



AUTARQUIA ASSOCIADA À UNIVERSIDADE
DE SÃO PAULO

DESENVOLVIMENTO DE METODOLOGIA NUCLEAR PARA
ANÁLISES CLÍNICAS

LAURA CRISTINA DE OLIVEIRA

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

Orientadora:
Dra. Cibele Bugno Zamboni

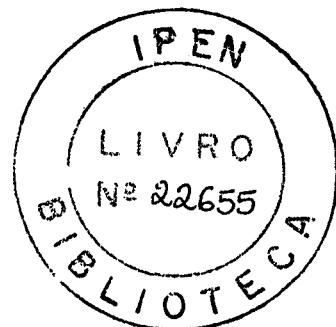
São Paulo
2003

INSTITUTO DE PESQUISAS ENERGÉTICAS E NUCLEARES

Autarquia Associada à Universidade de São Paulo

**DESENVOLVIMENTO DE METODOLOGIA NUCLEAR PARA
ANÁLISES CLÍNICAS**

Laura Cristina de Oliveira



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

Orientadora:

Dra. Cibele Bugno Zamboni

São Paulo
2003

Viver é acreditar e realizar o impossível
(Roberto Shinyashiki)

Dedico este trabalho
aos meus pais José e Romilda

ao Marco

Agradecimentos

Diversas pessoas contribuíram direta e indiretamente para que este trabalho fosse viável. Em especial gostaria de agradecer:

A Dra. Cibele B. Zamboni, pela orientação, incentivo, apoio e paciência indispensáveis para a realização desse trabalho.

Aos colegas do LEN, Agostinho, Ilca, Fred, Guilherme, Marcus, Renato e Rodrigo pela amizade e auxílio no desenvolvimento desse trabalho.

A Dra. Sonia P. Camargo e Msc. Ana C. Cestari da UNISA pelas contribuições em diversas etapas do trabalho.

A Dra. Ana M.G. Figueiredo e a Dra. Mitiko Saiki do LAN pelas várias discussões, principalmente no início deste trabalho.

Ao corpo técnico do reator IEA-R1m e Proteção Radiológica pelo pronto atendimento nas irradiações.

Aos colegas Cláudio, Fábio e Roberto pela colaboração e amizade.

Ao pessoal da CPG pela colaboração.

Ao IPEN/CNEN por possibilitar a realização deste trabalho.

À CNPq pelo apoio financeiro.

Ao Marco pelo carinho, amor e companheirismo.

Aos meus pais e irmãos pelo carinho e apoio em todos os momentos.

E a todos que a minha memória não conseguiu incluir nesta lista, mas que merecem um carinhoso reconhecimento.

DESENVOLVIMENTO DE METODOLOGIA NUCLEAR PARA ANÁLISES CLÍNICAS

Laura Cristina de Oliveira

RESUMO

No presente trabalho foi realizado um estudo detalhado da viabilidade do uso da técnica de ativação neutrônica para realização de análises clínicas de urina e sangue com o objetivo de auxiliar o estudo das funções biológicas de animais submetidos à ingestão crônica de Urânio. Para agilizar as análises e diminuir gastos empregou-se o método absoluto para determinação da concentração dos elementos de interesse nas amostras biológicas. Os resultados das análises nucleares quando comparados com os dados das análises convencionais mostraram-se compatíveis.

Esta metodologia nuclear foi empregada também em análises de ossos e alguns órgãos tais como fígado e músculo para a avaliação de danos ou lesões nos animais.

NUCLEAR METHODOLOGY DEVELOPMENT FOR CLINICAL ANALYSES

Laura Cristina de Oliveira

ABSTRACT

In the present work the viability of using the neutron activation analysis to perform urine and blood clinical analysis was checked. The aim of this study is to investigate the biological behavior of animals that has been fed with chow doped by natural uranium for a long period. Aiming at time and cost reduction, the absolute method was applied to determine element concentration on biological samples. The quantitative results of urine sediment using NAA were compared with the conventional clinical analysis and the results were compatible.

This methodology was also used on bone and body organs such as liver and muscles to help the interpretation of possible anomalies.

SUMÁRIO

	Página
INTRODUÇÃO.....	1
MOTIVAÇÕES RELACIONADAS À PROPOSIÇÃO DO PROJETO.....	1
MOTIVAÇÕES PARA USO DE METODOLOGIA NUCLEAR PARA REALIZAÇÃO DE ANÁLISES CLÍNICAS.....	2
CAPÍTULO 1: ASPECTOS BIOLÓGICOS FUNDAMENTAIS PARA AVALIAÇÃO CLÍNICA DO ORGANISMO.....	7
1.1 Composição e Importância dos Elementos Presentes no Organismo.....	7
1.1.1 Composição e Importância dos Elementos Presentes nos Ossos.....	10
1.2 Irradiação Interna por Urânio.....	11
1.2.1 Características Cinéticas do Urânio.....	12
1.2.2 Características Toxicológicas do Urânio.....	13
1.3 Descrição dos Experimentos com Animais.....	15
CAPÍTULO 2: DESCRIÇÃO DA METODOLOGIA NUCLEAR.....	17
2.1 Cálculo do Fluxo de Nêutrons.....	17
2.2 Instrumentação Nuclear.....	22
CAPÍTULO 3: PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL.....	23
3.1. Calibração do Espectrômetro - γ	23
3.2 Coleta e Preparo das Amostras Biológicas.....	24
3.3 Análise de Dados.....	24
3.3.1 Espectroscopia Gama das Amostras.....	25
CAPÍTULO 4: EXPERIMENTOS COM ANIMAIS.....	26
4.1 Experimento envolvendo Cães da Raça Beagles: Aplicação de Metodologia Nuclear para Estudo da Função Renal.....	26
4.1.1. Descrição do Experimento com Cães Beagles.....	27
4.1.2. Procedimento Experimental e Resultados.....	29
4.2 Experimento envolvendo Cães da Raça Beagles: Aplicação de Metodologia Nuclear para Análise de Sangue.....	33

4.2.1 Procedimento Experimental e Resultados.....	34
4.3 Avaliação do Método Nuclear para Análise de Sangue Total e Urina.....	37
4.4 Experimento com ratos Wistar: Aplicação de Metodologia Nuclear para Estudo de Ossos e Órgãos.....	41
4.4.1 Procedimento Experimental e Resultados - Análise de Ossos.....	41
4.4.2 Procedimento Experimental e Resultados - Análise de Órgãos.....	44
4.5 Experimento com Frangos Cobb: Aplicação de Metodologia Nuclear para Estudo de Ossos.....	47
4.5.1 Procedimento Experimental e Resultados.....	47
CAPITULO 5: CONCLUSÕES.....	51
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	53

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1: Urânio na cadeia alimentar.....	6
Figura 2: Diagrama dos Experimentos.....	16
Figura 3: Comportamento da atividade do detetor de ativação em função do tempo.....	21
Figura 4: Instrumentação nuclear para aquisição dos espectros de radiação gama.....	22
Figura 5: Curva de eficiência do espectrômetro- γ	23
Figura 6: Diagrama do Experimento com Cães Beagles.....	28
Figura 7: Espectro- γ (parcial) do material biológico ativado (urina Beagle).....	30
Figura 8: Comportamento do elemento Potássio na urina (Beagles).....	32
Figura 9: Comportamento do elemento Sódio na urina (Beagles).....	32
Figura 10: Comportamento do elemento Cloro na urina (Beagles).....	33
Figura 11a: Espectro- γ (parcial) do material biológico ativado (sangue total Beagle).....	34
Figura 11b: Espectro- γ (parcial) do material biológico ativado (sangue total Beagle).....	35
Figura 11c: Espectro- γ (parcial) do material biológico ativado (sangue total Beagle irradiação no caroço).....	35
Figura 12: Comportamento do elemento Al nas amostras de sangue total (Beagle).....	36
Figura 13: Diagrama comparativo entre os métodos clínicos convencionais e a metodologia nuclear estabelecida no presente estudo, para análise clínica de sangue.....	39
Figura 14: Diagrama comparativo entre os métodos clínicos convencionais e a metodologia nuclear estabelecida no presente estudo, para análise clínica de urina.....	40
Figura 15a: Espectro- γ (parcial) do material biológico ativado (osso Wistar).....	42
Figura 15b: Espectro- γ (parcial) do material biológico ativado (osso Wistar).....	42
Figura 16: Comportamento dos elementos Cálcio e Magnésio nas amostras de osso (Wistar).....	43

Figura 17a: Espectro- γ (parcial) do material biológico ativado (fígado Wistar).....	44
Figura 17b: Espectro- γ (parcial) do material biológico ativado (fígado Wistar).....	45
Figura 18a: Espectro- γ (parcial) do material biológico ativado (músculo Wistar).....	45
Figura 18b: Espectro- γ (parcial) do material biológico ativado (músculo Wistar).....	46
Figura 19a: Espectro- γ (parcial) do material biológico ativado (osso Cobb).....	48
Figura 19b: Espectro- γ (parcial) do material biológico ativado (osso Cobb).....	49
Figura 20: Comportamento dos elementos Cálcio e Magnésio nas amostras de osso (Cobb).....	50

LISTA DE TABELAS

	Página
Tabela 1: Exames clínicos necessários para o acompanhamento das funções biológicas.....	3
Tabela 2: Valores de referência (normalidade) associados aos principais elementos presentes no organismo.....	9
Tabela 3: Elementos analisados e suas principais características nucleares (urina Beagle)...	29
Tabela 4: Concentração de K, Na e Cl em urina obtida por ativação nuclear para o animal controle comparados com outras análises clínicas convencionais (Beagle).....	31
Tabela 5: Limite de detecção dos elementos Na, Cl e K na amostra de urina (Beagle).....	31
Tabela 6: Concentração e limite de detecção dos elementos presentes na amostra de sangue total do animal controle (Beagle).....	36
Tabela 7: Limite de detecção dos elementos Al, I, Mg, Mn e Zn presentes na amostra de urina do animal controle (Beagle).....	37
Tabela 8: Concentração e limite de detecção dos elementos presentes na amostra de osso do animal controle (Wistar).....	43
Tabela 9: Concentração e limite de detecção dos elementos presentes na amostra de fígado do animal controle (Wistar).....	46
Tabela 10: Concentração e limite de detecção dos elementos presentes na amostra de músculo do animal controle (Wistar).....	47
Tabela 11: Concentração e limite de detecção dos elementos presentes na amostra de osso do animal controle (Cobb).....	50

INTRODUÇÃO

A necessidade de avaliar o quadro clínico de animais submetidos à ingestão de Urânio por períodos prolongados está vinculada à participação do Grupo de Estrutura Nuclear (LEN) do IPEN no projeto multidisciplinar "*Determinação da Biodistribuição de Urânio na Cadeia Alimentar*". Trata-se de um projeto em parceria com o Instituto de Física da Universidade de São Paulo (IFUSP), com a Universidade de Santo Amaro (UNISA), com a Universidade Estadual Paulista (UNESP) e com o Instituto Superior de Ciência e Tecnologia Nuclear (ISCTN) em Cuba. Para mostrar a relevância, bem como o vínculo do presente estudo com o projeto, será apresentada primeiramente uma descrição sucinta do projeto e a seguir as motivações relacionadas à proposição do projeto, bem como para o desenvolvimento de uma metodologia, no caso na área nuclear, para auxiliar o estudo das funções biológicas dos animais envolvidos.

O projeto "*Determinação da Biodistribuição do Urânio na Cadeia Alimentar*" surgiu da necessidade de avaliar a ocorrência de anomalias em organismos sadios, em função da ingestão crônica de Urânio em sua dieta regulamentar. Entretanto, dadas as dificuldades de avaliar prováveis anomalias em seres humanos foram programados vários experimentos nos quais diferentes mamíferos e aves são submetidos à ingestão de Urânio, via dieta, por períodos prolongados. As informações obtidas podem então ser "extrapoladas" para os humanos utilizando o modelo geral de múltiplos compartimentos [1] para o cálculo de transporte de radionuclídeos em sistemas biológicos.

Motivações relacionadas à proposição do projeto

Considerando-se o fato de que os humanos são consumidores de produtos animais e seus derivados e, sabendo-se que rochas fosfáticas e calcárias (FIG. 1), nas quais o Urânio é um constituinte traço, são extensivamente utilizadas como fonte de Fósforo e Cálcio para suplemento de ração animal, em fertilizantes e adubos e conseqüentemente repassado para

organismo humano via dieta, é de fundamental importância avaliar quanto de Urânio ingerido é distribuído em cada órgão do corpo e quais os danos para saúde humana. A necessidade desta investigação tem por base medidas que envolvem a determinação de Urânio em várias marcas de FBC (Fosfato – Bicálcico usado como suplemento na alimentação animal) comercializadas no Brasil [2]. Estas medidas revelam que em 15 marcas de FBC analisadas, a concentração de Urânio em apenas uma das marcas apresenta quantidade inferior a 30 ppm-U, limite recomendado pela EPA (Environmental Protection Agency). Sabendo-se que parte do Urânio ingerido pelo corpo humano é retida em diferentes órgãos do corpo e parte é eliminada principalmente através da urina, fezes e suor, as quantidades não eliminadas podem se acumular nos rins e/ou em outros órgãos causando distúrbios ou até mesmo lesões em organismos saudáveis. Clinicamente, é usual a realização de exame de urina para diagnosticar danos associados à função renal a partir da determinação da concentração de Cloro, Sódio e Potássio na urina. Outros exames clínicos, relacionados na TAB. 1, fornecem também subsídios para avaliar organismos saudáveis. Analisando-se esta tabela verifica-se que a relação de exames convencionais necessários, para se obter um quadro clínico completo, envolvem: alto custo, demanda de tempo (dias) e requer coleta de material biológico em grande quantidade podendo desgastar, principalmente o organismo dos animais de pequeno porte, e conseqüentemente interferir no bom funcionamento de suas funções biológicas.

Motivações para uso de metodologia nuclear para realização de análises clínicas

Com o objetivo de obter esclarecimentos a respeito das conseqüências que a ingestão de Urânio pode vir a causar, foram programados experimentos com diferentes animais (ratos, frangos, cães e cabras), de modo que se possa avaliar a existência ou não de danos e lesões em organismos saudáveis. Particularmente, no presente estudo pretende-se mostrar a viabilidade de acompanhar as funções biológicas desses animais expondo pequenas quantidades de material biológico (urina, sangue, etc) à radiação neutrônica, para posterior análise da radiação gama induzida. Desta forma, pode-se determinar a concentração dos elementos de interesse (relacionados na TAB. 1) utilizando-se a técnica de cálculo da atividade absoluta, eliminando a necessidade da utilização de padrões e conseqüentemente reduzindo custos. Além disso, como a determinação quantitativa de vários elementos presentes na amostra pode ser obtida em uma única irradiação, o que nem

sempre é possível via métodos clínicos convencionais (TAB. 1), tem-se uma redução significativa também no tempo empregado nas análises.

Em cada experimento os animais são divididos em dois grupos: 1 grupo controle e 1 grupo de animais submetidos a dieta com ração dopada com quantidades bem estabelecidas de Urânio. A comparação entre os dados experimentais obtidos para cada grupo fornecem subsídios para uma interpretação dos resultados.

Tabela 1: Exames clínicos necessários para o acompanhamento das funções biológicas.

