

ANÁLISE POR ATIVAÇÃO COM NÊUTRONS DE TECIDOS ÓSSEOS MEDULAR E CORTICAL DE ANIMAIS

Marcelo Kazuo Takata e Mitiko Saiki

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

RESUMO

Neste trabalho o método de ativação com nêutrons foi utilizado para a determinação dos elementos Ba, Br, Ca, Cl, Cr, Fe, K, Mg, Mn, Na, P, Rb, Sb, Sc, Sr e Zn em tecidos ósseos de origem animal. Os resultados obtidos indicaram que há diferenças significativas entre os teores de elementos presentes nos tecidos cortical e medular. Também foi verificado que há diferenças entre concentrações elementares em ossos de espécies distintas de animais.

I. INTRODUÇÃO

As determinações de elementos traço em tecidos ósseos têm sido de grande interesse principalmente na área médica por se tratar de uma matriz com depósito de elementos tóxicos e essenciais, e o fato do excesso ou a deficiência desses elementos estarem relacionados com as doenças metabólicas do osso.

Também na arqueologia, análises de elementos em ossos tem sido realizadas para o estudo da correlação existente entre os elementos presentes nos ossos e a dieta dos povos antigos.

Além disso dados sobre análises de ossos de humanos são bastante escassos na literatura devido a dificuldade na amostragem por causa das implicações médico legais na obtenção de amostras[1].

A amostragem e o tratamento do osso também são dificultados porque o osso adulto é constituído de dois tipos de tecidos: o externo chamado de tecido cortical que encontra-se numa forma mais compacta e o interno mais poroso denominado tecido medular. A subdivisão desses dois tecidos apresenta dificuldades por se tratar de um tecido humano que requer cuidados para evitar a contaminação do analista com as doenças do doador.

Dentre os trabalhos sobre análise de ossos subdivididos em seus dois subcompartimentos cortical e medular tem-se o de Foltynová e colaboradores[2] que verificaram concentrações de sódio duas vezes menores no tecido interno do que as no externo do osso.

Aras e colaboradores[3] analisaram individualmente os subcompartimentos ósseos de biópsias da crista ilíaca de humanos pelo método de análise por ativação com nêutrons e encontraram significantes diferenças entre os teores dos elementos As, Ba, Br, Ca, Cd, Cr, Eu, Fe, Hg, K, La, Lu, Na, Rb, Sb, Sm, Ta e U encontrados no tecido medular e cortical. Bigi e colaboradores[4] verificaram diferenças químicas e estruturais entre as fases inorgânicas dos ossos

cortical e medular. Samuldrawar e Robertson[5] analisaram os elementos Ba, Br, Ca, Cd, Cr, Cu, F, Fe, Mg, Mn, N, Na, Ni, O, P, Pb, Rb, Sr e Zn do tecido cortical e medular de costelas de humanos provenientes de autópsias e ressaltam a importância da caracterização elementar da medula óssea para o estudo da função deste tecido. Estes autores[5] também ressaltam a dificuldade na análise de osso pela falta de um procedimento padrão para o tratamento dos tecidos constituintes da amostra de osso.

No trabalho anterior, Takata e colaboradores[6] estudaram a precisão e exatidão dos resultados obtidos numa matriz de tecido ósseo por meio da análise dos materiais de referência certificados de ossos pelo método de análise por ativação com nêutrons.

Dando continuidade a este trabalho, o método de análise por ativação com nêutrons foi aplicado na determinação de teores de elementos traço no tecido ósseo para avaliar se há diferença entre a composição elementar no tecido cortical e medular do osso bem como entre os teores de elementos em ossos de espécies distintas de animais (bovinos e suínos).

II. PARTE EXPERIMENTAL

Preparação das soluções padrões de elementos. As soluções padrões dos elementos foram preparadas fazendo a dissolução dos elementos nas formas metálica, óxido ou sal com reagentes apropriados e usando água destilada para diluição. A partir das soluções padrões estoques foram preparadas as soluções mais diluídas contendo um ou mais elementos. Estas soluções foram preparadas pipetando-se alíquotas de 50 a 100 μL destas soluções sobre tiras de papel de filtro Whatman nº 40, que foram colocadas num dessecador para a secagem. Posteriormente estas tiras foram colocadas em invólucros de polietileno. Para o caso do padrão de P foi utilizado o sal $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ (dihidrogeno fosfato de amônio), Puratronic 99,998% da Johnson

Matthey Chemical Limited. Na TABELA 1 são apresentadas as massas dos elementos nos padrões utilizados na análise.

