

ANÁLISE DOS PERFIS DE ESPALHAMENTO COERENTE DE  
RAIOS X DE AMOSTRAS LIOFILIZADAS DE SANGUE  
HUMANO TOTAL E DERIVADOS

Rogério de Andrade Filgueiras

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<sup>a</sup>. Regina Cely Barroso, D.Sc.

---

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

---

Prof<sup>a</sup>. Silvana Moreira, D.Sc.

RIO DE JANEIRO, RJ – BRASIL

NOVEMBRO DE 2006

FILGUEIRAS, ROGÉRIO DE ANDRADE

Análise dos perfis de espalhamento coerente de raios x de amostras liofilizadas de sangue humano total e derivados [Rio de Janeiro] 2006.

IX, 77p. 29,7 cm (COPPE/UFRJ, M.Sc., Engenharia Nuclear, 2006)

Dissertação – Universidade Federal do Rio de Janeiro, COPPE

1. Espalhamento Coerente de Raios X
2. Sangue
3. Luz Síncrotron

I. COPPE/UFRJ II. Título (série)

*"Dedico esta dissertação de mestrado a minha  
filha Ana Clara e minha esposa Érica Cristina."*

# AGRADECIMENTOS

---

A Deus, em primeiro lugar.

Ao Prof. Delson Braz pela orientação, atenção, paciência e compreensão durante todo o desenvolvimento deste trabalho de pesquisa.

À querida Prof. Regina Cely Barroso pela ajuda nos momentos mais complicados, pelo grande apoio moral, pela experiência, paciência e pelo privilégio de sua amizade que se iniciou no desenvolvimento deste trabalho.

Ao Prof. Ricardo Tadeu Lopes pelos esclarecimentos e colaborações durante todo o período do curso.

À Prof. Cátia Martins Leite Padilha pela imperiosa ajuda na área biológica e pela aquisição das amostras indispensáveis ao desenvolvimento deste trabalho de pesquisa.

Aos colegas do Laboratório de Instrumentação Nuclear (LIN): João Carlos, Cristiano, Nívia, Ana Paula e todos os demais alunos e funcionários.

Aos alunos de Iniciação Científica Bruno Gonçalves de Ornelas Castro, Leonardo Mendonça e Maurício Quelhas Antolin pela ajuda na preparação das amostras e tratamento dos dados.

Ao Laboratório de Análises Clínicas Eliel Figueiredo, em especial ao Dr. Eliel Figueiredo, Edinaldo Martins, Leiane Couto pela doação das amostras.

À minha esposa Érica por todo seu amor dedicado a nossa família e pela ajuda incondicional em todas as fases de elaboração trabalho de pesquisa.

À minha filha Ana Clara pela compreensão, apesar da pouca idade, de minha ausência em vários momentos.

Aos meus pais Osmar e Laís por todo amor, carinho, apoio e atenção que vocês sempre me deram.

A todos meus familiares que contribuíram direta e indiretamente para elaboração deste trabalho.

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

ANÁLISE DOS PERFIS DE ESPALHAMENTO COERENTE DE RAIOS X DE  
AMOSTRAS LIOFILIZADAS DE SANGUE HUMANO TOTAL E DERIVADOS

Rogério de Andrade Filgueiras

Novembro/2006

Orientador: Delson Braz

Programa: Engenharia Nuclear

As potenciais aplicações das medidas de espalhamento coerente de raios X são atualmente de grande interesse entre a comunidade da área de física médica. Espalhamento a baixo ângulo para a caracterização do sangue é baseado nas interferências moleculares e intermoleculares que fornecem um perfil único e característico. Neste trabalho, são apresentadas as assinaturas de espalhamento obtidas a partir das amostras de sangue liofilizadas. As medidas de espalhamento das amostras pulverizadas de sangue total, elementos figurados, plasma e hemoglobinas foram realizadas no Laboratório Nacional de Luz Síncrotron (LNLS) e no Laboratório de Instrumentação Nuclear (LIN/COPPE/UFRJ). As amostras de sangue fresco foram obtidas de voluntários por meio de punção venosa e, então, liofilizadas para remoção da água. As assinaturas apresentam dois picos largos, que são típicos de amostras amorfas. A posição dos picos, suas FWHM e intensidades relativas foram medidas e relacionadas ao sexo, idade, nível de hemoglobina A1c e tipos de hemoglobinas variantes. A análise estatística mostra que as variações encontradas nos parâmetros de caracterização para o plasma são significantes quando comparadas ao sangue total, elementos figurados e hemoglobinas. Além disso, o plasma apresenta ainda dois picos estreitos. O teste-t sugere que a variação é significativamente diferente para o sangue total considerando à idade.

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

COHERENT X-RAY SCATTERING SIGNATURES ANALYSIS FOR  
LYOPHILIZED SAMPLES FROM HUMAN WHOLE BLOOD AND  
HEMODERIVED

Rogério de Andrade Filgueiras

November / 2006

Advisor: Delson Braz

Department: Nuclear Engineering

The potential applications of coherent X-ray scatter measurements are nowadays of great interest among the medical physics community. Low-angle x-ray scatter for blood characterization is based in molecular and intermolecular interference effects which give rise to a unique and characteristic profile. In this work, we present the scattering signatures obtained for lyophilized blood samples. Scattering measurements for powdered whole blood, formed elements, plasma and haemoglobin samples were carried out in the Brazilian Synchrotron Light Laboratory (LNLS) and Nuclear Instrumentation Laboratory (LIN/COPPE/UFRJ). Fresh blood specimens were obtained from volunteers by vein puncture and then, lyophilized to removal the water. The signatures show similar shape presenting two broad peaks, which are typical for amorphous samples. The position of peaks, their FWHM and relative intensities were measured and related with gender, age, level of HBA1c and haemoglobin types. The statistical analysis shows that the variation found for the plasma characterization parameters is significant for whole blood, formed elements and haemoglobin. Besides, the profile for plasma presents two sharp peaks. The t-tests suggest that the variation found for the characterization parameters is significant for whole blood considering the age.

# ÍNDICE

<b>Capítulo I</b>	<b>Introdução</b> .....	01
1.1	O Sangue .....	01
1.2	Perfis de Espalhamento .....	02
1.3	Objetivos do Trabalho .....	04
<b>Capítulo II</b>	<b>Considerações Teóricas</b> .....	06
2.1	A Importância do Sangue.....	06
2.2	Principais Células do Sangue .....	07
2.3	Hemoglobina .....	10
2.4	Fracionamento do Sangue .....	10
2.5	Coagulação de Sangue .....	12
2.6	EDTA .....	12
2.7	Diabetes .....	12
2.8	Hemoglobinopatias .....	13
2.8.1	Hemoglobina C .....	14
2.8.2	Hemoglobina S .....	15
2.9	Liofilização .....	16
2.10	Espalhamento Coerente de Raios X .....	19
2.11	Luz Síncrotron .....	21
2.12	Estatística .....	22
2.12.1	População e Amostra .....	23
2.12.2	Estatística Descritiva .....	23
2.12.3	Medidas de Posição .....	24
2.12.4	Medidas de Dispersão .....	25
2.12.5	Boxplot .....	26
2.12.6	Inferência Estatística .....	27
2.12.7	Estimação de Parâmetros .....	27
2.12.8	Estimativa da Média da População Quando não é Conhecido o Desvio Padrão.....	28

2.12.9	Testes de Hipóteses .....	29
2.12.10.	Análise de Variância .....	31
<b>Capítulo III</b>	<b>Materiais e Métodos .....</b>	<b>32</b>
3.1.	Preparação das Amostras .....	32
3.2.	Medidas de Espalhamento .....	37
3.2.1.	Difratômetro Comercial .....	37
3.2.2.	Laboratório Nacional de Luz Síncrotron .....	39
3.3.	Parâmetros de Caracterização .....	40
<b>Capítulo IV</b>	<b>Resultados e Discussões .....</b>	<b>43</b>
4.1.	Perfis de Espalhamento .....	44
4.2.	Estatística Descritiva dos Parâmetros de Caracterização .....	48
4.3.	Testes de Hipótese .....	52
4.3.1.	ANOVA - Parâmetros de Caracterização .....	53
4.3.2.	Teste-t – Sexo e Idade dos Doadores .....	55
4.3.3.	Teste-t – Hemoglobinas A1c e Variantes .....	60
<b>Capítulo V</b>	<b>Conclusão e Trabalhos Futuros .....</b>	<b>66</b>
5.1.	Diferenciação entre os Tipos de Amostras Estudadas .....	66
5.2.	Diferenciação entre Sexos .....	68
5.3.	Diferenciação entre Faixas Etárias .....	68
5.4.	Diferenciação entre Níveis de Hemoglobina A1c .....	69
5.5.	Diferenciação entre Tipos Variantes de Hemoglobinas .....	70
5.6.	Trabalhos Futuros e Sugestões .....	71
5.7.	Considerações Finais .....	72
<b>Referências Bibliográficas</b>	<b>.....</b>	<b>74</b>

# CAPÍTULO I

---

## INTRODUÇÃO

### 1.1. O Sangue

O sangue é uma variedade de tecido conjuntivo que funciona como um eficiente sistema de transporte de centenas de substâncias que são essenciais ao funcionamento do organismo humano. O sangue é basicamente formado por uma parte líquida, o plasma, na qual está misturada a parte sólida – composta pelas hemácias, leucócitos e plaquetas; que são os elementos figurados do sangue (CAZARIN, 2005).

O plasma é um líquido amarelo claro que representa aproximadamente 55% do volume total do sangue. Segundo TORTORA & GRABOWSKI (2006), o plasma é constituído de 91,5% de água, onde se encontram dissolvidas proteínas, açúcares, gorduras, sais minerais, enzimas, hormônios, etc. Por meio do plasma circulam por todo o organismo os elementos nutritivos necessários à vida das células.

Os elementos figurados representam aproximadamente 45% do volume total de sangue. As hemácias, também chamadas de glóbulos vermelhos ou eritrócitos, são as células que existem em maior quantidade no sangue e são responsáveis pela sua coloração avermelhada. A função das hemácias é transportar o oxigênio dos pulmões para as células de todos os tecidos do organismo e eliminar o gás carbônico das células transportando-os de volta aos pulmões. A proteína encontrada no interior das hemácias que é responsável por esse transporte é chamada de hemoglobina (CAZARIN, 2005).

Os leucócitos, ou glóbulos brancos, distinguem-se em cinco variedades: neutrófilos, eosinófilos, basófilos, linfócitos e monócitos. O sangue possui um número bem menor de glóbulos brancos do que vermelhos (OLIVEIRA, 2003). Segundo SOUZA & ELIAS (2006) os leucócitos são, ao contrário dos eritrócitos, nucleados e constituem a parte celular do sistema imunológico ou de defesa do organismo contra substâncias estranhas e microorganismos patológicos (vírus, bactérias, fungos, etc).

As plaquetas, as quais fazem parte do mecanismo primário da hemostasia e da coagulação, têm origem a partir dos megacariócitos (OLIVEIRA, 1990; JAMRA & LORENZI, 1997).

Em muitas circunstâncias, é interessante realizar o fracionamento do sangue total. Nesse processo, o sangue é separado em três grandes componentes primários: glóbulos (vermelhos e brancos), plasmas e plaquetas. O fracionamento do sangue total traz vantagens em relação ao aproveitamento e eficácia, aumentando o tempo de validade de todos os componentes sangüíneos. Além disso, diminui o risco das transfusões e beneficiam no mínimo três pacientes por doação (RAZOUK & REICH, 2004).

## **1.2. Perfis de Espalhamento**

Nas últimas décadas, muitos autores, têm realizado medidas de perfis de espalhamento a baixo ângulo (LAXS) de amostras biológicas (EVANS *et al.*, 1991; ELSHEMEY *et al.*, 1999; DESOUKY *et al.*, 2001; CASTRO *et al.*, 2004). O crescente interesse em tais medidas deve-se à natureza característica do espalhamento coerente da radiação. Dessa forma, LAXS de amostras biológicas, como o sangue e seus

componentes, tem importância nos campos da biologia e medicina. Por meio do LAXS entende-se a estrutura molecular da amostra, ou seja, a natureza dos picos disponíveis nos perfis de espalhamento fornece uma assinatura que é característica do material em estudo. Assim, é importante que se faça um levantamento dos perfis de espalhamento de sangue total e dos seus constituintes. Com isso, será possível comparar os perfis característicos de sangue normal com aquele de pessoas que apresentem algum tipo de alteração fisiológica no sangue.

O espalhamento coerente das amostras biológicas é dominado pelo perfil da água (ELSHEMEY *et al.*, 2001; CASTRO, 2005), já que os tecidos biológicos são em grande parte compostos dessa substância. A remoção da água por liofilização produz espectros consideravelmente diferentes das amostras não liofilizadas. Essa técnica, também conhecida como desidratação a frio (*freeze dry*) é um eficiente processo de secagem de amostras biológicas que preserva células, enzimas, vacinas, vírus, soros, derivados sanguíneos, etc (BOSS, 2004). Na liofilização, as amostras biológicas são submetidas à baixa temperatura e pressão fazendo com que a água presente se transforme em gelo que, em seguida, devido à baixa pressão sublimará, ou seja, passará do estado sólido diretamente para o gasoso – desidratando a amostra.

No caso de materiais amorfos os padrões de difração não produzem picos estreitos como nos materiais cristalinos, pois os arranjos dos átomos são irregulares (BARROSO *et al.*, 2000). No caso do sangue total, os perfis de espalhamento possuem picos bastantes largos devido, principalmente, às estruturas de moléculas grandes como, por exemplo, as proteínas. Entretanto, o sangue possui algumas estruturas cristalinas presentes, que podemos observar de forma evidente no plasma sanguíneo.

### 1.3. Objetivos

A caracterização de amostras liofilizadas de sangue total, elementos figurados, plasma e hemoglobinas foi realizada através da obtenção de perfis de espalhamento coerente de raios X. As medidas foram realizadas no Laboratório Nacional de Luz Síncrotron – LNLS, Campinas, São Paulo.

Além das medias realizadas no LNLS, os perfis também foram obtidos em um difratômetro comercial no Laboratório de Instrumentação Nuclear (LIN/COPPE/UFRJ), a fim de se comparar com àqueles medidos no LNLS e verificar de que forma a estatística de contagem interfere na definição dos perfis de espalhamento coerente de raios X.

Os perfis obtidos fornecem “assinaturas” que são características de cada uma das amostras mencionadas. Dessa forma, será possível, também, estudar as prováveis mudanças fisiológicas do sangue relativas ao sexo e idade dos doadores. Da mesma forma como são feitos nos laudos de diagnósticos nos laboratórios de análises clínicas.

Vários tipos de doenças também são responsáveis por alterações na fisiologia do sangue. Assim, primeiramente foram estudados os perfis de espalhamento de pacientes com alterações no nível de hemoglobina glicosilada (relacionada a diabetes *melitus*). Um segundo estudo está relacionado a tipos variantes de hemoglobinas de agregação S e C (NAOUM, 1987) que ocorrem quando há substituição de aminoácidos na cadeia beta, desencadeando uma agregação em grandes polímeros (CAMPOS *et al.*, 2006; LEONELI *et al.*, 2000; JEANNE, 1987). Os perfis encontrados foram comparados com o grupo de controle, ou seja, de indivíduos que não apresentem a patologia estudada.

Esse estudo possibilita a compreensão dos perfis de espalhamento coerente dos principais componentes do sangue por meio da sua caracterização. Com isso, será possível, futuramente, comparar esses perfis com aqueles de pacientes que sofram de outras patologias – principalmente aquelas ligadas às alterações moleculares do sangue. A caracterização também poderá ser útil no estudo de exposição das amostras de sangue às radiações ionizantes de diferentes tipos e energias.

O presente estudo não se propõe à descoberta de um novo método de diagnóstico em hematologia, entretanto pretende-se contribuir com os avanços científicos e tecnológicos ocorridos nos últimos dez anos que tiveram conseqüências muito positivas nas áreas de hematologia, banco de sangue e hemoterapia.

# CAPÍTULO II

---

## CONSIDERAÇÕES TEÓRICAS

### 2.1. A Importância do Sangue

Nos animais ditos superiores, existem dois principais sistemas de coordenação: o nervoso, que controla e comanda todo o organismo, e o sistema endócrino, que engloba todas as glândulas internas que fabricam substâncias (hormônios) necessárias ao corpo, coordenando seu funcionamento.

O sistema nervoso funciona de forma independente, porque através de suas ramificações alcança todos os tecidos do corpo. Já o sistema endócrino precisa do sangue para liberar, transportar e distribuir seus hormônios por todo o organismo (MOTTA *et al.*, 2004). O sangue funciona, portanto, como um eficiente sistema de transporte de centenas de substâncias que são essenciais ao funcionamento do organismo humano.

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 (OLIVEIRA, 2003). O controle da temperatura do corpo, o equilíbrio da distribuição de água e o processo de absorção celular também estão diretamente ligados ao sangue.

Segundo BONACELLA (1991), a água é substância que existe em maior quantidade nos seres vivos, pois além de fazer parte das células vivas, desempenha importantes funções como solventes que transporta as substâncias pelo organismo e como a principal via de integração com o meio. Cerca de 60% do corpo humano é constituído de água. O sangue é o principal distribuidor dessa água, nas quantidades necessárias a cada atividade orgânica. Além disso, o sangue regula o teor de acidez das células, controlando substâncias químicas simples que elas contêm, tais como sais, bicarbonato, uréia e outras. Encarregado de tantas e variadas atribuições o sangue é uma variedade de tecido conjuntivo e pode ser considerado o único tecido líquido do corpo.

## **2.2. Principais Células do Sangue**

Os elementos celulares que constituem o sangue têm forma, tamanho e funções distintas. Os glóbulos vermelhos, também chamados de hemácias ou eritrócitos, são as células que existem em maior quantidade no sangue. No interior das hemácias encontra-se um pigmento avermelhado denominado hemoglobina (RAZOUK & REICH, 2004).

