



**ANÁLISE POR ATIVAÇÃO E SUAS POSSIBILIDADES
NAS CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**

FAUSTO W. LIMA

INFORMAÇÕES IEA N.º

11

Dezembro — 1968

INSTITUTO DE ENERGIA ATÔMICA
Caixa Postal 11049 (Pinheiros)
CIDADE UNIVERSITÁRIA "ARMANDO DE SALLES OLIVEIRA"
SÃO PAULO — BRASIL

ANÁLISE POR ATIVAÇÃO E SUAS POSSIBILIDADES

NAS CIÊNCIAS BIOLÓGICAS *

Fausto W. Lima

Divisão de Radioquímica
Instituto de Energia Atômica
São Paulo - Brasil

Informações IEA Nº 11

Dezembro - 1968

* Trabalho a ser apresentado no Fórum Científico da Academia de Medicina de São Paulo, 3 a 8 de Março de 1969.

Comissão Nacional de Energia Nuclear

Presidente: Prof. Uriel da Costa Ribeiro

Universidade de São Paulo

Reitor: Prof.Dr. Luis Antonio da Gama e Silva

Instituto de Energia Atômica

Diretor: Prof. Rômulo Ribeiro Pieroni

Conselho Técnico-Científico do IEA

Prof.Dr. José Moura Gonçalves	}	pela USP
Prof.Dr. José Augusto Martins		
Prof.Dr. Rui Ribeiro Franco	}	pela CNEN.
Prof.Dr. Theodoreto H.I. de Arruda Souto		

Divisões Didático-Científicas

Divisão de Física Nuclear -

Chefe: Prof.Dr. Marcello D.S. Santos

Divisão de Radioquímica -

Chefe: Prof.Dr. Fausto Walter de Lima

Divisão de Radiobiologia -

Chefe: Prof.Dr. Rômulo Ribeiro Pieroni

Divisão de Metalurgia Nuclear -

Chefe: Prof.Dr. Tharcísio D.S. Santos

Divisão de Engenharia Química -

Chefe: Lic. Alcídio Abrão

Divisão de Engenharia Nuclear -

Chefe: Eng^o Pedro Bento de Camargo

Divisão de Operação e Manutenção de Reatores -

Chefe: Eng^o Azor Camargo Penteadó Filho

Divisão de Física de Reatores -

Chefe: Prof.Dr. Paulo Saraiva de Toledo

Divisão de Ensino e Formação -

Chefe: Prof. Rui Ribeiro Franco

Í N D I C E

	<u>Pág.</u>
SUMÁRIO	i
I. INTRODUÇÃO	1
II. IRRADIAÇÃO	3
III. SENSIBILIDADE	5
IV. PROBLEMAS LIGADOS À CONTAMINAÇÃO DA AMOSTRA NA ANÁLISE DE ELEMENTOS TRAÇOS	6
V. MANUSEIO DA AMOSTRA IRRADIADA E PREPARO PARA CONTAGEM	8
VI. ANÁLISE SEM PROCESSAMENTO QUÍMICO	9
VII. PROCESSAMENTO QUÍMICO	10
VIII. CÁLCULO	11
IX. PROBLEMAS LIGADOS À PERDA DE ELEMENTO NA ANÁLISE DE ELEMENTOS TRAÇOS	13
X. APLICAÇÕES	14
X.1 - Doseamento de Sódio nas Unhas de Crianças com Fibrose-Cística	16
X.2 - Variação da Concentração de Elementos Traços na Aterosclerose	17
X.3 - Determinação de Elementos Traços em Tecidos Humanos Cancerosos e Não Cancerosos.	20
X.4 - Elementos Traços no Tecido Cardíaco no Caso de Enfarte do Miocárdio	22
X.5 - Determinação da Concentração de Manganês no Sangue e no Soro	23
X.6 - Concentração de Manganês no Gânglio Basal em Consequência do Uso de Fenotiazina	25
X.7 - Cobre Hepático e Cirrose	27
X.8 - Elementos Traços no Plasma de Indivíduos Normais e de Indivíduos com Uremia Crônica	29

	<u>Pág.</u>
X.9 - Determinação de Cromo, na Pele Humana, em Casos de Eczema	29
X.10 - Análise de Arsênico nos Fâneros	31
X.11 - Análise por Ativação "in Vivo"	33
XI. CONCLUSÕES	34
AGRADECIMENTOS	36
XII. REFERÊNCIAS	37

ANÁLISE POR ATIVAÇÃO E SUAS POSSIBILIDADES

NAS CIÊNCIAS BIOLÓGICAS *

Fausto W. Lima

SUMÁRIO

Após conceituar análise por ativação o autor examina os aspectos mais importantes relativos a este método de análise, a saber, os problemas ligados à irradiação das amostras, a sensibilidade do método, os problemas gerais de contaminação do material quando se trata da análise de elementos traços, o processamento químico e o preparo da amostra irradiada para a contagem, os cálculos necessários para as análises quantitativas e as técnicas experimentais que podem ser adotadas para evitar a perda dos elementos traços.

Na segunda parte é feita a apresentação de alguns exemplos típicos, tirados da literatura, de aplicação da análise por ativação às ciências biológicas e médicas

I. INTRODUÇÃO

Podemos conceituar a análise por ativação como o processo analítico em que um elemento químico é determinado, qualitativa e quantitativamente, através das radiações emitidas por algum radioisótopo formado como consequência do bombardeio daquele elemento com partículas nucleares apropriadas.

A natureza das radiações emitidas bem como as suas energias e a meia-vida do radioisótopo formado, propriedades características desse radioisótopo, fornecem elementos para a análise qualitativa. É necessário que se chame atenção para o fato de que, em geral, esta identificação qualitativa requer uma separação química

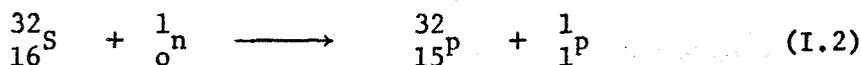
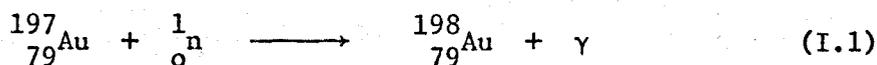
* Trabalho a ser apresentado no Fórum Científico da Academia de Medicina de São Paulo, 3 a 8 de Março de 1969

(radioquímica) do radioisótopo a fim de evitar interferências, especialmente no caso de amostras muito complexas.

A determinação quantitativa é fundamentada no fato de que a atividade do radioisótopo formado é proporcional à massa do elemento a ser analisado.

As partículas mais usadas para a reação nuclear são os nêutrons, embora algumas análises importantes, mas não em grande número, possam ser levadas a cabo com partículas carregadas tais como, por exemplo, prótons, deutérons e ions ^3He . A fonte de nêutrons mais comum é constituída pelos reatores nucleares.

Dois exemplos típicos de reações com nêutrons, e que podem ser usadas para análise por ativação, são apresentados a seguir:



Quer o ${}^{198}\text{Au}$ como o ${}^{32}\text{P}$ são radioativos e as quantidades de elemento ouro e de elemento enxôfre podem ser determinadas pela medida das atividades dos radioisótopos ${}^{198}\text{Au}$ e ${}^{32}\text{P}$, as quais são proporcionais às quantidades iniciais de ouro e enxôfre, respectivamente.

Deve-se notar que a atividade induzida no elemento bombardeado independe da forma química do elemento. A análise por ativação constitui assim uma técnica de análise elementar, isto é, não presta informação nenhuma, diretamente, sobre o tipo da ligação química do elemento que está sendo analisado. Se um elemento como o sódio, por exemplo, se encontra presente como cloreto de sódio e como sulfato de sódio, o resultado da análise dará o sódio total, somente.

II. IRRADIAÇÃO

Consideremos u'a amostra (a matriz) contendo um ou mais elementos a serem analisados e fixemos nossa atenção sôbre o que acontece com um isótopo de um dêesses elementos quando a matriz é colocada em um fluxo de nêutrons. Êste isótopo (cujo número de átomos na amostra admitiremos como igual a fN em que f é a percentagem isotópica e N o número de átomos do elemento) poderá reagir com os nêutrons e formar um isótopo radioativo, conforme vimos nas reações (I.1) e (I.2). Durante o próprio bombardeamento êste radioisótopo formado sofre desintegração como o que acontece com uma espécie radioativa isolada; dessa maneira a quantidade de radioisótopo cresce, inicialmente, até que a taxa de desintegração se torne igual à taxa de formação.

Ê de se esperar que a taxa de formação seja tão maior quão maior fôr o fluxo de partículas bombardeadoras, bem como o número de átomos expostos aos bombardeio; em outras palavras, a taxa de formação será proporcional ao fluxo ϕ de partículas bombardeadoras (em número de partículas que, em cada segundo, atravessam uma área de um centímetro quadrado) e ao número de átomos N expostos ao bombardeio, isto é,

$$\text{taxa de formação} = \sigma fN \phi \quad (\text{II.1})$$

em que σ é uma constante de proporcionalidade. Esta grandeza σ é denominada "secção de choque" e é uma característica do isótopo al vo bem como do tipo e energia da partícula bombardeadora, isto é, é uma característica da reação nuclear que está ocorrendo. A grandeza σ é expressa em unidades correspondentes a centímetros quadrados (a).

(a) Em geral σ é tabelado em barns, sendo um barn = 10^{-24} cm².

A medida que cada átomo bombardeado se transforma num átomo radioativo ele passa a ter a probabilidade de se desintegrar, sendo a taxa de desintegração proporcional ao número de átomos radioativos formados N^* , isto é,

$$\text{taxa de desintegração} = \lambda N^* \quad (\text{II.2})$$

em que λ é a constante de desintegração.