TABELA 1. Massas dos Elementos nos Padrões

| Elemento | Massa (μg) |
|----------|-------------------------|
| Ba | 49,9 |
| Br | 5,2 |
| Ca | 800,0 |
| Cl | 100,0 |
| Cr | 1,6 |
| Fe | 271,0 |
| K | 1000,7 |
| Mg | 1000,0 |
| Mn | 1,8 |
| Na | 64,8 |
| P | 15000 |
| Rb | 4,1 |
| Sb | 0,600 |
| Sc | 0,0559 |
| Sr | 505,8 |
| Zn | 34,6 |

Amostras de ossos e seu tratamento para análise por ativação. As amostras de origens bovina e suína utilizadas foram adquiridas de um açougue local e conservadas num freezer até o início de seu tratamento. O tratamento destas amostras consistiu na separação do tecido perióstio do tecido ósseo com o auxílio de um bisturi. Para algumas amostras a secagem foi feita após a separação entre o tecido cortical e medular. Foram utilizados dois processos de secagem: calcinação e liofilização. No processo de secagem por calcinação foi utilizada uma mufla de marca QUIMIS, modelo Q.318.21 a uma temperatura inicial de 100°C aumentando gradualmente até uma temperatura final de 800°C , e o tempo de calcinação foi de aproximadamente 10 horas. Na secagem por liofilização foi utilizado o liofilizador de marca EDWARDS, modelo Micro Modulyo 10-F105-01-880 a uma pressão de 5×10^{-2} mbar por um período de cerca de 7 horas. A TABELA 2 apresenta a lista de amostras coletadas para o presente estudo juntamente com os processos de secagem. A grande variação na porcentagem de perda de peso obtida para o tecido medular da costela bovina e do pé bovino se deve provavelmente a diferença da quantidade de tecido adiposo neles presentes. O tecido medular do pé bovino foi submetido a calcinação por se tratar de um tecido adiposo com dificuldades de secagem por liofilização.

Procedimento para análise por ativação. O procedimento para análise por ativação consistiu na irradiação de cerca de 100 a 150 mg de cada amostra em invólucros de polietileno juntamente com os padrões sintéticos dos elementos no reator nuclear de pesquisa do IEA-R1m do IPEN.

TABELA 2. Percentagens de Perda de Peso (P,%) na Secagem das Amostras de Tecido Ósseo.

| Amostra | Tecido | Proc. de secagem | P,% |
|----------------|------------|------------------|-----|
| Costela Bovina | Cortical | Liofilização | 14 |
| Costela Bovina | Medular | Liofilização | 36 |
| Pé Bovino | Cortical | Liofilização | 11 |
| Pé Bovino | Medular | Calcinação | 92 |
| Costela Bovina | Cort.+Med. | Calcinação | 49 |
| Costela Suína | Cort.+Med. | Calcinação | 66 |

Foram realizadas duas séries de irradiações: curtas de 2 minutos sob fluxo de nêutrons térmicos de $4,5 \times 10^{11}$ n $\text{cm}^{-2}\text{s}^{-1}$ para a detecção dos elementos Ba, Ca, Cl, K, Mg, Mn, Na e Sr e longas de 8 horas sob fluxo de nêutrons de 10^{12} n $\text{cm}^{-2}\text{s}^{-1}$ para analisar os elementos Ba, Br, Ca, Cr, Fe, K, Na, Rb, Sb, Sc, Sr e Zn.

Após adequados tempos de decaimento foram feitas as medidas das atividades gama induzidas aos elementos da amostra e padrões no detector de Ge hiperpuro da EG & G Ortec ligado ao cartão FINEP, a um microcomputador e sistema eletrônico associado. A seguir foram realizadas as identificações dos elementos presentes na amostra pelas energias dos raios gama e pelas meias-vidas. As concentrações dos elementos foram calculadas pelo método comparativo.

O P foi analisado pela medida da atividade beta (β^-) de 1,71 MeV do ^{32}P de $T_{1/2} = 14,28$ dias num contador Geiger Muller, após um período de decaimento de aproximadamente 14 dias.

III. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na TABELA 3 estão os resultados das análises das amostras do tecido cortical e medular do pé bovino. Os resultados das análises obtidos na base seca foram corrigidos para base úmida utilizando os valores das percentagens de perda de peso da TABELA 1. A comparação entre estes resultados indica que estes dois tipos de tecidos apresentam teores distintos de elementos traço. O tecido cortical do pé bovino apresenta teores da maioria dos elementos mais elevados que o tecido medular. Os elementos Cr, Fe e Sb não foram detectados no tecido cortical e o Rb no tecido medular.

