

ESTUDO DE ELEMENTOS TRAÇO EM UNHAS PELO MÉTODO DE ANÁLISE POR ATIVAÇÃO COM NÊUTRONS

Amilton Reinaldo Aguiar e Mitiko Saiki

Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, IPEN-CNEN/SP
Caixa Postal 11049
05422 - 970, São Paulo, SP, Brasil
e-mail: araguiar@net.ipen.br

RESUMO

O objetivo do presente trabalho foi desenvolver a metodologia de ativação com nêutrons para a análise de unhas visando estudo da doença fibrose cística. Por meio de irradiações curtas e longas de aparas de unhas, sob fluxo de nêutrons de 10^{11} a 10^{13} n.cm⁻².s⁻¹ no reator nuclear de pesquisa IEA-R1, foi verificada a possibilidade de análise dos elementos Al, As, Br, Ca, Cd, Cl, Co, Cr, Cu, Fe, K, Mg, Mn, Na, Se e Zn. Pela medida das atividades gama das unhas irradiadas, antes e depois do seu tratamento de lavagem, foi verificado que a solução diluída de Triton-X100 é adequada para eliminar os contaminantes de origem exógena. Com a solução de NH₄OH a limpeza foi parcial e com acetona praticamente não houve remoção de nenhum dos radioisótopos formados na ativação das unhas. Análises das unhas de cada um dos dedos separadamente mostrou a necessidade de se coletar unhas de todos os dedos das duas mãos para se ter uma amostra representativa. A exatidão e a precisão do método foram verificadas pelas análises dos materiais biológicos de referências Rice Flour, Bowen's Kale e Citrus Leaves, certificados por instituições como o NIES, IUPAC e NIST.

INTRODUÇÃO

As concentrações anormais de elementos traço nas unhas humanas podem ser atribuídas a dois fatores principais a saber: variações dos teores de elementos nas superfícies das unhas devido à contaminação externa e variações dos componentes inorgânicos intrínsecos das unhas que ocorrem durante o processo de sua formação.

As variações dos teores dos elementos nas superfícies das unhas estão relacionadas ao acúmulo dos elementos provenientes do meio ambiente e também ao contato constante com algum elemento que possa ser incorporado nas unhas, principalmente no contato das mãos com contaminantes, no exercício de determinadas profissões.

As variações dos componentes intrínsecos das unhas são relacionadas com o estado nutricional e de saúde dos indivíduos, que podem ser afetados pela composição dos elementos presentes no organismo e pelas alterações na capacidade do organismo de absorver ou eliminar elementos tóxicos ou essenciais. Portanto, estas anomalias podem ser diagnosticadas pela análise de elementos traço em unhas.

As análises de cabelos e de unhas são também de grande interesse para o exame de determinados tipos de

doenças, cuja diagnose é baseada nos sintomas apresentados pelo paciente quando a doença já se encontra em estado bastante avançado. Em geral estas doenças apresentam a característica de provocar alterações nos teores dos elementos comumente eliminados pelas unhas ou cabelos, muito antes do aparecimento do sintoma.

Muitos pesquisadores têm procurado analisar a correlação de certas doenças com os teores dos elementos contidos nas unhas. Mahler e colaboradores[1] determinaram os teores de Cu, Na, Au, Mn e Zn em unhas e estudaram sua correlação com as doenças renais. Xiao e colaboradores[2] determinaram os teores de Ca, Cl, K, Mg, Se e Zn em unhas de pacientes portadores de câncer no esôfago, distinguindo-os de pacientes não-portadores. Hunter e colaboradores[3] estudaram a correlação entre os teores de selênio e a incidência de câncer de mama em casos de pré- e pós-menopausa. A técnica usada em todos os trabalhos acima citados foi a de Análise Instrumental por Ativação com Nêutrons.

