

DETERMINAÇÃO DA COMPOSIÇÃO MINERAL NA FRAÇÃO CELULAR DE
SANGUE DE INDIVÍDUOS PORTADORES DE LEUCEMIA MIELÓIDE CRÔNICA
USANDO EDXRF

Glauber Tebaldi Dias

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. Ricardo Tadeu Lopes, D.Sc.

Prof. Marcelino José dos Anjos, D.Sc.

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

Prof. Inayá Corrêa Barbosa Lima, D.Sc.

RIO DE JANEIRO, RJ - BRASIL
SETEMBRO DE 2007

DIAS, GLAUBER TEBALDI

Determinação da Composição Mineral
na Fração Celular de Sangue de Indivíduos
Portadores de Leucemia Mielóide Crônica
Usando EDXRF [Rio de Janeiro] 2007

VI,73 p. 29,7 cm (COPPE / UFRJ,
M.Sc., Engenharia Nuclear, 2007)

Dissertação - Universidade Federal do
Rio de Janeiro, COPPE

1.Fluorescência de raios X por dispersão de
energia

2.Sangue Humano

3.Leucemia Mielóide Crônica

I. COPPE /UFRJ II. Título (série)

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

DETERMINAÇÃO DA COMPOSIÇÃO MINERAL NA FRAÇÃO CELULAR DE
SANGUE DE INDIVÍDUOS PORTADORES DE LEUCEMIA MIELÓIDE CRÔNICA
USANDO EDXRF

Glauber Tebaldi Dias

Setembro / 2007

Orientador: Ricardo Tadeu Lopes

Programa: Engenharia Nuclear

A leucemia mielóide crônica (LMC) é uma doença que atinge a medula óssea fazendo com que esta produza um número elevado de glóbulos brancos anormais. Ela é responsável por cerca de 20% dos casos de leucemia, sendo mais comum em indivíduos de 25 a 60 anos e raramente atinge crianças com idade inferior a 10 anos.

Este trabalho faz um estudo comparativo entre as concentrações elementares de sangue sadio (SAD) e de sangue proveniente de portadores de LMC. Para tal foram coletadas 60 amostras de indivíduos de cada um dos grupos. As amostras foram centrifugadas e apenas a parte celular do sangue foi analisada. As amostras foram liofilizadas e transformadas em pastilhas, o que facilitou a obtenção das medidas.

Para a análise das amostras foi utilizada a técnica de fluorescência de raios X por dispersão de energia (EDXRF). Esta é uma técnica que apresenta grande facilidade de execução e eficiência na determinação de concentrações elementares. Os elementos encontrados foram S, Cl, K, Fe, Cu, Zn, Br e Rb. A análise estatística dos resultados baseou-se na separação das amostras de acordo com o sexo dos indivíduos e foi obtida empregando-se o teste *t de Student*. Quase todos os elementos apresentaram diferenças estatisticamente significativas em suas concentrações, as exceções foram os Fe e o Cu.

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

DETERMINATION OF MINERAL COMPOSITION IN BLOOD CELLULAR
FRACTION OF PATIENTS WITH CHRONIC MYELOID LEUKEMIA BY EDXRF

Glauber Tebaldi Dias

September / 2007

Advisor: Ricardo Tadeu Lopes

Department: Nuclear Engineering

Chronic myeloid leukemia (LMC) is a disease that leads the bone marrow to produce a huge number of anomalous white blood cells. It is responsible for about 20% of the leukemia cases, being more common among 25 to 60-year-old individuals, and rare among children below the age of 10.

This research is a comparative study of the elementary concentrations of healthy blood (SAD) and blood from LMC patients. We have collected 60 samples of individuals from each group. The samples were centrifuged and only the cellular blood portion was analyzed. The samples were then lyophilized and transformed in pellets, in order to facilitate measuring.

The energy dispersion X-ray fluorescence (EDXRF) technique has been used to analyze the samples. This technique presents great execution facility and efficiency in determining the elementary concentrations. The following elements were detected: S, Cl, K, Fe, Cu, Zn, Br and Rb. The statistical analysis of the results was based on the separation of the samples according to gender, and it was accomplished through Student t-test. The great majority of the elements presented significant statistical differences in their concentrations, except for Fe and Cu.

SUMÁRIO

Capítulo I – Introdução.....	01
Capítulo II – Revisão Bibliográfica.....	03
Capítulo III – Fundamentos Teóricos.....	09
III.1 – Princípios físicos.....	09
III.1.1 – Modelo atômico de Schrödinger.....	09
III.1.2 – Espectros discretos de raios X.....	11
III.1.3 – Efeito Auger.....	14
III.1.4 – Fator de excitação.....	15
III.1.5 – Expressão para intensidade de fluorescência de raios X.....	16
III.1.6 – Fluorescência de raios X por dispersão de energia.....	20
III.2 – Princípios biológicos.....	21
III.2.1 – O sangue.....	21
III.2.2 – Leucemia mielóide crônica.....	23
Capítulo IV – Materiais e Métodos.....	25
IV.1 – Arranjo experimental.....	25
IV.1.1 – Conjunto fonte de alimentação - tubo de raios X.....	27
IV.1.2 – Os detectores.....	27
IV.1.3 – Suporte de PVC (geometria de medição).....	30
IV.2 – Filtragem da radiação.....	31
IV.3 – Amostras de sangue.....	33
IV.3.1 – Coleta das amostras no HEMORIO.....	33
IV.3.2 – Preparação das amostras.....	33
IV.4 – Tratamento das medidas.....	36
IV.4.1 – Curva de absorção.....	37
IV.4.2 – Curva de sensibilidade.....	38
IV.4.3 – Cálculo das concentrações.....	38
IV.5 – Limite de detecção.....	39

Capítulo V – Resultados e discussão.....	40
V.1 – Curva de absorção.....	40
V.2 – Curva de sensibilidade.....	42
V.3 – Medida da amostra certificada.....	46
V.4 – Limite de detecção.....	46
V.5 – Espectros de EDXRF.....	49
V.6 – Concentrações elementares nas amostras de sangue.....	51
V.7 – Comparação entre as concentrações elementares de sangue.....	52
V.8 – Comparação entre as concentrações elementares de sangue para ambos os sexos..	53
V.9 – Tratamento estatístico dos resultados.....	57
V.9.1 – Teste t de Student para amostras de sangue sadio e com LMC.....	59
V.9.2 – Teste t de Student para amostras de sangue de homens sadios e portadores de LMC.....	59
V.9.3 – Teste t de Student para amostras de sangue de mulheres sadias e portadoras de LMC.....	60
V.9.4 – Comparação entre os testes t de Student aplicados nas três situações.....	60
V.10 – Análise dos resultados.....	61
Capítulo VI – Conclusões e Sugestões.....	63
Capítulo VII – Bibliografia.....	65
Apêndice A.....	68
Apêndice B.....	71
Apêndice C.....	73

CAPÍTULO I

INTRODUÇÃO

A leucemia mielóide crônica (LMC) é uma doença na qual células que se encontram na medula óssea se transformam em cancerosas e produzem um número elevado de glóbulos brancos.

A LMC é responsável por cerca de 20% de todos os casos de leucemia. Ela é mais comum em adultos de 25 a 60 anos e atingem mais frequentemente a população masculina. Raramente se apresenta na infância, representando apenas 3% dos casos de leucemia que ocorrem nesta faixa etária, mas quando se manifesta nessas circunstâncias é mais agressiva que o normal.

Esta doença não possui causas bem definidas, além de ser de difícil diagnóstico precoce por não apresentar sintomas em suas fases iniciais. Portanto, estudos que encontrem quaisquer sinais do surgimento dessa doença são de grande importância para a área médica, pois podem melhorar as condições de tratamento e, conseqüentemente, aumentar o tempo de sobrevivência dos pacientes.

Este trabalho tem por objetivo determinar as concentrações dos elementos presentes na parte celular do sangue de indivíduos portadores de LMC e verificar a variação destas concentrações quando comparadas com as concentrações determinadas em amostras de sangue de indivíduos sadios. Para tal, foram analisadas 60 amostras de sangue de indivíduos portadores de LMC e os resultados obtidos foram comparados com outros obtidos de amostras de um grupo de 60 indivíduos sadios (SAD).

Para se determinar as concentrações elementares do sangue foi utilizada a técnica de fluorescência de raios X por dispersão de energia (EDXRF). Esta é uma técnica bastante utilizada na análise de concentrações de elementos presentes em vários tipos de amostras. Ela consiste em analisar a radiação característica emitida por uma amostra quando, sobre ela, se faz incidir um feixe de raios X. As vantagens desta técnica em relação a outras técnicas analíticas são: eficiência, facilidade de execução, preservação da amostra e pouca interferência de elementos.

O principal estímulo à realização deste trabalho foi a carência de estudos focados neste tema até então. Embora a utilização de EDXRF para a determinação de concentrações elementares de diversos tipos de amostras seja muito difundida, trabalhos envolvendo amostras de sangue humano, e ainda investigando leucemia, são poucos.

MANGAL *et al.* (1981) usou ativação neutrônica para analisar o efeito da leucemia na concentração de alguns elementos em sangue humano total. EKINCI *et al.* (2004) propôs que EDXRF seria um método alternativo para a determinação das concentrações elementares em sangue humano de pacientes portadores de leucemia, câncer de pulmão e esquizofrenia. Os resultados obtidos por estes pesquisadores são um tanto quanto discrepantes, o que pode ter sido causado pelo pequeno número de amostras analisadas em cada um destes estudos.

Essa falta de concordância entre os resultados até então obtidos e a não abordagem específica da leucemia mielóide crônica como objeto de estudo, serviram como motivações adjacentes à concretização deste estudo.

CAPÍTULO II

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Neste capítulo serão descritos métodos e resultados apresentados em outros trabalhos que, de certa forma, serviram como base para o estudo desenvolvido neste trabalho.

STUMP et al. (1977) relataram a aplicabilidade da técnica de fluorescência de raios X na análise multielementar em amostras biológicas. Utilizaram a fluorescência de raios X por dispersão de energia com alvo secundário para analisar amostras de sangue total e plasma humanos. O grupo de indivíduos estudados era composto por 38 mulheres com idade de 18 a 22 anos e 35 homens de 18 a 33 anos. Do sangue colhido de cada indivíduo, apenas 1ml foi retirado para a preparação das amostras. Na preparação das amostras o sangue foi centrifugado para a retirada do plasma e, em seguida, liofilizado e transformado em pastilhas de 13mm de diâmetro. Os elementos que tiveram determinadas suas concentrações foram o cobre, o zinco, o bromo e o rubídio. Em sangue total, as concentrações obtidas foram: Cu ($1,07 \pm 0,25\mu\text{g.g}^{-1}$), Zn ($7,76 \pm 0,88\mu\text{g.g}^{-1}$), Br ($3,46 \pm 0,69\mu\text{g.g}^{-1}$) e Rb ($3,65 \pm 0,45\mu\text{g.g}^{-1}$), para homens e Cu ($1,02 \pm 0,21\mu\text{g.g}^{-1}$), Zn ($7,07 \pm 0,73\mu\text{g.g}^{-1}$), Br ($2,87 \pm 0,45\mu\text{g.g}^{-1}$) e Rb ($4,04 \pm 0,77\mu\text{g.g}^{-1}$), para mulheres. Este trabalho reafirmou a técnica de EDXRF como um bom método não destrutivo de análise elementar.

MANGAL et al. (1981) utilizaram a técnica de ativação neutrônica para estudar a concentração de elementos presentes em sangue total humano. Foram analisadas amostras provenientes de 26 indivíduos dos quais 9 eram sadios e 17 eram portadores de leucemia. Os elementos estudados foram Fe, Co, Zn, Cr, Se, Rb, Sc e Hg. Os elementos que apresentaram maiores concentrações foram o Fe, Zn e Rb. Em sangue sadio tais concentrações foram $3,92 \pm 0,58 \times 10^2\mu\text{g.g}^{-1}$ para o Fe, $36,86 \pm 7,7\mu\text{g.g}^{-1}$ para o Zn e $12,25 \pm 5,14\mu\text{g.g}^{-1}$ para o Rb, enquanto em sangue leucêmico os valores encontrados foram Fe ($3,54 \pm 0,67 \times 10^2\mu\text{g.g}^{-1}$), Zn ($34,19 \pm 8,58\mu\text{g.g}^{-1}$) e Rb ($7,90 \pm 3,14\mu\text{g.g}^{-1}$). A redução de 9,7% de ferro foi atribuída à redução de eritrócitos no sangue leucêmico, a redução do

zinco foi considerada como não significativa. O rubídio apresentou a maior variação de concentração entre todas as amostras analisadas.

TORLBARA et al. (1982) construíram um instrumento que se baseava no princípio da fluorescência de raios X por dispersão de energia para analisar elementos traço em fios de cabelo. O feixe de raios X era produzido por um alvo de molibdênio e, em seguida, passava por um filtro, também de molibdênio, o que gerava um feixe quase que monocromático de energia igual a 17 keV (K_{α} do Mo). Este equipamento proporcionou uma análise não destrutiva das amostras e resultados mais reprodutíveis que os obtidos através dos métodos anteriores. As amostras analisadas são originárias de indivíduos não expostos a metais pesados ou qualquer tipo de drogas. Os elementos encontrados foram: Ca, Ti, V, Cr, Mn, Fe, Ni, Cu, Zn, As, Se, Br, Rb, Sr, Hg e Pb.

AKKUS et al. (1998) estudaram amostras de soro e unhas das mãos de 22 crianças com o objetivo de comparar as concentrações de cobre (Cu) e magnésio (Mg) em indivíduos sadios e com leucemia linfoblástica aguda (LLA). Do grupo de crianças estudadas 10 eram portadoras da doença e as outras 12, sadias, serviam de grupo controle. A técnica utilizada na determinação das concentrações foi à espectrometria de absorção atômica. As concentrações de cobre encontradas em amostras de soro de indivíduos sadios e portadores de LLA foram, respectivamente, $1,15 \pm 0,70 \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ e $5,251 \pm 1,607 \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$.

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

BÁRÁNY et al. (2001) compararam níveis de elementos traço de sangue e soro de adolescentes suecos usando espectrometria de massa com fonte de plasma (ICP-MS).

Foram determinadas as concentrações de Co, Cu, Zn, Se, Rb, Rh, Pd, Cd, W, Pt, Hg, Tl e Pb. Os elementos que apresentaram as maiores concentrações foram: Cu ($0,95 \pm 0,1 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$), Zn ($6,1 \pm 0,9 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$) e Rb ($2,9 \pm 0,5 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$). Os demais elementos apresentavam concentrações da ordem de $\text{ng}\cdot\text{g}^{-1}$.

CELIK et al. (2002) usaram espectrometria de massa com fonte de plasma (ICP) para determinar a concentração de alguns elementos traços presentes em fluido abdominal e soro em indivíduos portadores de cirrose e portadores de doenças malignas abdominais. Foram coletadas amostras de 17 pacientes, sendo 10 deles cirróticos (5 homens e 5 mulheres) e 7 mulheres portadoras de doenças malignas. Os elementos analisados foram: cobre, zinco, magnésio e ferro. As concentrações obtidas no soro de indivíduos do grupo de portadores de doenças malignas foram: Cu ($1,1843 \pm 0,3298 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$), Zn ($1,1786 \pm 0,2518 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$), Mg ($0,0224 \pm 0,0036 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$) e Fe ($0,9228 \pm 0,4066 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$). As concentrações dos mesmos elementos em amostras de soro de indivíduos portadores de cirrose (doença benigna) foram: Cu ($0,975 \pm 0,2603 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$), Zn ($1,277 \pm 0,3451 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$), Mg ($0,023 \pm 0,0057 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$) e Fe ($2,558 \pm 1,8377 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$). Segundo o autor, as diferenças de concentrações observadas entre indivíduos portadores de doenças malignas abdominais e cirrose podem ser úteis para um diagnóstico e para a distinção entre elas.

KUMAR et al. (2002) analisaram amostras de soro de crianças portadoras de deficiência mental. Utilizaram a técnica de emissão de raios X induzidos por prótons (PIXE) para investigar as concentrações elementares das amostras e compararam com um grupo controle formado por indivíduos sadios. O grupo controle era formado por 70 indivíduos, assim como o grupo de deficientes. Este último foi dividido em três subgrupos classificados de acordo com o grau do retardo mental (leve, moderado e severo). As amostras foram liofilizadas, envolvidas por Mylar e, em seguida, irradiadas com um feixe de prótons de 2,3 MeV. Os elementos encontrados foram: P, S, Cl, K, Ca, Ti, Fe, Cu, Zn, Br, Rb, Sr e Pb. Foi observada uma redução nas concentrações de ferro, zinco e cobre no grupo de indivíduos com maior grau de retardo mental levando à conclusão de que a deficiência destes elementos tem papel importante na causa de problemas mentais.

EKINCI et al. (2004) utilizaram fluorescência de raios X por dispersão de energia (EDXRF) para analisar as concentrações elementares em sangue humano proveniente de indivíduos que sofriam de esquizofrenia, câncer de pulmão e leucemia. A fluorescência de raios X foi obtida a partir de fontes radioativas de ^{55}Fe e ^{241}Am . Os elementos encontrados em sangue leucêmico foram: Cl, K, Ca, Fe, Rb, Nb, Mo, In, Sn e I.

MARTINEZ et al. (2004) determinaram elementos traço em amostras de sangue utilizando a fluorescência de raios X por reflexão total (TXRF). Foram analisadas 50 amostras de sangue humano proveniente de indivíduos sadios (35 de homens e 15 de mulheres). As amostras foram liofilizadas por 8 horas e, em seguida, digeridas com ácido nítrico e ácido hidrocloreídrico para que o ferro fosse separado. Os elementos detectados foram S, K, Ca, Mn, Cu, Zn, Br, Rb e Pb. O potássio apresentou a maior concentração ($3156,22\mu\text{g.g}^{-1}$) seguido pelo enxofre ($1478,95\mu\text{g.g}^{-1}$). O controle de qualidade foi feito utilizando-se amostras certificadas pela Agência Internacional de Energia Atômica de sangue animal liofilizado (IAEA, A-13).

CUSTÓDIO et al. (2005) analisaram as concentrações de elementos traços presentes em sangue total proveniente de cordões umbilicais, utilizando EDXRF. O sangue foi coletado, liofilizado e transformado em pastilhas de diâmetro de 2,0cm e espessura 1,0mm. A irradiação das pastilhas foi feita por meio de um tubo de raios X com anodo de molibdênio e feixe não filtrado. As análises das concentrações basearam-se em três condições distintas: a idade da mãe, a massa do recém-nascido e o período de gestação. Os elementos analisados foram: potássio, cálcio, ferro, cobre, zinco, bromo, rubídio e chumbo. Para verificar a reprodutibilidade dos resultados, medidas de concentração foram feitas em amostras certificadas, uma de sangue liofilizado de animal (IAEA, A-13) e uma de folhas de árvores frutíferas (NBS, 1571). Foram observadas concentrações de K, Ca, Fe, Cu, Zn, Br, Rb e Pb que tiveram uma pequena variação para as três condições de análise.

CANELLAS et al. (2006) utilizando a fluorescência de raios X por reflexão total empregando radiação síncroton (SRTXRF) analisaram amostras de soro de indivíduos portadores de leucemia mielóide crônica (LMC) e indivíduos sadios (controle). Foram analisadas 60 amostras de indivíduos portadores de LMC e 60 de indivíduos sadios. As

amostras de sangue foram centrifugadas para a retirada do soro. Em seguida o soro foi diluído com água Milli-Q e adicionado 50µL de Ga, que serviu como padrão interno. Foram encontrados os seguintes elementos: P, S, Cl, K, Ca, Cr, Mn, Fe, Ni, Cu, Zn, Br e Rb. O teste estatístico ANOVA foi utilizado na análise dos resultados e mostrou que há diferenças reais entre as concentrações dos elementos essenciais P, S, Cl, Ca, Cr, Mn, Fe, Cu e Rb encontradas nas amostras de soro de indivíduos portadores de LMC e sadios. Essas diferenças podem estar relacionadas não só ao sexo, mas à alimentação, aos medicamentos e até mesmo ao estágio da doença.

MAGALHÃES et al. (2006) fizeram um estudo da distribuição elementar em amostras de tecidos humanos cancerosos e sadios utilizando as técnicas de EDXRF e TXRF. Foram analisadas amostras provenientes de sete alemães e dez portugueses, sendo que, de cada indivíduo, foram retiradas duas amostras, uma de tecido sadio e outra de tecido canceroso. As amostras de câncer dos doadores alemães foram: os cânceres de colo, mama e útero, já nos doadores portugueses foram os cânceres de reto, sigmóide, tireóide, rins, laringe e pulmão. As amostras estudadas com TXRF foram previamente congeladas e fatiadas em sessões de, aproximadamente, 10µm de espessura e, em seguida, posicionadas em um suporte de quartzo e analisadas diretamente. As amostras estudadas em EDXRF foram liofilizadas por 48 horas a -60°C e a pressão de 10⁻¹atm, trituradas e transformadas em pastilhas de 2,0 cm de diâmetro. Para verificar a reprodutibilidade dos resultados foram feitas medidas com amostras certificadas de folhas de árvores frutíferas (NBS, 1571) e sangue liofilizado de animal (IAEA, A-13). Os elementos determinados no estudo das amostras dos indivíduos portugueses foram: P, S, K, Ca, Fe, Cu, Zn e Cr, enquanto que nos alemães foram: P, S, K, Ca, Fe, Ni, Cu, Zn, Br, Sr, Rb e I. A TXRF apresenta melhor sensibilidade na análise de elementos de número atômico mais baixo.

HEITLAND et al. (2006) pesquisaram concentrações de elementos traço em sangue humano. Utilizaram ICP-MS para determinar as concentrações de amostras provenientes de 130 indivíduos sadios, habitantes da região de Bremen (norte da Alemanha). Nesta pesquisa foram analisados os hábitos alimentares dos indivíduos, se eram fumantes ou não, além da presença de ligas metálicas em obturações dentárias, idade, sexo e local de

residência. Tais fatores determinaram concentrações elementares atípicas. Dentre os elementos analisados estavam o Cu e o Rb, os quais apresentaram concentrações respectivamente iguais a $1.042\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ e $2.408\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$.

CAPÍTULO III

FUNDAMENTOS TEÓRICOS

III.1 – Princípios Físicos

A explicação do espectro discreto de raios X emitido por um determinado átomo só foi plenamente possível após a descrição do modelo atômico feita por Erwin Schrödinger no início do século XX. Alguns dos modelos que o antecederam, como o de Bohr e Sommerfeld, também traziam informações sobre o fenômeno, mas não o explicavam completamente.

III.1.1 – Modelo atômico de Schrödinger

Schrödinger teve grande reconhecimento da comunidade científica internacional ao usar sua então recente teoria da Mecânica Quântica para descrever o átomo monoelétrônico. Tal teoria baseia-se no princípio de dualidade onda-partícula de De Broglie para explicar as leis do movimento ondulatório que as partículas de qualquer sistema microscópico obedecem. Desta forma, determinando a onda de De Broglie associada que descreve o comportamento destas partículas, ou função de onda (Ψ), obtém-se toda a informação disponível a respeito da partícula.

