



**COPPE/UFRJ**

ESTUDO DE DOENÇAS HEMATOLÓGICAS USANDO A TÉCNICA DE  
FLUORESCÊNCIA DE RAIOS X COM RADIAÇÃO SÍNCROTRON

Catarine Canellas Gondim Leitão

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

Orientadores: Ricardo Tadeu Lopes  
Marcelino José dos Anjos

Rio de Janeiro  
Novembro de 2009

ESTUDO DE DOENÇAS HEMATOLÓGICAS USANDO A TÉCNICA DE  
FLUORESCÊNCIA DE RAIOS X COM RADIAÇÃO SÍNCROTRON

Catarine Canellas Gondim Leitão

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

Examinada por:

---

Prof. Ricardo Tadeu Lopes, D.Sc.

---

Prof. Marcelino José dos Anjos, D.Sc.

---

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

---

Prof. Ademir Xavier da Silva, D.Sc.

---

Prof. Alfredo Victor Bellido Bernedo, D.Sc.

---

Prof<sup>a</sup>. Silvia Maia Farias de Carvalho, D.Sc.

RIO DE JANEIRO, RJ - BRASIL

NOVEMBRO DE 2009

Leitão, Catarine Canellas Gondim

Estudo de Doenças Hematológicas Usando a Técnica de Fluorescência de Raios X com Radiação Síncrotron/ Catarine Canellas Gondim Leitão. – Rio de Janeiro: UFRJ/COPPE, 2009.

XXIII,164 p.: il.; 29,7 cm.

Orientadores: Ricardo Tadeu Lopes

Marcelino José dos Anjos.

Tese (doutorado) – UFRJ/ COPPE/ Programa de Engenharia Nuclear, 2009.

Referências Bibliográficas: p. 108-118.

1. Fluorescência de Raios X. 2. Radiação Síncrotron. 3. Soro Humano. 4. Leucemias. 5. Anemia Falciforme. 6. Púrpura Trombocitopênica Idiopática. I. Lopes, Ricardo Tadeu et al. II. Universidade Federal do Rio de Janeiro, COPPE, Programa de Engenharia Nuclear. III. Título.

A minha saudosa avó Arilda,  
exemplo de caráter e de luta, que sempre  
me ofereceu amor eterno e incondicional.

Aos meus queridos pais,  
que abriram as portas do meu futuro,  
iluminando meu caminho com a luz mais  
brilhante que puderam encontrar: o estudo,  
sacrificando seus sonhos em favor dos meus.

Ao meu amado Rogério,  
por compartilhar meus ideais,  
incentivando-me a prosseguir com um  
sorriso amigo, uma palavra de carinho e amor dedicado.

## AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Ricardo Tadeu Lopes por acreditar no desenvolvimento deste trabalho de pesquisas no Laboratório de Instrumentação Nuclear (PEN/COPPE/UFRJ).

Ao Prof. Marcelino José dos Anjos (IF/UERJ) pela ajuda, orientação e incentivo sempre que precisei.

Ao Prof. Edgar Francisco Oliveira de Jesus (PEN/COPPE/UFRJ) pela colaboração desenvolvida no LNLS.

Ao Prof. Alfredo Victor Bellido Bernedo (IQ/UFF) pelo auxílio na análise estatística dos resultados deste trabalho.

À Dra. Silvia Maia Farias de Carvalho (HEMORIO) pela atenção e disponibilidade sempre que solicitei sua ajuda.

À Laura Jane e à Thais (HEMORIO) por acreditarem nesse trabalho desde o início.

Ao Dr. Luiz Amorim (HEMORIO) pela agilidade e eficiência na aquisição das amostras de soro dos doadores sadios voluntários de sangue.

Ao farmacêutico Luis Cláudio (HEMORIO) que sempre esteve ao meu lado dando importante colaboração na etapa de coleta das amostras.

Ao Dr. Carlos Pérez (LNLS) pela ajuda técnica na linha XRF do LNLS.

Aos químicos Simone e Fábio (LQAU/LNLS) que viabilizaram a preparação de amostras no Laboratório Químico de Apoio ao Usuário do LNLS.

Aos amigos Roberta Leitão, Cristiane Calza e Davi Oliveira (PEN/COPPE/UFRJ) pela amizade e pelo auxílio nas medidas experimentais no LNLS.

Às amigas Elizabete e Solange (HEMORIO) que me ajudaram a tornar mais rápido o processo de coleta de amostras.

Ao Prof. Assis e sua família pelo auxílio e incentivo para que eu ingressasse no curso de Física. Sem a presença deles em minha vida eu não estaria neste caminho.

A todos do LIN e do Programa de Engenharia Nuclear que de alguma forma participaram desta minha trajetória.

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

## ESTUDO DE DOENÇAS HEMATOLÓGICAS USANDO A TÉCNICA DE FLUORESCÊNCIA DE RAIOS X COM RADIAÇÃO SÍNCROTRON

Catarine Canellas Gondim Leitão

Novembro/2009

Orientadores: Ricardo Tadeu Lopes

Marcelino José dos Anjos

Programa: Engenharia Nuclear

Neste trabalho foram determinadas as concentrações elementares presentes em amostras de soro de portadores de Leucemia Mielóide Crônica, Leucemia Mielóide Aguda, Leucemia Linfóide Crônica, Leucemia Linfóide Aguda, Anemia Falciforme e Púrpura Trombocitopênica Idiopática através da Técnica de Fluorescência de Raios X por Reflexão Total usando Radiação Síncrotron (SRTXRF). Foram estudados 60 pacientes de cada grupo de doença hematológica - de ambos os sexos - com idades entre 18 e 70 anos além de 60 doadores voluntários sadios (Grupo de Controle) com idades entre 18 e 60 anos. O sangue foi coletado em tubos a vácuo sem aditivos. Após coleta, o sangue total foi centrifugado a 3000 rev/min durante 10 minutos para separar “as células” do soro. As amostras de soro foram transferidas para tubos de polietileno e estocadas até manuseio sob temperatura de  $-10^{\circ}\text{C}$ . Os elementos de baixos números atômicos ( $8 \leq Z \leq 20$ ) foram determinados utilizando uma câmara de vácuo para evitar a absorção do ar e o padrão interno utilizado foi o Vanádio. A determinação de elementos com números atômicos maiores ( $26 \leq Z \leq 37$ ) foi realizada sob pressão de 1,0 atm e o padrão interno utilizado foi o Gálio. Através do *teste t* foi possível analisar as diferenças significativas ( $\alpha = 0,05$ ) entre o grupo sadio e cada grupo de doença hematológica. Foi possível determinar a concentração de onze elementos: Na, P, S, Cl, K, Ca, Fe, Cu, Zn, Br e Rb. Usando o SPSS foi possível verificar as diferenças e/ou similaridades entre os grupos através da análise multivariada.

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

STUDY OF HEMATOLOGIC DISEASES USING THE TECHNIQUE OF X-RAY  
FLUORESCENCE WITH SYNCHROTRON RADIATION

Catarine Canellas Gondim Leitão

November/2009

Advisors: Ricardo Tadeu Lopes

Marcelino José dos Anjos

Department: Nuclear Engineering

In this work, elemental concentrations were determined in serum of patients with Chronic Myelogenous Leukemia, Acute Myelogenous Leukemia, Chronic lymphocytic Leukemia, Acute Lymphocytic Leukemia, Sickle Cell Anemia and Idiopathic Thrombocytopenic Purpura using Total Reflection X-Ray Fluorescence induced by Synchrotron Radiation (SRTXRF). We studied sixty patients – male gender and female gender – with ages ranging from 18 to 70 years old and sixty healthy volunteers aged 18 to 60 years. Blood was collected into vacutainers without any additives. In the wake of collection, each blood sample was centrifuged at 3000 rev/min for 10 min in order to separate blood cells and suspended particles from blood serum. Sera were transferred into polyethylene tubes and stored in a freezer at 263 K until analyzed. Low Z elements ( $8 \leq Z \leq 20$ ) were performed in a high vacuum chamber to avoid air absorption and internal standard were Vanadium. For elements with atomic numbers higher, ( $26 \leq Z \leq 37$ ), atmospheric pressure of 1 atm and internal standard were Galium. By using *t-test* it could be seen significant differences ( $\alpha = 0.05$ ) between group of healthy subjects and groups of diseases. It was possible to determine the elemental concentrations of the following eleven elements: Na, P, S, Cl, K, Ca, Fe, Cu, Zn, Br and Rb. Using SPSS was possible to verify the differences and/or similarities between the groups by multivariate analysis.



## ÍNDICE

<b>CAPÍTULO I</b>	01
<b>INTRODUÇÃO</b>	01
<b>CAPÍTULO II</b>	05
<b>REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b>	05
II.1 - Estado da Arte - Elementos Traço no Sangue e no Soro de Seres Humanos	05
<b>CAPÍTULO III</b>	14
<b>FUNDAMENTOS TEÓRICOS</b>	14
III.1 - A Essencialidade dos Elementos Químicos para a Vida Humana	14
III.2 - Hematopoese – A Origem do Sangue	15
III.3 - A Medula Óssea	17
III.4 - O Sangue e Seus Componentes	17
III.4.1 - O Plasma	17
III.4.1.1 - Plasma e Soro – A Diferença	18
III.4.2 - O Sangue e Suas Células – Elementos Figurados	18
III.4.2.1 - As Hemácias (Glóbulos Vermelhos ou Eritrócitos)	19
III.4.2.2 - Os Leucócitos (Glóbulos Brancos)	20
III.4.3.3 - As Plaquetas (Tromboplastídeos ou Trombócitos)	21
III.5 - As Linhagens Mielóide e Linfóide	22
III.6 - Protooncogenes e Oncogenes	23
III.7 - Leucemogênese	23
III.8 - Leucemia Mielóide Crônica (LMC)	24
III.9 - Leucemia Mielóide Aguda (LMA)	25
III.10 - Leucemia Linfóide Crônica (LLC)	26
III.11 - Leucemia Linfóide Aguda (LLA)	27

III.12 - Anemia Falciforme (AF)	28
III.13 - Púrpura Trombocitopênica Idiopática (PTI)	30
III.14 - A Emissão de Raios X Característicos	32
III.15 - A Fluorescência de Raios X	36
III.15.1 - A Emissão de Fluorescência de Raios X	37
III.15.2 - A Intensidade Relativa das Linhas de Raios X Característicos	39
III.15.3 - A Fluorescência de Raios X por Reflexão Total	40
III.15.3.1 - Reflexão e Refração da Luz	40
III.15.3.2 - O Coeficiente de Reflexão Total	42
III.15.3.3 - A Refletividade e o Poder de Penetração	42
III.15.3.4 - A Intensidade da Radiação Fluorescente na Reflexão Total	43
III.15.3.5 - O Limite de Detecção	44
III.15.3.6 - A Análise Quantitativa da Fluorescência de Raios X por Reflexão Total	47
III.15.3.7 - A Utilização da Fonte de Luz Síncrotron na TXRF	48
III.15.3.8 - Laboratório Nacional de Luz Síncrotron (LNLS)	49
 <b>CAPÍTULO IV</b>	 51
 <b>MATERIAIS E MÉTODOS</b>	 51
IV.1 - Amostragem de Soro	51
IV.1.1 - Aquisição das Amostras de Soro no HEMORIO	51
IV.1.1.1 - Coleta de Soro de Indivíduos Sadios	51
IV.1.1.2 - Coleta de Soro de Pacientes	52
IV.2 - Preparação de Amostras de Soro	52
IV.2.1 - Primeira Etapa da Preparação de Amostras de Soro (HEMORIO)	53
IV.2.2 - Segunda Etapa de Preparação de Amostras de Soro (LNLS)	53
IV.2.2.1 - Preparação das Amostras de Soro (SRTXRF - Baixo Z)	53
IV.2.2.2 - Preparação das Amostras de Soro (SRTXRF – Convencional)	55
IV.3 - O Arranjo Experimental	57

IV.4 - Calibração do Sistema e Verificação da Reprodutibilidade	60
IV.5 - A Curva de Sensibilidade	61
IV.5.1 - Preparação de Amostras para a Sensibilidade	
(SRTXRF – Baixo Z)	61
IV.5.2 - Preparação de Amostras para a Sensibilidade	
(SRTXRF – Convencional)	63
IV.6 - Preparação de Amostras de Referência	64
IV.6.1 - Preparação de Amostras de Referência (SRTXRF – Baixo Z)	64
IV.6.2 - Preparação de Amostras de Referência (SRTXRF – Convencional)	65
<b>CAPÍTULO V</b>	<b>66</b>
<b>APRESENTAÇÃO E ANÁLISE DE RESULTADOS</b>	<b>66</b>
V.1 - Cálculo da Sensibilidade Relativa	66
V.2 - Análise entre as Médias das Concentrações Elementares Encontradas	69
V.2.1 - Análise das Amostras de Referência	70
V.2.2 - Análise entre as Médias das Concentrações Elementares	
Encontradas (SRTXRF – Baixo Z)	71
V.2.3 - Análise entre as Médias das Concentrações Elementares	
Encontradas (SRTXRF – Baixo Z)	78
V.3 - Teste t - Ferramenta Estatística para Análise Bivariada dos Resultados	80
V.3.1 - Teste t e a SRTXRF - Baixo Z	81
V.3.1.1 – Análise dos Resultados obtidos com o Teste t na	
SRTXRF – Baixo Z	82
V.3.1.1.1 - Indivíduos Sadios e Portadores de LMC	82
V.3.1.1.2 - Indivíduos Sadios e Portadores de LMA	83
V. 3.1.1.3 - Indivíduos Sadios e Portadores de LLC	83
V. 3.1.1.4 - Indivíduos Sadios e Portadores de LLA	84
V. 3.1.1.5 - Indivíduos Sadios e Portadores de AF	85
V. 3.1.1.6 - Indivíduos Sadios e Portadores de Púrpura PTI	85
V.3.2 - Teste t e a SRTXRF - Convencional	86
V.3.2.1 – Análise dos Resultados obtidos com o Teste t	
na SRTXRF – Convencional	87

V.3.2.1.1 - Indivíduos Sadios e Portadores de LMC	87
V.3.2.1.2 - Indivíduos Sadios e Portadores de LMA	88
V. 3.2.1.3 - Indivíduos Sadios e Portadores de LLC	88
V. 3.2.1.4 - Indivíduos Sadios e Portadores de LLA	89
V. 3.2.1.5 - Indivíduos Sadios e Portadores de AF	89
V.4 – SPSS for Windows – Análise Multivariada	90
V.4.1 – Análise Bivariada através do SPSS	91
V.4.1.1 – Análise Bivariada através do SPSS para SRTXRF – Baixo Z	92
V.4.1.2 – Análise Bivariada através do SPSS para SRTXRF – Convencional	93
V.4.2 - Análise Multivariada Através do SPSS	94
V.4.2.1 - Análise Multivariada Através do SPSS Dentro de Cada Grupo Estudado (SRTXRF – Baixo Z)	96
V.4.2.2 - Análise Multivariada Através do SPSS Dentro de Cada Grupo Estudado (SRTXRF - Convencional)	98
V.4.2.3 - Análise Multivariada Através do SPSS Entre os Grupos Estudados em Relação às Concentrações Elementares Individuais (SRTXRF – Baixo Z)	99
V.4.2.4 - Análise Multivariada Através do SPSS Entre os Grupos Estudado em Relação às Concentrações Elementares Individuais (SRTXRF - Convencional)	101
 <b>CAPÍTULO VI</b>	 103
 <b>CONCLUSÕES E SUGESTÕES</b>	 103
VI.1 - Conclusões	103
VI.2 – Sugestões	106
 <b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	 108
 <b>APÊNDICE A</b>	 119

<b>APÊNDICE B</b>	126
<b>APÊNDICE C</b>	128
<b>APÊNDICE D</b>	141
<b>APÊNDICE E</b>	154

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>3.1 - O sangue e seus principais componentes</b>	19
<b>3.2 - O diagrama de energias para os níveis K, L M e N</b>	35
<b>3.3 - O processo do Efeito Fotoelétrico</b>	36
<b>3.4 - Representação esquemática do efeito Auger para um modelo clássico do elemento magnésio (Mg)</b>	39
<b>3.5 – Refração e Reflexão da Luz</b>	41
<b>3.6 - Panorâmica do anel no LNLS</b>	49
<b>4.1 - Processo de preparação de amostras de soro de pacientes e indivíduos saudáveis (SRTXRF - Baixo Z)</b>	54
<b>4.2 - Processo de preparação de amostras de soro de pacientes e indivíduos saudáveis (SRTXRF – Convencional)</b>	56
<b>4.3 - Arranjo experimental - porta amostra horizontal (SRTXRF – Baixo Z)</b>	57
<b>4.4 - Arranjo experimental - porta amostra tipo carrossel (SRTXRF – Convencional)</b>	58
<b>4.5 - Diagrama que representa cada etapa da aquisição de dados</b>	59
<b>5.1 - Curva da Sensibilidade Relativa (<math>S_{r,i}</math>) para a linha K (STXRF – Baixo Z)</b>	68
<b>5.2 - Curva da Sensibilidade Relativa (<math>S_{r,i}</math>) para a linha K (SRTXRF - Convencional)</b>	68

<b>5.3 - Típico Espectro de Fluorescência de Raios X (SRTXRF- Baixo Z)</b>	<b>69</b>
<b>5.4 - Típico Espectro de Fluorescência de Raios X (SRTXRF- Convencional)</b>	<b>70</b>
<b>5.5 - Comparação entre as médias das concentrações de Na, S e Cl encontradas nas amostras de soro de indivíduos sadios e portadores de LMC.</b>	<b>72</b>
<b>5.6 - Comparação entre as médias das concentrações de P, K e Ca encontradas nas amostras de soro de indivíduos sadios e portadores de LMC.</b>	<b>72</b>
<b>5.7 - Comparação entre as médias das concentrações de Na, S e Cl encontradas nas amostras de soro de indivíduos sadios e portadores de LMA.</b>	<b>73</b>
<b>5.8 - Comparação entre as médias das concentrações de P, K e Ca encontradas nas amostras de soro de indivíduos sadios e portadores de LMA.</b>	<b>73</b>
<b>5.9 - Comparação entre as médias das concentrações de Na, S e Cl encontradas nas amostras de soro de indivíduos sadios e portadores de LLC.</b>	<b>74</b>
<b>5.10 - Comparação entre as médias das concentrações de P, K e Ca encontradas nas amostras de soro de indivíduos sadios e portadores de LLC.</b>	<b>74</b>
<b>5.11 - Comparação entre as médias das concentrações de Na, S e Cl encontradas nas amostras de soro de indivíduos sadios e portadores de LLA.</b>	<b>75</b>
<b>5.12 - Comparação entre as médias das concentrações de P, K e Ca encontradas nas amostras de soro de indivíduos sadios e portadores de LLA.</b>	<b>75</b>
<b>5.13 - Comparação entre as médias das concentrações de Na, S e Cl encontradas nas amostras de soro de indivíduos sadios e portadores de AF.</b>	<b>76</b>
<b>5.14 - Comparação entre as médias das concentrações de P, K e Ca encontradas nas amostras de soro de indivíduos sadios e portadores de AF.</b>	<b>76</b>

<b>5.15</b> - Comparação entre as médias das concentrações de Na, S e Cl encontradas nas amostras de soro de indivíduos sadios e portadores de PTI.	77
<b>5.16</b> - Comparação entre as médias das concentrações de P, K e Ca encontradas nas amostras de soro de indivíduos sadios e portadores de PTI.	77
<b>5.17</b> - Comparação entre as médias das concentrações de Fe, Cu, Zn, Br e Rb encontradas nas amostras de soro de indivíduos sadios e portadores de LMC.	78
<b>5.18</b> - Comparação entre as médias das concentrações de Fe, Cu, Zn, Br e Rb encontradas nas amostras de soro de indivíduos sadios e portadores de LMA.	78
<b>5.19</b> - Comparação entre as médias das concentrações de Fe, Cu, Zn, Br e Rb encontradas nas amostras de soro de indivíduos sadios e portadores de LLC.	79
<b>5.20</b> - Comparação entre as médias das concentrações de Fe, Cu, Zn, Br e Rb encontradas nas amostras de soro de indivíduos sadios e portadores de LLA.	79
<b>5.21</b> - Comparação entre as médias das concentrações de Fe, Cu, Zn, Br e Rb encontradas nas amostras de soro de indivíduos sadios e portadores de AF.	80
<b>D.1</b> – Gráfico das Componentes Principais – Sadio (SRTXRF – Baixo Z)	141
<b>D.2</b> – Gráfico das Componentes Principais – LMC (SRTXRF – Baixo Z)	142
<b>D.3</b> – Gráfico das Componentes Principais – LMA (SRTXRF – Baixo Z)	143
<b>D.4</b> – Gráfico das Componentes Principais – LLC (SRTXRF – Baixo Z)	144



<b>D.5</b> – Gráfico das Componentes Principais – LLA (SRTXRF – Baixo Z)	145
<b>D.6</b> – Gráfico das Componentes Principais – AF (SRTXRF – Baixo Z)	146
<b>D.7</b> – Gráfico das Componentes Principais – PTI (SRTXRF – Baixo Z)	147
<b>D.8</b> – Gráfico das Componentes Principais – Sadio (SRTXRF – Convencional)	148
<b>D.9</b> – Gráfico das Componentes Principais – LMC (SRTXRF – Convencional)	149
<b>D.10</b> – Gráfico das Componentes Principais – LMA (SRTXRF – Convencional)	150
<b>D.11</b> – Gráfico das Componentes Principais – LLC (SRTXRF – Convencional)	151
<b>D.12</b> – Gráfico das Componentes Principais – LLA (SRTXRF – Convencional)	152
<b>D.13</b> – Gráfico das Componentes Principais – AF (SRTXRF – Convencional)	153
<b>E.1</b> – Gráfico das Componentes Principais – Na (SRTXRF – Baixo Z)	154
<b>E.2</b> – Gráfico das Componentes Principais – P (SRTXRF – Baixo Z)	155
<b>E.3</b> – Gráfico das Componentes Principais – S (SRTXRF – Baixo Z)	156
<b>E.4</b> – Gráfico das Componentes Principais – Cl (SRTXRF – Baixo Z)	157
<b>E.5</b> – Gráfico das Componentes Principais – K (SRTXRF – Baixo Z)	158
<b>E.6</b> – Gráfico das Componentes Principais – Ca (SRTXRF – Baixo Z)	159
<b>E.7</b> – Gráfico das Componentes Principais – Fe (SRTXRF - Convencional)	160
<b>E.8</b> – Gráfico das Componentes Principais – Cu (SRTXRF - Convencional)	161

<b>E.9</b> – Gráfico das Componentes Principais – Zn (SRTXRF - Convencional)	162
<b>E.10</b> – Gráfico das Componentes Principais – Br (SRTXRF - Convencional)	163
<b>E.11</b> – Gráfico das Componentes Principais – Rb (SRTXRF - Convencional)	164

## ÍNDICE DE TABELAS

<b>3.1</b> – Relação entre cada patologia estudada com a sua incidência, faixa-etária e sexos pedominantes	31
<b>3.2</b> - Características da Linha XRF	50
<b>4.1</b> - As características dos arranjos experimentais.	60
<b>5.1</b> - Sensibilidade relativa para a linha K (SRTXRF – Baixo Z)	67
<b>5.2</b> - Sensibilidade relativa para a linha K (SRTXRF - Convencional)	67
<b>5.3</b> - Resultados da análise da amostra de referência Solução 1.10322.010 - MERCK para SRTXRF - Baixo Z	71
<b>5.4</b> – Rejeição ou Aceitação da Hipótese nula $H_0$	81
<b>5.5</b> - Teste t entre as médias das concentrações encontradas nas amostras de soro de indivíduos sadios e de portadores de LMC, LMA, LLC, LLA, AF e PTI.	82
<b>5.6</b> - Teste t entre as médias das concentrações encontradas nas amostras de soro de indivíduos sadios e de portadores de LMC., LMA, LLC, LLA e AF.	87
<b>C.1</b> - Correlação Bivariada do Grupo Sadio (SRTXRF - Baixo Z)	128
<b>C.2</b> - Correlação Bivariada do Grupo LMC (SRTXRF – Baixo Z)	129
<b>C.3</b> - Análise Bivariada do Grupo LMA (SRTXRF – Baixo Z)	130
<b>C.4</b> - Análise Bivariada do Grupo LLC (SRTXRF – Baixo Z)	131

<b>C.5 - Análise Bivariada do Grupo LLA (SRTXRF – Baixo Z)</b>	132
<b>C.6 - Análise Bivariada do Grupo AF (SRTXRF – Baixo Z)</b>	133
<b>C.7 - Análise Bivariada do Grupo PTI (SRTXRF – Baixo Z)</b>	134
<b>C.8 - Análise Bivariada do Grupo Sadio (SRTXRF – Convencional)</b>	135
<b>C.9 - Análise Bivariada do Grupo LMC (SRTXRF – Convencional)</b>	136
<b>C.10 - Análise Bivariada do Grupo LMA (SRTXRF – Convencional)</b>	137
<b>C.11 - Análise Bivariada do Grupo LLC (SRTXRF – Convencional)</b>	138
<b>C.12 - Análise Bivariada do Grupo LLA (SRTXRF – Convencional)</b>	139
<b>C.13 - Análise Bivariada do Grupo AF (SRTXRF – Convencional)</b>	140
<b>D.1 – Matriz Componente – Sadio (SRTXRF – Baixo Z)</b>	141
<b>D.2 – Matriz Componente - LMC (SRTXRF – Baixo Z)</b>	142
<b>D.3 – Matriz Componente - LMA (SRTXRF – Baixo Z)</b>	143
<b>D.4 – Matriz Componente - LLC (SRTXRF – Baixo Z)</b>	144
<b>D.5 – Matriz Componente - LLA (SRTXRF - Baixo Z)</b>	145
<b>D.6 – Matriz Componente - AF (SRTXRF – Baixo Z)</b>	146
<b>D.7 – Matriz Componente - PTI (SRTXRF – Baixo Z)</b>	147
<b>D.8– Matriz Componente – Sadio (SRTXRF - Convencional)</b>	148

<b>D.9</b> – Matriz Componente – LMC (SRTXRF - Convencional)	149
<b>D.10</b> – Matriz Componente – LMA (SRTXRF - Convencional)	150
<b>D.11</b> – Matriz Componente – LLC (SRTXRF - Convencional)	151
<b>D.12</b> – Matriz Componente – LLA (SRTXRF - Convencional)	152
<b>D.13</b> – Matriz Componente – AF (SRTXRF - Convencional)	153
<b>E.1</b> – Matriz Componente – Na (SRTXRF Baixo Z)	154
<b>E.2</b> – Matriz Componente – P (SRTXRF - Baixo Z)	155
<b>E.3</b> – Matriz Componente – S (SRTXRF – Baixo Z)	156
<b>E.4</b> – Matriz Componente – Cl (SRTXRF – Baixo Z)	157
<b>E.5</b> – Matriz Componente – K (SRTXRF – Baixo Z)	158
<b>E.6</b> – Matriz Componente – Ca (SRTXRF – Baixo Z)	159
<b>E.7</b> – Matriz Componente – Fe (SRTXRF - Convencional)	160
<b>E.8</b> – Matriz Componente – Cu (SRTXRF - Convencional)	161
<b>E.9</b> – Matriz Componente – Zn (SRTXRF - Convencional)	162
<b>E.10</b> – Matriz Componente – Br (SRTXRF - Convencional)	163
<b>E.11</b> – Matriz Componente – Rb (SRTXRF - Convencional)	164

## LISTA DE NOMENCLATURAS

- AF** – Anemia Falciforme
- ASS** - Espectrometria de Absorção Atômica
- ABTLuS** – Associação Brasileira de Luz Síncrotron
- CNPq** – Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e tecnológico
- EDXRF** - Fluorescência de Raios X por Dispersão de Energia
- ETAAS, FAAS** - Espectrometria de Absorção Atômica com Atomização Eletrotérmica
- Extran** – Detergente Neutro (5%)
- FAAS** - Espectrometria de Absorção Atômica em Chama
- HEMORIO** – Instituto de Hematologia Arthur de Siqueira Cavalcanti
- IAEA** – Agência Internacional de Energia Atômica
- ICP-MS** - Espectrometria de Massa com Plasma Indutivamente Acoplado
- INAA** - Análise por Ativação Neutrônica Instrumental
- INCA** – Instituto Nacional de Câncer
- LIN** – Laboratório de Instrumentação Nuclear
- LLA** – Leucemia Linfóide Aguda
- LLC** – Leucemia Linfóide Crônica
- LMA** – Leucemia Mielóide Aguda
- LMC** – Leucemia Mielóide Crônica
- LMD** - Limite Mínimo de Detecção
- LNLS** - Laboratório Nacional de Luz Síncrotron
- LQAU** – Laboratório Químico de Apoio ao Usuário
- MILLI-Q** – Água ultrapura ou desmineralizada (Marca registrada Millipore Corporation)
- PIXE** - Emissão de Raios X por Indução de Partículas Carregadas
- PTI** – Púrpura Trombocitopênia Idiopática
- Q-ICP-MS** - Espectrometria de Massa com Plasma Indutivamente Acoplado com Analisador do tipo Quadrupolo
- QXAS** - Software de Análise Quantitativa de Raios X
- SIMAAS** - Espectrometria de Absorção Atômica Simultânea
- SPSS** - Statistical Package for the Social Science (Análise estatística multicariada)
- SRTXRF** – Fluorescência de Raios X por Reflexão Total usando Radiação Síncrotron

**SRTXRF – Convencional** - Fluorescência de Raios X por Reflexão Total usando Radiação Síncrotron para números atômicos entre 26 e 37.

**SRTXRF – Baixo Z** - Fluorescência de Raios X por Reflexão Total usando Radiação Síncrotron para números atômicos entre 8 e 20.

**TXRF** - Fluorescência de Raios X por Reflexão Total

**XRF** - Fluorescência de Raios X

# CAPÍTULO I

## INTRODUÇÃO

As pesquisas associadas na determinação das composições elementares em organismos biológicos têm grande importância para área biomédica, uma vez que estes elementos podem ser essenciais à fisiologia dos tecidos biológicos. Várias doenças estão diretamente associadas com a deficiência ou excesso desses elementos, o que pode interferir diretamente no metabolismo dos seres humanos.

Até o presente momento, todas as pesquisas realizadas nesta área não abordaram a avaliação da composição multielementar de amostras de soro voltada para o estudo exclusivo da Leucemia Mielóide Crônica, da Leucemia Mielóide Aguda, da Leucemia Linfóide Crônica, da Leucemia Linfóide Aguda, da Anemia Falciforme e da Púrpura Trombocitopênica Idiopática ao mesmo tempo.

Dentro da área médica, o diagnóstico preciso e a prevenção das doenças sempre foram os principais focos das pesquisas biomédicas. Em doenças como LMC, LMA, LLC, LLA e PTI que não possuem causas definidas, pode-se dizer que um diagnóstico preciso pode definir o tempo e a qualidade de sobrevivência do paciente além da melhoria do tratamento clínico. No caso da AF, doença de causa genética, o diagnóstico precoce e o tratamento permanente acompanhado do estudo genético também são outros focos importantes das pesquisas médicas.

De acordo com a publicação “*Estimativa 2008: Incidência de Câncer no Brasil*” (INCA, 2008), 9.540 indivíduos serão afetados por leucemias no Brasil. Destes, 5.220 serão homens e 4.320 serão mulheres. A estimativa para o Estado do Rio de Janeiro é de 510 e 450 novos casos para homens e mulheres respectivamente. Para a capital é de 240 e 230 novos casos para homens e mulheres respectivamente. Esta é uma estimativa da taxa bruta de incidência em 100.000 indivíduos.

Neste trabalho de pesquisa, foi desenvolvido um estudo que correlaciona as características das doenças hematológicas LMC, LMA, LLC, LLA, AF e PTI às



concentrações químicas multielementares contidas nos soros de seus portadores. Como alguns elementos químicos podem se apresentar no organismo na ordem de parte por bilhão ( $\mu\text{g.L}^{-1}$ ), os chamados *elementos traço*, tais concentrações foram analisadas através da Técnica de Fluorescência de Raios X por Reflexão Total (TXRF), a qual fornece uma análise rápida, precisa e muito sensível.

A Fluorescência de Raios X (XRF) é uma técnica analítica multielementar bastante difundida e com aplicações em várias áreas da ciência e da tecnologia. Tem como princípio físico básico a produção de raios X característicos emitidos por átomos de um elemento presente em uma amostra quando devidamente excitada. A Fluorescência de Raios X por Reflexão Total (TXRF) é uma variante da XRF convencional que tem maior poder de detecção e exige uma técnica de preparação de amostras mais simples. É uma técnica bastante confiável, que proporciona a determinação da composição multielementar de amostras em análises em nível de ultratraço ( $\mu\text{g.L}^{-1}$ ) com aplicações no meio ambiente, na Odontologia, na Medicina e em entre outras áreas (PRANGE, 1989). Como a TXRF é técnica muito sensível, o soro foi escolhido como amostra no lugar do sangue total uma vez o sangue possui concentrações muito altas de ferro, o que levaria a uma análise espectral não muito confiável. O espectro do ferro se sobreporia aos demais elementos em concentrações bem menores. Por sua vez, o plasma também não foi escolhido por apresentar além das proteínas do soro, fibrinogênio, fibrina (ricos em ferro) e anticoagulante.

Para execução deste trabalho, fez-se uma parceria com o Laboratório Nacional de Luz Síncrotron (LNLS/CNPq) onde se localiza a linha de Luz de Fluorescência de Raios X por Reflexão Total usando Radiação Síncrotron (SRTXRF) e com o Instituto de Estadual de Hematologia Arthur de Siqueira Cavalcanti (HEMORIO) por ser um centro de referência na área de pesquisa, diagnóstico e tratamento de doenças hematológicas localizado no Estado do Rio de Janeiro.

O Comitê de Ética em Pesquisa (CEP-HEMORIO), instituído pela direção geral e aprovado pela Comissão Nacional de Ética em Pesquisa avaliou e aprovou a execução desta pesquisa registrada sob número 071/05 após ter cumprido todos os requisitos da resolução CSN 196/96 e suas complementares do Conselho Nacional de Saúde - Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP - Ministério da Saúde). Só a partir

desse momento, foi possível a obtenção das alíquotas de soro provenientes dos pacientes e dos indivíduos saudáveis.

A preparação de amostras foi realizada no Laboratório de Química de Apoio aos Usuários (LQAU), instalado no Laboratório Nacional de Luz Síncrotron (LNLS) assim como as todas as medidas experimentais deste trabalho foram realizadas na linha XRF também do Laboratório Nacional de Luz Síncrotron (LNLS), localizado em Campinas, o qual foi o primeiro deste gênero existente no Hemisfério Sul.

A análise dos resultados foi realizada no Laboratório de Instrumentação Nuclear (LIN) que pertence ao Programa de Engenharia Nuclear do Instituto Alberto Luiz Coimbra de Pós-Graduação e Pesquisa de Engenharia (COPPE) localizado na Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ).

Este trabalho teve como objetivo principal desenvolver um conjunto de ações capazes de avaliar a composição multielementar presente no soro de indivíduos saudáveis (grupo de controle) e de portadores das seguintes doenças hematológicas:

- a) Leucemia Mielóide Crônica
  
- b) Leucemia Mielóide Aguda
  
- c) Leucemia Linfóide Crônica
  
- d) Leucemia Linfóide Aguda
  
- e) Anemia Falciforme
  
- f) Púrpura Trombocitopênica Idiopática

Os objetivos específicos são:

1. Utilizar a técnica de Fluorescência de Raios X por Reflexão Total com a finalidade de determinar as concentrações multielementares presentes no soro de indivíduos sadios, portadores de LMC, de LMA, de LLC, de LLA, de AF e de PTI.
2. Comparar os valores encontrados para médias das concentrações elementares presentes no soro de indivíduos sadios com os valores encontrados para as médias das concentrações elementares presentes no soro de portadores de cada uma das doenças citadas no item 1 através da análise bivariada do teste t.
3. Usar a Análise por Componentes Principais (PCA) do programa de análise estatística multivariada SPSS a fim de avaliar as possíveis semelhanças e/ou diferenças entre os grupos de doenças hematológicas levando-se em consideração quatro fatores: concentrações elementares, sexo, idade e tempo de tratamento. Este tipo de análise irá agrupar por similaridade as doenças hematológicas analisadas. Caso existam diferenças entre elas, serão formados dois ou mais grupos com características individualizadas, o que pode ajudar às pesquisas médicas no que diz respeito a diagnóstico precoce e melhoria do tratamento clínico.

## CAPÍTULO II

### REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Neste capítulo serão apresentadas publicações nas quais as concentrações multielementares presentes em amostras biológicas de seres humanos foram analisadas através de diferentes técnicas analíticas, além da técnica de Fluorescência de Raios X por Reflexão Total.

#### II.I – Estado da Arte - Elementos Traço no Sangue e no Soro de Seres Humanos

As pesquisas com elementos traços presentes no sangue e no soro humano são relativamente novas (cerca de duas décadas). Muitos autores vêm desenvolvendo trabalhos relevantes nesta área, e em outras áreas relacionadas.

A seguir, serão apresentados resumos de alguns trabalhos que analisaram a composição multielementar de amostras biológicas de seres humanos:

**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 TXRF. Identificaram os seguintes elementos: K, Ca, Ti, Cr, Fe, Ni, Cu, Zn, Pb, Rb e Sr. Demonstraram que a técnica permite uma redução significativa do background e identificaram o limite de detecção para o Pb em torno de  $0,03 \mu\text{g.mL}^{-1}$  em 1000 segundo de medida.

**ROSAS et al. (1995)** Analisaram os níveis de Cu e Zn e a razão Cu/Zn em amostras de soro de pacientes com linfomas, leucemias agudas e crônicas através da técnica AAS. Foram analisados 44 pacientes com diagnóstico recente: 17 (linfoma), 15 (leucemia aguda), e 12 (leucemia crônica) e 95 indivíduos saudáveis. Os níveis de Cu ( $54,4 \pm 8,9 \mu\text{g.L}^{-1}$ ,  $p < 0,05$ ) em saudáveis foram significativamente menores em relação aos pacientes com linfoma ( $93,7 \pm 37,5 \mu\text{g.L}^{-1}$ ), leucemia aguda ( $80,6 \pm 44,6 \mu\text{g.L}^{-1}$ ), leucemia

crônica ( $95,7 \pm 28,9 \mu\text{g.L}^{-1}$ ). Por outro lado, os níveis de Zn em sadios ( $100,4 \pm 14 \mu\text{g.L}^{-1}$ ,  $p < 0,05$ ) foram significativamente maiores comparados aos pacientes com linfoma ( $72,2 \pm 22,6 \mu\text{g.L}^{-1}$ ), leucemia aguda ( $66 \pm 15,6 \mu\text{g.L}^{-1}$ ), leucemia crônica ( $74,8 \pm 14,7 \mu\text{g.L}^{-1}$ ). A razão de Cu/Zn foi considerada menor nos indivíduos sadios ( $0,54 \pm 0,13 \mu\text{g.L}^{-1}$ ,  $p < 0,05$ ) quando comparados com pacientes com linfoma ( $1,21 \pm 0,5 \mu\text{g.L}^{-1}$ ), leucemia aguda ( $1,22 \pm 0,7 \mu\text{g.L}^{-1}$ ), leucemia crônica ( $1,28 \pm 0,4 \mu\text{g.L}^{-1}$ )

**AKKUS et al. (1998)** usaram a técnica AAS para analisar as concentrações de Cu e Mg em amostras de soro e de unhas de 10 crianças com LLA e no grupo controle (sadio) de 12 crianças. Para as concentrações de Cu e Mg nas unhas do grupo portador de LLA foram encontrados os seguintes valores para Cu e Mg respectivamente:  $8,67 \pm 5,35$  e  $0,22 \pm 0,12 \text{ mmol.mg}^{-1}$ . Para as concentrações de Cu e Mg nas amostras de unhas do grupo controle foram encontrados os seguintes valores respectivamente:  $4,27 \pm 2,32$  e  $0,14 \pm 0,03 \text{ mmol.mg}^{-1}$ . Para as concentrações de Cu e Mg nas amostras de soro do grupo portador de LLA foram encontrados os seguintes valores respectivamente:  $525,1 \pm 160,9 \mu\text{g.dL}^{-1}$  e  $2,42 \pm 0,54 \text{ mg.dL}^{-1}$ . Para as concentrações de Cu e Mg nas amostras de soro do grupo controle foram encontrados os seguintes valores respectivamente  $115,0 \pm 70,7 \mu\text{g.dL}^{-1}$  e  $2,20 \pm 0,70 \text{ mg.dL}^{-1}$ .

**CARVALHO et al. (1998)** analisaram através da técnica EDXRF amostras de tecidos humanos (cabelo, fígado, osso e rim) coletados pós-morte. Todas as amostras foram analisadas usando tratamento químico. Foram encontrados os seguintes elementos: Mn, Fe, Cu, Zn, Sr, As, Rb e Pb. As concentrações de alguns elementos variam com o sexo e a idade. Para o cabelo, houve uma significativa diferença entre homens e mulheres em relação à concentração de Zn. Para as amostras de osso, Zn, Sr e Pb apresentaram significativa correlação com a idade. Descobriu-se uma correlação positiva entre Fe e Pb e negativa entre Zn e Pb em amostras de fígado. Para as amostras de rim, constatou-se uma forte e positiva correlação entre Zn e Fe e entre Cu e Zn enquanto que uma fraca correlação entre Rb e Pb.

**SAVAGE et al. (1998)** desenvolveram uma metodologia analítica para análise dos elementos traço em amostras de plasma humano usando TXRF. Os elementos

analisados foram As, Br, Ca, Cl, Co, Cu, I, Fe, Pb, Mn, Mo, Ni, Se, Sn e Sn. As concentrações ficaram entre  $1 \text{ ng.g}^{-1}$  e  $270 \text{ }\mu\text{g.g}^{-1}$ .

**BELLISOLA et al. (1999)** usaram a técnica TXRF para monitorar o metabolismo e a excreção de selênio (Se) em humanos. Foram utilizadas amostras de soro, de sangue e de urina com a finalidade de estudar a absorção intestinal e a taxa de síntese de selênio-proteínas, depois que os indivíduos pesquisados ingeriram um composto de sódio e selênio. Após aproximadamente 3 horas ocorreu um pico de concentração de Se nas amostras de sangue e de soro, mas esse valor foi decrescendo lentamente. Nas amostras de urina, a excreção de Se aumentou progressivamente.

**RODUSHKIN et al. (1999)** fizeram análise multielementar em amostras de sangue humano usando a técnica ICP-MS. Foram colhidas amostras em 31 atletas suecos com idade entre 16 e 36 anos. Antes de doarem as amostras os indivíduos tiveram que interromper o uso de suplementos minerais alimentares. Cinquenta elementos foram detectados, estabelecendo assim o ICP-MS como uma boa técnica de análise multielementar. Os elementos encontrados que apresentaram maiores concentrações foram: Fe ( $476 \text{ }\mu\text{g.g}^{-1}$ ), P ( $375 \text{ }\mu\text{g.g}^{-1}$ ), Br ( $6,6 \text{ }\mu\text{g.g}^{-1}$ ), Zn ( $5,8 \text{ }\mu\text{g.g}^{-1}$ ), Rb ( $2,5 \text{ }\mu\text{g.g}^{-1}$ ), Si ( $2,3 \text{ }\mu\text{g.g}^{-1}$ ) e Cu ( $0,83 \text{ }\mu\text{g.g}^{-1}$ ).

**ALIMONTI et al. (2000)** encontraram valores de referência para alguns elementos traços em amostras de soro de recém nascidos da área urbana de Roma. Foram analisadas amostras de soro de 143 bebês com idade superior a 37 semanas e com mais de 2500 g através da técnica Q-ICP-MS. Foram encontrados os seguintes valores em  $\text{ng.mL}^{-1}$ : Al (1,12-6,72); Cd (0,10-0,52); Co (0,20-0,43); Cu (140-691); Li (0,31-2,23); Mn (0,79-3,26); Mo (0,36-1,56); Ni (0,20-3,15); Rb (196-1302); Sb (0,10-1,48); Se (20,2-69,7); Zn (318-1405).

**GREAVES et al. (2000)** monitoraram os níveis de substâncias medicamentosas em amostras de plasma e de urina de pacientes com câncer pediátrico sob quimioterapia através da correlação com os níveis de contaminação por platina. A técnica TXRF mostrou-se eficaz e apropriada para a rotina de monitoramento dos níveis de Pt em pacientes com câncer.

**ZARCADAS et al. (2001)** verificaram a aplicabilidade da TXRF em casos de amostras de sangue e de soro de seres humanos. Demonstraram a estabilidade da técnica em análises de amostras líquidas oferecendo limites de detecção muito baixos na maioria dos casos. Identificaram as concentrações dos seguintes elementos: S, Cl, K, Ca, Fe, Cu, Zn, Br e Rb.

**BÁRÁNY et al. (2002a)** analisaram os níveis de elementos traço em amostras de sangue e de soro de adolescentes através da técnica ICP-MS. O sangue e o soro de 372 adolescentes de 15 anos foram coletados em duas cidades da Suécia e analisados através da técnica ICP-MS. Determinaram as médias das concentrações de 13 elementos (Co, Cu, Zn, Se, Rb, Rh, Pd, Cd, W, Pt, Hg, Tl e Pb) nas amostras de sangue e de soro para esta faixa etária e para cada elemento.

**BÁRÁNY et al. (2002b)** estudaram a relação entre os elementos traço em amostras de sangue e de soro de adolescentes suecos em relação ao sexo, a idade, a área residencial e a situação socioeconômica através da técnica ICP-MS. Neste estudo foram analisados 13 elementos: Co, Cu, Zn, Se, Rb, Rh, Pd, Cd, W, Pt, Hg, Tl e Pb. Utilizou uma amostragem de 372 para a faixa de idade de 15 anos e 294 indivíduos para a faixa de idade de 17 anos. Os níveis de Cu tanto nas amostras de soro quanto nas amostras de sangue foram maiores para os indivíduos do sexo feminino. Concluíram que a idade é um fator muito importante e pode influenciar na exposição ambiental especialmente para elementos não essenciais. A área residencial influencia todos os níveis de concentração dos 13 elementos analisados.

**CELIK et al. (2002)** usaram a técnica ICP-MS para determinar a concentração de alguns elementos traços presentes em amostras de fluido abdominal e em amostras de soro de indivíduos portadores de cirrose e portadores de doenças malignas abdominais. Foram coletadas amostras de 17 pacientes, sendo 10 deles portadores de cirrose (5 homens e 5 mulheres) e 7 mulheres portadoras de doenças malignas. Os elementos analisados foram: Cu, Zn, Mg e Fe. As concentrações obtidas no soro de indivíduos do grupo de portadores de doenças malignas foram: Cu ( $1,1843 \pm 0,3298 \mu\text{g.g}^{-1}$ ), Zn ( $1,1786 \pm 0,2518 \mu\text{g.g}^{-1}$ ), Mg ( $0,0224 \pm 0,0036 \mu\text{g.g}^{-1}$ ) e Fe ( $0,9228 \pm 0,4066 \mu\text{g.g}^{-1}$ ). As concentrações dos mesmos elementos em amostras de soro de indivíduos portadores de cirrose (doença benigna) foram: Cu ( $0,975 \pm 0,2603 \mu\text{g.g}^{-1}$ ), Zn ( $1,277 \pm 0,3451$

$\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ ), Mg ( $0,023 \pm 0,0057 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ ) e Fe ( $2,558 \pm 1,8377 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ ). Segundo os autores, as diferenças nas concentrações observadas entre indivíduos portadores de doenças malignas abdominais e cirrose podem ser úteis para um diagnóstico e para a distinção entre estas duas patologias.

**CORREIA et al. (2002)** usaram a técnica SIMAAS para determinar as concentrações de Mn e de Se em amostras de sangue. Os limites de detecção foram  $0,43 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  para o Mn e  $3,3 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  para o Se. Os valores para as médias das concentrações de Mn e Se ficaram bem próximos dos valores certificados ( $97 \pm 9\%$  para o Mn e  $96 \pm 7\%$  para o Se).

**KUMAR et al. (2002)** analisaram através da técnica PIXE os níveis de elementos traço em crianças mentalmente estimuladas. Quatorze elementos foram estudados em amostras de sangue de pacientes do centro de reabilitação de retardo mental do Colégio-Hospital Coimbatore, Tanil Nadu na Índia. Foram encontradas diferentes concentrações para Zn, Fe, Cu, Pb, Cl e Rb relacionados com os estímulos empregados. Os resultados foram comparados com o controle sadio.

**MIURA et al. (2002)** fizeram um estudo das concentrações de elementos traços (Mg, Al, Si, P, Ca, Fe, Cu, Zn, Se, Br, Rb, e Sr) e Creatinine Clearance (Ccr) encontrados nas amostras de urina e de no soro de 50 pacientes com doenças renais e submetidos a hemodiálises utilizando a técnica PIXE. Em alguns casos, constataram o aumento do Si no soro e uma diminuição do Si nos fluidos das diálises. Alguns resultados sugerem que a diminuição da função renal e as diálises contribuíram para o acúmulo de Si. Houve uma diminuição significativa da concentração de Se associada a diminuição da Ccr ( $r=0,452$ ,  $p < 0,01$ ). Observaram a transferência do Br para o fluidos da diálise, o que contribuiu para a diminuição da concentração de Br nas amostras de soro dos pacientes submetidos a hemodiálise.

**SCANCAR et al. (2003)** estudaram as concentrações totais de metais em amostras de soro de pacientes submetidos à diálises e as concentrações de Cu, Rb, Al, Fe e Zn em 12 pacientes CAPD (ambulatório de tratamento contínuo através de diálises) através das técnicas ETAAS, FAAS. Os valores encontrados foram: Cu ( $720$  a  $1780 \text{ ng}\cdot\text{cm}^{-3}$ ), Rb



(128 a 346 ng.cm<sup>-3</sup>), Al (10 a 72 ng.m<sup>-3</sup>), Fe (800 a 2300 ng.cm<sup>-3</sup>) e Zn (659 a 1310 ng.cm<sup>-3</sup>).

**CUNHA et al. (2003)** analisaram os níveis séricos de Cu e Se em voluntários sadios moradores da cidade do Rio de Janeiro através da técnica FAAS. Trinta indivíduos de ambos os sexos, brancos e negros foram submetidos às análises nutricionais, eletrocardiograma e ecocardiograma para certificar a saúde de todos. A acurácia e a precisão desses métodos foram validadas utilizando materiais de referência certificada. O nível de Se sérico médio entre as mulheres brancas foi de  $76,28 \pm 8,7$  mg.L<sup>-1</sup>. Nos homens brancos foi igual  $72,23 \pm 10,24$  mg.L<sup>-1</sup> (P = 0,35). Entre os indivíduos não-brancos, a média foi de  $73,12 \pm 12,57$  mg.L<sup>-1</sup> e nos indivíduos brancos foi  $73,20 \pm 9,11$  mg.L<sup>-1</sup> (P = 0,98). O nível sérico médio do Cu foi  $1,09 \pm 0,39$  mg .L<sup>-1</sup>. A média encontrada para as mulheres foi de  $0,99 \pm 0,22$  mg.L<sup>-1</sup> e para os homens  $1,13 \pm 0,43$  mg.L<sup>-1</sup> (P = 0,42). Em indivíduos não-brancos foi  $1,36 \pm 0,48$  mg.L<sup>-1</sup> e em indivíduos brancos foi de  $1,00 \pm 0,31$  mg.L<sup>-1</sup> (P = 0,02). Os autores concluíram que os níveis séricos de Se e Cu observados neste estudo foram semelhantes aos encontrados em outras cidades.