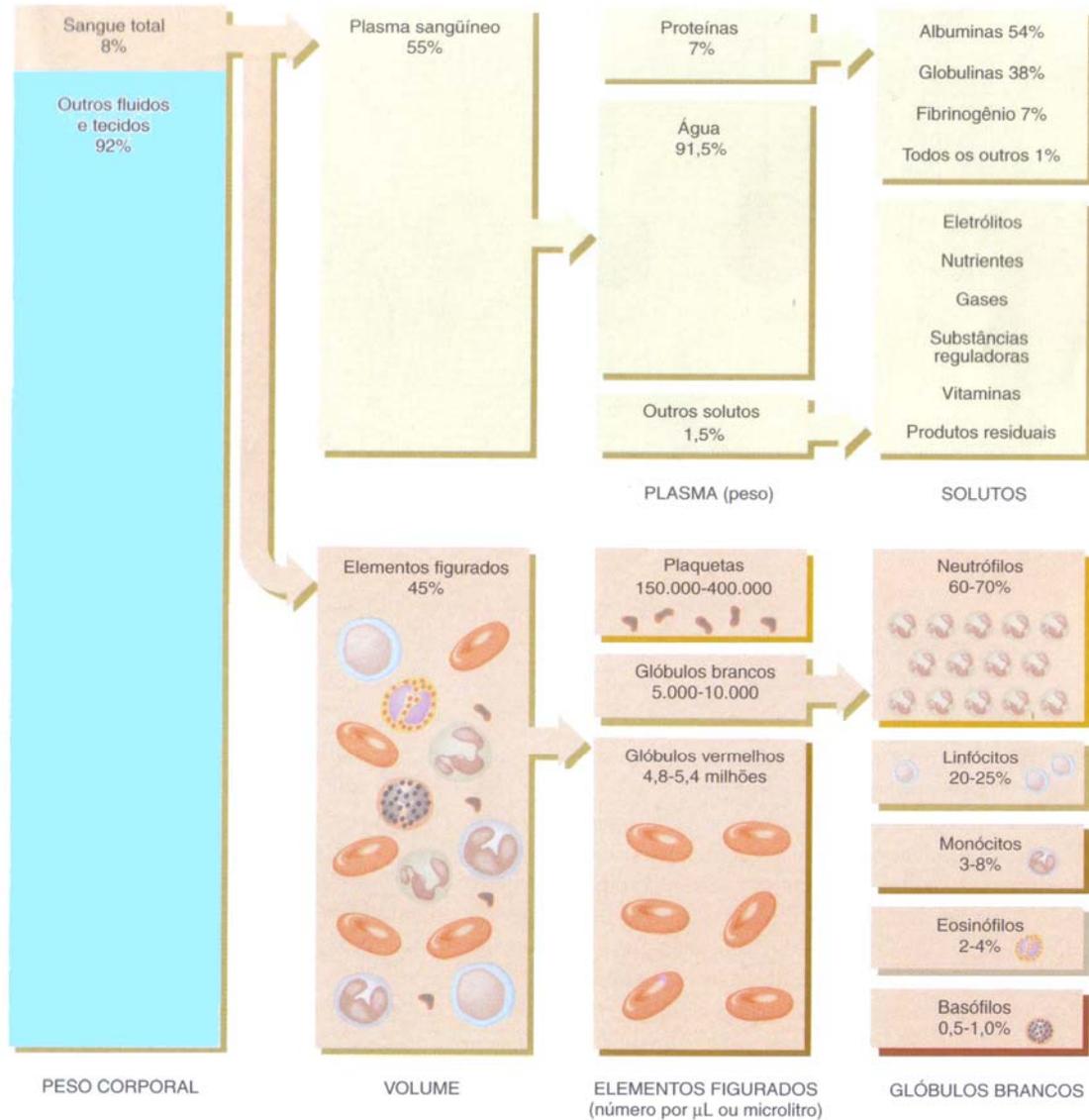
Quando a hemoglobina está saturada de oxigênio assume uma coloração avermelhada viva (sangue arterial), quando saturada de gás carbônico, torna-se vermelho escuro (sangue venoso). Em cada milímetro cúbico de sangue existem cerca

de 4,5 milhões de glóbulos vermelhos, no homem, e aproximadamente 4 milhões, na mulher (OLIVEIRA, 2003).

O sangue também tem importância na defesa da integridade do organismo. Estão concentrados nele os principais meios de defesa contra o ataque de agentes externos. Os leucócitos são os principais agentes desse mecanismo.

Um terceiro elemento de importância fundamental no sangue são as plaquetas. Sua relevância reside no mecanismo da hemóstase e na coagulação do sangue. O seu número normal é de 150 mil a 400 mil por milímetro cúbico (OLIVEIRA, 2003).

A parte líquida do sangue forma o plasma sanguíneo, onde os glóbulos e as plaquetas ficam suspensos. O plasma consiste em 91,5 de água, 7% de proteínas e 1,5% de solutos não-protéicos (TORTORA & GRABOWSKI, 2006). Em cada litro de sangue existem de 60 a 80 gramas de proteínas. A Figura 2.1 mostra a composição do plasma sanguíneo e as quantidades dos vários tipos de elementos figurados no sangue.



**Figura 2.1.** - Componentes do Sangue (TORTORA & GRABOWSKI, 2006).

As proteínas plasmáticas mais abundantes são as albuminas, que correspondem a cerca de 54% de todas as proteínas do plasma. Entre outras funções, as albuminas ajudam na troca de fluido através das paredes dos vasos capilares. As globulinas, que compõem 38% das proteínas plasmáticas, incluem os anticorpos ou imunoglobulinas, proteínas de defesa produzidas durante certas respostas imunes. O fibrinogênio perfaz em torno de 7% das proteínas plasmáticas e é uma proteína essencial na formação dos

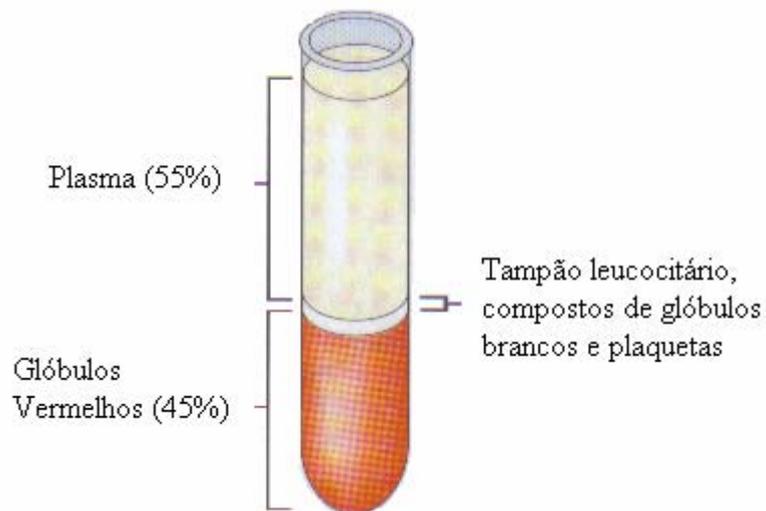
coágulos sanguíneos. Os outros solutos do plasma incluem os eletrólitos, nutrientes, gases, substâncias reguladoras como as enzimas e os hormônios.

### **2.3. Hemoglobina**

Segundo NAOUM (1987), a hemoglobina (Hb) é composta pela conjugação de um pigmento, o heme, e uma proteína, a globina. O heme é um complexo formado por um átomo de ferro que lhe dá a cor vermelha característica da hemoglobina. A globina consiste de dois pares de cadeias polipeptídicas (o tetrâmero) com um total de 574 aminoácidos. Assim, a molécula de hemoglobina tetramerizada apresenta dimensões de 50 x 55 x 64nm e peso molecular de 64.458 Daltons. Duas das cadeias que participam na formação do tetrâmero possuem 141 aminoácidos, cada denominada por tipo alfa, e as outras duas, com 146 aminoácidos são conhecidas por tipo beta.

### **2.4. Fracionamento do Sangue**

Quando uma amostra de sangue é centrifugada (rotação de alta velocidade) ou deixada para decantação em um pequeno tubo de vidro, as células depositam-se no fundo do tubo e o plasma sanguíneo, de menor peso, forma uma camada acima delas conforme mostra a figura 2.2. No sangue, cerca de 45% são elementos figurados e 55%, plasma. Normalmente, mais de 99% dos elementos figurados são constituídos pelos glóbulos vermelhos. A porcentagem do volume de sangue total ocupado pelos glóbulos vermelhos é denominada hematócrito.



**Figura 2.2.** - *Aspecto do sangue fracionado.*

As células pálidas ou descoradas, denominadas de glóbulos brancos, e as plaquetas ocupam menos de 1% do volume sanguíneo total. Elas formam uma camada muito delgada, chamada tampão leucocitário, entre os glóbulos vermelhos compactados e o plasma sanguíneo.

A partir do plasma fresco congelado pode se obter um outro produto que é o crio precipitado de fator anti-hemofílico, rico em fator VIII e fibrinogênio, principalmente, e tem como a sua indicação primeira o tratamento da hemofilia (OLIVEIRA, 2003). No entanto, hoje progressivamente, está sendo substituído pelos concentrados purificados, de fator VIII. O plasma pode ser encaminhado para uma indústria de fracionamento para serem obtidas a albumina, concentrados de gamaglobulina e os concentrados de fator anti-hemofílicos para tratamento da hemofilia. É possível ainda obter-se alguns outros produtos oriundos de plasma através da indústria de fracionamento.

## 2.5. Coagulação do Sangue

Normalmente, o sangue flui no organismo em contato com o endotélio vascular. Quando o sangue sai do interior dos vasos, perde a fluidez, torna-se viscoso e, em pouco tempo, forma-se um gel (coágulo) que se separa da parte líquida. Esse líquido de cor amarelada é chamado de soro que nada mais é que o plasma sem suas proteínas de coagulação. O coágulo consiste em uma malha de fibras protéicas insolúveis denominada fibrina, no qual os elementos figurados do sangue ficam aprisionados. Segundo TORTORA & GRABOWSKI (2006) a coagulação é um processo complexo, no qual várias substâncias químicas conhecidas como fatores de coagulação (íons cálcio, enzimas, e moléculas associadas a plaquetas ou a tecidos danificados) ativam-se uns aos outros.

## 2.6. EDTA

O EDTA (ácido etilenodiamino tetra-acético) é um composto orgânico que age como ligante, formando complexos muito estáveis com diversos íons metálicos. Devido a isso, o EDTA é usado para preservar o sangue, pois se liga aos íons cálcio bloqueando a cascata de coagulação. A sua fórmula química ( $C_{10}H_{16}N_2O_8$ ).

## 2.7. Diabetes

A hemoglobina A1c, também conhecida como glicosilada ou ainda glicada, foi validada por dois estudos clínicos sobre a avaliação do impacto do controle glicêmico sobre as complicações crônicas do *diabetes*: o *Diabetes Control and Complications*

*Trial* (DCCT) de 1993, e o *United Kingdom Prospective Diabetes Study* (UKPDS) de 1998 (SUMITA & ANDRIOLO, 2006).

A concentração de hemoglobina HbA1c no sangue é diretamente proporcional à concentração média da glicose durante um período de tempo de 6 a 8 semanas (que equivale à vida média das hemácias). O valor de referência para pessoas saudáveis é de 4 a 5,9%. Pessoas com *diabetes mellitus* possuem níveis mais elevados de Hb A1c. Um diabético com um bom controle de glicose tem o nível de hemoglobina A1c perto ou dentro do valor de referência. A Associação Americana de Diabetes atualmente recomenda um nível de HbA1c menor que 7,0% – para pacientes diabéticos. Quando a glicose não está bem controlada apresenta valores acima do mencionado.

## **2.8. Hemoglobinopatias**

As cadeias polipeptídicas das hemoglobinas são sintetizadas sob controle genético. Esse controle é exercido sobre dois grupos de genes com funções distintas os genes estruturais e os genes reguladores.

Alterações envolvendo os genes estruturais promovem a formação de moléculas de hemoglobinas com características bioquímicas diferentes aos das hemoglobinas normais e são por isso denominadas de hemoglobinas variantes. Mutações afetando os genes reguladores promovem desequilíbrio do conteúdo quantitativo das cadeias e conseqüentemente dos tipos normais de hemoglobinas, causando as talassemias. Dessa forma, as hemoglobinas variantes e as talassemias são classificadas como hemoglobinas anormais hereditárias.

É interessante destacar que a detecção de hemoglobinas variantes, em larga escala, teve início em 1949 quando o Professor Linus Pauling e seus colaboradores

diferenciaram físico-quimicamente a hemoglobina da anemia falciforme, a Hb S, da hemoglobina normal Hb A.

A maior parte das hemoglobinas variantes é originada pela substituição de aminoácidos das cadeias polipeptídicas. Existem aproximadamente 350 variantes estruturais de hemoglobinas. Entretanto, neste trabalho só há interesse nas hemoglobinas de agregação S e C que apresentam formação de tactóides e cristais respectivamente (NAOUM, 1987).

### **2.8.1. Hemoglobina C**

A hemoglobina C foi descrita em 1950 por Itano e Neel. Estudos realizados por Hunt e Ingram, em 1958, revelaram que essa variante foi originada pela substituição do resíduo número 6 da cadeia beta, o ácido glutâmico, pela lisina. A troca de um aminoácido de carga negativa (Glu) por outro de carga positiva (Lis) alterou completamente a mobilidade da hemoglobina mutante. A Hb C é freqüente entre os povos da África, especialmente na África Ocidental, onde sua prevalência alcança valores entre 15 e 30% (NAOUM, 1987).

Os portadores heterozigotos são assintomáticos, não têm anemia e não apresentam evidência de aumento da destruição de eritrócitos. O portador homozigoto de Hb C (ou doença de Hb CC) caracteriza-se por anemia hemolítica crônica moderada e alguns sintomas clínicos.

### 2.8.2. Hemoglobina S

A doença das células falciformes é a mais comum das alterações hematológicas hereditárias conhecida no homem. Estima-se no Brasil cerca de quatro milhões de pessoas portadoras do traço falciforme, ou hemoglobina S heterozigota, e perto de trinta mil com a forma grave, incluindo a anemia falciforme, doença de Hb SC, e interação entre Hb S e talassemia beta (NAOUM, 1987).

Em 1927, Hahn e Gillespie demonstraram a dependência do fenômeno da falcização com a tensão de oxigênio, atribuindo o defeito à hemoglobina, e não somente ao glóbulo vermelho. Três anos depois esses resultados foram confirmados *in vivo* quando se observou a formação de células falcizadas, especialmente quando a tensão de oxigênio caía abaixo de 40 a 45 mmHg. Em 1946, Sherman demonstrou que as células falciformes, ao serem desoxigenadas, exibiam birrefringência óptica. Essa foi a primeira evidência que a hemoglobina S, na ausência de oxigênio, apresentava uma estrutura ordenada no interior dos eritrócitos, e sugeriu a Linus Pauling que a Hb S era diferente da hemoglobina normal.

Em 1956, Ingram, utilizando a técnica de eletroforese bidimensional associada com cromatografia, demonstrou que a anormalidade química da Hb S era devido à substituição do ácido glutâmico pela valina, na posição número 6 da cadeia beta, produzindo a perda de duas cargas negativas por molécula de hemoglobina.

Perutz e Mitchison mostraram que as formas oxigenadas de hemoglobinas S e A têm a mesma solubilidade, entretanto, sob desoxigenação, a solubilidade da Hb A cai para a metade, enquanto na Hb S torna-se 100 vezes menos solúvel que a sua forma oxigenada. A solubilidade de eritrócitos com reduzida quantidade de Hb S — como nos portadores de Hb AS — causa menos efeitos patológicos a essas células quando

comparada com eritrócitos contendo maior concentração de Hb S — como nos portadores de Hb SS. Este fato é demonstrado quando se desoxigeniza uma solução concentrada de Hb S e, como conseqüência, ocorre a formação de um estado de gelificação semi-sólida dessa solução.

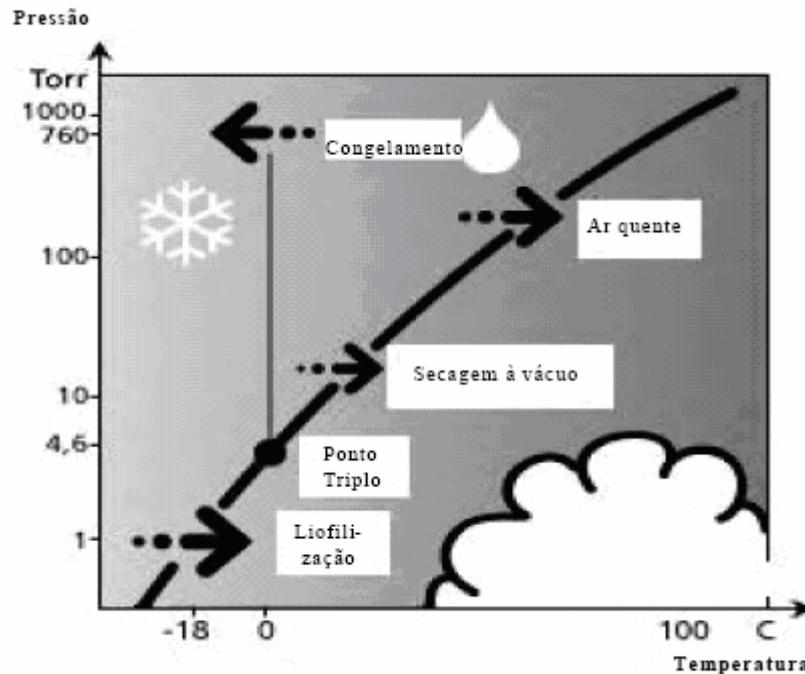
O exame microscópico dessa solução mostra a formação de cristais, que variam de 1 a 15 $\mu$  de comprimento, que tem a forma das células falcizadas. Esses cristais crescem somente no sentido longitudinal e são chamados de tactóides, que é o termo técnico para cristais unidirecionados. Os tactóides desaparecem na reoxigenação, porém, revertem-se à forma original quando o oxigênio é removido. Assim, o fenômeno da falcização pode ser entendido como resultado da formação intracelular de tactóides em células com Hb S desoxigenada. A Hb S desoxigenada polimeriza-se em filamentos de pesos moleculares muito altos que se associam longitudinalmente, formando fibras e feixes de fibras (NAOUM, 1987).

## **2.9. Liofilização**

A liofilização também conhecida como desidratação a frio, ou ainda *freeze dry* é um excelente processo de conservação de produtos orgânicos, pois envolve os métodos mais confiáveis de conservação de produtos biológicos, além disso, não utilizam conservantes ou produtos químicos. Esse é o processo mais adequado para preservar derivados sangüíneos, células, enzimas, vírus, vacinas, soros, leveduras, algas, bem como frutas, vegetais, carnes, peixes e etc (ZENG *et al.*, 2006).

