

ESTUDO DE AMOSTRAS DE SANGUE HUMANO E HEMOCOMPONENTES
IRRADIADOS COM BAIXA DOSE UTILIZANDO A TÉCNICA DE
FLUORESCÊNCIA DE RAIOS X POR REFLEXÃO TOTAL

Carla Lemos da Silva Mota

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

Aprovada por:

Prof. Delson Braz, D.Sc.

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

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

RIO DE JANEIRO, RJ – BRASIL
FEVEREIRO DE 2008

MOTA, CARLA LEMOS DA SILVA

Estudo de amostras de sangue humano e hemocomponentes irradiados com baixa dose utilizando a técnica de Fluorescência de Raios X por Reflexão Total [Rio de Janeiro] 2008.

IX, 76p. 29,7 cm (COPPE/UFRJ, M.Sc., Engenharia Nuclear, 2008)

Dissertação – Universidade Federal do Rio de Janeiro, COPPE

1. TXRF
2. Sangue Humano
3. Luz Síncrotron
4. Biodosimetria

I. COPPE/UFRJ II. Título (série)

A Deus,
por toda honra, poder e majestade;
Aos meus pais,
que com todo amor e carinho ajudaram a construir a minha educação;
Ao meu agora marido Junior,
que tanto amo e que sempre contribuirá na construção da minha história.

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar, agradeço a Deus por que Ele é fiel e as Suas misericórdias se renovam a cada dia em minha vida.

Ao meu orientador, professor Delson Braz, pela oportunidade e pelo incentivo à minha carreira de pesquisadora. Agradeço também pela dedicação e pela amizade.

A querida professora Regina, pela amizade, carinho e amor desde a graduação, sempre me aconselhando, me ajudando a crescer mais como pesquisadora e principalmente como pessoa. Por todo comprometimento e responsabilidade com este trabalho.

A professora Silvana Simambuco, da Universidade Federal de Campinas – UNICAMP, por todo auxílio, pela disponibilidade das instalações de seu laboratório, pela paciência durante o processo de preparação de amostras e pelo carinho.

Ao Dr. Carlos Pérez, LNLS/CNPq, pelo suporte oferecido nas medidas de fluorescência no LNLS.

A amiga Nivia, em especial, por toda a força dada durante o desenvolvimento deste trabalho. Pela dedicação e noites e noites perdidas durante a preparação e medida das infinitas amostras. Pelo valiosíssimo apoio dado em momentos difíceis e pela sua amizade. Com certeza amigos como você estarão guardados do lado esquerdo do peito.

A amiga Ana Paula, pela amizade e por toda ajuda dada durante a realização deste trabalho, principalmente na parte de apresentação.

Aos amigos, Aline, Milena, Liebert, Edson e Cristiano, pois sem o apoio deles, tudo se tornaria mais difícil.

Ao Laboratório Nacional de Luz Síncrotron, LNLS, pela oportunidade de trabalhar com equipamentos de alta tecnologia para a obtenção dos resultados essenciais a este trabalho.

Ao Centro Nacional de Pesquisas (CNPq), pelo apoio financeiro essencial no decorrer do estudo.

Resumo da Dissertação apresentada à COPPE/UFRJ como parte dos requisitos necessários para a obtenção de grau de Mestre em Ciências (M.Sc.)

ESTUDO DE AMOSTRAS DE SANGUE HUMANO E HEMOCOMPONENTES
IRRADIADOS COM BAIXA DOSE UTILIZANDO A TÉCNICA DE
FLUORESCÊNCIA DE RAIOS X POR REFLEXÃO TOTAL

Carla Lemos da Silva Mota

Fevereiro/2008

Orientador: Delson Braz

Programa: Engenharia Nuclear

A técnica de fluorescência de raios X por reflexão total usando radiação síncrotron (SR-TXRF) é uma poderosa ferramenta utilizada para a determinação das concentrações elementares presentes em amostras biológicas. O alvo deste estudo é avaliar as possíveis alterações causadas por processos de irradiação na concentração de elementos traço em amostras de sangue humano. As amostras de sangue foram coletadas no Laboratório de Análises Clínicas Dr. Eliele Figueiredo, Rio de Janeiro. As amostras (n=288) foram irradiadas com doses que variaram de 2 à 100cGy utilizando uma bomba de cobalto Theratron 780 C do INCa, Rio de Janeiro. As amostras de sangue total, plasma e matriz celular foram então, liofilizadas até a completa eliminação da água e, em seguida, passaram pelo procedimento padrão de digestão aberta. Todas as medidas foram realizadas na linha de fluorescência de raios X do Laboratório Nacional de Luz Síncrotron (LNLS), em Campinas, Brasil. Nas amostras de sangue total, os resultados mostraram uma diminuição na concentração de K, Fe ($\alpha > 95\%$) e Zn ($\alpha > 90\%$) em função da dose para todo intervalo estudado. Nas amostras de plasma, a concentração de K aumenta a partir de 4 cGy ($\alpha > 95\%$). Entretanto, verificou-se um decréscimo na concentração de Fe ($\alpha > 90\%$) para todas as doses. Para as amostras de matriz celular, foi verificado apenas um suave decréscimo na concentração de K ($\alpha > 95\%$) a partir de 20 cGy. A concentração de Ca não apresentou variação significativa em função do aumento de dose para nenhuma das amostras analisadas.

Abstract of Dissertation presented to COPPE/UFRJ as a partial fulfillment of the requirements for the degree of Master of Science (M.Sc.)

STUDY OF HUMAN BLOOD AND HEMOCOMPONENTS IRRADIATED WITH
LOW DOSE BY X-RAY TOTAL REFLECTION FLUORESCENCE

Carla Lemos da Silva Mota

February/2008

Advisor: Delson Braz

Department: Nuclear Engineering

The total-reflection X-ray fluorescence using synchrotron radiation (SR-TXRF) is a very well-suited analytical technique to study the trace element contents in biomedical samples. The aim of this study was to investigate the suitability of measuring mineral and essential trace elements as a monitoring tool for the diagnosis of alterations caused by irradiation procedures. Fresh blood specimens were obtained from Dr. Eliel Figueiredo Laboratory, Rio de Janeiro. The samples (n=288) were irradiated with doses from 2 to 100 cGy using of gamma radiation in a Theraton 780 C irradiator at the National Cancer Hospital, INCa. After irradiation process, all samples were lyophilized to remove the water content and then, they were submitted to the standard chemical digestion by adding nitric acid. All the measurements were carried out at the X-Ray Fluorescence beamline at the Brazilian Synchrotron Light Laboratory (LNLS), in Campinas. In the whole blood samples, the data show a decrease in the concentration of K, Fe ($\alpha > 95\%$) and Zn ($\alpha > 90\%$) as the dose increases over the dose range. In blood formed elements samples, there was a slight decrease of K level compared to the non-irradiated samples ($\alpha > 95\%$) up to 20 cGy. In blood plasma samples, K levels increase up to 4 cGy ($\alpha > 95\%$). However Fe levels ($\alpha > 90\%$) decrease for all dose range. The statistical analysis showed that the variation found for the Ca levels is not significant for the whole blood and hemocomponents samples. In this way, Ca levels were not found sensitive to the irradiation dose.

ÍNDICE

	página
RESUMO	vi
ABSTRACT	vii
<i>CAPÍTULO 1</i>	1
INTRODUÇÃO	1
<i>CAPITULO II</i>	13
FUNDAMENTOS TEÓRICOS	13
II.1. Biodosimetria	13
II.2. Sangue.....	15
II.2.1. Composição do sangue	16
II.2.2. Plasma sangüíneo.....	16
II.2.3. Elementos Figurados.....	17
II.2.4. Principais elementos envolvidos no processo biológico.....	19
II.2.4.1. Potássio	19
II.2.4.2. Cálcio	20
II.2.4.3. Ferro	20
II.2.4.4. Zinco	21
II.3. Espectroscopia por fluorescência de raios X	22
II.3.1. TXRF - Total Reflection XRF	24
II.3.2. Análise quantitativa	26
II.3.3. Limite de detecção	30
II.4. Radiação Síncrotron.....	31
II.5. Liofilização	33
II.6. Testes de Hipótese	35
<i>CAPITULO III</i>	36
MATERIAIS E MÉTODOS	36
III.1. Preparação das amostras	36
III.2. Instrumentação	41
<i>CAPITULO IV</i>	43

RESULTADOS E DISCUSSÃO	43
IV. Análise quantitativa por TXRF	43
IV.1. Sensibilidade do sistema	45
IV.2. Limite de detecção	48
IV.3. Validação da metodologia	50
IV.4. Análise dos resultados	52
IV.5. Testes de Hipotese	57
<i>CAPITULO V.....</i>	<i>63</i>
CONCLUSÃO.....	63
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	65

CAPÍTULO I

INTRODUÇÃO

A humanidade está constantemente sendo exposta a várias formas de radiação, cujos efeitos presentes e futuros não estão perfeitamente delineados. Sendo da mesma natureza da primária, a radiação secundária penetra na pele e pode afetar os tecidos vitais, inclusive aqueles do sistema hematopoiético.

Acidentes afetos aos raios X começaram após seu descobrimento, sendo que até 1922 haviam falecido inúmeros radiologistas devido à exposição ocupacional. Este elevado índice de óbitos se devia ao desconhecimento dos efeitos lesivos da radiação ionizante.

As radiações ionizantes desencadeiam efeitos biológicos sendo classificados em efeitos estocásticos e determinísticos que dependem da quantidade de energia, do local onde são absorvidas na célula e do tempo de exposição. Esses efeitos não são muito considerados pelos trabalhadores porque não são imediatos e algumas lesões cutâneas podem levar muitos anos até surgirem.

Os danos à exposição sistemática da radiação ionizante em doses baixas, não são totalmente conhecidos. Uma vez que não temos modelos precisos para analisar este risco, a posição mais prudente é procurar manter os níveis de exposição os mais baixos possivelmente exequíveis. Este princípio é conhecido como princípio ALARA (As Low As Reasonable Achievable). A aplicação do ALARA implica em três princípios fundamentais: distância, tempo e blindagem, no serviço que envolva exposição às radiações ionizantes.

Para que se possa mensurar o efeito negativo da radiação ionizante sobre a saúde do trabalhador há de se considerar como já foi dito, a dose e o tempo de irradiação. Elas produzem lesões agudas, crônicas e tardias no corpo das pessoas em decorrência de alguns fatores tais como: ter contato através de bombas nucleares, exposição com finalidade terapêutica ou diagnóstica, contatos acidentais com reatores, aparelhos de

radioterapia ou radiodiagnóstico e, por último, inalação ou ingestão de poeira ou alimentos que contêm partículas radioativas.

A sensibilidade dos órgãos do corpo humano está relacionada ao tipo de células que os compõem. Por exemplo, se as células formadoras do sangue são as mais sensíveis devido a sua taxa de reprodução ser rápida, os órgãos formadores do sangue são os mais sensíveis à radiação. As células musculares e nervosas são relativamente mais resistentes à radiação e, portanto, os músculos e o cérebro são menos afetados.

Segundo OKUNO (1998) e KONDO (1993) mesmo pequenas exposições poderiam aumentar a probabilidade de mutações e, conseqüentemente, a incidência de cânceres e de doenças hereditárias, em uma população exposta à radiação.

A hipótese de linearidade entre a dose e o efeito e da ausência de um limiar de dose (LNT – Linear Non Threshold) se manteve, em sua forma original, por aproximadamente uma década, quando W. Russell, do Oak Ridge National Laboratory, se propôs a testar sua validade, em ratos. Em seus resultados, notou que a observação de Timofeff, referente à linearidade do fenômeno, não se confirmava para baixas doses (RUSSEL, 1956). Segundo ele, quanto menor a taxa de dose, maior a dose necessária para a produção de um mesmo efeito. O extremo do fenômeno foi observado em fêmeas de rato, nas quais nenhum efeito genético era detectável, se as taxas de dose fossem mantidas suficientemente baixas.

Na década de 60, a Academia Nacional de Ciências dos Estados Unidos criou um comitê com a incumbência de promover o levantamento de todos os dados da literatura relativos às relações “dose-resposta”. Para seu posicionamento em relação à carcinogênese, o comitê se baseou, principalmente, em estudos envolvendo seres humanos.

Segundo o IAEA (1978), International Atomic Energy Agency, (Agência Internacional de Energia Atômica), os ataques nucleares as cidades de Hiroshima e Nagasaki proporcionaram uma oportunidade única para o entendimento dos efeitos da exposição de uma população humana a baixas e altas doses de radiação. Até então, os

estudos relativos aos efeitos genéticos da radiação se limitavam à exposição de pequenos animais a altas doses.

Os estudos realizados na população de Hiroshima e Nagasaki contribuíram para confirmar a hipótese da LNT, apesar de não terem sido identificados, nos descendentes das populações irradiadas, efeitos passíveis de serem imputados às explosões nucleares. O aumento significativo de leucemia e tumores sólidos nas populações irradiadas e a relação dose/efeito observada, mesmo para doses consideradas baixas, confirmavam a hipótese de LNT; também confirmava a indução de leucemias e de cânceres, como os principais efeitos produzidos nas populações sobreviventes (IAEA, 1978).

Novas formas de vida se desenvolveram e evoluíram na terra em um campo de radiação que era muito mais forte do que o existente hoje (CRONKITE, 1990). No entanto, a exposição experimental à radiação ionizante tem sido muito conhecida por ser associada às alterações nos tecidos hematopoiéticos e por vezes a morte (SHOUSE *et al.*, 1913, BOND *et al.*, 1965).

As contínuas mudanças na recomendação sobre limites de dose têm contribuído para a filosofia de que a radiação ionizante é prejudicial em qualquer dose (ausência de um limiar de dose). Como resultado, em geral, as pessoas acreditam que elas estão expostas a riscos mais graves de radiações do que elas realmente estão. Por exemplo, a estimativa de risco não pode ser obtida a partir de estudos epidemiológicos para doses muito baixas, como aquelas associadas a radiodiagnósticos em medicina nuclear. Doses abaixo de 200mSv são consideradas baixas doses (UNSCEAR, 1993).

Experimentos com células e animais continuam a ser o melhor caminho para construir uma relação entre baixas doses e efeitos biológicos (OVERBEEK *et al.*, 1999). No entanto, extrapolação de experimentos celulares ou de animais não é simples porque a consideração deve ser dada a uma faixa de fatores de efeitos- mudanças.

A percepção de risco, uma opinião subjetiva de risco, depende do conhecimento da natureza da radiação ionizante, seus potenciais efeitos na saúde e os mecanismos empregados para prevêê-los. Neste contexto, dosímetros físicos e biológicos são os principais instrumentos de monitoramento individual e coletivo.

Em resposta a radiação ionizante, estimativas de dose rápidas e confiáveis são cruciais para avaliações do risco de vítimas expostas durante a investigação do real ou do suspeito. O emprego de biodosimetria pode representar mais do que uma metodologia complementar para dosimetria física no monitoramento individual. O conhecimento sobre a quantidade de dose absorvida, um número em conjunto com a sua unidade, não é, certamente, suficiente para avaliar os riscos relacionados à exposição às radiações.

Além disso, a comparação entre as mudanças dos indicadores biológicos como resultados de uma irradiação com as mesmas alterações causadas por outros agentes físico-químicos, pode ser importante para uma melhor compreensão dos perigos das radiações e os riscos que lhes estão associados. Isso ajuda profissionais, bem como leigos, numa uma visão melhor das práticas radioproteção (AMARAL, 2005).

Nesse contexto e para fins de proteção contra efeito das radiações, numa atitude reconhecidamente de prudência, ficou estabelecido que qualquer dose, por menor que fosse, representava um risco para a saúde do indivíduo irradiado (ausência de um limiar de dose) e que esse risco poderia ser estimado com base nas observações realizadas para altas doses (Hipótese da Linearidade Dose-Efeito).

Nos relatórios em que algum crédito foi dado para o efeito “taxa de dose”, os questionamentos se relacionavam com a forma de introduzi-lo nas estimativas dos coeficientes de risco e na estimativa de respostas para taxas de doses extremamente baixas (JAWOROWSKI, 1995 e 1997).

Em suma, a questão da LNT, embora tenha sido tratada de forma superficial, deixa elucidado que a questão dose resposta, para o caso das baixas doses, permanece aberta, sendo seus efeitos a saúde humana de interesse mundial. Evidencia-se, portanto, a falta de respaldos experimentais técnico-científicos consistentes que permitam às autoridades pertinentes uma tomada de decisões específicas de proteção radiológica. Sendo assim, torna-se crucial o desenvolvimento de projetos de pesquisa voltados especificamente para baixas doses de radiação e de sua ligação com as questões da proteção contra possíveis efeitos danosos à saúde humana e aos seres vivos em geral.

Os recentes avanços nos estudos dos efeitos biológicos de baixas doses de IR têm apresentado três fenômenos inesperados: (1) instabilidade genética, descrito como um retardado no aparecimento de mutações e aberrações; (2) “efeitos espectadores”, descritos como efeitos radiobiológicos nas células não expostas causados por fatores transmissíveis; (3) uma hipersensibilidade de baixa dose (HRS) e aumentou radioresistência (IRR), expressa coletivamente como uma mudança na relação dose-efeito que ocorre em cerca de doses 50cGy (KAHDIM *et al.*, 2004, MOTHERSILL *et al.*, 2002, JOINER *et al.*, 2001, MARPLES *et al.*, 2004).

Embora os mecanismos intrínsecos e os efeitos da baixa dose ainda não sejam claros, existe uma grande massa de dados que mostram que a abaixo de 50 cGy certos efeitos não são quantitativamente relacionados com a dose e que fundamentalmente diferentes processos estão envolvidos nas respostas celulares à radiação ionizante (NASONOVA *et al.*, 2006).

CENGIZ *et al.* (2007) mostraram que a resposta de fase aguda das proteínas também aumenta depois da radiação. Maior campo de radiação e dose mais elevada levam a um aumento ainda maior da fase aguda das proteínas. Ao considerar todos os dados em conjunto, hipotetisaram que a irradiação de corpo inteiro (TBI) muda a concentração dos elementos traço do sangue (CENGIZ *et al.*, 2003), induz a rápida resposta de fase aguda das proteínas (CENGIZ *et al.*, 2001), e provavelmente de muitas outras proteínas inflamatórias e citocinas (NETA, 1997, RUIFROK *et al.*, 1999 e TRAVIS, 2001) no sangue.

A mudança na concentração do sangue pode sensibilizar os órgãos à radiação. Acredita-se que a disfunção orgânica após TBI é devido aos danos causados às células parenquimais e a vasos sanguíneos dentro do próprio sangue. Estão atualmente a estudando mudanças na concentração do sangue da resposta da fase aguda das proteínas e as mudanças hemodinâmicas no sangue após TBI.

JANATPOUR *et al.* (2005) descrevem que frequentemente irradia-se sangue e seus hemocomponentes com radiação gama, mas alguns centros utilizam raios X como forma alternativa de irradiação de sangue. No entanto, os efeitos bioquímicos dos raios X nas células vermelhas (eritrócitos) não são bem caracterizados. É sabido que ocorrem

mudanças na membrana dos eritrócitos, porém essas diferenças não chegam a comprometer o resultado clínico.

De fato, considerando a radiosensibilidade dos linfócitos *in vitro* e *in vivo* como sendo iguais, a relação dose-efeito obtida após irradiação *in vitro* de sangue pode ser utilizada para estimar os efeitos de uma irradiação *in vivo* (IAEA, 2001). Segundo HOSSEINIMEHR *et al.* (2006) a exposição a IR danifica diretamente as células hematopoiéticas e altera a capacidade da medula óssea de suportar e/ou manter a hematopoiese *in vivo* e *in vitro*.

