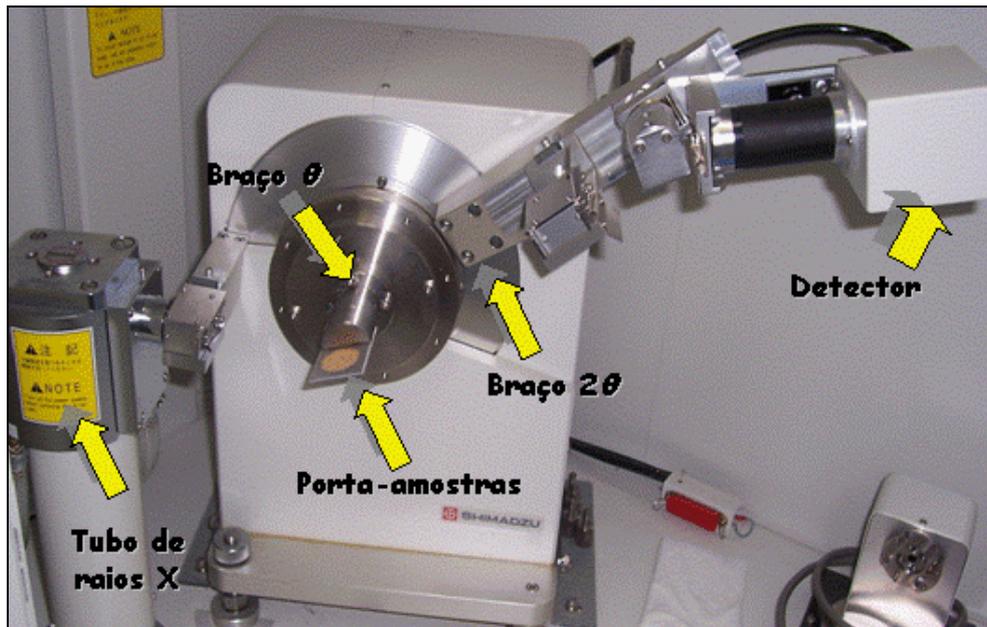


Figura 3. 8 - Difratorômetro XRD-6000 da Shimadzu.

A parte central dos porta-amostras possui uma depressão em forma de círculo, onde as amostras foram depositadas homogeneamente, sem regiões preferenciais e com a superfície plana, condições essenciais para medidas de difração em pó, como é mostrado na figura 3.9.

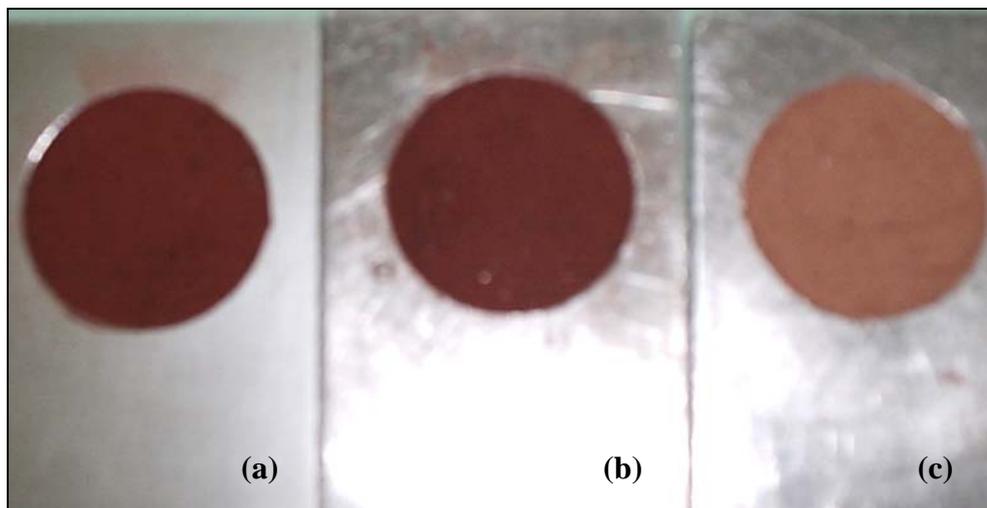


Figura 3. 9 - Amostras de (a) sangue total, (b) matriz celular e (c) plasma colocadas nos porta-amostras.

3.1.3 - PARÂMETROS DE CARACTERIZAÇÃO

Com objetivo de caracterizar cada perfil de espalhamento das amostras de sangue total (ST), elemento figurado (matriz celular - MC) e plasma (PL), foram introduzidos alguns parâmetros de caracterização obtidos a partir da análise de cada perfil. Esses parâmetros são:

- posição do primeiro pico (θ_1),
- posição do segundo pico (θ_2),
- largura a meia altura do primeiro pico ($FWHM_1$),
- largura a meia altura do segundo pico ($FWHM_2$),
- razão entre as intensidades dos picos (I_1/I_2)

Os valores de posição dos picos foram considerados como iguais aos dos picos centróides. Isto é, uma função gaussiana foi ajustada para cada pico e os valores de θ_1 e θ_2 foram selecionados de forma que a posição do pico fosse simétrica. Os valores de largura a meia altura e de área foram obtidos traçando-se uma linha de base. A metodologia de obtenção dos parâmetros está representada na figura 3.10.

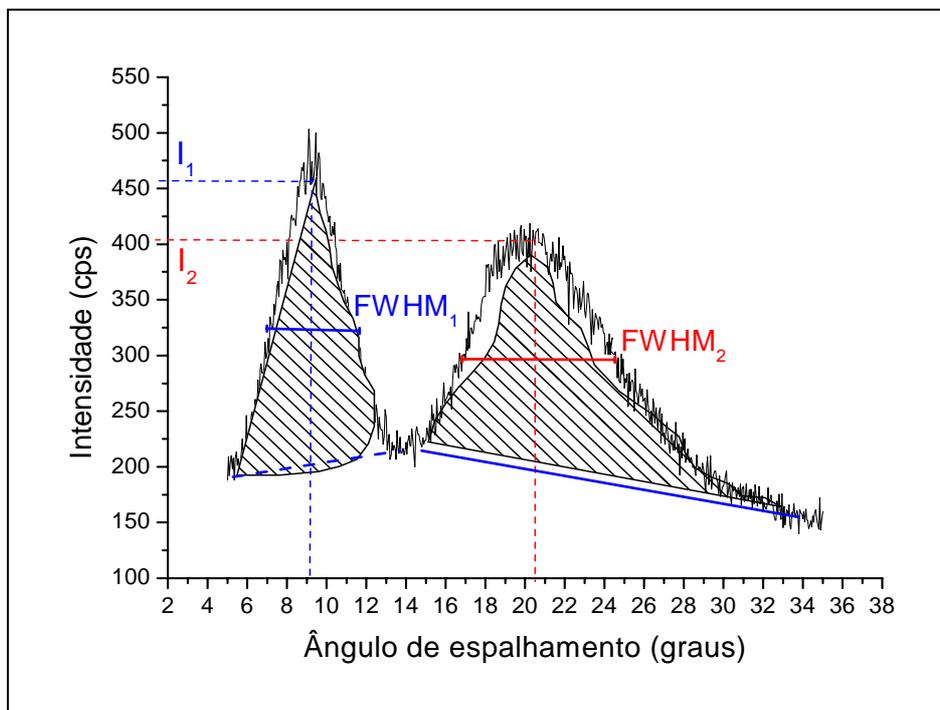


Figura 3. 10 - Obtenção dos parâmetros de caracterização.

3.2 – MEDIDAS DE FLUORESCÊNCIA DE RAIOS-X POR REFLEXÃO TOTAL COM RADIAÇÃO SÍNCROTRON (SR-TXRF)

3.2.1. PREPARAÇÃO DAS AMOSTRAS

Após a realização das medidas de difração de raios X, algumas amostras foram destinadas às medidas de SR-TXRF. A figura 3.11 mostra a distribuição das amostras em função da dose. A figura 3.12 apresenta a distribuição das amostras em função dos hemocomponentes estudados. Para as medidas de SR-TXRF, não houve análise em função da idade como foi feito na difração de raios X devido ao número reduzido de amostras.

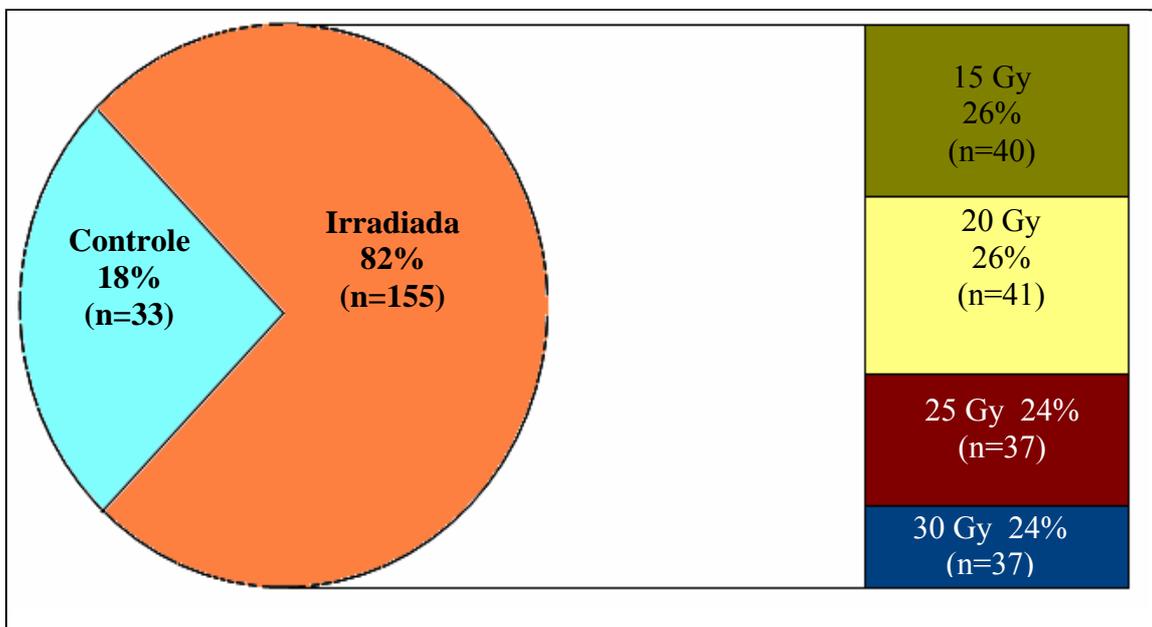


Figura 3. 11 – Distribuição das amostras para SR-TXRF em função da dose.

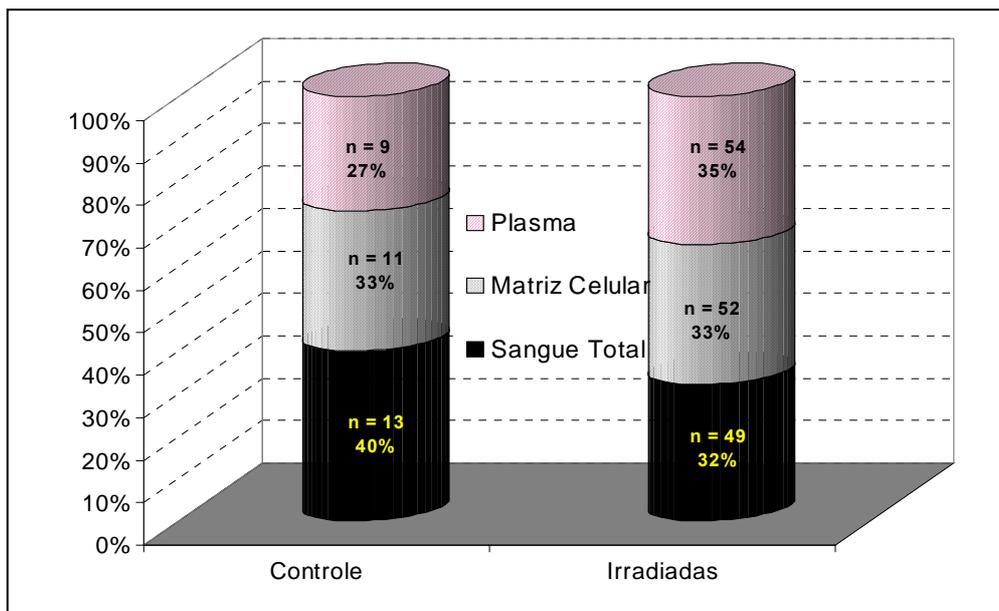


Figura 3. 12 - Distribuição das amostras em função dos hemocomponentes.

Devido a elevado conteúdo da matriz orgânica, amostras de sangue total requerem a realização de digestão química ou pelo menos uma diluição antes de serem analisadas por TXRF (TASCH, 2000; PRANGE, 1989). Segundo KLOCKENKAMPER (1995), amostras de minerais e biomateriais podem ser submetidas à digestão aberta ou fechada, essas amostras são usualmente inseridas em tubos de vidros ou teflon e adicionada um ácido forte ou uma mistura de ácidos onde normalmente o HNO₃ é escolhido e também H₂O₂, HF e HCl. Sendo assim, as amostras foram preparadas para as medidas de TXRF usando-se o procedimento padrão de digestão química aberta. Todas as amostras foram preparadas em parceria com a Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP-SP), com a colaboração da Prof^a Silvana Moreira, seguindo o mesmo procedimento.

Primeiramente, aferiram-se as massas de todas as amostras usadas nesse trabalho. Em cada amostra foi adicionado 6mL de ácido nítrico (HNO₃) e então encaminhadas ao bloco digestor e mantidas a 130°C por 3h, em seguida gotas de H₂O₂ (peróxido de hidrogênio) foram adicionadas como mostra a figura 3.13.



Figura 3. 13 - Amostras colocadas no tubo digestor.

Após o período de digestão, o volume das amostras digeridas foi recuperado em um balão volumétrico de 10 mL com água deionizada que depois foi acondicionado em tubos. Após essa fase, retirou-se dos 10 mL, um volume de 500 μ L da amostra e colocou-se em tubo de *eppendorf*. A esse volume é adicionado 50 μ L de uma solução de Gálio (102,5 μ g.mL⁻¹) usado como padrão interno, resultando em uma concentração de 9,32 μ g.mL⁻¹ do padrão em cada amostra. Em seguida, a solução final foi homogeneizada por agitação e, então, 5 μ L desta solução foi pipetada no refletor de lucite (Perspex). As amostras foram secas com uso de uma lâmpada infra-vermelha e, finalmente, alocadas em placas de Petri para transporte.

Com o intuito de corrigir efeitos referentes a possíveis contaminações e verificar a qualidade dos materiais utilizados, cinco amostras (chamadas brancos) foram preparadas de maneira análoga às amostras de análise, contendo apenas água e demais reagentes. É importante ressaltar que todos os recipientes utilizados foram previamente lavados com detergente neutro e água destilada, submersos em uma solução de HNO₃ a

10% por aproximadamente 30-40 minutos e, em seguida, rinsados com água deionizada (Mili-Q).

3.2.2 – INSTRUMENTAÇÃO

As amostras foram analisadas na linha de Fluorescência de Raios X (XRF) no Laboratório Nacional de Luz Síncrotron (LNLS), Campinas. A linha de XRF destina-se à análise da composição química multielementar ($Z \geq 13$) em aplicações científicas de determinação de elementos traços em ciências ambientais, biológicas e materiais, perfil de profundidade química de filmes finos e mapeamento químico.

O arranjo experimental, mostrado na figura 3.14, tem a geometria disposta de modo a propiciar a reflexão total. O refletor é fixado no porta-amostra, onde incide o feixe de luz Síncrotron sobre a alíquota depositada, permitindo a visualização dos elementos contidos na amostra.

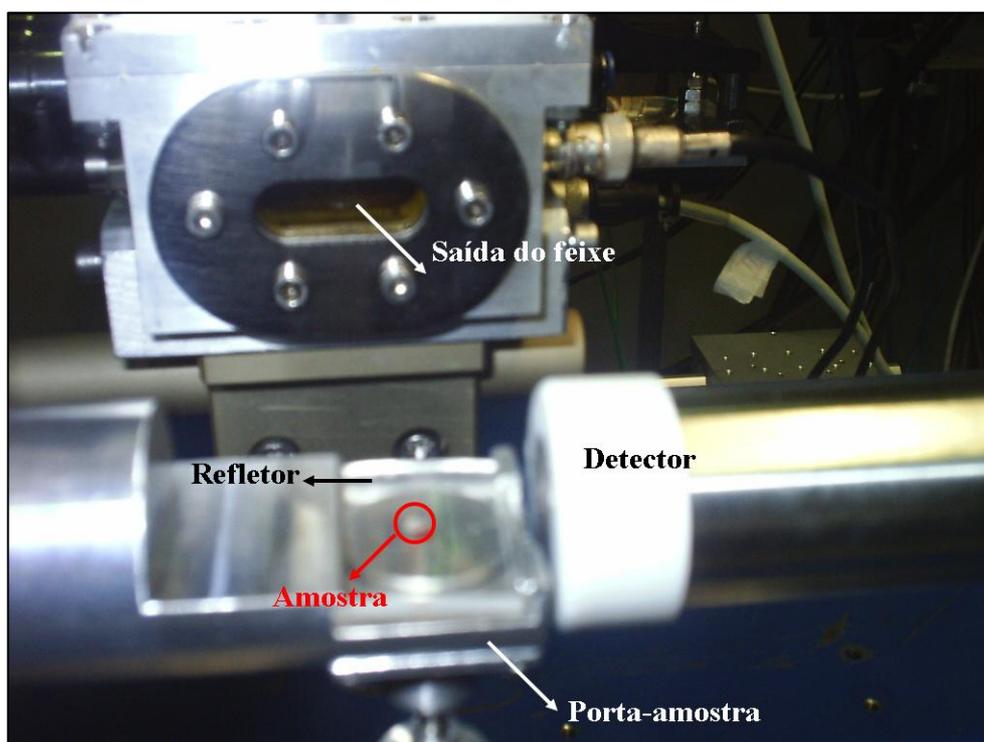


Figura 3. 14 - Arranjo experimental.

Todas as medidas foram realizadas em triplicata com um tempo de excitação igual a 100s, resultando em 300s por amostra. Os espectros de raios X obtidos foram analisados com o auxílio do programa computacional AXIL (Analysis of X-ray spectra by Iterative Least squares fitting). Este programa faz parte do pacote Quantitative X-ray Analysis System – QXAS, distribuído pela Agência Nacional de Energia Atômica (IAEA), o mais utilizado na área de fluorescência de raios X (BERNASCONI, 1996).

CAPÍTULO IV – RESULTADOS

4.1. DIFRAÇÃO DE RAIOS X

4.1.1. CARACTERIZAÇÃO DOS PERFIS DE ESPALHAMENTO

As figuras 4.1 a 4.3 mostram perfis de espalhamento típicos obtidos para as amostras de sangue total (ST), matriz celular (MC) e plasma (PL).

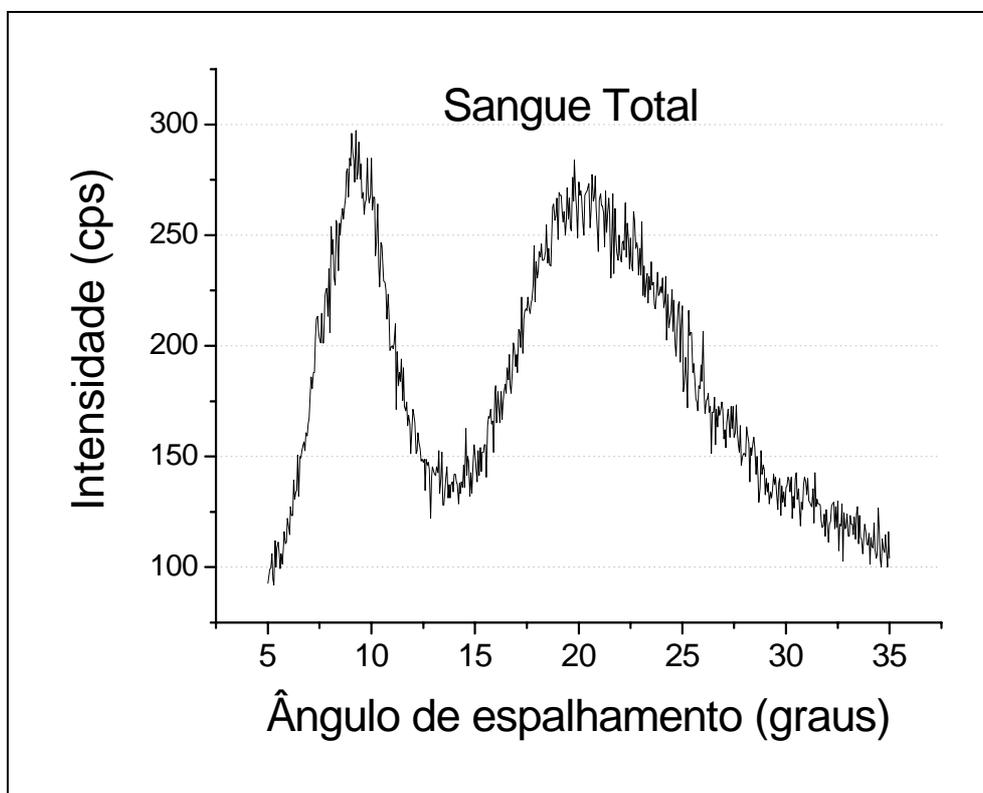


Figura 4.1 - Perfil característico de amostras de sangue total (ST).