Liofilização é o processo de desidratação por sublimação. A água, ou a substância aquosa, é removida como vapor da substância congelada, ou seja, passa da fase sólida direto para fase vapor. Para isso, faz-se necessário que a zona da

temperatura de sublimação esteja abaixo do ponto triplo (BOSS, 2004). A Figura 2.3 apresenta um gráfico de pressão *versus* temperatura mostrando o ponto triplo da água que ocorre para uma pressão de 4,57 Torr e temperatura de 0,01°C. Dessa forma, a água ou solução aquosa existente no produto que se pretende sublimar deve estar na fase sólida.



**Figura 2.3.** – Representação no gráfico PT do processo de liofilização (BOSS, 2004).

O congelamento deve ser rápido para que se formem microcristais de gelo que não danifiquem a membrana celular da estrutura do produto. Quando o congelamento é lento formam-se cristais grandes que rompem a membrana celular, acarretando perda do líquido citoplasmático. No congelamento rápido, a estrutura do produto mantém-se intacta conservando suas características originais.

Utilizando-se câmaras herméticas e provando a condição de vácuo, o produto previamente congelado perde a água diretamente do estado sólido para o gasoso por sublimação. A liofilização é o único processo que consegue retirar a água do produto até

níveis menores que 1%. A facilidade de re-hidratação do produto é muito grande, pois este fica extremamente poroso e higroscópico.

A liofilização permite uma rápida transição de material hidratado para desidratado. Essa rápida transição minimiza várias reações de degradação que ocorrem durante a secagem como a reação de Maillard, desnaturação de proteínas e reações enzimáticas (LIAPIS *et al.*, 1985). Além disso, as bactérias não são exterminadas por este tipo de secagem, mas sua proliferação não é possível no material seco.

Após a secagem, as atividades das enzimas são inativadas (pois não há água no meio) e as reações químicas oxidativas ou não-oxidativas ocorrem em pequena quantidade, trazendo um resultado satisfatório. Assim, algumas características indesejáveis que podem ocorrer em processos de desidratação a quente (retirada da água a temperaturas de 80 a 90°C), tais como desnaturação protéica, perda de compostos voláteis, formação de camadas duras e impermeáveis, migração de sólidos solúveis para a superfície durante a secagem e dificuldade de se hidratar novamente o produto, são evitados no processo de liofilização.

Outra vantagem do processo de liofilização é o aumento da estabilidade do produto durante a estocagem, além de poder ser armazenado e transportado à temperatura ambiente (BOSS, 2004). Se corretamente processado e mantido sob condições adequadas, o produto liofilizado pode ser guardado por um estágio quase ilimitado de tempo enquanto mantém suas propriedades físico-químicas e biológicas. Além do aumento da vida útil do produto (pela diminuição da sua atividade de água) há redução de peso e volume do produto liofilizado.

## 2.10. Espalhamento Coerente de Raios X

As quantidades físicas relevantes no estudo do espalhamento de fótons por elétrons dos orbitais atômicos, são a amplitude e a seção de choque diferencial  $\frac{d\sigma}{d\Omega}$ , que é definida como a razão entre o número de partículas espalhadas (isto é, desviadas do feixe incidente) em um ângulo sólido  $d\Omega$  por unidade de tempo, dividido pelo número de partículas incidentes atravessando uma área unitária normal à direção do feixe incidente, na unidade de tempo. Fisicamente,  $\frac{d\sigma}{d\Omega}$  representa a probabilidade, por unidade de ângulo sólido, de que uma partícula incidente seja espalhada em um ângulo sólido  $d\Omega$  (CASTRO, 2006).

A radiação espalhada torna-se importante, na medida em que os fótons espalhados carregam informações sobre a estrutura e tipo de tecido. Outro fato importante é que o espalhamento por elétron ligado ao átomo (Rayleigh) é feito corrigindo-se a seção de choque de Thomson para elétron livre, considerando a possibilidade de interferência da radiação espalhada. Essa correção aparece na forma da transformada de Fourier da densidade de carga, conhecida como fator de forma do átomo (Cesareo et al., 1992).

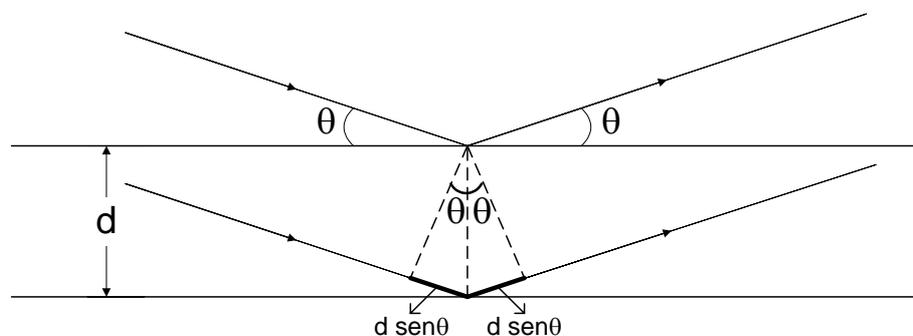
O espalhamento é dito coerente ou elástico, quando a radiação incidente interagindo com o meio troca momento, mas permanece com a mesma energia ao ser espalhada (KANE *et al.*, 1986). Para a região de baixo ângulo (ou baixo momento transferido), o fenômeno de espalhamento com interferência construtiva, pode ser medido, constituindo numa técnica para se determinar a estrutura e composição de materiais.

Na condição de espalhamento coerente, os raios X quando interagem com o meio têm o seu comprimento de onda incidente associado às dimensões do centro espalhador ou da abertura de uma fenda por onde ele terá que passar. Considerando  $d$  como a dimensão do centro espalhador ou a distância entre os planos de uma rede cristalina, podemos observar três condições de espalhamento (AZÁROF, 1968):

- para  $d \ll \lambda$ , o espalhamento é isotrópico;
- para  $d \gg \lambda$ , o espalhamento é governado pelas leis da ótica geométrica;
- para  $d \cong \lambda$ , o fenômeno de difração ocorre, gerando uma dependência angular na radiação espalhada.

O motivo de ser usar ondas eletromagnéticas na região dos raios X, em cristalografia, é devido ao espaçamento entre as camadas de átomos em um cristal possuírem a mesma ordem de grandeza (Å) do comprimento de onda dessa radiação, onde o fenômeno de difração pode ser observado.

Para obtermos padrões de difração acentuados em cristais, as ondas espalhadas devem interagir entre si de forma construtiva. Esse fenômeno é conhecido como interferência e ocorre quando as ondas espalhadas, por planos sucessivos de átomos em um cristal, estão em fase, ou seja, a diferença de caminho, entre os planos do cristal deve ser igual a um múltiplo inteiro do comprimento de onda (Figura 2.4).



**Figura 2.4.** – Representação esquemática da Lei de Bragg (CASTRO, 2006).

Essa condição é atendida, quando um conjunto de planos desse cristal satisfaz a equação de Bragg:

$$n\lambda = 2d \operatorname{sen} \theta; \quad n = 1,2,3,\dots \quad (2.1)$$

onde: os valores de  $n$  são limitados pela condição:  $\operatorname{sen} \theta < 1 \Rightarrow \left( \frac{n\lambda}{2d} < 1 \right)$ ;

$\lambda$  é o comprimento de onda da onda difratada;

$\theta$  é o ângulo de espalhamento.

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

Um feixe de raios X monocromático incidindo em um cristal, em ângulos variáveis, produz um gráfico chamado de difratograma. As intensidades são colocadas em função do ângulo de espalhamento  $2\theta$  (ângulo entre a onda incidente e a onda espalhada).

Esse padrão de difração é único para cada tipo de cristal, possibilitando-se descobrir a composição de materiais através da difração de raios X. Esse processo é chamado de caracterização.

## 2.11. Luz Síncrotron

Os feixes de raios X que se podem obter em uma máquina de luz síncrotron são extremamente intensos, colimados e dotados de um elevado grau de coerência

longitudinal. Além disso, com a utilização de cristais monocromadores, é possível obter feixes monocromáticos com energia selecionável 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. 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 (LEWIS, 1997; CASTRO, 2006).

Em um laboratório síncrotron, os pacotes de elétrons são acelerados no interior de um canal quase circular onde alcançam velocidades próximas à da luz irradiando energia. A radiação emitida é chamada luz síncrotron. A tabela 2.1 mostra alguns parâmetros do Laboratório Nacional de Luz Síncrotron – LNLS.

**Tabela 2.1.** Parâmetros do LNLS.

<b>Parâmetro</b>	<b>Valor Nominal</b>
Energia dos elétrons	1,37 GeV
Corrente do feixe de elétrons	250 mA
Energia de injeção	500 MeV
Campo magnético	1,67 T
Diâmetro médio	29,7 m
Energia crítica	2,08 keV

## 2.12. Estatística

Para alguns estudiosos, a estatística é uma arte; para outros, a estatística é a simples aplicação de bom senso (LAPPONI, 1997). Em qualquer caso, a estatística ajuda a tomar decisões com informações incompletas. Nem sempre é possível compreender o significado dos dados disponíveis por simples inspeção de seus valores

numéricos. Entretanto, o sucesso da decisão dependerá da habilidade em compreender as informações contidas nesses dados. Portanto, necessitamos de métodos que permitam extrair dos dados as informações necessárias para compreender o que representam.

### **2.12.1. População e Amostra**

Os métodos estatísticos são úteis para estudar populações. Uma população é o conjunto maior de indivíduos ou objetos cujo estudo nos interessa ou acerca dos quais se deseja ter informações. Os elementos desse conjunto se denominam dados ou observações. Por ser numerosa, em muitos casos, é impossível ter uma informação completa sobre uma determinada população. Nesses casos, recorre-se à informação proporcionada por uma parte finita da população chamada amostra. Simplesmente amostrar não é suficiente, a amostra deve ser representativa da população, isto é, a amostra deve ter características similares às características da população.

### **2.12.2. Estatística Descritiva**

O objetivo da estatística descritiva é o de representar de uma forma compreensível a informação contida nos dados. A necessidade de um esforço de classificação desses dados e de síntese da informação neles contida resulta da incapacidade que, normalmente, a mente humana tem de assimilar e interpretar conjuntos significativos de dados que sejam apresentados de uma forma desorganizada (CANCHO, 2004).

### 2.12.3. Medidas de Posição

As medidas de posição ou tendência central são usadas para indicar um valor que tende a resumir ou representar melhor um conjunto de dados. As três medidas mais usadas são a média, a mediana e a moda.

- A média de um conjunto de observações é definida como a soma de todas as observações dividida pelo número de observações. Essa medida de posição apresenta a desvantagem de ser fortemente influenciada por valores discrepantes. Portanto, nesse caso a média já não será um valor representativo do conjunto de dados.
- A mediana é uma medida de posição que divide o conjunto de observações em dois grupos de tal modo que 50% das observações são menores que a mediana e os outros 50% são maiores.
- A moda de um conjunto de observações é definida como o valor, classe ou categoria que ocorre com maior frequência.

A mediana, seja de uma população ou de uma amostra, divide o conjunto de dados em duas partes iguais. Também é possível dividi-lo em mais de duas partes. Quando se divide um conjunto ordenado de dados em quatro partes iguais, os pontos da divisão são conhecidos como quartil; o primeiro quartil,  $Q_1$ ; é o valor que divide aproximadamente, a quarta parte (25%) das observações abaixo dele, e os 75% restantes, acima dele. O segundo quartil é exatamente a mediana. O terceiro quartil ou quartil inferior,  $Q_3$ , tem aproximadamente os três quartos (75%) das observações debaixo dele.

#### 2.12.4. Medidas de Dispersão

As medidas de posição ou de tendência central não necessariamente proporcionam informação suficiente para descrever dados de maneira adequada. As medidas de dispersão ou variabilidade são medidas estatísticas que permitem conhecer o grau de homogeneidade ou heterogeneidade de um conjunto de dados. As medidas aqui utilizadas são: variância, desvio padrão, coeficiente de curtose, assimetria, amplitude, erro de estimativa para a média da população.

- Variância é uma medida de dispersão absoluta das observações e é dada pela soma das diferenças quadráticas das observações em relação à sua média dividida pelo número total de observações.
- Desvio padrão é a raiz quadrada positiva da variância.
- Coeficiente de curtose é o resultado da comparação da distribuição de freqüências dos valores informados com a distribuição normal. A interpretação da curtose é a seguinte: se o coeficiente de curtose for igual a zero a distribuição em estudo é a própria distribuição normal; se for negativo, a distribuição será achatada (plana) e se for positivo a distribuição de freqüências será concentrada ao redor da média.
- Assimetria, ou distorção, é a forma em que os dados estão distribuídos. Se a distribuição for simétrica não existem valores realmente extremos em determinada direção, de modo que valores baixos e altos se equilibram reciprocamente, retornando o valor zero. A assimetria positiva surge quando a média aritmética é aumentada em função de alguns valores elevados. A assimetria negativa ocorre quando a média aritmética é reduzida em função de alguns valores extremamente baixos (LEVINE *et al.*, 2002). Assim, quanto

mais a assimetria se aproximar de zero mais simétrica é a distribuição, quanto mais positiva mais deslocada para a direita e quanto mais negativa mais deslocada para a esquerda será a distribuição.

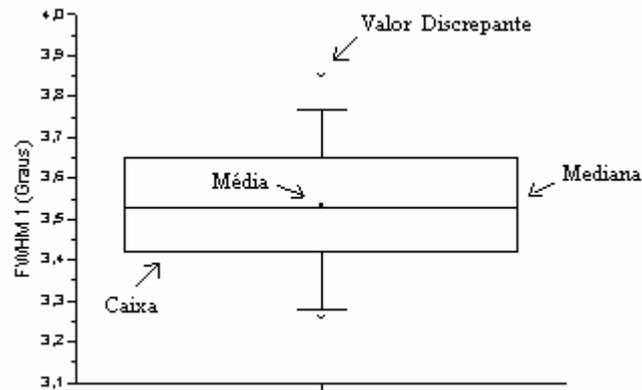
- Amplitude é a diferença entre a observação de maior e menor valor da distribuição.
- Erro de estimativa, ou margem de erro da média da população, é o cálculo da diferença entre a média das amostras e a média da população para um dado nível de confiança. Assim, para um nível de confiança de, por exemplo, 95% tem-se essa probabilidade de que a média da população se encontrará dentro desse intervalo do erro de estimativa.

### **2.12.5. Boxplot**

O *boxplot* é um gráfico que fornece uma visualização da distribuição dos dados, além de permitir detectar rapidamente uma possível assimetria dessa distribuição. Sua construção é baseada nas seguintes medidas: na mediana, no primeiro e terceiro quartis, e nos valores extremos. Conforme mostrado na figura 2.5, a forma desse gráfico tem as seguintes características:

- a) A caixa ("box") é delimitada pelo primeiro (Q1) e terceiro (Q3) quartis. A linha interior da caixa corresponde à mediana e o ponto representa a média.
- b) A partir dos limites da caixa, consideram-se duas linhas auxiliares que distam  $1,5d$  o intervalo interquartil  $d = Q3 - Q1$ . Essas linhas não aparecerão no gráfico final. Elas servem para caracterizar os valores discrepantes que são os valores menores que  $Q1 - 1,5d$  ou valores maiores que  $Q3 + 1,5d$ . Os valores discrepantes serão representados no gráfico com asteriscos (\*).

c) Os limites do gráfico, representados por uma linha acima e abaixo ("bigodes") da caixa, correspondem ao maior e ao menor valores não discrepantes do conjunto de dados.



**Figura 2.5.** - Exemplo de gráfico boxplot.

### 2.12.6. Inferência Estatística

A inferência estatística é o processo que consiste em utilizar os resultados de uma amostra para tirar conclusões gerais de uma ou mais características de uma população (CANCHO, 2004). Ela compreende: estimação de parâmetros e testes de hipótese estatística.

### 2.12.7. Estimação de Parâmetros

Para estimar os parâmetros, considera-se uma amostra aleatória de tamanho “ $n$ ” e utilizam-se os dados amostrais para estimar os parâmetros desconhecidos. Esse problema pode ser dividido em duas categorias: estimação pontual e estimação por intervalos.

Estimativa pontual de um parâmetro de uma população é obtida, por cálculo, de uma amostra retirada da população. A média  $\bar{X}$  de uma amostra retirada de uma população é um estimador pontual da média da população  $\mu_x$ . Um estimador pontual afirma simplesmente que, por exemplo, a posição de um pico de espalhamento é 21,5 graus.

Estimação por intervalos dá uma estimativa entre dois limites com um grau de acerto. É possível afirmar que o valor da estimativa é falso ou verdadeiro, quando conhecemos a média da população. Entretanto, o valor da população é uma incógnita e objeto de estimativa. Não será possível afirmar que a média da população está contida no intervalo da média amostral, a única coisa que se pode fazer é estabelecer uma probabilidade de acerto. Poderíamos, então, dizer que a posição do pico estará entre 20 e 21 graus, com 95% de probabilidade. Assim, afirmamos que o intervalo de confiança contém a média da população com 95% de chance de acerto.

Ao estabelecer a probabilidade de acerto de 95% estará definida automaticamente a probabilidade de erro ( $\alpha = 0,05$ ). O erro  $\alpha$  aceito no processo de estimação define o valor unitário  $(1 - \alpha)$  denominado como coeficiente de confiança.

### **2.12.8. Estimativa da Média da População Quando Não é Conhecido o Desvio Padrão**

Quando o desvio padrão da população não é conhecido a estimativa da média da população é dividida em duas partes, amostras suficientemente grandes, em geral  $n > 30$ , e amostras pequenas,  $n < 30$ . Se o tamanho da amostra for suficientemente grande, podemos aceitar que a distribuição das médias amostrais é normal e usar o procedimento para o cálculo da distribuição normal padronizada “Z”.

Entretanto na maioria dos casos, não é possível obter amostras grandes, pois os dados disponíveis são poucos, o custo unitário da amostragem é muito grande, o tempo disponível não é suficiente, etc. Como o teorema central do limite se aplica para amostras grandes, a forma da distribuição das médias amostrais de pequenas amostras dependerá da forma da distribuição da população. Nesse caso, o desvio padrão da amostra não é um bom estimador do desvio padrão da população.