Por esta razão, o presente trabalho visa estudar as prováveis mudanças decorrentes da irradiação a baixas doses de amostras de sangue liofilizado e hemocomponentes utilizando-se a técnica de fluorescência de raios X por reflexão total (TXRF), uma vez que o processo de irradiação pode ser responsável por alterações na fisiologia do sangue. Essa técnica de liofilização, também conhecida como desidratação a frio, é um eficiente processo de secagem de amostras biológicas que preserva células, enzimas, vacinas, vírus, soros, derivados sangüíneos etc.

A importância da compreensão de elementos traço na fisiologia humana levou, ao longo dos últimos anos, a uma maior necessidade de rapidez e métodos precisos analíticos para a análise de fluidos biológicos. A análise dos dados obtidos a partir desses estudos fornece informações valiosas em campos da medicina, farmácia e controle ambiental. Para este objetivo, diferentes técnicas analíticas têm sido envolvidas.

A espectrometria de raios X evoluiu bastante, estima-se hoje, uma média superior a mil publicações anuais. É uma das técnicas mais difundidas e utilizadas em todo o mundo desenvolvido.

A primeira evidência da aplicação de raios X para análise elementar foi descrita por BARCKLA (1911) no começo deste século, a partir da observação dos espectros característicos de raios X. Entretanto, foi MOSELEY (1912) quem estabeleceu, pela primeira vez, uma relação entre a frequência e o número atômico de cada elemento estudado.

A Fluorescência de Raios X (XRF) foi, efetivamente, introduzida como técnica de análise elementar na década de 50, quando os primeiros equipamentos de XRF tornaram-se disponíveis comercialmente. Estes equipamentos utilizavam um sistema de Fluorescência de Raios X por Dispersão de Comprimento de Onda (WDXRF). Nestes sistemas, os raios X característicos são selecionados, por um cristal difrator, de acordo com seus comprimentos de ondas, obedecendo a Lei de Bragg da difração por LACHANCE *et al.* (1995).

O rápido desenvolvimento dos detectores semicondutores contribuiu para aumentar e diversificar as aplicações com os sistemas de Fluorescência de Raios X por Dispersão de Energia (EDXRF). GIAUQUE *et al.* (1973) descreveram um sistema de EDXRF usando detectores semicondutores de Si-Li com alta sensibilidade. Usaram como fonte de excitação de fluorescência, um tubo de raios com ânodo de Mo e padrões finos, com um único elemento, para calibrar o sistema. Com este sistema conseguiram medir, simultaneamente, 17 elementos a níveis de traços em amostras biológicas e geológicas.

CELIS (1996) descreveu um sistema de XRF de baixo custo e rápido para análises não destrutivas de minérios de ouro. O sistema utilizava uma fonte de Co-57 para excitar os raios X característicos do ouro (linhas K) e não apresentava interferências de outros elementos presentes na matriz. A absorção da radiação na amostra foi pequena e as concentrações medidas foram da ordem de 1 ppm.

Uma variante da EDXRF, denominada de Reflexão Total (TXRF), vem sendo utilizada principalmente na análise de elementos traço (na faixa de ng.g^{-1}) em amostras líquidas (da ordem de μL) e em amostras sólidas (μg) precedidas por digestão química (MISTRA *et al.*, 2002), em pesquisas relacionadas ao Monitoramento Ambiental, Oceanografia, Biologia, Medicina, Indústria, Mineralogia, etc (NASCIMENTO, 1999).

A TXRF é uma técnica relativamente nova que deu provas de ser hoje uma poderosa ferramenta para a análise de todos os tipos de amostras. Seus princípios, como vasta aplicabilidade e capacidade de detecção com relação às outras técnicas, têm sido extensamente revisados por diversos autores.

As bem conhecidas propriedades intrínsecas do método oferecem diversas vantagens, tais como: eficiente excitação da amostra tanto pelo feixe primário pelo feixe refletido; baixíssima radiação de fundo; detecção simultânea de praticamente todos os elementos; a simples ou não preparação de amostra; e, além disso, o volume amostras necessário é de alguns microlitros. Até agora a TXRF tem sido aplicada com sucesso para a determinação dos elementos traço em diferentes ramos de biologia.

A amostra a ser analisa através da TXRF pode ser considerada um filme fino, uma vez que esta técnica necessita de diminutas quantidades de amostra para a análise. Dessa forma, os efeitos de absorção e os efeitos de matriz observados na EDXRF podem ser desprezados, tornando-a uma técnica bastante competitiva.

Em análises por TXRF, um pequeno volume (tipicamente 20 µl) de amostras líquidas é sempre seco, como um filme fino, depositado num refletor de quartzo, depois é irradiado com raios X de alta energia produzindo assim espectros de fluorescência (PRANGE, 1989).

YAP *et al.* (1989) usaram TXRF para a análise de amostras finas de areia mineral. O método foi testado com amostras certificadas de rochas (JB-3J). Mostraram que o método possui algumas vantagens: foi multielementar, a preparação das amostras foi simples, a contribuição da radiação espalhada foi baixa e foram necessárias pequenas quantidades das amostras (2µl) para a análise.

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

Além disso, na TXRF, a determinação da concentração elementar é realizada através do método da adição do padrão interno, corrigindo as instabilidades do sistema, como flutuações no gerador de raios X, emissão de raios X pelo anodo, detecção dos

raios X, e erros operacionais, como a posição do filme formado no refletor, posicionamento das amostras, dentre outros fatores (KLOCKENKÄMPER *et al.*, 1992).

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

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

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

Análises diretas por si só, ou combinadas com os procedimentos de preparação, é uma alternativa adequada para a determinação quantitativa dos elementos de traços por TXRF em amostras clínicas como soro (GREAVES *et al.*, 2000), o sangue total (AYALA *et al.*, 1991), cérebro humano (MARCÓ *et al.*, 1999), fluido amniótico (GREAVES *et al.*, 1995) e tecidos liofilizados (MARCÓ *et al.*, 2001).

AYALA *et al.* (1991) constataram a determinação direta dos níveis de elementos traço no sangue usando TXRF propondo o desenvolvimento de uma nova técnica de preparação de amostras. Foram identificados os seguintes elementos: K, Ca, Ti, Cr, Fe, Ni, Cu, Zn, Pb, Rb e Sr.

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

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

Atualmente uma das técnicas mais utilizadas para análise de fluorescência de raios X é através da associação com luz Síncrotron. A construção de Laboratórios de Luz Síncrotron em todo mundo possibilitou uma grande variedade de aplicações em diferentes campos, tais como: ciências dos materiais, cristalografia, micro-espectroscopia, difração de raios X, fluorescência de raios X e muitos outros. A luz Síncrotron possui um alto grau de polarização do feixe e uma alta energia para detecção, isso permite a determinação de elementos traços em diferentes amostras em ciências ambientais, biológicas e materiais (MELO JUNIOR, 2007).

Diversos trabalhos (BORGES, 2007; CANELLAS, 2006; CARVALHO, 2007; SERPA, 2006; YUYING, 2001) destacam a grande variedade de aplicações do uso de Fluorescência de Raios X por Reflexão Total usando uma fonte de Radiação Síncrotron (SR-TXRF) no campo da medicina, uma vez que o conhecimento da concentração de elementos traços em tecidos é de grande importância, já que esses elementos estão envolvidos em muitas funções biológicas.

PRINS *et al.* (1984) e também JAKLEVIC *et al.* (1990) apresentaram um sistema de fluorescência de raios X utilizando como fonte de excitação a radiação Síncrotron (SRXRF). Discutiram a análise de traços em vários tipos de amostras e, em particular, as vantagens e limitações, relacionadas com as propriedades específicas da radiação Síncrotron como também, a influência do múltiplo espalhamento inelástico e o espalhamento Raman. Foi realizada uma detalhada comparação entre os vários modos de excitação de fluorescência de raios X para análise de elementos a níveis de traço.

HOMMA *et al.* (1995) investigaram as distribuições dos elementos Cu, Se e Zn a níveis de traços, em rins humanos, através de imagens obtidas usando-se fluorescência de raios X com fonte de radiação Síncrotron. As imagens revelaram que os elementos Cu, Se e Zn, em adultos, estavam mais concentrados no córtex renal do que na medula. Resultados similares foram obtidos com recém-nascidos. As análises das amostras com SRXRF confirmaram que estes elementos se distribuem, preferencialmente, no córtex. A técnica é apresentada como uma ferramenta poderosa e auxiliar nos estudos de amostras biológicas, principalmente, em histoquímica.

Este trabalho foi dividido da seguinte forma:

1ª *Etapa*:

O crescente uso de fontes de radiação no campo industrial e médico acarreta na exposição de pessoas a campos de radiação cuja intensidade dependerá não só das características da fonte, mas também da função exercida.

A importância de programas de proteção radiológica cresceu como consequência desse aumento das aplicações das radiações ionizantes e do interesse nos riscos associados à sua utilização. Assim como DANAIK (2002), que ao contrário de outros relatórios (onde a baixa dose deve ser ≤ 1 rad), considerou a exposição às radiações dividida em: baixa dose (≤ 1 Gy) e alta dose (> 1 Gy), em nosso trabalho foram usadas amostras de sangue irradiadas *in vitro* em intervalos de dose chamados: baixas doses (2 a 100 cGy).

As amostras de sangue foram doadas pelo Laboratório de Análises Clínicas Dr. Eliel de Figueiredo no Rio de Janeiro. Estas amostras foram irradiadas no serviço de cobaltoterapia do Instituto Nacional do Câncer (INCA/RJ) como será apresentado no Capítulo II.

2ª Etapa:

As amostras foram preparadas conforme será mostrado no Capítulo III e avaliadas pela técnica de SR-TXRF. Optou-se por essa técnica uma vez que a fonte de excitação, a Radiação Síncrotron (SR), oferece características peculiares em detrimento às fontes convencionais de raios X, tornando-a um modo ideal de excitação para a fluorescência de raios X (CHEVALLIER, 1996).

No capítulo seguinte será apresentada a teoria envolvida neste trabalho. No capítulo III, toda a metodologia experimental e os materiais utilizados serão introduzidos. Os resultados obtidos se encontram no capítulo IV e no capítulo V, baseando-se nesses resultados, haverá a conclusão deste presente estudo.

CAPÍTULO II

FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

II.1 – Biodosimetria

A exposição de corpo inteiro a doses de radiação causa danos ao sistema hematopoético que se refletirá nas células sanguíneas periféricas e plaquetas. Essa redução nas células sanguíneas circulantes pode causar septicemia, hemorragia, anemia e morte (HOSSEINIMEHR *et al*, 2006).

Atualmente, é consenso que o conhecimento sobre os complexos processos bioquímicos e biofísicos causados pela radiação a nível celular e molecular, bem como o desenvolvimento de tecnologia para o uso seguro da radiação ionizante precisam ser incrementados (AMARAL, 2005). A dosimetria biológica (biodosimetria) é baseada na investigação de efeitos biológicos radioinduzidos (bioindicadores) de modo a correlacioná-los com a dose da radiação (SILVA-BARBOSA *et al*, 2005).

As características da radiação ionizante que podem predizer uma resposta biológica incluem sua qualidade (por exemplo, o I-131 é seletivamente concentrado na glândula tireóide enquanto que o Sr-90 é seletivamente depositado no osso), meia-vida, taxa de dose e dose. Dose absorvida é a quantidade física mais importante para avaliar o potencial resposta biológica no tecido hematológico (e qualquer outro tecido do corpo) como resultado da exposição à radiação ionizante (SILVA-BARBOSA *et al*, 2005; DANIYAK, 2002).

Dose absorvida é uma quantidade não-estocástica aplicável tanto para radiações diretamente ionizantes quanto para as indiretamente ionizantes. Para radiações indiretamente ionizantes, a energia é depositada na matéria através de um processo de duas etapas. Na primeira etapa (resultando no *kerma*), a radiação indiretamente ionizante transfere energia como energia cinética para partículas carregadas secundárias. Na segunda etapa, essas partículas carregadas transferem parte da sua energia para o

meio (resultando na dose absorvida) e perdem parte de sua energia na forma de perdas por freanamento (*bremssstrahlung*) (PODGORSAK, 2005).

A dose absorvida é definida como a energia média $\bar{\varepsilon}$ depositada pela radiação ionizante na matéria de massa m em um volume finito V :

$$D = \frac{d\bar{\varepsilon}}{dm} \quad (\text{II.1})$$

A energia depositada $\bar{\varepsilon}$ é a soma de toda energia incidente no volume de interesse menos toda energia que deixa o volume, levando-se em conta qualquer conversão massa-energia dentro do volume.

A unidade usada para dose de radiação tem mudado apreciavelmente em anos recentes. Primeiramente, o *rad* foi considerado a unidade padrão de dose absorvida e o *rem* a unidade de equivalente dose. Esses termos foram mudados recentemente. No Sistema Internacional (SI), a unidade de dose absorvida é Joule/kg ou *Gray (Gy)*, que é igual a 100 rad, e a unidade de equivalente dose é *Sievert (Sv)*, que é igual a 100 rem (FINCH, 2007).

A radiação pode interagir com moléculas biologicamente importantes em tecidos do corpo, em particular DNA (ação direta), ou com a água que, após sua excitação ou ionização, transforma-se em espécies químicas altamente reativas (radicais livres) que danificam moléculas biológicas (ação indireta). A sensibilidade das células à irradiação é determinada por quatro processos físicos biológicos (conhecidos como os 4 Rs): Reparo, Repopulação, Redistribuição e Reoxigenação. A importância e efetividade relativa desses processos podem ser significativamente diferentes para tecidos diferentes (HALL, 2000).

A exposição à radiação ionizante danifica diretamente as células hematopoiéticas e altera a capacidade da medula óssea estromal suportar e/ou manter a hematopoiese *in vivo* e *in vitro*. A exposição à radiação ionizante provoca a dependência com a dose, diminuindo a circulação de células hematopoiéticas devido à redução da produção das células pela medula óssea e também devido redistribuição e a apoptose

dos elementos constituintes das células sangüíneas (MAUCH *et al.*, 1995 e DAINIAK, 2002). A exposição de animais a raios gama resultou em doenças radioinduzidas e até na morte (HOSSEINIMEHR *et al.*, 2006).

II.2. Sangue

O sistema circulatório constitui-se de três componentes inter-relacionados: o sangue, o coração e os vasos sangüíneos. Funcionalmente, o sistema circulatório transporta substâncias para as células do corpo e outras delas provenientes. A fim de desempenhar as suas funções, o sangue deve circular por todo o corpo. O coração serve como uma bomba para a circulação e os vasos sangüíneos transportam o sangue do coração às células do corpo e destas de volta ao coração e aos pulmões.

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

O sangue, o único tecido conjuntivo líquido, tem três funções gerais: transporte, regulação e proteção. Ele é um fluido mais denso e mais viscoso do que a água e constitui cerca de 8% do peso corporal.

II.2.1. Composição do sangue

O sangue total é composto de duas porções: o plasma sangüíneo e os elementos figurados (figura 2.1).

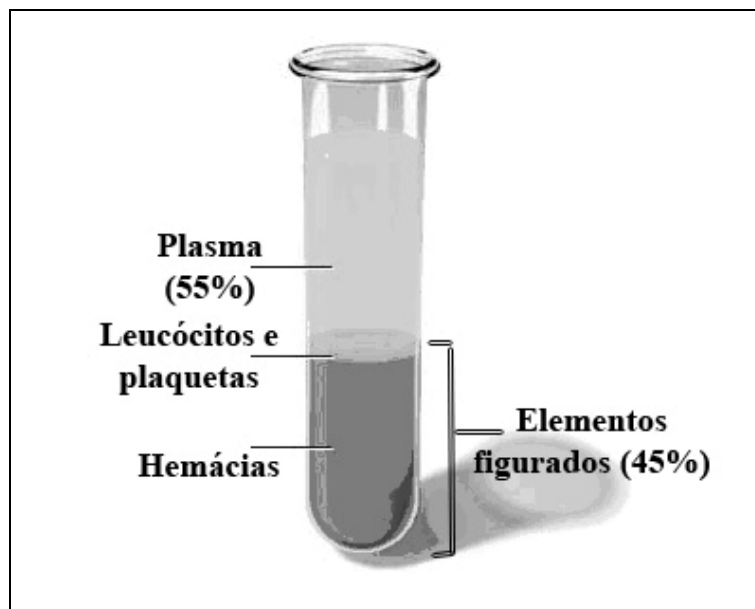


Figura 2.1 – Composição do sangue total

II.2.2. Plasma sangüíneo

Quando os elementos figurados são removidos do sangue, o que resta é um líquido amarelado, chamado plasma. Ele corresponde a 55% do volume de sangue de um adulto normal (~60Kg). O plasma consiste em 91,5% de água, 7% de proteínas e 1,5% de solutos não-protéicos. Os 9% restantes correspondem a proteínas (7%) e outros elementos, tais como: Potássio, Sódio, Cloro, Cálcio e Ferro, Magnésio, Br, que embora em pequenas quantidades (2%), são de grande importância, pois variações em sua concentração estão diretamente relacionadas a disfunções no organismo. Para cada um desses elementos tem-se associado seu valor de referência (normalidade). Como exemplo, temos a falta de ferro (concentração de ferro abaixo de seu valor de referência) que caracteriza anemia (ZAMBONI *et al.*, 2005).

Sua função é transportar água e nutrientes para todos os tecidos do organismo. O plasma também contém sais minerais, proteínas relacionadas com a coagulação do sangue (fatores da coagulação) e com a defesa contra infecções (imunoglobulinas), hormônios, enzimas e as células do sangue.

O plasma é o líquido que fica sobre a camada de células resultante da centrifugação do sangue total quando coletado em tubos contendo anticoagulante. Neste trabalho o anticoagulante utilizado foi o EDTA (EthyleneDiamineTetrAcetic acid - ácido etilenodiamino tetra-acético). Este é o anticoagulante largamente empregado em hematologia e oferece as vantagens de ser de preço acessível e de provocar menos danos à morfologia eritrocitária e leucocitária.

O EDTA é um composto orgânico que age como ligante polidentado, formando complexos muito estáveis com diversos íons metálicos. Devido a isso, é usado como preservante do sangue, pois inativa os íons de cálcio, que promovem a coagulação sanguínea. Esta habilidade de complexar e assim inativar íons metálicos é também usada como antídoto para envenenamento por chumbo. Sua fórmula molecular e sua massa molecular são respectivamente: $C_{10}H_{16}N_2O_8$ e 292,25 g/mol (CARVALHO *et al.*, 1993).

O soro, por sua vez, é obtido a partir da centrifugação do sangue em tubos que não contêm anticoagulantes. Por definição, ele é destituído do fator de coagulação, mas é enriquecido com componentes celulares das plaquetas e produtos metabólicos. Basicamente, a diferença entre plasma e soro reside no fato de que o primeiro contém, além das proteínas do soro, fibrinogênio, fibrina e fatores de coagulação (LEITÃO, 2005).

II.2.3. Elementos Figurados

Os elementos figurados são constituídos por células e fragmentos celulares, como os eritrócitos ou hemácias (glóbulos vermelhos), os leucócitos (glóbulos brancos) e as plaquetas (figura 2.2). As células constituem de 30 a 45% do volume do sangue. A fração de células no sangue é denominada hematócrito.

