



AUTARQUIA ASSOCIADA A UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

**Comparação de desempenho do espectrômetro portátil de Fluorescência de Raios-X
utilizando alvos de Au e Ag para análise de amostras na área da saúde**

ÓRION GIOVANE TASSO

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

Orientadora:

Profa. Dra. Cibele Bugno Zamboni

São Paulo

2022

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

**Comparação de desempenho do espectrômetro portátil de Fluorescência
de Raios X utilizando alvos de Au e Ag para análise de amostras na área
da saúde**

Versão Corrigida
Versão Original disponível no IPEN

ÓRION GIOVANE TASSO

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

Orientadora: Cibele Bugno Zamboni

São Paulo
2022

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Como citar:

TASSO, O. G. . ***Comparação de desempenho de espectrômetro portátil de fluorescência de raios X utilizando alvos de Au e Ag para análise de amostras na área da saúde***. 2022. 51 f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia Nuclear), Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, IPEN-CNEN, São Paulo. Disponível em: <<http://repositorio.ipen.br/>> (data de consulta no formato: dd/mm/aaaa)

Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema de geração automática da Biblioteca IPEN, com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Tasso, Orion Giovane

Comparação de desempenho de espectrômetro portátil de fluorescência de raios X utilizando alvos de Au e Ag para análise de amostras na área da saúde / Orion Giovane Tasso; orientadora Cibele Bugno Zamboni. -- São Paulo, 2022.
51 f.

Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Tecnologia Nuclear (Aplicações) -- Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, São Paulo, 2022.

1. FRX. 2. Dosagem de Íons. 3. Urina. 4. Soro. 5. Clinical Tests. I. Zamboni, Cibele Bugno, orient. II. Título.

FOLHA DE APROVAÇÃO

AUTOR: Órion Giovane Tasso

Titulo: Comparação de desempenho do espectrômetro portátil de Fluorescência de Raio X utilizando alvos de Au e Ag para análise de amostras na área da saúde

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Tecnologia Nuclear da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências

Data: 21\11\2022

Banca Examinadora

Prof. Dr.: Cibele Bugno Zamboni

Instituição: IPEN- Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares

Julgamento: APROVADO

Prof. Dr.: Dalton Giovanni Nogueira da Silva

Instituição: Faculdade Estácio Julgamento: APROVADO

Prof. Dr.: Simone Michaela Simons

Instituição: Instituto Butantan Julgamento: APROVADO

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

AGRADECIMENTO

Agradeço a Dra. Cibele Bugno Zamboni minha orientadora, que com toda a dedicação e paciência sempre me auxiliou e orientou nestes anos de mestrado, agradeço todos os colegas do Laboratório de Espectroscopia e Espectrometria das Radiações, do Centro de Reator de Pesquisas, onde recebi muito apoio e incentivos durante o mestrado.

RESUMO

Tasso, Órion G. **Comparação de desempenho do espectrômetro portátil de Fluorescência de Raios X utilizando alvos de Au e Ag para análise de amostras na área da saúde. 2022.** 51p. Dissertação (Mestrado em Tecnologia Nuclear) Instituto de Pesquisa de Energéticas e Nucleares – IPEN – CNEN/SP. São Paulo

Este trabalho teve por objetivo avaliar o desempenho do espectrômetro portátil e compacto de Fluorescência de Raios X (pFRX), para análise de elementos químicos em amostras biológicas de interesse na área da saúde humana (prioritariamente fluidos corpóreos como soro e urina) bem como para medicina veterinária, utilizando alvos de prata (Ag) e ouro (Au). O foco das comparações foi direcionado às análises quantitativas de elementos de relevância clínica e nutricional (prioritariamente a dosagem de Ca, Cl, Fe, K, P e S). Para este estudo foram avaliados, para cada alvo, os parâmetros: linearidade, reprodutibilidade, acurácia, sensibilidade e limite de detecção. Essas investigações permitiram a realização de um estudo comparativo entre os alvos com a finalidade de fornecer subsídios que permitem a escolha adequada do alvo (Ag e/ou Au), agilizando as medidas além de fornecer resultados mais precisos.

Palavras-chave: FRX, dosagem de íons, urina, soro, teste clínico

ABSTRACT

This study aimed to evaluate the performance of the portable and compact X-ray Fluorescence spectrometer (pXRF) for the analysis of chemical elements in biological samples of interest in the health area (primarily body fluids, such as, serum and urine) as well as for veterinary medicine using targets of the Silver (Ag) and Gold (Au). The focus of the comparisons was directed to the quantitative analysis of elements of clinical and nutritional relevance (mainly the dosage of Ca, Cl, Fe, K, P, S, Br and Zn). For this study, the following parameters were evaluated (for each target): linearity, reproducibility, accuracy, sensitivity and detection limit. These investigations made it possible to carry out a comparative study between the targets in order to provide subsidies that allow the appropriate choice of the target (Ag and/or Au), speeding up measurements in addition to providing more accurate results.

Word Keys: XRF, ion dosage, urine, serum, clinical test

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Exames empregados na prática clínica convencional.....	12
Tabela 2 - Determinação da sensibilidade (S), limite de detecção (LD) e desvio padrão relativo (DPR) para Ca, Cl, Fe, K, P, S, Br e Zn (solução padrão).....	27
Tabela 3 - Concentrações dos elementos medidos em soro pela técnica de FRXDE, usando alvos de Ag e Au, e pela técnica de AAN.....	32
Tabela 4 - Concentrações dos elementos medidos em urina pela técnica de FRXDE, usando alvos de Ag e Au, e pela técnica de AAN.....	34

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Rato Wistar (esquerda); detalhes da dimensão da amostra (direita)....	19
Figura 2 - Detalhes do posicionamento da amostra (solução padrão) e geometria de detecção. Dimensão do arranjo compacto de FRX e das amostras em tamanho real.	20
Figura 3- Tela ilustrativa do software Amptek Mini-X Controller.....	21
Figura 4 - Tela ilustrativa do software de aquisição de dados: Dcc MCA Digital Acquisition.....	22
Figura 5 - Tela ilustrativa do software WinQXAS para análise de soro.....	22
Figura 6 - Retas de calibração do espectrômetro de FRX utilizando alvos de Ag e Au para Ca (100 - 600 $\mu\text{g mL}^{-1}$)	23
Figura 7 - Retas de calibração do espectrômetro de FRX utilizando alvos de Ag e Au para Cl (500 - 1000 $\mu\text{g mL}^{-1}$)	24
Figura 8 - Retas de calibração do espectrômetro de FRX utilizando alvos de Ag e Au para K (500 - 1000 $\mu\text{g mL}^{-1}$)	24
Figura 9 - Retas de calibração do espectrômetro de FRX utilizando alvos de Ag e Au para Fe (100 - 500 $\mu\text{g mL}^{-1}$).....	25
Figura 10 - Retas de calibração do espectrômetro de FRX utilizando alvos de Ag e Au para P (500 - 1000 $\mu\text{g mL}^{-1}$)	25
Figura 11 - Retas de calibração do espectrômetro de FRX utilizando alvos de Ag e Au para S (500 - 1000 $\mu\text{g mL}^{-1}$)	26
Figura 12 - Sensibilidade para os elementos P, S, Cl, K, Ca e Fe, para os alvos Ag e Au, utilizando pFRX	28
Figura 13 – Limite de Detecção (LD) para os elementos P, S, Cl, K, Ca e Fe, para os alvos Ag e Au, utilizando pFRX	29
Figura 14 – Valores de Z-score para os elementos P, S, Cl, K, Ca e Fe, para os alvos Ag e Au, utilizando pFRX.....	29
Figura 15 - Espectro de soro usando o espectrômetro de FRX na condição otimizada para o alvo Ag. O pico Argônio (Ar) é devido à sua presença no ar.	30
Figura 16 - Espectro de soro usando o espectrômetro de FRX na condição otimizada para o alvo Au. O pico Argônio (Ar) é devido à sua presença no ar.	31
Figura 17 - Comparativo das concentrações de P em soro pela técnica de FRXDE para os alvos de Ag e Au.	36
Figura 18 - Comparativo das concentrações de S em soro pelas técnicas de FRXDE (para os alvos de Ag e Au) e AAN.	36

Figura 19 - Comparativo das concentrações de Cl em soro pelas técnicas de FRXDE (para os alvos de Ag e Au) e AAN.	37
Figura 20 - Comparativo das concentrações de K em soro pelas técnicas de FRXDE (para os alvos de Ag e Au) e AAN.	37
Figura 21 - Comparativo das concentrações de Ca em soro pelas técnicas de FRXDE (para os alvos de Ag e Au) e AAN.	38
Figura 22 - Comparativo das concentrações de Fe em soro pelas técnicas de FRXDE (para os alvos de Ag e Au) e AAN.	38
Figura 23 - Comparativo das concentrações de P em urina pelas técnicas de FRXDE (para os alvos de Ag e Au).....	39
Figura 24 - Comparativo das concentrações de S em urina pelas técnicas de FRXDE (para os alvos de Ag e Au) e AAN.	39
Figura 25 - Comparativo das concentrações de Cl em urina pelas técnicas de FRXDE (para os alvos de Ag e Au) e AAN.	40
Figura 256 - Comparativo das concentrações de K em urina pelas técnicas de FRXDE (para os alvos de Ag e Au) e AAN.	40
Figura 27 - Comparativo das concentrações de Ca em urina pelas técnicas de FRXDE (para os alvos de Ag e Au) e AAN.	41
Figura 28 - Comparativo das concentrações de Fe em urina pelas técnicas de FRXDE (para os alvos de Ag e Au) e AAN.	41

LISTA DE ABREVIATURAS

AAN: Análise por Ativação com Nêutrons

CERPq: Centro do Reator de Pesquisas

CNEN: Comissão Nacional de Energia Nuclear

FRX: Fluorescência de Raios X

FRXDE: Fluorescência de Raios X por Dispersão de Energia

IPEN: Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares

LEER: Laboratório de Espectroscopia e Espectrometria das Radiações

pFRX: Espectrômetro portátil de Fluorescência de Raios X

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	11
1.1 Motivação.....	13
1.2 Objetivo.....	13
2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....	15
2.1 Metodologia de Fluorescência de Raios X por Dispersão de Energia (FRXDE)	15
2.2 Avaliação do Desempenho do Espectrômetro Portátil de FRX.....	16
3 PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL	19
3.1 Preparo das amostras.....	19
3.1.1 Solução Padrão Certificada	19
3.1.2 Amostras biológicas de soro e urina	19
3.2 Espectrômetro de Fluorescência de Raios X.....	20
3.3 Aquisição e Análise de Dados	21
4 RESULTADOS	23
4.1 Avaliação do Desempenho do Espectrômetro Compacto de FRX	23
4.2 Análise das amostras biológicas de soro e urina	30
6 CONCLUSÃO	44
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	45
8 ANEXOS	48

1 INTRODUÇÃO

Os íons e metais são indispensáveis ao organismo e, embora estejam presentes em pequenas quantidades, participam de vários processos metabólicos e fisiológicos.

A presença de íons e metais no corpo humano pode ser aferida em análises laboratoriais convencionais de soro, plasma e urina e em análises destrutivas como as biópsias, sendo que a acurácia de cada método de análise varia de elemento para elemento. O diagnóstico tradicional de certas disfunções que afetam significativamente a população brasileira, como por exemplo, anemia, cardiopatias, distúrbios renais e outros, bem como os exames clínicos periódicos (clínica preventiva, de pré-diagnóstico e/ou de acompanhamento de tratamento) podem demandar dias para obtenção do resultado sendo, para boa parte da população, um processo oneroso. No caso das análises convencionais [1], como os exames bioquímicos realizados em fluidos corpóreos (**Tabela 1**), nota-se que a sua execução requer quantidades de amostra de no mínimo 0,5mL de soro/plasma/urina (por exame), bem como a necessidade de refrigeração das amostras [2,3], além de ser um procedimento destrutivo. Portanto, a busca por processos de análises bioquímicas que possam minimizar os interferentes pré-analíticos (transporte e armazenamento com refrigeração) e com isso permitir um diagnóstico mais rápido, preciso e com menor custo, é de fundamental importância em prática clínica. Isso motivou a busca por metodologias alternativas.

