



AUTARQUIA ASSOCIADA À UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

Determinação de elementos químicos inorgânicos em amostras de sangue total humano e de animais de experimentação (hamster dourado e cavalo da raça crioula) pela técnica de fluorescência de raios X (EDXRF)

Marcelo Miyada Redígolo

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do Grau de Mestre em Ciências na Área de Tecnologia Nuclear - Materiais

Orientadora:
Profa. Dra. Ivone Mulako Sato

São Paulo
2011

INSTITUTO DE PESQUISAS ENERGÉTICAS E NUCLEARES
Autarquia associada à Universidade de São Paulo

**DETERMINAÇÃO DE ELEMENTOS QUÍMICOS INORGÂNICOS EM
AMOSTRAS DE SANGUE TOTAL HUMANO E DE ANIMAIS DE
EXPERIMENTAÇÃO (HAMSTER DOURADO E CAVALO DA RAÇA CRIOULA)
PELA TÉCNICA DE FLUORESCÊNCIA DE RAIOS X (EDXRF)**

MARCELO MIYADA REDÍGOLO

Dissertação apresentada
como parte dos requisitos
para obtenção do grau de
Mestre em Ciências na área
de Tecnologia Nuclear –
Materiais.

Orientadora: Profa. Dra.
Ivone Mulako Sato

SÃO PAULO
2011

AGRADECIMENTOS

À Professora Doutora Ivone Mulako Sato pela amizade e dedicação durante todo o período que compreendeu a realização deste trabalho e pela orientação nessa longa fase de amadurecimento pessoal e profissional.

Ao Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares pelo apoio institucional.

À Professora Doutora Cibele Bugno Zamboni e seu grupo de pesquisa pela colaboração e por ter cedido as amostras analisadas neste trabalho.

Ao Professor Doutor Marcos Antonio Scapin pela ajuda e dedicação inestimáveis durante todo o período no qual realizei trabalhos junto ao Laboratório de Fluorescência de Raios X, CQMA – IPEN/CNEN, SP.

À Professora Doutora Vera Lúcia Ribeiro Salvador pela ajuda e pelo incentivo desde o curso de Graduação.

Aos funcionários da biblioteca “Terezine Arantes Ferraz” por serem sempre muito solícitos e gentis.

Aos meus pais por sempre incentivarem meu desenvolvimento acadêmico e profissional, pela dedicação e amor incondicionais.

À minha namorada Doutora Jacqueline Salotti pelo companheirismo, carinho e amor durante toda essa difícil jornada.

Ao grande amigo Thiago Assan Piwowarczyk pelo companheirismo durante o árduo período da graduação no Instituto de Química da USP.

DETERMINAÇÃO DE ELEMENTOS QUÍMICOS INORGÂNICOS EM AMOSTRAS DE SANGUE TOTAL HUMANO E ANIMAL UTILIZANDO A TÉCNICA DE FLUORESCÊNCIA DE RAIOS X (EDXRF)

Marcelo Miyada Redígolo

RESUMO

O sangue é uma suspensão de células contidas num líquido complexo chamado plasma. O termo “sangue total” refere-se a amostras de sangue com a totalidade de seus constituintes, parte sólida e líquida. Sendo os elementos químicos responsáveis por funções essenciais, como regulação osmótica, frequência cardíaca e contratilidade, coagulação sanguínea e excitabilidade neuromuscular. A determinação de elementos químicos em fluidos corporais como sangue, soro, plasma, tecido e urina é usada como monitor de parte ou de todo o organismo.

Nesse trabalho, utilizou-se a técnica de fluorescência de raios X (EDXRF) para análise de amostras de sangue total humano e animal, *hamsters* da espécie dourada (*Mesocricetus auratus*) e cavalos da raça crioula (*Equus caballus*). Nas amostras de sangue humano, foram determinados intervalos de referência de Na (1788 – 1826 $\mu\text{g g}^{-1}$), Mg (63 – 75 $\mu\text{g g}^{-1}$), P (602 – 676 $\mu\text{g g}^{-1}$), S (1519 – 1718 $\mu\text{g g}^{-1}$), Cl (2743 – 2867 $\mu\text{g g}^{-1}$), K (1508 – 1630 $\mu\text{g g}^{-1}$), Ca (214 – 228 $\mu\text{g g}^{-1}$), Cu (4 -6 $\mu\text{g g}^{-1}$) e Zn (1 – 3 $\mu\text{g g}^{-1}$). Foram determinados intervalos de referência de Na (1714 – 1819 $\mu\text{g g}^{-1}$), Mg (51 – 79 $\mu\text{g g}^{-1}$), P (970 – 1080 $\mu\text{g g}^{-1}$), S (1231 – 1739 $\mu\text{g g}^{-1}$), Cl (2775 – 2865 $\mu\text{g g}^{-1}$), K (1968 – 2248 $\mu\text{g g}^{-1}$), Ca (209 – 257 $\mu\text{g g}^{-1}$), Cu (4 – 6 $\mu\text{g g}^{-1}$) e Zn (3 -5 $\mu\text{g g}^{-1}$) para amostras de sangue de *hamster* dourado. As amostras de sangue de cavalo da raça crioula apresentaram os intervalos de: Na (1955 – 2013 $\mu\text{g g}^{-1}$), Mg (51 – 75 $\mu\text{g g}^{-1}$), P (443 – 476 $\mu\text{g g}^{-1}$), S (1038 – 1140 $\mu\text{g g}^{-1}$), Cl (2388 – 2574 $\mu\text{g g}^{-1}$), K (1678 – 1753 $\mu\text{g g}^{-1}$), Ca (202 – 213 $\mu\text{g g}^{-1}$), Cu (4,1 – 4,5 $\mu\text{g g}^{-1}$) e Zn (2,0 – 2,2 $\mu\text{g g}^{-1}$).

Estudo comparativo dos resultados entre as técnicas de análise por ativação neutrônica (NAA) e EDXRF indica a igualdade de desempenho das técnicas analíticas na análise de matrizes biológicas. Os resultados contribuem no estabelecimento de intervalos de referência para a população brasileira saudável e para as referidas espécies de animais.

INORGANIC ELEMENTS DETERMINATION IN HUMAN AND ANIMAL WHOLE BLOOD SAMPLES BY X-RAY FLUORESCENCE TECHNIQUE (EDXRF)

Marcelo Miyada Redígolo

ABSTRACT

Blood is a suspension of cells contained in a complex liquid called plasma. The term “whole blood” refers to samples with both solid and liquid parts. Inorganic elements are responsible for essential functions, such as osmotic regulation, cardiac frequency and contractibility, blood clotting and neuromuscular excitability. The determination of inorganic elements in corporeal fluids such as blood, serum, plasma, tissue and urine is used as a monitor for a part or the whole organism.

In this work, the X-Ray fluorescence technique (EDXRF) was used for the determination of inorganic elements in whole blood samples from humans and animals (golden hamsters, *Mesocricetus auratus* and crioula breed horses, *Equus caballus*). The reference intervals of Na ($1788 - 1826 \mu\text{g g}^{-1}$), Mg ($63 - 75 \mu\text{g g}^{-1}$), P ($602 - 676 \mu\text{g g}^{-1}$), S ($1519 - 1718 \mu\text{g g}^{-1}$), Cl ($2743 - 2867 \mu\text{g g}^{-1}$), K ($1508 - 1630 \mu\text{g g}^{-1}$), Ca ($214 - 228 \mu\text{g g}^{-1}$), Cu ($4 - 6 \mu\text{g g}^{-1}$) e Zn ($1 - 3 \mu\text{g g}^{-1}$) were determined for human blood. The reference intervals, for golden hamster blood were found to be: Na ($1714 - 1819 \mu\text{g g}^{-1}$), Mg ($51 - 79 \mu\text{g g}^{-1}$), P ($970 - 1080 \mu\text{g g}^{-1}$), S ($1231 - 1739 \mu\text{g g}^{-1}$), Cl ($2775 - 2865 \mu\text{g g}^{-1}$), K ($1968 - 2248 \mu\text{g g}^{-1}$), Ca ($209 - 257 \mu\text{g g}^{-1}$), Cu ($4 - 6 \mu\text{g g}^{-1}$) e Zn ($3 - 5 \mu\text{g g}^{-1}$). The reference intervals, for crioula breed horse blood, showed to be: Na ($1955 - 2013 \mu\text{g g}^{-1}$), Mg ($51 - 75 \mu\text{g g}^{-1}$), P ($443 - 476 \mu\text{g g}^{-1}$), S ($1038 - 1140 \mu\text{g g}^{-1}$), Cl ($2388 - 2574 \mu\text{g g}^{-1}$), K ($1678 - 1753 \mu\text{g g}^{-1}$), Ca ($202 - 213 \mu\text{g g}^{-1}$), Cu ($4,1 - 4,5 \mu\text{g g}^{-1}$) e Zn ($2,0 - 2,2 \mu\text{g g}^{-1}$).

Comparative study between NAA and EDXRF, both techniques showed the same performance for the analyses of biological matrices. The results contribute for the establishment of reference intervals for the Brazilian healthy population and the referred animal species.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	12
Sangue humano	12
Sangue animal	14
Técnicas analíticas utilizadas na análise de sangue	16
Intervalos de referência	17
2. OBJETIVO GERAL	20
2.1. Objetivos específicos	20
3. REVISÃO DA LITERATURA	21
4. CONSIDERAÇÕES TEÓRICAS	24
4.1. Espectrometria de fluorescência de raios X	24
4.1.1 Fenômeno	24
4.1.2 Espectrômetros comerciais	26
4.1.4 Incerteza de medição	29
4.1.5 Métodos de análise	30
4.2 Tratamentos estatísticos	34
4.2.1 Avaliação do método	34
Eliminação de valores dispersos	34
Incerteza de medição	34
Desvio padrão relativo	35
Teste <i>Z-score</i>	35
Limite de quantificação	36
4.2.2 Comparação de resultados das técnicas EDXRF e NAA	37
Teste F	37
Teste t de <i>Student</i> , para variâncias amostrais diferentes	37
Teste t de <i>Student</i> , para variâncias amostrais iguais	38
5. MATERIAIS E MÉTODOS	39
5.1. Coleta e preparo de amostras de sangue total humano	39
5.2. Coleta e preparo de amostras de sangue total animal	41
5.3. Condições experimentais de medida do espectrômetro de fluorescência de raios X	43
5.5. Avaliação do método de análise	44
5.6. Comparação dos resultados das técnicas analíticas EDXRF e NAA	45

6. RESULTADOS E DISCUSSÃO	47
6.1. Avaliação do método de análise	47
6.2. Análise de sangue total humano	49
6.2. Análise de sangue total de <i>hamster</i> dourado, <i>Mesocricetus auratus</i>	53
6.3. Análise de sangue total de cavalo da raça crioula, <i>Equus caballus</i>	55
7. CONCLUSÕES	57

ANEXOS E APÊNDICES

ANEXO A – Coeficiente de sensibilidade experimental para as linhas de emissão características	58
ANEXO B – Curva de sensibilidade experimental	59
APÊNDICE A - Correspondência entre a nomenclatura Siegbahn e IUPAC das radiações características de emissão	60
APÊNDICE B – Material de referência certificado NIST 1577c - Bovine liver	61
APÊNDICE C – Material de referência certificado IAEA-A-13 – Animal blood	62
APÊNDICE D – Valores críticos e critérios para cálculo do Teste Q de <i>Dixon</i>	63
Referências bibliográficas	64

LISTA DE TABELAS

TABELA 1.1 – Classificação de elementos traços e ultratraços.....	13
TABELA 1.2 – Associação de elementos químicos com a doença em fluidos biológicos	14
TABELA 1.3 – Comparação de técnicas analíticas na determinação de elementos inorgânicos no sangue e soro	16
TABELA 4.1 – Abreviações e símbolos nas equações do cálculo da intensidade teórica.....	32
TABELA 5.1 – Parâmetros instrumentais de medida do espectrômetro EDXRF	44
TABELA 6.1 – Dados do CRM IAEA-A-13.....	47
TABELA 6.2 – Análise de sangue total humano. Volume de deposição: 100 μL , $\mu\text{g g}^{-1}$	49
TABELA 6.3 – Comparação de resultados de sangue total humano. Volume de deposição: 100 μL , $\mu\text{g g}^{-1}$	50
TABELA 6.4 – Análise de sangue total humano. Volume de deposição: 25 μL , $\mu\text{g g}^{-1}$	51
TABELA 6.5 – Intervalos de referência para deposições de 25 μL e 100 μL , $\mu\text{g g}^{-1}$	52
TABELA 6.6 – Análise de sangue total de <i>hamster</i> dourado (<i>Mesocricetus auratus</i>). Volume de deposição: 100 μL , $\mu\text{g g}^{-1}$	53
TABELA 6.7 – Comparação de resultados de sangue total de <i>hamster</i> dourado (<i>Mesocricetus auratus</i>), $\mu\text{g g}^{-1}$	54
TABELA 6.8 – Análise de sangue total de cavalo da raça crioula (<i>Equus caballus</i>), $\mu\text{g g}^{-1}$. Volume de deposição: 100 μL , $\mu\text{g g}^{-1}$	55
TABELA 6.9 – Comparação de resultados de sangue total de cavalo da raça crioula (<i>Equus caballus</i>), $\mu\text{g g}^{-1}$	56

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 4.1 – Processo de absorção fotoelétrica	24
FIGURA 4.2 – Transições eletrônicas de um elemento químico	25
FIGURA 4.3 – Composição básica do espectrômetro de dispersão de comprimento de onda, WDXRF.....	27
FIGURA 4.4 – Composição básica do espectrômetro de dispersão de energia, EDXRF	27
FIGURA 4.5 – Excitação primária e secundária em amostra espessa.....	33
FIGURA 5.1 – Fluxograma de execução das análises de sangue total humano e de animais de experimentação.....	39
FIGURA 5.2 - Amostra de sangue total humano (volume de deposição de 100 µL).....	40
FIGURA 5.3 – Amostra de sangue total humano (volume de deposição de 25 µL)	41
FIGURA 5.4 – <i>Hamster</i> dourado (<i>Mesocricetus auratus</i>)	42
FIGURA 5.5 – Amostra de sangue total animal.....	42
FIGURA 5.6 – Cavalo da raça crioula (<i>Equus caballus</i>)	43
FIGURA 5.7 – Espectrômetro EDXRF, da Shimadzu Co. modelo Rayny 720.....	43
FIGURA 5.8 – MRC IAEA-A-13 <i>Animal Blood</i>	45
FIGURA 6.1 – Valores do teste <i>Z-score</i> para o MRC IAEA-A-13	48
FIGURA 6.2 – Comparação dos resultados das técnicas EDXRF e NAA para amostras de sangue total humano. Volume de deposição: 100 µL	50
FIGURA 6.3 – Comparação dos resultados de amostras de sangue total humano (volumes de deposição: 100 µL e 25 µL)	52
FIGURA 6.4 – Comparação dos resultados das técnicas EDXRF e NAA para amostras de sangue total de <i>hamster</i> dourado (<i>Mesocricetus auratus</i>)	54
FIGURA 6.5 – Comparação dos resultados das técnicas EDXRF e NAA para amostras de sangue total de cavalo da raça crioula (<i>Equus caballus</i>)	56
FIGURA B – Curva de sensibilidade experimental	59

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

Símbolo/Abreviação	Denominação
AAS	Espectrometria de absorção atômica
ADCP	Ácido pirrolidina ditiocarbamato de amônio
ATP	Adenosina trifosfato
ATPase	Adenosina trifosfatase
CRCN	Centro Regional de Ciências Nucleares
DPR%	Desvio padrão relativo percentual
EDXRF	Espectrometria de fluorescência de raios X por dispersão de energia
FAAS	Espectrometria de absorção atômica de chama
FPC	Detector proporcional com fluxo de gás
GSR	<i>Gunshot residue</i> , resíduo de arma de fogo
HEMOPE	Fundação de Hematologia e Hemoterapia de Pernambuco
HPLC	Cromatografia líquida de alta eficiência
IAEA	Agência Internacional de Energia Atômica
IBu	Instituto Butantan
ICP-MS	Espectrometria de massa com plasma indutivamente acoplado
IFUSP	Instituto de Física da Universidade de São Paulo
IPEN	Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares
ISE	Eletrodo íon seletivo
LQ	Límite de quantificação
MIBK	Metilisobutilcetona
CRM	Material de referência certificado
NAA	Análise por ativação neutrônica
NIST	Instituto Nacional de Padrões e Tecnologia
OSHA	<i>Occupational Safety and Health Administration</i>
PIXE	Emissão de raios X induzida por partículas
PTFE	Politetrafluoretileno

Símbolo/Abreviação	Denominação
SRXRF	Espectrometria de fluorescência de raios X de radiação síncrotron
TXRF	Espectrometria de fluorescência de raios X de dispersão total
u	Incerteza de medição expandida
UFPE	Universidade Federal de Pernambuco
UNIFESP	Universidade Federal de São Paulo
UNISA	Universidade Santo Amaro
WDXRF	Espectrometria de fluorescência de raios X de dispersão de comprimento de onda
XRF	Espectrometria de fluorescência de raios X
μXRF	Espectrometria de micro fluorescência de raios X

1. INTRODUÇÃO

Sangue humano

O sangue é uma suspensão de células, como glóbulos brancos, vermelhos e plaquetas, contidas num líquido complexo chamado plasma, constituído por água, sais minerais, vitaminas, proteínas, glicídios e lipídios (Verrasto, 1998). Portanto, ele é formado, majoritariamente, por compostos orgânicos e, minoritariamente, por elementos químicos inorgânicos. É possível separar a parte sólida da parte líquida pelo processo de centrifugação e, dessa forma, obtém-se o soro. O termo “sangue total” refere-se a amostras de sangue com a totalidade de seus constituintes, ou seja, parte sólida e líquida.