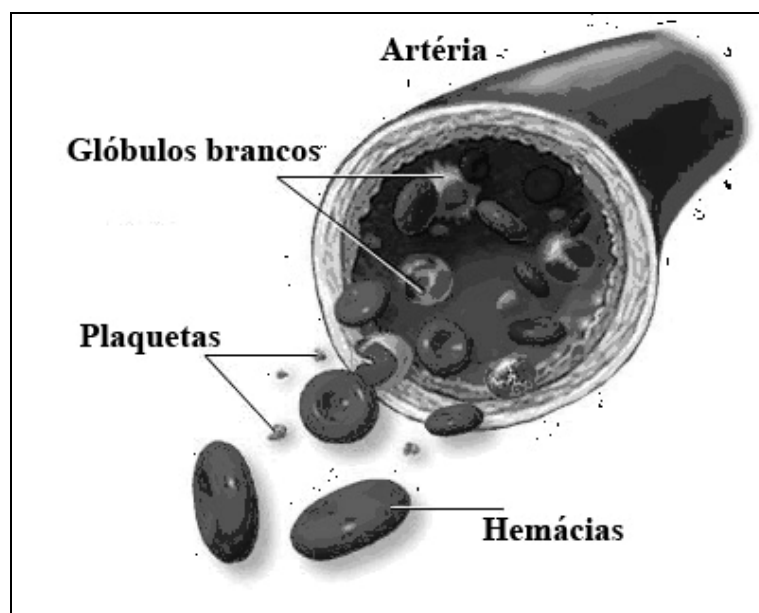


Figura 2.2 – Constituintes dos elementos figurados

As células do sangue são produzidas na medula dos ossos, especialmente nos ossos chatos como vértebras, costelas e esterno. Essas células são essenciais para a vida, pois são responsáveis pelo transporte do oxigênio aos tecidos, pelo controle das infecções do organismo e por ajudar no controle de sangramento:

- **Hemácias:** São as células que existem em maior quantidade no sangue, cerca de 4,5 milhões na mulher e 5 a 5,5 milhões nos homens por milímetro cúbico de sangue. São anucleadas e possuem a forma de um disco bicôncavo. Contém no seu interior uma proteína chamada hemoglobina a qual é responsável pelo transporte do oxigênio do pulmão a todas as partes do organismo e do gás carbônico dos tecidos para os pulmões.
- **Glóbulos brancos:** Distinguem-se em cinco variedades chamadas neutrófilos, eosinófilos, basófilos, linfócitos e monócitos. O sangue possui um número menor de glóbulos brancos do que vermelhos (de 6000 a 8000 leucócitos em cada mililitro de sangue). São os leucócitos as células de defesa do nosso organismo contra infecções. Eles possuem a capacidade de migrar do sangue para os tecidos e combater microorganismos que invadem o corpo. A diminuição do número de

leucócitos ou a alteração da sua função deixa o organismo suscetível a múltiplas infecções.

- **Plaquetas:** São discos arredondados, sendo que no sangue circulante existem cerca de 250.000 plaquetas por ml. Consistem em pequenos fragmentos celulares presentes no sangue que contribuem para a parada do sangramento após um ferimento. Pacientes com diminuição do número de plaquetas ou que possuem plaquetas com função prejudicada têm risco aumentado de hemorragia.

II.2.4. Principais elementos envolvidos no processo biológico

II.2.4.1. Potássio

O potássio regula o balanço dos fluidos corpóreos, atua em contrações musculares e impulsos nervosos. Vários mecanismos atuam em conjunto para manter o equilíbrio hídrico do organismo. Por exemplo, quando o nível de sódio do organismo é baixo, os rins aproveitam as substâncias químicas da urina, devolvendo-as para a circulação. Alguns indivíduos, entretanto, possuem uma tendência genética a reter mais sódio que necessário. Dessa forma, o organismo também precisa de mais líquido para equilibrar a concentração de sódio no sangue. Portanto, os rins retiram menos líquidos do organismo e, conseqüentemente, há uma diminuição na excreção de urina. Dessa forma, o coração é forçado a bombear com mais força para manter um volume maior de líquido em circulação, aumentando, assim, a pressão arterial.

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

A hipopotassemia pode ser originada por: aporte inadequado, perda urinária excessiva, perda extra-renal excessiva (gastrointestinal, sudorese profusa) e desvio do potássio para o compartimento intracelular. Os fatores que alteram a distribuição interna do potássio, produzindo o seu desvio para o intracelular, são: infusão de glicose

(formação de glicogênio), insulina, infusão de alcalinos, mineralocorticóides, glicocorticóides, envenenamento por bário e paralisia familiar periódica hipopotassêmica. Nestas condições encontramos o potássio sérico baixo e o potássio total do corpo normal.

II.2.4.2. Cálcio

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

O cálcio é um elemento essencial, que é um regulador crucial de muitos processos fisiológicos em cada célula viva, incluindo os espermatozóides. Íon de cálcio (Ca^{+2}) é o desencadeamento da reação acrossômica em espermatozóides mamíferos, e existe um forte indício de que o íon de cálcio é diferentemente envolvido na motilidade espermática, dependendo do estágio de maturação esperma (HONG *et al.*, 1984, YANAGIMACHI *et al.*, 1974, PRIEN *et al.*, 1990, MORTON *et al.*, 1978). Tem sido demonstrado que a próstata, vesículas seminais e epidídimo também são muito ricos em cálcio, que é a razão pela qual vários estudos têm investigado a associação entre o cálcio e a subfertilidade masculina (WONG, 2001).

A distribuição do cálcio no plasma pode ser modificada de acordo com a concentração de albumina, anomalias protéicas e distúrbios do equilíbrio ácido-básico. Nas hiperproteinemias, o cálcio total está alto, porém, o ionizado está normal, por exemplo, mieloma múltiplo, insuficiência adrenal (hemoconcentração).

II.2.4.3. Ferro

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

II.2.4.4. Zinco

O zinco é o segundo elemento de transição mais abundante no organismo (TAKEDA, 2000). Para os nutricionistas, é um micronutriente essencial, para os bioquímicos, é um componente enzimático e de outras proteínas, enquanto que para os ambientalistas e biólogos marinhos, o zinco livre na água é um tóxico poluente. Assim como o cálcio, o zinco livre em excesso nos tecidos é tóxico (FREDERICKSON *et al.*, 2005).

Ele desempenha um papel importante como um elemento traço essencial em diversas funções biológicas. Dentre as mais relevantes descobertas, podemos destacar o papel do zinco como sendo um componente catalisador de mais de 200 enzimas e um constituinte estrutural de várias proteínas, além de sua função na prevenção da formação dos radicais livres. Além disso, ele é um componente nutricional crucial necessário para o desenvolvimento normal e na manutenção de funções imunológicas em humanos e animais (MOCCHEGIANI *et al.*, 1998).

Existem muitas fontes de contaminação de Zn, dentre elas incluem-se anticoagulantes, como a heparina, citrato, oxalato, EDTA (este usado em nosso trabalho) (VENKATESH *et al.*, 1998).

II.3. Espectroscopia por fluorescência de raios X

A análise multielementar instrumental por fluorescência de raios X (XRF) é baseada na medida das intensidades dos raios X característicos emitidos pelos elementos químicos componentes da amostra, quando devidamente excitada. Até 1966 a XRF era realizada unicamente por espectrômetros por dispersão por comprimento de onda (WD-XRF, abreviação de *wave-length dispersive X-ray fluorescence*), baseados na lei de Bragg, os quais necessitam de um movimento sincronizado e preciso entre o cristal difrator e o detector (JENKIN *et al.*, 1981).

A XRF é um método de análise para determinação quantitativa e qualitativa da concentração de elementos em uma ampla variedade de tipos de amostras. A emissão característica é resultante da excitação dos elementos da amostra por uma fonte de raios-X (tubo, fonte síncrotron, entre outras).

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

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

A fluorescência emitida por elementos presentes na amostra incide em um detector com eletrônica associada que resolve a energia dos fótons incidentes com precisão suficiente para fornecer uma distribuição espectral de intensidades versus energia. Analisadores multicanal computadorizados são utilizados para adquirir, mostrar o espectro e realizar a análise dos dados. Este método é geralmente aplicado para determinação de elementos com número atômico igual ou maior a 11 (Na).

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

Amostras sólidas finas são ideais para análise, mas amostras grossas e líquidas também podem ser analisadas sem problemas. Os limites de detecção em materiais sólidos são tipicamente algumas partes por milhão, mas a obtenção destes resultados depende de alguns fatores como o elemento sobre análise e a composição da matriz de átomos. As aplicações deste método incluem: análises químicas de elementos traços em ciências ambientais, biológicas e materiais, perfil de profundidade química em filmes finos e mapeamento químico.

Em um experimento de XRF, a amostra é excitada por um feixe primário de raios X, elementos presentes nesta amostra absorvem os fótons de raios X, decaem e emitem fluorescência característica. A fluorescência emitida pela amostra (feixe secundário) é detectada e “classificada” de acordo com sua energia. O sistema de aquisição de dados transforma os pulsos elétricos provenientes da etapa de detecção em um espectro de fluorescência (comprimento de onda vs. Intensidade). A partir do espectro de fluorescência são obtidas informações sobre concentrações de elementos na amostra, presença ou não de determinado elemento, perfis de profundidade de filmes finos, mapeamento químico (análise localizada da concentração de elementos na amostra) e várias outras informações.

Existem várias formas de realização de um experimento de XRF, cada qual tenta otimizar uma medida, minimizar efeitos indesejados, realizar análise localizada, etc. Dentre essas formas de XRF, citam-se: a convencional, a XRF por reflexão total (TXRF) e a XRF com microfeixe (μ -XRF).

II.3.1. TXRF - Fluorescência de Raios X por Reflexão Total

Uma variante da EDXRF, denominada de Reflexão Total (TXRF), vem sendo bastante desenvolvida nos últimos anos e tem sido aplicada principalmente na análise de elementos traço (na faixa de ppb) em amostras líquidas (da ordem de microlitros). A TXRF como o próprio nome sugere é baseada no fenômeno físico da reflexão total. A excitação da amostra é efetuada pela incidência de um feixe sob um ângulo de aproximadamente 1 mrad, para o caso do refletor ser o lucite. Esse ângulo é denominado por ângulo crítico do material refletor (KLOCKEMKÄMPER *et al.*, 1996).

O efeito da reflexão total é aplicado para minimizar a intensidade da radiação de fundo e intensificar o sinal de fluorescência. A radiação de fundo baixa resulta, principalmente, da menor profundidade de penetração com ângulos inferiores ao ângulo crítico de reflexão total (KLOCKEMKÄMPER *et al.*, 1996). Além disso, outra característica marcante da TXRF é a distância pequena entre a amostra e o detector, de apenas alguns milímetros, resultando em um ângulo grande, obtendo dessa forma, a detecção eficiente do sinal de fluorescência proveniente da amostra.

Podemos destacar então, que a principal diferença entre a EDXRF e a TXRF consiste na geometria de excitação utilizada. Na EDXRF a radiação é espalhada na amostra, resultando em um aumento do contínuo no espectro da radiação característica detectada. Na TXRF, por utilizar-se um feixe rasante, não há espalhamento na amostra, reduzindo assim a radiação de fundo, e, conseqüentemente melhorando os limites de detecção (MISTRA *et al.*, 2002).

A técnica de TXRF foi desenvolvida principalmente para amostras líquidas, sendo possível também analisar amostras sólidas, desde que estas sejam precedidas por digestão química em meio ácido. Outra característica importante na TXRF é a espessura da amostra ($< 10 \mu\text{l}$ de amostras líquidas e evaporados ou $< 10 \mu\text{g}$ de amostras sólidas). Ela é considerada como um filme fino, o que permite desprezar os efeitos da absorção e reforço da radiação (presentes na XRF), simplificando, dessa forma, o cálculo da concentração elementar.

Os raios X excitam átomos da superfície da amostra e a fluorescência é detectada por detectores de estado sólido posicionados sob a amostra. Esta técnica é sensível a quantidades muito pequenas de material (poucas partes em 10^9), mas requer amostras muito planas. A fonte de raios X pode ser um tubo convencional ou uma fonte de luz Síncrotron.

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

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

- Atuar como um refletivo,
- Ser um suporte para a amostra.

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

Os suportes para as amostras são discos com diâmetro de 30 mm e espessura de 2 ou 3 mm, mas suportes retangulares também são disponíveis (inclusive foram utilizados como porta-amostras nesse estudo). Muitos materiais são utilizados como suportes, especialmente o vidro de quartzo (Suprasil) e lucite 10 (Perspex) (SCHMITT *et al.*, 1987).

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

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

A técnica de TXRF apresenta muitas vantagens, podendo-se destacar entre elas, o fato de possuir excelentes níveis de detecção e ser capaz de detectar a maioria dos elementos da tabela periódica.

II.3.2. Análise quantitativa

Determinações quantitativas usando XRF vão desde a simples utilização de curvas intensidade-vs-concentração padrão até sofisticados programas que convertem intensidade para concentração. Linhas de emissão que não possuem sobreposição podem ser medidas com programas que realizam integração. Estas rotinas retornam a intensidade de pico acima de uma determinada radiação de fundo (background) para o pico de interesse. Elas trabalham bem, exceto quando a relação sinal-ruído é baixa.

Casos onde ocorre a sobreposição de picos requerem rotinas de filtro do espectro. A resolução de detectores modernos de Si(Li) não é adequada para separação de linhas K_{β} de um elemento químico de número atômico Z de outro com número atômico $Z+1$. Portanto amostras como ligas, solos e vegetais possuem um espectro com intensa sobreposição.

A partir do uso de filmes finos para análise, o efeito matriz, que normalmente traz problemas na fluorescência de raios X convencional, não ocorre na TXRF (BOUMANS; KLOCKENKÄMPER, 1989). Utilizar a técnica do filme fino permite um tratamento matemático simples para a análise quantitativa, quando é adicionado um padrão interno.

A função do padrão interno é eliminar o efeito de geometria porque o filme fino formado sobre o suporte não possui geometria regular. Desta forma, a contagem obtida na irradiação da amostra depende da posição em que esta for colocada no suporte. Com a adição do padrão interno, o resultado obtido será sempre em relação a este padrão, não importando a posição da amostra (LADISICH *et al.*, 1994; KLOCKENKÄMPER e VON BOHLEN, 1996). Normalmente tem-se utilizado os elementos Ge, Ga, Co e Y como padrão interno.

Devido à diminuta espessura da amostra (amostra ultrafina) e a alta energia dos raios X normalmente utilizados na excitação, o efeito matriz na TXRF é o menor possível, e conseqüentemente, a sua correção não é necessária. Desse modo, a equação básica para análise quantitativa é a relação entre a intensidade fluorescente da linha característica K e a concentração de um elemento de interesse, pode ser obtida conforme a equação II.2

$$I_i = S_i \cdot C_i \quad (\text{II.2})$$

onde:

I_i – intensidade líquida de raios X da linha característica K ou L do elemento i de interesse (cps = contagens por segundo);

S_i – sensibilidade elementar do sistema (cps.mL/ μ g);

C_i – concentração na solução pipetada no suporte (μ g/ml).

Assim, esta técnica apresenta a grande vantagem de permitir a determinação simultânea da sensibilidade elementar para vários elementos, utilizando-se uma solução padrão multielementar, contendo esses elementos em baixa concentração (na faixa de ppm) e emissores de raios X de energia não muito próxima, evitando a ocorrência de sobreposição de picos.

Utilizando a equação II.3, podemos fazer a razão entre a intensidade do elemento *i* e o padrão interno *Ga* utilizado neste trabalho:

$$\frac{I_i}{I_{Ga}} = \frac{S_i \cdot C_i}{S_{Ga} \cdot C_{Ga}} \quad (\text{II.3})$$

$$\frac{I_i}{I_{Ga}} \cdot C_{Ga} = \frac{S_i}{S_{Ga}} \cdot C_i \quad (\text{II.4})$$

Fazendo:

$$R_i = \frac{I_i}{I_{Ga}} \cdot C_{Ga} \quad (\text{II.5})$$

e

$$S_{Ri} = \frac{S_i}{S_{Ga}} \quad (\text{II.6})$$

Então

$$R_i = S_{Ri} \cdot C_i \quad (\text{II.7})$$

Construindo-se um gráfico de $R_i \times C_i$, o coeficiente angular (S_i) da reta representará a sensibilidade relativa do elemento *i*. Com isto, pode-se calcular a concentração do elemento de interesse, utilizando a equação II.8, apresentada a seguir:

$$C_i = \frac{I_i}{I_{Ga}} \cdot \frac{C_{Ga}}{S_{Ri}} \quad (\text{II.8})$$

onde:

I_{Ga} – intensidade do padrão interno na amostra (cps);

I_i – intensidade do elemento i na amostra (cps);

S_{Ga} – sensibilidade do detector para o padrão interno (cps.mL/ μ g);

S_i – sensibilidade do detector para o elemento i (cps.mL/ μ g);

C_{Ga} – concentração do padrão interno na amostra (μ g/ml);

C_i – concentração do elemento i de interesse (μ g/ml);

S_{Ri} – sensibilidade relativa para o elemento i ;

R_i – contagem relativa.

Vale a pena ressaltar que existe uma alta correlação matemática entre a sensibilidade elementar e o número atômico dos elementos. Assim, com base nas sensibilidades elementares dos elementos contidos na solução padrão multielementar, pode-se estimar a sensibilidade para um elemento detectado na amostra padrão multielementar, a seguir definir uma sensibilidade para um elemento detectado na amostra não contido na solução padrão e conseqüentemente estimar a sua concentração na amostra de interesse. De maneira análoga, as mesmas equações podem ser utilizadas para a linha K_β e outras, como L e M, onde logicamente as sensibilidades elementares terão outros valores (KREGSMER, 1991).

A técnica de TXRF tem sido aplicada na análise de diferentes substâncias como água, sangue, ar, tecido vegetal e animal entre outros, podendo ser aplicado em materiais sólidos como solos, sedimentos, filtros de ar, material particulado etc., devendo, a amostra ser antecedida de digestão química e diluição apropriada segundo KOOPMANW *et al.* (1991).

A utilização da TXRF para análise de elementos traços não só compete com outros métodos analíticos, como também oferece novas possibilidades de solucionar problemas analíticos intrínsecos (PRANGE, 1989). Foi observado por KLOCKENKÄMPER *et al.* (1992), que a vantagem de utilização desta técnica, é em relação à geometria de excitação e detecção, o tipo de preparo da amostra e a análise

quantitativa, quando bem ajustado pode ser utilizado para a análise de elementos traços em trabalhos de rotina de laboratório.

II.3.3. Limite de detecção

O limite de detecção (LD) representa a menor quantidade (concentração, massa, volume, etc) que pode ser discriminada estatisticamente em relação ao *background* de uma medida.

O LD para os elementos de número atômico abaixo de 13 (Al) é afetado pelo baixo rendimento de fluorescência e outras limitações, como baixo valor para o efeito fotoelétrico, absorção dos raios X característicos pela janela de Berílio (Be) e pelo ar contido entre a amostra e o detector. Trabalhando sob vácuo e com detector sem janela de Be, alguns autores têm obtido limites de detecção de 10 ng (0,2 ppm) para oxigênio e 800 pg (16 ppb) para magnésio utilizando SR-TXRF (STRELI *et al.*, 1992).