Exame Clínico	Material Biológico/ Coleta	Diagnóstico	Elemento medido/ Método [3]	(*) Preço R\$
Alumínio	Sangue/ 2,0 ml	Níveis elevados de Al em pacientes renais crônicos podem causar osteodistrofia e encéfalopatia	Al/ Espectrofotometria de absorção atômica	57,29
Alumínio	Urina/ 25 ml	Níveis elevados de Al em pacientes renais crônicos podem causar osteodistrofia e encéfalopatia	Al/ Espectrofotometria de absorção atômica	697,59
Brometo	Sangue/ 4 ml	Verificação dos níveis de intoxicação de pacientes que ingerem sedativos	Br ⁻ / Colorimétrico	353,85
Cálcio	Sangue/ 0,5 ml	Útil no diagnóstico de distúrbios do metabolismo de Ca, incluindo doenças ósseas e neoplásicas	Ca/ Colorimétrico	40,40
Cálcio	Urina/ 20 ml	Avaliação de cálculo renal	Ca/ Espectrofotometria de absorção atômica	57,29
Cloro	Sangue/ 0,5 ml	Avaliação do equilíbrio hídrico, eletrolítico e ácido básico.	Cl/ Titrimétrico	43,81
Cl urinário	Urina/ 5,0 ml	Avaliação do equilíbrio hídrico e salino	Cl ⁻ / Titrimétrico	37,07
Ferro	Sangue/ 1,0 ml	Útil na avaliação de anemias	Fe/ De lauber	43,81
Ferro	Urina/ 7,0 ml	Útil na avaliação de anemias	Fe/ Espectroscopia de emissão acoplada	609,97

Iodo	Urina/ 50 ml	Monitoração da excreção de Iodo após dose dessa substância	I/ Cromatografia líquida de alta pressão	542,57
Ionograma	Urina/ 5,0 ml	Disfunção renal	Cl, Na e K/ Eletrodo íon-seletivo	57,60
Magnésio	Sangue/ 0,5 ml	Avaliação dos distúrbios hidro-eletrolíticos	Mg/ Química seca	43,81
Magnésio	Urina/ 10,0 ml	Avaliação dos distúrbios hidro-eletrolíticos	Mg/ Colorimétrico	43,81
Manganês	Sangue/ 2,0 ml	Avaliação de intoxicação pelo Mn	Mn/ Espectrofotometria de absorção atômica	488,65
Manganês	Urina/ 25,0 ml	Avaliação de intoxicação pelo Mn	Mn/ Espectrofotometria de absorção atômica	370,70
Potássio	Sangue/ 1,0 ml	Avaliação do equilíbrio hídrico, eletrolítico e ácido básico, também em nefropatias como insuficiência renal	K/ Eletrodo íon-específico	33,70
Potássio	Urina/ 5,0 ml	Avaliação do equilíbrio hídrico, eletrolítico e ácido básico.	K/ Fotometria de chama	37,07
Sódio	Sangue/ 3,0 ml	Avaliação do equilíbrio hídrico e eletrolítico	Na/ Eletrodo íon-específico	33,70
Sódio	Urina/ 10,0 ml	Avaliação do equilíbrio hídrico	Na/ Fotometria de chama	37,07
Zinco	Sangue/ 2,0 ml	Deficiência de Zn indica um quadro de anemia ou leucemia	Zn/ Espectrofotometria de emissão indutivamente acoplada	33,70
Zinco	Urina/ 25,0 ml	Deficiência de Zn indica um quadro de cirrose, diabetes	Zn/ Espectroscopia de emissão indutivamente acoplada	303,30

(*) Preços praticados pelo Laboratório Fleury

Com base no exposto, o presente estudo pretende estabelecer o procedimento para realização de análises clínicas dos materiais biológicos de interesse, via ativação nuclear,

fornecendo dados que permitam avaliar o quadro clínico de animais de pequeno (ratos e frangos) e médio porte (cães e cabras), que serão submetidos à alimentação dopada com Urânio por períodos prolongados.

A abordagem do texto é feita em cinco capítulos. No capítulo 1 são apresentados os aspectos biológicos relevantes. No capítulo 2 é feita a descrição da metodologia aplicada. Da mesma forma, no capítulo 3 é feita a descrição da instrumentação utilizada e da análise de dados. A descrição dos experimentos com os animais, os resultados, bem como as discussões são apresentadas no capítulo 4. No capítulo 5 são apresentadas as conclusões.

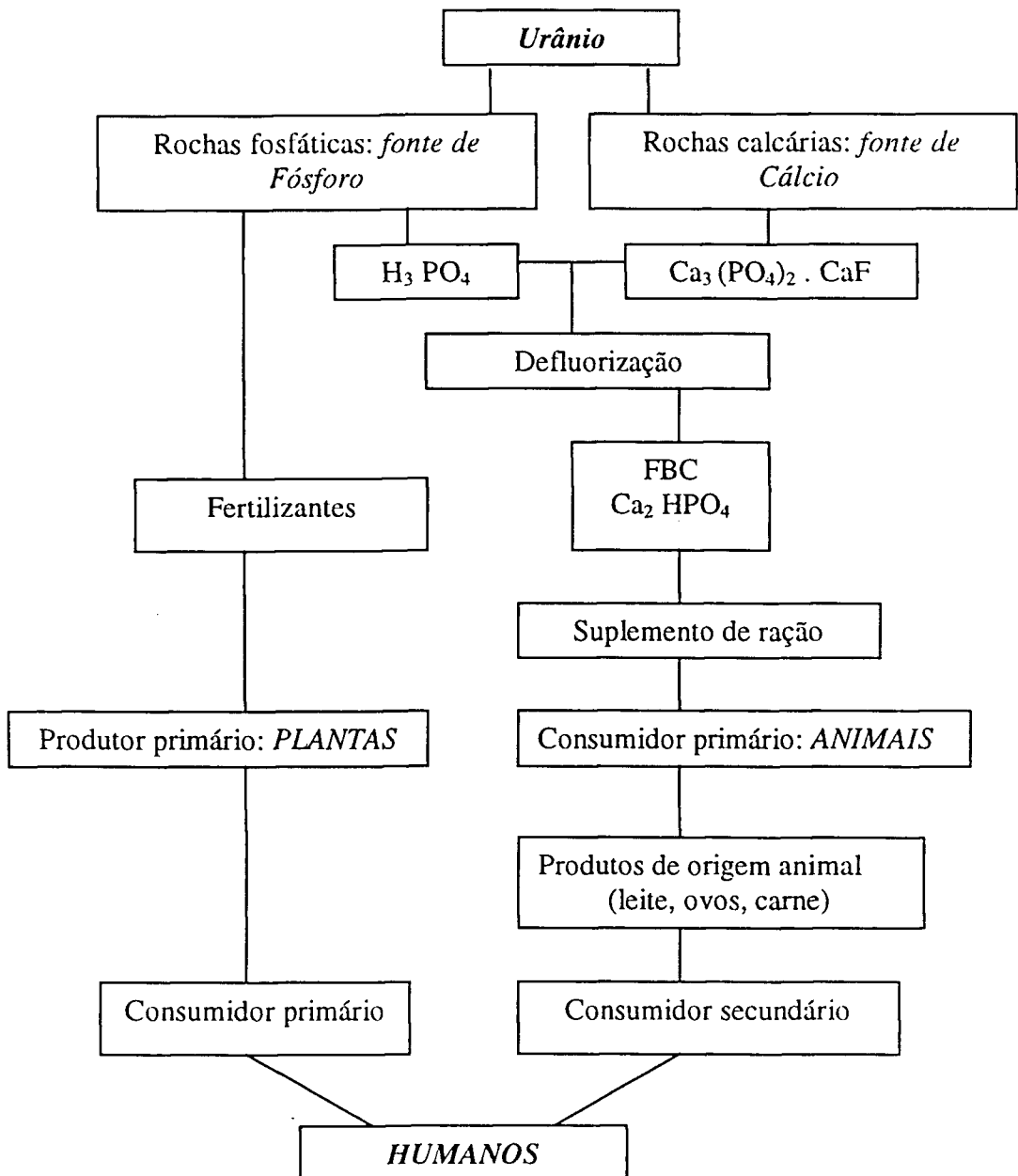


Figura 1: Urânio na cadeia alimentar.

CAPITULO 1: ASPECTOS BIOLÓGICOS FUNDAMENTAIS PARA AVALIAÇÃO CLÍNICA DO ORGANISMO

1.1 Composição e Importância dos Elementos Presentes no Organismo

Os elementos Oxigênio, Carbono, Hidrogênio e Nitrogênio são os mais abundantes no organismo e representam da ordem de 96% do peso corpóreo total, enquanto que o Cálcio, Fósforo, Potássio, Enxofre, Sódio, Cloro e Magnésio representam quase 4%. Os demais elementos são necessários na proporção de menos de 0,01%. [4]

Em um organismo sadio os elementos constituintes encontram-se dentro dos limites de normalidade apresentados na TAB. 2. Nesta tabela encontram-se informações a respeito do elemento e do material biológico (primeira coluna); do isótopo que pode ser quantificado via metodologia nuclear (segunda coluna) e dos valores de normalidade (terceira coluna). Quantitativamente, os elementos mais importantes são: *Na*, *Cl*, *K*, *Ca*, *Mg*, *P*, *H*, *C* e *O*, pois a manutenção de concentrações normais de *Na* e *Cl* são fundamentais para o equilíbrio osmótico do organismo (entrada e saída de água das células) e, no caso de processos fisiológicos, a alteração da concentração de *Ca* e/ou *Mg* e/ou *P* pode ser deletéria ou fatal.

Um outro aspecto importante relacionado a um organismo sadio diz respeito à manutenção do equilíbrio hídrico. Como sabemos, a água constitui ~ 70% do peso total do corpo de um adulto do sexo masculino e ~60% de um adulto do sexo feminino. A quantidade referente a 2/3 da água do corpo encontra-se no interior das células e o 1/3 restante fora destas. Em um organismo sadio, o corpo perde mais de 2400 ml de água por dia, sendo 1500 ml sob a forma de urina, ~ 800 ml através dos pulmões e superfície da pele e ~100 ml são perdidos nas fezes. Os líquidos são repostos pelos alimentos e pelas bebidas. Quando as perdas excedem a reposição, desenvolve-se a desidratação. Como o Sódio é

geralmente perdido com a água, a inspeção dos níveis de Na na urina é um bom indicador do equilíbrio hídrico - salino do organismo.

Com relação a disfunções metabólicas, as variações da concentração de eletrólitos no organismo podem levar ao desequilíbrio eletrolítico.

Eletrólitos são íons livres que existem nos líquidos orgânicos, sendo os principais cátions o Na^+ e o K^+ , e, os principais ânions o Cl^- e o HCO_3^- . Desta forma, todos os fenômenos metabólicos são afetados de alguma maneira pelas concentrações destes elementos, que são os responsáveis pelo controle de entrada e saída de água das células bem como do estado de hidratação e do pH, tanto do Líquido Intra-Celular (LIC) quanto do Líquido Extra-Celular (LEC). Portanto, a neutralidade elétrica do organismo é preservada desde que a proporção de cátions e ânions esteja em equilíbrio no organismo.

Outro aspecto importante relacionado a organismos sadios diz respeito à manutenção do equilíbrio ácido-básico. Uma grande quantidade de ácidos é produzida diariamente no organismo, como resultado do metabolismo, sendo a maior parte desses ácidos excretados pela urina. Todo organismo saudável dispõe de mecanismos eficazes para manter o pH do LEC e do LIC dentro dos estreitos limites (7,35 a 7,45). Através da determinação da concentração de Potássio e Cloro no sangue, tem-se condição de avaliar o equilíbrio ácido - básico no organismo.

Tabela 2. Valores de referência (normalidade) associados aos principais elementos presentes no organismo.

Elemento/ material biológico	Características dos radionuclídeos [T _{1/2}]; E _γ (keV)[5].	Limites de normalidade [6] (adultos)
Alumínio/sangue	²⁸ Al (2,24min); 1779	0 – 6,0 ng/ml
Alumínio /urina		0 – 32 mg/24h
Bromo / sangue	⁸⁰ Br (17,68 min); 616	1 – 2 mg/ml
Cálcio /sangue	⁴⁹ Ca (8,7min); 3084	8,8 – 10,6 mg/dl
Cálcio /urina		55 – 220 mg/24h
Cloro /sangue	³⁸ Cl (37min); 1642	97 – 106 mEq/l
Cloro / urina		110 – 250 mEq/24h
Ferro / sangue	⁵⁹ Fe (44d); 1099	60 – 140 mg/dl
Ferro / urina		100 - 300 µg/24h
Iodo / urina	¹²⁸ I (25 min); 442	100 – 460 µg/24h
Magnésio / sangue	²⁷ Mg (9.4m); 843	1,9 – 2,5 mg/dl
Magnésio / urina		70 – 120 mg/24h
Manganês / sangue	⁵⁶ Mn (2.5 h): 846	0,40 – 0,85 ng/ml
Manganês / urina		< 0,2 µg/24h
Potássio / sangue	⁴² K (12,2 h); 1525	3,5 – 4,5 mEq/l
Potássio / urina		25 – 125 mEq/24h
Sódio / sangue	²⁴ Na (15 h); 1368	137 – 148 mEq/l
Sódio / urina		40 – 220 mEq/l
Zinco / sangue	⁶⁹ Zn (14 h); 438	0,66 – 1,10 µg/ml
Zinco / urina		300 - 600 µg/24h

1.1.1 Composição e Importância dos Elementos Presentes nos Ossos

Nos mamíferos a maior parte do Cálcio, Fósforo e Magnésio do corpo encontra-se no esqueleto, o qual tem por função proporcionar apoio mecânico além de servir como reservatório destes minerais ao metabolismo [7]. A distribuição desses elementos em um organismo adulto (ossos e dentes) é de 1300g de Ca, 600g de P e 14g de Mg sendo que, em média, os ossos contêm 98% de Ca e 85% de P do corpo [8].

A resistência do osso depende fundamentalmente da matriz orgânica, responsável por regular e distribuir o componente inorgânico e pela reabsorção e formação da matriz óssea, remodelando o osso de acordo a atividade física, bem como do material inorgânico, constituído essencialmente por cristais de Hidroxiapatita [$\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$]. Em organismos sadios existe um intercâmbio diário de cerca de 25mg a 110mg do Ca presente no osso e do Ca presente no soro [7].

Estudando a estrutura óssea, via quantificação dos elementos Ca, Mg e P, pode-se diagnosticar várias anomalias, tais como:

- *disfunção da glândula paratireóide*: esta disfunção provoca a descalcificação dos ossos, para manter a concentração de Cálcio no soro. [8];
- *raquitismo*: provocado principalmente por falta de vitamina D, disfunção identificada pela falta de Ca e P;
- *osteomalácia aguda*: fragilidade exagerada do esqueleto - insuficiência de reabsorção ou excesso de eliminação do cálcio;
- *osteoporose*: descalcificação do tecido ósseo.

Quantitativamente os elementos que devem ser monitorados (em estruturas ósseas) dizem respeito ao *Ca, Mg e P*, pois a manutenção destas concentrações é de fundamental importância para garantir o correto desenvolvimento da estrutura óssea e bem como a manutenção mecânica do esqueleto. De acordo com a TAB. 2, pode-se determinar Ca e Mg pela radiação gama emitida (3084 keV e 843 keV, respectivamente), entretanto, o P não pode ser obtido por esta técnica pois trata-se de um emissor beta puro .

1.2 Irradiação Interna por Urânio

A ingestão crônica de elementos radioativos via dieta, conforme discussão apresentada na introdução deste trabalho (FIG. 1), pode levar a irradiação interna de indivíduos resultando em doses de radiação não programadas.

A irradiação interna é resultante da incorporação de material radioativo, o qual vai se distribuir pelo organismo, se depositar em órgãos e/ou ser eliminado via excretas. A contaminação interna envolve quatro estágios sucessivos: a incorporação, a absorção, a deposição e a eliminação.

Incorporação: é a passagem do material radioativo pelas vias de entrada do corpo, ou seja, a ingestão, a inalação ou a deposição na pele intacta ou ferida.

Absorção: é a passagem do material radioativo para os fluídos extracelulares como sangue e linfa. Uma vez incorporado, o radionuclídeo pode então se difundir no meio interno. Particularmente, a absorção gastrintestinal difere para cada radionuclídeo, isto é, alguns não são absorvidos sendo eliminados diretamente pelas fezes e outros podem ser absorvidos, principalmente, via intestinal. Os isótopos cuja absorção via gastrintestinal é insignificante ou nula são os que possuem baixa solubilidade, como os óxidos de urânio, plutônio e tório.

Deposição: após a absorção para os fluídos extracelulares, o radionuclídeo pode se distribuir pelo corpo de forma homogênea ou localizada, concentrando-se em certos órgãos ou tecidos. O comportamento interno do radionuclídeo, ou seja, sua cinética, está relacionada com suas características físico-químicas.

Eliminação: trata-se da remoção do material radioativo por excreção, essencialmente a eliminação urinária (resultante da filtração do sangue pelo rim) e fecal (eliminação de bile, secreções digestivas e materiais incorporados não absorvidos no trato gastrintestinal).

Os eventos que se sucedem quando um organismo é exposto a irradiação interna podem ser descritos pelas seguintes etapas: a energia da radiação é transferida para o organismo; as moléculas que absorvem a radiação podem ser alteradas direta ou indiretamente, produzindo lesões bioquímicas nas células do organismo. No mecanismo direto tem-se a transferência de energia para uma molécula (como DNA, aminoácidos e proteínas), já no mecanismo indireto, a energia é transferida para uma molécula de água e esta sofre alterações estruturais (radiólise da água), originando espécies químicas bastante reativas e difusíveis, chamadas radicais livres que podem reagir entre si originando produtos altamente tóxicos para a célula ou se ligar às moléculas danificando-as.

Particularmente, a incorporação do urânio tem sido muito estudada nos últimos anos. Um estudo realizado por Duarte [9] aborda em detalhes os aspectos relevantes a respeito da incorporação interna, tais como cinética do urânio nos órgãos, danos e processos de eliminação. Os principais aspectos serão mencionados a seguir.

1.2.1 Características Cinéticas do Urânio

O urânio é o quarto elemento da série dos actínídeos. Consiste de uma mistura de três radioisótopos: ^{238}U (99,2739%), ^{235}U (0,7204%) e ^{234}U (0,0057%) e qualquer que seja sua via de incorporação, sua absorção pela corrente sanguínea vai depender de sua solubilidade.