Na Química Clínica, os elementos químicos inorgânicos presentes em maior concentração são denominados “eletrólitos”. Estes são responsáveis por diversas funções como: regulação osmótica (Na^+ , Cl^- , K^+), frequência cardíaca e contratilidade (K^+ , Mg^{2+} , Ca^{2+}), cofatores em ativação enzimática (Mg^{2+} , Ca^{2+}), regulação da bomba de íons da ATPase (Mg^{2+}), sinalização das vias de câncer (Ca^{2+}), coagulação sanguínea (Ca^{2+} , Mg^{2+}), excitabilidade neuromuscular (K^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+}) e produção e uso do ATP da glicose (Mg^{2+} , PO_4^{3-}). Elementos químicos presentes em menor concentração são denominados elementos traços (presentes na faixa de concentração de miligramas, mg kg^{-1}) e “ultra-traços” (presentes na faixa de concentração de microgramas, $\mu\text{g kg}^{-1}$). A TAB.1.1 mostra a classificação dos elementos traços e ultra-traços em três categorias: essenciais, potencialmente essenciais e não essenciais até o momento. Destes, apenas o primeiro grupo foi alvo de estudo neste trabalho. Sua relevância é observada pelas funções que desempenham no organismo como respiração e processos de oxidação (Fe), desenvolvimento ósseo, síntese de hemoglobina (Zn), metabolismo do colesterol e fosforilação oxidativa (Mn) (Bishop, 2005).

TABELA 1.1 – Classificação de elementos traços e ultratraços (Bishop, 2005)

Elemento	Essenciais	Potencialmente essenciais	Não essenciais até o momento
Traço	Fe, Zn e Cu	-	-
Ultratraço	Mn, Co, Se, Mo, Cr, Sr e I	Ni, V e Sn	Al, Ar, Cd, F, Au, Pb, Hg e Si

Sendo os elementos químicos responsáveis por funções essenciais, como as citadas acima, sua determinação em fluidos corporais como sangue, soro, plasma, tecido e urina são usados como monitores de parte ou de todo o organismo humano. A alteração na concentração destes elementos pode conduzir a um desempenho deficiente do organismo, indicando a presença de diversas doenças. Na TAB.1.2 é mostrada, de forma sintética, a associação dos elementos químicos com a doença, diagnóstico, avaliação de contaminação e correlação com as doenças para diferentes fluidos corporais.

Algumas doenças, citadas na TAB.1.2, já estão estabelecidas na literatura médica, como natremia, calemia, cloremia (que representam a deficiência específica de um elemento químico), doenças cognitivas e cardiovasculares (causadas pela exposição ao chumbo), anemia (pela falta de ferro) e contaminação por metais pesados (causadas pela exposição a mercúrio, cromo, alumínio e cobre). Outras doenças encontram-se ainda em fase de estudos e não estão estabelecidas na literatura médica, mas indicam que alguns tipos de tumores podem ser diagnosticados pela alteração das relações de concentração de zinco/cobre e ferro/cobre; alterações na concentração de zinco podem afetar a saúde do feto; processos de envelhecimento podem ser indicados por alterações nas relações de concentração de cobre/estrôncio e ferro/cobre.

Na área de epidemiologia, por exemplo, há trabalhos envolvendo a exposição de chumbo. Além da identificação de sequelas e doenças, existe uma proposta do Ministério da Saúde e Segurança Ocupacional dos Estados Unidos da América, OSHA, de utilização de Pb como biomarcador nos exames clínicos e de saúde pública ocupacional (Schwartz e Hu, 2007).

TABELA 1.2 - Associação de elementos químicos com a doença em fluidos biológicos
(Taylor, 2010 ; West, 2009 ; Bishop, 2005)

Elemento	Sangue	Soro	Osso	Tecido	Doença/Diagnóstico/ Contaminação
Na		X			Hiper, hiponatremia
K		X			Hiper, hipocalemia
Cl		X			Hiper, hipocloremia
Mg		X			Hiper, hipomagnesemia
Ca		X			Hiper, hipocalcemia
P		X			Hiper, hipofosfatemia
Fe	X	X	-	-	Anemia
Zn	-	X	-	-	Câncer/Saúde do feto
Pb	X	-	-	-	Doenças cognitivas/ cardiovasculares
Cr	X	-	-	-	Exposição ocupacional
Zn/Cu	-	X	-	-	Câncer
Fe/Cu	-	X	-	-	Câncer
Cu	-	-	-	X	Exposição ocupacional
Al	-	-	-	X	Contaminação
Hg	-	-	-	X	Contaminação
Cu/Sr	-	-	X	X	Processos de envelhecimento
Fe/Cu	-	-	X	X	Processos de envelhecimento

Sangue animal

Animais de laboratório são comumente utilizados como modelo biomédico para o estudo de diversas doenças e de disfunções cognitivas. A importância da determinação dos elementos químicos inorgânicos no sangue animal é apresentada nos trabalhos de Frisk (2007) e Teng (2008), onde os elementos traços são monitorados em camundongos durante uma infecção viral e sob estresse agudo por confinamento, respectivamente.

Para a avaliação de patologia clínica de camundongos, é recomendada a análise de parâmetros como glicose, ureia, proteína total e elementos inorgânicos. A coleta de sangue de camundongos é difícil devido ao pequeno volume de amostra que pode ser obtido de um espécime, que, invariavelmente, é sacrificado no processo de coleta. Por

isso, uma observação a longo prazo requer um grande número de cobaias, inviabilizando alguns estudos. Os elementos químicos inorgânicos são usualmente analisados no soro com equipamento denominado imunoanalisador químico, que quantifica sódio, cloro e potássio (Wiedmeyer, 2007).

De acordo com a Organização Mundial de Saúde, 5 milhões de pessoas são picadas por cobras anualmente, sendo que metade dos casos resulta em envenenamento. A mortalidade relacionada a acidentes ofídicos é de 100.000/ano; entretanto, o número de vítimas com sequelas permanentes e/ou amputações é, no mínimo, três vezes maior (*World Health Organization*, 2010a, 2010b). No estado de São Paulo, a Secretaria Estadual de Saúde contabilizou 14.601 acidentes ofídicos no ano de 2010, o que indica um aumento de 112% em relação ao ano de 2000 (Boletim Fapesp, 2011). Diferentemente de outras moléstias, há nesse caso um tratamento rápido e eficaz, com a utilização de soros hiperimunes ou imunoglobulinas antiofídicas. Na prevenção de mortes e/ou amputações causadas por acidentes ofídicos, a produção de soros hiperimunes é essencial para uma boa política de Saúde Pública. Soros hiperimunes constam da “lista de medicamentos essenciais” da Organização Mundial de Saúde.

A produção de soros envolve o fracionamento do plasma obtido de animais de grande porte, majoritariamente cavalos, imunizados contra o veneno de animais peçonhentos. Quando o soro é injetado no paciente, este é capaz de neutralizar o veneno (Fundação Nacional da Saúde, 2001). A saúde dos animais empregados na produção de soros é essencial. A alteração nas concentrações de alguns elementos inorgânicos no sangue podem causar distúrbios como diminuição do peso e do crescimento (Na, P, K e Zn), perda de pelos (P e Zn), fadiga (K e Se), claudicação (P e Ca) e tremores musculares e convulsões (Mg) (Lewis, 2000).

Técnicas analíticas utilizadas na análise de sangue

As técnicas instrumentais de análise mais utilizadas ou propostas, para exames bioclínicos humanos e veterinários, são as de espectrometria de absorção atômica (AAS), cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), eletrodo íon-seletivo (ISE) e colorimetria (Bain, 2007).

Mais recentemente, técnicas de análise nuclear, como análise por ativação neutrônica (NAA) e espectrometria de fluorescência de raios X (XRF) têm-se mostrado de grande interesse, por apresentar vantagens principalmente em relação às características como realização de análise multielementar, rapidez e requerimento de pequenas quantidades de amostras de fluidos biológicos para a determinação de elementos químicos (Oliveira, 2005; Redígolo, 2008, no prelo).

Na TAB.1.3, são apresentadas técnicas analíticas nucleares (XRF e NAA) e convencionais (ISE, FAAS, colorimetria) utilizadas em análises clínicas. As técnicas são comparadas quanto ao volume de sangue requerido, matriz, tempo total de análise e tipo de análise. O tempo total de análise compreende a coleta e preparo da amostra, análise e emissão de dados para uma única amostra.

TABELA 1.3 – Comparação de técnicas analíticas na determinação de elementos inorgânicos no sangue e soro

Técnica analítica	Volume de sangue total	Matriz	Tempo total de análise	Tipo de análise
XRF	0,1 mL	Sangue total	40 minutos	Multielementar
NAA	0,1 mL	Sangue total	40 minutos	Multielementar
ISE	2 mL	Sangue total	90 minutos	Monoelementar
FAAS	10 mL	Soro	90 minutos	Monoelementar
Colorimetria	10 mL	Soro	1 dia	Monoelementar

É possível observar, na TAB.1.3, que as técnicas de análise nuclear requerem um pequeno volume de sangue total e curto tempo de análise, em relação às outras técnicas analíticas usuais na determinação de elementos inorgânicos em amostras de sangue.

Ainda, as técnicas como FAAS e colorimetria utilizam o soro como matriz de análise no lugar de sangue total. O soro é obtido pela centrifugação do sangue após a coagulação. Dessa forma, utiliza-se a parte líquida do sangue e despreza-se a parte sólida, que pode conter elementos químicos relevantes. O uso de sangue total como matriz apresenta duas vantagens principais como: não há perda de material (menor volume de sangue a ser coletado) e não necessita uso de reagentes químicos para a análise (mais econômico). Estes fatores são relevantes do ponto de vista sanitário e ambiental, principalmente no caso de material infectante.

Na Química Clínica, a coleta de sangue arterial como alternativa à coleta sangue venoso periférico auxilia na análise de sangue, por exemplo, das crianças de baixo peso, das acometidas por doenças e recém-nascidos, por diminuir o volume de sangue a ser coletado. Na Medicina Veterinária, a coleta sangue total em menor volume, de animais de laboratório ou de pequeno porte, possibilita a utilização do mesmo indivíduo para um estudo de longa duração, evitando-se seu sacrifício; e para animais de grande porte, como cavalos, a coleta de pequenos volumes de sangue diminui o estresse do animal, simplificando a operação.

Intervalos de referência

De acordo com Bain (2007), a interpretação do resultado de qualquer exame laboratorial requer que se avalie se tal resultado é normal ou não. “Valor normal” significa que o resultado obtido é o esperado em um determinado indivíduo quando este está em perfeito estado de saúde. Como raramente se dispõe de dados para essa afirmativa, costuma-se, em vez disso, considerar se o resultado é o esperado de um indivíduo sadio, biologicamente tão parecido quanto possível com o indivíduo em questão. Os resultados de exames eram convencionalmente comparados com “valores normais”, em geral obtidos de livros especializados, mas, estes sem a comprovação adequada. Mais recentemente, os resultados de exames são comparados com “valores de referência”. Um indivíduo selecionado, segundo critérios definidos, que se encontra dentro de uma população de todos os indivíduos e atende estes critérios, é considerado

indivíduo de referência. Valores de referência são resultados de exames feitos em indivíduos de referência. Quando analisados e descritos estatisticamente, tais valores incidem dentro de certos limites e apresentam distribuição com média, mediana e moda decorrentes. O conjunto de valores de referência é geralmente descrito como limite de referência, excluindo 2,5% dos valores em cada extremo da distribuição normal observada, definindo o intervalo de referência. A precisão de concordância entre o intervalo da amostra e o intervalo da população pode ser representada pelos limites de confiança da média e de cada um dos dois limites de referência.

Na avaliação clínica, é recomendado utilizar intervalos de referência da população da qual o indivíduo analisado faz parte, sendo relevante, em alguns casos, criar intervalos de referência ainda mais específicos, separados por idade, sexo, hábitos alimentares etc.

No Brasil, não há intervalos de referência estabelecidos para a população saudável, geralmente, a avaliação clínica é realizada utilizando-se parâmetros internacionais.

Nos últimos anos, o emprego de vários métodos analíticos tem contribuído para elaboração de um banco de dados sobre intervalos de referência em sangue total e soro. O projeto “Determinação de íons e metais em amostras biológicas via metodologia nuclear: obtenção dos valores de referência para população brasileira”, em andamento no Laboratório de Espectroscopia e Espectrometria das Radiações (LEER-IPEN), tem colaboração com Bancos de Sangue e Laboratórios Hematológicos de diferentes regiões do Brasil; e o resultado apresenta as primeiras estimativas para os valores de referência em sangue total e soro para população brasileira saudável. Fazem parte deste projeto entidades como UNISA (SP), CRCN (PE), o IBu (SP), UNIFESP (SP), e HEMOPE (PE).

A comparação dos resultados com outros métodos analíticos, visando consolidar os resultados já obtidos, é de grande relevância. Neste sentido, estão em andamento, os usos das técnicas de PIXE (parceira com IFUSP), AAS e ICP-MS

(parceria com CRCN e com o Hospital das Clínicas do Setor de Nefrologia da UFPE) e EDXRF (parceria com o Laboratório de Fluorescência de Raios-X, CQMA/IPEN).

Os resultados obtidos foram apresentados nos trabalhos como o de Oliveira (2005, 2008), Oliveira e Zamboni (2005), Kovacs (2008) e Redígolo (2008).

Na área de Medicina Veterinária, os valores de intervalos de referência para animais de experimentação são escassos na literatura e, no caso de algumas linhagens de roedores e cavalos, são inexistentes. Estes valores de referência são de grande importância para o controle da saúde dos animais durante o experimento.

O projeto CNPQ Universal “Avaliação bioquímica do tecido sanguíneo de camundongos distróficos utilizando a técnica de análise por ativação com nêutrons: novo enfoque para o acompanhamento clínico” (Nº de Processo: 473203/2009-0, em andamento no LEER-IPEN) tem a finalidade de estabelecer valores de intervalos de referência de *hamster* dourado (*Mesocricetus auratus*). Nesta área, foram realizados trabalhos como o de Zamboni (2007, 2009), Aguiar (2009), Redígolo (2010) e Baptista (2011).

2. OBJETIVO GERAL

O objetivo desse trabalho é estabelecer um método de análise de determinação de elementos químicos inorgânicos (Na, Mg, P, S, Cl, K, Ca, Cu e Zn), em amostras de sangue total humano e de animais de experimentação, utilizando a técnica de fluorescência de raios X de dispersão de energia (EDXRF).

2.1. Objetivos específicos

- Avaliar o método de Parâmetros Fundamentais, em relação a precisão, exatidão e limite de quantificação, utilizando materiais de referência certificados;
- Avaliar a sensibilidade da técnica EDXRF para diferentes volumes de deposição (100 e 25 μL) de amostras de sangue total;
- Realizar um estudo comparativo de resultados entre as técnicas de EDXRF e NAA, para amostras de sangue total humano e de animais de experimentação (*hamster* dourado (*Mesocricetus auratus*) e cavalo da raça crioula (*Equus caballus*)).

3. REVISÃO DA LITERATURA

O emprego da técnica de fluorescência de raios X teve o seu início nas décadas de 50 e 60 na determinação da composição química de ligas metálicas convencionais como aços inoxidáveis e ligas de Ni. Nas décadas seguintes, a técnica foi aplicada, principalmente, para as análises de ligas refratárias e de difícil separação química como Zr-Hf, Nb-Tl, Mo-W e outras (Müller, 1972). Mais recentemente, ela tem sido muito utilizada em pesquisa e desenvolvimento e caracterização química nas áreas de engenharia dos materiais (ligas metálicas e aços especiais, supercondutores, medida de espessura de filmes finos metálicos, biomateriais), geologia (minerais, rochas, minérios), meio ambiente (solos, efluentes líquidos e sólidos, sedimentos, plantas bioindicadoras de poluição metálica e aerossóis), forense (resíduo de arma de fogo, GSR) e biomédica (plantas, fitoterápicos, alimentos, dietas e fluidos orgânicos).

Taylor e colaboradores (2010) realizaram uma extensiva revisão, referente aos anos 2008 e 2009, relacionando a determinação de elementos Al a Zn, com diferentes técnicas instrumentais de análise, métodos de preparação de amostra e pré-concentração para diferentes matrizes biológicas.

West e colaboradores (2009) realizaram uma revisão, referente aos anos de 2007 e 2008, sobre as técnicas de fluorescência de raios X aplicadas à determinação de elementos inorgânicos em materiais biológicos, relacionando diferentes sistemas de detecção (EDXRF, SRXRF, μ XRF e TXRF) e tratamento e preparação de amostras (digestão, coprecipitação, extração e outras) requeridos.

Parsons e Barbosa (2007) realizaram uma pequena revisão, de 2002 a 2006, sobre técnicas espectrométricas utilizadas em Medicina Clínica, onde elementos químicos inorgânicos são determinados em matrizes biológicas (cabelo, urina, sangue e soro) e materiais de referência certificados disponíveis comercialmente para validação de metodologia.

A seguir, são relacionados os trabalhos científicos mais relevantes e recentes envolvendo as técnicas de fluorescência de raios X na determinação de elementos químicos em fluídos biológicos nas áreas clínicas e biomédicas.

Hong e Ha (1996) determinaram os elementos K, Ca, Fe, Cu, Zn, As, Br, Rb, Sr e Pb em amostras de urina e sangue para avaliar a contaminação por esses elementos em trabalhadores de campos petrolíferos, utilizando a técnica de EDXRF. A técnica de preparação de amostras consistiu na deposição de 0,5 mL de sangue em papel de poliéster, *mylar*, e secagem em baixa temperatura para as medidas das intensidades fluorescentes características.

Estudos sobre correlação entre sexos, doenças e idade foram realizados por Carvalho e colaboradores (1998) em amostras de tecidos humanos (ossos, cabelos, fígado) a partir da determinação de elementos como Mn, Fe, Cu, Zn, Se, As, Sr, Rb e Pb, utilizando a técnica de EDXRF.