**ILHAN et al. (2004)** fizeram uma comparação entre os níveis de Mn, Cu e Zn contidos em amostras de unhas e em amostras de soro de pacientes portadores de epilepsia e indivíduos sadios através da técnica AAS. Foi constatado um aumento de Mn nas amostras unha dos pacientes comparados com amostras de indivíduos sadios (P > 0,008). As concentrações de Zn e Cu permaneceram inalteradas tanto para os pacientes portadores de epilepsia quanto para o controle. Estatisticamente houve um aumento significativo dos níveis de Cu nas amostras de soro dos pacientes quando comparados com o controle (P > 0,009).

**EKINCI et al. (2004)** utilizaram a técnica EDXRF para analisar as concentrações elementares em sangue humano proveniente de indivíduos que sofriam de esquizofrenia, câncer de pulmão e leucemia. A fluorescência de raios X foi obtida a partir de fontes radioativas de <sup>55</sup>Fe e <sup>241</sup>Am. Os elementos encontrados nas amostras de sangue de portadores de leucemia foram: Cl, K, Ca, Fe, Rb, Nb, Mo, In, Sn e I.

**MARQUES et al. (2004)** utilizaram a técnica TXRF para analisar amostras de dentes de pacientes com insuficiência renal. As concentrações de Ti, Mn, Fe, Co, Ni, Cu, Zn, Se, Br, Rb, Sr e Pb foram correlacionadas com os valores encontrados em amostras de indivíduos saudáveis. Para investigar a influência do tratamento na composição dos dentes, foram pesquisados pacientes com e sem tratamento de diálise. As concentrações de Mn, Fe, Cu e Se não foram diferentes entre os dois grupos. As concentrações de Pb foram maiores na região da polpa enquanto que as concentrações de Ti, Co, Ni, Se, Br e Rb foram menores nas amostras de pacientes submetidos a longos períodos de tratamento.

**MARTINEZ et al. (2004)** utilizaram a técnica de TXRF para determinar as concentrações de S, Ca, Cu, Zn, Rb e Pb em amostras de sangue de indivíduos moradores da zona metropolitana do Vale do México. As concentrações de S, Ca, Zn, Rb e Pb estavam dentro da faixa de valores medidos em populações de outros países. As concentrações de K e Br foram altas possivelmente devido a hábitos alimentares, diferenças geográficas ou fatores regionais.

**CUSTÓDIO et al. (2005)** analisaram as concentrações de elementos traços presentes em sangue total proveniente de cordões umbilicais, utilizando a técnica EDXRF. O sangue foi coletado, liofilizado e transformado em pastilhas de diâmetro de 2,0 cm e espessura 1,0 mm. A irradiação das pastilhas foi feita por meio de um tubo de raios X com anodo de molibdênio e feixe não filtrado. As análises das concentrações basearam-se em três condições distintas: a idade da mãe, a massa do recém-nascido e o período de gestação. Os elementos analisados foram: K, Ca, Fe, Cu, Zn, Br, Rb e Pb. Para verificar a reprodutibilidade dos resultados, medidas de concentração foram feitas com uma amostra certificada de sangue liofilizado de animal (IAEA, A-13). Foram observadas pequenas variações nas concentrações de K, Ca, Fe, Cu, Zn, Br, Rb e Pb para as três condições de análise.

**BEGUIN et al. (2006)** determinaram as concentrações de Cu e Zn em amostras de soro de 50 portadores de Leucemia Linfóide Crônica e em amostras de soro de 100 indivíduos normais (grupo controle) através da técnica TXRF. Foram encontrados os valores para as concentrações de Cu nas amostras de soro iguais a  $1,50 \pm 0,06 \mu\text{g.mL}^{-1}$  para portadores de Leucemia Linfóide Crônica e  $1,10 \pm 0,02 \mu\text{g.mL}^{-1}$  para indivíduos

normais com  $p < 0,001$  indivíduos normais. Foram encontradas os valores para as concentrações de Zn nas amostras de soro iguais a  $0,94 \pm 0,03 \mu\text{g.mL}^{-1}$  para portadores de Leucemia Linfóide Crônica e  $1,10 \pm 0,02 \mu\text{g.mL}^{-1}$  para indivíduos normais com  $p < 0,001$ .

**CANELLAS et al. (2006)** através da técnica SRTXRF analisaram amostras de soro de indivíduos portadores de Leucemia Mielóide Crônica (LMC) e indivíduos saudáveis (grupo controle). Foram analisadas 60 amostras de soro de indivíduos portadores de LMC e 60 amostras de soro de indivíduos saudáveis. As amostras de sangue foram centrifugadas para a retirada do soro. Em seguida o soro foi diluído com água desmineralizada e adicionado 50 $\mu\text{L}$  de Ga, que serviu como padrão interno. Foram encontrados e identificados os seguintes elementos: P, S, Cl, K, Ca, Cr, Mn, Fe, Ni, Cu, Zn, Br e Rb. O teste estatístico ANOVA foi utilizado na análise dos resultados e mostrou que há diferenças reais entre as concentrações dos elementos essenciais P, S, Cl, Ca, Cr, Mn, Fe, Cu e Rb encontradas nas amostras de soro de indivíduos portadores de LMC e nas amostras de soro de indivíduos saudáveis. Essas diferenças podem estar relacionadas não só ao sexo, mas à alimentação, aos medicamentos e até mesmo aos estágios da doença.

**HEITLAND et al. (2006)** pesquisaram concentrações de elementos traço em sangue humano. Utilizaram a técnica ICP-MS para determinar as concentrações elementares em amostras de sangue provenientes de 130 indivíduos saudáveis, habitantes da região de Bremen (norte da Alemanha). Nesta pesquisa foram analisados os hábitos alimentares dos indivíduos, se eram fumantes ou não, além da presença restaurações e próteses dentárias, idade, sexo e local de residência. Tais fatores determinaram concentrações elementares. Dentre os elementos analisados estavam o Cu e o Rb, os quais apresentaram concentrações respectivamente iguais a  $1.042 \mu\text{g.g}^{-1}$  e  $2.408 \mu\text{g.g}^{-1}$ . Essas concentrações foram consideradas maiores que as previstas para um grupo de indivíduos normais. Possivelmente, estes valores têm relação com o material que compõe as restaurações e próteses dentárias desses indivíduos.

**MOON et al. (2007)** utilizaram a técnica INAA para analisar as concentrações multielementares de amostras de soro de 63 mulheres coreanas com idade entre 20 e 60 anos. Foram identificados e quantificados os seguintes elementos: Br ( $6,46 \text{ mg.L}^{-1}$ ), Ca

(96,4 mg.L<sup>-1</sup>), Cl (3,533 mg.L<sup>-1</sup>), Co, Cr, Cs, Fe, K (191 mg.L<sup>-1</sup>), Na (3,365 mg.L<sup>-1</sup>), Rb, Se (0,13 mg.L<sup>-1</sup>) e Zn (0,98 mg.L<sup>-1</sup>).

## CAPÍTULO III

### FUNDAMENTOS TEÓRICOS

Neste capítulo serão abordados assuntos como a essencialidade dos elementos químicos, a origem do sangue e as características de cada doença hematológica analisada neste trabalho. Serão vistos também os processos de reflexão e refração da luz, a emissão de raios X característicos, a produção de fluorescência de raios X, a interação da radiação ionizante com a matéria e o modelo de análise quantitativa usando Fluorescência de Raios X por Reflexão Total.

#### III.1 - A Essencialidade dos Elementos Químicos para a Vida Humana

Existe uma série de elementos químicos que são considerados *essenciais* para a vida humana. Para que um determinado elemento químico seja considerado essencial, este deve se atender algumas condições (**GIBSON, 1989; ANDERSON, 2002 e FRANCO, 2005**):

- a) A ingestão insuficiente do elemento químico provoca deficiências funcionais reversíveis se o elemento retornar as suas concentrações adequadas;
- b) Perante a ausência do elemento, o organismo não desenvolve nem completa seu ciclo vital;
- c) O elemento influencia diretamente o organismo através dos seus processos metabólicos;
- d) O mesmo efeito no organismo não pode ser conseguido por nenhum outro elemento.

Alguns elementos químicos não são essenciais apesar de estarem presentes no organismo. É provável que um elemento se incorpore ao organismo como, por exemplo,

através da ingestão ou inalação de compostos químicos, medicamentos, pesticidas ou produtos derivados de solventes. Dessa maneira, o indivíduo pode a curto, médio ou longo prazo desenvolver doenças, entre elas, as Leucemias e até mesmo a Púrpura Trombocitopênica Idiopática. Comprovar e verificar a deficiência de um elemento não é um estudo tão fácil devido às pequenas concentrações envolvidas no metabolismo.

Acredita-se que a importância dos elementos químicos está relacionada a sua abundância e acessibilidade. Qualquer elemento, seja ele essencial ou não, pode ser tóxico a partir de certo limite. Para cada elemento químico há uma faixa de concentração considerada *ótima* para o organismo (PESCE et al, 1999). Dentro dessa faixa de concentração, o organismo é capaz de desenvolver adequadamente as funções que dependem deste elemento, mas quando o nível de concentração é muito alto são produzidos efeitos tóxicos que causam doenças e até mesmo a morte do indivíduo.

Os *mecanismos homeostáticos* regulam os níveis ótimos de cada elemento no organismo humano. Esses mecanismos controlam a absorção, armazenamento e excreção dos elementos químicos. O organismo pode apresentar deficiência ou excesso de um elemento devido a dieta, problemas no mecanismo de absorção e provavelmente devido a deficiência do mecanismo homeostático gerada por determinadas doenças. O **APÊNDICE A** apresenta alguns elementos químicos essenciais e suas respectivas funções no organismo humano.

### **III.2 – Hematopoese – A Origem do Sangue**

O termo *hematopoese* ou *hemopoese* significa o processo altamente organizado de formação das células sanguíneas do sangue. Envolve todos os fenômenos relacionados com a origem, com a multiplicação e com a maturação das células primordiais ou precursoras das células do sangue, ao nível da medula óssea. Estas células precursoras estão em grande atividade proliferativa e maturativa, garantindo a manutenção do número de células maduras em circulação. O controle da proliferação, diferenciação e maturação dessas células é feito através de uma complexa interação molecular das células com o microambiente da medula óssea. Esse microambiente complexo produz glicoproteínas solúveis genericamente chamadas de citocinas que controlam a mitose e

a diferenciação das células hematopoéticas. Nos processos neoplásicos, especialmente os malignos, ocorrem alterações moleculares induzindo nas células um comportamento biológico anormal (ANJOS et al, 2000c).

O sangue é composto de três linhagens ou séries diferentes de células (*eritrócitos, leucócitos e plaquetas*), que se originam a partir de uma mesma célula-mãe única, denominada *célula pluripotente ou célula tronco* (OLIVEIRA et al, 1991, LORENZI et al, 1999 e ZAGO et al, 2001). Há duas linhagens de células indiferenciadas: a *linhagem mielóide* e a *linhagem linfóide*. A célula indiferenciada mielóide possui capacidade de diferenciação para as linhagens granulócita, eritrocitária, monocitária e megacariocitária. A célula indiferenciada linfóide origina os linfócitos T e os linfócitos B, ambos também produzidos na medula óssea. As células indiferenciadas mielóide e linfóide se diferenciam das células pluripotentes por sua incapacidade de auto-renovação. A auto-renovação é a principal característica das células pluripotentes.

Todas as células indiferenciadas pluripotentes se originam na fase embrionária ao nível de saco vitelino. A partir do saco vitelino, essas células vão para a circulação embrionária e se fixam em determinadas regiões bem específicas do embrião e posteriormente no, onde há uma riqueza vascular muito grande. Dentre essas regiões destacam-se o baço, o fígado e a medula óssea (LORENZI et al, 1999 e ZAGO et al, 2001).

O principal órgão formador das células sanguíneas é a medula óssea. Nela, as células pluripotentes estão localizadas produzindo constantemente células adultas. Do período pré-natal ao nascimento, a medula óssea existe em praticamente todos os ossos. A medula óssea é muito vascularizada e tem cor vermelha escura (medula vermelha). A medida que deixa de ser ativa, vai se tornando amarela, rica em células gordurosas (medula amarela). A estrutura da medula óssea permite a proliferação ou multiplicação das células pluripotentes e, ao mesmo tempo, a diferenciação destas (OLIVEIRA, 1990). As células indiferenciadas pluripotentes formam um compartimento que deve manter suas características normais praticamente constantes ao longo da vida do indivíduo. Qualquer agente que atue sobre este compartimento, reduzindo o número ou alterando a qualidade dessas células, irá perturbar toda a hematopoese normal.

### **III.3 – A Medula Óssea**

A medula óssea se localiza na parte esponjosa dos ossos chatos, onde o desenvolvimento das células do sangue acontece. Todos os ossos possuem medula ativa no nascimento. Quando o indivíduo atinge a fase adulta, seus ossos das mãos, pés, braços e pernas perdem a medula funcional. As vértebras, ossos dos quadris, os ossos dos ombros, das costelas, os ossos da caixa torácica e do crânio contêm medula que continua produzindo os glóbulos vermelhos (**HOFFMAN et al, 2000 e ZAGO et al, 2001**).

A medula óssea é constituída por um tecido esponjoso mole localizado no interior dos ossos longos. É nela que o organismo produz praticamente todas as “células” do sangue: hemácias (eritrócitos ou células vermelhas), leucócitos (células brancas) e plaquetas (trombócitos). Estas “células” sangüíneas são renovadas continuamente e a medula óssea é quem se encarrega desta renovação. Trata-se, portanto de um tecido de grande atividade evidenciada pelo grande número de multiplicações celulares (**OLIVEIRA, 1990**).

### **III.4 – O Sangue e Seus Componentes**

O sangue é constituído basicamente pelo plasma, pelos os glóbulos vermelhos (eritrócitos), pelos glóbulos brancos (leucócitos) e pelas plaquetas (trombócitos). Cada componente tem um papel importante e vital para o sangue e conseqüentemente para a vida dos seres vivos. O sangue pode ser separado em componentes celular e extracelular por meio de centrifugação (**OLIVEIRA et al, 1991, HOFFMAN et al, 2000 e ZAGO et al, 2001**).

#### **III.4.1 - O Plasma**

O Plasma é um líquido acelular ou extracelular do sangue. A água constitui 93% do volume plasmático. Cerca de 5 a 7% do seu volume é constituído de proteínas moleculares.



As proteínas plasmáticas são sintetizadas no fígado e adicionadas à corrente sanguínea enquanto passam pelos capilares hepáticos. 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.

Quando o sangue é centrifugado, o plasma, que é mais leve do que as células, permanece na parte superior do tubo. Para a obtenção do plasma deve-se evitar a coagulação adicionando-se um anticoagulante ao sangue.

O plasma contém pequena quantidade de gases (oxigênio, dióxido de carbono e nitrogênio) em solução. Somente 1% do oxigênio carregado no sangue é na forma dissolvida. Os 99 % restantes são carregados em combinação química com hemoglobina presente nas hemácias (células vermelhas) do sangue.

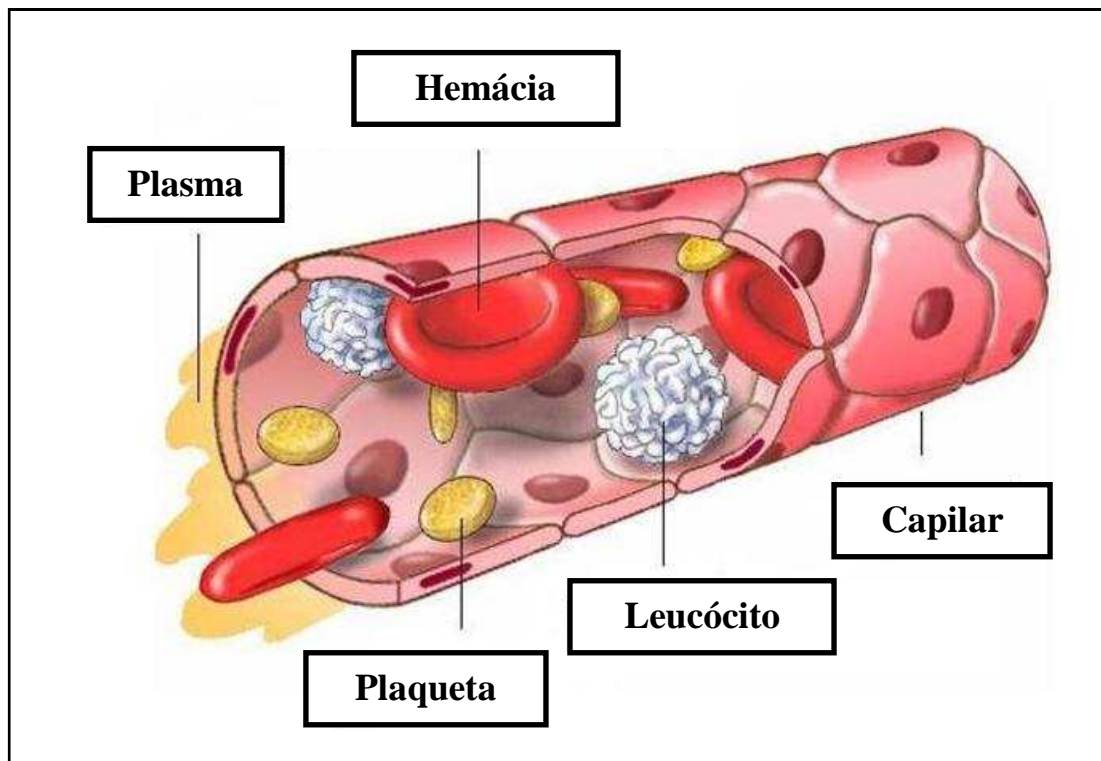
#### **III.4.1.1 - Plasma e Soro – A Diferença**

O plasma é o líquido que fica sobre os elementos figurados do sangue resultante da centrifugação do sangue total quando coletado em tubos contendo anticoagulante. No entanto, 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.

#### **III.4.2 – O Sangue e Suas Células – Elementos Figurados**

As células (elementos figurados) constituem de 30 a 55% do volume sanguíneo. A fração de células no sangue é denominada hematócrito. A maioria dos componentes celulares tem aparência vermelha, porque a maior parte das células do sangue é constituída de eritrócitos ou células vermelhas do sangue. Os eritrócitos possuem a hemoglobina que funciona como “carregadora” de oxigênio e de dióxido de carbono. Os leucócitos ou células brancas são mais leves e se encontram numa camada fina acima dos eritrócitos. Os leucócitos são fundamentais para a resposta imune e alérgica do

organismo. Tanto os eritrócitos quanto os leucócitos são produzidos na medula óssea. Um terceiro grupo de células são as plaquetas, estas participam na hemostasia (controle de sangramento, coagulação e coágulos) (OLIVEIRA et al, 1991 e LORENZI et al, 1999). A figura 3.1 mostra os principais componentes do sangue.



**Figura 3.1** – O sangue e seus principais componentes.

#### **III.4.2.1 – As Hemácias (Glóbulos Vermelhos ou Eritrócitos)**

As hemácias (glóbulos vermelhos ou eritrócitos) são responsáveis pelo transporte de oxigênio dos pulmões para os tecidos, através da hemoglobina. São produzidas no interior dos ossos, a partir de células da medula óssea vermelha e se dispõem na forma de discos bicôncavos com diâmetro de cerca de 7,6  $\mu\text{m}$  e uma espessura de aproximadamente 1,0  $\mu\text{m}$  no centro e 2,8  $\mu\text{m}$  na borda. O número aproximado de hemácias é de 5 a 5,5 milhões. $\text{mm}^{-3}$  de sangue nos homens e de 4,5 a 5 milhões. $\text{mm}^{-3}$  nas mulheres, ocupando aproximadamente 45% do volume sanguíneo.

Durante os estágios iniciais da hematopoese, as células dividem-se muitas vezes e mudam de cor, devido à progressiva formação de maiores quantidades de hemoglobina.

No estágio de normoblasto, o núcleo se degenera e a célula transforma-se num reticulócito. É nesse estágio que geralmente a célula deixa a medula óssea. O reticulócito contém ainda pequenos filamentos de retículo endoplasmático e continua a produzir pequenas quantidades de hemoglobina. Contudo, o retículo degenera dentro de um ou dois dias e se transforma numa célula madura: a hemácia, que circula pelo sangue durante aproximadamente 120 dias, antes de ser destruída.

As hemácias não podem ser propriamente chamadas de células porque não possuem núcleo e compõem-se, fundamentalmente, de uma proteína contendo ferro e de um constituinte lipóide que parece estar em grande concentração na membrana plasmática.

### **III.4.2.2 - Os Leucócitos (Glóbulos Brancos)**

Os leucócitos (glóbulos brancos) são células especializadas na defesa do organismo, combatendo vírus, bactérias e outros agentes invasores que penetram no corpo. Apresentam-se de tamanhos diferentes e, em média, têm cerca de 10  $\mu\text{m}$ . São muito menos numerosos que os eritrócitos e, em um indivíduo sadio existem entre 5.000 a 8.000 leucócitos. $\text{mm}^{-3}$  de sangue. Basicamente, os leucócitos são divididos em **(LORENZI et al, 1999)**:

- a) Neutrófilos: Atuam na defesa do organismo contra processos infecciosos através de algumas propriedades que lhe são próprios, como quimiotaxia, fagocitose, ação bactericida e digestão de bactéria através de enzimas presentes nas granulações como fosfatase alcalina e a peroxidase.
- b) Eosinófilos: Fagocitam partículas estranhas e se proliferam em resposta a estímulos imunológicos (processos alérgicos, por exemplo), além de estarem aumentados nas infecções parasitárias. Participam do transporte e da síntese de plasminogênio.
- c) Basófilos: Suas granulações são ricas em histamina e heparina, portanto das reações de hipersensibilidade retardada (asma alérgica, por exemplo). Estão

aumentados na lipemia posprandial, pois participam do metabolismo dos triglicérides.

- d) Linfócitos T: Atuam na imunidade mediada por células, é o caso da rejeição de enxertos, defesas contra organismos intracelulares como o bacilo de Kock, hipersensibilidade tardia, etc.
- e) Linfócitos B: Atuam na imunidade humoral ou produção de anticorpos, seja sob a forma de linfócito ou após sua diferenciação em plasmócito.
- f) Monócitos: Permanece no sangue poucos dias, depois atravessa a parede dos capilares, penetrando no tecido conjuntivo e em alguns órgãos transformando-se em macrófago que vai constituir o sistema mononuclear fagocitário, desempenhando importante papel na defesa contra microorganismos. Os monócitos integram a imunidade tanto humoral quanto a celular proporcionando o contato do antígeno com o linfócito.

Denomina-se *leucocitose* o fenômeno em que o número de leucócitos fica acima de  $10.000 \text{ mm}^{-3}$  de sangue e *leucopenia* quando ficam abaixo de  $2.000 \text{ mm}^{-3}$  de sangue. A leucocitose geralmente ocorre devido a uma infecção, enquanto a leucopenia predispõe o organismo a infecções. Os monócitos do sangue podem atravessar por *diapedese* (movimento das células da defesa para fora dos vasos sanguíneos) os vasos sanguíneos e alojar-se em outros tecidos, dando origem a diferentes tipos celulares, que têm em comum a grande capacidade de fagocitose: nos tecidos conjuntivos de propriedades gerais dão origem aos macrófagos; no fígado, às células de Kupffer; no tecido nervoso, às células micróglia.

#### **III.4.2.3 - As Plaquetas (Tromboplastídeos ou Trombócitos)**

As plaquetas (tromboplastídeos ou trombócitos) são pequenas (2 a 4  $\mu\text{m}$  de diâmetro) massas de protoplasma, as quais têm papel importante no processo de coagulação do sangue.

Os megacariócitos desintegram-se, enquanto ainda estão na medula óssea, liberando depois as plaquetas no sangue. A concentração normal de plaquetas no sangue situa-se em torno de 150.000 a 300.000 plaquetas  $\text{mm}^{-3}$  de sangue (OLIVEIRA, 1990).

Na *trombocitopenia* ocorre redução do número de plaquetas circulantes, o que predispõe o paciente a um grande número de minúsculos pontos hemorrágicos na pele e nos tecidos profundos, uma vez que o método de tamponamento plaquetário para interromper pequenas hemorragias vasculares se torna deficiente. A trombocitopenia pode ser determinada geneticamente, porém a maioria dos casos resulta de intoxicação por toxinas, por medicamentos ou por produtos químicos derivados do benzeno.

Na *trombocitose* ocorre aumento do número de plaquetas circulantes, podendo levar à formação de trombos (coágulos), predispondo o indivíduo à trombose, que é a solidificação do sangue dentro do coração ou dos vasos. Geralmente é determinada geneticamente.

### III.5 – As Linhagens Mielóide e Linfóide

O processo de proliferação e de diferenciação das células hematopoéticas indiferenciadas ou células tronco é um mecanismo complexo que depende também da presença de proteínas nucleares, citoplasmáticas e da ação de vários tipos de genes. Tais genes podem sofrer mutações de modo que o programa de diferenciação fica alterado. A alteração deste programa de diferenciação está relacionada com o aparecimento da leucemia, a qual se caracteriza pela desordem da proliferação celular ou pela produção de um clone anormal celular. Este mecanismo de diferenciação vem sendo amplamente estudado em relação às células humanas normais e leucêmicas das diferentes linhagens mielóide e linfóide (OLIVEIRA et al, 1991 e LORENZI et al, 1999).

Basicamente, do ponto de vista citológico, a leucemia classifica-se em dois grupos principais: *mielóide* e *linfóide*. Esses grupos podem ser subdivididos conforme o grau de maturidade celular em formas imaturas, que têm em geral uma evolução aguda e em formas maduras, que têm por sua vez uma evolução crônica.

### III.6 - Protooncogenes e Oncogenes

Quando não existe a translocação e cada gene está no seu respectivo cromossomo, eles exercem sua função normal, tendo um papel importante no controle da divisão e maturação celular sendo chamados de *protooncogenese*. Após translocação passam a ser chamados de *oncogeneses* (BUDILON, 1995, CARSON et al, 1995 e SINCLAIR et al, 2000).

Os *protooncogenes* são genes promotores do crescimento e diferenciação celulares, controlando a divisão celular de maneira ordenada. Se um protooncogene sofre qualquer alteração estrutural (mutação, rearranjo, translocação) levando à formação de uma proteína anormal ou sofre alteração na regulação da sua expressão (produção aumentada ou diminuída de uma proteína normal) ele passa a ser um *oncogene*.

### III. 7 – Leucemogênese

A *leucemogênese* é um fenômeno complexo caracterizado por anomalias de proliferação e diferenciação resultando em bloqueio de maturação e expansão clonal de células leucêmicas. A habilidade em responder a fatores exógenos de diferenciação apresenta-se diminuída em células da leucemia, podendo ocorrer alteração na expressão de produtos gênicos específicos necessários para a diferenciação celular (KRAJINOVIC et al, 2004).

A etiologia das leucemias em geral, não é bem esclarecida, porém acredita-se que um ou mais determinantes ambientais atuem em um momento particular de um indivíduo suscetível resultando na produção de um clone anormal celular e conseqüentemente no surgimento da doença. Alguns fatores podem ser desencadeantes como: radiação ionizante, drogas e agentes químicos (cloranfenicol, fenilbutazona ou benzeno), viroses e fatores genéticos.

### III.8 - Leucemia Mielóide Crônica (LMC)

A Leucemia Mielóide Crônica é responsável por 20% de todos os casos de leucemias e por aproximadamente 3% das leucemias na infância. A faixa etária predominante fica entre 25 e 60 anos, com um número maior de doentes com sexo masculino (WILLIAMS, 1996, FADERL et al, 1999, DEININGER et al, 2000 e WANG et al, 2001).

No início a doença é assintomática. Gradativamente, os sintomas vão se ligando ao metabolismo como: perda de peso, anorexia, febre, sudorese noturna, fadiga, fraqueza e dores ósseas. A apresentação de palidez, dispnéia e taquicardia são sintomas relacionados à anemia, seguida de manifestações hemorrágicas, infiltrações cutâneas e hepatomegalia.

A LMC é causada pela translocação cromossômica que ocorre entre os cromossomos 9 e 22 t(9;22). A troca entre os fragmentos cromossômicos se dá entre os braços longos (q) de ambos os cromossomos, logo o cromossomo 22 fica muito menor em relação aos cromossomos pequenos do grupo g (compostos pelos pares 21 e 22) (MAJLIS et al, 1996, SAWER et al, 1999, SINCLAIR et al, 2000 e WANG et al, 2001). Esse cromossomo muito pequeno foi chamado de Philadelphia (22 translocado) pelo fato de ter sido descoberto na Philadelphia, Estados Unidos da América.

O cromossomo Philadelphia faz a junção dos genes *bcr* e *abl*, onde o *bcr* está localizado no braço longo do cromossomo 22 e é seu ponto de quebra e *abl* está localizado no braço longo do cromossomo 9 (GHAFFARI et al, 1999, SINCLAIR et al, 2000 e POLAK et al, 2000). A partir desta junção se forma uma proteína quimérica, já que as bases nitrogenadas mudaram de sequência. Esta proteína formada não regula a divisão celular e as células da linhagem mielóide (plaquetas e granulócitos) passam a se dividir independente da necessidade do sangue periférico e/ou dos tecidos. A contagem global de leucócitos tende a ser elevada.

A LMC apresenta três fases basicamente (**WILLIAMS, 1996, HOFFMAN et al, 2000 e WANG et al, 2001**):

- I. Fase Crônica - Diagnóstico da doença.  
(2-5 anos)
  
- II. Fase Acelerada - Transição entre a forma crônica e aguda.  
(6-18 meses)
  
- III. Fase Blástica - A LMC se comporta como aguda e o paciente vai ao óbito.  
(3-4 meses).

O tratamento da LMC deve ser iniciado imediatamente após diagnóstico. Nesse caso, são ministrados quimioterapia e medicamentos associados. Em alguns casos é indicado o transplante de medula óssea (**FADERL et al, 1999, THIJSIN et al, 1999 e WANG et al, 2001**).

### **III.9 - Leucemia Mielóide Aguda (LMA)**

A Leucemia Mielóide Aguda é o tipo de leucemia aguda mais comum e mais de 80% dos casos ocorre em adultos. Este tipo de leucemia representa cerca de 15-20% das leucemias agudas da infância com pico de incidência entre 40 e 60 anos. A LMA é mais comum em homens do que em mulheres embora as causas para este fato não sejam claras. A designação *aguda* refere-se à rapidez com que se desenvolve este tipo de leucemia.

A LMA é uma doença clonal do tecido hematopoético que se caracteriza pela proliferação anormal de células progenitoras da linhagem mielóide, ocasionando produção insuficiente de células sanguíneas maduras normais. (**BITTENCOURT et al, 2003**). O mecanismo que leva a célula progenitora da linhagem mielóide a perder o controle da proliferação celular, ocasionando a expansão do clone leucêmico, permanece incerto.



A origem da LMA localiza-se na medula óssea, mas na maioria dos casos, passa rapidamente para o sangue periférico, podendo espalhar-se para outras partes do corpo, incluindo os nódulos linfáticos, fígado, baço e sistema nervoso central.

Perda de peso e febre são alguns dos primeiros sintomas. Devido a produção insuficiente de células sanguíneas maduras normais, verifica-se contagem baixa de:

- a) glóbulos brancos/leucócitos (*leucopenia*), e de granulócitos maduros (neutropénia), o que aumenta o risco de infecções
- b) glóbulos vermelhos/eritrócitos/hemácias (*anemia*), o que causa palidez, cansaço, falta de ar e palpitações cardíacas.
- c) Plaquetas/trombócitos (*trombocitopenia*), o que provoca maior tendência para equimoses e hemorragias, úlceras do lábio e da boca.

O tratamento principal da LMA consiste na aplicação de quimioterapia, às vezes seguida de transplante de medula óssea. Em certos casos, este tratamento pode aliar-se à radioterapia. O tratamento da trombocitopenia ou plaquetopenia (redução do número de plaquetas no sangue) consiste principalmente em transfusão de plaquetas (**ROWE, 2001**).

### **III.10- Leucemia Linfóide Crônica (LLC)**

A Leucemia Linfóide Crônica é um distúrbio linfoproliferativo caracterizado pela proliferação e acúmulo de linfócitos B neoplásicos maduros. (**DIGHIERO, 2005**). Ocorre geralmente em indivíduos com mais 60 anos de idade. É duas vezes mais freqüente nos homens do que nas mulheres. É a leucemia mais freqüente nos países ocidentais, ocupando de 20 a 30% de todas as leucemias do adulto, sendo extremamente rara nos países asiáticos.

Inicialmente, os sintomas da LLC são brandos. Logo, um indivíduo pode conviver com essa doença durante anos de forma assintomática até que ela se torne clinicamente exuberante, começando pela fraqueza e pela anemia seguida de linfadenopatia (doença no sistema linfático), quase sempre presente, esplenomegalia (aumento do baço) e hepatomegalia (aumento do fígado) (**CHIATTONE, 2005**).

A LLC apresenta-se habitualmente no paciente com idade acima de 60 anos, motivo pelo qual muitas vezes o tratamento quimioterápico agressivo não é utilizado, atingindo-se assim índices de cura reduzidos. Outro motivo que leva o tratamento a ser feito de forma paliativa é a característica da doença que, muitas vezes, não requer uma intervenção terapêutica, vivendo o paciente por volta de 20 anos sem maiores problemas (**YAMAMOTO, et al, 2005**).

### **III.11 - Leucemia Linfóide Aguda (LLA)**

A Leucemia Linfóide Aguda é responsável por 70% das leucemias agudas na infância, com o pico de incidência entre os 2 e 12 anos de idade. A LLA também ocorre em adultos, onde compreende 20% do total das leucemias agudas. É uma neoplasia do sistema hematopoético caracterizada pela alteração do crescimento e da proliferação das células linfóides na medula óssea, com conseqüente acúmulo de células jovens indiferenciadas chamadas blastos (**LANZKOWSKY et al, 1995**).

Os primeiros sintomas são mal-estares, perda de peso, suor noturno, fadiga, saciedade precoce e febre baixa constante devido ao estado hipermetabólico, além do aumento do volume abdominal devido a esplenomegalia (aumento do baço) (**IKEUTI et al, 2006**). Gradativamente, podem surgir trombozes arteriais que levam aos primeiros sintomas isquêmicos no cérebro, coração (coronária), perturbações visuais e trombose venosa. Em casos extremos, quando o aumento do número de leucócito é exagerado (leucocitose) chegando até  $500.000 \text{ mm}^{-3}$ , o paciente apresenta visão turva, alteração do estado mental e estresse respiratório.

O tratamento visa exterminar as células leucêmicas com quimioterapia intensa. Após a recuperação inicial por parte do paciente, faz-se quimioterapia de consolidação para prolongar a cura, seguida de terapia de manutenção por 3 anos no mínimo.

### **III.12 – Anemia Falciforme (AF)**

A Anemia Falciforme é uma doença hereditária do sangue que afeta por ano, 1500 nascimentos no Brasil. É a mais comum das alterações hematológicas hereditárias conhecidas no homem. Sua distribuição no mundo afeta principalmente os negros da África e da América do Norte, bem como algumas populações latinas. É estimado que no Brasil haja cerca de 7 milhões de portadores apenas do traço falciforme (HbAS), e cerca de 10 mil são portadores de doenças falciformes.

A ocorrência da AF está ligada à presença nas hemácias de uma hemoglobina anormal (hemoglobina S), que ao transportar menos oxigênio, adquire uma forma alongada. Isto provoca uma deformação nas hemácias, fenômeno esse conhecido como *falcização*, tornando-se parecidas com foices, daí o nome falciforme. Essa deformação concorre para uma prematura destruição pelo Sistema Retículo Endotelial, que lhes dá uma sobrevivência de 15 a 60 dias, quando normalmente viveriam 120 dias. Essas hemácias falciformes apresentam uma tendência a aderirem-se uma às outras formando trombos intravasculares, que são responsáveis pelas crises vaso - oclusivas características da própria da doença.

O termo falciforme define um grupo de doenças nas quais pelo menos umas das hemoglobinas é a hemoglobina S. A forma mais freqüente e também a mais grave, é a homozigótica que é denominada Anemia Falciforme ou Drepanocitose (Hb SS) e ocorre quando a criança herda de ambos os pais o gene S.

A AF pode se manifestar de maneiras diferentes de um indivíduo para o outro. Alguns indivíduos possuem apenas alguns sintomas leves enquanto outros já apresentam maior intensidade de manifestações clínicas. A seguir alguns sintomas (BRAGA, 2007):

- a) Crise de dor: É o sintoma mais freqüente da doença falciforme causado pela obstrução de pequenos vasos sanguíneos pelos glóbulos vermelhos em foice. A dor é mais freqüente nos ossos e nas articulações, podendo, porém, atingir qualquer parte do corpo. Essas crises têm duração variável e podem ocorrer várias vezes ao ano. Geralmente são associadas ao tempo frio, infecções, período pré-menstrual, problemas emocionais, gravidez ou desidratação.
  
- b) Icterícia (cor amarela nos olhos): É o sinal mais freqüente da doença. O quadro não é contagioso e não deve ser confundido com hepatite. Quando o glóbulo vermelho se rompe, aparece um pigmento amarelo no sangue que se chama bilirrubina fazendo com que o branco dos olhos fique amarelo.
  
- c) Síndrome mão-pé: Nas crianças pequenas as crises de dor podem ocorrer nos pequenos vasos sanguíneos das mãos e pés causando inchaço, dor e vermelhidão no local.
  
- d) Infecções: As pessoas com doença falciforme têm maior propensão a infecções e principalmente as crianças podem ter mais pneumonias e meningites. Por isso elas devem receber vacinas especiais para prevenir estas complicações.
  
- e) Úlcera de Perna: Ocorrem mais freqüentemente, próximo aos tornozelos, a partir da adolescência. As úlceras podem levar anos para a cicatrização completa, se não forem bem cuidadas no início do seu aparecimento.
  
- f) Sequestro do Sangue pelo Baço: Neste caso há palidez e aumento de volume desse órgão.

O diagnóstico ideal deve ser feito ainda no recém-nascido, através do teste de triagem neonatal ou "Teste do Pezinho". A AF é extremamente variável quanto à sua história natural, gravidade e resposta à intervenção clínica. Vários fatores influenciam a evolução desta doença. Não existe cura, mas existem diversos tratamentos adequados inclusive para as formas mais graves.

O tratamento profilático precoce e o acompanhamento das crianças acometidas são as melhores formas de reduzir a intensidade das manifestações clínicas e a mortalidade pela doença. São necessários cuidados médicos sistemáticos para a detecção precoce das várias manifestações da doença que abrange desde medidas gerais, tais como educação continuada ao paciente e seus familiares, hidratação, uso contínuo de ácido fólico, e outras orientações, bem como a prevenção de infecções com o uso de vacinas de forma rotineira e antibioticoterapia profilática. A deficiência de Zinco (Zn) tem sido sugerida como uma das causas do atraso do crescimento e do aumento do número de úlceras de perna nesse pacientes **(BRAGA et al, 1995)**.

### **III.13 - Púrpura Trombocitopênica Idiopática (PTI)**

A Púrpura Trombocitopênica Idiopática é uma doença que pode ou não ser congênita. Seu principal sintoma se deve à trombocitopenia ou plaquetopenia, que é a diminuição do número das plaquetas no sangue. **(CINES et al, 2002)**. Como a maioria dos casos parece estar relacionados ao aparecimento de anticorpos contra as plaquetas, ela também é conhecida como Púrpura Trombocitopênica Imunológica (Auto-imune). A PTI afeta, geralmente, mais as mulheres do que os homens e é mais comum em crianças que em adultos. Não há diferença de sexo nas crianças. Os fatores de risco são desconhecidos. A incidência é de 1 para um grupo de 10.000 indivíduos **(GEORGE, 2002)**.

Os sintomas iniciais são pequenas manchas avermelhadas (petéquias) sob a pele devido ao rompimento de capilares sanguíneos, que com o tempo passam a se manifestar como hematomas, à medida que a velocidade de coagulação do sangue diminui. O doente pode sangrar facilmente por mucosas, como a da boca e do nariz (epistaxe), além de frequentemente apresentar hematúria (sangue na urina) **(WILLIAMS, 1996)**.

A fragilidade capilar pode ser causada por deficiência de vitamina C, manifestações alérgicas, hormonais, doenças genéticas, deficiência na estrutura da pele pelo envelhecimento natural (púrpura senil) ou não possuir uma causa determinada. Quando é possível identificar a causa da manifestação, o tratamento é feito com a

eliminação do fator (por exemplo, do contato com a substância que o induziu) (PROVAN et al, 2002).

O tratamento inicial da PTI é feito à base de corticóides (corticosteróides, anti-inflamatórios hormonais) sistêmicos, geralmente com prednisona, para controle da reação auto-imune. Quando não surte efeito em até 1 ano, indica-se a esplenectomia (remoção cirúrgica do baço), com a finalidade de diminuir a quantidade de plaquetas que são removidas do sangue por esse órgão. Devido à presença de anticorpos antiplaquetários, transfusões sanguíneas não constituem o tratamento adequado para essa doença, já que os níveis plaquetários voltam a decrescer um certo tempo após a realização da transfusão (PROVAN et al, 2006).

A tabela 3.1 mostra cada patologia em relação a sua incidência, faixa etária e predominância de sexo.

**Tabela 3.1** – Relação entre cada doença hematológica estudada com a sua incidência, faixa-etária e sexo predominante (em 100.000 indivíduos).

Patologia	Incidência		Faixa Etária	Sexo/Predominância
	População (%)	Infância (%)		
LMC	20 <sup>a</sup>	3	25-60	Masculino
LMA	80 <sup>a</sup>	15-20	40-60	Masculino
LLC	20-30 <sup>a,c</sup>	-	>60	Masculino (2x>)
LLA	20 <sup>a</sup>	70	2-12	Masculino
AF	0,1 a 0,3 <sup>b</sup>	-	-	Masculino/Feminino
PTI	0,01 <sup>b</sup>	5	20-50	Feminino

<sup>a</sup> Porcentagem de incidência em relação à ocorrência de todas as leucemias.

<sup>b</sup> Porcentagem de incidência desta patologia no mundo.

<sup>c</sup> Extremamente rara nos países asiáticos. Comum nos países ocidentais.

### III.14 - A Emissão de Raios X Característicos

Para provocar a emissão dos raios X característicos dos elementos que constituem uma determinada amostra, a excitação pode ser feita de várias maneiras: excitação como partículas carregadas como elétrons, prótons, partículas alfas e íons ou usando radiação eletromagnética como radiação gama ou raios X.

Para haver produção de raios X característicos há necessidade de se “retirar” elétrons mais fortemente ligados, como aqueles localizados nos níveis mais internos dos átomos, por exemplo, nível K. Para que isto ocorra, a energia mínima necessária deve ser superior a energia de ligação do elétron nesse nível. A esse tipo de energia denomina-se energia de ligação eletrônica ou energia corte de absorção.

Esta energia de ligação eletrônica pode ser calculada de modo aproximado, aplicando-se a teoria atômica de Bohr para o átomo de hidrogênio e átomos hidrogenóides. Desse modo, a equação 3.5 permite o cálculo aproximado dessa energia para os elétrons das camadas K e L dos átomos de um elemento.

$$E = \frac{me^4(Z - b)^2}{8\epsilon_0^2 h^2 n^2} \quad (3.1)$$

Onde:

**E** = energia de ligação eletrônica (J);

**m** = massa de repouso do elétron =  $9,11 \cdot 10^{-31}$  kg;

**e** = carga elétrica do elétron =  $1,60 \cdot 10^{-19}$  C;

**Z** = número atômico do elemento emissor dos raios X;

**b** = constante de Moseley, com valores iguais a 1,00 e 7,40, para os níveis K e L, respectivamente;

**$\epsilon_0$**  = permissividade elétrica no vácuo =  $8,85 \cdot 10^{-12} \frac{CN}{m^2}$  ;

**h** = constante de Planck =  $6,63 \cdot 10^{-34}$  J.s; e

**n** =  $n^o$  quântico principal do nível eletrônico

(n = 1 para o nível K, n = 2 para o nível L, etc.).

Substituindo-se na equação 3.1 os valores das constantes no sistema internacional de unidades, a energia do raio X (em joules) é dada por:

$$E = 2,18 \cdot 10^{-18} \frac{(Z - b)^2}{n^2} \quad (3.2)$$

A equação 3.2 pode ser reescrita em termos de elétronvolts:

$$E = 13,65 \frac{(Z - b)^2}{n^2} \quad (3.3)$$

Pode-se observar nesta equação que a energia de ligação para um dado nível é diretamente proporcional ao quadrado do número atômico  $Z$  do elemento. Assim, para "retirar" elétrons do nível K dos elementos Al, Fe e Te, de números atômicos 13, 26 e 52, respectivamente, são necessários 1,56, 7,11 e 31,81 keV para o nível K e 0,074 - 0,723 e 4,61 keV para o nível L.

Para que ocorra uma transição entre dois estados quânticos é necessário que um elétron seja ejetado do átomo. Logo, a energia da radiação que excita o átomo, deve ser igual ou superior a energia de ligação do elétron ao átomo, neste caso  $E_K$ . Similarmente, a liberação de elétrons do nível L, gera o espectro de energia das linhas L e a energia de radiação incidente deve ser igual ou superior as energias de ligação  $E_{L1}$ ,  $E_{L2}$  e  $E_{L3}$ . Portanto, para que ocorra emissão de raios X característicos é necessário que a energia da radiação incidente seja igual ou superior a estas energias críticas. Em espectrometria de raios X, sabe-se que os estados quânticos estão associados a níveis de energias. Estes níveis de energia não dependem apenas dos dois números quânticos  $n$  e  $l$ , mas também de um outro número quântico  $j$ , que representa a soma vetorial de  $l$  e  $s$ , com a restrição que  $j$  não pode ser negativo.

$$j = l + s \quad (3.4)$$

Assim,  $j$  somente assumirá os seguintes valores:

$$j = l \pm \frac{1}{2} \quad (3.5)$$



Quando  $l$  assumir valor zero,  $j = \frac{1}{2}$ . Se  $l$  for 1;  $j = \frac{1}{2}$  e  $j = \frac{3}{2}$ ; e sucessivamente para todos os valores de  $l$ . O número máximo de elétron em um subnível é dado por:

$$n_{e^-} = 2j + 1 \quad (3.6)$$

Como um exemplo de produção de um espectro de raios X, suponha que um elétron do nível K é inicialmente removido do átomo. Na primeira etapa do processo de desexcitação, um elétron do nível L, pode realizar um salto quântico para preencher a vacância. Isto produz uma vacância no nível L, que poderá ser preenchida por um elétron no nível M, deixando uma vacância no nível M que por sua vez será preenchida por um elétron do nível N. O efeito resultante, de cada etapa, é a passagem de uma vacância para um menor nível energético. Quando a vacância atinge o nível de mais baixa energia (banda de valência), ela é preenchida por um outro elétron qualquer, livre, no material. Deste modo, o átomo fica novamente neutro e no estado fundamental. Cada transição entre estados quânticos constitui uma perda de energia, resultando na emissão de raios X, com uma energia característica bem definida para cada elemento. Estes fótons formam o a chamado espectro de raios X característicos.

A energia dos fótons emitidos será igual a diferença entre os dois estados quânticos envolvidos. Por exemplo: a transição entre um elétron do subnível  $L_3$  para o nível K, resulta na emissão de fótons chamada K- $L_3$ . A energia deste fóton é expressa como:

$$E_{K-L_3} = E_K - E_{L_3} \quad (3.7)$$

Se a transição é do subnível  $M_3$  para o nível K, temos a emissão de fótons da linha K- $M_3$ , com energia (Todos esses fótons representam as emissões da linha K):

$$E_{K-M_3} = E_K - E_{M_3} \quad (3.8)$$

Nem todas as transições entre estados quânticos ocorrem, uma vez que existem transições proibidas (EISBERG e RESNIK, 1988). Pode-se selecionar através de regras a variação dos números quânticos:

$$\begin{pmatrix} \Delta l = \pm 1 \\ \Delta j = 0, \pm 1 \end{pmatrix} \quad (3.9)$$

São permitidas apenas as transições que estão de acordo com as regras representadas pela equação 3.9. O nível L, por exemplo, possui 3 subníveis  $L_1$ ,  $L_2$  e  $L_3$ . Apenas as transições  $K-L_2$  e  $K-L_3$  ocorrem. A transição  $K-L_1$  é proibida ( $\Delta l=0$  e  $\Delta j=0$ ).

As transições entre estados quânticos são representadas em termos de um diagrama de níveis de energia. A figura 3.2 mostra, esquematicamente, os principais níveis até  $n = 4$ .