Nos últimos anos o Laboratório de Espectroscopia e Espectrometria das Radiações (LEER), do Centro do Reator de Pesquisas (CERPq/IPEN), tem utilizado a técnica de Análise por Ativação com Nêutrons (AAN [2], para a investigação de íons e metais em fluidos corpóreos como alternativa para análise clínica [3,4,5,6,7]. Essas medidas são realizadas utilizando feixe de nêutrons gerados no Reator de Pesquisa IEA-R1 do IPEN. A principal vantagem do uso da técnica de AAN está relacionada com a possibilidade do uso de pequena quantidade de fluido corpóreo (100 a 500 μ L) quando comparado com a análise convencional, ~1ml em média [1].

Tabela 1 - Exames empregados na prática clínica convencional.

Clínica Convencional / Tipo análise	Material Biológico / Quantidade	Elemento medido / Método [1]	Diagnósticos [8, 9]
Cálcio / monoelementar	soro /urina 0,5 mL	Ca / Eletrodo de Íon Seletivo- soro; Colorimétrico - urina	Distúrbios do metabolismo de Ca, como doenças neurológicas, ósseas (osteoporose ou osteopenia) e do rim (cálculo renal) (soro e urina); Doença de Paget, intoxicação por vitamina D, sarcoidose (urina)
Cloro / monoelementar	soro / urina 0,5 mL	Cl / Eletrodo de Íon Seletivo-soro; Colorimétrico- urina	Avaliação da pressão osmótica, do equilíbrio hídrico, eletrolítico e ácido básico (soro); avaliação do metabolismo hidro-salino para controle de diuréticos (urina)
Ferro / monoelementar	soro / urina 1,0 mL	Fe / Colorimétrico-soro Química seca - urina	Avaliação de anemia ferropriva, hemocromatose (soro); anemia hipocrômicas microcíticas (urina)
Potássio / monoelementar	soro / urina 1,0 mL	K / Eletrodo de Íon Seletivo - soro Potenciométrico - soro e urina	Avaliação do equilíbrio hídrico, eletrolítico e ácido básico (soro e urina); nefropatias (insuficiência renal), cetoacetose diabética (soro)
Fosforo / monoelementar	soro / urina 1,0 mL	P / Colorimétrico	Avaliação de insuficiência renal, menopausa mieloma múltiplo, metástases ósseas, deficiência de vitamina D (soro); hipoparatiroidismo (urina)
Bromo / monoelementar	sangue 3,0 mL	Br / Colorimétrico	Avaliação de alterações psicóticas do comportamento.
Zinco / monoelementar	soro 2,0 mL/ urina 50 mL	Zn / Enzimático colorimétrico	Avaliação de insuficiência cardíaca crônica, osteosarcoma ou aterosclerose (soro); toxicidade e deficiência (urina).
Br, Ca, Cl, Fe, K, P, S, Zn/ multielementar	soro / urina < 50 µL	Ca, Cl, K, Fe, P e S / FRXDE **	Diagnósticos acima citados

** Fluorescência de Raios X por Dispersão de Energia

Fonte: Autor, 2022.

O bom desempenho do método nuclear (AAN) motivou a procura por um procedimento alternativo que viabiliza-se sua execução fora das dependências do Reator de Pesquisa IEA-R1 do IPEN. Com base nesta necessidade a técnica de Fluorescência de Raios X (FRX) vem sendo testada no LEER visando agregar a possibilidade de utilizar equipamento portátil de FRX.

O presente estudo foi direcionado a investigar o desempenho de um espectrômetro portátil e compacto de FRX (pFRX), para avaliação quantitativa de elementos químicos entre $14 < Z < 35$ (isto é, para elementos de número atômico entre P e Br) utilizando alvos de Ag e Au, associado a um detector Si Drift e sem a necessidade de vácuo (medidas em atmosfera de ar). Esta região ($14 < Z < 35$) abrange elementos de relevância clínica e nutricional, tais como, P (Z= 15), S (Z= 16), Cl (Z= 17), K (Z= 19), Ca (Z= 20), Fe (Z= 26), Zn (Z= 30), Br (Z= 35).

O desempenho do espectrômetro pFRX foi verificado, para cada alvo (Ag e Au), por meio da avaliação dos parâmetros: linearidade, reprodutibilidade, sensibilidade e limite de detecção, normalmente considerados para procedimentos de validação em métodos analíticos [4,5,10,11].

1.1 Motivação

Com a proposta de selecionar o alvo que melhor atenda às necessidades de medida (dosagens de íons) em amostras de fluidos corpóreos (soro e urina) foi realizada uma investigação comparativa do desempenho do espectrômetro de FRX, para cada alvo (Ag e Au), com foco na determinação quantitativa de elementos de relevância clínica e nutricional (prioritariamente Ca, Cl, K, Fe, P, S, Br e Zn). Para essas avaliações foram utilizadas soluções certificadas e amostras de fluidos corpóreos de soro e urina disponíveis no Banco de Amostras Biológicas do Laboratório de Espectroscopia e Espectrometria das Radiações (LEER do CERPq) do IPEN.

1.2 Objetivo

Realizar um estudo comparativo do desempenho do espectrômetro pFRX, fazendo uso de alvos de Ag e Au, para avaliação multielementar de amostras líquidas depositado em substrato de papel.

Este estudo faz parte de uma linha de pesquisa multidisciplinar, de âmbito Institucional, denominado “*Estudo da Distribuição de Íons e Metais em Amostras Biológicas: obtenção dos valores de referência*”, em andamento no LEER (IPEN) em colaboração com Bancos de Sangue e Laboratórios Hematológicos de diferentes regiões do Brasil, Universidades e centros de Pesquisas.

2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1 Metodologia de Fluorescência de Raios X por Dispersão de Energia (FRXDE)

A técnica de FRXDE é baseada na excitação de uma amostra por raios X provenientes de um tubo de raios X. A interação deste feixe de raios X com a amostra faz com que o material (os elétrons na amostra) seja excitado e, no processo de desexcitação, raios X característicos do material são emitidos [12,13]. Utilizando-se detectores específicos para detecção de raios X é possível detectar e identificar os elementos químicos presentes no material analisado. Os detectores mais utilizados são os semicondutores do tipo “Silicon Drift” que possuem alta resolução (energia), ou seja, a habilidade de separar as transições energéticas K_{α} – K_{β} ou L_{α} – L_{β} dos raios X característicos dos elementos presentes na amostra analisada, facilitando deste modo a análise quali-quantitativa.].

A quantificação dos elementos químicos presentes no material analisado é determinada utilizando a seguinte equação:

$$I = C \cdot S \cdot A'$$

onde:

C representa a concentração (em fração);

I a intensidade líquida;

S a sensibilidade do dado elemento;

A' representa o fator de absorção, podendo ser igual a 1 para amostras finas ou igual:

$\frac{1}{\chi\rho_0 D}$ para amostras espessas, sendo:

ρ_0 a densidade

D a espessura da matriz

χ o coeficiente de absorção total da matriz, dado pela equação:

$$\chi = \frac{\mu_0}{\text{sen}(\theta_0)} + \frac{\mu}{\text{sen}(\theta)}$$

onde μ_0 e μ são os coeficientes de absorção da matriz para as energias das radiações incidente e do raio-X característico, respectivamente

θ_0 e θ são os ângulos das radiações incidente e emergente, respectivamente, em relação à superfície da amostra.

Particularmente no caso de análise de amostras líquidas depositadas em papel pode-se considerar as amostras como finas facilitando sua quantificação. Pode-se também associar nesta análise o uso de padrões líquidos com concentrações conhecidas que irão auxiliar a análise quantitativa através de relação linear entre a medida do padrão e amostra analisada [14].

2.2 Avaliação do Desempenho do Espectrômetro Portátil de FRX

A performance do espectrômetro pFRX foi verificada pela avaliação dos parâmetros: linearidade, reprodutibilidade, acurácia, sensibilidade e limite de detecção utilizando solução padrão certificada [10, 11, 14].

Linearidade: O procedimento matemático conhecido como regressão linear é utilizado para estimar os coeficientes angular (a) e linear (b) da curva de calibração, usualmente expressa por:

$$Y = a_x + b$$

onde:

Y: intensidade do analítico (medido experimentalmente)

x: a concentração da solução padrão

Precisão: Pode ser avaliada pela repetição das medidas em circunstâncias similares. A precisão do método é considerada satisfatória quando os valores de desvio padrão relativo (DPR) é abaixo de 10%.

$$\text{DPR \%} = \text{DP}_{\text{det}} / V_{\text{det}}$$

onde

SD_{det} : desvio padrão do valor determinado experimentalmente

V_{det} : Valor determinado experimentalmente

Acurácia ou exatidão: Pode ser verificada a partir do teste Z-score que avalia a concordância das medidas em fornecer resultados próximo ao valor verdadeiro (de um padrão certificado). A avaliação do teste Z-score é considerada satisfatória para valores de $|Z| < 2$; valores de $2 < |Z| < 3$ são questionáveis; valores de $|Z| > 3$ são insatisfatórios.

$$\text{Z-score} = (V_{\text{det}} - V_{\text{cert}}) / \sqrt{(\text{DP}_{\text{det}}^2 + \text{DP}_{\text{cert}}^2)}$$

onde:

V_{det} : Valor determinado

V_{cert} : Valor certificado

SD: Desvio Padrão

Sensibilidade (S_i): para cada elemento (i) será obtido pela relação

$$S_i = \frac{I_i}{C_i}$$

onde:

I_i é a intensidade do raio X característico (expresso pela área) de cada elemento inorgânico (i);

C_i é a concentração associada a cada elemento;

Limite de detecção: É a menor concentração que pode ser determinada (distinguida da radiação de fundo) com acurácia e precisão.

$$\text{LD} = \frac{3}{S_i} \sqrt{I_{\text{BG}}} / t$$

onde:

LD = Limite de detecção para o analito

I_{BG} = Intensidade (cps) do background sob o pico do analito

S_i = sensibilidade do analito

t = tempo de excitação/detecção.

3 PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

3.1 Preparo das amostras

3.1.1 Solução Padrão Certificada

O procedimento para o preparo das amostras reduz-se a depositar (gotejar) uma gota de solução padrão em papel de filtro (Whatman – nº 42). As amostras (solução padrão) foram preparadas em duplicata.

3.1.2 Amostras biológicas de soro e urina

O mesmo procedimento foi empregado para o preparo das amostras de soro e urina. Para este estudo foram utilizadas amostras de 3 ratos Wistar (Figura 1, provenientes do Banco de Amostras Biológicas do LEER. Essas amostras compõem um estudo direcionado à análise de elementos químicos em soro e urina de ratos Wistar (animal de experimentação) que foram submetidos a insuficiência renal aguda (IRA), uma queda abrupta no fluxo sanguíneo renal. As amostras de soro e urina foram coletadas antes, durante e após a indução de IRA [15], em triplicata.

Figura 2 – Rato Wistar (esquerda); detalhes da dimensão da amostra (direita)



3.2 Espectrômetro de Fluorescência de Raios X

O espectrômetro portátil de FRX (modelo X-123 SDD Complete X-Ray Spectrometer - Amptek®) é constituído de um mini tubo de raio X, cujo alvo pode ser de Ag ou Au, com tensões variáveis de 10 a 50 kV e corrente de 5-200 μA , associado a um detector semicondutor de silício do tipo “Si Drift” (25 mm² x 500 μm) com janela de Berílio de 12,5 μm), o qual é acoplado a um sistema de refrigeração. Esta adaptação (refrigeração do detector) foi feita para possibilitar o uso do espectrômetro por longos períodos (horas consecutivas de aquisição); trata-se de uma recomendação do fabricante. As medidas foram realizadas em atmosfera de ar. O espectrômetro pesa ~ 750 g e o conjunto espectrômetro mais computador requer pouco espaço (**Figura 2**).