A ligação básica entre as propriedades da função de onda $\Psi(x,t)$ e o comportamento da partícula associada é expressa em termos de densidades de probabilidade $P(x,t)$. Esta grandeza especifica a probabilidade por unidade de comprimento do eixo x , de encontrar a partícula próxima da coordenada x em um instante t . $P(x,t)$ é dada pela relação mostrada na eq.3.1.

$$P(x,t) = \Psi^*(x,t) \cdot \Psi(x,t), \quad (3.1)$$

onde $\Psi^*(x,t)$ representa o complexo conjugado de $\Psi(x,t)$.

A teoria de Schrödinger resulta na equação que também recebeu seu nome (eq.3.2).

$$-\frac{\hbar^2}{2m} \frac{\partial^2 \Psi(x,t)}{\partial x^2} + V(x,t)\Psi(x,t) = i\hbar \frac{\partial \Psi(x,t)}{\partial t}, \quad (3.2)$$

onde \hbar é a constante de Plank dividida por 2π , m é a massa da partícula em questão, $V(x,t)$ é o potencial ao qual o sistema está submetido e i o número imaginário.

A resolução da equação 3.2, representada em sua forma tridimensional e independente do tempo, forma que de fato descreve o comportamento atômico, tornou possível a compreensão da estrutura de um átomo (eq.3.3).

$$-\frac{\hbar^2}{2\mu}\nabla^2\Psi(x,y,z)+V(x,y,z)\Psi(x,y,z)=E\Psi(x,y,z) \quad (3.3)$$

onde ∇^2 é o operador laplaciano.

Como solução da equação 3.3 obtém-se as previsões para os autovalores de energia do átomo (eq.3.4).

$$E_n = -\frac{\mu Z^2 e^4}{(4\pi\epsilon_0)^2 2\hbar^2 n^2}, \quad (3.4)$$

onde μ é a massa reduzida, Z o número atômico do elemento, e é a carga do elétron, ϵ_0 a permissividade elétrica no vácuo e n o número quântico principal (EISBERG, 1979).

As autofunções que levam a estes autovalores (eq.3.4) dependem de certas constantes conhecidas como números quânticos. Tais números são historicamente representados pelas letras n , l e m .

Do número quântico principal (n) dependem os autovalores de energia do átomo. Ele também está relacionado à dependência da distância do elétron ao núcleo atômico. O número quântico orbital (l) depende do momento angular orbital do átomo. Se o átomo se encontra em um campo elétrico externo, existe uma dependência de sua energia com m , por isso ele é chamado de número quântico magnético.

Estudos sobre o comportamento dos elétrons, posteriores à teoria de Schrödinger, revelaram que estas partículas apresentam um campo magnético intrínseco associado à sua carga girando em um movimento de rotação em torno de si mesmas. A esta rotação está relacionado um momento angular, denominado spin, ou número quântico de spin (s). Os possíveis valores dos números quânticos para um elétron ligado são mostrados na Tabela 3.1. Tendo o elétron dois momentos angulares, um associado ao número quântico l e outro ao s , é possível descrever um momento angular total dado pela soma vetorial destes dois. O número quântico que representa este momento angular total é o número quântico j , dado por

$$j = l \pm s. \tag{3.5}$$

Tabela 3.1 – Possíveis valores assumidos pelos números quânticos dos elétrons.

Número Quântico	Nome	Valores Possíveis
n	principal	1, 2, 3...
l	orbital	0, 1, 2, ..., $n-1$
m	magnético	$-l, -l+1, \dots, 0, \dots, l-1, l$
s	spin	$\pm 1/2$

É o conjunto dos números quânticos que caracteriza um determinado elétron, diferenciando-o assim dos demais presentes num átomo. Isto se dá porque os números quânticos estão presentes na função de onda de uma partícula e, como já dito, a função de onda leva ao cálculo da probabilidade de se encontrar tal partícula em uma determinada região ($\Psi^*\Psi$), região esta conhecida como orbital.

III.1.2 – Espectros discretos de raios X

A produção de fluorescência de raios X (ou raios X característicos) se dá a partir da remoção de um elétron de seu orbital atômico. Tal fenômeno decorre de interações, de elétrons com fótons ou partículas de energia maior que sua energia de ligação ao átomo, que resultam na transferência do elétron para um nível mais energético ou, até mesmo, na ejeção deste elétron do átomo. Com a ausência do elétron surge um “buraco” no orbital, denominado vacância (LACHANCE, 1995). A retirada do elétron de um orbital interno leva o átomo a um estado excitado de energia. Como forma de retornar ao estado atômico fundamental (estado de menor energia), elétrons de orbitais mais energéticos migram para o orbital mais interno (menor energia) para preencher a vacância, deixando uma outra vacância no seu orbital de origem. Desta forma se faz necessária a migração de um outro elétron de um orbital mais energético e o processo se repete até que o orbital mais externo seja preenchido por um elétron livre do meio. Então o átomo fica novamente neutro e no estado fundamental.

Estas migrações eletrônicas de um orbital para outro são também chamadas de saltos quânticos, pois, na mecânica quântica o conceito clássico de órbita, onde os elétrons giram

ao redor do núcleo, como os planetas ao redor do Sol, é expandido para o conceito de estados quânticos (Figura 3.1). Estes estados quânticos são determinados por um conjunto de números quânticos que dão as características do elétron presente em tal estado. Os estados quânticos são comumente representados por nuvens de probabilidade de diferentes formas e tamanhos dentro das quais a chance de se encontrar o elétron é maior que em qualquer outro lugar (EISBERG, 1979).

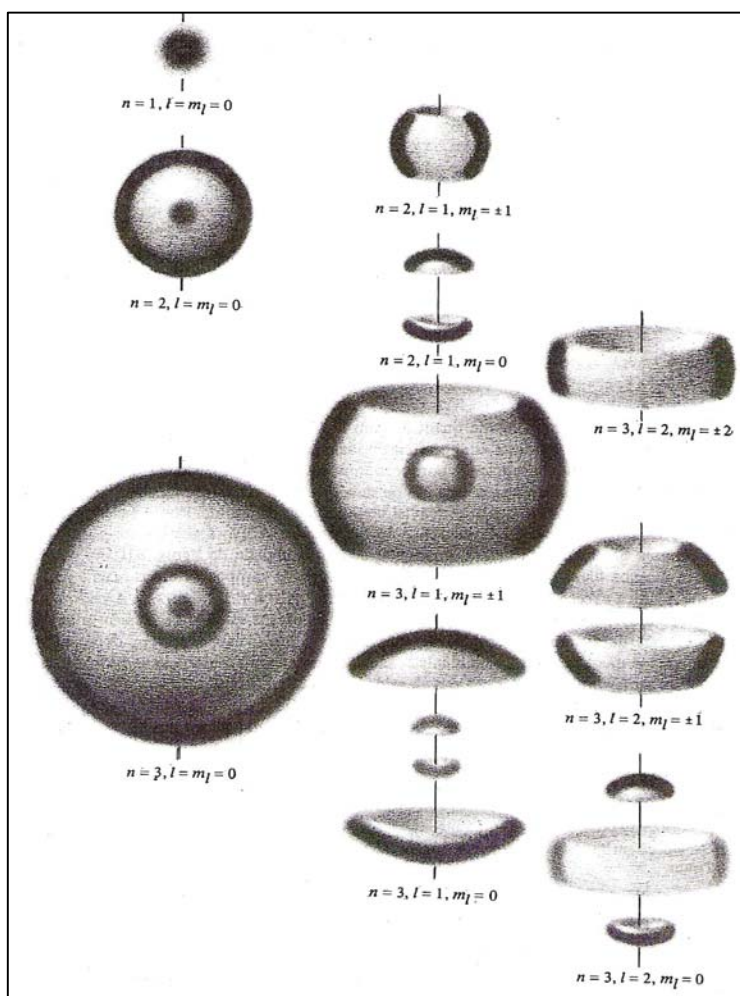


Figura 3.1 – Visão quântica dos orbitais atômicos. Nas regiões sombreadas apresenta-se maior probabilidade de se encontrar um elétron, probabilidade esta que varia com a mudança dos números quânticos (EINSBERG, 1979).

Para que a energia seja conservada em cada um destes saltos quânticos, ocorre a emissão de raios X com energia igual à energia de excitação do átomo, ou seja, igual à

diferença entre as energias do orbital onde se formou a vacância e do orbital de origem do elétron que migrou para preenchê-la. Como a energia de um determinado orbital depende do número atômico (Z) do elemento (3.4), orbitais que possuem mesmo conjunto de números quânticos, mas em átomos de elementos diferentes, possuem energias diferentes. Sendo assim, saltos quânticos que ocorrem em átomos de elementos diferentes emitem fóton de raios X de energias diferentes.

Tais fótons representam uma assinatura do elemento químico, por isso são também chamados de raios X característicos. O Apêndice A mostra as energia de emissão de raios X característico para diversos elementos.

Uma notação amplamente adotada em diversas situações, inclusive em espectrometria de raios X, é atribuir a cada valor do número quântico principal (n) uma letra maiúscula, como representado na tabela 3.2.

Tabela 3.2 - Notação espectroscópica para n .

n	1	2	3	4	5	...
Notação Espectroscópica	K	L	M	N	O	...

Por exemplo, se uma vacância é formada na *camada K* de um átomo, um elétron de uma camada superior migrará para esta camada liberando um fóton de raios X. Se o elétron vier da camada L então o fóton é chamado de K_{α} , se vier da camada M , K_{β} , e assim sucessivamente. Estes fótons formam a série K . Outras séries são formadas quando a vacância se forma em camadas mais externas que a K (KNOLL, 1989). O esquema das séries de decaimento pode ser observado na Figura 3.2.

Como mostrado na Figura 3.2, nem todas as transições são observadas. Para que haja uma transição ela deve satisfazer determinadas condições conhecidas como regras de seleção: $\Delta l = \pm 1$ e $\Delta j = 0, \pm 1$.

Isto é, só existem transições entre níveis cujos números quânticos orbitais diferem de uma unidade e cujos números quânticos j diferem de zero ou uma unidade. As regras de seleção especificam quais transições têm probabilidades tão baixas de ocorrer que não podem ser normalmente observadas.

III.1.3 – Efeito Auger

O efeito Auger é uma forma alternativa que o átomo excitado possui de liberar sua energia extra. Para que um elétron migre de uma camada mais externa para preencher uma vacância gerada por uma determinada interação é preciso que libere energia igual à energia de excitação do átomo. Esta energia pode ser liberada pela emissão de fótons de radiação X, raios X característicos, ou de um elétron, conhecido como elétron Auger. Este elétron é emitido pelo átomo com energia cinética igual à diferença entre as energias de excitação do átomo e de ligação do seu orbital de origem. A probabilidade de emissão de elétrons Auger diminui com o aumento do número atômico.

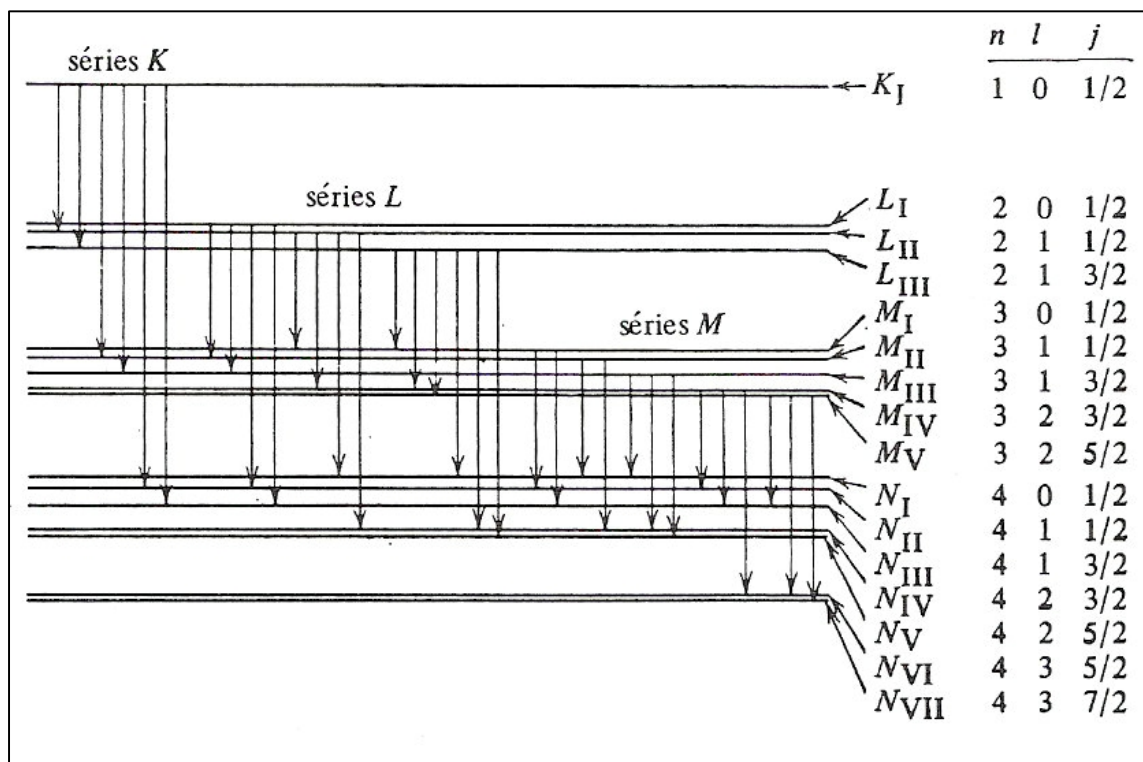


Figura 3.2 - A figura apresenta alguns dos níveis de energia de um átomo e seus números quânticos correspondentes. Também são mostradas as transições permitidas pelas regras de seleção (EINBERG, 1979).

III.1.4 – Fator de excitação

O fator de excitação (p_{E_i}) representa a probabilidade de que a radiação incidente na amostra produza uma determinada linha de fluorescência de raios X. Esta probabilidade é dada pelo produto de outras três (LACHANCE, 1995):

$$p_{E_i} = p_{nível} \cdot p_{linha} \cdot p_{fluorescência} \quad (3.6)$$

onde $p_{nível}$ é a probabilidade de que a interação da radiação incidente com um átomo da amostra resulte na ejeção de um elétron de um dado nível, p_{linha} é a probabilidade de que uma determinada linha seja emitida dentro de sua série e $p_{fluorescência}$ é a probabilidade no processo de preenchimento da vacância gerada ocorra a emissão de fótons de fluorescência de raios X, ao invés de elétrons Auger.

A probabilidade $p_{nível}$, também conhecida como razão salto/absorção, está diretamente relacionada à fração da radiação absorvida pelo nível em questão.

$$p_{nível} = \frac{\text{absorção da radiação num nível específico}}{\text{absorção da radiação em todos os níveis}} \quad (3.7)$$

Considere a probabilidade para a camada K . A razão salto/absorção também pode ser representada pela relação

$$p_K = \frac{r_K - 1}{r_K}, \quad (3.8)$$

onde $r_K = \frac{\tau_K + \tau_{L_1} + \tau_{L_2} + \tau_{L_3} \dots}{\tau_{L_1} + \tau_{L_2} + \tau_{L_3} \dots}$ e ainda, τ_i é a seção de choque fotoelétrica da camada i

(Apêndice B).

A probabilidade de que uma determinada linha dentro de uma série seja emitida, p_{linha} , é dada pela intensidade relativa desta linha dentro de sua série. Desta forma, a probabilidade de que K_{α_1} seja emitida tendo em vista toda a série K é dada por

$$f_{K_{\alpha_1}} = \frac{I_{K_{\alpha_1}}}{\sum I_{K_r}}, \quad (3.9)$$

onde $\sum I_{K_r}$ é o somatório das intensidades de todas as linhas da série K .

Rendimento de fluorescência, ω , é o nome dado à probabilidade de que a migração de um elétron para preencher uma vacância de um nível energético mais interno gere um fóton de fluorescência ao invés de um elétron Auger. Desta forma, ω pode ser representado por

$$P_{\text{fluorescência}} = \omega = \frac{n_s}{n_p}, \quad (3.10)$$

onde n_s é o número de fótons de fluorescência produzidos, n_p é o número total de migrações eletrônicas ocasionadas pela necessidade das vacâncias de níveis mais internos serem preenchidas. O valor de n_p é dado pela soma de n_s com o número de elétrons Auger produzidos (Apêndice B). A Figura 3.3 mostra o rendimento de fluorescência para as linhas K e L em função do número atômico.

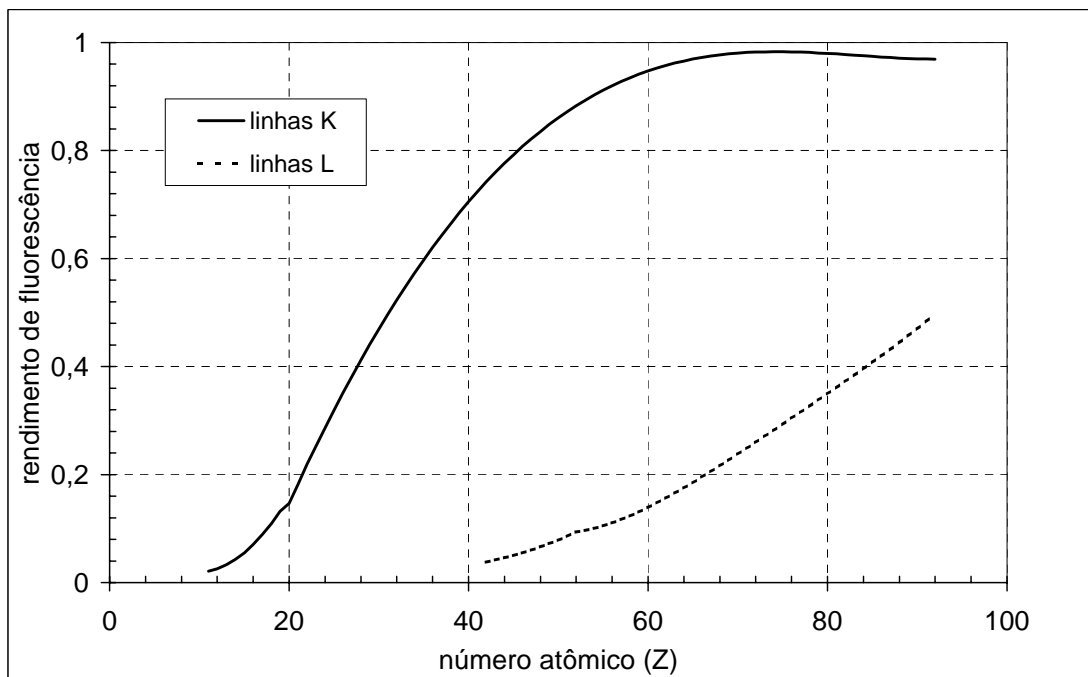


Figura 3.3 - Rendimento de fluorescência para as linhas K e L (ANJOS, 2000).

III.1.5 – Expressão para intensidade de fluorescência de raios X

Determinar-se a intensidade da fluorescência de raios X que emerge de uma determinada amostra para um dado elemento químico é de grande importância quando se quer obter a concentração de cada um destes elementos. O estudo que leva à expressão usada para determinar as concentrações elementares presentes numa amostra a partir de tal intensidade assume que a distribuição dos elementos que constituem a amostra se dá de

forma uniforme ao longo de seu volume (amostra homogênea). A Figura 3.4 apresenta um esquema de uma disposição tipicamente usada em espectroscopia de fluorescência de raios X por dispersão de energia. Um feixe de fótons colimado incide sobre a amostra com um ângulo θ_1 e produz fluorescência de raios X numa camada de espessura dx situada a uma profundidade x . O feixe de raios X característicos, de intensidade I_i (correspondente ao elemento i), emitido que atinge o detector forma um ângulo θ_2 em relação à superfície da amostra.

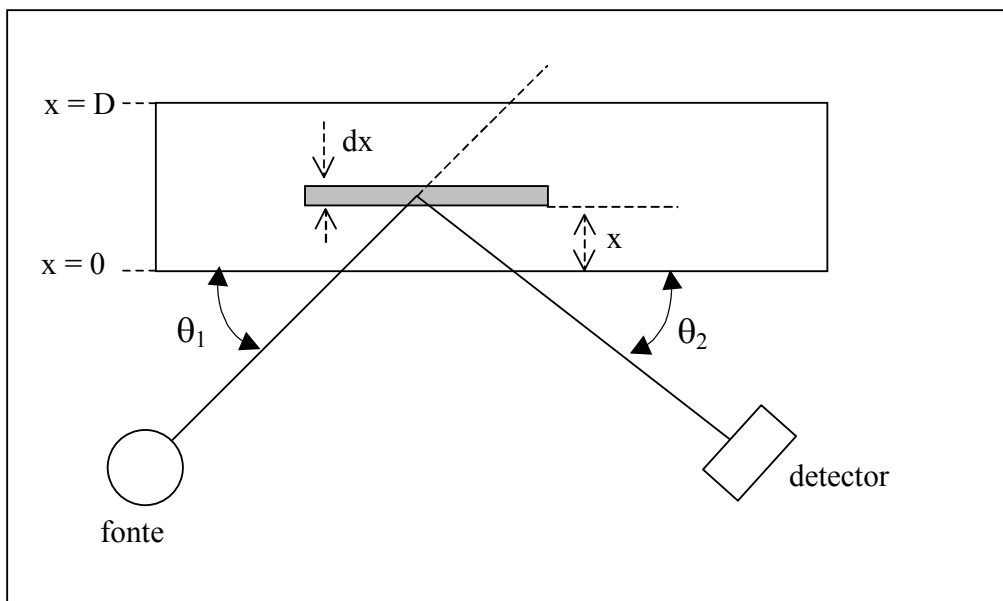


Figura 3.4 – Geometria utilizada na dedução da equação que determina a intensidade de radiação fluorescente que emerge de uma amostra considerando as concentrações de cada um dos elementos que a compõem (ANJOS, 2000).

A intensidade de radiação fluorescente, para uma dada linha y , emitida por um elemento i na camada dx depende da combinação de outras três intensidades (LACHANCE, 1995), descritas a seguir.

1. I_i é a intensidade da radiação do feixe incidente, de energia E_0 , que atinge a camada dx . Sendo assim, este valor depende da intensidade I_0 do feixe que atinge a amostra, atenuada ao longo de seu caminho até atingir dx . Depende também do ângulo sólido Ω_1 com que o feixe incidente foi emitido. Desta forma

$$I_1 = I_0 \cdot \exp(-\mu_M(E_0) \cdot \rho_M \cdot \frac{x}{\text{sen } \theta_1}) \cdot \Omega_1, \quad (3.11)$$

nde μ_M é o coeficiente de atenuação de massa da amostra para a energia E_0 dos fótons incidentes e ρ_M é densidade da amostra.