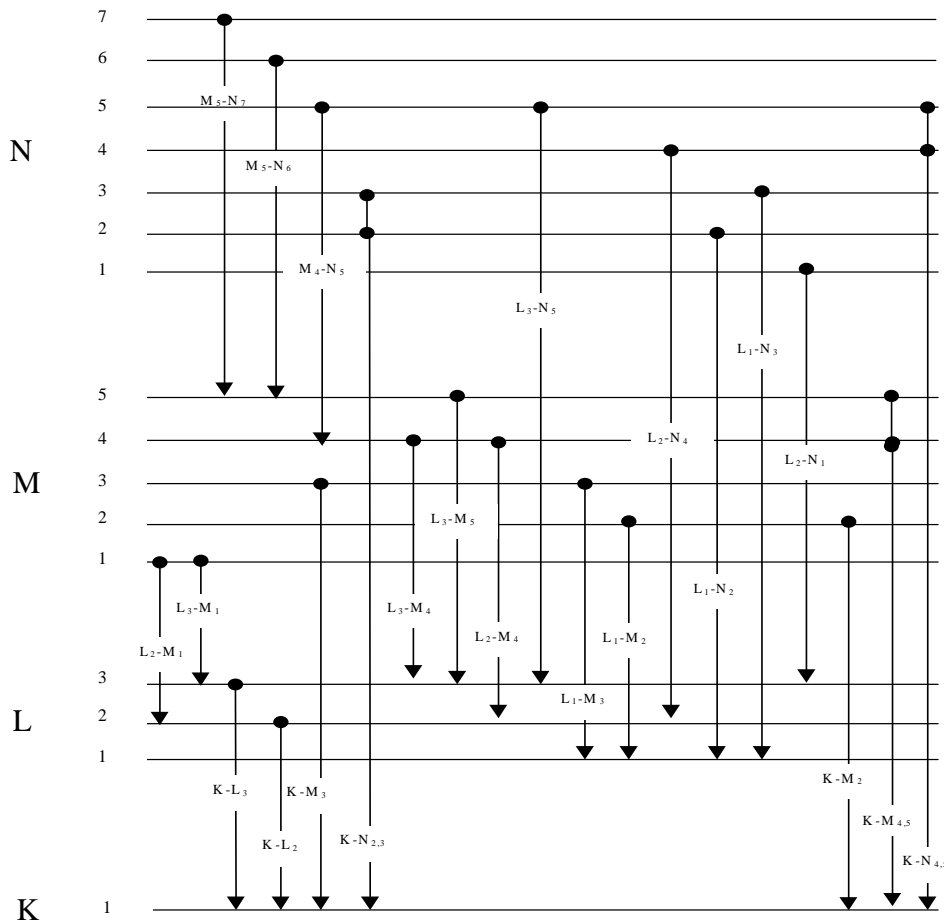
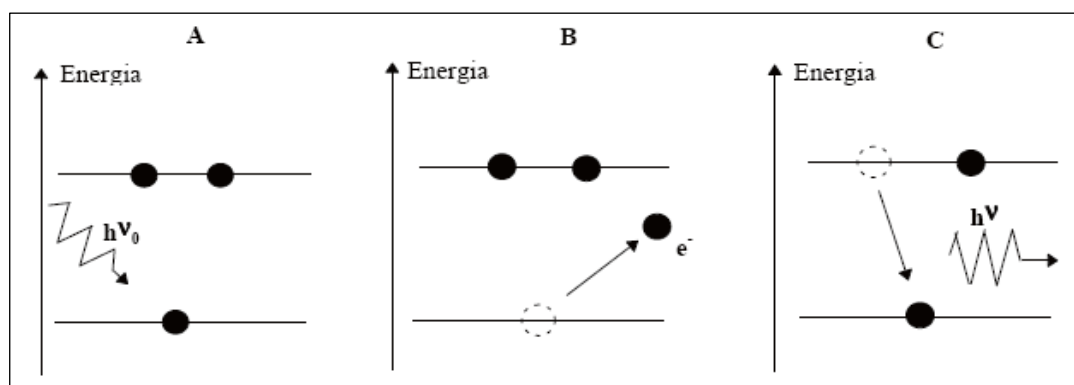


Figura 3.2 – O diagrama de energias para os níveis K, L M e N (ANJOS, 2000a)

### III.15 - A Fluorescência de Raios X

A técnica de Fluorescência de Raios X é um método quali-quantitativo baseado na medida das intensidades (número de raios X detectados por unidade de tempo) dos raios X característicos emitidos pelos elementos que constituem uma amostra (KLOCKENKAMPER, 1996). Quando um feixe de radiação ionizante incide sobre a amostra, há o processo de interação com os elementos constituintes da amostra.

Neste processo de interação pode ocorrer a ionização dos elementos (efeito fotoelétrico), e como consequência, os elementos (átomos) emitem linhas espectrais com energias características e cujas intensidades estão relacionadas com a concentração do elemento na amostra. A figura 3.3, mostra o processo do efeito fotoelétrico.



**Figura 3.3** – (A) O fóton incidente chega ao átomo, (B) Um elétron de orbital mais interno é ejetado deixando uma vacância, (C) Um elétron de orbital mais energético ocupa a vacância emitindo fluorescência.

Quando um elemento de uma amostra é excitado, este tende a ejetar os elétrons dos seus orbitais, e como consequência disto, elétrons dos níveis mais afastados realizam um salto quântico para preencher a vacância produzida. Cada transição eletrônica constitui uma perda de energia para o elétron, e esta energia é emitida na forma de um fóton de raio X, de energia característica e bem definida para cada elemento. Assim, de modo resumido, a análise por fluorescência de raios X consiste de três fases: excitação dos elementos que constituem a amostra, dispersão dos raios X característicos emitidos pela amostra e detecção desses raios X (LACHANCE e CLAISSE, 1995; ANJOS, 2000a).

### III.15.1 - A Emissão de Fluorescência de Raios X

A fração da radiação incidente que leva a emissão de uma determinada linha de raios X característicos é determinada por uma probabilidade de excitação que é produto de três outras probabilidades (PEREIRA, 2003 e COSTA, 2003):

$$P_{E_i} = P_{\text{nível}} \cdot P_{\text{linha}} \cdot P_{\text{fluorescência}} \quad (3.10)$$

Onde:

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

$P_{\text{linha}}$  é a probabilidade que uma determinada linha seja emitida dentro de sua série. Para um elétron retirado do nível K podemos ter as seguintes transições do nível L : K-L<sub>2</sub> e K-L<sub>3</sub>;

$P_{\text{fluorescência}}$  é a probabilidade de ocorrer emissão de fluorescência de raios X ao invés de elétron Auger, a partir de uma transição realizada entre dois estados quânticos.

O átomo fica excitado quando libera um elétron orbital. Os elétrons de níveis mais energéticos vão preenchendo as vacâncias produzidas. A energia na transição é liberada de duas formas:

- a) Como um fóton na forma de fluorescência de raios X;
- b) Como um elétron na forma de elétron Auger. Neste caso, o fóton liberado é reabsorvido dentro do átomo por um outro elétron. Este elétron é liberado do átomo com uma energia igual a diferença entre a energia do fóton absorvido e a energia de ligação do elétron. Uma importante consequência na emissão de elétrons Auger é o fato que o número de raios X característicos produzidos é menor do que o esperado.

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

$$\omega = \frac{n_s}{n_p} \quad (3.11)$$

$$n_p = n_s + n_A \quad (3.12)$$

Onde:

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

$n_p$  é o número de fótons que são produzidos devido as vacância nos níveis e sub-níveis atômicos;

$n_A$  é o número de fóton que são reabsorvidos dentro do átomo, produzindo elétrons Auger.

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

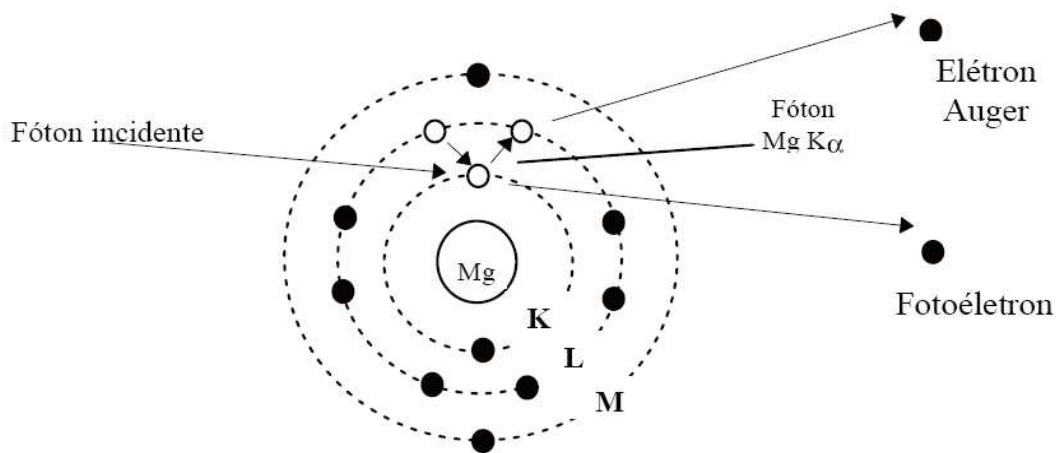
$$\omega_K = \frac{n_{K-L_3} + n_{K-L_2} + n_{K-M_3} + \dots}{N_K} = \frac{\sum n_K}{N_K} \quad (3.13)$$

É possível obter o rendimento de fluorescência  $\omega_L$  para as linhas L tendo três diferentes valores:  $\omega_{L_1}$ ,  $\omega_{L_2}$  e  $\omega_{L_3}$ .

O efeito Auger é mais comum em elementos com baixo número atômico ( $Z < 20$ ) porque os elétrons estão mais fracamente presos e os fótons característicos são mais facilmente absorvidos. A figura 3.4 é a representação esquemática do efeito Auger para um modelo clássico do elemento magnésio (Mg).

Uma das conseqüências do efeito Auger é que as linhas espectrais de uma dada série não são tão intensas como prevista pelo número de vacâncias criadas no orbital associado. As emissões de fótons de fluorescência e elétrons Auger são processos de decaimentos concorrentes e a predominância de um ou outro depende basicamente do número atômico do elemento analisado na amostra. A emissão de elétrons Auger é a principal limitação na sensibilidade de experimentos com elementos com baixo número atômico.

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



**Figura 3.4** - Representação esquemática do efeito Auger para um modelo clássico do elemento magnésio (Mg).

### III.15.2 – A Intensidade Relativa das Linhas de Raios X Característicos

A intensidade relativa entre a linha específica e as outras linhas na série dá probabilidade para que uma determinada linha específica seja emitida dentro de uma série. Assim, a probabilidade que a linha K-L<sub>2,3</sub> seja emitida em relação as outras linhas K é dada pelo fator (DE BOER, 1990 e COSTA, 2003):

$$f_{K-L_{2,3}} = \frac{I_{K-L_{2,3}}}{\sum I_{\text{todas as linhas K}}} \quad (3.14)$$

Experimentalmente a linha K-L<sub>3</sub> é, aproximadamente, duas vezes mais intensa que a linha K-L<sub>2</sub>. A intensidade relativa para linha K-L<sub>2,3</sub> é dada por:

$$f_{K-L_{2,3}} = \frac{I_{K-L_{2,3}}}{I_{K-L_{2,3}} + I_{K-M_3}} \quad (3.15)$$

Podem-se desprezar as intensidades das demais linhas que são muito pequenas.

A probabilidade de emissão da série L<sub>3</sub>-M<sub>4,5</sub> em relação as outras linhas L é:

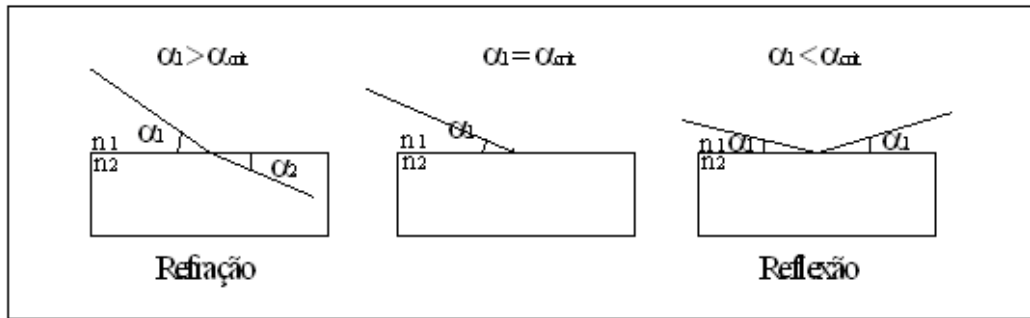
$$f_{L_3-M_{4,5}} = \frac{I_{L_3-M_{4,5}}}{\sum I_{\text{todas as linhas L}}} \quad (3.16)$$

### III.15.3 - A Fluorescência de Raios X por Reflexão Total

Devido a reflexão, ou seja, ausência de espalhamento pelo suporte, os picos de espalhamento incoerente e coerente serão bastante reduzidos no espectro de pulsos produzidos pelo detector, mesmo quando colocado o mais próximo possível da amostra (a distância entre o suporte e a janela do detector é da ordem de 5 mm). Nestas condições geométricas de excitação/deteção tem-se então a denominada fluorescência de raios X por reflexão total (TXRF).

#### III.15.3.1 - Reflexão e Refração da Luz

A reflexão e a refração acontecem quando um feixe de luz incide sobre uma interface entre dois meios com índices de refração  $n_1$  e  $n$ . A figura 3.5 mostra o esquema da refração e a reflexão da luz, onde  $\alpha_1$  é o ângulo de incidência e  $\alpha_2$  é o ângulo de refração. Na reflexão, o ângulo de incidência é igual ao de reflexão ( $\alpha_1$ ). O ângulo crítico é representado por  $\alpha_{\text{crít.}}$ .



**Figura 3.5** – Refração e Reflexão da Luz

Através da lei de Snell, tem-se a seguinte relação:

$$v_2 \cdot \cos(\alpha_1) = v_1 \cdot \cos(\alpha_2) \quad (3.17)$$

onde:  $v_1$  é a velocidade de propagação da luz no meio 1,  $v_2$  a velocidade de propagação no meio 2,  $\alpha_1$  é o ângulo de incidência e  $\alpha_2$  o ângulo de reflexão.

Dividindo-se a equação 3.17 por  $c$  (velocidade da luz no vácuo):

$$\frac{v_2}{c} \cdot \cos(\alpha_1) = \frac{v_1}{c} \cdot \cos(\alpha_2) \quad (3.18)$$

Pode-se definir o índice de refração como:

$$n = \frac{c}{v} \quad (3.19)$$

onde a velocidade da luz no meio é representada por  $v$ .

A equação 3.19 pode ser rescrita como:

$$n_1 \cdot \cos(\alpha_1) = n_2 \cdot \cos(\alpha_2) \quad (3.20)$$

onde:  $n_1$  e  $n_2$  são os índices de refração absolutos dos meios 1 e 2, respectivamente.



### III.15.3.2 – O Coeficiente de Reflexão Total

Na TXRF, parte da radiação de fundo, que é produzida no processo interação do feixe incidente e o refletor (meio 2), devem-se ao espalhamento da radiação no próprio refletor e na amostra. Por isso o coeficiente de reflexão é um parâmetro muito importante. E chega próximo de 100%, uma vez que toda radiação incidente sofre reflexão e, desta forma, o espalhamento no refletor tende a valores muito baixos.

O valor de R pode ser calculado para três situações bem distintas (**KLOCKENKAMPER, 1996 e PEREIRA, 2003**).

$$\alpha_1 \ll \alpha_{\text{crítico}} \quad R \approx 1 - \sqrt{\frac{2}{\delta}} \cdot \frac{\beta}{\delta} \cdot \alpha_1 \quad (3.21)$$

$$\alpha_1 = \alpha_{\text{Crítico}} \quad R \approx \frac{\delta + \beta - \sqrt{(2\beta\delta)}}{\delta + \beta + \sqrt{(2\beta\delta)}} \quad (3.22)$$

$$\alpha_1 \gg \alpha_{\text{crítico}} \quad R \approx \frac{\delta^2}{4\alpha_1^4} \quad (3.23)$$

### III.15.3.3 - A Refletividade e o Poder de Penetração

Se o feixe monoenergético incidir sobre uma superfície com ângulo menor que o crítico, ocorrerá a reflexão total. Isto pode ser visualizado através de uma característica denominada refletividade, que representa a razão entre as intensidades do feixe refletido e incidente, e pode ser calculada em função do ângulo de incidência (**AIGINGER e WOBRAUSCHEK, 1974; KLOCKENKAMPER, 1996**).

O poder de penetração ( $Z_p$ ) é definido como a profundidade de penetração da radiação incidente num meio homogêneo, (distância normal à superfície) de modo que sua intensidade seja reduzida a 36,8% de seu valor inicial (**AIGINGER e WOBRAUSCHEK, 1974; KLOCKENKAMPER, 1996**). Esta característica de penetrabilidade da radiação em função do ângulo de incidência tem despertado bastante

interesse na indústria de semicondutores, pela possibilidade de se analisar camadas superficiais de bolachas semicondutoras de Si e Ge, com limites de detecção da ordem de  $10^{11}$  átomos.cm<sup>-2</sup>.

A eficiência de produção de raios X característicos ( $K_{\alpha}$  e  $K_{\beta}$ ) é proporcional à tensão acima do corte de absorção aplicada no tubo, mas a elevação da alta tensão ocasionará um aumento na produção da radiação de freamento. Sendo esta energia maior que os raios X  $K_{\alpha}$  e  $K_{\beta}$ , sofrerá refração no suporte e conseqüentemente haverá radiação espalhada de modo coerente e incoerente atingindo o detector, aumentando a região desses picos e também a região do *continuum* nos espectros de pulsos. Um modo de se evitar que esta radiação de freamento atinja o suporte é a utilização de um filtro passa-baixa (*low pass filter*), também denominado de filtro cortador de alta energia (*high energy cut-off*), colocado entre o tubo e o suporte

Pode-se discriminar três situações para os valores de  $Z_p$  onde energia E é dada em keV. (KLOCKENKAMPER, 1996).

$$\alpha_1 \ll \alpha_{\text{crítico}} \quad Z_p \approx 9,87 \times 10^{-9} \cdot \frac{1}{E} \cdot \frac{1}{\sqrt{2\delta}} \quad (3.24)$$

$$\alpha_1 = \alpha_{\text{crítico}} \quad Z_p \approx 9,87 \times 10^{-9} \frac{1}{E\sqrt{\beta}} \quad (3.25)$$

$$\alpha_1 \gg \alpha_{\text{crítico}} \quad Z_p \approx 9,87 \times 10^{-9} \frac{1}{E} \frac{\alpha_1}{\beta} \quad (3.26)$$

### III.15.3.4 - A Intensidade da Radiação Fluorescente na Reflexão Total

A TXRF (geometria de  $\approx 0^\circ/90^\circ$ ) possui vantagens em relação a EDXRF convencional (geometria de  $45^\circ/45^\circ$ ) cuja intensidade da radiação é constante (campo uniforme de radiação) e diminui exponencialmente ao interagir com um material (penetração). São elas: Diminuição do *background*; dupla excitação da amostra por

ambos os feixes primário e refletido; pequena distância amostra-detector ( $\cong 1$  mm) – ângulo sólido grande; pequenos volumes da amostra; baixos limites de detecção (**KLOCKENKAMPER, 1996 e ANJOS, 2000b**).

A reflexão total ocorre num campo não homogêneo de ondas estacionárias. A intensidade da radiação na fluorescência de raios X por reflexão total está relacionada ao fenômeno de interferência e formação de ondas estacionárias na superfície do refletor. Os átomos do material ao interagirem neste campo, são excitados e produzem fluorescência de raios X com uma probabilidade proporcional à intensidade do campo de ondas estacionárias. Nesta região, há formação de ondas estacionárias com nodos e anti-nodos a partir do fenômeno de interferência. A intensidade dos nodos é zero e dos anti-nodos é aproximadamente 4 vezes a intensidade do feixe incidente. Os nodos e anti-nodos possuem um comprimento de onda da ordem de 10 nm.

Se na superfície do refletor for depositada uma fina camada de um material para análise, o feixe incidente pode penetrar na amostra e sofrer reflexão total na interface amostra/refletor, desde que o ângulo de incidência seja menor do que o ângulo crítico. Neste caso, ondas estacionárias serão produzidas na superfície da amostra, dentro da amostra e na interface amostra/refletor e novamente nodos e anti-nodos serão formados. Na reflexão total, a intensidade da radiação fluorescente possui uma dependência muito grande em relação ao ângulo de incidência e a posição da amostra no refletor.

### **III.15.3.5 – O 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 do elemento  $i$  na amostra denominada contagem líquida  $N_L$  e em parte ao *background* dos raios X característicos do elemento  $i$  na

amostra denominada contagem relativa ao background  $N_B$ . Assim, pode-se definir o limite mínimo de detecção (LMD) como a menor quantidade (concentração, massa, volume, etc) que pode ser discriminada estatisticamente em relação ao “background” de uma medida. A equação 3.23 mostra como foi obtido o LMD.

$$\mathbf{LMD} = 3\sqrt{N_B} \frac{C_i}{N_i} \quad (3.27)$$

Onde:

$N_B$  = Intensidade do background sob o pico de fluorescência de raios X para o elemento  $i$  na mostra.

$C_i$  = Concentração do elemento  $i$  na amostra.

$N_i$  = Intensidade do pico de fluorescência de raios X para o elemento  $i$  na amostra.

De modo geral, os limites de detecção para a técnica de TXRF são bem menores que aqueles da fluorescência convencional, devido principalmente a três fatores:

- 1) A baixa intensidade do *continuum*, devido a reduzida transferência de energia ao suporte da amostra em relação à EDXRF.
- 2) O fluxo da radiação primária disponível para a excitação da amostra, devido ao feixe refletido, é muito mais efetivo do que na XRF.
- 3) A distância entre a amostra (filme fino) e o detector de Si é menor que na EDXRF, aumentando, portanto a eficiência de detecção dos raios X característicos.

Estes dois últimos fatores fazem com que a sensibilidade elementar tenha valores superiores aqueles da EDXRF, e juntamente com *continuum* inferiores, resulta em limites de detecção mais satisfatórios para a TXRF.

Alguns melhoramentos nos limites de detecção podem ser alcançados se os parâmetros físicos que influenciam o limite de detecção são otimizados: a sensibilidade e o background.

A sensibilidade pode ser aumentada considerando-se:

- a) A intensidade da radiação incidente;
- b) As distâncias da fonte à amostra e da amostra ao detector;
- c) A área ativa do detector;
- d) O sistema eletrônico utilizado para processar os pulsos de voltagem, que têm origem no detector;
- e) O mecanismo de monocromatização do feixe primário para modificar a distribuição do espectro da radiação.

A intensidade do Background pode ser aumentada considerando-se:

- a) A intensidade da radiação incidente, sua distribuição espectral e a respectiva seção de choque de espalhamento para a cada amostra;
- b) A massa da amostra;
- c) A forma geométrica e do material do substrato, assim como da profundidade de penetração da radiação incidente no substrato e do coeficiente de reflexão;
- d) A medida no ar que leva o espalhamento da radiação primária e a contribuição da radiação característica do ar (Ar e Kr);
- e) O ajuste real do ângulo de incidência;
- f) O ângulo sólido do detector.

O limite de detecção para os elementos de número atômico abaixo de 13 (Al) é afetado pelo baixo rendimento de fluorescência e outras limitações bem conhecidas em energia dispersiva, como baixo valor para o efeito fotoelétrico, absorção dos raios X característicos pela janela de Be e pelo ar entre a amostra e o detector. Trabalhando sob vácuo e com detector sem janela de Be, alguns autores têm obtidos limites de detecção de 10 ng para O e 0,8 ng para Mg (STRELI et al, 1991).

### III.15.3.6 - A Análise Quantitativa da Fluorescência de Raios X por Reflexão Total

Como a técnica de TXRF exige uma quantidade muito pequena ( $\cong 5 \mu\text{L}$ ), logo a amostra pode ser considerada como um filme fino. Os efeitos de absorção podem ser desprezados devido a alta intensidade dos raios X que excitam a amostra. A concentração elementar pode ser determinada pela relação entre a intensidade da radiação fluorescente de um determinado elemento  $i$  e a sensibilidade do sistema de espectrometria para este elemento (COSTA, 2003).

A amostra depositada no refletor não possui uma geometria regular e portanto não se pode garantir a homogeneidade da geometria do sistema, uma vez que a intensidade da fluorescência dependerá da disposição da amostra em relação ao feixe. Esse efeito de geometria pode ser corrigido, calculando-se a intensidade relativa ( $I_{r,i}$ ) para cada elemento em relação a um padrão interno, com concentração conhecida, adicionado na amostra.

A equação 3.28, pode ser escrita em relação a um padrão com intensidade  $I_S$ .

$$\frac{I_i}{I_S} = \frac{K \cdot I_o \cdot S_i \cdot W_i [1 + R(\alpha)] \cdot T_{ar}}{K \cdot I_o \cdot S_S \cdot W_S [1 + R(\alpha)] \cdot T_{ar}} \quad (3.28)$$

onde:  $I_i$  é a intensidade da radiação fluorescente e  $W_i$  é a concentração do elemento  $i$  na amostra;  $I_S$  e  $W_S$  a intensidade da radiação fluorescente e a concentração do padrão interno na amostra;  $S_i$  é a sensibilidade para o elemento  $i$  e  $S_S$  é a sensibilidade para o padrão interno, logo:

$$\frac{I_i}{I_S} \cdot W_S = \frac{S_i}{S_S} \cdot W_i \quad (3.29)$$

Redefinindo equação 3.29, tem-se:

$$I_{r,i} = S_{r,i} \cdot W_i \quad (3.30)$$

onde:  $I_{r,i}$  é chamado de intensidade relativa e  $S_{r,i}$  sua sensibilidade relativa.

A relação 3.30 representa uma função linear. O que se deseja é determinar a concentração elementar  $W_i$ . A intensidade relativa é obtida através de padrões multielementares, com concentrações conhecidas.

### III.15.3.7 – A Utilização da Fonte de Luz Síncrotron na TXRF

A radiação síncrotron é a radiação eletromagnética emitida quando partículas carregadas com velocidade relativística são submetidas a aceleração radial. A utilização de uma fonte de radiação síncrotron permite alcançar limites de detecção mais baixos do que quando se utiliza um tubo de raios X de alta potência. (**KLOCKENKAMPER, 1996 e CASTRO, 2001**):

Algumas propriedades básicas da radiação síncrotron são importantes para TXRF:

1. Forma contínua em nível de infravermelho a raios X;
2. Alta intensidade;
3. Alto nível de colimação;
4. Polarização linear no plano de órbita;
5. Polarização elíptica ou circular acima e abaixo do plano da órbita para a radiação magnética da curva;

6. Tamanho da fonte é pequena determinada por feixe de elétrons;
7. Estrutura de tempo bem definida;
8. Características quantitativas conhecidas;
9. Alta estabilidade de intensidade e posição de fonte.

### III.14.3.8 – Laboratório Nacional de Luz Síncrotron (LNLS)

O Laboratório Nacional de Luz Síncrotron, localizado em Campinas, S.P., tem como objetivo fomentar o desenvolvimento científico e tecnológico, colocando ao alcance de pesquisadores do Brasil e do exterior infra-estrutura de luz síncrotron, microscópios eletrônicos de alta resolução, microscópios de varredura de ponta e espectrômetros de ressonância magnética nuclear. No LNLS existem quinze estações experimentais de luz que oferecem ótimas condições para os cientistas realizarem pesquisas com nível de competitividade mundial (LNLS, 2008). A operação do LNLS é feita pela ABTLuS para o CNPQ e para o Ministério da Ciência e Tecnologia (MCT).

A figura 3.6 mostra uma panorâmica do anel e a disposição de algumas linhas de luz no LNLS.



**Figura 3.6** - Panorâmica do anel no LNLS.



Nas instalações do LNLS, são realizados experimentos que contribuem para ampliar os conhecimentos nas áreas de Física, Química, Engenharia, Meio Ambiente, Arqueologia, Biologia, Medicina entre outras.

As amostras de soro foram analisadas através da técnica SRTXRF na linha XRF no LNLS. A linha XRF é o dipolo magnético D09B do anel de armazenamento (3 - 12 keV). As características desta linha estão dispostas na tabela 3.2.

**Tabela 3.2 - Características da Linha XRF**

<b>XRF (4 - 23 keV)</b>	<b>Características</b>
<b>Aplicações</b>	Análises químicas de elementos traços ( $Z > 14$ ) em ciências ambientais, biológicas e materiais, perfil de profundidade química de filmes finos e mapeamento químico a 20 $\mu\text{m}$ de resolução espacial.
<b>Fonte</b>	Ímã defletor D09B(15°), $\sigma_y = 0,222 \text{ mm}$ . O fluxo na amostra é de $4 \cdot 10^9 \text{ fótons.s}^{-1}$ a 8 keV.
<b>Monocromador</b>	Monocromador channel-cut.
<b>Cristais</b>	Si(111): ( $2d=6,217 \text{ \AA}$ ): 4-14 keV ( $E/\Delta E=2800$ ) Si(220): ( $2d=3,84 \text{ \AA}$ ): 5-23 keV ( $E/\Delta E=15000$ ).
<b>Detectores</b>	Detectores de estado sólido de Germânio Hiperpuro (HPGe) [resolução de 150 eV] e Si(Li) [resolução de 165 eV]; fotodiodos e câmeras de ionização.
<b>Óptica</b>	Óptica capilar com 20 $\mu\text{m}$ de resolução espacial.
<b>Manuseio das amostras</b>	Câmara de vácuo (10-2 mbar) com geometria de excitação convencional (45°-45°). Estações para experiências a incidência rasante e mapeamento 2D, ambas com controle total de posicionamento de amostras.

## **CAPÍTULO IV**

### **MATERIAIS E MÉTODOS**

Neste capítulo serão vistos os processos de aquisição e de preparação de amostras, assim como as condições de instrumentação da linha de Fluorescência de Raios X (XRF) do Laboratório Nacional de Luz Síncrotron, onde foram realizadas as medidas experimentais.

#### **IV.1 - Amostragem de Soro**

A amostragem de soro foi dividida em sete grupos: Indivíduos sadios (grupo controle), portadores de LMC, de LMA, de LLC, de LLA, de AF e de PTI.

##### **IV.1.1 - Aquisição das Amostras de Soro no HEMORIO**

Através de uma parceria com o Instituto Estadual de Hematologia Arthur de Siqueira Cavalcanti (HEMORIO) foi possível a obtenção das amostras de soro de 60 indivíduos portadores de cada doença hematológica analisada neste trabalho: LMC, LMA, LLC, LLA, AF e PTI e 60 indivíduos sadios doadores voluntários de sangue. Todos os grupos do próprio HEMORIO.

###### **IV.1.1.1 - Coleta de Soro de Indivíduos Sadios**

Através da autorização da chefia do serviço de hemoterapia do HEMORIO foi possível a obtenção das amostras de soro provenientes dos doadores sadios voluntários de sangue da própria instituição. No ato da coleta de sangue, todos os doadores assinaram um termo de consentimento, autorizando eventuais pesquisas. Logo não foi necessário um questionário específico para este grupo.

Foram 60 doadores sadios de sangue entre 18 e 60 anos. Cada doador forneceu uma alíquota de 5 mL de sangue. Como pré-requisito para doação de sangue, todos se submeteram a hemograma completo, o qual foi possível ter acesso.

#### **IV.1.1.2 - Coleta de Soro de Pacientes**

Através da autorização da chefia da documentação médica, obteve-se a planilha dos pacientes portadores de LMC, de LMA, de LLC, de LLA, de AF e de PTI com exames de sangue previamente marcados.

Foi feito um termo de consentimento pós-informado com os objetivos, os riscos e os benefícios da pesquisa e um questionário que abordava perguntas básicas e fundamentais como nome, idade, bairro residencial, medicamentos empregados, tempo de tratamento, etc. O termo de consentimento pós-informado e o questionário podem ser visualizados no **APÊNDICE B**.

No dia e hora marcados, no ato do exame de sangue, cada um dos 60 pacientes de cada grupo (LMC, LMA, LLC, LLA, AF e PTI) com idade entre 18 e 80 anos foram abordados e informados individualmente sobre o trabalho de pesquisa que seria desenvolvido. Depois de assinados o termo de consentimento e o questionário, o paciente doou uma alíquota de aproximadamente 5 mL de seu sangue a qual foi reservada para esta pesquisa.

#### **IV.2 - Preparação de Amostras de Soro**

A preparação das amostras foi dividida em duas etapas. A primeira etapa foi desenvolvida no HEMORIO e a segunda desenvolvida no Laboratório de Química de Apoio ao Usuário (LQAU) instalado no Laboratório Nacional de Luz Síncrotron (LNLS).

#### **IV.2.1 - Primeira Etapa de Preparação de Amostras de Soro (HEMORIO)**

Todas as amostras de sangue foram coletadas em tubos de ensaio de vidro de 5 mL a vácuo, sem anticoagulante e com gel separador da marca Becton Dickinson. Os tubos foram devidamente etiquetados com o código de cada doador de sangue e de cada paciente (número da matrícula do paciente no HEMORIO). Esse processo de identificação por código facilitou o acesso aos exames e prontuários.

Todos os tubos de ensaio contendo 5 mL de sangue foram centrifugados à 3000 rev/min durante 10 minutos para a obtenção do soro logo após a coleta. A porção particulada foi decantada e sobre o gel separador ficou apenas o soro o qual foi transferido para outro tubo esterilizados de 5 mL. A etiqueta com cada código foi repassada dos tudo de sangue para os tubos de soro. Os tubos contendo apenas o soro foram imediatamente congelados à aproximadamente -20 °C (ZARCADAS. et al, 2001 e BÁRÁNY. et al, 2002), até que fossem manipulados novamente no Laboratório Químico de Apoio ao Usuário (LQAU) do LNLS.

#### **IV.2.2 - Segunda Etapa de Preparação de Amostras de Soro (LNLS)**

Esta etapa foi desenvolvida nas instalações do LQAU do LNLS.

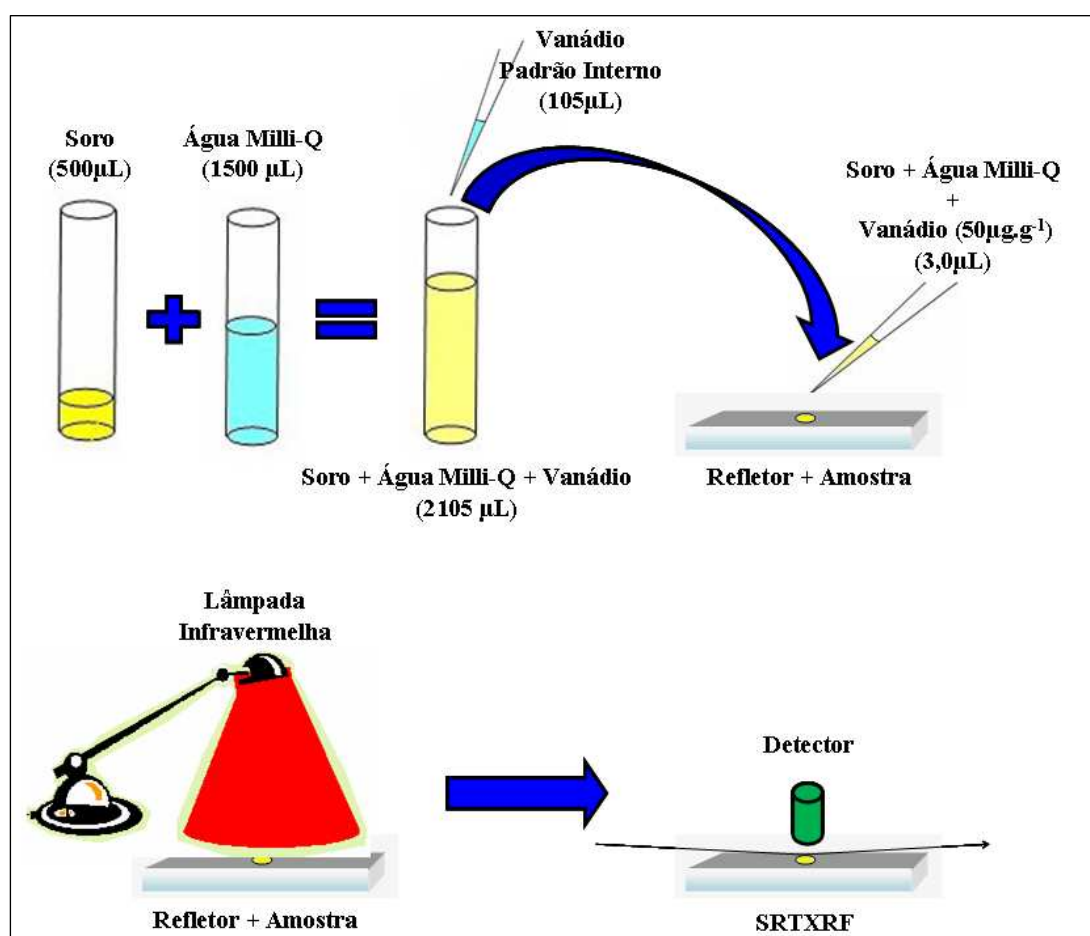
Todos os recipientes utilizados foram previamente lavados com detergente neutro extran (5%) e água Milli-Q, em seguida ficaram submersos durante 12 horas na mistura contendo extran + água Milli-Q. Depois desse período, foram lavados novamente com água Milli-Q apenas. A secagem foi realizada na estufa por aproximadamente 5 horas sob 45°C.

##### **IV.2.2.1 - Preparação de Amostras de Soro (SRTXRF – Baixo Z)**

De cada um dos tubos contendo soro puro de pacientes e de indivíduos saudáveis, foram retirados 500 µL e transferidos para outro tubo, no qual foi adicionado 1500 µL de água Milli-Q. A essa solução de 2000 µL (soro + Milli-Q) foram adicionados 105 µL do padrão interno Vanádio – V (1000 µg.g<sup>-1</sup>). Em seguida, essa solução foi

homogeneizada em um agitador de tubos. Dessa solução com 2105  $\mu\text{L}$  (soro + Milli-Q + V), foram retirados aproximadamente 3  $\mu\text{L}$  e transferidos para o centro de cada refletor de lucite. Para cada solução resultante (soro + Milli-Q + V) o processo foi executado por três vezes, ou seja, três refletores para cada amostra. Todos os refletores com deposição de amostra secaram sob luz infravermelha.

A figura 4.1 mostra o processo de preparação das amostras de soro de pacientes e indivíduos sadios para análise com a técnica SRTXRF – Baixo Z.



**Figura 4.1** - Processo de preparação de amostras de soro de pacientes e indivíduos sadios (SRTXRF – Baixo Z)

O branco foi feito seguindo os mesmos passos da preparação das amostras de soro. Em um tubo foram depositados 500  $\mu\text{L}$  de gel oriundo de um tubo virgem. Em seguida, adicionou-se 1500  $\mu\text{L}$  de água Milli-Q novamente. A essa solução de 2000  $\mu\text{L}$

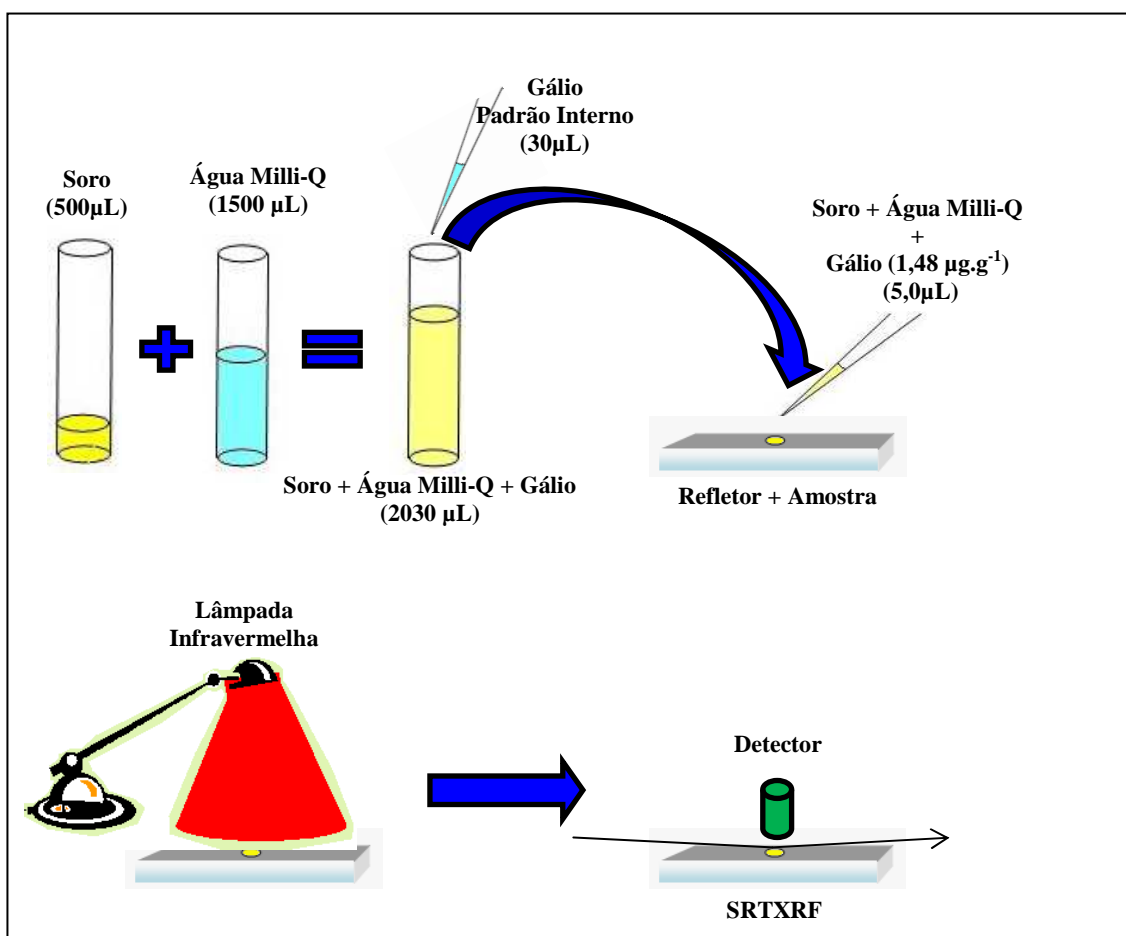
(apenas Milli-Q) foram adicionados 105  $\mu\text{L}$  do padrão interno Vanádio – V ( $1000 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ ). Posteriormente, essa solução foi homogeneizada em um agitador de tubos. Dessa solução com 2105  $\mu\text{L}$  (Milli-Q, + V), foram retirados aproximadamente 3  $\mu\text{L}$  e transferidos para o centro de cada refletor de lucite. O processo foi executado por cinco vezes, ou seja, cinco refletores, cada um com aproximadamente 3  $\mu\text{L}$  da mesma solução, os quais secaram sob luz infravermelha.

O branco do gel separador presente no tubo a vácuo de coleta foi realizado seguindo os mesmos passos da preparação das amostras de soro. Em um tubo foram depositados 500  $\mu\text{L}$  de gel oriundos de um tubo virgem. Em seguida, adicionou-se 1500  $\mu\text{L}$  de água Milli-Q. A essa solução de 2000  $\mu\text{L}$  (gel + Milli-Q) foram adicionados 105  $\mu\text{L}$  do padrão interno Vanádio – V ( $1000 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ ). Posteriormente, essa solução foi homogeneizada em um agitador de tubos. Dessa solução com 2105  $\mu\text{L}$  (gel + Milli-Q, + V), foram retirados aproximadamente 3  $\mu\text{L}$  e transferidos para o centro de cada refletor de lucite. O processo foi executado por cinco vezes, ou seja, cinco refletores, cada um com aproximadamente 3  $\mu\text{L}$  da mesma solução, os quais secaram sob luz infravermelha.

#### **IV.2.2.2 – Preparação de Amostras de Soro (SRTXRF - Convencional)**

De cada um dos tubos contendo soro puro de pacientes e de indivíduos saudáveis, foram retirados 500  $\mu\text{L}$  e transferidos para outro tubo, no qual foi adicionado 1500  $\mu\text{L}$  de água Milli-Q. A essa solução de 2000  $\mu\text{L}$  (soro + Milli-Q) foram adicionados 30  $\mu\text{L}$  do padrão interno Gálio – Ga ( $100 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ ). Em seguida, essa solução foi homogeneizada em um agitador de tubos. Dessa solução com 2030  $\mu\text{L}$  (soro + Milli-Q + Ga), foram retirados aproximadamente 5  $\mu\text{L}$  e transferidos para o centro de cada refletor de lucite. Para cada solução resultante (soro + Milli-Q + Ga) o processo foi executado por três vezes, ou seja, três refletores para cada amostra. Todos os refletores com deposição de amostra secaram sob luz infravermelha.

A figura 4.2 mostra o processo de preparação das amostras de soro de pacientes e de indivíduos saudáveis para análise com a técnica SRTXRF – Convencional.



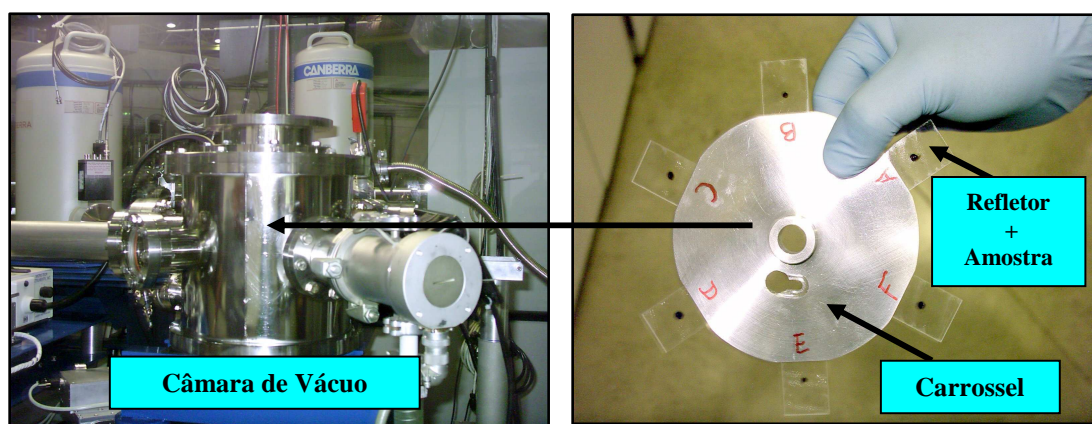
**Figura 4.2** - Processo de preparação de amostras de soro de pacientes e indivíduos saudáveis (SRTXRF - Convencional).

O branco foi feito seguindo os mesmos passos da preparação das amostras de soro. Em um tubo foram depositados 500 µL de água Milli-Q. Em seguida, adicionou-se 1500 µL de água Milli-Q novamente. A essa solução de 2000 µL (apenas Milli-Q) foram adicionados 30 µL do padrão interno Gálio – Ga ( $100 \mu\text{g.g}^{-1}$ ). Posteriormente, essa solução foi homogeneizada em um agitador de tubos. Dessa solução com 2030 µL (Milli-Q + Ga), foram retirados aproximadamente 5 µL e transferidos para o centro de cada refletor de lucite. O processo foi executado por cinco vezes, ou seja, cinco refletores, cada um com aproximadamente 5 µL da mesma solução, os quais secaram sob luz infravermelha.

O branco do gel separador presente no tubo a vácuo de coleta foi realizado seguindo os mesmos passos da preparação das amostras de soro. Em um tubo foram depositados 500  $\mu\text{L}$  de gel oriundos de um tubo virgem. Em seguida, adicionou-se 1500  $\mu\text{L}$  de água Milli-Q. A essa solução de 2000  $\mu\text{L}$  (Gel + Milli-Q) foram adicionados 30  $\mu\text{L}$  do padrão interno Gálio – Ga ( $100 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ ). Posteriormente, essa solução foi homogeneizada em um agitador de tubos. Dessa solução com 2030  $\mu\text{L}$  (Gel + Milli-Q, + Ga), foram retirados aproximadamente 5  $\mu\text{L}$  e transferidos para o centro de cada refletor de lucite. O processo foi executado por cinco vezes, ou seja, cinco refletores, cada um com aproximadamente 5  $\mu\text{L}$  da mesma solução, os quais secaram sob luz infravermelha.

### IV.3 - O Arranjo Experimental

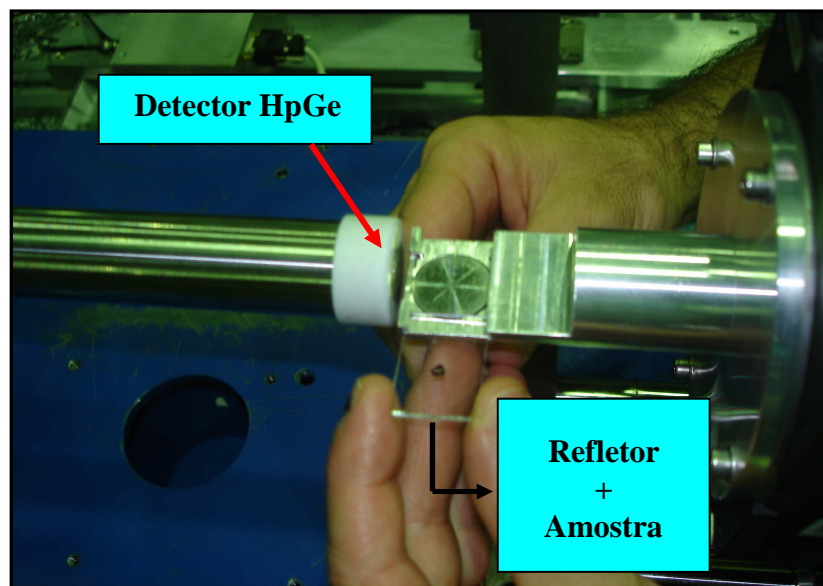
O arranjo experimental da SRTXRF – Baixo Z é mostrado na figura 4.3 consiste numa câmara de vácuo dentro da qual se localiza um carrossel onde seis refletores (seis amostras) ficam dispostos verticalmente em relação ao feixe. Após a fixação de cada refletor ao carrossel, este deve ser encaixado dentro da câmara. Em seguida, faz-se vácuo para então ajustar o posicionamento de cada refletor feito com ajuda de um monitor de vídeo e dos motores de passo, de forma a garantir que ocorra a reflexão total no ato da incidência do feixe sobre a amostra. Em seguida, podem-se iniciar as medidas, de acordo com parâmetros previamente estabelecidos.



**Figura 4.3** - Arranjo experimental - porta amostra tipo carrossel  
(SRTXRF – Baixo Z)



O arranjo experimental da SRTXRF - Convencional mostrado na figura 4.4 consiste numa mesa posicionadora que permite movimentos tridimensionais com uma resolução espacial de 0,5 mm por cada passo. O controle deste mecanismo é feito por motores de passo. Na mesa, localiza-se um suporte para a fixação dos refletores, em frente ao detector. O posicionamento é controlado através de uma câmara CCD.

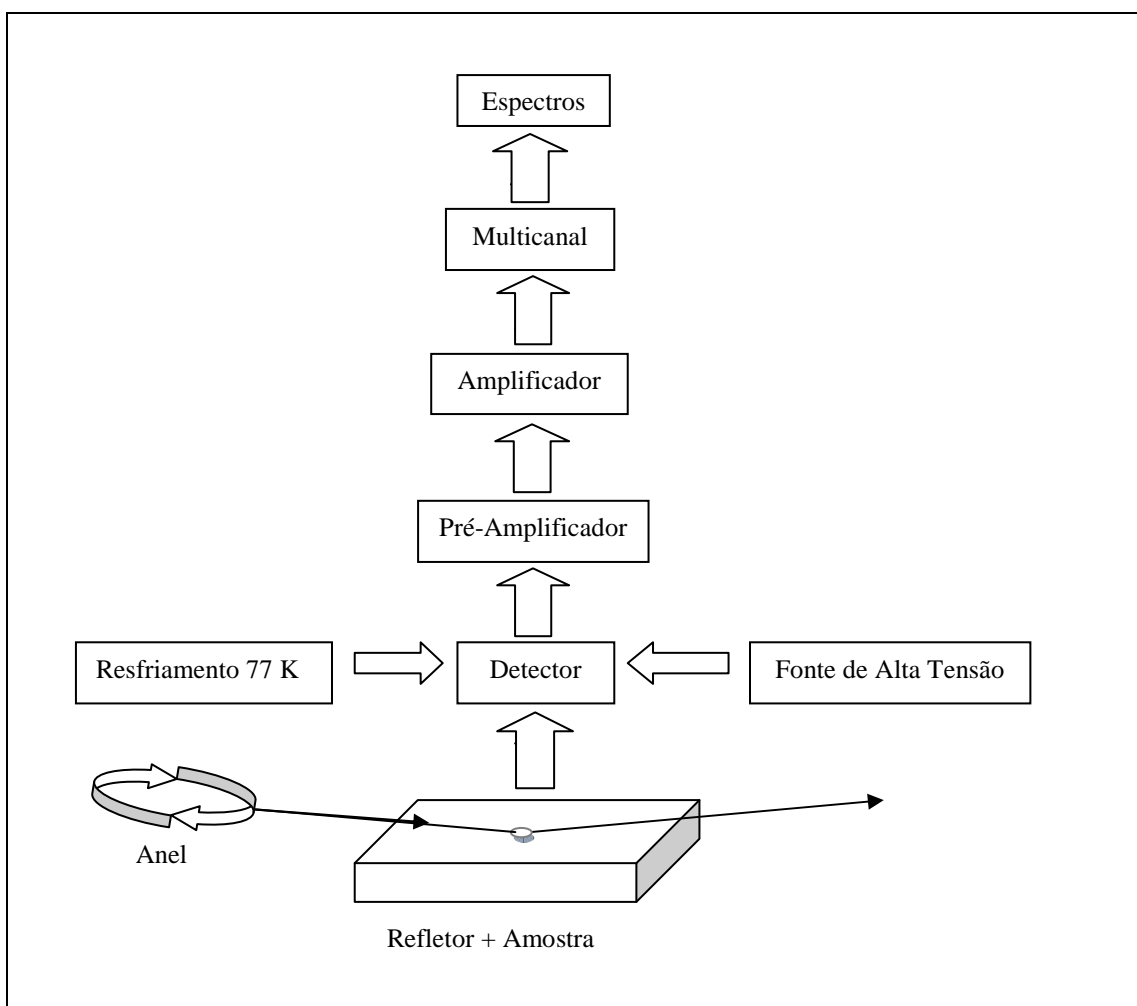


**Figura 4.4** - Arranjo experimental - porta amostra horizontal (SRTXRF - Convencional)

O tempo de obtenção dos espectros de fluorescência de raios X para cada amostra de soro e para os padrões foi de 100 s. Para a identificação das linhas K e L de cada elemento, ajuste dos espectros, determinação das intensidades da radiação fluorescente (áreas líquidas sob fotopicos) e background foi empregado o programa Quantative X-ray Analysis Software (QXAS) (BERNASCONI e TAJANI, 1996), o mais utilizado na área de fluorescência de raios X, distribuído pela Agência Nacional de Energia Atômica (IAEA).