TABELA 3. Concentrações de Elementos nos Tecidos do Osso de Pé Bovino. Resultados Expressos em $\mu\text{g/g}$ a Menos que Esteja Indicado

| Elemento | Tecido Cortical Base Úmida $X_m \pm s (n)$ | Tecido Medular Base Úmida $X_m \pm s (n)$ |
|-----------|---|--|
| Ba | 141,9 \pm 6,5 (8) | 17,2 \pm 0,4 (4) |
| Br | 0,61 \pm 0,11 (4) | 0,03 \pm 0,01 (2) |
| Ca (%) | 19,8 \pm 1,3 (9) | 2,6 \pm 0,1 (4) |
| Cr | n.d. | 1,2 \pm 0,1 (2) |
| Cl | 261,7 \pm 15,8 (5) | 50,7 \pm 1,8 (2) |
| Fe | n.d. | 5,0 \pm 0,1 (2) |
| Mg | 3453 \pm 336 (6) | 451 \pm 1 (2) |
| Mn (ng/g) | 279 \pm 42 (3) | 68 \pm 3 (2) |
| Na | 5538 \pm 335 (6) | 769 \pm 7 (2) |
| P (%) | 6,3 \pm 0,8 (4) | 1,8 \pm 0,5 (2) |
| Rb | 0,7 \pm 0,2 (2) | n.d. |
| Sb | n.d. | 0,09 \pm 0,04 (2) |
| Sr | 244 \pm 10 (7) | 29,3 \pm 0,3 (4) |
| Zn | 53,7 \pm 0,5 (3) | 6,8 \pm 0,2 (2) |

*n.d. indica não detectado; X_m , indica média aritmética; s. indica desvio padrão individual; n. indica o número de determinações.

Já para os resultados das análises do tecido cortical e medular da costela bovina apresentados na TABELA 4, verifica-se no tecido cortical as concentrações mais altas dos elementos Ba, Ca, Mg, Na, P e Sr e mais baixas de Br, Cl, K e Rb quando comparadas com as do tecido interno medular. Para o elemento Zn, praticamente não houve uma diferença significativa entre concentrações obtidas em ambos os tecidos (45,9 $\mu\text{g/g}$ de Zn no tecido cortical e 44,7 $\mu\text{g/g}$ no tecido medular). Os elementos Cr, Fe e Sc não foram detectados no tecido cortical e o Mn e Sb no medular.

Na TABELA 5 estão as concentrações de elementos obtidas nas amostras de costela bovina e suína submetidas a secagem por calcinação do osso todo (tecido cortical + tecido medular). Para os elementos Ca, Cl, Na e P observa-se que não há uma diferença significativa entre as concentrações encontradas na costela bovina e suína. Já para as concentrações dos elementos Fe, K, Mg, Mn, Sr e Zn, estas foram mais altas nas costelas suínas do que nas de bovinas. O elemento Ba não foi detectado na amostra de costela suína.

IV. CONCLUSÕES

Baseando-se nos resultados obtidos conclui-se que o tecido cortical e medular apresentam diferentes concentrações de vários elementos. Também os ossos de suínos e bovinos apresentam concentrações de elementos distintos, devido provavelmente à diferença na alimentação.

TABELA 4. Concentrações de Elementos nos Tecidos da Costela Bovina. Resultados Expressos em $\mu\text{g/g}$ a Menos que Esteja Indicado

| Elementos | Tecido Cortical Base Úmida $X_m \pm s (n)$ | Tecido Medular Base Úmida $X_m \pm s (n)$ |
|-----------|---|--|
| Ba | 109,3 \pm 1,4 (6) | 75,3 \pm 2,6 (5) |
| Br | 0,59 \pm 0,15 (3) | 1,10 \pm 0,08 (3) |
| Ca (%) | 18,7 \pm 1,0 (9) | 9,7 \pm 1,0 (6) |
| Cl | 194,4 \pm 2,7 (5) | 519,1 \pm 54,2 (3) |
| Cr | n.d. | 2,7 \pm 0,1 (3) |
| Fe | n.d. | 77,0 \pm 0,1 (2) |
| K | 669 \pm 6 (4) | 1011 \pm 115 (3) |
| Mg | 3512 \pm 68 (4) | 2121 \pm 256 (3) |
| Mn (ng/g) | 374 \pm 47 (5) | n.d. |
| Na | 4801 \pm 99 (4) | 2610 \pm 357 (6) |
| P (%) | 6,0 \pm 0,5 (6) | 4,8 \pm 0,4 (3) |
| Rb | 3,4 \pm 0,2 (2) | 5,8 \pm 0,3 (3) |
| Sb (ng/g) | 116,1 \pm 0,5 (2) | n.d. |
| Sc (ng/g) | n.d. | 0,8 \pm 0,3 (2) |
| Sr | 264,8 \pm 7,8 (8) | 154,2 \pm 12,6 (5) |
| Zn | 45,9 \pm 0,3 (3) | 44,7 \pm 1,5 (3) |