Custódio e colaboradores (2005) realizaram um estudo de relação da saúde de mães e recém-nascidos em amostras de sangue a partir da determinação de elementos K, Ca, Fe, Cu, Zn, Br, Rb e Pb pela técnica de EDXRF, utilizando amostras de sangue liofilizadas em forma de pó.

Carvalho e colaboradores (2007) realizaram uma pequena revisão sobre diferentes sistemas de detecção (EDXRF, SRXRF, TXRF e PIXE) utilizados na análise de tecidos cancerosos, observando concordância nos resultados obtidos por diferentes sistemas para o mesmo tipo de tecido.

Khuder e colaboradores (2007) determinaram os elementos P, S, K, Ca, Mn, Fe, Ni, Cu, Zn, Br, Rb, Sr e Pb em amostras de sangue e cabelo humano, utilizando técnicas de EDXRF e TXRF, variando as condições instrumentais de medida e utilizando diferentes tipos de tratamentos de amostras. As amostras de sangue foram digeridas por meio de micro-ondas em bombas de politetrafluoretileno, PTFE, e um posterior enriquecimento de metais foi realizado, utilizando as técnicas como a de

coprecipitação com ácido pirrolidina ditiocarbamato de amônio, ADPC, e extração com metilisobutilcetona, MIBK.

Kovacs e colaboradores (2008) determinaram os elementos Na, Cl e K em amostras de sangue total e soro humano, utilizando as técnicas de NAA e EDXRF, na avaliação de desordem eletrolítica. Redígolo e colaboradores (2008) determinaram os elementos Na, Mg, Cl, K e Br em amostras de sangue total utilizando a técnica de EDXRF.

Aguiar (2009) e Redígolo e colaboradores (2010) determinaram os elementos Na, Mg, P, S, Cl, K e Ca em amostras de sangue total de *hamster* dourado pelas técnicas de NAA e EDXRF.

Baptista e colaboradores (2011) determinaram os elementos Na, Mg, P, S, Cl, K, Ca, Fe, Cu e Zn em amostras de sangue total de cavalo da raça crioula utilizando técnicas de NAA e EDXRF.

4. CONSIDERAÇÕES TEÓRICAS

4.1. Espectrometria de fluorescência de raios X

4.1.1 Fenômeno

A técnica de fluorescência de raios X (Bertin, 1970; Müller, 1972; Jenkins, 1981; Buhrke, 1998; Beckhoff, 2006) baseia-se na obtenção de um espectro de emissão fluorescente característico do elemento químico a partir de uma fonte de excitação controlada. Tal fonte pode ser um feixe de partículas carregadas provenientes de aceleradores ou tubos de raios X; ou ainda radiações alfa ou gama provenientes de fontes radioativas. O fenômeno de fluorescência ocorre quando os elétrons de camadas eletrônicas mais internas do átomo são ejetados, a partir de uma fonte de excitação. Elétrons de camadas mais externas ocupam a vacância daqueles ejetados e, nesse processo, ocorre a emissão de um fóton de energia na faixa dos raios X. (FIG.4.1).

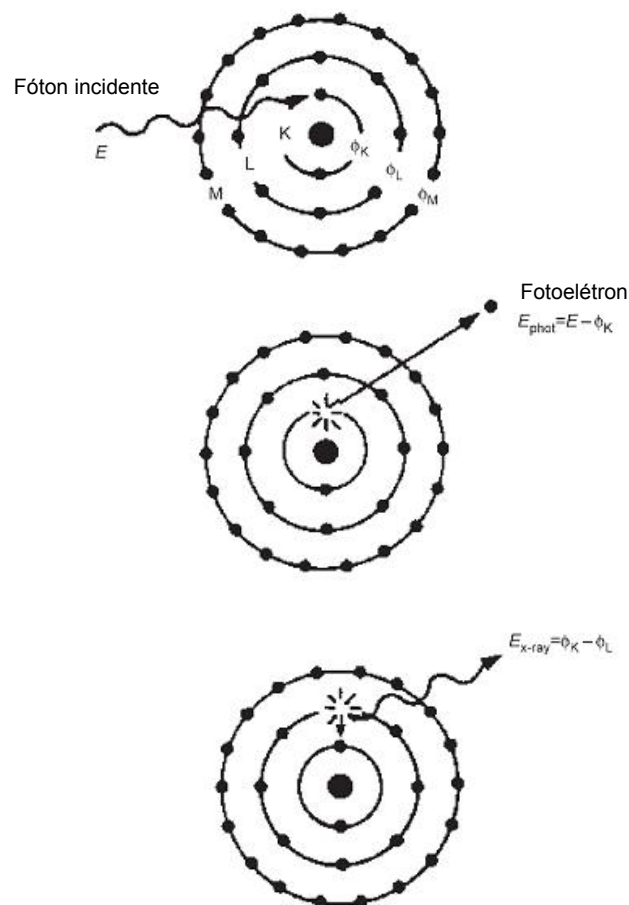


FIGURA 4.1 - Processo de absorção fotoelétrica (Janssens, 2004)

Devido às transições eletrônicas distintas, diferentes elementos químicos emitem espectros com linhas de emissão características que permitem a realização de análises qualitativas e quantitativas. Quando ocorre transição eletrônica de camadas L e M para a camada K, obtém-se espectro da série K (radiações características $K\alpha$, $K\beta$). O espectro da série L (radiações características $L\alpha$, $L\beta$, $L\gamma$ e outras) é obtido quando ocorre transição eletrônica das camadas M e N para a camada L. Os espectros de emissão das séries M e L ocorrem de forma similar envolvendo as transições eletrônicas de camadas mais externas (FIG.4.2).

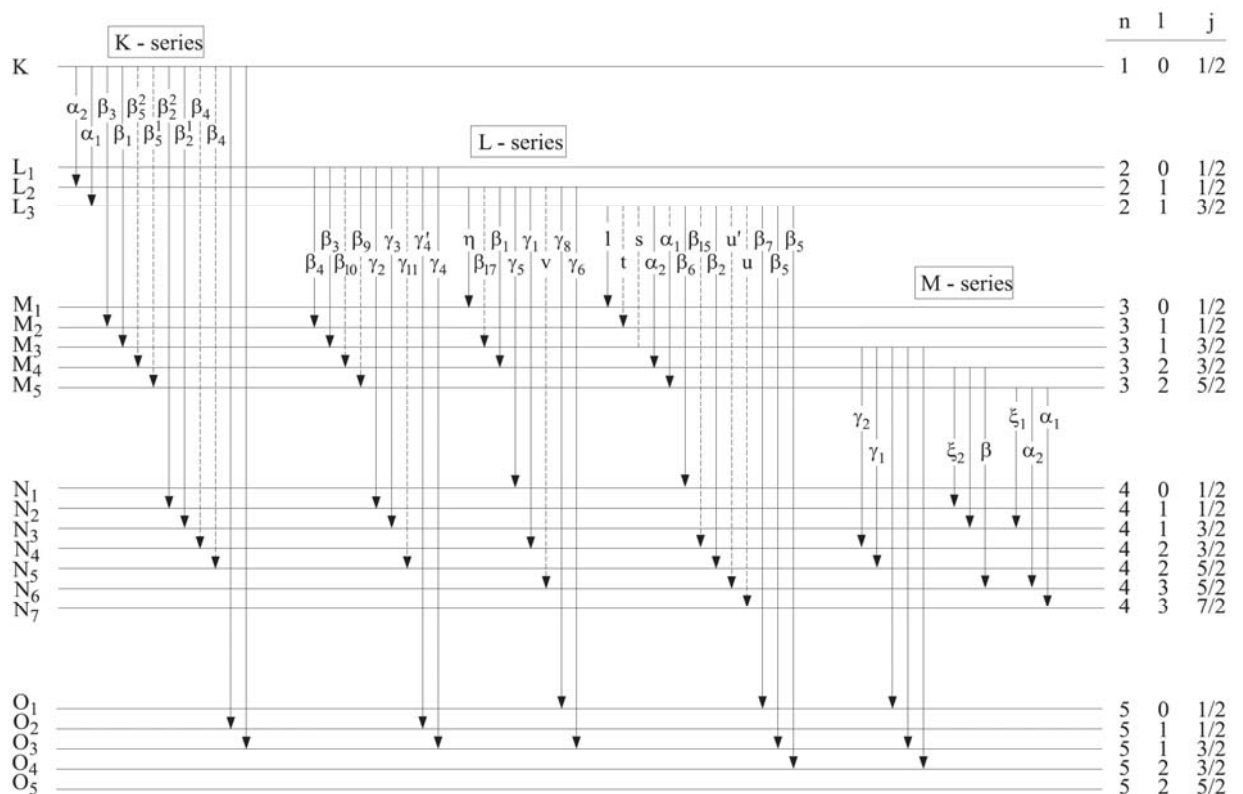


FIGURA 4.2 - Transições eletrônicas de um elemento químico (Zschornack, 2007).

A nomenclatura referente às radiações características adotada, neste trabalho, é aquela proposta por Siegbahn. A correspondência entre a nomenclatura adotada e a proposta pela IUPAC encontra-se no APÊNDICE A.

A detecção das radiações fluorescentes características pode ser realizada, utilizando-se diferentes configurações como WDXRF (fluorescência de raios X de dispersão de comprimento de onda), EDXRF (fluorescência de raios X de dispersão de energia), TXRF (fluorescência de raios X de dispersão total) e μ XRF (microfluorescência).

4.1.2 Espectrômetros comerciais

As configurações mais utilizadas são:

- WDXRF: Neste sistema (FIG.4.3), os tubos de raios X são usualmente empregados como fontes de excitação. As radiações características de raios X dos elementos presentes na amostra são separadas por meio de cristais analisadores conforme a sua energia, obedecendo à lei de Bragg, realizando análise multielementar de forma sequencial. As intensidades fluorescentes são medidas por meio de detectores de cintilação (NaI:Tl) e proporcional com fluxo de gás (FPC). A geometria do equipamento, aliada ao sistema de detecção, proporcionam ótima precisão e exatidão nos resultados de análise. A técnica apresenta, para maioria das matrizes, um limite de quantificação ao redor de 1 $\mu\text{g g}^{-1}$ para os elementos com número atômico > 20 ; e para elementos leves apresenta uma sensibilidade menor (cerca de 100 a 10 $\mu\text{g g}^{-1}$). A sensibilidade está relacionada diretamente com a composição da matriz e com parâmetros instrumentais de medida das intensidades fluorescentes características estabelecidas no espectrômetro.
- EDXRF: Neste sistema (FIG.4.4), as linhas características dos elementos são medidas pelos detectores de estado sólido tipo Si(Li), GeHp ou ainda com detectores selados, realizando análise simultânea e multielementar. Tubos de raios X, luz síncrotron e fontes radioativas são utilizados como fontes de excitação. Atualmente, com o desenvolvimento de *softwares* de algoritmos para correção matricial, a técnica tem-se tornado muito atrativa para diferentes

aplicações; e apresenta uma sensibilidade similar, para maioria dos elementos químicos, ao do sistema WDXRF.

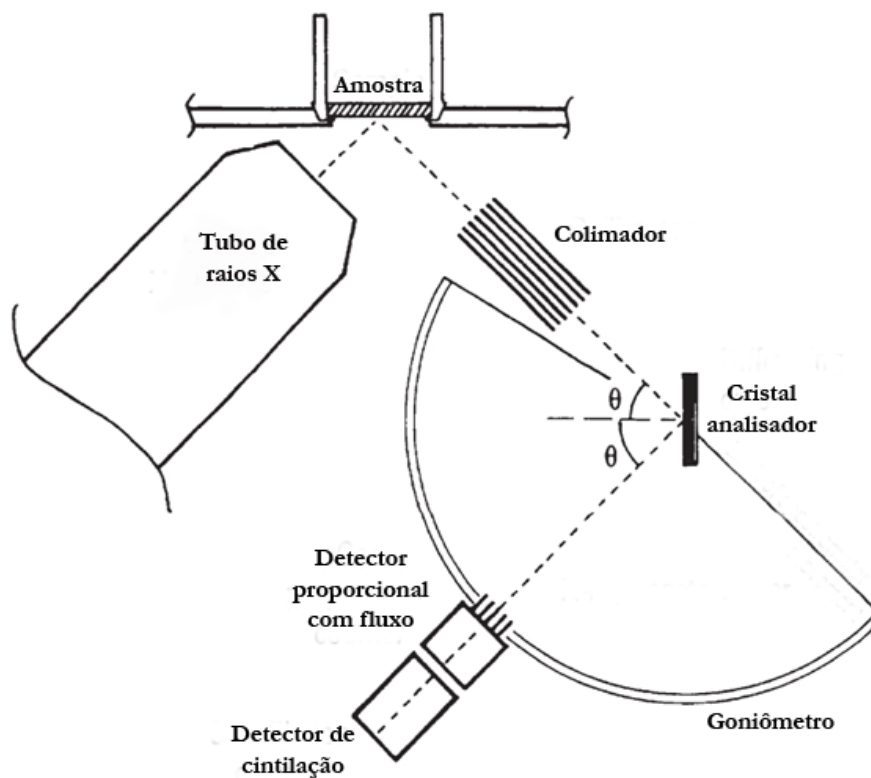


FIGURA 4.3 – Composição básica do espectrômetro de dispersão de comprimento de onda, WDXRF (Janssens, 2004)

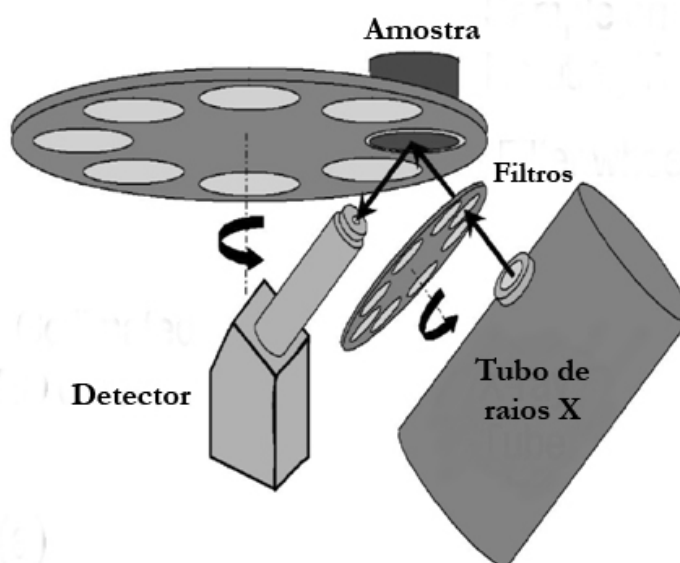


FIGURA 4.4 – Composição básica do espectrômetro de dispersão de energia, EDXRF (Janssens, 2004)

4.1.3 Fontes de erro

A intensidade de uma linha espectral pode ser fortemente influenciada pelas fontes de erro provenientes da amostra, chamado “efeito da matriz”, que são classificadas em efeito interelementar e efeito físico.

Os efeitos interelementares, provocados pela composição da amostra, são os efeitos de absorção (específica e total) e de intensificação, também chamado efeito “reforço” da radiação característica; eles estão relacionados diretamente com os coeficientes de absorção de massa e barreira de absorção (*absorption edge*) dos elementos químicos presentes na amostra. Além desses efeitos, uma amostra multielementar pode apresentar efeito de sobreposição de linhas espectrais. Os efeitos interelementares provocam erros sistemáticos nas medidas das intensidades fluorescentes, relacionando-se diretamente com a exatidão dos resultados da análise.

Os efeitos físicos são relacionados com o estado físico das amostras e técnicas de preparação (rugosidade, heterogeneidade, densidade e outras) e com os parâmetros instrumentais de medida (contagem estatística, aferição, estabilidade do espectrômetro e outros). Estes efeitos são classificados como erros aleatórios e relacionam-se com a precisão dos resultados da análise.

Amostras sólidas metálicas são preparadas por corte, fundição e, posteriormente, polimento. Amostras sólidas não metálicas, em forma de pó, são moídas e preparadas sob a forma de pastilha prensada (*pellet*) e disco fundido.

Amostras líquidas podem ser analisadas diretamente, utilizando porta-amostra especial ou modificadas, que são preparadas, utilizando as técnicas de conversão; tais como em amostra gelatinosa, onde se aumenta a viscosidade da solução; conversão em polímero orgânico vítreo, onde se funde a solução com sacarose; e deposição em camada fina (*thin film*), onde pequenas alíquotas de amostras (0,1 a 1,0 mL) são depositadas na superfície de substratos como *mylar*, filmes de polipropileno e papel de filtro.

A deposição em camada fina torna insignificante a espessura da amostra e, dessa forma, observa-se uma relação linear entre intensidade da radiação fluorescente e concentração do elemento químico. As vantagens dessa técnica são a eliminação do efeito de absorção da matriz, aumento de sensibilidade, rapidez, facilidade e reprodutibilidade na preparação das amostras. Ainda, este tipo de preparação de amostras é econômico, uma vez que dispensa o uso de reagentes químicos e conseqüentemente não produz rejeitos químicos.

Entretanto, o efeito cromatográfico apresenta-se como predominante, que afeta a exatidão das análises, e os efeitos de heterogeneidade e/ou rugosidade das amostras encontram-se relacionados com a precisão das análises.

4.1.4 Incerteza de medição

É fundamental que os laboratórios analíticos disponham de meios e critérios objetivos que demonstrem que a execução de análises químicas produz resultados confiáveis e adequados, dentro de uma qualidade requerida. Este requisito é realizado por meio de validação dos métodos de ensaio e cálculo de incerteza das medições. A definição de incerteza é baseada na medição; ela é “um parâmetro associado ao resultado de uma medição, que caracteriza a dispersão dos valores a ser atribuída ao mensurando” (INMETRO, 2009). Esta dispersão pode ser um desvio padrão ou um intervalo de confiança. As principais fontes de incerteza são a amostragem, os efeitos da matriz e suas interferências, condições experimentais oriundas do equipamento e incertezas associadas à aferição da massa e volume de reagentes e amostras.