Um sistema eletrônico de detecção é integrado ao sistema fonte-detector. O detector é acoplado ao pré-amplificador que envia pulsos para o amplificador, o qual remete os pulsos de saída para uma placa multicanal que se encontra em um microcomputador do tipo PC.

A figura 4.5, a seguir, mostra o diagrama que representa cada etapa da aquisição de dados.



**Figura 4.5** - Diagrama que representa cada etapa da aquisição de dados.

Os refletores utilizados como suportes das amostras foram paralelepípedos de lucite (perspex) com 3,0 cm de comprimento, 2,0 cm de largura e espessura de 3 mm. O lucite possui um coeficiente de reflexão de aproximadamente 99,8% e contém apenas hidrogênio, carbono e oxigênio. É um material barato que se obtém com facilidade no mercado e, além disso, pode ser descartado após o uso. Cada refletor vem recoberto por uma película plástica que protege as duas faces, a qual evita contaminações e arranhões durante o manuseio dos refletores.

Um bom refletor deve apresentar as seguintes características: superfície maciça e plana, ser constituído de material quimicamente inerte e livre de impurezas e garantir

que nenhum pico de fluorescência originado a partir da sua constituição ocorra acima da escala de energia considerada (KLOCKENKAMPER, 1996).

Os dados experimentais foram obtidos no Laboratório Nacional de Luz Síncrotron (LNLS) em duas etapas diferentes: A SRTXRF - Convencional e a SRTXRF – Baixo Z. A tabela 4.1 mostra as características de cada arranjo experimental.

**Tabela 4.1** - As características dos arranjos experimentais.

<b>INSTRUMENTAÇÃO</b>	<b>SRTXRF (CONVENCIONAL)</b>	<b>SRTXRF (BAIXO Z)</b>
Feixe	Branco	Branco
Absorvedor	0,75 mm de Al (filtro no feixe)	0,75 mm de Al (filtro no feixe)
Colimador	1,0 mm de Ta (no detector)	1,0 mm de Ta (no detector)
Câmara 1	2X1	2X1
Distância	12 mm (amostra – detector)	12 mm (amostra – detector)
Detector	HpGe Resolução 140 eV	Si(Li) Resolução de 165 eV
Altura	0,2 mm	0,2 mm
Largura	5,0 mm	5,0 mm
Ângulo de Incidência	1,0 mrad	1,0 mrad
Pressão na câmara	1 atm	$<10^{-1}$ mbar (vácuo)

#### **IV.4 - Calibração do Sistema e Verificação da Reprodutibilidade**

Para a calibração do sistema e verificação da reprodutibilidade foram utilizadas duas soluções multielementares de concentrações elementares bem definidas uma para ser utilizada na SRTXRF - Convencional e outra para SRTXRF - Baixo Z. Estas foram preparadas e analisadas sob mesmos critérios para amostras de soro. A partir dos dados obtidos, foi possível calcular as concentrações elementares e estes valores foram

comparados com os valores certificados fornecidos juntamente com o material de referência da solução multielementar.

- Solução 1.10322.010 - MERCK para SRTXRF - Baixo Z.

Componentes da solução (Especificações do produto):

*[(100 mg.L<sup>-1</sup>): NH<sub>4</sub>, Ba, Ca, K, Li, Na, Mg, Mn e Sr]*

- Solução 70002 – Multielement Atomic Spectroscopy Standard Solution I da FLUKA - MERCK para SRTXRF - Convencional.

Componentes da solução (Especificações do produto):

*[Ag (10 ppm); Al (50 ppm); B (50 ppm), Ba (10 ppm); Bi (100 ppm); Ca (10 ppm), Cd (10 ppm); Co (10 ppm); Cr (50 ppm); Cu (10 ppm); Fe (10 ppm); K (100 ppm); Li (50 ppm); Mg (10 ppm); Mn (10 ppm); Mo (50 ppm); Na (50 ppm); Ni (50 ppm); Pb (100 ppm); Sr (10 ppm); Ti (50 ppm); Zn (10 ppm)]*

#### **IV.5 - A Curva de Sensibilidade**

É possível construir um gráfico considerando as diferentes concentrações de um elemento *i*, representando a relação linear entre a intensidade da radiação fluorescente e a concentração elementar. Logo, ao se obter várias concentrações para um dado elemento *i* (elemento cuja concentração pretende-se definir na amostra), pode-se determinar a sensibilidade relativa para o mesmo elemento. Ao se estender este processo para outros elementos, tem-se a sensibilidade relativa, que pode ser representada graficamente numa relação entre o *Z* do elemento e sua respectiva sensibilidade relativa.

##### **IV.5.1 – Preparação de Amostras para a Sensibilidade (SRTXRF – Baixo Z)**

Para obtenção da curva de sensibilidade para a SRTXRF – Baixo Z foram utilizadas soluções monoelementares, cada uma com 1000 µg.g<sup>-1</sup> (Na, Mg, Al, Si, P, S, K, Ca e Sc).

A preparação das amostras para a sensibilidade foi realizada a partir de dois grupos de elementos:

***Grupo 1 (Mg, Al, Si, P e S):***

Em um tubo foram depositados 1600  $\mu\text{L}$  da solução monoelementar (1600  $\mu\text{L}$  de cada solução em cinco tubos diferentes). Em seguida, adicionou-se 200  $\mu\text{L}$  do padrão interno Vanádio – V ( $1000 \mu\text{g.g}^{-1}$ ). A essa solução contendo 1800  $\mu\text{L}$  (Solução monoelementar + V) foram adicionados 200  $\mu\text{L}$  de água Milli-Q. Posteriormente, essa solução foi homogeneizada em um agitador de tubos. Dessa solução com 2000  $\mu\text{L}$  (Solução monoelementar + V + Milli-Q), foram retirados aproximadamente 3  $\mu\text{L}$  e transferidos para o centro de cada refletor de lucite. O processo foi executado por cinco vezes, ou seja, cinco refletores, cada um com aproximadamente 3  $\mu\text{L}$  da mesma solução, os quais secaram sob luz infravermelha. A preparação foi realizada para cada solução monoelementar individualmente. A concentração final de cada elemento na mostra foi igual a  $800 \mu\text{g.g}^{-1}$ .

***Grupo 2 (K, Ca e Sc):***

Em um tubo foram depositados 800  $\mu\text{L}$  da solução monoelementar (800  $\mu\text{L}$  de cada solução em cinco tubos diferentes). Em seguida, adicionou-se 200  $\mu\text{L}$  do padrão interno Vanádio – V ( $1000 \mu\text{g.g}^{-1}$ ). A essa solução contendo 1000  $\mu\text{L}$  (Solução monoelementar + V) foram adicionados 1000  $\mu\text{L}$  de água Milli-Q. Posteriormente, essa solução foi homogeneizada em um agitador de tubos. Dessa solução com 2000  $\mu\text{L}$  (Solução monoelementar + V + Milli-Q), foram retirados aproximadamente 3  $\mu\text{L}$  e transferidos para o centro de cada refletor de lucite. O processo foi executado por cinco vezes, ou seja, cinco refletores, cada um com aproximadamente 3  $\mu\text{L}$  da mesma solução, os quais secaram sob luz infravermelha. A preparação foi realizada para cada solução monoelementar individualmente. A concentração final de cada elemento na mostra foi igual a  $400 \mu\text{g.g}^{-1}$ .

#### **IV.5.2– Preparação de Amostras para a Sensibilidade (SRTXRF – Convencional)**

Para obtenção da curva de sensibilidade para a SRTXRF – Convencional foi utilizada uma solução multielementar: 70002 – Multielement Atomic Spectroscopy Standard Solution I da FLUKA.

A preparação das amostras para a sensibilidade foi realizada a partir de três processos que resultaram em três soluções finais as quais foram denominadas *Sensibilidade A*, *Sensibilidade B* e *Sensibilidade C*.

##### ***Sensibilidade A***

Foram retirados 500 µL da solução multielementar e transferidos para um tubo. A esse tubo foi adicionada água Milli-Q até completar o volume de 1000 µL ou 10 mL. Essa solução (Solução multielementar + Milli-Q) foi chamada de *Solução A*.

Em um tubo foram adicionados 488 µL da *Solução A* e 12 µL do padrão interno Gálio - Ga ( $100 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ ). Esta solução chamada *Sensibilidade A* foi homogeneizada em um agitador de tubos e a seguir, foram retirados da mesma 5 µL e transferidos para o centro de cada refletor de lucite. O processo foi executado por cinco vezes, ou seja, cinco refletores, cada um com aproximadamente 5 µL da mesma *Sensibilidade A*, os quais secaram sob luz infravermelha.

##### ***Sensibilidade B***

Foram retirados 800 µL da solução multielementar e transferidos para um tubo. A esse tubo foi adicionada água Milli-Q até completar o volume de 1000 µL ou 10 mL. Essa solução (Solução multielementar + Milli-Q) foi chamada de *Solução B*.

Em um tubo foram adicionados 480 µL da *Solução A* e 20 µL do padrão interno Gálio - Ga ( $100 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ ). Esta solução chamada *Sensibilidade B* foi homogeneizada em um agitador de tubos e a seguir, foram retirados da mesma 5 µL e transferidos para o centro de cada refletor de lucite. O processo foi executado por cinco vezes, ou seja,

cinco refletores, cada um com aproximadamente 5  $\mu\text{L}$  da mesma *Sensibilidade B*, os quais secaram sob luz infravermelha.

### *Sensibilidade C*

Foram retirados 1200  $\mu\text{L}$  da solução multielementar e transferidos para um tubo. A esse tubo foi adicionada água Milli-Q até completar o volume de 1000  $\mu\text{L}$  ou 10 mL. Essa solução (Solução multielementar + Milli-Q) foi chamada de *Solução C*.

Em um tubo foram adicionados 470  $\mu\text{L}$  da *Solução C* e 30  $\mu\text{L}$  do padrão interno Gálio - Ga ( $100 \mu\text{g.g}^{-1}$ ). Esta solução chamada *Sensibilidade C* foi homogeneizada em um agitador de tubos e a seguir, foram retirados da mesma 5  $\mu\text{L}$  e transferidos para o centro de cada refletor de lucite. O processo foi executado por cinco vezes, ou seja, cinco refletores, cada um com aproximadamente 5  $\mu\text{L}$  da mesma *Sensibilidade C*, os quais secaram sob luz infravermelha.

## **IV.6– Preparação de Amostras de Referência**

Para a preparação das amostras de referência foi utilizada a solução 1.10322.010 da MERCK contendo os seguintes componentes: *NH<sub>4</sub>, Ba, Ca, K, Li, Na, Mg, Mn e Sr* (cada um com concentração igual  $100 \text{ mg.L}^{-1}$  na solução)

### **IV.6.1 – Preparação de Amostras de Referência (SRTXRF – Baixo Z)**

Em um tubo foram adicionados 1000  $\mu\text{L}$  da solução 1.10322.010 da MERCK e 120  $\mu\text{L}$  do padrão interno Vanádio – V ( $1000 \mu\text{g.g}^{-1}$ ). Esta solução foi homogeneizada em um agitador de tubos e a seguir, foram retirados da mesma 3  $\mu\text{L}$  e transferidos para o centro de cada refletor de lucite. O processo foi executado por cinco vezes, ou seja, cinco refletores, cada um com aproximadamente 3  $\mu\text{L}$  da mesma amostra, os quais secaram sob luz infravermelha.

#### **IV.6.2 – Preparação de Amostras de Referência (SRTXRF – Convencional)**

A preparação das amostras de referência foi realizada a partir de dois processos que resultaram em duas soluções finais as quais foram denominadas *Multi A* e *Multi B*.

##### ***Multielementar A***

Em um tubo foram adicionados 50  $\mu\text{L}$  da solução 1.10322.010 da MERCK, 1500  $\mu\text{L}$  de água Milli-Q e 20  $\mu\text{L}$  do padrão interno Gálio – Ga ( $100 \mu\text{g.g}^{-1}$ ). Esta solução (MERCK + Milli-Q + Ga) foi homogeneizada em um agitador de tubos e a seguir, foram retirados da mesma 5  $\mu\text{L}$  e transferidos para o centro de cada refletor de lucite. O processo foi executado por cinco vezes, ou seja, cinco refletores, cada um com aproximadamente 5  $\mu\text{L}$  da mesma amostra, os quais secaram sob luz infravermelha.

##### ***Multielementar B***

Em um tubo foram adicionados 200  $\mu\text{L}$  da solução 1.10322.010 da MERCK, 1350  $\mu\text{L}$  de água Milli-Q e 50  $\mu\text{L}$  do padrão interno Gálio – Ga ( $100 \mu\text{g.g}^{-1}$ ). Esta solução (MERCK + Milli-Q + Ga) foi homogeneizada em um agitador de tubos e a seguir, foram retirados da mesma 5  $\mu\text{L}$  e transferidos para o centro de cada refletor de lucite. O processo foi executado por cinco vezes, ou seja, cinco refletores, cada um com aproximadamente 5  $\mu\text{L}$  da mesma amostra, os quais secaram sob luz infravermelha.



## CAPÍTULO V

### APRESENTAÇÃO E ANÁLISE DOS RESULTADOS

Neste capítulo serão vistos os resultados obtidos através da técnica de SRTXRF para números atômicos entre 8 e 20 (Baixo Z) e para números atômicos entre 26 e 37 (Convencional). Serão expostos os gráficos de suas respectivas sensibilidades, exemplos típicos de espectros de fluorescência de raios X e os gráficos comparativos das médias das concentrações elementares entre o grupo controle (sadios) e cada um dos grupos das doenças analisadas (LMC, LMA, LLC, LLA, AF e PTI). Veremos a aplicação do Student's teste t e do programa estatístico SPSS na análise bivariada e multivariada para a verificação de similaridades e/ou diferenças entre os grupos.

#### V.1 - Cálculo da Sensibilidade Relativa

Para a determinação da sensibilidade relativa ( $S_{r,i}$ ) foram utilizadas soluções multielementares e monoelementares para as linhas K nos experimentos realizados com técnica de SRTXRF – Baixo Z com a técnica de SRTXRF - Convencional.

Tendo os valores experimentais da intensidade relativa de cada elemento ( $I_{r,i}$ ) contida nas soluções monoelementares (para SRTXRF – Baixo Z) e multielementares (para SRTXRF – Convencional), sabendo-se os valores das concentrações dos respectivos elementos ( $W_i$ ), além da concentração utilizada do padrão interno Vanádio (V) no caso da SRTXRF – Baixo Z e a concentração do padrão interno Gálio (Ga) no caso da SRTXRF – Convencional, pode-se obter a sensibilidade experimental. Representando os dados da sensibilidade experimental num plano cartesiano ( $S_{exp}$  versus Z) e realizando-se um ajuste polinomial pode-se obter a sensibilidade relativa do sistema experimental para o intervalo de número atômico desejado.

As tabelas 5.1 e 5.2 mostram as sensibilidades relativas, obtidas experimentalmente para a linha K através da técnica de SRTXRF – Baixo Z e através da técnica de SRTXRF – Convencional, respectivamente.

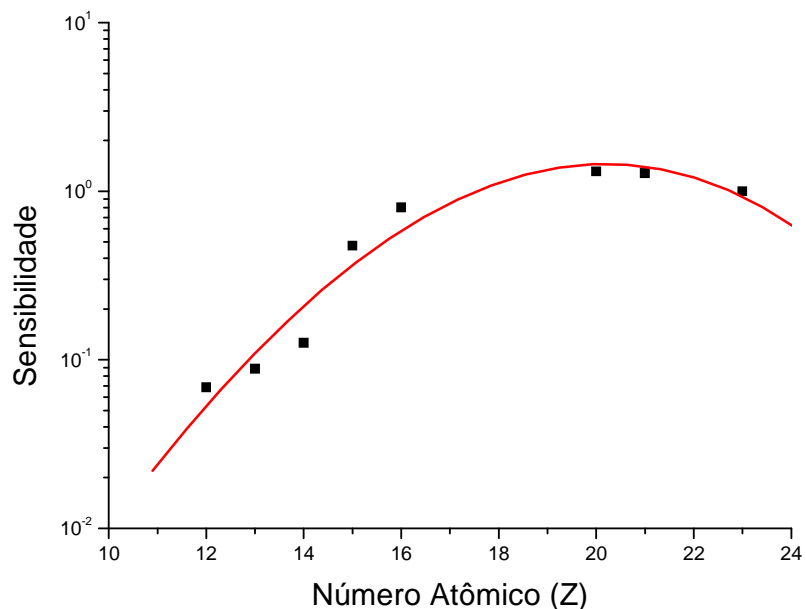
**Tabelas 5.1** - Sensibilidade relativa para a linha K (SRTXRF – Baixo Z)

<b>Z</b>	<b>Elemento</b>	<b>S<sub>r,i</sub></b>
12	Mg	6,87E-02
13	Al	8,86E-02
14	Si	1,26E-01
15	P	4,76E-01
16	S	8,02E-01
20	Ca	1,31E+00
21	Sc	1,28E+00
23	V	1,00E+00

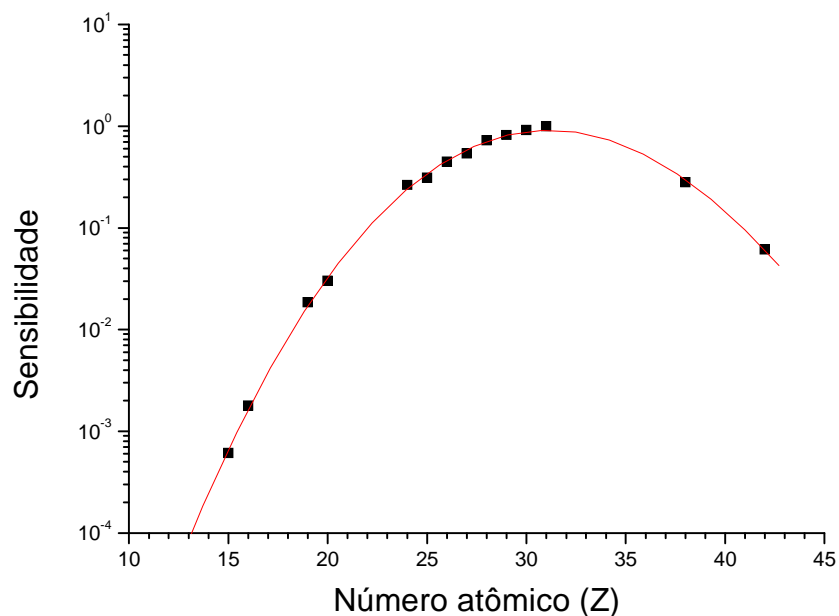
**Tabelas 5.2** - Sensibilidade relativa para a linha K (SRTXRF - Convencional)

<b>Z</b>	<b>Elemento</b>	<b>S<sub>r,i</sub></b>
19	K	3,744E-02
20	Ca	2,218E-01
24	Cr	2,660E-01
25	Mn	3,527E-01
26	Fe	6,213E-01
27	Co	5,445E-01
28	Ni	7,162E-01
29	Cu	8,335E-01
30	Zn	1,043E+00
31	Ga	1,000E+00
38	Sr	2,717E-01
42	Mo	5,934E-02

As figuras 5.1 e 5.2 representam os gráficos para a sensibilidade relativa ( $S_r$ ) em função do número atômico ( $Z$ ) para a linha K através da técnica de SRTXRF – Baixo Z e através da técnica SRTXRF – Convencional, respectivamente.



**Figura 5.1** - Curva da Sensibilidade Relativa ( $S_{r,i}$ ) para a linha K (SRTXRF – Baixo Z)



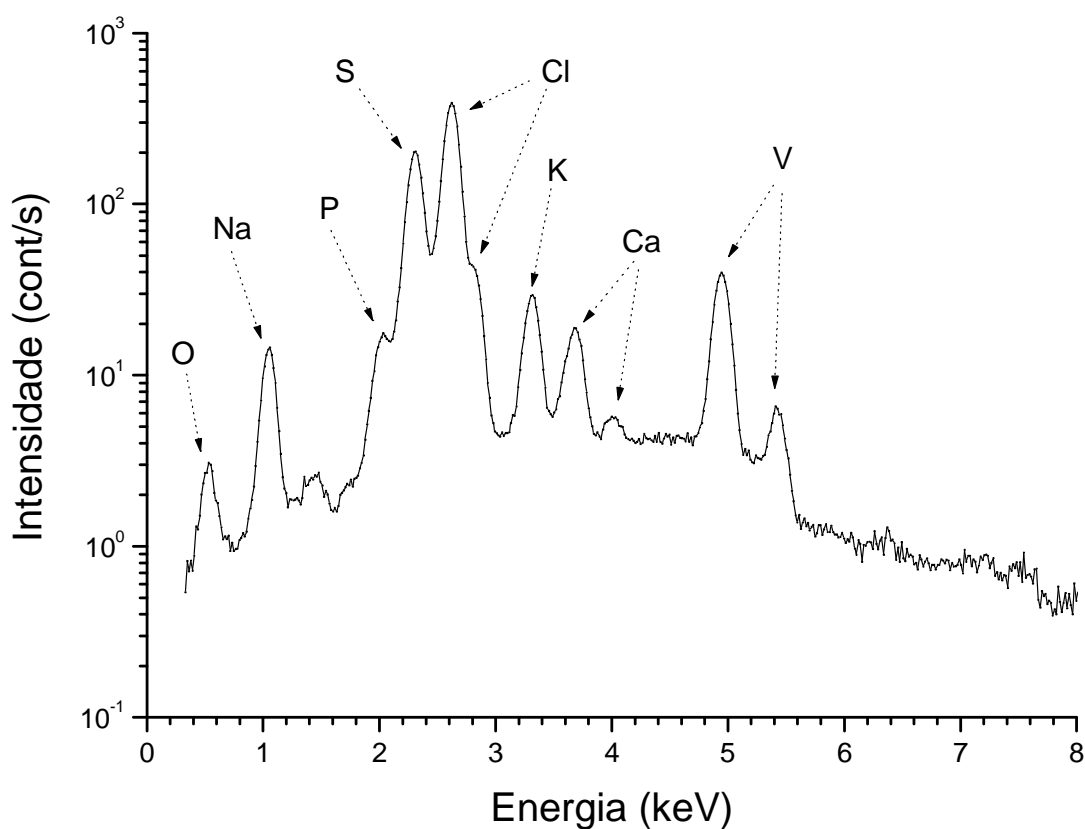
**Figura 5.2** - Curva da Sensibilidade Relativa ( $S_{r,i}$ ) para a linha K (SRTXRF - Convencional)

## V.2 - Análise das Médias das Concentrações Elementares Encontradas

A seguir, serão expostos dois típicos espectros de Fluorescência de Raios X obtidos com as análises das amostras de soro humano através das técnicas SRTXRF – Baixo Z e SRTXRF – Convencional. Serão mostrados gráficos comparativos das médias das concentrações elementares encontradas entre o grupo controle (sadios) e cada um dos grupos das doenças hematológicas (LMC, LMA, LLC, LLA, AF e PTI).

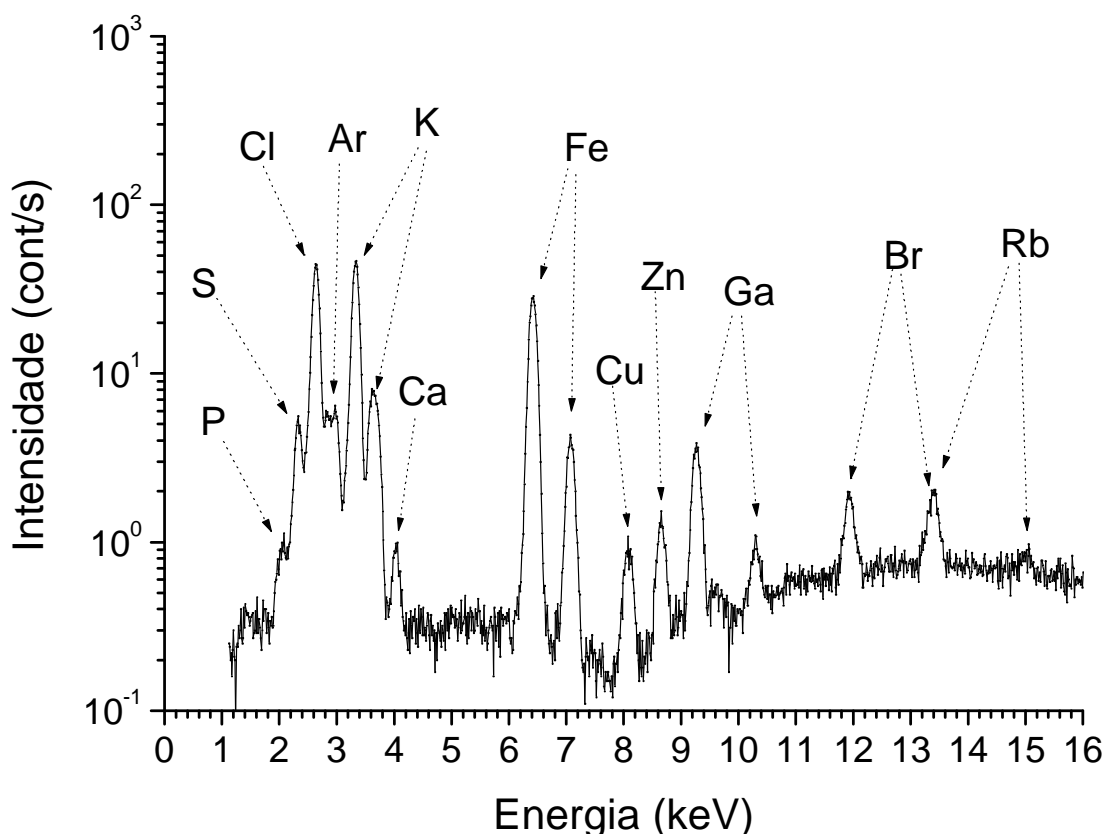
As figuras 5.3 e 5.4 representam típicos espectros de Fluorescência de Raios X para a técnica de SRTXEF – Baixo Z e para a técnica de SRTXRF – Convencional, respectivamente.

Apesar de a instrumentação ter sido realizada sob vácuo, o elemento oxigênio (O) apareceu no espectro de Fluorescência de Raios X devido a composição do refletor de lucite utilizado no experimento. Este possui em sua composição aproximadamente 32% de oxigênio. O elemento Vanádio (V) é o padrão interno utilizado.



**Figura 5.3** - Típico Espectro de Fluorescência de Raios X (SRTXEF – Baixo Z)

Como os elementos P, S, Cl, K e Ca foram analisados também com a técnica de SRTXRF – Baixo Z de maior sensibilidade para números atômicos menores que 20, para a técnica de SRTXRF – Convencional, utilizou-se apenas os resultados obtidos para os elementos Fe, Cu, Zn, Br e Rb. O elemento Argônio (Ar) apareceu no espectro devido à presença do ar atmosférico e o elemento Gálio (Ga) é o padrão interno utilizado.



**Figura 5.4** - Típico Espectro de Fluorescência de Raios X (SRTXEF –Convencional)

### V.2.1 - Análise das Amostras de Referência

A tabela 5.3 mostra os resultados encontrados na análise das amostras de referência para SRTXRF - Baixo Z. Foram realizadas seis repetições ( $n = 6$ ) e o coeficiente de variação (CV) ficou entre 7 % e 12 %, mostrando uma boa repetibilidade dos resultados. Comparando os valores obtidos usando a técnica de TXRF com os valores de referência pode-se observar que o erro relativo variou de 0,2 % para o Sódio a 9,9 % para o Potássio; mostrando que existe uma boa reprodutibilidade dos resultados.

**Tabela 5.3** – Resultados da análise da amostra de referência  
 Solução **1.10322.010** - MERCK para SRTXRF - Baixo Z

Elemento	Na	Mg	K	Ca	Mn
Média <sup>a</sup> (ppm)	99,8	108	110	107	107
DP <sup>b</sup> (ppm)	12	9	7	8	11
CV <sup>c</sup>	0,12	0,08	0,07	0,07	0,11
Valores de referência (ppm)	100	100	100	100	100
E <sub>relativo</sub> (%)	0,2	-8,3	-9,9	-6,8	-7,1

<sup>a</sup> Média aritmética com n = 6

<sup>b</sup> Desvio Padrão

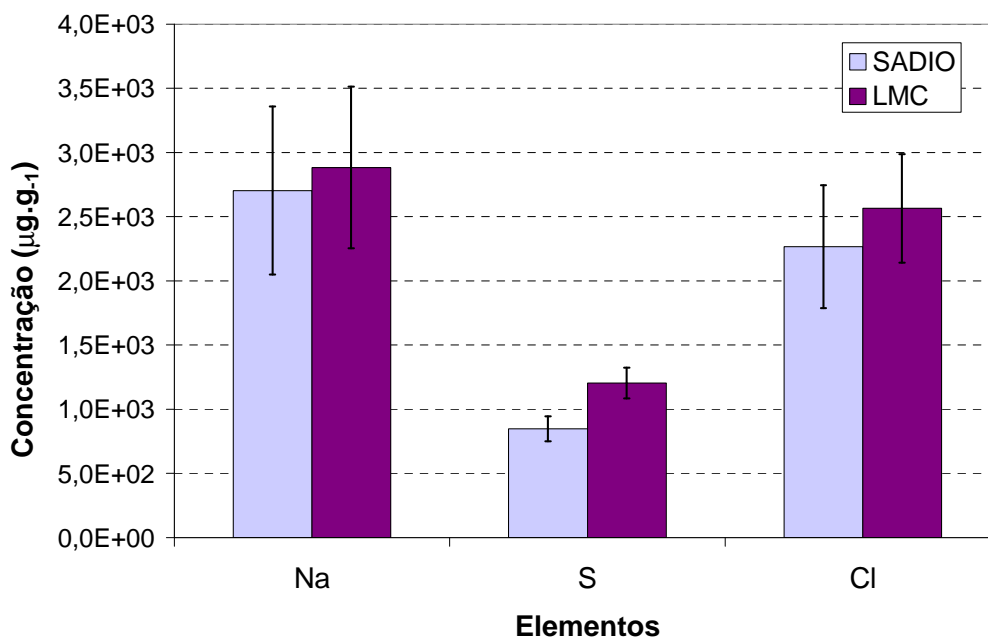
<sup>c</sup> Coeficiente de Variação (DP/Média)

Os resultados encontrados na análise das amostras de referência para SRTXRF – Convencional (CANELLAS et al, 2006) apresentaram boas repetibilidade e reprodutibilidade. Foram realizadas seis repetições (n = 6) e o coeficiente de variação (CV) ficou entre 1 % e 14 %.

### V.2.2 - Análise entre as Médias das Concentrações Elementares Encontradas (SRTXRF – Baixo Z)

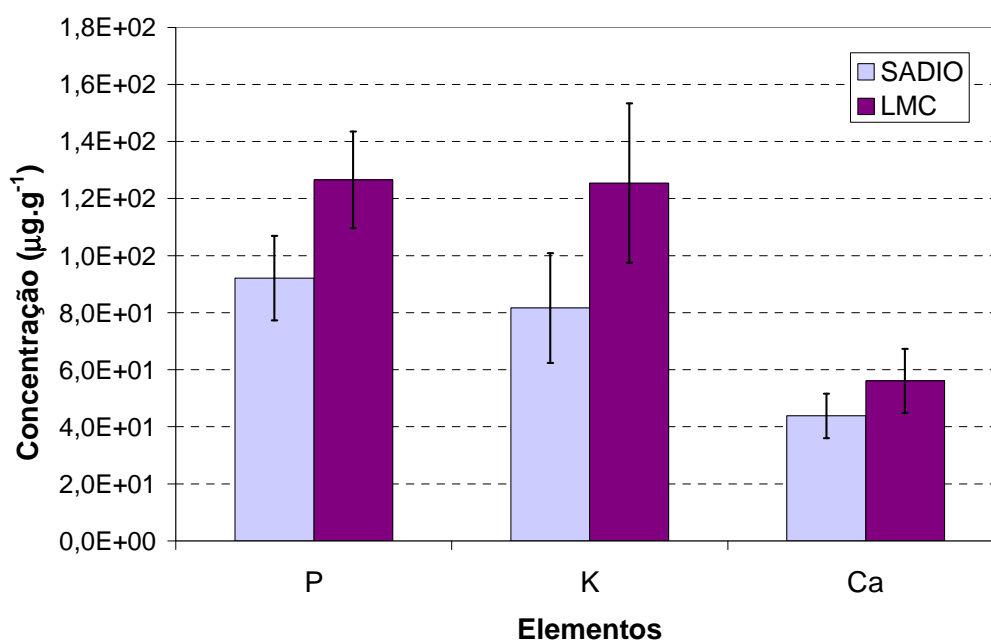
A seguir, serão expostos os gráficos comparativos das médias das concentrações elementares encontradas entre o grupo controle (sadios) e cada um dos grupos das doenças hematológicas (LMC, LMA, LLC, LLA, AF e PTI). Para a técnica de SRTXRF – Baixo Z foram analisados os seguintes elementos: *Sódio, Fósforo, Enxofre, Cloro, Potássio e Cálcio*.

A figura 5.5 mostra a comparação entre as médias das concentrações de Na, S e Cl encontradas nas amostras de soro de indivíduos saudáveis e portadores de LMC.



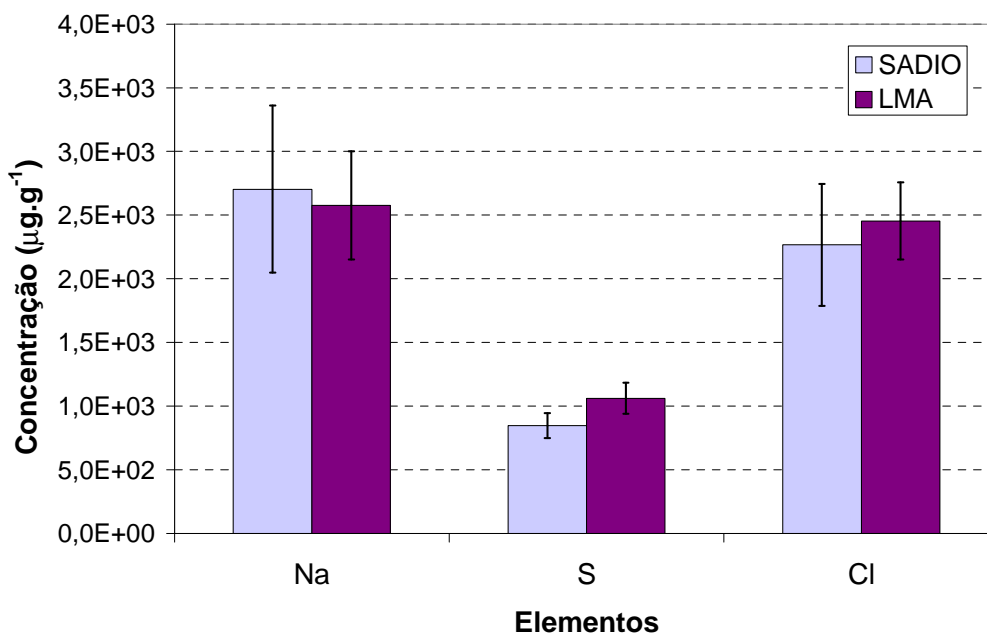
**Figura 5.5** - Comparação entre as médias das concentrações de Na, S e Cl encontradas nas amostras de soro de indivíduos saudáveis e portadores de LMC.

A figura 5.6 mostra a comparação entre as médias das concentrações de P, K e Ca encontradas nas amostras de soro de indivíduos saudáveis e portadores de LMC.



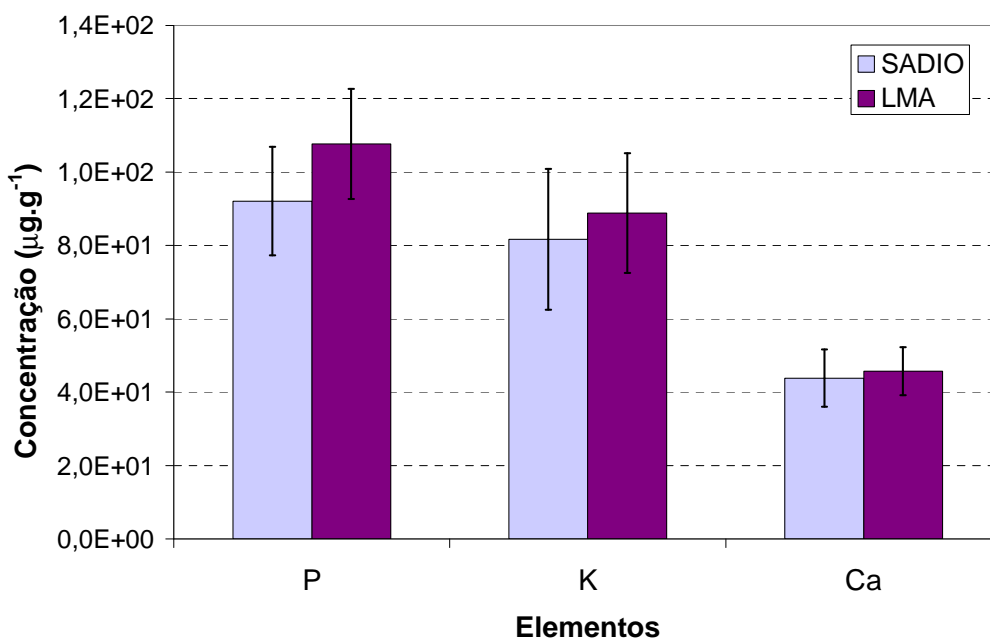
**Figura 5.6** - Comparação entre as médias das concentrações de P, K e Ca encontradas nas amostras de soro de indivíduos saudáveis e portadores de LMC.

A figura 5.7 mostra a comparação entre as médias das concentrações de Na, S e Cl encontradas nas amostras de soro de indivíduos sadios e portadores de LMA.



**Figura 5.7** - Comparação entre as médias das concentrações de Na, S e Cl encontradas nas amostras de soro de indivíduos sadios e portadores de LMA.

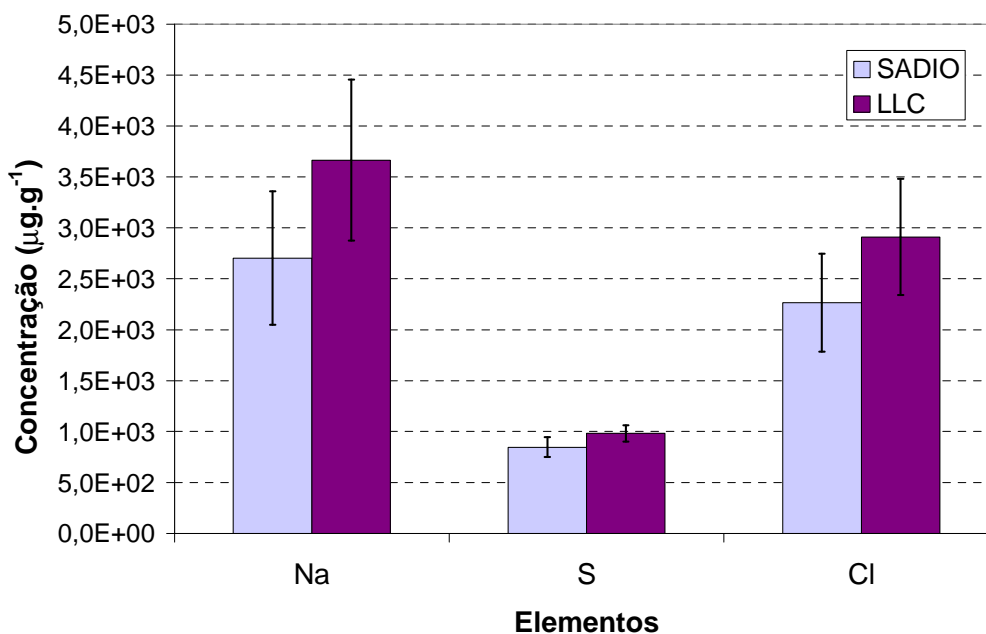
A figura 5.8 mostra a comparação entre as médias das concentrações de P, K e Ca encontradas nas amostras de soro de indivíduos sadios e portadores de LMA.



**Figura 5.8** - Comparação entre as médias das concentrações de P, K e Ca encontradas nas amostras de soro de indivíduos sadios e portadores de LMA.

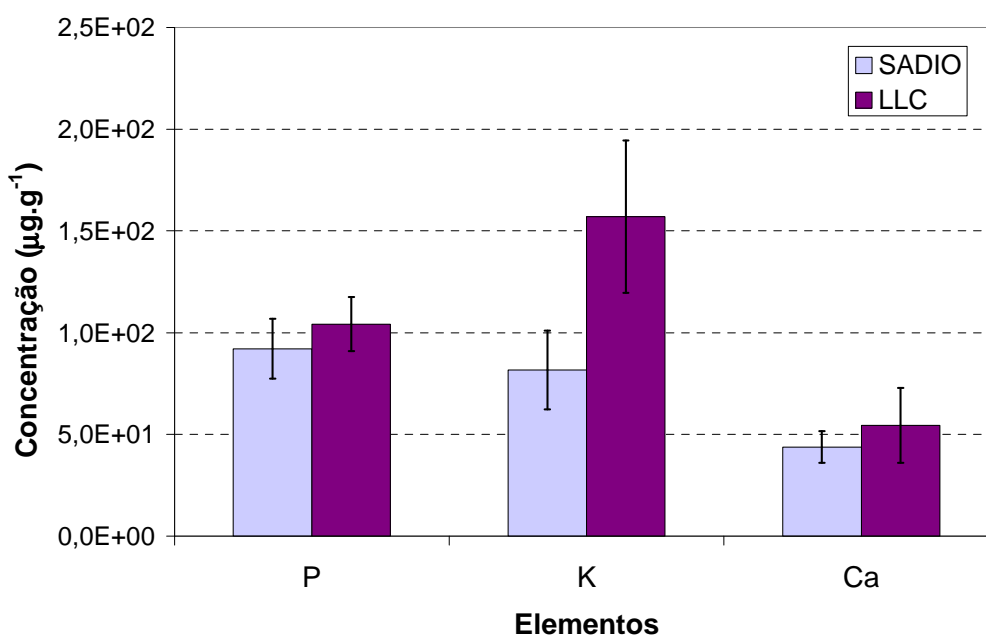


A figura 5.9 mostra a comparação entre as médias das concentrações de Na, S e Cl encontradas nas amostras de soro de indivíduos saudáveis e portadores de LLC.



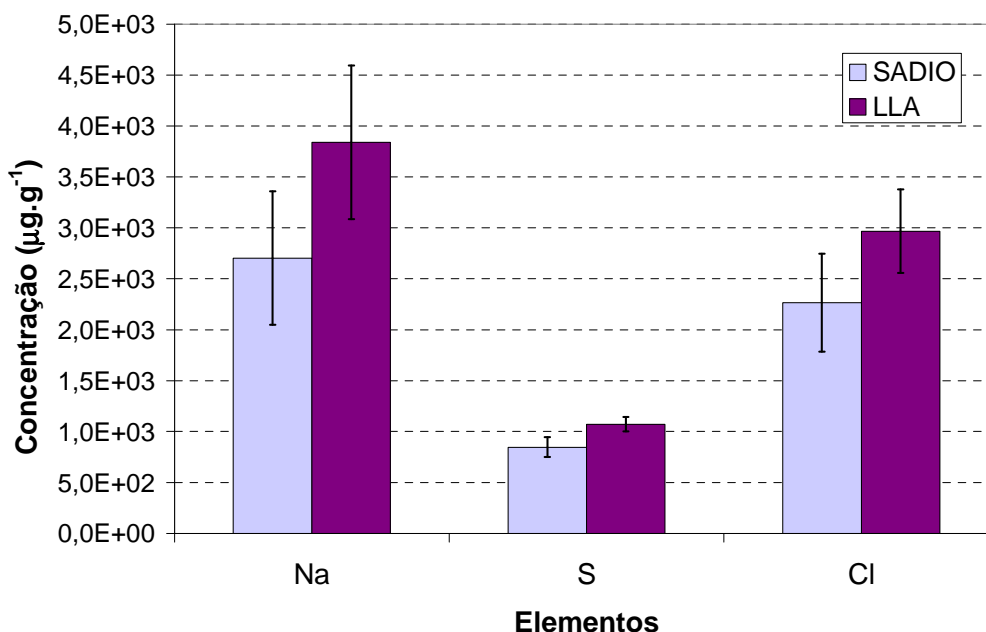
**Figura 5.9** - Comparação entre as médias das concentrações de Na, S e Cl encontradas nas amostras de soro de indivíduos saudáveis e portadores de LLC.

A figura 5.10 mostra a comparação entre as médias das concentrações de P, K e Ca encontradas nas amostras de soro de indivíduos saudáveis e portadores de LLC.



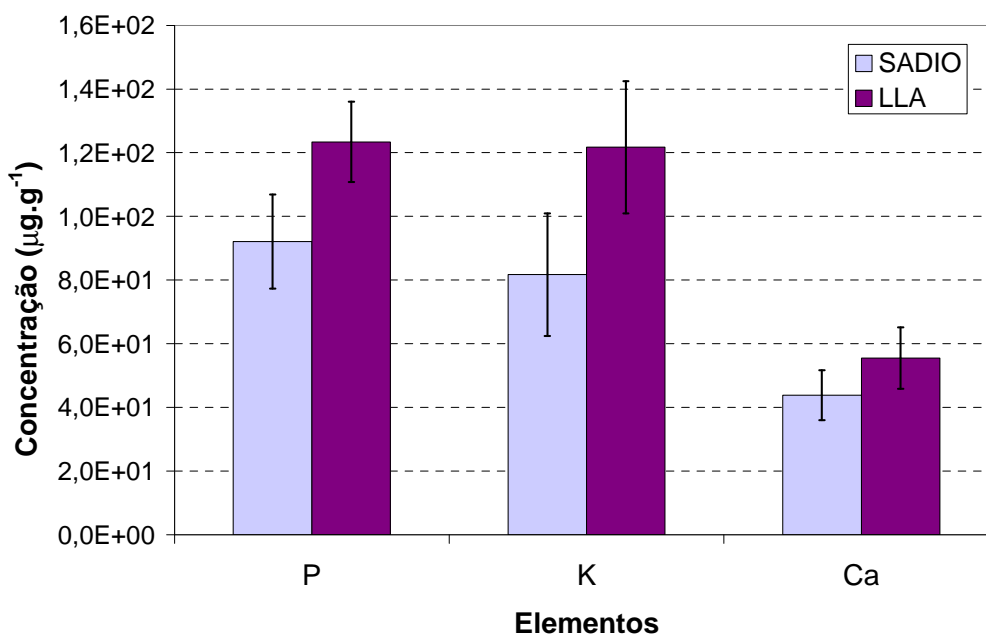
**Figura 5.10** - Comparação entre as médias das concentrações de P, K e Ca encontradas nas amostras de soro de indivíduos saudáveis e portadores de LLC.

A figura 5.11 mostra a comparação entre as médias das concentrações de Na, S e Cl encontradas nas amostras de soro de indivíduos saudáveis e portadores de LLA.



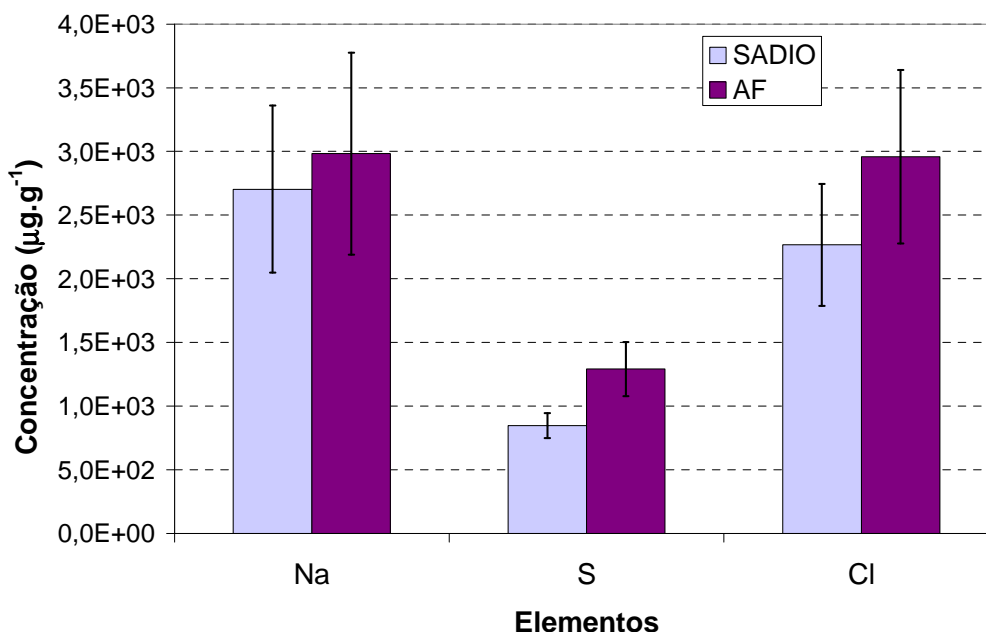
**Figura 5.11** - Comparação entre as médias das concentrações de Na, S e Cl encontradas nas amostras de soro de indivíduos saudáveis e portadores de LLA.

A figura 5.12 mostra a comparação entre as médias das concentrações de P, K e Ca encontradas nas amostras de soro de indivíduos saudáveis e portadores de LLA.