2. dI_f é a intensidade de emissão de uma determinada linha de fluorescência gerada num elemento i de densidade ρ_i ao longo da camada dx . Este valor depende da quantidade de radiação que atinge a camada dx .

$$dI_f = I_1 \cdot \tau_i(E_0) \cdot \rho_i \cdot p_{\text{nível}} \cdot f_{i,y} \cdot \omega_{i,y} \cdot dx \quad (3.12)$$

Com τ_i sendo a seção de choque fotoelétrica do elemento i para a energia E_0 .

As probabilidades $p_{\text{nível}}$, f_y e ω já foram descritas em III.1.4.

3. I_2 é a intensidade de radiação fluorescente que é detectada. Essa intensidade depende da absorção sofrida pelos fótons de fluorescência ao longo de seu caminho dentro da amostra, do ângulo sólido de abertura do detector, Ω_2 , e da eficiência (ε) do detector para a energia dos fótons de fluorescências (E_i) emitidos por cada um dos elementos i .

$$I_2 = I_f \cdot \exp(-\mu_M(E_i) \cdot \rho_M \cdot \frac{x}{\text{sen } \theta_2}) \cdot \Omega_2 \cdot \varepsilon(E_i) \quad (3.13)$$

Onde $\mu_M(E_i)$ é o coeficiente de atenuação de massa da amostra para a energia da radiação fluorescente produzida pelo elemento i .

Combinando-se estes três fatores chega-se à expressão da intensidade de radiação fluorescente, para uma determinada linha y , emitida por um elemento i na camada dx .

$$dI_{i,y} = (I_0 \cdot \Omega_1 \cdot \Omega_2) \cdot \left[\tau_i(E_0) \cdot \omega_{i,y} \cdot f_{i,y} \cdot \left(\frac{r_{\text{nível}} - 1}{r_{\text{nível}}} \right) \right] \cdot \varepsilon(E_i) \cdot \rho_i \cdot \left[\exp\left(-\mu_M(E_0) \cdot \rho_M \cdot \frac{x}{\text{sen } \theta_1}\right) \right] \cdot \left[\exp\left(-\mu_M(E_i) \cdot \rho_M \cdot \frac{x}{\text{sen } \theta_2}\right) \right] \cdot dx \quad (3.14)$$

Agrupando alguns dos termos, é possível reescrever a equação 3.14 da seguinte forma:

$$dI_{i,y} = G \cdot K_i \cdot \varepsilon(E_i) \cdot \rho_i \cdot \left[\exp(-\chi_i(E_0, E_i) \cdot \rho_M \cdot x) \right] \cdot dx \quad (3.15)$$

onde:

- K_i corresponde ao agrupamento dos parâmetros físicos responsáveis pela produção de fluorescência de raios X.

$$K_i = \tau_i(E_0) \cdot \omega_{i,y} \cdot f_{i,y} \cdot \left(\frac{r_{nível} - 1}{r_{nível}} \right). \quad (3.16)$$

- G agrupa termos que dependem da intensidade da fonte de excitação e das características geométricas da fonte e do detector. Por isso esse fator pode ser chamado de fator de geometria do sistema.

$$G = I_0 \cdot \Omega_1 \cdot \Omega_2. \quad (3.17)$$

- Os coeficientes de absorção de massa para a energia do feixe incidente (E_0) e emergente (E_i) são agrupados em χ_i .

$$\chi_i = \frac{\mu_M(E_0)}{\text{sen } \theta_1} + \frac{\mu_M(E_i)}{\text{sen } \theta_2}. \quad (3.18)$$

Integrando-se a equação 3.15 em toda a espessura da amostra, tem-se:

$$I_{i,y} = G \cdot K_i \cdot \varepsilon(E_i) \cdot \rho_i \cdot \int_0^D \exp(-\chi_i(E_0, E_i) \cdot \rho_M \cdot x) dx, \quad (3.19)$$

ou ainda,

$$I_{i,y} = G \cdot K_i \cdot \varepsilon(E_i) \cdot \frac{\rho_i}{\rho_M} \cdot \frac{1}{\chi_i} \cdot [1 - \exp(-\chi_i(E_0, E_i) \cdot \rho_M \cdot D)] \quad (3.20)$$

O termo $\rho_M \cdot D$ corresponde à densidade superficial da amostra, medida em g/cm^2 ; ρ_i/ρ_M é a concentração do elemento i , W_i , na amostra, medida em $\mu\text{g/g}$.

O produto $G \cdot K_i \cdot \varepsilon(E_i)$ representa a sensibilidade (S_i) do sistema para a produção e detecção de fluorescência do elemento i da amostra. A sensibilidade depende do fator geométrico, ou seja, posicionamento do detector, da amostra e da fonte, da capacidade da amostra de produzir fluorescência e da eficiência do detector para captá-la.

Sendo assim, a equação 3.19 pode ser reescrita como

$$I_{i,y} = S_i \cdot W_i \cdot \frac{[1 - \exp(-\chi_i(E_0, E_i) \cdot \rho_M \cdot D)]}{\chi_i(E_0, E_i)}. \quad (3.21)$$

Assim a concentração W_i de um elemento i pode ser obtida como:

$$W_i = \frac{I_i}{S_i} \left\{ \frac{\chi_i(E_0, E_i)}{[1 - \exp(-\chi_i(E_0, E_i) \cdot \rho_M \cdot D)]} \right\} \quad (3.22)$$

A partir da equação 3.22, a determinação da concentração de um elemento i na amostra pode ser feita medindo-se experimentalmente a intensidade da radiação fluorescente (I_i), determinando-se semi-empiricamente os valores de sensibilidade do sistema (S_i) a partir de padrões e conhecendo-se a absorção da radiação na amostra, representado pelo termo entre chaves na própria equação 3.22.

III.1.6 – Fluorescência de raios X por dispersão de energia

A fluorescência de raios X por dispersão de energia é um dos métodos mais simples e acurados utilizados na determinação da composição química e da concentração elementar de vários tipos de materiais. Ele consiste em analisar o espectro de fluorescência emitido por uma amostra excitada com um feixe de raios X.

É um método não destrutivo que requer pouca, ou nenhuma, preparação das amostras analisadas. Ele pode ser utilizado para um grande intervalo de elementos, que vai do boro ($Z=5$) ao urânio ($Z=92$) (LACHANCE, 1995)

Esta técnica surgiu no início dos anos 70, com o advento dos detectores de estado sólido, pois estes, diferentemente de seus antecessores, a gás, podiam ser calibrados em energia. Para elementos de número atômico na faixa de 13 (Al) a 50 (Sn), característica comum aos elementos estudados neste trabalho, utilizam-se, normalmente, detectores semicondutores de Si(Li) com janela de berílio. A maior eficiência dos detectores semicondutores de germânio hiperpuro (HPGe) para a detecção de raios de alta energia faz com que estes sejam mais utilizados em EDXRF aplicada a elementos de alto número atômico ($Z>50$) devido às altas energias de suas linhas K . Empecilhos tecnológicos dificultam a utilização de EDXRF na investigação de elementos de número atômico menor que 13, devido a baixa energia das linhas K emitidas por tais elementos.

Os fótons de fluorescência de raios X, provenientes da amostra, que atingem o detector produzem pulsos eletrônicos de amplitude proporcional à sua energia. Estes pulsos são processados pela eletrônica associada ao detector, discriminados por analisador multicanal de acordo com sua amplitude e apresentado sob a forma de um espectro de energia.

Para a análise de amostras compostas por elementos de número atômico na faixa de 13 a 50, a excitação pode ser feita com tubos de raios X de tensão máxima na faixa de

30kV, já que tais elementos possuem a energia de excitação da camada *K* abaixo deste valor.

A Figura 3.5 mostra um esquema de um sistema de análise que utiliza a fluorescência de raios X por dispersão de energia.

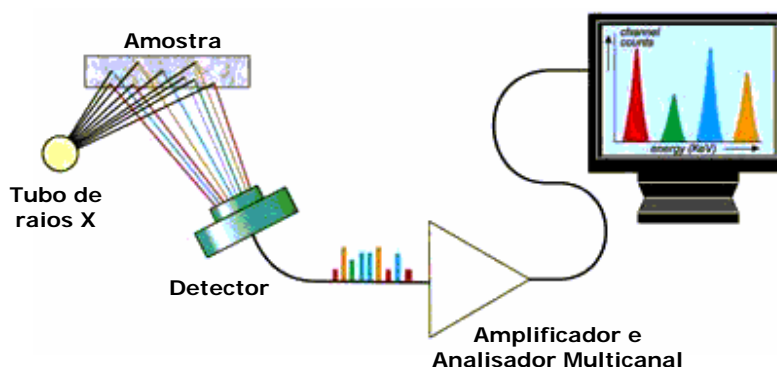


Figura 3.5 – Sistema de medida normalmente empregado em análises de amostras utilizando fluorescência de raios X por dispersão de energia.

III.2 – Princípios biológicos

Uma vez que este trabalho baseou-se na análise das concentrações elementares do sangue humano e na comparação dos valores obtidos em sangue de indivíduos saudáveis e portadores de LMC, faz-se necessária a exposição de alguns conceitos que facilitam a compreensão de tais temas.

III.2.1 – O sangue

O sangue, líquido que circula no sistema cardiovascular, vem despertando o interesse do homem há vários séculos. Há registros em pergaminhos egípcios que datam de aproximadamente 2000 anos atrás que defendem a sangria como tratamentos para algumas doenças (SILVERTHORN, 2003).

Análises microscópicas mostram que o sangue é formado por plasma e elementos celulares. O plasma é a parte líquida na qual os elementos celulares estão em suspensão. Nele estão também presentes diversos tipos de proteínas, hormônios, glicose e sais

inorgânicos. O grupo dos elementos celulares é composto pelas plaquetas, leucócitos e hemácias.

As plaquetas são corpúsculos desprovidos de núcleo, originados da fragmentação de células conhecidas como megacariócitos. Elas têm como função a coagulação do sangue e o reparo das paredes dos vasos sanguíneos.

Os leucócitos, ou glóbulos brancos, são células incolores e esféricas quando em suspensão no sangue. São responsáveis pela defesa do organismo, constituindo assim uma das primeiras barreiras contra infecção. Quando um tecido é invadido por microorganismos, os leucócitos são atraídos para a região da invasão, deixando assim os vasos sanguíneos.

As hemácias, ou eritrócitos, são anucleadas e possuem forma de disco bicôncavo. Realizam trocas gasosas em todos os tecidos do corpo, levando O₂ para as células e coletando CO₂. Essa troca se dá graças à hemoglobina, uma proteína presente nos eritrócitos que confere a estes e a todo o sangue um aspecto avermelhado.

A forma bicôncava dos eritrócitos proporciona grande superfície em relação ao volume, o que facilita as trocas de gases. O volume de sangue ocupado pelas hemácias em relação ao sangue total é de 35 a 45% nas mulheres e 40 a 50% nos homens (JUNQUEIRA, 2004). A Figura 3.6 é uma foto de uma amostra de sangue observada por microscopia eletrônica. Durante a vida pré-natal as células sanguíneas são produzidas por alguns órgãos como o fígado e o baço. Após o nascimento é a medula óssea que passa a produzir tais células num processo conhecido como hemocitopoese, ou hematopoese.

A medula óssea é encontrada no canal medular dos ossos longos e nas cavidades dos ossos esponjosos. Nos recém-nascidos toda a medula óssea produz células sanguíneas, ficando assim com uma aparência avermelhada devido à hemoglobina presente nos eritrócitos, o que lhe confere o nome de medula óssea vermelha. Com o desenvolvimento cronológico do indivíduo a maior parte da medula deixa de ser ativa e adquire uma coloração amarelada devido ao acúmulo de células adiposas, recebendo assim o nome de medula óssea amarela (LORENZI, 1999). Um indivíduo adulto possui medula óssea vermelha apenas no esterno, na coluna vertebral, nas costelas, nos ossos da pelve e nas extremidades de ossos longos.

Admite-se que todas as células do sangue derivem de um único tipo celular da medula óssea, por isso chamado de célula-troco pluripotente. Estas células proliferam e formam duas linhagens: a das células linfóides, que vai formar os linfócitos (um dos tipos de leucócitos), e a das células mielóides, que originam os eritrócitos, plaqueta, granulócitos e monócitos (estes dois últimos também são tipos de leucócitos).

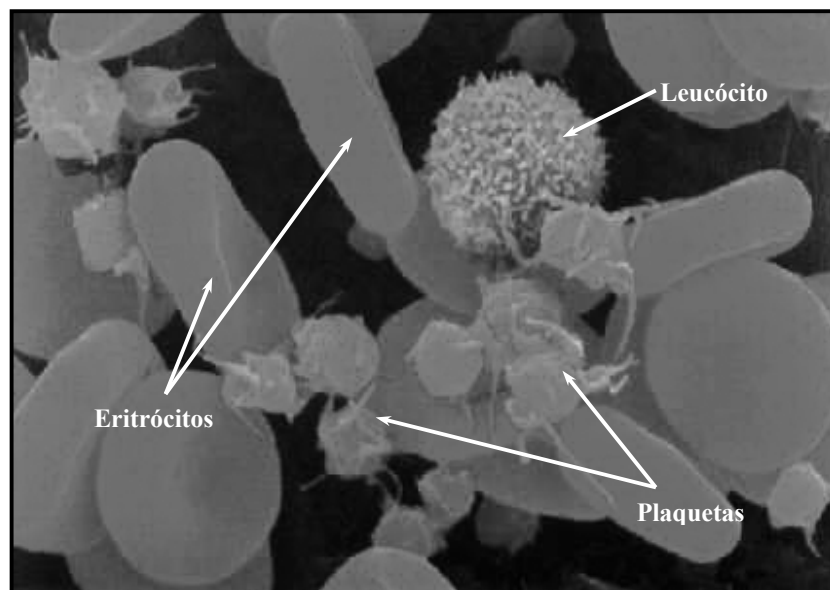


Figura 3.6 – Foto de uma amostra de sangue obtida por microscopia eletrônica na qual é possível observar os elementos celulares do sangue.

III.2.2 – Leucemia mielóide crônica (LMC)

As leucemias, de uma forma geral, são doenças caracterizadas pela proliferação irregular das células formadoras dos leucócitos. As células leucêmicas se desenvolvem às custas das células normais as quais terminam por substituir, levando à deficiência e finalmente à falência da medula óssea. A origem da leucemia ainda não está precisamente determinada, mas são conhecidos alguns dos fatores que aumentam a suscetibilidade a esta doença. Dentre eles estão:

- a. Radiação ionizante – a comprovação da radiação como agente leucêmico veio com a observação do aumento da incidência da doença em médicos radiologistas e em sobreviventes dos ataques nucleares de Hiroshima e Nagasaki;

- b. Agentes químicos – a exposição prolongada a drogas como cloranfenicol, fenilbutazona ou benzeno é normalmente seguida por um ligeiro aumento na frequência de leucemia.
- c. Fatores genéticos – a observação de incidência de leucemia em indivíduos da mesma família chamou a atenção para a relevância dos fatores genéticos. Notou-se que o gêmeo univitelino de um paciente leucêmico tem um alto risco de adquirir a doença. Notou-se também que o risco de indivíduos portadores da síndrome de Down adquirir leucemia é 30 vezes maior que na população em geral (ZAGO, 2001).

Quanto à classificação as leucemias se dividem clinicamente entre agudas, as quais apresentam evolução abrupta devido à presença de células imaturas, e crônicas, estas de evolução mais amena. Citomorfologicamente, as leucemias se dividem em linfocitárias e mielóides, dependendo do grupo de células proveniente da diferenciação das células-tronco atingido.

A leucemia mielóide crônica (LMC), forma estudada neste trabalho, é responsável por cerca de 20% de todos os casos de leucemia, sendo rara em crianças e acometendo, principalmente, adultos jovens. Ela é causada pela translocação cromossômica, gerando assim células mielóides anômalas. Apesar desta alteração cromossômica possa ser observada em todas as células mielóides, os eritrócitos e as plaquetas são essencialmente normais, ao passo que os granulócitos não (OLIVEIRA, 1991).

No início a doença não apresenta sintomas. Os primeiros a se manifestar são: anemia, perda de peso, sudorese noturna, fadiga e dores ósseas. De seis meses a oito anos após o surgimento da LMC a doença passa para sua fase aguda levando o indivíduo à morte. O tratamento tem por objetivo diminuir a massa de leucócitos circulante no sangue. Para tal a quimioterapia é o mais indicado. Em alguns casos o transplante de medula é o procedimento mais indicado.

CAPÍTULO IV

MATERIAIS E MÉTODOS

Neste capítulo serão descritos todos os componentes físicos e eletrônicos utilizados na aquisição das medidas, além das técnicas de preparação das amostras e tratamento dos dados.

Todas as medidas experimentais foram realizadas no Laboratório de Instrumentação Nuclear (LIN), pertencente ao Programa de Engenharia Nuclear da COPPE-UFRJ.

IV.1 – Arranjo experimental

Devido à variedade de elementos presentes no sangue a tomada de medidas de fluorescência de raios X foi dividida em duas etapas agrupando os elementos em duas categorias: a dos elementos de baixo número atômico (P, S, Cl e K) e a dos elementos de alto número atômico (Fe, Cu, Zn, Br e Rb).

As medidas foram realizadas utilizando-se dois sistemas experimentais diferentes. Ambos os sistemas eram compostos por um conjunto fonte de alimentação-tubo de raios X, por um suporte de PVC onde as pastilhas de sangue liofilizado analisadas eram devidamente posicionadas e por um detector associando à sua eletrônica de contagem, sendo este último o componente que diferenciava os dois sistemas.

No sistema usado nas medições de elementos de baixo número atômico, foi utilizado um detector do tipo SI-PIN ligado a um equipamento compacto que continha todo o sistema necessário para aplicar ao detector a tensão de alimentação e processar o sinal proveniente dele.

No sistema usado para elementos de alto número atômico um detector do tipo Si(Li) encontrava-se conectado a um BIN que continha uma fonte de baixa tensão que alimentava os demais componentes a ele conectados, uma fonte de alta tensão, utilizada para aplicar a tensão no detector e um amplificador, utilizado no processamento do sinal proveniente do pré-amplificador.

Ambos os sistemas foram conectados a uma placa multicanal acoplada a um computador do tipo PC. Os arranjos experimentais podem ser observados na Figura 4.1.

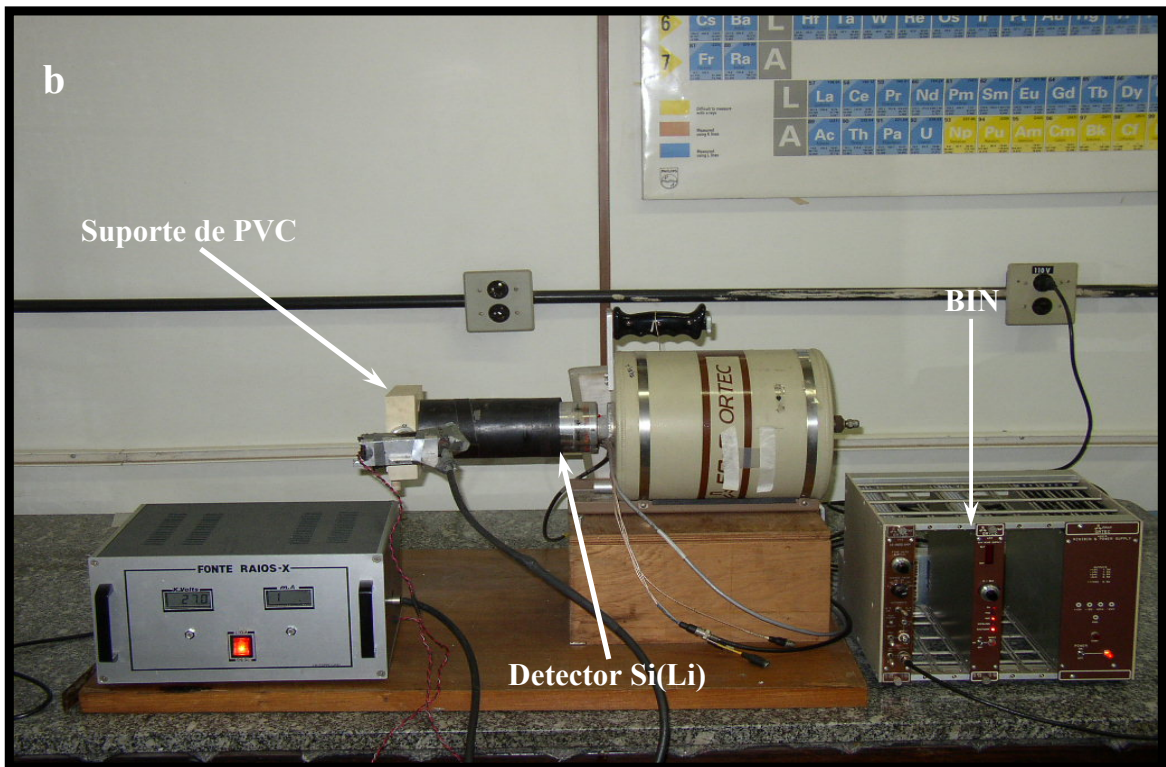
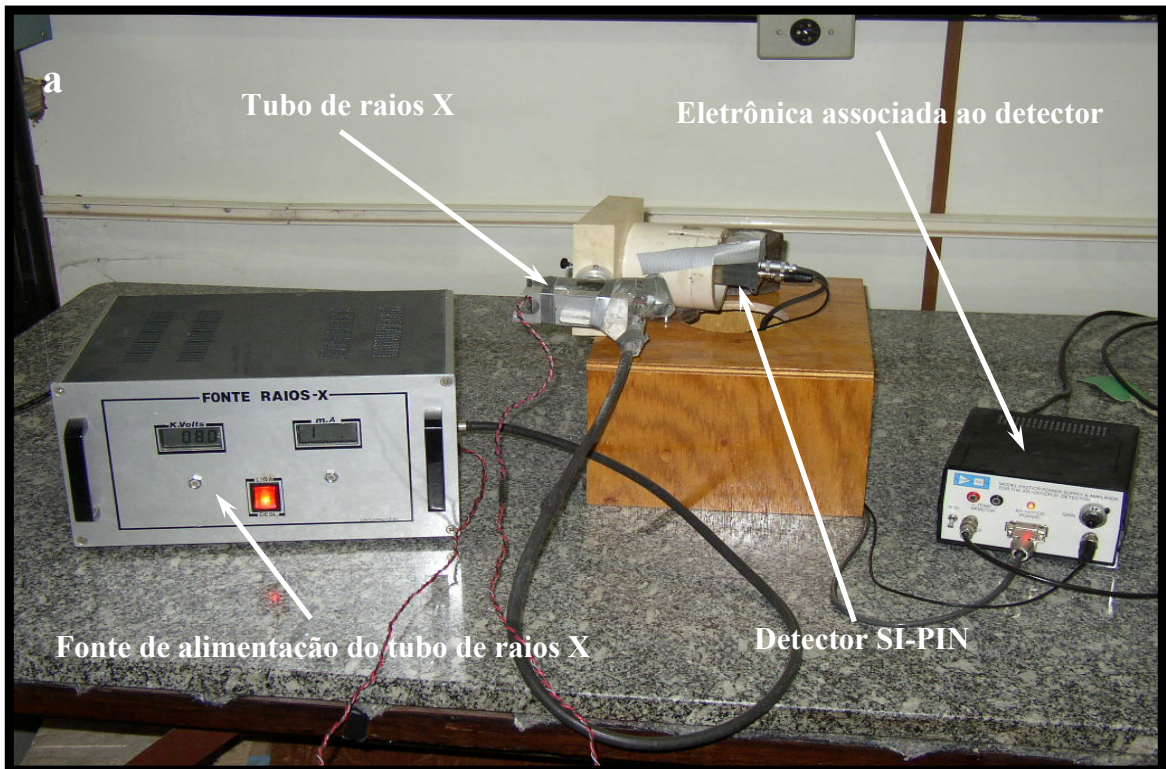


Figura 4.1 – Sistemas experimentais. A figura ‘a’ mostra o sistema utilizado para medir a fluorescência de raios X dos elementos de baixo número atômico e a figura ‘b’ o sistema utilizado para os elementos de alto Z.