Portanto, para estimar a média da população com amostras pequenas devemos estabelecer como premissa que a população da qual é retirada a amostra deve ter distribuição normal. Nessas condições, a estimativa da média da população deve ser realizada com a distribuição “t”, conhecida também como distribuição de Student.

A distribuição “t” tem uma forma similar à da distribuição normal, porém, com as caudas um pouco mais altas. Para grandes amostras as distribuições “t” e “Z” são praticamente iguais.

### **2.12.9. Testes de Hipóteses**

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

O procedimento de tomada de decisão em um teste de hipóteses pode resultar em dois tipos de conclusões incorretas. Ao tomar uma decisão a favor ou contra uma hipótese existem dois tipos de erros que você pode cometer. Pode-se rejeitar a hipótese

nula quando de fato ela é verdadeira (erro tipo I) ou falhar em rejeitar  $H_0$  quando de fato ela é falsa (erro tipo II). A tabela 2.2 apresenta os tipos de erros destes testes.

**Tabela 2.2.** – *Tipos de erros dos testes de hipótese.*

<b>Decisão</b>	<b>Decisão Real e Desconhecida</b>	
	$H_0$ 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  $\alpha$ ), 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  $\beta$ . 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  $\beta$ ), mantendo-se  $\alpha$  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  $H_0$  e aceitar  $H_1$ . Quanto menor o *p-value*, maior é o suporte dado a  $H_1$ .

### 2.12.10. Análise de Variância

O objetivo da análise de variância (ANOVA) é decidir se as amostras foram retiradas de populações que tem a mesma média. Embora o nome não mostre o objetivo real do procedimento a ANOVA é um teste de hipótese de médias de duas ou mais populações. Se as médias são diferentes entre si, faz sentido perguntar: por que as médias das amostras são diferentes? Existem duas fontes de variabilidade e, portanto, duas respostas. A primeira fonte de variabilidade é consequência das populações serem realmente diferentes, denominada como variabilidade, *entre*. Quanto maior for a variabilidade *entre*, maior a evidência que existem diferenças entre as populações das quais foram retiradas as amostras. A outra fonte de variabilidade são as diferenças dentro de cada amostra, denominada como variabilidade *dentro*. Quanto maior for a variabilidade *dentro*, maior será a dificuldade para concluir que as populações sejam ou não diferentes (LAPPONI, 1997).

A análise de variância parte das seguintes premissas: as amostras são extraídas de populações que têm distribuição normal; as populações têm o mesmo valor de variância e as amostras são aleatórias e independentes.

O procedimento do teste de hipóteses que deve ser estabelecido é o seguinte: a hipótese nula  $H_0$  afirma que as  $k$  populações sob análise têm o mesmo valor de média e a hipótese alternativa  $H_1$  afirma que nem todas as médias das populações são iguais.

# CAPÍTULO III

---

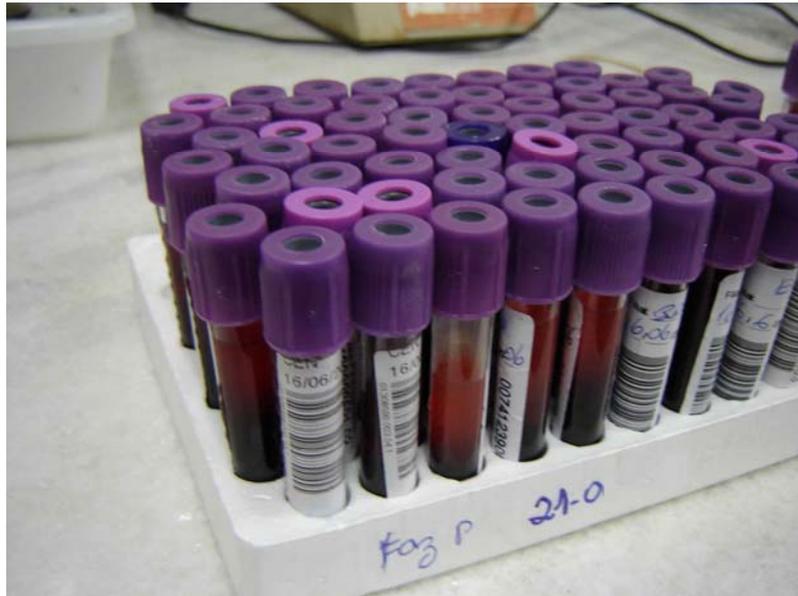
## MATERIAIS E MÉTODOS

### 3.1. Preparação das Amostras

As amostras de sangue foram coletadas de pacientes do laboratório de análises clínicas *Eliel Figueirêdo Laboratórios Médicos* por meio de punção venosa. Esse procedimento é usado com bastante freqüência e consiste na retirada de sangue de uma veia, por meio de agulha e seringa estéreis. A veia utilizada foi a intermédia do cotovelo (mediana cubital), anterior ao cotovelo. Um torniquete foi aplicado ao redor do braço para interromper o fluxo de sangue e fazer com que as veias se dilatasse, facilitando assim a coleta das amostras de sangue. A doação das amostras de sangue que seriam descartadas pelo laboratório de análises clínicas foi autorizada pelo titular, respeitando a condição de que a identidade dos doadores não seria fornecida.

As amostras foram acondicionadas em tubos contendo o anticoagulante EDTA e cuidadosamente homogeneizados por inversão, por 4 a 5 vezes, logo após a coleta, com objetivo de impedir a ativação do sistema de coagulação, conforme mostra a figura 3.1.

Após a coleta, as amostras foram acondicionadas em geladeira a uma temperatura 4°C. Neste trabalho, foram utilizados sangue total e alguns de seus componentes: plasma, elementos figurados e hemoglobinas.



**Figura 3.1.** - Amostras de sangue nos tubos vacutainers contendo EDTA.

Para realizar a separação do plasma dos elementos figurados, as amostras ficaram em repouso por uma hora em estante. Devido à gravidade os elementos figurados, mais pesados, se depositaram no fundo do tubo; enquanto que o plasma, mais leve, ficou sobrenadante, conforme mostrado na figura 3.2. O plasma e os elementos figurados foram retirados do tubo por aspiração utilizando uma pipeta. As amostras de sangue total, plasma e os elementos figurados foram postas em vidro de relógio e encaminhadas ao liofilizador.

Para obtenção das hemoglobinas, foi utilizado o método proposto por NAOUM (1987) de preparação de hemolisados realizado no *Eliel Figueirêdo Laboratórios Médicos*. O sangue foi centrifugado com anticoagulante a 1500 rpm, durante 5 minutos, o plasma foi removido e os eritrócitos lavados por três vezes com solução salina a 0,85%. Logo após, os eritrócitos foram centrifugados, mais uma vez nas mesmas condições e o sobrenadante desprezado. Ao volume de eritrócitos lavados foi adicionado outro de água destilada. A mistura foi homogeneizada e, a seguir,

adicionado um volume de clorofórmio, idêntico ao do hemolisado formado. A solução foi agitada vigorosamente e centrifugada a 2000 rpm por 15 minutos.



**Figura 3.2.** - *Aspecto do sangue após decantação.*

A solução de hemoglobina sobrenadante, ou hemolisado, foi retirada por meio de pipeta Pasteur e transferida para um frasco limpo. A concentração do hemolisado, preparado conforme metodologia apresentada fica geralmente entre 10 e 15g/dl. Para a identificação dos tipos de hemoglobinas (AA, AS, AC e SS) foi realizada a eletroforese de hemoglobina no setor de bioquímica do referido laboratório de análise clínicas. As amostras após serem devidamente preparadas e identificadas foram postas em um vidro de relógio e encaminhadas ao liofilizador, conforme mostrado na figura 3.3.



(a)



(b)

**Figura 3.3.** - (a) Amostras de sangue no liofilizador (b) detalhamento de uma amostra no vidro de relógio.

As amostras foram liofilizadas por 48 horas a uma temperatura de  $-60^{\circ}\text{C}$  e uma pressão de  $-780$  mmHg, no liofilizador do Laboratório de Instrumentação Nuclear – LIN/COPPE/UFRJ. O referido liofilizador constitui-se de duas bandejas ligadas a uma barra de metal (*dedo frio*) que fica imersa em nitrogênio líquido, acondicionado em tambor apropriado. O arranjo do liofilizador conta ainda com uma cúpula de vidro transparente com uma borracha de vedação na parte inferior (com o objetivo de garantir a pressão negativa necessária a essa câmara para realizar a liofilização). Para manter o vácuo, foi utilizada uma bomba de vácuo (*Edwards High Vacuum Pump Oil ES50*) com capacidade máxima de  $15$  lb/in<sup>2</sup>, que se mantinha em funcionamento durante o processo de liofilização, conforme mostra a figura 3.4.



(a)



(b)

**Figura 3.4.** -Arranjo utilizado para liofilização: (a) câmara de vácuo e (b) motor e a bomba de alto vácuo.

Com auxílio de uma espátula as amostras foram retiradas do vidro de relógio e postas em um cadinho, onde foram cuidadosamente moídas com um pilão até tomarem a forma de pó bastante fino. As amostras foram então acondicionadas em frascos apropriados, etiquetadas e acondicionados novamente em geladeira a 4°C (figura 3.5). Foram preparadas 45 amostras de sangue total, 20 de elementos figurados, 20 de plasma e 34 de hemoglobinas.



(a)



(b)

**Figura 3.5.** – (a) Amostras acondicionadas e (b) o porta amostras utilizado no LNLS, à esquerda o pó branco é o plasma e o da direita é o sangue total.

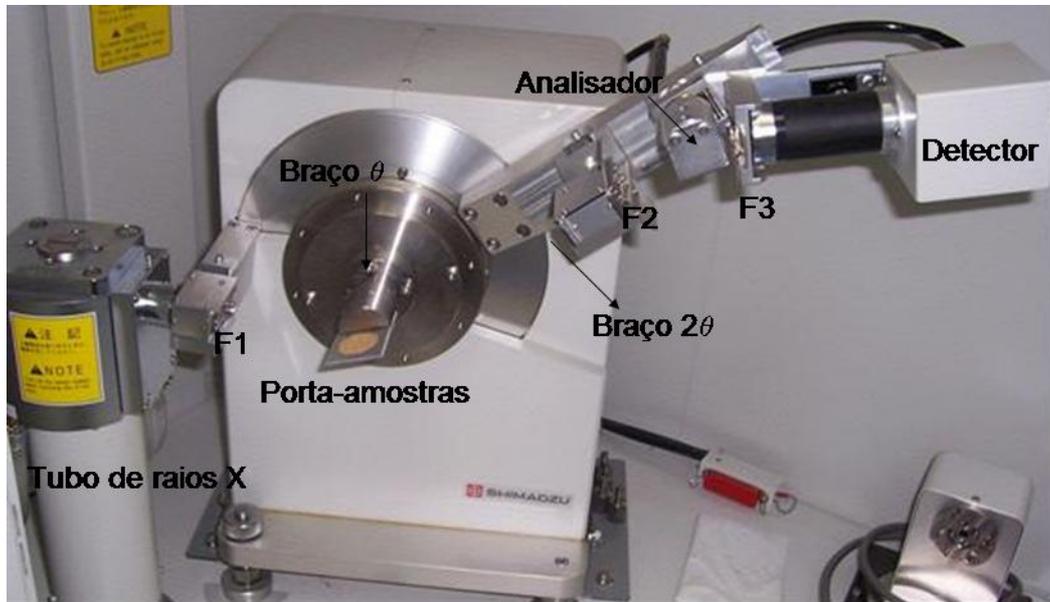
### 3.2. Medidas de Espalhamento

Para realizar as medidas dos perfis de espalhamento coerente de raios X das amostras foi utilizada a linha XRD2 do Laboratório Nacional de Luz Síncrotron – LNLS, em Campinas. Além dessas medidas, para as mesmas amostras, os perfis de espalhamento foram obtidos por meio de um difratômetro comercial da Shimadzu XRD 6000, do Laboratório de Instrumentação Nuclear – LIN/COPPE/UFRJ.

#### 3.2.1. Difratômetro Comercial

Para realizar as medidas dos perfis de espalhamento coerente de raios X das amostras foi utilizado o difratômetro da Shimadzu XRD 6000 com geometria de reflexão  $\theta$ - $2\theta$ . Utilizou-se alvo de Cu que produz um pico de raios X característico de 8,047 keV (linha  $K\alpha$ ). O feixe de raios X foi colimado com um sistema de fendas. A

figura 3.6 mostra o esquema experimental utilizado indicando os principais componentes.



**Figura 3.6.** Geometria experimental no difratômetro. F1 – fenda de divergência, F2 – fenda de recepção e F3 – fenda de espalhamento.

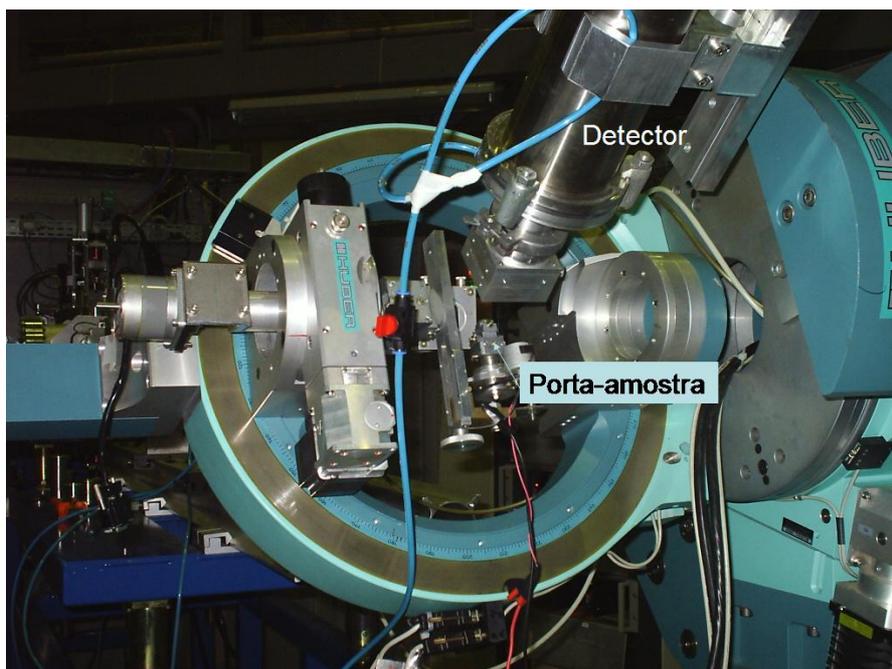
A parte central do porta-amostras possui uma depressão em forma de círculo, onde as amostras, já em forma de pó, foram cuidadosamente compactadas. A varredura foi realizada de  $5^\circ$  a  $35^\circ$ , com passos de  $0,05^\circ \pm 0,001^\circ$  – com uma integração no tempo de 3s por leitura. A rotação foi feita no modo ( $\theta$ - $2\theta$ ). Os dados da difração foram coletados por meio de um detector cintilador que utiliza um cristal de Iodoeto de Sódio e um grafite monocromador para separar  $K\alpha$  e  $K\beta$ . Os dados coletados foram enviados a um computador que foi usado como interface. As condições experimentais são apresentadas na tabela 3.1.

**Tabela 3.1** - Condições experimentais para obtenção dos perfis.

Condições instrumentais	Valores
Alvo	Cu ( $\lambda = 1,54186\text{\AA}$ )
Tensão (kV)	40,0
Corrente (mA)	30,0
Fenda de divergência (graus)	1,0000
Fenda de recepção (mm)	0,3
Fenda de espalhamento (graus)	1,0000
Ângulo inicial (graus)	5
Ângulo final (graus)	35
Passo angular (graus)	0,05
Tempo (s)	3,0

### 3.2.2. Laboratório Nacional de Luz Síncrotron

As medidas foram realizadas na linha de luz de Difração de Raios X de alta resolução (XRD2) instalada no imã defletor B10 ( $4^\circ$ ) do Laboratório Nacional de Luz Síncrotron (LNLS/CNPq) situado em Campinas, Brasil. A linha possui um monocromador de duplo cristal de Si (111) com saída constante com possibilidade de uso de monocromador *channel-cut* Si (111) e Si (220), assim como monocromador de quatro cristais de alta resolução. O difratômetro de seis círculos Huber é equipado com analisador  $\theta-2\theta$  e analisador de polarização (GILES *et al.*, 2003). A energia do feixe incidente foi de 8 keV ( $\lambda=1,55 \text{ \AA}$ ). A figura 3.7 mostra o arranjo experimental.



**Figura 3.7.** *Linha XRD2 do Laboratório Nacional de Luz Síncrotron.*

As medidas foram realizadas em geometria de reflexão  $\theta$ - $2\theta$  com a amostra girando. Câmaras de ionização foram utilizadas antes e depois do difratômetro e as intensidades espalhadas foram adquiridas por um detector cintilador rápido NaI(Tl) ( $10^6$  contagens/s). As câmaras de ionização foram utilizadas para corrigir os dados experimentais em consequência das variações na corrente do anel. Fendas com 0,5 mm foram colocadas antes e depois da amostra para reduzir a contribuição do espalhamento. Os perfis foram obtidos no intervalo de  $5^\circ$  a  $40^\circ$  com passo angular de  $0,1^\circ$ . O tempo de aquisição foi de 0,5s por ponto.