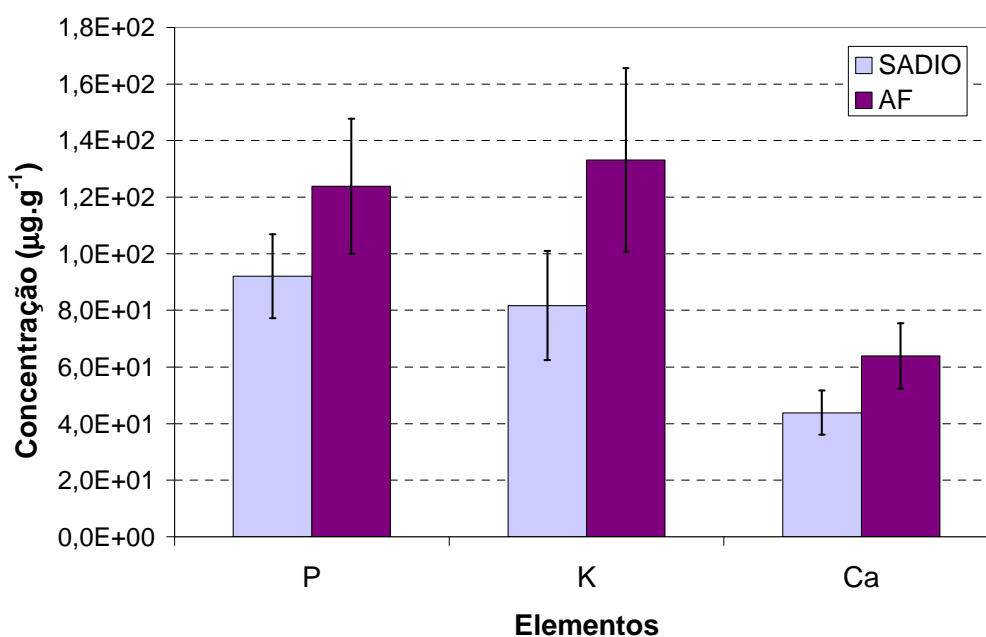
**Figura 5.12** - Comparação entre as médias das concentrações de P, K e Ca encontradas nas amostras de soro de indivíduos saudáveis e portadores de LLA.

A figura 5.13 mostra a comparação entre as médias das concentrações de Na, S e Cl encontradas nas amostras de soro de indivíduos sadios e portadores de AF.



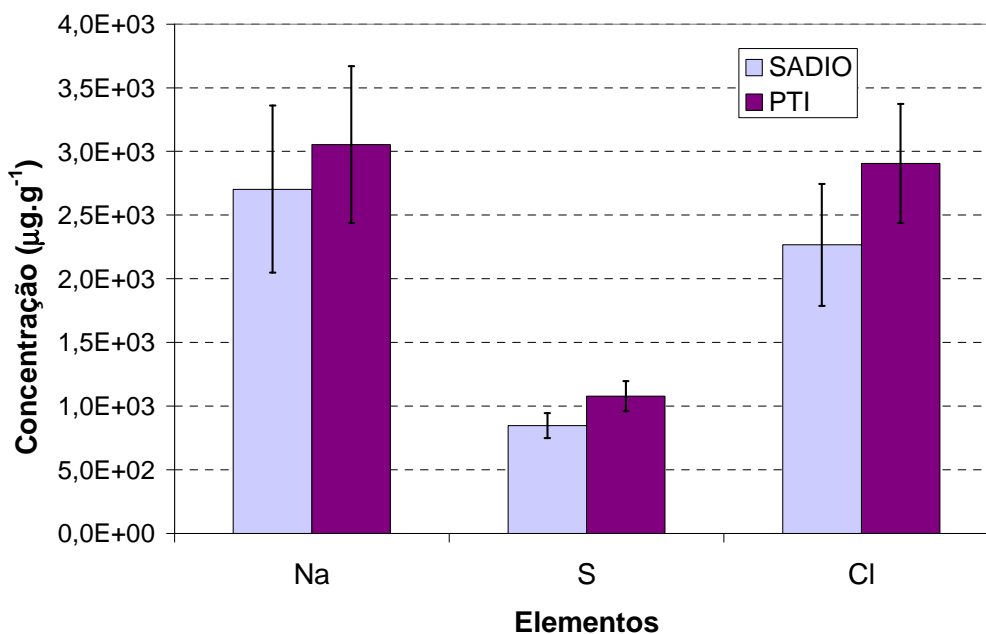
**Figura 5.13** - Comparação entre as médias das concentrações de Na, S e Cl encontradas nas amostras de soro de indivíduos sadios e portadores de AF.

A figura 5.14 mostra a comparação entre as médias das concentrações de P, K e Ca encontradas nas amostras de soro de indivíduos sadios e portadores de AF.



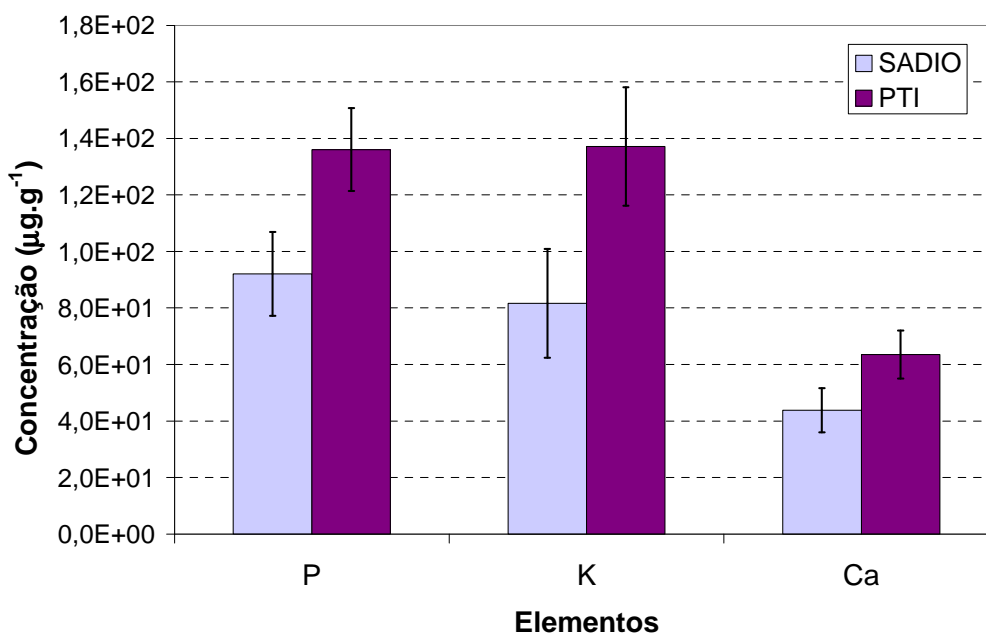
**Figura 5.14** - Comparação entre as médias das concentrações de P, K e Ca encontradas nas amostras de soro de indivíduos sadios e portadores de AF.

A figura 5.15 mostra a comparação entre as médias das concentrações de Na, S e Cl encontradas nas amostras de soro de indivíduos saudáveis e portadores de PTI.



**Figura 5.15** - Comparação entre as médias das concentrações de Na, S e Cl encontradas nas amostras de soro de indivíduos saudáveis e portadores de PTI.

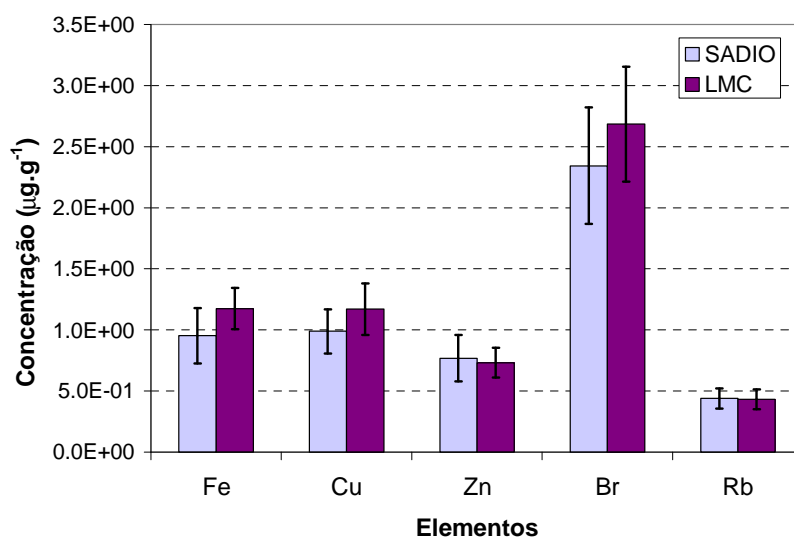
A figura 5.16 mostra a comparação entre as médias das concentrações de P, K e Ca encontradas nas amostras de soro de indivíduos saudáveis e portadores de PTI.



**Figura 5.16** - Comparação entre as médias das concentrações de P, K e Ca encontradas nas amostras de soro de indivíduos saudáveis e portadores de PTI.

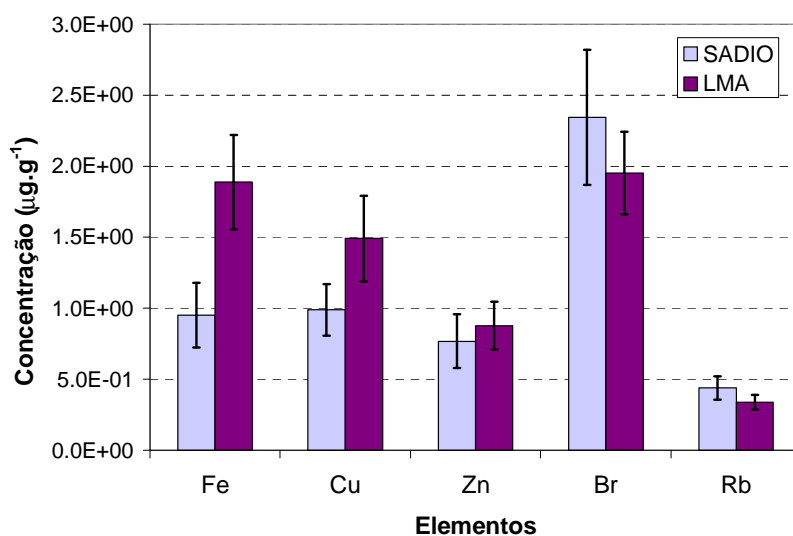
### V.2.3 - Análise entre as Médias das Concentrações Elementares Encontradas (SRTXRF – Convencional)

A figura 5.17 mostra a comparação entre as médias das concentrações de Fe, Cu, Zn, Br e Rb encontradas nas amostras de soro de indivíduos saudáveis e portadores de LMC.



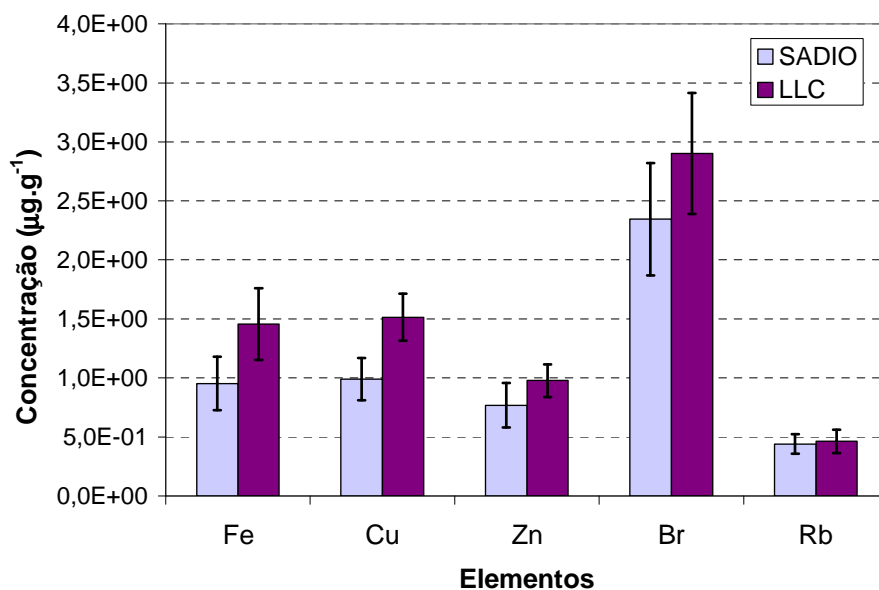
**Figura 5.17** - Comparação entre as médias das concentrações de Fe, Cu, Zn, Br e Rb encontradas nas amostras de soro de indivíduos saudáveis e portadores de LMC.

A figura 5.18 mostra a comparação entre as médias das concentrações de Fe, Cu, Zn, Br e Rb encontradas nas amostras de soro de indivíduos saudáveis e portadores de LMA.



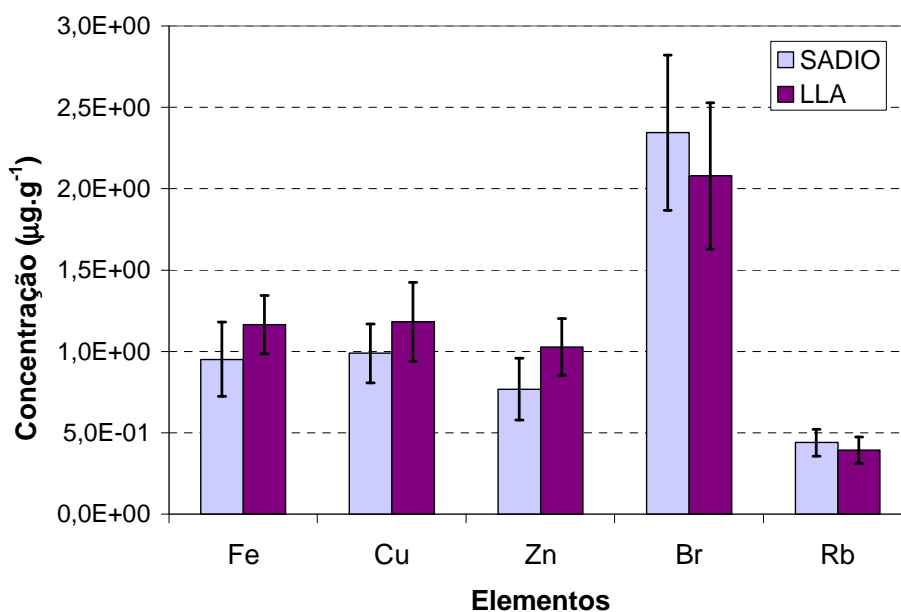
**Figura 5.18** - Comparação entre as médias das concentrações de Fe, Cu, Zn, Br e Rb encontradas nas amostras de soro de indivíduos saudáveis e portadores de LMA.

A figura 5.19 mostra a comparação entre as médias das concentrações de Fe, Cu, Zn, Br e Rb encontradas nas amostras de soro de indivíduos sadios e portadores de LLC.



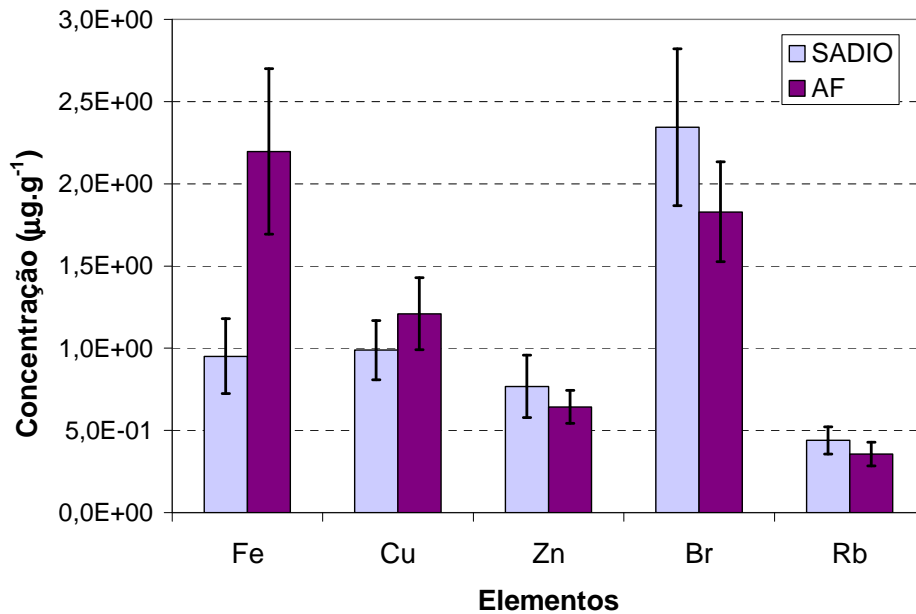
**Figura 5.19** - Comparação entre as médias das concentrações de Fe, Cu, Zn, Br e Rb encontradas nas amostras de soro de indivíduos sadios e portadores de LLC.

A figura 5.20 mostra a comparação entre as médias das concentrações de Fe, Cu, Zn, Br e Rb encontradas nas amostras de soro de indivíduos sadios e portadores de LLA.



**Figura 5.20** - Comparação entre as médias das concentrações de Fe, Cu, Zn, Br e Rb encontradas nas amostras de soro de indivíduos sadios e portadores de LLA.

A figura 5.21 mostra a comparação entre as médias das concentrações de Fe, Cu, Zn, Br e Rb encontradas nas amostras de soro de indivíduos saudáveis e portadores de AF.



**Figura 5.21** - Comparação entre as médias das concentrações de Fe, Cu, Zn, Br e Rb encontradas nas amostras de soro de indivíduos saudáveis e portadores de AF.

### V.3 - Teste t - Ferramenta Estatística para Análise Bivariada dos Resultados

Para o tratamento estatístico das medidas foi utilizado o Student's teste t. Esse teste é utilizado apenas para dois grupos de amostras e testa a igualdade das médias de população subjacentes a cada um deles (LEVINE et al, 2000).

A variação dentro do grupo é considerada um erro experimental, enquanto que a variação entre grupos é atribuída a efeitos de tratamento. Supondo-se que os níveis do fator de estudo representam populações cujas medidas de resultado são retiradas aleatoriamente e independentemente, seguem uma distribuição normal e tem variâncias equivalentes, a hipótese nula de nenhuma diferença nas médias aritméticas das populações:

$$H_0 = \mu_1 = \mu_2 = \dots = \mu_c \quad (5.1)$$

Pode ser testada em relação à hipótese de que nem todas as médias aritméticas das populações são iguais:

$H_1$ : Nem todas as médias ( $\mu_1, \mu_2, \dots, \mu_c$ ) são iguais.

O teste t compara o teste F, que é a média dos quadrados entre os grupos dividida pela média dos quadrados dentro do grupo, com o teste  $F_{crítico}$  que representa uma distribuição F com  $c - 1$  e  $n - c$  graus de liberdade. Então, se  $F > F_{crítico}$ , rejeitar  $H_0$ , caso contrário, não rejeitar (aceitar)  $H_0$  (LOPES, 1999).

Basicamente, se o teste t rejeitar a hipótese nula  $H_0$ , as diferenças entre os dois grupos analisados serão relevantes, ou seja, significativas. Caso contrário, se o teste t aceitar a hipótese nula  $H_0$ , não haverá diferenças significativas entre os dois grupos analisados. A tabela 5.4 resume basicamente a rejeição ou aceitação da hipótese nula  $H_0$ .

**Tabela 5.4** – Rejeição ou Aceitação da Hipótese nula  $H_0$

<b>Teste t (<math>\alpha = 0,05</math>)</b>	
<i>Rejeita a hipótese nula <math>H_0</math></i>	<i>Aceita a hipótese nula <math>H_0</math></i>
<i>Os dois grupos apresentam diferenças significativas</i>	<i>Os dois grupos não apresentam diferenças significativas</i>

### V.3.1 – Teste t e a SRTXRF – Baixo Z

A tabela 5.5 representa os resultados do teste t entre as médias das concentrações dos elementos Na, P, S, Cl; K e Ca encontradas nas amostras de soro de indivíduos sadios e nas amostras de soro de portadores de LMC, de LMA, de LLC, de LLA, de AF e de PTI.



**Tabela 5.5** - Teste t entre as médias das concentrações encontradas nas amostras de soro de indivíduos sadios e de portadores de LMC, de LMA, de LLC, de LLA, de AF e de PTI

		<b>Teste t</b>					
<b>Z</b>	<b>Elemento</b>	<b>LMC (H<sub>0</sub>)</b>	<b>LMA (H<sub>0</sub>)</b>	<b>LLC (H<sub>0</sub>)</b>	<b>LLA (H<sub>0</sub>)</b>	<b>AF (H<sub>0</sub>)</b>	<b>PTI (H<sub>0</sub>)</b>
11	Na	Aceita	Aceita	<b>Rejeita</b>	<b>Rejeita</b>	Aceita	Aceita
15	P	<b>Rejeita</b>	<b>Rejeita</b>	Aceita	<b>Rejeita</b>	<b>Rejeita</b>	<b>Rejeita</b>
16	S	<b>Rejeita</b>	<b>Rejeita</b>	<b>Rejeita</b>	<b>Rejeita</b>	<b>Rejeita</b>	<b>Rejeita</b>
17	Cl	Aceita	Aceita	<b>Rejeita</b>	<b>Rejeita</b>	<b>Rejeita</b>	<b>Rejeita</b>
19	K	<b>Rejeita</b>	Aceita	<b>Rejeita</b>	Aceita	<b>Rejeita</b>	<b>Rejeita</b>
20	Ca	<b>Rejeita</b>	Aceita	Aceita	<b>Rejeita</b>	<b>Rejeita</b>	<b>Rejeita</b>

### V.3.1.1 – Análise dos Resultados obtidos com o Teste t na SRTXRF – Baixo Z

Foram encontrados os seguintes elementos no soro de indivíduos sadios e portadores de LMC, de LMA, de LLC, de LLA, de AF e de PTI: *Sódio, Fósforo, Enxofre, Cloro, Potássio e Cálcio.*

#### V.3.1.1.1 – Indivíduos Sadios e Portadores de LMC

Apresentaram diferenças significativas entre as médias das concentrações dos seguintes elementos: **P**, **S**, **K** e **Ca**.

A média das concentrações de **P** nas amostras de soro de indivíduos portadores de LMC é aproximadamente 35 % maior do que a média das concentrações encontrada para o mesmo elemento nas amostras de soro de indivíduos sadios.

A média das concentrações de **S** nas amostras de soro de indivíduos portadores de LMC é aproximadamente 40 % maior do que a média das concentrações encontrada para o mesmo elemento nas amostras de soro de indivíduos sadios.

A média das concentrações de **K** nas amostras de soro de indivíduos portadores de LMC é aproximadamente 50 % maior do que a média das concentrações encontrada para o mesmo elemento nas amostras de soro de indivíduos sadios.

A média das concentrações de **Ca** nas amostras de soro de indivíduos portadores de LMC é aproximadamente 30 % maior do que a média das concentrações encontrada para o mesmo elemento nas amostras de soro de indivíduos sadios.

#### **V.3.1.1.2 – Indivíduos Sadios e Portadores de LMA**

Apresentaram diferenças significativas entre as médias das concentrações dos seguintes elementos: **P** e **S**.

A média das concentrações de **P** nas amostras de soro de indivíduos portadores de LMA é aproximadamente 20 % maior do que a média das concentrações encontrada para o mesmo elemento nas amostras de soro de indivíduos sadios.

A média das concentrações de **S** nas amostras de soro de indivíduos portadores de LMA é aproximadamente 25 % maior do que a média das concentrações encontrada para o mesmo elemento nas amostras de soro de indivíduos sadios.

#### **V.3.1.1.3 – Indivíduos Sadios e Portadores de LLC**

Apresentaram diferenças significativas entre as médias das concentrações dos seguintes elementos: **Na**, **S**, **Cl** e **K**.

A média das concentrações de **Na** nas amostras de soro de indivíduos portadores de LLC é aproximadamente 35 % maior do que a média das concentrações encontrada para o mesmo elemento nas amostras de soro de indivíduos sadios.

A média das concentrações de **S** nas amostras de soro de indivíduos portadores de LLC é aproximadamente 15 % maior do que a média das concentrações encontrada para o mesmo elemento nas amostras de soro de indivíduos saudáveis.

A média das concentrações de **Cl** nas amostras de soro de indivíduos portadores de LLC é aproximadamente 30 % maior do que a média das concentrações encontrada para o mesmo elemento nas amostras de soro de indivíduos saudáveis.

A média das concentrações de **K** nas amostras de soro de indivíduos portadores de LMC é aproximadamente 85 % maior do que a média das concentrações encontrada para o mesmo elemento nas amostras de soro de indivíduos saudáveis.

#### **V.3.1.1.4 – Indivíduos Saudáveis e Portadores de LLA**

Apresentaram diferenças significativas entre as médias das concentrações dos seguintes elementos: **Na, P, S, Cl e Ca**.

A média das concentrações de **Na** nas amostras de soro de indivíduos portadores de LLA é aproximadamente 37 % maior do que a média das concentrações encontrada para o mesmo elemento nas amostras de soro de indivíduos saudáveis.

A média das concentrações de **P** nas amostras de soro de indivíduos portadores de LLA é aproximadamente 35 % maior do que a média das concentrações encontrada para o mesmo elemento nas amostras de soro de indivíduos saudáveis.

A média das concentrações de **S** nas amostras de soro de indivíduos portadores de LLA é aproximadamente 20 % maior do que a média das concentrações encontrada para o mesmo elemento nas amostras de soro de indivíduos saudáveis.

A média das concentrações de **Cl** nas amostras de soro de indivíduos portadores de LLA é aproximadamente 40 % maior do que a média das concentrações encontrada para o mesmo elemento nas amostras de soro de indivíduos saudáveis.

A média das concentrações de **Ca** nas amostras de soro de indivíduos portadores de LLA é aproximadamente 30 % maior do que a média das concentrações encontrada para o mesmo elemento nas amostras de soro de indivíduos sadios.

#### **V.3.1.1.5 – Indivíduos Sadios e Portadores de AF**

Apresentaram diferenças significativas entre as médias das concentrações dos seguintes elementos: **P, S, Cl, K e Ca.**

A média das concentrações de **P** nas amostras de soro de indivíduos portadores de AF é aproximadamente 27 % maior do que a média das concentrações encontrada para o mesmo elemento nas amostras de soro de indivíduos sadios.

A média das concentrações de **S** nas amostras de soro de indivíduos portadores de AF é aproximadamente 50 % maior do que a média das concentrações encontrada para o mesmo elemento nas amostras de soro de indivíduos sadios.

A média das concentrações de **Cl** nas amostras de soro de indivíduos portadores de AF é aproximadamente 20 % maior do que a média das concentrações encontrada para o mesmo elemento nas amostras de soro de indivíduos sadios.

A média das concentrações de **K** nas amostras de soro de indivíduos portadores de AF é aproximadamente 30 % maior do que a média das concentrações encontrada para o mesmo elemento nas amostras de soro de indivíduos sadios.

A média das concentrações de **Ca** nas amostras de soro de indivíduos portadores de AF é aproximadamente 40 % maior do que a média das concentrações encontrada para o mesmo elemento nas amostras de soro de indivíduos sadios.

#### **V.3.1.1.6 – Indivíduos Sadios e Portadores de PTI**

Apresentaram diferenças significativas entre as médias das concentrações dos seguintes elementos: **P, S, Cl, K e Ca.**

A média das concentrações de **P** nas amostras de soro de indivíduos portadores de PTI é aproximadamente 45 % maior do que a média das concentrações encontrada para o mesmo elemento nas amostras de soro de indivíduos saudáveis.

A média das concentrações de **S** nas amostras de soro de indivíduos portadores de PTI é aproximadamente 25 % maior do que a média das concentrações encontrada para o mesmo elemento nas amostras de soro de indivíduos saudáveis.

A média das concentrações de **Cl** nas amostras de soro de indivíduos portadores de PTI é aproximadamente 30 % maior do que a média das concentrações encontrada para o mesmo elemento nas amostras de soro de indivíduos saudáveis.

A média das concentrações de **K** nas amostras de soro de indivíduos portadores de PTI é aproximadamente 60 % maior do que a média das concentrações encontrada para o mesmo elemento nas amostras de soro de indivíduos saudáveis.

A média das concentrações de **Ca** nas amostras de soro de indivíduos portadores de PTI é aproximadamente 40 % maior do que a média das concentrações encontrada para o mesmo elemento nas amostras de soro de indivíduos saudáveis.

### **V.3.2 – Teste t e a SRTXRF - Convencional**

A tabela 5.6 representa os resultados do Teste t entre as médias das concentrações dos elementos Fe, Cu, Zn, Br e Rb encontradas nas amostras de soro de indivíduos saudáveis e nas amostras de soro de portadores de LMC, de LMA, de LLC, de LLA e de AF.

**Tabela 5.6** - Teste t entre as médias das concentrações encontradas nas amostras de soro de indivíduos sadios e de portadores de LMC, de LMA, de LLC, de LLA e de AF.

<b>Z</b>	<b>Elemento</b>	<b>LMC (H<sub>0</sub>)</b>	<b>LMA (H<sub>0</sub>)</b>	<b>LLC (H<sub>0</sub>)</b>	<b>LLA (H<sub>0</sub>)</b>	<b>AF (H<sub>0</sub>)</b>
26	Fe	Aceita	<b>Rejeita</b>	<b>Rejeita</b>	Aceita	<b>Rejeita</b>
29	Cu	<b>Rejeita</b>	<b>Rejeita</b>	<b>Rejeita</b>	<b>Rejeita</b>	<b>Rejeita</b>
30	Zn	Aceita	Aceita	<b>Rejeita</b>	<b>Rejeita</b>	<b>Rejeita</b>
35	Br	<b>Rejeita</b>	<b>Rejeita</b>	<b>Rejeita</b>	<b>Rejeita</b>	<b>Rejeita</b>
37	Rb	Aceita	<b>Rejeita</b>	Aceita	Aceita	<b>Rejeita</b>

### V.3.2.1 – Análise dos Resultados obtidos com o Teste t na SRTXRF - Convencional

Foram encontrados os seguintes elementos no soro de indivíduos sadios e portadores de LMC, de LMA, de LLC, de LLA e de AF: Fósforo, Enxofre, Cloro, Potássio, Cálcio, Ferro, Cobre, Zinco, Bromo e Rubídio. O teste t foi utilizado apenas para comparar os elementos que não foram comparados na SRTXRF – Baixo Z (para números atômicos entre 8 e 20). Os elementos avaliados pelo teste t para a SRTXRF – Convencional foram: *Ferro, Cobre, Zinco, Bromo e Rubídio*.

#### V.3.2.1.1 – Indivíduos Sadios e Portadores de LMC

Apresentaram diferenças significativas entre as médias das concentrações dos seguintes elementos: **Cu** e **Br**.

A média das concentrações de **Cu** nas amostras de soro de indivíduos portadores de LMC é aproximadamente 25 % maior do que a média das concentrações encontrada para o mesmo elemento nas amostras de soro de indivíduos sadios.

A média das concentrações de **Br** nas amostras de soro de indivíduos portadores de LMC é aproximadamente 20 % maior do que a média das concentrações encontrada para o mesmo elemento nas amostras de soro de indivíduos saudáveis.

#### **V.3.2.1.2 – Indivíduos Saudáveis e Portadores de LMA**

Apresentaram diferenças significativas entre as médias das concentrações dos seguintes elementos: **Fe, Cu, Br e Rb**

A média das concentrações de **Fe** nas amostras de soro de indivíduos portadores de LMA é aproximadamente 80 % maior do que a média das concentrações encontrada para o mesmo elemento nas amostras de soro de indivíduos saudáveis.

A média das concentrações de **Cu** nas amostras de soro de indivíduos portadores de LMA é aproximadamente 50 % maior do que a média das concentrações encontrada para o mesmo elemento nas amostras de soro de indivíduos saudáveis.

A média das concentrações de **Br** nas amostras de soro de indivíduos portadores de LMA é aproximadamente 25 % menor do que a média das concentrações encontrada para o mesmo elemento nas amostras de soro de indivíduos saudáveis.

A média das concentrações de **Rb** nas amostras de soro de indivíduos portadores de LMA é aproximadamente 35 % menor do que a média das concentrações encontrada para o mesmo elemento nas amostras de soro de indivíduos saudáveis.

#### **V.3.2.1.3 – Indivíduos Saudáveis e Portadores de LLC**

Apresentaram diferenças significativas entre as médias das concentrações dos seguintes elementos: **Fe, Cu, Zn e Br**

A média das concentrações de **Fe** nas amostras de soro de indivíduos portadores de LLC é aproximadamente 50 % maior do que a média das concentrações encontrada para o mesmo elemento nas amostras de soro de indivíduos saudáveis.

A média das concentrações de **Cu** nas amostras de soro de indivíduos portadores de LLC é aproximadamente 50 % maior do que a média das concentrações encontrada para o mesmo elemento nas amostras de soro de indivíduos saudáveis.

A média das concentrações de **Zn** nas amostras de soro de indivíduos portadores de LLC é aproximadamente 25 % maior do que a média das concentrações encontrada para o mesmo elemento nas amostras de soro de indivíduos saudáveis.

A média das concentrações de **Br** nas amostras de soro de indivíduos portadores de LLC é aproximadamente 20 % maior do que a média das concentrações encontrada para o mesmo elemento nas amostras de soro de indivíduos saudáveis.

#### **V.3.2.1.4 – Indivíduos Saudáveis e Portadores de LLA**

Apresentaram diferenças significativas entre as médias das concentrações dos seguintes elementos: **Cu, Zn e Br**

A média das concentrações de **Cu** nas amostras de soro de indivíduos portadores de LLA é aproximadamente 20 % maior do que a média das concentrações encontrada para o mesmo elemento nas amostras de soro de indivíduos saudáveis.

A média das concentrações de **Zn** nas amostras de soro de indivíduos portadores de LLA é aproximadamente 30 % maior do que a média das concentrações encontrada para o mesmo elemento nas amostras de soro de indivíduos saudáveis.

A média das concentrações de **Br** nas amostras de soro de indivíduos portadores de LLA é aproximadamente 15 % menor do que a média das concentrações encontrada para o mesmo elemento nas amostras de soro de indivíduos saudáveis.

#### **V.3.2.1.5 – Indivíduos Saudáveis e Portadores de AF**

Apresentaram diferenças significativas entre as médias das concentrações dos seguintes elementos: **Fe, Cu, Zn, Br e Rb**



A média das concentrações de **Fe** nas amostras de soro de indivíduos portadores de AF é aproximadamente 120 % maior do que a média das concentrações encontrada para o mesmo elemento nas amostras de soro de indivíduos saudáveis.

A média das concentrações de **Cu** nas amostras de soro de indivíduos portadores de AF é aproximadamente 25 % maior do que a média das concentrações encontrada para o mesmo elemento nas amostras de soro de indivíduos saudáveis.

A média das concentrações de **Zn** nas amostras de soro de indivíduos portadores de AF é aproximadamente 10 % menor do que a média das concentrações encontrada para o mesmo elemento nas amostras de soro de indivíduos saudáveis.

A média das concentrações de **Br** nas amostras de soro de indivíduos portadores de AF é aproximadamente 25 % menor que a média das concentrações encontrada para o mesmo elemento nas amostras de soro de indivíduos saudáveis.

A média das concentrações de **Rb** nas amostras de soro de indivíduos portadores de AF é aproximadamente 20 % menor que a média das concentrações encontrada para o mesmo elemento nas amostras de soro de indivíduos saudáveis.

#### **V.4 – SPSS for Windows – Análise Multivariada**

As técnicas de análise multivariada possibilitam avaliar um conjunto de características (variáveis), considerando correlações existentes. A análise multivariada tem a finalidade de reunir, por critérios de classificação, as unidades amostrais em grupos, de tal forma que exista homogeneidade dentro do grupo e heterogeneidade entre os grupos (**JOHNSON e WICHERN, 1992**)

O SPSS (Statistical Package for the Social Science) for Windows é um software que permite o gerenciamento e a análise de dados oriundos de uma amostragem com mais de uma variável. Neste trabalho, o SPSS foi utilizado para fazer a análise bivariada e multivariada dos grupos analisados (Sadio – SS, LMC, LMA, LLC, LLA, AF e PTI) e

as quatro variáveis envolvidas (concentração elementar, sexo, idade e tempo de tratamento).

#### V.4.1 – Análise Bivariada através do SPSS

A análise bivariada do SPSS estuda a influência de uma variável em outra ou o grau de associação entre elas. Para este tipo de análise foi utilizado o *coeficiente de correlação Pearson* que atua como um teste de hipóteses para determinar se existe correlação linear significativa ou não entre as duas variáveis: nula e alternativa (MILONE e ANGELINE, 1995).

$H_0: r = 0$  (Não há correlação linear significativa)

$H_1: r \neq 0$  (Há correlação linear significativa)

A estatística do teste é dada pela equação:

$$t = \frac{r}{\sqrt{\frac{1-r^2}{n-2}}} \quad (5.2)$$

O sinal de  $r$  é dado pela direção da correlação entre as variáveis observadas e calculadas. Este valor estará sempre entre  $-1$  e  $1$ . O sinal é obtido pela direção da correlação entre as variáveis. Se elas forem diretamente proporcionais, a correlação será dita direta e  $r$  será positivo; se forem inversamente proporcionais, a correlação será dita inversa e  $r$  será negativo.

A probabilidade de significância deste teste corresponde ao menor nível de significância que pode ser assumido para rejeitar a hipótese nula. O arquivo de saída neste caso gera uma tabela de distribuição de frequências de dupla entrada ou bivariada. As variáveis avaliadas foram os grupos de doenças hematológicas, as médias das concentrações de cada elemento além de informações do sexo, idade e tempo de tratamento de cada paciente. As tabelas (C.1 até C.13) com as correlações encontram-se no **APÊNDICE C**.

As correlações significantes estão marcadas com um asterístico \* ( $\alpha = 0,05$ ) ou dois asterísticos \*\* ( $\alpha = 0,01$ ). Usualmente, a partir de 0,400, pode-se entender como uma correlação significativa forte e a partir de 0,700 como uma correlação significativa muito forte. Estas correlações podem ser positivas ou negativas, ou seja, diretamente ou inversamente proporcionais.

#### **V.4.1.1 – Análise Bivariada através do SPSS (SRTXRF – Baixo Z)**

Deve-se tomar como parâmetro a tabela C.1 de análise bivariada do Grupo Sadio (Grupo de Controle) e compará-la com as tabelas C.2, C.3, C.4, C.5, C.6 e C.7. As diferenças entre as tabelas, ou seja, entre os grupos de doenças hematológicas no que diz respeito às correlações encontradas, podem caracterizar cada grupo e diferenciá-lo dos demais. Em alguns casos, algumas correlações se repetem de um grupo para outro, porém, nunca com a mesma intensidade (sempre mais ou menos fortes).

Na tabela C.1, que representa a correlação bivariada do Grupo Sadio, vê-se correlações significativas (fortes ou muito fortes) entre: Na e Cl; Na e K; Na e a idade (inversamente proporcionais); P e S; P e Cl; P e K; S e Cl; S e K; S e Ca; S e a idade (inversamente proporcionais); Cl e K; Cl e a idade (inversamente proporcionais); K e a idade (inversamente proporcionais).

Na tabela C.2, que representa a correlação bivariada do Grupo LMC, vê-se correlações significativas (fortes ou muito fortes) entre: Na e Cl; Na e Ca; P e S; Cl e K; Cl e Ca; K e Ca.

Na tabela C.3, que representa a correlação bivariada do Grupo LMA, vê-se correlações significativas (fortes ou muito fortes) entre: Na e Cl; P e S; P e K; P e Ca; S e K; S e Ca; Cl e a idade; K e Ca; K e o tempo de tratamento; Ca e o tempo de tratamento.

Na tabela C.4, que representa a correlação bivariada do Grupo LLC, vê-se correlações significativas (fortes ou muito fortes) entre: Na e P (inversamente proporcionais); Na e K (inversamente proporcionais); Na e Ca (inversamente proporcionais); Na e o sexo (inversamente proporcionais); P e S; P e a idade

(inversamente proporcionais); S e a idade (inversamente proporcionais); K e Ca; K e o sexo; Ca e o sexo; Ca e a idade; Sexo e idade.

Na tabela C.5, que representa a correlação bivariada do Grupo LLA, vê-se correlações significativas (fortes ou muito fortes) entre: Na e Cl; Na e Ca; Na e o tempo de tratamento (inversamente proporcionais); P e S; P e K; P e o tempo de tratamento (inversamente proporcionais); S e K; Cl e Ca; sexo e idade (inversamente proporcionais).

Na tabela C.6, que representa a correlação bivariada do Grupo AF, vê-se correlações significativas (fortes ou muito fortes) entre: Na e S; Na e Cl; Na e K; P e S; P e Cl; P e K; P e Ca; S e Cl; S e K; S e Ca; Cl e K; Cl e Ca; K e Ca; sexo e idade.

Na tabela C.7, que representa a correlação bivariada do Grupo PTI, vê-se correlações significativas (fortes ou muito fortes) entre: Na e P; Na e S; Na e Cl; P e S; P e Cl; P e K; P e Ca; S e Cl; S e Ca; Cl e K; Cl e Ca; K e Ca, K e a idade; sexo e tempo de tratamento.

#### **V.4.1.2 – Análise Bivariada através do SPSS (SRTXRF – Convencional)**

Deve-se tomar como parâmetro a tabela C.8 de análise bivariada do Grupo Sadio (Grupo de Controle) e compará-la com as tabelas C.9, C.10, C.11, C.12 e C.13. As diferenças entre as tabelas, ou seja, entre os grupos de doenças hematológicas no que diz respeito às correlações encontradas, podem caracterizar cada grupo e diferenciá-lo dos demais. Em alguns casos, algumas correlações se repetem de um grupo para outro, porém, nunca com a mesma intensidade (sempre mais ou menos fortes).

Na tabela C.8, que representa a correlação bivariada do Grupo Sadio, vê-se correlações significativas (fortes ou muito fortes) entre: Cu e Zn; Cu e sexo (inversamente proporcionais); Rb e idade.

Na tabela C.9, que representa a correlação bivariada do Grupo LMC, vê-se correlações significativas (fortes ou muito fortes) entre: Br e Rb

Na tabela C.10, que representa a correlação bivariada do Grupo LMA, vê-se correlações significativas (fortes ou muito fortes) entre: Fe e Rb; Br e sexo.

Na tabela C.11, que representa a correlação bivariada do Grupo LLC, vê-se correlações significativas (fortes ou muito fortes) entre: Fe e Cu (inversamente proporcionais); Fe e Zn; Fe e Rb; Fe e sexo; Fe e idade; Cu e Zn (inversamente proporcionais); Cu e Br (inversamente proporcionais); Cu e idade; Zn e sexo; Zn e idade; Br e idade; Rb e sexo; sexo e idade, idade e tempo (inversamente proporcionais).

Na tabela C.12, que representa a correlação bivariada do Grupo LLA, vê-se correlações significativas (fortes ou muito fortes) entre: Fe e Rb; Cu e idade; Zn e Br; Zn e idade; Sexo e tempo de tratamento (inversamente proporcionais).

Na tabela C.13, que representa a correlação bivariada do Grupo AF, vê-se correlações significativas (fortes ou muito fortes) entre: Cu e Br (inversamente proporcionais); Br e Rb.

#### **V.4.2 - Análise Multivariada Através do SPSS**

A análise multivariadas foi realizada através do programa SPSS: Para tal, usou-se a uma ferramenta estatística do próprio SPSS chamada de Análise por Componentes Principais (PCA - Principal Component Analysis).

Quando o interesse é verificar como os grupos se relacionam, ou seja, o quanto eles são semelhantes segundo variáveis definidas, destaca-se o PCA, ferramenta do próprio SPSS (TRUGILHO, 1995). Nesta análise, através de um gráfico cartesiano (dados bidimensionais organizados na forma de matriz) onde as linhas podem ser as amostras e as colunas as variáveis ou vice-versa, é possível “localizar” a variável no espaço e distanciá-la ou não de outras dependendo do seu grau de semelhança com estas. Isto é feito da seguinte forma: Um ponto no gráfico cartesiano é representado por valores das coordenadas  $m$  e  $n$ . Pode-se dizer que o ponto devidamente localizado no espaço é uma amostra (ou grupo) e os valores de cada uma das coordenadas corresponde aos valores das variáveis medidas ou as características de cada amostra (indivíduo) (MOITA NETO e MOITA, 1998). As componentes principais são

ortogonais entre si e cada uma delas traz uma informação diferente da outra. Desta forma, através do PCA é possível identificar amostras anômalas (diferentes dentro dos grupos das quais fazem parte) chamadas de *outliers*, classificar e selecionar variáveis importantes para cada grupo de doença hematológica. Basicamente o PCA consiste em reescrever as variáveis originais em novas variáveis através de uma transformação de coordenadas através de matrizes.

Os dados consistem em  $n$  variáveis executadas sobre  $m$  amostras, de modo que a matriz de dados  $D$  é formada por  $m \times n$  elementos ( $m$  linhas correspondentes as amostras e  $n$  colunas correspondentes as variáveis).

$$D = \begin{pmatrix} d_{11} & d_{12} & \cdots & d_{1j} & \cdots & d_{1n} \\ d_{21} & & & \vdots & & \vdots \\ \vdots & & & \vdots & & \vdots \\ d_{i1} & \cdots & \cdots & d_{ij} & \cdots & \vdots \\ \vdots & & & \vdots & & \vdots \\ d_{m1} & \cdots & \cdots & \cdots & \cdots & d_{mn} \end{pmatrix} \quad (5.3)$$

A  $j$ -ésima variável é representada por um vetor coluna. O  $i$ -ésimo objeto, ou seja, uma amostra qualquer, é representada por um vetor linha chamado vetor resposta e pode ser descrito como um ponto no espaço  $n$ -dimensional.

A tabela gerada antes do gráfico das componentes principais (**Component Plot**) com título “**Component Matrix**” extraída diretamente do SPSS representa o grau de correlação múltipla de cada variável na *componente principal 1 (PC1)* e na *componente principal 2 (PC2)*. Esta tabela mostra a correlação de cada elemento com a *componente principal 1 e a componente principal 2*. Os valores para as correlações entre componentes e elementos variam de -1 a +1. Os sinais negativos e positivos representam a parte negativa e positiva de cada eixo (componente). Usualmente, acima de 0,500 tem-se uma correlação alta entre a variável, neste caso, o elemento e a componente em questão (1 ou 2).

As variáveis em questão geram, através de combinações lineares,  $n$  componentes principais ortogonais que são obtidas em ordem decrescente de máxima variância, ou

seja, a componente principal 1 (PC1) contém mais informações estatísticas que a componente principal 2 (PC2) e assim por diante.

Usualmente, utilizam-se as duas primeiras componentes principais porque geralmente estas detêm aproximadamente 80% das informações relevantes. Para interpretar estas tabelas, devem-se identificar as variáveis originais com maior “peso” na combinação linear das componentes principais mais importantes.

#### **V.4.2.1 - Análise Multivariada Através do SPSS Dentro de Cada Grupo Estudado (SRTXRF – Baixo Z)**

Através das tabelas D.1 até D.7 com títulos “**Component Matrix**” que se encontram no **APÊNDICE D** serão vistas as representações dos graus de correlação múltipla de cada variável na componente principal 1 (PC1) e na componente principal 2 (PC2). Cada tabela representa o grau de correlação múltipla das variáveis que são as médias das concentrações de Na, P, S, Cl, K e Ca com as componentes principais 1 e 2 dentro de cada grupo analisado (Sadio, LMC, LMA, LLC, LLA, AF e PTI).

As figuras D.1 até D.7 com títulos “**Component Plot**” são gráficos extraídos diretamente do SPSS que mostram o quanto as variáveis, neste caso, representadas pelos elementos, estão próximas ou afastadas entre si. Estas figuras encontram-se no **APÊNDICE D**. Cada gráfico caracteriza o grupo analisado (Sadio, LMC, LMA, LLC, LLA, AF e PTI) em relação às suas variáveis que são as médias das concentrações de Na, P, S, Cl, K e Ca.

A figura D.1 representa o gráfico que caracteriza o grupo Sadio (Grupo Controle). Basicamente formaram-se dois subgrupos:

- Subgrupo 01: Contém P e S.
- Subgrupo 02: Contém Na, Cl e K.

A figura D.2 representa o gráfico que caracteriza o grupo LMC. Basicamente formaram-se dois subgrupos:

- Subgrupo 01: Contém P e S.

- Subgrupo 02: Contém Na, Cl, K e Ca.

A figura D.3 representa o gráfico que caracteriza o grupo LMA. Basicamente formou-se um subgrupo:

- Subgrupo 01: Contém P, S, K e Ca.

A figura D.4 representa o gráfico que caracteriza o grupo LLC. Basicamente formou-se um subgrupo:

- Subgrupo 01: Contém P e S.

A figura D.5 representa o gráfico que caracteriza o grupo LLA. Basicamente formaram-se dois subgrupos:

- Subgrupo 01: Contém Na, Cl e Ca.
- Subgrupo 02: Contém P, S e K.

A figura D.6 representa o gráfico que caracteriza o grupo AF. Basicamente formaram-se dois subgrupos:

- Subgrupo 01: Contém Na e Cl.
- Subgrupo 02: Contém P, S, K e Ca.

A figura D.7 representa o gráfico que caracteriza o grupo PTI. Basicamente formam-se dois subgrupos:

- Subgrupo 01: Contém Na e Cl
- Subgrupo 02: Contém P, S, K e Ca.

Os gráficos que representam AF e PTI são muito parecidos, mas não são iguais. Pode-se dizer que as figuras D.1, D.2, D.3, D.4, D.5, D.6 e D.7 caracterizam os grupos e os diferenciam em relação às suas concentrações elementares.



#### V.4.2.2 - Análise Multivariada Através do SPSS Dentro de Cada Grupo Estudado (SRTXRF - Convencional)

Através das tabelas D.8 até D.13 com títulos “**Component Matrix**” que se encontram no **APÊNDICE D** serão vistas as representações dos graus de correlação múltipla de cada variável na componente principal 1 (PC1) e na componente principal 2 (PC2). Cada tabela representa o grau de correlação múltipla das variáveis que são as médias das concentrações de Fe, Cu, Zn, Br e Rb com as componentes principais 1 e 2 dentro de cada grupo analisado (Sadio, LMC, LMA, LLC, LLA e AF)

As figuras D.8 até D.13 com títulos “**Component Plot**” são gráficos extraídos diretamente do SPSS que mostram o quanto as variáveis, neste caso, representadas pelos elementos, estão próximas ou afastadas entre si. Estas figuras encontram-se no **APÊNDICE D**. Cada gráfico caracteriza o grupo analisado (Sadio, LMC, LMA, LLC, LLA e AF) em relação às suas variáveis que são as médias das concentrações de Fe, Cu, Zn, Br e Rb.

A figura D.8 representa o gráfico que caracteriza o grupo Sadio (Grupo Controle). Basicamente formaram-se dois subgrupos:

- Subgrupo 01: Contém Fe e Br.
- Subgrupo 02: Contém Cu e Zn.

A figura D.9 representa o gráfico que caracteriza o grupo LMC. Basicamente formaram-se dois subgrupos:

- Subgrupo 01: Contém Fe e Zn.
- Subgrupo 02: Contém Br e Rb.