IV.1.1 – Conjunto fonte de alimentação - tubo de raios X

A fonte de alimentação do tubo de raios X foi montada no próprio LIN. Ela produz uma corrente máxima de 770 μA e uma tensão máxima de 65 kV.

O tubo de raios X é de fabricação Oxford Instruments[®], modelo TF3500, série 35919, espessura da janela igual a 0,0127 cm, anodo de tungstênio (W) e potência máxima suportada pelo anodo igual a 15 W. Os valores de tensão e corrente utilizados foram respectivamente iguais a 8 kV e 400 μA , para medidas de elementos de baixo número atômico, e 27 kV e 400 μA , para elementos de alto número atômico. A Figura 4.2 mostra o tubo de raios X.

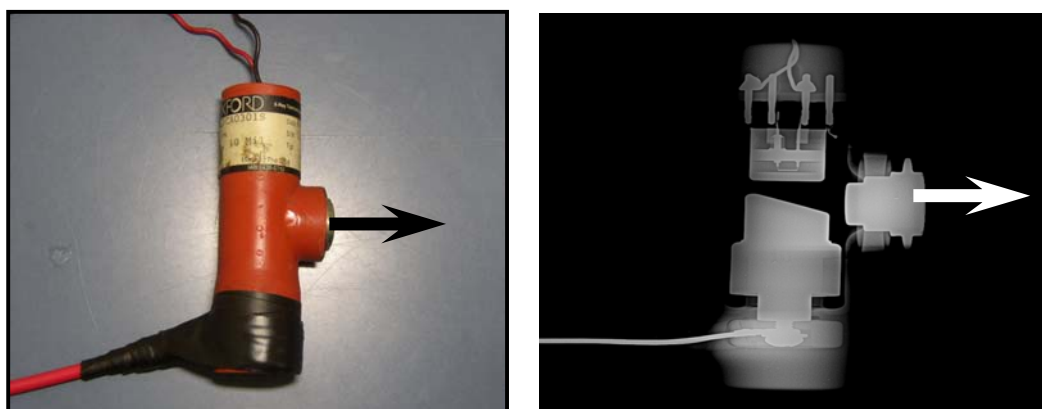


Figura 4.2 – Tubo de raios X utilizado para provocar fluorescência nas amostras de sangue. À direita, a radiografia do tubo permite a visualização de seus componentes internos.

No caso em que a tensão utilizada foi de 27 kV, além do espectro de *bremmstrahlung*, há também a produção de fluorescência de raios X no anodo devido à excitação da camada *L* do tungstênio, como mostrado na Figura 4.3.

IV.1.2 - Os detectores

O detector escolhido para a realização das medidas de fluorescência de elementos de alto número atômico era composto por um cristal semiconductor de silício dopado com lítio, Si(Li). Esta escolha baseou-se na boa eficiência de detecção apresentada por este tipo de detector na faixa de energia de 4 a 30 keV. A tabela 4.1 apresenta as principais características do detector de Si(Li) utilizado.

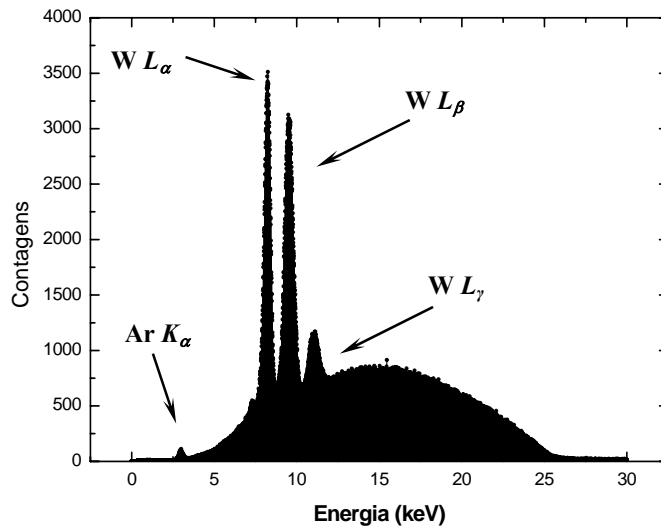


Figura 4.3 – Espectro de Raios-X sem filtragem. A figura mostra o espectro de *bremstrahlung* e os picos de fluorescência do tungstênio.

Tabela 4.1 – Características do detector de Si(Li) utilizado nas medidas de fluorescência de elementos de alto número atômico.

ELEMENTO	CARACTERÍSTICA
Fabricante	EG&G ORTEC
Modelo	SLP-10180-P
Série	35-T7215
Diâmetro ativo	10 mm
Área ativa	~80 mm ²
Janela de Be	254 μm
Camada de Au	0,02 μm
Camada morta de Si	0,1 μm
Profundidade ativa de Si	5,42 mm
Distância detector-janela de Be	7 mm
Tensão de operação	-1500 V
FWHM em 5,9 keV	180 eV

Para a detecção das linhas de fluorescência emitidas por elementos de baixo número atômico foi utilizado um detector do tipo SI-PIN por apresentar eficiência para baixas energias melhor que o Si(Li) disponível. A tabela 4.2 apresenta as principais características deste detector.

Tabela 4.2 – Características do detector de SI-PIN utilizado nas medidas de fluorescência de elementos de baixo número atômico.

ELEMENTO	CARACTERÍSTICA
Fabricante	AMPTEK
Modelo	XR-100CR
Série	N2026
Diâmetro ativo	500 μm
Área ativa	$\sim 6 \text{ mm}^2$
Janela de Be	25 μm
FWHM em 5,9 keV	224 eV

A Figura 4.4 mostra ambos os detectores utilizados.

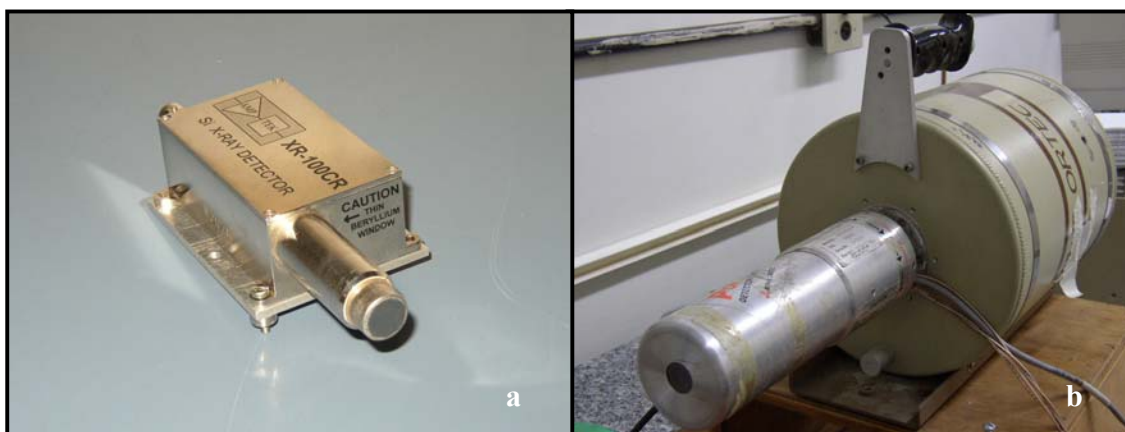


Figura 4.4 - Detectores utilizados nas medições. a) Detector SI-PIN usado nas medições de fluorescência de elementos de baixo número atômico, b) Detector de Si(Li) usado nas medições de fluorescência dos elementos de alto número atômico.

IV.1.3 – Suporte de PVC (geometria de medição)

A geometria de medição foi fixada por um suporte porta amostra de PVC confeccionado no próprio LIN (Figura 4.5). O suporte foi construído de forma que, além de se encaixar no detector e de fixar a amostra, possibilitava a troca de colimadores. O feixe emergente foi colimado por um cilindro de alumínio com um orifício central de $12,45\pm 0,05\text{mm}$ de diâmetro (Figura 4.6). Uma vez que os elementos do sistema de medidas estivessem devidamente posicionados, o feixe de raios X incidia sobre a amostra formando um ângulo médio aproximadamente igual a $16\pm 1^\circ$ com sua superfície e os fótons de fluorescência emergiam da amostra e atingiam o detector perpendicularmente (Figura

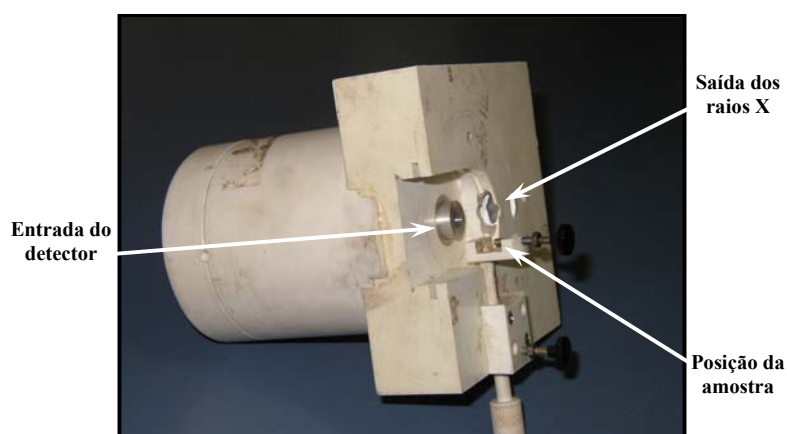


Figura 4.5 – Suporte porta-amostras de PVC utilizado para fixar a geometria de medida.

4.7).

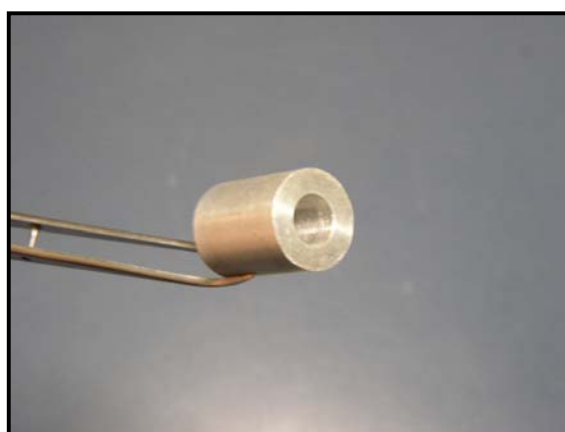


Figura 4.6 – Colimador utilizado nas medidas de fluorescência em ambos os sistemas. Diâmetro do orifício igual a $12,45\pm 0,05\text{mm}$.

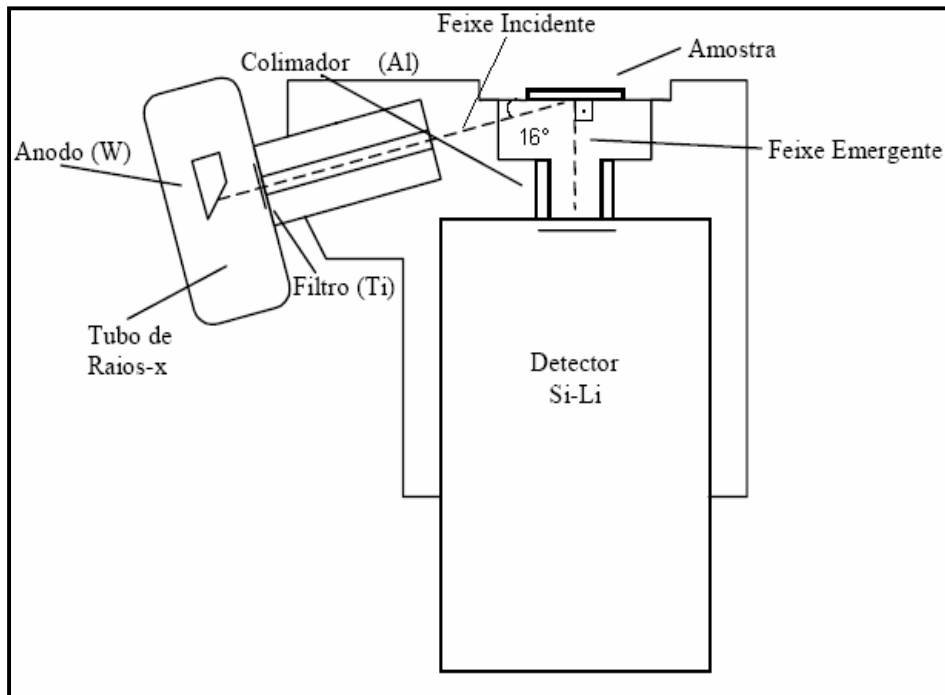


Figura 4.7 – Esquema do sistema experimental (ANJOS, 2000).

As distâncias entre a janela do tubo de raios X e a amostra e entre a amostra e o detector foram iguais a 7,6 e 3,5 cm, respectivamente.

IV.2 – Filtragem da radiação

A filtragem do espectro de raios X se fez necessária, na situação em que a tensão de 27kV foi usada, por dois motivos:

1. os elementos analisados neste estudo apresentam concentrações da ordem de parte por milhão (ppm), sendo assim, os picos formados no espectro por fótons de fluorescência provenientes de elementos presentes na amostra em baixa concentração (como cobre e bromo) seriam dificilmente observados em meio ao espectro de radiação de *bremmstrahlung* (Figura 4.3).
2. com a excitação da camada L do tungstênio, apareciam no espectro picos com energias: $L_{\alpha} = 8,39\text{keV}$ e $L_{\beta} = 9,67\text{keV}$ (Figura 4.3). Como estes picos eram muito intensos, mascaravam os de outros elementos, como o zinco ($K_{\alpha} = 8,63\text{keV}$ e $K_{\beta} = 9,57\text{keV}$).

A Figura 4.8 mostra o espectro de raios X após ser filtrado. O composto químico utilizado na confecção do filtro foi o óxido de titânio IV (TiO_2). Essa escolha baseou-se nas propriedades de absorção de radiação do titânio.

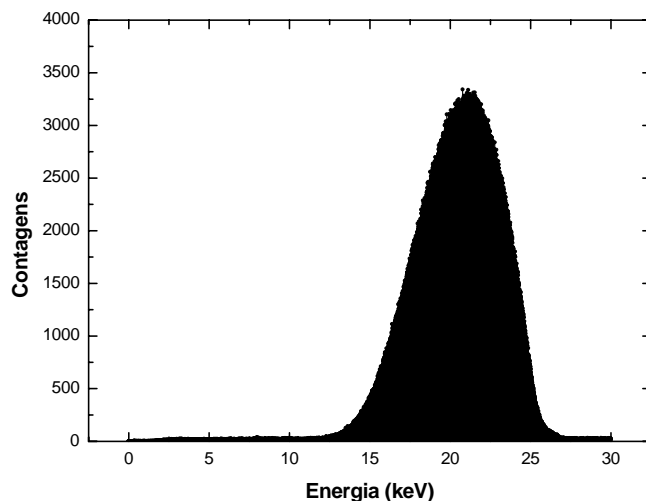


Figura 4.8 – Espectro de raios X após a filtragem. Atenção para a ausência das linhas do tungstênio e para o início do espectro espalhado.

Este elemento possui energia de corte igual a 4,97keV. Esta condição e a espessura com que o filtro foi confeccionado garantiram uma boa absorção dos fótons com energias até cerca de 12keV e pouca absorção daqueles com energia superior a este valor, como pode ser observado na figura 4.8. O filtro consistiu de uma pastilha resultante da compressão de 1000mg de óxido de titânio IV em pó envolvida por Mylar (Figura 4.9). O

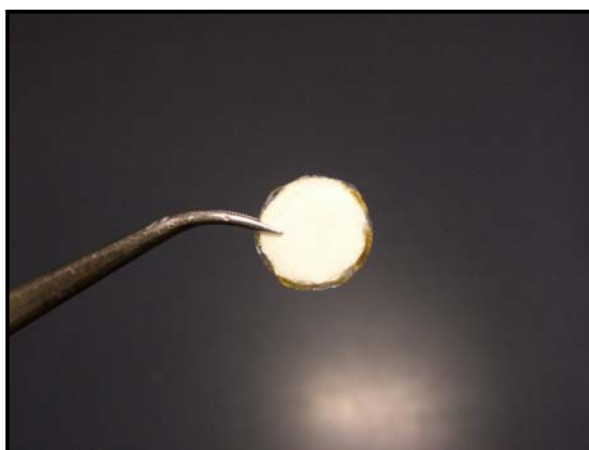


Figura 4.9 – Filtro de óxido de titânio utilizado para endurecer o feixe de raios X.

produto final apresentou diâmetro igual a $10,550 \pm 0,005\text{mm}$ e espessura igual a $1,270 \pm 0,005\text{mm}$.

IV.3 – Amostras de sangue

IV.3.1 – Coleta das amostras no HEMORIO

Este trabalho é fruto de um projeto de cooperação entre o LIN e o Instituto Estadual de Hematologia “Arthur de Siqueira Cavalcanti” (HEMORIO), pois, foi nessa instituição que as amostras tanto de sangue de indivíduos sadios quanto de sangue de portadores de leucemia mielóide crônica (LMC) foram obtidas. As amostras começaram a ser coletadas logo após a aprovação do projeto pela Comissão Nacional de Ética em Pesquisa – CONEP / Conselho Nacional de Saúde / Ministério da Saúde que então foi registrado sob o número 032(04).

Foram coletadas 60 amostras de cada um dos grupos estudados (sadio e LMC). As amostras de sangue sadio foram obtidas de doadores voluntários com idade entre 18 e 64 anos, que forneceram, consensualmente, uma alíquota de 5ml cada um. As amostras de sangue do outro grupo foram obtidas no ato do exame de sangue dos pacientes. Estes eram abordados e questionados quanto à intenção de participar do trabalho. Uma vez obtido o consentimento, eram retiradas alíquotas de 5ml de sangue, sempre que possível, já que alguns se encontravam muito debilitados fisicamente. Os pacientes tinham idade entre 18 e 80 anos. O questionário apresentado aos pacientes encontra-se no apêndice C.

IV.3.2 – Preparação das amostras

A preparação das amostras se deu em duas etapas: uma no HEMORIO e outra no LIN. No HEMORIO as amostras foram coletadas em tubos de ensaio a vácuo, sem gel anticoagulante e com gel separador, feito à base de água, da marca Becton Dickinson. Os tubos foram devidamente etiquetados e, logo após, centrifugados a 3070rpm por 10min para que o soro se separasse da parte celular, sendo esta última a parte estudada neste trabalho (Figura 4.10). Em seguida foram congelados a aproximadamente -20°C (LEITÃO, 2005) e transportados para o LIN.

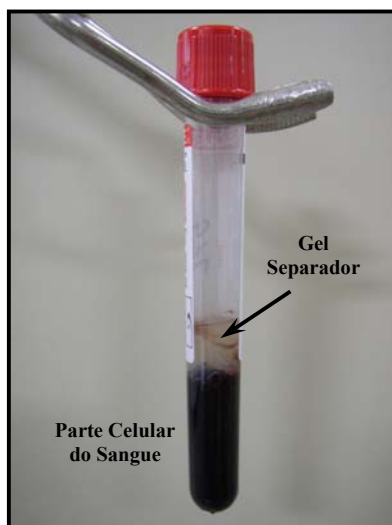


Figura 4.10 – Amostra de sangue colhida no HEMORIO. A amostra contém apenas o gel separador e a parte celular do sangue.

Para que as amostras pudessem ser transformadas em pastilhas, forma que melhor se ajustava ao sistema de medição utilizado, foram liofilizadas, trituradas e então compactadas. Esta etapa da preparação se deu no LIN e obedeceu a seguinte seqüência: o sangue, já sem o soro, era descongelado para que pudesse ser retirado do tubo de ensaio. Era então depositado em um recipiente devidamente lavado com água ultrapura (MILLI-Q) e, em seguida, levado ao liofilizador (Figura 4.11).

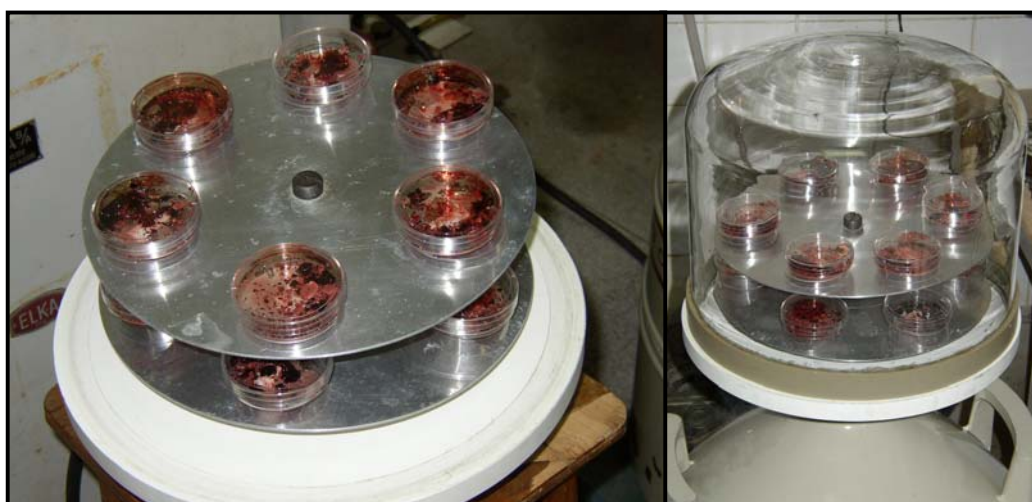


Figura 4.11 – Amostras no liofilizador.

As amostras permaneciam no liofilizador por cerca de 48 horas, ou até que estivessem totalmente desidratadas. Posteriormente, já liofilizadas, eram trituradas utilizando-se um cadinho de porcelana e um pistilo. Uma vez transformada em pó, eram separadas em porções de 400mg que eram compactadas a uma pressão de cerca de 57atm (massa de 12 toneladas sobre uma área de $2,03 \times 10^{-3} \text{m}^2$) e transformadas nas pastilhas de 2,54cm de diâmetro e de densidade superficial média aproximadamente igual a $0,077 \pm 0,015 \text{g} \cdot \text{cm}^{-2}$.