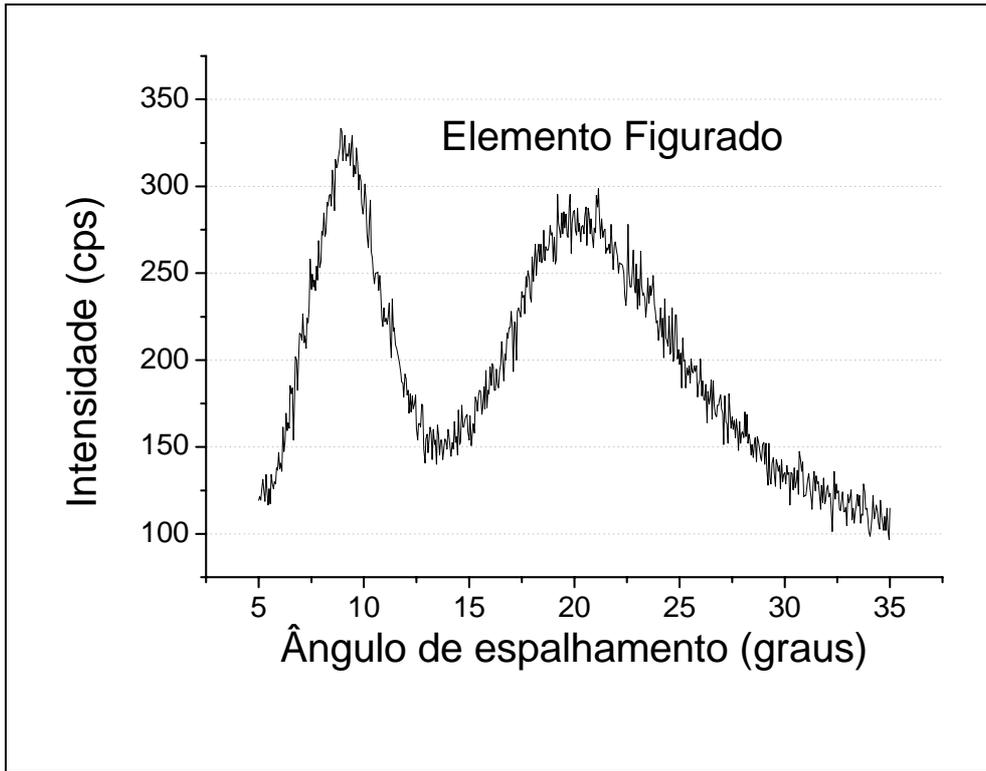


Figura 4. 2 – Perfil característico das amostras de matriz celular (MC).

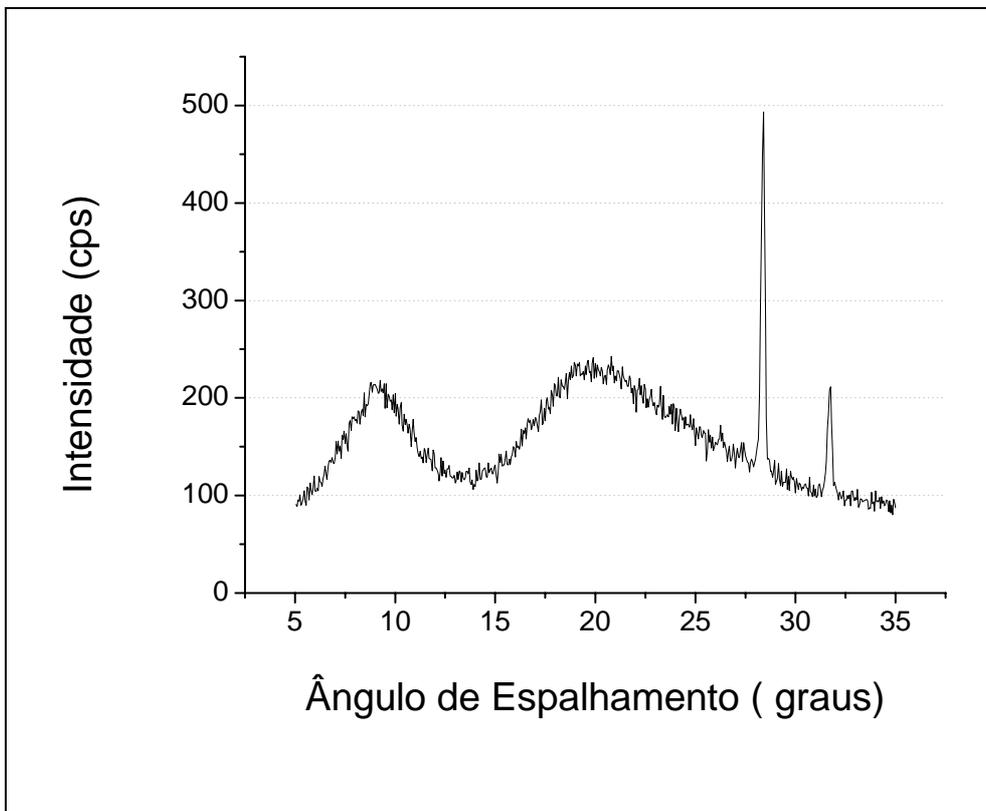


Figura 4. 3 – Perfil característico das amostras de plasma (PL).

Quanto à forma, pode-se observar que os perfis de espalhamento das amostras de sangue e seus hemocomponentes liofilizados são caracterizados pela presença de dois picos distintos. Esses perfis são significativamente característicos para cada tipo de amostra investigada. É também possível perceber que para o perfil do plasma (PL), além do perfil característico, existe ainda a presença de dois picos estreitos de grande intensidade.

Para análise quantitativa dos perfis medidos, a análise estatística dos valores obtidos para cada parâmetro de caracterização para as amostras de controle de ST, MC e PL foi realizada utilizando ANOVA. A tabela 4.1 apresenta os resultados obtidos. Os valores $p > 0,05$ são apresentados em negrito de modo a ressaltar os parâmetros que não apresentaram diferenças significativas entre os hemocomponentes estudados.

Tabela 4. 1 – Valores médios encontrados para os parâmetros de caracterização para as amostras de controle.

Valores médios							
Parâmetros	ST		MC		PL		p-value
	n=68		n=49		n=44		
	média	desvio	média	desvio	média	desvio	
Pico 1	9,402	0,149	9,464	0,203	9,463	0,275	0,2760
FWHM ₁	3,430	0,246	3,482	0,199	3,064	0,344	0,0001
Pico 2	22,983	0,433	23,067	0,315	20,716	0,554	0,0001
FWHM ₂	7,026	0,917	6,945	0,736	6,141	0,835	0,0001
I ₁ /I ₂	1,287	0,149	1,335	0,179	0,968	0,176	0,0001

O teste ANOVA foi capaz de apontar diferenças entre os valores médios dos parâmetros do PL quando comparados com os parâmetros do ST e da MC, exceto para a posição do primeiro pico. Analisando separadamente os parâmetros de caracterização θ_2 , FWHM₂ e I₁/I₂ para as amostras de ST e MC, todos os valores de p encontrados foram maiores que 0,05. Desta forma, a análise dos perfis de espalhamento das amostras de ST e MC será apresentada em separado da análise realizada para as amostras de PL.

4.1.1.1. SANGUE TOTAL E MATRIZ CELULAR

De acordo com DESOUKY (2001), há evidências da relação entre a posição do primeiro pico de espalhamento das amostras de sangue total e matriz celular e as proteínas existentes na hemoglobina (HB). FILGUEIRAS (2006) mostrou que os perfis de espalhamento das amostras de sangue total, matriz celular e hemoglobinas são bastante semelhantes, o que sugere que o perfil de espalhamento para essas amostras é dominado pela presença da hemoglobina. Esse comportamento é esperado já que sabe-se que as hemácias são as células mais numerosas no sangue e 90% da parte sólida é constituída de hemoglobina.

A figura 4.4 mostra os perfis de espalhamento típicos para as amostras de matriz celular, sangue total e hemoglobina. Os valores dos parâmetros de caracterização calculados através dos perfis de espalhamento são apresentados na tabela 4.2. Os valores referentes à hemoglobina foram obtidos de FILGUEIRAS (2006).

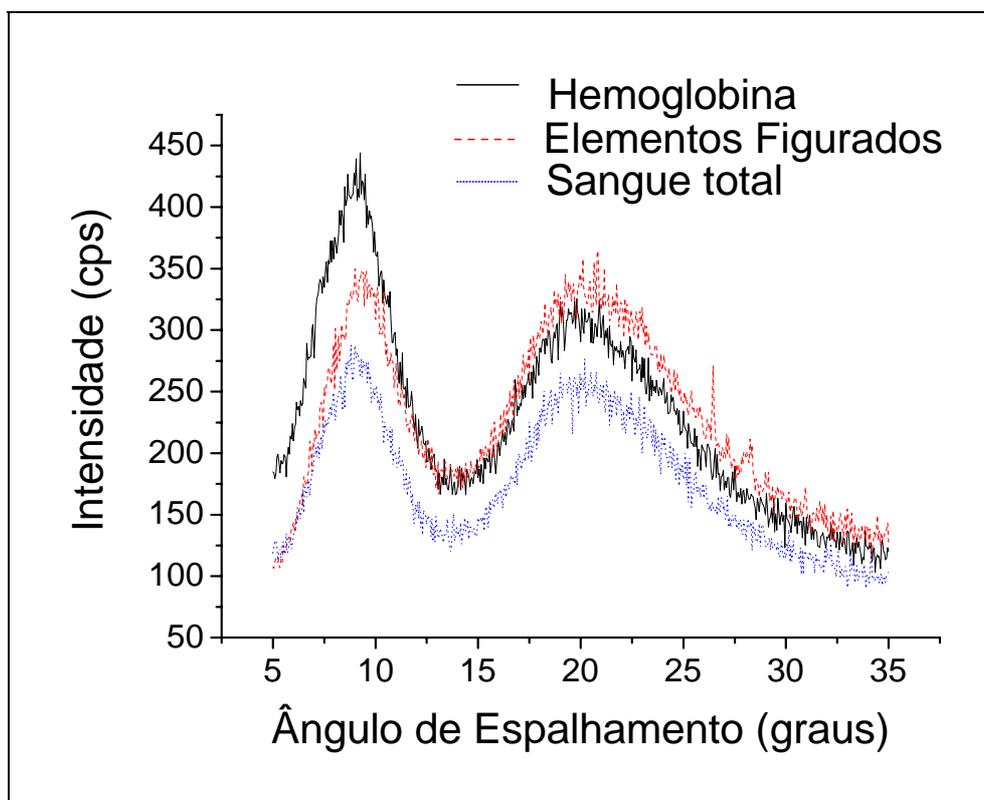


Figura 4. 4 - Comparação entre os perfis de espalhamento de ST, MC e HB.

Tabela 4. 2 – Valores médios encontrados para os parâmetros de caracterização para as amostras de ST, MC e HB.

Valores médios							
Parâmetros	ST		MC		HB		p-value
	n=68		n=49		n=12		
	média	desvio	média	desvio	média	desvio	
Pico 1	9,402	0,149	9,464	0,203	9,460	0,200	0,1470
FWHM ₁	3,430	0,246	3,482	0,199	3,480	0,160	0,4230
Pico 2	22,983	0,433	23,067	0,315	20,520	0,541	0,0001
FWHM ₂	7,026	0,917	6,945	0,736	7,980	0,380	0,0001
I ₁ /I ₂	1,287	0,149	1,335	0,179	1,010	0,080	0,0001

Comparando-se exclusivamente θ_1 e FWHM₁ para a matriz celular e hemoglobina, os valores encontrados para *p-value* foram 0,951 e 0,974, respectivamente, o que demonstra a forte similaridade entre esses parâmetros.

4.1.1.2. PLASMA

O plasma contém água (92%), proteínas (7%, como fibrinogênio, globulinas e albumina) e outras substâncias dissolvidas, como gases, nutrientes, excretas, hormônios e enzimas. Dentre as proteínas presentes no sangue, a mais abundante é a albumina. Em DESOUKY et al (2001), os autores mostraram que existe similaridade entre os perfis de amostras de soro humano e a proteína albumina. No entanto, para a realização desse trabalho, o plasma foi analisado considerando que este é o hemocomponente mais utilizado para fins transfusionais.

O plasma difere-se do soro porque além das proteínas do soro, o plasma também contém fibrinogênio, fibrina, fatores de coagulação e a globulina. A albumina e fibrinogênio são proteínas geralmente encontradas no plasma. Isso sugere que exista também alguma similaridade entre o perfil do plasma e da albumina. Com base nessa

informação os perfis de espalhamento de amostras de albumina humana a 20% e do plasma foram sobrepostos como mostra a figura 4.5.

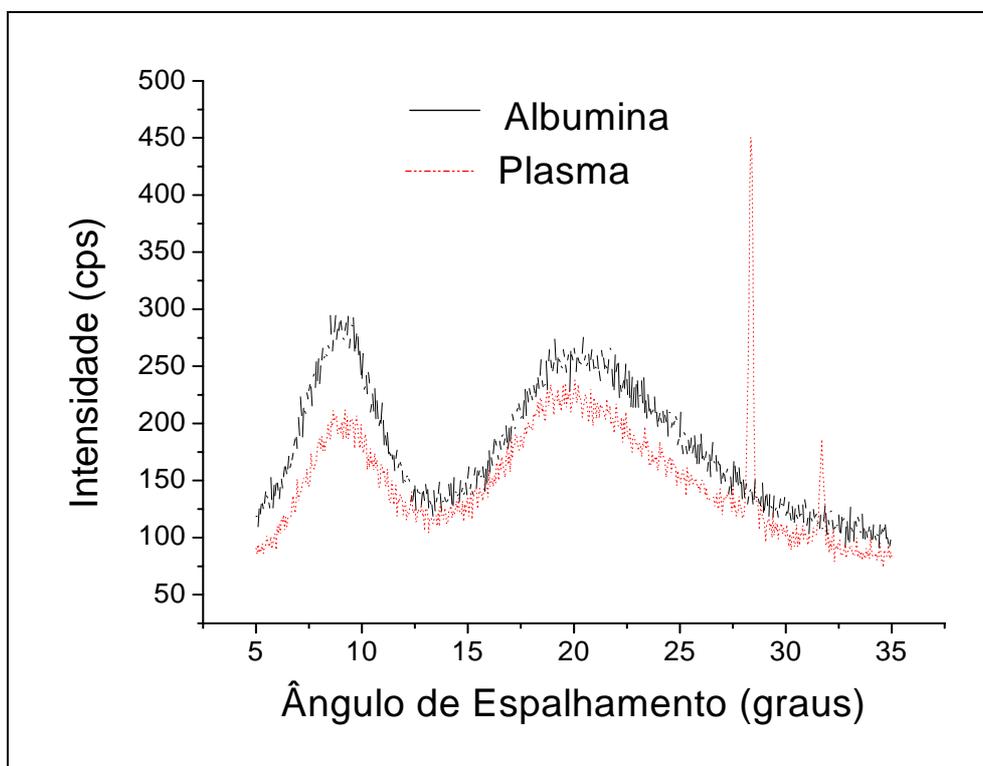


Figura 4.5 - Comparação entre os perfis de espalhamento da albumina e do plasma.

A albumina é uma proteína fundamental para a manutenção da pressão osmótica, necessária para a distribuição correta dos líquidos corporais entre o compartimento intravascular e o extra vascular, localizado entre os tecidos. Seu excesso ocasiona diversas doenças, como problemas renais e hepáticos. A albumina é usada principalmente em tratamentos relacionados com queimaduras e hemorragias graves (CAMPION et al,1988; SALIVE et al, 1992; CLOCHESY et al, 1999).

A fim de saber se o perfil de espalhamento da albumina se assemelha com o perfil do plasma, assim como ocorre com os perfis de sangue total e matriz celular quando comparados com a hemoglobina, os parâmetros de caracterização da proteína albumina foram comparados com os parâmetros obtidos para as amostras de controle de plasma, como mostra a tabela 4.3.

Tabela 4. 3 - Comparação entre os parâmetros de caracterização dos perfis de espalhamento da albumina e do plasma.

Comparação entre albumina e PL					
Parâmetros	Albumina		Plasma		p-value
	n=12		n=16		
Pico 1	9,376	0,135	9,463	0,275	0,3280
FWHM ₁	3,416	0,095	3,064	0,344	0,0001
Pico 2	20,500	0,327	20,716	0,554	0,2880
FWHM ₂	7,764	0,150	6,141	0,835	0,00001
I ₁ /I ₂	1,056	0,034	0,968	0,176	0,0169

Com os dados obtidos na tabela 4.3 pode-se observar que as posições dos picos de espalhamento não apresentaram diferenças significativas ($p > 0,05$). Para os demais parâmetros o *p-value* foi menor que 0,05 o que sugere que, apesar da albumina corresponder a 55% das proteínas, as demais proteínas existentes contribuem fortemente na formação do perfil de espalhamento do plasma.

4.1.2. ANÁLISE QUANTO À DOSE

As tabelas 4.4 a 4.7 apresentam os valores obtidos para os parâmetros de caracterização dos perfis de espalhamento das amostras de ST, MC e PL irradiadas com 15Gy, 20Gy, 25Gy e 30Gy, respectivamente.

Tabela 4. 4 - Valores médios encontrados para os parâmetros de caracterização para as amostras irradiadas com 15Gy.

Valores médios - 15Gy							
Parâmetros	ST		MC		PL		p-value
	n=44		n=42		n=36		
	média	desvio	média	desvio	média	desvio	
Pico 1	9,484	0,106	9,497	0,200	9,499	0,261	0,9360
FWHM ₁	3,393	0,296	3,460	0,352	3,118	0,304	0,0001
Pico 2	23,338	0,173	23,394	0,366	20,881	0,929	0,0001
FWHM ₂	7,359	0,822	7,194	0,820	6,356	1,757	0,0001
I ₁ /I ₂	1,217	0,226	1,216	0,196	0,966	0,235	0,0001

Tabela 4. 5 - Valores médios encontrados para os parâmetros de caracterização para as amostras irradiadas com 20Gy.

Valores médios - 20Gy							
Parâmetros	ST		MC		PL		p-value
	n=55		n=52		n=52		
	média	desvio	média	desvio	média	desvio	
Pico 1	9,415	0,171	9,246	0,198	9,174	0,252	0,0001
FWHM ₁	3,450	0,213	3,464	0,263	3,079	0,328	0,0001
Pico 2	23,246	0,260	22,913	0,225	20,447	0,413	0,0001
FWHM ₂	7,162	0,694	6,563	0,743	5,719	0,803	0,0001
I ₁ /I ₂	1,268	0,273	1,441	0,200	1,024	0,242	0,0001

Tabela 4. 6 - Valores médios encontrados para os parâmetros de caracterização para as amostras irradiadas com 25Gy.

