

DETERMINAÇÃO DE ELEMENTOS TRAÇO EM OSSOS HUMANOS PELO MÉTODO DE ANÁLISE POR ATIVAÇÃO COM NÊUTRONS

Sila Kramarski*, Mitiko Saiki*, Aurélio Borelli** e João R. Ferreira Batalha***

*Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares - IPEN-CNEN/SP
Caixa Postal 11049
05422-970, São Paulo, Brasil

**Laboratório de Nutrição Humana - Faculdade de Medicina, USP
São Paulo, SP

***Faculdade de Medicina da Universidade de Mogi das Cruzes
Mogi das Cruzes, SP

RESUMO

Apresentam-se, neste trabalho, os resultados obtidos nas análises do tecido cortical de costelas de indivíduos saudáveis aplicando o método instrumental de análise por ativação com nêutrons. Foram obtidos os teores dos elementos Br, Cl, Fe, K, Mg, Na, Rb, Sr e Zn ao nível de ppm, Ca e P ao nível de percentagem. A precisão e a exatidão do método foram avaliadas pela análise dos materiais biológicos de referência NIST SRM 1577a Bovine Liver, IAEA A-11 Milk Powder, NIES CRM 9 Sargasso e NIES CRM 10A Rice Flour Unpolished.

I. INTRODUÇÃO

As determinações de elementos traço em ossos são de interesse para a avaliação do seu estado de fragilidade, das suas doenças metabólicas decorrentes dos efeitos de mineralização e para os exames dos ossos nas interfaces com os materiais metálicos dos implantes. Também as análises de ossos tem sido realizadas para detectar intoxicações dos trabalhadores de indústrias e nas investigações arqueológicas para o estudo da dieta e da saúde dos povos antigos.

Dentre as doenças ósseas mais comuns está a osteoporose, uma doença degenerativa resultante da perda lenta da massa óssea tornando os ossos mais sensíveis às fraturas.

As técnicas analíticas nucleares vem sendo muito utilizadas e com sucesso na análise de ossos^[1]. São utilizadas as técnicas de análise por ativação em testes *in vivo* e *in vitro*. Os testes *in vivo* são realizados usando fontes de nêutrons de ²³⁸Pu - Be para análise de elementos como Ca, Na e Cl principalmente dos ossos dos pés, mãos e espinha dorsal.

Rakovic e colaboradores^[2] determinaram a relação entre os teores de Na e Ca nos tecidos ósseos descalcificados. Kidd e colaboradores^[3] analisaram na tibia humana os elementos Ca, P, Mg, Na, Cl, Zn e Br.

O objetivo do presente trabalho consistiu em desenvolver o método instrumental de ativação com nêutrons para análise de amostras de ossos humanos para posterior contribuição ao estudo das doenças ósseas como a osteoporose.

II. PARTE EXPERIMENTAL

Coleta e Tratamento de Amostras de Ossos. As amostras de costelas humanas foram obtidas no Instituto Médico Legal de Mogi das Cruzes, SP. Foram coletadas amostras de dois indivíduos saudáveis. As amostras foram embrulhadas em folha de polietileno e mantidas congeladas até o momento de seu tratamento.

O tratamento destas amostras consistiu em seccionar os ossos com o auxílio de um bisturi e uma faca de titânio, para eliminar o tecido medular (parte esponjosa) e o perióstio (parte branca), ficando somente o tecido cortical. Foi analisado somente o tecido cortical devido a quantidade do tecido medular das costelas ser insuficiente para análise. De cada indivíduo foram coletadas duas ou três costelas e de cada costela foram obtidas duas amostras do tecido cortical. As lascas deste tecido foram lavadas com água destilada e colocadas sobre folhas de papel de filtro Whatman nº 41 para eliminação da umidade superficial. Posteriormente, estas amostras de tecido cortical foram submetidas a secagem por liofilização. As percentagens de perda de peso nesta secagem variaram de 15 a 20%.

Preparação dos Padrões Sintéticos dos Elementos. Inicialmente, foram preparadas soluções padrões, dissolvendo-se os elementos nas formas de metal, óxido ou sal, todos de alta pureza, com reagentes apropriados e, em seguida, fazendo-se a diluição com água destilada em balões volumétricos previamente calibrados. Dispondo-se destas soluções estoques de elementos, foram preparadas soluções mais diluídas, contendo um ou mais elementos, ou seja, foram preparadas as soluções padrões mistas.