A taxa real de produção ou de acumulação de material radioativo (dN^*/dt) será igual à diferença entre a taxa de formação (equação II.1) e a taxa de desintegração (equação II.2), isto é,

$$\text{taxa de acumulação} = \text{taxa de formação} - \text{taxa de desintegração}$$

isto é,

$$dN^*/dt = \sigma fN \phi - \lambda N^* \quad (\text{II.3})$$

A integração desta equação dará o número de átomos radioativos presentes após ter decorrido o tempo t desde o início da irradiação da amostra, isto é,

$$N^* = \frac{\sigma fN \phi}{\lambda} (1 - e^{-\lambda t}) \quad (\text{II.4})$$

ou em termos de atividade (número de átomos que se desintegram por segundo = $A = \lambda N^*$)

$$A = \sigma fN \phi (1 - e^{-\lambda t}) \quad (\text{II.5})$$

Quando o tempo de irradiação t for suficientemente grande, bem maior que a meia-vida do isótopo formado (cerca de 6 a 7 vezes o valor da meia-vida) o parenteses da expressão (II.5)

passa a ser, aproximadamente, igual à unidade e A atinge o seu valor máximo^(a) (atividade de saturação)

$$A_{\max} = \sigma fN \phi \quad (\text{II.6})$$

A irradiação por um tempo correspondente à meia-vida dá uma atividade correspondente à metade da de saturação^(aa).

$$A_{1/2} = \sigma fN \phi / 2 \quad (\text{II.7})$$

III. SENSIBILIDADE

Se na expressão (II.7) tomarmos alguns valores típicos para as várias grandezas, p.ex., $\sigma = 10$ barns,

$$N = \frac{6,02 \times 10^{23} \times 10^{-6}}{60}$$

(número de átomos em 1 μg de um elemento de massa atômica igual 60), um fluxo de nêutrons $\phi = 10^{13}$ nêutrons/seg. cm^2 , $f = 1$ (percentagem do isótopo sendo irradiado igual a 100%) teremos

$$\begin{aligned} A_{1/2} &= 10 \times 10^{-24} \times \frac{6,02 \times 10^{23} \times 10^{-6}}{60} \times 10^{13} / 2 \\ &= 5 \times 10^5 \text{ desintegrações por seg} \\ &= 30 \times 10^5 \text{ desintegrações por min} \end{aligned}$$

isto é, este elemento cuja secção de choque é de apenas 10 barns, irradiado durante o tempo correspondente à meia-vida do isótopo a ser formado, num fluxo de 10^{13} n/seg. cm^2 (fluxo facilmente encon-

(a) Rigorosamente isto só é válido para $t \rightarrow \infty$

(aa) Basta fazer $t = t_{1/2}$ na expressão (II.5) e lembrar que $\lambda = \frac{0,693}{t_{1/2}}$

trado nos reatores modernos) dá 3 milhões de desintegrações por minuto!

Admitindo uma eficiência do aparelho detector de apenas 10%, teríamos 300 000 contagens por minuto (atividade facilmente detectável), quando a massa irradiada foi de apenas um micrograma! Uma sensibilidade desta ordem, em casos práticos, é difícilmente alcançada por outros métodos analíticos.

Deve-se notar que esta sensibilidade calculada o é na hipótese de não haver interferências, isto é, o elemento a ser analisado foi convenientemente separado antes de sua atividade ser determinada.

A sensibilidade, em análise por ativação, depende do elemento em estudo e o cálculo apresentado constitui apenas um exemplo. De qualquer modo o método é, quase sempre, um método de grande sensibilidade e altamente apropriado à análise de elementos traços (isto é, aqueles cujas concentrações são da ordem de partes por milhão). A Tabela III.1 indica os valores da sensibilidade (entendendo como tal a massa mínima que pode ser determinada), para alguns elementos, no caso de irradiação durante uma hora num fluxo de nêutrons térmicos correspondente a 10^{13} n/seg.cm².

IV. PROBLEMAS LIGADOS À CONTAMINAÇÃO DA AMOSTRA NA ANÁLISE DE ELEMENTOS TRAÇOS

Dependendo da natureza do problema analítico a ser enfrentado, nem sempre a análise por ativação constitui o método mais sensível, podendo ser suplantado, por exemplo, por espectrometria de absorção atômica e espectrometria de massa e mesmo outros métodos de sensibilidade geral não muito grande. Entretanto a análise por ativação tem, sobre os métodos analíticos para traços, uma extraordinária vantagem que é a possibilidade de, na maioria dos casos, reduzir a praticamente zero a probabilidade de con

taminar-se a amostra com o próprio elemento que está sendo analisado. Esta contaminação pode ser introduzida em qualquer estágio do trabalho analítico e os reagentes usados têm, frequentemente, maiores quantidades do elemento a ser analisado do que aquela que está presente na amostra. Nenhum método analítico, que não a análise por ativação, permite separar a parte do elemento presente na amostra, da parte introduzida pelos reagentes.

TABELA III.1

Sensibilidade (S) do Método de Análise por Ativação
(Irradiação durante uma hora em fluxo
de nêutrons térmicos de 10^{13} n/seg.cm²)

ELEMENTO	S(em µg)	ELEMENTO	S(em µg)
Sb	0,0009	Ce	0,02
As	0,0002	Cs	0,0004
Br	0,0001	Cl	0,002
Cd	0,009	Cr	0,2
Ca	0,5	Co	0,0009
Cu	0,0002	I	0,001
Dy	0,00000004	La	0,0004
Er	0,0004	Mn	0,000005
Eu	0,0000009	Ni	0,004
Au	0,0002	Ag	0,0001
Hf	0,0007	Na	0,0004

Nota: tabelas completas podem ser encontradas nas referências (1) e (2).

Na análise por ativação, desde que se possa irradiar a amostra diretamente sem nenhum tratamento químico prévio, o que ocorre na maioria das vezes, aquele risco de contaminação com o próprio elemento sendo analisado fica praticamente eliminado. Uma vez irradiada a amostra o elemento investigado torna-se radioativo e a radioatividade é que permitirá a determinação do elemento; se este elemento for agora acidentalmente adicionado ao material que está

sendo analisado, por constituir impureza dos reagentes químicos, não interferirá com a determinação final (contagem) visto que não é radioativo (a).

V. MANUSEIO DA AMOSTRA IRRADIADA E PREPARO PARA CONTAGEM

Uma vez irradiada a amostra, a sua complexidade, sob o ponto de vista de espécies radioativas presentes, é muito grande, especialmente no caso em que a matriz é um material biológico (sangue, urina, etc). Não apenas o elemento que se está analisando se tornou radioativo mas também todos os demais presentes na matriz. Uma tentativa de contagem direta da amostra para em seguida comparar a sua atividade com a do padrão e aplicar a relação (VIII.3) que permite a determinação quantitativa é, em geral, tentativa fadada ao insucesso. Se a contagem é feita num contador Geiger este acusará as radiações dos isótopos radioativos do elemento sendo analisado e as dos isótopos de todos os demais elementos presentes, ao passo que na contagem do padrão somente as radiações dos isótopos do elemento padrão serão emitidas. A relação (VIII.3) não pode, pois, ser aplicada. Consequentemente será necessário isolar-se, quimicamente, o elemento cuja análise se efetua para que as contagens A e A_p possam ser correlacionadas.

Como, em geral, a concentração do elemento-proble-

(a) Numa das discussões da Conferência sobre análise por ativação de Gaithersburg⁽³⁾ alguém argumentou que a concentração de manganês no plasma sanguíneo tem diminuído de alguns anos para cá, o que provocou a seguinte pergunta: o manganês indicado, naquelas análises anti-gas, estaria todo ele no material analisado ou houve contaminação durante o trabalho analítico?

A êste respeito é interessante examinar resultados analíticos para manganês, no plasma, obtidos há alguns anos (técnicas não por análise por ativação) com resultados recentes, notando-se um apreciável decréscimo nos resultados que indicam a concentração de manganês:

<u>conc. Mn</u>	<u>método</u>	<u>ano</u>	<u>ref.</u>
10 µg/100 ml	espectrografia	1940	(7)
0,1-0,2 µg/g sang.líquido	colorimétrico	1962	(8)
0,005-0,02 " "	ativação	1961	(9)

ma na matriz é muito baixa (traços), uma separação química quantitativa teria pouca probabilidade de êxito. Basta lembrar que não seriam possíveis separações por precipitação e filtração do precipitado, visto que êste precipitado não se formaria por não ser atingido o produto de solubilidade (a concentração é muito baixa! ...).

Êste inconveniente (dificuldade de operações químicas por estar o elemento em baixa concentração) pode, entretanto, ser facilmente contornado, conforme veremos. O elemento em análise já foi tornado radioativo e será esta radioatividade que indicará qual a sua quantidade original. Se juntarmos, à amostra irradiada, uma certa quantidade ponderável do elemento a ser analisado (se contaminarmos propositalmente a amostra com o próprio elemento em análise) esta quantidade juntada não irá afetar em nada o resultado final da análise, pois a quantidade original, e que deve ser determinada, está radioativa (e a medida será feita somente através da radioatividade) ao passo que a massa ponderável adicionada é constituída pelo elemento estável. Obviamente esta última massa não será acusada na contagem final; somente a radioativa.

Esta técnica, denominada dos carregadores, constitui um dos grandes trunfos da análise por ativação comparativamente com outros métodos analíticos de traços; nenhum outro método pode se dar ao luxo de uma contaminação proposital (e muito menos não proposital) da amostra com o próprio elemento a ser analisado.

Uma vez adicionado o carregador, constituído pelo elemento estável, as separações químicas podem ser feitas sem maiores problemas. O mesmo conjunto de separações químicas é aplicado ao padrão e assim as atividades A e A_p poderão ser determinadas e em seguida aplicada a fórmula (VIII.3).