Figura 2 - Detalhes do posicionamento da amostra (solução padrão) e geometria de detecção. Dimensão do arranjo compacto de FRX e das amostras em tamanho real.



Fonte: Autor, 2022.

3.3 Aquisição e Análise de Dados

As medidas de FRXDE foram realizadas utilizando as amostras depositadas em papel de filtro. As intensidades fluorescentes foram detectadas e os espectros construídos usando softwares dedicados [16]:

- I. *Software Amptek Mini-X Controller*: permite o controle do tubo de raios X, definindo valores para diferença de potencial (kV) e corrente aplicada (μA) (**FIGURA 3**).
- II. *Software Dcc MCA Digital Acquisition*: permite o controle de operação do detector, do multicanal e do amplificador; por este software é possível estabelecer o ganho de amplificação e o tempo de aquisição (**FIGURA 4**).

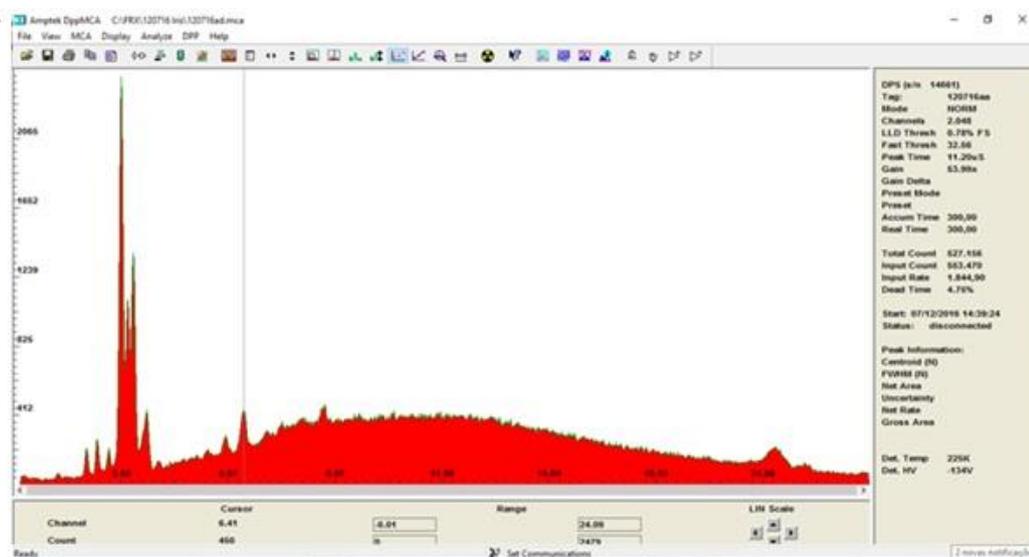
Todas as medidas foram realizadas utilizando a intensidade da linha K_{α} , bem estabelecida na literatura [17]. A análise espectral foi realizada utilizando o programa *WinQxas* [18]. Para ilustrar, na **FIGURA 5** é apresentada uma análise de espectro do soro utilizando alvo de Ag para condição de medida de corrente de $10 \mu\text{A}$, tensão de 40 kV e tempo de contagem de 300 s.

Figura 3- Tela ilustrativa do software *Amptek Mini-X Controller*



Fonte: Autor, 2022.

Figura 4 - Tela ilustrativa do software de aquisição de dados: *Dcc MCA Digital Acquisition*



Fonte: Autor, 2022.

Figura 5 - Tela ilustrativa do software *WinQxas* para análise de sorro



Fonte: Autor, 2022.

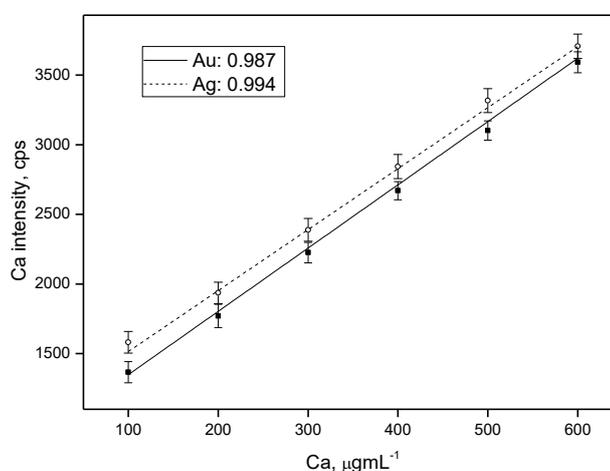
4 RESULTADOS

4.1 Avaliação do Desempenho do Espectrômetro Compacto de FRX

A performance do espectrômetro de FRX foi verificada pela avaliação dos parâmetros: linearidade, reprodutibilidade, acurácia, sensibilidade e limite de detecção utilizando solução padrão certificada [14].

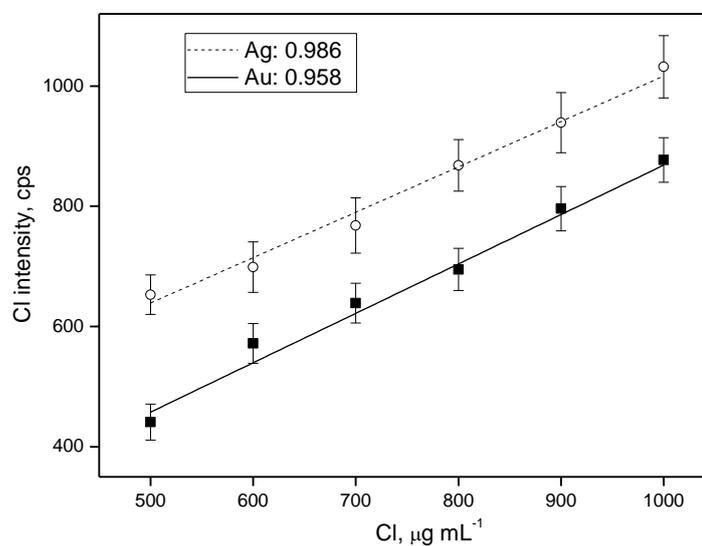
Para a calibração do espectrômetro, utilizando os alvos de Au e Ag, soluções padrão contendo concentrações variadas de Ca, Cl, Fe, K, P e S foram preparadas em duplicata. Para cada amostra de solução padrão, três repetições foram feitas usando 30 kV de corrente de 5 μ A e 300 s de tempo de excitação. As medidas foram realizadas utilizando a intensidade da linha K_{α} . Para ilustrar o comportamento linear dessas calibrações são apresentados as **FIGURAS 6 a 11** que correspondem a calibração do pFRX para os elementos Ca, Cl, K, Fe, P e S, respectivamente. Em cada figura é apresentado o valor do ajuste linear obtido para o alvo de Ag (em linha tracejada) e o valor do ajuste linear obtido para alvo de Au (em linha contínua). Nessas figuras a área (eixo y) é expressa em contagens por segundos (cps) e a concentração dos elementos (eixo x) em $\mu\text{g mL}^{-1}$.

Figura 6 - Retas de calibração do espectrômetro de FRX utilizando alvos de Ag e Au para Ca (100 - 600 $\mu\text{g mL}^{-1}$)



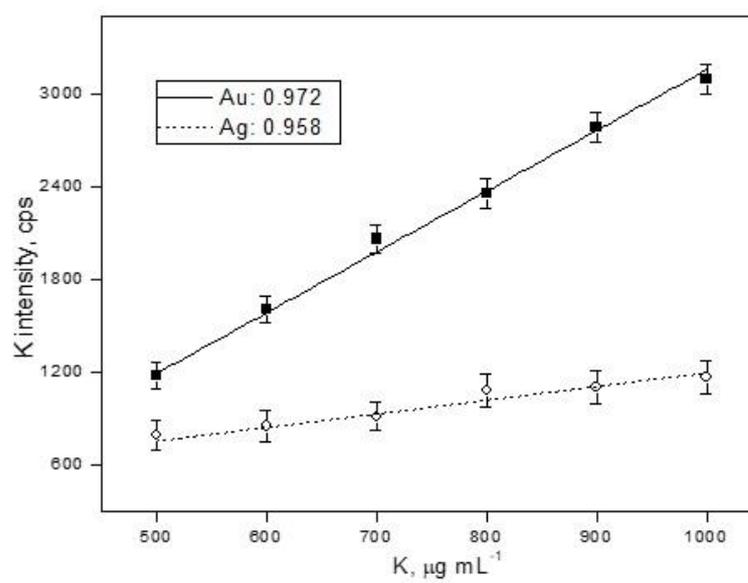
Fonte: Autor, 2022.

Figura 7 - Retas de calibração do espectrômetro de FRX utilizando alvos de Ag e Au para Cl (500 - 1000 $\mu\text{g mL}^{-1}$)



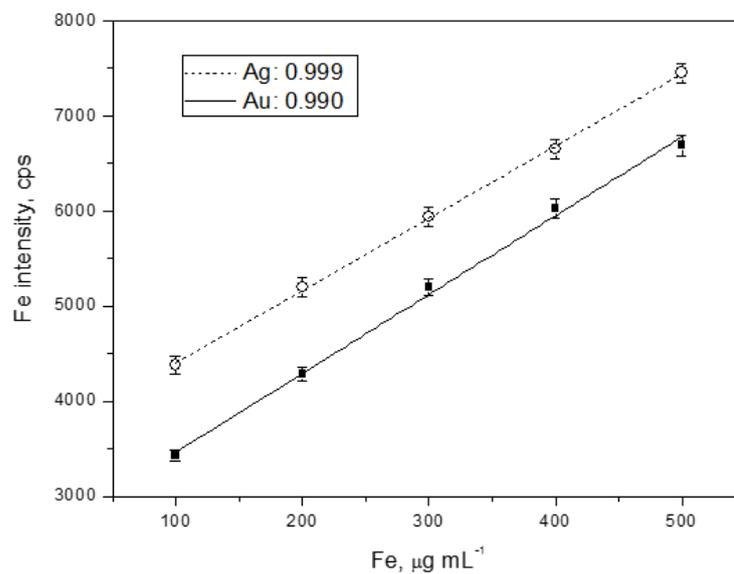
Fonte: Autor, 2022

Figura 8 - Retas de calibração do espectrômetro de FRX utilizando alvos de Ag e Au para K (500 - 1000 $\mu\text{g mL}^{-1}$)



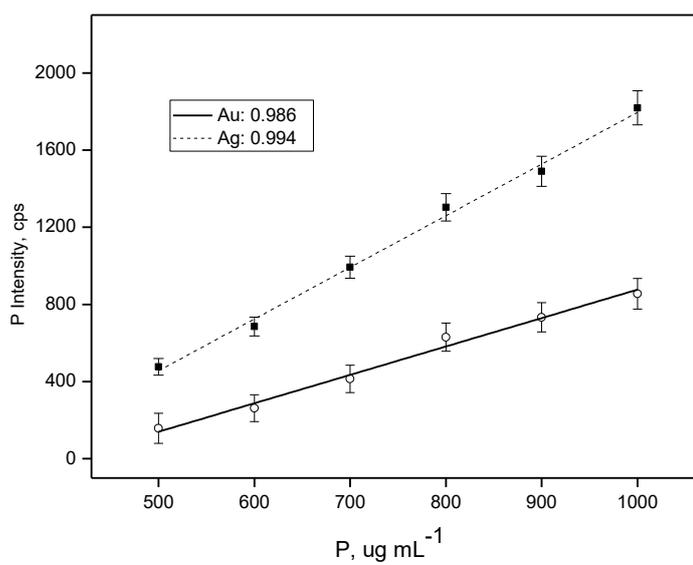
Fonte: Autor, 2022.