A figura D.10 representa o gráfico que caracteriza o grupo LMA. Os elementos ficaram bem distribuídos pelo gráfico. Não se foram subgrupos.

A figura D.11 representa o gráfico que caracteriza o grupo LLC. Basicamente formou-se um subgrupo:

- Subgrupo 01: Contém Fe e Zn.

A figura D.12 representa o gráfico que caracteriza o grupo LLA. Basicamente formou-se um subgrupo:

- Subgrupo 01: Contém Zn, Br e Rb.

A figura D.13 representa o gráfico que caracteriza o grupo AF. Os elementos ficaram bem distribuídos pelo gráfico. Não se foram subgrupos.

Pode-se dizer que as figuras D.8, D.9, D.10, D.11, D.12 e D.13 caracterizam os grupos e os diferenciam em relação às suas concentrações elementares.

#### **V.4.2.3 - Análise Multivariada Através do SPSS Entre os Grupos Estudados em Relação às Concentrações Elementares Individuais (SRTXRF – Baixo Z)**

Através das tabelas E.1 até E.6 com títulos “**Component Matrix**” que se encontram no **APÊNDICE D** serão vistas as representações dos graus de correlação múltipla de cada variável na componente principal 1 (PC1) e na componente principal 2 (PC2). Cada tabela representa o grau de correlação múltipla das variáveis que são os grupos analisados (Sadio, LMC, LMA, LLC, LLA, AF e PTI) com as componentes principais 1 e 2 dentro de cada grupo analisado levando-se em consideração a média da concentração de cada elemento (Na, P, S, Cl, K e Ca).

As figuras E.1 até E.6 com títulos “**Component Plot**” são gráficos extraídos diretamente do SPSS que mostram o quanto as variáveis, neste caso, representadas pelos grupos, estão próximas ou afastadas entre si. Estas figuras encontram-se no **APÊNDICE E**. Cada gráfico caracteriza a distribuição dos grupos analisados (Sadio, LMC, LMA, LLC, LLA, AF e PTI) em relação às médias das concentrações individuais.

A figura E.1 representa o gráfico que diferencia a distribuição dos grupos em relação às médias das concentrações de Na. Verificou-se que os grupos estão bem distribuídos. Isso caracteriza diferenças entre os grupos em relação às médias de Na.

A figura E.2 representa o gráfico que diferencia a distribuição dos grupos em relação às médias das concentrações de P. Verificou-se que os grupos estão bem

distribuídos caracterizando diferenças entre os mesmos em relação às médias de P. Porém o grupo LMC e o grupo LLA estão muito próximos caracterizando semelhanças entre eles.

A figura E.3 representa o gráfico que diferencia a distribuição dos grupos em relação às médias das concentrações de S. Verificou-se que os grupos estão bem distribuídos caracterizando diferenças entre os mesmos em relação às médias de S. Porém o grupo LMC e o grupo LLA estão muito próximos caracterizando semelhanças entre eles.

A figura E.4 representa o gráfico que diferencia a distribuição dos grupos em relação às médias das concentrações de Cl. Verificou-se que os grupos estão bem distribuídos caracterizando diferenças entre os mesmos em relação às médias de Cl. Porém o grupo LMA e o grupo LLA estão muito próximos caracterizando semelhanças entre eles.

A figura E.5 representa o gráfico que diferencia a distribuição dos grupos em relação às médias das concentrações de K. Verificou-se que os grupos estão bem distribuídos caracterizando diferenças entre os mesmos em relação às médias de K. Porém o grupo PTI e o grupo LLA estão muito próximos caracterizando semelhanças entre eles.

A figura E.6 representa o gráfico que diferencia a distribuição dos grupos em relação às médias das concentrações de Ca. Verificou-se que os grupos estão bem distribuídos caracterizando diferenças entre os mesmos em relação às médias de Ca.

Pode-se dizer que as figuras E.1, E.2, E.3, E.4, E.5 e E.6 diferenciam ou assemelham os grupos (LMC, LMA, LLC, LLA, AF e PTI), dependendo da proximidade ou afastamento entre eles no gráfico cartesiano, em relação à média da concentração de cada elemento individualmente.

#### V.4.2.4 - Análise Multivariada Através do SPSS Entre os Grupos Estudados em Relação às Concentrações Elementares Individuais (SRTXRF Convencional)

Através das tabelas E.7 até E.11 com títulos “**Component Matrix**” que se encontram no **APÊNDICE D** serão vistas as representações dos graus de correlação múltipla de cada variável na componente principal 1 (PC1) e na componente principal 2 (PC2). Cada tabela representa o grau de correlação múltipla das variáveis que são os grupos analisados (Sadio, LMC, LMA, LLC, LLA e AF) com as componentes principais 1 e 2 dentro de cada grupo analisado levando-se em consideração a média da concentração de cada elemento (Fe, Cu, Zn, Br e Rb).

As figuras E.7 até E.11 com títulos “**Component Plot**” são gráficos extraídos diretamente do SPSS que mostram o quanto as variáveis, neste caso, representadas pelos grupos, estão próximas ou afastadas entre si. Estas figuras encontram-se no **APÊNDICE E**. Cada gráfico caracteriza a distribuição dos grupos analisados (Sadio, LMC, LMA, LLC, LLA e AF) em relação às médias das concentrações individuais.

As figuras E.7 até E.11 com títulos “**Component Plot**” são gráficos extraídos diretamente do SPSS que mostram o quanto as variáveis, neste caso, representadas pelos grupos, estão próximas ou afastadas entre si. Estas figuras encontram-se no **APÊNDICE E**. Cada gráfico caracteriza a distribuição dos grupos (sadio - SS, LMC, LMA, LLC, LLA e AF) em relação às concentrações elementares individuais (Fe, Cu, Zn, Br e Rb).

A figura E.7 representa o gráfico que diferencia a distribuição dos grupos em relação às médias das concentrações de Fe. Verificou-se que os grupos estão bem distribuídos caracterizando diferenças entre os mesmos em relação às médias de Fe.

A figura E.8 representa o gráfico que diferencia a distribuição dos grupos em relação às médias das concentrações de Cu. Verificou-se que os grupos estão bem distribuídos caracterizando diferenças entre os mesmos em relação às médias de Cu.

A figura E.9 representa o gráfico que diferencia a distribuição dos grupos em relação às médias das concentrações de Zn. Verificou-se que os grupos estão bem distribuídos caracterizando diferenças entre os mesmos em relação às médias de Zn.

A figura E.10 representa o gráfico que diferencia a distribuição dos grupos em relação às médias das concentrações de Br. Verificou-se que os grupos estão bem distribuídos caracterizando diferenças entre os mesmos em relação às médias de Br.

A figura E.11 representa o gráfico que diferencia a distribuição dos grupos em relação às médias das concentrações de Rb. Verificou-se que os grupos estão bem distribuídos caracterizando diferenças entre os mesmos em relação às médias de Rb. Porém o grupo Sadio e o grupo LLA estão muito próximos caracterizando semelhanças entre eles.

Pode-se dizer que as figuras E.7, E.8, E.9, E.10 e E.11 diferenciam ou assemelham os grupos (LMC, LMA, LLC, LLA e AF), dependendo da proximidade ou afastamento entre eles no gráfico cartesiano, em relação à média da concentração de cada elemento individualmente.

## CAPÍTULO VI

### CONCLUSÕES E SUGESTÕES

#### VI.1 - Conclusões

Os resultados obtidos com a realização deste trabalho levaram a uma série de considerações importantes quanto à técnica empregada, às análises estatísticas utilizadas e quanto aos futuros trabalhos que poderão ser desenvolvidos a partir destes resultados.

A técnica de Fluorescência de Raios X por Reflexão Total com Radiação Síncrotron (Baixo Z e Convencional) mostrou-se bastante eficiente na determinação das concentrações multielementares em amostras de soro humano. Os elementos detectados foram: Sódio, Fósforo, Enxofre, Cloro, Potássio, Cálcio, Ferro, Cobre, Zinco, Bromo e Rubídio.

Através da análise bivariada Student's teste t foi possível obter as diferenças reais entre as médias das concentrações dos elementos encontradas nas amostras de soro dos pacientes e nas amostras de soro dos indivíduos sadios.

Na análise bivariada dos resultados usando o SPSS foi possível verificar a correlação múltipla entre os elementos e as variáveis como concentração elementar, sexo, idade e tempo de tratamento em cada grupo de doença hematológica (LMC, LMA, LLC, LLA, AF, PTI) e o grupo Sadio. A análise bivariada do SPSS mostrou como as correlações elementares (fortes ou muito fortes) apresentam-se diferentes entre os grupos, caracterizando assim, diferenças que de fato, representam a individualidade de cada doença hematológica.

Através da análise multivariada por Componentes Principais (PCA) do SPSS foi possível caracterizar cada grupo em relação às distribuições das concentrações elementares presentes nas amostras de soro.

Usando o PCA também foi possível caracterizar a distribuição dos grupos LMC, LMA, LLC, LLA, AF, PTI e Sadio em relação à concentração de cada elemento químico medido nas amostras de soro (Sódio, Fósforo, Enxofre, Cloro, Potássio, Cálcio, Ferro, Cobre, Zinco, Bromo e Rubídio). De uma forma geral, foi observado que cada grupo de doença hematológica tem características diferentes bem definidas na maioria dos casos analisados, o caracteriza cada grupo.

Os aumentos das concentrações de Ferro nas amostras de soro de portadores de LMA (80%>), LLC (50%>) e AF (120%>) podem estar relacionados com a ingestão de medicamentos de reposição de Ferro e com as sucessivas transfusões de sangue total e/ou de hemácias as quais são submetidos esses pacientes. Em consequência do aumento da concentração de Ferro, tem-se o aumento de da concentração de Cobre, uma vez que o Cobre participa ativamente da homeostase do Ferro e do mecanismo de proteção antioxidante.

O Ferro depende do Cobre para sua absorção e transporte porque este permite a ligação do Ferro à *transferrina* para seu deslocamento e armazenamento nos tecidos hematopoéticos através de enzimas *cu-dependentes* como:

- a) a *hefestina* que promove o efluxo de Ferro dos enterócitos (tecidos epiteliais dos intestinos);
- b) a *ceruloplasmina ou ferroxidase I* que age de forma a “expulsar” os radicais livres do organismo protegendo as estruturas protéicas e DNA de lesões. É um reagente de fase aguda, logo, condições inflamatórias (comuns em portadores de doenças hematológicas) acarretam em seu aumento e se refletem na *elevação do nível de cobre sérico*;
- c) a *lisil oxidase* que desempenha função importante na formação, na manutenção e na estabilização do tecido conjuntivo;
- d) a *cobre-zinco superóxido dismutase* que está envolvida na dismutação do radical livre ânion superóxido a peróxido de hidrogênio e água, tendo o Cobre como

cofator essencial para a atividade catalítica, enquanto que o Zinco desempenha função estrutural;

- e) a *metalotioneína* que é capaz de ligar o zinco, o cobre e o cádmio, sendo importante na manutenção dos níveis adequados destes elementos dentro das células, além de reduzir a toxicidade do cobre, limitando a sua participação em reações que favorecem a liberação de espécies reativas de oxigênio.

O cobre participa de diversas funções no organismo, sendo essencial para o sistema imune, nervoso e cardiovascular bem como na manutenção da saúde óssea. A manutenção da homeostase de Cobre no organismo exige mecanismos complexos de absorção, transporte, captação, distribuição e detoxificação celular, alguns deles dependentes de outros elementos. Deve-se dar maior importância a investigação sobre o aumento da concentração de Cobre e sua relação com o aumento das demais concentrações elementares presentes no sangue e/ou no soro de pacientes com doenças hematológicas.

A redução da concentração de Zinco nas amostras de soro de portadores de AF é coerente com os dados encontrados na literatura sobre a relação entre a deficiência desse elemento e o aumento de úlceras nos membros inferiores, além de atraso no crescimento. Cabe acrescentar que a maioria dos pacientes que forneceu as amostras de soro apresenta ou já apresentou pelo menos uma dessas complicações.

O aumento da concentração de Cloro nas amostras de soro de portadores de LLC, LLA, AF e PTI implica no aumento das concentrações de Sódio e de Potássio porque juntos esses elementos atuam no equilíbrio hidro-eletrólito e também na pressão osmótica do organismo. Este fato justifica o aumento dessas concentrações elementares em conjunto nas amostras de soro analisadas.

O aumento da concentração de Cálcio nas amostras de soro de portadores de LMC pode está relacionado com o aumento da concentração de Fósforo, pois estes elementos estão estreitamente relacionados em processos metabólicos, principalmente na formação óssea. Além disso, o Cálcio, Sódio e o Potássio são elementos essenciais para o



mecanismo de coagulação do sangue, como também para a manutenção do equilíbrio ácido-básico.

O aumento das concentrações de Sódio nas amostras de soro foi observado, principalmente, em amostras de portadores de LLC e de LLA. Estes portadores, frequentemente, apresentam problemas renais e hipertensão. A literatura mostra que o aumento da concentração de Sódio em conjunto com o aumento da concentração de Cloro é responsável por distúrbios renais e cardíacos. Portanto, o aumento encontrado na concentração de Sódio nas amostras de portadores de LLC e de LLA pode ser um indicativo de um destes distúrbios.

As diferenças encontradas entre os grupos analisados com o auxílio da análise bivariada Student's teste t e com o auxílio das análises bivariada e multivariada do SPSS caracterizam cada grupo (LMC, LMA, LLC, LLA, AF, PTI e Sadio) e os diferenciam entre si. A caracterização/diferenciação destes grupos pode influenciar a área médica, especificamente a Hematologia, a um diagnóstico mais precoce e como consequência, a melhoria dos tratamentos clínicos.

## **VI.2 - Sugestões**

A partir da análise dos resultados obtidos, pode-se indicar como sugestões para continuidade deste trabalho:

- a) Utilização da Técnica de Espectroscopia de Absorção de Raios X Próximo à Borda de Absorção (XANES).

Através da técnica de XANES é possível obter informações a respeito do estado de oxidação de átomos fotoabsorvedores em amostras de soro. No caso da Anemia Falciforme, por exemplo, os níveis de  $Fe^{+2}$  (dentro da hemácia) e de  $Fe^{+3}$  (sérico/ferritina) podem indicar o estágio desta doença.

- b) Formação de um banco de dados sobre as principais doenças hematológicas.

A existência de um banco de dados ajudaria a área médica a encontrar uma “assinatura” para cada doença hematológica analisada.

Esse banco de dados poderia ser formado com os seguintes dados: concentrações elementares, sexo, idade, tempo de doença, tempo de tratamento, hábitos alimentares, fumante ou não, etnia, histórico de casos familiares, local de residência, aspectos sociais, atividade ocupacional, níveis séricos de ferritina, dados de hemograma completo, etc.

- c) Utilizar a técnica de SRTXRF na análise de outras doenças hematológicas.

Seria importante dar continuidade ao estudo de doenças hematológicas que ainda não foram abordadas neste trabalho. Como exemplos, têm-se: Talassemias, Linfomas e Anemias Ferroprivas.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AIGINGER, H., WOBRAUSCHEK, P., 1974, "Method for Quantitative X-Ray Fluorescence Analysis in Nanogram Region", *Nucl. Instrum. Methods Phys.*, v. 114, pp. 157 - 158.
- AIGINGER, H., WOBRAUSCHEK, P., 1975, "Total-Reflection X-ray Fluorescence Spectrometry Determination of Elements in Nanogram Amounts", *Anal. Chem.*, v. 47, pp. 852 - 855.
- AKKUS, I., GURBILEK. M., CALISKAN, U., KAPTANOGLU, B., ONER, A., 1998, "Blood and Fingernail Copper (Cu) and Magnesium (Mg) Levels of Children Whith Acute Lymphoblastic Leukemia", *J. Med. Sci.*, v. 28, pp. 155-156.
- ALIMONTI, A., PETRUCCI, F., PAPOFF, P., CAROLI, S., 2002, "Reference values for select trace elements in serum of term newborns from the urban area of Rome", *Clin. Chim.*, v. 292, pp. 163 - 173.
- ANDRESON, J. J. B., 2002, **Minerais. In: Mahan, L. K., Escott-Stump, S. Alimentos, nutrição e dietoterapia.** 2 ed. São Paulo, Roca.
- ANJOS, M. J. , *Análise de Solos Agrícolas por Fluorescência de Raios-X por Dispersão em Energia.* Tese de D.Sc., COPPE/UFRJ, Rio de Janeiro, RJ, Brasil, 2000 a
- ANJOS, M. J.; LOPES, R. T.; De JESUS, E. F. O.; et al., 2000b, "Quantitative Analysis of metals in Soil using X-ray Fluorescence", *Spectrochim. Acta, Part B*, v. B55, pp. 1189-1194.
- ANJOS, A. R., SILVA, M. A., BORELLI, P., 2000c, "Matriz Extracelular e Leucemia", *Rev. Bras. Hematol. Hemoter.*, v. 22, n. 3, pp. 404-412.

- AYALA, R. E., ALVAREZ, E. M., WOBRAUSCHEK, P., 1991, "Direct determination of lead in whole human blood by total reflection X- ray fluorescence spectrometry", *Spectrochim. Acta, Part B*, v. 46, n. 10, pp. 1429 - 1432.
- BÁRÁNY, E., BERGDAHL, I. A., BRATTEBY, L. E., LUNDH, T., SAMUELSON, G., SCHUTZ, A., SKERFVING, S., OSKARSSON, A., 2002a, "Trace elements in blood and serum of Swedish adolescents: Relation to gender., age, residential area, and socioeconomic status. Environmental", *Res. Sect. A*, v.89, pp. 72 - 84.
- BÁRÁNY, E., BERGDAHL, I. A., BRATTEBY, L. E., LUNDH, T., SAMUELSON, G., SCHUTZ, A., SKERFVING, S., OSKARSSON, 2002b, "A.Trace element levels in Whole blood and serum from swedish adolescents", *Sci. Total Environmen.*, v. 286, pp. 129 - 141.
- BÁRÁNY, E., BERGDAHL, I. A., BRATTEBY, L. E., LUNDH, T., SAMUELSON, G., SCHUTZ, A., SKERFVING, S., OSKARSSON, A., 2002c, "Relationships between trace element concentrations in human blood and serum", *Toxicol. Lett.*, v. 134, pp. 177 - 184.
- BEGUIN, Y., BRASSEUR, F., WEBWR, G., BURY, J., DELBROUCK, J. ROELANDTS, I., ROBAYE, G., FILLET. G., 2006 "Observations of serum trace elements in chronic lymphocytic leukemia", *Cancer*, v. 60, pp. 1842-1846.
- BELLISOLA, G., PASTI, F., VALDES, M., TORBOLI, A., 1999, "The use of total-reflection X-ray fluorescence to track the metabolism and excretion of selenium in humans", *Spectrochim. 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.
- BITTENCOURT, R., FAGLIATO, L., DAUDT, L., BITTENCOURT, H. N. S., FRIEDERICH, J. R., FERNANDES, F., ONSTEN, T., FASSINA, K., ROCHA, L. K., MORENO, F., SILVA, G., CRUZ, M. S., GARCIA, R. G., MANIERSKY, J.

- C., SILVA, L. M. R., 2003, "Acute Myelogenous Leukemia: Two decades overview – Hematology Service Hospital de Clinicas de Porto Alegre – RS", *Rev. Bras. Hematol. Hemoter*, v. 25, n. 1, pp. 17 – 24.
- BRAGA, J. A. P., KERBAUY. J., FISBERG, M., 1995, " Zinc, copper and iron and their interrelations in the growth of sickle cell patients", *Arch Latinoam. Nutr.*, v. 45, n. 3, pp. 198-203.
- BRAGA, J. A. P., 2007, "General measures in treatment of sickle disease", *Rev. Bras. Hematol. Hemoter*, .v. 29, n.3, pp. 233-238.
- BUDILON, A., 1995, "Molecular genetics of cancer - oncogenes and tumos suppress genes", *Cancer* , v. 76, n. 10, pp. 1869 – 1873.
- CALZA, C. F., Análise de Metais Pesados em Tecidos de Peixes por Fluorescência de Raios X com Reflexão Total e radiação Síncrotron. Tese de M.Sc., COPPE/UFRJ, Rio de Janeiro, RJ, Brasil, 2003.
- CARSON, D. A., et al., 1995, "Cancer progression and p 53", *Lancet*, v. 346, pp. 1009 - 1011.
- CANELLAS, C.G., CARVALHO, S.M.F., DE JESUS, E.F.O, ANJOS, M. J., LOPES, R.T., 2006, "Trace and Major Elements in Serum of Patients with Chronic Myelogenous Leukemia", *J. Radioanal. Nucl. Chem.*, v. 269, n. 3, pp. 631-634.
- CARVALHO, M. L., BRITO, J., BARREIROS, M. A., 1998, "Study of trace elements concentrations in human tissues by EDXRF", *X-Ray Spectrom.*, v. 27, pp. 198 - 204.
- CASTRO, A. R. B., 2001, "Synchrotron Light and its Applications", *Physical*, v. 2, pp. 31 - 41.

- CELIK, H.A., AYDIN, H.H., OZSARAN, A., 2002, "Trace Elements Analysis of Ascitic Fluid in Benign and Malignant Diseases", *Clin. Biochem.*, v. 35, pp. 477-481.
- CHIATTONE, C. S., 2005, "Chronic lymphocytic leukemia: When to start treatment" *Rev. Bras. Hematol. Hemoter.*, v. 27, n. 4, pp. 272-275.
- CINES, D. B., BLANCHETTE, V.T., 2002 "Immune thrombocytopenic purpura", *Engl. J. Med.*, v. 346, n. 13, pp. 995-1008
- CORREIA, P. R. M., OLIVEIRA, E., OLIVEIRA, P. V., 2000, "Simultaneous determination of manganese and selenium in serum by electrothermal atomic absorption", *Talanta*, v. 57, pp. 527 - 535.
- COSTA, A. C. M., Análise da Poluição Ambiental produzida por Metais pesados em Águas Superficiais da Baía de Sepetiba usando SRTXRF. Tese de M.Sc., COPPE/UFRJ, Rio de Janeiro, RJ, Brasil, 2003.
- CUSTÓDIO, P.J., CARVALHO, M.L., NUNES, F., 2005, "Direct Analysis of Human Blood (Mothers and Newborns) by Energy Dispersive X-ray Fluorescence", *J. Trace Elem. Med. Biol.*, v.19, pp. 151-158.
- CUNHA, S., ALBANESI FILHO, F. M., ANTELO, D. S., SOUZA, M. M., 2003, "Serum sample levels of selenium and copper in healthy volunteers living in Rio de Janeiro", *Sci. Total Environ.*, v.301, pp. 51 - 54.
- DE BOER, D. K. G., 1990, "Calculation on X-Ray Fluorescence Intensities from Bulk and Multilayer Samples", *X-Ray Spectrom.*, v.19, pp. 145 - 154.
- DEININGER, M., GOLDMAN, J., MELO, J., 2000, "The molecular biology of chronic myeloid leukemia", *Blood*, v.96, pp. 3343 - 3356.
- DIGHIERO, G., 2005, "Chronic lymphocytic leukemia biology and prognosis", *Hematology*, pp. 278-284.

- EISBERG, R., RESNIK, R., 1988, *Física Quântica: Átomos, Moléculas, Sólidos, Núcleos e Partículas*, 7 ed. Rio de Janeiro, Campus.
- EKINCI, R., EKINCI, N., 2004, "An Alternative Method for the Determination of Element Concentrations in Schizophrenic, Lung Cancer and Leukemia Patient Bloods", *J. Quant. Spectrosc. Radiat. Transf.*, v.86, pp. 379-385.
- FADERL, S., TALPAZ, M., ESTROV, Z., KANTARJIAN, H. M., 1999, "Chronic Myelogenous Leukemia: biology and therapy", *An. Intern. Med.*, v. 131, pp. 207 - 219.
- FRANCO, G., 2005, *Tabela de composição química de alimentos*. 9 ed. São Paulo, Atheneu.
- GEORGE, J. N., 2002, "Idiopathic thrombocytopenic purpura and myelo-dysplastic syndrome: distinct entities or overlapping syndromes?" *Leukemia*, v. 26, pp. 789-790.
- GHAFFARIS, S., DAEY, G. Q., LODISH, H. F., 1999, "Growth factor independence and BCR/ABL transformation: promise and pitfalls of murine model systems and assays", *Leukemia*, v. 13, pp. 1200 - 1206.
- GIBSON, R. S., 1989, "Assessment of trace elements status in human", *Prog. Food. Nutr. Sci.*, v. 13, pp. 67 – 111.
- GREAVES, E. D., PARR, L. M. M., ROJAS, A., BOHUS, S., 2000, "Determination of platinum level in serum and urine sample from pediatric cancer patients by TXRF", *X-Ray Spectrom.*, v. 29, pp. 349 - 353.
- HEITLAND, P., KÖSTER, H., D., 2006, "Biomonitoring of 37 Trace Elements in Blood Samples from Inhabitants of Northern Germany by ICP-MS", *J. Trace Elem. Med. Biol.*, v.20 pp. 253-262.

HEMORIO. Disponível em: [http://www.cursohematologiacitologia.com.br/cursos\\_realizados/lmc.htm](http://www.cursohematologiacitologia.com.br/cursos_realizados/lmc.htm). Acesso em: 15 set. 2007, 18:35:00.

HOFFMAN, R., BENZ JUNIOR, E. J., SHATTIL, S. J., FURIE, B., COHEN, H. J., SILVERTEIN, L. E., MCGLAVE, P., 2000, *Hematology: Basic Principles and Practice*, 3 ed. Philadelphia, Churchill Livingstone.

IKEUTI, P. S., BORIM, L. N. B., LUPORINE, R. L., 2006, "Bone pain and its relation to the initial presentation of acute lymphoblastic leukemia", *Rev. Bras. Hematol. Hemoter.*, v. 28, n.1, pp. 45-48.

ILHAN, A., OZEROL, E., GULEÇ, M., ISIK, B., ILHAN, N., ILHAN, N., AKYOL, O., 2004, "The comparison of nail and serum trace elements in patients with epilepsy and Healthy subjects. Progress", *Prog. Neuropharmacol. Biol. Psychiatry*, v. 28, pp. 99 - 104.

INCA. Disponível em: <http://www.inca.gov.br>. Acesso em 20 ago. 2008, 17:40:20

JOHNSON, R. A., WICHERN, D. W., 1992, *Applied Multivariate Statistical Analysis*, 3 ed. New York, Englewood Cliffs: Prentice Hall.

KRAJINOVIC M, LAMOTHE S, LABUDA D, LEMIEUX-BLANCHARD E, THEORET Y, MOGHRABI A, et al, 2004, "Role of MTHFR genetic polymorphisms in the susceptibility to childhood acute lymphoblastic leukemia", *Blood*. V. 103, n.1, pp. 252 - 257.

KLOCKENKAMPER R., 1996, *Total-Reflection X-Ray Fluorescence Analysis*. Institut für Spectrochemie und Angewandte Spektroskopie. v. 140. Dortmund, Germany.

KLOCKENKAMPER R., VON BOHLEN, A., 1996, "Elemental Analysis of Environmental Samples by Total Reflection Fluorescence: a Review", *X-ray Spectrom.*, v. 25, p. 156 - 162.



- KUMAR, R. A., KENNEDY, V. D., SASIKALA, K., JUDE, A. L. C., ASHOK, M., MORETTO, PH., 2002, "Trace element analysis of blood sample from mentally challenged children by PIXE", *Nucl. Instrume. Methods in Phys. Res. B*, v. 190, pp. 449 - 452.
- LACHANCE, G. R., CLAISSE, F., 1995, *Quantitative X-Ray Fluorescence Analysis: Theory and Application*, 1 ed. New York, John Willey & Sons.
- LANZKOWSKY, P., 1995, *Manual of Pediatric Hematology and Oncology*, 2 ed. New York, Churchill Livingstone.
- LEVINE, D. M., BERENSON, M. L., STEPHAN, D., 1998, *Estatística: Teoria e Aplicações usando microsoft EXCEL*, 1 ed. Rio de Janeiro, LTC.
- LNLS. Disponível em: [http:// www.lnls.br](http://www.lnls.br). Acesso em 20 ago. 2008, 15:30:30.
- LOPES, P. A., 1999, *Probabilidades e Estatística: Conceitos, Modelos e Aplicações no Excel*, 1 ed. Rio de Janeiro, Reichmann & Affonso.
- LORENZI, T. F., 1999, *Manual de hematologia: Propedêutica e Clínica*, 2 ed. São Paulo, Medsi.
- MAJLIS, A., SMITH, T. L., TALPAZ, M., O'BRIEN, S., RIOS, M. B., KANTARJIAN, H.M., 1996, "Significance of cytogenetic clonal evolution in chronic myelogenous leukemia", *J. Clin. Oncol.*, v. 14, pp. 196 - 203.
- MARQUES, A. F., MARQUES, J. P., CASADA, C., CARVALHO, M. L., 2004, "X-ray microprobe synchrotron radiation X-ray fluorescence application on human teeth of renal insufficiency patients", *Spectrochim. Acta, Part B*, v. 59, pp. 1675 - 1680.
- MARTINEZ, T., LARTIGUE, J., AVILA-PEREZ, P., ZARAZUA, G., NAVARRETE, M., TEJEDA, S., RAMÍREZ, A., 2004, "Determination of trace elements in blood samples by TXRF analysis", *J. Radioanal.Nucl. Chem.*, v. 599, n. 3, pp. 511 - 514.

- MILONE, G., ANGELINI, F., 1995, *Estatística Aplicada*, 1 ed. São Paulo, Atlas
- MIURA, Y., NAKAI, K., SUWABE, A., SERA, K., 2002, "Trace elements in renal disease and hemodialysis. Nuclear Instruments and Methods", *Nucl. Instrum. Methods Phys. Res. B*, v. 189, pp. 443 - 449.
- MOITA NETO, J. M., MOITA, G. C., 1998, "Uma introdução á análise exploratória de dados multivariados", *Quim. Nova*, v. 21, n. 4, pp. 467 – 469.
- MOON, J., KANG, S., CHUNG, Y., LEE. O., 2007, "Elemental analysis of Korean women's blood serums using instrumental neutron activation analysis", *J. Radioanal. Nucl. Chem.*, v.271, n. 1, pp. 155-158.
- OLIVEIRA, H. P., 1990, *Hematologia Clínica. Princípios de fisiologia, estudo clínico, diagnóstico e orientação terapêutica das enfermidades do sangue no adulto e na criança. O transplante de medulla óssea*. 3 ed. São Paulo, Atheneu.
- OLIVEIRA, M. R. A. A., 1991, *Princípios da fisiologia. Aspectos clínicos: estudo laboratorial*, 1 ed. São Paulo, Campus.
- PEREIRA, M. O., *Análise de Metais Pesados em Água e Sedimento de Fundo do Rio Paraíba do Sul por Fluorescência de Raios X com Radiação Síncrotron (SR-TXRF)*, Tese de M.Sc., COPPE/UFRJ, Rio de Janeiro, RJ, Brasil, 2003.
- PESCE, A. J., KAPLAN, L. A., 1999, *Química Clínica: Métodos*, 1 ed. Buenos Aires, Panorâmica.
- PRANGE, A., 1989, "Total Reflection X-Ray Spectrometry: Method and Applications", *Spectrochim. Acta, Part A*, v. 44B, n.5, pp. 437 - 452.
- PROVAN, D., NEWLAND, A.C., 2002, "Fifty years of idiopathic thrombocytopenic purpura (ITP): management of refractory ITP in adults", *J. Hematol*, v. 118, n.4, pp. 933–944

- PROVAN, D., MOSS, A. J., NEWLAND, A. C., BUSSEL, J. B., 2006, "Efficacy of Mycophenolate Mofetil as Single-Agent Therapy for Refractory Immune Thrombocytopenic Purpura", *Am. J. Hematol.*, v. 81, pp. 19–25
- POLAK, J., KOZA, V., CETKOVSKY, P., HASKOVEC, C., 2000, "Na accelerated - phase CML patient with e19a2 junction of BCR/ABL gene - the first case of transplanted CML with micro bcr [Letter]", *Bone Marrow Transplant*, v. 25, pp. 1109 - 1110.
- RAPOSO JUNIOR, J. L., RÉ-POPPI, N., HONDA, N. K., 2007. "Avaliação da concentração de alguns íons metálicos em diferentes espécies de líquens do cerrado Sul-Mato-Grossense". *Quím. Nova*, v. 30, n.3, pp. 582 – 587.
- REUS, U., KNOTH, J., PRANGE, A., et al., 1999, "A Formula for the Background in TXRF as a function of the Incidence Angle and Substrate Material", *Spectrochim. Acta, Part B*, v. 54, pp. 1513 - 1515.
- RODUSHKIN, I., ÖDMAN, F., BRANTH, S., 1999, "Multielement Analysis of Whole Blood by High Resolution Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry", *J. Anal. Chem.*, v. 364, pp. 338-346.
- ROSAS, R., POO, J.L., MONTENEGRO, A., ISOARD, F., MAJLUF, A., LABARDINI, J., 1995, "Utility of Copper/Zinc ratio in patients with lymphoma or acute or chronic leukemias", *Rev. Invest. Clin.*, v. 47, n. 6, pp. 477 - 452.
- ROWE. J. M., 2001, "Uncertainties in the standard care of acute myelogenous leukemia", *Leukemia*, v. 15, pp. 677-679.
- SAVAGE, I., HASWELL, S. J., 1998, "The development of analytical methodology for trace Elemental analysis of blood plasma samples using reflection X-ray fluorescence spectrometry", *J. Anal. At. Spectrom.*, v. 13, pp. 1119-1122.
- SAWER, C. L., 1999, "Chronic Myeloid Leukemia", *Engl. J. Med.*, v. 340, pp 1330 - 1340.

- SCANCAR, J., MILACIC, R., BENEDIK, M., KRIZAJ, I., 2003, "Total metal concentrations in serum of dialysis patients and fractionation of Cu, Rb, Al, Fe and Zn in spent continuous ambulatory peritoneal dialysis fluids", *Talanta*, v. 59, pp. 355 - 364.
- SCHWENKE, H., KNOTH, J., 1982, "A Highly Sensitive Energy-dispersive X-Ray Spectrometer with Multiple Total Reflection of the Exciting Beam", *Nucl. Instrum. Methods Phys. Res.*, v. 193, pp. 239 - 243.
- SILVA, L. M. R., 2003, "Acute Myelogenous Leukemia: Two decades overview – Hematology Service Hospital de Clinicas de Porto Alegre – RS", *Rev. Bras. Hematol. Hemoter.*, v. 25, n. 1, pp. 17-24.
- SINCLAIR, P. B., NACHEVA, P. E., LEVERSHA, M., TELFORD, N., CHANG, J., REID, A., BENCH, A., CHAMPION, K., HUNTLY, B, GREEN, R. A., 2000, "Large deletions at the t(9:22) breakpoint are common and may identify a poor-prognosis subgroup of patients with chronic myeloid leukemia", *Blood*, v. 95, pp. 303 - 309.
- THIJSEN, S., SCHURHUIS, G., VAN OSTVEEN, J., OSSENKOPPELE, G., 1999, "Chronic myeloid leukemia from basics to beside", *Leukemia*, v. 13, pp 1646 - 1674.
- TRUGILHO, P. F., *Aplicações de algumas técnicas multivariadas na avaliação da qualidade da madeira e carvão vegetal de Eucalyptus*. Tese de D. SC., UFV, Viçosa, M.G., Brasil, 1995.
- YAMAMOTO, M., FIGUEIREDO, V. L. P., 2005, "Epidemiology of chronic lymphocytic leukemia and familiar chronic lymphocytic leukemia", *Rev. Bras. Hematol. Hemoter*, v. 27, n. 4, pp. 229-232
- ZOGO, M. A., FALCÃO, R. P., PASQUINI, R., 2001, **Hematologia: Fundamentos e Prática**, 1 ed, São Paulo, Atheneu.

ZARCADAS, CH., KARYDAS, A. G., PARADELLIS, T., 2001, "Applicability of direct total reflection X-ray fluorescence analysis in the case of human blood serum samples". *Spectrochim. Acta, Part B*, v. 56, pp. 2219 - 2228.

WANG, Y. L., BAGG, A., PEAR, W., NOWELL, P. C., HESS, J. L., 2001, " Chronic Myelogenous Leukemia: Laboratory, Diagnosis and Monitoring", *Genes, Chromosome. Cancer*, v.32, pp. 97 - 111.

WILLIAMS, W., 1996, *Hematologia. Compêndio*. 5 ed. Chile, MCGRAW-HILL.

WOBRAUSCHEK, P., KREGSAMER, P., STRELI, C., et al., 1991, "Instrumental Developments in Total Reflection X-Ray Fluorescence Analysis for K-Lines from Oxygen to the Rare-earth Elements", *X-Ray Spectrom.*, v.20, pp. 23 - 28.

## APÊNDICE A

### Alguns Elementos Químicos Essenciais e Suas Respectivas Funções no Organismo Humano

#### A.1. - Cálcio (Ca)

Uma pessoa tem entre 1,5 e 2,0% de cálcio em massa, do qual 99,0% é encontrado nos ossos e o restante nos tecidos e fluidos corporais intervindo no metabolismo celular. A quantidade diária recomendada para adultos oscila entre 800-1000 mg, quantidade que deve ser incrementada durante o crescimento, na gravidez, na lactação e posteriormente na menopausa até 1200-1300 mg.

O cálcio atua como um mediador intracelular cumprindo uma função de segundo mensageiro como, por exemplo, o íon  $\text{Ca}^{2+}$  intervém na concentração dos músculos. Este elemento também implica no controle de algumas enzimas quinases que realizam funções de fosforilação. O cálcio participa de funções enzimáticas de maneira similar ao magnésio em processos de transferência de fosfato. Outra função está relacionada com a coagulação do sangue, através de sua relação com a proteína protombina.

A competição que se estabelece com certos elementos pode inibir a absorção de cálcio. O magnésio e o cálcio competem nos mesmos pontos de absorção, portanto, pessoas que ingerem suplementos de magnésio devem tomar cuidado especial com a ingestão diária de cálcio. Produtos ricos em cálcio são o leite e seus derivados e vegetais como feijão e espinafre.

#### A.2 - Fósforo (P)

Os compostos de fósforo intervêm em funções vitais do organismo. O fósforo faz parte da estrutura do DNA e ARN. As células o utilizam para armazenar e transportar a energia na forma de fosfato e adenosina. Além disso, é um importante elemento do protoplasma e tecido nervoso.

### **A.3 - Enxofre (S)**

Os aminoácidos cisteína, metioína, homocisteína e taurina contém enxofre, formando as pontes de dissulfeto entre os polipeptídeo, ligação de grande importância para a formação das estruturas espaciais das proteínas. É constituinte de algumas vitaminas, participando na síntese do colágeno, neutraliza os tóxicos e ajuda o fígado na secreção de bilis. É encontrado em alguns legumes como aspargo, alho-poró, alho, cebola, também em pescados e gema de ovo. O enxofre encontrado nos alimentos diferentemente do inorgânico não é tóxico e seu excesso é eliminado pela urina. A sua deficiência retarda o crescimento.

### **A.4 - Potássio (K)**

O íon  $K^+$  está presente nas extremidades dos cromossomos (telômeros) estabilizando a estrutura do DNA e ARN, compensando a carga negativa dos grupos fosfatos. A bomba de sódio é um mecanismo pelo qual se consegue concentrações requeridas de  $K^+$  e  $Na^+$  dentro e fora da célula (concentrações de íon  $K^+$  mais altas dentro da célula do que no seu exterior para possibilitar a transmissão do impulso nervoso). A diminuição do nível de potássio no sangue provoca hipopotasemia. É encontrado em hortaliças como beterraba, couve-flor e frutas como abricó, cereja, ameixa e pêssego.

### **A.5 - Sódio ( $Na^+$ )**

O cátion sódio ( $Na^+$ ) tem um papel fundamental no metabolismo celular, como por exemplo, na transmissão do impulso nervoso. Mantém o volume e a osmolaridade. Participa nas contrações musculares, no equilíbrio ácido-base e na absorção de nutrientes pelas células. A concentração plasmática de sódio é em condições normais de 135 a 145  $mmol.L^{-1}$ . O aumento da concentração de sódio no sangue é conhecido como *hipernatremia* e sua diminuição de *hiponatremia*. O composto mais abundante de sódio é o sal de cozinha.

## **A.6 - Cloro (Cl)**

Na natureza não é encontrado em seu estado puro, já que reage com rapidez com muitos elementos e compostos químicos. É encontrado, por exemplo, no Cloreto de sódio, conhecido como sal de cozinha e na água como potabilizador. Oxidantes, desinfetantes e alvejantes têm em suas fórmulas o cloro.

O cloro pode provocar irritação do sistema respiratório. Pode ser detectado no ar pelo seu odor a partir de  $3,5 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ , sendo mortal a partir de  $1000 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ . Uma exposição aguda a altas concentrações não letais de cloro pode provocar edema pulmonar, ou líquidos nos pulmões. Uma exposição crônica debilita os pulmões aumentando a vulnerabilidade à doenças respiratórias.

## **A.7 - Magnésio (Mg)**

A maior parte do magnésio no organismo é encontrado nos ossos e seus íons desempenham papéis de importância na atividade de muitas enzimas e em reações que dependem da ATP. Também exerce um papel estrutural através do íon  $\text{Mg}^{+2}$  que estabiliza a estrutura de cadeias de DNA e ARN. Dependendo do peso e da altura, a quantidade diária necessária e recomendada é de 300 a 350 mg. Pode ser encontrado na maioria dos alimentos, principalmente nas folhas verdes das hortaliças que são ricas em magnésio.

## **A.8 - Ferro (Fe)**

Existem diferentes proteínas que contém o grupo hemo, que consiste na ligação com um átomo de ferro. A seguir, alguns exemplos:

- a) A hemoglobina responsável pelo transporte de oxigênio e a mioglobina responsável pelo armazenamento;
- b) Os citocromos reduzem o oxigênio em água. Os citocromos P450 catalisam a oxidação de compostos hidrofóbicos, como drogas e fármacos, para que possam ser excretados, e participam da síntese de diversas moléculas;



- c) As peroxidases e catalases catalisam a oxidação de peróxidos,  $H_2O_2$ , que são tóxicos;
- d) As proteínas de ferro/enxofre participam em processos de transferência de elétrons.

Para que o transporte de ferro seja feito dentro do organismo são utilizadas as proteínas denominadas *transferrinas*. Para o armazenamento são empregadas a ferritina e a hemosiderina. O ferro entra no organismo absorvido no intestino delgado.

Tanto o excesso como a deficiência de ferro pode causar problemas graves no organismo. Nas transfusões de sangue são usados ligantes que formam com o ferro complexos de alta estabilidade, evitando que ocorra uma queda demasiada na concentração de ferro livre. Estes ligantes são conhecidos como *sideróforos*. É encontrado em carnes vermelhas e vegetais verde-escuros como brócolis, espinafre e bortalha, inclusive no feijão.

#### **A.9 - Zinco (Zn)**

O zinco é um elemento que intervém no metabolismo das proteínas e ácidos nucleicos. Estimula a atividade de mais de 100 enzimas, colaborando com o bom funcionamento do sistema imunológico. É importantíssimo para a cicatrização de ferimentos e para a síntese de DNA.

A deficiência de zinco pode produzir retardamento no crescimento, perda de cabelo, diarréias, lesões oculares e da pele, perda de peso, aumento do tempo de cicatrização de ferimentos e anomalias no sentido do olfato.

As causas que podem provocar uma deficiência de zinco são a quantidade insuficiente na dieta alimentar e a dificuldade na sua absorção que pode ocorrer em casos de alcoolismo, quando é eliminado pela urina, ou dietas vegetarianas, ou ainda devido a eliminação excessiva devido a desordens digestivas. O excesso de zinco está associado a baixos níveis de cobre, alterações na função do ferro, diminuição da função imunológica e dos níveis de colesterol bom. É encontrado em diversos alimentos como

nas ostras, carnes vermelhas, aves, mariscos, nozes e favas. A ingestão diária recomendada de zinco é em torno de 10 mg com alguma variação entre bebês e mulheres grávidas.

#### **A.10 - Cobre (Cu)**

Tal qual o ferro (para cuja absorção é necessário) contribui na formação dos glóbulos vermelhos e na manutenção dos vasos sanguíneos, nervos, sistema imunológico e ossos. A maior parte do cobre é transportada através do fluxo sanguíneo em uma proteína denominada ceruloplasmina. Contudo, quando é absorvido no intestino, é transportado até o fígado unido a albumina. Não existe uma quantidade recomendada de cobre, uma vez que é raro uma deficiência na dieta. Estima-se que para adultos pode ser recomendada uma ingestão diária de 0,9 mg.

A *enfermidade de Wilson* é um transtorno hereditário que provoca o acúmulo de cobre no fígado e outros órgãos, podendo induzir hepatites, alterações renais e outros transtornos. É encontrado em ostras, mariscos, alguns legumes, vísceras e nozes.

#### **A.11 - Bromo (Br)**

A maior parte do bromo é encontrada no mar na forma de brometo. Ainda não se conhece muito bem as suas funções no organismo. Alguns de seus compostos têm sido empregados no tratamento contra epilepsia e como sedantes.

O bromo é empregado na fabricação de produtos de pulverização, produtos para a purificação de água, corantes, brometos empregados em fotografias, desinfetantes, inseticidas, etc. Pode ser altamente tóxico ( $10 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ ), tanto por através da pele como inalado, causando sérios riscos à saúde e até mesmo a morte.

#### **A.12 - Selênio (Se)**

É um antioxidante, ajudando a neutralizar os radicais livres. Estimula o sistema imunológico e intervém no funcionamento da glândula tireóide. Está no aminoácido

selenocisteína. Em pesquisas recentes, têm se correlacionado o consumo de selênio e a prevenção de câncer.

A deficiência de selênio é rara, porém pode ocorrer com pacientes com disfunções intestinais severas ou com alimentação exclusivamente parenteral, assim como populações que dependem de alimentos cultivados em solo pobres de selênio. A ingestão diária recomendada para adultos é de 55 - 70 µg. Acima de 400 µg surgem os efeitos tóxicos (selenose). É encontrado no pão, nos cereais, nos pescados, nas carnes e nos ovos.

### **A.13 - Iodo (I)**

A glândula tireóide fabrica os hormônios tiroxina e triiodotiroxina, que contém iodo. A deficiência de iodo ocasiona o hipotioridismo de que resulta o bócio. Na infância o déficit de iodo pode resultar em retardamento mental e físico. O iodo é encontrado principalmente nos peixes. O iodeto de potássio, KI, é adicionado ao sal de cozinha, NaCl (mistura chamada de sal iodado), para prevenir o surgimento do bócio endêmico.

A tintura de iodo é uma solução de iodo e KI (iodeto de potássio) em álcool, em água ou em uma mistura de ambos que tem propriedades antissépticas. Os iodetos, assim como as tiroxinas, são utilizados na medicina interna.

### **A.14- Manganês (Mn)**

O manganês tem um papel tanto estrutural como enzimático. Está presente em diversas enzimas, destacando-se a *superóxido dismutase* de manganês (Mn - SOD), que catalisa superóxidos,  $O_2^-$ ; a Mn - catalase, que catalisa o peróxido,  $H_2O_2$ ; assim como a concavalina A (da família das lectinas), onde o manganês tem um papel estrutural. É absorvido no intestino delgado, porém é no fígado que sua concentração é maior.

É necessário um consumo diário entre 1 e 5 mg por dia, que é conseguido através de vários alimentos entre eles hortaliças. O manganês é tóxico em excesso. Exposições

prolongadas a compostos de manganês, de forma inalada ou oral, podem provocar danos ao sistema nervoso e respiratório.

#### **A.15 - Arsênio (As)**

Ainda que o arsênio esteja associado a morte, sua deficiência pode gerar diversas complicações ao organismo. É recomendada uma ingestão diária de 12 a 15 µg. Os alimentos mais ricos em arsênio são os frutos do mar apresentando-se na forma de arsenobetaina, menos tóxica que o arsênio inorgânico, mas também é encontrado em carnes vermelhas e vegetais.

#### **A.16 - Níquel (Ni)**

Quase todas as enzimas hidrogenases contêm níquel, especialmente aquelas cuja função é oxidar o hidrogênio. Consta que o níquel sofre mudanças no seu estado de oxidação indicando que o núcleo de níquel é a parte ativa da enzima.

A exposição ao metal níquel e seus compostos solúveis não deve ultrapassar o limite de 0,05 mg.cm<sup>-3</sup>, medidos em níveis de níquel equivalente para uma exposição de 8 horas diárias e 40 horas semanais para trabalhadores. Os vapores e o pó de sulfeto de níquel podem ser cancerígenos. As pessoas sensíveis podem manifestar alergias ao níquel.

#### **A.17 - Cromo (Cr)**

Ainda não se conhece com exatidão suas funções no organismo. A princípio, o Cr<sup>+3</sup> participa no metabolismo dos lipídios e nos hidratos de carbono. Alguns de seus complexos participam na potencialização da insulina. A ausência de cromo provoca uma intolerância a glicose. Até o momento, não se encontrou nenhuma metalproteína com atividade biológica que contenha cromo, e por isso não se tem explicado sua atuação. Por outro lado, o Cr<sup>+6</sup> em compostos é muito oxidante e cancerígeno.

## APÊNDICE B



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO  
PROGRAMA DE ENGENHARIA NUCLEAR-COPPE  
LABORATÓRIO DE INSTRUMENTAÇÃO NUCLEAR

### **CONSENTIMENTO PÓS-INFORMATIVO PARA O PACIENTE**

Fui informado (a) que o projeto de pesquisa intitulado “*Estudo de Doenças Hematológicas Usando a Técnica de Fluorescência de Raios X com Radiação Síncrotron*” foi delineado pelo Laboratório de Instrumentação Nuclear – COPPE da Universidade Federal do Rio de Janeiro juntamente com o Laboratório Nacional de Luz Síncrotron (LNLS/CNPq) em Campinas. Esta pesquisa tem por objetivo analisar e comparar amostras de soro de pacientes portadores das doenças citadas acima e de doadores voluntários de sangue, ambos do HEMORIO, através da técnica de Fluorescência de Raios X por Reflexão Total Usando Radiação Síncrotron (SRTXRF). Esta técnica permite “ver” muitas características importantes de átomos e moléculas que constituem o soro humano através de um tipo de raios-X mais potente. Espera-se que estes resultados sejam de extrema relevância para a caracterização de possíveis causas de algumas doenças do sangue, gerando informações que poderão ser úteis para a melhoria dos diagnósticos e dos tratamentos clínicos.

#### **Riscos**

Não há riscos para o paciente. Apenas uma pequena parcela (aproximadamente 5 mL) do seu soro será utilizada nesta pesquisa.

#### **Benefícios**

Não há benefício direto para o paciente ao participar deste estudo, além da sua importante contribuição para a pesquisa das possíveis causas das doenças de doenças do sangue.

#### **Confidencialidade e resultados**

Sua identidade não será revelada. A pequena quantidade de soro que você irá doar será avaliada individualmente, porém o resultado desta pesquisa será obtido através de um trabalho estatístico, no qual, todas as amostras juntas fornecerão dados importantes. Logo, você não terá o resultado deste estudo realizado com seu soro.

#### **Autorização**

Estou ciente de que a minha participação é voluntária.