VI. ANÁLISE SEM PROCESSAMENTO QUÍMICO

O uso de contadores de cintilação constituídos por mono

cristais de iodeto de sódio, acoplados a espectrômetros de raios gama multicanais, tem permitido a realização de algumas poucas análises por contagem direta após a irradiação. De um modo geral, entretanto, os espectros de amostras biológicas são muito complexos para permitir uma análise direta sem processamento químico. Mesmo o uso de contadores de germânio-lítio, com grande poder de resolução, mas cuja sensibilidade de detecção é muito baixa comparativamente com a dos cristais de iodeto de sódio, não permite ainda uma análise quantitativa sem o processamento químico das amostras irradiadas, a não ser em alguns casos especiais.^(a)

VII. PROCESSAMENTO QUÍMICO

Uma vez que a análise por ativação puramente instrumental, isto é, sem tratamento químico das amostras irradiadas, não é aplicável a não ser em casos especiais, cabe-nos tecer algumas considerações sobre os problemas ligados às separações dos elementos que estão sendo analisados.

Ao pé da letra o único método analítico que permite uma análise de vários elementos ao mesmo tempo é o de espectrografia ótica. A análise por ativação, na maioria dos casos, ainda é, "a single element technique". Praticamente todos métodos analíticos, gravimetria, volumetria e os instrumentais requerem que o elemento a ser determinado seja separado da matriz onde se encontra e dos demais elementos da matriz (alguns métodos instrumentais, como a polarografia, efetua a separação no decorrer da própria análise, se a mistura não for muito complexa).

Nas amostras biológicas a grande quantidade de sódio,

(a) Em recente conferência internacional sobre análise por ativação, realizada em Gaithersburg, E.U. (Outubro-1968), foram largamente discutidos os méritos dos contadores Ge:Li e de NaI, sem que tenha ficado evidenciado, no momento, a superioridade dos primeiros sobre os segundos, no que diz respeito aos problemas de análise por ativação (ver ref. 3).

cloro e fósforo interferem com a determinação dos demais elementos, especialmente no caso em que os radioisótopos desses elementos têm meia-vida mais curta que as do ^{24}Na e ^{38}Cl . Mesmo usando espectrometria de raios gama, com cristais de boa resolução, esta interferência ainda persiste.

A fim de que a análise por ativação possa ter completa aplicação a todos os problemas analíticos inorgânicos das ciências biológicas, é necessário que o caráter de análise para vários elementos ao mesmo tempo, em u'a mesma amostra, seja muito mais geral do que o é presentemente. Por exemplo, a análise dos oligoelementos presentes no sangue será muito mais importante quando vários desses elementos puderem ser determinados em uma única análise.

Um esforço considerável vem sendo feito, em vários laboratórios do mundo, no sentido de desenvolver métodos e esquemas de separação que permitam a análise de dez ou vinte elementos presentes em uma única matriz. Na Divisão de Radioquímica do I.E.A. um dos temas de dissertação de Mestrado versa sobre o assunto de esquema de separação dos elementos após irradiação da amostra⁽⁴⁾. A idéia geral, em todos esquemas em estudo, consiste em separar a mistura complexa em grupos, cada um contendo poucos elementos. O exame de cada grupo em espectrômetros de raios gama torna-se exequível e muito mais simples, especialmente se as energias dos raios gama dos isótopos de cada grupo forem bem diferentes, bem como as suas meias-vidas.

VIII. CÁLCULO

O número de átomos, do elemento sendo analisado, expostos ao bombardeio, N , (expressão II.5) é, evidentemente,

$$N = \frac{6,02 \times 10^{23}}{M} m$$

em que M e m são a massa atômica e massa a determinar, respectiva-

mente, do elemento em estudo. A expressão (II.5) transforma-se pois em:

$$A = m f \sigma \frac{6,02 \times 10^{23}}{M} \phi (1 - e^{-\lambda t}) \quad (\text{VIII.1})$$

Em princípio o conhecimento da secção de choque, massa atômica, fluxo de partículas bombardeadoras, percentagem isotópica, tempo de irradiação e atividade obtida no fim da irradiação permite a determinação de m . Não é prático, entretanto, fazer-se o cálculo dessa maneira, pois o fluxo de partículas pode variar durante a irradiação; a secção de choque, devidamente tabelada, é uma grandeza determinada experimentalmente e como tal sujeita a erros de medidas; o tempo de irradiação teria que ser determinado rigorosamente; e, finalmente, a atividade A teria que ser determinada em valor absoluto (desintegrações por unidade de tempo) e não em contagens por unidade de tempo. Para contornar todos estes inconvenientes o que se faz é irradiar-se, juntamente com a amostra, u'a massa conhecida m_p do elemento que se pretende analisar (um padrão, portanto); para esta massa m_p seria válida a relação:

$$\frac{A}{A_p} = m_p f \sigma \frac{6,02 \times 10^{23}}{M} \phi (1 - e^{-\lambda t}) \quad (\text{VIII.2})$$

Dividindo membro a membro as expressões (VIII.1) e ... (VIII.2) tem-se:

$$\frac{A}{A_p} = \frac{m}{m_p} \dots m = \frac{A}{A_p} m_p \quad (\text{VIII.3})$$

as atividades A e A_p deverão ser determinadas no mesmo aparelho contador e na mesma geometria, isto é, deverão ser determinadas com o mesmo coeficiente de eficiência.

IX. PROBLEMAS LIGADOS À PERDA DE ELEMENTO NA ANÁLISE DE ELEMENTOS TRACOS

O trabalho com soluções de concentrações baixas padece de uma dificuldade inerente a essas soluções pois a perda de soluto, por adsorção nas paredes dos frascos, nas baguetas, nos papéis de filtro etc, é pronunciada^(a). O único meio de evitar-se esta perda seria aumentar artificialmente a concentração do elemento traço o que, obviamente, não é possível nos problemas analíticos, a não ser no método de análise por ativação, como veremos. Conforme foi visto na Secção IV, se a amostra já foi irradiada o elemento a ser analisado tornou-se radioativo; a adição do mesmo elemento para elevar a concentração a valores em que as perdas por adsorção são desprezíveis (ver gráfico, nota de rodapé) não interferirá com a análise. Em nenhum outro método analítico seria possível adicionar-se o próprio elemento que se deseja analisar, se isto viesse a trazer alguma vantagem experimental (como evitar as perdas por adsorção) ao método.

Esta técnica de adicionar-se o mesmo elemento sendo analisado denomina-se técnica dos carregadores e tem várias vantagens

(a) Se se admitir que esta adsorção, em quaisquer dos materiais mencionados, é regulada pela lei de Freundlich, por exemplo, isto é

$$x = k c^n$$

em que x é a massa adsorvida (elemento em baixa concentração) c a concentração de equilíbrio (concentração do elemento ainda em solução após a adsorção ter ocorrido) k e n constantes próprias do sistema em estudo ($n < 1$), tem-se que a quantidade relativa adsorvida, comparativamente com a que fica em solução, isto é x/c , será

$$x/c = k c^{n-1}$$

e fazendo $n-1$ igual $-p$ ($n-1$ é negativo)

$$x/c = k c^{-p} = k/c^p$$

Se nesta última expressão fizermos $c \rightarrow 0$ (concentrações muito baixas) teremos

$$\lim_{c \rightarrow 0} x/c = \lim_{c \rightarrow 0} k/c^p =$$

(Cont. à pag. 14 ...)

além da vista acima e relativa aos fenômenos de adsorção. Uma delas é que, estando o elemento em concentração de traços e não sendo possível uma separação por meio de uma reação de precipitação, por exemplo, a adição do carregador (isótopo estável do elemento que se analisa) torna esta precipitação quantitativa possibilitando a recuperação e determinação, também quantitativas, do elemento original.

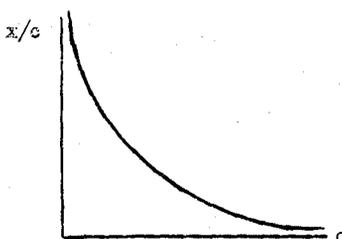
Não se deve encarar a técnica de adição de carregadores como auxiliando apenas as separações por reações de precipitação, pois quaisquer outras operações de separação (extração por solventes, uso de resinas iônicas, destilações, etc) ficarão beneficiadas por aquela adição.

X. APLICAÇÕES

A análise por ativação encontra possibilidades de aplicações práticas em todas as ciências naturais. No caso das ciências biológicas o aspecto fundamentalmente importante da aplicação é, primeiramente, a possibilidade de análise de elementos traços com um alto grau de sensibilidade, sem introdução de contaminação constituída pelo elemento a ser analisado; o segundo aspecto, também importante a considerar, consiste na possibilidade de análise de elementos em concentrações comuns com técnicas de laboratório frequentemente mais simples que as técnicas usuais da quí

(a) (Cont. da pág. 12)

isto é, a quantidade x perdida por adsorção, comparada com a que fica em solução e que deverá ser analisada, é extremamente grande (ver gráfico)



mica analítica clássica.

O número de trabalhos de análise por ativação aplicada às ciências biológicas é muito grande. Em maio de 1967 a Agência Internacional de Energia Atômica patrocinou, em Amsterdam, um simpósio exclusivamente sobre técnicas de ativação aplicadas às ciências da vida (ver ref. 5) cobrindo aplicações às ciências médicas em geral, agricultura, botânica, veterinária, saúde pública e ciências forenses. Em outubro de 1968 a Comissão de Energia Atômica Norte-Americana, em colaboração com a Agência Internacional de Energia Atômica e o "National Bureau of Standards", levaram a cabo em Gaithersburg, Estados Unidos, a III Conferência Internacional Sobre Análise por Ativação (ver ref. 3) na qual duas sessões, entre dezenove, foram inteiramente dedicadas às aplicações médico-biológicas. Além dessas duas recentes reuniões, a Comissão de Energia Atômica Norte-Americana patrocinou, em setembro de 1966, conferência internacional dedicada somente às aplicações da análise por ativação às ciências forenses e medicina legal (ver ref. 6).