Figura 9 - Retas de calibração do espectrômetro de FRX utilizando alvos de Ag e Au para Fe (100 - 500 $\mu\text{g mL}^{-1}$)



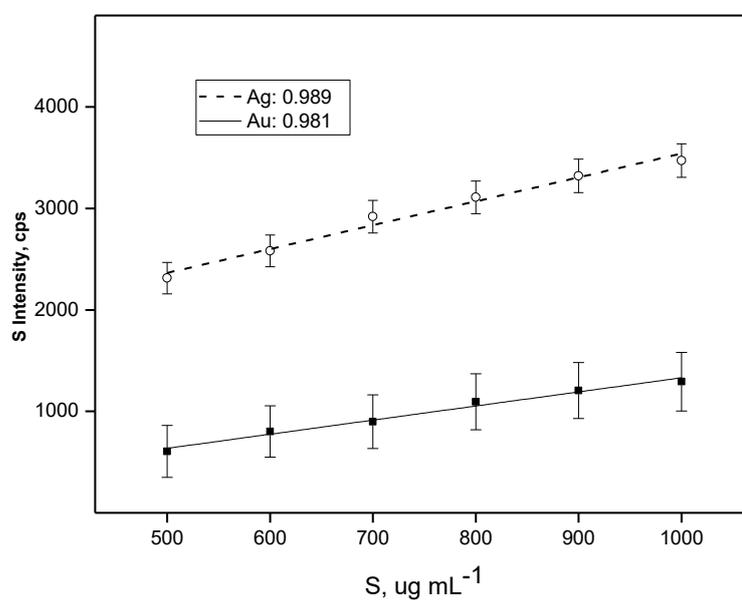
Fonte: Autor, 2022.

Figura 10 - Retas de calibração do espectrômetro de FRX utilizando alvos de Ag e Au para P (500 - 1000 $\mu\text{g mL}^{-1}$)



Fonte: Autor, 2022.

Figura 11 - Retas de calibração do espectrômetro de FRX utilizando alvos de Ag e Au para S (500 - 1000 $\mu\text{g mL}^{-1}$)



Fonte: Autor, 2022.

A precisão do método foi verificada através do cálculo do Desvio Padrão Relativo (DPR, em %) para a concentração de 10 amostras preparadas utilizando solução padrão. Os resultados, expressos pelo valor médio (VM); desvio padrão (DP); sensibilidade (S) e limite de detecção (LD), são apresentados na **Tabela 2**.

Tabela 2 - Determinação da sensibilidade (S), limite de detecção (LD) e desvio padrão relativo (DPR) para Ca, Cl, Fe, K, P, S, Br e Zn (solução padrão)

Elemento, (keV)	$VM_{s \pm 1DP_s}$ $\mu\text{g mL}^{-1}$	$VM_{det \pm 1DP_{det}}$ $\mu\text{g mL}^{-1}$	DPR %	S $\text{cps } \mu\text{g}^{-1}$ mL	LD $\mu\text{g mL}^{-1}$	Z-score
Alvo						
Cl (2,62)						
Ag	1006 ± 5	1003 ± 21	2,1	0,030	218	-0,14
Au		1045 ± 53	5,1	0,054	440	0,73
Ca (3,69)						
Ag	1000 ± 10	986 ± 20	2,0	0,034	449	-0,63
Au		1026 ± 51	5,0	0,017	279	-0,50
K (3,31)						
Ag	1000 ± 10	980 ± 25	2,6	0,038	212	-0,74
Au		1020 ± 51	5,0	0,017	311	0,38
Fe (6,40)						
Ag	10032 ± 54	10050 ± 310	3,1	0,048	301	0,06
Au		10025 ± 64	0,6	0,082	132	-0,08
P (2,02)						
Ag	1000 ± 10	973 ± 71	7,3	0,004	1516	-0,38
Au		924 ± 112	12,1	0,001	3324	-0,68
S (2,31)						
Ag	10100 ± 30	10225 ± 98	1,0	0,003	1890	1,22
Au		10077 ± 149	1,5	0,001	2823	-0,15
Zn (8,64)						
Ag	9990 ± 50	10011 ± 26	0,3	0,045	451	0,37
Au		10214 ± 538	5,3	0,080	342	0,41
Br (11,908)						
Ag	10020 ± 40	10153 ± 294	2,9	0,009	1263	0,45
Au		9404 ± 741	7,9	0,015	766	-0,83

$VM_s \pm 1DP_s$: valores certificados

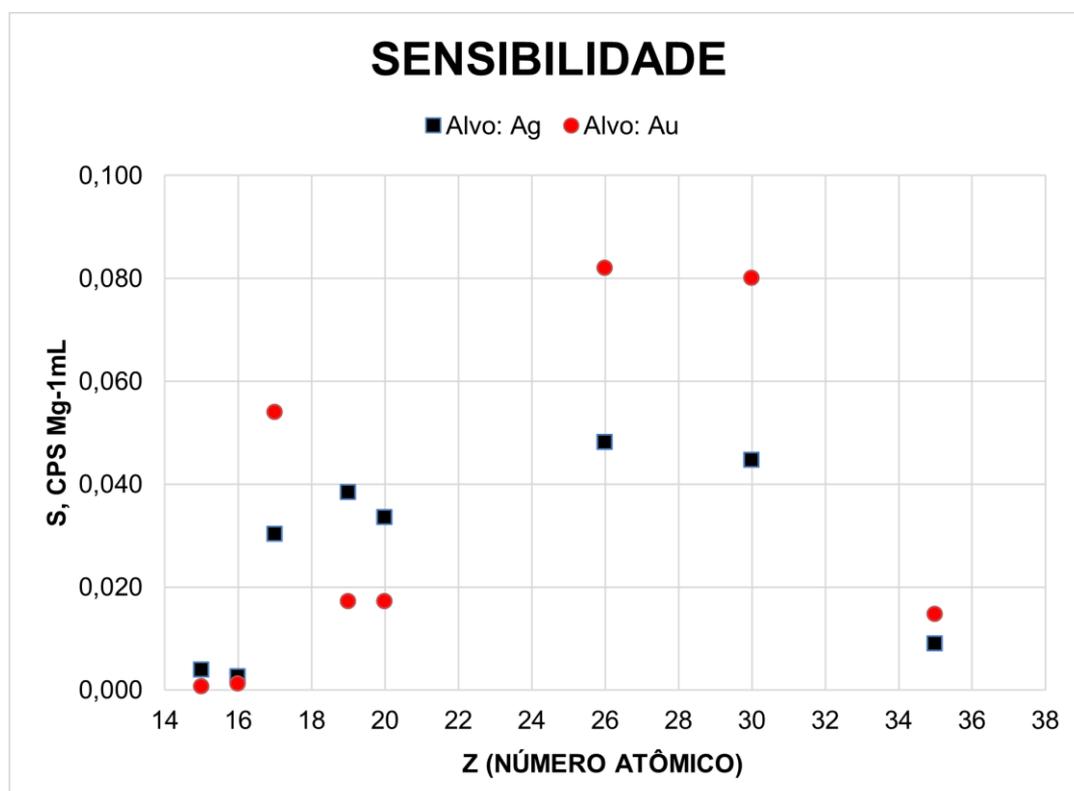
$VM_{det} \pm 1DP_{det}$: valores determinados

Fonte: Autor, 2022.

Na **Tabela 2** os valores determinados ($VM_{det} \pm 1DP_{det}$) são satisfatórios ($-2 < Z < 2$) para todos os elementos em ambos os alvos. Com relação a precisão somente para o P ($K_{\alpha} = 2,02$ keV), utilizando alvo de Au, o DPR está acima de 10%, o que está relacionado com a interferência da linha $M_{\alpha 1}$ (2,1 KeV) proveniente do tubo de Au. Com relação ao Limite de Detecção a utilização do alvo de Ag é significante melhor para região de energia de P ($K_{\alpha} = 2,02$ keV) e S ($K_{\alpha} = 2,31$ keV), o que também está relacionado com a interferência do alvo de Au da linha $M_{\alpha 1}$ (2,1 keV).

O comportamento da Sensibilidade (S) em função do número atômico (Z) é apresentado na **FIGURA 12** e evidencia a maior sensibilidade para Fe (Z=26) em ambos os alvos, o que é compatível com modelo do equipamento em questão (modelo X-123 SDD Complete X-Ray Spectrometer da Amptek®) [10].

Figura 12 - Sensibilidade para os elementos P, S, Cl, K, Ca e Fe, para os alvos Ag e Au, utilizando pFRX



Fonte: Autor, 2022.

Para ilustrar, nas **FIGURAS 13 e 14** são apresentados os valores de limite de detecção (LD) e do parâmetro Z- score, respectivamente.

Figura 13 – Limite de Detecção (LD) para os elementos P, S, Cl, K, Ca e Fe, para os alvos Ag e Au, utilizando pFRX

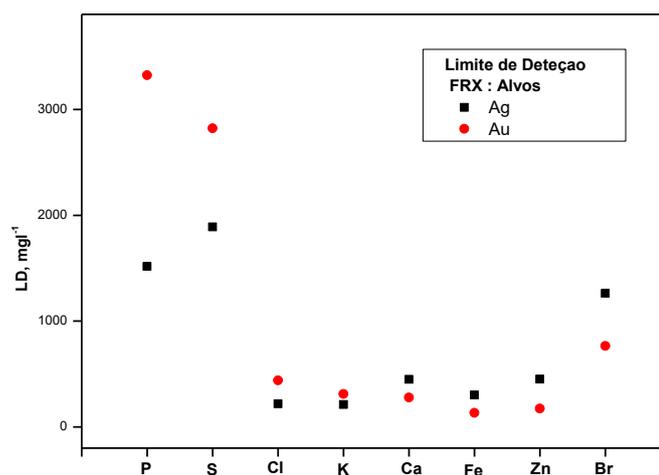
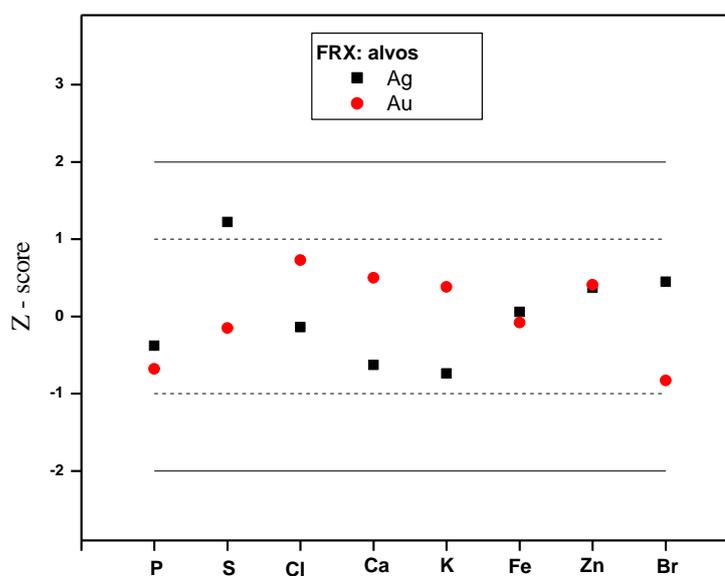


Figura 14 – Valores de Z-score para os elementos P, S, Cl, K, Ca e Fe, para os alvos Ag e Au, utilizando pFRX

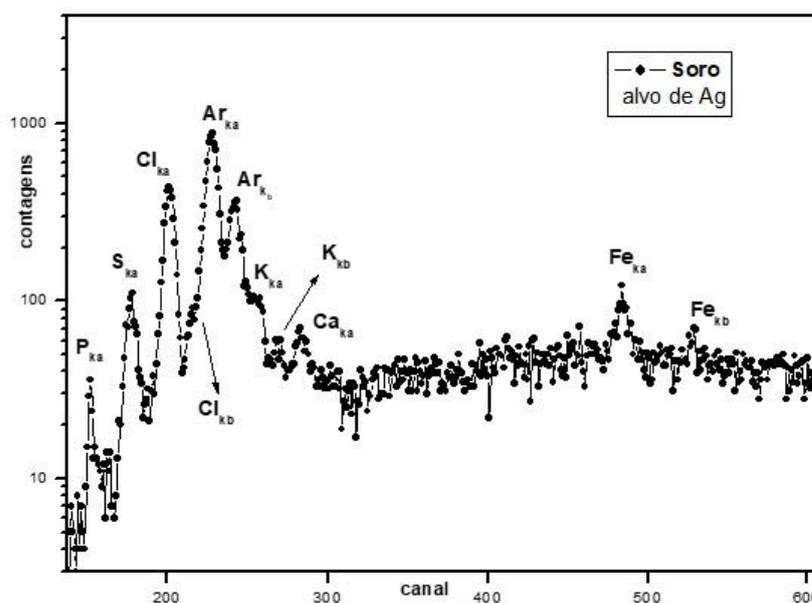


Fonte: Autor, 2022.