O presente trabalho tem como objetivo o desenvolvimento do método de ativação com nêutrons a análise elementar de unhas, visando posterior uso desta técnica no estudo de doenças humanas, principalmente a diagnose da fibrose cística. Esta é uma doença hereditária, caracterizada por disfunções nas glândulas endócrinas do

organismo que ataca os pâncreas e a mucosa pulmonar, provocando doença pulmonar crônica, insuficiência pancreática e aumento do nível de eletrólitos no suor (principalmente Na, Cl e K), podendo ser uma doença fatal na infância ou na adolescência.

Para que o método de análise por ativação possa ser aplicado a análise de unhas, fez-se necessário estabelecer procedimentos para coleta e tratamento de amostras, bem como a execução da análise propriamente dita, de maneira a obter resultados satisfatórios, com relação a exatidão e precisão.

MATERIAL E MÉTODO

Coleta das amostras de unhas. A coleta de amostras foi simples, uma vez que as unhas puderam ser cortadas facilmente com o auxílio de um par de tesouras de aço inoxidável ou cortadores sem maiores problemas para o doador. Além disso, não houve a necessidade de se tomar cuidados especiais para o acondicionamento destas amostras, sendo guardadas em invólucros plásticos. Na primeira fase deste trabalho foram coletadas amostras do grupo controle constituído de indivíduos saudáveis de diferentes idades e de ambos os sexos.

Preparação. O tratamento das amostras exigiu a remoção prévia da contaminação de origem exógena.

O método padrão de lavagem, descrito pela Agência Internacional de Energia Atômica[4], consiste em cinco lavagens sucessivas de 10 minutos, sob agitação mecânica, utilizando em sequência acetona, água deionizada, água deionizada, água deionizada e acetona. Muitos pesquisadores, porém, têm evidenciado a vantagem do uso de soluções de detergentes durante o processo de lavagem, tais como Triton-X100, Deconex, etc...

Para o estabelecimento das condições de lavagem a serem aplicadas nas amostras de unha, visando a remoção da contaminação superficial, foram realizados experimentos utilizando as seguintes soluções de lavagem: Triton-X100 2% em água, NH_4OH 12,5% e acetona p.a.. Para este experimento, cerca de 100 mg de amostras de unhas foram irradiadas por 8 h sob um fluxo de nêutrons térmicos de $10^{13} \text{ n.cm}^{-2}.\text{s}^{-1}$ do reator IEA-R1 e submetidas a medida da atividade gama antes e depois da lavagem. A operação de lavagem foi realizada com 10 ml de cada uma das soluções e sob agitação mecânica de 30 minutos, para uma lavagem mais efetiva.

Tendo os valores das taxas de contagens dos radioisótopos presentes nas unhas, antes e depois da operação de lavagem, foram realizados os cálculos dos teores dos elementos remanescentes após o processo de lavagem. Os resultados das porcentagens dos elementos remanescentes são mostrados na Tabela 1.

TABELA 1. Porcentagem dos Elementos Remanescentes nas Unhas Após a Lavagem com Diferentes Soluções

Elementos	Soluções de Lavagem		
	Acetona	NH_4OH	Triton-X100
Br	96,7-105,9	28,4	30,1
K	72,5	2,3	24,7
Na	90,7-114,6	2,8-14,1	34,1
Sb	85,7-94,8	75,0-85,4	85,8-92,8
Zn	100,0	88,1	98,5

Os resultados apresentados na Tabela 1 mostram que a acetona não foi eficiente para a remoção dos elementos analisados. A solução de NH_4OH não foi adequada, devido a remoção parcial do elemento Zn, considerado componente intrínseco da unha. A solução de Triton-X100 possibilitou a remoção dos contaminantes Br, K e Na de origem exógena e os elementos intrínsecos (Sb e Zn) não foram afetados pela operação de lavagem.

Após a execução destes ensaios, optou-se pela lavagem sob agitação mecânica por 30 min. com o detergente Triton-X100 2% em água, seguido de sua posterior lavagem com água destilada e acetona p.a. da Merck, para acelerar o processo de secagem. As unhas foram separadas da solução e a sua secagem foi feita à temperatura ambiente sobre papéis de filtro.