A avaliação da incerteza global é realizada considerando as várias fontes de incerteza, tratadas separadamente e quantificadas conforme as normas vigentes (Juran, 1988; ABNT NBR-17025, 2005; EURACHEM, 2000).

4.1.5 Métodos de análise

Os métodos de análise clássicos utilizados nas técnicas de fluorescência de raios X são os denominados “métodos de compensação”, que são curvas de calibração (regressão linear), padrão interno, método de adição, método de “Compton” e outros (Müller, 1972; Jenkins, 1988). Atualmente, estes métodos possuem, na sua maioria, um *software* acoplado ao espectrômetro para tratamento de dados.

Os métodos de algoritmos são formulações matemáticas para a correção de efeitos matriciais, interelementares e físicos, predominantes numa análise por fluorescência de raios X. Inicialmente, foram propostos para as análises químicas de amostras metálicas binárias, ternárias e quaternárias. Entre os métodos de algoritmos, destaca-se o método de parâmetros fundamentais (FP), que permite determinar a composição química de uma amostra dispensando o uso de padrões similares.

Utilizando parâmetros instrumentais (tubo de raios X, detector, geometria e outros) e parâmetros fundamentais (distribuição espectral primária, coeficientes de absorção fotoelétrica e de massa e rendimento de fluorescência) é possível construir curvas de sensibilidade instrumental. A sensibilidade instrumental de um elemento químico é a relação das intensidades fluorescentes medidas e teóricas (Beckhoff, 2006). Dessa forma, é possível montar uma biblioteca de sensibilidade para vários elementos químicos. Espectrômetros comerciais incluem bibliotecas de sensibilidade baseadas em intensidades fluorescentes medidas a partir de elementos puros (óxidos e metálicos) de composição conhecida. A determinação da sensibilidade de elementos químicos não medidos é realizada pela interpolação.

O método FP baseia-se em três premissas com relação às amostras: homogeneidade, superfície plana e espessura infinita. O cálculo é realizado em duas etapas, calibração e previsão. Na etapa de calibração, corrige-se a intensidade medida para cada linha característica a partir da sensibilidade instrumental e da intensidade teórica (EQ.4.1).

$$I_m = f \cdot I_t \quad (\text{EQ.4.1})$$

Na qual:

I_m : intensidade medida

I_t : intensidade teórica

f : coeficiente de sensibilidade

Na etapa de previsão, o algoritmo estima a composição da amostra considerando a intensidade relativa das linhas de emissão de cada elemento presente na matriz e assumindo um total emitido correspondente a uma composição de 100%. O software realiza um ajuste da composição assumida e calcula um novo conjunto de intensidades esperadas. O processo de iteração é repetido até que seja obtido um valor satisfatório dentro de uma faixa de erro de 0,05 % de significância (Nagata, 2001).

A intensidade teórica é calculada por meio da EQ.4.2 (Kataoka, 1989).

$$I_t = I_{Pi} + I_{Si} \quad (\text{EQ.4.2})$$

Na qual:

I_t = intensidade teórica

I_{Pi} = excitação primária

I_{Si} = excitação secundária

As intensidades de excitação primária e secundária são calculadas por meio das EQ.4.3 e EQ.4.4, respectivamente.

$$I_{Pi} = \frac{K(\lambda_i)}{\text{sen}\psi_2} \int_{\lambda_{min}}^{\lambda_e^i} \frac{Q_i(\lambda)}{X} I_o(\lambda) d\lambda \quad (\text{EQ.4.3})$$

$$I_{Si} = \frac{K(\lambda_i)}{2\text{sen}\psi_2} \sum_j \int_{\lambda_{min}}^{\lambda_e^i} \frac{Q_j(\lambda)Q(\lambda_j)}{X} I_o(\lambda) Y d\lambda \quad (\text{EQ.4.4})$$

Os algoritmos Q, X e Y são calculados por meio das EQ.4.5, EQ.4.6 e EQ.4.7, respectivamente.

$$Q_i(\lambda) = \tau_i(\lambda) W_i \left(1 - \frac{1}{J_i}\right) \omega_i R_p^i \quad (\text{EQ.4.5})$$

$$X = \frac{\mu(\lambda)}{\text{sen}\psi_1} + \frac{\mu(\lambda_i)}{\text{sen}\psi_2} \quad (\text{EQ.4.6})$$

$$Y = \frac{\text{sen}\psi_1}{\mu(\lambda)} \ln \left(1 + \frac{\mu(\lambda)}{\mu(\lambda_j)\text{sen}\psi_1} \right) + \frac{\text{sen}\psi_2}{\mu(\lambda_i)} \ln \left(1 + \frac{\mu(\lambda_i)}{\mu(\lambda_j)\text{sen}\psi_2} \right) \quad (\text{EQ.4.7})$$

Os símbolos e abreviações utilizados nas equações para o cálculo da intensidade teórica encontram-se na TAB.4.1.

TABELA 4.1 – Abreviações e símbolos nas equações do cálculo da intensidade teórica

Símbolo ou abreviação	Definição
K	Fração da radiação fluorescente que chega ao detector
I₀	Radiação incidente proveniente do espectro primário de raios X
Ψ₁, Ψ₂	Ângulo incidente e emergente
W_i	Composição química
μ_λ	Coefficiente de absorção de massa total
τ_i(λ)	Coefficiente de absorção fotoelétrica
ω_i	Rendimento de fluorescência
1 - 1/J_i	<i>Jump ratio</i>
R_pⁱ	Probabilidade transicional
λ_l	Energia de raios X fluorescente
λ_eⁱ	Barreira de absorção
λ_{min}	Energia mínima

É apresentada na FIG.4.5 a produção de radiação secundária numa amostra espessa do elemento *i* por meio de excitação primária, I_{Pi}, e secundária, I_{Si}. A excitação secundária ocorre quando a radiação primária, I₀, de comprimento de onda λ_i incide na amostra com ângulo Ψ₁, sofrendo absorção pelo elemento *j* e intensificação pelo elemento *i*.

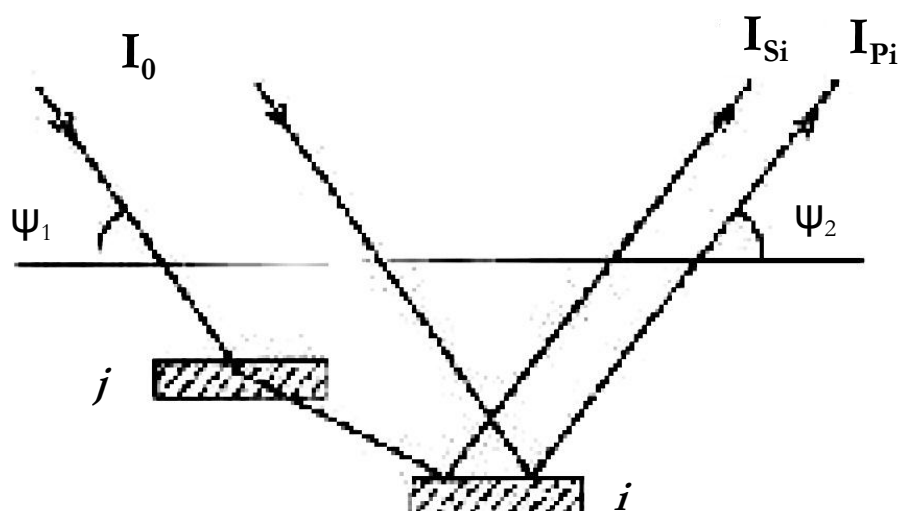


FIGURA 4.5 – Excitação primária e secundária em amostra espessa (Kataoka, 1989).

O método de parâmetros fundamentais foi apresentado por Jacob Sherman em 1955, entretanto, sua aplicabilidade só foi possível com o avanço tecnológico dos microcomputadores. Autores como Shiraiwa e Fujino (1966) e Criss e Birks (1968) foram responsáveis pelo desenvolvimento do método FP no final da década de 60. Uma compilação de algoritmos foi realizada por Lachance e Claisse em 1994. Nos últimos anos, introdução de novos parâmetros e melhorias nas formulações matemáticas para cálculos de parâmetros nucleares e matriciais têm sido realizadas pelos autores como Kataoka (1989) e Han (2006). Formulações matemáticas, instrumentação e métodos de algoritmos como α -coeficiente e parâmetros fundamentais têm sido extensivamente avaliados por autores como Tsuji (2004) e Beckhoff (2006).

Atualmente, *workshops* internacionais são realizados, junto a representantes industriais, laboratórios de referência e instituições acadêmicas, com a iniciativa de melhorar as bases de dados de parâmetros fundamentais utilizados na física de raios X. Para o ano de 2011, o encontro será realizado em *Gaithersburg, Maryland, EUA* (4th *International Workshop on Fundamental Parameters*, <http://beam.to/fp-workshop>).

4.2 Tratamentos estatísticos

Neste trabalho, foi utilizado o teorema do limite central e todas as distribuições são consideradas estatisticamente normais. Média aritmética, desvio padrão, mediana, valor máximo, valor mínimo e intervalo de referência foram determinados.

4.2.1 Avaliação do método

Eliminação de valores dispersos

De acordo com a norma ISO 5725-2:1994, um valor disperso (*outlier*) é “um resultado suficientemente diferente dos outros resultados, que alerta para uma investigação posterior”. A norma ainda estabelece que um valor disperso não deve ser descartado levando-se em conta somente a estatística, é necessário analisar a relevância do seu valor.

Um teste indicativo de valor disperso numa distribuição normal é o Teste Q de *Dixon*, EQ.4.8 (Dixon, 1953). Se o valor de Q calculado for maior que o valor de Q crítico, num nível de significância de 0,01; o resultado suspeito é considerado estatisticamente disperso. A tabela de valores críticos para o Teste Q de *Dixon* encontra-se no APÊNDICE D.

$$Q_{n=3 \rightarrow 7} = \frac{x_n - x_{n-1}}{x_n - x_1} \quad (\text{EQ.4.8})$$

Na qual:

x_n = resultado suspeito

x_{n-1} = resultado anterior, em ordem crescente, ao resultado suspeito

x_1 = primeiro resultado em ordem crescente

Incerteza de medição

De acordo com ABNT (NBR-17025, 2005), a incerteza de medição é o “parâmetro não negativo que caracteriza a dispersão dos valores atribuídos a um mensurando”. A incerteza de medição expandida (u) ou incerteza global, representa o

intervalo em torno do resultado de uma medição com o qual se espera abranger uma grande fração da distribuição de valores que podem ser atribuídos ao mensurando, caracterizado pela média aritmética de “n” determinações independentes. O nível de significância utilizado foi $\alpha = 0,05$. A EQ.4.9 define a incerteza de medição expandida.

$$u = t_{n-1\left(\frac{\alpha}{2}\right)} \cdot \frac{S_{\text{det}}}{\sqrt{n}} \quad (\text{EQ.4.9})$$

Na qual:

$t_{n-1(\alpha/2)}$ = valor t-Student para 95% de confiança

s_{det} = desvio padrão do valor determinado

n = número de medidas

Desvio padrão relativo

O desvio padrão relativo percentual é a medida do grau de dispersão dos valores em relação à média, conforme a EQ.4.10. A precisão é avaliada por meio do grau de repetitividade.

$$DPR\% = \frac{S_{\text{det}}}{x_{\text{det}}} \cdot 100 \quad (\text{EQ.4.10})$$

Na qual:

x_{det} = valor determinado

s_{det} = desvio padrão do valor determinado

O DPR% é avaliado da seguinte forma: valores abaixo de 10% são considerados satisfatórios e valores acima de 10% são considerados não satisfatórios (INMETRO, DOQ-CGCRE-008, 2007).

Teste Z-score

O teste *Z-score*, EQ.4.11, compara o valor real e o valor medido, avaliando a exatidão e a precisão do método.

$$Z = \frac{x_{\text{det}} - x_{\text{cert}}}{\sqrt{s_{\text{det}}^2 + s_{\text{cert}}^2}} \quad (\text{EQ.4.11})$$

Na qual:

x_{det} = valor determinado

s_{det} = desvio padrão do valor determinado

x_{cert} = valor certificado

s_{cert} = desvio padrão do valor certificado

O teste *Z-score* é avaliado da seguinte forma: valores de $|Z| < 2$: resultado satisfatório; valores de $2 < |Z| < 3$: resultado questionável e valores de $|Z| > 3$: resultado insatisfatório (INMETRO, DOQ-CGCRE-008, 2007).

Limite de quantificação

O limite de quantificação é a menor concentração de um elemento químico que pode ser determinada num nível aceitável de precisão e exatidão, conforme INMETRO, DOQ-CGCRE-008, 2007. Na espectrometria de fluorescência de raios X, de acordo com Rousseau (2001), este termo é usualmente confundido com o “limite de detecção”, que é uma estimativa teórica da mais baixa intensidade líquida detectável na posição de pico de um dado analito. O autor critica ainda o cálculo do limite de quantificação utilizando somente medidas da radiação de fundo ($I_b + 6\sigma_b$), argumentando que o cálculo deve levar em conta o nível de confiança, a distribuição dos dados, a repetitividade e a variação de concentração do analito, conforme EQ.4.12.

$$LQ = 2 \cdot \sqrt{\frac{\sum_{m=1}^n (X_m - \bar{X})^2}{n-1}} \quad (\text{EQ.4.12})$$

Na qual:

X_m = valor de concentração do *m*-ésimo analito

\bar{X} = valor médio das concentrações

n = número de medidas

4.2.2 Comparação de resultados das técnicas EDXRF e NAA

Teste F

A comparação entre as variâncias amostrais foi realizada aplicando-se o Teste F (EQ.4.13). Se o valor de F calculado for menor que o valor crítico, as duas variâncias são estatisticamente iguais.

$$F = \frac{s_1^2}{s_2^2} \quad (\text{EQ.4.13})$$

Na qual:

s_1^2 = variância dos resultados obtidos pela técnica de NAA

s_2^2 = variância dos resultados obtidos pela técnica de EDXRF

Teste t de *Student*, para variâncias amostrais diferentes

O teste t é um teste de hipótese utilizado para populações que seguem a distribuição normal; a hipótese nula confirma a igualdade de duas médias ($H_0 : \bar{x}_1 = \bar{x}_2$) e hipótese alternativa nega a igualdade de duas médias ($H_1 : \bar{x}_1 \neq \bar{x}_2$). O valor de t calculado (t_{calc}) é comparado ao valor de t crítico (t_{crit}) tabelado. Quando o valor de t_{calc} for menor que t_{crit} , a hipótese nula é confirmada, ou seja, as duas médias são estatisticamente iguais.

O cálculo do teste t varia de acordo com a variância amostral das médias comparadas. A comparação dos resultados entre as duas técnicas foi realizada utilizando o teste t para variâncias amostrais estatisticamente diferentes, conforme a equação EQ.4.14.

$$\hat{t}_v = \frac{\bar{x}_1 - \bar{x}_2}{\sqrt{\frac{s_1^2}{n_1} + \frac{s_2^2}{n_2}}} \quad (\text{EQ.4.14})$$

Na qual, especificamente para este trabalho:

\bar{x}_1 = média dos resultados obtidos pela técnica de EDXRF

\bar{x}_2 = média dos resultados obtidos pela técnica de NAA

s_1^2 = variância dos resultados obtidos pela técnica de EDXRF

s_2^2 = variância dos resultados obtidos pela técnica de NAA

n_1 = número de amostras analisadas pela técnica de EDXRF

n_2 = número de amostras analisadas pela técnica de NAA

$\nu = n_1 + n_2 - 2$, graus de liberdade

Teste t de *Student*, para variâncias amostrais iguais

Na comparação das médias, com variâncias amostrais iguais, foi aplicado o teste t, conforme a equação EQ.4.15 (Neto, 2010).

$$t_{calc} = \frac{(\bar{x}_1 - \bar{x}_2)}{\sqrt{\left(\frac{1}{n_1} + \frac{1}{n_2}\right) \times \left(\frac{s_1^2(n_1 - 1) + s_2^2(n_2 - 1)}{(n_1 + n_2 - 2)}\right)}} \quad (\text{EQ.4.15})$$

Na qual, especificamente para este trabalho:

\bar{x}_1 = média dos resultados obtidos para amostras de volume de deposição de 100 μL

\bar{x}_2 = média dos resultados obtidos para amostras de volume de deposição de 50 μL

n_1 = número de amostras de volume de deposição de 100 μL

n_2 = número de amostras de volume de deposição de 50 μL

s_1^2 = variância dos resultados obtidos para amostras de volume de deposição de 100 μL

s_2^2 = variância dos resultados das amostras de volume de deposição de 50 μL

5. MATERIAIS E MÉTODOS

5.1. Coleta e preparo de amostras de sangue total humano

As amostras biológicas humanas são oriundas do Banco de Sangue Paulista da cidade de São Paulo e da fundação HEMOPE da cidade de Recife (Lins, 2004 e Oliveira, 2008), coletadas mediante autorização por escrito no Termo de Consentimento Livre e Esclarecido a respeito do trabalho em desenvolvimento, conforme padrões éticos para trabalho envolvendo seres humanos (Oliveira, 2008. p.67). O fluxograma de execução das análises de sangue total humano e de animais de experimentação é apresentado na FIG.5.1.