4.2 Análise das amostras biológicas de soro e urina

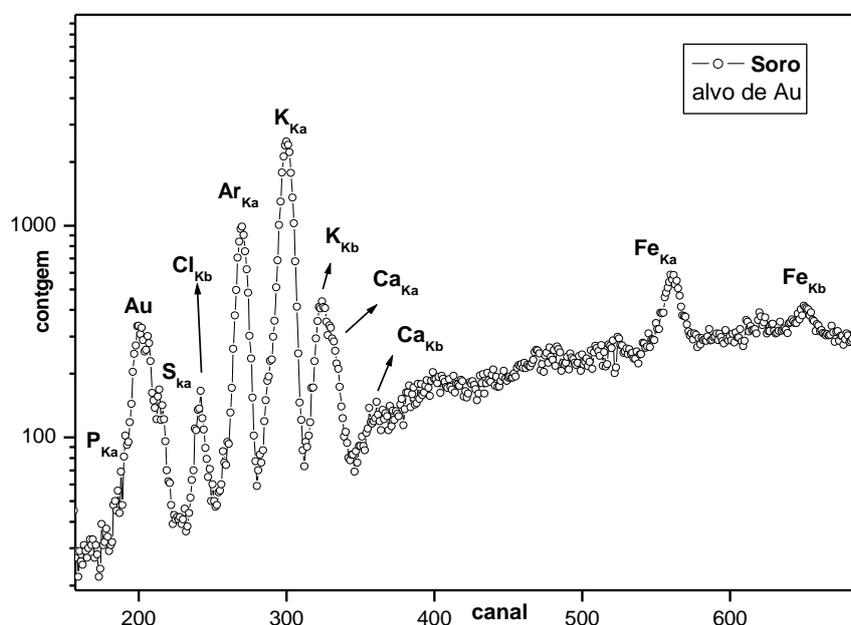
Para realização dessas medidas foram utilizadas amostras de soro e urina de três ratos Wistar, coletadas antes (n_1), durante (n_2) e após (n_3) o procedimento de IRA, em triplicata. As amostras foram submetidas às seguintes condições de excitação: 30 kV e 5 μ A para tempo de excitação de 600 s. Essas medições foram realizadas com o objetivo de estabelecer uma condição de medição otimizada, ou seja, a determinação simultânea de Ca, Cl, Fe, K, P e S. As **FIGURAS 15** e **16** ilustram os espectros de soro usando o espectrômetro de FRX, na condição otimizada de medida (30 kV, 5 μ A, 600 s) para alvos de Ag e Au, respectivamente.

Figura 15 - Espectro de soro usando o espectrômetro de FRX na condição otimizada para o alvo Ag. O pico Argônio (Ar) é devido à sua presença no ar.



Fonte: Autor, 2022.

Figura 16 - Espectro de soro usando o espectrômetro de FRX na condição otimizada para o alvo Au. O pico Argônio (Ar) é devido à sua presença no ar.



Fonte: Autor, 2022.

Nas **Tabelas 3 e 4** as concentrações dos elementos medidos em soro e urina antes (n_1) durante (n_2) e após (n_3) a indução de IRA, usando alvos de Ag e Au, são apresentadas como valor médio (VM) e desvio padrão ($\pm 1DP$) das análises em triplicata. Os dados obtidos pela técnica de Análise por Ativação com Nêutrons AAN foram incluídos para comparação. Para ilustrar, nas **FIGURAS de 17 a 28**, é apresentado um comparativo dos resultados das análises para os elementos determinados em soro e urina pelas técnicas de FRXDE (para os alvos de Ag e Au) e AAN (ANEXO A).

Tabela 3 - Concentrações dos elementos medidos em soro pela técnica de FRXDE, usando alvos de Ag e Au, e pela técnica de AAN

Análise de soro			
Elementos			
n_i	FRX-Ag	FRX-Au	AAN
Ca, g/L			
n_1	0,577 ± 0,035	0,565 ± 0,025	0,644 ± 0,066
n_2	0,350 ± 0,021	0,391 ± 0,018	0,448 ± 0,045
n_3	0,312 ± 0,019	0,381 ± 0,017	0,366 ± 0,037
Cl, g/L			
n_1	3,76 ± 0,17	3,82 ± 0,15	4,07 ± 0,16
n_2	3,53 ± 0,16	3,23 ± 0,13	3,99 ± 0,16
n_3	2,93 ± 0,13	2,97 ± 0,12	2,76 ± 0,11
Fe, g/L			
n_1	0,053 ± 0,003	0,045 ± 0,003	0,059 ± 0,009
n_2	0,100 ± 0,005	0,080 ± 0,005	0,098 ± 0,015
n_3	0,101 ± 0,005	0,092 ± 0,006	0,099 ± 0,015
K, g/L			
n_1	0,240 ± 0,031	0,220 ± 0,019	0,231 ± 0,020
n_2	0,224 ± 0,029	0,200 ± 0,018	0,177 ± 0,016
n_3	0,207 ± 0,020	0,211 ± 0,019	0,189 ± 0,017
P, g/L			
n_1	0,099 ± 0,012	0,083 ± 0,017	nd
n_2	0,083 ± 0,010	0,055 ± 0,011	nd
n_3	0,065 ± 0,008	0,067 ± 0,013	nd
S, g/L			
n_1	2,06 ± 0,20	1,92 ± 0,24	2,20 ± 0,26
n_2	2,15 ± 0,21	2,35 ± 0,30	2,23 ± 0,27
n_3	1,69 ± 0,16	1,92 ± 0,23	1,87 ± 0,21

n_i : identifica cada etapa de coleta de amostra no processo IRA, onde:

i =1 antes

i = 2 durante

i =3 depois

sendo que cada resultado é expresso pela média das amostras preparadas em triplicata

nd: não determinado

Fonte: Autor, 2022.

Tabela 4 - Concentrações dos elementos medidos em urina pela técnica de FRXDE, usando alvos de Ag e Au, e pela técnica de AAN

Análise de Urina			
Elementos	RX-Ag	FRX-Au	AAN
n_i			
Ca, g/L			
n_1	0,480 ± 0,040	0,420 ± 0,019	0,456 ± 0,073
n_2	0,346 ± 0,029	0,330 ± 0,015	0,382 ± 0,061
n_3	0,300 ± 0,025	0,361 ± 0,016	0,311 ± 0,050
Cl, g/L			
n_1	3,02 ± 0,09	3,30 ± 0,13	2,75 ± 0,14
n_2	5,20 ± 0,16	5,04 ± 0,20	4,98 ± 0,28
n_3	5,10 ± 0,15	5,73 ± 0,22	5,36 ± 0,31
Fe, g/L			
n_1	0,035 ± 0,010	0,032 ± 0,010	0,028 ± 0,003
n_2	0,035 ± 0,010	0,032 ± 0,010	0,028 ± 0,003
n_3	0,032 ± 0,010	0,034 ± 0,011	0,030 ± 0,004
K, g/L			
n_1	3,40 ± 0,31	3,27 ± 0,16	3,14 ± 0,24
n_2	8,62 ± 0,78	8,09 ± 0,40	8,12 ± 0,63
n_3	7,88 ± 0,71	9,01 ± 0,45	9,89 ± 0,76
P, g/L			
n_1	0,85 ± 0,05	0,42 ± 0,09	nd
n_2	2,41 ± 0,15	1,54 ± 0,34	nd
n_3	2,71 ± 0,17	2,79 ± 0,53	nd
S, g/L			
n_1	1,88 ± 0,13	2,20 ± 0,22	2,32 ± 0,28
n_2	7,46 ± 0,53	6,82 ± 0,68	7,00 ± 0,50
n_3	3,52 ± 0,25	4,46 ± 0,45	3,83 ± 0,39

n_i : identifica cada etapa de coleta de amostra no processo IRA, onde:

i =1 antes

i = 2 durante

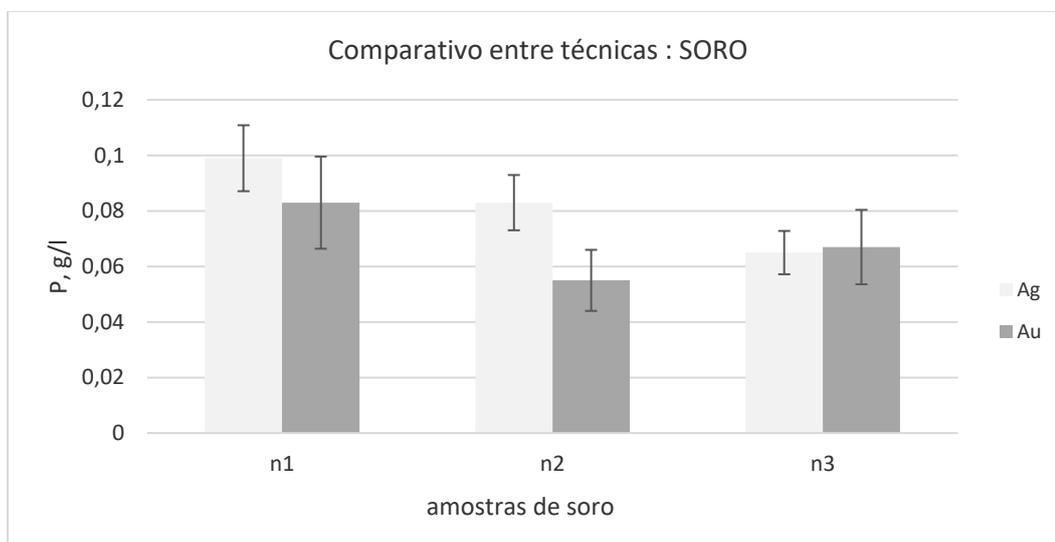
i =3 depois

sendo que cada resultado é expresso pela média das amostras preparadas em triplicata

nd: não determinado

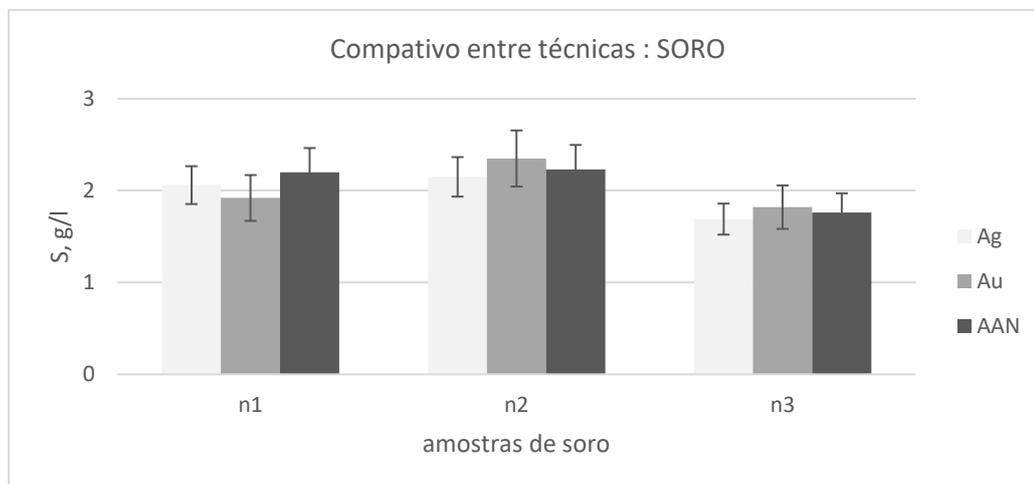
Fonte: Autor, 2022.