Para a análise, cerca de 60 a 100 mg da amostra foram pesados em invólucros de plástico e selados usando um ferro elétrico para solda.

Padrões sintéticos. Para uma avaliação quantitativa dos elementos contidos nas unhas, foram preparados padrões sintéticos, pipetando-se alíquotas de 50 μL das soluções padrões, contendo um ou mais elementos sobre tiras de papel de filtro Whatman nº 42. Estas tiras de papel foram colocadas posteriormente em dessecador à temperatura ambiente, para a sua secagem. As soluções padrões foram previamente preparadas dissolvendo sais, óxidos ou elementos na forma metálica, todos de grau p.a., com reagentes convenientes. A quantidade dos elementos no padrão sintético variou de 1 a 1000 μg .

Após a secagem, as tiras de papel de filtro foram dobradas e colocadas em invólucros de plástico.

Metodologia. Utilizando-se a técnica de análise por ativação comparativa, amostras e padrões foram irradiados simultaneamente em dispositivos apropriados no reator de pesquisa IEA-R1, do IPEN-CNEN, São Paulo.

Foram realizadas duas séries de irradiações. As irradiações curtas de 5 min foram feitas sob um fluxo de nêutrons térmicos de $4,25 \times 10^{11} \text{ n.cm}^{-2}.\text{s}^{-1}$, para a determinação dos elementos Al, Cl, Cu, K, Mg, Mn e Na. As irradiações longas de 16 h, a um fluxo de $10^{13} \text{ n.cm}^{-2}.\text{s}^{-1}$, foram feitas para a determinação dos elementos As, Br, Ca, Cd, Co, Cr, Cu, Fe, K, Na, Se e Zn.

As medidas de atividade gama induzida nas amostras e padrões foram realizadas utilizando-se um detector de Ge hiperpuro modelo GEM 20190 da EG & G Ortec conectado a uma placa ACE8K, a um microcomputador da

linha IBM-PC e eletrônica associada. Para aquisição dos dados foi utilizado o programa MAESTRO II e para a análise dos espectros foi utilizado o programa VISPECT2. As concentrações dos elementos foram calculadas pelo método comparativo de análise por ativação.

Os radioisótopos utilizados no presente trabalho foram: ^{28}Al , ^{76}As , ^{82}Br , ^{47}Ca , ^{115}Cd , ^{38}Cl , ^{60}Co , ^{51}Cr , ^{64}Cu , ^{66}Cu , ^{59}Fe , ^{42}K , ^{27}Mg , ^{56}Mn , ^{24}Na , ^{75}Se e ^{65}Zn .

No método comparativo de análise por ativação neutrônica, considera-se que a atividade gama induzida a um radioisótopo é proporcional à massa do elemento correspondente. Conhecendo-se ambas as taxas de contagem A_a (da amostra) e A_p (do padrão), além da massa m_p do elemento no padrão, se pode calcular diretamente a massa m_a do elemento na amostra ou sua concentração C_a em função da massa total da amostra M_a , segundo a relação (1):

$$C_a = \frac{A_a \cdot m_p}{A_p \cdot M_a} \cdot e^{\frac{0,693 \cdot (t_A - t_P)}{T_{1/2}}} \quad (1)$$

onde:

- A_a - atividade do radioisótopo na amostra
- A_p - atividade do radioisótopo no padrão
- m_p - massa do elemento no padrão
- M_a - massa total da amostra
- t_A - tempo de decaimento da amostra
- t_P - tempo de decaimento do padrão
- $T_{1/2}$ - meia-vida do radioisótopo

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Com o intuito de verificar se há uma diferença significativa entre os resultados obtidos para as unhas de cada um dos dedos de um mesmo indivíduo procedeu-se a análise de unhas de cada um dos dedos e de cada mão separadamente. Nas Tabelas 2 e 3 são apresentados os resultados destas análises das unhas das mãos esquerda e direita, respectivamente.