### **3.3. Parâmetros de Caracterização**

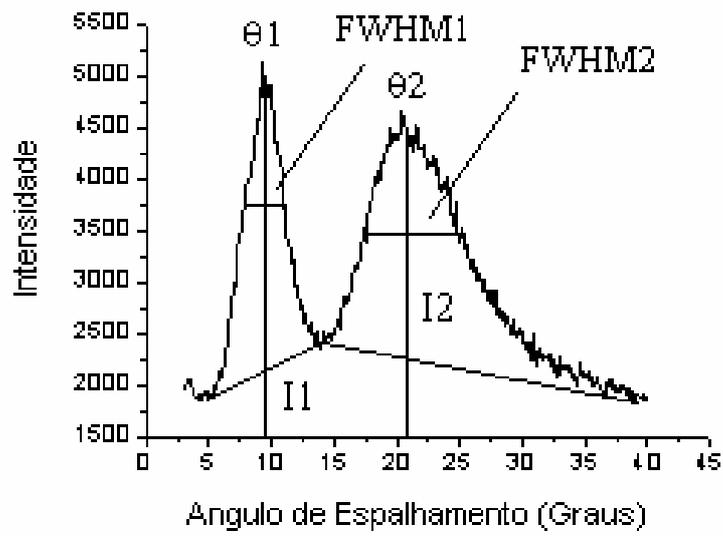
Após a obtenção dos perfis de espalhamento com o difratômetro comercial e pela utilização de luz síncrotron observou-se perfis bastante característicos que dão

uma “assinatura” das amostras estudadas. Para o sangue total, elementos figurados e hemoglobina o perfil de espalhamento nos fornece dois picos largos, sendo o segundo sempre mais largo que o primeiro. O perfil do plasma apresenta, além dos dois picos mencionados, mais alguns picos estreitos e bastante intensos, típicos de estruturas cristalinas.

Com objetivo de caracterizar as diversas assinaturas fornecidas pelos perfis de espalhamento, foram introduzidos cinco parâmetros, denominados de parâmetros de caracterização. Esses parâmetros são: posição do primeiro pico ( $\theta_1$ ), posição do segundo pico ( $\theta_2$ ), largura a meia altura do primeiro pico (FWHM 1), largura a meia altura do segundo pico (FWHM 2) e razão entre as intensidades do primeiro e segundo pico  $I_1/I_2$ . Para obtenção dos parâmetros de caracterização dos perfis de espalhamento, foi utilizado o *ORIGIN PRO 7.5 SR0*, com o auxílio da ferramenta “*Peak Analysis*”.

O *software* citado acima considerou as posições dos picos como sendo a intensidade máxima dos mesmos. Com relação à largura a meia altura foi traçada uma linha de base para se extrair essa informação. A figura 3.8 mostra o perfil de espalhamento de uma amostra típica de sangue total, ilustrando a forma pela qual foram extraídos os parâmetros de caracterização.

A estatística descritiva foi realizada com o auxílio do *MICROSOFT EXCEL 2000*. Para a realização dos testes estatísticos de hipótese foi utilizada a ferramenta ANOVA e teste-t de Student (para duas amostras independentes) do *ORIGIN PRO 7.5 SR0*.



**Figura 3.8** - Obtenção dos parâmetros de caracterização.

## CAPÍTULO IV

---

### RESULTADOS E DISCUSSÕES

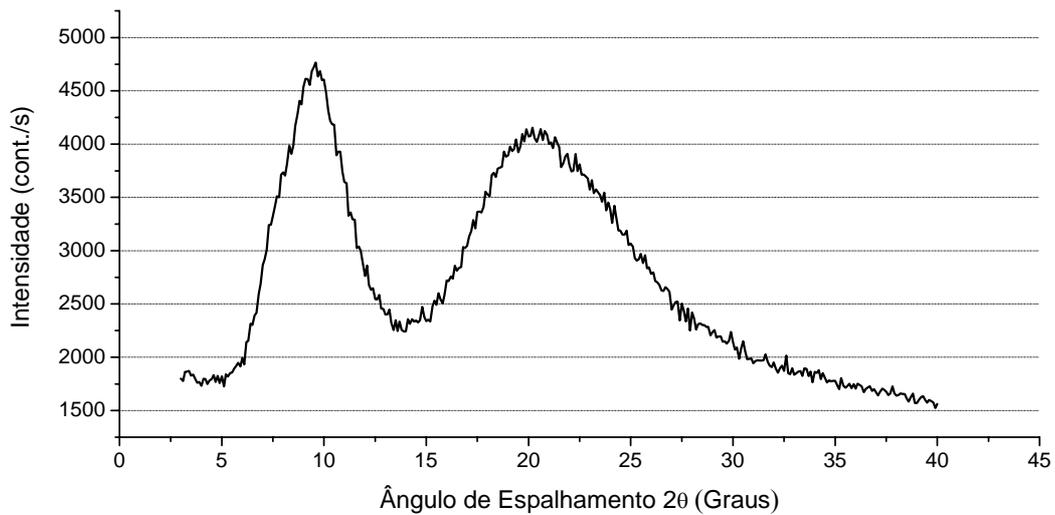
Os perfis de espalhamento das amostras de sangue total, elementos figurados, plasma e hemoglobina foram obtidos no Laboratório Nacional de Luz Síncrotron – LNLS, em Campinas. As medidas foram repetidas no Laboratório de Instrumentação Nuclear – LIN/COPPE/UFRJ usando um difratômetro da Shimadzu XRD 6000.

A forma (assinatura) encontrada para os perfis de espalhamento obtidos em ambos os laboratórios é bastante similar. A principal diferença entre os perfis reside na intensidade espalhada, já que a intensidade medida no LNLS é aproximadamente 4 vezes maior do que aquelas medidas no difratômetro comercial. A obtenção de uma melhor estatística de contagem é de grande importância para a caracterização. As medidas realizadas no LNLS foram obtidas com um erro menor do que 2% para a razão das intensidades máximas dos picos. Em contrapartida, as medidas realizadas no difratômetro comercial fornecem um erro de aproximadamente 5% para a razão das intensidades.

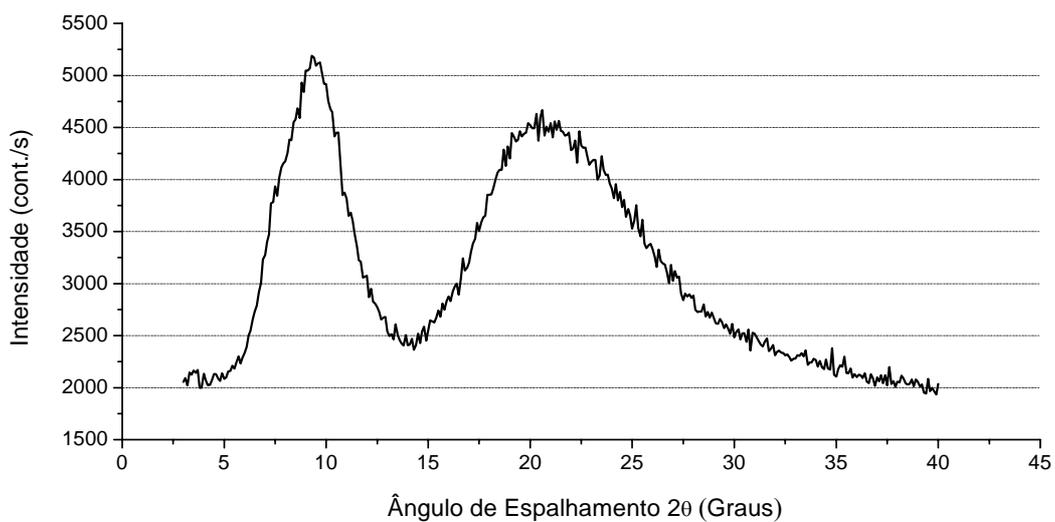
Além disso, o tempo de obtenção total dos perfis foi muito menor no Laboratório Nacional de Luz Síncrotron. Enquanto que no difratômetro da Shimadzu XRD 6000, levou-se trinta minutos para medir cada amostra no intervalo de 5 a 35 graus, no LNLS gastou-se pouco mais de três minutos para um intervalo de 3 a 40 graus.

## 4.1. Perfis de Espalhamento

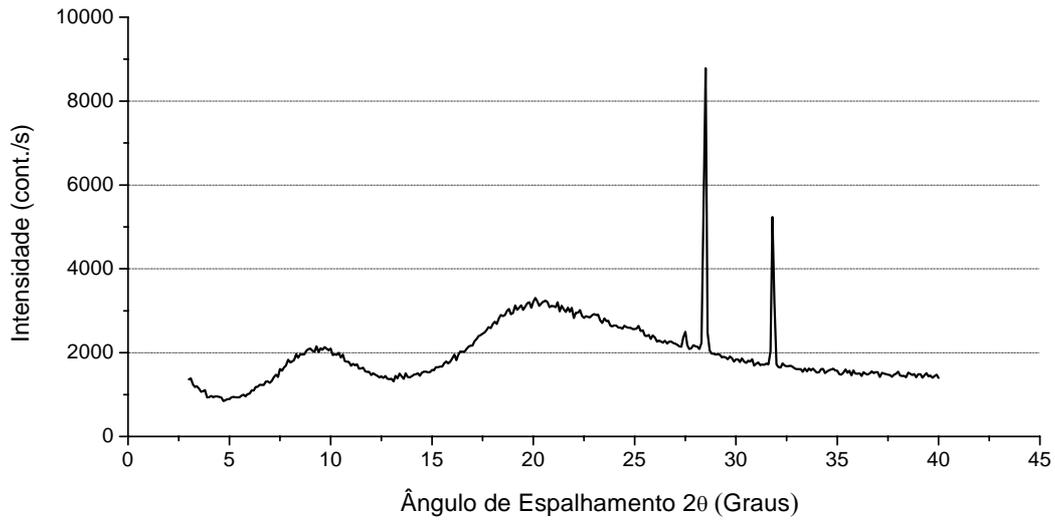
As figuras 4.1. a 4.4. mostram perfis de espalhamento típicos obtidos no LNLS para as amostras de sangue total, elementos figurados, plasma e hemoglobina, respectivamente.



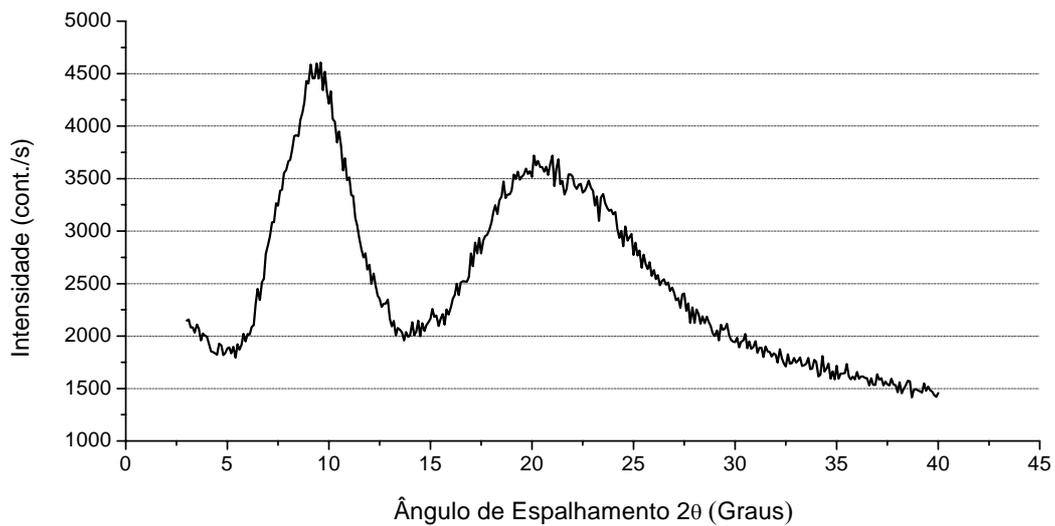
**Figura 4.1.** Perfil de espalhamento típico para o sangue total, obtido no LNLS.



**Figura 4.2.** Perfil de espalhamento típico dos elementos figurados, obtido no LNLS.



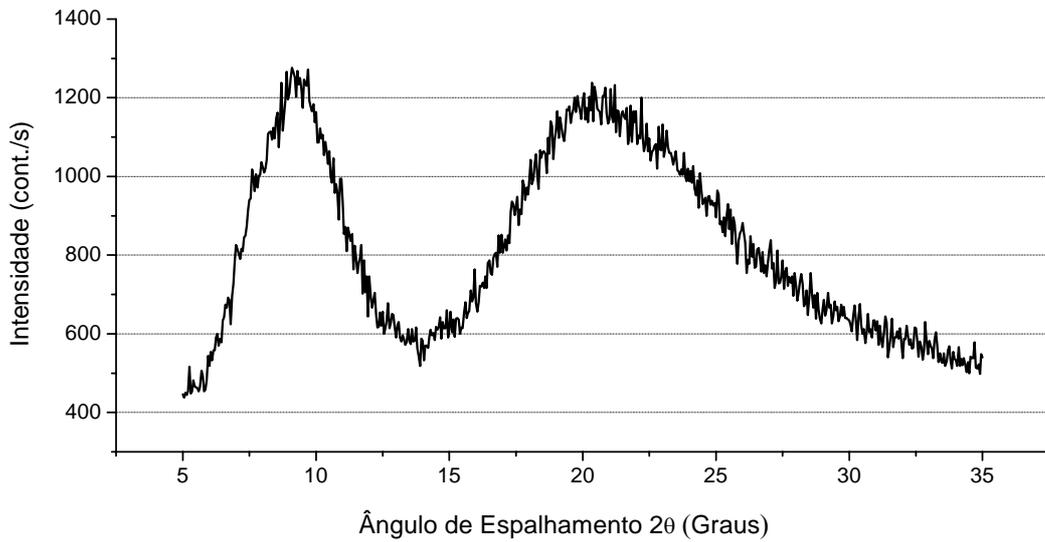
**Figura 4.3.** Perfil de espalhamento típico do plasma, obtido no LNLS.



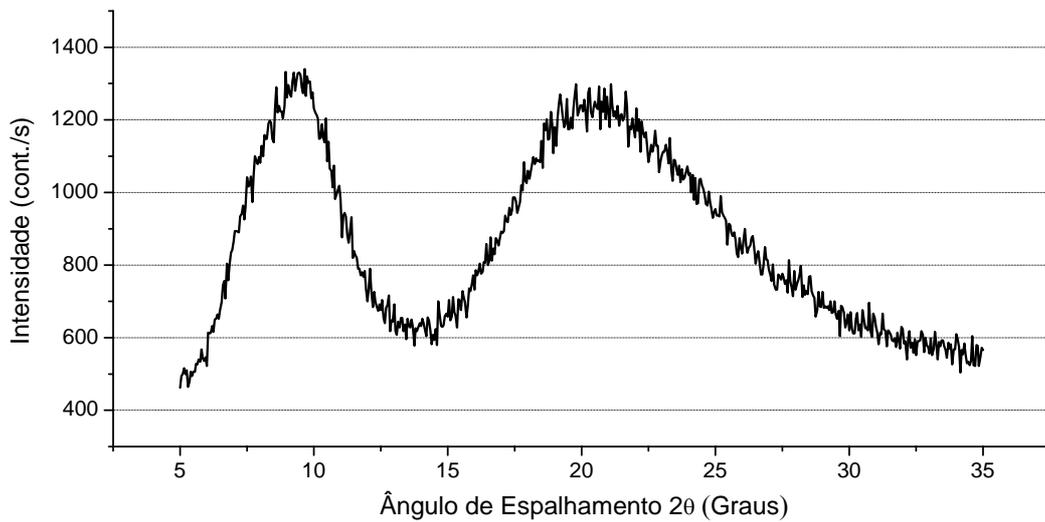
**Figura 4.4.** Perfil de espalhamento típico da hemoglobina, obtido no LNLS.

Podemos perceber que as assinaturas do sangue total, elementos figurados e hemoglobina são bastante semelhantes. Para o plasma notamos uma inversão dos picos e a presença de dois picos estreitos e com grande intensidade. O mesmo ocorre para os perfis obtidos por meio do difratômetro comercial, entretanto podemos observar que esses perfis possuem menor intensidade e, portanto, menor definição.

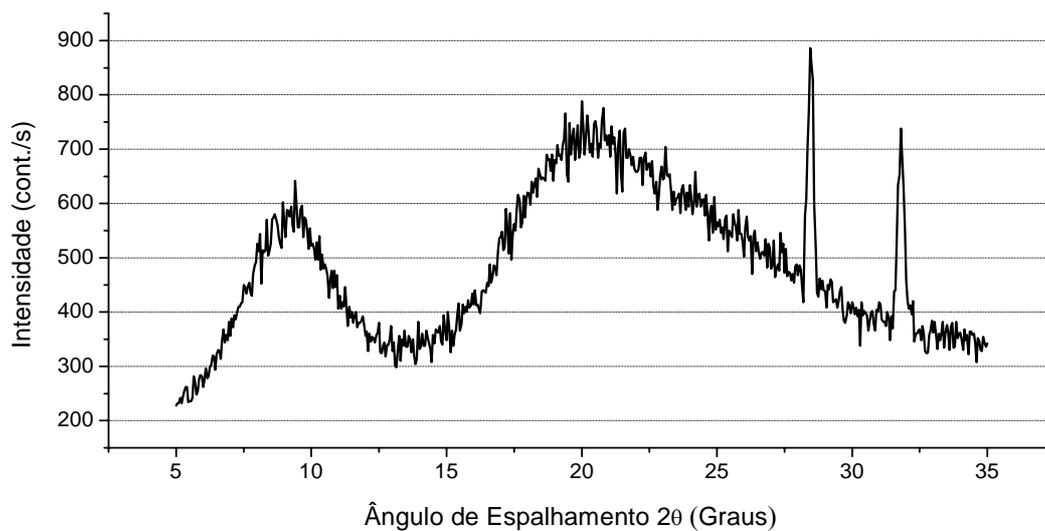
Exemplos dos perfis de espalhamento obtidos com o difratômetro da Shimadzu XRD 6000 são apresentados nas figuras 4.5 a 4.8 para as amostras de sangue total, elementos figurados, plasma e hemoglobina, respectivamente.



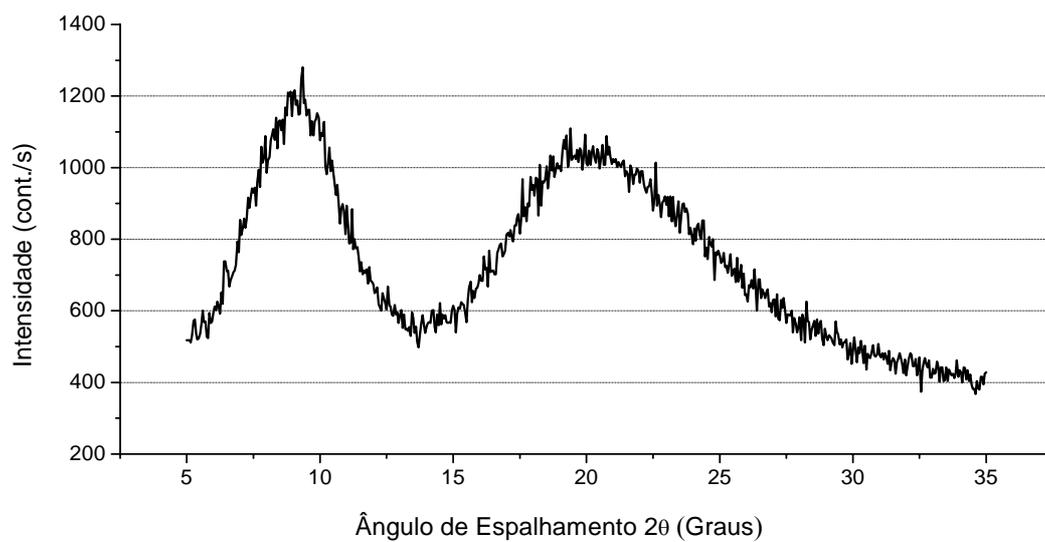
**Figura 4.5.** Perfil de espalhamento típico do sangue total, obtido no LIN.