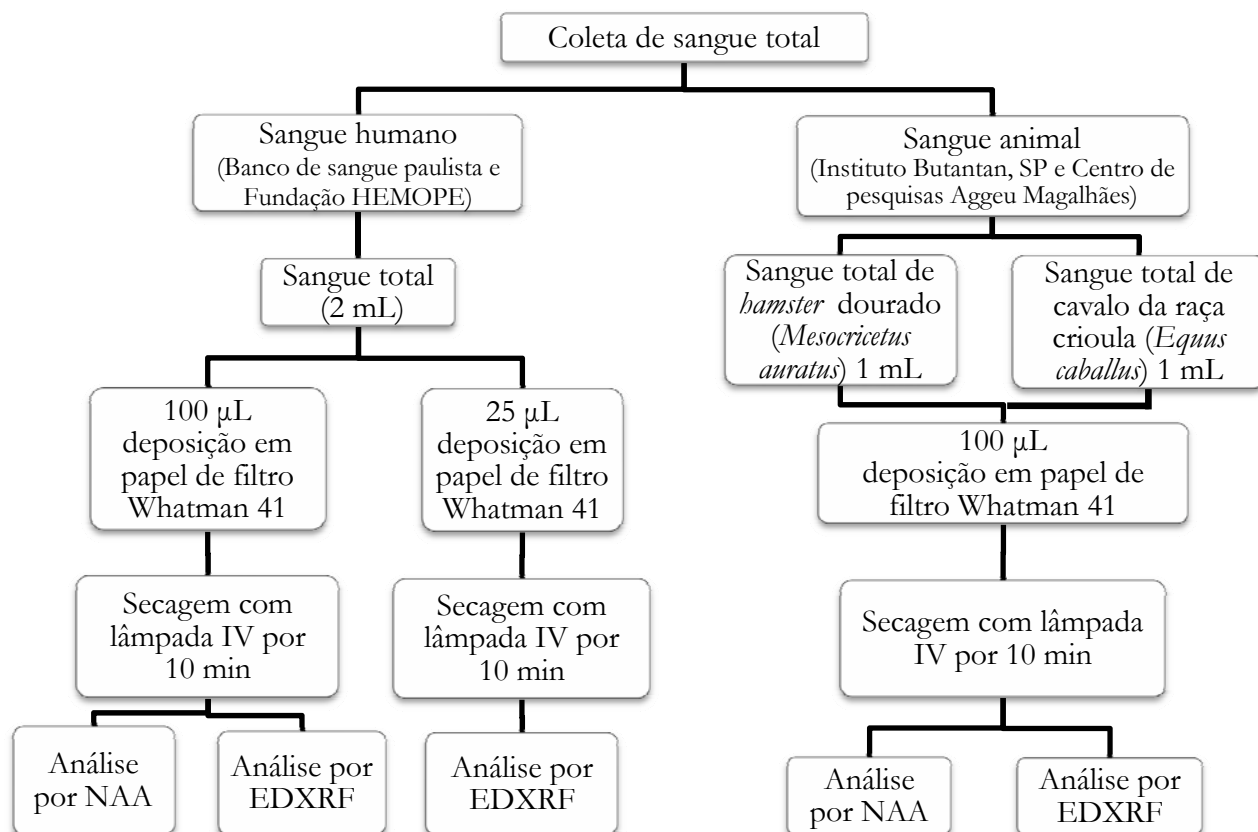


FIGURA 5.1 – Fluxograma de execução das análises de sangue total humano e de animais de experimentação.

As amostras foram coletadas de homens e mulheres, seguindo a legislação vigente e as exigências estabelecidas para doadores, ter entre 25 e 60 anos de idade e apresentar peso acima de 50 kg (Brasil, 1994 e 2001).

Cerca de 2 mL sangue venoso periférico foram coletados em de tubo de plástico sem agentes anticoagulantes. Agentes anticoagulantes comerciais apresentam altas concentrações de íons Na^+ e K^+ , e seu uso causaria desvio na determinação desses elementos. Imediatamente após a coleta e antes da coagulação, 100 μL de sangue total foram depositados sobre a superfície de papel de filtro Whatman 41 (área de deposição de 500 - 700 mm^2) (FIG.5.2). Uma segunda deposição foi realizada da mesma maneira, utilizando um volume de 25 μL de sangue total (área de deposição \approx 50 mm^2) (FIG.5.3). As amostras foram secas por 10 minutos utilizando lâmpada infravermelha. O volume de amostra restante foi encaminhado para triagem através de sorologia convencional a fim de excluir amostras de doadores portadores de doenças infectocontagiosas (Oliveira, 2008).

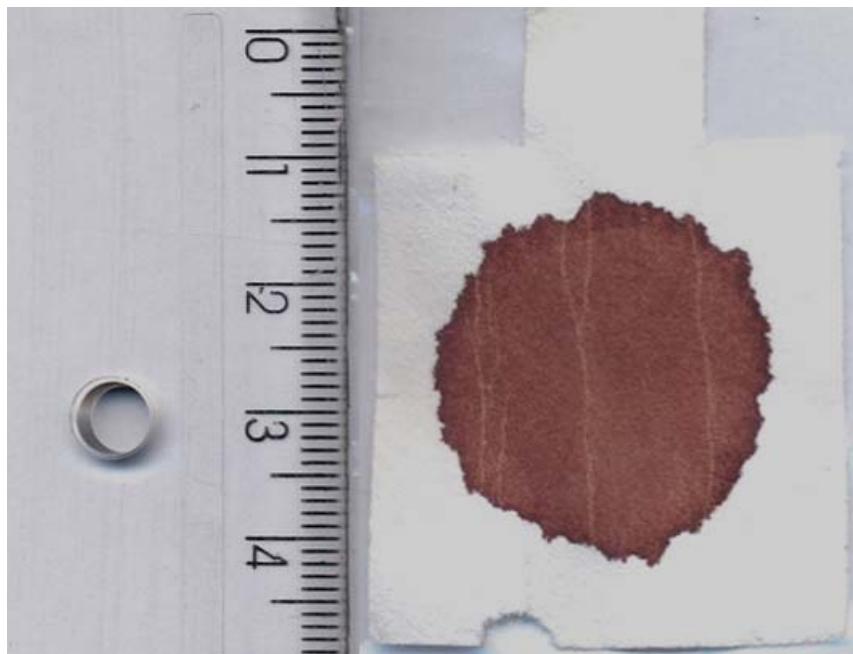


FIGURA 5.2 – Amostra de sangue total humano (volume de deposição de 100 μL).

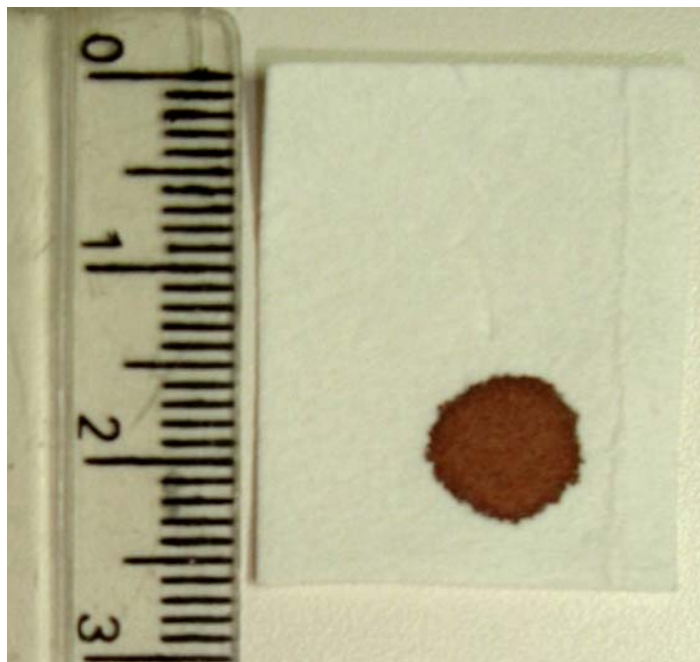


FIGURA 5.3 – Amostra de sangue total humano (volume de deposição de 25 μ L).

5.2. Coleta e preparo de amostras de sangue total animal

As amostras biológicas de *hamsters* são oriundas de laboratórios de pesquisas da área de Saúde Pública e Ambiental (Instituto Butantan e Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães). O fluxograma apresentado na FIG.5.1 foi seguido na realização das análises das amostras de sangue animal.

Cerca de 1 mL de sangue total de *hamster* dourado (*Mesocricetus auratus*) (FIG.5.4) foi coletado através de venossecção em tubo plástico, sem uso de agentes anticoagulantes. Antes da coagulação, 100 μ L foram depositados em papel de filtro Whatman 41 (área de 500 – 700 mm²) e secos com o auxílio de lâmpada infravermelha (FIG.5.5) (Aguiar, 2009).

As amostras biológicas de cavalos são oriundas do Instituto Butantan, da fazenda São Joaquim. Para obtenção das amostras foram utilizados 20 cavalos da raça crioula (*Equus caballus*) (FIG.5.6), fêmeas e machos, não imunizados, sadios, com idades entre 1 e 3 anos e peso médio de 350 kg.

Cerca de 2 mL de sangue total foram coletados através de venossecção em tubo plástico, sem uso de agentes anticoagulantes. Antes da coagulação, 100 μ L foram

depositados em papel de filtro Whatman 41 (área de 500 – 700 mm²) e secos com o auxílio de lâmpada infravermelha (Baptista, 2010).

Na ausência de normas ou leis nacionais que regulam a coleta de material biológico animal, foram seguidas normas criadas pelos próprios institutos de pesquisa para tal finalidade.

Neste trabalho, as amostras de sangue total humano e animal foram preparadas em duplicata e analisadas por NAA e EDXRF. As amostras foram conservadas à temperatura ambiente, separadas individualmente e armazenadas em tubos plásticos. Todo o material foi descartado como resíduo infectante.



FIGURA 5.4 – Hamster dourado (*Mesocricetus auratus*).

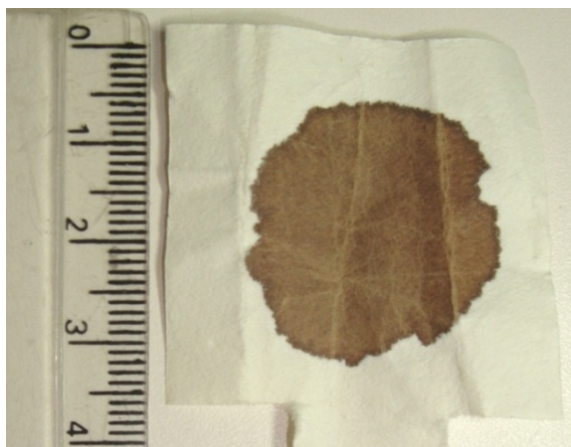


FIGURA 5.5 – Amostra de sangue total animal.



FIGURA 5.6 – Cavalo da raça crioula (*Equus caballus*) (Baptista, 2010).

5.3. Condições experimentais de medida do espectrômetro de fluorescência de raios X

Foi utilizado um espectrômetro de dispersão de energia (EDXRF) da *Shimadzu Co*, modelo *Rayny 720* para realizar medidas das intensidades fluorescentes características (FIG.5.7). Este espectrômetro possui um *software* de parâmetros fundamentais acoplado. As condições instrumentais de medida utilizadas são apresentadas na TAB.5.1.



FIGURA 5.7 – Espectrômetro EDXRF da *Shimadzu Co.*, modelo *Rayny 720*.

TABELA 5.1 – Parâmetros instrumentais de medida do espectrômetro EDXRF

Parâmetro	Condição
Tubo de raios X	Alvo de Rh
Grupos de análise	Determinação de Na, Mg, P, S, Cl, K e Ca (15 kV) Determinação de Fe, Cu e Zn (50 kv)
Corrente	Ajustável (máximo de 40 μ A)
Atmosfera	Vácuo
Detector	Si(Li)
Colimador	5 mm
Contagem fixa de tempo	100 s para cada grupo
Linha de emissão	K α para todos os elementos
Área de irradiação	30 mm ²

As curvas de sensibilidade do espectrômetro mostraram-se inadequadas para análise de amostras biológicas, uma vez que foram construídas a partir de elementos em forma de óxidos puros e metálicos. Dessa forma, uma nova curva de sensibilidade experimental foi construída a partir de uma matriz biológica utilizando material de referência certificado da NIST (SRM 1577c - *Bovine liver* - APÊNDICE B). Os coeficientes de sensibilidade determinados (f) sob as condições experimentais de medida encontram-se apresentadas no ANEXO A e a curva de sensibilidade experimental é apresentada no ANEXO B.

5.5. Avaliação do método de análise

Foi utilizado o material de referência certificado IAEA-A-13 *Animal Blood*, da Agência Internacional de Energia Atômica (IAEA) para avaliação da metodologia (Certificado - APÊNDICE C). O MRC foi analisado na forma pó liofilizado, sem nenhum pré-tratamento adicional, condicionado dentro de um porta-amostra (FIG.5.8).

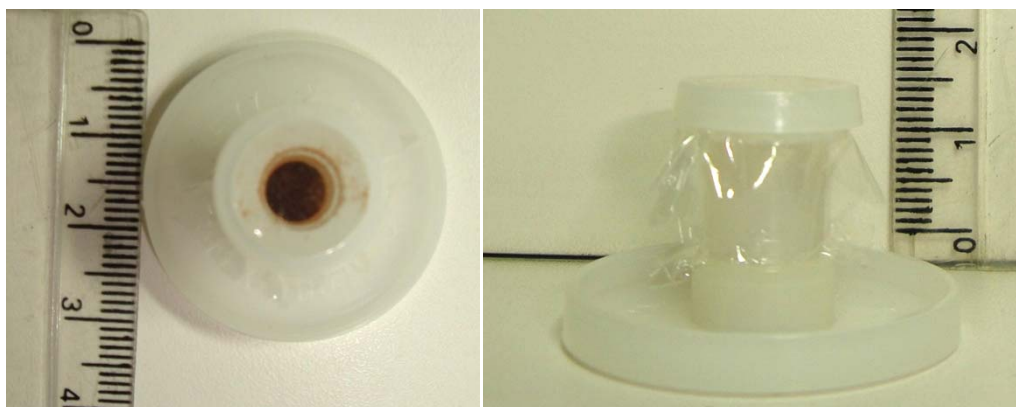


FIGURA 5.8 – MRC IAEA-A-13 Animal Blood

Os elementos químicos Na, Mg, P, S, K, Ca, Fe, Cu e Zn foram determinados utilizando a curva de sensibilidade experimental, a partir de um conjunto de dados de 12 medidas para cada linha de emissão característica. Para o conjunto de dados, foram aplicados os testes estatísticos de eliminação de valores dispersos e calculados a média e incerteza expandida ($\bar{x} \pm u$) e o desvio padrão relativo (DPR%) para avaliação da precisão. Para avaliar a exatidão do método, foi aplicado o teste *Z-score*. O limite de quantificação (LQ) foi calculado para cada elemento determinado.

5.6. Comparação dos resultados das técnicas analíticas EDXRF e NAA

A etapa final do presente trabalho é a comparação dos resultados de amostras de sangue humano e animal, obtidos pelas técnicas de fluorescência de raios X com os determinados pela técnica de análise por ativação neutrônica.

Neste trabalho, os resultados são expressos em intervalos de referência: $[\bar{x} - u; \bar{x} + u]$ ou $[\bar{x} - s; \bar{x} + s]$; portanto, a igualdade dos resultados foi avaliada com o teste t de *Student*, comparando a média (\bar{x}) e o desvio padrão (s) das determinações de cada elemento químico.

O teste F foi calculado para avaliar igualdade das variâncias amostrais das duas técnicas (EQ.4.6); e, posteriormente, foi calculado o teste t de *Student*, para variâncias amostrais diferentes (EQ.4.7).

Na avaliação de sensibilidade da técnica de fluorescência de raios X, para diferentes volumes de deposição (100 e 25 μL), as médias foram comparadas aplicando o teste t, para variâncias amostrais estatisticamente iguais (EQ.4.8).

6. RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1. Avaliação do método de análise

Foram realizadas várias medidas de “branco” em papel de filtro Whatman 41, isto é, realizou-se a detecção dos elementos determinados em diferentes áreas não depositadas. As concentrações desses elementos mostraram-se desprezíveis em relação à concentração dos mesmos presentes nas amostras de sangue total.

A metodologia foi avaliada pela determinação de Na, Mg, P, S, K, Ca, Fe, Cu e Zn. Os valores certificados (intervalos de confiança), valores determinados (média e incerteza), valores de DPR%, do teste *Z-score* e de limite de quantificação do material de referência certificado IAEA-A-13 *Animal blood* são mostrados na TAB.6.1.

TABELA 6.1 – Dados do CRM IAEA-A-13

Elemento	Intervalo de confiança (IAEA-A-13) ($\mu\text{g g}^{-1}$)	$x_{\text{det}} \pm u_{\text{det}}$ ($\mu\text{g g}^{-1}$)	DPR%	Valores de <i>Z-score</i>	LQ ($\mu\text{g g}^{-1}$)
Na	11600 – 13500	12523 \pm 249	3,1	0,1	113
Mg	81 – 139	106 \pm 7	9,2	-0,3	1
P	690 – 1120	954 \pm 34	5,0	0,2	8
S	6000 – 7000	6052 \pm 270	6,2	-0,7	42
K	2100 – 2700	2263 \pm 79	4,9	-0,4	15
Ca	226 – 332	264 \pm 19	10,0	-0,4	3
Fe	2200 – 2500	2179 \pm 95	6,1	-0,9	17
Cu	3,7 – 4,8	4,5 \pm 0,2	4,1	0,5	0,03
Zn	12 – 14	13 \pm 1	4,2	0,2	0,06

Os valores para o teste *Z-score* são menores que 1 para os elementos Na, Mg, P, S, K, Ca, Fe, Cu e Zn (TAB.6.1 e FIG.6.1); portanto, a exatidão do método é satisfatória, isto é, está em conformidade com os requisitos do INMETRO (DOQ-CGCRE-008).

A precisão, avaliada em termos de desvio padrão relativo, apresentou valores satisfatórios para todos os elementos: Os elementos Na, P, S, K, Fe, Cu e Zn apresentaram valores de DPR% menores que 6,2%, demonstrando uma boa repetitividade do método. Mg e Ca apresentaram valores mais altos (9,2% e 10,0%,

respectivamente). A repetitividade mais baixa destes elementos pode ser atribuída à concentração mais baixa destes, em relação aos demais elementos de número atômico baixo, associada à condição de medida estabelecida no espectrômetro de raios X (TAB.5.1); indicando que a formação de um grupo de análise só para Mg e Ca pode resultar em melhor repetitividade.