Valores médios -25Gy							
Parâmetros	ST		MC		PL		p-value
	n=39		n=40		n=39		
	média	desvio	média	desvio	média	desvio	
Pico 1	9,487	0,170	9,477	0,193	9,366	0,346	0,0610
FWHM ₁	3,378	0,258	3,492	0,251	3,146	0,259	0,0001
Pico 2	23,206	0,287	23,292	0,258	20,908	0,740	0,0001
FWHM ₂	7,278	0,760	7,375	0,507	6,447	0,829	0,0001
I ₁ /I ₂	1,181	0,197	1,170	0,146	0,941	0,133	0,0001

Tabela 4. 7 - Valores médios encontrados para os parâmetros de caracterização para as amostras irradiadas com 30Gy.

Valores médios - 30Gy							
Parâmetros	ST		MC		PL		p-value
	n=27		n=29		n=28		
	média	desvio	média	desvio	média	desvio	
Pico 1	9,519	0,218	9,407	0,188	9,493	0,213	0,1080
FWHM ₁	3,413	0,208	3,350	0,185	3,127	0,350	0,0001
Pico 2	23,265	0,334	23,266	0,259	20,663	0,256	0,0001
FWHM ₂	7,336	0,679	7,322	0,626	6,081	0,853	0,0001
I ₁ /I ₂	1,073	0,186	1,213	0,205	0,956	0,147	0,0001

A análise de variância mostrou que a posição do primeiro pico de todos os perfis analisados não apresentou diferença estatisticamente significativa independente do valor de dose, com exceção para a dose de 20Gy.

O teste de Bonferroni foi aplicado a todos os parâmetros que apresentaram o valor de $p < 0,05$. Assim, também pode se verificar que os valores médios dos parâmetros de caracterização do ST e MC não apresentam diferenças significativas. Porém, os valores médios dos parâmetros de caracterização do PL são significativamente diferentes dos valores encontrados para ST e MC.

Os valores médios dos parâmetros de caracterização para as amostras irradiadas com 20 Gy apresentaram um comportamento atípico quando comparados com os demais grupos. A figura 4.6 mostra a comparação dos parâmetros que apresentaram diferenças estatisticamente significantes para os valores de dose de 0Gy, 15Gy, 25Gy e 30Gy. A comparação para as amostras irradiadas com 20 Gy é apresentada separadamente na figura 4.7.

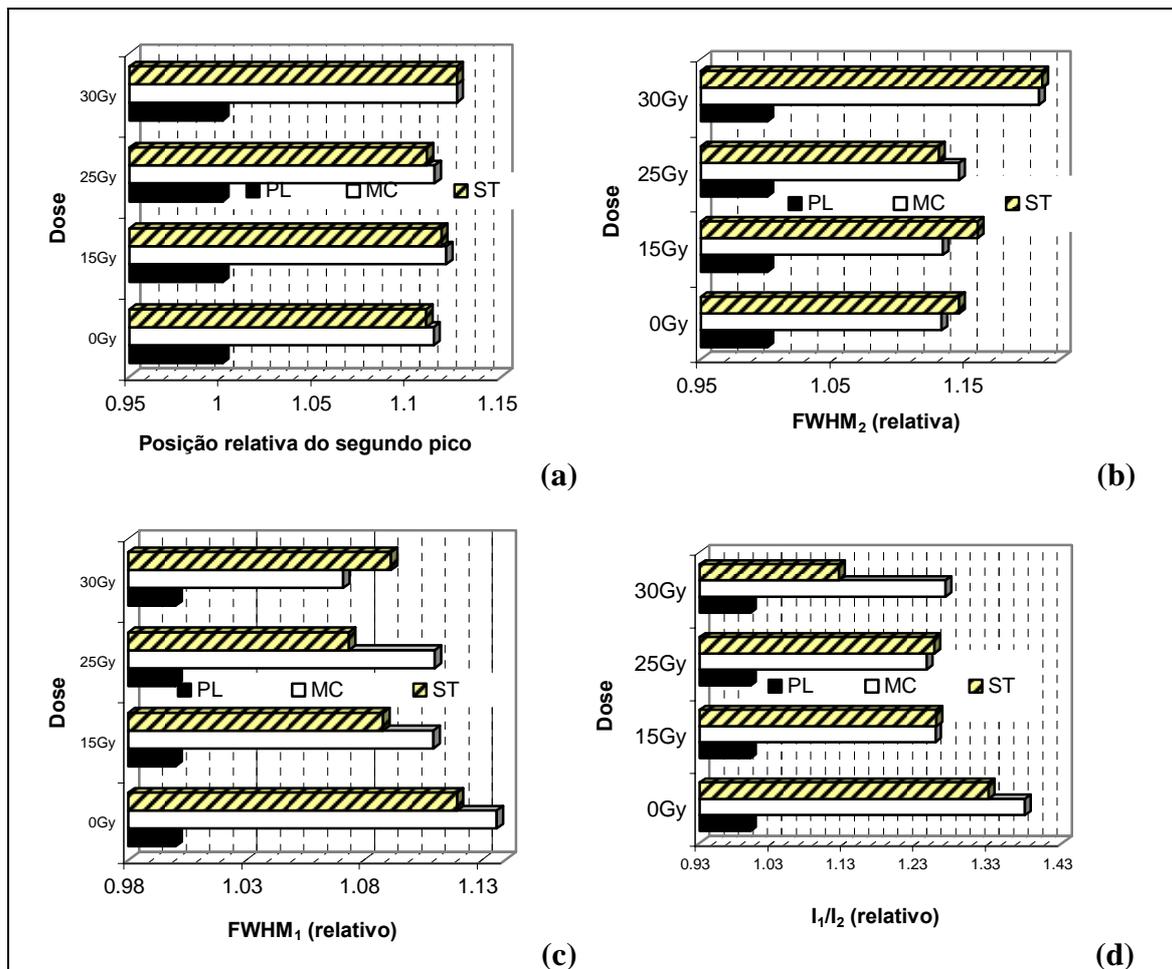


Figura 4. 6 – Comparação dos valores médios encontrados para parâmetros de caracterização: (a) θ_2 , (b) FWHM₂, (c) FWHM₁ e (d) I₁/I₂.

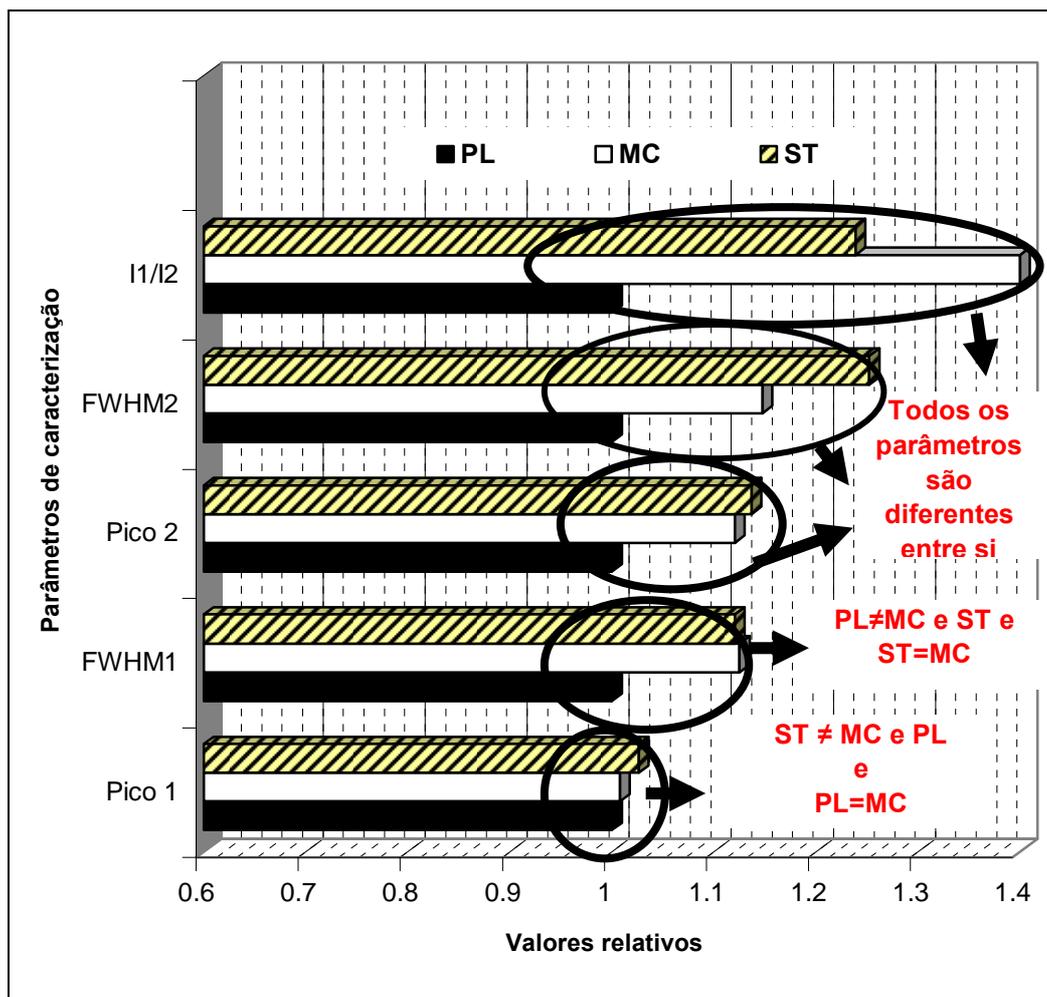


Figura 4. 7 - Comparação dos valores médios encontrado para todos os parâmetros de caracterização para as amostras irradiadas com 20Gy.

4.1.3. ANÁLISE QUANTO À IDADE DOS DOADORES

É sabido que o sistema hematológico tem um papel preponderante no equilíbrio interno do organismo. Entretanto, seus componentes não se encontram entre os mais estudados com relação às modificações decorrentes do envelhecimento natural. Em decorrência disso, tem-se a falsa idéia de que todas as alterações são fisiológicas e, portanto, próprias do envelhecimento natural. As alterações decorrentes da idade no sangue incluem a diminuição dos valores médios de hemoglobina e hematórcitos.

NILSSON et al (2000), estudaram a possibilidade do declínio dos valores de hemoglobina em idosos com idade superior a 70 anos. Nesse trabalho eles observaram

baixos valores para a concentração de hemoglobina (hemoglobina menor que 13g/dL para homens e 12g/dL para mulheres).

4.1.3.1. SANGUE TOTAL E MATRIZ CELULAR

Com o objetivo de testar a possível relação entre os valores obtidos para os parâmetros de caracterização e a idade dos doadores, os resultados para as amostras de sangue total e de matriz celular foram comparados para os grupos de adultos (18-65anos) e idosos (>65anos). As tabelas 4.8 a 4.12 apresentam essas comparações para as amostras de sangue total de controle e irradiadas. As comparações para as amostras de matriz celular são apresentadas nas tabelas 4.13 a 4.17.

Tabela 4. 8 – Comparação dos parâmetros de caracterização dos perfis de amostras de sangue total em função da idade do doador – Amostras de controle.

ST - 0Gy					
Parâmetros	Idoso		Adulto		p-value
	n=35		n=33		
	média	desvio	média	desvio	
Pico 1	9,456	0,154	9,345	0,300	0,055
FWHM ₁	3,453	0,235	3,406	0,258	0,437
Pico 2	23,050	0,372	22,911	0,485	0,186
FWHM ₂	7,009	0,614	7,043	1,166	0,879
I ₁ /I ₂	1,311	0,150	1,261	0,146	0,160

Tabela 4. 9 – Comparação dos parâmetros de caracterização dos perfis de amostras de sangue total em função da idade do doador – Amostras irradiadas com 15 Gy.

ST - 15Gy					
Parâmetros	Idoso		Adulto		p-value
	n=20		n=24		
	média	desvio	média	desvio	
Pico 1	9,498	0,093	9,472	0,117	0,413
FWHM ₁	3,423	0,358	3,368	0,238	0,554
Pico 2	23,338	0,162	23,338	0,185	0,994
FWHM ₂	7,150	0,697	7,533	0,891	0,109
I ₁ /I ₂	1,220	0,212	1,214	0,241	0,932

Tabela 4. 10 – Comparação dos parâmetros de caracterização dos perfis de amostras de sangue total em função da idade do doador – Amostras irradiadas com 20 Gy.

ST - 20Gy					
Parâmetros	Idoso		Adulto		p-value
	n=28		n=27		
	média	desvio	média	desvio	
Pico 1	9,475	0,149	9,352	0,173	0,004
FWHM ₁	3,466	0,238	3,434	0,187	0,579
Pico 2	23,321	0,232	23,168	0,268	0,023
FWHM ₂	7,211	0,771	7,112	0,615	0,433
I ₁ /I ₂	1,234	0,228	1,304	0,313	0,340

Tabela 4. 11 – Comparação dos parâmetros de caracterização dos perfis de amostras de sangue total em função da idade do doador – Amostras irradiadas com 25 Gy.

ST - 25Gy					
Parâmetros	Idoso		Adulto		p-value
	n=19		n=20		
	média	desvio	média	desvio	
Pico 1	9,438	0,148	9,534	0,180	0,219
FWHM ₁	3,375	0,222	3,380	0,295	0,951
Pico 2	23,223	0,262	23,191	0,316	0,735
FWHM ₂	7,381	0,601	7,181	0,891	0,408
I ₁ /I ₂	1,246	0,190	1,118	0,187	0,427

Tabela 4. 12 – Comparação dos parâmetros de caracterização dos perfis de amostras de sangue total em função da idade do doador – Amostras irradiadas com 30 Gy.

ST - 30Gy					
Parâmetros	Idoso		Adulto		p-value
	n=12		n=15		
	média	desvio	média	desvio	
Pico 1	9,483	0,256	9,547	0,187	0,471
FWHM ₁	3,384	0,217	3,437	0,205	0,515
Pico 2	23,333	0,289	20,040	0,661	0,331
FWHM ₂	7,415	0,700	7,273	0,680	0,596
I ₁ /I ₂	1,050	0,177	1,092	0,196	0,562

Tabela 4. 13 – Comparação dos parâmetros de caracterização dos perfis de amostras de matriz celular em função da idade do doador – Amostras de controle.

MC- 0Gy					
Parâmetros	Idoso		Adulto		p-value
	n=13		n=36		
	média	desvio	média	desvio	
Pico 1	9,559	0,178	9,430	0,203	0,023
FWHM ₁	3,514	0,188	3,471	0,204	0,482
Pico 2	23,281	0,318	22,990	0,281	0,003
FWHM ₂	7,351	0,413	6,798	0,776	0,001
I ₁ /I ₂	1,278	0,182	1,356	0,177	0,165

Tabela 4. 14 – Comparação dos parâmetros de caracterização dos perfis de amostras de matriz celular em função da idade do doador – Amostras irradiadas com 15 Gy.

MC - 15Gy					
Parâmetros	Idoso		Adulto		p-value
	n=19		n=23		
	média	desvio	média	desvio	
Pico 1	9,601	0,201	9,411	0,157	0,001
FWHM ₁	3,428	0,410	3,486	0,304	0,608
Pico 2	23,575	0,380	23,244	0,283	0,002
FWHM ₂	7,322	0,972	7,089	0,675	0,376
I ₁ /I ₂	1,247	0,200	1,190	0,193	0,346

Tabela 4. 15 – Comparação dos parâmetros de caracterização dos perfis de amostras de matriz celular em função da idade do doador – Amostras irradiadas com 20 Gy.

MC - 20Gy					
Parâmetros	Idoso		Adulto		p-value
	n=25		n=27		
	média	desvio	média	desvio	
Pico 1	9,237	0,203	9,254	0,197	0,760
FWHM ₁	3,445	0,260	3,482	0,270	0,613
Pico 2	22,890	0,212	22,935	0,238	0,468
FWHM ₂	6,511	0,454	6,612	0,943	0,620
I ₁ /I ₂	1,484	0,150	1,401	0,233	0,122

Tabela 4. 16 – Comparação dos parâmetros de caracterização dos perfis de amostras de matriz celular em função da idade do doador – Amostras irradiadas com 25 Gy.

MC - 25Gy					
Parâmetros	Idoso		Adulto		p-value
	n=20		n=20		
	média	desvio	média	desvio	
Pico 1	9,479	0,190	9,475	0,200	0,944
FWHM ₁	3,526	0,197	3,459	0,297	0,399
Pico 2	23,290	0,256	23,294	0,266	0,965
FWHM ₂	7,316	0,586	7,434	0,420	0,459
I ₁ /I ₂	1,189	0,146	1,152	0,147	0,430

Tabela 4. 17 – Comparação dos parâmetros de caracterização dos perfis de amostras de matriz celular em função da idade do doador – Amostras irradiadas com 30 Gy.

MC - 30Gy					
Parâmetros	Idoso		Adulto		p-value
	n=14		n=15		
	média	desvio	média	desvio	
Pico 1	9,365	0,228	9,446	0,138	0,599
FWHM ₁	3,326	0,199	3,372	0,174	0,278
Pico 2	20,404	0,773	23,344	0,167	0,437
FWHM ₂	7,372	0,690	7,276	0,581	0,507
I ₁ /I ₂	1,239	0,243	1,190	0,168	0,448

As amostras de sangue total não se mostraram sensíveis ao teste de hipóteses, com exceção das amostras de controle que apresentaram apenas uma diferença na posição do primeiro pico. Os valores dos parâmetros de caracterização não apresentaram diferenças significativas em função da dose, com exceção das amostras irradiadas com 20Gy que apresentaram diferenças para as posições dos dois picos.

Para as amostras de matriz celular, pode-se observar que para os valores médios das posições dos picos de espalhamento apresentaram diferenças estatisticamente significante para as amostras de controle e as irradiadas com 15Gy. Não se verificaram diferenças estatisticamente significantes para os valores dos parâmetros de caracterização para doses superiores a 15Gy.

As distribuições dos valores encontrados para θ_1 e θ_2 que apresentaram diferenças estatisticamente significantes considerando-se a idade do doador são mostradas através de *boxplot* nas figuras 4.8 a 4.13.

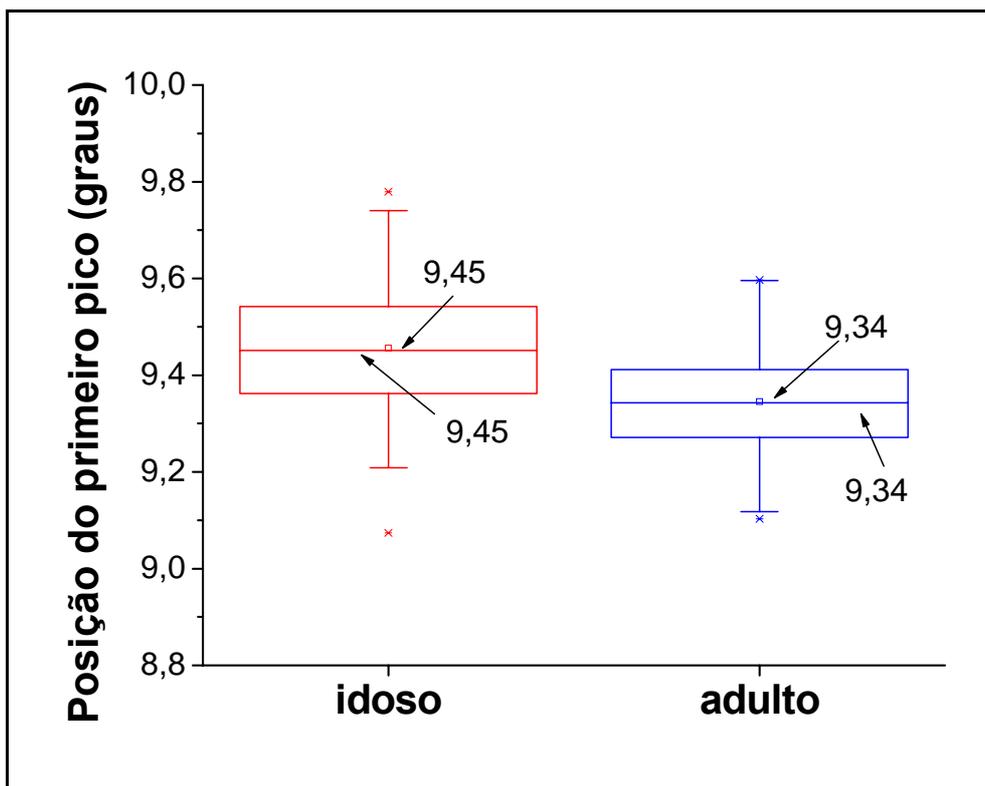


Figura 4. 8 - Representação da posição do primeiro pico para as amostras de ST de controle.