Os limites de detecção para a técnica de TXRF são melhores que os da fluorescência convencional (REFA, TEFA, STEFA e WD-XRF), devido, principalmente, a três fatores:

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

O LD é obtido a partir da equação II.9 (LADISICH *et al.*, 1993), sendo ele extrapolado em um tempo de medida de 100 s:

$$LD = 3 \cdot \sqrt{\frac{I_i(BG)}{t}} \frac{C_{Ga}}{I_{Ga} S_{Ri}} \quad (II.9)$$

onde:

I_i (BG) – a intensidade do *background* por unidade de tempo (cps);

I_{Ga} – a intensidade da radiação fluorescente relativa ao padrão interno (cps) gálio (Ga);

C_{Ga} – a concentração do padrão interno ;

S_{Ri} – a sensibilidade relativa (adimensional) para o elemento i ;

t – o tempo de medida(s).

Normalmente, o LD é determinado para alguns elementos e depois por extrapolação (curva do limite de detecção) determina-se o limite de detecção para os elementos de interesse. O limite de detecção em TXRF é da ordem de $ng.g^{-1}$.

II.4. Radiação Síncrotron

Sempre que uma carga elétrica é acelerada, da mesma forma que elétrons oscilando numa antena, ela emite radiação eletromagnética. Uma partícula que é acelerada de forma harmônica gera um campo elétrico senoidal em função do tempo, e este oscila de acordo com a frequência do seu movimento. Se a velocidade da partícula for bem inferior à da luz, essa emissão tem o seu valor máximo para ângulos perpendiculares à direção de aceleração. Por outro lado, nas proximidades da velocidade da luz ocorrem mudanças interessantes na emissão de radiação, relacionadas com as frequências emitidas e a forma (direção) de como a partícula emite. Alterações mais profundas ocorrem a velocidades relativísticas no movimento circular em que o espectro de emissão de radiação torna-se quase-contínuo, apresentando uma infinidade de harmônicos da frequência fundamental de oscilação. Esta radiação é conhecida como luz Síncrotron.

O processo de produção é iniciado por um canhão de elétrons de um acelerador linear. Os aceleradores lineares são aceleradores de partículas carregadas, como elétrons, prótons ou íons pesados. As partículas carregadas entram em um tubo onde existem campos elétricos alternados. Estas partículas são aceleradas primeiramente por um campo elétrico, entram em um tubo de corrente, onde são protegidas do campo elétrico, e o atravessam com velocidade constante até a próxima abertura. Neste ponto as partículas são novamente aceleradas e, a cada abertura entre os tubos (“*drifts*”), as

partículas recebem mais e mais energia. Esse processo é capaz de acelerar as partículas carregadas com energias muito grandes.

A circulação de corrente em anéis de armazenamento de alta energia emite feixes pulsados de luz tipicamente polarizados. São utilizados três tipos de magnetos na geração de radiação síncrotron: *bending magnets*, *wigglers* e *undulators*. Estes elementos aceleram de diferentes maneiras os elétrons armazenados. Os *bending magnets*, fazem com que os elétrons percorram a trajetória curva do anel. Devido à velocidade relativística dos elétrons, pulsos de radiação são altamente colimados e com ângulo de abertura vertical de $1/\gamma$, ($\gamma=E0/mc^2$), próximo da energia crítica síncrotron. O *wiggler* e o *undulator* diferem basicamente pela magnitude da perturbação que proporcionam ao feixe de elétrons. São responsáveis pelas características de coerência do feixe de elétrons.

A utilização de luz Síncrotron pressupõe o uso de monocromadores de modo a selecionar a região desejada dentro de um amplo espectro de energia. O feixe é, por sua natureza, laminar com altura de alguns milímetros e com largura de algumas dezenas de centímetros no plano do objeto, o que o torna ideal para sistemas de imagem. As características geométricas do feixe podem também ser modificadas mediante o uso de cristais assimétricos ou de outras óticas, de modo a adaptar-se às exigências específicas (ARFELLI, 2000).

Laboratórios de Luz Síncrotron de todo o mundo possibilitam uma grande variedade de aplicações em diferentes campos tais como ciências dos materiais, cristalografia, micro-espectroscopia, fluorescência de raios X e muitos outros. A principal característica destas fontes é o espectro de energia largo e contínuo que fornece um alto fluxo de fótons sob uma faixa de energia de até 50 keV ou maior (CASTRO, 2006).

Durante os últimos anos, diversos laboratórios de luz Síncrotron desenvolveram linhas de luz dedicadas às aplicações médicas (TAKEDA *et al.*, 1998, ARFELLI, 2000, AKSIROV, 2001). A disponibilidade de uma fonte intensa e altamente colimada de luz Síncrotron no Brasil – Laboratório Nacional de Luz Síncrotron (LNLS/CNPq) em

Campinas, SP – torna possível o estudo da fluorescência de raios X por reflexão total de materiais biológicos.

A associação de luz Síncrotron à TXRF possibilita que sejam atingidos limites de detecção mais baixos do que quando se utiliza um tubo de raios X de alta potência. As vantagens de se utilizar este tipo de radiação são as seguintes (CALZA, 2003):

- O alto brilho espectral de um feixe de Síncrotron resulta em raios-X primários com intensidades de 3 a 5 vezes maiores que as obtidas com tubos convencionais de raios-X.
- Uma vez que a luz Síncrotron cobre uma larga faixa de energia no espectro de raios-X, torna-se altamente adequada para tunelamento de energia. Utiliza-se um cristal de multicamadas para a seleção de uma faixa particular de energia, a qual pode facilmente ser ajustada para otimizar a energia de excitação dos elementos desejados.
- O “background” espectral já reduzido pela TXRF, pode ser reduzido ainda mais devido à polarização.

Através do desenvolvimento da SRTXRF em diferentes centros de pesquisa, foi possível perceber que ela possui as seguintes vantagens (SERPA,2007):

- Alta sensibilidade;
- Pequena quantidade de amostra necessária para a análise;
- Aplicação multielementar (do Na até os elementos do final da tabela periódica, podem ser medidos, levando em consideração as características do arranjo experimental de cada centro de pesquisa);
- Rápida obtenção de resultados;
- Várias aplicabilidades: geologia, indústria, medicina, etc.

II.5. Liofilização

A liofilização é um método prático de preservação de amostra devido à eliminação da água e alteração de proteínas, destruindo quase completamente enzimas e

bactérias, baseado no fenômeno da sublimação.. A perda de elementos voláteis, mesmo durante a liofilização, deve ser mínima, com a exceção do mercúrio (VERSIECK *et al.*, 1994). O armazenamento de materiais liofilizados é menos perigoso do que a armazenagem de líquidos por causa da menor reação química. Componentes de uma amostra em estado líquido tendem a ter um maior grau de interação com o recipiente do que os que estão no estado sólido.

O material liofilizado pode ser facilmente reconstituído para análise. O NIST (National Institute of Standards and Technology Gaithersburg, U.S. – Instituto Nacional de Padrões e Tecnologia Gaithersburg) verificou que a liofilização seguida de irradiação contribui significativamente para a estabilidade da amostra e permite longa conservação (MOODY, 1982). O NIST tem sido capaz de armazenar muitos materiais biológicos liofilizados usados como padrão de referência por anos à temperatura ambiente (20°C), sem qualquer cuidado especial. O sangue liofilizado, por exemplo, pode ser armazenado durante, pelo menos, 4 anos a -20°C (IYENGAR, 1985).

II.6. Teste de Hipótese

O teste de uma hipótese estatística é talvez a área mais importante da teoria de decisão. Em todo problema de teste de hipóteses, duas hipóteses complementares são consideradas. A hipótese nula, sendo representada por H_0 , pois ela expressa que não há mudança. A outra hipótese, que será aceita caso H_0 seja rejeitada, é denominada hipótese alternativa e é denotada por H_1 . São mutuamente excludentes, ou seja, rejeitar H_0 significa aceitar H_1 e vice-versa (CANCHO, 2004).

O procedimento de tomada de decisão em um teste de hipóteses pode resultar em dois tipos de conclusões incorretas. Ao tomar uma decisão a favor ou contra uma hipótese existem dois tipos de erros que você pode cometer. Pode-se rejeitar a hipótese nula quando de fato ela é verdadeira (erro tipo I) ou falhar em rejeitar H_0 quando de fato ela é falsa (erro tipo II). A tabela 2.1 apresenta os tipos de erros destes testes.

Tabela 2.1 – Tipos de erros dos testes de hipótese.

Decisão	Decisão Real e Desconhecida	
	H ₀ verdadeira	H ₀ falsa
Não rejeitar H ₀	Decisão correta	Erro tipo II
Rejeita H ₀	Erro tipo I	Decisão correta

Estes dois tipos de erro estão, de tal forma, relacionados que, ao reduzir-se a probabilidade de ocorrência de um deles, aumenta-se automaticamente a probabilidade de ocorrência do outro. De modo geral, controla-se apenas o erro tipo I através do nível de significância (representado por α), que consiste na probabilidade máxima de ocorrência do erro tipo I. O grau de confiança ($1 - \alpha$) expressa a confiabilidade de se ter tomado a decisão correta ao rejeitar-se uma hipótese nula.

A proporção do erro tipo II é representada por β . O poder do teste ($1 - \beta$) é a probabilidade de rejeitar uma hipótese nula quando esta é falsa e a hipótese alternativa é correta, e decresce rapidamente quando a hipótese alternativa aproxima-se da hipótese nula.

Uma forma de aumentar o poder do teste (ou reduzir β), mantendo-se α constante, é aumentar o tamanho amostral. Outro enfoque importante é o *p-value*, que quantifica a consistência do valor observado de um teste estatístico em um modelo de distribuição, sendo a proporção dos valores do modelo de distribuição que determina a máxima probabilidade de rejeitar H₀ e aceitar H₁. Quanto menor o *p-value*, maior é o suporte dado a H₁.

No capítulo III descreveremos todo o processo de preparação das amostras para a análise por Reflexão Total, bem como as características da instrumentação do sistema.

CAPÍTULO III

MATERIAIS E MÉTODOS

III.1 – Preparação das amostras

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

O primeiro passo mais importante para qualquer análise biomédica é preservar a integridade da amostra (WATT *et al.*, 1993). A maioria dos tecidos dos mamíferos é macia, logo, na maioria das vezes necessitam de fixação antes do seccionamento. Contudo, qualquer fixador, como por exemplo, glutaraldeído ou álcool, eventualmente irá alterar a distribuição dos elementos traço no tecido através da retirada, inclusão ou até mesmo a modificação regional dos elementos traço.

A criofixação, onde os tecidos e as células são rapidamente congelados mantendo dessa maneira sua integridade, é considerada a melhor forma de preparação das amostras tanto para estudos morfológicos de alta resolução quanto para estudos analíticos (WATT *et al.*, 1993). Por esta razão, após a coleta, as amostras transportadas em caixa de isopor com gel térmico congelado e, então, acondicionadas em geladeira a uma temperatura 4°C.

Neste trabalho, foram utilizadas amostras de sangue total e de hemocomponentes (plasma e elementos figurados (ou matriz celular)). Para realizar a separação do plasma dos elementos figurados, as amostras ficaram em repouso. Devido à gravidade, os elementos figurados, mais pesados, se depositaram no fundo do tubo; enquanto que o plasma, mais leve, ficou sobrenadante, conforme a figura 3.1. Em seguida, retirou-se de cada amostra, através de uma pipeta, primeiramente o plasma e depois a matriz celular. Todas essas amostras foram devidamente identificadas com códigos que permitissem posterior identificação caso necessário, como mostra a figura 3.2.

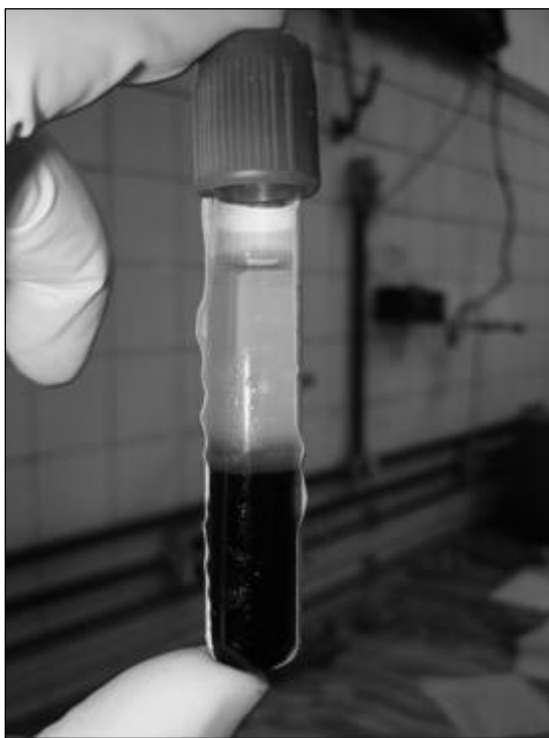


Figura 3.1 – Imagem do plasma sobrenadante e dos elementos figurados (cor escura), após algumas horas de repouso da amostra.

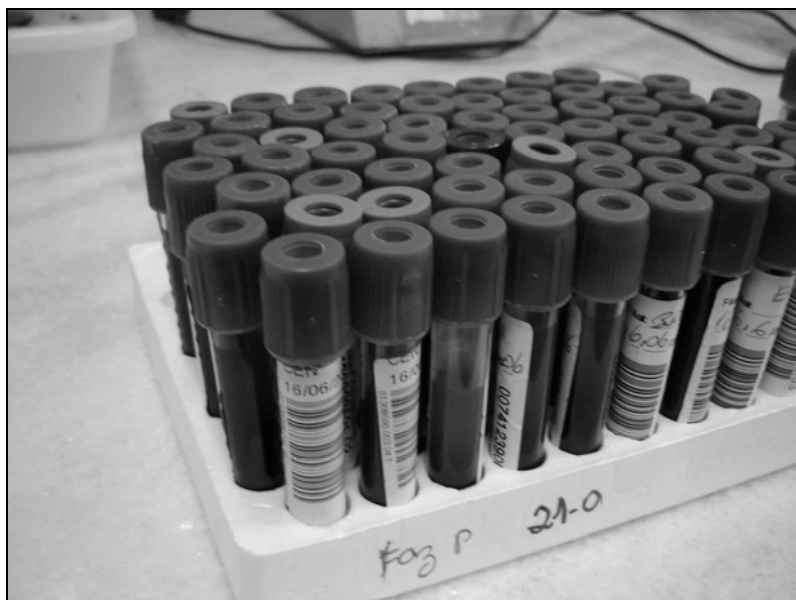


Figura 3.2 – Amostras devidamente identificadas

Após essa identificação, os grupos foram encaminhados à irradiação em uma bomba de cobalto Theratron 780 C (figura 3.3), instalado no Instituto Nacional do Câncer, no Rio de Janeiro, Brasil. As amostras foram irradiadas com as seguintes doses: 2, 4, 8, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 100 cGy usando um campo 15 x 15 cm a uma distância fonte-superfície (SSD) igual a 80 cm. A figura 3.4 mostra as amostras prontas para irradiação e a tabela 3.1 apresenta os tempos de irradiação necessários para alcançar as doses estabelecidas.

Tabela 3.1 – Dados do aparelho de cobaltoterapia Theratron, INCa.

Dose Teórica (cGy)	Dose Estimada (cGy)	Tempo de Irradiação (min)
2	2,536	0,01
4	3,680	0,02
5	4,824	0,03
8	8,257	0,06
10	10,546	0,08
15	15,123	0,12
20	19,701	0,16
30	30,000	0,25
40	40,299	0,34
50	49,454	0,42
60	59,753	0,51
70	70,052	0,60
80	80,351	0,69
90	89,506	0,77
100	99,805	0,86



Figura 3.3 – Aparelho de Cobaltoterapia do INCa/RJ

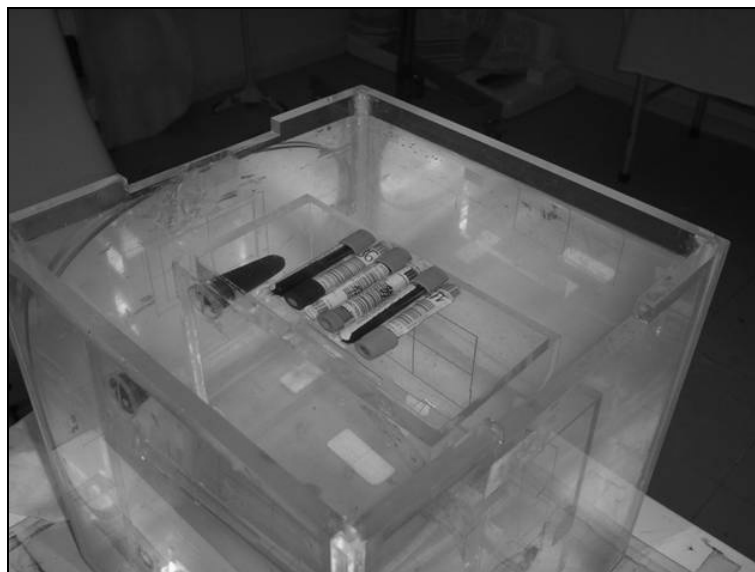


Figura 3.4 – Amostras sendo irradiadas

É válido ressaltar que todo o processo de irradiação foi realizado obedecendo-se o planejamento de tratamento radioterápico pré-estabelecido pelo INCa.

Após a irradiação, o plasma e os elementos figurados foram separados por aspiração utilizando uma pipeta, em seguida as amostras de sangue total, plasma e os elementos figurados foram colocados em vidro de relógio e encaminhadas ao liofilizador como mostra a figura 3.5.



Figura 3.5 – Amostras sendo liofilizadas

Todas as amostras foram liofilizadas por um período de 48 horas a uma temperatura de -60°C e uma pressão de -780mmHg , no liofilizador disponível no Laboratório de Instrumentação Nuclear (LIN/COPPE).

Posteriormente, já liofilizadas, as amostras foram trituradas utilizando-se um cadinho de porcelana e um pistilo. Uma vez transformadas em pó, as amostras foram acondicionadas em frascos apropriados e etiquetados.

Após todo esse processo de liofilização, as amostras foram levadas e preparadas em Campinas, em parceria com a Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP-SP), sob a supervisão da Prof^a Silvana Moreira, seguindo o mesmo procedimento. Primeiramente, aferiram-se as massas de todas as amostras desse trabalho. Em cada amostra, foram adicionados 6mL de ácido nítrico (HNO_3), em seguida encaminharam-se

todas elas ao bloco digestor, onde foram mantidas a uma temperatura de 130°C por 3h. Logo após, gotas de H₂O₂ (peróxido de hidrogênio) foram adicionadas.

É importante ressaltar que todos os recipientes, utilizados neste trabalho, foram previamente lavados com detergente neutro e água destilada. Em seguida, foram submersos em uma solução de HNO₃ a 10% por aproximadamente 30-40 minutos e depois rinsados com água deionizada (Mili-Q).

Depois desta fase de digestão, as amostras foram colocadas em tubos volumétricos adicionando-se água Mili-Q, a fim de completar o seu volume até 10ml. Retirou-se então desses 10ml um volume de 500µL da solução, colocou-se em um tubo de *ependorf* e adicionou-se então 50µL de Ga (usado como padrão interno, com uma concentração de 9,32 µg.ml⁻¹). Em seguida, agitou-se esta solução final e retirou-se 5 µl, que foram pipetados no refletor. Para a secagem deste refletor, que contém a amostra já pronta para ser analisada, utilizou-se uma lâmpada infra-vermelha. Todas as amostras foram preparadas em triplicatas.