TABELA 5. Concentrações de Elementos nas Amostras de Costela Bovina e Costela Suína Totais (Tecido Cortical + Tecido Medular) Calcinadas. Resultados na Base Seca do Material Expressos em $\mu\text{g/g}$ a Menos que Esteja Indicado

| Elementos | Costela Bovina $X_m \pm s (n)$ | Costela Suína $X_m \pm s (n)$ |
|-----------|-----------------------------------|----------------------------------|
| Ba | 476,5 \pm 19,0 (9) | n.d. |
| Ca (%) | 33,8 \pm 2,5 (8) | 36,0 \pm 2,6 (8) |
| Cl | 238,9 \pm 3,4 (4) | 231,6 \pm 2,2 (3) |
| Fe | 56,5 \pm 3,5 (2) | 110,2 \pm 0,5 (3) |
| K | 857 \pm 46 (3) | 5352 \pm 180 (5) |
| Mg | 6335 \pm 206 (6) | 8087 \pm 230 (5) |
| Mn (ng/g) | 383,1 \pm 16,4 (5) | 864,4 \pm 19,5 (4) |
| Na | 8686 \pm 554 (5) | 8196 \pm 94 (4) |
| P (%) | 27,7 \pm 3,6 (4) | 25,0 \pm 3,7 (5) |
| Sr | 284,2 \pm 12,5 (5) | 853,4 \pm 11,8 (3) |
| Zn | 96,4 \pm 5,3 (3) | 281,8 \pm 10,9 (3) |

AGRADECIMENTOS

À FAPESP e ao CNPq pelo apoio financeiro

REFERÊNCIAS

- [1] Tandon, L., Iyengar, G.V., Parr, R.M., **A Review of Radiologically Important Trace Elements in Human Bones**, Appl. Rad. Isot., vol. 49, n. 8, p. 903-910, 1998.
- [2] Foltynová, V., Voska, L., Povysil, C., Kucera, J., Pilecká, N., Rakovic, M., **A Comparison of Sodium Amounts in Compact Bone, Red Marrow and Yellow Marrow Sections as Determined by Instrumental Neutron Activation Analysis**, J. Radioanal. Nucl. Chem., Letters. vol. 201, n. 6, p. 477-480, 1995.
- [3] Aras, N., Yilmaz, G., Alkan, S., Korkusuz, F., **Trace Elements in Human Bone Determined by Neutron Activation Analysis**, J. Radioanal. Nucl. Chem., vol. 239, n. 1, p. 79-86, 1999.
- [4] Bigi, A., Cojazzi, G., Panzavolta, S., Ripamonti, A., Roveri, N., Romanello, M., Noris Suarez, K., Moro, L., **Chemical and Structural Characterization of the Mineral Phase from Cortical and Trabacular Bone**, J. Inorg. Biochem., vol. 68, p. 45-51, 1997.
- [5] Samudralwar, D.L., Robertson, J.D., **Determination of Major and Trace Elements in Bones by Simultaneous PIXE/PIGE Analysis**, J. Radioanal. Nucl. Chem., Articles, vol. 169, p. 259-267, 1993.
- [6] Takata, M.K., Saiki, M., Borelli, A., **Análise de Materiais de Referência Bone Meal (NIST 1486) e Bone Ash (NIST 1400) pelo Método de Ativação com Nêutrons**, Anais do VII Congresso Geral de Energia Nuclear, Belo Horizonte, MG. 30 de agosto a 3 de setembro de 1999, em CD-ROM.

ABSTRACT

In this work, neutron activation analysis was applied in the determination of the elements Ba, Br, Ca, Cl, Cr, Fe, K, Mg, Mn, Na, P, Rb, Sb, Sc, Sr and Zn present in animal bone tissues. The obtained results indicated a significant difference between the elemental concentrations present in medular and cortical tissues. The results obtained for bone tissues from distinct animal species were also different.