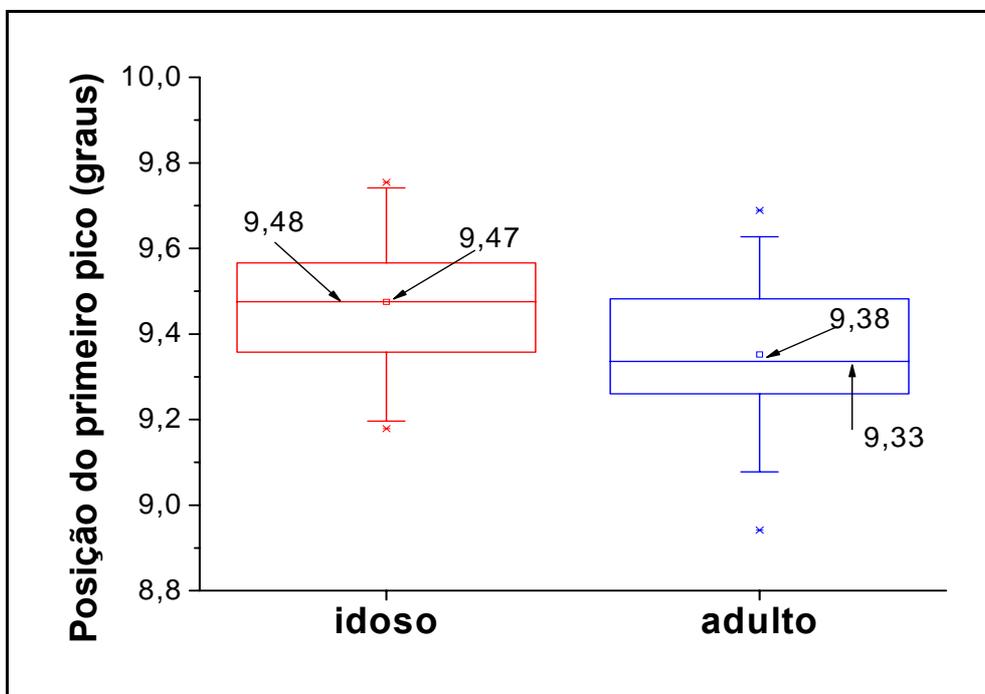


Figura 4. 9 - Representação da posição do primeiro pico para as amostras de ST irradiadas com 20 Gy.

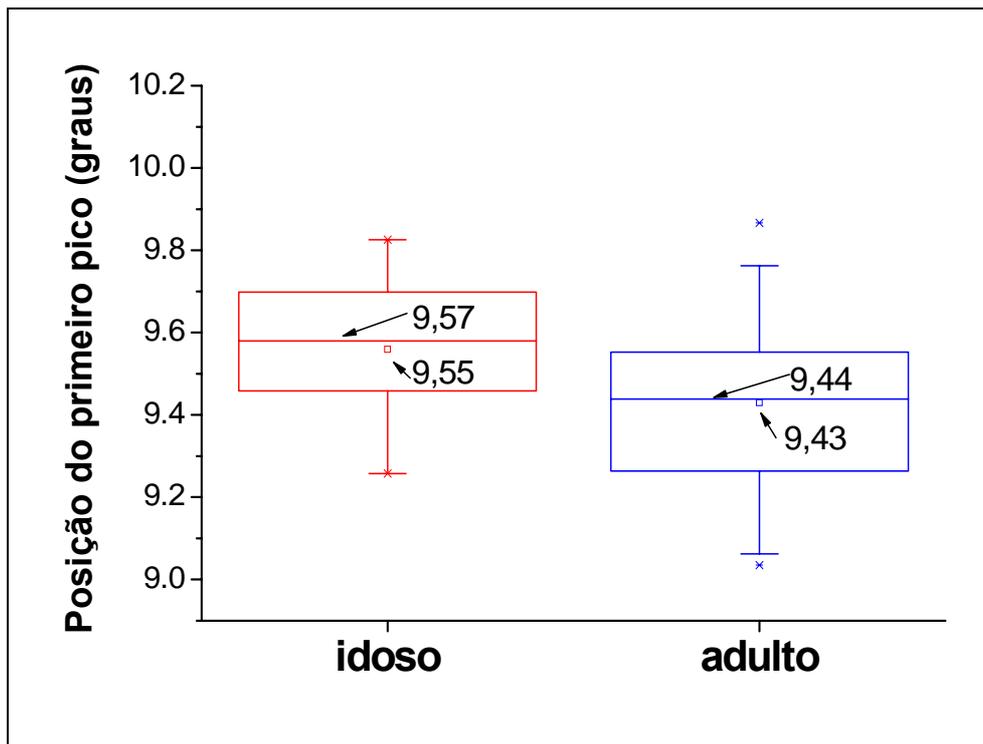


Figura 4. 10 - Representação da posição do primeiro pico para as amostras de MC de controle.

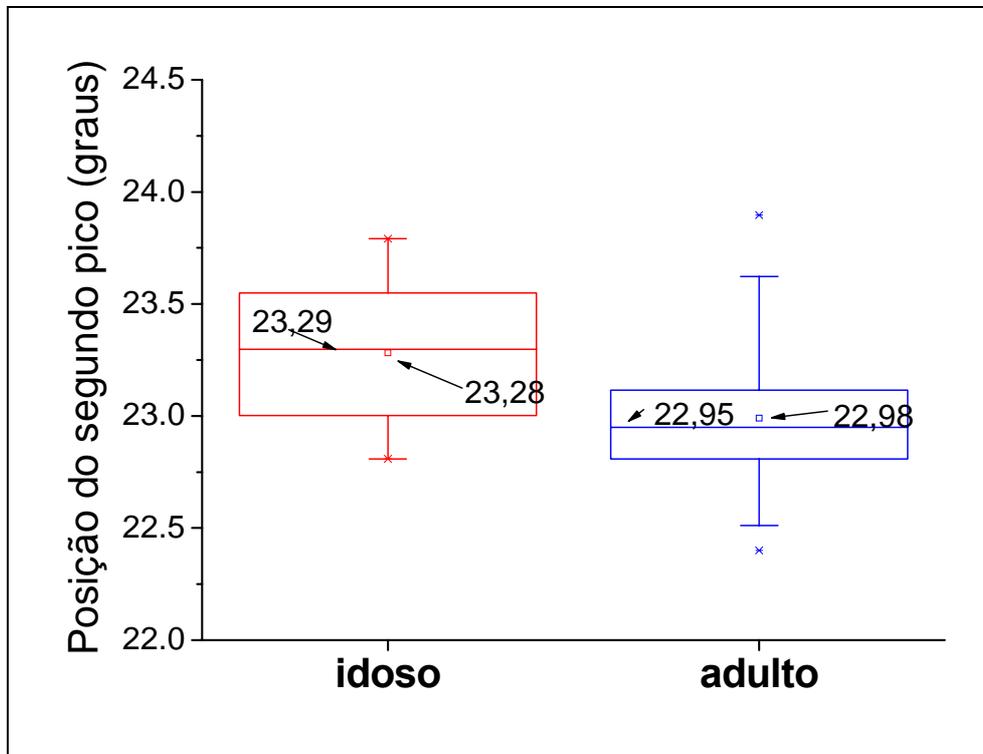


Figura 4. 11 - Representação da posição do segundo pico para as amostras de MC de controle.

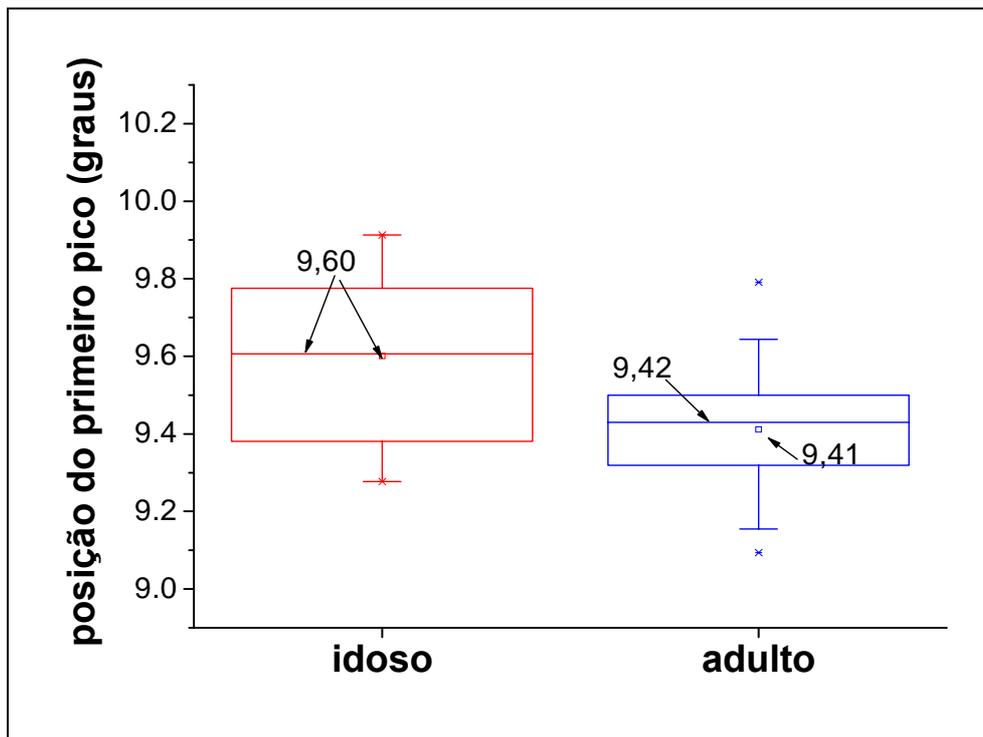


Figura 4. 12 - Representação da posição do primeiro pico para as amostras de MC irradiadas com 15 Gy.

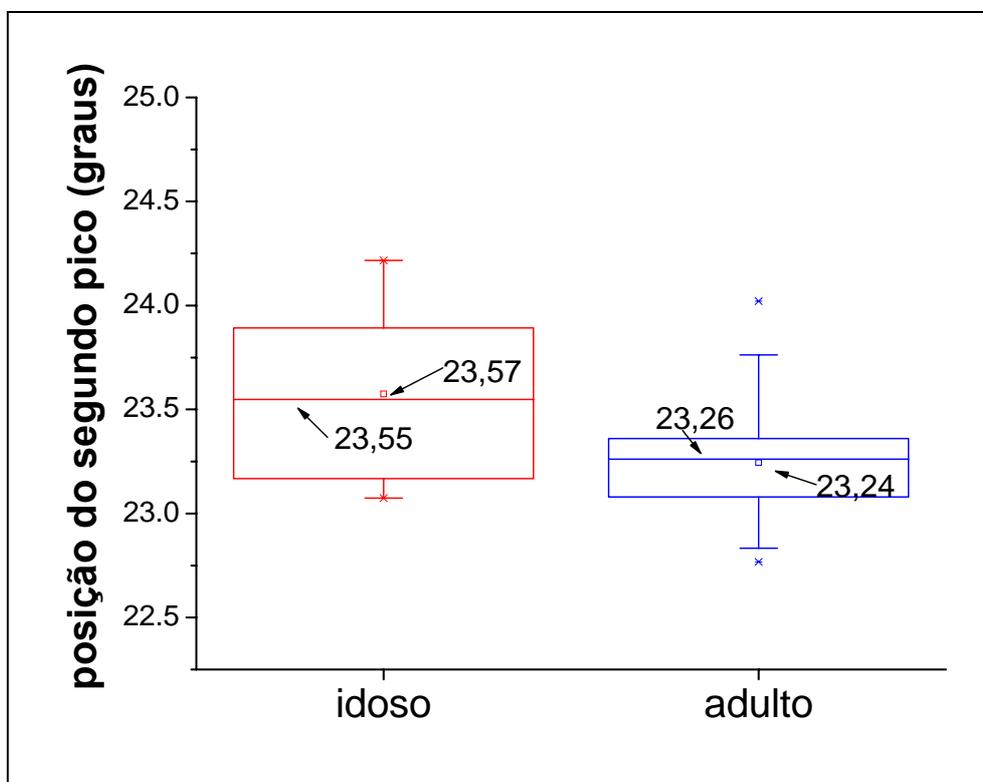


Figura 4. 13 - Representação da posição do segundo pico para as amostras de MC irradiadas com 15 Gy.

Analisando os *boxplots* foi possível observar que os valores medidos de θ_1 e θ_2 são pouco dispersos em relação às médias e medianas encontradas. Pode-se também observar que as posições dos picos dos perfis de espalhamento característicos para o grupo de adultos é sempre menor que as posições desses mesmos picos para o grupo de idosos.

4.1.3.2. PLASMA

A mesma análise levando em consideração a idade também foi realizada para as amostras de plasma. As tabelas de 4.18 a 4.22 apresentam os resultados obtidos.

Tabela 4. 18 – Comparação dos parâmetros de caracterização dos perfis de amostras de plasma em função da idade do doador – Amostras de controle.

PL - amostras de controle					
Parâmetros	Idoso		Adulto		p-value
	n=12		n=32		
	média	desvio	média	desvio	
Pico 1	9,627	0,269	9,401	0,255	0,0118
FWHM ₁	2,892	0,258	3,128	0,353	0,0146
Pico 2	20,821	0,152	20,677	0,641	0,2350
FWHM ₂	6,556	0,738	5,986	0,826	0,0274
I ₁ /I ₂	0,907	0,160	0,989	0,176	0,1410

Tabela 4. 19 – Comparação dos parâmetros de caracterização dos perfis de amostras de plasma em função da idade do doador – Amostras irradiadas com 15 Gy.

PL - 15Gy					
Parâmetros	Idoso		Adulto		p-value
	n=14		n=22		
	média	desvio	média	desvio	
Pico 1	9,522	0,035	9,485	0,019	0,0003
FWHM ₁	3,018	0,312	3,132	0,338	0,7180
Pico 2	21,435	1,240	20,528	0,390	0,0078
FWHM ₂	5,959	0,583	5,514	0,914	0,2260
I ₁ /I ₂	0,953	0,225	1,084	0,243	0,3890

Tabela 4. 20 – Comparação dos parâmetros de caracterização dos perfis de amostras de plasma em função da idade do doador – Amostras irradiadas com 20 Gy.

PL - 20Gy					
Parâmetros	Idoso		Adulto		p-value
	n=24		n=28		
	média	desvio	média	desvio	
Pico 1	9,099	0,189	9,239	0,283	0,033
FWHM ₁	3,018	0,312	3,132	0,338	0,207
Pico 2	20,539	0,158	20,369	0,310	0,011
FWHM ₂	5,959	0,583	5,514	0,914	0,033
I ₁ /I ₂	0,953	0,225	1,084	0,243	0,043

Tabela 4. 21 – Comparação dos parâmetros de caracterização dos perfis de amostras de plasma em função da idade do doador – Amostras irradiadas com 25 Gy.

PL - 25Gy					
Parâmetros	Idoso		Adulto		p-value
	n=19		n=20		
	média	desvio	média	desvio	
Pico 1	9,416	0,218	9,318	0,263	0,201
FWHM ₁	3,125	0,244	3,167	0,279	0,619
Pico 2	21,037	0,777	20,785	0,700	0,288
FWHM ₂	6,381	1,030	6,511	0,600	0,633
I ₁ /I ₂	0,934	0,126	0,947	0,143	0,760

Tabela 4. 22 – Comparação dos parâmetros de caracterização dos perfis de amostras de plasma em função da idade do doador – Amostras irradiadas com 30 Gy.

PL - 30Gy					
Parâmetros	Idoso		Adulto		p-value
	n=11		n=16		
	média	desvio	média	desvio	
Pico 1	9,387	0,283	9,573	0,300	0,093
FWHM ₁	3,131	0,345	3,124	0,364	0,962
Pico 2	20,685	0,234	20,647	0,278	0,691
FWHM ₂	6,000	0,541	6,141	1,042	0,674
I ₁ /I ₂	0,943	0,074	0,966	0,186	0,692

Foi possível observar que para as amostras de controle e as irradiadas com 15 Gy e 20 Gy as posições dos picos característicos dos perfis de espalhamento apresentaram diferenças significativas em função dos grupos de idades analisados. Para

as demais doses, essa diferença deixa de ser estatisticamente significativa para qualquer que seja o parâmetro considerado. As figuras 4.14 a 4.18 mostram, através de *boxplot*, a distribuição dos valores de θ_1 e θ_2 que apresentaram diferença estatisticamente significativa levando em consideração a idade do doador.

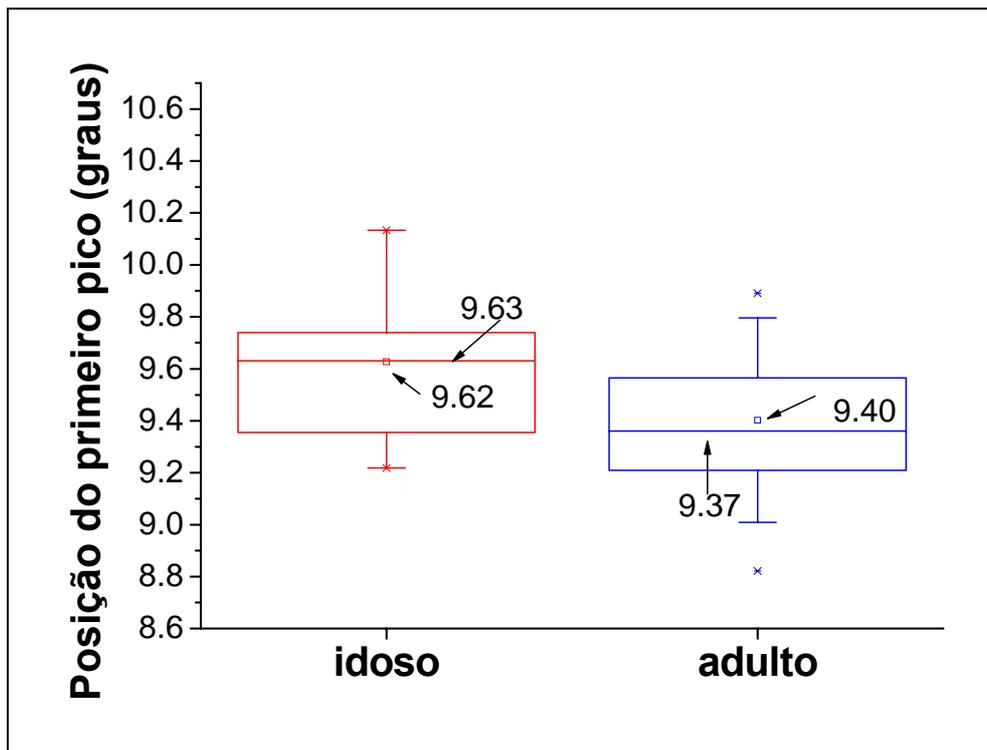


Figura 4. 14 - Representação da posição do primeiro pico para as amostras de PL de controle.