No organismo dos mamíferos os átomos de Urânio tendem a ser convertidos a Urânio hexavalente. A presença da forma tetravalente na corrente sanguínea só é conseguida por meio de injeção intravenosa, mesmo este, se oxida em Urânio hexavalente ou óxido de Urânio coloidal no plasma [10], [11], [12]. O óxido de uranila (UO_2^{++}) é a espécie mais estável em solução e é a forma mais comum de urânio presente nos fluidos do corpo.

Uma vez na corrente sanguínea, os compostos solúveis de Urânio são rapidamente distribuídos pelo organismo humano. Dados de experimentos em humanos revelaram que 2/3 da dose injetada deixa a corrente sanguínea em 6 minutos e após 20 horas da

administração 99% deixou a corrente sanguínea [13]. Isso ocorre em virtude da abundância de íons HCO_3^- no sangue, que fazem com que o complexo Urânio-proteína se dissocie continuamente para restabelecer o equilíbrio com o complexo Urânio-bicarbonato e assim ser eliminado [14].

Em medidas em vivo, de indivíduos expostos, 85% da carga corporal de Urânio foi encontrada no osso, mais que 90% do remanescente estava no rim e quantidades detectáveis poderiam também ser encontradas no fígado [15]. Segundo a “International Commission on Radiological Protection”, ICRP [16], a distribuição do Urânio no organismo ocorre na seguinte ordem: esqueleto, rim e fígado com a relação 131:15:1, respectivamente. Dados mais recentes de análises radioquímica de tecidos de autópsia, feitas pelo “United States Uranium Registry”, USUR [17], revelaram que a deposição de Urânio em tecidos humanos segue a seguinte ordem decrescente: esqueleto, fígado e rim, com razão de 63:3:1, respectivamente.

Nos ossos, o Urânio se deposita principalmente nos cristais de Hidroxiapatita, ligando-se aos grupamentos fosfato destes cristais. Sua deposição no osso é uma reação de troca iônica, na qual o íon uranila substitui os íons Ca^{++} [18]. O tamanho dos íons UO_2^{++} impede sua entrada no interior do cristal de Hidroxiapatita e ele permanece em sua superfície acessível a reações de troca iônica [11, 14].

Nos rins, constatou-se que o Urânio se distribui de maneira uniforme pelo órgão concentrando-se principalmente, nas estruturas corticais e sobre células do túbulo contornado proximal [19].

1.2.2 Características Toxicológicas do Urânio

A exposição humana a compostos de Urânio pode levar a dois tipos de dano, um renal causado pela toxicidade química do Urânio e outro radiológico causado pela absorção da radiação ionizante emitida. A avaliação de qual é o mais crítico vai depender da solubilidade do composto e de sua composição isotópica. Para os composto classe D, considerados altamente solúveis, (meia vida biológica menor que 10 dias), o dano químico

renal é o mais crítico, mesmo para um alto grau de enriquecimento; para compostos classe W, moderadamente solúveis, (meia vida biológica de 10 a 100 dias), o dano mais crítico é determinado pelo grau de enriquecimento e para os compostos classe Y, ditos insolúveis, (meia vida biológica de mais de 100 dias), o dano radiológico no pulmão é o mais crítico, não importando o grau de enriquecimento. Portanto, o isótopo mais danoso do ponto de vista de irradiação é o ^{235}U , cuja concentração é menor que 1% em Urânio natural.

Realizaram-se vários estudos para explicar a ação tóxica do Urânio no rim [11, 20, 21]. A explicação que prevalece é a de que o Urânio não entra nas células, mas danifica o rim pela ligação com proteínas das membranas das células do túbulo renal. Em estudos realizados em pacientes terminais [9, 11], notou-se que após administração de Urânio a capacidade de reabsorção pelo rim de Sódio e Cloro, assim como a secreção de Potássio, são alteradas. Em decorrência, os cloretos aparecem em grande abundância na urina.

Para compostos solúveis de Urânio altamente enriquecido em ^{235}U , o órgão considerado crítico é o osso, pela sensibilidade à radiação das células da medula óssea que podem ser danificadas. Neste caso, o efeito tóxico nos rins é de importância secundária [22, 23]. Alguns estudos revelam alterações metabólicas no fígado de animais, mas o fígado mostrou alto poder de regeneração [24]. Para compostos de Urânio insolúvel, o órgão que recebe a maior dose é o pulmão, não importando o grau de enriquecimento [22, 23].

Portanto, uma vez incorporado ao organismo (o Urânio) tem-se a urina como principal via de eliminação, entretanto, o Urânio remanescente pode-se depositar em vários órgãos principalmente nos ossos, rins e fígado, podendo levar o organismo sadio a desenvolver o câncer ósseo e necrose das células renais em função de sua toxicidade [9]. Desta forma, além da análise da urina e sangue, os órgãos de maior relevância para termos informação da incorporação interna do Urânio dizem respeito aos ossos, rins e fígado. Em função disto, os animais envolvidos nos experimentos terão prioritariamente estes órgãos analisados.

1.3 Descrição dos Experimentos com Animais

Na FIG. 2 é apresentado um diagrama que descreve a rotina dos experimentos. Os animais selecionados são alojados em baias metabólicas logo após o desmame. No caso dos frangos após a primeira semana de vida. Esses animais são alimentados diariamente com ração dopada com diferentes concentrações de nitrato de uranila, exceto o animal controle. Os experimentos são realizados no laboratório UNITOX da UNISA e na UNESP e estão previstos para terem a duração de 7 meses (cães e cabras) e 5 meses (ratos e frangos). Particularmente, os experimentos com cães Beagles (UNISA) e ratos Wistars (UNESP) já foram concluídos. No momento encontra-se em andamento o experimento envolvendo frangos Cobb. Outros experimentos, envolvendo ratos e cabras, estão previstos.

Durante os experimentos, como pode ser observado no diagrama apresentado na FIG.2, a rotina consta do controle diário do peso, quantidade de ração ingerida pelos animais, coletas semanais de urina e quinzenais e/ou mensais de sangue. Ao término de cada experimento os cães são sacrificados e necropsiados. Foram coletados amostras de diferentes tecidos para determinação da concentração dos elementos constituintes.

Portanto, no presente estudo, pretende-se estabelecer para cada material a ser analisado o método de preparo da amostra biológica e as condições de irradiação no reator nuclear para posterior determinação da concentração dos elementos, essenciais para as análises clínicas (conforme relação apresentada na TAB. 1) e para análise da estrutura óssea e demais órgãos (conforme diagrama apresentado na FIG. 2).

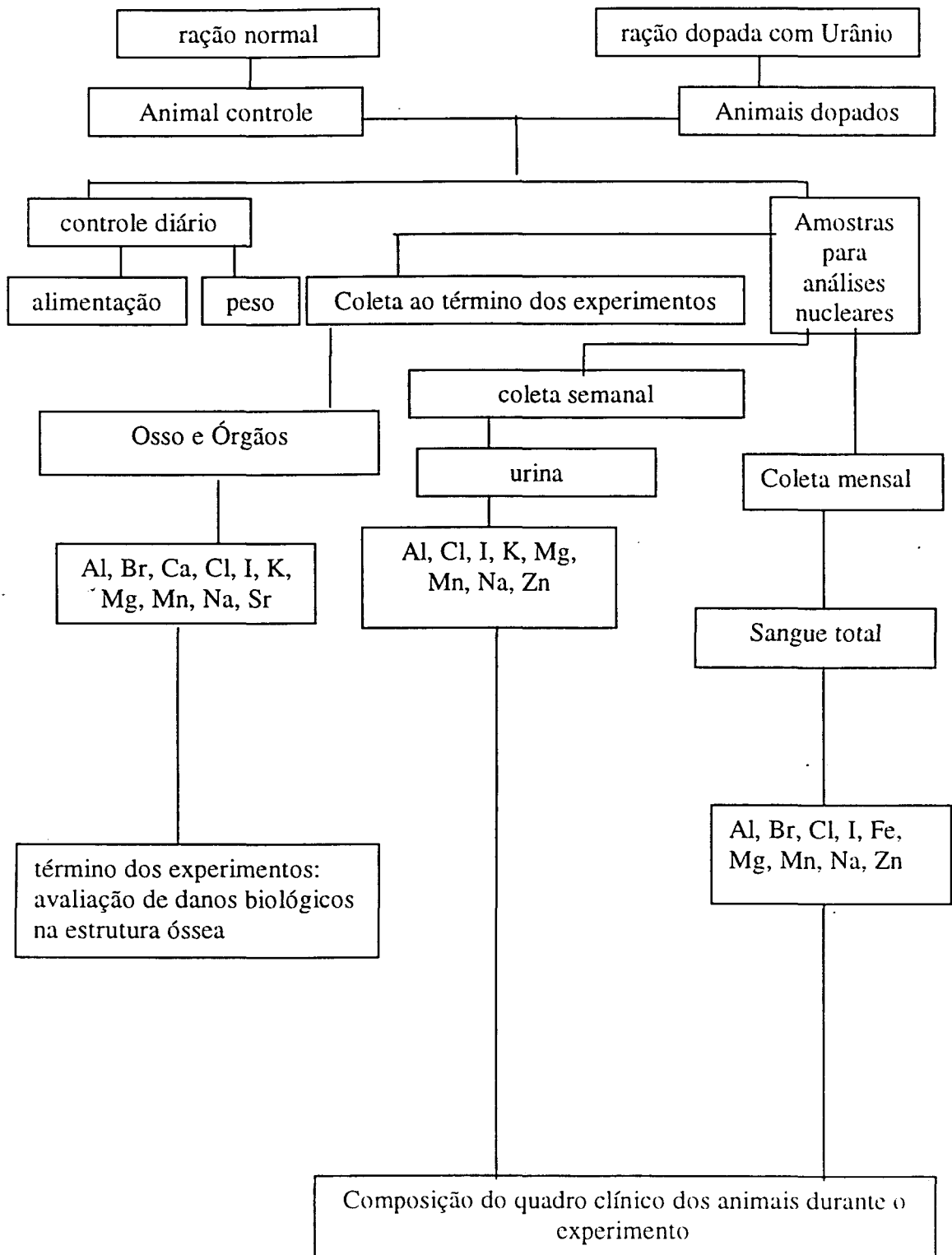


Figura 2: Diagrama dos Experimentos.

CAPITULO 2: DESCRIÇÃO DA METODOLOGIA NUCLEAR

2.1 Cálculo do Fluxo de Nêutrons

A indução de radioatividade em materiais utilizando nêutrons como feixe incidente é denominada ativação neutrônica. Através desta técnica pode-se obter informações da composição do material ativado bem como do fluxo de nêutrons ao qual o material foi exposto.

Em reatores o fluxo de nêutrons pode ser obtido por detetores de ativação. Um dos primeiros experimentos utilizando esta técnica para medida de fluxo de nêutrons foi realizado por W. Bothe em 1943 [25]. Uma característica importantíssima desta técnica é que devido à sua pequena dimensão, esse detetores de ativação (usualmente folhas finas e/ou fios metálicos) não causam praticamente perturbação no fluxo em comparação com os detetores convencionais tais como: o uso de detetores de cintilação líquida orgânica, que permitem a obtenção do espectro de energia do nêutron na presença de radiação gama, por discriminação eletrônica [26], ou pelo os espectrômetros multi-esferas (as quais são constituídas de material hidrogenado e possuem em seu interior detetor de cintilação) [27], ou ainda por emulsão nuclear, que se baseia na medida de traços deixadas pelos nêutrons na interação destes com o hidrogênio da presente na emulsão.

A escolha do tipo e formato do detetor de ativação depende principalmente da magnitude da seção de choque, da magnitude do feixe de nêutrons, do tempo de irradiação e das propriedades de fabricação do detetor de ativação. Levando em consideração que em um reator nuclear as temperaturas são elevadas, os detetores de ativação devem possuir alto ponto de fusão; devem ser confeccionados de material extremamente puro (>99%), para evitar a interferência de reações competitivas, e possuir dimensão diminuta. Dentro destas especificações utiliza-se preferencialmente detetores sólidos metálicos. Particularmente, para determinação de fluxo de nêutrons térmicos o Ouro

é altamente recomendado [28]. Entretanto, quando folhas de Ouro são irradiadas em um fluxo de nêutrons a atividade resultante tem tanto a contribuição de nêutrons térmicos como epitérmicos, descrita por [29]:

$$A_{Au} = A_{th} + A_{ep} \quad (1)$$

onde:

A_{Au} é atividade de saturação no detetor de ativação de ouro

A_{th} é a atividade de saturação devido ao nêutrons térmicos

A_{ep} é a atividade de saturação devido aos nêutrons epitérmicos

Isto significa que tanto a contribuição de nêutrons térmicos bem como de epitérmicos precisa ser obtida. Para esta finalidade utiliza-se a técnica da Razão de Cádmio. Esta técnica consiste em irradiar, nas mesmas condições, a folha ouro nua juntamente com uma folha de ouro coberta com cádmio, de tal forma que se obtenha a razão:

$$R_{cd} = A_{Au} / A_{cd} \quad (2)$$

onde:

A_{Au} atividade de saturação da folha de Ouro nua

A_{cd} atividade de saturação da folha de Ouro coberta com Cádmio

Embora o Cádmio seja um excelente filtro para nêutrons térmicos ele não é totalmente transparente a nêutrons epitérmicos [30], então é usual introduzir um fator de correção F_{cd} , que depende da espessura da cobertura de Cd bem como das características da folha ativada [31, 32]. Desta forma,

$$A_{ep} = A_{cd} \cdot F_{cd} \quad (3)$$

e

$$A_{th} = A_{Au} [1 - F_{cd}/R_{cd}] \quad (4)$$

onde:

F_{cd} é o fator de Cádmiio, tabelado na referência [32] e R_{cd} a razão obtida experimentalmente pela irradiação das folhas de Ouro (nua e coberta com Cádmiio).

A utilização deste procedimento permite a determinação do fluxo de nêutrons pela expressão:

$$\phi_n = A_{au} \cdot M (1 - F_{cd}/R_{cd}) / m \cdot N_A \cdot \sigma \cdot k_t \quad (5)$$

onde:

M massa atômica do elemento

N_A número de Avogadro

m massa da amostra

σ seção de choque de ativação

k_t fator de perturbação do fluxo, tabelado na referência [33]. Na prática pode-se utilizar detetores de ativação suficientemente finos de modo que os efeitos de perturbação do fluxo neutrônico sejam desprezíveis [34, 35, 36].

Experimentalmente, outro aspecto relevante na medida do fluxo de nêutrons diz respeito ao cálculo da atividade saturada. A equação geral que fornece a atividade induzida por um fluxo de nêutrons é bem estabelecida na literatura [37, 38], e é expressa por:

$$A_0 = N_A \cdot \phi \cdot \sigma \cdot m \cdot f \cdot F \cdot (1 - e^{-\lambda T_i}) / M \quad (6)$$

onde:

N_A número de Avogadro

ϕ fluxo de nêutrons

σ secção de choque

m massa da amostra

f fração do isótopo que irá sofrer a ativação

F fração do elemento ativado

T_i tempo de irradiação

M massa atômica do elemento

Considerando-se que um intervalo de tempo decorre entre o final da irradiação e o início da contagem, a atividade induzida na amostra deve ser corrigida segundo a lei do decaimento radioativo:

$$A = A_0 e^{-\lambda T_c} \quad (7)$$

onde:

A é a atividade da amostra após um tempo de espera decorrido entre o término da irradiação e o início da contagem (T_c). Portanto, a equação (6) passa a ser expressa por:

$$A_0 = N_A \cdot \phi \cdot \sigma \cdot m \cdot f \cdot F \cdot (1 - e^{-\lambda T_i}) \cdot (e^{-\lambda T_c}) / M \quad (8)$$

Na prática, pode-se obter a atividade de uma amostra por meio de um sistema de contagem conhecendo-se a eficiência de detecção da transição gama de interesse usando a expressão:

$$A = C_\gamma \cdot \lambda / \epsilon_\gamma \cdot I_\gamma \cdot (1 - e^{-\lambda T_c}) \quad (9)$$

onde:

C_γ área da transição gama discriminada

ϵ_γ eficiência de detecção na energia da transição gama discriminada

I_γ intensidade da transição gama discriminada

T_c tempo de contagem

Analisando-se a equação (5) observa-se que a determinação do fluxo depende da atividade saturada. Para quantificarmos esta atividade teríamos que irradiar o detector de ativação por um período muito longo, isto é, por várias meia-vidas [28], mas na prática isto não é necessário. O procedimento consiste em irradiar o detector de ativação até um valor A_0 , suficiente para ser medido num sistema de detecção (FIG. 3). Desta forma, na equação (7) temos que: $e^{-\lambda T_i} \rightarrow 1$ e $A_\infty = A_0$.