Com o intuito de corrigir efeitos referentes a possíveis contaminações, amostras foram preparadas de maneira análoga às amostras de análise, contendo apenas água e demais reagentes. Permitindo verificar, dessa maneira, a qualidade dos materiais utilizados na dissolução das amostras.

A acurácia das medidas foi verificada através da determinação da concentração elementar em uma amostra certificada de água mineral (NIST/SEM 1640) e em uma amostra certificada de solo (NIST/SEM 2709), ambas preparadas por digestão, seguindo o mesmo procedimento usado para o preparo das amostras de sangue.

III.2 – Instrumentação

As medidas foram realizadas na linha de Fluorescência de raios X (XRF) do Laboratório Nacional de Luz Síncrotron, Campinas – São Paulo (figura 3.6). Com as amostra já preparadas, os refletores são transportados em placas de Petri até esta linha de XFR. A amostra foi posicionada horizontalmente ao detector de germânio hiperpuro

(HPGe) e excitada através de um feixe branco de radiação de energia máxima igual a 20 keV, como mostra a figura 3.7.

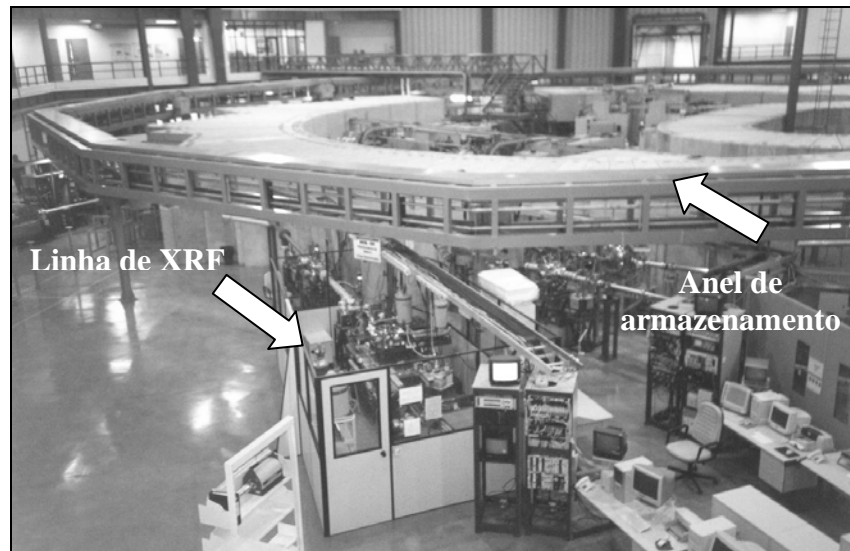


Figura 3.6 - Vista geral da estação experimental DO9B-XRF do Laboratório Nacional de Luz Síncroton.

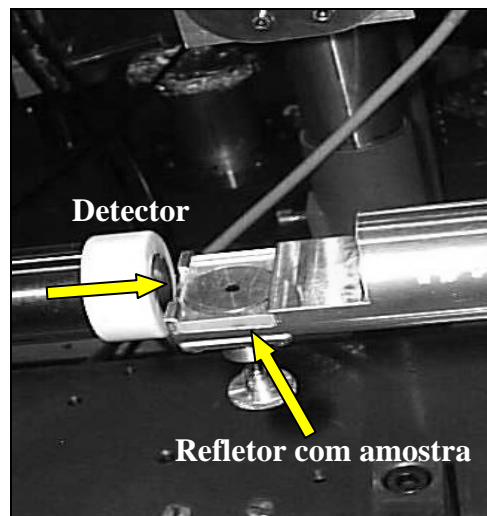


Figura 3.7 – Esquema da montagem do arranjo experimental.

O tempo de medida das amostras e dos padrões foi igual a 100s e os espectros de raios X característicos obtidos foram analisados através do software Sistema de Análise Quantitativa de raios X (AXIL) (IAEA, 1978), distribuído pela Agência Internacional de Energia Atômica (AIEA), obtendo as intensidades dos raios X para cada elemento.

CAPÍTULO IV

RESULTADOS E DISCUSSÃO

IV – Análise Quantitativa por TXRF

Os fundamentos da análise quantitativa por TXRF estão descritos no capítulo 2. A concentração elementar, de acordo com a equação 3.32, é obtida a partir da medida da intensidade da radiação fluorescente emitida por um elemento *i* em função da sensibilidade do sistema. Essas intensidades foram obtidas a partir da análise dos espectros de raios X característicos usando o *software* AXIL (IAEA, 1978). As figuras 4.1, 4.2 e 4.3 ilustram, respectivamente, os espectros característicos das amostras de sangue total, plasma e matriz celular obtidos.

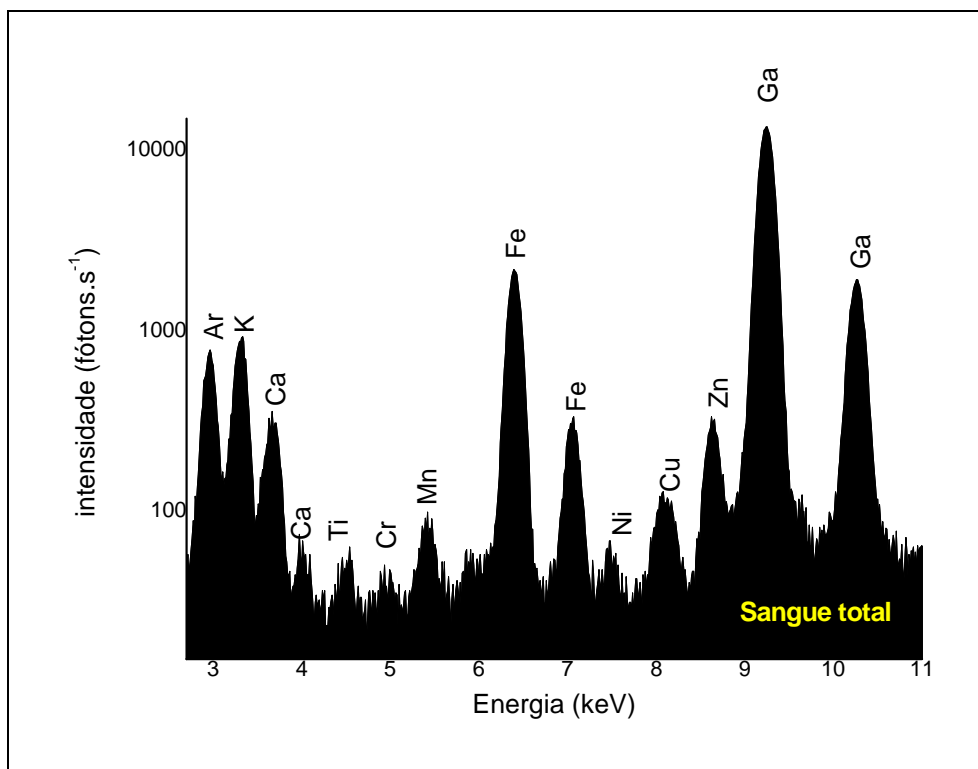


Figura 4. 1– Espectro característico de uma amostra de sangue total.

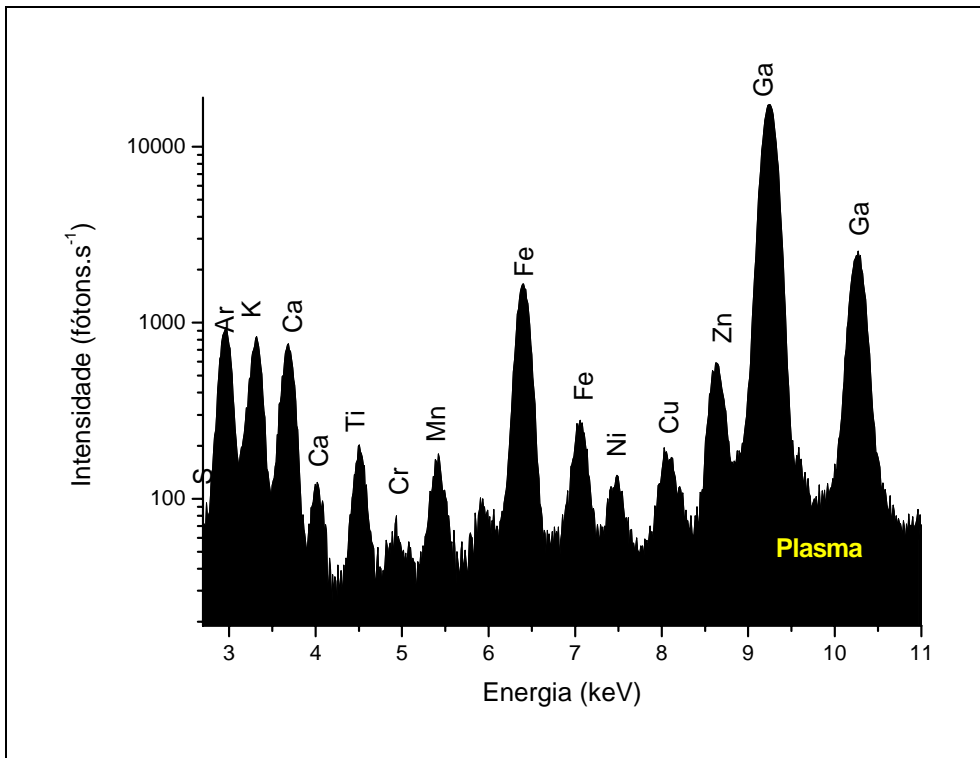


Figura 4.2 – Espectro característico de uma amostra de plasma.

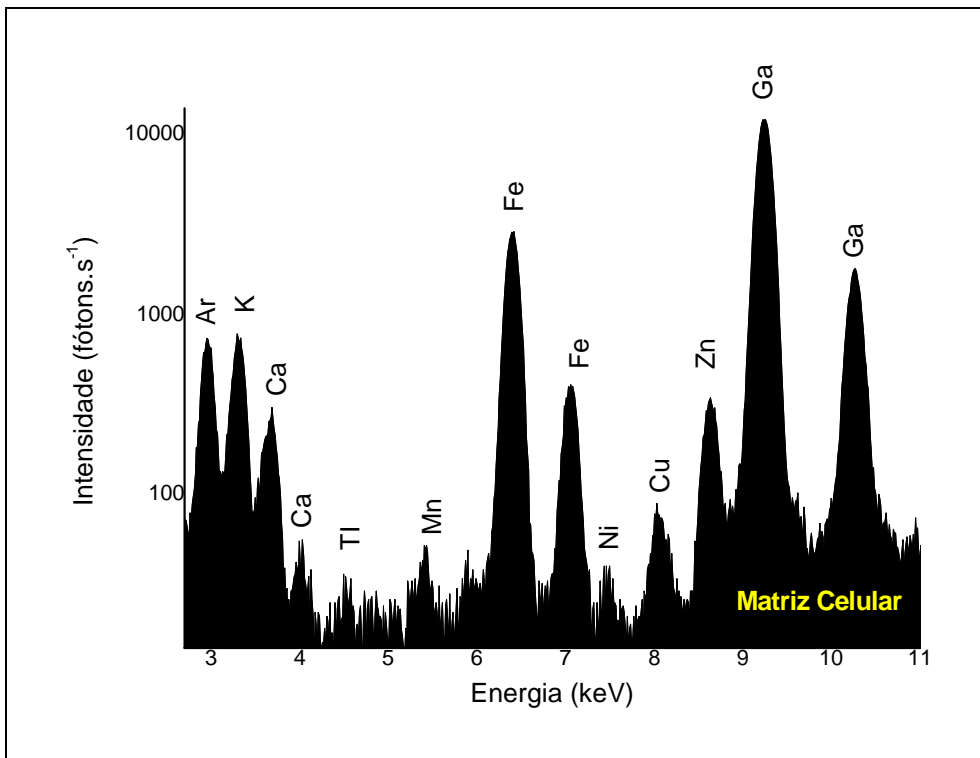


Figura 4.3 – Espectro característico de uma amostra de matriz celular.

IV.1 – Sensibilidade Relativa

Para calcular as sensibilidades relativas, foram utilizadas 5 soluções padrão para a linha K e 5 soluções para a linha L, contendo elementos conhecidos e em diferentes concentrações. A todas elas foi acrescido o elemento Gálio (Ga), utilizado como padrão interno.

As tabelas 4.1 e 4.2 apresentam os valores das concentrações dos elementos e do padrão interno em cada solução padrão para determinação das sensibilidades para as séries K e L.

Tabela 4.1 – Concentração (mg.L^{-1}) de cada elemento químico presente na solução padrão, para a determinação da sensibilidade da série K.

Número Atômico (Z)	Elemento	Padrões				
		1K	2K	3K	4K	5K
13	Al	120,36	180,55	216,65	232,96	240,73
14	Si	121,82	182,73	219,27	235,78	243,64
19	K	6,10	9,15	10,99	14,77	18,31
20	Ca	6,12	9,18	11,02	14,81	18,36
22	Ti	6,03	9,05	10,85	14,59	18,09
24	Cr	6,03	9,05	10,85	14,59	18,09
26	Fe	6,05	9,07	10,89	14,63	18,15
28	Ni	6,06	9,09	10,91	14,66	18,18
30	Zn	6,03	9,05	10,85	14,59	18,09
31	Ga	9,32	9,32	9,32	9,32	9,32
34	Se	5,94	8,91	10,69	14,37	17,82
38	Sr	6,09	9,14	10,96	14,74	18,27
42	Mo	6,06	9,09	10,91	14,66	18,18

Tabela 4.2 – Concentração de cada elemento químico (em mg.L⁻¹) presente na solução padrão, para determinação da sensibilidade da série L.

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

Através das relações entre a intensidade relativa e as concentrações elementares em cada padrão, foi possível obter as sensibilidades relativas para cada elemento presente nos padrões. O resultado para as sensibilidades relativas com as correspondentes séries K e L são mostrados nas figuras 4.4 e 4.5, respectivamente.

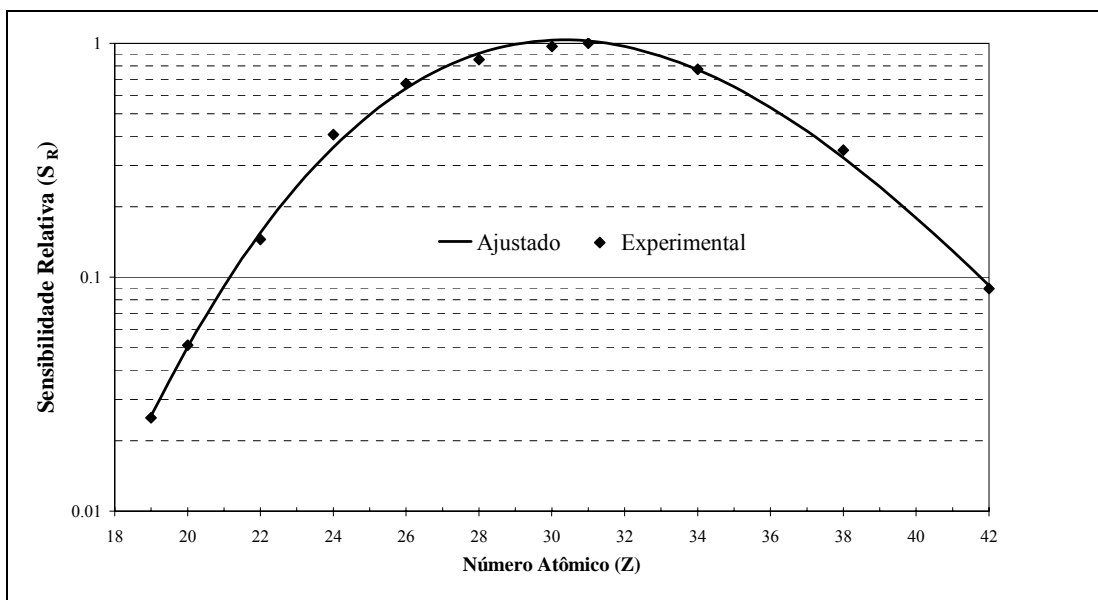


Figura 4.4 – Curva de calibração para a série K

A equação que relaciona a sensibilidade relativa S_i e o número atômico Z para a série K obtida através do ajuste dos valores experimentais obtidos é dada por:

$$S_i(Z) = \exp(-34,93 + 2,75 * Z - 0,07 * Z^2 + 0,00048 * Z^3) \quad (IV.1)$$

$$R^2 = 0,99$$

Com a equação IV.1, obtêm-se quaisquer valores de sensibilidade para a série K, em função do número atômico (Z).

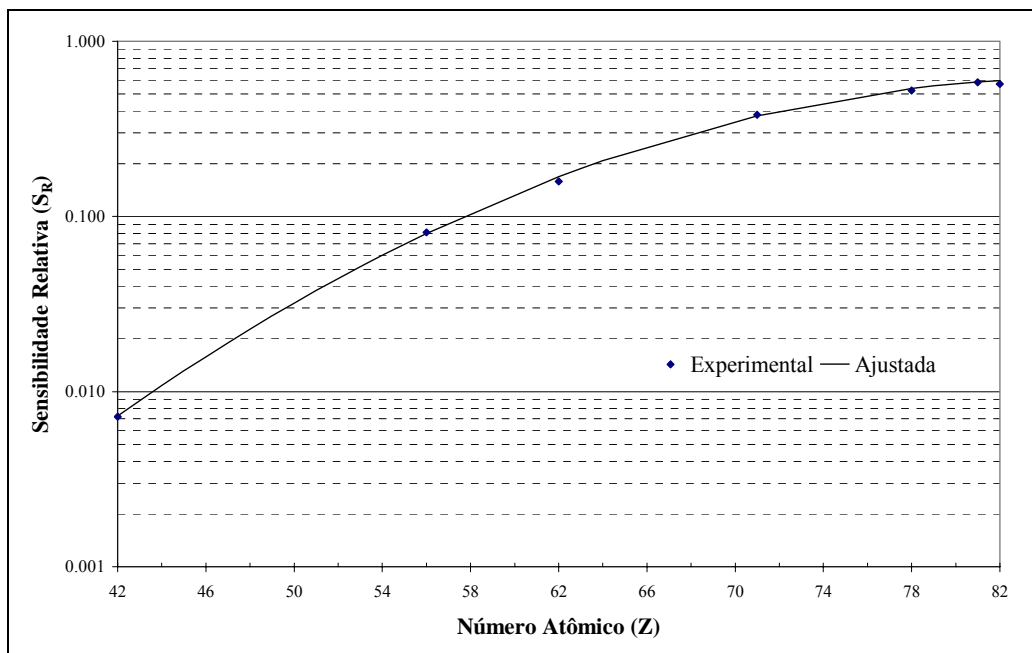


Figura 4.5 – Curva de calibração para a série L

Através do gráfico número atômico versus sensibilidade relativa é possível obter a seguinte equação para a série L:

$$S_i(Z) = \exp(3,80 - 0,198 * Z + 0,003 * Z^2 + 0,00002 * Z^3) \quad (IV.2)$$

$$R^2 = 0,99$$

Com a equação IV.2, obtêm-se quaisquer valores de sensibilidade para a série L, em função do número atômico (Z).

IV.2 – Limite de detecção

A tabela 4.3 mostra os limites de detecção calculados utilizando a equação II.9 para os elementos da série K nas amostras de sangue total, plasma e matriz celular.

Tabela 4.3 – Limite de detecção para os elementos da série K, nas amostras de sangue total, plasma e matriz, utilizando SR-TXRF.