**Figura 4.6.** Perfil de espalhamento típico dos elementos figurados, obtido no LIN.



**Figura 4.7.** Perfil de espalhamento típico do plasma, obtido no LIN.



**Figura 4.8.** Perfil de espalhamento típico da hemoglobina, obtido no LIN.

## 4.2. Estatística Descritiva dos Parâmetros de Caracterização

Para analisar os perfis de espalhamento obtidos utilizaram-se os cinco parâmetros de caracterização mencionados no capítulo anterior: posição do primeiro pico ( $\theta_1$ ), posição do segundo pico ( $\theta_2$ ), largura a meia altura do primeiro pico (FWHM 1), largura a meia altura do segundo pico (FWHM 2) e razão entre as intensidades do primeiro e segundo pico  $I_1/I_2$ .

Foi realizada a estatística descritiva dos parâmetros de caracterização das amostras medidas no LNLS e LIN. Os resultados estão apresentados nas tabelas 4.1. a 4.8.

**Tabela 4.1.** *Sangue total (n = 45) LNLS.*

Parâmetro	$\theta_1$	$\theta_2$	FWHM1	FWHM2	I1/I2
Média	9,48	20,50	3,54	7,86	1,05
Mediana	9,50	20,50	3,53	7,84	1,04
Moda	9,70	20,70	3,60	8,04	1,00
Desvio padrão	0,20	0,44	0,16	0,43	0,10
Variância da amostra	0,04	0,19	0,02	0,18	0,01
Curtose	-0,92	0,38	-0,89	0,92	0,33
Assimetria	-0,24	0,08	-0,07	-0,14	-0,08
Amplitude	0,70	2,10	0,59	2,31	0,48
Mínimo	9,10	19,50	3,26	6,71	0,81
Máximo	9,80	21,60	3,85	9,02	1,29
Margem de erro para média (95%)	0,06	0,13	0,05	0,13	0,03

**Tabela 4.2.** *Sangue total (n = 34) LIN.*

<b>Parâmetro</b>	<b>01</b>	<b>02</b>	<b>FWHM1</b>	<b>FWHM2</b>	<b>I1/I2</b>
Média	9,26	20,27	3,49	7,43	1,10
Mediana	9,20	20,23	3,48	7,41	1,10
Moda	9,15	20,25	3,46	7,26	----
Desvio padrão	0,21	0,61	0,14	0,43	0,09
Variância da amostra	0,05	0,37	0,02	0,18	0,01
Curtose	1,55	3,26	0,65	-0,50	0,21
Assimetria	0,92	1,37	0,34	0,06	-0,26
Amplitude	1,10	3,05	0,66	1,69	0,39
Mínimo	8,80	19,35	3,20	6,59	0,86
Máximo	9,90	22,40	3,86	8,28	1,26
Margem de erro para média (95%)	0,07	0,21	0,05	0,15	0,03

**Tabela 4.3.** *Elementos figurados (n = 19) LNLS.*

<b>Parâmetro</b>	<b>01</b>	<b>02</b>	<b>FWHM1</b>	<b>FWHM2</b>	<b>I1/I2</b>
Média	9,44	20,52	3,47	7,68	1,08
Mediana	9,50	20,60	3,46	7,80	1,10
Moda	9,50	20,60	3,41	7,77	-----
Desvio padrão	0,14	0,56	0,22	0,62	0,15
Variância da amostra	0,02	0,31	0,05	0,39	0,02
Curtose	-0,54	2,73	3,21	10,42	2,00
Assimetria	-0,17	-1,23	-1,33	-2,97	-0,04
Amplitude	0,50	2,30	0,95	2,82	0,70
Mínimo	9,20	18,90	2,82	5,41	0,74
Máximo	9,70	21,20	3,77	8,23	1,44
Margem de erro para média (95%)	0,07	0,27	0,11	0,30	0,07

**Tabela 4.4.** *Elementos figurados (n = 20) LIN.*

<b>Parâmetro</b>	<b>01</b>	<b>02</b>	<b>FWHM1</b>	<b>FWHM2</b>	<b>I1/I2</b>
Média	9,40	20,60	3,58	7,52	1,09
Mediana	9,40	20,45	3,56	7,52	1,09
Moda	9,50	20,50	3,45	7,92	----
Desvio padrão	0,20	0,88	0,16	0,46	0,05
Variância da amostra	0,04	0,78	0,03	0,21	0,00
Curtose	-0,83	1,33	-0,25	-1,12	2,10
Assimetria	-0,14	1,21	0,64	0,01	-0,80
Amplitude	0,70	3,35	0,56	1,63	0,24
Mínimo	9,00	19,50	3,34	6,67	0,95
Máximo	9,70	22,85	3,90	8,30	1,18
Margem de erro para média (95%)	0,10	0,41	0,07	0,22	0,02

**Tabela 4.5.** *Plasma (n = 19) LNLS.*

<b>Parâmetro</b>	<b>01</b>	<b>02</b>	<b>FWHM1</b>	<b>FWHM2</b>	<b>I1/I2</b>
Média	9,36	20,02	3,36	8,74	0,71
Mediana	9,40	20,00	3,34	8,54	0,72
Moda	9,60	19,60	3,34	9,51	----
Desvio padrão	0,27	0,34	0,23	0,65	0,07
Variância da amostra	0,07	0,12	0,05	0,43	0,01
Curtose	-0,84	0,15	0,45	-1,05	1,47
Assimetria	0,16	0,00	0,83	0,05	0,99
Amplitude	0,90	1,40	0,88	2,12	0,29
Mínimo	9,00	19,30	3,02	7,64	0,60
Máximo	9,90	20,70	3,90	9,76	0,90
Margem de erro para média (95%)	0,13	0,16	0,11	0,32	0,03

**Tabela 4.6.** *Plasma (n = 20) LIN.*

<b>Parâmetro</b>	<b>01</b>	<b>02</b>	<b>FWHM1</b>	<b>FWHM2</b>	<b>I1/I2</b>
Média	9,12	20,08	3,25	7,30	0,81
Mediana	9,10	20,09	3,28	7,45	0,82
Moda	9,10	20,15	3,19	8,04	----
Desvio padrão	0,17	0,25	0,21	0,57	0,05
Variância da amostra	0,03	0,06	0,05	0,33	0,00
Curtose	-0,23	1,58	0,23	-0,37	-0,13
Assimetria	0,12	0,66	-0,45	-0,66	-0,20
Amplitude	0,60	1,10	0,84	1,96	0,21
Mínimo	8,80	19,65	2,76	6,08	0,70
Máximo	9,40	20,75	3,60	8,04	0,91
Margem de erro para média (95%)	0,08	0,12	0,10	0,27	0,02

**Tabela 4.7.** *Hemoglobina (n = 34) LNLS.*

<b>Parâmetro</b>	<b>01</b>	<b>02</b>	<b>FWHM1</b>	<b>FWHM2</b>	<b>I1/I2</b>
Média	9,52	20,30	3,59	7,66	1,13
Mediana	9,50	20,35	3,63	7,67	1,11
Moda	9,60	20,10	3,60	7,32	----
Desvio padrão	0,18	0,37	0,19	0,60	0,10
Variância da amostra	0,03	0,14	0,04	0,35	0,01
Curtose	6,01	0,69	0,21	0,90	-0,49
Assimetria	1,54	-0,35	-0,90	-0,35	0,37
Amplitude	1,00	1,70	0,79	2,85	0,40
Mínimo	9,20	19,30	3,07	6,12	0,96
Máximo	10,20	21,00	3,86	8,97	1,36
Margem de erro para média (95%)	0,06	0,13	0,07	0,21	0,04

**Tabela 4.8.** Hemoglobina ( $n = 24$ ) LIN.

Parâmetro	01	02	FWHM1	FWHM2	I1/I2
Média	9,29	20,26	3,59	7,19	1,20
Mediana	9,25	20,33	3,61	7,21	1,22
Moda	9,25	19,40	3,40	----	----
Desvio padrão	0,21	0,62	0,16	0,43	0,11
Variância da amostra	0,04	0,38	0,02	0,19	0,01
Curtose	0,87	-1,22	-0,93	0,25	-1,19
Assimetria	-0,53	-0,10	0,01	0,52	0,02
Amplitude	0,90	1,85	0,56	1,74	0,33
Mínimo	8,75	19,40	3,34	6,40	1,04
Máximo	9,65	21,25	3,90	8,14	1,37
Margem de erro para média (95%)	0,09	0,26	0,07	0,18	0,05

### 4.3. Testes de Hipótese

Os testes de hipótese aqui utilizados (análise de variância e teste-t de Student) têm como objetivo determinar se é ou não razoável concluir que as médias das populações em estudo são diferentes, ou seja, a finalidade desses testes é estabelecer um critério que permita distinguir entre diferenças amostrais e diferenças reais. Assim, será possível responder a seguinte pergunta: a diferença entre as médias das amostras pode ou não ser atribuída à variação amostral?

### 4.3.1. ANOVA - Parâmetros de Caracterização

Com o objetivo de analisar as diferenças encontradas entre os parâmetros de caracterização dos perfis de espalhamento obtidos para cada tipo de amostra, utilizamos a análise de variância para quantificar, através do *p-value*, as diferenças entre as médias encontradas.

As tabelas 4.9 e 4.10 apresentam resumidamente os valores médios e o *p-value* encontrado para os parâmetros de caracterização obtidos a partir dos perfis de espalhamento para as amostras medidas no LNLS e LIN, respectivamente.

**Tabela 4.9.** Média dos parâmetros de caracterização obtidos no LNLS.

Parâmetros	Sangue Total (n=45)	Elementos Figurados (n=19)	Plasma (n=19)	HB (n=34)	<i>p-value</i>
$\theta_1$ (graus)	9,48 ± 0,20	9,44 ± 0,14	9,36 ± 0,27	9,52 ± 0,18	0,0448
$\theta_2$ (graus)	20,50 ± 0,44	20,52 ± 0,56	20,02 ± 0,34	20,30 ± 0,37	0,0003
FWHM1 (graus)	3,54 ± 0,16	3,47 ± 0,22	3,36 ± 0,23	3,59 ± 0,19	0,0008
FWHM2 (graus)	7,86 ± 0,43	7,68 ± 0,62	8,74 ± 0,65	7,66 ± 0,60	D.A.
Razão I1/I2	1,05 ± 0,10	1,08 ± 0,15	0,71 ± 0,07	1,13 ± 0,10	D.A.

**D.A. – Diferença Apreciável (*p-value* < 0,0001).**

**Tabela 4.10.** Média dos parâmetros de caracterização obtidos no LIN.

Parâmetros	Sangue Total (n=34)	Elementos Figurados (n=20)	Plasma (n=20)	HB (n=24)	<i>p-value</i>
$\theta_1$ (graus)	9,26 ± 0,21	9,40 ± 0,20	9,12 ± 0,17	9,29 ± 0,21	0,0005
$\theta_2$ (graus)	20,27 ± 0,61	20,60 ± 0,88	20,08 ± 0,25	20,26 ± 0,62	<b>0,0700</b>
FWHM1 (graus)	3,49 ± 0,14	3,58 ± 0,16	3,25 ± 0,25	3,59 ± 0,16	D.A.
FWHM2 (graus)	7,43 ± 0,43	7,52 ± 0,46	7,30 ± 0,57	7,19 ± 0,43	<b>0,0902</b>
Razão I1/I2	1,10 ± 0,09	1,09 ± 0,05	0,81 ± 0,05	1,20 ± 0,11	D.A.

**D.A. – Diferença Apreciável (*p-value* < 0,0001).**

Conforme podemos perceber pela tabela 4.9, no LNLS as médias dos parâmetros de caracterização das amostras estudadas são expressivamente diferentes ao nível de significância de 5% ( $\alpha = 0,05$ ), uma vez que o *p-value* apresentou-se abaixo desse valor para todos os parâmetros de caracterização.

Os testes de análise de variância foram repetidos suprimindo-se o plasma sanguíneo e o resultado obtido fornece a informação de que as médias das posições dos picos e respectivas larguras a meia altura não apresentam diferenças expressivas ao nível de significância de 5%, o *p-value* foi maior que 0,10 para todos os parâmetros, com exceção da razão das intensidades ( $I_1/I_2$ ) entre sangue total, elementos figurados e hemoglobina que é significativamente diferente ( $p = 0,00685$ ). Esse resultado sugere que a diferença entre as médias das razões das intensidades se deve à hemoglobina, já que ela apresenta caracteristicamente um aumento no valor dessa razão.

A tabela 4.10 apresenta o resumo das médias das amostras estudadas no LIN, pode-se observar que o teste ANOVA forneceu o resultado de que não há diferença ao

nível de significância de 5% para a posição ( $\theta_2$ ) e largura a meia altura do segundo pico (FWHM2) das amostras de sangue total, elementos figurados, plasma e hemoglobina. Suprimindo-se o plasma sanguíneo, como ocorrido no LNLS, a razão entre as intensidades apresenta um *p-value* bastante expressivo ( $p=0,00002$ ) devido à diferença encontrada entre a hemoglobina e as demais amostras (sangue total e elementos figurados).

### 4.3.2. Teste-t – Sexo e Idade dos Doadores

Para cada parâmetro de caracterização, obtido a partir dos perfis de espalhamento das amostras de sangue total, foram estudadas as possíveis alterações em função do sexo e idade dos doadores, através do *p-value* fornecido pelo teste-t de Student para a diferença das médias de duas populações independentes.

A investigação a respeito do sexo do paciente tem como objetivo analisar se existe modificação nos parâmetros de caracterização devido às diferenças fisiológicas do sangue entre homens e mulheres.

As tabelas 4.11 e 4.12 apresentam os valores médios dos parâmetros de caracterização e os valores de *p* encontrados a partir dos perfis obtidos no LNLS e LIN, respectivamente, para as amostras de sangue total em função do sexo dos doadores. A fim de facilitar a visualização nas tabelas, os níveis de significância estabelecidos para o *p-value* serão relacionados aos símbolos:

▲	Altamente Significativo	$p\text{-value} < 0,05$
■	Significativo	$0,05 \leq p\text{-value} < 0,10$
●	Pouco Significativo	$0,10 \leq p\text{-value} < 0,20$
	Não Significativo	$p\text{-value} \geq 0,20$

**Tabela 4.11.** – Média dos parâmetros de caracterização separados por sexo – LNLS.

Parâmetros	Masculino (n=19)	Feminino (n=25)	<i>p-value</i>
$\theta_1$ (graus)	9,50 ± 0,17	9,47 ± 0,21	0,632
$\theta_2$ (graus)	20,50 ± 0,53	20,52 ± 0,30	0,860
FWHM1 (graus)	3,51 ± 0,15	3,53 ± 0,15	0,676
FWHM2 (graus)	7,99 ± 0,46	7,77 ± 0,38	0,081 <sup>■</sup>
Razão $I_1/I_2$	1,05 ± 0,11	1,04 ± 0,09	0,839

**Tabela 4.12.** – Média dos parâmetros de caracterização separados por sexo – LIN.

Parâmetros	Masculino (n=19)	Feminino (n=14)	<i>p-value</i>
$\theta_1$ (graus)	9,26 ± 0,17	9,25 ± 0,26	0,938
$\theta_2$ (graus)	20,22 ± 0,42	20,30 ± 0,86	0,748
FWHM1 (graus)	3,48 ± 0,14	3,51 ± 0,12	0,635
FWHM2 (graus)	7,35 ± 0,51	7,48 ± 0,49	0,474
Razão $I_1/I_2$	1,10 ± 0,08	1,07 ± 0,10	0,494

No LNLS, o parâmetro mais sensível às diferenças fisiológicas no sangue entre homens e mulheres foi a FWHM2 tendo um *p-value* de 0,081, ou seja, representa a máxima probabilidade de rejeitar hipótese nula e aceitar a hipótese alternativa. Assim, temos 91,9% de confiança de ter tomado a decisão correta ao rejeitar-se a hipótese nula e aceitar a hipótese alternativa. Devido ao tamanho da amostra (n=44) o poder do teste é de 40,7% que representa a probabilidade de rejeitar a hipótese nula quando esta é falsa e a hipótese alternativa é correta. Caso fosse fixado um grau de confiança de 95%

( $\alpha = 0,05$ ) com um tamanho de amostra de  $n=100$  ter-se-ia um poder de 75,7%. Caso o tamanho da amostra fosse aumentado para  $n=200$  ter-se-ia um poder de 96,5%.

Da mesma forma, foram estudadas as possíveis alterações quanto à idade dos doadores:

- crianças/adolescentes: idade < 18 anos
- adultos:  $18 \leq \text{idade} < 60$  anos
- idosos: idade  $\geq 60$  anos.

As tabelas 4.13 e 4.14 apresentam os valores médios dos parâmetros de caracterização encontrados a partir dos perfis obtidos no LNLS e LIN, respectivamente, para as amostras de sangue total em função da idade dos doadores.