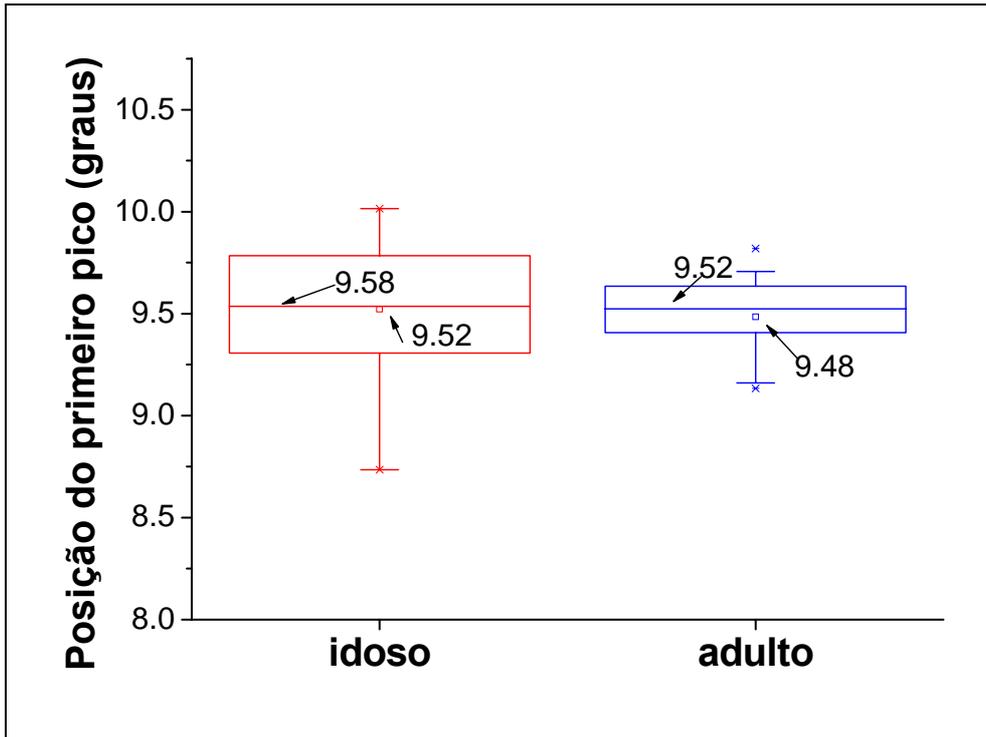


Figura 4. 15 - Representação da posição do primeiro pico para as amostras de PL irradiadas com 15 Gy.

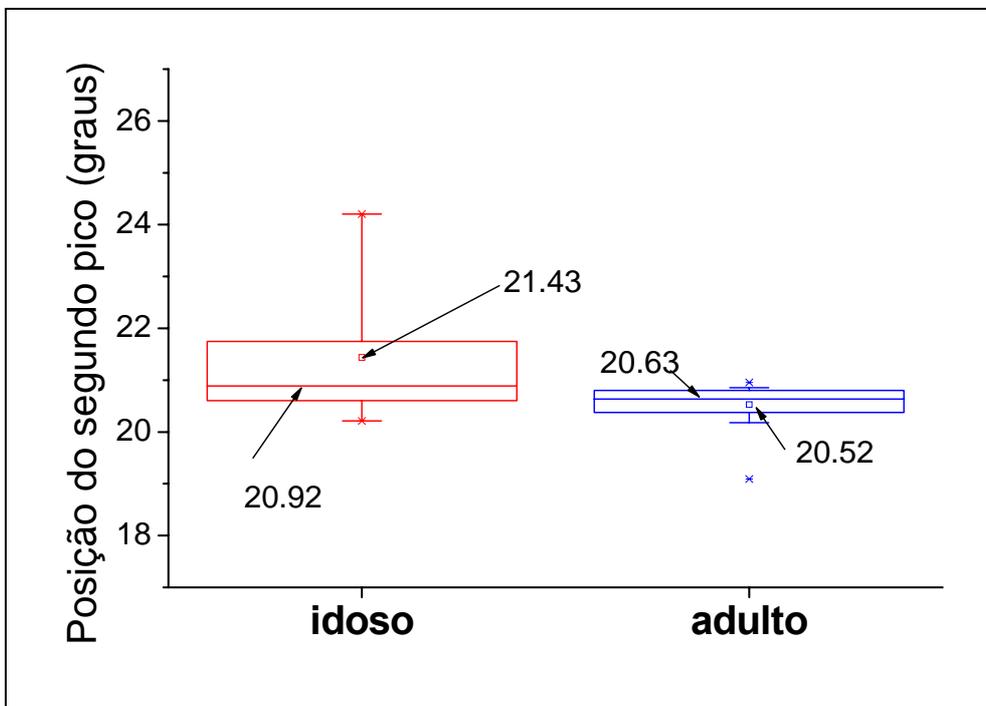


Figura 4. 16 - Representação da posição do segundo pico para as amostras de PL irradiadas com 15 Gy.

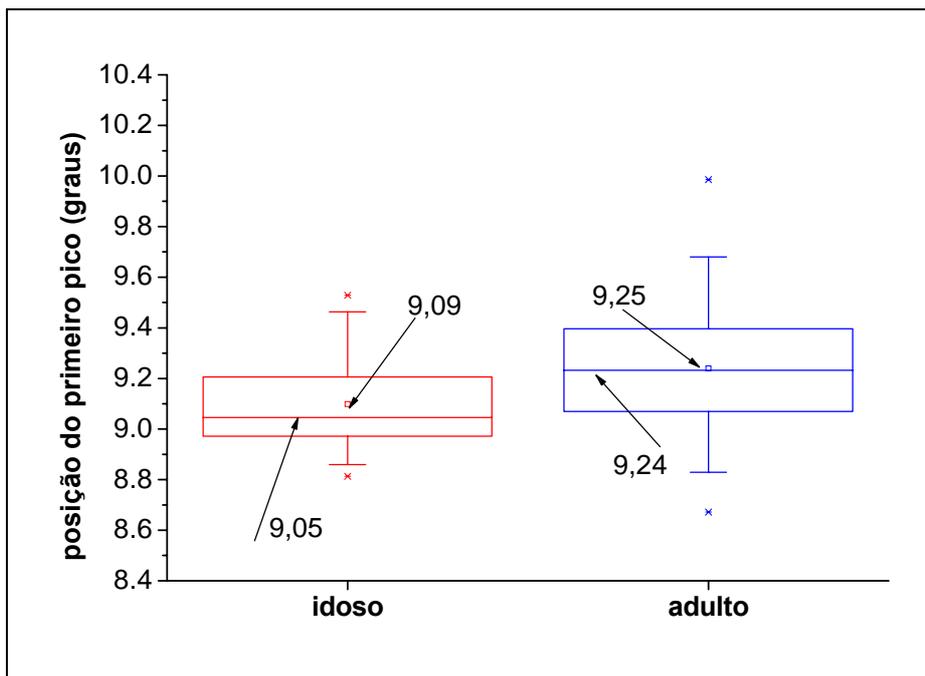


Figura 4.17 - Representação da posição do primeiro pico para as amostras de PL irradiadas com 20 Gy.

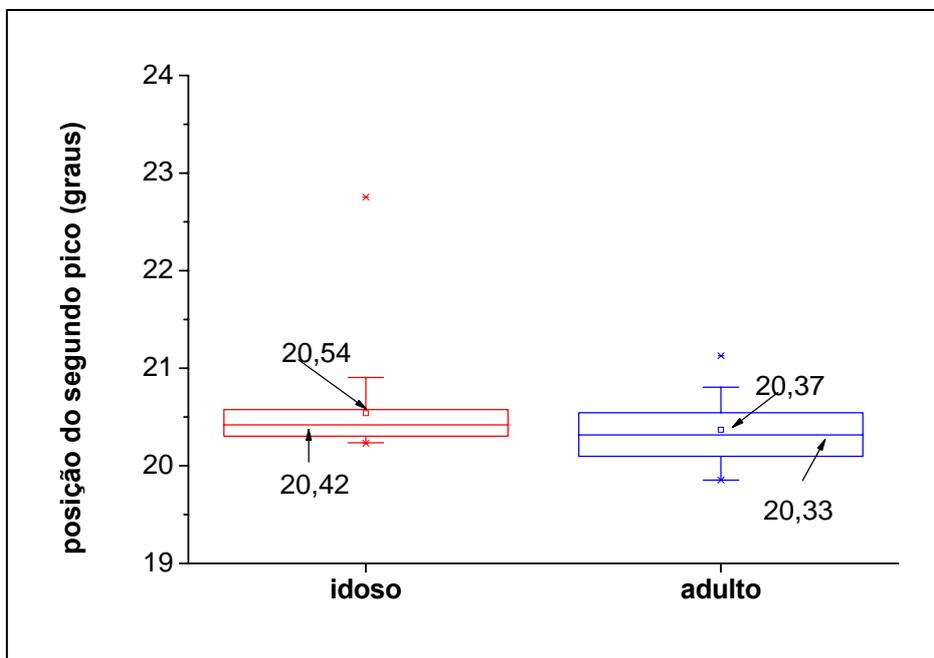


Figura 4.18 - Representação da posição do segundo pico para as amostras de PL irradiadas com 20 Gy.

Analisando as figuras 4.14 a 4.18 pode-se observar que os resultados obtidos para o grupo de adultos estão mais concentrados em torno da média e que os valores da média e da mediana também são menores que os encontrados para o grupo de idosos. Esse comportamento para as amostras de plasma foi também observado para as amostras de sangue total e matriz celular.

4.1.4 – AS AMOSTRAS IRRADIADAS COM 20Gy.

A fim de eliminar qualquer discussão sobre o comportamento atípico das amostras de 20Gy estar relacionado ao preparo ou irradiação dessas amostras, um novo grupo de amostras foi preparado. Noventa e duas novas amostras (29 de sangue total, 32 de matriz celular e 31 de plasma) foram preparadas seguindo o mesmo procedimento utilizado para as demais. Na tentativa de caracterizar os perfis de espalhamento, foi realizada a análise estatística das amostras utilizando ANOVA (análise de variância) seguida do teste de Bonferroni como é mostrado na tabela 4.23.

Tabela 4. 23 – Comparação entre os perfis de espalhamento das amostras de 20Gy.

Valores médios - 20Gy – Novos							
Parâmetros	ST		MC		PL		p-value
	N=29		N=32		N=31		
	média	desvio	média	desvio	média	desvio	
Pico 1	9,428	0,190	9,519	0,141	9,375	0,211	0,0001
FWHM ₁	3,416	0,240	3,494	0,258	3,127	0,202	0,0001
Pico 2	23,115	0,308	23,158	0,189	21,128	0,512	0,0001
FWHM ₂	7,044	0,128	7,173	0,656	6,798	0,763	0,0450
I ₁ /I ₂	1,211	0,139	1,343	0,140	0,879	0,148	0,0001

Analisando a tabela 4.23 observou-se que parâmetros de caracterização apresentaram $p < 0,05$, mostrando que a diferença existente entre os valores médios é significativa. Porém, aplicando-se o teste de Bonferroni pode-se observar que o comportamento das novas amostras irradiadas a 20Gy ainda continua diferente quando

comparadas com as demais doses. Desta forma, conclui-se que o comportamento atípico das amostras de sangue e hemocomponentes irradiadas com 20 Gy não é devido ao procedimento de preparo das amostras.

4.2. ANÁLISE QUANTITATIVA POR FLUORÊNCENCIA DE RAIOS X POR REFLEXÃO TOTAL (TXRF)

O estudo das amostras de sangue e hemocomponentes irradiados é resultado do projeto submetido ao Laboratório Nacional Luz Síncrotron (LNLS/Campinas) XRF-6634.

4.2.1 - CÁLCULO DA SENSIBILIDADE RELATIVA

Para calcular as sensibilidades relativas foram utilizadas 10 soluções padrão contendo elementos conhecidos e em diferentes concentrações (mg/L), acrescidas do elemento Gálio (Ga), utilizado como padrão interno. As tabelas 4.24 e 4.25 apresentam os valores das concentrações dos elementos e do padrão interno em cada amostra padrão, para determinação das sensibilidades para as séries K e L, respectivamente.

Tabela 4. 24 - Concentração dos elementos químicos (mg/L) contidos nas soluções padrão, para determinação da sensibilidade da série K.

Série K						
Z	Elemento	1K	2K	3K	4K	5K
13	Al	120,36	180,55	216,65	232,96	240,73
14	Si	121,82	182,73	219,27	235,78	243,64
19	K	6,10	9,15	10,99	14,77	18,31
20	Ca	6,12	9,18	11,02	14,81	18,36
22	Ti	6,03	9,05	10,85	14,59	18,09
24	Cr	6,03	9,05	10,85	14,59	18,09
26	Fe	6,05	9,07	10,89	14,63	18,15
28	Ni	6,06	9,09	10,91	14,66	18,18
30	Zn	6,03	9,05	10,85	14,59	18,09
34	Se	5,94	8,91	10,69	14,37	17,82
38	Sr	6,09	9,14	10,96	14,74	18,27
40	Mo	6,06	9,09	10,91	14,66	18,18
31	Ga	9,09	9,09	9,09	9,09	9,09

Tabela 4. 25 - Concentração dos elementos químicos (mg/L) contidos nas soluções padrão, para determinação da sensibilidade da série L.

Série L						
Z	Elemento	1L	2L	3L	4L	5L
42	Mo	17,15	32,47	46,22	58,65	69,93
56	Ba	5,77	10,93	15,56	19,75	23,54
62	Sm	5,72	10,82	15,41	19,55	23,31
71	Lu	5,72	10,82	15,41	19,55	23,31
78	Pt	5,55	10,50	14,95	18,96	22,61
81	Tl	5,72	10,82	15,41	19,55	23,31
82	Pb	5,77	10,93	15,56	19,75	23,54
31	Ga	9,09	9,09	9,09	9,09	9,09

A partir das soluções padrão foi determinada a sensibilidade para cada elemento e em seguida feita o ajuste dos valores experimentais com a finalidade de obter uma curva da sensibilidade, como mostram as figuras 4.19 e 4.20, em função do número atômico para os elementos na faixa de energia de interesse.

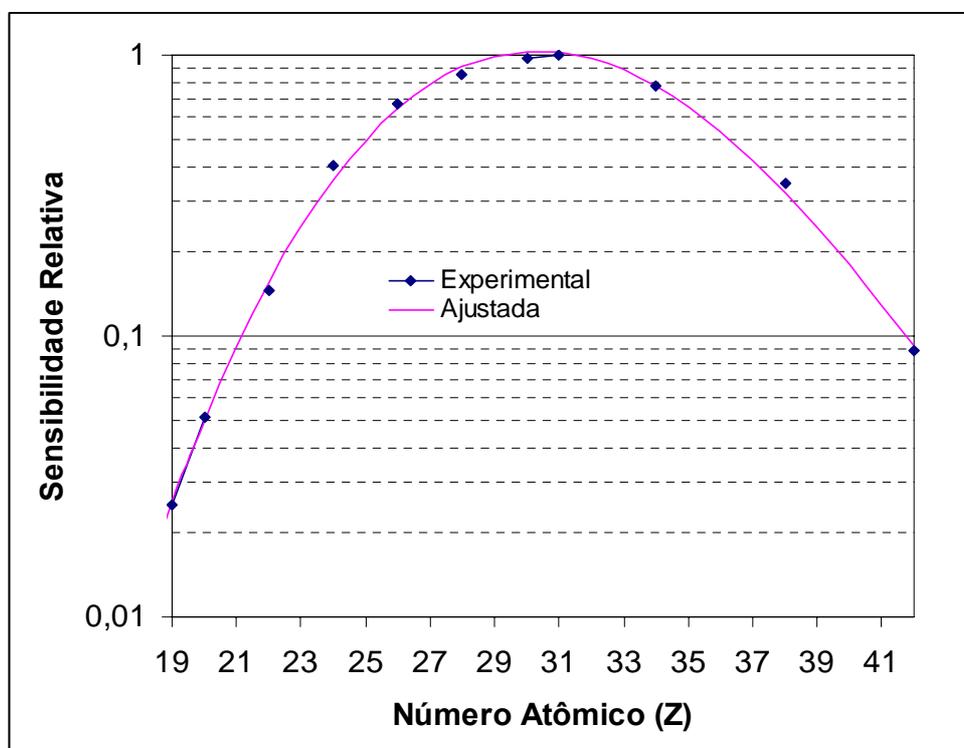


Figura 4. 19 - Curva da sensibilidade relativa (S_i) para a série K.

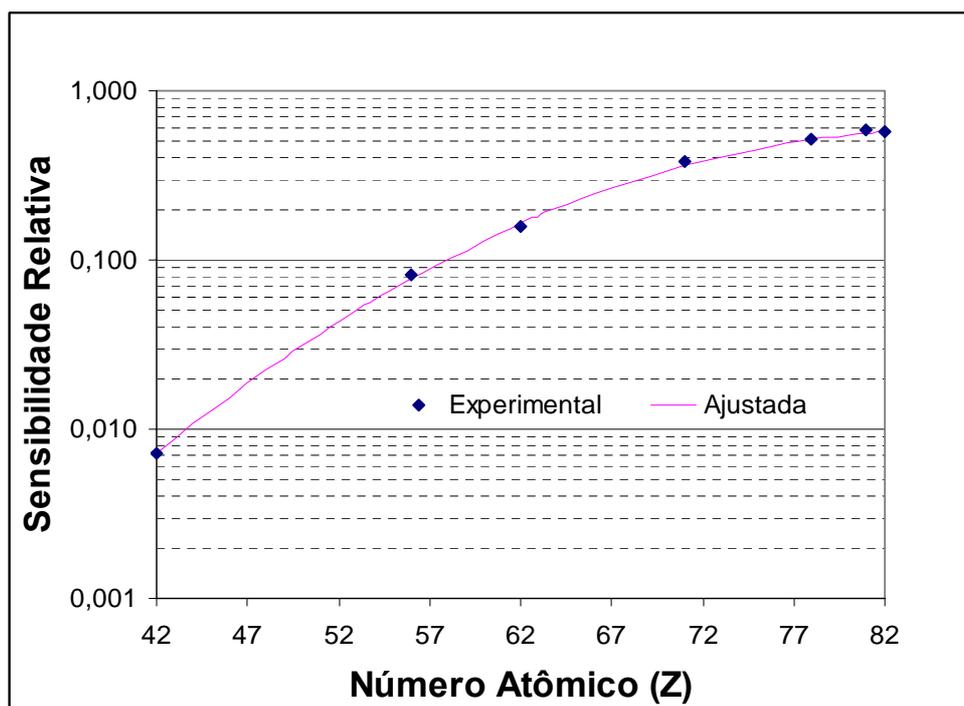


Figura 4. 20 - Curva da sensibilidade relativa (S_i) para a série L.

Com base nos gráficos de sensibilidade mostrados anteriormente as equações que relacionam a sensibilidade relativa com o número atômico do elemento para cada série e os seus coeficientes de determinação foram obtidos como é mostrado a seguir.

- $S_i = \exp (-34,93368 + 2,75054 Z - 0,06733Z^2 + 4,8316 \cdot 10^{-4} Z^3)$ *Série K* (4.1)

$R^2=0,997$.

- $S_i = \exp (-17,07327 + 0,37183Z - 0,00186Z^2 - 2,67158 \cdot 10^{-6}Z^3)$ *Série L* (4.2)

$R^2 = 0,999$.

Utilizando-se as equações 4.1 e 4.2, obtêm-se quaisquer valores de sensibilidade para a série K e L, em função do número atômico (Z).

4.2.2 – CÁLCULO DO LIMITE DE DETECÇÃO (LD).

O limite de detecção (LD) foi calculado como apresentado no capítulo 2, baseado no espectro da radiação de fundo, área abaixo do pico de cada elemento de

interesse, nas amostras medidas por 100 s. A tabela 4.26 mostra valores calculados para os limites de detecção para os elementos da série K nas amostras de sangue total, matriz celular e plasma.

Tabela 4.26 – Limites de detecção para os elementos da série K nas amostras de plasma.

LD (µg/g)				
Z	Elemento	ST	MC	PL
17	Cl	$1,32 \cdot 10^{-1}$	$1,33 \cdot 10^{-1}$	$3,96 \cdot 10^{-1}$
19	K	$4,87 \cdot 10^{-2}$	$4,68 \cdot 10^{-2}$	$1,43 \cdot 10^{-1}$
20	Ca	$3,14 \cdot 10^{-2}$	$2,85 \cdot 10^{-2}$	$9,25 \cdot 10^{-2}$
22	Ti	$1,44 \cdot 10^{-2}$	$1,15 \cdot 10^{-2}$	$4,05 \cdot 10^{-2}$
24	Cr	$8,23 \cdot 10^{-3}$	$6,01 \cdot 10^{-3}$	$2,13 \cdot 10^{-2}$
25	Mn	n.d	$4,72 \cdot 10^{-3}$	$1,72 \cdot 10^{-2}$
26	Fe	$5,41 \cdot 10^{-3}$	$3,88 \cdot 10^{-3}$	$1,32 \cdot 10^{-2}$
28	Ni	n.d.	$4,35 \cdot 10^{-3}$	$1,44 \cdot 10^{-2}$
29	Cu	$5,91 \cdot 10^{-3}$	$4,20 \cdot 10^{-3}$	$1,45 \cdot 10^{-2}$
30	Zn	$6,24 \cdot 10^{-3}$	$4,45 \cdot 10^{-3}$	$1,44 \cdot 10^{-2}$
35	Br	$1,59 \cdot 10^{-2}$	$1,38 \cdot 10^{-2}$	$3,56 \cdot 10^{-2}$
37	Rb	$2,72 \cdot 10^{-2}$	$1,48 \cdot 10^{-2}$	$3,20 \cdot 10^{-2}$

Para os elementos da série L não foi possível obter um ajuste, pois apenas o elemento chumbo (Pb) foi detectado nas amostras usadas. O valor obtido para este elemento é apresentado na tabela 4.27.