Uma revisão bibliográfica completa sobre os trabalhos publicados relativamente às aplicações da análise por ativação nas ciências biológicas seria pouco adequado ao tipo de reuniões deste Fórum. Consequentemente serão examinados, no presente trabalho, apenas alguns problemas que têm recentemente surgido na literatura internacional, em particular os relativos à reuniões da Agência realizadas em Amsterdam em maio de 1967 e em Gaithersburg em outubro de 1968, bem como alguns outros que se relacionem diretamente com os temas de outras sessões do Fórum.

X.1 - Doseamento de Sódio nas Unhas de Crianças com Fibrose-Cística (a)

Como uma alternativa para o teste de suor na fibrose-cística (determinação de sódio, cloro e potássio) tem sido sugerido a determinação de sódio nas unhas e cuja concentração seria maior no caso de pessoas doentes em comparação com pessoas sãs. Embora se considere que o processo não substitua o teste convencional de suor, é considerado útil numa diagnose preliminar em virtude de necessitar apenas pequena quantidade de amostras (cêrca de 0,1 miligrama de unha, se a análise por ativação é o método empregado). Pacientes que estivessem situados longe de hospitais e impossibilitados de se submeter a um teste de suor poderiam enviar pequenos pedaços de unhas para as análises. Estas mesmas análises poderiam auxiliar em casos duvidosos dos testes clássicos de suor quanto à determinação de cloro e de sódio. Babb et al⁽¹⁰⁾ julgam que com um pouco mais de estudo do método será possível um exame de grande número de pessoas e, em particular, de crianças recém-nascidas, para um diagnóstico precoce que permita uma terapia em tempo. O trabalho de Babb et al⁽¹⁰⁾ foi, em linhas gerais, confirmado por dois trabalhos apresentados na Conferência de Gaithersburg⁽³⁾ em que o método de análise por ativação foi aplicado a crianças com fibrose-cística e crianças sãs, dando concentrações da ordem de 4000 ppm a 7000 ppm de sódio em crianças doentes comparadas com 800 ppm a 2000 ppm de sódio em crianças sãs. Embora nesses trabalhos mencionados não seja considerado que somente a medida de concentração de sódio na unha seja suficiente para uma informação definitiva, o assunto continua em investiga-

(a) Condições de trabalho (ref. 10):
Fluxo de nêutrons térmicos: 10^{12} n/seg.cm²
Tempo de irradiação: não indicado.
Processamento químico: não.
Elemento determinado: Na.

ção com grande dose de otimismo sendo considerado, no momento, como um complemento ao resultado de outros exames. A análise por ativação do sódio na unha é simples e as possibilidades de contaminação superficial podem ser facilmente contornadas por limpeza de superfície da unha com algodão embebido em álcool etílico.

Babb et al⁽¹⁰⁾ tentaram também a dosagem de sódio nos cabelos, mas as conclusões foram insatisfatórias em virtude da facilidade de remoção daquele elemento, do cabelo humano, por lavagens com água, quer no caso de pessoas doentes como no caso de pessoas sãs.

X.2 - Variação da Concentração de Elementos Traços na Aterosclerose^(a)

Na Conferência de Gaithersburg, Strain "et al"⁽³⁾ apresentaram os resultados dos trabalhos ligados à variação da concentração de vários elementos, além da do cálcio, que poderiam contribuir para o estudo de aterosclerose. Segundo os autores já está estabelecido que a concentração de cálcio na aorta, no caso de aterosclerose, é muito elevada, mas pouco se sabe sobre a mudança de concentração de outros elementos no tecido arterial. O trabalho de Strain e colaboradores foi levado a cabo no sentido de fornecer dados adicionais ao estudo de trauma vascular e constitui uma extensão de trabalho anterior relativo à zincoterapia oral para o tratamento da aterosclerose.

Para as análises foram usadas aortas de ratos. No caso humano o material foi colhido na autópsia de um homem com 70 anos e na cirurgia de um aneurisma da aorta de um homem de 60 anos. O

(a) Condições de trabalho (ref. 3):

Fluxo de nêutrons térmicos: $1,8 \times 10^{12}$ n/seg. cm²

Tempo de irradiação: 30 minutos.

Processamento químico: sim.

Elementos determinados: Ca, Cd, Co, Cu, Mg, Mn, Se, V e Zn.

material foi cortado em secções e o grau de aterosclerose em cada secção foi determinado histològicamente.

O preparo das amostras para irradiação consistiu em colocar cada peça em papel de filtro sem cinza, o tecido estranho foi removido, bem como o sangue. Cada secção foi cortada em pequenos pedaços com facas de quartzo, secada a 110°C , pulverizada em almofariz de quartzo, a massa de cada secção foi determinada, estas foram colocadas em pequenos tubos de polietileno e irradiadas. Com as amostras a serem irradiadas foram também enviados padrões de cada elemento a ser analisado. Após irradiação, amostras e padrões foram transferidos para frascos erlenmeyers e devidamente processados. A contagem foi feita em espectrômetro de raios gama multicanal.

Os resultados indicaram diferenças significativas nas quantidades de elementos em aortas sadias e nas que apresentavam aterosclerose, a saber a medida que o grau da aterosclerose aumentava a proporção dos elementos alterava-se da seguinte maneira (Tabela X.2-1).

T A B E L A X.2-1

Variação da Concentração de Alguns Elementos em Aortas Sadias e com Graus Progressivos de Aterosclerose

	<u>de</u>	<u>a</u> <u>ppm</u>
Ca	350	170 000
Cd	não detectado	1,4
Co	não detectado	0,34
Mg	110	880
Mn	0,081	1,9
Se	0,4	0,6
Zn	30	152
V	sem alteração	

Quanto à relação Ca:Zn Strain e colaboradores concluíram que em todo tecido aterosclerótico há uma alteração na relação Ca:Zn e como o metabolismo normal de cálcio dependeria de quantidades adequadas de zinco haveria uma indicação de insuficiência de zinco na dieta quando se manifesta a aterosclerose. A Tabela X.2-2 seguinte indica alguns valores:

TABELA X.2-2

Relação Ca: Zn em Vários Graus de Desenvolvimento de Aterosclerose

Grau de Aterosclerose	Ca:Zn	
	Homem	Rato
Nenhum		5
Leve	49	66
Moderado	69	198
Severo	186	237

TABELA X.2-3

Relação Ca:Zn em Aneurisma Abdominal

Trombo	15
Aterosclerose (secção média)	1188
Aterosclerose ligeira (secção média)	55
Aterosclerose ligeira (secção adventícia)	18
Aterosclerose severa (secção adventícia)	85

X.3 - Determinação de Elementos Traços em Tecidos Humanos Cancerosos e Não Cancerosos ^(a)

A análise por espectrografia de emissão já tem sido empregada para a comparação da concentração de elementos traços em tecidos humanos cancerosos e não cancerosos (fígado), (ver p.ex., Tietz et al, ref. 11).

A determinação desses elementos por análise por ativação seria extremamente interessante em virtude da pequena quantidade de material necessária para o trabalho tal como a que se conseguiria com punções para biopsia.

Com a intenção de desenvolver método analítico para determinação simultânea de vários elementos em materiais biológicos Samsahl, Brune e Wester ⁽¹²⁾ determinaram dezoito elementos em fígado e rins normais, num caso de hipernefroma, de metastase no fígado e nos rins bem como no tumor primário; num caso de adenocarcinoma do intestino grosso, de metastases nos rins, no fígado, no tumor primário e no intestino são. De acordo com Samsahl e colaboradores o número de casos e de amostras examinadas é ainda muito pequeno para conclusões e a finalidade do trabalho foi a de desenvolvimento do método analítico, por ativação, para casos como o examinado. Em linhas gerais a maioria dos elementos determinados têm a menor concentração no tumor primário e nas metastases do que nos tecidos são. Há, entretanto, necessidade de investigações posteriores para que se possa estabelecer uma correlação entre a concentração dos elementos traços no tecido canceroso e no tecido não canceroso, o que se torna viável pela técnica de análise

(a) Condições de trabalho (ref. 12):

Fluxo de nêutrons térmicos: 2×10^{13} n/seg.cm².

Tempo de irradiação: 24 horas.

Elementos determinados: As, Au, Br, Ca, Cd, Co, Cr, Cs, Cu, Fe, Hg, La, Mo, P, Rb, Sb, Se e Zn.

Processamento químico: sim.

se por ativação em virtude de, conforme visto, ser remota a possibilidade de contaminar-se a matriz com os próprios elementos a serem examinados quando da aplicação do método analítico.

O estudo da incidência de câncer nos pulmões de fumantes e não fumantes e em função da quantidade de arsênico acumulado nos pulmões de pacientes sofrendo ou não de câncer, vem sendo feito por Lenihan⁽¹³⁾ adotando a técnica de ativação. Trabalhos de Holland et al⁽¹⁴⁾, usando a técnica de traçadores (⁷⁴As) mostraram que de 4,8 a 6,8% do arsênico contido em um cigarro é retido nos pulmões.^(a)

Os primeiros resultados das investigações de Lenihan⁽¹³⁾ não são ainda concludentes sendo necessário, de acordo com o próprio autor⁽¹³⁾, a obtenção de muitos mais dados^(aa).