As diferentes etapas da preparação das amostras podem ser observadas na Figura 4.12.

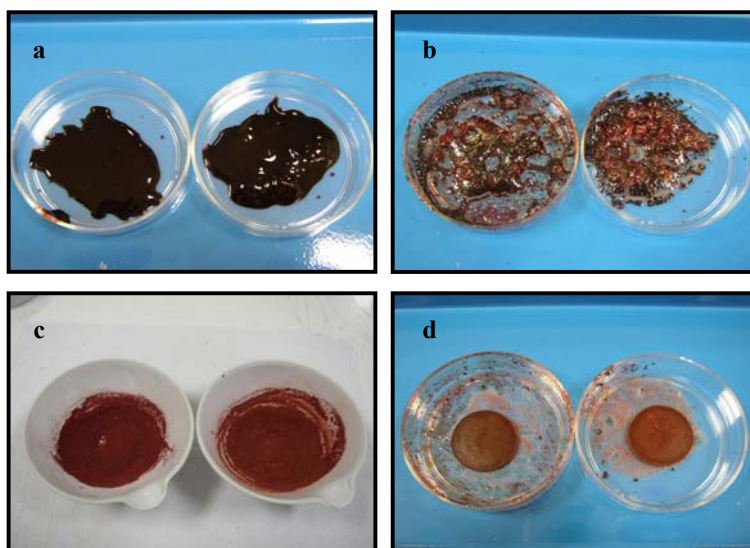


Figura 4.12 – Etapas da preparação das amostras. a) Amostras após o descongelamento, b) resultado da liofilização, c) depois de trituradas e d) compactadas e transformadas em pastilhas.

Os instrumentos utilizados nesta fase da preparação das amostras podem ser observados na Figura 4.13. Como as alíquotas de sangue retiradas dos doadores eram sempre maiores que as retiradas dos enfermos, as amostras vindas daqueles, na maioria das vezes, davam para fazer duas pastilhas, enquanto as vindas destes, quase nunca. Sendo assim, para que não houvesse apenas uma única medida, as amostras que não tinham duas pastilhas eram medidas em ambas as faces.

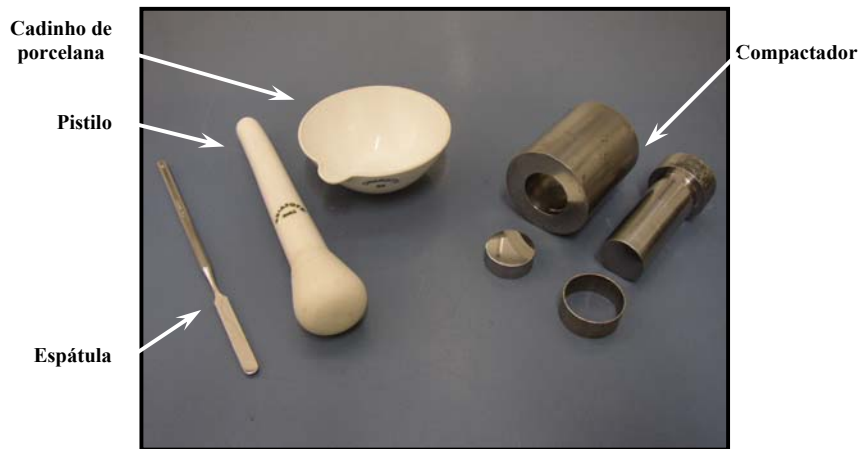


Figura 4.13 – Instrumentação utilizada na preparação das amostras.

IV.4 – Tratamento das medidas

Sendo o objetivo deste trabalho o estudo da comparação entre as concentrações elementares de sangue de indivíduos leucêmicos e saudáveis, o primeiro passo do tratamento dos espectros de fluorescência de raios X obtidos é, a partir deles, calcular-se tais concentrações. Para tal parte-se da equação 3.21.

$$I_{i,y} = S_i \cdot W_i \cdot \frac{[1 - \exp(-\chi_i(E_0, E_i) \cdot \rho_M \cdot D)]}{\chi_i(E_0, E_i)}$$

Ou ainda, reescrevendo a equação,

$$W_i = \frac{I_{i,y}}{S_i} \cdot \left[\frac{\chi_i(E_0, E_i)}{1 - \exp(-\chi_i(E_0, E_i) \cdot \rho_M \cdot D)} \right] \quad (4.1)$$

Para obter-se W_i da equação 4.1 é necessário determinar-se cada um dos fatores que a compõem: o termo $I_{i,y}$ representa a intensidade de fluorescência produzida na amostra, fator obtido diretamente do espectro, S_i é a sensibilidade do sistema para a produção e detecção de um fóton de determinada energia proveniente de um elemento cuja concentração deseja-se estudar e o termo entre colchetes representa a absorção sofrida pelos fótons no interior das amostras.

Em seguida descreve-se os processos para a obtenção destes fatores.

IV.4.1 – Curva de absorção

Um dos passos para o cálculo da concentração elementar de uma amostra é determinar o quanto da radiação é absorvida pela mesma obtendo-se sua curva de absorção da radiação. Esta curva, normalmente obtida de forma empírica, leva ao comportamento da variação do coeficiente de absorção da amostra em função da energia da radiação, $\mu(E)$.

O método adotado foi o de transmissão de radiação. Ele tem por base a hipótese de que a absorção na amostra obedece a uma função potência do tipo (ANJOS, 2000)

$$\mu(E) = A \cdot E^B, \quad (4.2)$$

ou ainda,

$$\ln|\mu(E)| = \ln|A| + B \cdot \ln|E|. \quad (4.3)$$

Para se encontrar a expressão que relaciona a variação de μ com a mudança da energia é preciso determinar as constantes A e B. A forma mais comum de se obter estas constantes é de forma experimental.

Através de medidas de absorção da amostra realizadas utilizando-se um alvo multielementar composto por concentrações conhecidas de Ti, Mn, Cu e Sr é possível obter-se valores de coeficientes de atenuação da seguinte forma: irradiando-se o alvo obtém-se a medida a intensidade de fluorescência (I_0) produzida por ele, em seguida uma das pastilhas é posicionada entre o alvo e o detector de forma a atenuar o feixe inicial de radiação fluorescente, obtendo-se assim I_1 .

Uma vez conhecida a densidade superficial da pastilha ($\rho_M \cdot D$), a partir da equação

$$I_1 = I_0 \cdot \exp(-\mu \cdot \rho_M \cdot D), \quad (4.4)$$

ou ainda

$$\mu = \ln\left(\frac{I_0}{I_1}\right) / \rho_M \cdot D, \quad (4.5)$$

chega-se a valores do coeficiente de atenuação para cada um dos picos do espectro, a saber K_α Sr - 14,142keV; K_α Cu - 8,04keV; K_α Mn - 5,895keV; K_α Ti - 4,509keV.

O ajuste da curva gerada pelos pontos formados por estes valores de energia e o coeficiente de atenuação calculado para cada um deles leva à curva de absorção e, conseqüentemente, à relação $\mu(E)$ que a gera.

Conhecida $\mu(E)$ pode-se calcular o coeficiente de atenuação da amostra para a energia que incide sobre ela.

IV.4.2 – Curva de sensibilidade

A curva de sensibilidade representa a capacidade do detector captar um fóton de fluorescência produzido na amostra. Ela é uma função da eficiência de detecção para energia de tal fóton, dos parâmetros físicos relacionados à fluorescência de raios X e também da geometria do sistema. Por conta disto a curva de sensibilidade é característica de cada sistema de medida.

Apesar das amostras e da geometria de medida serem as mesmas, foram usados detectores diferentes para medir as diferentes faixas de energias analisadas. Sendo assim foi necessária a determinação de uma curva de sensibilidade para cada um dos sistemas.

Com isso, baseando-se novamente na equação 3.20, chega-se à relação da sensibilidade em função da energia do pico de fluorescência.

$$S_i = \frac{I_{i,y}}{W_i} \cdot \frac{\chi_i(E_0, E_i)}{1 - \exp(-\chi_i(E_0, E_i) \cdot \rho_M \cdot D)} \quad (4.6)$$

Os valores de $I_{i,y}$ são obtidos do espectro de fluorescência de raios X a partir do número de contagens de um pico normalizado pelo tempo de medida. O valor da concentração W_i é conhecido e a densidade superficial da pastilha é calculada medindo-se a massa e calculando-se a área da pastilha.

A curva de sensibilidade foi obtida a partir de uma pastilha certificada fígado bovino (NIST 1577b) de mesmas dimensões das pastilhas de sangue analisadas.

IV.4.3 – Cálculo das concentrações

Uma vez conhecidas as relações que determinam a sensibilidade de cada um dos sistemas utilizados e a absorção sofrida pela radiação no interior das amostras para qualquer energia, é possível encontrar as concentrações elementares das pastilhas através da relação 4.1.

IV.5 – Limites de detecção

Os limites de detecção (LD) correspondem à quantidade mínima de um determinado elemento que pode ser detectada por um sistema de medição (CURRIE, 1968).

A obtenção dos limites de detecção (LD) de ambos os sistemas utilizados baseou-se nos resultados das medidas realizadas na amostra certificada de fígado bovino (NIST 1577b) aplicados à equação (CUSTÓDIO, 2005)

$$LD = \frac{3 \cdot W_i \cdot \sqrt{I_{BG}}}{I_{PICO}}, \quad (4.7)$$

onde W_i é a concentração do elemento i não amostra, I_{BG} é a intensidade da radiação de *background* e I_{PICO} é a intensidade dos pico correspondente à energia do elemento i .

CAPÍTULO V

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Este capítulo apresenta os resultados obtidos com as medidas de fluorescência de raios X nas amostras de sangue. São apresentados, também, os espectros de fluorescência de raios X obtidos para cada grupo de amostras (sadio e LMC) e a concentração elementar separada por sexo dos indivíduos.

V.1 – Curva de Absorção

A absorção da radiação numa determinada amostra depende de sua composição elementar. Como, *a priori*, não se conheciam as composições e concentrações elementares das amostras, foram escolhidas ao acaso três pastilhas de cada grupo (sadio e LMC) para que tivessem determinada sua curva de absorção. As curvas de absorção são mostradas nas figuras 5.1 e 5.2. Foi observado que variação de absorção entre as pastilhas analisadas é pequena. Portanto, a curva de absorção foi considerada como sendo uma média dos valores obtidos para três amostras de um determinado grupo.

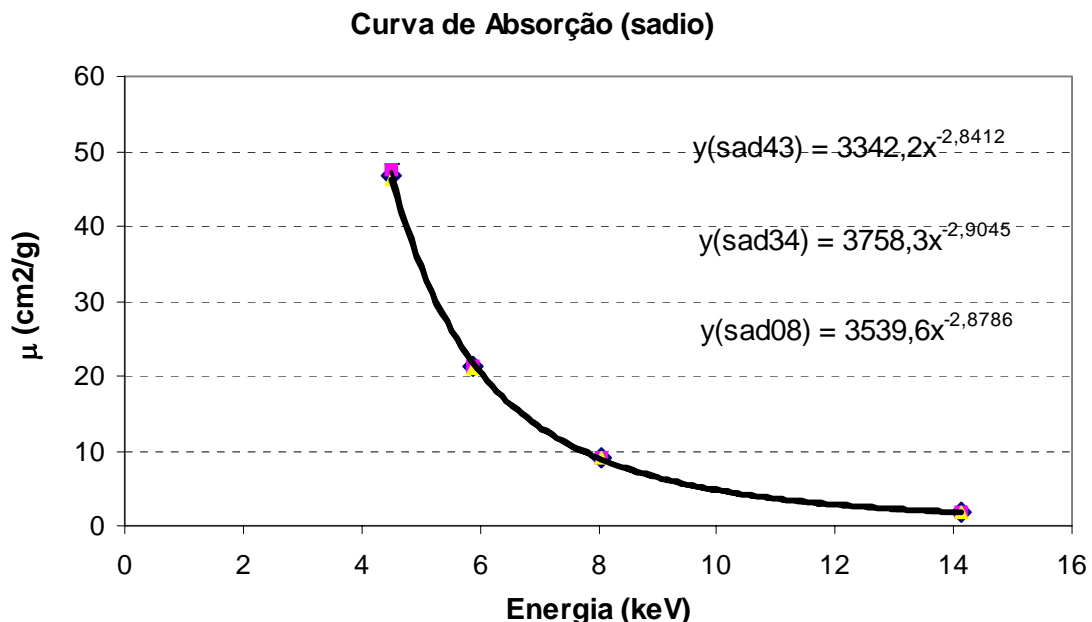


Fig. 5.1 – Ajuste das curvas de absorção de três amostras de sangue sadio.

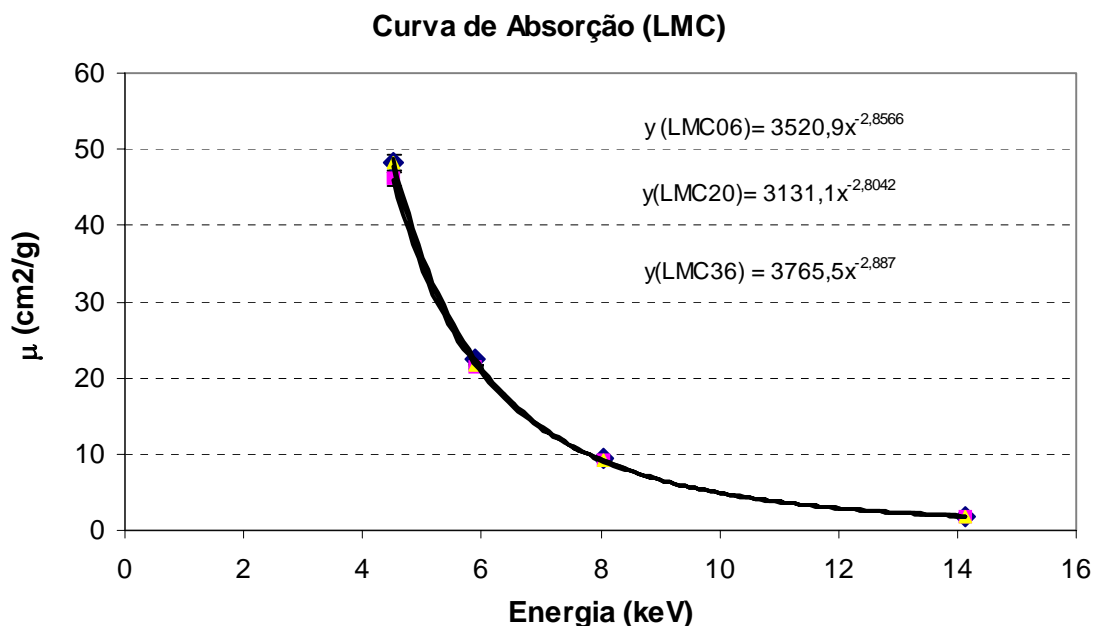


Fig. 5.2 – Ajuste das curvas de absorção de três amostras de sangue do grupo de portadores de leucemia mielóide crônica (LMC).

Foi observado que quase não havia variação de absorção entre as pastilhas analisadas. Os valores de absorção que geraram as figuras 5.1 e 5.2 acima resultaram também no valor da intensidade do feixe atenuado após passar pela amostra (I_i). Este valor foi importante para se determinar o coeficiente de atenuação da pastilha, este utilizado nos cálculos da sensibilidade do sistema e da concentração elementar presente na amostra.

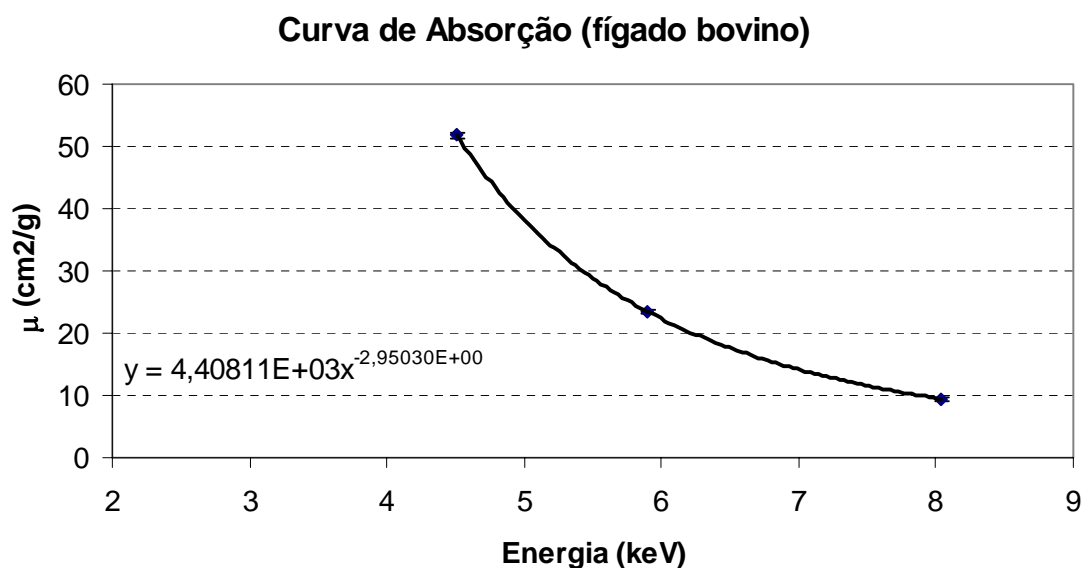


Fig. 5.3 – Ajuste da curva de absorção para a amostra certificada de fígado bovino (NIST 1577b).

Da mesma forma que foi feita para as amostras de sangue, a curva de absorção foi determinada para amostras certificadas de fígado bovino e de leite em pó, utilizada em seguida na validação do método. Estas amostras possuem suas composições e respectivas concentrações elementares já determinadas por instituições reconhecidas internacionalmente, como Agência Internacional de Energia Atômica (IAEA) e o Instituto Nacional de Padrões e Tecnologia (NIST) norte americano. As curvas de absorção obtidas para as amostras certificadas estão representadas nas figuras 5.3 e 5.4.

Curva de Absorção (leite em pó)

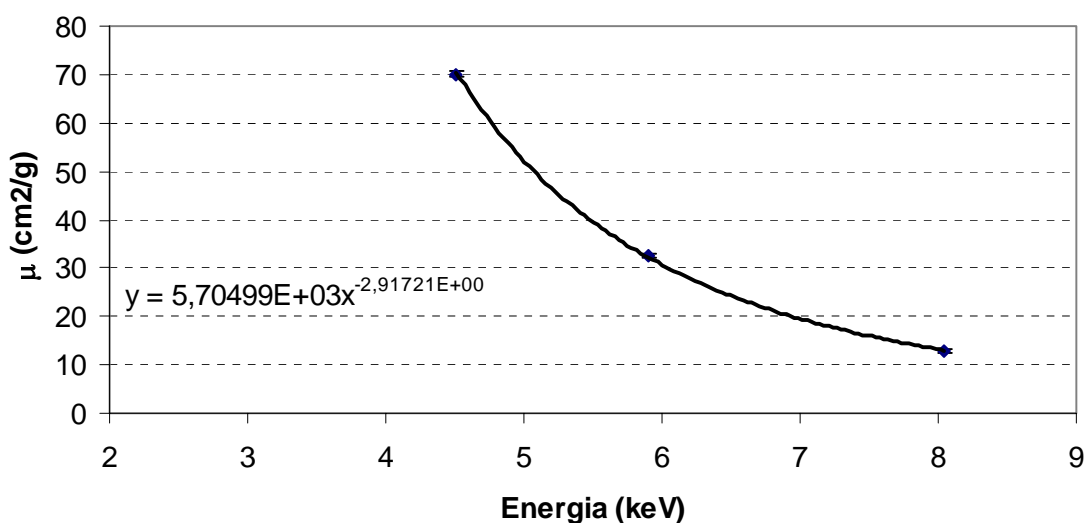


Fig. 5.4 – Ajuste da curva de absorção para a amostra certificada de leite em pó (IAEA-153).

V.2 – Curva de sensibilidade

A curva de sensibilidade para a linha K foi obtida a partir da equação 4.6 levando em consideração as concentrações elementares de uma amostra certificada de fígado bovino (NIST, 1577b).

O termo $I_{i,y}$ necessário ao cálculo da curva de sensibilidade foi extraído dos espectros de fluorescência de raios X da amostra de fígado bovino (figura 5.5 e 5.6).

Sendo a amostra certificada pelo *National Institut of Standard Tecnology* (NIST), possuía valores de concentrações elementares (W_i) conhecidos. Estes valores podem ser observados na tabela 5.1.

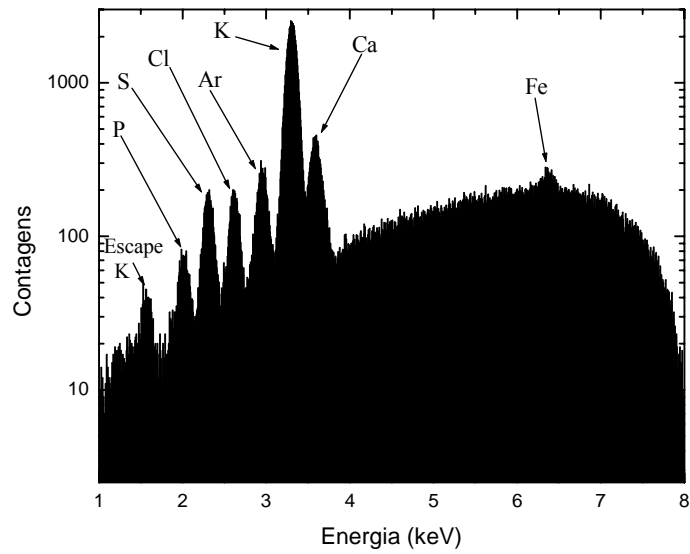


Figura 5.5 – Espectro de fluorescência de raios X oriundo da irradiação de uma pastilha de uma amostra certificada de fígado bovino (NIST, 1577b) com um feixe de raios X de 8kV.

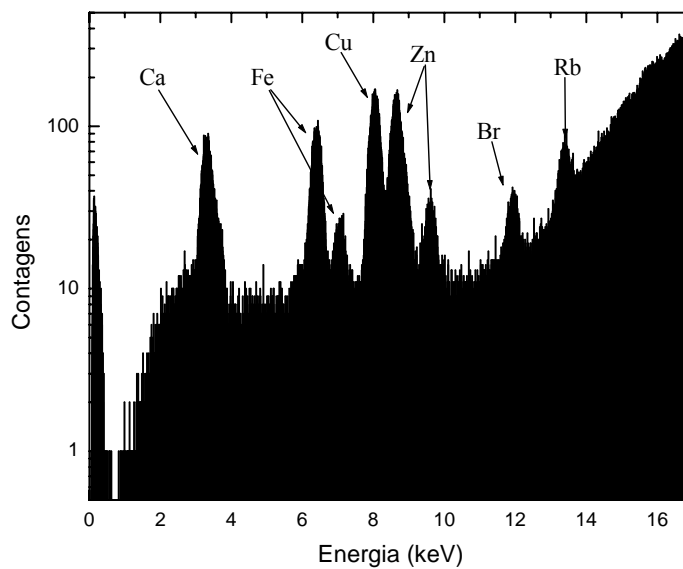


Figura 5.6 – Espectro de fluorescência de raios X oriundo da irradiação de uma pastilha de uma amostra certificada de fígado bovino (NIST, 1577b) com um feixe de raios X de 27kV.