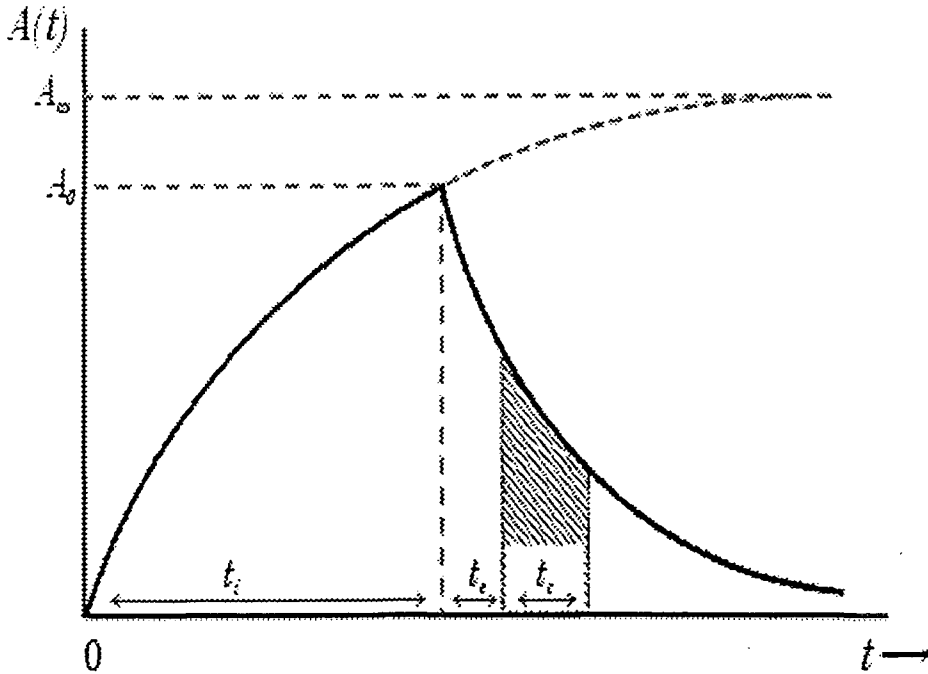


Figura 3: Comportamento da atividade do detetor de ativação em função do tempo, sendo A_∞ a atividade saturada ($T_i \rightarrow \infty$).

Substituindo-se a equação (9) na (6), pode-se obter a concentração dos elementos extraíndo-se a fração do isótopo ativado, isto é:

$$F = \lambda \cdot M \cdot C_\gamma \cdot e^{\lambda T_e} / m \cdot N_A \cdot \epsilon_\gamma \cdot \sigma \cdot \phi \cdot f \cdot I_\gamma \cdot (1 - e^{-\lambda T_i}) \cdot (1 - e^{-\lambda T_c}) \quad (10)$$

Para a obtenção da incerteza nas medidas de fluxo de nêutrons, atividade saturada e fração de massa, foi feita a propagação dos erros [39] associados aos valores obtidos experimentalmente (massa da amostra, área do pico, razão de Cádmiu, tempo e eficiência da transição gama) bem como dos erros estabelecidos para as grandezas físicas envolvidas ($\lambda, M, N_A, \sigma, f, I_\gamma, N_A, F_{cd}$).

2.2 Instrumentação Nuclear

A instrumentação nuclear utilizada na aquisição dos espectros em energia da radiação-gama constitui-se de um espectrômetro- γ , um sistema eletrônico e um sistema de aquisição de dados descritos a seguir.

O espectrômetro- γ é constituído por um detetor de HPGE de 68cm^3 (FWHM = 1,98 keV), montado no interior de uma blindagem de chumbo. Este tipo de blindagem é necessário para minimizar a radiação de fundo do laboratório. Um suporte circular de lucite, centralizado sobre a face do detetor, sustenta a fonte a uma distância que atenua efeitos secundários de detecção como soma e empilhamento, causados pelas transições-gama mais intensas. Entre a fonte e o detetor não há nenhum tipo de absorvedor, o que minimiza os efeitos de absorção e espalhamento.

O sistema de aquisição de dados consiste de um multicanal ADCAM, (ORTEC-918-A) controlado por um microcomputador padrão PC-486. Um diagrama de blocos deste sistema eletrônico é apresentado na FIG. 4.

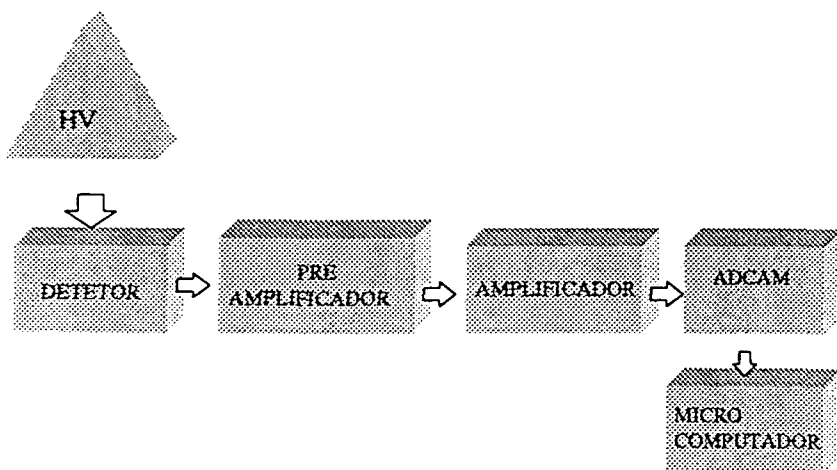


Figura 4: Instrumentação nuclear para aquisição dos espectros de radiação gama.

CAPÍTULO 3: PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

3.1. Calibração do Espectrômetro- γ

Com a instrumentação descrita na seção 2.2, foi obtida a curva de calibração em energia do espectrometro- γ utilizando-se fontes padrão [40] de: ^{60}Co , ^{109}Cd , ^{133}Ba , ^{137}Cs e ^{152}Eu , com a finalidade de associar a posição dos fotopicos do espectros resultantes, ao longo dos 4096 canais, com suas respectivas energias.

A curva de eficiência do detector, na geometria de detecção, foi obtida à partir de dados provenientes das fontes padrão de ^{152}Eu e ^{57}Co , que possuem valores de intensidade de suas transições gamas bem determinadas, obtidas na compilação da IAEA [40]. A curva obtida é apresentada na FIG. 5 e a função ajustada é dada por:

$$E_f = [P1 + P2 * 1/x] \quad (11)$$

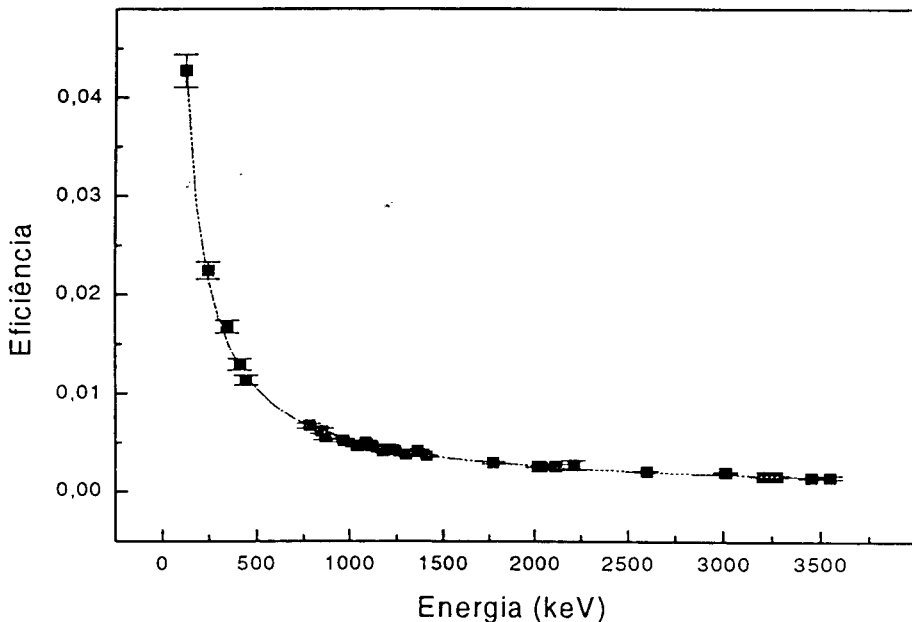


Figura 5: Curva de eficiência do espectrômetro- γ

3.2 Coleta e Preparo das Amostras Biológicas

Para o desenvolvimento do presente trabalho foram coletados amostras biológicas de urina, sangue, osso, fígado e músculo dos animais em estudo. Estes materiais biológicos foram coletados e processados na UNISA e na UNESP, as quais possuem laboratórios credenciados para experimentação animal atendendo aos protocolos exigidos. Tanto para o preparo das amostras de sangue como de urina foram pipetados $100,0 \pm 0,5 \mu\text{l}$ de material biológico em papel de filtro; a seguir, as amostras foram expostas à luz infravermelha para secagem, estando prontas para posterior irradiações no reator nuclear e análise no espectrômetro $-\gamma$. Todas as amostras foram preparadas em duplicata.

Para a medida do fluxo de nêutrons foi utilizado o Ouro como detetor de ativação (Goodfellow). Folhas de Ouro com dimensões de $2,00 \pm 0,05 \text{ mm}$ de diâmetro por $0,025 \text{ mm}$ de espessura foram confeccionadas em duplicatas para obtenção do espectro gama da fonte de ^{197}Au nua e coberta com Cádmio. Este procedimento permitiu homogeneizar o preparo das amostras facilitando a correção de ângulo sólido, além de minimizar a quantidade de ouro a ser irradiada.

Para a análise de ossos e demais órgãos as amostras foram calcinadas até a obtenção das cinzas. As cinzas foram prensadas ($\sim 50 \text{ mg}$) em forma de pastilha com dimensões da ordem de $\sim 10 \text{ mm}$ de diâmetro por $0,5 \text{ mm}$ de espessura. Todas as amostras foram preparadas em duplicatas.

3.3 Análise de Dados

Cada amostra biológica, juntamente com as amostras de Ouro envolta por Cádmio e sem Cádmio (nua), foram irradiadas via estação pneumática, no reator IEA-R1, (por 3 minutos), permitindo a ativação simultânea destes materiais. Desta forma obtinha-se os espectros de raios gama tanto para o cálculo do fluxo de nêutrons bem como para a obtenção da concentração dos elementos ativados, nas mesmas condições de irradiação. Particularmente, para a determinação de Ferro em sangue as amostras foram submetidas a

5 minutos de irradiação no caroço do Reator. Todas as análises foram realizadas em duplicata.

3.3.1 Espectroscopia Gama das Amostras

Após a irradiação, as amostras do Ouro (nua) e de Ouro com Cádmiu foram submetidas à contagem no espectrômetro de raios gama, permitindo a identificação e cálculo da área da transição gama de 411keV do ^{197}Au para determinação da razão de Cádmiu e posterior cálculo do fluxo de nêutrons. Da mesma forma, cada amostra biológica foi também submetida à contagem no espectrômetro- γ , permitindo a identificação e cálculo das áreas das transições gama de interesse (TAB. 2). Esses espectros de raios gama foram analisados utilizando-se o programa IDF [41]. Particularmente, para a determinação de Ferro em sangue as amostras foram submetidas a contagem após 12hs à irradiação.

De posse da curva de eficiência do espectrômetro- γ (FIG. 5), do valor do fluxo de nêutrons, da área da transição γ de interesse, obtém-se a concentração dos elementos selecionados (TAB. 2), por meio da equação (10).

CAPÍTULO 4: EXPERIMENTOS COM ANIMAIS

4.1 Experimento envolvendo Cães da Raça Beagles: Aplicação de Metodologia Nuclear para Estudo da Função Renal

Dentro do projeto: "Determinação do Urânio na Cadeia Alimentar", este primeiro experimento com animais pode ser descrito como um experimento piloto, no qual cães Beagles alimentados com ração dopada com Urânio forneceram material biológico (urina) para o estudo da função renal utilizando metodologia nuclear. A decisão de iniciar os experimentos com Beagles deve-se ao fato de que 90% das características fisiológicas destes animais são similares a dos humanos [42]. Desta forma os resultados das análises clínicas via metodologia nuclear podem ser comparados com os dados das análises convencional.

Como discutido no capítulo 1 deste trabalho, a maior parte do Urânio ingerido pelo corpo humano é retida em diferentes órgãos do corpo e então, parcialmente, eliminada através da urina. Entretanto, as quantidades não eliminadas podem se acumular nos rins causando lesões. Dentro deste contexto, o presente estudo propõe a utilização da ativação neutrônica para avaliar anomalias na função renal causado pela ingestão de Urânio, via dieta. Basicamente, o procedimento consiste em irradiar pequenas quantidades de urina com nêutrons e analisar a radiação gama induzida após a ativação nuclear. Particularmente neste experimento estamos interessados em avaliar a concentração de Cloro, Sódio e Potássio na urina para posterior comparação com os valores de normalidade do organismo (TAB. 2).

4.1.1. Descrição do Experimento com Cães Beagles

Este experimento desenvolveu-se no Laboratório da UNITOX da Universidade Santo Amaro (UNISA). Quatro cães machos da raça Beagle foram alojados em baias metabólicas logo após o período de vacinação (isto é, 60 dias). Esses animais foram alimentados diariamente com ração dopada com 20 e 100 ppm de nitrato de urânio, exceto o animal controle. O experimento teve duração de 7 meses.

Durante o período de desenvolvimento do experimento a rotina constou de controle diário do peso, quantidade de ração ingerida e coletas semanais de urina, que foram submetidas a testes bioquímicos e análise quantitativa do sedimento urinário. Os resultados obtidos via metodologia nuclear foram comparados às análises clínicas de urina (TAB. 1), fornecendo dados que permitem verificar a ocorrência ou não de danos à função renal. Ao término dos experimentos, isto é após o período de 7 meses, os animais foram sacrificados e necropsiados. Para ilustrar, na FIG. 6 é apresentado o diagrama do experimento.

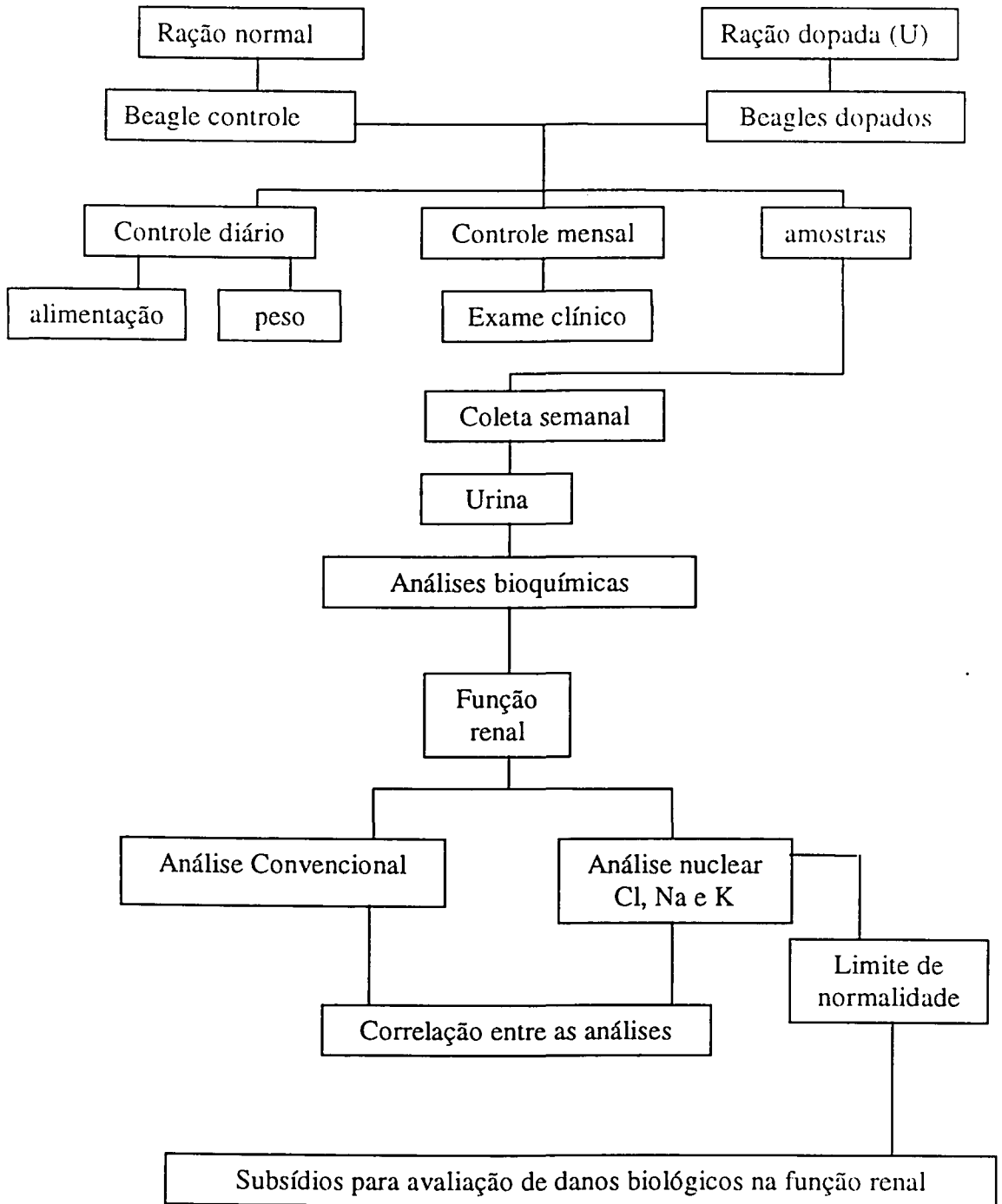


Figura 6: Diagrama do experimento.