Se existe ou não, realmente, uma relação de incidência de câncer e a presença ou ausência de alguns elementos traços, é problema aberto a investigação, investigação esta que, no aspecto da análise de elementos, dificilmente poderia ser levada a cabo a não ser por ativação, especialmente considerando a pequena quantidade de material disponível para análise, a baixa concentração dos elementos a serem determinados e, finalmente, o grande número de elementos a serem determinados.

(a) Trabalhos preliminares conduzidos em nossos laboratórios, e cuja sensibilidade do método analítico permite dosar cerca de 0,0002 µg de arsênico⁽¹⁵⁾ indicam que cigarros nacionais (uma só marca examinada) contém cerca de 0,2 a 1,0 micrograma de arsênico por cigarro, o que daria uma retenção nos pulmões da ordem de 0,068 microgramas de arsênico por cigarro fumado.

(aa) É interessante observar que arsênico, sempre considerado um carcinogênico, tem recebido um tratamento um pouco mais "amigável" ultimamente. De acordo com D.V. Frost dos Laboratórios Abbot (North Chicago, Ill) é justificável um reexame do comportamento do arsênico pois muitos dos efeitos atribuídos a esse elemento (incluindo envenenamentos, além do aspecto de carcinogênese) poderiam ser devidos ao selênio (ver ref. 16).

X.4 - Elementos Traços no Tecido Cardíaco no Caso de Enfarte do Miocárdio ^(a)

Considerando que alguns elementos traços têm influência nas reações enzimáticas quando do metabolismo das gorduras e que são observadas alterações enzimáticas no sêro de pacientes com enfarte do miocárdio, bem como no tecido de coração com enfarte, que há alterações na concentração daqueles elementos no sêro de pacientes com enfarte e que o conhecimento da concentração de elementos traços em coração com enfarte não é amplo, Wester⁽¹⁷⁾ estudou, em tecidos de coração sadio e atingidos por enfarte, as quantidades presentes de vários elementos traços.

Para o estudo em questão Wester examinou o tecido de coração de doze casos de enfarte do miocárdio (oito homens e quatro mulheres, idades de 58 a 86 anos). As amostras de tecido injuriado e tecido sã tinham o pês de 1,5 g. Os tecidos foram cortados e preparados utilizando faca de vidro para evitar contaminação com elementos químicos da liga metálica do bisturi. O tecido gorduroso e conjuntivo foram removidos e as amostras transferidas para ampôlas de quartzo, as quais foram seladas a fogo e em seguida irradiadas. Após irradiação deixa-se decair durante dois ou três dias e em seguida passa-se ao processamento químico o qual foi feito utilizando-se resinas iônicas; a contagem foi levada a cabo em espectrômetro de raios gama de 512 canais, acoplado a cristal de NaI(Tl) de 3" x 3".

Foi observado que no tecido injuriado, comparado com o tecido não injuriado, havia um decréscimo na quantidade de Co,

(a) Condições de trabalho (ref. 17):

Fluxo de nêutrons térmicos: 2×10^{13} n/seg.cm².

Tempo de irradiação: 24 a 75 horas

Processamento químico: sim.

Elementos determinados: Ag, As, Au, Ba, Br, Ca, Cd, Ce, Co, Cr, Cs, Cu, Fe, Hg, La, Mo, Na, P, Rb, Sb, Sc, Se, Sm, W e Zn.

Cs, K, Mo, P, Rb e Zn e um aumento em Br, Ca, Ce, La, Na, Sb e Sm.

O artigo original, bastante extenso, deve ser consultado para um exame mais detalhado no que diz respeito à variação dos elementos traços que, segundo os autores, têm função biológica conhecida (Ca, Co, Cu, Fe, Zn), os elementos traços com possível função biológica (Ba, Br, Cd, Cr, Mo, Rb, Se) e elementos traços sem função biológica conhecida (Ag, As, Au, La, Sb).

A interpretação desses resultados talvez seja difícil e um grande número de dados, interpretados estatisticamente, serão necessários, o que dificilmente poderá ser conseguido por outro método que não análise por ativação^(a).

X.5 - Determinação da Concentração de Manganês no Sangue e no Soro^(aa)

O estudo do metabolismo de alguns elementos traços, tomados isoladamente, pode também se beneficiar da análise por ativação.

Apesar da importância do manganês como micronutriente, investigações correlacionadas com o seu metabolismo tornam-se difíceis face à sua concentração extremamente baixa nos compartimen

(a) A literatura tem mencionado aparecimento de cardiopatias entre consumidores de cerveja em apreciáveis quantidades diárias. O exame histológico da tireóide indica, naqueles casos, lesões semelhantes às consequentes à ingestão de sais de cobalto.

O exame da cerveja produzida na cidade onde aquelas cardiopatias ocorreram mostrou que, em alguns casos, eram adicionadas pequeníssimas quantidades de sulfato de cobalto para aumentar a quantidade de espuma da bebida.

O exame, por ativação, de duas marcas de cerveja nacionais, em nossos laboratórios, indicou 0,002 µg/ml e 0,00004 µg/ml. A análise feita foi mais em caráter de curiosidade e os resultados indicados necessitariam confirmação com trabalho sistemático.

(aa) Condições de trabalho (ref. 18):

Fluxo de nêutrons térmicos: $1,2 \times 10^{13}$ n/seg. cm².

Tempo de irradiação: não indicado.

Processamento químico: sim.

Elemento determinado: Mn.

tos líquidos, acessíveis, do homem.

Cotzias e colaboradores^{(18), (19)} observaram que tôdas as determinações de manganês que fizeram no sôro davam resultados muito inferiores aos apresentados por outros laboratórios, o que fêz com que fôsse suspeitado, pelo próprio grupo acima mencionado, que haveria uma perda sistemática de manganês no processo analítico adotado. Um reexame rigoroso do método mostrou que, ao contrário da suposta perda, havia uma pequena contaminação sistemática. O processo foi devidamente modificado e em seguida aplicado ao estudo da estabilidade da concentração de manganês no plasma e no sangue total. Os resultados indicaram uma apreciável invariabilidade da concentração daquele elemento, invariabilidade esta que não era alterada mesmo com a ingestão de quantidades razoáveis de sal manganoso.

Em quatro pacientes, que receberam doses diárias de 1,2 a 2,0 gramas de sulfato manganoso em períodos que variaram de 34 a 570 dias, foi verificado que não havia mudança na concentração de manganês no sangue. Em três outros pacientes procurou-se provocar uma alteração na concentração de manganês no sangue total e no plasma. A êstes pacientes foram dados 300 mg de sulfato manganoso, diariamente, durante uma semana; os resultados (ver Tabela X.5-1) indicaram que, apesar da apreciável quantidade de manganês ingerida pelos pacientes não houve variação significativa na concentração do elemento.

No trabalho em pauta foram tomadas as precauções devidas para evitar a eventual interferência causada pela reação
⁵⁶Fe(n,p) ⁵⁶Mn e que poderia ocorrer com o ferro da hemoglobina dando resultados, para manganês, maiores que os reais (ver ref. 20).

T A B E L A X.5-1

Concentração de Mn ($\mu\text{g}/\text{l}$), no Sangue, Antes e Após Dose Diária de 300 mg de $\text{Mn SO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, Durante uma Semana.

Paciente com	Sangue Total		Sêro	
	Antes	Após	Antes	Após
Hipertensão e Esquizofrenia	5,62 a 5,83	5,75 a 5,93	0,430 a 0,750	0,548 a 1,189
Parkinsonismo	8,48 a 9,78	6,91 a 8,99	0,556 a 0,847	0,678 a 1,139
Hipertensão	7,49 a 7,85	7,11 a 7,47	0,593 a 1,190	0,686 a 1,020

X.6 - Concentração de Manganês no Gânglio Basal em Consequência do Uso de Fenotiazina ^(a)

De acôrdo com Bird et al ⁽²¹⁾ o uso de drogas do tipo fenotiazina tem provocado desordens neurológicas semelhantes às que ocorrem em casos de envenenamentos causados por manganês (trabalhadores em minas de manganês), bem como nas que ocorrem na doença de Parkinson. Cotzias e Borg ⁽²²⁾ observaram que as fenotiazinas formam um radical semiquinona com manganês e sugeriram que o manganês pode ser a causa das alterações neurológicas observadas.

A fim de investigar as desordens neurológicas provocadas pelo fenotiazina Bird et al ⁽²¹⁾ estudaram o efeito da droga na concentração de manganês nos gânglios basais de macacos. Para a determinação da concentração de manganês nos vários núcleos do cérebro foi adotada a técnica de ativação.

Foi administrado prochlorperazine "Compazine" aos ani-

(a) Condições de trabalho (ref. 21):

Fluxo de nêutrons térmicos: $1,2 \times 10^{13}$ n/seg.cm².

Tempo de irradiação: não indicado.

Processamento químico: sim.

Elemento determinado: Mn.

mais, por injeção intramuscular (experimentos conduzidos em três dias) ou por intubação gástrica (experimentos em 30 dias). Após os animais terem sido sacrificados, o cérebro foi removido e vários núcleos dos gânglios basais foram separados usando-se facas de plástico para dissecação (a fim de evitar a contaminação pelo uso de metal). As amostras foram secadas em forno a vácuo por 48 horas e massas da ordem de 3 miligramas foram irradiadas durante 5 minutos (ou massas de 0,3 miligramas durante 60 minutos), juntamente com padrões de manganês. Após irradiação o manganês foi separado quimicamente, com adição de carregador, e contado em espectrômetro de raios gama multicanal acoplado a cristal de iodeto de sódio tipo poço.