TABELA 2. Concentrações de Elementos Traço em Amostras de Unha de Cada Um dos Dedos da Mão Esquerda de Um Único Doador Adulto

Elemento	Polegar	Indicador	Médio	Anelar	Mínimo
Al (ppm)	76,3±4,3 ^a	140,6±6,1	176,6±14,2	76,5±4,1	45,1±4,8
As (ppb)	52,1±2,5	67,7±3,3	68,4±3,3	31,9±3,1	37,3±1,0
Br (ppm)	1,71±0,01	1,81±0,02	1,01±0,02	17,00±0,16	9,42±0,12
Ca (ppm)	1108±385	1179±212	1121±401	1141±357	1117±509
Cd (ppb)	43,1±4,4	39,3±9,4	N.D. ^b	271,0±28,3	142,2±44,2
Cl (ppm)	744±70	772±43	488±75	264±21	366±69
Co (ppb)	72,6±4,5	66,2±7,6	57,4±3,4	79,2±1,6	90,3±6,6
Cr (ppb)	357±17	421±25	377±22	278±25	278±24
Cu (ppm)	N.D.	14,8±3,0	N.D.	3,4±1,8	N.D.
Fe (ppm)	35,9±0,4	61,8±1,2	57,4±3,4	76,27±43,8	35,0±1,1
K (ppm)	96,2±1,5	258,0±8,0	253,3±4,4	76,0±31,2	71,1±30,6
Mg (ppm)	156±13	278±10	523±79	193±6	234±8
Mn (ppm)	0,45±0,03	0,65±0,09	0,58±0,11	0,30±0,23	0,24±0,13
Na (ppm)	134±3	365±13	290±40	193±11	193±1
Se (ppb)	984±125	813±31	1505±27	743±91	891±53
Zn (ppm)	110,3±0,8	104,2±4,5	113,0±3,5	106,1±1,6	117,1±3,0

a. Média e desvio padrão.

b. Indica que o elemento não foi detectado.

TABELA 3. Concentrações de Elementos Traço em Amostras de Unha de Cada Um dos Dedos da Mão Direita de Um Único Doador Adulto

Elemento	Polegar	Indicador	Médio	Anelar	Mínimo
Al (ppm)	107,5±4,6	197,2±7,3	146,5±10,5	84,5±6,4	91,3±5,5
As (ppb)	61,0±2,9	250,4±6,6	44,0±1,2	37,5±5,9	45,6±6,2
Br(ppm)	1,39±0,01	17,83±0,19	9,91±0,11	0,80±0,01	1,25±0,01
Ca (ppm)	1654±444	2327±1550	1487±676	1200±29	1790±43
Cd (ppb)	48±5	563±87	409±233	298±74	150±75
Cl (ppm)	667±10	452±11	378±49	158±10	258±26
Co (ppb)	53±4	3047±76	71±1	17±1	17±1
Cr (ppb)	470±20	34302±210	484±20	235±18	304±26
Cu (ppm)	N.D.	N.D.	18,8±3,2	2,6±2,5	3,2±2,5
Fe (ppm)	39±1	4730±37	60±2	11±1	26±1
K (ppm)	135±3	38±26	163±8	176±10	183±12
Mg (ppm)	152±6	343±94	158±88	192±34	144±14
Mn (ppm)	0,54±0,03	0,67±0,04	0,50±0,16	0,34±0,07	0,46±0,09
Na (ppm)	123±4	220±10	213±4	167±8	152±3
Se (ppb)	651±99	2400±28	744±64	1211±30	863±41
Zn (ppm)	139,1±1,6	473,2±6,2	116,9±2,9	113,5±0,5	99,3±0,5

Estes dados preliminares obtidos indicam que há uma flutuação entre as concentrações dos elementos, para as unhas de diferentes dedos de cada uma das mãos, comprovando a necessidade de se realizar a coleta de unhas de todos os dedos das duas mãos, para se obter uma amostra representativa. Pode haver também flutuação decorrente de uma lavagem incompleta para unhas de dedos que estão mais facilmente sujeitos à contaminações. Em geral, as unhas do dedo indicador de ambas as mãos apresentaram teores mais elevados dos elementos quando

comparadas com as dos demais dedos. Por outro lado, a unha do dedo indicador da mão direita apresentou teores mais altos de Al, As, Ca, Cd, Co, Cr, Fe, Se e Zn que dos dedos da mão esquerda.