Para a preparação dos padrões sintéticos propriamente ditos, foram pipetados 50 µL das soluções padrões simples ou mistas sobre tiras de papel de filtro Whatman nº 41, que em seguida foram colocadas em um dessecador à temperatura ambiente para que fosse realizada a secagem. Após a secagem, estas tiras de papel foram dobradas com o auxílio de pinças de aço inoxidável e colocadas em invólucros de plástico previamente limpos com solução de ácido nítrico diluído e água destilada.

Para o padrão de fósforo foram utilizados cerca de 25 mg de dihidrogenofosfato de amônio de pureza 99,999% da Aldrich Chemical Company, Inc pesados diretamente em invólucros de plástico.

Determinação da perda de peso na secagem dos materiais de referência. Para análise da exatidão do método foram analisados os seguintes materiais certificados de referência: Sargasso 9, Rice Flour Unpolished 10A ambos procedentes do National Institute for Environmental Studies (NIES), Japão, Bovine Liver 1577 proveniente do National Institute of Standard and Technology (NIST), Milk Powder A-11 proveniente da Agência Internacional de Energia Atômica (AIEA). O procedimento consistiu na secagem de uma alíquota de aproximadamente 450 mg de cada material em uma estufa a 78°C por 24 horas. Foram obtidas as seguintes perdas de peso: 4,96% para o Sargasso, 4,75% para o Bovine Liver, 11,76% para o Rice Flour Unpolished (10A) e 8,08% para o Milk Powder (A-11). Estes valores foram utilizados no cálculo das concentrações na base seca do material.

Procedimento para Análise Instrumental por Ativação com Nêutrons. Cerca de 100 a 200 mg de amostra pesada em invólucros de polietileno previamente limpos, foram irradiados juntamente com os padrões sintéticos dos elementos e de fósforo sob fluxo de nêutrons térmicos do reator nuclear nas seguintes condições:

-irradiações curtas de 3 minutos sob fluxo de nêutrons térmicos de $10^{11} \text{ n cm}^{-2} \text{ s}^{-1}$ no reator nuclear IEA-R1 por

meio de um sistema pneumático de irradiação na Estação 4. Este tipo de irradiação foi realizada para análise dos elementos Ca, Cl, K, Mg, Mn, Na, P e Sr;

-irradiações longas de 8 a 16 horas sob fluxo de nêutrons térmicos de $10^{12} \text{ n cm}^{-2} \text{ s}^{-1}$ foram realizadas para análise dos elementos Br, Ca, Fe, Na, Rb, Sr e Zn.

Após adequados tempos de decaimento, as medidas das atividades gama induzida pelos elementos das amostras e padrões foram realizadas utilizando-se um detector de Ge hiperpuro GEM 20190 da EG & G Ortec acoplado a um cartão ACE8K, a um microcomputador e eletrônica associada. A aquisição dos dados foi realizada utilizando o programa MAESTRO da EG & G Ortec, e os espectros gama foram processados pelo programa VISPECT2. Para a medida da atividade beta do ^{32}P foi utilizado um detector Geiger Müller. As concentrações dos elementos foram calculadas pelo método comparativo de análise por ativação.

III. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Nas TABELAS 1 e 2 estão os resultados das análises de costelas dos indivíduos Nº 1 e 2 respectivamente. Os elementos Br, Cl, Fe, K, Mg, Na, Rb, Sr e Zn foram encontrados da ordem de ppm e os elementos Ca e P da ordem de percentagem. Os resultados indicam que para a maioria dos elementos não houve uma diferença significativa nos teores encontrados entre as amostras de uma mesma costela, bem como entre as costelas de um mesmo indivíduo e entre as costelas de indivíduos diferentes. Somente para o elemento Fe houve uma discrepância entre os resultados obtidos para as diferentes amostras, isto devido provavelmente a contaminação deste elemento proveniente do sangue.