**Tabela 4.13.** – Média dos parâmetros de caracterização separados por idade-LNLS.

<b>Parâmetros</b>	<b>Criança (n=9)</b>	<b>Adulto (n=21)</b>	<b>Idoso (n=14)</b>
$\theta_1$ (graus)	$9,46 \pm 0,18$	$9,43 \pm 0,19$	$9,57 \pm 0,19$
$\theta_2$ (graus)	$20,37 \pm 0,42$	$20,47 \pm 0,34$	$20,67 \pm 0,48$
FWHM1 (graus)	$3,55 \pm 0,13$	$3,52 \pm 0,16$	$3,51 \pm 0,14$
FWHM2 (graus)	$7,73 \pm 0,28$	$7,86 \pm 0,50$	$7,95 \pm 0,39$
Razão I1/I2	$1,08 \pm 0,06$	$1,05 \pm 0,12$	$1,02 \pm 0,09$

**Tabela 4.14.** – Média dos parâmetros de caracterização separados por idade - LIN

<b>Parâmetros</b>	<b>Criança (n=7)</b>	<b>Adulto (n=15)</b>	<b>Idoso (n=11)</b>
$\theta_1$ (graus)	9,22 ± 0,18	9,32 ± 0,24	9,19 ± 0,19
$\theta_2$ (graus)	19,91 ± 0,26	20,34 ± 0,77	20,35 ± 0,54
FWHM1 (graus)	3,56 ± 0,14	3,49 ± 0,16	3,46 ± 0,07
FWHM2 (graus)	7,08 ± 0,44	7,36 ± 0,55	7,67 ± 0,32
Razão I1/I2	1,11 ± 0,09	1,08 ± 0,10	1,09 ± 0,07

O teste-t foi realizado para a diferença entre as médias de duas amostras. As tabelas 4.15 e 4.16 apresentam os valores de  $p$  encontrados para os dados obtidos no LNLS e LIN, respectivamente.

**Tabela 4.15.** – Comparação do  $p$ -value entre as diferentes faixas etárias – LNLS.

<b>Parâmetros</b>	<b><math>p</math>-value</b>		
	<b>Criança/Adulto</b>	<b>Adulto/Idoso</b>	<b>Criança/Idoso</b>
$\theta_1$ (graus)	0,711	0,042 <sup>▲</sup>	0,184 <sup>•</sup>
$\theta_2$ (graus)	0,510	0,174 <sup>•</sup>	0,156 <sup>•</sup>
FWHM1 (graus)	0,674	0,813	0,519
FWHM2 (graus)	0,457	0,576	0,153 <sup>•</sup>
Razão I1/I2	0,487	0,482	0,125 <sup>•</sup>

**Tabela 4.16.** – Comparação do *p-value* entra as diferentes faixas etárias – LIN.

Parâmetros	<i>p-value</i>		
	Criança/Adulto	Adulto/Idoso	Criança/Idoso
$\theta_1$ (graus)	0,375	0,161 •	0,722
$\theta_2$ (graus)	0,172 •	0,977	0,067 ■
FWHM1 (graus)	0,352	0,699	0,103 •
FWHM2 (graus)	0,246	0,111 •	0,004 ▲
Razão I1/I2	0,435	0,801	0,521

No LNLS, o parâmetro mais sensível entre adultos e idosos no sangue total é a posição do primeiro pico tendo um *p-value* de 0,042. Assim, temos 95,8% de confiança de ter tomado a decisão correta ao rejeitar-se a hipótese nula e aceitar a hipótese alternativa. Devido ao tamanho da amostra ( $n=35$ ) o poder do teste é de 52,8%. Caso fosse fixado um grau de confiança de 95% ( $\alpha=0,05$ ) com um tamanho de amostra de  $n=100$  ter-se-ia um poder de 94%. Caso o tamanho da amostra fosse aumentado para  $n=200$  ter-se-ia um poder de 99,8%. Podemos notar que o aumento do tamanho da amostra de  $n=100$  para  $n=200$  não traz melhora significativa no poder do teste.

No LIN, o parâmetro mais sensível entre crianças e idosos no sangue total é a largura a meia altura do segundo pico tendo um *p-value* de  $p=0,004$ . Assim, temos 99% de confiança de ter tomado a decisão correta ao rejeitar-se a hipótese nula e aceitar a hipótese alternativa. Devido ao tamanho da amostra ( $n=18$ ) o poder do teste é de 86,7%. Caso fosse fixado um grau de confiança de 95% ( $\alpha=0,05$ ) com um tamanho de amostra de  $n=100$  ter-se-ia um poder de 99,9%.

Pela comparação dos valores de *p* das duas tabelas acima, pode-se observar que, embora os valores das médias nem sempre coincidam, as maiores diferenças são apresentadas na faixa etária entre crianças e idosos.

### 4.3.3. Teste-t – Hemoglobinas A1c e Variantes

A avaliação do nível de hemoglobina A1c ou glicosilada tem como escopo analisar as possíveis alterações nos parâmetros de caracterização dos pacientes com *diabetes mellitus*, já que esses pacientes têm, frequentemente, níveis elevados de HbA1c.

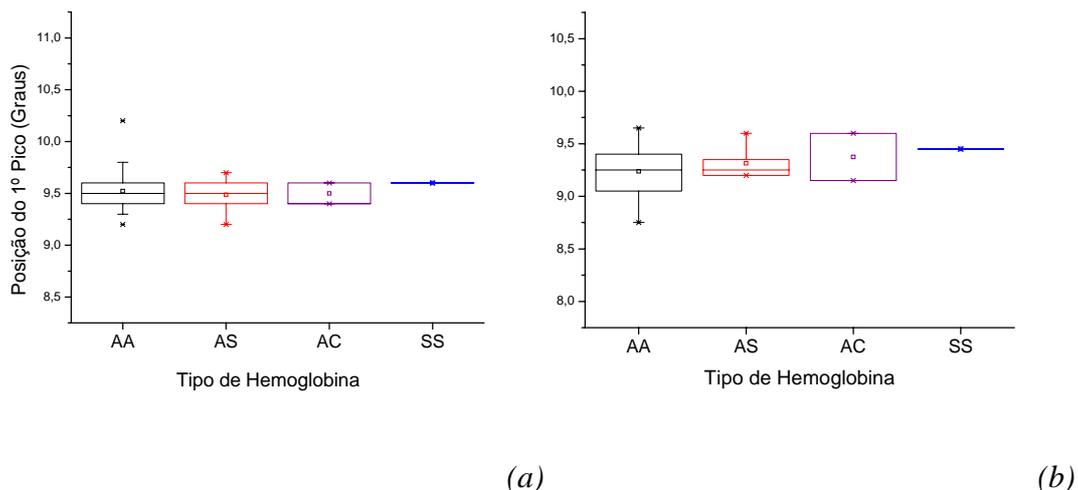
O teste-t foi realizado para a diferença entre as médias dos doadores dentro e acima do valor de referência (VR). Para medidas de sangue total realizadas no LNLS e no LIN. As diferenças entre as médias das amostras medidas no LNLS são mostradas na tabela 4.16. No LIN, não foi observado nenhum *p-value* menor que 0,20.

**Tabela 4.16.** – *Teste de hipótese para VR da hemoglobina A1C, sangue total – LNLS.*

Parâmetros	Acima de VR (n=6)	Dentro de VR (n=12)	<i>p-value</i>	Poder
θ1 (graus)	9,58 ± 0,23	9,46 ± 0,20	0,264	0,178
θ2 (graus)	20,70 ± 0,45	20,52 ± 0,54	0,511	0,089
FWHM1 (graus)	3,48 ± 0,14	3,48 ± 0,16	0,984	0,050
FWHM2 (graus)	7,62 ± 0,60	7,98 ± 0,38	0,141 •	0,321
Razão I1/I2	1,10 ± 0,11	1,01 ± 0,08	0,084 ▪	0,381

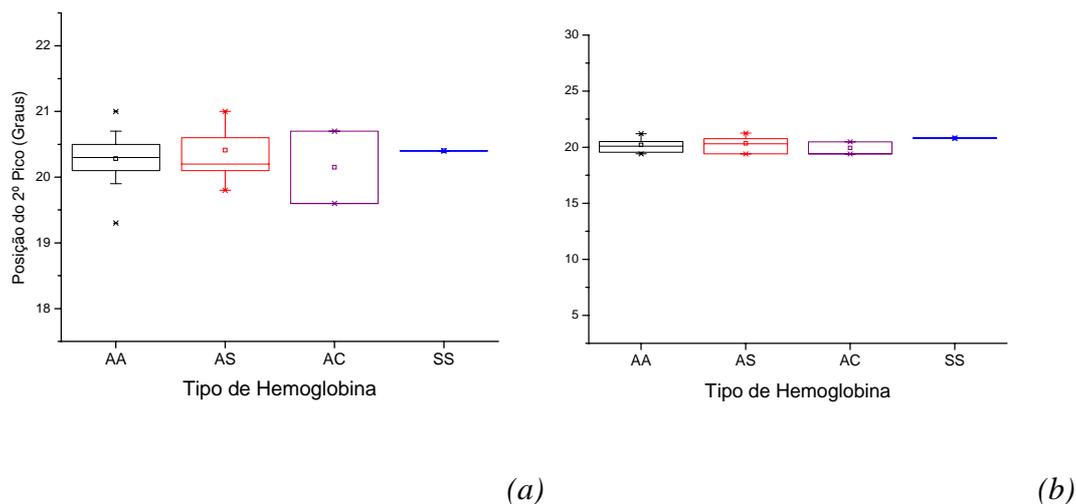
O estudo das hemoglobinas variante tem como objetivo analisar as mudanças nos perfis de espalhamento devido à presença de hemoglobinas de agregação S e C que apresentam formação de tactóides e cristais respectivamente. Dessa forma, foram avaliadas vinte e duas amostras de hemoglobina AA (normal), oito de AS (portador heterozigótico de Hb S), duas de AC (portador heterozigótico de Hb C) e uma SS (portador homozigótico de Hb S).

Os testes de hipóteses foram realizados para todos os parâmetros de caracterização relacionados aos diferentes tipos de hemoglobinas AA, AS, AC e SS. Entretanto, nenhuma diferença nas médias com *p-value* menor que 0,20 foi observada, tanto nas medidas do LNLS quanto nas do LIN. As figuras 4.9 a 4.13 mostram, através de *boxplot*, as distribuições das medidas dos parâmetros de caracterização das amostras de hemoglobina realizadas no LNLS e LIN. Observa-se nas figuras que seguem que para as hemoglobinas AC e SS não é apresentada propriamente uma distribuição, já que se realizaram apenas medidas de uma única amostra de Hb SS e duas de Hb AC. Para hemoglobina SS é apresentada uma linha única que é a própria medida dessa amostra. A Hb AC é apresentada pela caixa onde os pontos medidos são as próprias bordas inferior e superior do *boxplot*. Embora não se possa tirar conclusões precisas a respeito dessas amostras, os dados apresentados mostram que não houve valores discrepantes para os parâmetros de caracterização das mesmas.



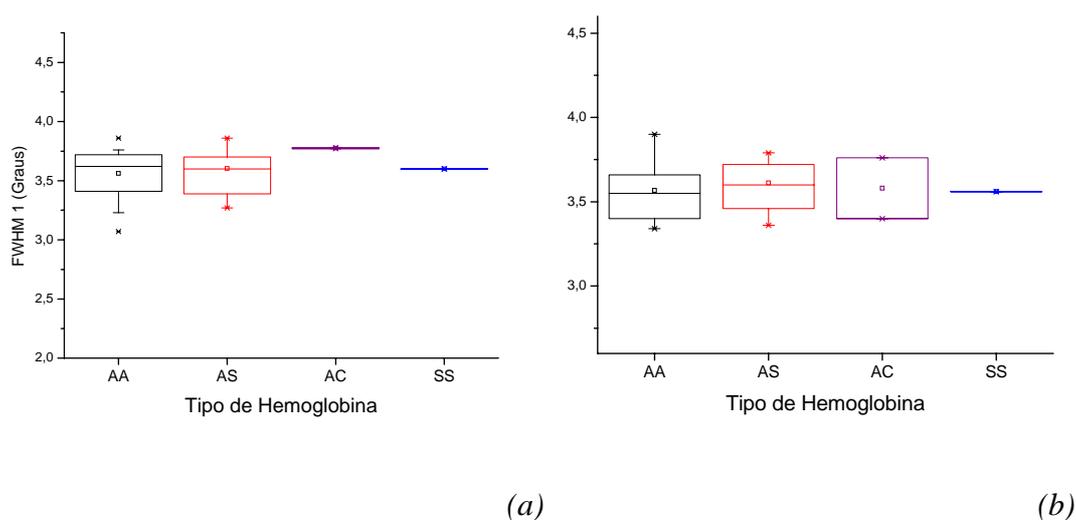
**Figura 4.9.** Representação dos resultados para hemoglobinas variantes, relativos ao primeiro pico, obtido no LMLS (a) e LIN (b).

Na figura 4.9, pode-se observar que as médias e medianas das medidas realizadas em ambos os laboratórios, com os diferentes tipos de hemoglobinas estudadas, são muito próximas. Esse resultado vem corroborar com os resultados obtidos com os testes de hipóteses realizados. Para a posição do primeiro pico, medida no LMLS, nota-se que as distribuições estão mais concentradas em torno da média. Enquanto que no LIN a distribuição ficou mais dispersa e assimétrica, principalmente para as medidas da hemoglobina AS. Para a hemoglobina normal (AA) obteve-se um valor no LMLS que se distanciou bastante das medidas de tendência central (maior que  $10^\circ$ ) ele está representado no *boxplot* e, como se pode ver, deslocou um pouco a média em sua direção.



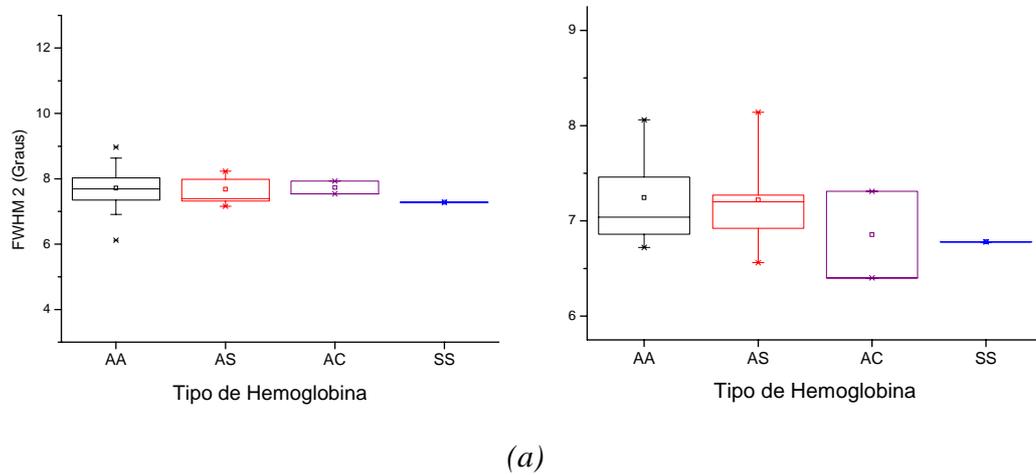
**Figura 4.10.** Representação dos resultados para hemoglobinas variantes, relativos ao segundo pico, obtido no LNLN (a) e LIN (b).

Na figura 4.10, observa-se distribuições bastante concentradas nas medidas no LIN. Nas medidas do LNLN, nota-se uma distribuição assimétrica para as amostras de hemoglobina AS. Para as hemoglobinas AC observa-se uma dispersão maior para as duas medidas, entretanto não ultrapassaram os valores extremos da hemoglobina normal.



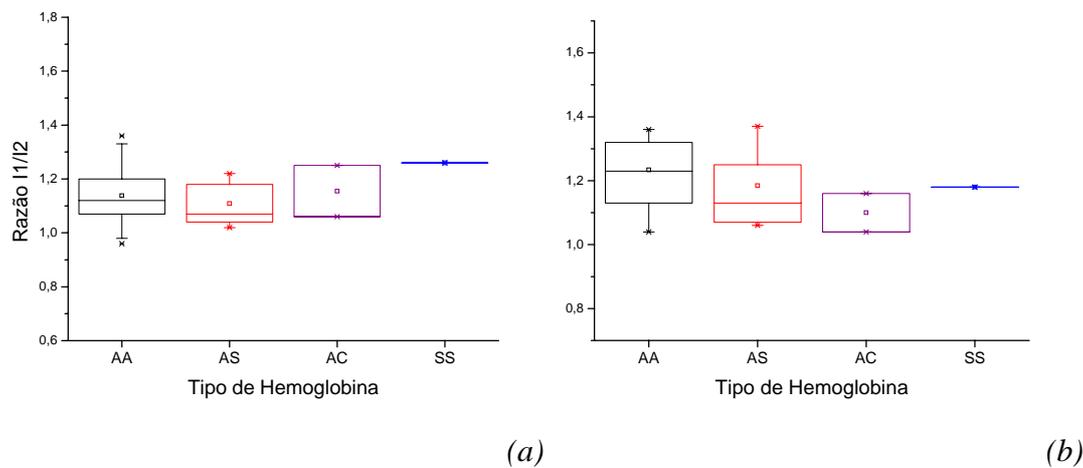
**Figura 4.11.** Representação dos resultados para hemoglobinas variantes, relativos à FWHM 1, obtido no LNLN (a) e LIN (b).

A figura 4.11 mostra as distribuições das medidas da largura a meia altura do primeiro pico. Nota-se que os valores obtidos para as hemoglobinas variantes não ultrapassam as medidas das hemoglobinas normais.



**Figura 4.12.** Representação dos resultados para hemoglobinas variantes, relativos à *FWHM 2*, obtido no LNL (a) e LIN (b).

Observa-se, na figura 4.12, distribuições bastante assimétricas principalmente nas médias realizadas no LIN. Novamente não são observados valores consideravelmente diferentes nas medidas.



**Figura 4.13.** Representação dos resultados para hemoglobinas variantes, relativos à *razão das intensidades*, obtido no LNL (a) e LIN (b).

A figura 4.13 mostra a razão  $I_1/I_2$  para a os diferentes tipos de hemoglobina. É observada facilmente pelos *boxplots* assimetrias nas medidas principalmente para a hemoglobina heterozigótica S, onde se vê que a média foi deslocada devido a valores mais elevados da razão das intensidades.

# CAPÍTULO V

---

## CONCLUSÃO E TRABALHOS FUTUROS

Os perfis de espalhamento apresentados no capítulo anterior mostram que se obteve sucesso na proposta de caracterização das amostras de sangue estudadas, considerando: o domínio da técnica de preparação das amostras, as medidas de espalhamento realizadas e a análise estatística dos dados.