Elementos	LD para a série K (ng.m ⁻³)		
	Sangue total	Plasma	Matriz celular
S	0,572091	1,700914	0,568846
Cl	0,251106	0,687315	0,231555
K	0,054824	0,146997	0,04629
Ca	0,028591	0,076281	0,023622
Ti	0,008872	0,023952	0,007136
Cr	0,003713	0,010092	0,001918
Fe	0,002232	0,00593	0,001786
Ni	0,002453	0,006425	0,002165
Cu	0,002305	0,006057	0,002139
Zn	0,00225	0,00598	0,002215
Sr	0,015111	0,041029	0,011841

Com os dados da tabela 4.3, foi realizado o ajuste dos pontos experimentais a fim de se obter a curva do limite de detecção em função do número atômico para os elementos da série K para o sangue total, plasma e matriz, apresentados nas figuras 4.6, 4.7 e 4.8.

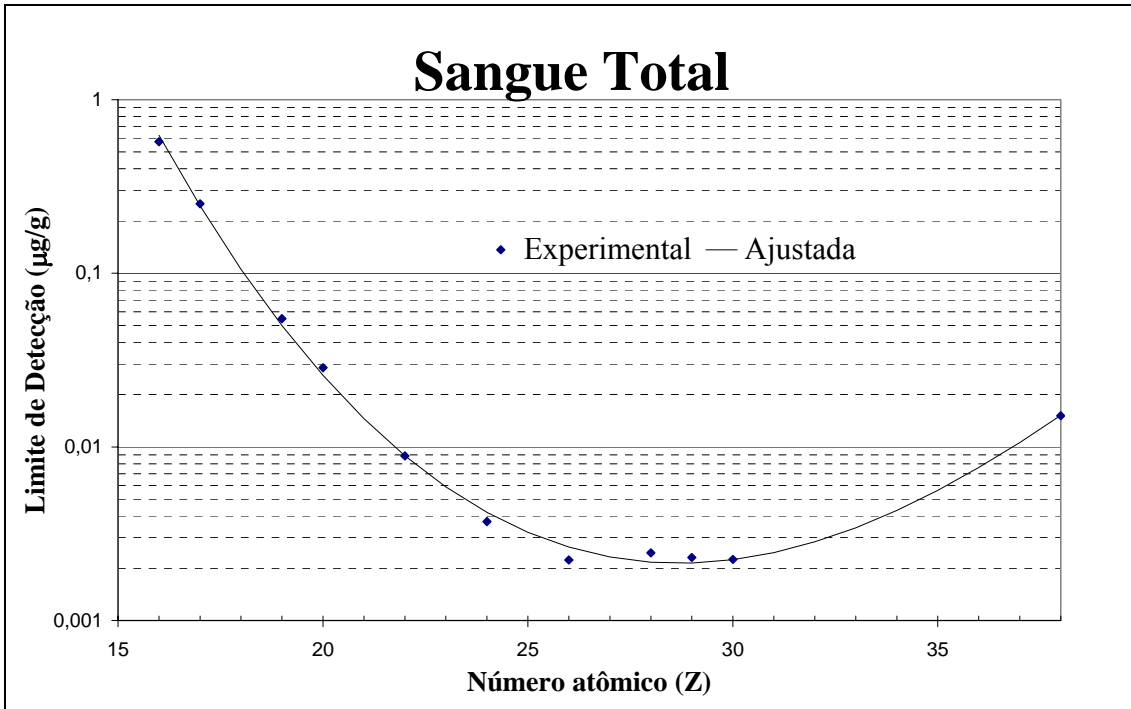


Figura 4.6 – Limite de detecção dos elementos da série K para as amostras de sangue total, utilizando TXRF.

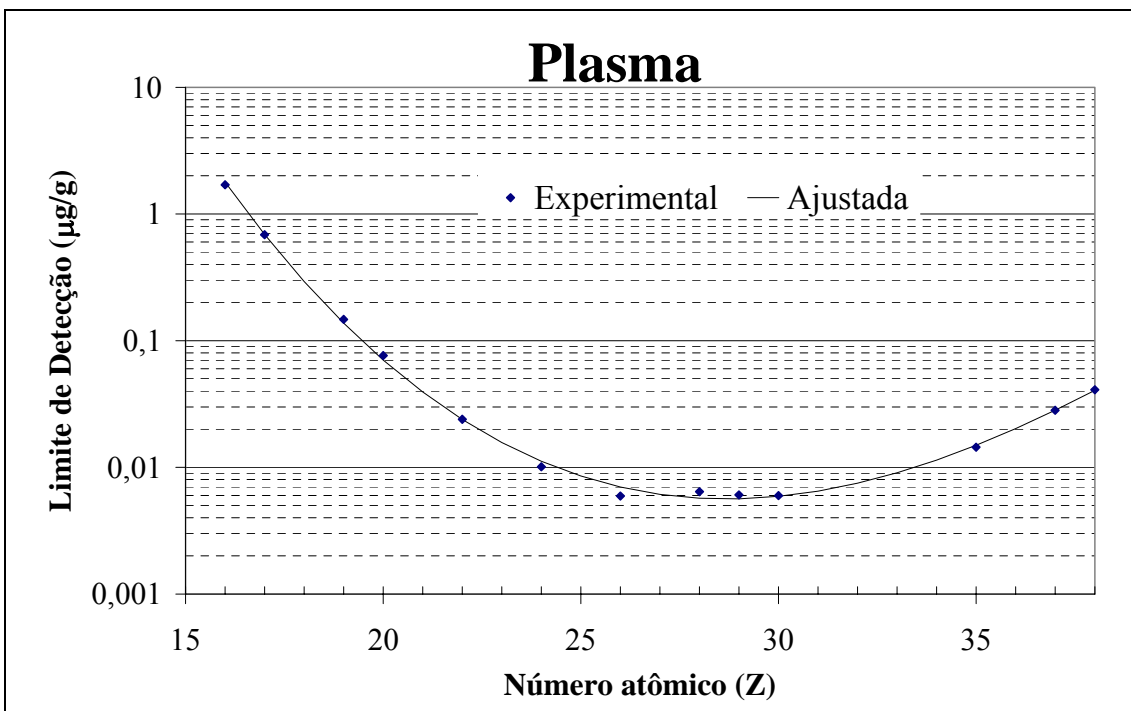


Figura 4.7 – Limite de detecção dos elementos da série K para as amostras de plasma, utilizando TXRF.

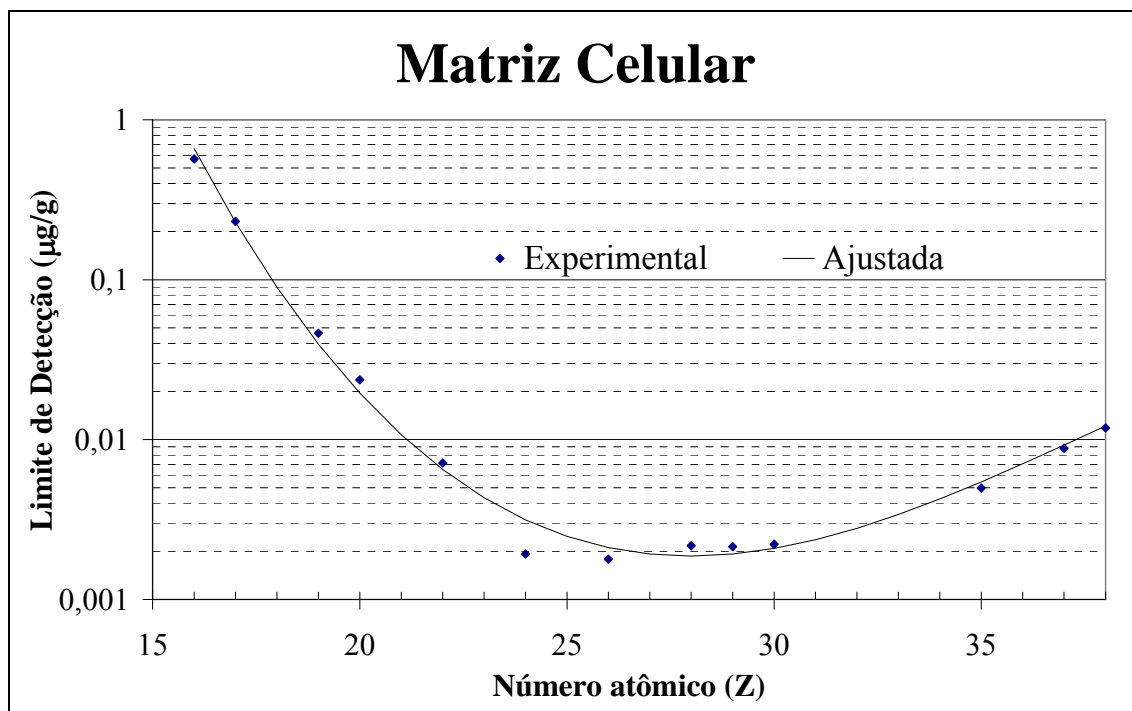


Figura 4.8 – Limite de detecção dos elementos da série K para as amostras de matriz celular, utilizando TXRF.

Para os elementos da série L não foi possível obter um ajuste, pois apenas o elemento chumbo foi detectado nas amostras de matriz celular e plasma. O valor obtido para este elemento é apresentado na tabela 4.4.

Tabela 4.4 – Valor do limite de detecção para o elemento Pb.

LD (ng.m ⁻³)			
Elemento	Sangue total	Plasma	Matriz Celular
Pb	1,42.10 ⁻²	3,20.10 ⁻²	4,76.10 ⁻²

IV.3 – Validação da metodologia

Para verificar a exatidão do processo desenvolvido para análise quantitativa, dois materiais de referência fornecidos pelo National Institute of Standards and Technology (NIST). Um material de referência contém elementos traço em água natural (Trace

Elements in Natural Water – SRM 1640) e o outro contém elementos traço em solo (San Joaquim Soil – SMR 2709). Ambos foram analisados e os dados medidos foram comparados com os valores certificados (tabela 4.5 e 4.6, respectivamente).

Tabela 4.5 – Comparação dos valores medidos e certificados da amostra de referência “Trace Elements in Natural Water” (NIST/SRM 1640).

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

* em mg.kg^{-1}

Tabela 4.6 – Comparação dos valores medidos e certificados da amostra de referência “San Joaquim Soil” (NIST/SRM 2709).

Elemento	Valor medido (mg.L^{-1})	Valor certificado (mg.L^{-1})
Ca	17916 \pm 1006	18900 \pm 500
V	113 \pm 8	112 \pm 5
Cr	141 \pm 6	130 \pm 4
Mn	549 \pm 6	538 \pm 17
Fe	35836 \pm 2000	35000 \pm 1100
Cu	36.4 \pm 3.0	34.6 \pm 0.7
Zn	104 \pm 5	106 \pm 3

É válido ressaltar que foram utilizados no presente estudo dois padrões certificados diferentes com o objetivo de avaliar a eficiência do processo de digestão.

Os resultados obtidos no presente trabalho apresentaram desvios padrões relativos inferiores a 10% para a maioria dos elementos, confirmando um bom ajuste para a curva de calibração utilizando a SR-TXRF.

IV.4 – Análise dos resultados

Alguns elementos têm efeitos tóxicos sobre o corpo humano e, portanto, há uma necessidade de controlar os seus níveis em órgãos e tecidos humanos. Além disso, é importante aumentar o nosso conhecimento das relações entre os efeitos tóxicos observáveis e as concentrações elementares no homem e no seu ambiente (BÖRJESSON *et al.*, 2003).

Diversos trabalhos (AYALA *et al.*, 1991, GIAUQUE *et al.*, 1973, GREAVES *et al.*, 1995 e 2000) citam elementos essenciais ao ser humano, bem como os efeitos da variação da concentração dos mesmos. Neste trabalho, foram escolhidos 4 elementos químicos a serem analisados: Potássio (K), Cálcio (Ca), Ferro (Fe) e Zinco (Zn).

Através da SR-TXRF, foram medidas as concentrações elementares de cada um desses elementos para cada grupo de dose. A tabela 4.7 representa as concentrações médias para as amostras não irradiadas.

Tabela 4.7 – Médias e desvios para cada componente das amostras não irradiadas.

Componente	n	Concentração Elementar ($\mu\text{g/g}$)							
		K		Ca		Fe		Zn	
		Média	Desvio	Média	Desvio	Média	Desvio	Média	Desvio
Sangue Total	13	2650	620	400	260	1490	380	56	20
Plasma	18	2370	560	550	230	520	280	50	18
Matriz Celular	19	2020	510	100	56	1680	580	40	15

De acordo com a tabela 4.7, é possível observar que a concentração de potássio nas amostras não irradiadas analisadas é parecida para todos os componentes. Já a concentração de ferro é maior no sangue total e na matriz celular do que no plasma, o que é esperado, pois o ferro está concentrado nas hemácias, localizadas na matriz celular. A concentração de zinco é praticamente a mesma em todos os componentes.

Para uma melhor visualização da tabela 4.7, foi construído o gráfico de concentração por componentes, presente na figura 4.9.

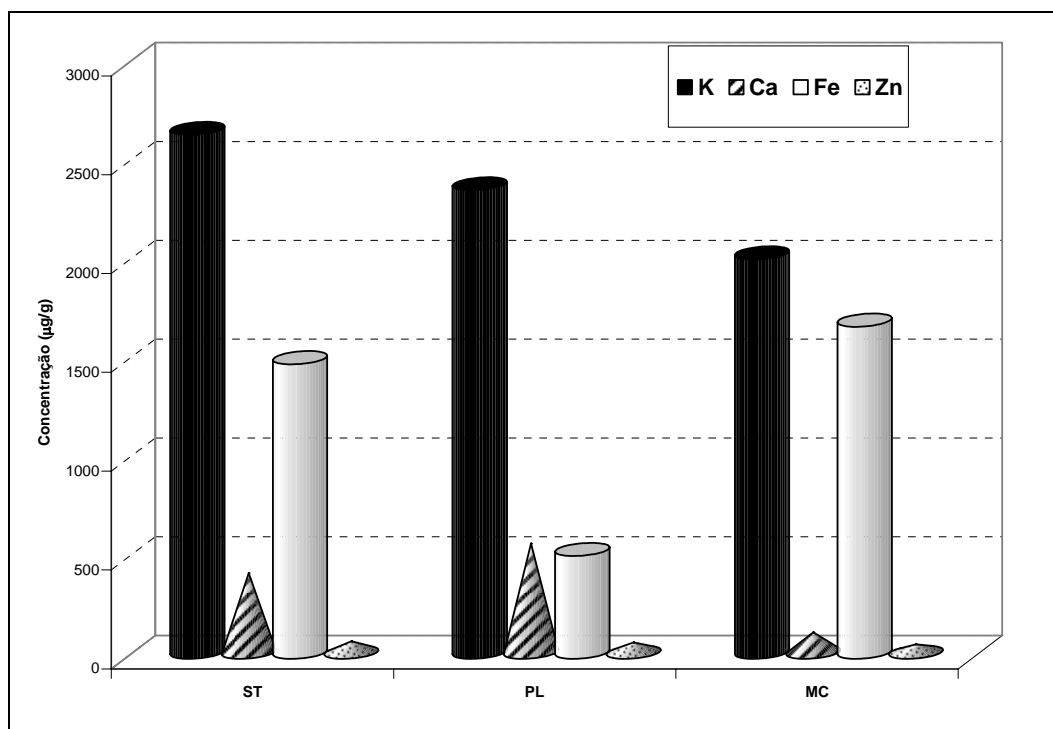


Figura 4.9 – Gráfico das concentrações para cada componente do sangue.

As tabelas 4.8, 4.9 e 4.10 apresentam os valores médios de concentração.

Tabela 4.8 – Médias e desvios para cada dose de sangue total

Dose (cGy)	n*	Concentração elementar (µg/g)							
		K		Ca		Fe		Zn	
		média	desvio	média	desvio	média	desvio	média	desvio
0	13	2650	620	400	260	1490	380	56	20
2	4	1540	595	354	202	612	348	20	9
4	4	1455	714	260	76	960	213	24	12
8	4	1400	530	200	65	926	373	28	15
10	3	1070	376	150	89	760	325	26	21
20	5	750	333	214	45	650	460	27	18
30	2	940	1114	72	50	550	350	12	14
40	3	813	406	130	79	560	290	26	21
50	6	1219	542	166	48	743	382	29	13
60	4	1410	480	100	11	538	356	33	12
70	2	1030	870	318	338	100	96	15	20
80	5	1230	303	86	32	869	519	36	20
90	4	1290	572	151	33	788	519	37	15
100	4	1680	630	124	32	783	611	34	15

*Sendo: n o número de amostras de cada grupo

Tabela 4.9 – Médias e desvios para cada dose de plasma

Dose (cGy)	n*	Concentração elementar (µg/g)							
		K		Ca		Fe		Zn	
		média	desvio	média	desvio	média	desvio	média	desvio
0	18	2370	560	550	230	520	280	50	18
2	5	2657	650	496	222	186	83	34	16
4	6	2460	833	622	151	190	120	42	9
8	6	4540	1540	600	174	230	120	36	15
10	5	4150	1050	720	260	270	140	38	21
20	7	2660	1480	697	178	292	118	35	20
30	4	4610	2130	785	265	220	91	46	2
40	5	3840	2180	717	375	254	156	45	24
50	5	3010	790	430	150	280	84	33	25
60	7	2590	920	530	350	220	94	36	17
70	5	2580	1040	570	93	310	56	44	25
80	4	2680	820	450	120	320	140	42	13
90	6	3890	1420	500	100	200	100	38	20
100	6	2530	990	410	160	460	180	31	11

*Sendo: n o número de amostras de cada grupo

Tabela 4.10 – Médias e desvios para cada dose de matriz celular

Dose (cGy)	n*	Concentração elementar (µg/g)							
		K		Ca		Fe		Zn	
		média	desvio	média	desvio	média	desvio	média	desvio
0	19	2020	510	100	56	1680	580	40	15
2	6	1290	390	110	110	1050	510	32	14
4	4	2080	700	130	63	1770	480	43	8
8	4	1970	930	160	64	1450	870	36	14
10	5	1170	480	69	31	1120	630	25	11
20	4	1040	350	66	19	1150	370	29	11
30	6	1570	730	130	52	1520	870	26	17
40	4	1120	180	120	59	1010	320	30	12
50	5	1220	150	71	24	1570	500	33	6
60	5	1250	650	110	46	1160	550	29	14
70	7	1500	570	150	58	1250	300	35	2
80	4	930	280	49	22	1180	390	31	9
90	4	1210	330	74	12	1470	280	39	5
100	5	1100	510	56	19	1580	630	35	19

*Sendo: n o número de amostras de cada grupo

Os altos valores de desvio padrão obtidos, em alguns casos, podem ser atribuídos a fatores biológicos, devido a características específicas de cada indivíduo que afetam as diferentes amostras. De fato, as diferenças de concentrações elementares obtidas para as três repetições foram negligenciáveis, quando comparadas com as variações entre as amostras.

Para saber se essas variações das médias são estatisticamente significantes, usou-se o teste de *Student*, que será apresentado mais adiante nas tabelas 4.11, 4.12 e 4.13.

IV.5 – Teste de Hipótese

O teste de hipótese utilizado foi o *teste-t de Student* cuja finalidade é estabelecer um critério que permita distinguir entre diferenças amostrais e diferenças reais. Assim, será possível responder se a diferença encontrada entre as concentrações medidas é devida apenas as características amostrais ou se pode ser atribuída à diferença causada pelo processo de irradiação.