Na Tabela 4 são apresentados os resultados das análises das unhas de indivíduos do grupo controle, os quais indicam que os elementos Al, Br, Ca, Cl, Cu, Fe, K, Mg, Mn, Na e Zn estão presentes em teores mais altos, da ordem de ppm e os elementos As, Cd, Co, Cr e Se na ordem de ppb.

TABELA 4. Análises de Unhas das Mãos de Indivíduos do Grupo Controle e Valores da Literatura

Elemento	Número de Amostras	Média Aritmética	Intervalo de Concentração	Média Geométrica	Mediana	Valores da literatura[5]
Al (ppm)	13	52±25	7,6 - 93	43,1x±2,1	52,5	130 - 930
As (ppb)	10	67±18	44 - 88	64,6x±1,3	70,6	200 - 3000
Br(ppm)	10	5,6±9,5	0,64 - 28,7	2,1x±3,6	1,4	9
Ca (ppm)	12	1050±412	436 - 1781	976,8x±1,5	939,5	370 - 3400
Cd (ppb)	10	240±147	41 - 499	192,0x±2,2	221,5	80 - 3400
Cl (ppm)	16	567±264	180 - 1070	493,6x±1,8	614,5	1000 - 3600
Co (ppb)	10	37±27	12 - 98	30,3x±1,9	27,3	55
Cr (ppb)	10	435±195	167 - 813	394,4x±1,6	435,5	5500
Cu (ppm)	10	6,4±4,8	1,7 - 15	4,8x±2,2	4,8	18
Fe (ppm)	10	25±11	11 - 47	22,6x±1,6	22,8	27 - 350
K (ppm)	10	113±88	20 - 258	81,3x±2,5	84,8	360 - 2800
Mg (ppm)	16	84±37	41 - 195	77,3x±1,5	76,5	16 - 120
Mn (ppm)	16	0,46±0,33	0,10 - 1,5	0,4x±1,9	0,38	0,04 - 2,1
Na (ppm)	16	201±120	39 - 499	169,8x±1,9	146,6	330 - 3000
Se (ppb)	12	762±237	473 - 1197	732,8x±1,3	688,5	750 - 8000
Zn (ppm)	12	121±33	81 - 154	117,5x±1,3	117,4	70 - 300

Uma comparação com os valores da literatura mostra que os resultados obtidos estão dentro dos valores apresentados por Cesareo[5].

Para avaliar a exatidão e a precisão do método de análise utilizado, foram realizadas as análises dos materiais de referência, a saber: CRM-10C Rice Flour do National Institute for Environmental Studies (NIES), Bowen's Kale

da International Union of Pure and Applied Chemistry (IUPAC) e SRM-1572 Citrus-Leaves do National Institute for Standards and Technology (NIST). Na Tabela 5 são apresentados os resultados das análises desses materiais, juntamente com os valores certificados[6].