Tabela 4.27 Valor do limite mínimo de detecção (LMD) para o elemento Pb nas amostras estudadas.

LD (µg/g)			
Elemento	Sangue total	Matriz Celular	Plasma
Pb	$1,42 \cdot 10^{-2}$	$4,76 \cdot 10^{-2}$	$3,20 \cdot 10^{-2}$

Com os dados da tabela 4.26, foi realizado o ajuste dos pontos experimentais a fim de se obter a curva do limite de detecção em função do número atômico para os elementos da série K. As curvas obtidas são apresentadas nas figuras 4.21 a 4.23 para o

sangue total, matriz celular e plasma, respectivamente.

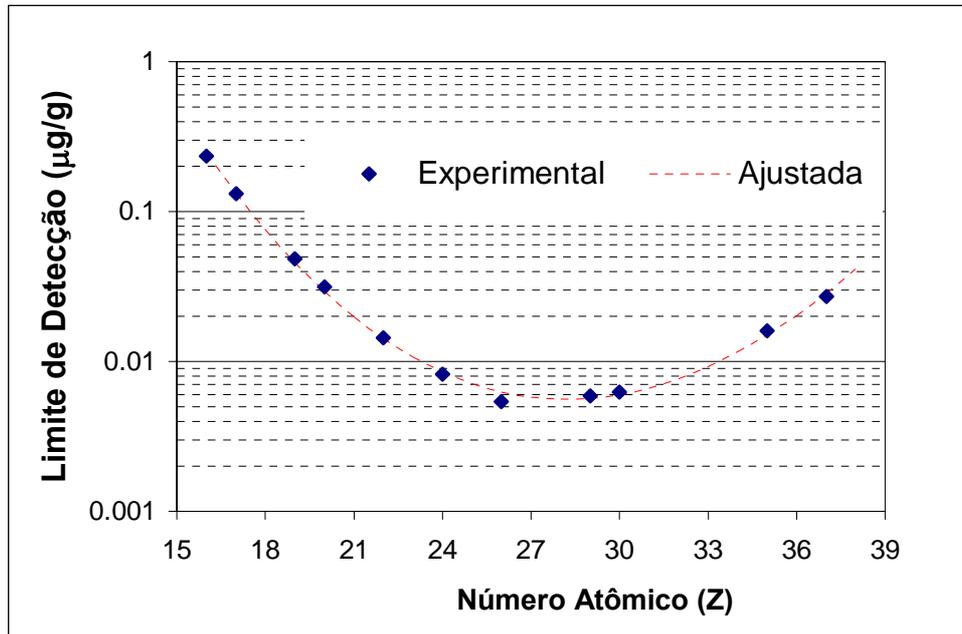


Figura 4. 21 - Limite de detecção dos elementos da série K nas amostras de sangue total.

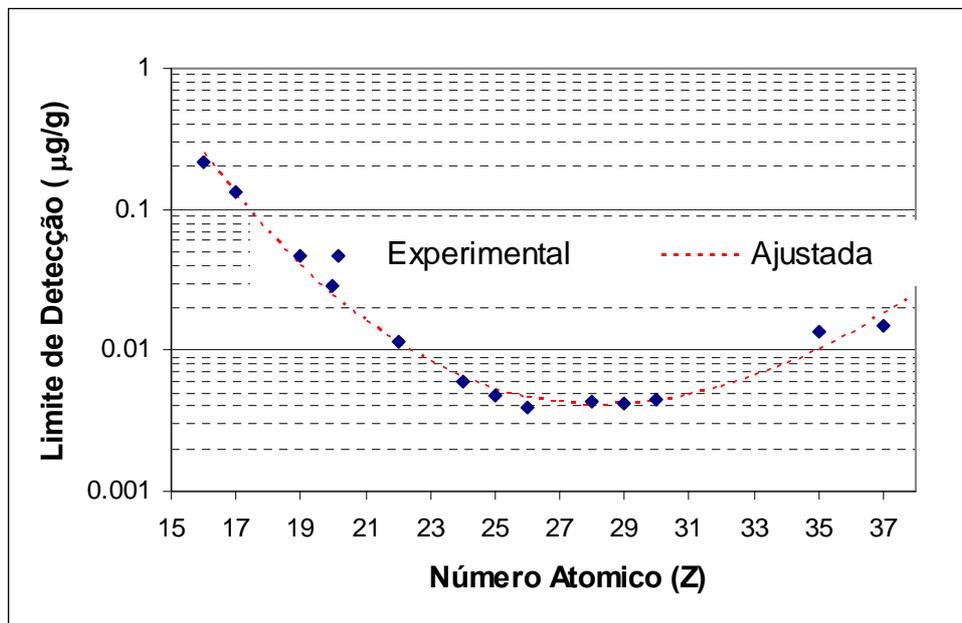


Figura 4. 22 - Limite de detecção dos elementos da série K nas amostras de matriz celular.

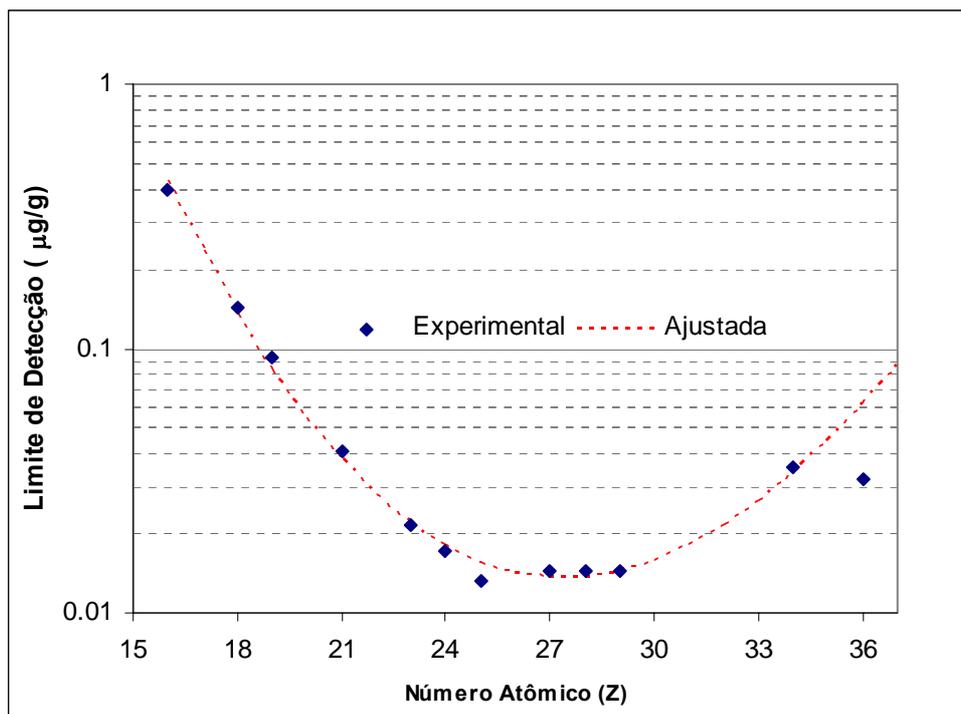


Figura 4. 23 - Limite de detecção dos elementos da série K nas amostras de plasma.

A seguir são apresentadas as equações que representam a relação entre o limite de detecção e o número atômico, utilizando as equações 4.3 a 4.5, obtêm-se quaisquer valores para o LD para as amostras estudadas em função de Z

- $L.D = \exp(17,62792 - 1,77943Z + 0,04015 Z^2 - 2,03596 \cdot 10^{-4} Z^3)$ Série K (4.3)

$R^2 = 0,997$ – Amostras de Sangue Total.

- $L.D = \exp(21,28764 - 2,19844Z + 0,05503Z^2 - 3,81104 \cdot 10^{-4} Z^3)$ Série K (4.4)

$R^2 = 0,987$ – Amostras de Matriz Celular

- $L.D = \exp(21,26799 - 2,04121 \cdot Z + 0,04867 \cdot Z^2 - 2,9932 \cdot 10^{-4} \cdot Z^3)$ Série K (4.5)

$R^2 = 0,994$ - Amostras de Plasma.

4.2.3 - VALIDAÇÃO DA METODOLOGIA

A calibração do sistema de SR-TXRF foi verificada através da determinação da concentração elementar em uma amostra certificada de água mineral (NIST/SEM 1640) e em uma amostra certificada de solo (NIST/SEM 2709), ambas preparadas por digestão, seguindo o mesmo procedimento usado para o preparo das amostras de sangue como são mostrados nas tabelas 4.28 e 4.29. É válido ressaltar que foram utilizados no presente estudo dois padrões certificados diferentes com o objetivo de avaliar a eficiência do processo de digestão assim como os valores medidos apresentaram desvios padrões relativos inferiores a 10% para a maioria dos elementos.

Tabela 4.28 – Comparação dos valores medidos e certificados da amostra de referência “Trace Elements in Natural Water” (NIST/SRM 1640) medidos por SR-TXRF.

Elemento	Valor medido ($\mu\text{g/mL}$)	Valor Certificado ($\mu\text{g/mL}$)	$E_R(\%)$
Ca*	$6,34 \pm 0,03^*$	$6,40 \pm 0,08^*$	0,9
K	$825,24 \pm 7,18$	$903,64 \pm 24,00$	8,7
V	$11,78 \pm 2,07$	$11,81 \pm 0,33$	0,2
Cr	$36,17 \pm 0,85$	$35,09 \pm 0,91$	3,1
Mn	$99,66 \pm 5,63$	$110,45 \pm 1,00$	9,8
Co	$15,67 \pm 0,74$	$18,44 \pm 0,28$	15
Ni	$18,89 \pm 1,5$	$24,91 \pm 0,73$	24
Cu	$68,93 \pm 1,68$	$77,45 \pm 1,09$	11
Zn	$49,85 \pm 0,96$	$48,36 \pm 0,91$	3,1
Rb	$21,11 \pm 0,88$	$19,96 \pm 0,20$	5,8
Sr	$102,72 \pm 5,51$	$112,91 \pm 0,64$	9,0

* mg.kg^{-1}

Tabela 4.29 – Comparação dos valores medidos e certificados da amostra de referência "San Joaquim Soil" (NIST/SRM 2709).

Elemento	Valor medido ($\mu\text{g/g}$)	Valor Certificado ($\mu\text{g/g}$)	$E_R(\%)$
Ca	17916 ± 1006	18900 ± 500	5,2
V	113 ± 8	112 ± 5	0,9
Cr	141 ± 6	130 ± 4	8,5
Mn	549 ± 6	538 ± 17	2,0
Fe	35836 ± 2000	35000 ± 1100	2,4
Cu	$36,4 \pm 3,0$	$34,6 \pm 0,7$	5,2
Zn	104 ± 5	106 ± 3	1,9

4.2.4 - ANÁLISE DOS RESULTADOS

Alguns elementos têm efeitos tóxicos sobre o corpo humano e, portanto, há uma necessidade de controlar os seus níveis em órgãos e tecidos humanos. Além disso, é importante aumentar o nosso conhecimento das relações entre os efeitos tóxicos observáveis e as concentrações elementares no homem e no seu ambiente (BÖRJESSON *et al.*, 2003). Neste trabalho, foram escolhidos 4 elementos químicos a serem analisados: Potássio (K), Cálcio (Ca), Ferro (Fe) e Zinco (Zn) afim de se dar continuidade aos estudos iniciados por MOTA (2008), para valores de dose até 100cGy.

As figuras 4.24 a 4.26 apresentam, respectivamente, os espectros característicos das amostras de sangue total, matriz celular e plasma obtidos nesse estudo.

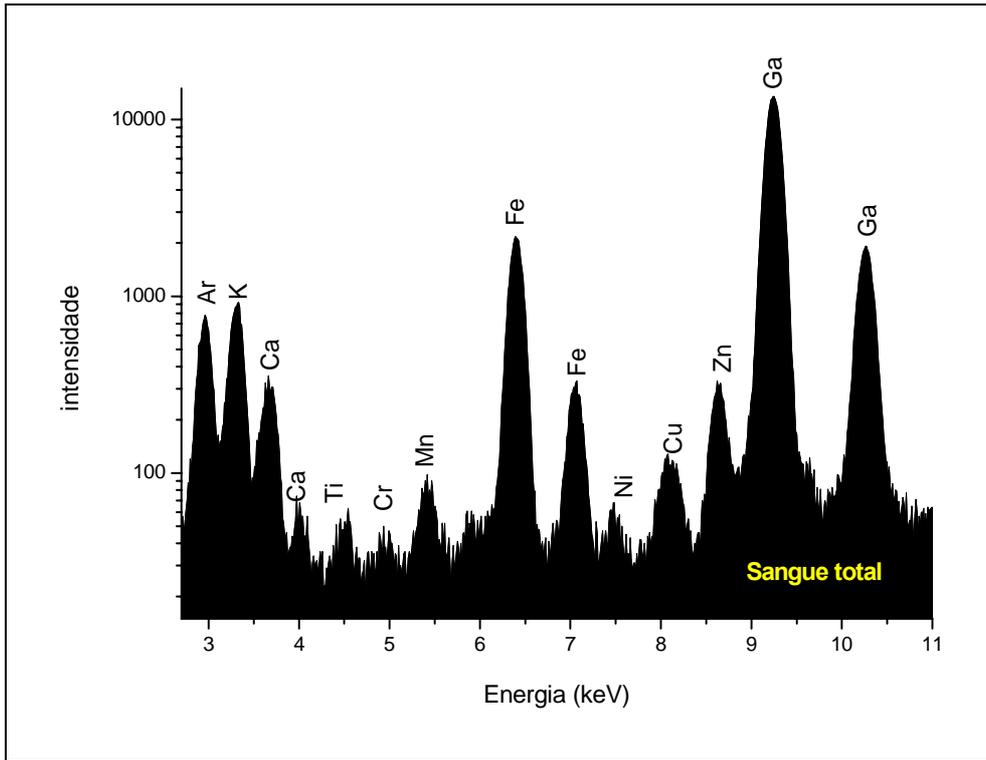


Figura 4. 24 – Espectro característico de uma amostra de sangue total.

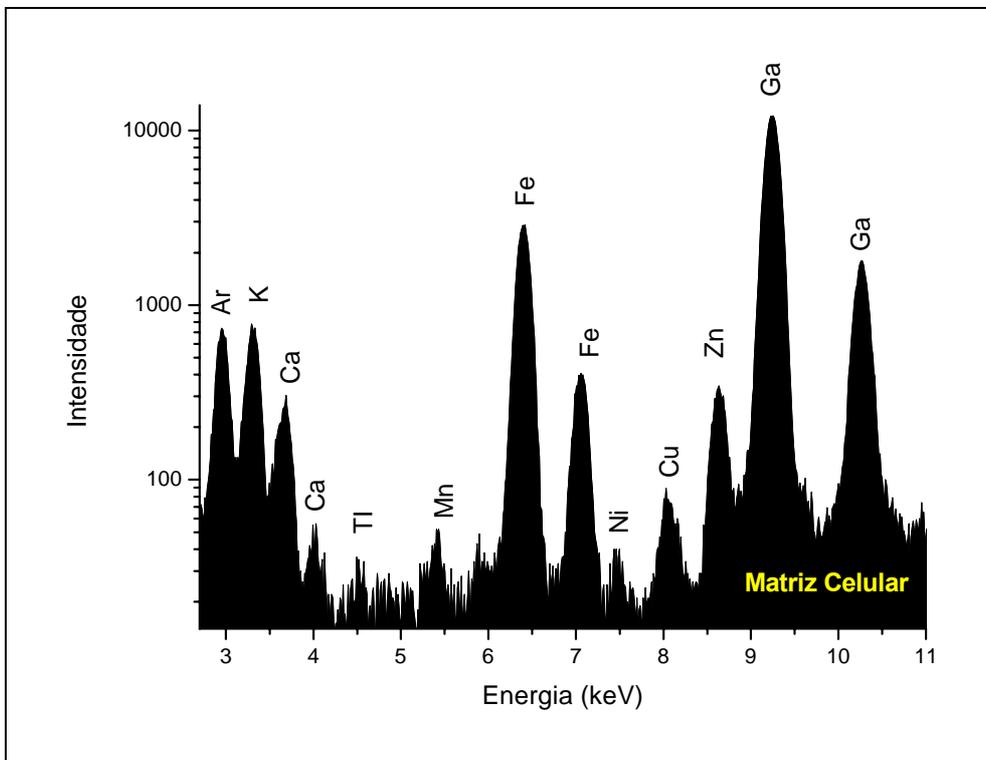


Figura 4. 25 – Espectro característico de uma amostra de matriz celular.

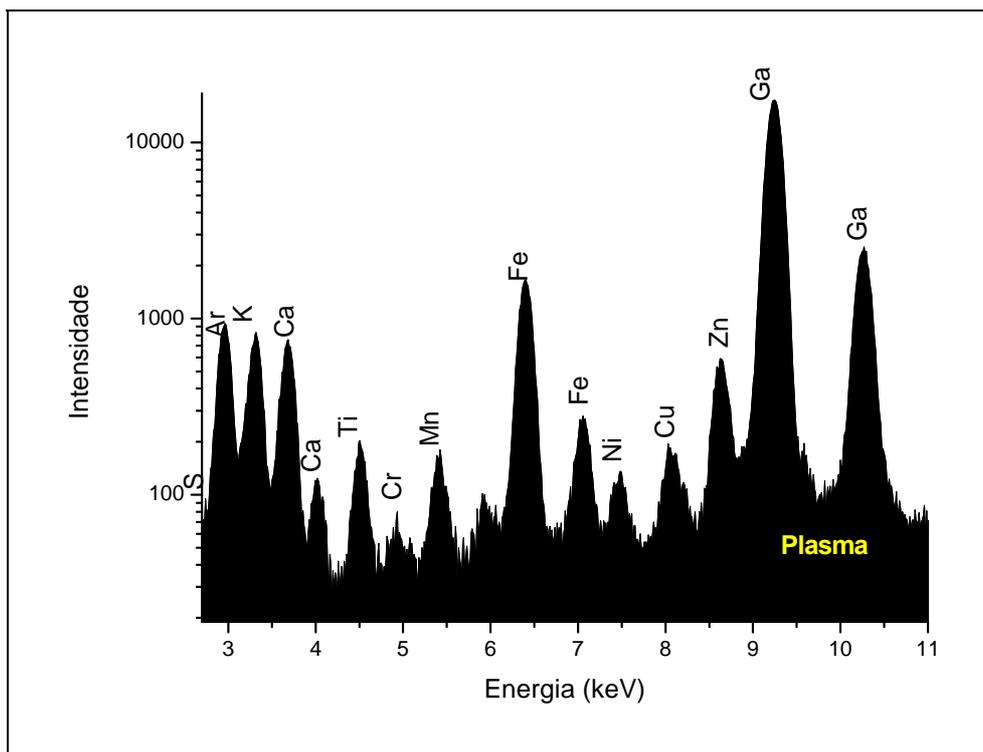


Figura 4. 26 – Espectro característico de uma amostra de plasma.

As tabelas 4.30 a 4.32 mostram os valores (média \pm desvio padrão) calculados das concentrações dos elementos K, Ca, Fe e Zn para as amostras de sangue total, matriz e plasma, respectivamente.

Tabela 4. 30 - Valores médios da concentração para amostras de sangue total.