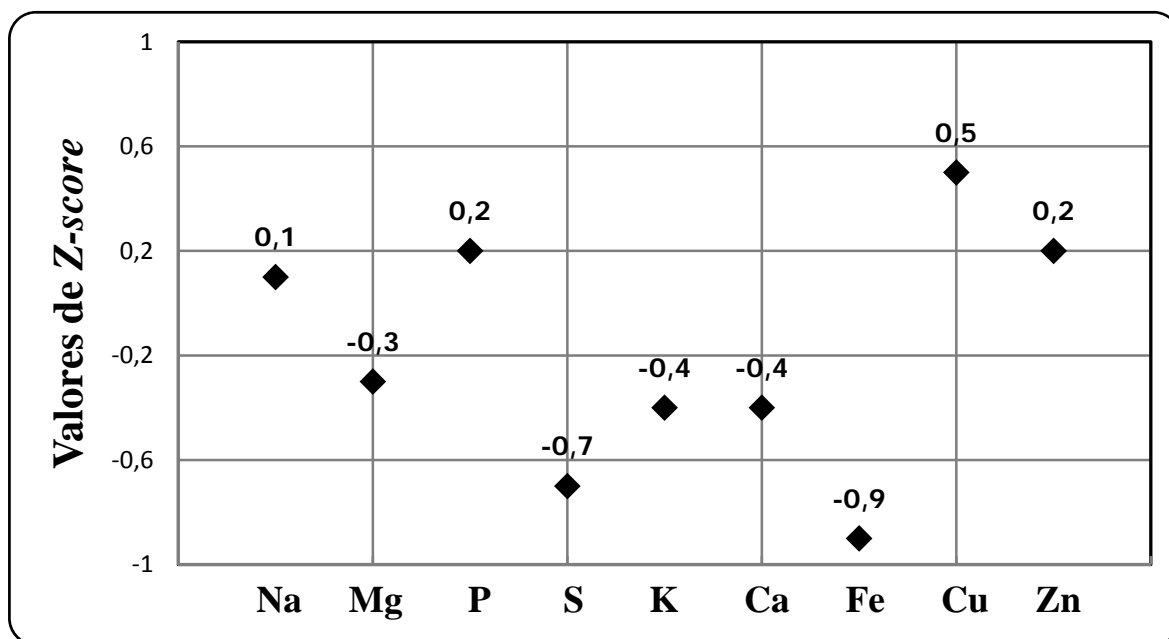


FIGURA 6.1 – Valores do teste Z-score para o MRC IAEA-A-13.

O limite de quantificação é significativo quando este valor é 100 a 1000 vezes menor que o valor determinado (EURACHEM, 2000). Os valores de LQ experimentais mostraram-se adequados, pois todos os elementos apresentaram valores de 100 a 200 vezes menores que os valores determinados, exceto para o Ca, 90 vezes menor.

Os valores de *Z-score*, DPR% e LQ demonstram a validade do método para os elementos determinados (Na, Mg, P, S, K, Ca, Fe, Cu e Zn), indicando que a curva de sensibilidade experimental, condições experimentais de medida e a técnica de preparação de amostras em filme fino são adequadas para análise de amostras de sangue total.

6.2. Análise de sangue total humano

A determinação de elementos químicos inorgânicos nas amostras de sangue total humano foi realizada em 12 amostras com volume de deposição de 100 μL e 10 amostras com volume de deposição de 25 μL . Três repetições de medida foram realizadas para cada amostra.

Na TAB.6.2 são apresentados valores de média e incerteza ($x \pm u$), valores de mediana, valores mínimos e máximos para análise de sangue total humano de volume de deposição 100 μL .

TABELA 6.2 – Análise de sangue total humano. Volume de deposição: 100 μL , $\mu\text{g g}^{-1}$

Elemento	$x \pm u$ EDXRF	Mediana	Valor mínimo	Valor máximo
Na	1807 \pm 19	1816	1606	1897
Mg	69 \pm 6	72	57	90
P	639 \pm 37	647	530	836
S	1618 \pm 99	1516	1424	2015
Cl	2805 \pm 62	2825	2525	3097
K	1569 \pm 61	1614	1429	1855
Ca	221 \pm 7	220	175	260
Fe	177 \pm 7	177	125	210
Cu	4,9 \pm 1,0	4,9	4,1	5,5
Zn	2,3 \pm 1,0	2,3	1,6	2,9

A média aritmética, apesar de amplamente utilizada, pode inferir em erro quando influenciada por valores extremos. A mediana é o valor central de uma distribuição, portanto, depende do número de amostras e não pode ser influenciada por valores extremos (Reis, 1991).

As médias e medianas apresentadas na TAB.6.2 são próximas para todos os elementos e os valores mínimos e máximos não são extremos, o que indica distribuição normal para todos os elementos.

Na TAB.6.3, são comparados os valores de média e incerteza ($x \pm u$) e intervalos de referência de Na, Mg, P, S, Cl, K, Ca, Fe, Cu e Zn obtidos pela técnica de EDXRF e os intervalos de Na, Mg, Cl, K, Ca e Fe obtidos pela técnica de NAA. Os resultados indicam que os intervalos de Na, Mg, Cl, K e Ca, determinados por EDXRF, se situam dentro dos intervalos obtidos por NAA. Exceção foi verificada

para o Fe, que apresentou valores mais baixos: 170 a 184 e 336 a 454 $\mu\text{g g}^{-1}$, EDXRF e NAA, respectivamente (TAB.6.3 e FIG.6.2).

Os valores de $t_{\text{calc}} < t_{\text{crit}}$ (TAB.6.3) para Na, Mg, Cl, K e Ca demonstram que as médias das concentrações obtidas das duas técnicas são estatisticamente iguais. A exceção foi verificada para as médias de Fe (177 ± 7 e $395 \pm 59 \mu\text{g g}^{-1}$, EDXRF e NAA, respectivamente), demonstrando que as médias não podem ser consideradas iguais ($t_{24,23} > t_{1,99}$); esta diferença pode ser atribuída a existência do efeito cromatográfico radial deste elemento.

TABELA 6.3 – Comparação de resultados de sangue total humano.
Volume de deposição: 100 μL , $\mu\text{g g}^{-1}$

Elemento	$\bar{x} \pm u$ EDXRF	$\bar{x} \pm s$ NAA	Intervalos de referência por EDXRF	Intervalos de referência por NAA	t_{calc}
Na	1807 ± 19	1770 ± 290	1788 – 1826	1480 – 2060	1,02
Mg	69 ± 6	57 ± 17	63 – 75	40 – 74	1,81
P	639 ± 37	–	602 – 676	–	–
S	1618 ± 99	–	1519 – 1718	–	–
Cl	2805 ± 62	3020 ± 480	2743 – 2867	2540 – 3500	-1,80
K	1569 ± 61	1610 ± 280	1508 – 1630	1330 – 1890	-0,68
Ca	221 ± 7	233 ± 83	214 – 228	150 – 316	-1,09
Fe	177 ± 7	395 ± 59	170 – 184	336 – 454 *	-24,23
Cu	5 ± 1	–	4 – 6	–	–
Zn	2 ± 1	–	1 – 3	–	–

$t_{\text{crit}} = 1,99$

* Valores determinados em amostras de sangue total de volume 500 μL .

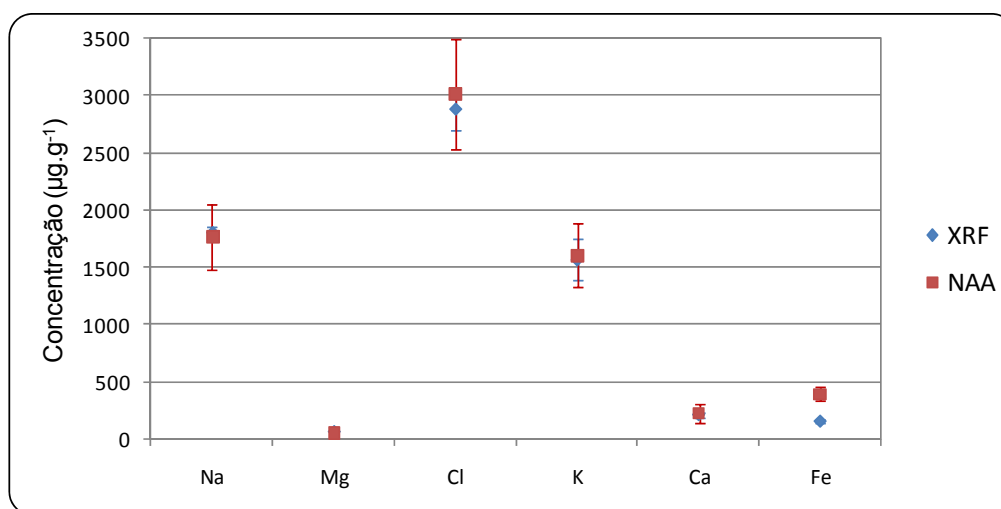


FIGURA 6.2 – Comparação dos resultados das técnicas EDXRF e NAA para amostras de sangue total humano. Volume de deposição: 100 μL .

Avaliação da sensibilidade da técnica de EDXRF para diferentes volumes de deposição

As deposições de 25 μL de sangue total foram preparadas com o objetivo de avaliar a sensibilidade da técnica de fluorescência de raios X para volumes menores. Todos os elementos foram determinados conforme o procedimento anteriormente descrito (TAB.5.1) e também com três repetições de medida para cada amostra (Número de amostras analisadas: 10).

São apresentados, na TAB.6.4, os valores de média e incerteza ($x \pm u$), valores de mediana e valores mínimos e máximos para análise de sangue total humano de volume de deposição 25 μL .

TABELA 6.4 – Análise de sangue total humano. Volume de deposição: 25 μL , $\mu\text{g g}^{-1}$

Elemento	$x \pm u$ EDXRF	Mediana	Valor mínimo	Valor máximo
Na	1799 ± 13	1800	1696	1873
Mg	70 ± 9	72	51	88
P	545 ± 18	531	475	627
S	1329 ± 36	1292	1216	1510
Cl	3040 ± 48	3027	2795	3246
K	1648 ± 20	1658	1531	1714
Ca	199 ± 5	195	182	223
Fe	133 ± 7	129	113	157
Cu	$4,6 \pm 0,2$	4,6	4,0	5,2
Zn	$1,8 \pm 0,1$	1,8	1,5	2,2

Os valores de mediana, mínimos e máximos, apresentados na TAB.6.4, indicam uma distribuição normal dos resultados para todos os elementos determinados.

Os valores da média e incerteza e os intervalos de referência de Na, Mg, P, S, Cl, K, Ca, Fe, Cu e Zn, para deposições de 25 e 100 μL , são apresentados na TAB.6.5 e FIG.6.3. Os valores de referência com deposição de 25 μL encontram-se dentro do intervalo de valores obtidos com a deposição de 100 μL . A comparação entre as duas médias foi realizada aplicando o teste t, para variâncias amostrais estatisticamente iguais (EQ.4.7). Os valores de $t_{\text{calc}} < t_{\text{crit}}$ para Na, Mg, P, S, Cl, K, Ca, Fe, Cu e Zn demonstram que as duas médias são estatisticamente iguais (TAB.6.5).

O resultado demonstra a sensibilidade da técnica de EDXRF, em que um volume menor que a uma gota de sangue total é suficiente para a determinação dos

elementos citados com boa precisão e exatidão. A redução do volume de sangue coletado do paciente é relevante para a Química Clínica; por exemplo, no caso de crianças de baixo peso e para a Medicina Veterinária, no caso de animais de pequeno porte, este tanto para diagnóstico bem como para estudos a longo prazo.

TABELA 6.5 – Intervalos de referência para deposições de 25 μL e 100 μL , $\mu\text{g g}^{-1}$

Elemento	$x \pm u$ 25 μL	$x \pm u$ 100 μL	Intervalos de referência. Deposição: 25 μL .	Intervalos de referência. Deposição: 100 μL .	t_{calc}
Na	1799 \pm 13	1807 \pm 19	1786 – 1813	1788 – 1826	0,302
Mg	70 \pm 9	69 \pm 6	63 – 77	63 – 75	-0,077
P	545 \pm 18	639 \pm 37	526 – 563	602 – 676	1,383
S	1329 \pm 36	1618 \pm 99	1294 – 1365	1519 – 1718	2,048
Cl	3040 \pm 48	2805 \pm 62	2993 – 3088	2743 – 2868	-1,710
K	1648 \pm 20	1569 \pm 61	1628 – 1668	1507 – 1630	-1,007
Ca	199 \pm 5	221 \pm 7	193 – 204	214 – 228	2,007
Fe	133 \pm 7	177 \pm 7	127 – 140	170 – 185	1,956
Cu	4,6 \pm 0,2	4,9 \pm 0,7	4,4 – 4,8	4,2 – 5,6	1,137
Zn	1,8 \pm 0,1	2,1 \pm 0,6	1,7 – 1,9	1,5 – 2,7	1,944

$t_{\text{crit}} = 2,086$

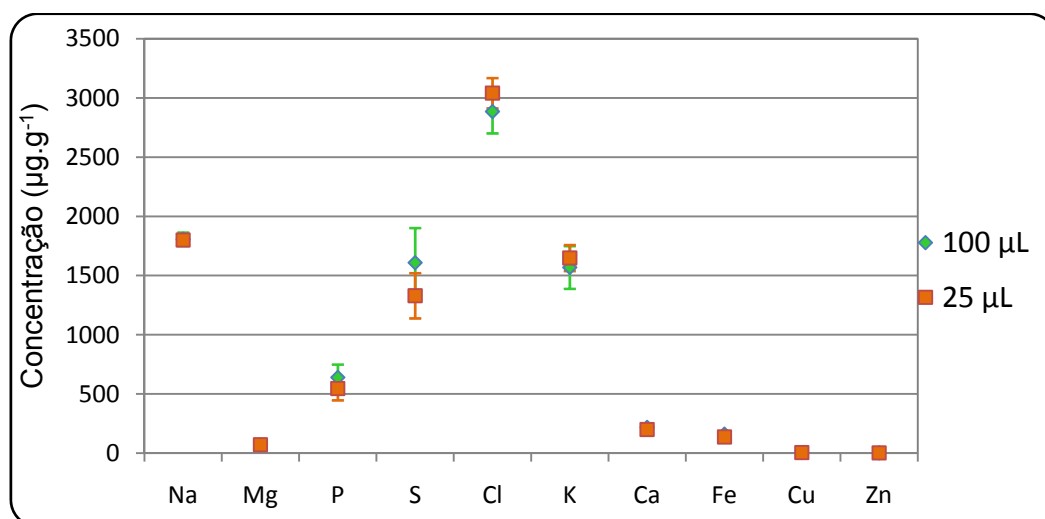


FIGURA 6.3 – Comparação dos resultados de amostras de sangue total humano (volumes de deposição: 100 μL e 25 μL)

6.2. Análise de sangue total de *hamster* dourado, *Mesocricetus auratus*

Foram analisadas 17 amostras de sangue total de *hamster* dourado de volume de deposição 100 μL . Três repetições de medida foram realizadas para cada amostra.

Os valores de média e incerteza ($x \pm u$), valores de mediana e valores mínimos e máximos são apresentados na TAB.6.6.

TABELA 6.6 – Análise de sangue total de *hamster* dourado (*Mesocricetus auratus*).
Volume de deposição: 100 μL , $\mu\text{g g}^{-1}$

Elemento	$x \pm u$ EDXRF	Mediana	Valor mínimo	Valor máximo
Na	1767 ± 52	1768	1636	1868
Mg	65 ± 14	63	44	87
P	1025 ± 55	973	772	1250
S	1484 ± 254	1440	1161	1748
Cl	2820 ± 45	2822	2628	2980
K	2108 ± 140	2108	1954	2377
Ca	233 ± 24	235	207	258
Fe	206 ± 61	194	153	248
Cu	5 ± 1	5	4	6
Zn	4 ± 1	4	2	5

Os valores de mediana e valores mínimos e máximos, quando comparados com a média e incerteza indicam uma distribuição normal para todos os elementos determinados (TAB.6.6).

Na TAB.6.7, são apresentados os valores de média e incerteza ($x \pm u$) e intervalos de referência de Na, Mg, P, S, Cl, K, Ca, Fe, Cu e Zn. Na mesma tabela, são apresentados os intervalos de Na, Mg, S, Cl, K e Ca obtidos pela técnica de NAA. Os resultados mostram que os intervalos obtidos por EDXRF se situam dentro daqueles obtidos por NAA para os elementos Na, Mg, S, Cl, K e Ca (TAB.6.7 e FIG.6.4). A aplicação do teste t, para variâncias amostrais estatisticamente diferentes, demonstrou que as médias obtidas pelas duas técnicas são iguais ($t_{\text{calc}} < t_{\text{crit}}$).