Tabela 5. Análises dos Materiais de Referência

Elementos	Rice Flour		Bowen's Kale		Citrus Leaves	
	Este Trabalho	Ref. (6)	Este Trabalho	Ref. (6)	Este Trabalho	Ref. (6)
As (ppb)	153±2 ^a	(150) ^b	N.D. ^c	134±45	3150±17	3100±301
Br(ppm)	0,6±0,1	(0,5)	24,4±0,1	24,9±2,4	8,2±0,1	(8,2)
Ca (ppm)	N.D.	(95)	40889±111	41060±2217	29814±415	31500±1000
Cd (ppb)	1834±39	1820±60	791±40	889±249	N.D.	30±10
Co (ppb)	15,6±0,6	(7)	75±1	63±11	23±1	(20)
Cr (ppb)	41±10	(80)	382±25	369±100	782±14	800±125
Fe (ppm)	11,4±0,5	11,4±0,8	118±2	119±15	90±1	90±10
K (ppm)	2645±13	2750±99	19586±112	24370±1642	18378±104	18200±601
Na (ppm)	16,2±0,1	14,0±0,4	2519±9	2366±279	151±1	160±21
Se (ppb)	72±15	(70)	135±22	134±20	N.D.	(25)
Zn (ppm)	21,7±0,1	23,1±0,8	31,6±0,2	32,2±2,8	29±1	29±2

a. Desvio padrão calculado considerando erros nas contagens de padrão e amostra.

b. Números entre parênteses são valores informativos.

c. Indica elemento não detectado.

A comparação dos resultados obtidos com os valores certificados apresentou, em geral, erros percentuais inferiores a 16,0 % e foi verificada também a precisão dos dados obtidos, com desvios padrões relativos variando de 0,1 a 16,0%, para a maioria dos elementos analisados. Os resultados menos precisos e exatos foram obtidos para elementos presentes em teores menores que 1 ppm. Um número maior de dados experimentais estão sendo obtidos para o tratamento estatístico destes resultados.

Os resultados obtidos neste trabalho indicam a viabilidade da aplicação do método de análise por ativação na análise de unhas, para o estudo da doença fibrose cística.

AGRADECIMENTOS

A CNPq e FAPESP pelo apoio financeiro.

REFERÊNCIAS

[1] MAHLER, D.J.; SCOTT, A.F.; WALSH, J.R. and HAYNIE, G.. A study of trace fingernails and hair using neutron activation analysis, *Journal of Nuclear Medicine*, vol. 11 (12), p. 739-742, 1970.

[2] XIAO, L.; ZHANG, Y.H.; LI, Q.G.; ZHANG, Q.X.; WANG, K., INAA of elemental contents in fingernails of esophageal cancer patients, *Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry, Articles*, vol. 195 (1), p. 43-49, 1995.

[3] HUNTER, H.A.; MORRIS, J.S.; STAMTER, M.J.; COLDITZ, G.A.; SPEIZER, F.E. and WILLET, W.C., A prospective study of selenium status and breast cancer risk, *Journal of the American Medical Association*, vol. 264, p. 1128-1131, 1990.

[4] INTERNATIONAL ATOMIC ENERGY AGENCY, Activation analysis of hair as an indicator of contamination of man by environmental trace element pollutants, IAEA/RL/50, I.A.E.A., Vienna, 1978.

[5] CESAREO, R., Nuclear analytical techniques in medicine, *Techniques and Instrumentation in Analytical Chemistry*, vol. 8, p. 10, 1988.

[6] TORO, E.C.; PARR, R.M., and CLEMENTS, S.A., Biological and environmental reference materials for trace elements, nuclides and organic microcontaminants, A Survey Report IAEA/RL/128 (Rev. 1) Vienna, Austria, 1990.

ABSTRACT

The purpose of this work was to develop the neutron activation analysis for trace element determinations in nails in order to apply this method to the study of the cystic fibrosis disease. It was verified that the elements Al, As, Br, Ca, Cd, Cl, Co, Cr, Cu, Fe, K, Mg, Mn, Na, Se and Zn can be determined by using short and long irradiations with thermal neutron flux from 10^{11} to 10^{13} $\text{n.cm}^{-2}.\text{s}^{-1}$ at the IEA-R1 nuclear research reactor. The washing solutions of Triton-X100, NH_4OH and acetone were tested in order to eliminate external contaminants from the nail samples. The nail analyses of the individual fingers from both of hands showed that the samples must be collected from all the fingers from both of hands to have a representative sample. The precision and the accuracy of the results were also examined by analyzing NIES 10C Rice Flour, IUPAC Bowen's Kale and NIST 1572 Citrus Leaves reference materials.