Figura 17 - Comparativo das concentrações de P em soro pela técnica de FRXDE para os alvos de Ag e Au.



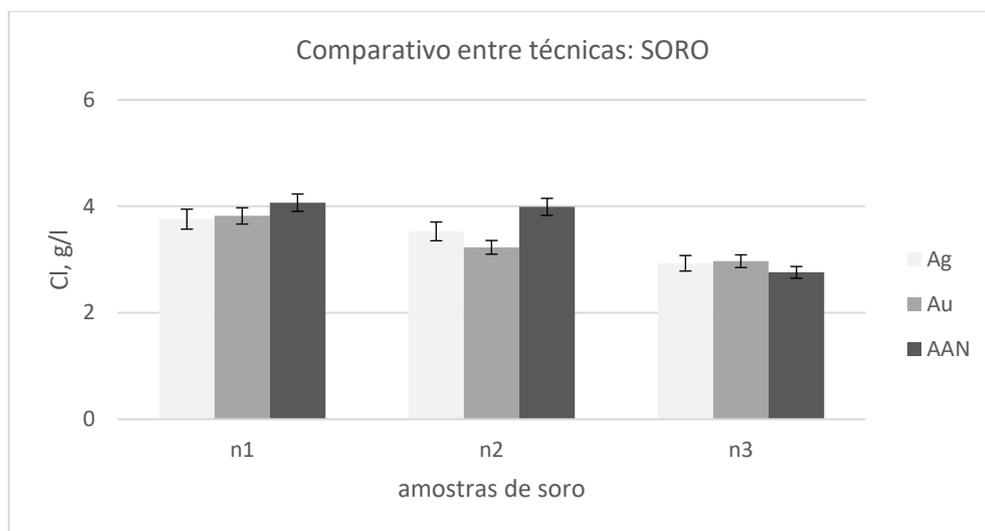
Fonte: Autor, 2022.

Figura 18 - Comparativo das concentrações de S em soro pelas técnicas de FRXDE (para os alvos de Ag e Au) e AAN.



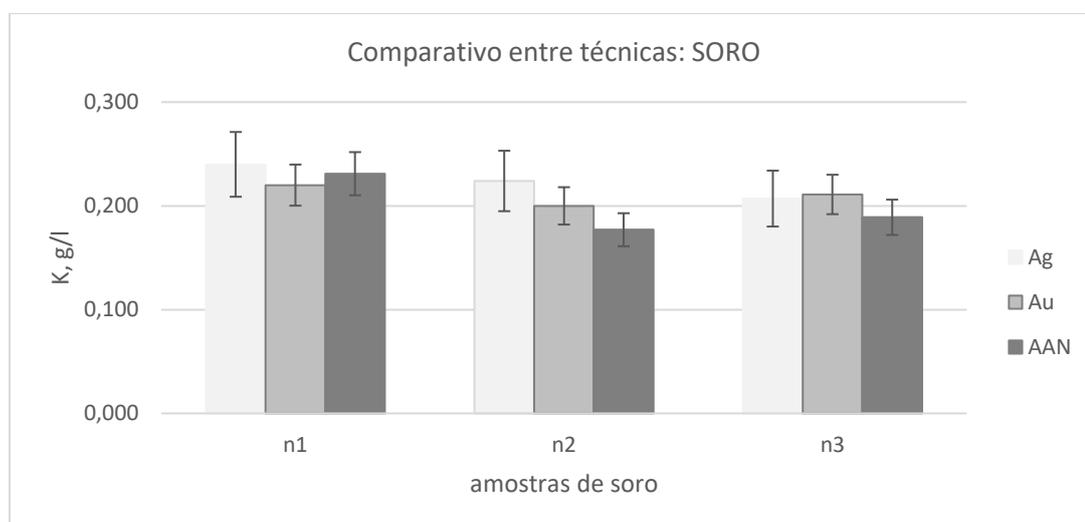
Fonte: Autor, 2022.

Figura 19 - Comparativo das concentrações de Cl em soro pelas técnicas de FRXDE (para os alvos de Ag e Au) e AAN.



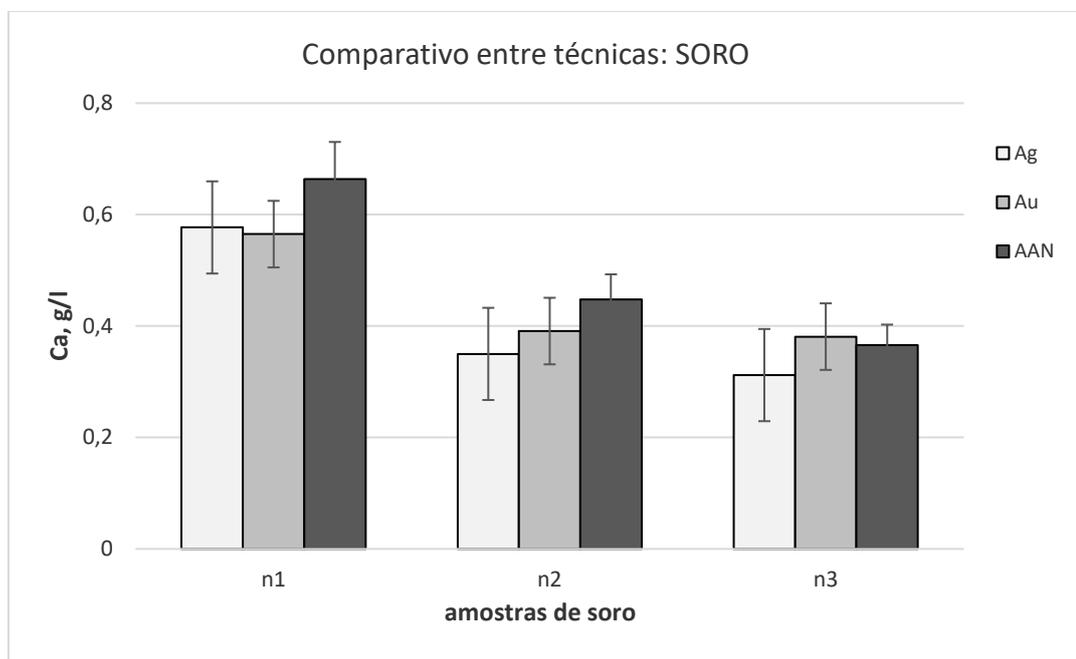
Fonte: Autor, 2022.

Figura 20 - Comparativo das concentrações de K em soro pelas técnicas de FRXDE (para os alvos de Ag e Au) e AAN.



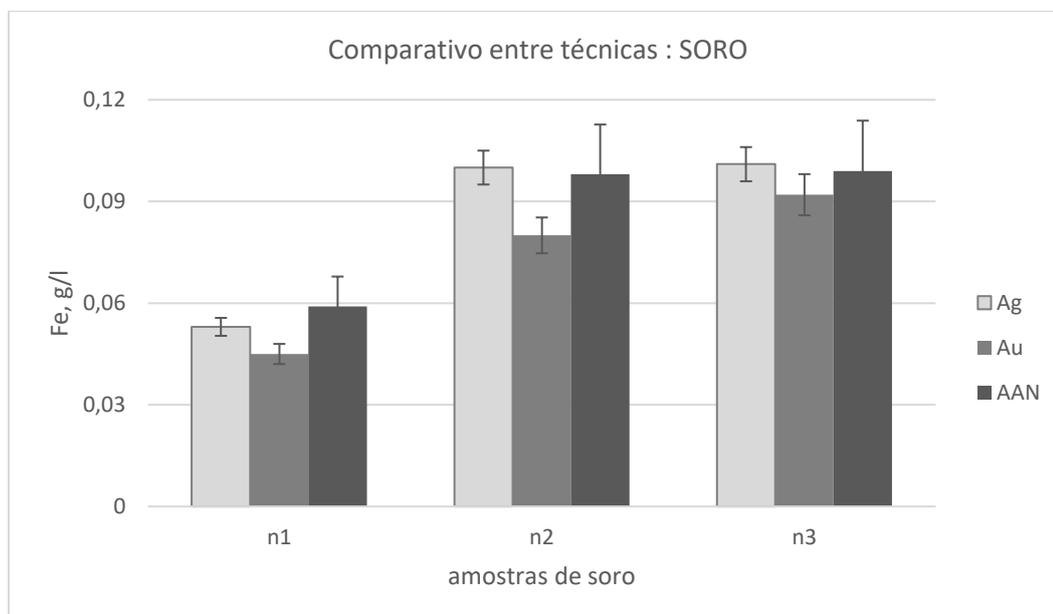
Fonte: Autor, 2022.

Figura 21 - Comparativo das concentrações de Ca em soro pelas técnicas de FRXDE (para os alvos de Ag e Au) e AAN.



Fonte: Autor, 2022.

Figura 22 - Comparativo das concentrações de Fe em soro pelas técnicas de FRXDE (para os alvos de Ag e Au) e AAN.



Fonte: Autor, 2022.

Figura 23 - Comparativo das concentrações de P em urina pelas técnicas de FRXDE (para os alvos de Ag e Au).

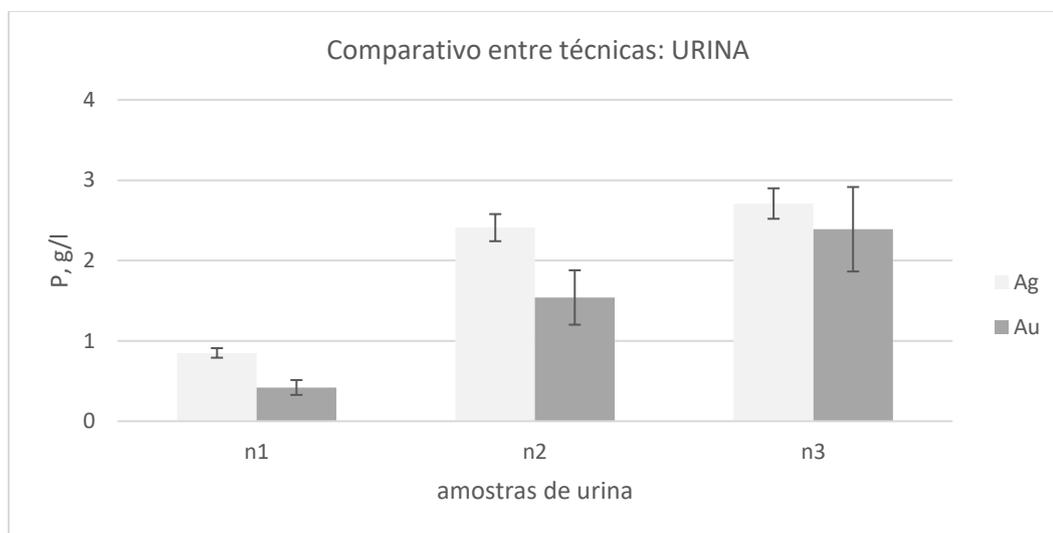


Figura 24 - Comparativo das concentrações de S em urina pelas técnicas de FRXDE (para os alvos de Ag e Au) e AAN.