4.1.2 Procedimento Experimental e Resultados

Seguindo o procedimento de preparo descrito na seção 3.2, as amostras de urina após serem submetidas à secagem foram seladas em plástico para então serem irradiadas juntamente com as amostras de Ouro (nua e coberta com Cádmiio), por um período de 3 minutos, no reator IEA - R1 do IPEN garantindo assim as mesmas condições de irradiação.

Após a irradiação, a amostra de urina e as amostras de Ouro eram submetidas a uma hora de contagem, respectivamente, no espectrômetro- γ , permitindo o cálculo da área referente às energias das transições gama de interesse, isto é: 1642 keV do ^{38}Cl , 1525 keV do ^{42}K e 1368 keV do ^{24}Na , bem como da energia de 411 keV do ^{197}Au , para o cálculo do fluxo de nêutrons utilizando as relações descritas na seção 2.1 A contribuição de fundo foi avaliada em todos os espectros, bem como a correção de ângulo sólido e tamanho da fonte [43]. Todos os espectros foram analisados utilizando-se o programa IDF [41]. Foram realizadas análises semanais de urina tanto para o animal controle como para os animais dopados. Os resultados foram comparados com os dados das análises convencionalmente utilizadas.

Para ilustrar, na TAB. 3 é apresentada a relação de energias utilizadas para estudo da função renal e na FIG. 7 é apresentado um exemplo do espectro- γ parcial do material biológico ativado (urina).

Tabela 3: Elementos analisados e suas principais características nucleares

Nuclídeo ($T_{1/2}$)	Composição Isotópica (%)	Produção via ativação nuclear com nêutrons	Energia da transição gama de interesse (keV)
^{24}Na (15 h)	100	$^{23}\text{Na} (n, \gamma)^{24}\text{Na}$	1368
^{38}Cl (37 min)	24,23	$^{37}\text{Cl} (n, \gamma)^{38}\text{Cl}$	1642
^{42}K (12,2 h)	6,7	$^{41}\text{K} (n, \gamma)^{42}\text{K}$	1525

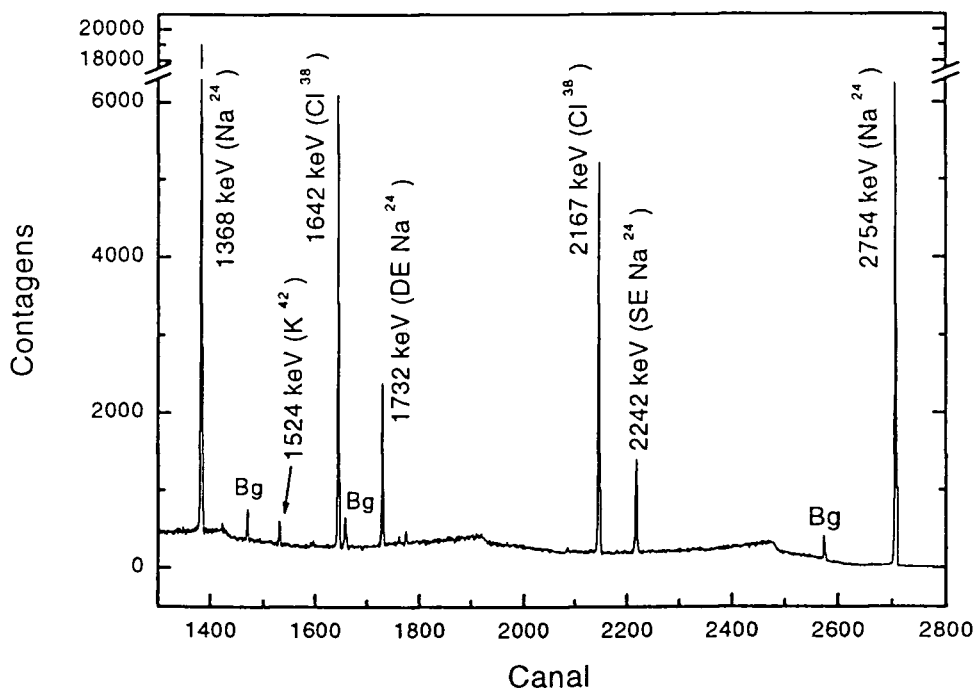


Figura 7: Espectro- γ (parcial) do material biológico ativado (urina do grupo controle) onde: Bg é a radiação de fundo e SE e DE Simple e Duplo Escape da radiação- γ .

Os resultados das análises da urina do animal controle por ativação nuclear e pelos métodos convencionais e os limites de detecção são apresentados nas TAB. 4 e 5, respectivamente. De acordo com os dados apresentados na TAB. 4 pode-se observar que os valores obtidos, via metodologia nuclear, são compatíveis com as análises convencionais. Portanto, a técnica de ativação nuclear pode ser considerada como um método para avaliar danos na função renal por meio da determinação da concentração de Sódio, Potássio e Cloro na urina.

Os valores obtidos para as concentrações de Cl, Na e K na urina, via ativação neutrônica foram analisados dentro dos limites de normalidade tanto para o animal controle como para o grupo dopado. Os resultados são apresentados nas FIG. 8, 9 e 10. Todas as medidas foram realizadas em duplicata e os valores médios foram considerados.

Tabela 4: Concentração de K, Na, e Cl em urina obtida por ativação nuclear para o animal do grupo controle comparados com outras análises clínicas convencionais.

NAA mg/ml	Espectrometria de chama mg/ml	NAA mg/ml	Espectrometria de chama mg/ml	NAA mg/ml	Colorimetria mg/ml
K		Na		Cl	
2,53 ± 0,38	3,03 ± 0,55	3,32 ± 0,23	2,99 ± 0,25	3,11 ± 0,15	2,79 ± 0,18
3,01 ± 0,54	3,21 ± 0,42	3,26 ± 0,13	3,08 ± 0,27	1,86 ± 0,09	2,02 ± 0,09
3,91 ± 0,26	2,97 ± 0,32	3,47 ± 0,016	3,00 ± 0,27	4,40 ± 0,22	2,88 ± 0,21
^(a) 1,78 ± 0,12	3,98 ± 0,11	^(a) 3,72 ± 0,15	2,28 ± 0,20	^(a) 6,40 ± 0,19	4,01 ± 0,13
2,24 ± 0,26	2,01 ± 0,25	2,53 ± 0,13	2,54 ± 0,25	3,25 ± 0,20	3,19 ± 0,18
2,85 ± 0,25	3,11 ± 0,31	3,40 ± 0,14	3,08 ± 0,27	1,30 ± 0,21	1,17 ± 0,15
4,30 ± 0,31	4,00 ± 0,33	3,59 ± 0,09	3,37 ± 0,29	4,13 ± 0,19	3,98 ± 0,14
1,60 ± 0,06	nd	3,31 ± 0,17	3,30 ± 0,22	5,93 ± 0,20	6,03 ± 0,17

nd - não determinado

^(a) medida realizada em triplicata

Tabela 5: Limite de detecção dos elementos Na, Cl e K na amostra de urina

Elemento	Limite de detecção (3σ) [44] μg g ⁻¹
Cl	3,2
K	45,4
Na	1,3

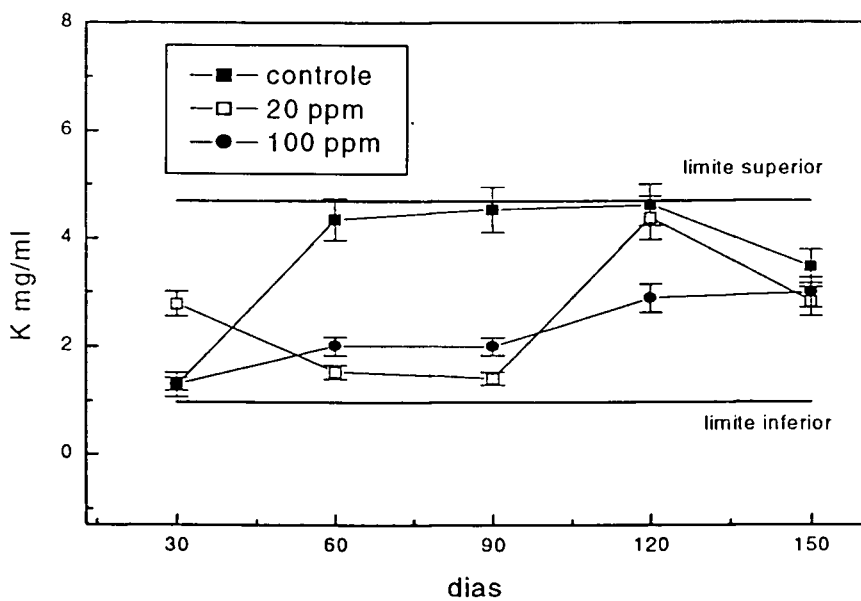


Figura 8: Comportamento do elemento Potássio na urina.

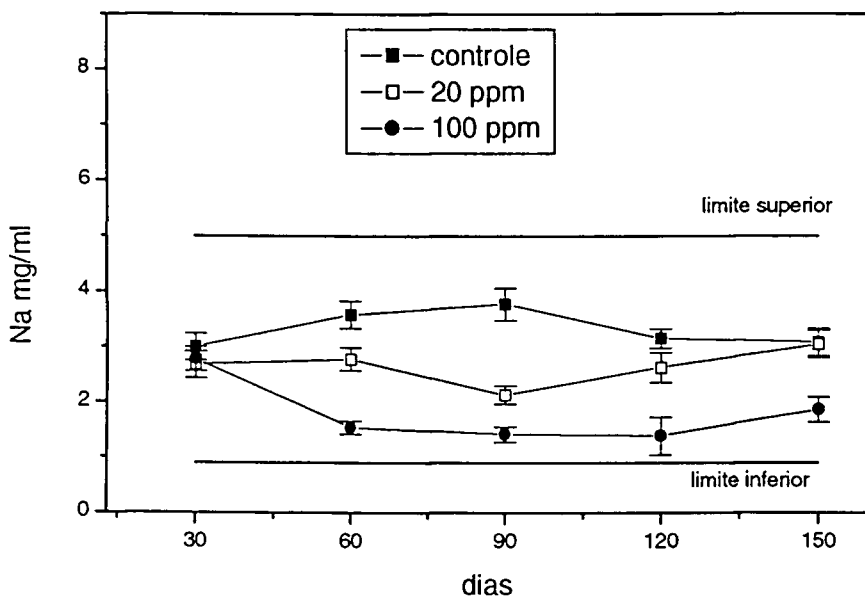


Figura 9: Comportamento do elemento Sódio na urina.

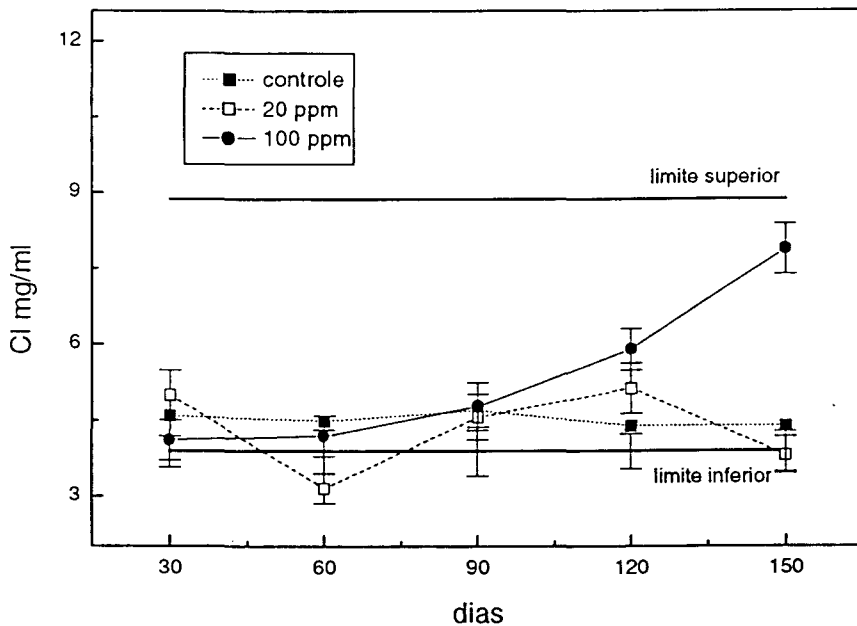


Figura 10: Comportamento do elemento Cloro na urina.

4.2 Experimento envolvendo Cães da Raça Beagles: Aplicação de Metodologia Nuclear para Análise de Sangue

Na prática, poucas análises são feitas com sangue total em função do método de análise empregado. No procedimento usual, adotado nos laboratórios de Análises Clínicas, a centrifugação do sangue é feita para separação do plasma (parte líquida) das células (parte sólida). Por coagulação do sangue total pode ser obtido o soro sanguíneo.

Em função da técnica de ativação não necessitar da etapa de separação do sangue (soro/plasma) pode-se reduzir significativamente a quantidade de material a ser coletado minimizando o estresse dos animais, principalmente os de pequeno porte, além de agilizar as análises, minimizar custos e simplificar a manipulação do material biológico pelo técnico, diminuindo riscos de contaminação.

4.2.1 Procedimento Experimental e Resultados

Para a realização desta etapa do experimento foi seguido o mesmo procedimento, descrito na seção 4.1.2., com exceção do tempo de irradiação da amostra biológica para medida de Ferro, que foi de 5 minutos no caroço do reator IEA - R1 do IPEN.

Após a irradiação, a amostra de sangue e as amostras de Ouro foram submetidas a uma hora de contagem, respectivamente, no espectrômetro γ , permitindo o cálculo da área referente às energias das transições gama de interesse bem como da energia de 411 keV do ^{197}Au , para o cálculo do fluxo de nêutrons utilizando as relações descritas na seção 2.1. A contribuição de fundo foi avaliada em todos os espectros, bem como a correção de ângulo sólido e tamanho da fonte [43]. Todos os espectros foram analisados utilizando-se o programa IDF [41].

Para ilustrar, na FIG. 11 é apresentado o espectro- γ parcial do material biológico ativado (sangue).

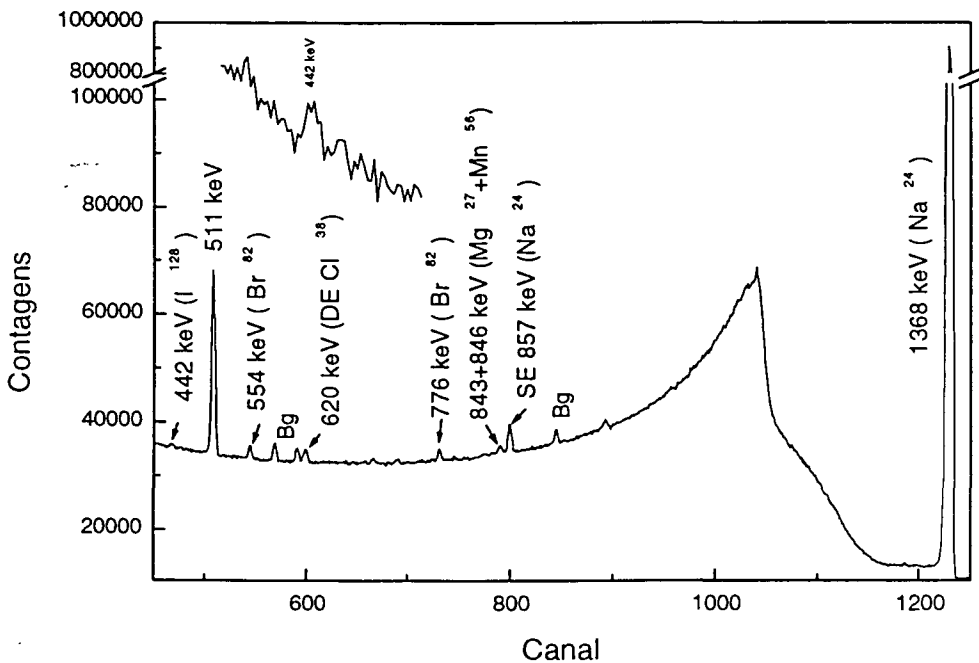


Figura 11a: Espectro- γ (parcial) do material biológico ativado (sangue total do grupo controle) onde: Bg é a radiação de fundo e SE e DE Simples e Duplo Escape da radiação- γ .