Os resultados constam da Tabela X.6-1. Nos experimentos a curto prazo os animais receberam a droga duas vezes ao dia, durante três dias, totalizando 160 mg. Nos experimentos a longo prazo a droga foi dada duas vezes ao dia, em doses crescentes, totalizando 300 a 1200 mg em 30 dias.

TABELA X.6-1

Efeito da Prochlorperazina na Concentração de Manganês (ppm) nos Gânglios Basais

Núcleo	Agudo		Crônico	
	Contrôles (8)	Tratados (13)	Contrôles (7)	Tratados (5)
Putamen	1,88 ± 0,14	2,1 ± 0,26(b)	1,88 ± 0,31	2,53 ± 0,26(a)
Caudato	1,78 ± 0,1	1,84 ± 0,18	1,81 ± 0,08	2,1 ± 0,33(b)
Globus Pallidus			2,09 ± 0,23	2,16 ± 0,15
Substancia Nigra			1,86 ± 0,14	2,17 ± 0,12
Thalamus			1,82 ± 0,29	1,9 ± 0,29

(a) - significativo no nível de 0,5%

(b) - significativo no nível de 5%

De acôrdo com Bird et al⁽²¹⁾ o trabalho em pauta confirmaria a sugestão de Borg e Cotzias⁽²²⁾ de que manganês seria o elemento tóxico responsável pelos efeitos neurológicos colaterais quando do uso de drogas do tipo fenotiazina. O mecanismo seria primeiramente uma complexação do manganês pela fenotiazina e, em seguida, transporte do complexo de manganês ao putamen. Bird estuda, presentemente, a quantidade de manganês, em outros tecidos que concentram fenotiazina, a fim de verificar se a relação fenotiazina/manganês permanece constante em todos os tecidos.

X.7 - Cobre Hepático e Cirrose^(a)

Worwood e Taylor⁽²³⁾ examinaram casos de cirroses primárias biliares verificando altos níveis de cobre nos fígados doentes. A concentração encontrada foi da ordem de 200 ppm, com um desvio padrão igual a 91, sendo que em fígados normais a concentração encontrada foi de 6,9 ppm (desvio padrão 1,7). Worwood e Taylor informam que nada concluíram relativamente a ser a alta concentração de cobre no fígado a causa da cirrose primária ou se se trata de um efeito secundário devido ao bloqueio do fluxo de bile e, portanto, do modo normal de excreção do cobre. A fim de obter informações a respeito do papel do cobre na cirrose, Worwood e Taylor estudaram o metabolismo desse elemento em ratos depois de ter bloqueado o fluxo de bile por ligação do canal biliar. Os animais recebiam injeções diárias de cobre (100 microgramas) tendo sido verificado hiperplasia e fibrose do ducto biliar intra hepático. O aumento da concentração de cobre, após 10 injeções, foi de 30 vêzes a concentração inicial. Foram verificadas, também, alterações relativamente à distribuição do cobre entre as células, por aplicação de

(a) Condições de trabalho (ref. 23):
 Fluxo de nêutrons térmicos: $1,5 \times 10^{12}$ n/seg.cm²
 Tempo de irradiação: 2 horas
 Processamento químico: sim
 Elemento determinado: Ca

centrifugação diferencial e análise por ativação das frações centrifugadas (fração sobrenadante, microsomal, mitocondrial e nuclear).

De acôrdo com os autores mencionados o desenvolvimento de altas concentrações de cobre no fígado deve envolver fatores mais complexos do que a simples obstrução do escoamento de bile , pois que em três casos de cirrose biliar secundária, em que o ducto biliar sofreu obstrução extra-hepática, as concentrações de cobre no fígado eram normais. Isto poderia indicar uma alteração mais séria no metabolismo do cobre e que teria importância no desenvolvimento da doença.

Foi estudado também um caso humano de paciente com cirrose alcoólica (pequena amostra, cêrca de 2 gramas, removida por ocasião da cirurgia), tendo sido verificado aumento na concentração de cobre comparativamente com os valores normais.

A técnica de análise por ativação associada à de centrifugação diferencial permitiu mostrar que, no caso de ratos, o excesso de cobre é encontrado principalmente nos núcleos, mitocôndria e microsomas. Porter⁽²⁴⁾ havia sugerido que, no caso de doença de Wilson, a deposição de cobre deveria dar-se primeiramente na mitocôndria. O trabalho de Worwood e Taylor⁽²³⁾ não indica deposição preferencial de excesso de cobre na mitocôndria do fígado de rato. Quanto ao decréscimo da proporção de cobre solúvel no sobrenadante da centrifugação, a observação de Porter⁽²⁴⁾, no caso de doença de Wilson, e a de Worwood e ... Taylor⁽²³⁾, no caso de cirrose do fígado, estão concordes.

X.8 - Elementos Traços no Plasma de Indivíduos Normais e de Indivíduos com Uremia Crônica ^(a)

Giovannetti et al ⁽²⁵⁾, estudaram a composição do plasma de indivíduos com uremia, comparativamente com a de indivíduos sãos. Para as experiências o plasma foi separado por centrifugação e liofilizado. Para as irradiações foram usadas cerca de 100 miligramas de amostras liofilizadas (cerca de 1 ml de plasma). De acordo com os elementos a serem analisados os tempos de irradiação variaram de 25 a 120 horas com um período de decaimento de 50 horas a 15 dias antes do processamento químico.

De todos elementos analisados somente o arsênico mostrou, segundo os autores mencionados, uma diferença significativa no caso de indivíduos sadios e de indivíduos doentes, a saber, em 13 indivíduos sadios a média de arsênico foi igual a $1,7 \times 10^{-3}$ $\mu\text{g/ml}$ (com variação de $0,9 \times 10^{-3}$ a $3,0 \times 10^{-3}$ $\mu\text{g/ml}$), em 15 indivíduos doentes a média foi igual a $5,4 \times 10^{-3}$ $\mu\text{g/ml}$ (com variação de 2×10^{-3} a $13,3 \times 10^{-3}$ $\mu\text{g/ml}$).

X.9 - Determinação de Cromo, na Pele Humana, em Casos de Eczema ^(aa)

O contato frequente de alguns metais, como por exemplo o cromo, com a pele, pode provocar uma reação alérgica que se manifesta como eczema, a qual pode ocorrer após um longo período de

- (a) Condições de trabalho (ref. 25):
 Fluxo de nêutrons térmicos: 3×10^{13} n/seg.cm²
 Tempo de irradiação: 24 a 120 horas
 Processamento químico: sim
 Elementos determinados: As, Au, Cu, Hg, Mc, Sb e Zn
- (aa) Condições de trabalho (ref. 26):
 Fluxo de nêutrons térmicos: $3,5 \times 10^{13}$ n/seg.cm²
 Tempo de irradiação: 7 a 10 dias.
 Processamento químico: sim
 Elemento determinado: Cr.

contato da pele com o metal (período de sensibilização). Após o paciente ter se tornado sensibilizado o eczema pode ressurgir em poucos dias após um novo contato com materiais que contenham cromo.

Mais de uma explicação é dada para este tipo de eczema. O longo período de sensibilização sugere um processo lento, tal seja a difusão do cromo através das camadas superiores da pele e acumulação na derme. O eczema se desenvolveria quando a concentração de cromo atingisse um valor crítico. Poder-se-ia admitir que a pele de pessoas sujeitas a este tipo de doença, como consequência de uma textura específica, permitiria o cromo difundir-se com mais facilidade de modo que o valor crítico seria atingido mais rapidamente. Outra explanação seria que a sensibilidade para cromo, no caso de pessoas sujeitas ao eczema, seria maior que no caso de pessoas normais.

A fim de estudar estes e outros pontos seria interessante o conhecimento da concentração de cromo na pele de pessoas sãs e na de pessoas com eczema de cromo. Trabalho desta natureza já foi levado a cabo por Tipton⁽²⁷⁾ usando técnica analítica espectrográfica e com amostras pesando de 100 a 200 gramas (indivíduos mortos). Somente a técnica por ativação permitiria o mesmo estudo em indivíduos vivos em virtude da pequena quantidade de amostra que se pode conseguir nestes casos (cerca de 10 mg).

Os trabalhos conduzidos por van Kooten et al⁽²⁶⁾, com esta finalidade, permitiram determinar até 5×10^{-11} gramas de cromo (ver condições de irradiação). O estudo da possível interferência causada pela reação $^{54}\text{Fe}(n, \alpha)^{51}\text{Cr}$ foi feito irradiando-se ferro puro, nas mesmas condições que as amostras de pele, sendo verificado que a pequena proporção de ferro na pele (10 a 100 ppm) não interferia com as determinações de cromo.

Os resultados dessas análises (amostras tiradas do antebraço e das costas), para pessoas sãs indica uma concentração de cromo de 0,45 a 1,35 ppm. No caso de pessoas com eczema as concen

as concentrações de cromo nas amostras, também tiradas do antebraço e costas, dão de 0,22 a 0,88 ppm. De acordo com os autores da referência 26, as diferenças, entre os valores encontrados no caso de pessoas sãs e de pessoas com eczemas, não são significativas, o que indicaria que a ocorrência de eczema de cromo não coincide com um aumento de cromo na pele^(a).

van Kooten et al⁽²⁶⁾ continuam as suas investigações, estando sendo examinados o conteúdo de cromo no soro sanguíneo e nos cabelos.

X.10 - Análise de Arsênico nos Fâneros^(aa)

Arsênico é um dos vários elementos normalmente encontrados nos cabelos e nas unhas. Uma concentração de arsênico de 0,50 a 2,10 ppm nos cabelos é considerada normal. Em casos de envenenamento por arsênico o valor dessa concentração pode aumentar apreciavelmente, especialmente no caso de envenenamento crônico por ingestão sistemática de pequenas quantidades de arsênico; nesses casos há tempo para o arsênico incorporar-se à raiz do cabelo e, após o crescimento, surgir nos fios que cresceram.