TABELA 1. Elementos Traço em Tecido Cortical de Costelas do Indivíduo Nº 1 (Resultados na Base Seca do Material)

Elementos	Indivíduo Nº 1			
	Costela Nº 1		Costela Nº 2	
	1-C1A	1-C1B	1-C2A	1-C2B
Br (ppm)	0,73 ± 0,05 ^a	0,55 ± 0,04	0,60 ± 0,07	0,77 ± 0,06
Ca (%)	19,8 ± 0,4	20,1 ± 0,4	21,6 ± 0,6	21,2 ± 0,4
Cl (ppm)	217 ± 10	246 ± 24	479 ± 16	508 ± 19
Fe (ppm)	44,4 ± 3,8	41,8 ± 9,8	16,8 ± 6,4	14,0 ± 3,9
K (ppm)	766 ± 74	798 ± 90	1180 ± 89	1182 ± 212
Mg (ppm)	3327 ± 150	3669 ± 197	2918 ± 117	3504 ± 162
Na (ppm)	4064 ± 90	3762 ± 51	4087 ± 61	3728 ± 60
P (%)	9,6 ± 0,1	12,1 ± 0,2	9,2 ± 0,1	9,1 ± 0,1
Rb (ppm)	1,21 ± 0,21	0,90 ± 0,26	1,99 ± 0,23	2,10 ± 0,24
Sr (ppm)	106 ± 10	91 ± 10	94,8 ± 7,2	113 ± 9
Zn (ppm)	120 ± 1	111 ± 1	88 ± 1	83 ± 1

a - Resultado de uma determinação. O desvio padrão foi estimado considerando erros nas medidas das taxas de contagens da amostra e padrão.

TABELA 2. Elementos Traço em Tecido Cortical de Costelas do Indivíduo Nº 2
(Resultados na Base Seca do Material)

Elementos	Indivíduo Nº 2					
	Costela Nº 1		Costela Nº 2		Costela Nº 3	
	2-C1A	2-C1B	2-C2A	2-C2B	2-C3A	2-C3B
Br (ppm)	0,83 ± 0,06	1,27 ± 0,05	0,81 ± 0,06	1,07 ± 0,04	1,05 ± 0,88	0,61 ± 0,03
Ca (%)	21,7 ± 0,1	20,0 ± 0,1	19,4 ± 0,5	20,3 ± 0,1	21,0 ± 0,1	19,7 ± 0,5
Cl (ppm)	668 ± 24	716 ± 27	708 ± 37	617 ± 30	647 ± 21	660 ± 22
Fe (ppm)	8,6 ± 2,4	8,9 ± 2,2	21,3 ± 2,7	14,9 ± 3,1	3,4 ± 1,8	10,6 ± 1,8
K (ppm)	714 ± 67	852 ± 75	836 ± 75	747 ± 60	831 ± 70	529 ± 81
Mg (ppm)	b	2319 ± 127	3132 ± 133	2734 ± 289	2928 ± 131	2744 ± 135
Na (ppm)	5432 ± 60	5574 ± 62	4217 ± 26	4761 ± 48	5133 ± 75	5353 ± 78
P (%)	10,2 ± 0,1	11,5 ± 0,2	8,7 ± 0,1	7,4 ± 0,1	9,1 ± 0,1	7,9 ± 0,1
Rb (ppm)	1,48 ± 0,22	1,41 ± 0,29	1,26 ± 0,70	0,84 ± 0,21	1,05 ± 0,88	1,04 ± 0,10
Sr (ppm)	105 ± 7	108 ± 12	100 ± 10	112 ± 10	84 ± 13	90 ± 12
Zn (ppm)	83,4 ± 0,6	82,2 ± 0,7	81,8 ± 0,7	101,0 ± 0,8	83,3 ± 0,7	78,2 ± 0,9

b - Espaço em branco indica que a análise não foi realizada

Na TABELA 3 estão apresentados os resultados obtidos nas análises dos materiais de referência Bovine Liver, Milk

Powder A-11, Rice Flour Unpolished 10A e Sargasso juntamente com os valores certificados.