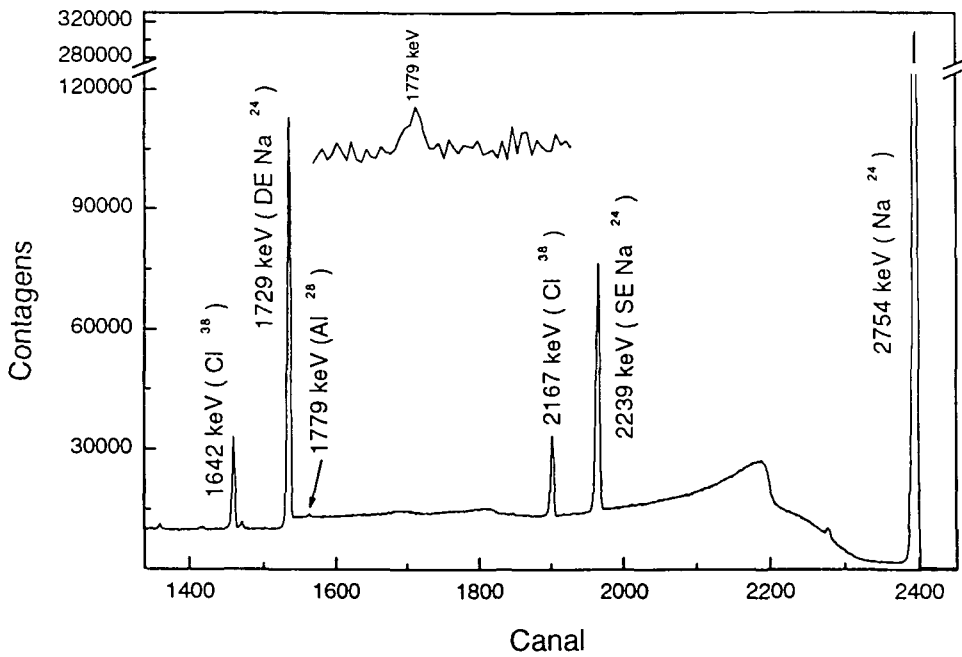


Figura 11b: Espectro-γ (parcial) do material biológico ativado (sangue total do grupo controle) onde: SE e DE são Simples e Duplo Escape da radiação-γ.

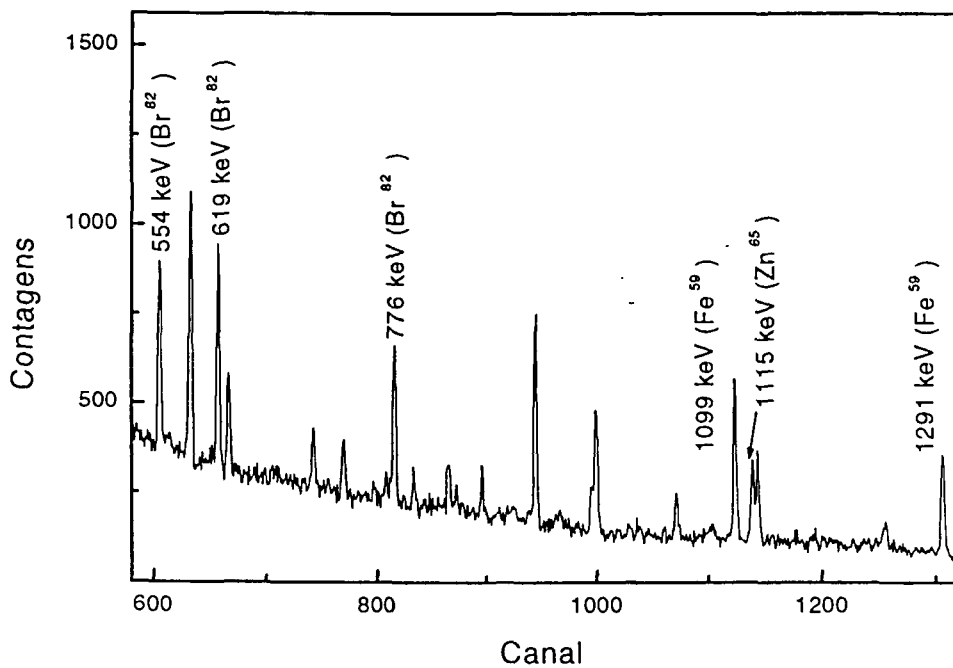


Figura 11c: Espectro-γ (parcial) do material biológico ativado (sangue total do grupo controle - irradiação no carço) onde os picos não identificados em termos de energia correspondem ao Bg (radiação de fundo).

Na TAB. 6 são apresentados os resultados de uma análise de sangue total do animal controle e os limites de detecção para cada elemento e na FIG. 12 o estudo sistemático envolvendo as análises de Al em sangue total, para os todos os animais. Todas as medidas foram realizadas em duplicata.

Tabela 6: Concentração e limite de detecção dos elementos presentes na amostra de sangue total do animal controle.

Elemento	Concentração ($\mu\text{g } \mu\text{l}^{-1}$)	Limite de detecção (3σ) [44] $\mu\text{g } \text{g}^{-1}$
Al	$(53,5 \pm 6,6) 10^{-3}$	8
Br	$(6,9 \pm 0,5) 10^{-3}$	0,4
Cl	$2,2 \pm 0,1$	7
Fe	$0,30 \pm 0,02$	21
I	$(0,76 \pm 0,11) 10^{-3}$	0,3
Mg	$0,14 \pm 0,05$	61
Mn	$(3,0 \pm 0,2) 10^{-3}$	0,4
Na	$1,8 \pm 0,1$	3
Zn	$(8,72 \pm 0,77) 10^{-3}$	1

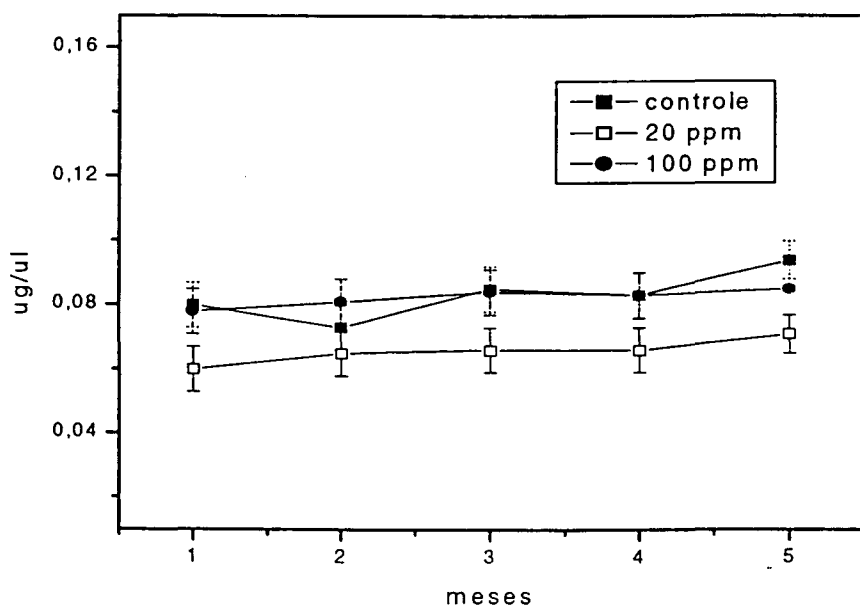


Figura 12: Comportamento do elemento Al nas amostras de sangue total.

4.3 Avaliação do Método Nuclear para Análise de Sangue Total e Urina

Com relação à utilização do método nuclear pode-se destacar as seguintes vantagens:

i) método alternativo para análise clínica de sangue total e urina;

ii) a utilização de quantidades pequenas, da ordem de 100µl, com relação a utilização de 5 a 20 ml para as análises clínicas convencionais; determinação simultânea dos elementos de interesse além de não necessitar do preparo da amostra de sangue (separação soro/plasma).

iii) avaliação simultânea da concentração Cl, K e Na em amostras de urina pela metodologia nuclear o que nem sempre é possível via análise convencional em função do método aplicado;

iv) outros elementos tais como: Al, I, Mg, Mn e Zn, também foram identificados nas amostras de urina. A determinação da concentração desses elementos é também útil para a avaliação biológica do organismo (TAB. 1), entretanto algumas dessas análises são convencionalmente realizadas no Exterior. O limite de detecção desses elementos, estimados pelo presente estudo, são apresentados na TAB. 7.

Tabela 7: Limite de detecção dos elementos Al, I, Mg, Mn e Zn presentes na amostra de urina do animal controle.

Elemento	Limite de detecção (3σ) [44] µg g ⁻¹
Al	3,5
I	0,2
Mg	29
Mn	0,2
Zn	60

iv) avaliação simultânea da concentração Al, Br, Cl, Mg, Mn, I, K, Na e Zn em amostras de sangue total pela metodologia nuclear, via irradiação de 3 minutos, na estação pneumática; o que não é possível via análise convencional (emprego diferenciado do método em função do elemento);

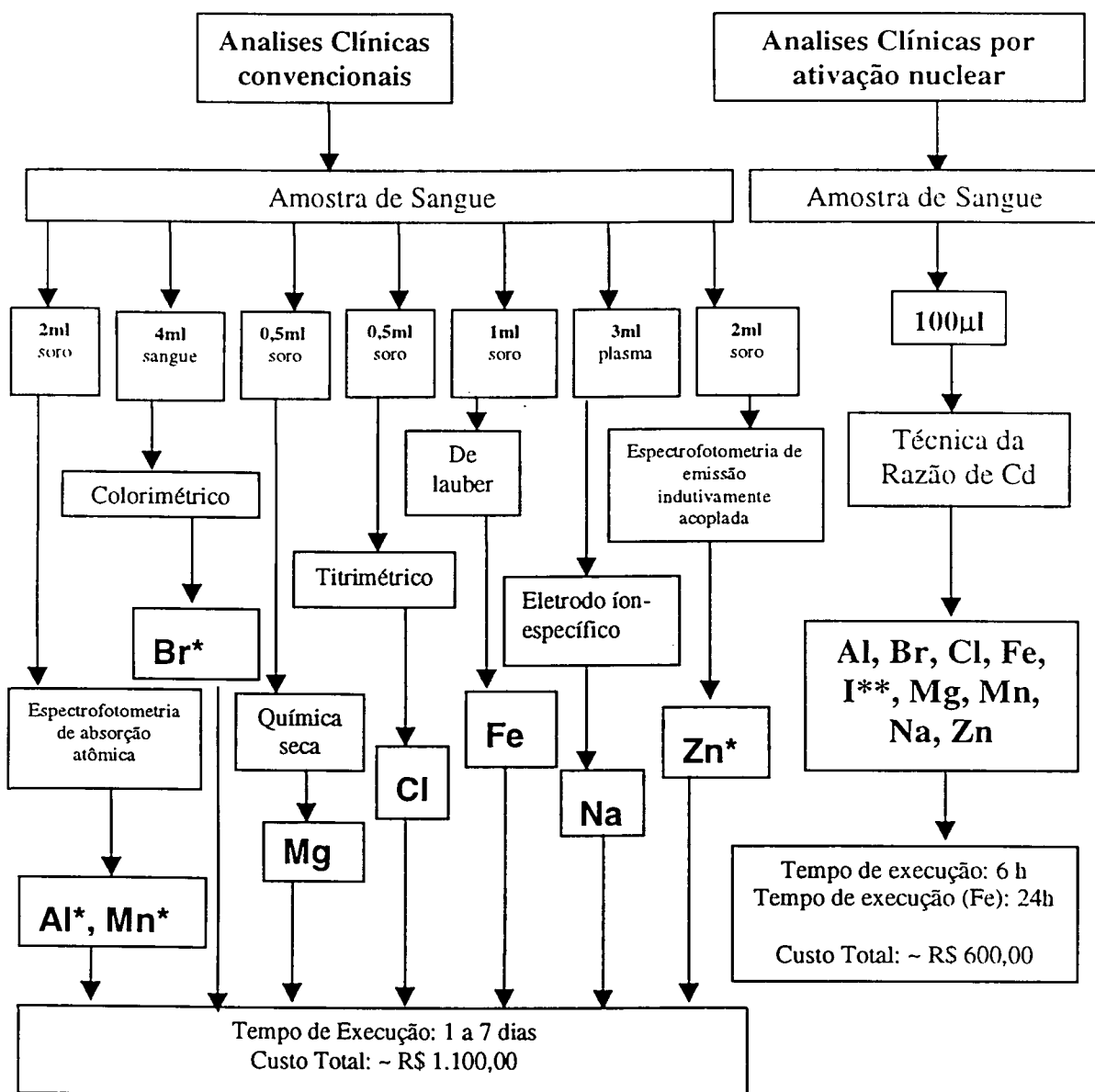
v) baixa atividade induzida, da ordem de $0,1\mu\text{Ci}$, o que minimiza o risco de exposição à radiação no processo de manipulação do material irradiado;

vi) em função da baixa atividade e da meia-vida associada aos elementos medidos não existe a geração de rejeitos radiativos, pois após 48hs no máximo, as amostras biológicas (urina e sangue) podem ser descartadas sem atividade residual ou armazenadas. Consequentemente as análises podem ser refeitas se necessário (problemas na operação do reator, na instrumentação nuclear, etc);

vii) a possibilidade do armazenamento das amostras permitiu que as análises fossem realizadas com a frequência desejada. Isto tornou possível a repetição das análises garantindo o bom desempenho do método.

viii) tanto o invólucro de Cd como as amostras de Au, utilizados para o cálculo do fluxo de nêutrons, podem ser reutilizados decorridos 45 e 30 dias, respectivamente, após a irradiação.

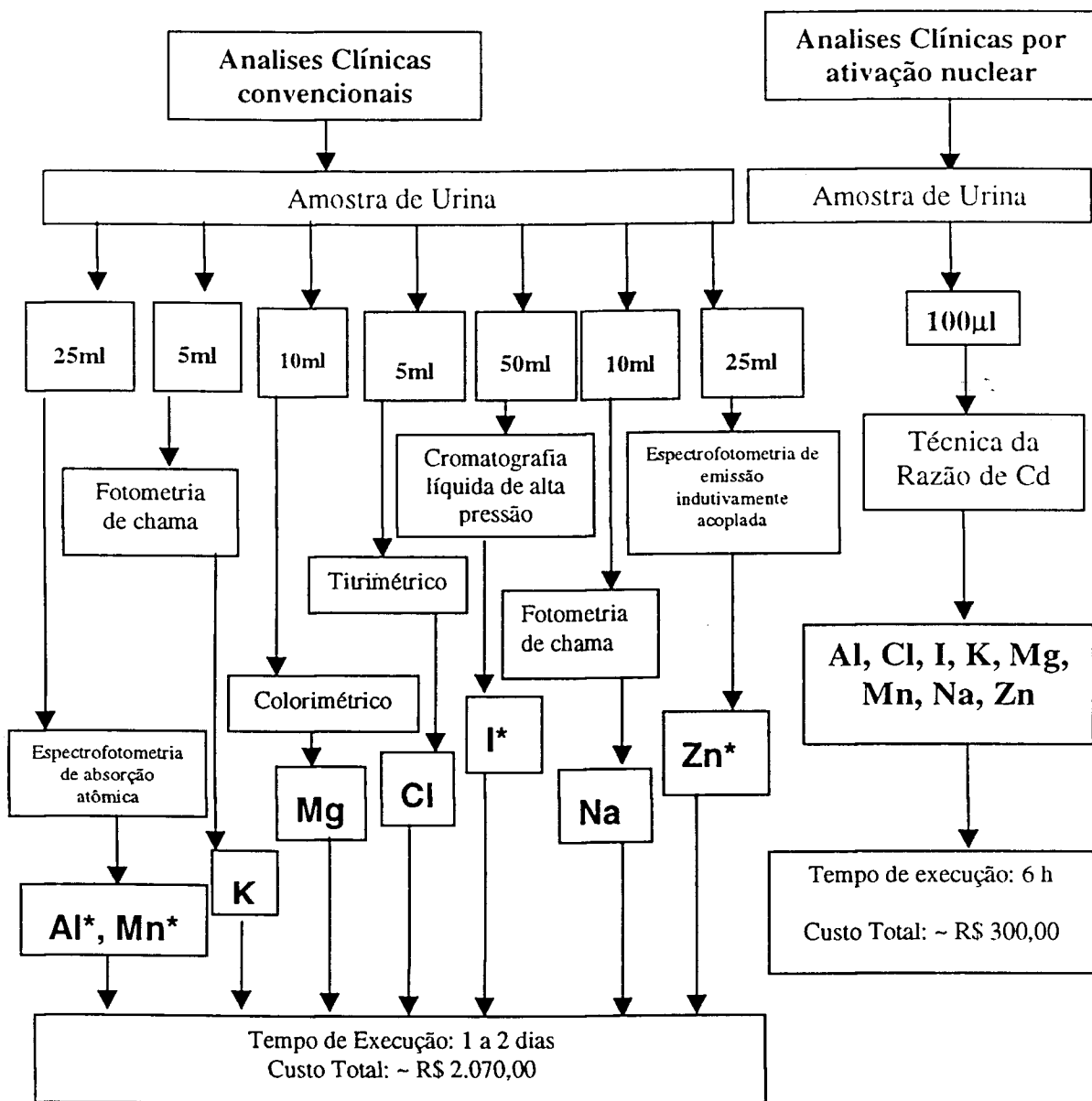
Nas FIG. 13 e 14 são apresentados diagramas que sintetizam as etapas de análises de sangue e urina e que permitem comparar os métodos clínicos convencionais empregados com a metodologia nuclear estabelecida no presente estudo.