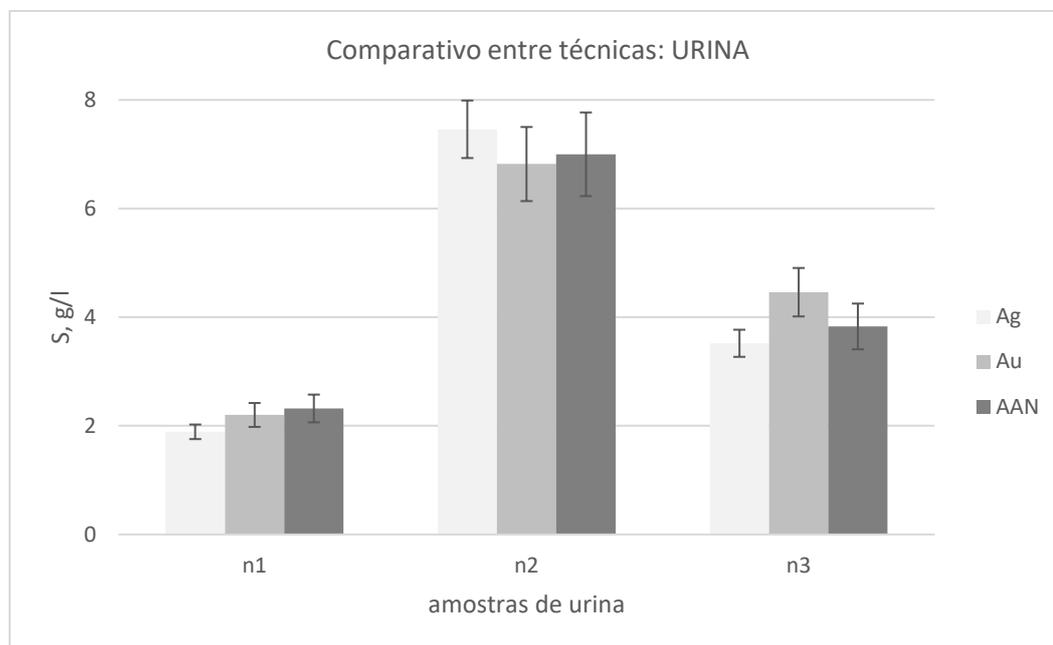
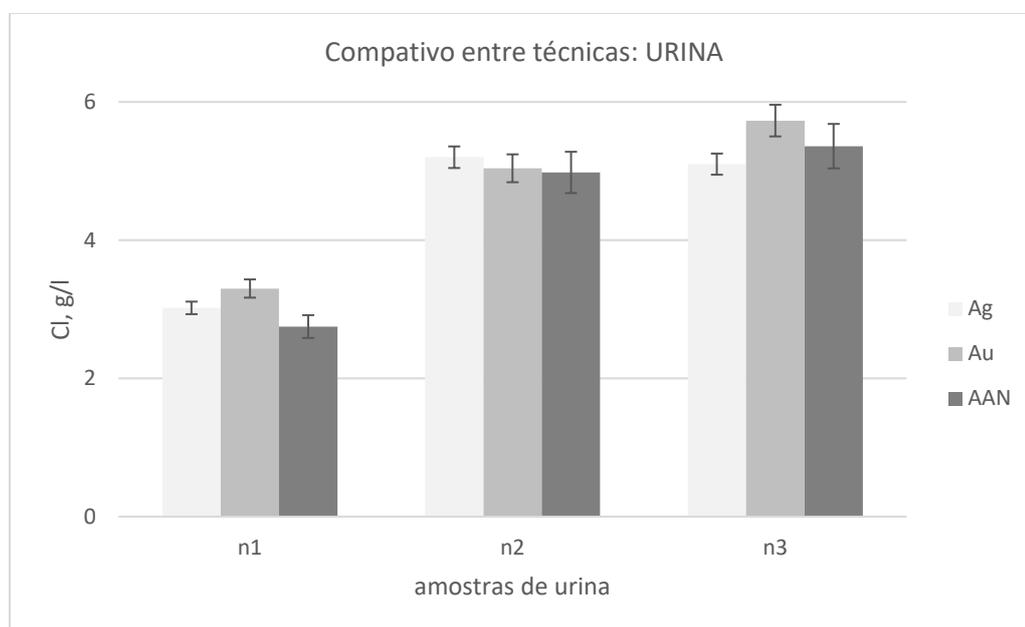
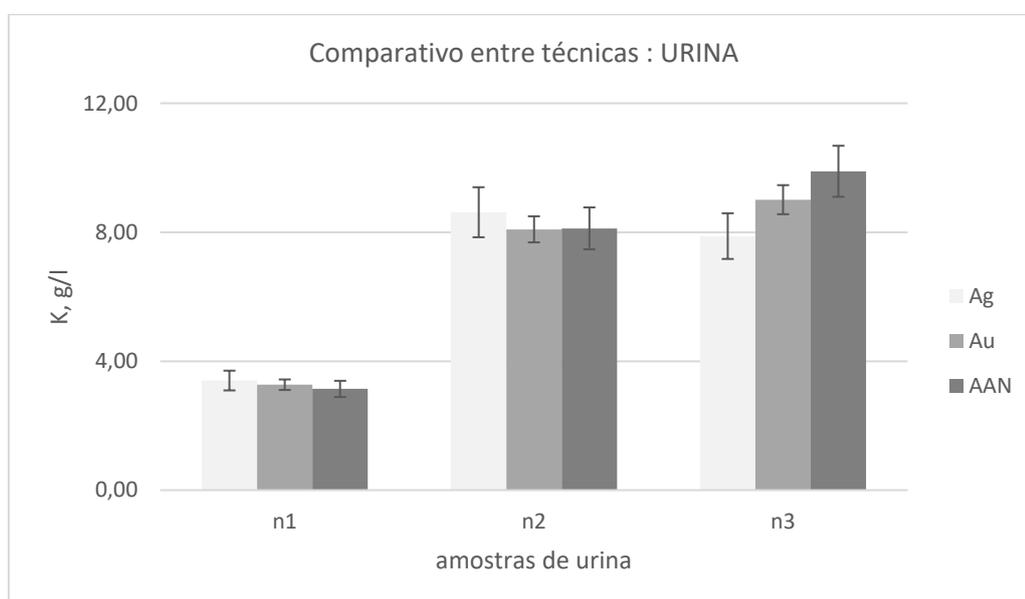


Figura 25 - Comparativo das concentrações de Cl em urina pelas técnicas de FRXDE (para os alvos de Ag e Au) e AAN.



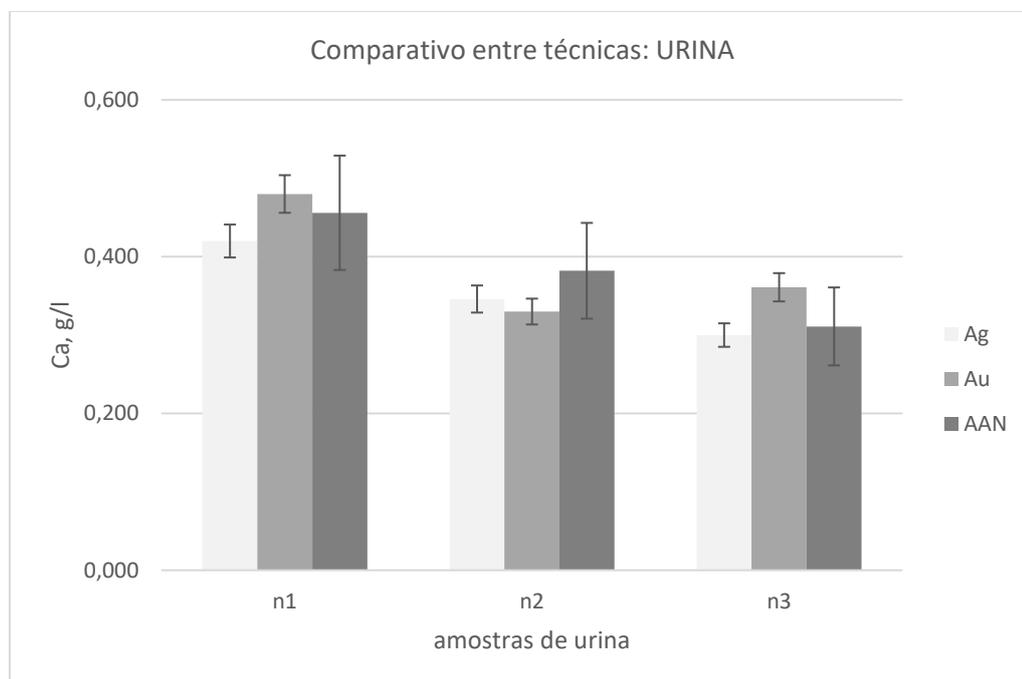
Fonte: Autor, 2022.

Figura 3 - Comparativo das concentrações de K em urina pelas técnicas de FRXDE (para os alvos de Ag e Au) e AAN.



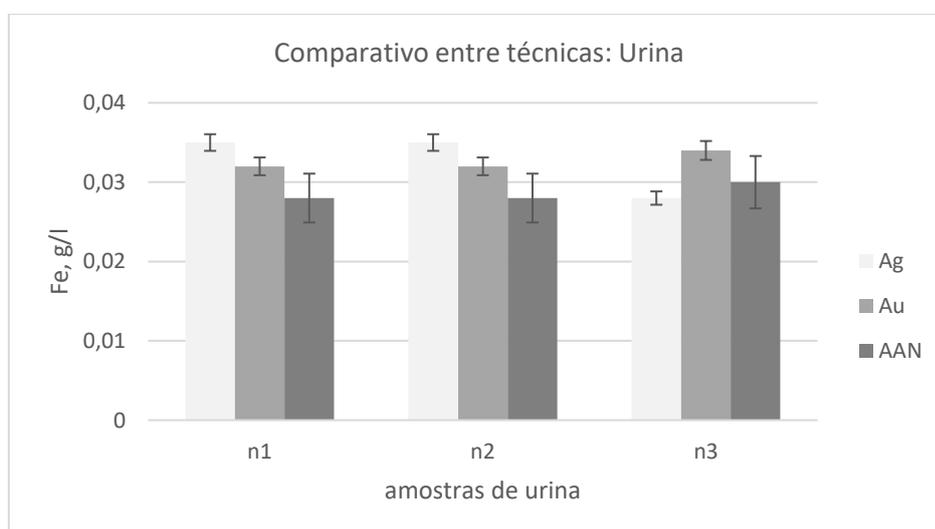
Fonte: Autor, 2022.

Figura 27 - Comparativo das concentrações de Ca em urina pelas técnicas de FRXDE (para os alvos de Ag e Au) e AAN.



Fonte: Autor, 2022.

Figura 28 - Comparativo das concentrações de Fe em urina pelas técnicas de FRXDE (para os alvos de Ag e Au) e AAN.



Fonte: Autor, 2022.

A análise estatística utilizando o teste t de *Student* (ANEXO B) foi aplicado para o nível de significância de 0,05, para as concentrações medidas pelos alvos de Ag e Au (**Tabelas 3 e 4**) e os resultados foram considerados concordantes. Entretanto, quando esta avaliação é feita em função técnicas (FRX e AAN) o

resultado para as concentrações de Ca, em soro e urina, foram considerados estatisticamente diferentes ($p < 0,05$), o que pode ser atribuído ao significativo desvio padrão da medida de AAN comparativamente aos dados obtidos por FRX.

Um aspecto importante a considerar clinicamente, é que a análise comparativa considerando o valor médio das concentrações medidas apresentadas nas **Tabelas 3 e 4** (referentes as **FIGURAS 17 a 28**) entre as técnicas de FRX (alvos de Ag e Au) e AAN, considerando $\pm 2DP$ usualmente adotado em exames clínicos, apresenta concordância para os elementos investigados (Ca, Cl, K, Fe e S) nas amostras de soro e urina.

5 DISCUSSÃO

As avaliações realizadas em soro e urina atestam a aplicabilidade da metodologia analítica multielementar (FRXDE), de alta precisão e sensibilidade dentro de padrões de qualidade exigidos (Boas Práticas de Laboratório – BPL), em análises de amostras líquidas depositado em substrato de papel.

Pretende-se ampliar o uso da técnica de FRXDE. A expectativa é, a curto-médio prazo, apresentar medidas concretas que poderão ser implantadas na área da saúde, contribuindo para redução das desigualdades e fortalecimento de ações no âmbito social, gerando melhorias na qualidade de vida de populações carentes, bem como no âmbito econômico em função de sua aplicabilidade com menor custo.