Concordo, baseado nas informações acima mencionadas e que me foram expostas claramente, em participar desta pesquisa.

\_\_\_\_\_  
Assinatura do paciente

\_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_  
Data

**Questionário para os pacientes que participarão voluntariamente da pesquisa intitulada “*Estudo de Doenças Hematológicas Usando a Técnica de Fluorescência de Raios X com Radiação Síncrotron*”.**

Por favor, leia com atenção este questionário, e responda com sinceridade a todas as perguntas. Suas respostas são totalmente confidenciais. O objetivo deste questionário é avaliar a presença de alguns fatores que podem interferir nos resultados obtidos com a análise da sua amostra de soro.

**LMC( )    LMA( )    LLC( )    LLA( )    AF( )    PTI( )**

**Nome do paciente:**

**Matrícula:**

**Idade:**

**Região onde mora (bairro e cidade):**

1. Está ingerindo algum remédio? Qual (ais)?	(SIM)	(NÃO)
2. Há quanto tempo faz tratamento?		
3. Já teve alguma doença grave? Qual (ais)?	(SIM)	(NÃO)
4. É fumante ou já fumou por muito tempo?	(SIM)	(NÃO)
5. Usa ou já usou drogas? Qual (ais)?	(SIM)	(NÃO)
6. Teve algum tipo de contato com pesticidas e/ou solventes?	(SIM)	(NÃO)

Declaro que as respostas acima são verdadeiras.

Rio, \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_

\_\_\_\_\_  
Assinatura do paciente

## APÊNDICE C

### ANÁLISE BIVARIADA ATRAVÉS DO SPSS (SRTXRF – BAIXO Z)

**Tabela C.1 - Correlação Bivariada do Grupo Sadio (SRTXRF – Baixo Z)**

	Na	P	S	Cl	K	Ca	sexo	idade
Na	1	,364(*) ,025	,353(*) ,030	<b>,869(**)</b> ,000	<b>,636(**)</b> ,000	,207 ,213	,129 ,439	<b>-,411(*)</b> ,010
P	,364(*) ,025	1	<b>,896(**)</b> ,000	<b>,580(**)</b> ,000	<b>,682(**)</b> ,000	,356(*) ,028	-,026 ,876	<b>-,369(*)</b> ,023
S	,353(*) ,030	,896(**) ,000	1	<b>,615(**)</b> ,000	<b>,653(**)</b> ,000	<b>,411(*)</b> ,010	,281 ,087	<b>,439(**)</b> ,006
Cl	,869(**) ,000	,580(**) ,000	,615(**) ,000	1	<b>,794(**)</b> ,000	,216 ,194	,203 ,222	<b>,532(**)</b> ,001
K	,636(**) ,000	,682(**) ,000	,653(**) ,000	,794(**) ,000	1	,293 ,075	,119 ,475	<b>-,406(*)</b> ,011
Ca	,207 ,213	,356(*) ,028	,411(*) ,010	,216 ,194	,293 ,075	1	,231 ,162	-,086 ,609
sexo	,129 ,439	-,026 ,876	,281 ,087	,203 ,222	,119 ,475	,231 ,162	1	-,232 ,161
idade	<b>-,411(*)</b> ,010	<b>-,369(*)</b> ,023	<b>,439(**)</b> ,006	<b>,532(**)</b> ,001	<b>-,406(*)</b> ,011	-,086 ,609	-,232 ,161	1

\* ( $\alpha = 0,05$ )

\*\* ( $\alpha = 0,01$ )

**Tabela C.2 - Correlação Bivariada do Grupo LMC (SRTXRF – Baixo Z)**

	Na	P	S	Cl	K	Ca	sexo	idade	tempo
Na	1	-,167 ,318	,043 ,797	<b>,887(**)</b> ,000	,391(*) ,015	<b>,522(**)</b> ,001	,246 ,137	-,149 ,373	-,003 ,987
P	-,167 ,318	1	<b>,877(**)</b> ,000	,129 ,440	-,273 ,097	-,044 ,792	-,150 ,367	,201 ,227	-,243 ,142
S	,043 ,797	,877(**) ,000	1	,325(*) ,046	-,098 ,560	,026 ,877	,090 ,590	,085 ,613	-,350(*) ,031
Cl	<b>,887(**)</b> ,000	,129 ,440	,325(*) ,046	1	<b>,440(**)</b> ,006	<b>,541(**)</b> ,000	,218 ,188	-,072 ,669	,009 ,958
K	,391(*) ,015	-,273 ,097	-,098 ,560	,440(**) ,006	1	<b>,469(**)</b> ,003	,309 ,059	,154 ,354	-,055 ,741
Ca	<b>,522(**)</b> ,001	-,044 ,792	,026 ,877	,541(**) ,000	,469(**) ,003	1	,341(*) ,036	,370(*) ,022	,115 ,492
sexo	,246 ,137	-,150 ,367	,090 ,590	,218 ,188	,309 ,059	,341(*) ,036	1	,248 ,133	,001 ,995
idade	-,149 ,373	,201 ,227	,085 ,613	-,072 ,669	,154 ,354	,370(*) ,022	,248 ,133	1	-,058 ,731
tempo	-,003 ,987	-,243 ,142	-,350(*) ,031	,009 ,958	-,055 ,741	,115 ,492	,001 ,995	-,058 ,731	1

\* ( $\alpha = 0,05$ )

\*\* ( $\alpha = 0,01$ )



**Tabela C.3 - Análise Bivariada do Grupo LMA (SRTXRF – Baixo Z)**

	Na	P	S	Cl	K	Ca	sexo	idade	tempo
Na	1	<b>,402(*)</b> ,018	,291 ,095	<b>,392(*)</b> ,022	,340(*) ,049	,273 ,118	,141 ,426	,142 ,425	,264 ,132
P	,402(*) ,018	1	<b>,857(**)</b> ,000	-,181 ,306	<b>,555(**)</b> ,001	<b>,761(**)</b> ,000	-,192 ,278	-,152 ,391	,174 ,324
S	,291 ,095	,857(**) ,000	1	-,190 ,283	<b>,525(**)</b> ,001	<b>,668(**)</b> ,000	-,293 ,093	-,300 ,085	,241 ,170
Cl	,392(*) ,022	-,181 ,306	-,190 ,283	1	-,368(*) ,032	-,176 ,318	,161 ,363	<b>,503(**)</b> ,002	-,245 ,162
K	,340(*) ,049	,555(**) ,001	,525(**) ,001	-,368(*) ,032	1	<b>,665(**)</b> ,000	-,069 ,698	-,184 ,297	<b>,402(*)</b> ,019
Ca	,273 ,118	,761(**) ,000	,668(**) ,000	-,176 ,318	,665(**) ,000	1	-,070 ,694	-,105 ,553	<b>,502(**)</b> ,002
sexo	,141 ,426	-,192 ,278	-,293 ,093	,161 ,363	-,069 ,698	-,070 ,694	1	,063 ,725	-,038 ,833
idade	,142 ,425	-,152 ,391	-,300 ,085	,503(**) ,002	-,184 ,297	-,105 ,553	,063 ,725	1	-,088 ,622
tempo	,264 ,132	,174 ,324	,241 ,170	-,245 ,162	,402(*) ,019	,502(**) ,002	-,038 ,833	-,088 ,622	1

\* ( $\alpha = 0,05$ )

\*\* ( $\alpha = 0,01$ )

**Tabela C.4 - Análise Bivariada do Grupo LLC (SRTXRF – Baixo Z)**

	Na	P	S	Cl	K	Ca	sexo	idade	tempo
Na	1	<b>-,573(*)</b> ,032	-,358 ,209	,274 ,343	<b>,928(**)</b> ,000	<b>-,656(*)</b> ,011	<b>-,497</b> ,071	-,160 ,585	-,266 ,358
P	-,573(*) ,032	1	<b>,822(**)</b> ,000	-,300 ,298	,382 ,178	-,035 ,905	-,006 ,984	<b>-,400</b> ,156	-,057 ,848
S	-,358 ,209	<b>,822(**)</b> ,000	1	,027 ,928	,263 ,364	-,300 ,298	-,022 ,941	<b>-,608(*)</b> ,021	-,002 ,994
Cl	,274 ,343	-,300 ,298	,027 ,928	1	-,291 ,313	,032 ,914	,209 ,473	-,356 ,212	,114 ,697
K	<b>,928(**)</b> ,000	,382 ,178	,263 ,364	-,291 ,313	1	<b>,661(*)</b> ,010	<b>,623(*)</b> ,017	,331 ,248	,159 ,587
Ca	<b>-,656(*)</b> ,011	-,035 ,905	-,300 ,298	,032 ,914	<b>,661(*)</b> ,010	1	<b>,506</b> ,065	<b>,476</b> ,085	,374 ,188
sexo	-,497 ,071	-,006 ,984	-,022 ,941	,209 ,473	<b>,623(*)</b> ,017	,506 ,065	1	<b>,526</b> ,053	-,393 ,165
idade	-,160 ,585	<b>-,400</b> ,156	<b>-,608(*)</b> ,021	-,356 ,212	,331 ,248	,476 ,085	,526 ,053	1	-,295 ,306
tempo	-,266 ,358	-,057 ,848	-,002 ,994	,114 ,697	,159 ,587	,374 ,188	-,393 ,165	-,295 ,306	1

\* ( $\alpha = 0,05$ )

\*\* ( $\alpha = 0,01$ )

**Tabela C.5 - Análise Bivariada do Grupo LLA (SRTXRF – Baixo Z)**

	Na	P	S	Cl	K	Ca	sexo	idade	tempo
Na	1 .	,164 ,394	-,079 ,682	<b>,787(**)</b> ,000	,010 ,957	<b>,475(**)</b> ,009	,022 ,911	,052 ,790	<b>-,406(*)</b> ,029
P	,164 ,394	1 .	<b>,762(**)</b> ,000	,369(*) ,049	<b>,745(**)</b> ,000	,254 ,183	,137 ,478	,118 ,544	<b>-,443(*)</b> ,016
S	-,079 ,682	,762(**) ,000	1	,148 ,445	<b>,778(**)</b> ,000	,271 ,155	,056 ,771	-,140 ,467	-,263 ,168
C	,787(**) ,000	,369(*) ,049	,148 ,445	1	,236 ,217	<b>,419(*)</b> ,024	,097 ,615	,181 ,348	-,263 ,168
K	,010 ,957	,745(**) ,000	,778(**) ,000	,236 ,217	1	,392(*) ,036	,211 ,271	-,229 ,233	-,014 ,942
Ca	,475(**) ,009	,254 ,183	,271 ,155	,419(*) ,024	,392(*) ,036	1	,392(*) ,036	-,388(*) ,037	-,236 ,218
sexo	,022 ,911	,137 ,478	,056 ,771	,097 ,615	,211 ,271	,392(*) ,036	1	<b>,592(**)</b> ,001	-,240 ,209
idade	,052 ,790	,118 ,544	-,140 ,467	,181 ,348	-,229 ,233	-,388(*) ,037	<b>,592(**)</b> ,001	1	,087 ,653
tempo	-,406(*) ,029	-,443(*) ,016	-,263 ,168	-,263 ,168	-,014 ,942	-,236 ,218	-,240 ,209	,087 ,653	1

\* ( $\alpha = 0,05$ )

\*\* ( $\alpha = 0,01$ )

**Tabela C.6 - Análise Bivariada do Grupo AF (SRTXRF – Baixo Z)**

	Na	P	S	Cl	K	Ca	sexo	idade	tempo
Na	1	,385 ,070	<b>,570(**)</b> ,004	<b>,856(**)</b> ,000	<b>,557(**)</b> ,006	,387 ,068	-,225 ,301	-,298 ,167	-,379 ,075
P	,385 ,070	1	<b>,928(**)</b> ,000	<b>,654(**)</b> ,001	<b>,744(**)</b> ,000	<b>,624(**)</b> ,001	-,222 ,308	-,028 ,898	,010 ,965
S	<b>,570(**)</b> ,004	<b>,928(**)</b> ,000	1	<b>,764(**)</b> ,000	<b>,783(**)</b> ,000	<b>,652(**)</b> ,001	-,202 ,356	-,045 ,838	,018 ,934
Cl	<b>,856(**)</b> ,000	<b>,654(**)</b> ,001	<b>,764(**)</b> ,000	1	<b>,793(**)</b> ,000	<b>,544(**)</b> ,007	-,041 ,851	-,003 ,989	-,136 ,537
K	<b>,557(**)</b> ,006	<b>,744(**)</b> ,000	<b>,783(**)</b> ,000	<b>,793(**)</b> ,000	1	<b>,846(**)</b> ,000	-,137 ,533	-,109 ,619	,197 ,368
Ca	,387 ,068	<b>,624(**)</b> ,001	<b>,652(**)</b> ,001	<b>,544(**)</b> ,007	<b>,846(**)</b> ,000	1	-,330 ,124	-,236 ,278	,053 ,810
sexo	-,225 ,301	-,222 ,308	-,202 ,356	-,041 ,851	-,137 ,533	-,330 ,124	1	<b>,805(**)</b> ,000	,174 ,426
idade	-,298 ,167	-,028 ,898	-,045 ,838	-,003 ,989	-,109 ,619	-,236 ,278	<b>,805(**)</b> ,000	1	,049 ,825
tempo	-,379 ,075	,010 ,965	,018 ,934	-,136 ,537	,197 ,368	,053 ,810	,174 ,426	,049 ,825	1

\* ( $\alpha = 0,05$ )

\*\* ( $\alpha = 0,01$ )

**Tabela C.7 - Análise Bivariada do Grupo PTI (SRTXRF – Baixo Z)**

	Na	P	S	Cl	K	Ca	sexo	idade	tempo
Na	1 ,007	<b>,417(**)</b> ,007	<b>,446(**)</b> ,004	<b>,818(**)</b> ,000	,281 ,079	,308 ,053	,029 ,859	-,029 ,859	,029 ,857
P	<b>,417(**)</b> ,007	1 ,007	<b>,693(**)</b> ,000	<b>,591(**)</b> ,000	<b>,701(**)</b> ,000	<b>,497(**)</b> ,001	-,033 ,839	,224 ,165	-,136 ,404
S	<b>,446(**)</b> ,004	<b>,693(**)</b> ,000	1 ,000	<b>,425(**)</b> ,006	,383(*) ,015	<b>,614(**)</b> ,000	,002 ,991	-,108 ,508	,054 ,743
Cl	<b>,818(**)</b> ,000	<b>,591(**)</b> ,000	<b>,425(**)</b> ,006	1 ,000	<b>,606(**)</b> ,000	<b>,418(**)</b> ,007	,159 ,327	,182 ,262	,231 ,152
K	,281 ,079	<b>,701(**)</b> ,000	,383(*) ,015	<b>,606(**)</b> ,000	1 ,000	<b>,598(**)</b> ,000	,207 ,200	<b>,400(*)</b> ,011	,375(*) ,017
Ca	,308 ,053	<b>,497(**)</b> ,001	<b>,614(**)</b> ,000	<b>,418(**)</b> ,007	<b>,598(**)</b> ,000	1 ,000	,056 ,733	-,067 ,680	,147 ,365
sexo	,029 ,859	-,033 ,839	,002 ,991	,159 ,327	,207 ,200	,056 ,733	1 ,044	,321(*) ,044	<b>,476(**)</b> ,002
idade	-,029 ,859	,224 ,165	-,108 ,508	,182 ,262	<b>,400(*)</b> ,011	-,067 ,680	,321(*) ,044	1 ,044	,112 ,490
tempo	,029 ,857	-,136 ,404	,054 ,743	,231 ,152	,375(*) ,017	,147 ,365	<b>,476(**)</b> ,002	,112 ,490	1

\* ( $\alpha = 0,05$ )

\*\* ( $\alpha = 0,01$ )

## ANÁLISE BIVARIADA ATRAVÉS DO SPSS (SRTXRF – CONVENCIONAL)

**Tabela C.8 - Análise Bivariada do Grupo Sadio (SRTXRF – Convencional)**

	<b>Fe</b>	<b>Cu</b>	<b>Zn</b>	<b>Br</b>	<b>Rb</b>	<b>sexo</b>	<b>idade</b>
<b>Fe</b>	1	-,001 ,997	-,002 ,991	,368 ,070	,139 ,508	-,169 ,419	-,020 ,923
<b>Cu</b>	-,001 ,997	1	<b>,568(**)</b> ,003	,090 ,670	,226 ,277	<b>-,433(*)</b> ,031	,099 ,636
<b>Zn</b>	-,002 ,991	,568(**) ,003	1	-,153 ,465	,336 ,100	-,001 ,996	,047 ,824
<b>Br</b>	,368 ,070	,090 ,670	-,153 ,465	1	,371 ,068	-,085 ,685	,272 ,189
<b>Rb</b>	,139 ,508	,226 ,277	,336 ,100	,371 ,068	1	,048 ,820	<b>,554(**)</b> ,004
<b>sexo</b>	-,169 ,419	-,433(*) ,031	-,001 ,996	-,085 ,685	,048 ,820	1	,384 ,058
<b>idade</b>	-,020 ,923	,099 ,636	,047 ,824	,272 ,189	,554(**) ,004	,384 ,058	1

\* ( $\alpha = 0,05$ )

\*\* ( $\alpha = 0,01$ )

**Tabela C.9 - Análise Bivariada do Grupo LMC (SRTXRF – Convencional)**

	<b>Fe</b>	<b>Cu</b>	<b>Zn</b>	<b>Br</b>	<b>Rb</b>	<b>sexo</b>	<b>idade</b>	<b>tempo</b>
<b>Fe</b>	1	,028 ,895	,136 ,518	,132 ,531	,024 ,909	-,014 ,946	,082 ,697	-,342 ,095
<b>Cu</b>	,028 ,895	1	,113 ,592	-,203 ,331	-,102 ,627	-,113 ,592	,048 ,819	-,170 ,418
<b>Zn</b>	,136 ,518	,113 ,592	1	,298 ,148	,098 ,642	-,021 ,921	,313 ,127	,218 ,295
<b>Br</b>	,132 ,531	-,203 ,331	,298 ,148	1	<b>,546(**)</b> ,005	-,196 ,347	,391 ,053	,067 ,749
<b>Rb</b>	,024 ,909	-,102 ,627	,098 ,642	,546(**) ,005	1	-,374 ,066	,101 ,630	-,139 ,507
<b>sexo</b>	-,014 ,946	-,113 ,592	-,021 ,921	-,196 ,347	-,374 ,066	1	-,336 ,100	-,060 ,775
<b>idade</b>	,082 ,697	,048 ,819	,313 ,127	,391 ,053	,101 ,630	-,336 ,100	1	,174 ,406
<b>tempo</b>	-,342 ,095	-,170 ,418	,218 ,295	,067 ,749	-,139 ,507	-,060 ,775	,174 ,406	1

\* ( $\alpha = 0,05$ )

\*\* ( $\alpha = 0,01$ )

**Tabela C.10 - Análise Bivariada do Grupo LMA (SRTXRF – Convencional)**

	Fe	Cu	Zn	Br	Rb	sexo	idade	tempo
Fe	1	,119 ,626	,072 ,771	,278 ,248	<b>-,517(*)</b> ,023	,082 ,738	-,173 ,479	-,115 ,639
Cu	,119 ,626	1	-,058 ,815	,087 ,724	-,234 ,336	-,053 ,828	,173 ,480	-,453 ,051
Zn	,072 ,771	-,058 ,815	1	,048 ,846	-,001 ,997	,079 ,749	-,360 ,130	,137 ,576
Br	,278 ,248	,087 ,724	,048 ,846	1	-,089 ,717	<b>,564(*)</b> ,012	,222 ,361	-,107 ,663
Rb	<b>-,517(*)</b> ,023	-,234 ,336	-,001 ,997	-,089 ,717	1	-,105 ,669	,289 ,229	,007 ,978
sexo	,082 ,738	-,053 ,828	,079 ,749	<b>,564(*)</b> ,012	-,105 ,669	1	,090 ,713	,062 ,801
idade	-,173 ,479	,173 ,480	-,360 ,130	,222 ,361	,289 ,229	,090 ,713	1	-,397 ,092
tempo	-,115 ,639	-,453 ,051	,137 ,576	-,107 ,663	,007 ,978	,062 ,801	-,397 ,092	1

\* ( $\alpha = 0,05$ )

\*\* ( $\alpha = 0,01$ )



**Tabela C.11 - Análise Bivariada do Grupo LLC (SRTXRF – Convencional)**

	Fe	Cu	Zn	Br	Rb	sexo	idade	tempo
Fe	1	-,471 ,286	<b>,957(**)</b> ,001	-,085 ,857	<b>,459</b> ,300	<b>,747</b> ,053	<b>,597</b> ,157	-,260 ,574
Cu	-,471 ,286	1	<b>-,500</b> ,253	<b>-,652</b> ,112	-,033 ,943	-,056 ,906	<b>846(*)</b> ,016	<b>,615</b> ,142
Zn	<b>,957(**)</b> ,001	-,500 ,253	1	-,039 ,933	,342 ,452	<b>,607</b> ,148	<b>,509</b> ,243	-,248 ,591
Br	-,085 ,857	-,652 ,112	-,039 ,933	1	-,242 ,600	-,185 ,691	<b>,639</b> ,123	-,022 ,962
Rb	<b>,459</b> ,300	-,033 ,943	,342 ,452	-,242 ,600	1	<b>,775(*)</b> ,041	,291 ,527	,025 ,957
sexo	<b>,747</b> ,053	-,056 ,906	,607 ,148	-,185 ,691	<b>,775(*)</b> ,041	1	<b>,468</b> ,289	,052 ,912
idade	<b>,597</b> ,157	<b>-,846(*)</b> ,016	,509 ,243	,639 ,123	,291 ,527	,468 ,289	1	<b>-,405</b> ,367
tempo	-,260 ,574	,615 ,142	-,248 ,591	-,022 ,962	,025 ,957	,052 ,912	-,405 ,367	1

\* ( $\alpha = 0,05$ )

\*\* ( $\alpha = 0,01$ )

**Tabela C.12 - Análise Bivariada do Grupo LLA (SRTXRF – Convencional)**

	<b>Fe</b>	<b>Cu</b>	<b>Zn</b>	<b>Br</b>	<b>Rb</b>	<b>sexo</b>	<b>idade</b>	<b>tempo</b>
<b>Fe</b>	1	,258 ,444	,223 ,509	,335 ,314	,507 ,112	-,295 ,378	,280 ,404	-,273 ,416
<b>Cu</b>	,258 ,444	1	,063 ,853	-,241 ,476	-,168 ,621	,071 ,836	,570 ,067	-,095 ,782
<b>Zn</b>	,223 ,509	,063 ,853	1	,798(**) ,003	,353 ,287	,356 ,282	,497 ,120	-,285 ,395
<b>Br</b>	,335 ,314	-,241 ,476	,798(**) ,003	1	,307 ,359	,294 ,380	,155 ,648	-,202 ,551
<b>Rb</b>	,507 ,112	-,168 ,621	,353 ,287	,307 ,359	1	-,161 ,636	,225 ,507	-,203 ,550
<b>sexo</b>	-,295 ,378	,071 ,836	,356 ,282	,294 ,380	-,161 ,636	1	-,122 ,721	-,553 ,078
<b>idade</b>	,280 ,404	,570 ,067	,497 ,120	,155 ,648	,225 ,507	-,122 ,721	1	-,302 ,366
<b>tempo</b>	-,273 ,416	-,095 ,782	-,285 ,395	-,202 ,551	-,203 ,550	-,553 ,078	-,302 ,366	1

\* ( $\alpha = 0,05$ )

\*\* ( $\alpha = 0,01$ )

**Tabela C.13 - Análise Bivariada do Grupo AF (SRTXRF – Convencional)**

	<b>Fe</b>	<b>Cu</b>	<b>Zn</b>	<b>Br</b>	<b>Rb</b>	<b>sexo</b>	<b>idade</b>	<b>tempo</b>
<b>Fe</b>	1	,191 ,219	-,174 ,264	-,067 ,669	,245 ,114	,106 ,499	,152 ,330	,150 ,338
<b>Cu</b>	,191 ,219	1	-,096 ,540	-,481(**) ,001	-,315(*) ,040	-,160 ,307	,306(*) ,046	-,029 ,854
<b>Zn</b>	-,174 ,264	-,096 ,540	1	-,012 ,938	-,043 ,784	-,068 ,665	-,035 ,822	,216 ,165
<b>Br</b>	-,067 ,669	-,481(**) ,001	-,012 ,938	1	,443(**) ,003	,269 ,082	-,103 ,509	-,129 ,409
<b>Rb</b>	,245 ,114	-,315(*) ,040	-,043 ,784	,443(**) ,003	1	,079 ,613	,059 ,706	,037 ,812
<b>sexo</b>	,106 ,499	-,160 ,307	-,068 ,665	,269 ,082	,079 ,613	1	,060 ,702	-,194 ,212
<b>idade</b>	,152 ,330	,306(*) ,046	-,035 ,822	-,103 ,509	,059 ,706	,060 ,702	1	,263 ,088
<b>tempo</b>	,150 ,338	-,029 ,854	,216 ,165	-,129 ,409	,037 ,812	-,194 ,212	,263 ,088	1

\* ( $\alpha = 0,05$ )

\*\* ( $\alpha = 0,01$ )

## APÊNDICE D

### Análise Multivariada Através do SPSS Dentro de Cada Grupo Estudado (SRTXRF – Baixo Z)

Tabela D.1 – Matriz Componente – Sadio (SRTXRF – Baixo Z)

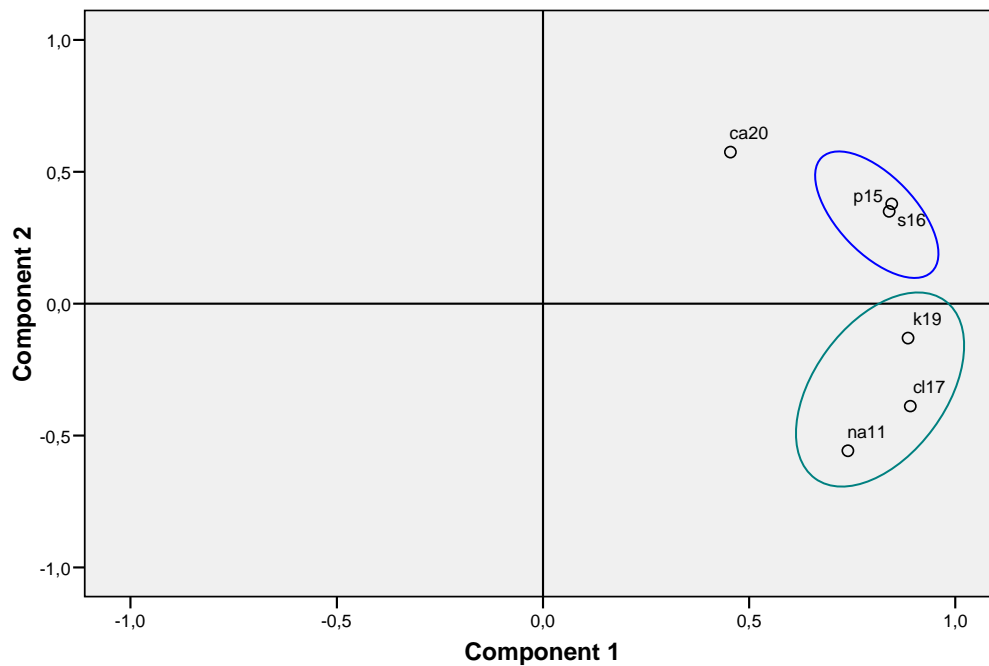
Component Matrix<sup>a</sup>

	Component	
	1	2
Na(11)	,740	-,558
P(15)	,839	,350
S(16)	,846	,378
Cl(17)	,891	-,389
K(19)	,885	-,131
Ca(20)	,455	,575

Extraction Method: Principal Component Analysis.

a. 2 components extracted.

Component Plot



**Figura D.1** – Gráfico das Componentes Principais – Sadio (SRTXRF – Baixo Z)

**Tabela D.2** – Matriz Componente - LMC (SRTXRF – Baixo Z)

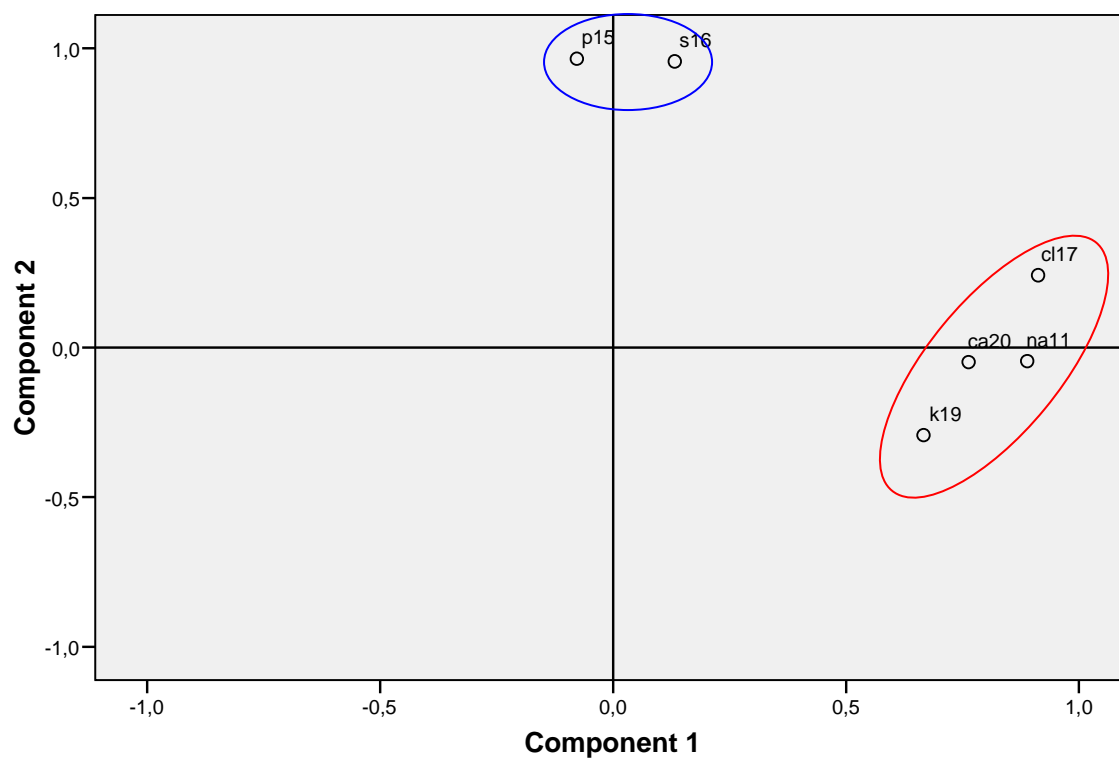
**Component Matrix<sup>a</sup>**

	Component	
	1	2
Na(11)	,889	-,045
P(15)	-,078	,965
S(16)	,132	,956
Cl(17)	,913	,242
K(19)	,667	-,293
Ca(20)	,763	-,048

Extraction Method: Principal Component Analysis

a. 2 components extracted.

**Component Plot**



**Figura D.2** – Gráfico das Componentes Principais – LMC (SRTXRF – Baixo Z)

**Tabela D.3** – Matriz Componente - LMA (SRTXRF – Baixo Z)

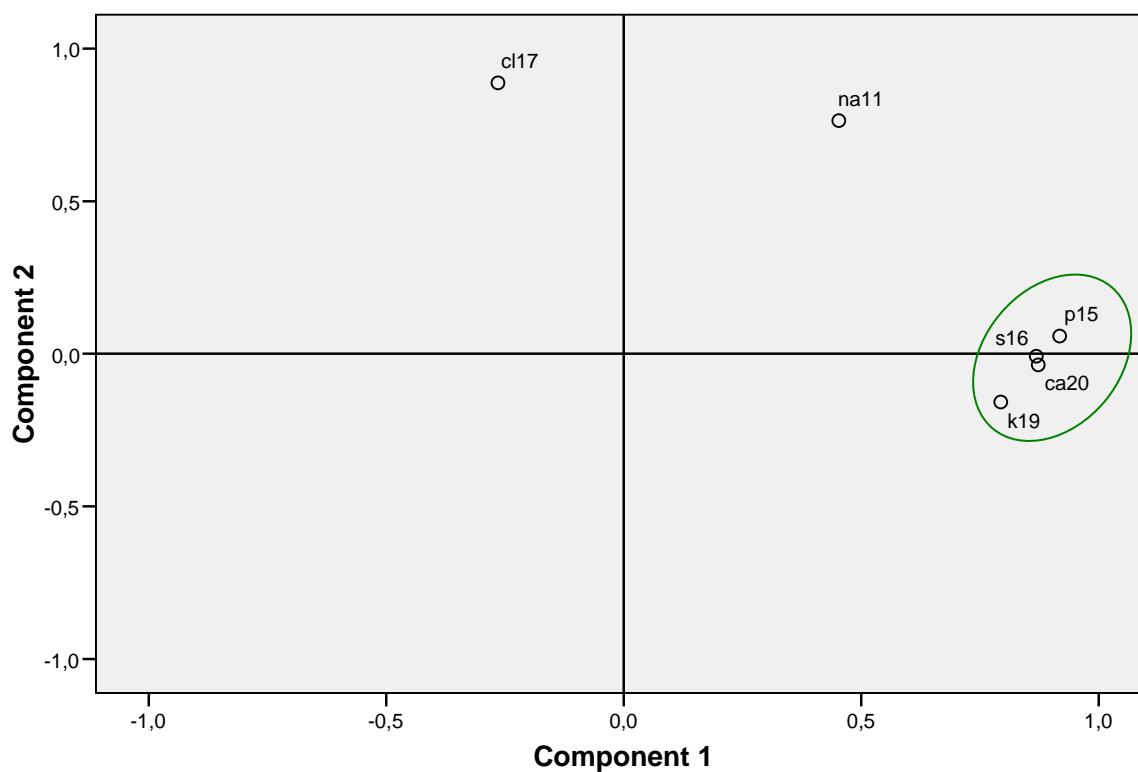
**Component Matrix<sup>a</sup>**

	Component	
	1	2
Na(11)	,453	,763
P(15)	,918	,058
S(16)	,869	-,009
Cl(17)	-,264	,888
K(19)	,794	-,158
Ca(20)	,873	-,037

Extraction Method: Principal Component Analysis

a. 2 components extracted.

**Component Plot**



**Figura D.3** – Gráfico das Componentes Principais – LMA (SRTXRF – Baixo Z)

**Tabela D.4** – Matriz Componente - LLC (SRTXRF – Baixo Z)

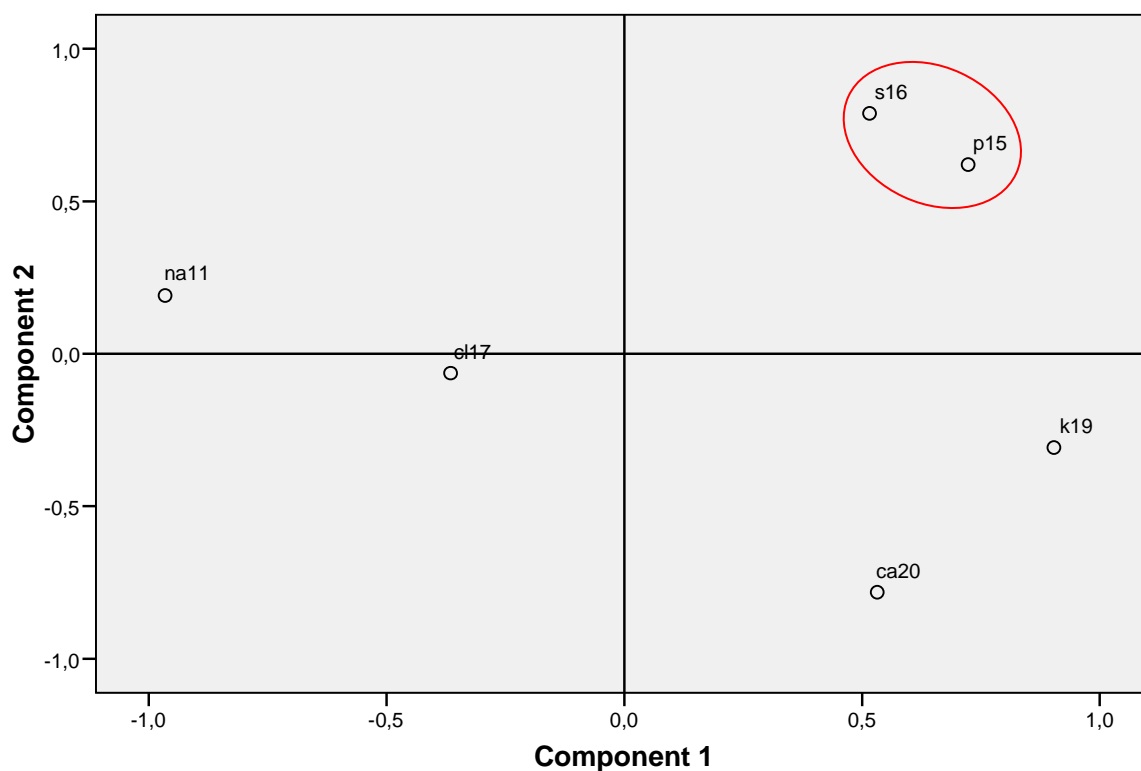
**Component Matrix<sup>a</sup>**

	Component	
	1	2
Na(11)	-,966	,191
P(15)	,723	,620
S(16)	,516	,788
Cl(17)	-,365	-,064
K(19)	,904	-,307
Ca(20)	,532	-,782

Extraction Method: Principal Component Analysis.

a. 2 components extracted.

**Component Plot**



**Figura D.4** – Gráfico das Componentes Principais – LLC (SRTXRF – Baixo Z)

**Tabela D.5** – Matriz Componente - LLA (SRTXRF - Baixo Z)

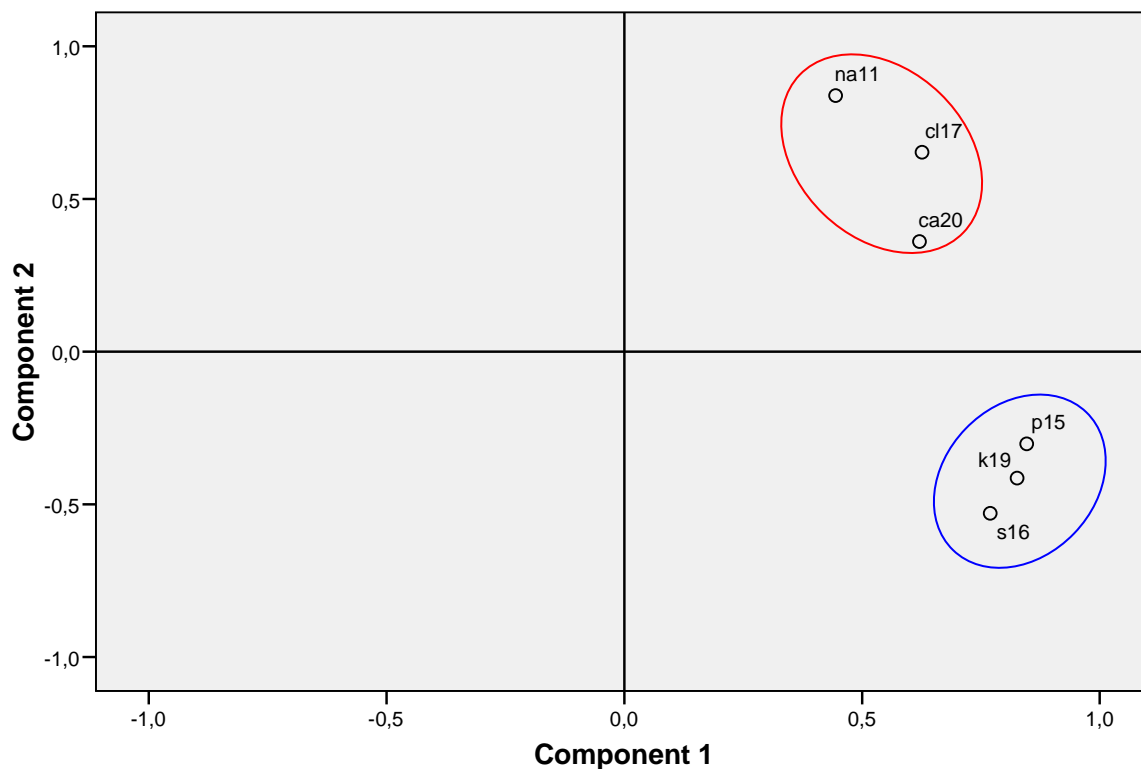
**Component Matrix<sup>a</sup>**

	Component	
	1	2
Na(11)	,445	,839
P(15)	,846	-,302
S(16)	,769	-,530
Cl(17)	,626	,653
K(19)	,826	-,415
Ca(20)	,621	,360

Extraction Method: Principal Component Analysis.

a. 2 components extracted.

**Component Plot**



**Figura D.5** – Gráfico das Componentes Principais – LLA (SRTXRF – Baixo Z)



**Tabela D.6** – Matriz Componente - AF (SRTXRF – Baixo Z)

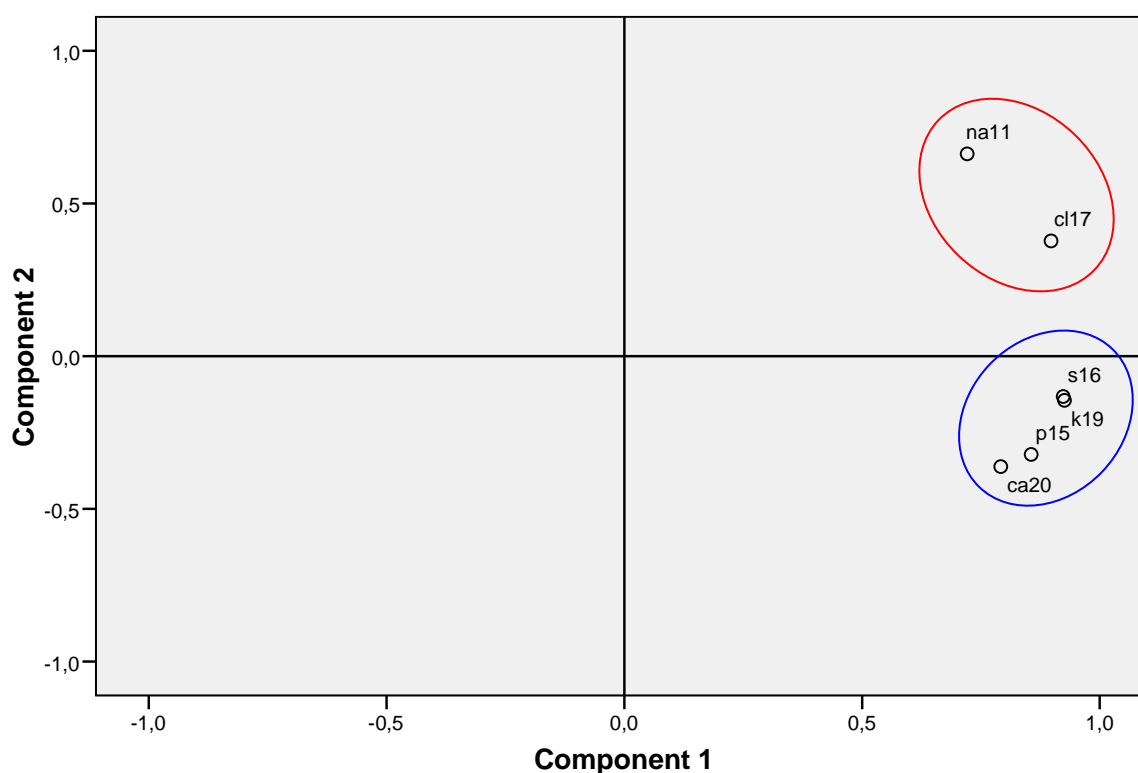
**Component Matrix<sup>a</sup>**

	Component	
	1	2
Na(11)	,721	,663
P(15)	,856	-,322
S(16)	,923	-,132
Cl(17)	,898	,378
K(19)	,926	-,145
Ca(20)	,791	-,361

Extraction Method: Principal Component Analysis.

a. 2 components extracted.

**Component Plot**



**Figura D.6** – Gráfico das Componentes Principais – AF (SRTXRF – Baixo Z)

**Tabela D.7** – Matriz Componente - PTI (SRTXRF – Baixo Z)

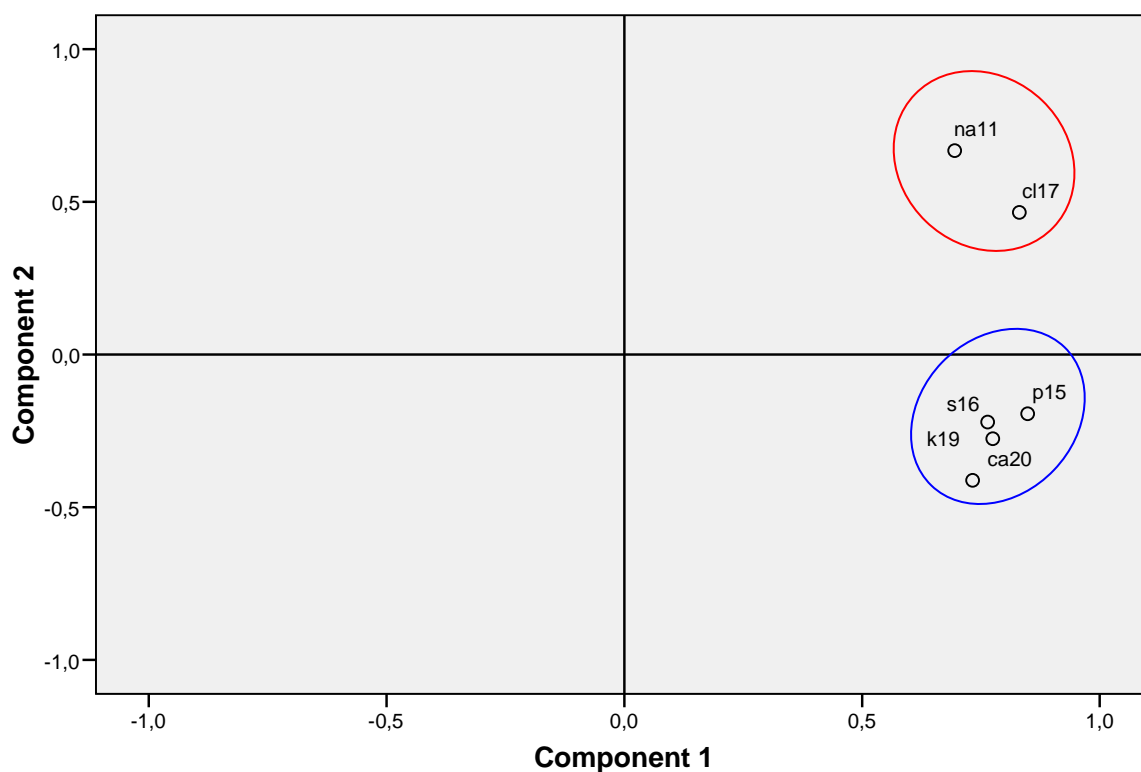
**Component Matrix<sup>a</sup>**

	Component	
	1	2
Na(11)	,695	,667
P(15)	,848	-,194
S(16)	,764	-,222
Cl(17)	,831	,465
K(19)	,775	-,276
Ca(20)	,733	-,413

Extraction Method: Principal Component Analysis

a. 2 components extracted.

**Component Plot**



**Figura D.7** – Gráfico das Componentes Principais – PTI (SRTXRF – Baixo Z)

**Análise Multivariada Através do SPSS Dentro de Cada Grupo Estudado  
(SRTXRF Convencional)**

**Tabela D.8**– Matriz Componente – Sadio (SRTXRF - Convencional)

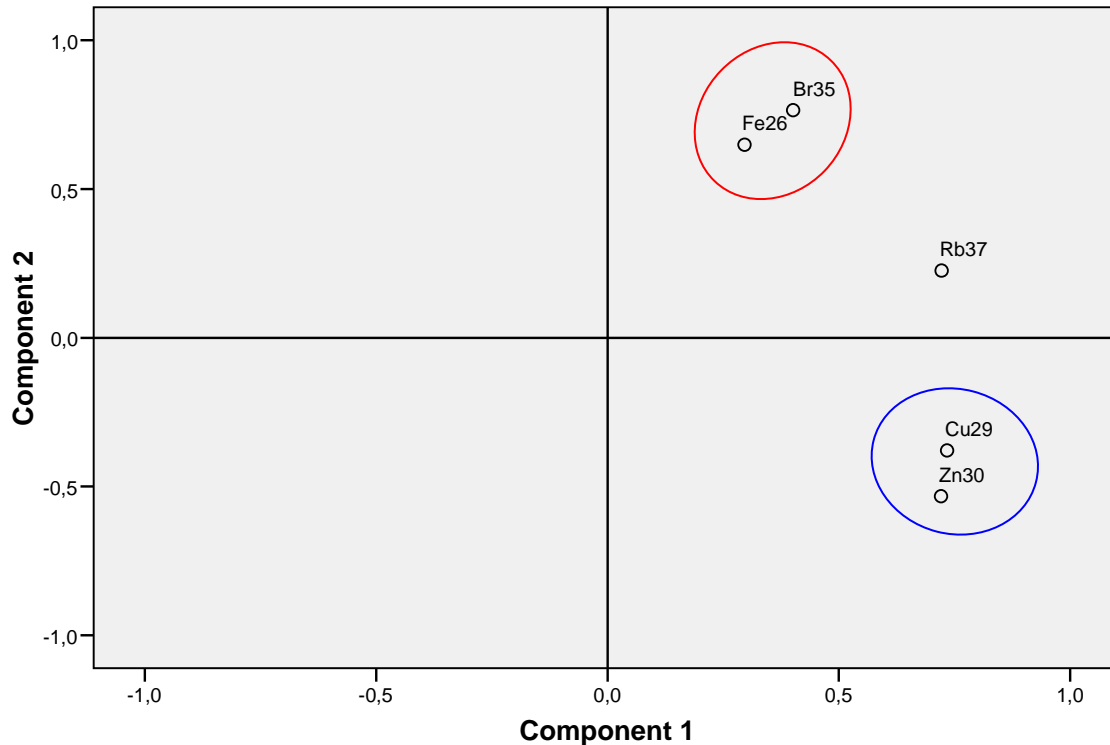
**Component Matrix<sup>a</sup>**

	Component	
	1	2
Fe(26)	,296	,649
Cu(29)	,734	-,379
Zn(30)	,721	-,533
Br(35)	,401	,765
Rb(37)	,722	,226

Extraction Method: Principal Component Analysis.

a. 2 components extracted.