* tempo de execução, em média, 15 dias.

** não determinado pela técnica convencional

Figura 13: Diagrama comparativo entre os métodos clínicos convencionais, aplicados pelo Laboratório Fleury, e a metodologia nuclear estabelecida no presente estudo, para análise clínica de sangue. (Preços praticados pelo Laboratório Fleury, atualizado em 02/03).



* tempo de execução, em média, 15 dias.

Figura 14: Diagrama comparativo entre os métodos clínicos convencionais, aplicados pelo Laboratório Fleury, e a metodologia nuclear estabelecida no presente estudo, para análise clínica de urina. (Preços praticados pelo Laboratório Fleury, atualizado em 02/03).

4.4 Experimento com ratos Wistar: Aplicação de Metodologia Nuclear para Estudo de Ossos e Órgãos

O experimento foi desenvolvido com 9 ratos Wistar machos, com 15 dias de idade, reunidos em 3 grupos de 2 animais e um grupo de controle com 3 animais. Durante o experimento, os animais foram mantidos em ambiente com temperatura controlada. Os animais foram alimentados por 60 dias com ração dopada com nitrato de urânio (exceto o grupo de controle) nas seguintes concentrações: 20, 50, e 100 (ppm de U). O controle e as medidas da quantidade de alimento ingerido e de peso animal foram feitas diariamente durante o experimento, depois do qual os animais foram sacrificados e dissecados.

4.4.1 Procedimento Experimental e Resultados – Análise de Ossos

As amostras de osso (fêmur) de cada grupo foram calcinadas, moídas e homogeneizadas. As cinzas foram seladas em plástico e pesadas (~50mg) para serem irradiadas juntamente com as amostras de Ouro (nua e coberta com Cádmiu), por um período de 3 minutos no reator IEA - R1 do IPEN, garantindo assim as mesmas condições de irradiação.

Após a irradiação, a amostra de osso e as amostras de Ouro eram submetidas a uma hora de contagem, respectivamente, no espectrômetro γ , permitindo o cálculo da área referente às energias das transições gama de interesse, bem como da energia de 411 keV do ^{197}Au , para o cálculo do fluxo de nêutrons utilizando as relações descritas na seção 2.1. A contribuição de fundo foi avaliada em todos os espectros, bem como a correção de ângulo sólido e tamanho da fonte [43]. Todos os espectros foram analisados utilizando-se o programa IDF [41].

Para ilustrar, na FIG. 15 é apresentado o espectro- γ parcial do material biológico ativado (osso).

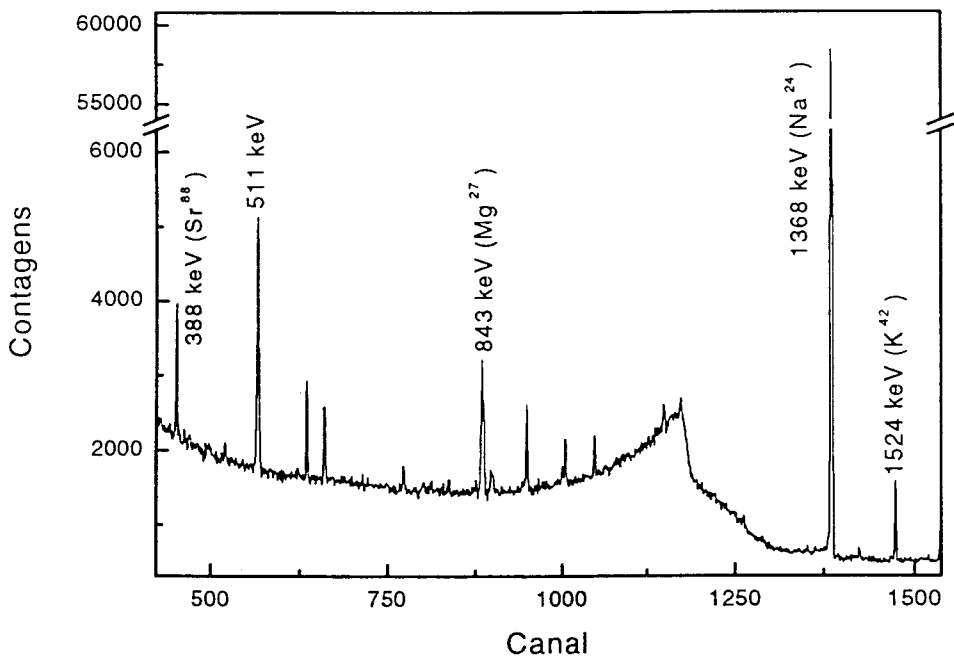


Figura 15a: Espectro- γ (parcial) do material biológico ativado (osso do grupo controle), onde os picos não identificados em termos de energia correspondem ao Bg (radiação de fundo).

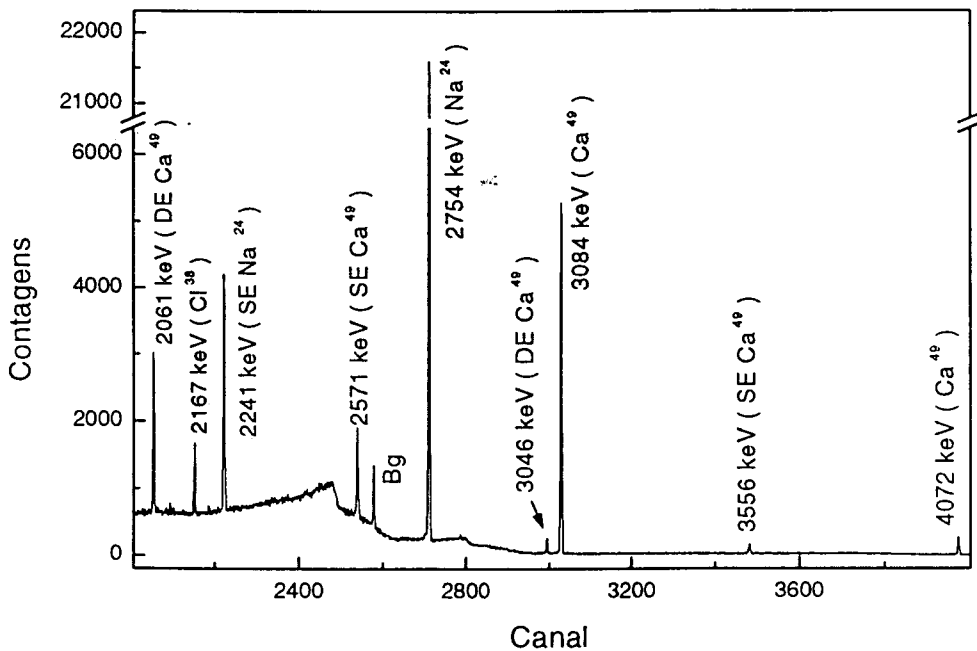


Figura 15b: Espectro- γ (parcial) do material biológico ativado (osso do grupo controle) onde: Bg é a radiação de fundo e SE e DE Simples e Duplo Escape da radiação- γ .

Na TAB. 8 são apresentados os resultados da análise de osso do animal controle e os limites de detecção para cada elemento e na FIG. 16 o comportamento dos elementos Ca e Mg em osso dopado com U em comparação com o animal controle.

Tabela 8: Concentração e limite de detecção dos elementos presentes na amostra de osso do animal controle.

Elemento	Concentração (g Kg ⁻¹)	Limite de detecção (3σ) [44] (μg g ⁻¹)
Ca	33,90 ± 0,13	258
Cl	0,75 ± 0,06	26
K	6,99 ± 0,18	495
Mg	0,44 ± 0,04	346
Na	3,09 ± 0,03	14
Sr	0,41 ± 0,05	26

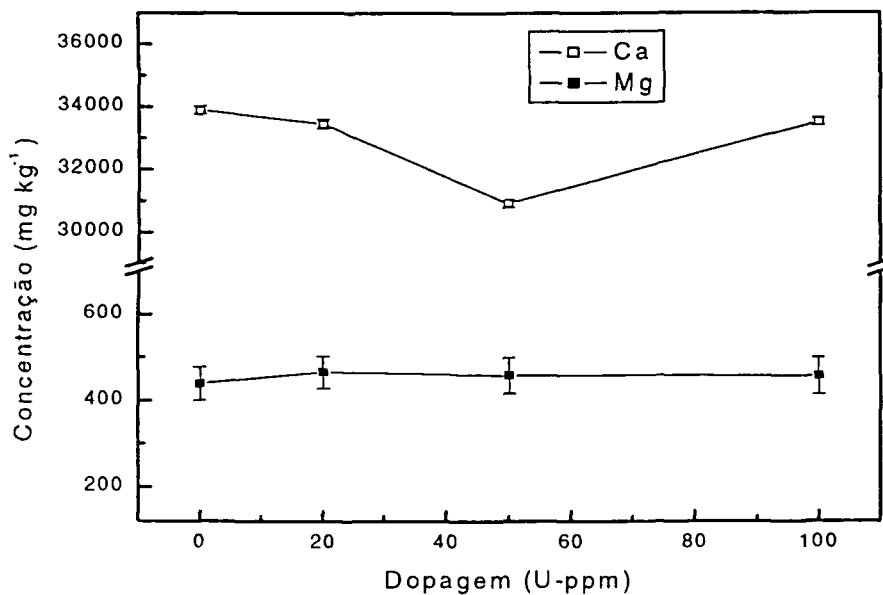


Figura 16: Comportamento dos elementos Cálcio e Magnésio nas amostras de osso. Os dados referentes ao animal controle estão representados no ponto 0 ppm no gráfico.

4.4.2 Procedimento Experimental e Resultados – Análise de Órgãos

Para análise fígado e músculo foi seguido o mesmo procedimento descrito na seção 4.4.1.

Para ilustrar, nas FIG. 17 e 18 são apresentados os espectros- γ parciais dos materiais biológicos ativados fígado e músculo, respectivamente.

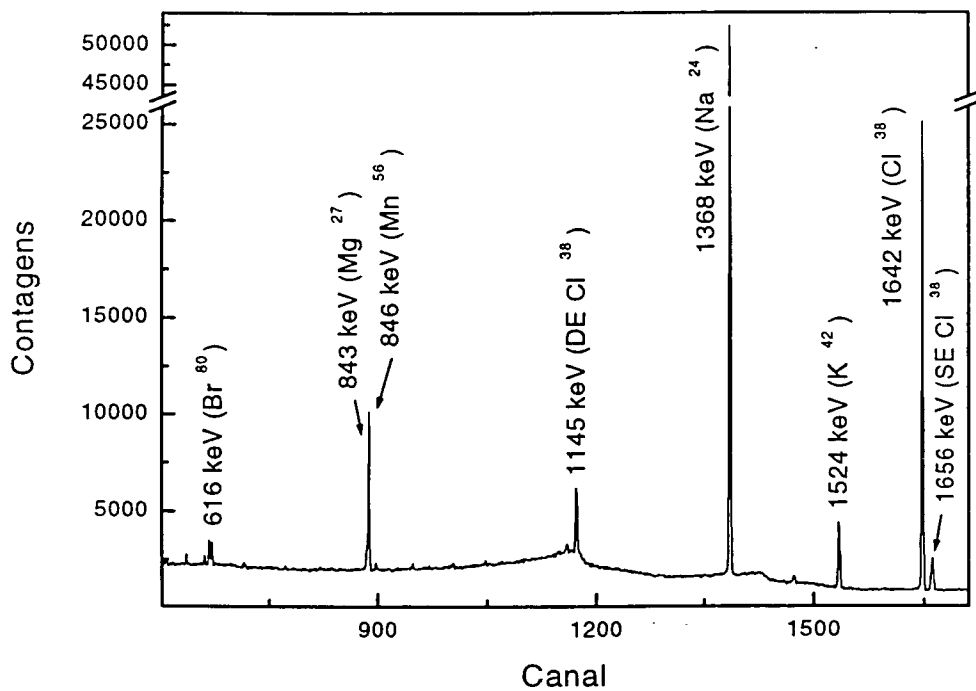


Figura 17a: Espectro- γ (parcial) do material biológico ativado (fígado do grupo controle) onde: SE e DE Simple e Duplo Escape da radiação- γ .

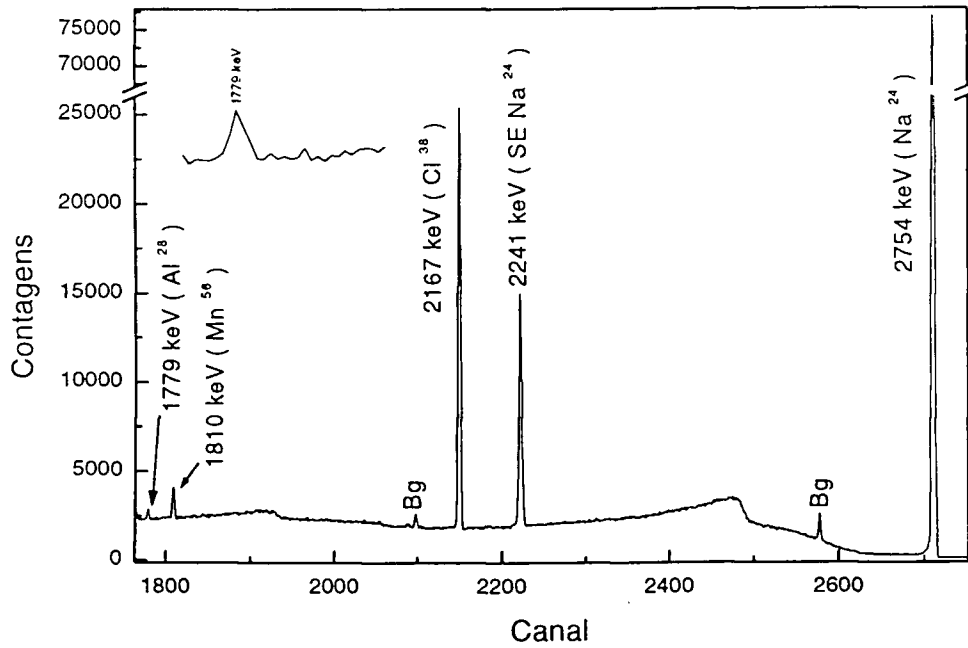


Figura 17b: Espectro- γ (parcial) do material biológico ativado (fígado do grupo controle) onde: Bg é a radiação de fundo e SE Simples Escape da radiação- γ .

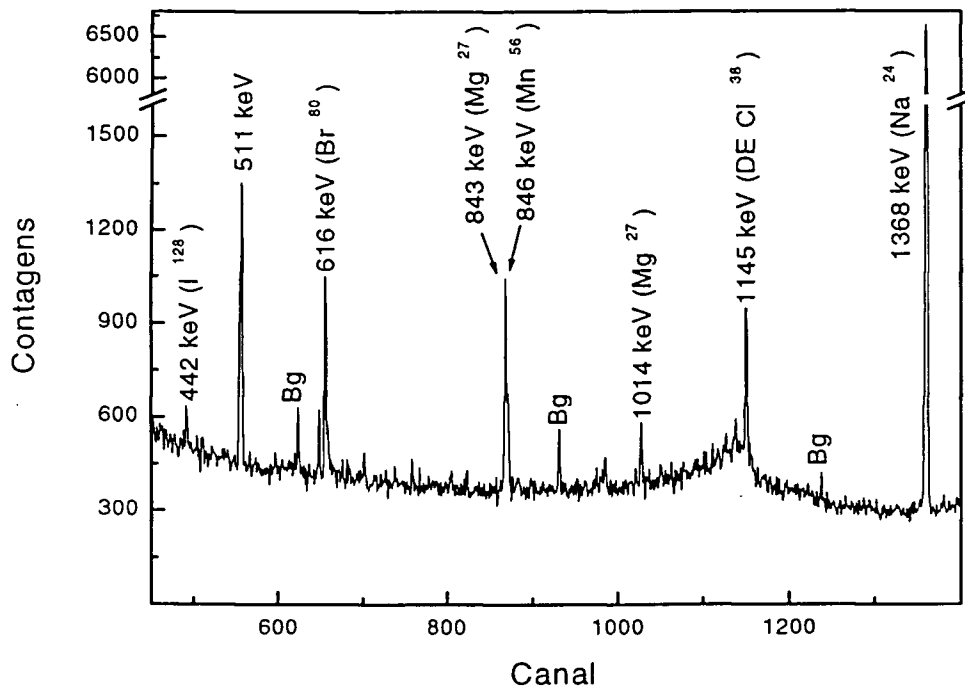


Figura 18a: Espectro- γ (parcial) do material biológico ativado (músculo do grupo controle) onde: Bg é a radiação de fundo e DE Duplo Escape da radiação- γ .