TABELA 6.7 – Comparação de resultados de sangue total de *hamster* dourado (*Mesocricetus auratus*), $\mu\text{g g}^{-1}$

Elemento	$x \pm u$ EDXRF	$x \pm s$ NAA	Intervalos de referência por EDXRF	Intervalos de referência por NAA	t_{calc}
Na	1767 ± 52	1770 ± 370	1714 – 1819	1400 – 2140	-0,01
Mg	65 ± 14	58 ± 16	51 – 79	42 – 74	0,60
P	1025 ± 55	–	970 – 1080	–	–
S	1485 ± 254	1490 ± 260	1231 – 1739	1230 – 1750	-0,03
Cl	2820 ± 45	2930 ± 410	2775 – 2865	2520 – 3340	-1,09
K	2108 ± 140	2070 ± 360	1968 – 2248	1710 – 2430	0,44
Ca	233 ± 24	230 ± 60	209 – 257	170 – 290	0,26
Fe	206 ± 61	–	145 – 267	–	–
Cu	5 ± 1	–	4 – 6	–	–
Zn	4 ± 1	–	3 – 5	–	–

$t_{\text{crit}} = 2,03$

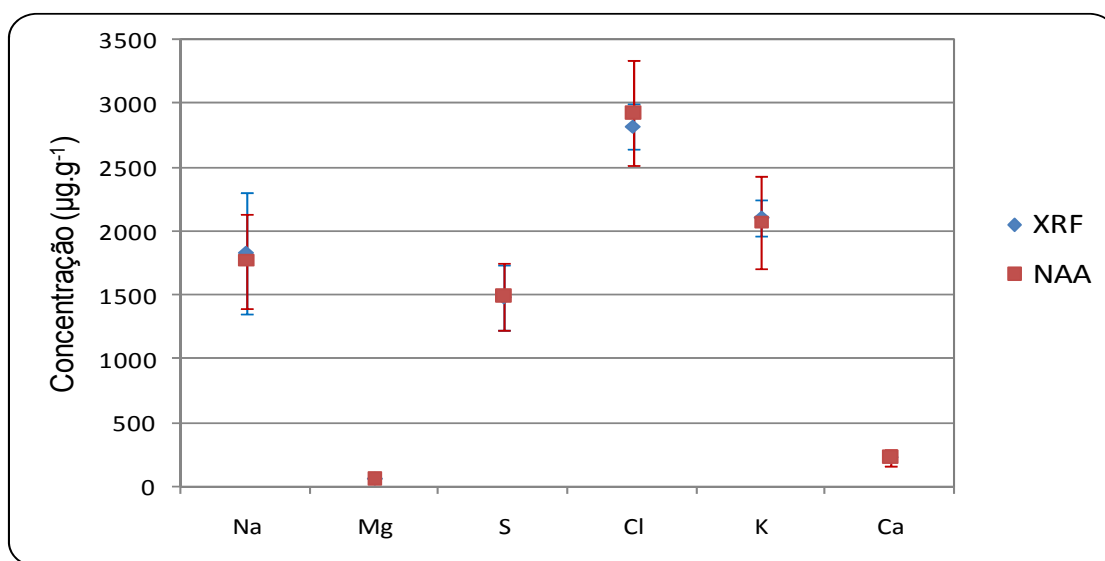


FIGURA 6.4 – Comparação dos resultados das técnicas EDXRF e NAA para amostras de sangue total de *hamster* dourado (*Mesocricetus auratus*)

6.3. Análise de sangue total de cavalo da raça crioula, *Equus caballus*

Foram analisadas 11 amostras de sangue total de cavalo da raça crioula de volume de deposição 100 μL . Três repetições de medida foram realizadas para cada amostra.

Na TAB.6.8, são apresentados valores de média e incerteza ($x \pm u$), valores de mediana e valores mínimos e máximos.

**TABELA 6.8 – Análise de sangue total de cavalo da raça crioula (*Equus caballus*), $\mu\text{g g}^{-1}$.
Volume de deposição: 100 μL , $\mu\text{g g}^{-1}$**

Elemento	$x \pm u$ EDXRF	Mediana	Valor mínimo	Valor máximo
Na	1984 ± 29	1989	1846	2104
Mg	63 ± 12	65	53	85
P	459 ± 16	458	376	548
S	1089 ± 51	1085	985	1236
Cl	2481 ± 93	2438	2100	2737
K	1715 ± 38	1727	1538	1796
Ca	208 ± 5	207	186	218
Fe	174 ± 8	173	147	225
Cu	$4,3 \pm 0,2$	4,2	3,6	5,0
Zn	$2,1 \pm 0,1$	2,0	1,9	2,3

Da mesma forma anterior, os valores de mediana e valores mínimos e máximos, quando comparados com a média e incerteza, indicam uma distribuição normal para todos os elementos.

Na TAB.6.9, são apresentados os valores de média e incerteza ($x \pm u$) e intervalos de referência de Na, Mg, P, S, Cl, K, Ca, Fe, Cu e Zn. Na mesma tabela, encontram-se os intervalos obtidos por NAA. A comparação dos resultados indica que os intervalos de Na, Mg, P, S, Cl, K, Ca, Fe e Zn obtidos por EDXRF se situam dentro dos intervalos obtidos por NAA; exceto Fe, que apresentou valores mais baixos: 166 a 182 e 381 a 689 $\mu\text{g g}^{-1}$, respectivamente para EDXRF e NAA (TAB.6.9 e FIG.6.5).

Seguindo o procedimento anterior, foi aplicado o teste t, para variâncias amostrais estatisticamente diferentes. As médias das concentrações obtidas pelas duas técnicas são estatisticamente iguais para os elementos Na, Mg, P, S, Cl, K, Ca e Zn ($t_{\text{calc}} < t_{\text{crit}}$) (TAB.6.9); exceto para o Fe ($t_{19,562} > t_{2,048}$). Este resultado confirma o efeito

cromatográfico radial observado na determinação de Fe em amostras de sangue total humano.

TABELA 6.9 – Comparação de resultados de sangue total de cavalo da raça crioula (*Equus caballus*), $\mu\text{g g}^{-1}$

Elemento	$\bar{x} \pm u$ XRF	$\bar{x} \pm s$ NAA	Intervalos de referência por EDXRF	Intervalos de referência por NAA	t_{calc}
Na	1984 ± 29	2080 ± 360	1955 – 2013	1720 – 2440	-1,143
Mg	63 ± 12	52 ± 11	51 – 75	41 – 63	1,096
P	459 ± 16	810 ± 590	443 – 476	220 – 1400	-2,041
S	1089 ± 51	1890 ± 450	1038 – 1140	1440 – 2340	-2,002
Cl	2481 ± 93	2600 ± 290	2388 – 2574	2310 – 2890	-0,494
K	1715 ± 38	1940 ± 400	1678 – 1753	1540 – 2340	-2,044
Ca	208 ± 5	229 ± 70	202 – 213	159 – 299	-1,326
Fe	174 ± 8	535 ± 77	166 – 182	458 – 612 *	-19,562
Cu	$4,3 \pm 0,2$	–	4,1 – 4,5	–	–
Zn	$2,1 \pm 0,1$	$3,0 \pm 0,9$	2,0 – 2,2	2,1 – 3,9	2,043

$t_{\text{crit}} = 2,048$

* Valores determinados em amostras de sangue total de volume 500 μL .

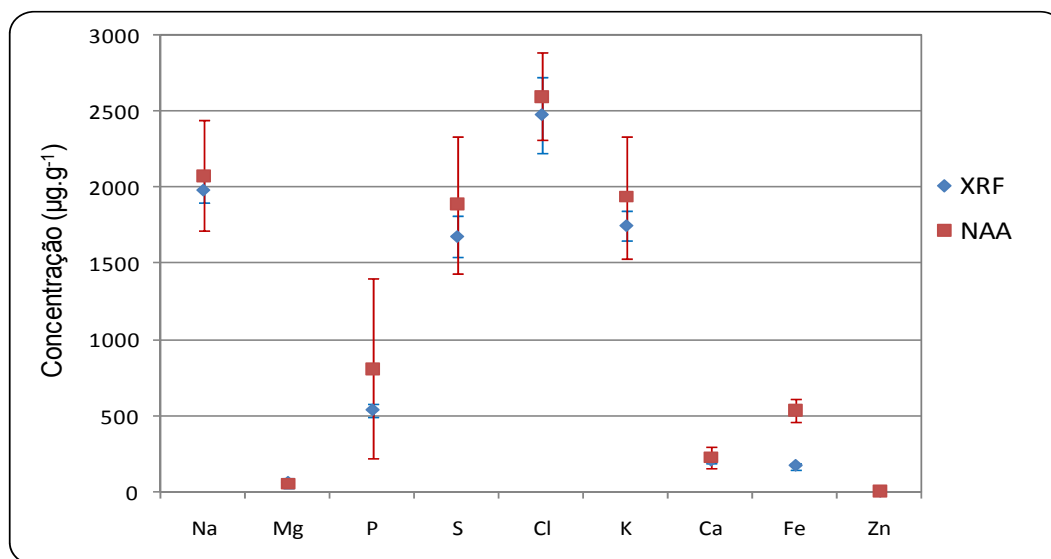


FIGURA 6.5 – Comparação dos resultados das técnicas EDXRF e NAA para amostras de sangue total de cavalo da raça crioula (*Equus caballus*)

7. CONCLUSÕES

Neste trabalho, foi estabelecido um método de análise para amostras de sangue total humano e animais de experimentação (*hamster* dourado, *Mesocricetus auratus*, e cavalo da raça crioula, *Equus caballus*) utilizando a técnica de fluorescência de raios X de dispersão de energia (EDXRF). Os resultados indicam que as condições de medida, estabelecidas no espectrômetro e a curva de sensibilidade experimental, obtida pelo método de Parâmetros Fundamentais, foram adequadas para a determinação dos elementos químicos inorgânicos Na, Mg, P, S, Cl, K, Ca, Cu e Zn. Ainda, a preparação de amostra de sangue, na forma de deposição em papel de filtro, apresenta vantagens como:

- requerimento de pequenas quantidades de amostras (<100 μL);
- facilidade e reprodutibilidade na preparação das amostras;
- realização de análise multielementar;
- facilidade no processo de descarte/disposição de amostras analisadas (rejeito);
- econômico por rapidez na execução das análises e por não necessitar de reagentes químicos.

A comparação de diferentes volumes de deposição (100 e 25 μL) demonstrou a sensibilidade da técnica de EDXRF, em que um volume menor que a uma gota de sangue (25 μL) é suficiente para a determinação dos elementos, acima citados, com boa precisão e exatidão.

Os intervalos de referência determinados por EDXRF para a população brasileira saudável endossam os valores determinados por NAA.

Os intervalos de referências determinados por EDXRF para as espécies de animais *hamster* dourado (*Mesocricetus auratus*) e cavalo da raça crioula (*Equus caballus*) são concordantes com os valores obtidos por NAA. Estes resultados consolidam os valores obtidos pela última técnica e demonstram que as duas apresentam o mesmo desempenho na análise de sangue total humano e de animais de experimentação.

ANEXO A – Coeficiente de sensibilidade experimental para as linhas de emissão características

$$I_m = f \cdot I_t$$

Na qual:

I_m : Intensidade medida

I_t : Intensidade teórica

f: coeficiente de sensibilidade

Elemento	f	Condição	Linha de emissão
Na	0,6948	Determinado	Na-K α
Mg	0,2300	Determinado	Mg-K α
Al	0,5760	Interpolado	Al-K α
Si	0,9220	Interpolado	Si-K α
P	1,2680	Determinado	P-K α
S	2,3712	Determinado	S-K α
Cl	2,8376	Determinado	Cl-K α
Ar	2,9102	Interpolado	Ar-K α
K	2,9827	Determinado	K-K α
Ca	12,0343	Determinado	Ca-K α
Sc	10,3361	Interpolado	Sc-K α
Ti	8,6379	Interpolado	Ti-K α
V	6,9398	Interpolado	V-K α
Cr	5,2416	Interpolado	Cr-K α
Mn	3,5434	Determinado	Mn-K α
Fe	2,7489	Determinado	Fe-K α
Co	2,7136	Interpolado	Co-K α
Ni	2,6784	Interpolado	Ni-K α
Cu	2,6432	Determinado	Cu-K α
Zn	2,3018	Determinado	Zn-K α
Ga	5,1114	Interpolado	Ga-K α
Ge	7,9210	Interpolado	Ge-K α
As	10,7306	Interpolado	As-K α
Se	13,5402	Determinado	Se-K α
Br	11,9200	Interpolado	Br-K α
Kr	10,2997	Interpolado	Kr-K α
Rb	8,6795	Interpolado	Rb-K α
Sr	7,0592	Interpolado	Sr-K α
Y	5,4389	Interpolado	Y-K α
Zr	3,8187	Interpolado	Zr-K α
Nb	2,1984	Interpolado	Nb-K α
Mo	0,5782	Determinado	Mo-K α

ANEXO B – Curva de sensibilidade experimental

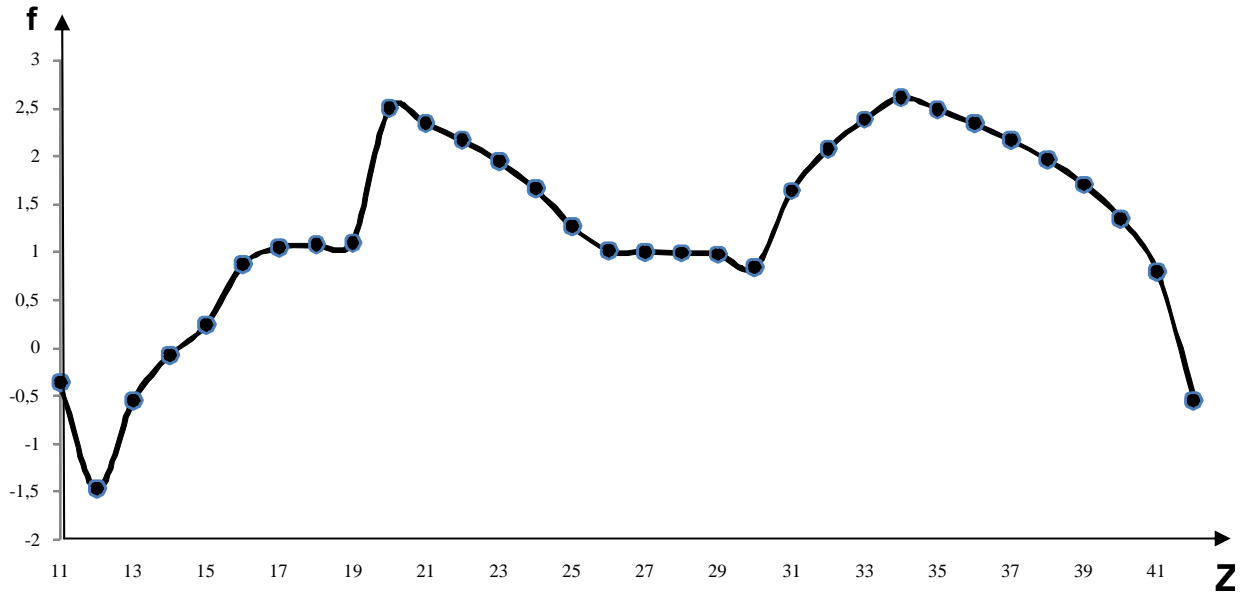


Figura B – Curva de sensibilidade experimental

APÊNDICE A - Correspondência entre a nomenclatura Siegbahn e IUPAC das radiações características de emissão

Siegbahn	IUPAC	Siegbahn	IUPAC	Siegbahn	IUPAC
$K\alpha_1$	$K-L_3$	$L\alpha_1$	L_3-M_5	$L\gamma_1$	L_2-N_4
$K\alpha_2$	$K-L_2$	$L\alpha_2$	L_3-M_4	$L\gamma_2$	L_1-N_2
$K\beta_1$	$K-M_3$	$L\beta_1$	L_2-M_4	$L\gamma_3$	L_1-N_3
$K\beta_2^I$	$K-N_3$	$L\beta_2$	L_3-N_5	$L\gamma_4$	L_1-O_3
$K\beta_2^{II}$	$K-N_2$	$L\beta_3$	L_1-M_3	$L\gamma'_4$	L_1-O_2
$K\beta_3$	$K-M_2$	$L\beta_4$	L_1-M_2	$L\gamma_5$	L_2-N_1
$K\beta_4^I$	$K-N_5$	$L\beta_5$	$L_3-O_{4,5}$	$L\gamma_6$	L_2-O_4
$K\beta_4^{II}$	$K-N_4$	$L\beta_6$	L_3-N_1	$L\gamma_8$	L_2-O_1
$K\beta_{4x}$	$K-N_4$	$L\beta_7$	L_3-O_1	$L\gamma'_8$	$L_2-N_{6(7)}$
$K\beta_5^I$	$K-M_5$	$L\beta'_7$	$L_3-N_{6,7}$	$L\eta$	L_2-M_1
$K\beta_5^{II}$	$K-M_4$	$L\beta_9$	L_1-M_5	Ll	L_3-M_1
		$L\beta_{10}$	L_1-M_4	Ls	L_3-M_3
		$L\beta_{15}$	L_3-N_4	Lt	L_3-M_2
		$L\beta_{17}$	L_2-M_3	Lu	$L_3-N_{6,7}$
				Lv	$L_2-N_{6(7)}$
				$M\alpha_1$	M_5-N_7
				$M\alpha_2$	M_5-N_6
				$M\beta$	M_4-N_6
				$M\gamma$	M_3-N_5
				$M\zeta$	$M_{4,5}-N_{2,3}$

(Jenkins, 1999)

APÊNDICE B – Material de referência certificado NIST 1577c - Bovine liver

Element	Unit	Mass Fraction	Element	Unit	Mass Fraction
Ag ^(A,B,b,C)	µg/kg	5.9 ± 1.6	Mn ^(A,a,b,D,d)	mg/kg	10.46 ± 0.47
As ^(C)	µg/kg	19.6 ± 1.4	Mo ^(A,a,b,C,D,d)	mg/kg	3.30 ± 0.13
Ca ^(A,a,D,d)	mg/kg	131 ± 10	Na ^(A,a,d)	%	0.2033 ± 0.0064
Cd ^(C,E)	µg/kg	97.0* ± 1.4	Ni ^(B,b,c)	µg/kg	44.5 ± 9.2
Co ^(A,a,b)	mg/kg	0.300 ± 0.018	Pb ^(E)	µg/kg	62.8 ± 1.0
Cr ^(A)	µg/kg	53 ± 14	S ^(a,D,d,F)	%	0.749 ± 0.034
Cu ^(A,a,C,D,d)	mg/kg	275.2 ± 4.6	Se ^(A,E)	mg/kg	2.031 ± 0.045
Fe ^(A,a,D)	mg/kg	197.94 ± 0.65	Sr ^(B,b,d)	µg/kg	95.3 ± 4.2
K ^(A,a,d,F)	%	1.023 ± 0.064	V ^(c,d,G)	µg/kg	8.17 ± 0.66
Mg ^(A,a,D,d)	mg/kg	620 ± 42	Zn ^(A,a,D,E,h)	mg/kg	181.1 ± 1.0

*Alternate statistical method [6]

Analytical techniques used for assignment of certified values; capital letters indicate that the method was used by NIST.