Os dados foram submetidos a tratamento estatístico, sendo que o valor de significância adotado foi $p < 0,05$ e $\alpha = 95\%$. As tabelas 4.10, 4.11 e 4.129 apresentam os valores médios e os *p-value* encontrados para sangue total, plasma e matriz celular, respectivamente, obtidos a partir das medidas realizadas.

Tabela 4.11 – Os valores de *p-value* encontrados a partir da comparação entre as amostras não irradiadas com as irradiadas de sangue total

Comparação entre amostras irradiadas e não irradiadas (0cGy)	n*	<i>p-value</i>			
		K	Ca	Fe	Zn
2	4	<i>p = 0.007</i>	p = 0.752	<i>p = 0.000</i>	<i>p = 0.004</i>
4	4	<i>p = 0.005</i>	p = 0.314	<i>p = 0.021</i>	<i>p = 0.009</i>
8	4	<i>p = 0.002</i>	p = 0.156	<i>p = 0.020</i>	<i>p = 0.022</i>
10	3	<i>p = 0.000</i>	p = 0.131	<i>p = 0.009</i>	<i>p = 0.036</i>
20	5	<i>p = 0.000</i>	p = 0.138	<i>p = 0.001</i>	<i>p = 0.012</i>
30	2	<i>p = 0.005</i>	p = 0.108	<i>p = 0.006</i>	<i>p = 0.011</i>
40	3	<i>p = 0.000</i>	p = 0.104	<i>p = 0.001</i>	<i>p = 0.036</i>
50	6	<i>p = 0.000</i>	p = 0.046	<i>p = 0.000</i>	<i>p = 0.002</i>
60	4	<i>p = 0.002</i>	p = 0.039	<i>p = 0.000</i>	<i>p = 0.048</i>
70	2	<i>p = 0.006</i>	p = 0.692	<i>p = 0.000</i>	<i>p = 0.018</i>
80	5	<i>p = 0.000</i>	p = 0.018	<i>p = 0.012</i>	p = 0.076
90	4	<i>p = 0.001</i>	p = 0.081	<i>p = 0.009</i>	p = 0.102
100	4	<i>p = 0.016</i>	p = 0.056	<i>p = 0.013</i>	p = 0.062

*Sendo: n o número de amostras de cada grupo e o número de amostras de 0 cGy = 13

Tabela 4.12 – Os valores de *p-value* encontrados a partir da comparação entre as amostras não irradiadas com as irradiadas de plasma

Comparação entre as amostras irradiadas com não irradiadas (0cGy)	n*	<i>p-value</i>			
		K	Ca	Fe	Zn
2	5	p = 0.283	p = 0.645	<i>p = 0.016</i>	p = 0.504
4	6	<i>p = 0.000</i>	p = 0.484	<i>p = 0.011</i>	p = 0.312
8	6	<i>p = 0.000</i>	p = 0.632	<i>p = 0.023</i>	p = 0.101
10	5	<i>p = 0.000</i>	p = 0.169	<i>p = 0.070</i>	p = 0.216
20	7	<i>p = 0.000</i>	p = 0.143	<i>p = 0.051</i>	p = 0.661
30	4	<i>p = 0.000</i>	p = 0.086	<i>p = 0.050</i>	p = 0.776
40	5	<i>p = 0.008</i>	p = 0.224	<i>p = 0.057</i>	p = 0.128
50	5	<i>p = 0.012</i>	p = 0.286	<i>p = 0.004</i>	p = 0.100
60	7	<i>p = 0.000</i>	p = 0.868	<i>p = 0.012</i>	p = 0.090
70	5	<i>p = 0.027</i>	p = 0.853	<i>p = 0.016</i>	p = 0.094
80	4	<i>p = 0.064</i>	p = 0.414	<i>p = 0.023</i>	p = 0.414
90	6	<i>p = 0.000</i>	p = 0.615	<i>p = 0.013</i>	p = 0.182
100	6	<i>p = 0.007</i>	p = 0.183	<i>p = 0.032</i>	p = 0.105

*Sendo: n o número de amostras de cada grupo e o número de amostras de 0 cGy = 18

Tabela 4.13 – Os valores de *p-value* encontrados a partir da comparação entre as amostras não irradiadas com as irradiadas de matriz celular

Comparação entre as amostras irradiadas com não irradiadas (0cGy)	n*	<i>p-value</i>			
		K	Ca	Fe	Zn
2	6	p = 0.004	p = 0.767	p = 0.026	p = 0.260
4	4	p = 0.842	p = 0.350	p = 0.776	p = 0.705
8	4	p = 0.879	p = 0.070	p = 0.514	p = 0.630
10	5	p = 0.335	p = 0.251	p = 0.072	p = 0.074
20	4	p = 0.002	p = 0.251	p = 0.097	p = 0.182
30	6	p = 0.046	p = 0.257	p = 0.024	p = 0.065
40	4	p = 0.003	p = 0.526	p = 0.038	p = 0.227
50	5	p = 0.002	p = 0.276	p = 0.092	p = 0.324
60	5	p = 0.009	p = 0.718	p = 0.086	p = 0.154
70	7	p = 0.035	p = 0.057	p = 0.076	p = 0.394
80	4	p = 0.000	p = 0.092	p = 0.109	p = 0.236
90	4	p = 0.007	p = 0.374	p = 0.493	p = 0.898
100	5	p = 0.002	p = 0.102	p = 0.739	p = 0.536

*Sendo: n o número de amostras de cada grupo e o número de amostras de 0 cGy = 19

A partir dos dados de *p-value*, foi possível construir os gráficos a seguir (figura 4.10, 4.11 e 4.12), relacionando a concentração relativa (de cada elemento que sofreu mudança significativa com as amostras não irradiadas) com cada dose estudada.

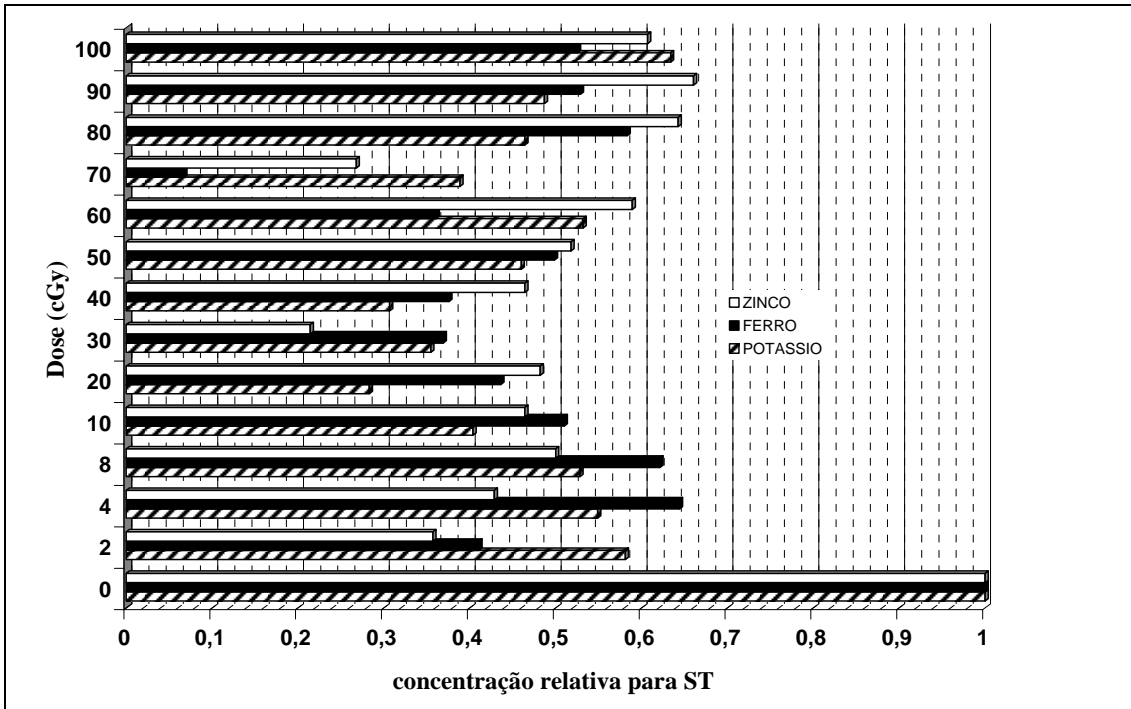


Figura 4.10 – Concentrações relativas para as amostras de sangue total.

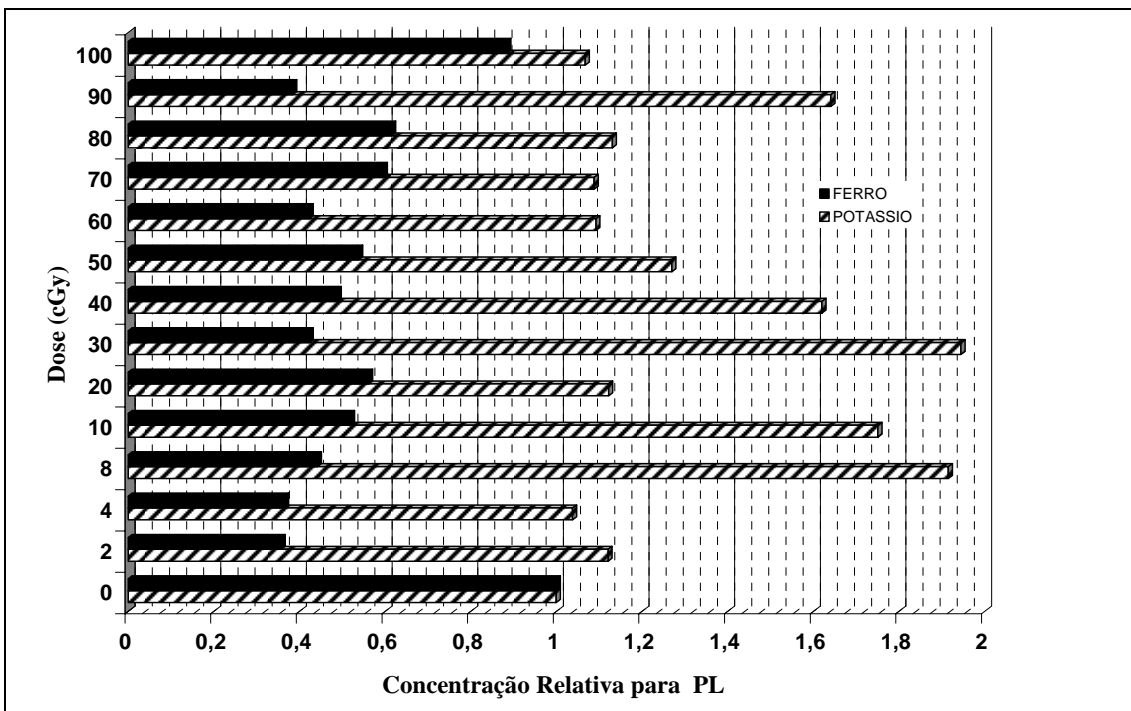


Figura 4.11 – Concentrações relativas para as amostras de plasma.

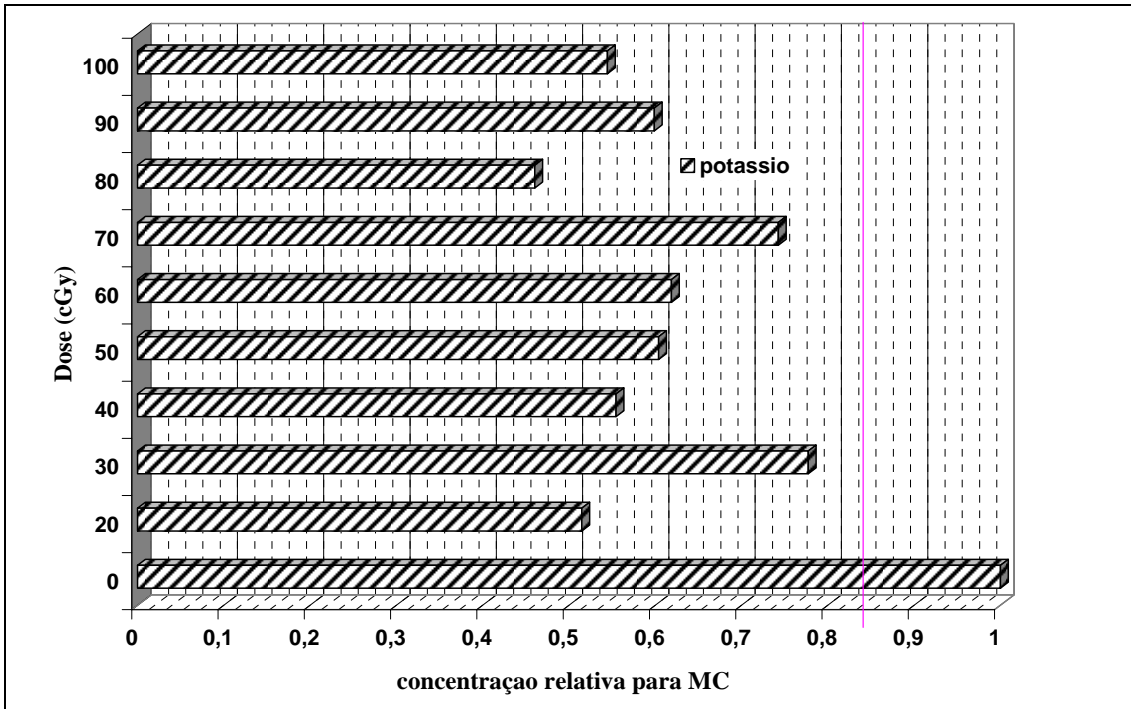


Figura 4.12 – Concentrações relativas para as amostras de matriz celular.

CONCLUSÃO

A SR-TXRF é uma técnica de alta sensibilidade que permite a determinação de múltiplos elementos em uma única medida utilizando uma pequena quantidade de material. A importância biológica dos muitos elementos traço (iodo, ferro, zinco) é bem conhecida. Uma série de dados tem sido acumulada relacionando o papel desses elementos na vida humana. Elementos traço essenciais são especialmente importantes para grupos populacionais críticos como crianças e mulheres grávidas. Concentrações inadequadas de elementos traço no organismo podem desencadear distúrbios do metabolismo e resultar em graves perturbações na saúde (SCHEPLYAGINA, 2005).

Como resultado deste trabalho, a análise estatística utilizada mostrou que a variação do nível de Ca encontrada não é significativa ($p > 0,05$) nem para o sangue total nem para hemocomponentes. Assim, pode-se concluir que o Ca não mostrou sensibilidade à radiação.

De outra forma, podem-se verificar alterações nas concentrações de K para todas as amostras analisadas ($p \leq 0,05$). A concentração de ferro apresentou variações significativas ($p \leq 0,05$) apenas para as amostras de sangue total e plasma. Enquanto que, a concentração de zinco apresentou variação significativa ($p \leq 0,10$) somente para as amostras de sangue total.

Nas amostras de sangue total, os resultados mostraram uma diminuição da concentração do K e do Fe ($\alpha \geq 95\%$) e do Zn ($\alpha \geq 90\%$) quando comparados com as amostras não irradiadas, em função do aumento de dose dentro de todo o intervalo estudado (de 2 a 100 cGy). É sabido que a diminuição da concentração de K causa aumento da pressão arterial e ocasiona acidente cerebral vascular.

Nas amostras de matriz celular, pode-se verificar uma diminuição da concentração de K somente a partir de 20 cGy. Para as doses abaixo de 20 cGy, não houve mudança significativa ($p > 0,05$) entre as amostras irradiadas e as não irradiadas.

Para as amostras de plasma, a concentração de K aumentou ($\alpha \geq 95\%$) a partir de 4 cGy. Entretanto, o nível de Fe diminuiu para todas as doses analisadas ($\alpha \geq 95\%$).

Segundo SALGADO (2000), a diminuição na concentração de ferro no sangue ocasiona uma diminuição das defesas imunitárias o que, de um lado, gera uma menor resistência às infecções, e de outro, acarreta um risco adicional de câncer por esta menor resistência.

A deficiência de zinco causa uma importante diminuição da libido, diminuição da visão noturna, diminuição da fertilidade, alterações esqueléticas, diarreias de repetição principalmente na infância, diminuição da imunidade propiciando um aumento das infecções de repetição e alterações da pele (MAFRA & COZZOLINO, 2004).

É sabido que as radiações ionizantes afetam a estrutura das moléculas destruindo suas ligações químicas por ação direta ou indireta. A ação indireta consiste na produção de derivados da radiólise da água (radicais livres hidroxila, íon hidrogênio e elétron desidratado), e a ação direta é a excitação ou ionização do próprio alvo biológico (ROGERO, 1995). Analisando os elementos minerais K e Ca e os elementos traço essenciais Fe e Zn no sangue total, na matriz celular e no plasma humano, conclui-se que mais informações a respeito do balanceamento dos eletrólitos e da condição nutricional do paciente devem ser obtidas.

Os altos valores de desvio padrão encontrados em alguns casos podem ser atribuídos a fatores biológicos devidos a características específicas de cada indivíduo que afetam as diferentes amostras. Para trabalhos futuros, sugere-se que um número maior de amostras seja analisado. Sugere-se ainda, que as amostras sejam analisadas utilizando-se outras técnicas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AKSIROV, A., 2001 “Biological and Medical Applications of SR from the Storage Rings of VEPP-3 and Siberia-2. The Origin of Specific Changes of Small-Angle X-Ray Diffraction Pattern of Hair and Their Correlation with the Elemental Content”, *Nucl. Instr. And Meth.*, v. 470, pp. 380-387.
- AMARAL, A., 2005, “Physical and Biological Dosimetry for Risk Perception in Radioprotection”, *Brazilian Archives of Biology and Technology*, v. 48, pp. 229-234.
- ARFELLI, F., 2000, “Synchrotron Light and Imaging Systems for Medical Radiology”, *Nucl. Instr. And Meth.*, v. 454, pp. 11-25.
- AYALA, R., ALVAREZ, E., WOBRAUSCHEK, P., 1991, “Direct Determination of Lead in Whole Human Blood by Total Reflection X-Ray Fluorescence Spectrometry”, *Spectrochim. Acta*, v. 46, pp. 1429-1432.
- BARCKLA, C., 1911, “The Spectra of the Fluorescent Rontgen Radiations”, *Phil. Mag.*, v. 22, pp.396-412.
- BELLISOLA, G., PASTI, F., VALDES, M., et al., 1999, “The Use of Total -Reflection X-Ray Fluorescence to Track the Metabolism and Excretion of Selenium in Humans”, *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy*, v. 54, pp. 1481-1485.
- BOND, V., FLIEDNER, T., ARCHAMBEAU, J., 1965 “Mammalian Radiation Lethality”, *Academic Press*, pp. 159.
- BORGES, C.V.D., VEIGA, A.P. B, BARROSO, S., et al., 2007, ”Associação Entre Concentrações Séricas de Minerais, Índices Antropométricos e Ocorrência de

Diarréia entre Crianças de Baixa Renda da Região Metropolitana do Rio De Janeiro.” *Rev. Nutr.*, v. 20, n. 2, pp.159-169.

BÖRJESSON, J., ISAKSSON, M., MATTSSON, S., 2003, “X-ray fluorescence analysis in medical sciences: a review”, *Acta Diabetol*, v. 40, pp. 39–44.