Tabela 5.1 – Concentrações elementares presentes na amostra de fígado bovino (NIST, 1577b).

NIST 1577b – Fígado Bovino		
Elem.	µg.g⁻¹	%
Cl	-	0,278±0,006
P	-	1,10±0,03
K	-	0,994±0,002
Na	-	0,242±0,006
S	-	0,785±0,006
Cd	0,50±0,03	-
Ca	116±4	-
Cu	160±8	-
Fe	184±15	-
Pb	0,129±0,004	-
Mg	601±28	-
Mn	10,5±1,7	-
Mo	3,5±0,3	-
Rb	13,7±1,1	-
Se	0,73±0,06	-
Ag	0,039±0,007	-
Sr	0,136±0,001	-
Zn	127±16	-

O termo de absorção havia sido previamente calculado e seu ajuste se encontra representado na figura 5.3. A partir dos elementos descritos anteriormente foi possível estabelecer a curva de sensibilidade para cada um dos sistemas de medição. Foi necessário obter uma curva para cada sistema devido à utilização de energias e detectores diferentes.

As figuras 5.7 e 5.8 mostram a curva de sensibilidade de cada um dos sistemas de medida.

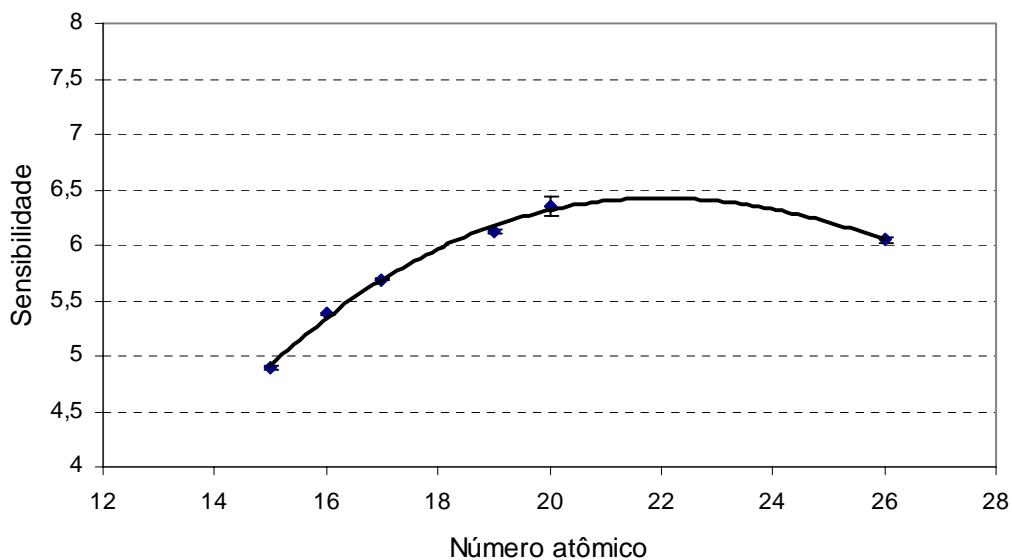


Figura 5.7 – Ajuste da curva de sensibilidade para a amostra certificada de fígado bovino (NIST 1577b) irradiada por um feixe de raios X de 8 kV.

O ajuste da curva mostrada na figura 5.7 é dado por

$$S_i = 13,38 + 2,13 \cdot Z_i - 0,07 \cdot Z_i^2 + 0,0007 \cdot Z_i^3 \quad (5.1)$$

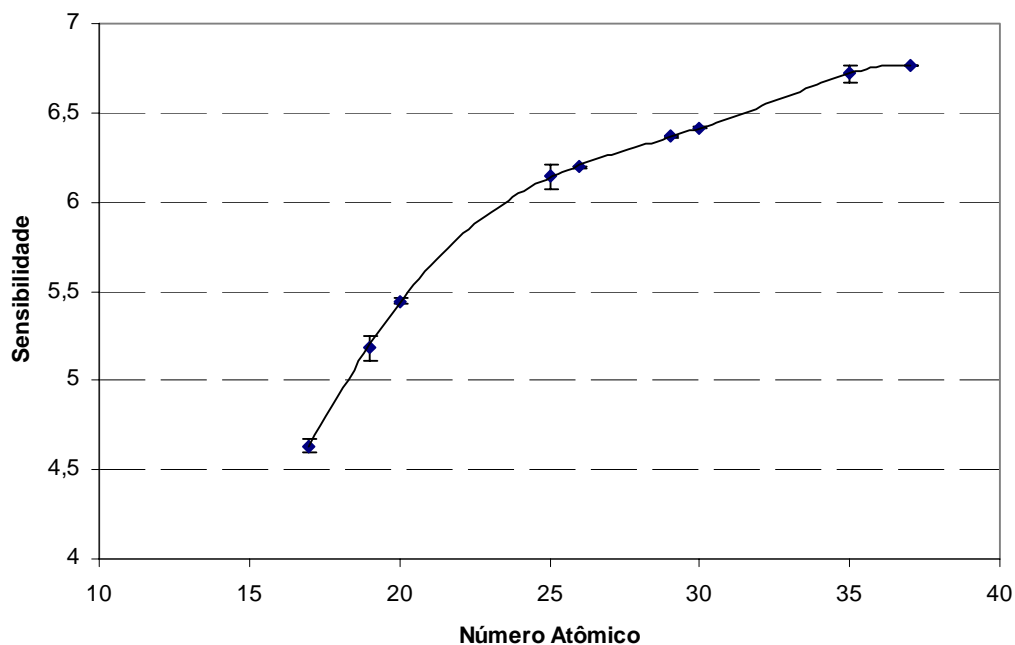


Figura 5.8 – Ajuste da curva de sensibilidade para a amostra certificada de fígado bovino (NIST 1577b) irradiada por um feixe de raios X de 27 kV.

O ajuste da curva mostrada na figura 5.8 é dado por

$$S_i = 19 - 4,53 \cdot Z_i + 0,45 \cdot Z_i^2 - 0,02 \cdot Z_i^3 + 0,0004 \cdot Z_i^4 - 0,000003 \cdot Z_i^5 \quad (5.2)$$

Os ajustes das curvas (5.1 e 5.2) possibilitaram o cálculo das concentrações elementares presentes nas amostras de sangue analisadas.

V.3 – Medida da amostra certificada

Medidas realizadas em uma amostra certificada de leite em pó (IAEA - 153) foram usadas para dar confiabilidade aos resultados. A metodologia utilizada na análise das amostras de sangue foi aplicada à medida obtida a partir da amostra de leite em pó. As concentrações obtidas foram comparadas com as fornecidas pela Agência Internacional de Energia Atômica (IAEA).

As figuras 5.9 e 5.10 mostram medidas de fluorescência de raios X provenientes desta amostra.

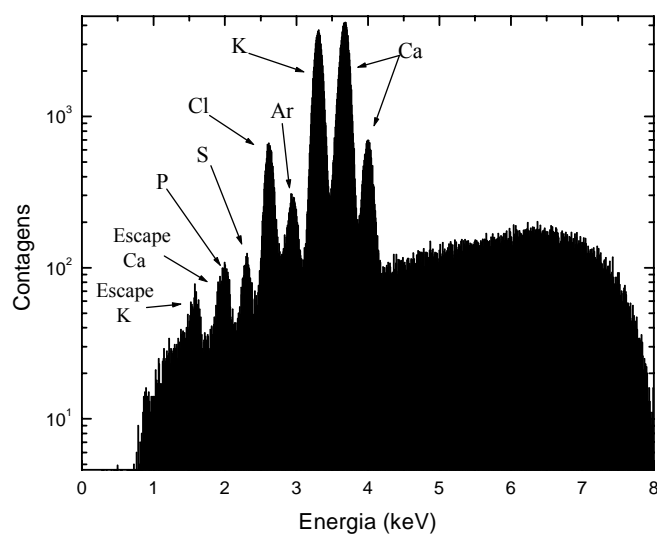


Figura 5.9 – Espectro de fluorescência de raios X oriundo da irradiação de uma pastilha de uma amostra certificada de leite em pó (IAEA - 153) com um feixe de raios X de 8kV.

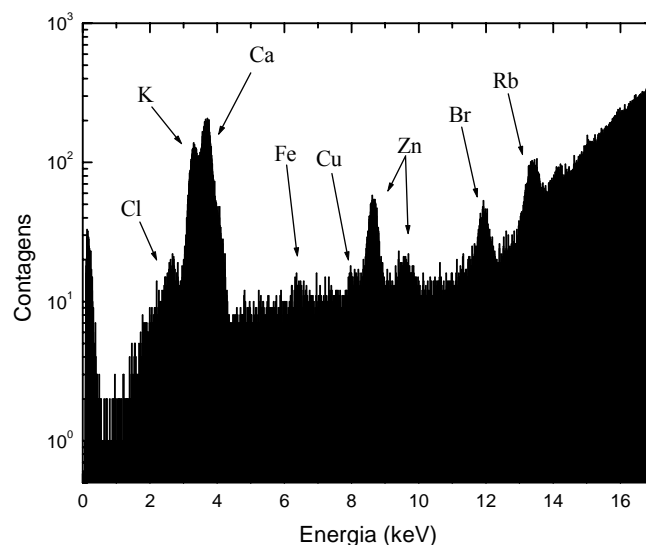


Figura 5.10 – Espectro de fluorescência de raios X oriundo da irradiação de uma pastilha de uma amostra certificada de leite em pó (IAEA - 153) com um feixe de raios X de 27kV.

A área sob os picos leva aos valores de $I_{i,y}$ que, quando aplicados à equação 4.1 junto com os resultados da sensibilidade e da atenuação, possibilita a obtenção dos valores de concentração elementar da amostra. A tabela 5.2 apresenta os valores de concentração elementar determinados pela IAEA e por este trabalho que utiliza a técnica de EDXRF.

Tabela 5.2 – Concentrações elementares presentes na amostra certificada de leite em pó (IAEA-153) determinadas pela IAEA e por este trabalho.

Elem.	IAEA-153 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$	EDXRF $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$	Desvio (%)
Br	12,32	11,3	8,3
Ca	12870	11000	14,5
K	17620	17200	2,4
Mg	1060	-	-
Mn	0,19	-	-
Mo	0,31	-	-
Na	4180	-	-
P	10100	9380	7,1
Rb	14,03	16,00	12,3
Sr	4,09	4,03	1,5
Zn	39,56	40,8	3,0

V.4 – Determinação dos limites de detecção

As figuras 5.11 e 5.12 mostram, respectivamente, os ajustes para as curvas de limite de detecção para os sistemas que utilizaram 8 e 27 kV.

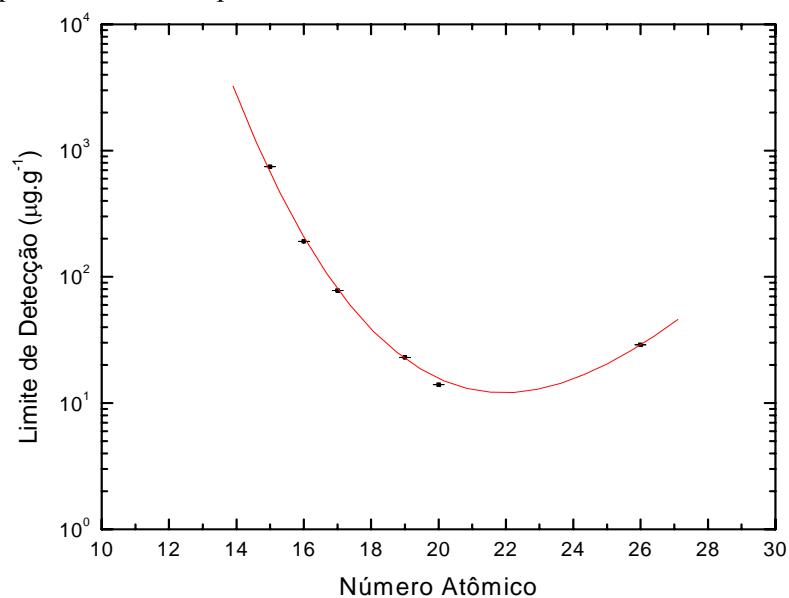


Figura 5.11 – Ajuste da curva que determina o limite de detecção do sistema utilizado para medir elementos de baixo número atômico.

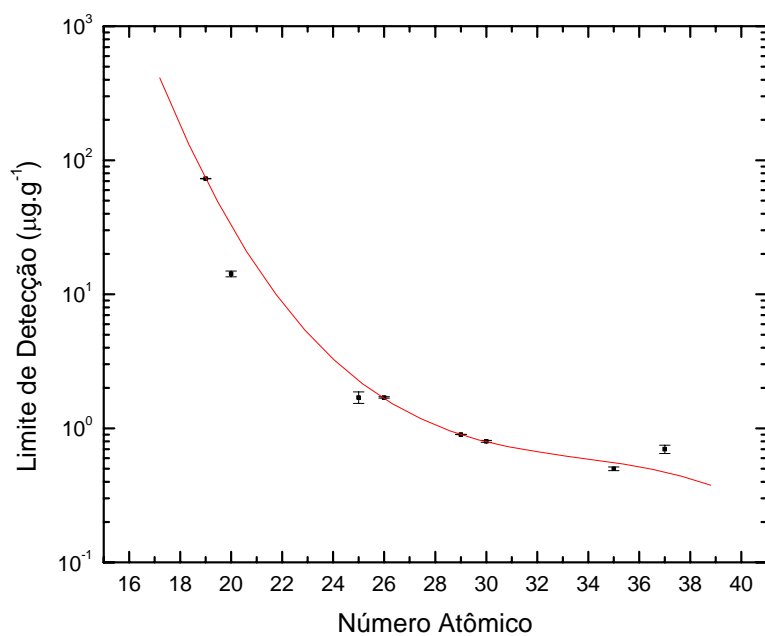


Figura 5.12 – Ajuste da curva que determina o limite de detecção do sistema utilizado para medir elementos de alto número atômico.

O limite de detecção para elementos de número atômico baixo do sistema que utilizou raios X de 8keV é mais baixo ao passo que, para elementos de número atômico alto, o limite mais baixo é o do sistema que utilizou raios X de 27keV.

A equação que melhor se ajustou à curva do LD obtida para 8keV foi

$$LD = 27,28 - 2,97 \cdot Z + 0,11 \cdot Z^2 - 0,0012 \cdot Z^3 \quad (5.3)$$

Já para o LD do sistema que utilizou 27keV a equação de ajuste foi

$$LD = 21,23 - 1,86 \cdot Z + 0,05 \cdot Z^2 - 0,00054 \cdot Z^3 \quad (5.4)$$

V.5 – Espectros de EDXRF

Espectros de fluorescência obtidos através da irradiação de amostras de sangue sadio e de portadores de LMC com feixe de raios X de energia máxima igual a 8keV podem ser observados nas figuras 5.13 e 5.14.

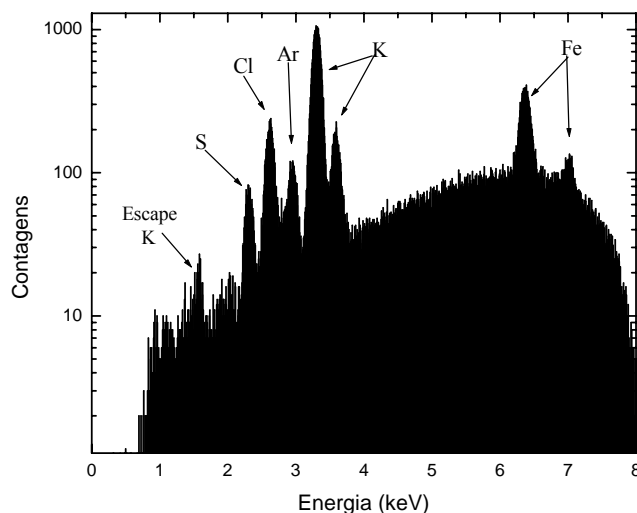


Figura 5.13 – Espectro de fluorescência de raios X oriundo da irradiação de uma pastilha de sangue sadio com feixe de energia máxima igual a 8keV.

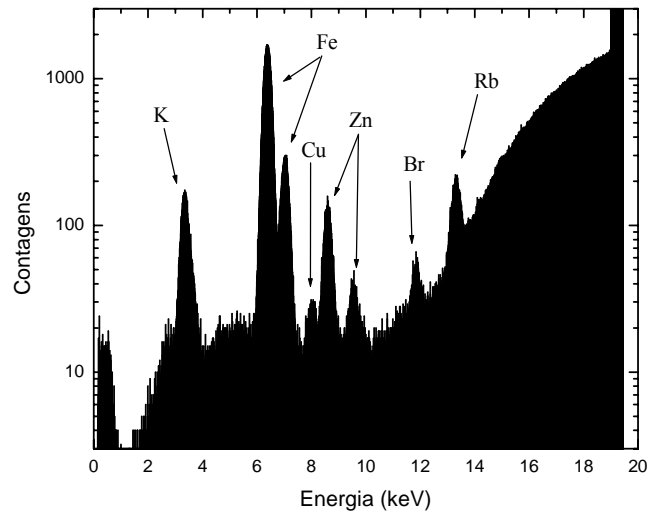


Figura 5.14 – Espectro de fluorescência de raios X resultante da irradiação de uma pastilha de sangue sadio com um feixe de energia máxima igual a 27 keV.

Da irradiação destas mesmas amostras com feixe de raios X de energia máxima igual a 27keV foram obtidos os espectros apresentados nas figura 5.15 e 5.16.

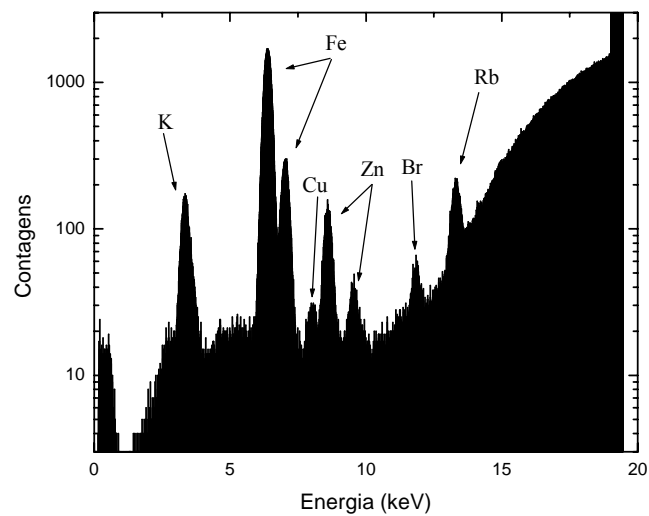


Figura 5.15 – Espectro de fluorescência de raios X resultante da irradiação de uma amostra de sangue de um indivíduo portador de LMC com um feixe de energia máxima igual a 27keV.

A partir da área sob os picos presentes nestes espectros chega-se a valores de intensidade de radiação fluorescente ($I_{i,y}$) para cada um dos elementos observado. Estes valores são utilizados na equação 4.1, a qual determina a concentração de cada um deles.

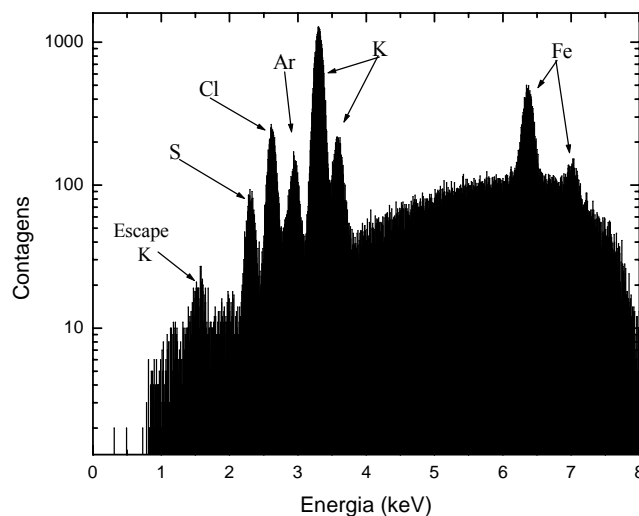


Figura 5.16 – Espectro de fluorescência de raios X oriundo da irradiação de uma amostra de sangue de um indivíduo portador de LMC com feixe de energia máxima igual a 8keV.

V.6 – Concentrações elementares nas amostras de sangue

Os resultados obtidos e a comparação destes com valores descritos na literatura podem ser observados na tabela 5.3 e 5.4.

Tabela 5.3 – Concentrações (em $\mu\text{g.g}^{-1}$) de elementos de baixo número atômico em amostras de sangue sadio e LMC.

Técnica	S	Cl	K	Referência
EDXRF (sadio)	5705±288	6548±805	7295±1061	Este trabalho
EDXRF (LMC)	6391±338	7302±619	8610±967	

Não foi encontrada na literatura medida de concentrações em sangue dos elementos enxofre, cloro e potássio para inter-comparação com os resultados encontrados.

Os elevados valores de concentração obtidos neste trabalho, com relação aos demais, pode ter como causa a utilização apenas da parte celular do sangue na preparação das amostras, e não do sangue total.

Tabela 5.4 – Concentração (em $\mu\text{g.g}^{-1}$) de elementos de alto número atômico em amostras de sangue sadio e LMC e valores de concentrações elementares em sangue obtidas na literatura.

Técnica	Fe	Cu	Zn	Br	Rb	Referência
EDXRF (sadio)	2152 ±65	6,2±0,5	34±5	4,8±0,9	26±4	Este trabalho
EDXRF (LMC)	2172 ±160	6,4±0,9	41±8	6±1	24±6	
EDXRF	-	1,1±0,3	7,8±0,9	3,5±0,7	3,7±0,5	Stump et al.
Ativação neutrônica (sadio)	392±58	-	36,9±8	-	12,3±5,1	Mangal et al.
Ativação neutrônica (leucêmicos)	354±67	-	34±9	-	7,9±3,1	Mangal et al.
ICP-SMS	476	0,38	5,8	6,6	2,5	Rodushikin et al.
ICP-SMS	-	0,95±0,1	6,1±0,9	-	2,9±0,5	Bárány et al.

V.7 – Comparação entre as concentrações elementares do sangue

As figuras 5.17 e 5.18 explicitam a comparação entre as concentrações elementares dos elementos encontrados nas amostras de sangue dos grupos analisados.