Concentrações ($\mu\text{g/g}$)									
Dose (Gy)	n	ST							
		K		Ca		Fe		Zn	
		média	desvio	média	desvio	média	desvio	média	desvio
0	13	2835	390	478	249	1403	312	52	27
15	10	2139	846	308	187	610	271	28	13
20	13	2037	797	311	173	923	210	35	5
25	13	2092	430	385	124	653	175	30	18
30	13	2068	486	398	144	634	187	35	7

Tabela 4. 31 - Valores médios da concentração para amostras de matriz celular.

Concentrações (µg/g)									
Dose (Gy)	n	MC							
		K		Ca		Fe		Zn	
		média	desvio	média	desvio	média	desvio	média	desvio
0	11	1623	469	136	73	1177	419	32	15
15	15	1127	281	126	45	922	396	24	10
20	13	2065	934	185	49	1272	361	49	18
25	11	1281	143	124	36	1308	769	23	12
30	13	1334	170	109	59	960	587	25	13

Tabela 4. 32 - Valores médios da concentração para amostras de plasma.

Concentrações (µg/g)									
Dose (Gy)	n	PL							
		K		Ca		Fe		Zn	
		média	desvio	média	desvio	média	desvio	média	desvio
0	9	2991	701	408	150	458	48	47	16
15	15	3585	342	515	213	354	50	35	27
20	15	4549	1195	521	252	322	40	57	40
25	13	3413	297	406	170	229	54	39	10
30	11	3950	343	353	184	305	46	44	13

Os resultados obtidos para cada dose foram comparados com os obtidos para as amostras de controle utilizando teste t-Student. Foram considerados estatisticamente diferentes quando $p < 0,05$, com um grau de confiança de 95% ($\alpha = 0,05$). As tabelas 4.33 a 4.36 mostram os p-values obtidos a partir das medidas realizadas para cada elemento estudado.

Tabela 4.33 - *p-value* encontrados a partir da comparação entre as amostras de controle e as irradiadas para a concentração de Ca.

Ca			
<i>p-value</i>			
Dose (Gy)	ST	MC	PL
15	0,086	0,670	0,200
20	0,059	0,063	0,240
25	0,240	0,630	0,970
30	0,326	0,327	0,480

Tabela 4.34 - *p-value* encontrados a partir da comparação entre as amostras de controle e as irradiadas para a concentração de K.

K			
<i>p-value</i>			
Dose (Gy)	ST	MC	PL
15	0,0150	0,003	0,010
20	0,0030	0,169	0,002
25	0,0001	0,031	0,066
30	0,0001	0,047	0,001

Tabela 4.35 - *p-value* encontrados a partir da comparação entre as amostras de controle e as irradiadas para a concentração de Fe.

Fe			
<i>p-value</i>			
Dose (Gy)	ST	MC	PL
15	0,001	0,110	0,001
20	0,001	0,560	0,001
25	0,001	0,610	0,001
30	0,001	0,290	0,001

Tabela 4.36 - *p-value* encontrados a partir da comparação entre as amostras de controle e as irradiadas para a concentração de Zn.

Zn			
<i>p-value</i>			
Dose (Gy)	ST	MC	PL
15	0,017	0,120	0,241
20	0,024	0,021	0,484
25	0,022	0,140	0,163
30	0,038	0,230	0,649

Baseado nas tabelas apresentadas anteriormente foi possível observar que a análise estatística utilizada não mostrou diferença significativa para a concentração do Ca para nenhuma das amostras estudadas independente do valor de dose.

Na matriz celular, a concentração de Zn apresentou um aumento estatisticamente significativo apenas para as amostras irradiadas com 20Gy. Pode-se verificar que a concentração de potássio não apresentou diferença significativa somente para as amostras irradiadas com 20Gy.

A figura 4.24 mostra as concentrações relativas dos elementos que apresentaram diferenças significativas quando comparados com as amostras de controle. Pode-se observar que o Zn apresentou uma diminuição de sua concentração quando comparados com as amostras de controle apenas para o sangue total.

Para as concentrações de Fe foi possível observar diferenças quando comparados com amostras não irradiadas para o sangue total e para o plasma. No sangue total e no plasma os resultados mostraram uma diminuição em sua concentração para os valores de dose analisadas.

Para as concentrações de K pode-se verificar que este foi o único elemento que sofreu alterações significativas em sua concentração para todos os tipos de amostras

analisadas (ST, MC e PL). Os resultados obtidos mostram uma diminuição em sua concentração para a matriz celular e para o sangue total e um aumento no plasma.

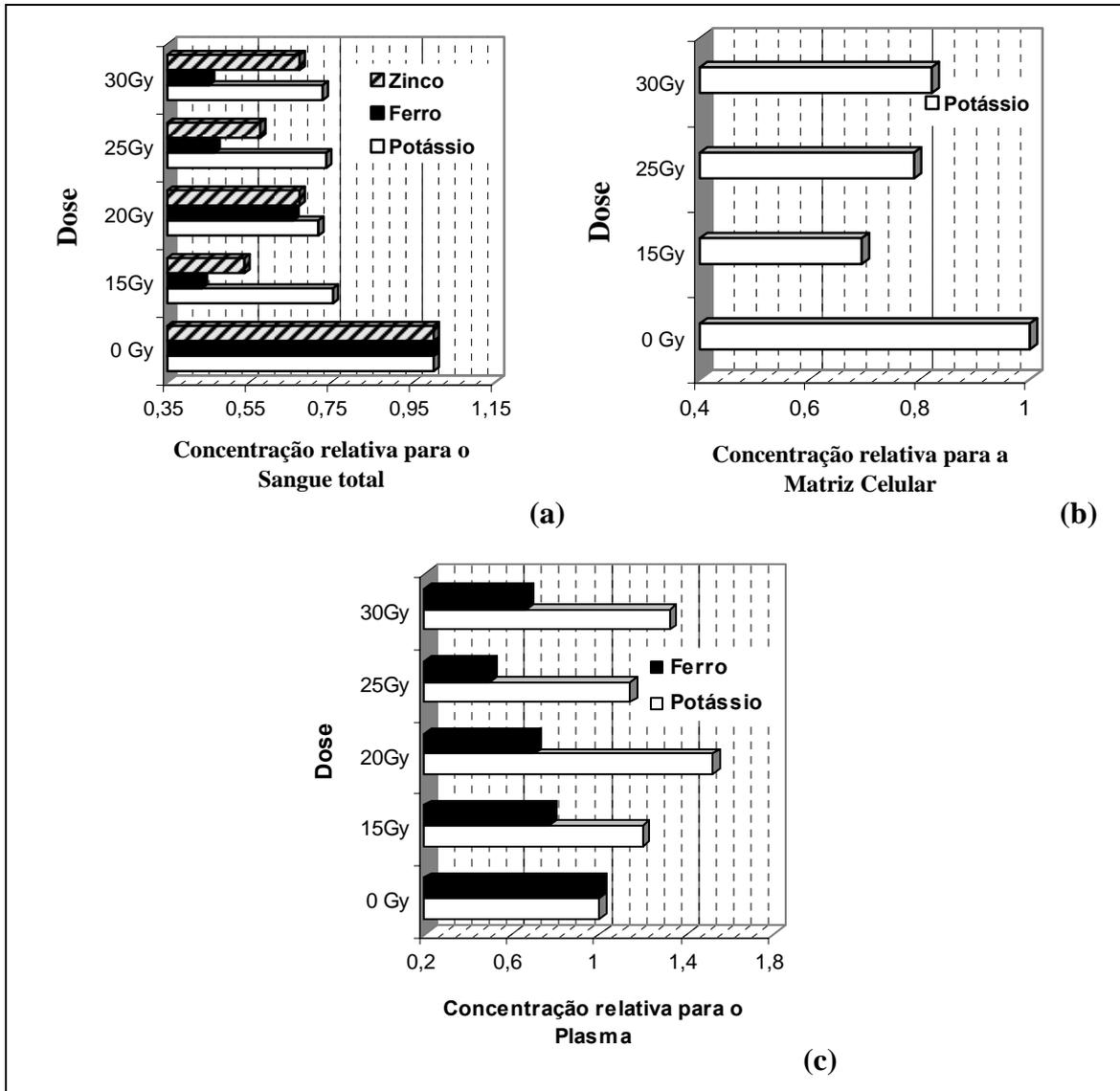


Figura 4. 27 – Concentrações relativas dos elementos avaliados nas amostras de (a) sangue total, (b) matriz celular e (c) plasma.

CAPÍTULO V – CONCLUSÕES E SUGESTÕES

5.1 – DIFRAÇÃO DE RAIOS X

5.1.1 – CARACTERIZAÇÃO DOS PERFIS DE ESPALHAMENTO

Os perfis de espalhamento das amostras liofilizadas de sangue total (ST), matriz celular (MC) e plasma (PL) são caracterizados pela presença de dois picos distintos largos. O perfil de espalhamento do PL, além deste perfil característico, apresenta ainda dois picos estreitos de grande intensidade característicos de estruturas cristalinas devidas, provavelmente, à presença de componentes de cristalização. A forma desses perfis é própria de materiais amorfos que não têm uma ordem de longa extensão. Isto é, os materiais amorfos, diferentes dos sólidos cristalinos, não são constituídos de arranjos atômicos ou moleculares cuja estrutura se repete numa forma periódica tridimensional. A forma dos perfis de espalhamento medidos é coerente com a literatura (DESOUKY, 2001; ELSHEMEY, 2001; FILGUEIRAS, 2006).

A distribuição angular do espalhamento coerente fornece informações detalhadas a respeito da amostra analisada e pode ser usada como uma “assinatura” do tipo de material do qual a amostra é composta (CASTRO, 2005). De modo a quantificar essa assinatura, o conceito de parâmetros de caracterização foi introduzido. Após a análise estatística, os resultados obtidos mostraram que existe uma forte semelhança entre as amostras de ST e MC, já que para essas amostras todos os parâmetros de caracterização são similares ($p > 0,05$). Para as amostras de PL, somente a posição do primeiro pico não apresentou diferença significativa quando comparada com as amostras de ST e MC.

É importante ressaltar que todas essas análises que serão apresentadas a seguir foram realizadas com o nível de significância estabelecido de 95% ($\alpha = 0,05$).

Pode-se verificar a presença predominante da proteína hemoglobina (HB) nas amostras de ST e MC. Comparando-se exclusivamente θ_1 e $FWHM_1$ para MC e HB na tabela 4.2, os valores encontrados para *p-value* foram 0,951 e 0,974, respectivamente, o

que demonstra a forte similaridade entre esses parâmetros. Esse comportamento é esperado já que sabe-se que as hemácias são as células mais numerosas no sangue e 90% da parte sólida (elementos figurados) é constituída de hemoglobina.

Para as amostras de PL, pode-se verificar a presença predominante da proteína albumina. As posições dos dois picos largos do perfil de espalhamento do PL não apresentaram diferença significativa com as posições dos picos do perfil característico da albumina. Esse resultado também era esperado já que sabe-se que o PL é basicamente constituído de água (92%) e proteínas e que a albumina é a proteína mais abundante no sangue.

Desta forma, pode-se concluir que o perfil de espalhamento das amostras de ST é uma composição dos perfis da MC e do PL sendo que, o perfil de espalhamento da MC é fortemente influenciado pela presença da hemoglobina e o perfil do PL, pela presença da albumina. Assim, a caracterização através dos perfis de espalhamento coerente de amostras de ST, MC e PL foi realizada.

5.1.2 – EFEITO DO PROCESSO DE IRRADIAÇÃO

O comportamento de todos os parâmetros de caracterização para as amostras de ST, MC e PL foi estatisticamente semelhante aos dos perfis de espalhamento das amostras de controle para as doses de 15 Gy, 25 Gy e 30 Gy. Isto é, com exceção da posição do primeiro pico que não apresentou diferença significativa entre os valores médios encontrados para as amostras de ST, MC e PL, os demais parâmetros analisados foram estatisticamente diferentes entre si.

Assim como para as amostras de controle, os valores médios dos parâmetros de caracterização das amostras de PL foram significativamente diferentes quando comparados com os parâmetros das amostras de ST e MC independente do valor de dose.

Esse resultado poderia indicar que não se verifica alteração estatisticamente significativa da estrutura molecular das amostras de ST, MC e PL em função da dose.

No entanto, os perfis de espalhamento para as amostras irradiadas com 20 Gy mostraram um comportamento diferente daqueles obtidos para as demais doses estudadas e para as amostras de controle. Ao invés de descartar-se esses dados, tomou-se a decisão de preparar novas amostras e proceder a mesma metodologia de preparação, irradiação e medidas utilizado para as demais amostras. O resultado obtido confirmou esse comportamento atípico das amostras irradiadas com 20 Gy.

Uma verificação interessante é que, com exceção de θ_1 , os demais parâmetros de caracterização dos perfis de espalhamento das amostras de PL apresentaram valores sempre significativamente diferentes dos obtidos para as amostras de ST e MC independente da dose, exceto para as amostras irradiadas com 20 Gy. Para as amostras irradiadas com 20 Gy também pode-se verificar que o valor médio de θ_1 para os perfis da MC e do PL sofre uma diminuição significativa.

5.1.3 – EFEITO DA IDADE DO DOADOR

A idade do doador é um fator importante a ser considerado no processo de doação sanguínea para transfusão. Desta forma, a caracterização das amostras de ST, MC e PL foi avaliada em função da idade do doador. Já que poderão ser doadores de sangue ou hemocomponentes pessoas com idades entre 18 e 65 anos de idade, as amostras foram divididas em dois grupos: adultos que potencialmente podem ser doadores e idosos com idade superior a 65 anos.

5.1.3.1 – AMOSTRAS DE CONTROLE

Para as amostras de ST, os perfis de espalhamento característicos dos grupos de adultos e idosos são significativamente similares, com exceção da posição do primeiro pico. Para o grupo de adultos, o valor médio de θ_1 é menor do que para o grupo de idosos.

De outra forma, para as amostras de MC, com exceção para $FWHM_1$ e I_1/I_2 , os valores médios dos demais parâmetros de caracterização obtidos para o grupo de adultos foram significativamente menores que os obtidos para o grupo de idosos.

Para as amostras de PL, somente os valores médios de θ_2 e I_1/I_2 não apresentaram diferença significativa. Novamente, para os demais parâmetros, os valores médios do grupo de adultos foram significativamente menores que para o grupo de idosos.

De modo geral, pode-se verificar que o fator idade influencia os valores médios dos parâmetros de caracterização dos perfis de espalhamento das amostras estudadas. No entanto, esse fator mostrou-se menos importante para as amostras de ST. Os valores médios dos parâmetros que apresentaram diferenças significativas, independentemente do tipo de amostra, foram menores para o grupo de adultos.

5.1.3.2 – AMOSTRAS IRRADIADAS

Para as doses de 25 Gy e 30 Gy os perfis de todas as amostras analisadas não apresentaram mais qualquer diferença estatisticamente significativa. Para as amostras de ST, já com 15 Gy não se podia observar diferenças significativas entre os perfis de espalhamento dos dois grupos.

Para as amostras de MC e PL irradiadas com 15 Gy pode-se observar que os valores medidos de θ_1 e θ_2 são pouco dispersos em relação às médias e medianas encontradas. Pode-se também observar que as posições dos picos dos perfis de espalhamento característicos para o grupo de adultos é sempre menor que as posições desses mesmos picos para o grupo de idosos.

As amostras irradiadas com 20 Gy apresentaram o comportamento atípico também quando se considerou o fator idade. Para as amostras de ST e PL, as posições dos dois picos apresentaram diferenças estatisticamente significantes. No entanto, para as amostras de PL a posição do primeiro pico foi maior para o grupo de adultos que para o grupo de idosos. Para as amostras de MC, os perfis para os dois grupos etários foram significativamente semelhantes.

Desta forma, pode-se concluir que considerando as duas faixas etárias analisadas, os perfis de espalhamento de todas as amostras de ST, MC e PL tendem a confundir suas características específicas em função do aumento de dose. Logo, de forma geral, não se pode mais diferenciar as características das amostras de ST, MC e PL quando as amostras sofrem irradiação independente da faixa etária a qual pertence o doador.

5.2 – SR-TXRF

5.2.1 – AMOSTRAS DE CONTROLE

Os resultados mostraram que os elementos K e Ca são predominantemente encontrados nas amostras de ST e PL. Em contrapartida, o Fe é predominantemente encontrado nas amostras de ST e MC, como era esperado já que o Fe é o principal componente da hemoglobina. A concentração de Zn é similar nas amostras de ST, MC e PL.

5.2.2 – AMOSTRAS IRRADIADAS

Dentro do nível de confiança estabelecido ($\alpha=0,05$), não se verificou variação significativa na concentração de Ca em função da dose, considerando o intervalo de doses estudado, para nenhum grupo de amostras.

Em contrapartida, o K foi o único elemento que sofreu alterações significativas em sua concentração para todas as amostras analisadas. Nas amostras de ST e MC verificou-se uma diminuição significativa em sua concentração quando comparadas com as amostras de controle. Ao contrário, nas amostras de PL a concentração de K apresentou um aumento significativo quando comparado com as amostras de controle. Mantendo o mesmo comportamento atípico das amostras irradiadas com 20Gy, as diferenças entre as concentrações de K encontradas para as amostras de MC não se mostraram estatisticamente significante quando comparadas com as amostras de controle.

A concentração de Fe apresentou diferenças significativas apenas para as amostras de ST e PL. Os resultados mostraram uma diminuição da concentração do Fe para todas as doses analisadas.

A concentração de Zn apresentou uma diminuição significativa em função do aumento de dose somente para as amostras de ST. Não houve diferenças significativas para as amostras de MC e PL. No entanto, as amostras de MC irradiadas com 20 Gy apresentaram um aumento significativo para a concentração de Zn quando comparada com as amostras de controle.

Esses resultados obtidos para amostras irradiadas com doses de 15 Gy a 30 Gy confirmam o comportamento verificado para as amostras irradiadas com doses de 2 cGy a 100 cGy (MOTA, 2008). Deste modo, a análise feita neste trabalho pode ser generalizada para o intervalo de 2 cGy a 3000 cGy.

5.3 – CONSIDERAÇÕES FINAIS E SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

Esse trabalho permitiu caracterizar amostras de ST, MC e PL usando-se as técnicas de espalhamento coerente e fluorescência por reflexão total de raios X dentro de um nível de significância bastante alto (95%). Os resultados apresentados englobam e complementam trabalhos anteriores (FILGUEIRAS, 2006; MOTA, 2008) servindo, então, como base para trabalhos futuros.

Além disso, esse trabalho abre novas perspectivas quanto ao estudo de avaliação do efeito de dose em amostras de sangue humano e hemocomponentes. Com as técnicas de espectrometria utilizadas foi possível avaliar o impacto do processo de irradiação a nível molecular e elementar em amostras de ST, MC e PL no intervalo de dose geralmente utilizado para irradiação de sangue humano e hemocomponentes para a prática transfusional.