**Component Plot**



**Figura D.8** – Gráfico das Componentes Principais – Sadio (SRTXRF – Convencional)

**Tabela D.9**– Matriz Componente – LMC (SRTXRF - Convencional)

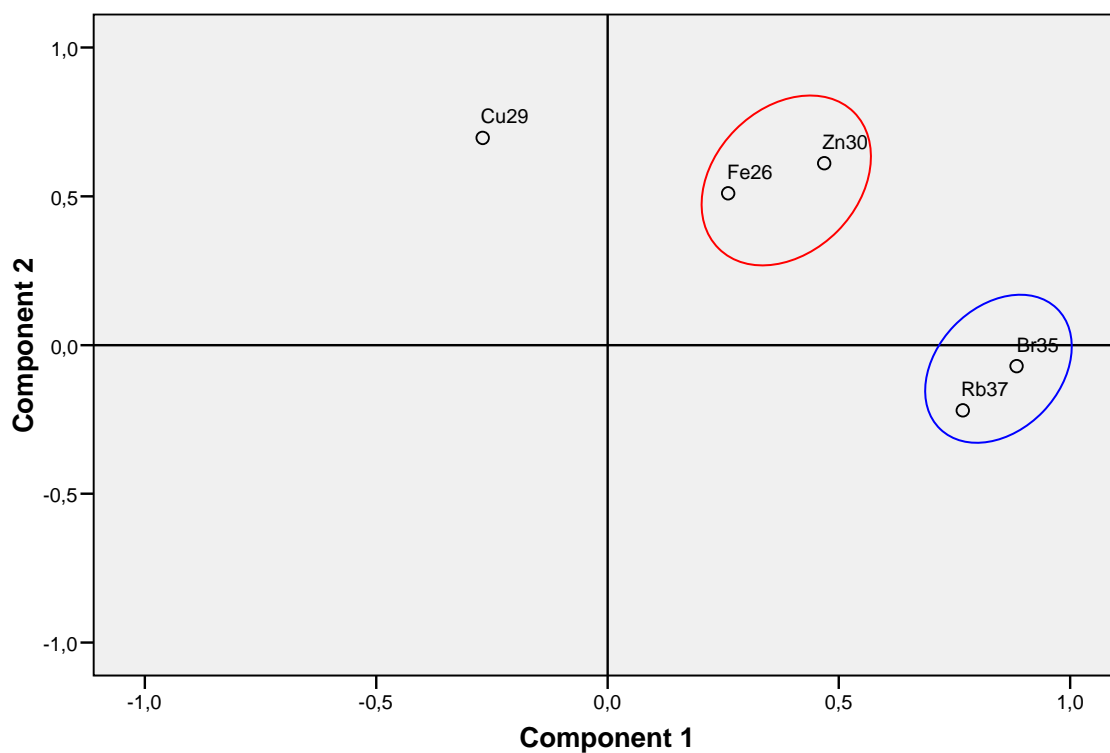
**Component Matrix<sup>a</sup>**

	Component	
	1	2
Fe (26)	,261	,510
Cu (29)	-,270	,697
Zn (30)	,469	,611
Br (35)	,884	-,071
Rb (37)	,768	-,220

Extraction Method: Principal Component Analysis.

a. 2 components extracted.

**Component Plot**



**Figura D.9** – Gráfico das Componentes Principais – LMC (SRTXRF – Convencional)

**Tabela D.10** – Matriz Componente – LMA (SRTXRF - Convencional)

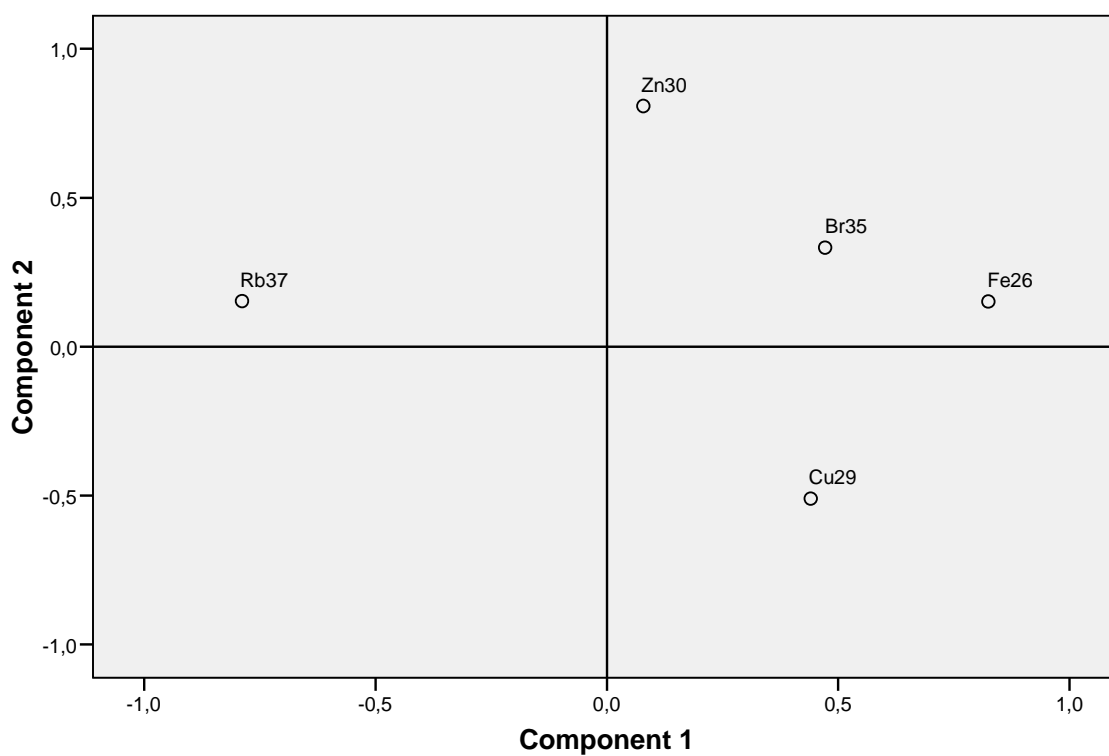
**Component Matrix<sup>a</sup>**

	Component	
	1	2
Fe (26)	,825	,151
Cu (29)	,440	-,510
Zn (30)	,079	,808
Br (35)	,472	,333
Rb (37)	-,789	,153

Extraction Method: Principal Component Analysis.

a. 2 components extracted.

**Component Plot**



**Figura D.10** – Gráfico das Componentes Principais – LMA (SRTXRF – Convencional)

**Tabela D.11** – Matriz Componente – LLC (SRTXRF - Convencional)

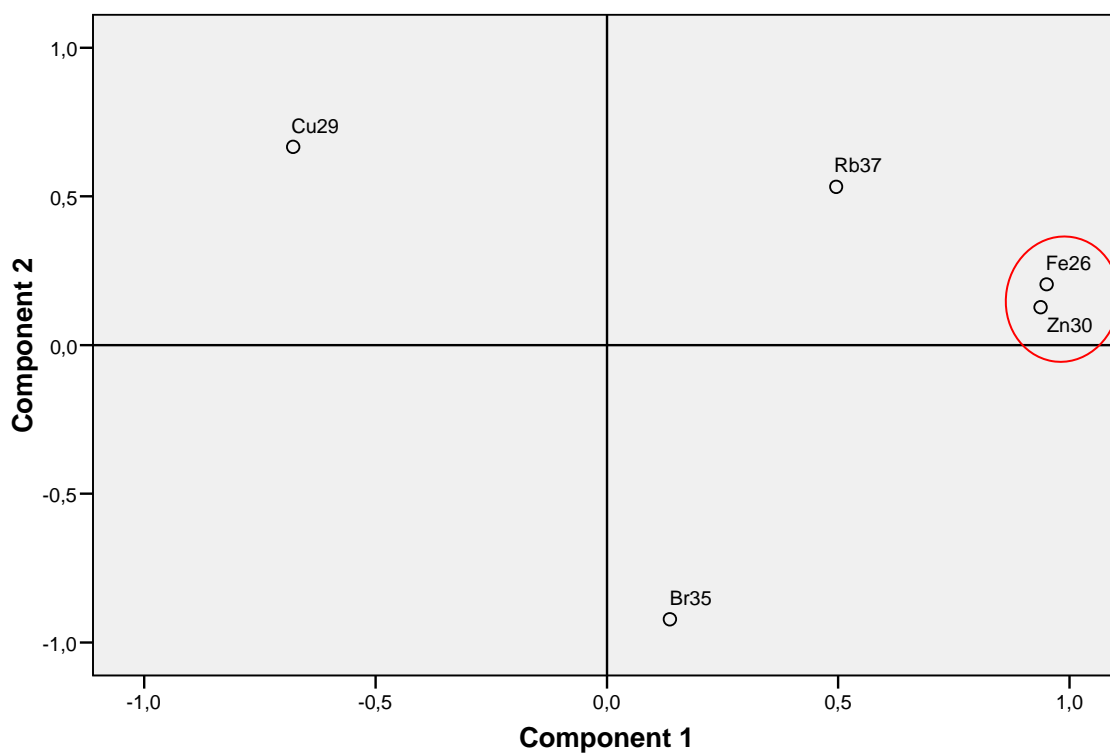
**Component Matrix<sup>a</sup>**

	Component	
	1	2
Fe (26)	,951	,204
Cu (29)	-,678	,666
Zn (30)	,938	,127
Br (35)	,136	-,922
Rb (37)	,496	,533

Extraction Method: Principal Component Analysis.

a. 2 components extracted.

**Component Plot**



**Figura D.11** – Gráfico das Componentes Principais – LLC (SRTXRF – Convencional)

**Tabela D.12** – Matriz Componente – LLA (SRTXRF - Convencional)

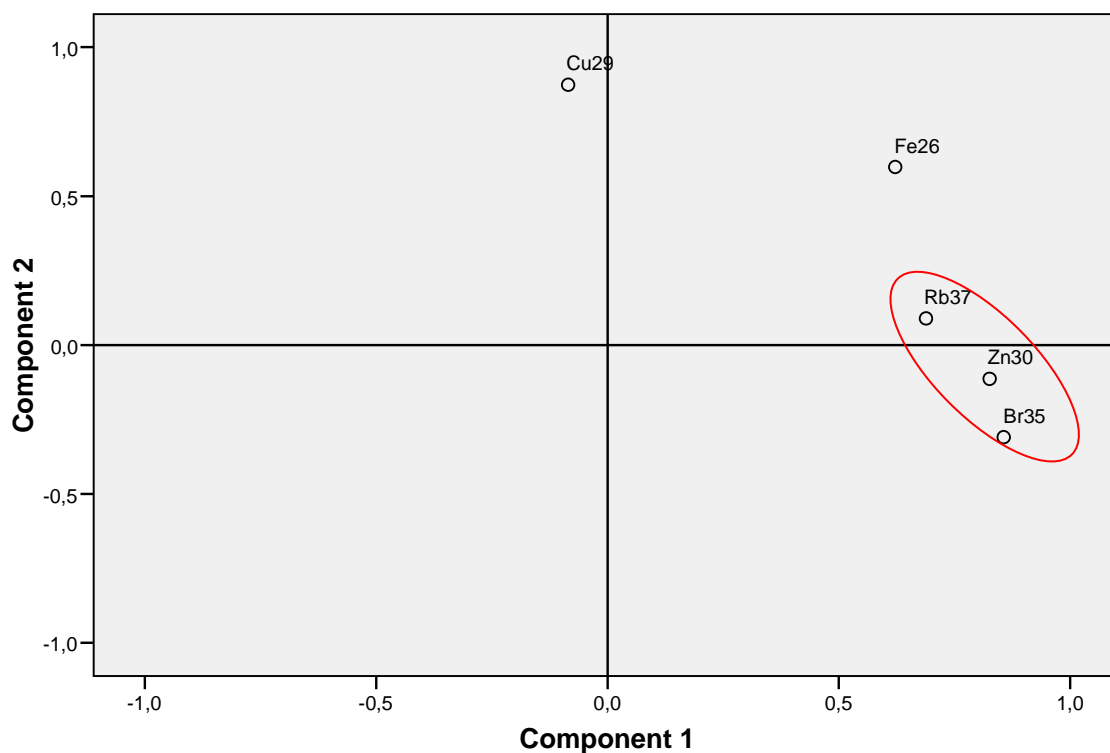
**Component Matrix<sup>a</sup>**

	Component	
	1	2
Fe (26)	,622	,598
Cu (29)	-,085	,873
Zn (30)	,826	-,113
Br (35)	,856	-,310
Rb (37)	,689	,089

Extraction Method: Principal Component Analysis.

a. 2 components extracted.

**Component Plot**



**Figura D.12** – Gráfico das Componentes Principais – LLA (SRTXRF – Convencional)

**Tabela D.13** – Matriz Componente – AF (SRTXRF - Convencional)

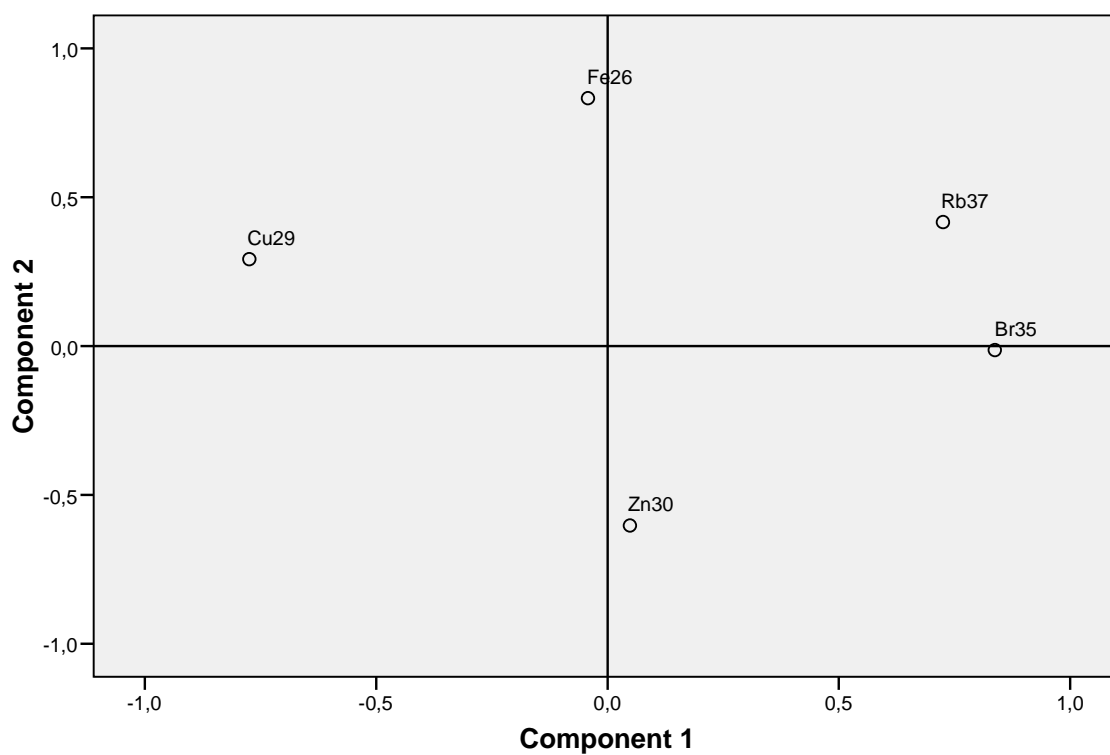
**Component Matrix<sup>a</sup>**

	Component	
	1	2
Fe (26)	-,042	,833
Cu (29)	-,775	,292
Zn (30)	,048	-,603
Br (35)	,837	-,013
Rb (37)	,725	,417

Extraction Method: Principal Component Analysis

a. 2 components extracted.

**Component Plot**



**Figura D.13** – Gráfico das Componentes Principais – AF (SRTXRF – Convencional)



## APÊNDICE E

### Análise Multivariada Através do SPSS Entre os Grupos Estudados em Relação às Concentrações Elementares Individuais (SRTXRF – Baixo Z)

Tabela E.1– Matriz Componente – Na (SRTXRF - Baixo Z)

**Component Matrix<sup>a</sup>**

	Component	
	1	2
SS	,698	,553
AF	-,542	,652
LLA	,830	-,301
LLC	,244	-,638
LMA	,803	,320
LMC	-,373	-,573
PTI	-,148	,652

Extraction Method: Principal Component Analysis.

a. 2 components extracted.

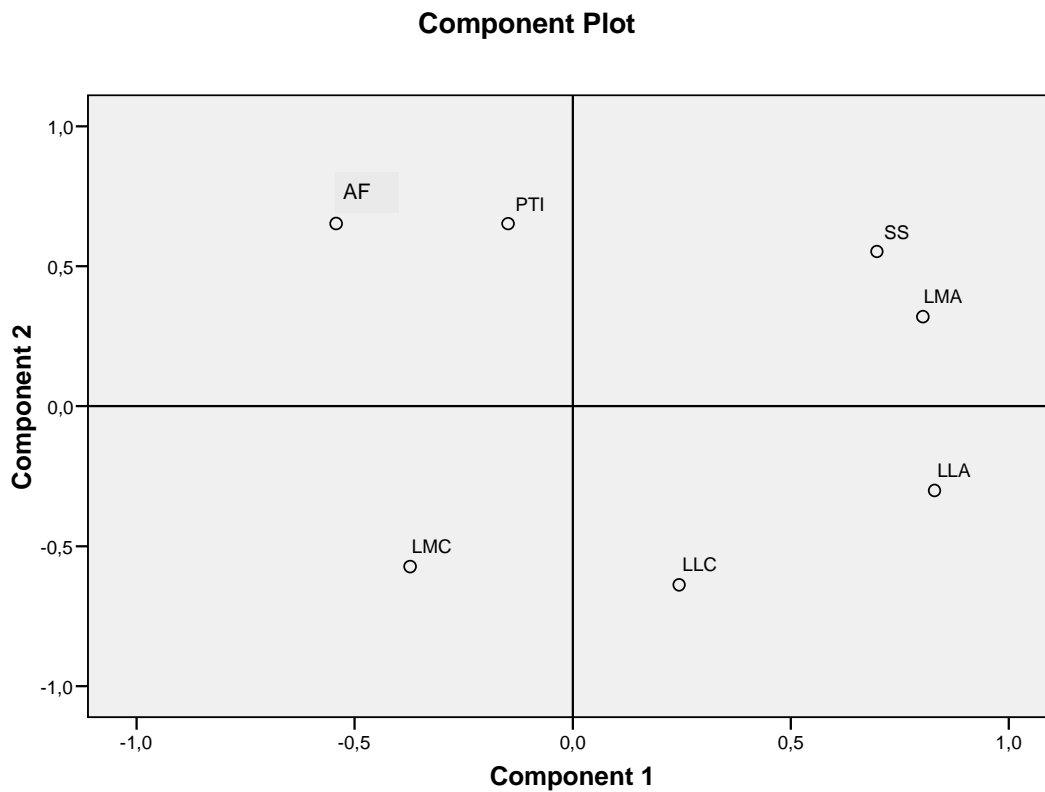


Figura E.1 – Gráfico das Componentes Principais – Na (SRTXRF – Baixo Z)

**Tabela E.2 – Matriz Componente – P (SRTXRF - Baixo Z)**

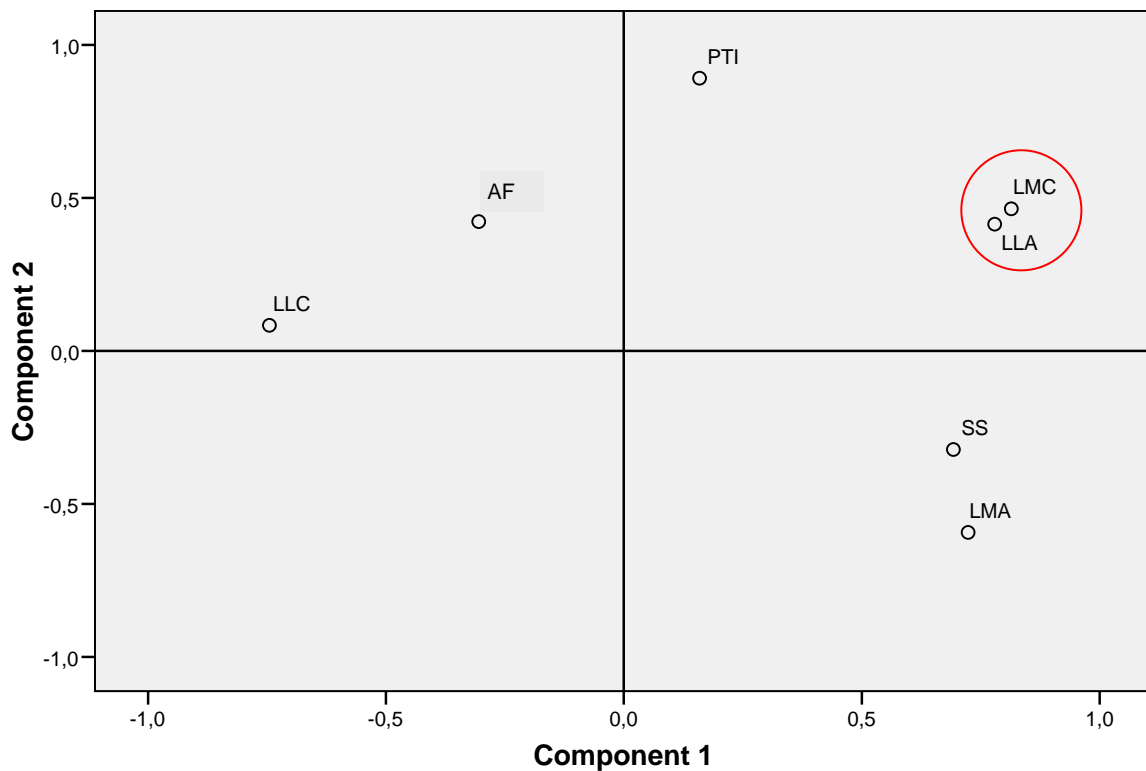
**Component Matrix<sup>a</sup>**

	Component	
	1	2
SS	,692	-,322
AF	-,305	,423
LLA	,779	,415
LLC	-,745	,084
LMA	,724	-,593
LMC	,814	,465
PTI	,159	,892

Extraction Method: Principal Component Analysis.

a. 2 components extracted.

**Component Plot**



**Figura E.2 – Gráfico das Componentes Principais – P (SRTXRF – Baixo Z)**

**Tabela E.3 – Matriz Componente – S (SRTXRF – Baixo Z)**

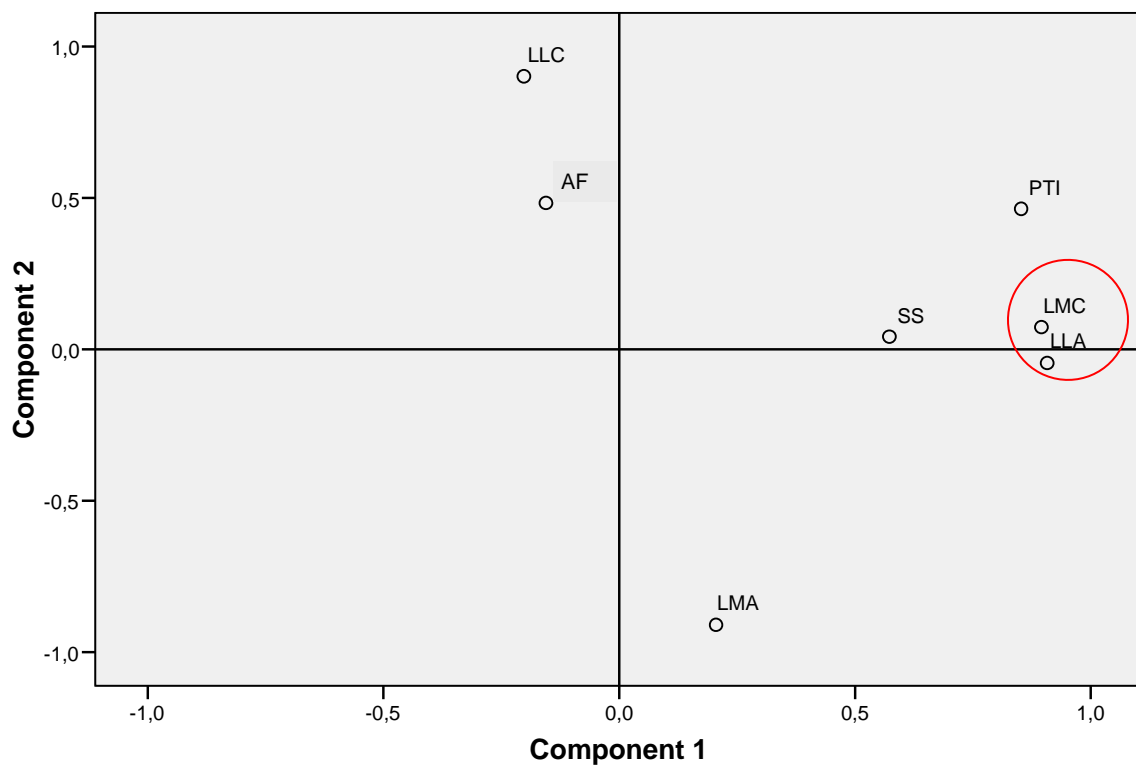
**Component Matrix<sup>a</sup>**

	Component	
	1	2
SS	,573	,042
AF	-,155	,483
LLA	,908	-,045
LLC	-,202	,902
LMA	,205	-,910
LMC	,895	,073
PTI	,852	,464

Extraction Method: Principal Component Analysis.

a. 2 components extracted.

**Component Plot**



**Figura E.3 – Gráfico das Componentes Principais – S (SRTXRF – Baixo Z)**

**Tabela E.4** – Matriz Componente – CI (SRTXRF – Baixo Z)

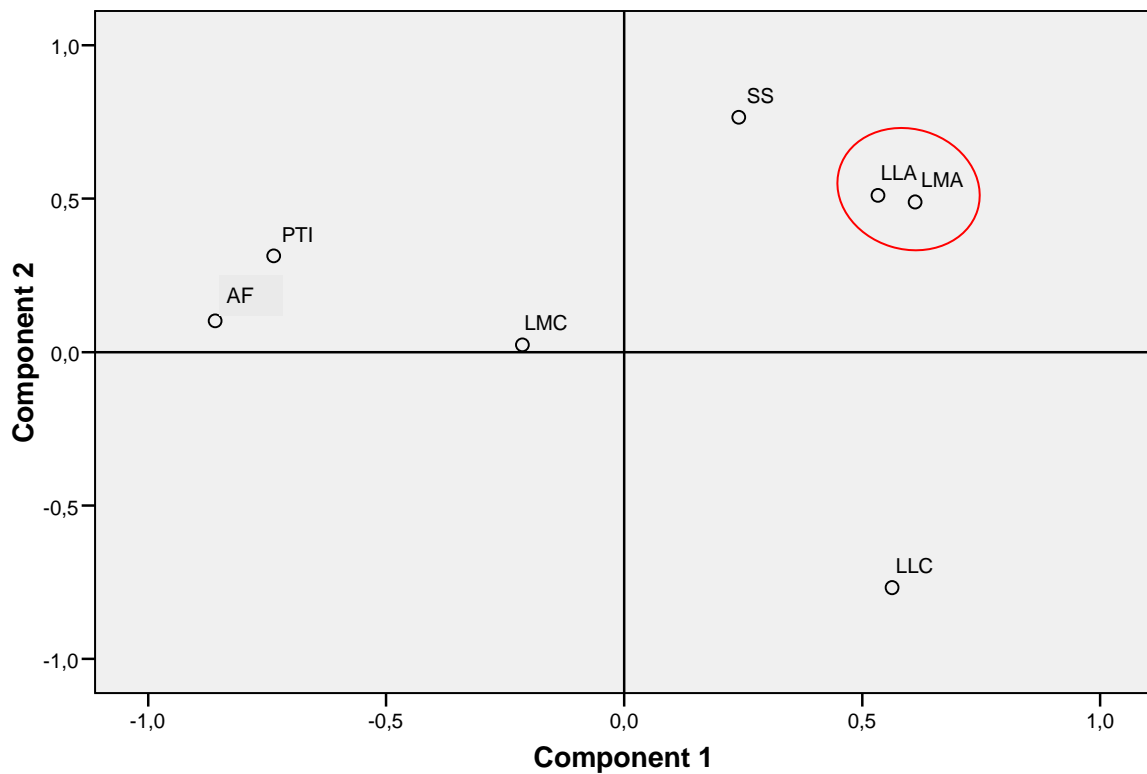
**Component Matrix<sup>a</sup>**

	Component	
	1	2
SS	,241	,765
AF	-,859	,102
LLA	,533	,510
LLC	,563	-,767
LMA	,611	,489
LMC	-,214	,023
PTI	-,736	,313

Extraction Method: Principal Component Analysis.

a. 2 components extracted.

**Component Plot**



**Figura E.4** – Gráfico das Componentes Principais – CI (SRTXRF – Baixo Z)

**Tabela E.5 – Matriz Componente – K (SRTXRF – Baixo Z)**

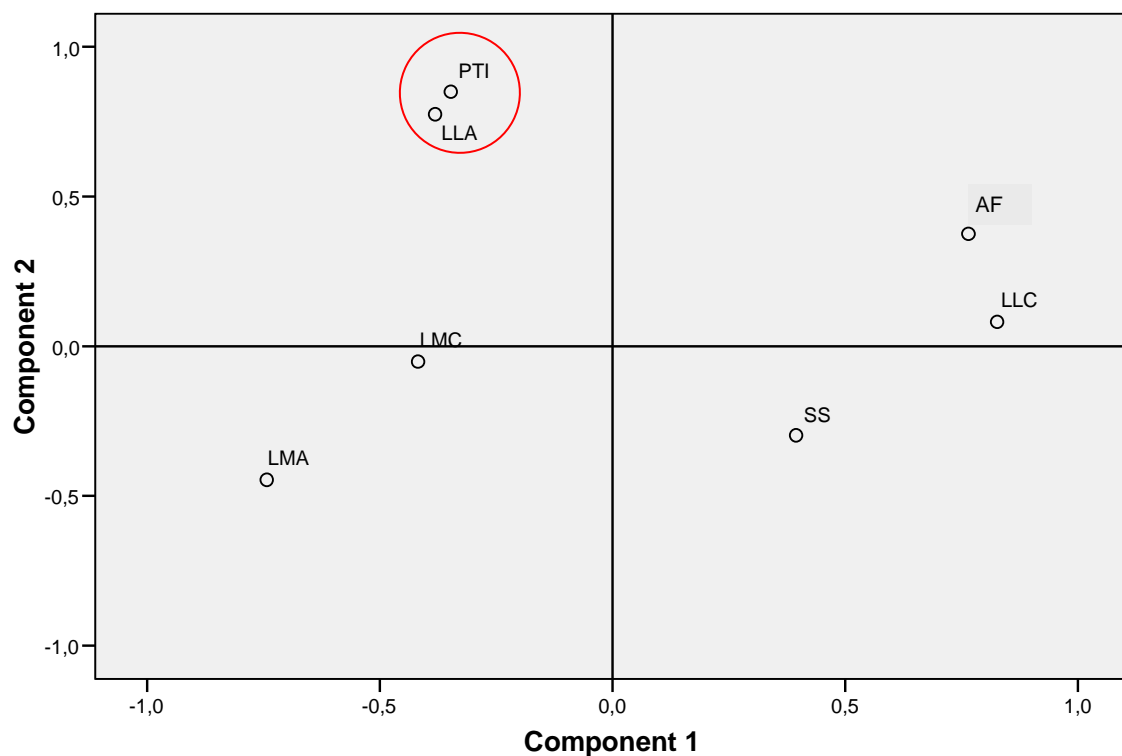
**Component Matrix<sup>a</sup>**

	Component	
	1	2
SS	,395	-,298
AF	,765	,375
LLA	-,381	,775
LLC	,827	,081
LMA	-,743	-,446
LMC	-,418	-,051
PTI	-,347	,850

Extraction Method: Principal Component Analysis.

a. 2 components extracted.

**Component Plot**



**Figura E.5 – Gráfico das Componentes Principais – K (SRTXRF – Baixo Z)**

**Tabela E.6** – Matriz Componente – Ca (SRTXRF – Baixo Z)

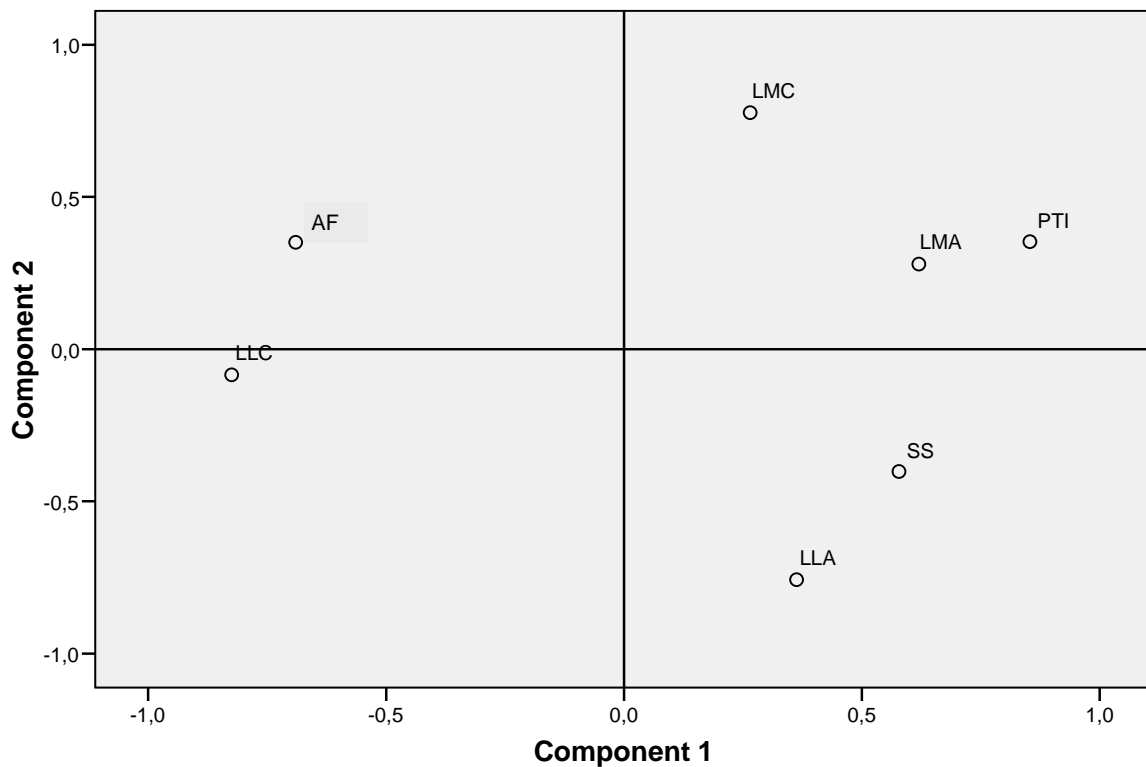
**Component Matrix<sup>a</sup>**

	Component	
	1	2
SS	,578	-,402
AF	-,690	,351
LLA	,363	-,757
LLC	-,825	-,085
LMA	,620	,280
LMC	,265	,777
PTI	,853	,353

Extraction Method: Principal Component Analysis.

a. 2 components extracted.

**Component Plot**



**Figura E.6** – Gráfico das Componentes Principais – Ca (SRTXRF – Baixo Z)

**Análise Multivariada Através do SPSS Entre os Grupos Estudado em Relação às  
Concentrações Elementares Individuais (SRTXRF - Convencional)**

**Tabela E.7– Matriz Componente – Fe (SRTXRF - Convencional)**

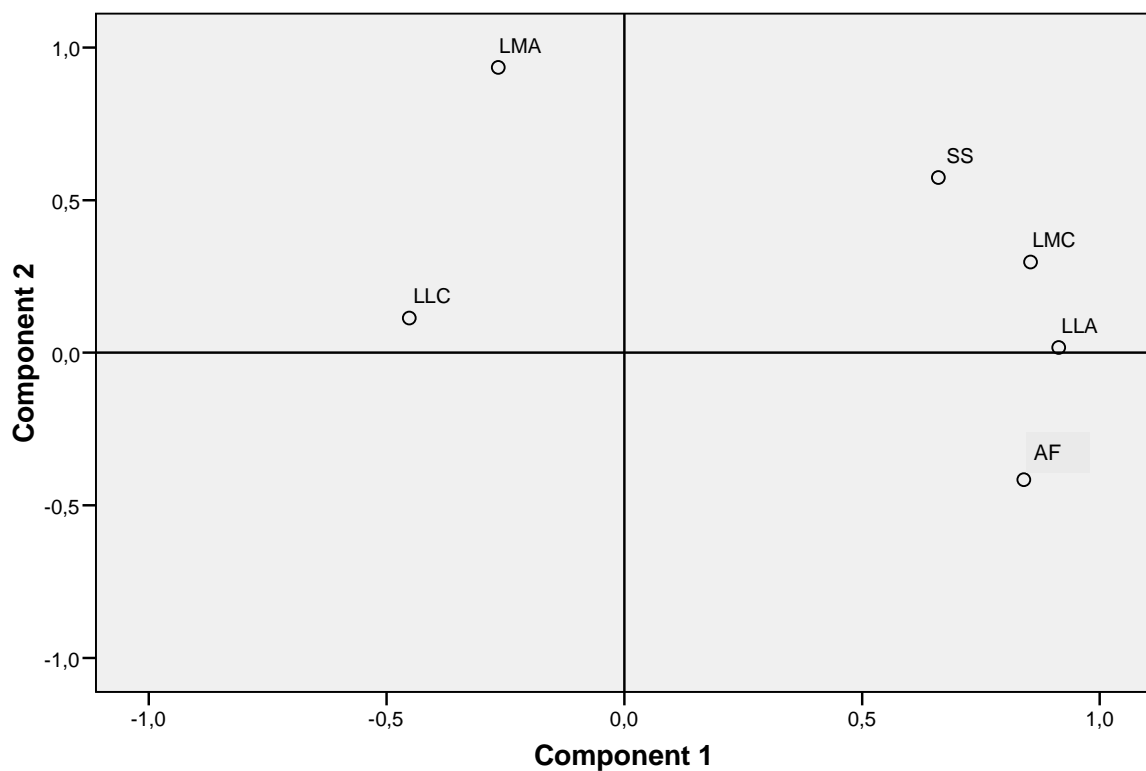
**Component Matrix<sup>a</sup>**

	Component	
	1	2
SS	,661	,574
AF	,840	-,416
LLA	,914	,017
LLC	-,452	,113
LMA	-,265	,935
LMC	,854	,297

Extraction Method: Principal Component Analysis.

a. 2 components extracted.

**Component Plot**



**Figura E.7 – Gráfico das Componentes Principais – Fe (SRTXRF - Convencional)**

**Tabela E.8** – Matriz Componente – Cu (SRTXRF - Convencional)

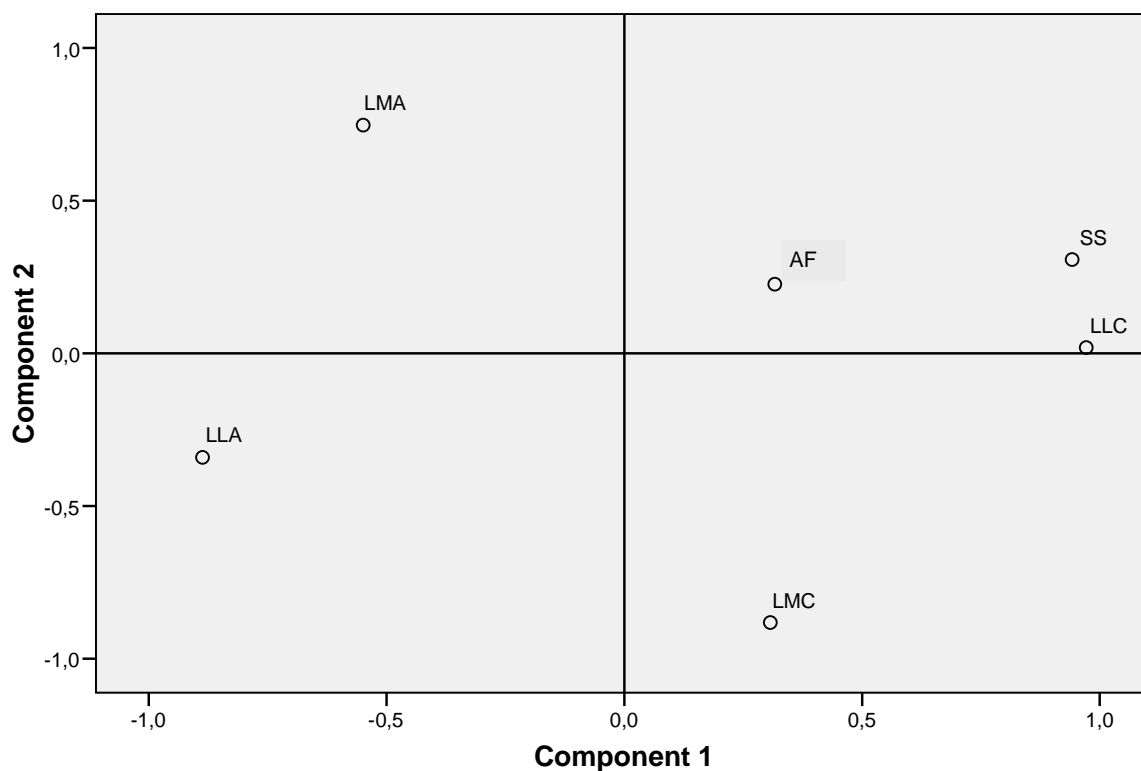
**Component Matrix<sup>a</sup>**

	Component	
	1	2
SS	,942	,307
AF	,317	,226
LLA	-,887	-,341
LLC	,971	,019
LMA	-,549	,747
LMC	,307	-,882

Extraction Method: Principal Component Analysis.

a. 2 components extracted.

**Component Plot**



**Figura E.8** – Gráfico das Componentes Principais – Cu (SRTXRF - Convencional)



**Tabela E.9** – Matriz Componente – Zn (SRTXRF - Convencional)

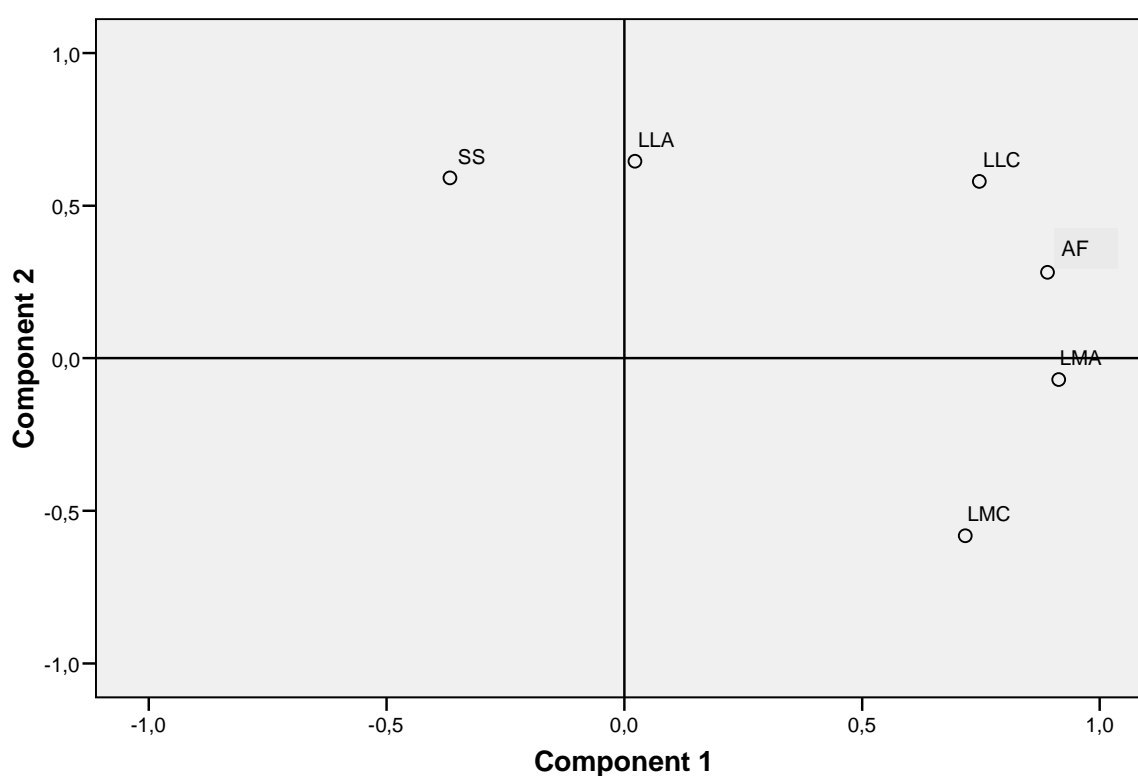
**Component Matrix<sup>a</sup>**

	Component	
	1	2
SS	-,366	,590
AF	,890	,281
LLA	,023	,646
LLC	,747	,579
LMAF	,914	-,070
LMC	,717	-,581

Extraction Method: Principal Component Analysis.

a. 2 components extracted.

**Component Plot**



**Figura E.9** – Gráfico das Componentes Principais – Zn (SRTXRF - Convencional)

**Tabela E.10** – Matriz Componente – Br (SRTXRF - Convencional)

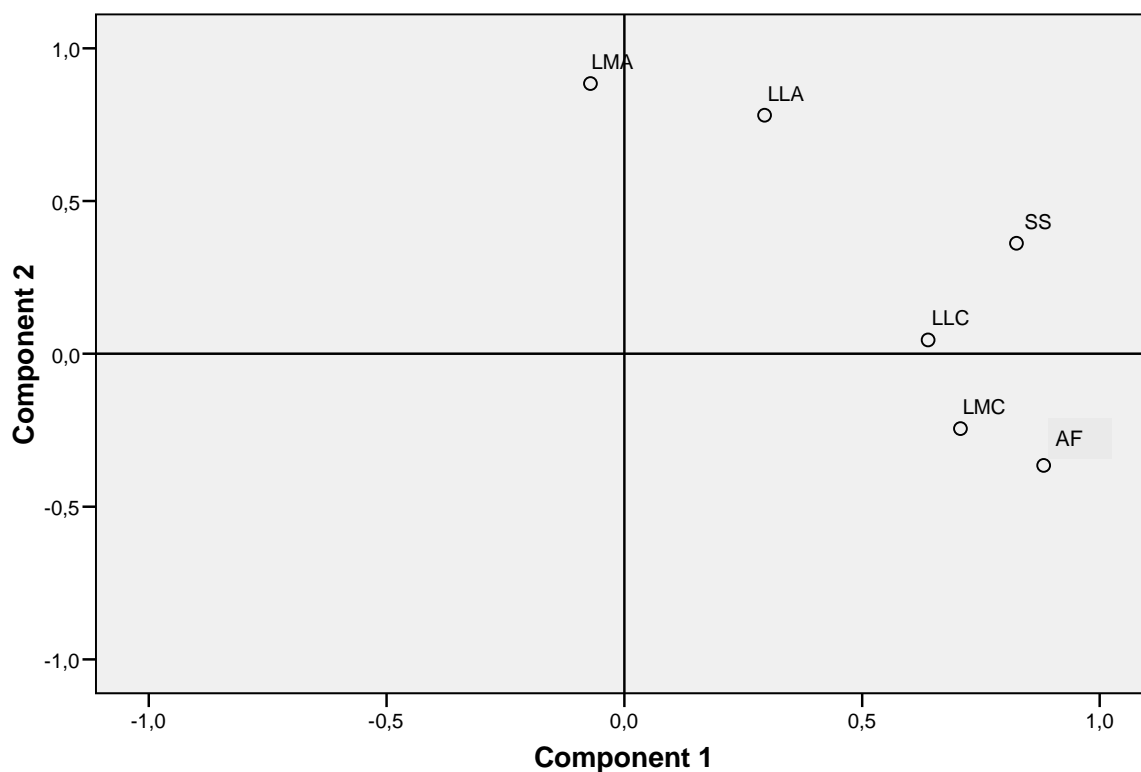
**Component Matrix<sup>a</sup>**

	Component	
	1	2
SS	,825	,362
AF	,882	-,366
LLA	,295	,781
LLC	,639	,046
LMA	-,071	,884
LMC	,707	-,245

Extraction Method: Principal Component Analysis.

a. 2 components extracted.

**Component Plot**



**Figura E.10** – Gráfico das Componentes Principais – Br (SRTXRF - Convencional)

**Tabela E.11** – Matriz Componente – Rb (SRTXRF - Convencional)

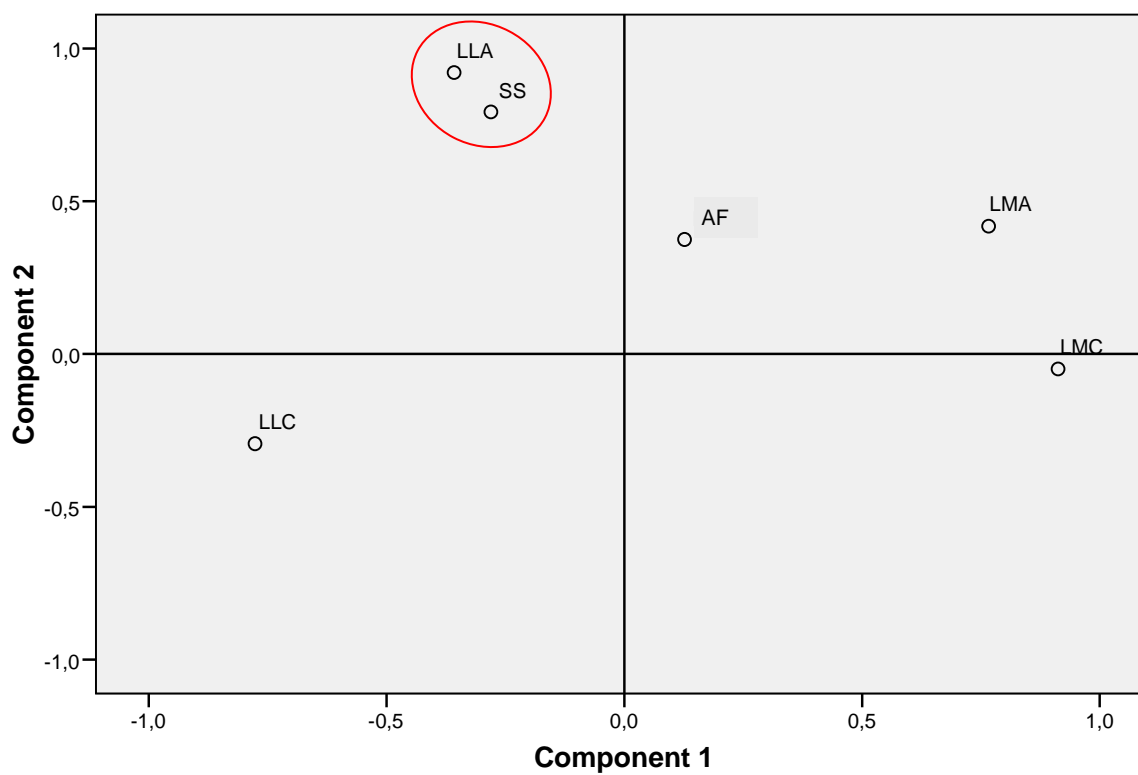
**Component Matrix<sup>a</sup>**

	Component	
	1	2
SS	-,280	,792
AF	,127	,375
LLA	-,358	,921
LLC	-,777	-,293
LMA	,766	,418
LMC	,913	-,048

Extraction Method: Principal Component Analysis.

a. 2 components extracted.

**Component Plot**



**Figura E.11** – Gráfico das Componentes Principais – Rb (SRTXRF - Convencional)