- (A,a) Instrumental neutron activation analysis (INAA)
- (B,b) Inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS)
- (C,c) Radiochemical neutron activation analysis (RNAA)
- (D,d) Inductively coupled plasma optical emission spectrometry (ICP-OES)
- (E) Isotope dilution inductively coupled plasma mass spectrometry (ID ICP-MS)
- (F) Prompt gamma activation analysis (PGAA)
- (G) Pre-concentration pre-separation neutron activation analysis (PNAA)
- (h) Solid-sampling graphite furnace atomic absorption spectrometry (SS-GFAAS)
- (I) Isotope dilution cold vapor inductively coupled plasma mass spectrometry (ID/CV ICP-MS)

APÊNDICE C – Material de referência certificado IAEA-A-13 – Animal blood

Recommended Values (Based on dry weight)

Element	Recommended Value mg/kg	95% Confidence Interval mg/kg	N*
Br	22	19 – 24	13
Ca	286	226 – 332	18
Cu	4.3	3.7 – 4.8	32
Fe	2400	2200 – 2500	34
K	2500	2100 – 2700	18
Na	12600	11600 – 13500	19
Rb	2.3	1.7 – 3.1	10
S	6500	6000 – 7000	4
Sc	0.24	0.15 – 0.31	7
Zn	13	12 – 14	34

* Number of accepted laboratory results which were used to calculate the recommended values and confidence intervals about the median value.

Element	Information Value mg/kg	95% Confidence Interval mg/kg	N*
Mg	99	81 – 139	16
Ni	1.0	0.6 – 1.4	4
P	940	690 – 1120	5
Pb	0.18	0.15 – 0.29	5

APÊNDICE D – Valores críticos e critérios para cálculo do Teste Q de Dixon

$N \backslash \alpha$.30	.20	.10	.05	.02	.01	.005	Criterion
3	.684	.781	.886	.941	.976	.988	.994	$r_{10} = \frac{x_N - x_{N-1}}{x_N - x_1}$
4	.471	.560	.679	.765	.846	.889	.926	
5	.373	.451	.557	.642	.729	.780	.821	
6	.318	.386	.482	.560	.644	.698	.740	
7	.281	.344	.434	.507	.586	.637	.680	
8	.318	.385	.479	.554	.631	.683	.725	$r_{11} = \frac{x_N - x_{N-1}}{x_N - x_2}$
9	.288	.352	.441	.512	.587	.635	.677	
10	.265	.325	.409	.477	.551	.597	.639	
11	.391	.442	.517	.576	.638	.679	.713	$r_{21} = \frac{x_N - x_{N-2}}{x_N - x_2}$
12	.370	.419	.490	.546	.605	.642	.675	
13	.351	.399	.467	.521	.578	.615	.649	
14	.370	.421	.492	.546	.602	.641	.674	$r_{22} = \frac{x_N - x_{N-2}}{x_N - x_3}$
15	.353	.402	.472	.525	.579	.616	.647	
16	.338	.386	.454	.507	.559	.595	.624	
17	.325	.373	.438	.490	.542	.577	.605	
18	.314	.361	.424	.475	.527	.561	.589	
19	.304	.350	.412	.462	.514	.547	.575	
20	.295	.340	.401	.450	.502	.535	.562	
21	.287	.331	.391	.440	.491	.524	.551	
22	.280	.323	.382	.430	.481	.514	.541	
23	.274	.316	.374	.421	.472	.505	.532	
24	.268	.310	.367	.413	.464	.497	.524	
25	.262	.304	.360	.406	.457	.489	.516	

Referências bibliográficas

- AGUIAR, R. O. *Determinação de elementos em sangue total de hamster dourado usando AAN*. 2009. Dissertação (Mestrado) – Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares – IPEN/CNEN/SP, São Paulo, 72 p. Disponível em: <<http://www.teses.usp.br>> Acesso em: 23 agosto 2010.
- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. *Requisitos gerais para a competência de laboratórios de ensaio e de calibração*. Rio de Janeiro: ABNT, 2005. (NBR-17025)
- BAIN, B. J. *Células sanguíneas: um guia prático*. 4 ed. Porto Alegre: Artmed, 2007.
- BAPTISTA, T. S. *Valores de referência de elementos em sangue de cavalos da raça crioula via metodologia nuclear*. 2010. Dissertação (Mestrado) – Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares – IPEN/CNEN/SP, São Paulo, 81 p. Disponível em: <http://pelicano.ipen.br/PosG30/TextoCompleto/Tatyana%20Spinosa%20Baptista_M.pdf> Acesso em: 11 de janeiro 2011.
- BAPTISTA, T. S.; REDÍGOLO M. M.; ZAMBONI C. B.; SATO, I. M.; MARCELINO, J. R. Inorganic elements determination in whole blood from Crioula breed horse by analytical nuclear techniques (NAA and EDXRF) In: 13th INTERNATIONAL CONFERENCE ON MODERN TRENDS IN ACTIVATION ANALYSIS, March13-18, 2011, Texas, USA. No prelo.
- BECKHOFF, B.; KANNGIEßER, B.; LANGHOOF, N.; WEDELL, R.; WOLFF, H. *Handbook of Practical X-Ray Fluorescence Analysis*. 1 ed. Berlin-London: Springer, 2006.
- BERTIN, E. P. *Principles and practice of x-ray spectrometric analysis*. New York: Plenum Press, 1970.
- BISHOP, M. L.; FODY, E. P.; SCHOEFF, L. *Clinical Chemistry: principles, procedures, correlations*. 5 ed. Lippincott Williams & Wilkins, 2005.
- BOLETIM FAPESP **Ataques com animais peçonhentos dobram em dez anos**. Disponível em: <<http://www.agencia.fapesp.br/13679>> Acesso em: 7 de abril de 2011.

- BRASIL. Portaria n 2135, de 22 de dezembro de 1994. *Aprova alterações na Portaria 1376/93 de 19.11.93, que aprova Normas Técnicas para coleta, processamento e transfusão de sangue, componentes e derivados*. Disponível em: <<http://www.prosangue.sp.gov.br/prosangue/actionlegislacaocomp.do>> Acesso em: 31 de agosto de 2010.
- BRASIL. Lei n 10205, de março de 2001. *Regulamenta o § 4º do art. 199 da Constituição Federal, relativo à coleta, processamento, estocagem, distribuição e aplicação do sangue, seus componentes e derivados, estabelece o ordenamento institucional indispensável à execução adequada dessas atividades, e dá outras providências*. Disponível em: <http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/Leis/LEIS_2001/L10205.htm>, Acesso em: 31 de agosto de 2010.
- BUHRKE, V. E.; JENKINS, R.; SMITH, D. K. *Practical guide for the preparation of specimens for x-ray fluorescence and x-ray diffraction analysis*. New York: John Wiley, 1998.
- CARVALHO, M. L.; BRITO, J.; BARREIROS, M. A. Study of trace element concentrations in human tissues by EDXRF spectrometry. *X-ray spectrom.* v. 27, p. 198-204, 1998.
- CARVALHO, M. L.; MAGALHÃES, T.; BECKER, M.; VON BOHLEN, A. Trace elements in human cancerous and healthy tissues. A comparative study by EDXRF, TXRF, synchrotron radiation and PIXE. *Spectrochim. Acta. Part B*, v. 62. p. 1004-1011, 2007.
- CRISS, J. W.; BIRKS, L. S. Calculation methods for fluorescent x-ray spectrometry. Empirical coefficients versus fundamental parameters. *Anal. Chem.* v. 40. p. 1080-1086, 1968.
- CUSTÓDIO, P. J. CARVALHO, M. L.; NUNES, F.; PEDROSO, S.; CAMPOS, A. Direct analysis of human blood (mothers and newborns) by energy dispersive X-ray fluorescence. *J. Trace elements in Med. Biol.*, v.19, p. 151-158, 2005.
- DIXON, W. J. Processing data for Outliers. *Biometrics*, v. 9 (1), p. 74 – 89, 1953.

- EURACHEM/COOPERATION ON INTERNATIONAL TRACEABILITY IN ANALYTICAL CHEMISTRY. *Quantifying uncertainty in analytical measurement*. 2nd edition. London, 2000.
- FRISK, P.; DARNERUD, P. O.; FRIMAN, G.; BLOMBERG, J.; ILBÄCK, N. Sequential trace element changes in serum and blood during a common viral infection in mice. *Trace. Elem. Med. Biol.*, v. 21, p. 29 – 36, 2007.
- FUNDAÇÃO NACIONAL DA SAÚDE. *Manual de diagnóstico e tratamento de acidentes por animais peçonhentos*. 2^a edição. 2001. Disponível em: <http://www.ivb.rj.gov.br/palestras/manu_peconhentos.pdf>, Acesso em: 11 de novembro de 2010.
- HAN, X. Y.; ZHUO, S, J.; SHEN, R. X.; WANG, P. L.; JI, A. Comparison of the quantitative results corrected by fundamental parameter method and difference calibration specimens in x-ray fluorescence spectrometry. *J. Quant. Spect, Rad. Trans.* v. 97, p. 68-74, 2006.
- HONG, N. T.; HA, H. V. Application of EDXRF to the determination of lead and other trace elements in the body fluids of industrial workers in Vietnam. *X-ray Spectrom.* v. 25, p. 3-14, 1996.
- INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA, NORMALIZAÇÃO E QUALIDADE INDUSTRIAL. *Vocabulário Internacional de Metrologia: conceitos fundamentais e gerais e termos associados*. 1^a Ed. Rio de Janeiro, 2009. (VIM 2008)
- INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA, NORMALIZAÇÃO E QUALIDADE INDUSTRIAL. *Orientação sobre validação de métodos de ensaios analíticos*. 2^a revisão, 2007(DOQ-CGCRE-008)
- JANSSENS, K., X-ray based methods of analysis In: JANSSENS, K.; VAN GRIEKEN, R. (Ed.) *Comprehensive Analytical Chemistry - Non-destructive Micro Analysis of Cultural Heritage Materials*. Elsevier p. 129 – 226, 2004.
- JENKINS, R. *Quantitative x-ray spectrometry*. New York: Marcel Dekker, 1988.
- JENKINS, R.; MANNE, R.; ROBIN, R.; SENEMAUD, C. Part VIII Nomenclature system for x-ray spectroscopy. *Pure Appl. Chem.* v. 63, p. 735-746, 1991.

- JURAN, J. M.; GRZYNA, F. M. *Quality control handbook*. 4 ed. New York: Plenum Press, 1988.
- KATAOKA, Y. Standardless x-ray fluorescence spectrometry – Fundamental parameters method using sensitivity library. *The Rigaku J.*, v. 6 (1), p. 33-39, 1989.
- KOVACS, L.; ZAMBONI, C. B.; OLIVEIRA, L.; SALVADOR, V. L. R.; SATO, I. M.; AZEVEDO, M. R. Analysis of serum and whole blood using NAA for clinical investigation. *J. Radioanal. Nucl. Chem.* v. 278, p. 585-589, 2008.
- KHUDER, A.; BAKIR, M. A.; KARJOU, J.; SAWAN, M. Kh. XRF and TXRF techniques for multi-element determination of trace elements in whole blood and human hair samples. *J. Radioanal. Nucl. Chem.* v. 273, p. 435-442, 2007.
- LACHANCE, G. R.; CLAISSE F. *Quantitative x-ray fluorescence analysis: Theory and application*. England: John Wiley & Sons, 1994.
- LEWIS, L. D.; OLIVEIRA, P. M. A. (trad.) *Nutrição clínica equina: alimentação e cuidados*. São Paulo: Roca, 2000.
- LINS, P. S. *Padronização de metodologia nuclear para determinação da concentração de ferro em amostras de sangue total*. 2004. Dissertação (Mestrado) - Universidade de Santo Amaro, São Paulo. 58 p. Resumo disponível em: <<http://www.capes.gov.br>>, Acesso em: 23 de agosto de 2010.
- MÜLLER, R. *Spectrochemical analysis by x-ray fluorescence*. New York: Plenum Press, 1972.
- NAGATA, N.; BUENO, M. I. M. S. Métodos matemáticos para correção de interferências espectrais e efeitos interelementos na análise quantitativa por fluorescência de raios X. *Quim. Nova* v. 24, n. 4, p. 531 – 539, 2001.
- NETO, B. B.; SCARMINIO, I. S.; BRUNS, R. E. *Como fazer experimentos: pesquisa e desenvolvimento na ciência e na indústria*. 4ª ed. Porto Alegre: Bookman, 2010.
- OLIVEIRA, L. C.; ZAMBONI, C. B.; LINS, P. S.; AZEVEDO, M. R. The chlorine reference value in whole blood using ANAA. *Brazilian J. of Phys.* v. 35, n. 3b, p. 793-796, 2005.

- OLIVEIRA, L. C.; ZAMBONI, C. B.; GENEZINI, F. A.; FIGUEIREDO, A. M. G.; ZAHN, G. S. Use of Thermal Neutrons to Perform Clinical Analyses in Blood and Urine Samples. *J. Radioanal. Nucl. Chem.* v. 263, p. 783-786, 2005.
- OLIVEIRA, L. C. *Estudo da distribuição de metais e íons em sangue via metrologia nuclear*. 2008. Tese (Doutoramento) – Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares – IPEN-CNEN/SP, São Paulo, 80 p. Disponível em: < <http://www.teses.usp.br> > Acesso em: 23 agosto 2010.
- PARSONS, P. J.; BARBOSA, F. Atomic spectrometry and trends in clinical laboratory medicine. *Spectrochim. Acta B*, V. 62, p. 992-1003, 2007.
- REDÍGOLO, M. M.; ZAMBONI, C. B.; SALVADOR, V. L. R.; SATO, I. M. Inorganic elements determination in whole blood from healthy Brazilian individuals by EDXRF technique. In: SARX 2008 - XI LATIN AMERICAN SEMINAR OF ANALYSIS BY X-RAY TECHNIQUES. November 16-20, 2008, Rio de Janeiro, Brazil. Proceedings, no prelo.
- REDÍGOLO, M. M.; AGUIAR, R. O.; ZAMBONI, C. B.; SCAPIN, M. A.; SALVADOR, V. L. R.; SATO, I. M. Inorganic elements determination in laboratory animals whole blood samples by EDXRF technique. In: EXRS – EUROPEAN CONFERENCE ON X-RAY SPECTROMETRY. June 20-25, 2010, Coimbra, Portugal. Proceedings No prelo.
- REIS, E. **Estatística descritiva**, 1ª ed, Lisboa, Sílabo, 1991.
- ROUSSEAU, R. Detection limit and estimate of uncertainty of analytical XRF results. *The Rigaku J.* v. 18(2); p. 33-47, 2001.
- SCHWARTZ, B. S.; HU, H. Adult lead exposure: Time for change. *Envr. Health Persp.* v. 115, p. 451-454, 2007.
- SHERMAN, J. The theoretical derivation of fluorescent X-ray intensities from mixtures. *Spectrochim. Acta*, v. 7, p. 283-306, 1955.
- SHIRAIWA, T.; FUJINO, N. Theoretical calculation of fluorescent x-ray intensities in fluorescent x-ray spectrochemical analysis. *Jpn. J. Appl. Phys.* v. 5, p. 886-899, 1966.
- TAYLOR, A; BRANCH, S.; DAY, M. P.; PATRIARCA, M.; WHITE, M. Clinical and biological materials, foods and beverages. *J. Anal. Spectrom.* v.25, p. 453-492, 2010.
- TENG, W.; SUN, W.; SHI, L.; HOU, D.; LIU, H. Effects of restraint stress on iron, zinc, calcium and magnesium whole blood levels in mice. *Biol. Trace Elem. Res.*, v. 121, p. 243 – 248, 2008.

- TSUJI, K; INJUK, J.; VAN GRIEKEN, R. *X-ray spectrometry: recent technological advances*. 1 ed. Wiley, 2004.
- VERRASTO, T. (coord.) *Hematologia Hemoterapia: fundamentos de morfologia, fisiologia, patologia e clínica*. 1 ed. Atheneu, 1998.
- WEST, M.; ELLIS, A. T.; POTTS, P. J.; STRELLI, C.; VANHOOF, C.; WEGRZYNEK, D.; WOBRAUSCHEK, P. Atomic spectrometry update. X-ray fluorescence spectrometry. *J. Anal. At. Spectrom.*, v. 24, p. 1289-1326, 2009.
- WIEDMEYER, C. E.; RUBEN, D.; FRANKLIN, C. Complete blood count, clinical chemistry, and serology profile by using a single tube of whole blood from mice. *J. Am. Assoc. Lab. Anim.*, v. 46, n. 2, p. 59 – 64, 2007.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION. *WHO Guidelines for the production control and regulation of snake antivenom immunoglobulins*. 2010. Disponível em: <<http://www.who.int/bloodproducts/snakeantivenoms>> Acesso em: 11 de novembro de 2010.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION. *Snake antivenoms*. 2010. Disponível em: <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs337/en/index.html>> Acesso em: 11 de novembro de 2010.
- ZAMBONI, C. B.; ZAHN, G. S.; SANT'ANNA, O. A. Trace elements at whole blood of distinct mouse lines by using NAA. *J. Radioanal. Nucl. Chem.*, v. 884, p. 509-512, 2007.
- ZAMBONI, C. B.; SUZUKI, M. F.; METAIRON, S.; CARVALHO, M. D. F.; SANT'ANNA, O. A. Investigation of whole blood of SJL/J mice using neutron activation analysis. *J. Radioanal. Nucl. Chem.*, v. 281, p. 97 – 99, 2009.
- ZSCHORNACK, G. *Handbook of X-Ray Data*, Berlin: Springer, 2007.