BOUMANS, P.; KLOCKENKÄMPER, R., 1989, “Total reflection X-Ray fluorescence spectrometry”, *The Second Workshop on TXRF, Dormund, Spectrochimica Acta*, v. 44B, pp. 433-435.

CALZA , C. F., 2003, *Avaliação dos Níveis de Metais Pesados no Rio Paraíba do Sul através da Análise de Tecidos de Peixes por SRTXRF*. Dissertação de M.Sc. COPPE/UFRJ, Rio de Janeiro, RJ, Brasil.

CANCHO, V.G., 2004, *Noções de Estatística e Probabilidade*, 1ª ed, Ouro Preto, Minas Gerais.

CANELLAS, C. G. L, CARVALHO, S. M. F, JESUS, E. F. O, ANJOS, M. J., LOPES R. T, 2006, “Trace and Major Elements in Serum of Patients with Chronic Myelogenous Leukemia”, *Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry*, v. 269, n.3, pp. 631–634

CARVALHO, M., CUSTODIO, P., REUS, U., 2001, “Elemental Analysis of Human Amniotic Fluid and Placenta by Total-Reflection X-ray Fluorescence and Energy-Dispersive X-Ray Fluorescence: Child Weight and Maternal Age Dependence”, *Spectrochim Acta Part B* 56, pp. 2175-2180.

CARVALHO, M. G; LIGNANI, C; OLIVEIRA, J. M. C; et al, 1993, “Estudo dos efeitos do anticoagulante EDTA sobre as células sanguíneas em diversos intervalos de tempo”, *Rev. Bras. Anal. Clin*; v. 25, n.4, pp.101-105.

- CASTRO, C., 2006, *Tomografia por Difração de Raios X em Tecidos Biológicos Utilizando Radiação Síncrotron*. Tese de Doutorado, COPPE/UFRJ.
- CELIS, B., 1996, “X-Ray Fluorescence Analysis of Gold Ore”, *Applied Spectroscopy*, v. 50, pp. 572-575.
- CENGIZ, M., AKBULUT, S., ATAHAN, I., et al., 2001 “Acute phase response during radiotherapy”, *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, v. 49, pp.1093–1096.
- CENGIZ, M., GÜRKAYNAK, M., VURAL, H., et al., 2003 “Tissue trace element change after total body irradiation”, *Nephron Exp Nephrol*, v. 94, pp.12–16.
- CENGIZ, M., CETIN, E., YILDIZ, F., et al., 2007 “Change in Blood Chemistry May Explain Higher Toxicity of Total Body Irradiation for Bone Marrow Transplantation”. *Medical Hypotheses*, v. 68, pp. 554-557.
- CHEVALLIER, P., DHEZ, P., ERKO, A., et al., 1996, “X-Ray microprobes”, *Nuclear Instruments & Methods in Physics Research B*, v.113, pp.122-127.
- CRONKITE, E., 1990 “Is Natural Background or Radiation from Nuclear Power Plants Leukemogenic?”, In N. Dainiak, E.P. Cronkite, R. McCaffrey, Shaddock R (eds.): *The Biology of Hematopoiesis, Progress in Clinical and Biological Research*, v. 352, p. 439.
- DAINIAK, N., 2002 “Hematologic consequences of exposure to ionizing radiation”, *Experimental Hematology*, v. 30, pp. 513–528.
- FINCH, S.C., 2007, “Radiation-induced leukemia: Lessons from history”, *Best Practice & Research Clinical Haematology*, v 20 (1), pp. 109-118.
- FREDERICKSON, C.J., KOSH, J.Y., BUSH, A.I., 2005, “The neurobiology of zinc in health and disease”, *Nature Reviews-Neuroscience*, v. 6, pp. 449-462.

- GIAUQUE, R.D., GOULDING, F.S., JAKLEVIC, J.M., et al., 1973, “Trace Element Determination with Semiconductor Detector X-Ray Spectrometers”, *Anal. Chem.*, v. 45, pp. 671-681.
- GREAVES, E.D., MEITIN, J., SAJO-BOHUS, L., et al., 1995, “Trace Element Determination in Amniotic Fluid by Total Reflection X-Ray Fluorescence”, *Adv. X-Ray Chem. Anal.*, v. 26, pp. 47-52.
- GREAVES, E., MARCO´ PARRA, L., ROJAS, A., et al., 2000, “Determination of Platinum Levels in Serum and Urine Samples from Pediatric Cancer Patients”, *X-ray Spectrom.*, v. 29, pp. 349– 353.
- HALL, E., 2000, *Radiobiology for the Radiologist*, Lippincott, Williams and Wilkins.
- HOMMA, S. NAKAI, I., MISAWA, S., et al, 1995, “Site-Specific Distribution of Cooper, Selenium, and Zinc in Human Kidney by Synchrotron Radiation Induced XRay Fluorescence”, *Nuclear Instruments & Methods in Physics Research*, v. 101, pp. 229-232.
- HONG, C., CHIANG, B., TURNER, P., 1984, “Calcium ion is the key regulator of human sperm function”, *Lancet*, pp. 1449 –1451.
- HOSSEINIMEHR, S., ZAKARYAEE, V., FROUGHIZADEH, M., 2006, “Oral Oxymetholone Reduces Mortality Induced by Gamma Irradiation in Mice Through Stimulation of Hematopoietic Cells”, *Molecular and Cellular Biochemistry*, v. 287, pp. 193–199.
- IAEA – International Atomic Energy Agency, 1978, “Late Biological effects of Ionazing Radiation”, V. I, International Atomic Agency, Vienna.
- IAEA – International Atomic Energy Agency, 2001, *Cytogenetic Analysis for Radiation Dose Assessment*. v.405, IAEA Technical Report Series, Vienna.
- IYENGAR, G., 1985, *Sample Collection, Treatment, Preservation and Storage of Biomedical Specimens for Trace Element Analysis*, In: Trace Elements in Health

and Disease, Skandia Int. Symp., Almqvist & Wiksell International, Stockholm, pp. 65-79.

JAKLEVIC, J. M., GOULDING, F. S., 1990, "Semiconductor Detector X-Ray Fluorescence Spectrometry Applied to Environmental and Biological Analysis", *IEEE Trans. Nucl. Sci.*, V. NS-19, pp. 384-390.

JANATPOUR, K, DENNING, L., BETLACH, B, et al., 2005, "Comparasion of X Rays Vs Gamma Irradiation of CPDA-1 Red Cells", *Vox Sanguinis.*, v. 89, pp. 215-219.

JAWOROWSKI, Z., 1995, "Beneficial Radiation" – *Nukleonika*, v. 40, pp. 3-12.

JAWOROWSKI, Z., 1997, "Beneficial Effects of Radiation and Regulatory Pollicy", *Australasian Physical & Engineering Sciences in Medicine*, v. 20.

JENKIN, R. et al, 1981, "Quantitative X-ray Spectrometry", Marcel Dekker, Nova Iorque, pp.588.

JENKIN, R.; GOULD, R. W.; GEDCKE, D., 2000, "Applied spectroscopy review", *Wil. Int. Pub.*, v. 35, pp. 129 – 150.

JOINER, M., MARPLES, B., LAMBIN, P., et al., 2001, "Low-Dose Hypersensitivity: Current Status and Possible Mechanisms", *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, v. 49, pp. 379–389.

KAHDIM, M., MOORE, S., GOODWIN, E., 2004 "Interrelationships Amongst Radiation-Induced Genomic Instability, Bystander Effects, and the Adaptive Response", *Mutat Res*, v. 568, pp. 21–32.

KLOCKENKÄMPER, R.; KNOTH, J.; PRANGE, A; SCHWENKE, H., 1992, "Total Reflection X-Ray Fluorescence Spectroscopy", *Analytical Chemistry*, v. 64, pp. 1115A – 1123A.

- KLOCKEMKÄMPER, R., VON BOHLEN, A., 1996, “Elemental Analysis of Environmental Samples by Total Reflection Fluorescent: A Review”, *X-Ray Spectrometry*, v. 25, pp. 156-162.
- KONDO, S., 1993 “Health Effects of Low-level Radiation”, Kinki U. P., Osaka, Japan, pp. 21-22.
- KOOPMANN, C., PRANGE, A., 1991 “Multielement Determination in Sediments from the German Wadden Sea – Investigations on Sample Preparation Techniques” *Spectrochim. Acta*, v. 46, pp. 1395-1402.
- KREGSMER, 1991
- LACHANCE, G.R., CLAISSE, F., 1995, *Quantitative X-Ray Fluorescence Analysis: Theory and Application*, 1 ed, John Willey & Sons, New York.
- LADISICH, W., RIEDER, R., WOBRAUSCHEK, P., 1993, “Total Reflection X-Ray Fluorescence Analysis with Monoenergetic Excitation and Full Spectrum Excitation Using Rotating Anode X-Ray Tubes”, *Nuclear Instruments & Methods in Physics Research A*, v. 330, pp. 501-506.
- LEITÃO, C., 2005, *Avaliação Multielementar em Soro Humano de Indivíduos Portadores de Leucemia Mielóide Crônica (LMC) Usando SRTXRF*. Tese de D.Sc., COPPE/UFRJ, Rio de Janeiro, RJ, Brasil.
- MAFRA, D., COZZOLNO, S.M.F., 2004, “Importância do zinco na nutrição humana”, *Revista de Nutrição*, v. 17, pp. 79-87.
- MARCÓ, L., GREAVES, E., ALVARADO, J., 1999, “Analysis of Human Blood Serum and Human Brain Samples by Total Reflection X-Ray Fluorescence Spectrometry applying Compton peak Standardization”, *Spectrochim. Acta*, v. 54, pp. 1469-1480.

- MARCÓ, L., CAPOTE, T., HERNÁNDEZ, E., et al., 2001, “Feasibility Study on in Situ Microwave Digestion Prior to Analysis of Biological Samples by Total Reflection X-Ray Fluorescence Spectrometry”, *Spectrochim. Acta*, v. B56, pp. 2187-2193.
- MARCÓ, L., HERNÁNDEZ, E., 2004 “Direct Analysis of Biological Samples by Total Reflection X-Ray Fluorescence”, *Spectrochimica Acta*, v. 59, pp. 1077– 1090.
- MAGALHÃES, T., von BOHLEN, A., CARVALHO, M., et al., 2006, “Trace Elements in Human Cancerous and Healthy Tissues from the Same Individual: A Comparative Study by TXRF and EDXRF”, *Spectrochimica Acta B*, pp. 1185-1193.
- MARPLES, B., WOUTERS, B., COLLIS, S., CHALMERS, A., JOINER, M., 2004 “Low-Dose Hyper-Radiosensitivity: a Consequence of Ineffective Cell Cycle Arrest of Radiation-Damaged G2-Phase Cells”, *Radiat Res*, v. 161, pp.247–255.
- MARTINEZ, T., LARTIGUE, J., AVILA-PEREZ, P., et al., 2004, “Determination of Trace Elements in Blood Samples by TXRF Analysis”, *Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry*, v. 259, pp. 511-514.
- MATSUOKA Y. HOSOKAWA, Y, MASAYUKI, H., et al, 2005, “Study of the Sampling Method of Blood Samples for Total-Reflection X-ray Fluorescence” *Bunseki Kagaku*, v. 54, n.9, pp. 749-753.
- MAUCH, P., CONSTINE, L., GREENBERGER, J., et al., 1995, “Hematopoietic stem cell compartment: acute and late effects of radiation therapy and chemotherapy”, *Int J Radiat Biol Oncol Biol Phys*, v. 31, pp. 1319–1339.
- MELO JUNIOR, A., 2007 *Análise Quantitativa do Material Particulado na Região de Campinas Através das Técnicas de Microfluorescência de Raios X e Reflexão Total Usando Radiação Síncrotron*. Tese* de D.Sc., UNICAMP, Campinas, SP, Brasil.

- MISTRA, N., SINGH MUDHER, K., 2002, “Total Reflection X-ray Fluorescence: a Technique for Trace Element Analysis in Materials”, *Progress in Crystal Growth and Characterizations of Materials*, pp.65-74.
- MOCCHIGIANI, E., MUZZIOLI, M., CIPRIANO, C., et al., 1998, “Zinc, T-cell pathways, aging: role of metallothioneins”, *Mechanisms of Ageing and Development*, v.106, (SEPT), pp.183-204.
- MOODY, J., 1982, “The sampling, handling and storage of materials for trace analysis”, *Philos. Trans.R. Soc.*, v. 305, pp. 669.
- MORTON, B., SAGADRACA, R., FRASER, C., 1978, “Sperm motility within the mammalian epididymis: species variation and correlation with free calcium levels in epididymal plasma”, *Fertil Steril*, v. 29, pp. 659 –698.
- MOSELEY, H. G. J., 1912, “The High-Frequency Spectra of the Elements”, *Phil. Mag.*, v.26, pp. 1024-1034, USA.
- MOTHERSILL, C., SEYMOUR, C., JOINER, M., 2002, “Relationship Between Radiation-Induced Low-Dose Hypersensitivity and the Bystander Effect”, *Radiat Res*, v. 157, pp.526–532.
- NASCIMENTO, V., 1999, *Técnicas Analíticas Nucleares de Fluorescência de Raios X por Dispersão de Energia (ED-XRF) e por Reflexão Total (TXRF)*, disponível online: www.cena.usp.br/apostilas/Virgilio/CEN-5723/EDXRF_TXRF.doc, pesquisa realizada em 20/06/2007.
- NASONOVA, E., SHMAKOVA, N., KOMOVA, O., et al., 2006, “Cytogenetic effects of low-dose radiation with different LET in human peripheral blood lymphocytes”, *Radiation and Environmental Biophysics*, v. 45, pp. 307-312.
- NETA, R., 1997, “Modulation with cytokines of radiation injury: suggested mechanism of action”, *Environ Health Perspect*, v. 105, pp. 1463–1465.

- OKUNO, E., 1998, *Radiação: Efeitos, Riscos e Benefícios*, Editora Harbra, São Paulo, pp. 213-244.
- OLIVEIRA, M.R.A.A, 1991, *Princípios da Fisiologia. Aspectos clínicos: estudo laboratorial*, 1º ed., Campus, São Paulo, Brasil.
- OVERBEEK, F., PAUWELS, E., BLOEM, J., CAMPS, J., GELEIJNS, J., 1999, “Somatic effects in nuclear medicine and radiology”, *Appl. Rad. Isot.*, v. 50, pp. 63-72.
- PODGORSK, E.B., 2005, “Radiation Oncology Physics: A Handbook for Teachers and Students”, IAEA.
- PRANGE, A., e H. SCHWENKE, 1989, “Sample Treatment for TXRF: Requirements And Prospects”. *Adv. X-Ray Anal.*, v. 32: pp. 211.
- PRANGE, A.; BÖDDEKER, H.; KRAMER, K., 1993, ‘Determination of Trace Elements in Riverwater using Total-Reflection X-Ray Fluorescence’, *Spectrochimica Acta*, v. 48, pp. 207- 215.
- PRIEN, S., LOX, C., MESSER, R., et al., 1990, “Seminal concentrations of total and ionized calcium from men with normal and decreased motility”, *Fertil Steril*, v. 54, pp. 171–172.
- PRINS, M. DAVIES, S.T., BOWEN, D. R., 1984, “Trace Element Analysis and Element Mapping by Scanning X-Ray Fluorescence at Daresbury SRS”, *Nuclear Instruments & Methods in Physics Research*, v. 222, pp. 324-328.
- RUIFROK, A., MCBRIDE, W., 1999, “Growth factors: biological and clinical aspects”, *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, v. 43, pp. 877–881.
- RUSSEL, W., 1956, “Lack of linearity Between Mutation Rate and Dose for X-Ray Induced Mutation in Mice”, *Genetics*, v. 41, pp. 658-660.

- SALGADO, J. M. O, 2000, *Previna Doenças. Faça do Alimento o seu Medicamento e Farmácia de Alimentos. Recomendações para Prevenir e Controlar Doença*", 1º Ed. Madras, Brasil.
- SCHEPLYAGINA, L., 2005, "Impact of the Mother's Zinc Deficiency on the Woman's and Newborn's Health Status", *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*, v. 19, pp. 29-35.
- SERPA, R., JESUS, E., ANJOS, M., et al., 2006, "Elemental concentration in the cortex and hippocampus of Wistar rats by X-ray total reflection fluorescence with synchrotron radiation", *Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry*, v. 269, pp.647 - 652.
- SERPA, R. 2007, *Análise Multielementar de Tecidos Cerebrais Através da Microfluorescência de Raios X porreflexão Total*. Tese de D.Sc., COPPE/UFRJ, Rio de Janeiro, RJ, Brasil
- SHOUSE, S., WARREN, A., WHIPPLE, G., 1913 "Apalasia of Marrow and Fatal Intoxication in Dogs Produced by Roentgen Irradiation of all Bones", *J Exp Med*, v: 53, pp. 421.
- SILVA-BARBOSA, I., PEREIRA-MAGNATA, S., AMARAL, A., et al., 2005, "Dose Assessment by Quantification of Chromosome Aberrations And Micronuclei in Peripheral Blood Lymphocytes from Patients Exposed to Gamma Radiation", *Genetics and Molecular Biology*, v. 28(3), pp. 452-457.
- STRELI, C.; et al., 1992 "Light Element Analysis with TXRF. Advances in X-ray Analysis", 35, p. 947. (PEGAR REFERÊNCIA CERTA NO GOOGLE)
- TAKEDA, T. et al, 1998, "Medical Applications of Synchrotron Radiation", *Phys. Med. Biol.* 48, R1-R35.

- TAKEDA, A., 2000, "Movement of zinc and its functional significance in the brain", *Brain Research Reviews*, v. 34, pp. 137-148.
- TRAVIS, E., 2001 "Organizational response of normal tissues to irradiation", *Semin Radiat Oncol*, v: 11, pp. 184–196.
- UNSCEAR - United Nations Scientific Committee on the Effects of Atomic Radiation, 1993, "Sources and effects of ionizing radiation". New York United Nations, Report to the General Assembly, with Scientific Annexes.
- VENKATESH, G., SUBRAMANIAN, K., WOITTEZ, J., 1998, "Elements Analysis of Biological Samples: Principles and Practices", Boca Raton, FL: CRC Press, New York, pp. 255.
- VERSIECK, J., VANBALLENBERGHE, L., 1994 "Collection, Transport and Storage of biological samples for the determination of trace metals", in *Handbook of Metals in Clinical and Analytical Chemistry*, Seiler, H., Sigel, A. and Sigel, H., Eds., Marcel Dekker, New York, pp. 31-44.
- WATT, F., LANDSBERG, J., 1993, "Nuclear microscopy: biomedical applications", *Nuclear Instruments & Methods in Physics Research B*, v. 3, pp. 232-240.
- YANAGIMACHI, R, USUI N., 1974, "Calcium dependent of the acrosome reaction and activation of guinea pig spermatozoa", *Exp Cell Res*, v. 89, pp. 161–74.
- YUYING, H. YINGRONG, W., LIMIN, Z., et al, 2001, "Beijing synchrotron radiation total-reflection X-Ray fluorescence analysis facility and its applications on trace element study of cells", *Spectrochimica Acta Part B*, v. 56, pp. 2057-2062.
- YAP, C., GUNAWARDENA, V., 1989, "TXRF Spectrometric Analysis of Major Elements in Mineral Sands", *Applied Spectroscopy*, v.43, n.4, pp. 702-704.

ZAMBONI, C., DALAQUA J., L., LINS, P., 2005, “Física do núcleo aplicada ao estudo do sangue”, In: *Anais XVI SNEF.*, Rio de Janeiro.