Smith⁽³⁰⁾ mostrou que cerca de meia hora após a ingestão de 3 mg de arsênico (trióxido de arsênico) a concentração do

(a) No trabalho de van Kooten et al as amostras de pessoas doentes e de pessoas sãs foram tiradas de partes correspondentes (antebraços e costas); é curioso que os resultados das análises da pele onde ocorreu o eczema, se é que essas análises também foram feitas, não são relatadas. É interessante notar que, quando este trabalho foi apresentado oralmente (ver ref. 26), Lenihan indagou se os autores esperariam encontrar u'a maior concentração de cromo na pele de pessoas com eczema, pois pacientes envenenados com arsênico apresentavam alta concentração desse elemento nos cabelos e nas unhas, nas concentrações normais na pele e indagava Lenihan se as alterações que provocavam uma condição eczematosa resultariam da maior deposição de cromo em outras partes do corpo (ver ref. 26, Discussão).

(aa) Condições de trabalho (ref. 28,29):
 Fluxo de nêutrons térmicos: $10^{12} - 10^{13}$ n/seg.cm²
 Tempo de irradiação: 8 horas
 Processamento químico: sim
 Elemento determinado: As

elemento na raiz do cabelo aumentava de 0,36 ppm a 0,48 ppm e de 0,22 ppm a 0,42 ppm, em dois indivíduos que se submeteram ao teste. Após quatro horas as concentrações atingiram os valores de 2,05 e 4,94 ppm, respectivamente.

Análises como as indicadas seriam extremamente difíceis de serem executadas pelos métodos clássicos, não só pelas pequenas quantidades de amostras disponíveis (raízes de cabelos), como pela pequena massa absoluta de arsênico (cêrca de 0,0005 µg).

Silva et al⁽²⁸⁾ determinaram arsênico, por ativação, em vários materiais (sangue, urina, unhas, cabelos, raiz de cabelos e cabelo do pubis) de trabalhadores de usinas de arsênico. Quantidades extremamente pequenas de amostras foram necessárias para as análises; em particular, no caso de cabelos, um único fio com comprimento de 2 a 5 milímetros, quando a concentração de arsênico é da ordem de 1 ou 2 ppm e maior, permite a análise com grande precisão⁽¹⁵⁾. No caso dos trabalhadores das usinas de arsênico observou-se que a concentração de arsênico nos fâneros era extremamente alta (da ordem de 200 a 500 ppm) ao passo que no sangue e urina as concentrações eram normais; na raiz do cabelo os valores, conquanto fôssem também altos (variação de 36 ppm a 126 ppm em seis indivíduos examinados), eram menores que os dos cabelos propriamente ditos. Isto indicaria que os altos valores encontrados para os cabelos da cabeça e do pubis (220 a 500 ppm) resultariam, na sua maior parte, de contaminação externa, o que seria de esperar face ao contato diário dos trabalhadores com o material sendo fabricado. Mesmo assim os valores encontrados para as raízes dos cabelos (arsênico incorporado ao cabelo através da corrente sanguínea), são bastante altos comparados com as concentrações chamadas normais. Isto poderia indicar uma espécie de mitridatismo para arsênico consequente da exposição e ingestão diária e sistemática de pequenas quantidades do elemento.

Döbereiner et al⁽³¹⁾ estudaram dois casos de mortanda-

de em rebanhos de bovinos, provocadas por ingestão acidental de ar^{sen}ico, em que as análises dos pelos dos animais intoxicados e de animais testemunhas foram feitas por Lima e colaboradores, tendo sido encontradas concentrações de arsênico, no pêlo dos animais in^{toxi}cados, que eram da ordem de 20 v^êzes maiores que a dos de ani^{ma}is testemunhas.

Especialmente no caso da análise de arsênico em cabelos e unhas, nos casos de envenenamentos acidentais ou criminosos, a técnica de ativação é extremamente útil, visto dispensar as provas em branco de todos os reagentes utilizados, provas em branco essas necessárias no caso do ensaio clássico de Gutzeit (ver ref.15)^(a).

X.11 - Análise por Ativação "In Vivo"

Recentemente a literatura tem apresentado alguns trabalhos de análise por ativação "in vivo", quer em animais como em ho^{me}ns. Lenihan et al⁽³⁵⁾ determinaram o conteúdo de iôdo na tireóide de carneiros, conteúdo êste que é da mesma ordem de grandeza que

(a) Cabelo, material até há pouco tempo não importante e pouco examinado em pesquisa científica, pode constituir excelente matriz para análise por ativação de vários elementos, obtendo-se daí importantes correlações entre as concentrações daqueles elementos e diversos fatos biológicos. Comar⁽³²⁾ sugere que se utilize cabelos para análise de alguns oligoelementos no sentido de estudar problemas ligados à dieta desses oligoelementos. Em realidade o cabelo, no processo excretório, tem a vantagem de ser um "integrador" dos oligoelementos, dando a quantidade total do elemento excretado durante um certo tempo (que pode ser de dias a anos), ao passo que urina e fezes permitem a análise do elemento excretado em períodos de horas. Por exemplo, as análises de arsênico no cabelo, mencionadas antes⁽²⁸⁾ possibilitam a determinação da época em que o arsênico começou a ser ingerido. Strain⁽³³⁾ mostrou que a determinação da concentração de zinco nos cabelos pode constituir um índice de carência desse elemento e que a transferência do zinco aos fâneros é influenciada por alguns estados patológicos tais como os que ocorrem como consequência de queimaduras; Lenihan e Smith⁽³⁴⁾ lembram que o cabelo de dentistas pode constituir material para análise periódica e rotineira a fim de se obter uma indicação precoce de intoxicação por mercúrio e consequente correção das condições de trabalho de modo a evitar aquela condição que facilite a intoxicação. Lenihan cita caso de intoxicação, por mercúrio, de dois dentistas (sinais clássicos de intoxicação, por mercúrio: salivação abundante, tremor nas mãos, insônia e irritabilidade) cujas concentrações de mercúrio nos cabelos eram da ordem de 170 ppm e 51 ppm (população normal naquela área, 4 ppm).

o do homem. Boddy e Alexander⁽³⁶⁾ estudaram o conteúdo de iôdo na tireóide do homem. Anderson e colaboradores⁽³⁷⁾ determinaram o conteúdo total de sódio, cloro e cálcio no homem. De acôrdo com os autores mencionados a dose de radiação recebida pelos pacientes, nas condições do experimento, é da mesma ordem de grandeza quando de um teste de captação de iôdo-131 pela tireóide.

Estas análises, segundo os autores, teriam permitido verificar que a quantidade total do sódio no organismo, determinado por ativação "in vivo", corresponde à determinada por diluição isotópica usando ²⁴Na. A determinação do iôdo na tireóide de carneiros, por ativação "in vivo", dá resultados idênticos àqueles encontrados por análise "in vitro" do mesmo órgão.

Vantagens apresentadas para análise por ativação "in vivo" seriam, por exemplo, a detecção de depósitos anormais, nos órgãos, de elementos tais como o cobre; a possibilidade de determinação da taxa de descalcificação, após a imobilização relativa do esqueleto no caso dos cosmonautas quando em vôos espaciais.

Desde que os resultados obtidos pela análise por ativação "in vivo", levada a cabo com animais, tem indicado concordância entre os resultados "in vitro" e "in vivo", o autor da presente revisão pergunta se não se deveria continuar os estudos com animais de laboratório para que um número maior de dados fôssem coletados, até que se mostrasse que, realmente, haveria necessidade de obtenção de informações, "in vivo", no homem.

XI. CONCLUSÕES

A finalidade dêste FORUM previa o entrosamento da classe médica com especialidades e ciências afins, em que se pudesse verificar como a atividade de cientistas de outros ramos do conhecimento poderia trazer contribuição ao desenvolvimento da Medicina.

Os poucos exemplos apresentados na presente revisão permitem prever a possibilidade de aplicação do método de análise por ativação em vários problemas biológicos e de medicina.

A intenção do presente autor em rever alguns problemas de aplicação que poderão ser considerados típicos foi de criar oportunidade para que o biologista e o médico possam fazer um paralelo com problemas seus, análogos em alguns aspectos com os examinados nesta revisão.

Uma série grande de outras aplicações às ciências biológicas deixaram de ser revistas para não tornar o trabalho muito longo. Assim é que não foram abordados problemas tais como detecção e influência de elementos traços em odontologia em que, por análise por ativação, os elementos traços puderam ser determinados em diferentes camadas dos dentes e os resultados correlacionados com incidência e resistência à cárie⁽³⁸⁾; investigações relacionados com a propagação do pólen das plantas⁽³⁹⁾; aplicações à higiene e saúde públicas⁽⁴⁰⁾ e vários outros.

Em síntese os problemas examinados no presente trabalho, enquadram-se dentro de três tipos fundamentais de pesquisa;

- (a) - o estudo e a determinação das concentrações normais dos elementos traços nos vários tecidos biológicos.
- (b) - correlação entre estados patológicos crônicos e o teor dos elementos traços nos órgãos.
- (c) - pesquisas relativamente a um elemento individual e seu metabolismo em condições normais ou patológicas.

Se o autor conseguiu entusiasmar pelo menos um único biologista ou médico, a aplicar o método de análise por ativação em seus próprios problemas, sentir-se-á plenamente recompensado do esforço feito para apresentar um trabalho a altura deste Fórum. É ne

cessário ter presente, entretanto, que se há possibilidade da análise por ativação vir a trazer, no Brasil, uma real contribuição aos problemas biológicos e médicos, esta contribuição só dependerá daqueles que entendem de biologia e de medicina. Além disto, é necessário que êstes profissionais se tornem também analistas por ativação para que tirem o real proveito dêste método nas suas investigações.