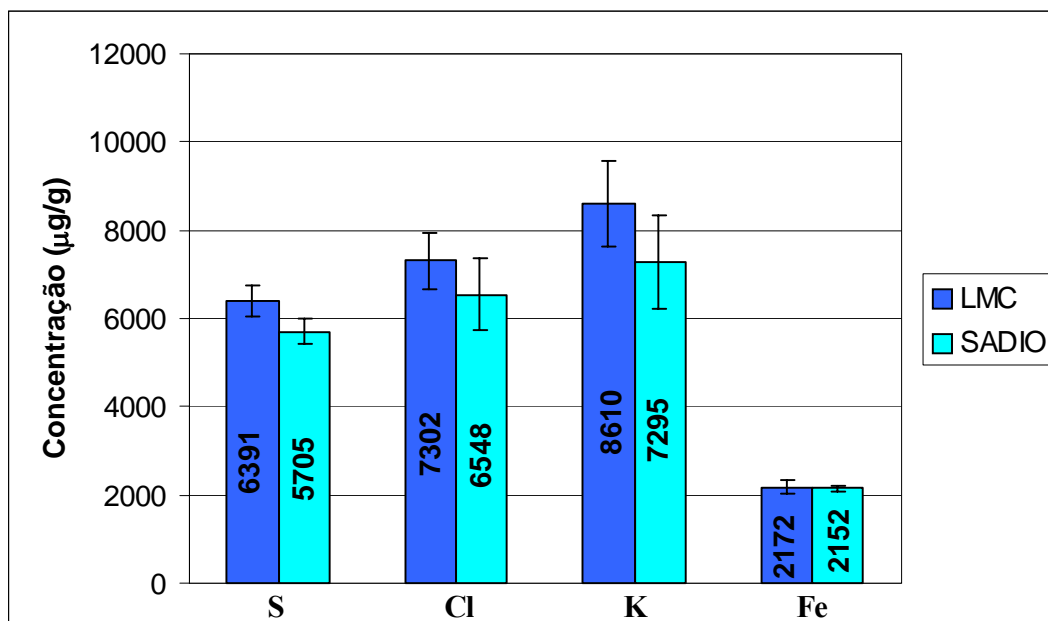


Figura 5.17 – Concentrações (em $\mu\text{g.g}^{-1}$) de S, Cl, K e Fe encontradas nas amostras de sangue sadio e de portadores de LMC.

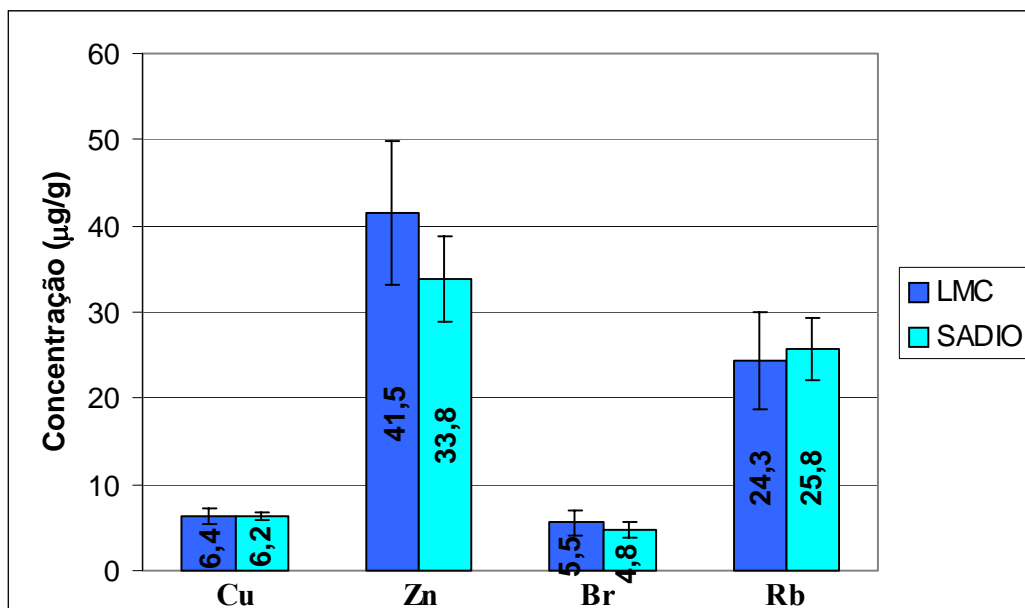


Figura 5.18 – Concentrações (em $\mu\text{g.g}^{-1}$) de Cu, Zn, Br e Rb encontradas nas amostras de sangue sadio e de portadores de LMC.

V.8 – Comparação entre as concentrações elementares do sangue para ambos os sexos

Uma outra análise seguinte levou em conta o sexo dos componentes dos dois grupos de amostras analisados (sadio e LMC). As concentrações elementares divididas entre homens e mulheres podem ser observadas nas figuras 5.19 – 5.26.

ENXOFRE (S)

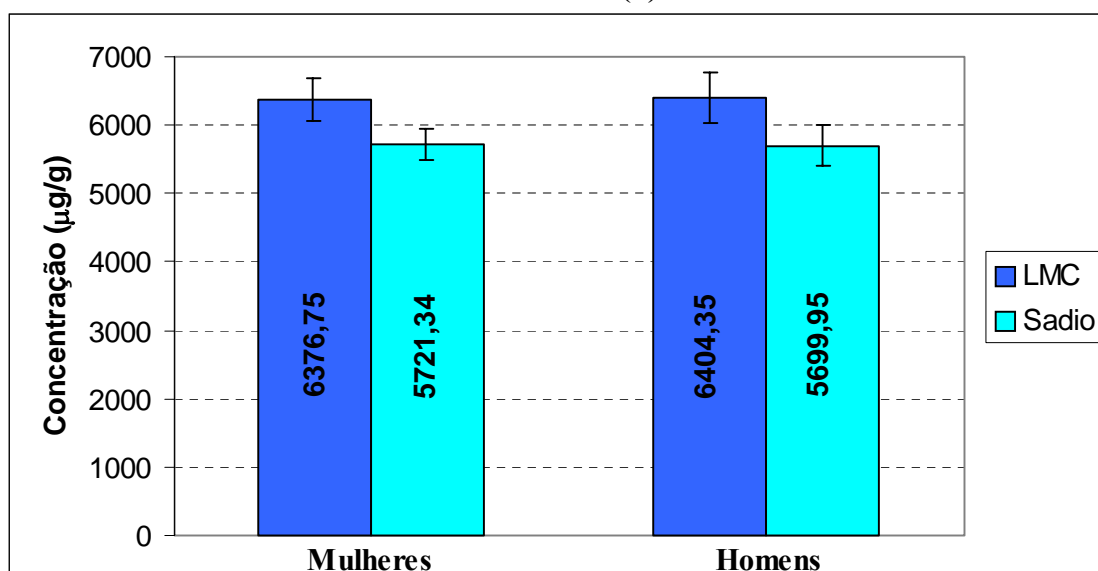


Figura 5.19 – Comparação entre as concentrações de enxofre (em $\mu\text{g.g}^{-1}$) presentes em sangue de portadores de LMC e sadio de mulheres e homens.

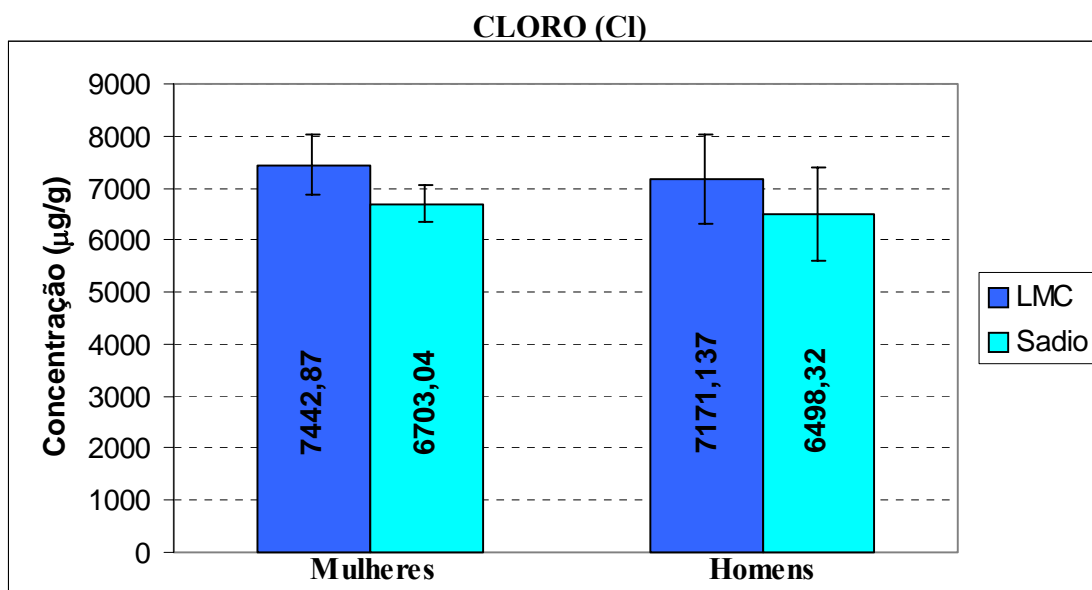


Figura 5.20 – Comparação entre as concentrações de cloro (em $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$) presentes em sangue de portadores de LMC e sadio de mulheres e homens.

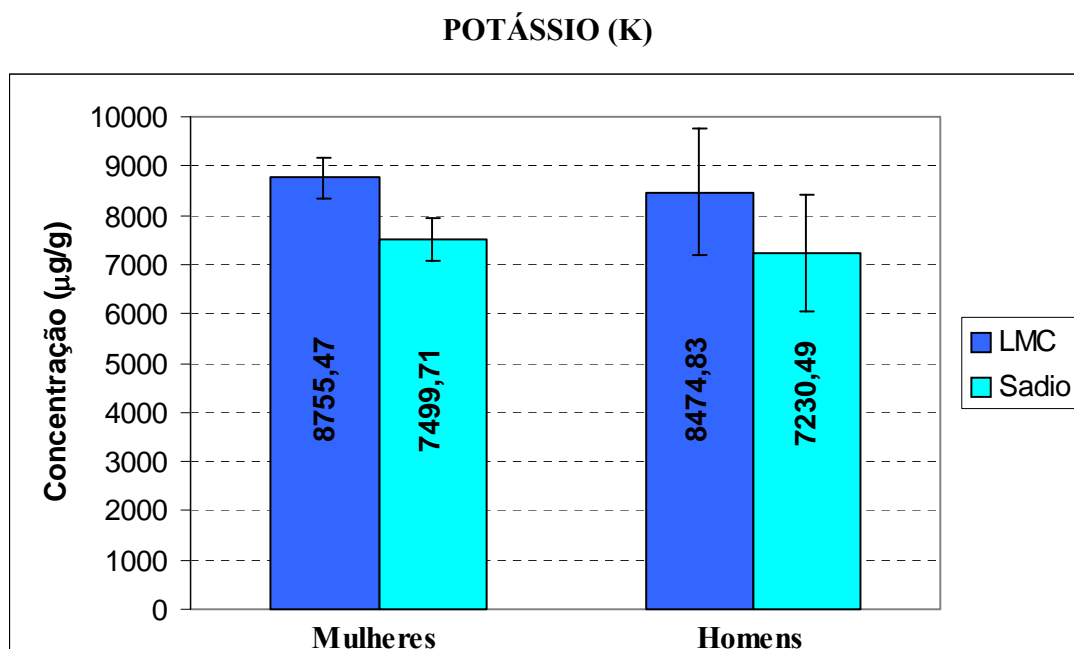


Figura 5.21 – Comparação entre as concentrações de potássio (em $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$) presentes em sangue de portadores de LMC e sadio de mulheres e homens.

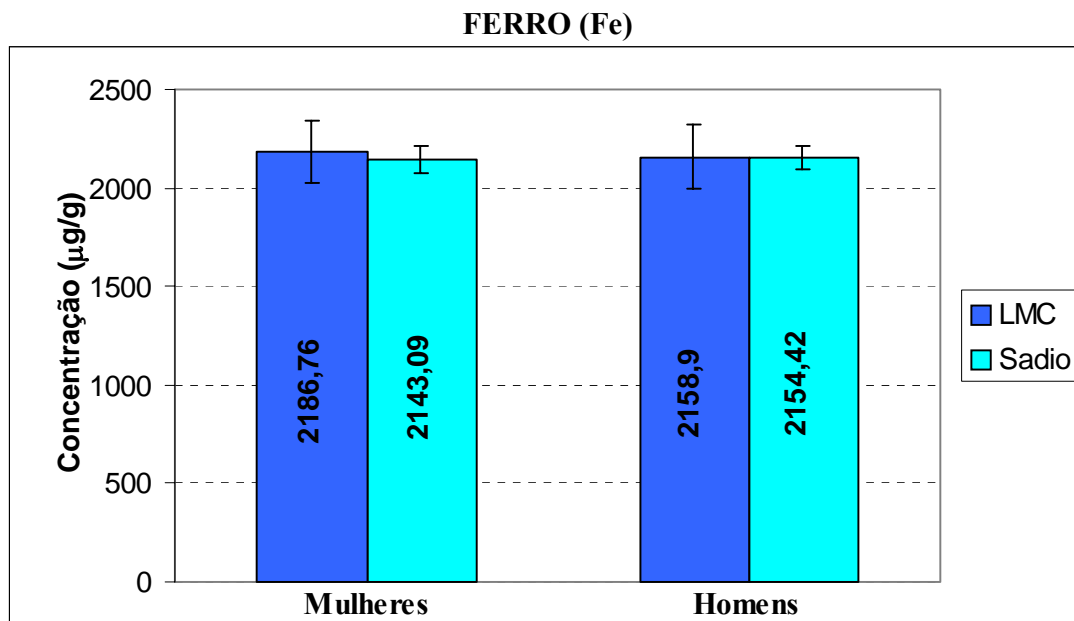


Figura 5.22 – Comparação entre as concentrações de ferro (em $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$) presentes em sangue de portadores de LMC e sadio de mulheres e homens.

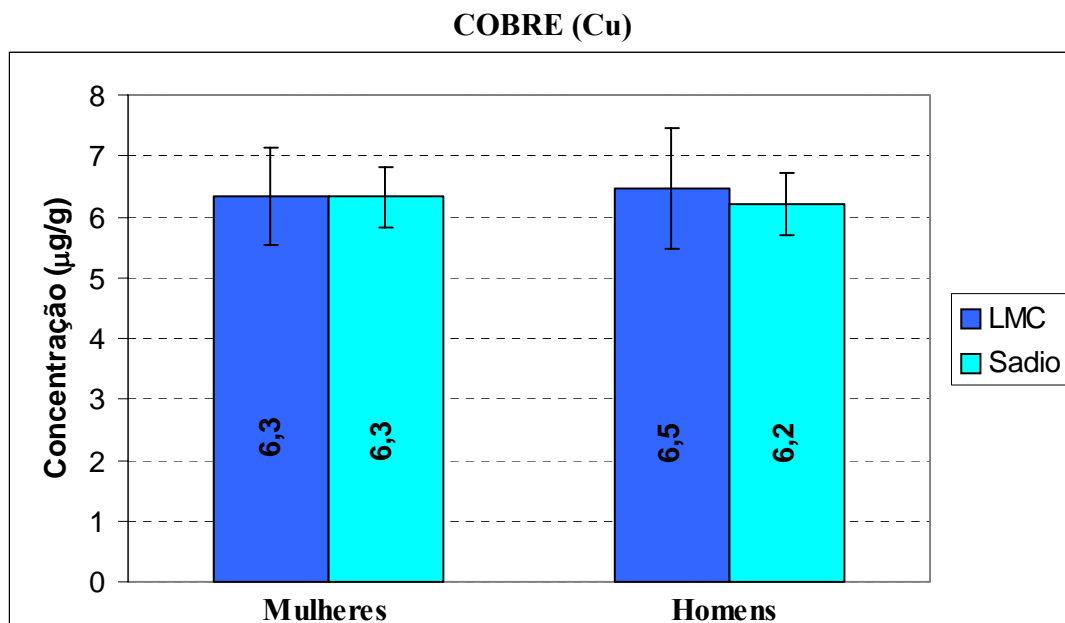


Figura 5.23 – Comparação entre as concentrações de cobre (em $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$) presentes em sangue de portadores de LMC e sadio de mulheres e homens.

ZINCO (Zn)

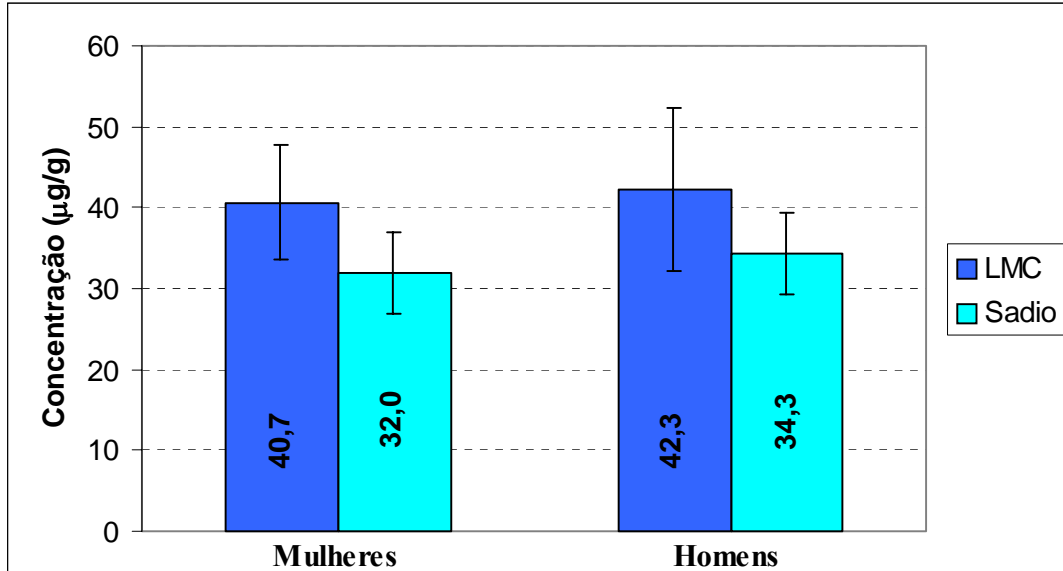


Figura 5.24 – Comparação entre as concentrações de zinco (em $\mu\text{g.g}^{-1}$) presentes em sangue de portadores de LMC e sadio de mulheres e homens.

BROMO (Br)

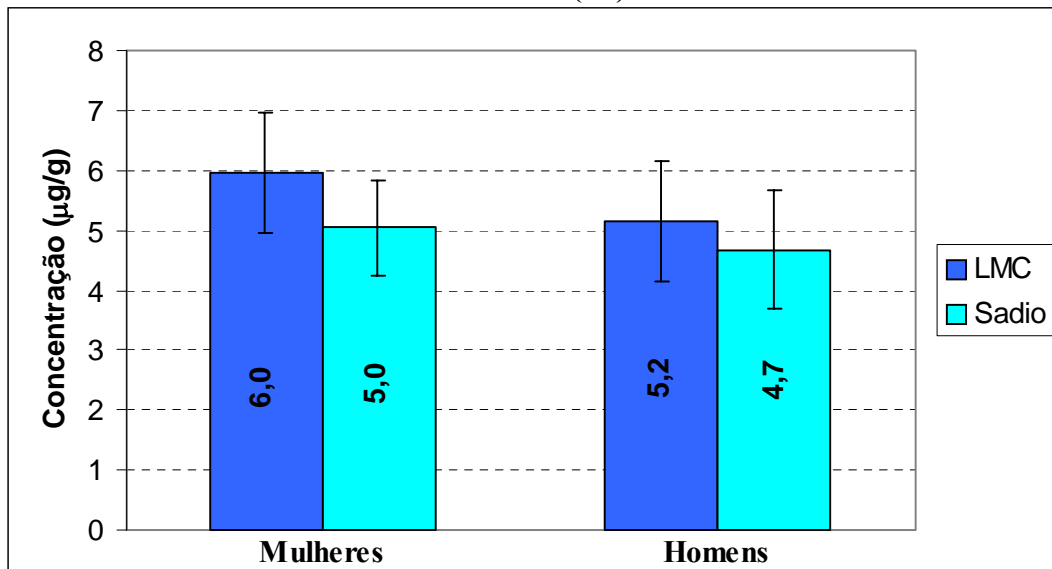


Figura 5.25 – Comparação entre as concentrações de bromo (em $\mu\text{g.g}^{-1}$) presentes em sangue de portadores de LMC e sadio de mulheres e homens.

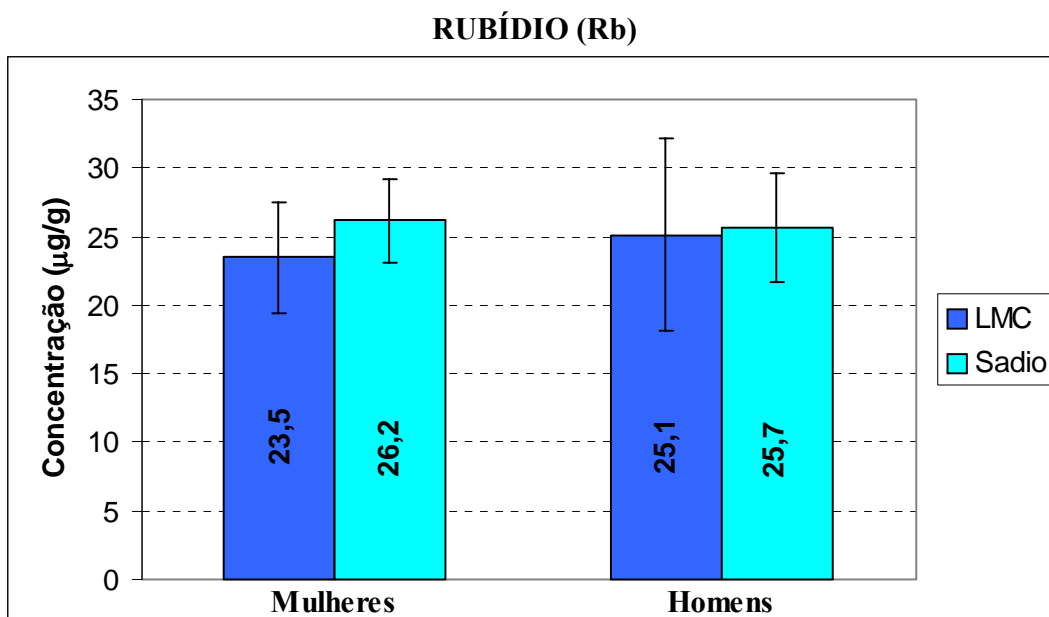


Figura 5.26 – Comparação entre as concentrações de rubídio (em $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$) presentes em sangue de portadores de LMC e sadio de mulheres e homens.

V.9 – Tratamento estatístico dos resultados

Uma análise estatística dos resultados se fez necessária para que fosse possível afirmar ou não se os dois grupos de amostras pertencem a uma mesma população. A ferramenta utilizada para efetuar tal análise foi o teste t de Student.

Este método foi escolhido porque ele é o ideal para se fazer comparações entre médias amostrais oriundos de populações distintas, além de garantir um resultado confiável em caso de amostras pequenas.