De acordo com o último Programa Nacional de Controle de Qualidade em Laboratórios e Bancos de Sangue (ProEx/2022) [19] 66,5% dos recursos laboratoriais se concentram na regiões sul e sudeste, enquanto 5,8 % atendem toda demanda de região norte. Uma avaliação em termos populacionais mostra um déficit significativo desses recursos clínicos para região norte, demanda que poderá ser atendida fazendo uso desta alternativa, focando o atendimento em regiões ribeirinhas, vilarejos e comunidades indígenas afastadas de centros urbanos, normalmente desprovida até de energia elétrica.

Além disso, outras áreas da saúde também poderão ser beneficiadas, tais como:

i) medicina de pré-diagnostico: Propor maior eficiência e rapidez no pré-diagnostico de disfunções de alta prevalência na população brasileira.

ii) uso na medicina veterinária: Outra contribuição importante está direcionada ao estudo da composição multielementar de fluidos corpóreos de animais de experimentação de pequeno porte (tais como, camundongos, ratos, hamsters, etc), gerando conhecimento original do mecanismo da interdependência entre elementos essenciais e não essenciais.

Em complemento, este procedimento servirá também para investigar outras amostras biológicas podendo ser útil também em investigações nas áreas de Toxicologia, Imunologia, Genética, dentre outras.

6 CONCLUSÃO

O desempenho do espectrômetro portátil de Fluorescência de Raios X (pFRX), para os alvos de Ag e Au, foi avaliado pelos parâmetros: linearidade, reprodutibilidade e acurácia. Os resultados obtidos mostraram-se satisfatórios para as avaliações realizadas em material certificado (solução padrão certificada) atestando sua aplicabilidade de uso em análises de amostras líquidas depositado em substrato de papel.

O desempenho do espectrômetro pFRX, utilizando alvos com alvos de Ag e Au, mostrou-se também promissor para dosagem simultânea de Ca, Cl, Fe, K, P e S em fluidos corpóreos (soro e urina) requerendo uma pequena quantidade de amostra (uma gota), rapidez na análise (minutos), bem como simplificações no preparo e armazenamento da amostra, quando comparados com as técnicas convencionais que necessitam de armazenamento sob refrigeração, compõem procedimento destrutivo e de maior custo.

Outra vantagem a destacar, com relação ao emprego do procedimento alternativo de FRXDE para dosagem de íons, é a viabilidade de repetição das análises, pois esta técnica possibilita um procedimento não destrutivo de análise. Além disso, os resultados das concentrações (Ca, Cl, Fe, K, P e S) fornecem subsídios que permitem a escolha adequada do alvo (Ag e/ou Au), agilizando as medidas além de fornecer resultados mais precisos.

Finalmente, um estudo comparativo das análises de fluidos corpóreos entre as técnicas de FRX (para os alvos de Ag e Au) e AAN, mostrou compatibilidade para o teste t de *Student* ($p > 0,05$), para P, S, Cl, K e Fe, enfatizando o bom desempenho do espectrômetro pFRX para prática clínica.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Wilson K, Walker JE. Principles and Techniques of Biochemistry and Molecular Biology, **7 ed., Cambridge University Press**, Cambridge, 2010.
2. ZAMBONI. CB. Fundamentos da Física de Nêutrons. **1.ed. São Paulo: Livraria da Física**, 2007.
3. METAIRON, SABRINA ; ZAMBONI, CIBELE B. ; SUZUKI, MIRIAM F. ; BUENO, CARLOS R. . **Evaluation of ions and metals in the blood of GRMD dogs submitted to hASCs therapy by NAA and XRF techniques.** APPLIED RADIATION AND ISOTOPES, v. 143, p. 107-112, 2019
4. ZAMBONI, CIBELE B.; METAIRON, SABRINA ; SUZUKI, MIRIAM F. ; BAHOVSKI, VANESSA ; RIZZUTTO, MARCIA A. . **Determination of iron content in whole blood in different mouse strains using a portable XRF spectrometer.** Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry v. 309, p. 333-336, 2016.
5. ZAMBONI, C. B.; KOVACS, L. ; METAIRON, S. ; AZEVEDO, M. R. A. ; FURHOLZ, C. F. ; UCHIDA, M. C. . **Blood elements concentration in cyclists investigated by instrumental neutron activation analysis.** Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry, v. 309, p. 45-51, 2016.
6. BAHOVSKI, V ; ZAMBONI, C B ; SILVA, L F F LOPES ; METAIRON, S ; MEDEIROS, I M M A . **Differences in iron concentration in whole blood of animal models using NAA.** Journal of Physics. Conference Series , v. 630, p. 012004, 2015.
7. METAIRON, S. ; ZAMBONI, C. B. ; Suzuki, M. F. ; Bueno Junior, CR ; ANDRADE, T. O. ; LANDINI, V. ; CANGUSSU, E. B. ; Zatz, M. **Tracking inorganic elements in GRMD blood dogs submitted to hASCs investigated by NAA technique.** Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry, v. 307, p. 1645-1649, 2015
8. Gaw A, Murphy M, Srivastava R, Cowan RA, O'Reilly DSJ. **Clinical Biochemistry** E-Book: An Illustrated Colour Text, Elsevier Health Sciences, 2013.

9. MARSHALL WJ, LAPSLEY M, DAY A, AYLING R. **Clinical Biochemistry E-Book: Metabolic and Clinical Aspects**, Elsevier Health Sciences, 2014.
10. EURACHEM/CITAC, In: ELLISON, S, L, R, e WILLIAMS, A, E, (Ed.), guide: **Quantifying Uncertainty in Analytical Measurement**, Third edition, 2012.
11. ISO/IEC, ISO/IEC 17025: 2017. General requirements for the competence of testing and calibration laboratories, **International Organization for Standardization and International Electrotechnical Commission**, 2017.
12. POTTS, P. J., ELLIS, A.T.; KREGSAMER, P. *et al.* **Atomic spectrometry update: X-ray fluorescence spectrometry**. *J. of Analytical Atomic Spectrometry*, v.19, n.10, p.1397 2004.
13. BECKHOFF B, KANNGIEBER B, LANGHOOF N, WEDEL R, WOLFF H. **Handbook of Practical X-Ray Fluorescence Analysis**, 1ed, Berlin-London: Springer, 2006.
14. ZAMBONI C, B; AZEVEDO, M, R; METAIRO, S. **Raios-X para dosagem de ferro em sangue**, 1ed. Novas Edições Acadêmicas, 60p, 2018.
15. OLIVEIRA L. C., ZAMBONI C. B, PESSOA, BORGES F.T.. **Determination of elements in kidney, serum and urine of Wistar rats with Acute Renal Insufficiency using NAA**. *Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry*, v. 291, p. 395-398, 2011.
- 16 . **"AMPTEK, DPPMCA Display & Acquisition Software"**, disponível em: <<https://www.amptek.com/software/dpp-mca-display-acquisition-software>>
17. ZSCHORNACK G. **Handbook of X-Ray Data**. Berlin: Springer, 2007.
18. CAPOTE R, LÓPEZ E, MAINEGRA E. **"WinQxas Manual (Quantitative X-Ray Analysis System for Widows) Version 1.4,"** IAEA, Viena & Austria, 2002
19. Programa PRO-EX, disponível em: <https://pncq.org.br/o-pncq/pncq-em-numeros/>

20. REUS, U.; WESTMEIER, W. Catalog of gamma rays from radioactive decay Part 1. ***Atomic data and nuclear data tables***. Germany: v.29, p.1-192, 1983.
21. MUGHABGHAB, SF. ***Atlas of neutron resonances: resonance parameters and thermal cross sections X=1-100***. Elsevier BV, London, 2006.
22. FIRESTONE, R.B. ***Table of Isotopes***. 8.ed. New York, NY.: Wiley, 1996.
23. GOUFFON, P. ***Manual do Programa Idefix***. Universidade de São Paulo, Instituto de Física, Laboratório do Acelerador Linear, São Paulo, 1987.

8 ANEXOS

ANEXO 1 - Metodologia de AAN

ANEXO 2 - Distribuição *t-student*

ANEXO 1 - Metodologia de AAN

O método denominado Análise por Ativação com Nêutrons (AAN) consiste em irradiar um material utilizando nêutrons produzidos a partir de um reator nuclear ou fontes de nêutrons. Cada elemento constituinte do material ao tornar-se radioativo emite uma radiação gama (γ) característica, com energia de emissão bem estabelecida. A partir da medida de radiação emitida por esses núcleos radioativos é possível obter informações da composição do material ativado através das análises qualitativas e quantitativas dos elementos químicos presentes na amostra [2,20].

No método de ativação, denominado instrumental (AANI), a amostra e o padrão (material de referência com teor conhecido dos elementos a serem determinados) devem ser irradiados sob a mesma intensidade do feixe de nêutrons garantindo assim as mesmas condições de irradiação. A equação geral que fornece a atividade induzida por um fluxo de nêutrons é expressa por:

$$A = \frac{N_A \cdot \varphi \cdot \sigma \cdot m \cdot f \cdot F}{M} \cdot (1 - e^{-\lambda T_i}) \quad (1)$$

onde:

N_A : número de Avogadro (tabelado);

φ : fluxo de nêutrons;

σ : secção de choque de ativação (tabelado) [21];

m : massa da amostra;

f : fração do isótopo que irá sofrer a ativação;

F : fração do elemento ativado;

T_i : tempo de irradiação;

M : massa atômica do elemento;

λ : constante de desintegração (tabelado) [22].

Desta forma, a razão entre as atividades (amostra e padrão) reduz-se a,

$$\frac{A_{am}}{A_{pd}} = \frac{m_{am}}{m_{pd}} \quad (2)$$

onde:

A_{am} : atividade da amostra;

A_{pd} : atividade do padrão (conhecida);

m_{am} : massa do elemento na amostra (estabelecida);

m_{pd} : massa do elemento no padrão (estabelecido).

Conhecendo a atividade da amostra é possível calcular a concentração do elemento através da equação (3), inserindo um fator de correção devido à diferença de tempo entre a medida do padrão e da amostra.

$$C_{am} = C_{pd} \cdot \frac{A_{am}}{A_{pd}} \cdot \frac{m_{pd}}{m_{am}} \cdot e^{\lambda t} \quad (3)$$

onde:

C_{am} : concentração do elemento na amostra;

C_{pd} : concentração do elemento no padrão (conhecido);

A_{am} : área da transição gama referente a amostra (calculada pelo programa IDF) [23];

A_{pd} : área da transição gama referente ao padrão (calculada pelo programa IDF) [23];

m_{pd} : massa do padrão;

m_{am} : massa da amostra;

λ : constante de desintegração (tabelado [22]);

t : intervalo de tempo entre o término da contagem do padrão e o início da contagem da amostra.

Desta forma obtém-se a concentração dos elementos ativados nas amostras em questão.

ANEXO 2 - Distribuição t-student

Para realizar a comparação entre as médias das concentrações em sangue total para os grupos investigados (G1, G2 e GC) foi utilizado o teste *t-student*

$$t_v = \frac{x_1 - x_2}{\sqrt{\frac{s_1^2}{n_1} + \frac{s_2^2}{n_2}}}$$

onde:

x_1 e x_2 : expressam as médias obtidas entre os grupos investigados;

s_1^2 e s_2^2 : expressam as variâncias associadas às médias investigadas;

n_1 e n_2 : número de amostras.

INSTITUTO DE PESQUISAS ENERGÉTICAS E NUCLEARES
Diretoria de Pesquisa, Desenvolvimento e Ensino
Av. Prof. Lineu Prestes, 2242 – Cidade Universitária CEP: 05508-000
Fone/Fax(0XX11) 3133-8908
SÃO PAULO – São Paulo – Brasil
<http://www.ipen.br>

**O IPEN é uma Autarquia vinculada à Secretaria de Desenvolvimento, associada
à Universidade de São Paulo e gerida técnica e administrativamente pela
Comissão Nacional de Energia Nuclear, órgão do
Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovação.**