A primeira etapa do processo de preparação das amostras foi alcançada com a separação dos elementos figurados, plasma e hemoglobinas do sangue total. Na segunda etapa, metodologia de secagem das amostras, obteve-se o domínio da técnica de liofilização que proporcionou a transformação do sangue total e seus componentes em pó. Contribuindo, assim, para futuros trabalhos envolvendo hemocomponentes e hemoderivados, que necessitem de amostras pulverizadas com suas propriedades físico-químicas e biológicas preservadas e com níveis de hidratação menores de 1%.

As medidas de espalhamento proporcionaram o domínio da técnica de operação dos equipamentos utilizados e, dessa forma, as informações adquiridas conduziram à utilização de ferramentas estatísticas que desenvolveram a habilidade em compreender as informações contidas nos perfis de espalhamento.

### 5.1. Diferenciação entre os Tipos de Amostras Estudadas

A análise estatística dos parâmetros de caracterização comprova, através dos testes de hipóteses, que existe diferença significativa ( $\alpha = 0,05$ ) entre as amostras de

plasma e às de sangue total, elementos figurados e hemoglobinas. A diferença mais marcante do perfil de espalhamento do plasma reside na inversão dos picos em relação às demais amostras estudadas, que se manifesta pelo valor da razão das intensidades dos picos ( $I_1/I_2 < 1$ ). Outra propriedade importante apresentada nos perfis do plasma sanguíneo é a presença de dois picos estreitos e com alta intensidade, característicos de estruturas cristalinas.

O estudo das posições dos picos e respectivas larguras a meia altura apresentou, pela análise de variância, diferenças apreciáveis ( $\alpha = 0,05$ ) na comparação do plasma com as demais amostras. Assim, pode-se concluir que o perfil de espalhamento típico do plasma se distinguiu dos demais pelas diferenças observadas nos parâmetros de caracterização e pela presença de dois picos estreitos e pronunciados.

As amostras de hemoglobina apresentaram, tipicamente, um aumento na razão das intensidades em relação ao sangue total e elementos figurados o que mostra que esse parâmetro de caracterização distingue as amostras de hemoglobina estudadas. Com relação à posição dos picos e respectivas larguras a meia altura, não foi detectado, pela análise de variância, nenhuma diferença significativa ( $\alpha = 0,05$ ) entre as amostras de hemoglobina e as de sangue total e elementos figurados.

Na comparação do sangue total com os elementos figurados, não foi apresentada diferença significativa ( $\alpha = 0,05$ ) entre as médias dos parâmetros de caracterização dessas duas amostras. Assim, pode-se concluir que, pela metodologia utilizada, não foi possível observar mudanças entre os perfis de espalhamento do sangue total e elementos figurados, com a quantidade de amostras estudadas.

Sumariamente, tem-se que ao nível de significância estabelecido ( $\alpha = 0,05$ ) foi possível distinguir o plasma em todos os parâmetros de caracterização estudados, já a

hemoglobina se distingue pela razão das intensidades. Não houve diferença observável entre o sangue total e elementos figurados.

## **5.2. Diferenciação entre Sexos**

Na comparação das médias dos parâmetros de caracterização das amostras de sangue total, em relação ao sexo dos doadores, pode-se concluir que, com a quantidade de amostras estudadas, nenhuma diferença significativa foi observada. Com a exceção da FWHM2 das médias realizadas no LNLS, que apresentou um poder para o teste-t de 40,7% para um tamanho de amostra de  $n=44$ . Para que se possa certificar que realmente existe diferença significativa em relação a FWHM2 necessita-se de um tamanho da amostra de  $n=200$ , a fim de que se possa ter um poder do teste-t de 96,5%. Já para os outros parâmetros, um tamanho de amostra de 200 não seria suficiente para se distinguir entre as médias, o que sugere que o sexo dos doadores não influencia de forma apreciável nos perfis de espalhamento do sangue total.

## **5.3. Diferenciação entre Faixas Etárias**

As médias dos parâmetros de caracterização do sangue total mostraram-se mais sensíveis em relação às diferentes faixas etárias estudadas (crianças/adolescentes, adultos e idosos). Isso pode ser comprovado pelo *p-value* fornecido pelo teste-t de Student. Embora com um número pequeno de amostras, pode-se perceber, pelas tabelas 4.15 e 4.16, que houve diferenças entre as médias – principalmente entre crianças e idosos.

Na análise dos parâmetros de caracterização, percebe-se que para  $\theta_1$  não há deslocamento preferencial do primeiro pico, entretanto a sua largura a meia altura (FWHM1) apresenta uma pequena diminuição com aumento da idade, como pode ser visto nas tabelas 4.13 e 4.14. Já para  $\theta_2$ , pode-se notar uma tendência de deslocamento da posição do pico para a direita conforme o aumento da idade dos doadores. Um aumento diretamente proporcional da FWHM2 com relação à idade dos doadores também é apresentado. Ou seja, com o aumento da idade o primeiro pico tem uma pequena tendência a se estreitar, enquanto o segundo tende a se deslocar para a direita ao mesmo tempo em que se alarga. Esses comportamentos se manifestaram nas medidas realizadas em ambos os laboratórios.

Na análise de  $I_1/I_2$ , pode-se observar uma diminuição na razão das intensidades com o aumento da idade, que se manifestou, principalmente, nas medidas realizadas no LNLS. Devido a maior intensidade do feixe espalhado no Laboratório Nacional de Luz Síncrotron, os perfis possuem melhor definição o que pode ser comprovado pela observação das figuras 4.1 a 4.8. Assim, tem-se mais confiança nas medidas realizadas no LNLS já que o erro na razão das intensidades foi menor que 2%. No entanto, os resultados obtidos no LIN estão de acordo com aqueles obtidos no LNLS demonstrando assim, a viabilidade de uso de um difratômetro comercial em aplicações nas áreas biomédicas.

#### **5.4. Diferenciação entre Níveis de Hemoglobina A1c**

Para a realização do estudo dos níveis de hemoglobina A1c foi realizado o teste-t para os níveis de HBA1c dentro e acima do valor de referência (VR). Entende-se por VR os valores recomendados pela Associação Americana de Diabetes, isto é, um

nível menor que 7% de HbA1c está dentro do valor de referência. Níveis maiores ou iguais a 7% estão acima do VR e representam um controle glicêmico ruim e é fator de risco para complicações do diabetes (SUMITA & ANDRIOLO, 2006). A hemoglobina A1c tem características peculiares isto é, o terminal valina da cadeia beta está ligado à glicose por meio de uma ligação estável e irreversível (BEM & KUNDE, 2006). Dessa forma, resolveu-se investigar de que maneira a hemoglobina A1c influencia os perfis de espalhamento para valores acima e abaixo do VR.

As médias dos parâmetros de caracterização mostram que as maiores diferenças encontradas se manifestaram na FWHM2 e  $I_1/I_2$  das medidas realizadas no LNLS. A tabela 4.16 apresenta esses resultados quantificados pelo *p-value*. Além disso, observe-se que o poder do teste está baixo, isso mostra que se deve aumentar o número de amostras para se ter resultados melhores. As medidas realizadas no LIN não apresentaram diferenças nas médias dos parâmetros de caracterização (*p-value*<0,20).

## **5.5. Diferenciação entre Tipos Variantes de Hemoglobinas**

Neste trabalho, os diferentes tipos de hemoglobina AA, AS, AC e SS foram estudados. Conforme mostrado no capítulo anterior observa-se que não houve diferença nas médias dos parâmetros de caracterização (*p-value*<0,20), para a quantidade de amostras utilizadas. As hemoglobinas AC e SS são menos comuns na população do que as traço falciforme (AS), por esse motivo obteve-se poucas amostras para este estudo. Apesar do número reduzido de amostras, é observado que não houve mudança na forma dos perfis de espalhamento. O mesmo comportamento se manteve na comparação da hemoglobina AA com a AS, nesse caso com um número maior de amostras  $n=30$ , como se pode observar nas figuras 4.9 a 4.13.

O objetivo da comparação dos perfis de espalhamento das hemoglobinas de agregação com as hemoglobinas normais (AA) é investigar as possíveis formações de polímeros. Analisando as médias dos parâmetros de caracterização das HB AA e as duas amostras HB AC notamos que não houve valores discrepantes. Segundo ARAUJO *et al.* (1999), não se observa formação de cristais nos portadores de HB C (n=8), sem que haja tratamento específico das amostras. Esse estudo vem corroborar com os resultados obtidos neste trabalho.

A amostra única de hemoglobina SS não apresentou mudança nas médias dos parâmetros de caracterização. Entretanto, não se pode afirmar que haja modificação, já que para isso, devem-se realizar medidas com um número maior de amostras. Essa medida serve apenas como indicativo que os perfis não são alterados com a metodologia utilizada. As amostras de hemoglobina AS (n=8) vêm apoiar essa suspeita.

A formação de tactóides (cristais unidirecionados) se dá, principalmente, nas HB SS com baixa tensão de oxigênio (HORIUCHI *et al.*, 1988). Esse fenômeno também ocorre nos heterozigotos, mas com menor intensidade (EATON & HOFRICHTER, 1987). Dessa forma, deve-se tratar as amostras de hemoglobinas de forma a forçar o estado de desoxigenação, a fim de favorecer a formação de cristais.

## **5.6. Trabalhos Futuros e Sugestões**

Para que se possa validar os resultados sobre as mudanças nos perfis de espalhamento relativo ao sexo, idade, nível de hemoglobina A1c e variantes deve-se aumentar o número de amostras. Entretanto, para uma melhor caracterização dos perfis de espalhamento seria interessante aumentarmos também os parâmetros de caracterização utilizados. Além da posição, larguras a meia altura e razão das

intensidades dos picos, sugere-se como novos parâmetros de caracterização: razão das áreas dos picos, centróide dos picos, meia largura direita (RHW) e meia largura esquerda (LHW) dos picos.

No estudo das hemoglobinas de agregação deve-se realizar preparação adequada das amostras para forçar a formação de cristais. O metabissulfito de sódio ( $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$ ) reduz a tensão de oxigênio (NAOUM, 1987). Dessa forma, deve-se preparar o sangue total e hemoglobina com a solução metabissulfito de sódio a 2%. Outra forma de forçar o estado desoxigenado é através da metodologia de cristalização proposta por ARAUJO *et al.* (1999) de incubação com tampão fosfato com um pH de 7,4 e 1,8M ou solução de NaCl a 3%.

## **5.7. Considerações Finais**

As assinaturas das amostras de sangue total, elementos figurados e hemoglobinas são bastante semelhantes. Isso sugere que o perfil apresentado por essas amostras seja dominado pelo perfil da hemoglobina, já que as hemácias são as células mais numerosas no sangue e 90% da parte sólida é constituída de hemoglobina, 64.725 Daltons (SOUZA & ELIAS, 2006).

Segundo SOUZA & ELIAS (2006), as proteínas também são o principal componente do plasma, suas moléculas são grandes e possuem elevado peso molecular. As três principais são: a albumina (69.000 Daltons) que corresponde a 55% das proteínas do plasma; globulina (entre 80.000 e 200.000 Dalton) com 38% das proteínas e em menor quantidade o fibrinogênio com 7% das proteínas e peso molecular de (350.000 a 400.000 Daltons). Isso sugere que o perfil de espalhamento do plasma é devido à presença dessas proteínas, além de estruturas cristalinas que apesar de estarem

em menor quantidade, são bastantes destacadas devido ao seu alto grau de ordenamento.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

---

- ARAÚJO, J.T.; BATISSOCO, A.C.; BODEMEIER, L. “*In Vivo* and *In Vitro* Demonstration of Hemoglobin C Crystals in Non-Splenectomized Patients”, *Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo*, São Paulo, 41(4), 1999.
- AZÁROF, L.V. *Elements of X-Ray Crystallography*. Mc Graw-Hill, 1968.
- BARROSO, R.C. *et al.*, “Angle-Dispersive Diffraction with Synchrotron Radiation at LNLS (Brazil): Potential for Use in Biomedical Imaging”, *Appl. Rad. Isoto.* 53(4-5), 717-724, 2000.
- BEM, A. F.; KUNDE, J., “The importance of glycated hemoglobin determination in the management of chronic complications associated with diabetes mellitus”, *J. Bras. Patol. Med. Lab.*, Rio de Janeiro, v. 42, n. 3, 2006.
- BONACELLA, P. H. *A poluição das águas*. São Paulo, Moderna, 1991.
- BOSS, E. A., *Modelagem e otimização do processo de liofilização: aplicação para leite desnatado e café solúvel*, D.Sc. Tese, Universidade Estadual de Campinas, Campinas – SP, Brasil, 2004.
- CAMPOS, L.M.F.R. *et al.*, “Hemoglobinas anormais em sangue de cordão umbilical”, *Rev. Bras. Hematol. Hemoter.*”, vol. 28, nº. 1, pp. 67-69, 2006
- CANCHO V.G., *Noções de Estatística e Probabilidade*, 1ª ed, Ouro Preto, 2004.
- CASTRO, C.R.F. *et al.*, “Coherent Scattering Characteristics of Normal and Pathological Breast Human Tissues”, *Rad. Phys. Chem.* 71(3-4), 649-651, 2004.
- CASTRO, C.R.F. *et al.*, “Scattering Signatures for Some Human Tissues Using Synchrotron Radiation”, *X-Ray Spect.* 34(6), 477-480, 2005.

- CASTRO, C.R.F. *Tomografia por Difração de Raios X em Tecidos Biológicos Utilizando Radiação Síncrotron*, Tese de Doutorado, COPPE/UFRJ, 97p., 2006.
- CAZARIN, G. *Doenças hematológicas e ambiente: Estudo do registro de condições de risco em serviço especializado*, Dissertação de Mestrado, CPqAM/FIOCRUZ/MS, 158p., 2005.
- CESAREO, R. *et al.*, “Interaction of keV Photons with Matter and New Application”, *Phys. Reports* 213(3), 117-178, 1992.
- DESOUKY O.S., ELSHEMEY W.M., *et al.*, “Analysis of Low-Angle X-Ray Scattering Peaks from Lyophilized Biological Samples”, *Phys. Med. Biol.* 46 2099-2106, 2001.
- EATON W.A., HOFRICHTER J., “Hemoglobin S gelation and sickle cell disease”. *Blood*, v. 70, p. 1245-1266, 1987.
- ELSHEMEY W.M., DESOUKY O.S. *et al.*, “Low-Angle X-Ray Scattering from Lyophilized Blood Constituents”, *Phys. Med. Biol.* 46, 531-539, 2001.
- ELSHEMEY, W.M. *et al.*, “Characteristics of Low-Angle X-Ray Scattering from Some Biological Samples”, *Phys. Med. Biol.* 44, 2907-2915, 1999.
- EVANS S.H. *et al.*, “Measurement of Small-Angle Photon Scattering for Some Breast Tissues and Tissue Substitute Materials”, *Phys. Med. Biol* 36 (1), 7-18, 1991.
- GILES C. *et al.*, “High-Resolution X-Ray Diffraction Beamline at the LNLS for the Study of Charge, Orbital and Magnetic Structures”, *J. Synchrotron Radiat.* 10, 430-434, 2003.
- HORIUCHI K, BALLAS SK, ASAKURA T. “The effect of deoxygenation rate on the formation of irreversibly sickled cells”, *Blood*, v. 71, p. 46-51, 1988.
- JAMRA, M.; LORENZI, T. F., *Sistema hematopoiético*, *Semiologia Médica*. 3ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, pt. 10, Cap. 142, p. 763-787, 1997.

- JEANNE A. S., “The natural history of sickle cell disease”, *Annals New York Academy of Sciences*, 1987.
- KANE, P.P. *et al.*, “Elastic Scattering of  $\gamma$ -Rays and X-Rays by Atoms”, *Phys. Reports* 140(2), 75-159, 1986.
- LAPPONI, J.C., *Estatística usando o Excel 5 e 7*, 1ª ed, São Paulo, 1997.
- LEONELI GG *et al.*, Hemoglobinas anormais e dificuldade diagnóstica. *Rev Bras Hematol Hemoter* 2000;22(3):396-403, 2000.
- LEVINE *et al.*, *Statistics for Managers Using MS Excel*, 3ª ed, New York, 2002.
- LEWIS, R., “Medical Applications of Synchrotron Radiation X-Rays”, *Phys. Med. Biol.* 42: (7), 1213-1243, 1997.
- LIAPIS, A. I., MILLMAN, M.J., MARCHELLO, J.M, “An Analysis of the Lyophilization Process Using a Sorption-Sublimation Model and Various Operational Policies”, *AIChE Journal. Missouri*, v.31, n. 10, p. 1594-1604, 1985.
- MOTTA. C. *et al.*, *Corpo Humano: Anatomia e Fisiologia*, 1ª ed, Rio de Janeiro, SENAC, 2004.
- NAOUM, P.C., *Diagnóstico das Hemoglobinopatias*, Brasil, São Paulo, Sarvier, 1987.
- OLIVEIRA, H. P. “Anemias aplásticas e diseritropoiéticas”, *Hematologia Clínica*. 3ed. Rio de Janeiro: Atheneu, cap. 11, p. 215-225, 1990.
- OLIVEIRA, R.R., *Imunohematologia e Transfusões Sangüíneas*, Academia de Ciência & Tecnologia, 2003.
- RAZOUK F.H. & REICH, E.M.V. “Caracterização, produção e indicação clínica dos principais hemocomponentes”, *Rev. bras. hematol. hemoter.* 26 (2):126-134, 2004.
- SOUZA M. H., ELIAS D.O., *Fundamentos da Circulação Extracorpórea*, 2ª ed, Vol. I, Centro Editorial Alfa Rio, Rio de Janeiro, 2006.

SUMITA N. M., ANDRIOLO A., W., “Importância da determinação da hemoglobina glicada no monitoramento do paciente portador de diabetes mellitus”, *J. Bras. Patol. Med. Lab.* 42(3), Rio de Janeiro, 2006.

TORTORA G. J., GRABOWSKI S. R., *Corpo Humano: Fundamentos de Anatomia e Fisiologia*, 6ª edição, Porto Alegre, Artmed, 2006.

ZHENG, X, WU, S.L., HANCOCK, W.S., “Glycation of interferon-beta-1b and human serum albumin in a lyophilized glucose formulation Part III: Application of proteomic analysis to the manufacture of biological drugs”, *Int. J. Pharm.* 322, 136–145, 2006.