O teste t foi aplicado às médias amostrais admitindo duas considerações. Na primeira foram comparadas entre os dois grupos as concentrações totais médias de cada um dos elementos. Na segunda consideração as amostras foram separadas de acordo com o sexo do doador (sadio) ou paciente (LMC) e, só então, as concentrações foram comparadas.

Um dado importante na comparação entre médias quando se utiliza o teste t é o número de componentes (n) de cada grupo. A tabela 5.5 apresenta os valores de n para cada um dos grupos. Os valores analisados podem ser observados na tabela 5.6 e 5.7.

Tabela 5.5 – Número de componentes de cada um dos grupos analisados.

Grupo	Homens	Mulheres
LMC	31	29
SAD	35	25

Tabela 5.6 – Valores de concentração (em $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$) obtidos para cada um dos grupos estudos sua totalidade.

Elemento	SAD	LMC
S	5703±289	6391±338
Cl	6548±805	7302±619
K	7285±1061	8610±967
Fe	2152±65	2172±160
Cu	6,2±0,5	6,4±0,9
Zn	34±5	41±8
Br	4,8±0,9	6±1
Rb	26±4	24±6

Tabela 5.7 – Valores de concentração (em $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$), separados por sexo, obtidos para cada um dos grupos estudados.

Elemento	Grupo	Homens	Mulheres
S	LMC	6404±368	6377±306
	SAD	5700±306	5721±232
Cl	LMC	7171±867	7443±573
	SAD	6498±897	6703±364
K	LMC	8475±1269	8755±431
	SAD	7230±1187	7500±440
Fe	LMC	2159±162	2187±159
	SAD	2154±63	2143±68
Cu	LMC	7±1	6,3±0,8
	SAD	6,2±0,5	6,3±0,5
Zn	LMC	42±10	41±7
	SAD	34±5	32±5
Br	LMC	5±1	6±1
	SAD	4,7±0,8	5±1
Rb	LMC	25±7	23±4
	SAD	26±4	26±3

As comparações realizadas entre as concentrações de cada elemento para os grupos LMC e SAD do mesmo sexo tiveram como base a hipótese nula de que os valores médios eram iguais.

$$H_0 : \mu_1 = \mu_2.$$

A hipótese alternativa testava a desigualdade das médias.

$$H_A : \mu_1 \neq \mu_2.$$

O nível de significância adotado foi igual a 5% ($\alpha = 0,05$).

Uma vez efetuado o teste nessas condições, caso houvesse rejeição da hipótese nula era possível concluir que as amostras eram provenientes de populações diferentes. Em outras palavras, a variação entre os valores de concentração é significativa.

V.9.1 – Teste t de Student para amostras de sangue sadio e com LMC

Inicialmente o teste foi aplicado nas amostras de sangue levando-se em conta apenas a diferença entre os grupos sadio e portadores de LMC. Os resultados do teste para os elementos S, Cl, K, Fe, Cu, Zn, Br e Rb se encontram descritos na tabela 5.8.

Tabela 5.8 – Teste t de Student para amostras de sangue dos grupos sadio e portadores de LMC.

Elemento	t_{calc}	$t_{0,05;gl}$	H_0
S	11,93	1,98	Rejeita
Cl	105,65	1,98	Rejeita
K	7,09	1,98	Rejeita
Fe	1,70	2,00	Aceita
Cu	1,71	1,99	Aceita
Zn	6,14	1,99	Rejeita
Br	3,61	1,99	Rejeita
Rb	1,72	1,99	Aceita

V.9.2 – Teste t de Student para amostras de sangue de homens sadios e portadores de LMC

A tabela 5.9 apresenta os resultados do teste t de Student aplicado às concentrações elementares obtidas para a população masculina de cada um dos grupos estudados.

Tabela 5.9 – Teste t de Student aplicado em amostras de sangue da população masculina dos grupos sadio e portadores de LMC.

Elemento	t_{calc}	$t_{0,05;gl}$	H_0
S	8,59	2,01	Rejeita
Cl	2,80	2,01	Rejeita
K	3,70	2,01	Rejeita
Fe	0,17	2,02	Aceita
Cu	1,66	2,02	Aceita
Zn	5,17	1,96	Rejeita
Br	2,79	1,99	Rejeita
Rb	-0,542	2,02	Aceita

V.9.3 – Teste t de Student para amostras de sangue de mulheres sadias e portadores de LMC

Como última análise o teste t de Student foi aplicado às concentrações elementares do sangue resultante apenas da população feminina dos grupos estudados neste trabalho. Os resultados obtidos com o teste estão apresentados na tabela 5.10.

Tabela 5.10 - Teste t de Student aplicado em amostras de sangue da população feminina dos grupos sadio e portadores de LMC.

Elemento	t_{calc}	$t_{0,05;gl}$	H_0
S	7,44	2,01	Rejeita
Cl	9,52	2,01	Rejeita
K	0,09	2,01	Aceita
Fe	1,59	2,02	Aceita
Cu	-0,01	1,96	Aceita
Zn	5,48	2,01	Rejeita
Br	2,68	2,01	Rejeita
Rb	-2,69	2,01	Rejeita

V.9.4 – Comparação entre os testes t de Student aplicados nas três situações

A tabela 5.11 apresenta uma comparação feita entre os três resultados obtidos anteriormente presentes nas tabelas 5.8, 5.9 e 5.10.

Tabela 5.11 – Comparação entre os resultados do teste t de Student obtidos anteriormente.

Elemento	SAD/LMC	Homens	Mulheres
S	Rejeita	Rejeita	Rejeita
Cl	Rejeita	Rejeita	Rejeita
K	Rejeita	Rejeita	Aceita
Fe	Aceita	Aceita	Aceita
Cu	Aceita	Aceita	Aceita
Zn	Rejeita	Rejeita	Rejeita
Br	Rejeita	Rejeita	Rejeita
Rb	Aceita	Aceita	Rejeita

V.10 – Análise dos resultados

As concentrações de enxofre analisadas em qualquer uma das três situações apresentam diferenças estatisticamente significantes. Na primeira situação, em que os grupos SAD e LMC foram integralmente comparados um com o outro, a diferença é de aproximadamente 11%. A mesma diferença de 11% se manteve na comparação entre as concentrações deste elemento presentes nas amostras da população masculina. E na análise feita para a população feminina a diferença foi de cerca de 10%.

O elemento cloro também apresentou concentrações com diferenças estatisticamente significativas nos três casos analisados. Na primeira análise a diferença foi de cerca de 10%. Quando comparadas as concentrações elementares da população masculina, a diferença entre os do grupo sadio e os do grupo de portadores de LMC foi 9%. No caso da população feminina a diferença foi de 10%.

As diferenças entre as concentrações de potássio nos três métodos de análise foram aproximadamente 15% nas três situações. Nas condições de comparação integral entre os grupos SAD e LMC e de comparação entre as concentrações elementares da população masculina, o teste t apresentou diferenças significativas entre as concentrações dos elementos, resultado que não se repetiu para os cálculos com os resultados da população feminina.

As variações nas concentrações de ferro entre os grupos SAD e LMC, nos três métodos de análise, não foram significativas. Tais variações foram de cerca de 1%.

O elemento cobre também apresentou pouca variação. Na comparação das concentrações totais médias a variação foi de cerca de 2,5%, das concentrações da população masculina, 4%, e da feminina, menor que 1%.

As concentrações de zinco apresentaram grande variação nos três métodos de análise. Na análise da concentração elementar total e na da população masculina a diferença entre os grupos SAD e LMC foi de 19%. Na análise da concentração elementar da população feminina a variação foi de cerca de 21%.

Para as concentrações de bromo, as variações foram iguais a 14% para concentrações elementares totais, 10% para a população masculina e 15% para a feminina. As três comparações apresentaram diferença estatística significativa.

E por fim, as concentrações de rubídio apresentaram variações de 6% para a análise envolvendo concentrações elementares totais, de 10% para análise da população masculina e de 15% para a feminina. Para este elemento a única análise que apresentou diferença estatisticamente significativa foi a comparação entre as concentrações elementares de ambos os grupos (SAD e LMC) para a população feminina.

CAPÍTULO VI

CONCLUSÕES E SUGESTÕES

De uma forma geral foi observado um aumento na concentração dos elementos no grupo dos portadores de leucemia mielóide crônica. Em todas as comparações, mesmo naquelas que não apresentaram significância estatística, pôde se notar um aumento nas concentrações para este grupo. Exceção feita à concentração de rubídio, que apresentou se ligeiramente maior nas amostras do grupo de indivíduos sadios.

Os elementos S, Cl, Zn e Br apresentaram diferenças estatisticamente significativas de suas concentrações elementares nas três situações de análise a que foram submetidas. A maior alteração foi do elemento zinco. Esta apresentou variações de até 21%.

O potássio apresentou variações estatisticamente significativas apenas para a situação que analisou a população masculina. A situação em que se analisam todas as amostras conjuntamente, sem divisão por sexo, também apresentou diferença significativa. Esse efeito pode ter sido causado pelo maior número de amostras provenientes de indivíduos do sexo masculino.

O rubídio apresentou diferença significativa em suas concentrações apenas para a população feminina.

Os elementos Fe e Cu não apresentaram diferenças estatisticamente significativas em nenhuma das situações analisadas.

Usar uma amostra certificada na obtenção da curva de sensibilidade se mostrou como sendo uma boa metodologia. Dentre as vantagens apresentadas por este método está a semelhança entre as amostras analisadas e a certificada. Além disso, por ser composta por diversos elementos, de uma única medida com a amostra certificada é possível traçar a curva e também, por ter as concentrações elementares determinadas por laboratórios que são normalmente citados como padrão de qualidade internacional, medidas obtidas de amostras certificadas apresentam um grau considerável de confiabilidade.

O método adotado para a realização desse estudo se mostrou eficaz. Como já havia sido relatado na literatura, a técnica de EDXRF apresentou boa eficiência na determinação das concentrações dos elementos presentes nas amostras. Preparar as amostras sob forma

de pastilhas provou ser uma boa metodologia, pois se dá de forma simples já que o equipamento necessário para tal é de fácil manuseio, além disso, as amostras sob essa forma são facilmente manuseáveis, o que não acontece quando o sangue se encontra na fase líquida.

Observações e Sugestões

- a) A utilização de um equipamento capaz de produzir raios X mais energéticos ou com anodo de Mo ou Rh permitiria verificar a presença no sangue de elementos de número mais elevado que o rubídio.
- b) A utilização de uma amostragem maior forneceria uma melhor estatística dos resultados.
- c) Estudar melhor a ação no organismo dos elementos encontrados no sangue e ver se as variações de concentração observadas são causadas pela própria doença ou pelo tratamento ao qual os indivíduos são submetidos.
- d) Analisar as amostras levando em conta outros fatores, como o estágio da doença e a idade dos indivíduos.

CAPÍTULO VII

BIBLIOGRAFIA

AKKUS, I., GÜRBİLEK, M., ÇALISKAN, Ü., *et al.*, 1998, “Blood and Fingernail Copper (Cu) and Magnesium (Mg) Levels of Children with Acute Lymphoblastic Leukemia”, *Turkish Journal of Medical Sciences*, v. 28, pp. 155-156.

ANJOS, M.J., 2000, *Análise de Solos Agrícolas por Fluorescência de Raios-X por Dispersão de Energia*, Tese de D.Sc, COPPE/UFRJ, Rio de Janeiro, RJ, Brasil.

ATTIX, F.H., 1986, *Introduction to Radiological Physics and Radiation Dosimetry*, 1ª ed., New York, John Wiley & Sons.

BÁRÁNY, E., BERGDAHL, I.A., BRATTEBY, L.E., *et al.*, 2002, “Trace Element Levels in Whole Blood and Serum from Swedish Adolescents”, *The Science of the Total Environment*, v. 286, pp. 129-141.

CANELLAS, C.G., CARVALHO, S.M.F., DE JESUS, E.F.O., *et al.*, 2006, “Trace and Major Elements in Serum of Patients with Chronic Myelogenous Leukemia”, *Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry*, v. 269, n. 3, pp. 631-634.

CALLEGARI-JACQUES, S.M., 2003, *Bioestatística: princípios e aplicações*, 1ª ed., Porto Alegre, Artmed Editora.

CELIK, H.A., AYDIN, H.H., OZSARAN, A., *et al.*, 2002, “Trace Elements Analysis of Ascitic Fluid in Benign and Malignant Diseases”, *Clinical Biochemistry*, v. 35, pp. 477-481.

CURRIE, L.A., 1968, “Limits of Qualitative Detection and Quantitative Determination”, *Analytical Chemistry*, v. 40, n. 3, pp. 586-593.

- CUSTÓDIO, P.J., CARVALHO, M.L., NUNES, F., *et al.*, 2005, “Direct Analysis of Human Blood (Mothers and Newborns) by Energy Dispersive X-ray Fluorescence”, *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*, v.19, pp. 151-158.
- EISBERG, R., RESNICK, R., 1979, *Física Quântica*, 1ª ed., Rio de Janeiro, Editora Campus.
- EKINCI, R., EKINCI, N., 2004, “An Alternative Method for the Determination of Element Concentrations in Schizophrenic, Lung Cancer and Leukaemia Patient Bloods”, *Journal of Quantitative Spectroscopy and Radiative Transfer*, v.86, pp. 379-385.
- HEITLAND, P., KÖSTER, H., D., 2006, “Biomonitoring of 37 Trace Elements in Blood Samples from Inhabitants of Northern Germany by ICP-MS”, *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*, v.20 pp. 253-262.
- JUNQUEIRA, L.C., CARNEIRO, J., 2004, *Histologia Básica*, 10ª ed., Rio de Janeiro, Editora Guanabara Koogan.
- KNOLL, G.F., 1989, *Radiation Detection and Measurement*, 2ª ed., Singapore, John Wiley & Sons.
- KUMAR, R.A., KENNEDY, V.J., SASIKALA, K., *et al.*, 2002, “Trace Element Analysis of Blood Samples from Mentally Challenged children by PIXE”, *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research B*, v. 190, pp. 449-452.
- LACHANCE, G.R., CLAISSE, F., 1995, *Quantitative X-ray Fluorescence Analysis: theory and application*, 1ª ed., Quebec, John Wiley & Sons.
- LEITÃO, C.C.G., 2005, *Avaliação Multielementar em Soro Humano de Indivíduos Portadores de Leucemia Mielóide Crônica (LMC) Usando SRTXRF*, Dissertação de M.Sc., COPPE/UFRJ, Rio de Janeiro, RJ, Brasil.
- LORENZI, T.F., 1999, *Manual de Hematologia: propedêutica e clínica*, 2ª ed., São Paulo, Editora Medsi.

- MAGALHÃES, T., VON BOHLEN, A., CARVALHO, M.L., *et al.*, 2006, “Trace Elements in Human Cancerous and Healthy Tissues from the Same Individual : A Comparative Study by TXRF and EDXRF”, *Spectrochimica Acta Part B*, v. 61, pp. 1185-1193.
- MANGAL, P.C., SHARMA, P., 1981, “Effect of Leukaemia on the Concentration of Some Trace Elements in Human Whole Blood”, *Indian Journal of Medical Research*, v. 74, October, pp. 559-564.
- MARTINEZ, T., LARTIGUE, J., AVILA-PEREZ, P., *et al.*, 2004, “Determination of Trace Elements in Blood Samples by TXRF Analysis”, *Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry*, v. 259, n. 3, pp. 511-514.
- OLIVEIRA, M.R.A.A., 1991, *Princípios da fisiopatologia: aspectos clínicos e estudo laboratorial*, 1ª ed., São Paulo, Editora Campus.
- RODUSHKIN, I., ÖDMAN, F., BRANTH, S., 1999, “Multielement Analysis of Whole Blood by High Resolution Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry”, *Fresenius Journal of Analytical Chemistry*, v. 364, pp. 338-346.
- SILVERTHORN, D.U., 2003, *Fisiologia Humana: uma abordagem integrada*, 2ª ed., Barueri, Editora Manole.
- STUMP, I.G., CARRTHERS, J., D'AURA, J.M., *et al.*, 1977, “Quantitative Analysis of Trace Elements in Human Blood and Plasma by Energy Dispersive X-ray Fluorescence”, *Clinical Biochemistry*, v. 10, n. 3, pp 127-132.
- TORLBARA, T.Y., JACKSON, D.A., FRENCH, W.R., *et al.*, 1982, “Nondestructive X-ray Fluorescence Spectrometry for Determination of Trace Elements along a Single Strand of Hair”, *Analytical Chemistry*, v. 54, pp. 1844-1849.
- ZAGO, M.A., FALCÃO, R.P., PASQUINI, R., 2001, *Hematologia: fundamentos e prática*, 1ª ed., São Paulo, Editora Atheneu.

APÊNDICE A

Este apêndice contém os valores de energia de algumas das possíveis transições eletrônicas que representam as linhas *K*.

Tabela A.1 – Energias das principais linhas *K*.

Z	Elem.	K_{α1}	K_{α2}	K_{β1}
11	Na	1,04	-	1,067
12	Mg	1,25	-	1,29
13	Al	1,49	1,49	1,55
14	Si	1,74	1,74	1,83
15	P	2,01	2,01	2,14
16	S	2,31	2,31	2,46
17	Cl	2,62	2,62	2,81
18	Ar	2,96	2,96	3,19
19	K	3,31	3,31	3,59
20	Ca	3,69	3,69	4,01
21	Sc	4,09	4,09	4,46
22	Ti	4,51	4,50	4,93
23	V	4,95	4,94	5,43
24	Cr	5,41	5,40	5,95
25	Mn	5,90	5,89	6,49
26	Fe	6,40	6,39	7,06
27	Co	6,93	6,91	7,65
28	Ni	7,48	7,46	8,26
29	Cu	8,05	8,03	8,90
30	Zn	8,64	8,61	9,57
31	Ga	9,25	9,23	10,26
32	Ge	9,88	9,85	10,98
33	As	10,54	10,51	11,72
34	Se	11,22	11,18	12,49
35	Br	11,92	11,88	13,29
36	Kr	12,65	12,60	14,11
37	Rb	13,39	13,34	14,96
38	Sr	14,16	14,10	15,83
39	Y	14,96	14,88	16,74
40	Zr	15,77	15,69	17,67
41	Nb	16,61	16,52	18,62
42	Mo	17,48	17,37	19,61

Z	Elem.	K_{α1}	K_{α2}	K_{β1}
43	Tc	18,41	18,33	20,58
44	Ru	19,28	19,15	21,65
45	Rh	20,21	20,07	22,72
46	Pd	21,17	21,02	23,82
47	Ag	22,16	21,99	24,94
48	Cd	23,17	22,98	26,09
49	In	24,21	24,00	27,27
50	Sn	25,27	25,04	28,48
51	Sb	26,36	26,11	29,72
52	Te	27,47	27,40	30,99
53	I	28,61	28,31	32,29
54	Xe	29,80	29,48	33,64
55	Cs	30,97	30,62	34,98
56	Ba	32,19	31,81	36,38
57	La	33,44	33,03	37,80
58	Ce	34,72	34,28	39,25
59	Pr	36,02	35,55	40,75
60	Nd	37,36	36,84	42,27
61	Pm	38,65	38,16	43,94
62	Sm	40,12	39,52	45,40
63	Eu	41,53	40,88	47,03
64	Gd	42,98	42,28	48,72
65	Tb	44,47	43,74	50,39
66	Dy	45,98	45,19	52,18
67	Ho	47,53	46,69	53,93
68	Er	49,10	48,20	55,69
69	Tm	50,73	49,76	57,58
70	Yb	52,36	51,33	59,35
71	Lu	54,06	52,96	61,28
72	Hf	55,76	54,58	63,21
73	Ta	57,52	56,27	65,21
74	W	59,31	57,97	67,23
75	Re	61,13	59,71	69,30
76	Os	62,99	61,48	71,40
77	Ir	64,89	63,28	73,55
78	Pt	66,82	65,11	75,74
79	Au	68,79	66,98	77,97
80	Hg	70,82	68,89	80,26
81	Tl	72,86	70,82	82,56

Z	Elem.	K_{α1}	K_{α2}	K_{β1}
82	Pb	74,96	72,79	84,92
83	Bi	77,10	74,80	87,33
92	U	98,43	94,65	111,29
95	Am	106,35	101,93	120,16
98	Cf	114,75	109,60	129,54

APÊNDICE B

Este apêndice apresenta os valores dos parâmetros fundamentais utilizados na determinação das concentrações elementares presentes numa determinada amostra.

Tabela B.1 – Valores dos parâmetros fundamentais para as linhas *K*.

Elem.	Z	f_{α}	ω_k	p_{α}
Na	11	0,999	0,021	0,900
Mg	12	0,989	0,026	0,898
Al	13	0,978	0,033	0,897
Si	14	0,966	0,043	0,895
P	15	0,953	0,055	0,894
S	16	0,940	0,071	0,893
Cl	17	0,925	0,089	0,891
Ar	18	0,910	0,109	0,890
K	19	0,894	0,132	0,888
Ca	20	0,883	0,147	0,887
Sc	21	0,882	0,183	0,886
Ti	22	0,882	0,218	0,884
V	23	0,881	0,253	0,883
Cr	24	0,880	0,286	0,881
Mn	25	0,880	0,319	0,880
Fe	26	0,879	0,351	0,879
Co	27	0,878	0,382	0,877
Ni	28	0,878	0,412	0,876
Cu	29	0,877	0,441	0,874
Zn	30	0,875	0,469	0,873
Ga	31	0,871	0,497	0,872
Ge	32	0,868	0,523	0,870
As	33	0,864	0,549	0,869
Se	34	0,860	0,574	0,867
Br	35	0,857	0,598	0,866
Kr	36	0,853	0,621	0,865
Rb	37	0,850	0,643	0,863
Sr	38	0,847	0,665	0,862
Y	39	0,844	0,685	0,860
Zr	40	0,841	0,705	0,859
Nb	41	0,838	0,724	0,858
Mo	42	0,835	0,742	0,856

Elem.	Z	F_{K-L}	ω_k	P_{K-L}
Tc	43	0,832	0,760	0,855
Ru	44	0,830	0,776	0,853
Rh	45	0,827	0,792	0,852
Pd	46	0,825	0,807	0,851
Ag	47	0,822	0,822	0,849
Cd	48	0,820	0,836	0,848
In	49	0,818	0,849	0,846
Sn	50	0,816	0,861	0,845
Sb	51	0,814	0,872	0,844
Te	52	0,812	0,883	0,842
I	53	0,810	0,893	0,841
Xe	54	0,809	0,903	0,839
Cs	55	0,807	0,912	0,838
Ba	56	0,806	0,920	0,837
La	57	0,804	0,928	0,835
Ce	58	0,803	0,935	0,834
Pr	59	0,802	0,941	0,832
Nd	60	0,801	0,947	0,831

APÊNDICE C

Questionário apresentado aos voluntários que cederam amostras de sangue para a realização desta pesquisa.

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

Nome do doador/paciente:

Idade:

Região onde mora (bairro e cidade):

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

Declaro que as respostas acima são verdadeiras.

Rio, ___/___/___

Assinatura do paciente