TABELA 3. Concentrações dos Elementos nos Materiais Biológicos de Referência

Elementos	Materiais de Referência	Valores Experimentais	Valores de Referência ^[4,5]
Br (ppm)	Bovine Liver Milk Powder	8,9 ± 0,5 ^c	(9)
		15,7 ± 1,1	12,3 ± 1,2
Ca (%)	Milk Powder Rice Flour	1,22 ± 0,08	1,28 ± 0,04
		0,0098 ± 0,0001	0,0093 ± 0,0003
Cl (ppm)	Bovine Liver Sargasso	2777 ± 264	2800 ± 98
		53400 ± 4711	(51000)
Fe (ppm)	Bovine Liver Rice Flour	190 ± 4	194 ± 19
		12,6 ± 1,4	12,7 ± 0,7
K (%)	Bovine Liver Sargasso	1,02 ± 0,13	0,9960 ± 0,0007
		7,0 ± 1,0	6,10 ± 0,20
Mg (ppm)	Bovine Liver Sargasso	650 ± 116	600 ± 15
		6575 ± 858	6500 ± 299
Mn (ppm)	Bovine Liver Sargasso	9,7 ± 1,0	9,9 ± 0,8
		20,4 ± 1,5	21,2 ± 1,0
Na (ppm)	Bovine Liver	2370 ± 239	2430 ± 129
	Rice Flour	12,2 ± 1,6	10,2 ± 0,3
	Sargasso	18674 ± 722	17800 ± 800
P (%)	Milk Powder	1,01 ± 0,06	1,010 ± 0,101
	Rice Flour	0,3228 ± 0,0187	0,3400 ± 0,0071
Rb (ppm)	Bovine Liver	12,7 ± 0,7	12,5 ± 0,1
	Milk Powder	35,7 ± 2,6	30,8 ± 6,2
	Rice Flour	4,4 ± 0,1	4,5 ± 0,3
Sr (ppm)	Sargasso	996 ± 114	1000 ± 30
Zn (ppm)	Bovine Liver	121 ± 6	123 ± 8
	Milk Powder	38,2 ± 1,6	39,9 ± 2,3
	Rice Flour	25,2 ± 1,0	25,2 ± 0,8

c - média aritmética e desvio padrão.

Estes resultados indicam para a maioria dos elementos, uma boa precisão com desvios padrões relativos variando entre 1 e 15%. A comparação dos valores obtidos com os valores certificados ou informativos indicam uma boa concordância apresentando, em geral, percentagens de erros relativos inferiores a 15%.

Resultados obtidos neste trabalho indicam a viabilidade do uso da técnica de análise por ativação com nêutrons na determinação dos elementos Br, Ca, Cl, Fe, K, Mg, Na, P, Rb, Sr e Zn em ossos humanos.

AGRADECIMENTOS

A FAPESP e CNPq. pelo auxílio financeiro.

REFERÊNCIAS

- [1] ZAICHICK, V. Y., **Instrumental Activation and X-Ray Fluorescent Analysis of Human Bone in Health and Disease**, J. Radioanal. Nucl. Chem., Articles, vol. 179 n.2, p 295-303, 1994.
- [2] RAKOVIC, M., KUCERA, J., PILECKA, N., POVISYL, C., **Determination of the Sodium-to-Calcium Ratio in Sections of Undecalcified Bone Tissue Bone Tissue by Neutron Activation Analysis**, J. Radioanal. Nucl. Chem. Lett., vol. 165, n. 1, p 41-48, 1992.
- [3] KIDD, P. M., NICOLAOU, G., SPYROU, N. M., **Elemental Composition and Distribution of a Human Tibia Using Non-Destructive and Destructive Techniques of Analysis**, J. Radioanal. Chem., vol. 71, n. 1-2, p 489-507, 1982.
- [4] NATIONAL INSTITUTE FOR ENVIRONMENTAL STUDIES NIES, **Certified Reference Material N^o-9 "Sargasso"**, Japan, 1988.
- [5] TORO, C. E., PARR, R. M., and CLEMENTS, S. A., **Biological and Environmental Reference Materials for Trace Elements, Nuclide and Organic Microcontaminants**, International Atomic Energy Agency (IAEA) / RL / 128 (Rev.1), Vienna, 1990.

ABSTRACT

This work presents the results obtained in the analysis of rib bone samples from normal human subjects by applying instrumental neutron activation analysis. In these analyses the elements Br, Cl, Fe, K, Mg, Na, Rb, Sr and Zn were found at the level of ppm and the elements Ca and P at the level of percentage. The precision and the accuracy of the results were evaluated by using biological reference materials NIST SRM 1577a Bovine Liver, IAEA A-11 Milk Powder, NIES CRM 9 Sargasso e NIES CRM 10A Rice Flour Unpolished.