A análise de dose-efeito foi realizada considerando a idade do doador e se limitou à avaliação das variações das concentrações de K, Ca, Fe e Zn em amostras de sangue total, matriz celular e plasma. Nesse sentido, sugere-se:

- Estudo de dose-efeito em outros hemocomponentes indicados para prática transfusional: concentrado de hemácias e plaquetas, eritrócitos, leucócitos;
- Análise mais abrangente seja realizada de modo que outros fatores associados ao doador sejam levados em conta: sexo, patologias e medicação associadas, condição nutricional;
- Avaliação da variação de outros elementos importantes presentes nas amostras, tais como: Cr, Mn, Cu, Br, Rb, Pb;
- Utilização de outras metodologias de preparação de amostras para SR-TXRF.
- Avaliação mais ampla de dose-efeito considerando a dose de 20 Gy.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALMEIDA, A.P.G., 2006. "Avaliação da Insfluência do Processo de Irradiação em Especiarias Utilizando a Técnica de Difração de Raios X". Dissertação de M.Sc. COPPE/UFRJ, Rio de Janeiro, RJ, Brasil.
- AMORIM, C. L. G., 2007." *Estudo do Efeito das Interações Água-Argila no Inchamento de Argilominerais através da Difração de Raios X* ". Tese de D.Sc, COPPE/UFRJ, Rio de Janeiro, RJ, Brasil.
- ARARIPE, T. C., 2006- "O Sangue e seus Derivados". 29º Congresso Brasileiro de Hematologia e Hemoterapia, HEMO2006, Pernambuco,- Brasil, Novembro. Trabalho apresentado no 29º – Recife
- AYALA, R. E., ALVAREZ, M., WOBRAUSCHEK P.,1991. "Direct Determination of Lead in Whole Human Blood by Total Reflection X-Ray Fluorescence". *Spectrometry Spectrochimica Acta Part B*, v. 46, n. 10, pp. 1429 - 1432.
- BELLISOLA, G., PASTI, F., VALDES, M., et al., 1999, "The use of Total Reflection X-Ray Fluorescence to Track the Metabolism and Excretion of Selenium in Humans", *Spectrochimica Acta Part B*, v. 54, pp. 1481 - 1485.
- BERNASCONI, G., TAJANI, A., 1996, "*Quantitative X-Ray Analysis System (QXAS) Software, Package: Documentation Version 1.2*". International Atomic Energy Agency, Vienna.
- BORDIN, J. O.; LANGHI JÚNIOR, D. M.; COVAS, D. T., 2007. "*Hemoterapia - Fundamentos e Prática*". 1ª ed, capítulos 8,10 e11, São Paulo, Brasil, Atheneu.
- BORGES, C.V.D., VEIGA, A.P. B, BARROSO, et al. S., 2007. "Associação Entre Concentrações Séricas de Minerais, Índices Antropométricos e Ocorrência de Diarréia entre Crianças de Baixa Renda da Região Metropolitana do Rio de Janeiro." *Rev. Nutr.*, v.20, n. 2, pp.159-169.

- BÖRJESSON, J., ISAKSSON, M., MATTSSON, S., 2003, “X-ray fluorescence analysis in medical sciences: a review”, *Acta Diabetol*, v. 40, pp. 39–44.
- BOSS, A. E., 2004. “*Modelagem e Otimização do Processo de Liofilização: Aplicação para Leite Desnatado e Café Solúvel.*” Tese de DSc. Unicamp, Campinas, SP, Brasil.
- BOUMANS, P.; KLOCKENKÄMPER, R., 1988. “Total reflection X-Ray fluorescence spectrometry.” *The Second Workshop on TXRF, Dormund, Spectrochimica Acta*, v.44B, pp. 433-435.
- BRASIL - AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. “*Manual Técnico para Investigação da Transmissão de Doenças pelo Sangue*”. Série Normas e Manuais Técnicos, Brasília, DF, 1998.
- BRASIL - AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Resolução - RDC nº 153, de 14 de junho de 2004, Brasília, DF, 2004.
- BRASIL, “*Portaria GM 1136 de 09 de setembro de 1999 - Regulamento Técnico de Medicina Transfusional*”. Brasília, DF, Brasil, 1999.
- CAMPION, E.W.; DELABRY, L.O.; GLYNN, R.J., 1988. “The effect of age on serum albumin in healthy males: report from the Normative Aging Study”. *J. Gerontol.*, v.43, n.1, pp.18-20.
- CANCHO, V.G., 2004. “*Noções de Estatística e Probabilidade*”, Universidade Federal de Ouro Preto, UFOP, Minas Gerais, Brasil.
- CANELLAS, C. G. L, CARVALHO, S. M. F, JESUS, E. F. O, ANJOS, M. J., LOPES R. T, 2006. “Trace and Major Elements in Serum of Patients with Chronic Myelogenous Leukemia.” *Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry*, v. 269, n.3, pp. 631–634.

- CARVALHO, M. G; LIGNANI, C; OLIVEIRA, J. M. C; et al, 1993. “Estudo dos efeitos do anticoagulante EDTA sobre as células sanguíneas em diversos intervalos de tempo. *Rev. Bras. Anal. Clin*; v.25, n.4, pp.101-105.
- CARVALHO, M.L, CUSTÓDIO, P.J, RÉUS, U., et al, 2001. “Elemental Analysis of Human Amniotic Fluid and Placenta by Total-Reflection X-Ray Fluorescence and Energy-Dispersive X-Ray Fluorescence: Child Weight and Maternal Age Dependence.” *Spectrochimica Acta Part B*, v. 56, pp.2175-2180.
- CASTRO, C.R.F. BARROSO, R.C., LOPES R.T, 2005. “Scattering Signatures for Some Human Tissues Using Synchrotron Radiation”, *X-Ray Spectrometry*, v.34, n.6, pp. 477-480.
- CASTRO, C.R.F., BARROSO, R.C., ANJOS M. J, et al., 2004. “Coherent Scattering Characteristics of Normal and Pathological Breast Human Tissues”, *Rad. Phys. Chem.*, v.71, pp.649-651.
- CHEVALLIER, P., DHEZ, P., ERKO, A., et al., 1996, “X-Ray microprobes”, *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research B*, v.113, pp.122-127.
- CLOCHESY, J.M.; DAVIDSON, L.J.; PIPER-CAULKINS, E.; et al, 1999. “Use of serum albumin level in studying clinical outcomes.” *Outcomes Manag. Nurs. Pract.*, v.3, n. 2, pp. 61-66.
- DESOUKY O.S, ASHOUR A.H, ABDULLAH M.I, et al, 2002. “Low-Angle X-Ray Scattering from Spices”. *Radiation Physics and Chemistry*, v. 64, n.4, pp.267-271.
- DESOUKY, O. S., ELSHEMEY, W. M., SELIM, N. S., et al, 2001. “Analysis of Low-Angle X-Ray Scattering Peaks from Lyophilized Biological Samples”. *Phys. Med Biol.* v.46, pp. 2099 –2106.
- ELSHMEY, W. M, ELSAYED, A. A., LAKKANI, A. E., 1999. “Characteristics of Low-Angle X-Ray Scattering from Some Biological Samples”, *Phys. Med. Biol.*v.44, pp.2907-2915.

- ELSHEMEY, W.M, DESOUKY, O.S, MOHAMMED, M.S, et al., 2003. “Characterization of Cirrhosis and Hepatocellular Carcinoma using Low-Angle X-Ray Scattering Signatures of Serum”. *Phys. Med. Biol.* v.48, n.17, pp.239-246.
- ELSHEMEY, W.M.; DESOUKY, O.S.; ASHOUR, A.H., 2001. “Low-angle Scattering from Lyophilized Blood Constituents.”, *Phys. Med. Biol.*, v. 46, pp.531-539.
- EVANS, S H, BRADLEY, D A, DANCE, D R, et al, 1991. “Measurement of Small-Angle Photon Scattering for Some Breast Tissues and Tissue Substitute Materials”, *Phys. Med. Biol*, v.36, n.1, pp.7-18.
- FICARIS, M. , 2004. “*Análise de Metais Pesados Em Águas Subterrâneas Empregando A Fluorescência de Raios X Por Reflexão Total Com Radiação Síncrotron (SR-TXRF)*”. Dissertação de M.Sc.Unicamp, Campinas,SP,Brasil.
- FILGUEIRAS, R. A., 2006. “*Análise dos Perfis de Espalhamento Coerente de Raios X de Amostras Liofilizadas de Sangue Humano Total e Derivados*”. Dissertação de M.Sc. COPPE/UFRJ, Rio de Janeiro, RJ, Brasil.
- GIRÓLAMO, M. K.S., 2005. “*Estatística, Parâmetros , Variáveis, Intervalos, Proporções – Resumão*”. Barros, Fisher e Associados, 1ª ed, Atheneu, São Paulo, Brasil.
- GOES, E.G., 1999. “*O uso da Telecobaltoterapia na Prevenção da Doença do Enxerto Versus Hospedeiro Associada à Transfusão*”. Tese de DSc, COPPE/UFRJ, Rio de Janeiro, RJ, Brasil.
- HATHAWAY, W. E., GITHENS, J.H., BLACKBURN, W.R, et al. 1965. “Aplastic Anemia, Histiocytosis and Erythrodermia in Immunologically Defficient Children” *N.Engi. J. Med.* v. 273, pp. 953-58.
- INTERNATIONAL ATOMIC ENERGY AGENCY (IAEA), 1997, “*Effects of Ionizing Radiation on Blood and Blood Components: a Survey*”- TECDOC n.934, IAEA, VIENNA.

- JACOBS, G. P, 1998 “A Review on the Effects of Ionizing Radiation on Blood and Blood Components”. *Radiation Physics and Chemistry*, v.53, n.5, pp. 511-523.
- JANATPOUR, K, DENNING, L., BETLACH, B, et al., 2005. “Comparasion of X Rays Vs Gamma Irradiation of CPDA-1 Red Cells”. *Vox Sanguinis*. v.89, pp.215-19.
- JENKIN, R.; GOULD, R. W.; GEDCKE, D., 2000. “Applied spectroscopy review”. *Wil. Int. Pub.* v.35, pp.129 – 150.
- JOHNS, P.C., WISMAYER, M.P., 2004. “Measurement Of Coherent X-Ray Scatter Form Factors for Amorphous Materials Using Diffractometers”, *Phys. Med. Biol.* v.49, pp.5233–5250.
- JUNQUEIRA, P.C, ROSENBLIT, J., HAMERSCHLAK, N et al. 2005 “História da Hemoterapia no Brasil”. *Ver. Brás. Hemoterapia*,v.27, n.3, pp 201-207.
- KHUDER, A., BAKIR M. A., KARJOU J et al. 2007, “ XRF and TXRF Techniques for Multi-Element Determination Of Trace Elements in Whole Blood and Human Hair Samples.” *Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry*, v. 273, n.2, pp. 435–442.
- KLOCKENKÄMPER, R.; VON BOHLEN, A., 1995 “Elemental Analysis of Environmental Samples by Total Reflection X-ray Fluorescence: a Review”. *X-ray Spectrometry*, v.25, pp.156-162.
- LADISICH, W.; RIEDER, R.; WOBRAUSCHEK, P. 1994 “Quantitative total reflection X-ray fluorescence analysis with monoenergetic excitation”. *X-Ray Spectrometry*, 23, p. 173- 177.
- LANDI, E.P., OLIVEIRA J.S.R, 1999.” Doença do Enxerto Contra Hospedeiro Pós-Transfusional - Guia para Irradiação Gama de Hemocomponentes”. *Rev Ass Med Brasil*, v.45, n.3, pp.261-272.

- LAPPONI, J.C., 1997. “*Estatística usando Excel 5 e 7*”. 1ª ed, Lapponi Treinamento e Editora Ltda, São Paulo Brasil.
- LEITÃO, C. C. G., 2005. “*Avaliação Multielementar em Soro Humano de Indivíduos Portadores de Leucemia Mielóide Crônica por SRTXF*”. Dissertação de M.Sc. COPPE/UFRJ, Rio de Janeiro, RJ, Brasil.
- LEVIN, J., 1987, “*Estatística Aplicada à Ciência Humana*”. 2ª ed, Editora Harper & Row do Brasil Ltda, São Paulo, Brasil.
- LUE, M. M. P, Caraballo, E. A. H., 2004. “Direct Analysis of Biological Samples by Total Reflectionx-Ray Fluorescence”. *Spectrochimica Acta Part B*, v. 59, pp.1077–1090.
- MAGALHÃES, T., VON BOHLEN, A., CARVALHO, M.L., et al., 2006, “Trace Elements in Human Cancerous and Healthy Tissues from the Same Individual : A Comparative Study by TXRF and EDXRF”, *Spectrochimica Acta Part B*, v. 61, pp. 1185-1193.
- MARTINEZ, T., LARTIGUE, J., PEREZ, P. A., G. ZARAZUA, et al, 2004, "Determination of Trace Elements in Blood Samples by TXRF Analysis", *Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry*, v. 599, n. 3, pp. 511 - 514.
- MATSUOKA Y. HOSOKAWA, Y, MASAYUKI, H., et al, 2005, “Study of the Sampling Method of Blood Samples for Total-Reflection X-ray Fluorescence” *Bunseki Kagaku*, v. 54, n.9, pp. 749-753.
- MELO JÚNIOR, A. S., 2007. “*Análise Quantitativa do Material Particulado na Região de Campinas Através das Técnicas de Microfluorescência de Raios X e Reflexão Total usando Radiação Síncrotron*”. Tese de D.Sc, Unicamp, Campinas, SP.
- MIKUSINKA-PLANNER, A., SURMA, M., 2000.”X-Ray Diffraction Study of Human Serum”, *Sepctrochimica Acta Part A*, v. 56, pp.1835-1841.

- MISTRA, N.L., SINGH MUDHER, K.D., 2002, “Total reflection X-rayfluorescence: a technique for trace element analysis in materials”. *Progress in Crystal Growth and Characterizations of Materials*, pp.65-74.
- MOREIRA, S. FICARIS, M., NASCIMENTO FILHO, V. F. D et al. 2006 “Heavy Metals in Groundwater using Synchrotron Radiation Total Reflection X-Ray Analysis”. *Instrumentation Science and Technology*, v.34, pp. 567–585.
- MOTA, C. L.S., 2008. “*Estudo de Amostras de Sangue Humano e Hemocomponentes Irradiados Com Baixa Dose Utilizando a Técnica de Fluorescência de Raios X por Reflexão Total*”. Dissertação de M.Sc. COPPE/UFRJ, Rio de Janeiro, RJ, Brasil.
- MOURA, A. S, MOREIRA, C.T, MACHADO, C.A, et al, 2006. “Doador de Sangue Habitual e Fidelizado: Fatores Motivacionais de Adesão ao Programa.” *RBPS*; v.19, n 2, pp. 61-68.
- MOURA, A. S., MOREIRA, C.T., MACHADO, C.A., 2006. “*Doador De Sangue Habitual e Fidelizado:Fatores Motivacionais de Adesão ao Programa*” *Revista Brasileira em Promoção da Saúde*; v.19, n.2, pp: 61-68.
- NASCIMENTO FILHO, V. F., 1999. “*Técnicas Analíticas Nucleares de Fluorescência de Raios X por Dispersão de Energia (ED-XRF) e por Reflexão Total (TXRF)*”. Disponível online: www.cena.usp.br/apostilas/Virgilio/CEN-5723/EDXRF_TXRF.doc, pesquisa realizada em 18/09/2007.
- NILSSON-EHLE, H, JAGENBURG, R., LANDAHL, S. et al, 2000. “Blood Haemoglobin Declines in The Elderly: Implications for Reference Intervals from Age 70 to 88.”. *Eur. J. Haematol.*, v.65, n.5, pp. 297-305.
- OLIVEIRA, M.R.A.A, 1991, “*Princípios da Fisiologia. Aspectos clínicos: estudo laboratorial*”, 1º ed., Campus, São Paulo, Brasil.
- PADILHA, A.F, AMBRÓZIO FILHO, F., 2004. “*Técnicas de Análise Micro Estrutural*”. 1ªed, Editora Hemus, São Paulo, Brasil.

- PEPLOW, D.E., VERGHESE, K., 1998. "Measured Molecular Coherent Scattering From Factors Of Animal Tissues, Plastics And Human Breast Tissue". *Phys. Med. Biol.* v.43, pp.2431-2452.
- PRANGE, A., e H. SCHWENKE, 1989."Sample Treatment for TXRF: Requirements And Prospects". *Adv. X-Ray Anal.*, v.32: pp.211.
- PRANGE, A.; BÖDDEKER, H.; KRAMER, K., 1993 'Determination Of Trace Elements in Riverwater using Total-Reflection X-Ray Fluorescence". *Spectrochimica Acta*, v.48B, n.2, pp. 207- 215.
- RAZOUK F.H., REICH, E.M.V, 2004. "Caracterização, Produção e Indicação Clínica dos Principais Hemocomponentes" *Rev. Bras. Hematol. Hemoter.*, v.26, n.2, pp.126-134.
- ROSEN N.R, WEIDNER J.G, BOLDT H.D, 1993."Prevention of Transfusion Associated Graft-Versus-Host Disease: Selection of an Adequate Dose of Gamma Radiaton." *Transfusion*, v.33, pp.125-127.
- ROY, S.C., 1999, "Elastic Scattering of Photons: Perspectives and Present Status, X-Ray". *Spectrom.*, v.28, pp.376–378.
- SALGADO, J. M. O, 2000. "*Previna Doenças. Faça do Alimento o seu Medicamento*" e "*Pharmácia de Alimentos. Recomendações para Prevenir e Controlar Doenças*", 1º Ed. Madras, Brasil.
- SALIVE, M.E.; CORNONI-HUNTLEY, J.; PHILLIPS, C.L.; et al., 1992. "Serum Albumin in Older Persons: Relationship with Age and Health Status". *J. Clin. Epidemiol.*, v.45, n.3, pp.213-21.
- SCHMITT, M.; HOFFMANN, P.; LIESER, K.H., 1987 "Perpex as Sample Carrier in TXRF". *Fresenius Zeitschrift Fur Analytische Chemie*, v.328, pp. 594-595.

- SERPA, R. F. B., 2007. “*Análise Multielementar de Tecidos Cerebrais Através da Microfluorescência de Raios X e Fluorescência de Raios X por Reflexão Total.*” Tese de D.Sc, COPPE/UFRJ, Rio de Janeiro, RJ, Brasil.
- SERPA, R. F. B. DE JESUS, E. F. O.; ANJOS, M. J., et al, 2006. “Elemental Concentration in the Cortex and Hippocampus of Wistar Rats by X-Ray Total Reflection Fluorescence with Synchrotron Radiation”. *Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry*, v. 269, n.3, pp.647–652.
- SILVA, M. M.; BOUZAS, L.F.S. e FILGUEIRA, A.L., 2005. “Manifestações tegumentares da doença enxerto contra hospedeiro em pacientes transplantados de medula óssea” - *An. Bras. Dermatol.*, v.80, n.1, pp.68-80.
- SKOOG, D. A.; HOLLER, F. J.; NIEMAN, T. A., 2002 “*Princípios de Análise Instrumental*”. 5ª ed, Bookman, São Paulo, Brasil.
- TAHUATA, L.; SALATI, P.; PRINZO, R., et al., 2001. “*Radioproteção e Dosimetria Fundamentos*”. Instituto de Radioproteção e Dosimetria, CNEN, RJ, Brasil.
- TARTARI, A, T. TAIBI, A.; BONIFAZZI, C., et al, 2002. “Updating of Form Factor Tabulations for Coherent Scattering of Photons in Tissues”, *Phys. Med. Biol.* v.47, pp.163-175.
- TASCH, P., DAMIANI, F., OLIVEIRA, L.C.M., 2000. “*Técnicas de Análise e Caracterização de materiais – XRF. X-Rays Fluorescence Spectroscopy*”. Disponível on line: www.dsif.fee.unicamp.br/~furio/IE607A/XRF.pdf, acessado em 01/02/2008.
- TORTORA G. J., GRABOWSKI S. R., 2006. “*Corpo Humano: Fundamentos de Anatomia e Fisiologia*”, 6ª ed., Artmed, Porto Alegre, Brasil.
- UNFER, T. C., 2006. “*Influência da terapia de reposição hormonal sobre a atividade de enzimas antioxidantes, níveis de estrôncio e ferro, e metabolismo ósseo em mulheres.*” Dissertação de MSc., UFSM, Rio Grande do Sul, Brasil.

- VIEIRA, S., 2006. “*Análise de Variância – ANOVA*”. 1ªed. Ed. Atlas, São Paulo, Brasil.
- VISENTAINER, J.E.L.A, 2003. “*Testes Prognósticos de Rejeição e Doença do Enxerto Contra o Hospedeiro em Transplantes de Células Progenitoras Hematopoiéticas com Doadores HLA Idênticos*” ,Tese de DSc., Unicamp, Campinas,. Brasil.
- WILLARD, H.H, MERRIT, L.L., DEAN, J.A., 1974, “Instrumental Methods of Analysis”. 2 ed., Lisboa, Portugal, Fundação Calouste Gulbenkian.
- YUYING, H. YINGRONG, W., LIMIN, Z., et al, 2001. “Beijing synchrotron radiation total-reflection X-Ray fluorescence analysis facility and its applications on trace element study of cells”. *Spectrochimica Acta Part B*, v.56Ž, pp.2057-2062.
- ZAGO, M.A., FALCÃO R. P, PASQUINI, R, 2005. “*Hematologia Fundamentos e Prática.*” 1ª ed., Atheneu, São Paulo, Brasil.