AGRADECIMENTOS

O autor agradece ao Presidente da Academia de Medicina de São Paulo, Professor Virgílio de Carvalho Pinto, pela honra do convite para participar, com êste trabalho, do Forum Científico da Academia.

A todos seus companheiros do I.E.A., em particular aos da Divisão de Radiobiologia, pela boa vontade com que o auxiliaram relativamente à nomenclatura de têrmos médicos.

E à Srta. Lilian Thomé pelo auxílio prestado no levantamento bibliográfico.

RÉSUMÉ

On a fait un mise-aux-point des applications de la méthode d'analyse par radio-activation aux problèmes biologiques et de recherche médicales. Les principes générales de la méthode sont présentés. Quelques exemples typiques d'application sont aussi discutés.

SUMMARY

A review of applications of activation analysis to biological sciences is made. The principles of the method is presented. Problems in connection with possible causes of errors such as loss of trace elements by adsorption and contamination of samples, are examined. Some typical examples of medical and biological problems are reviewed.

XII. REFERÊNCIAS

- (1) - Bowen, H.J.M., and D. Gibbons, Radioactivation Analysis, Oxford, At the Clarendon Press, 1963.
- (2) - Spronk, N., Nuclear Activation in the Animal Sciences , Proceedings of the Symposium on Nuclear Activation Techniques in the Life Sciences, Amsterdam, 8-12, May 1967 , IAEA, Vienna 1967.
- (3) - The 1968 International Conference on Modern Trends in Activation Analysis, October 7-11, 1968, National Bureau of Standards, Gaithersburg, Maryland.
- (4) - Atalla, L.T., O Problema da Determinação Simultânea de Vários Elementos em Análise por Ativação, Dissertação de Mestrado, EPUSP-IEA. Em preparo.
- (5) - Nuclear Activation Techniques in the life Sciences, Simposium held in Amsterdam, 8-12 may 1967 and promoted by the International Atomic Energy Agency.
- (6) - Proceedings of the First International Conference on Forensic Activation Analysis, held at General Atomic Laboratories, San Diego, Cal, September 19-21, 1966 - GA-8171.
- (7) - Kehoe, R.A., I. Cholak and R.V. Story, A Spectrochemical Study of the Normal Ranges of Concentration of Certain Trace Metals in Biological Materials, J. Nutrition 19 , 579 (1940).

- (8) - Miller, D.O. and J.H. Yoe, Anal. Chim. Acta 26, 224 (1962).
- (9) - Brune, D. et al, Actiebolaget Atomenergi Report AE 60 (1961).
- (10) - Babb, A.L. et al, The Use of Neutron Activation Analysis in the Early Diagnosis of Cystic Fibrosis in Children , Trans. Am. Nucl. Soc. 9, 591 (1966).
- (11) - Tietz, N.W., E.F. Hirsch and B.J. Neyman, J. Amer. med. Assoc. 165, (17) 2187 (1957).
- (12) - Samsahl K., D. Brune and P.O. Western, Simultaneous Determination of 30 Trace Elements in Cancerous and Non-Cancerous Human Tissue Samples by Neutron Activation Analysis, Int. J. Applied Rad. Isotopes, 16, 273 (1965).
- (13) - Lenihan, J.M.A., Trace Elements in Human Disease. Collect ed Papers: 1, Activation Analysis. Western Regional Hospital Board, Regional Physics Department, Glasgow 1966.
- (14) - Holland, R.H., M.S. McCall and H.C. Lanz, A Study of Inhaled Arsenic-74 in Man, Cancer Res. 19, 1154 (1959).
- (15) - Lima, F.W., and Célia M. Silva, Study of the Influence of Various Factors on the Radiochemical-Gutzeit Method of Activation Analysis of Arsenic. Apresentado na II Conferência Interamericana de Radioquímica, México, Abril 1968. Publicação IEA nº 176.
- (16) - Many Trace Elements Affect Animal Nutrition, Chem. and Eng. News, 44, may 16, 49 (1966).

- (17) - Wester, P.O., Trace Elements in Human Myocardial Infarction Determined by Neutron Activation Analysis, Acta med. Scand., Preprint, 1965.
- (18) - Cotzias, G.C., S.T. Miller and Judith Edwards, Neutron Activation Analysis: The Stability of Manganese Concentrations in Human Blood and Serum, J. Lab. Clin. Med. 67, 836 (1966).
- (19) - Cotzias, G.C., Trace Metals: Essential or Detrimental to Life? Brookhaven Lecture Series, BNL 828 (T-323), n^o 26, 1963.
- (20) - Borg, D.C., R.E. Segel, P. Kienle and L. Campbell, Selective Radioactivation and Multiple Coincidence Spectrometry in the Determination of Trace Elements in Biological Material - Measurement of Manganese, Int. J. Appl. Radiation Isotopes 11, 10 (1961), Appendix II.
- (21) - Bird, E.D., L.G. Grant and W.H. Ellis, Measurement of the Effect of Phenothiazine on the Manganese Concentration in the Basal Ganglia of Sub-Human Primates by Activation Analysis, Proceedings of the Symposium on Nuclear Activation Techniques in the Life Sciences, Amsterdam, 8-12 May 1967, IAEA, Vienna, 1967.
- (22) - Borg, D.C. G.C. Cotzias, Interaction of Trace Elements with Phenothiazine Drug Derivatives, Proc. nat. Acad. Sci., U.S.A. 48, 617 (1962).
- (23) - Worwood, M. and D.M. Taylor, Hepatic Copper and Cirrosis, Proceedings of the Symposium on Nuclear Activation Techniques in the Life Sciences, Amsterdam, 8-12, May 1967, Vienna 1967, IAEA.

- (24) - Porter, H., Arch. Neurol. 11, 341 (1964).
- (25) - Giovannetti, S.Q. Maggiore and R. Malvano, Neutron Activation Analysis of Trace Elements in Plasma from Normal Subjects and from Chronic Uraemic Patients, Proceedings of the Symposium on Nuclear Activation Techniques in The Life Sciences, Amsterdam, 8-12 May 1967, IAEA 1967.Vienna.
- (26) - van Kooten, J.W.H. Mali, J.J.M. de Goeij and J.P.W. Houtman, Determination of Chromium Content in Human Skin by Means of Neutron Activation Analysis, Proceedings of the Symposium on Nuclear Activation Techniques in the Life Sciences, Amsterdam, 8-12 May 1967, IAEA, Vienna, 1967.
- (27) - Tipton, I.H., Trace Elements in Human Tissue, Health Phys. 9, 103 (1963).
- (28) - Atalla, Laura T., Célia M. Silva e F.W. Lima, Activation Analysis of Arsenic in Human Hair - Some Observations on the Problems of External Contamination, An. Acad. brasil. Ciências 37, 433 (1965).
- (29) - Lima, F.W., H. Shibata and Laura T. Atalla, Activation Analysis Applied to Forensic Investigation: Some Observations on the Problem of Human Hair Individualization, Proceedings of a Symposium on Radiochemical Methods of Analysis, Salzburg, October 1964. Published by the IAEA, 1965.
- (30) - Smith, A., The Interpretation of the Arsenic Content of Human Hair, J. Forensic Sci. Soc. 4, 192 (1964).

- (31) - Döbereiner, J. et al, Perfuração do Abomaso e da Parede Abdominal na Intoxicação de Bovinos por Arsênico, *Pes. agropec. bras.* 2, 293 (1967).
- (32) - Comar, D., Analyse par Radioactivation: Applications à la Chimie Médicale, in *Chimie Analytique XVII*, Gautier Villars Ed., 1967.
- (33) - Strain, W.H., Effects of Some Minor Elements on Animals and People. Proceedings of a Symposium on Geochemical Evolution, Am. Assoc. Adv. Sci., Denver, Colorado, 1961.
- (34) - Lenihan, J.M.A. and H. Smith, Activation Analysis and Public Health Proceedings of the Symposium on Nuclear Activation Techniques in the Life Sciences, Amsterdam, 8-12 May 1967, IAEA, Vienna, 1967.
- (35) - Lenihan, J.M.A., D. Comar, R. Riviere and C.Kellershohn, Estimation of Thyroide Iodine "in Vivo" by Activation Analysis, *Nature* 214, 1221 (1967).
- (36) - Boddy, K. and W.D. Alexander, Clinical Experience of "in vivo" Activation Analysis of Iodine in the Thyroide Gland, Proceedings of the Symposium on Nuclear Activation Techniques in the Life Sciences, Amsterdam, 8-12, May 1967, IAEA, Vienna, 1967.
- (37) - Anderson, J., S.C. Osborn, R.W.S. Tomlinson, D. Newton, J. Rundo, L. Salmon and J.W. Smith, Neutron Activation Analysis in Man "in vivo" *Lancet* *ii*, 1201 (1964).
- (38) - Nixon, G.S., H. Smith and H.D. Livingston, Trace Elements in Human Tooth Enamel, Proceedings of the Symposium on

Nuclear Activation Techniques in the Life Sciences ,
Amsterdam, 8-12, May 1967, IAEA, Vienna, 1967.

- (39) - Fendrik, I. and H. Glubrecht, Investigation of the Propagation of Plant Pollen by an Indicator Activation Method, Proceedings of the Symposium on Nuclear Activation Techniques in the Life Sciences, Amsterdam, 8-12 , May 1967, Vienna, 1967, IAEA.
- (40) - Lenihan, J.M.A., Activation Analysis and Public Health, Proceedings of the Symposium Nuclear Activation Techniques in the Life Sciences, Amsterdam, 8-12, May 1967, IAEA, Vienna, 1967.