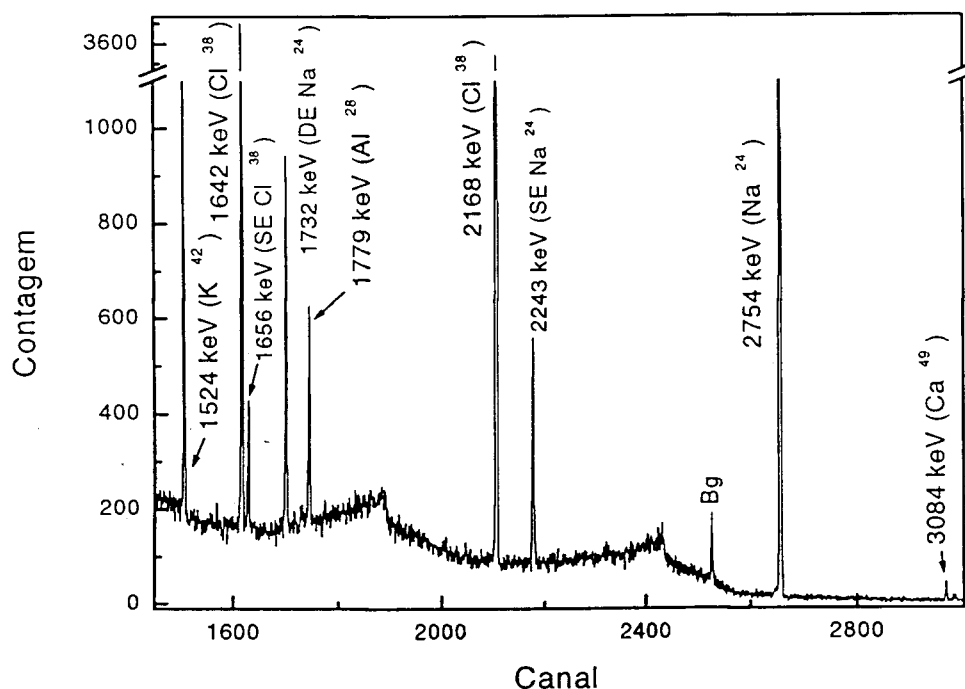


Figura 18b: Espectro- γ (parcial) do material biológico ativado (músculo do grupo controle) onde: Bg é a radiação de fundo e SE e DE Simples e Duplo Escape da radiação- γ .

Nas TAB. 9 e 10 são apresentados os resultados da análise de fígado e músculo do animal controle e os limites de detecção para cada elemento, respectivamente.

Tabela 9: Concentração e limite de detecção dos elementos presentes na amostra de fígado do animal controle.

Elemento	Concentração (g Kg ⁻¹)	Limite de detecção (3 σ) [44] (μ g g ⁻¹)
Al	0,31 \pm 0,03	58
Br	0,042 \pm 0,004	4,4
Cl	12,5 \pm 0,4	53
K	22,9 \pm 1,0	744
Mg	2,4 \pm 0,2	488
Mn	0,145 \pm 0,005	3,1
Na	7,5 \pm 0,2	22

Tabela 10: Concentração e limite de detecção dos elementos presentes na amostra de músculo do animal controle.

Elemento	Concentração (g Kg ⁻¹)	Limite de detecção (3σ) [44] (µg g ⁻¹)
Al	0,42 ± 0,03	38
Br	0,019 ± 0,002	2,2
Ca	0,95 ± 0,25	122
Cl	2,43 ± 0,11	27
I	(1,53 ± 0,52) 10 ⁻³	1
K	15,7 ± 0,8	538
Mg	3,25 ± 0,24	411
Mn	0,010 ± 0,001	2,3
Na	1,86 ± 0,20	16

4.5 Experimentos com Frangos Cobb: Aplicação de Metodologia Nuclear para Estudo de Ossos

Com o objetivo de verificar a incorporação de Urânio em aves, 40 frangos da raça Cobb foram alojados em gaiolas num ambiente controlado e aleatoriamente divididos em dois grupos experimentais. Cada grupo, a partir da primeira semana de vida recebeu ração com diferentes composições, a saber: Grupo I: Ração básica (milho e farelo de soja); Grupo II: Ração básica acrescida de 20 ppm de nitrato de Uranilo. O período de experimentação foi de 56 dias.

A partir do 14º dia, dois animais de cada grupo foram quinzenalmente sacrificados e as tíbias foram imediatamente removidas e congeladas.

4.5.1 Procedimento Experimental e Resultados

As amostras de ossos foram pesadas individualmente e transferidas para cadinhos de porcelana onde foram mantidas em estufa (80°C), durante aproximadamente 12h, para retirada do excesso de água. Em seguida as amostras foram colocadas sob uma placa aquecida (180°C), durante 8h, visando a carbonização do material. A conversão dos ossos

em cinzas foi obtida submetendo o material carbonizado a uma temperatura de 600°C em mufla durante 4h.

As cinzas de cada grupo foram pesadas (~ 50mg) e seladas em plástico, sendo irradiadas juntamente com as amostras de Ouro (nua e coberta com Cádmiio), por um período de 3 minutos, no reator IEA - R1 do IPEN garantindo assim as mesmas condições de irradiação.

Após a irradiação, cada amostra de osso e as duas amostras de Ouro eram submetidas a uma hora de contagem, respectivamente, no espectrômetro γ , permitindo o cálculo da área referente às energias das transições gama de interesse no osso, bem como da energia de 411 keV do ^{197}Au , para o cálculo do fluxo de nêutrons utilizando as relações descritas na seção 2.1. A contribuição de fundo foi avaliada em todos os espectros, bem como a correção de ângulo sólido e tamanho da fonte [43]. Todos os espectros foram analisados utilizando-se o programa IDF [41].

Para ilustrar, na FIG. 19 é apresentado o espectro- γ parcial do material biológico ativado (osso).

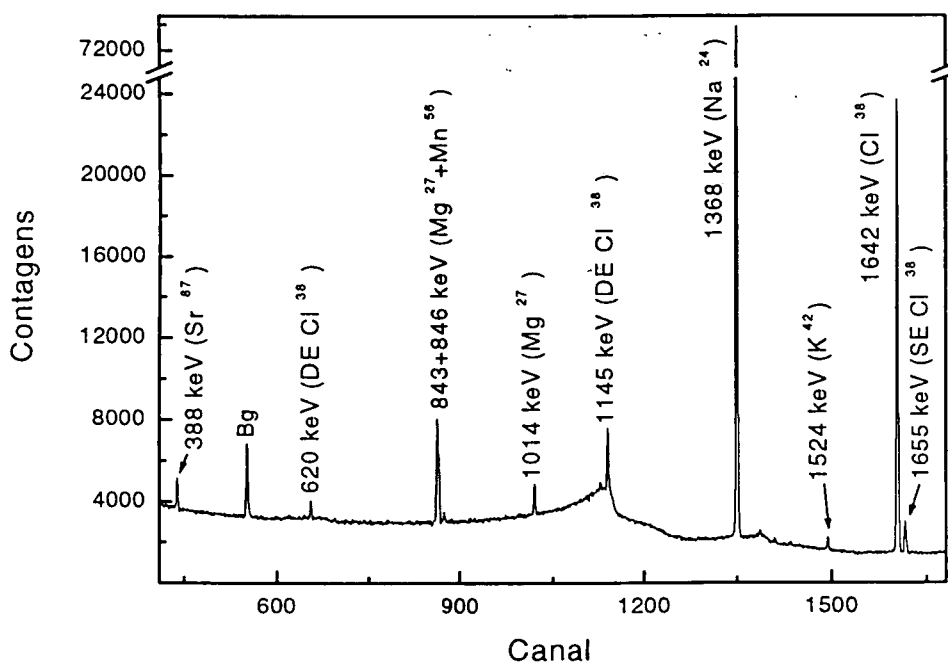


Figura 19a: Espectro- γ (parcial) do material biológico ativado (osso do grupo controle) onde: Bg é a radiação de fundo e SE e DE Simples e Duplo Escape da radiação- γ .

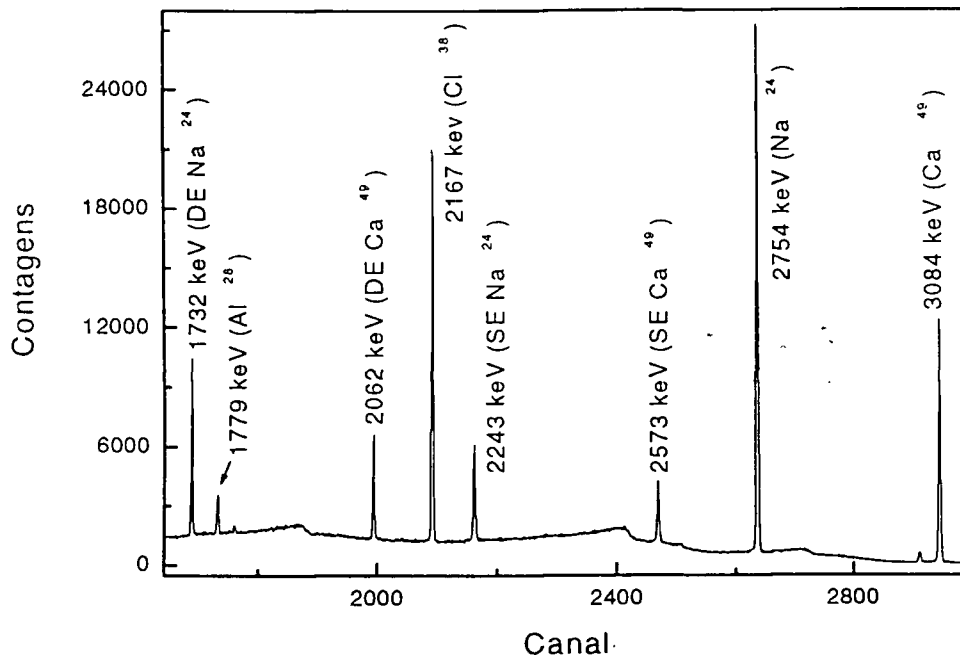


Figura 19b: Espectro- γ (parcial) do material biológico ativado (osso do grupo controle) onde: Bg é a radiação de fundo e SE e DE Simples e Duplo Escape da radiação- γ .

Na TAB. 11 são apresentados os resultados da análise de osso do animal controle e os limites de detecção para cada elemento e na FIG. 19 o comportamento dos elementos Ca e Mg em osso de frangos submetidos a dieta com ração dopada com Urânio em comparação com o animal controle.

Tabela 11: Concentração e limite de detecção dos elementos presentes na amostra de osso do animal controle.

Elemento	Concentração (g kg ⁻¹)	Limite de detecção (3σ) [44] (μg g ⁻¹)
Al	1,44 ± 0,07	85
Ca	232 ± 51	510
Cl	9,6 ± 0,4	51
K	4,98 ± 0,48	980
Mg	16,8 ± 0,7	685
Mn	0,072 ± 0,003	4,3
Na	14,14 ± 0,50	28
Sr	0,37 ± 0,03	52

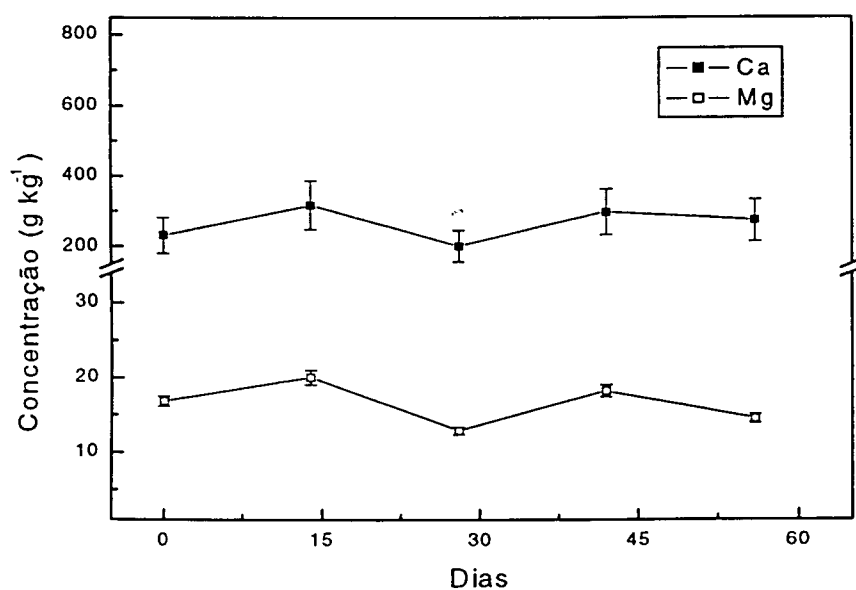


Figura 20: Comportamento dos elementos Cálcio e Magnésio nas amostras de osso. Os dados referentes ao animal controle estão representados no ponto 0 ppm no gráfico.

CAPÍTULO 5: CONCLUSÕES

No presente trabalho foi realizado um estudo detalhado da viabilidade do uso da técnica de ativação neutrônica para realização de análises clínicas de urina e sangue, com o objetivo de auxiliar o estudo das funções biológicas de animais submetidos à ingestão crônica de Urânio.

A técnica de ativação neutrônica foi empregada também para análises de ossos e demais órgãos fornecendo dados complementares para a avaliação de danos ou lesões nos animais.

Basicamente, o procedimento proposto consiste em irradiar pequenas quantidades de material biológico com nêutrons, no Reator IEA - R1 e analisar a radiação gama induzida após a ativação nuclear. Esta análise fornece tanto informações sobre o fluxo de nêutrons bem como dos materiais ativados.

Para agilizar as análises e diminuir gastos empregou-se o método absoluto para determinação da concentração dos elementos de interesse nas amostras biológicas de urina e sangue total bem como na análise de órgãos e ossos.

Os resultados das análises nucleares quando comparados com os dados das análises convencionais utilizadas permitiram algumas previsões positivas. As conclusões mais importantes são discutidas a seguir.

- ✓ trata-se de um método sensível e preciso para avaliar a concentração de elementos traços tais como: Al, Br, Ca, Cl, Fe, I, K, Mg, Mn, Na, Sr e Zn, em diferentes materiais biológicos;
- ✓ permite a avaliação simultânea da concentração de elementos de interesse em sangue (FIG. 13) e urina (FIG. 14), o que nem sempre é possível via análise convencional;

- ✓ fornece dados a respeito do quadro clínico dos organismos em estudo no decorrer do experimento (concentração dos elementos traços presentes nas amostras biológicas) utilizando quantidades significativamente menores de material biológico. Desta forma é possível a investigação clínica de animais de pequeno porte, sem desgaste dos mesmos, pois a realização dos vários exames necessários via análise clínica convencional (TAB. 1), não é viável em função da elevada quantidade de material a ser coletado:
- ✓ redução de custos tanto em função dos gastos com relação a realização das análises clínicas convencionais, bem como em função da metodologia nuclear aplicada:
- ✓ obtenção da concentração via método absoluto, a qual elimina o uso de padrões;
- ✓ redução do tempo tanto na execução como na obtenção dos dados para as análises.

Além disso, a metodologia nuclear fornece subsídios para realizações futuras de outras análises de materiais biológicos (como: fezes, unha, cabelo, etc) via ativação de núcleos emissores de radiação gama. Um desdobramento importante deste estudo resultou na possibilidade da obtenção dos valores de normalidade para análise de sangue total em indivíduos. Isto gerou a elaboração de um projeto em colaboração com o Departamento de Análises Clínicas da UNISA.

Com relação as limitações do método, tem-se a necessidade do uso do Reator Nuclear e a execução das análises clínicas por um técnico com formação em Proteção Radiológica. Entretanto, é importante ressaltar que a baixa atividade induzida permite o descarte do material ativado ou seu armazenamento sem necessidade de blindagem decorridos dois dias após a irradiação.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] GARCIA, F. *et al.* A new statistical method for transfer coefficients calculations in the framework of the general multiple-compartment model of transport for radionuclides in biological systems. *Physics in Medicine and Biology*, 44, 2463, 1999.
- [2] ARRUDA-NETO, J.D.T. *et al.* Concentrations of uranium in animal feed supplements: Measurements and dose estimates. *J.Radioanal. Nucl. Chem.*, 221, 97 - 104, 1997.
- [3] HENRY, J.B. *Diagnósticos Clínicos e Conduta Terapêutica por exames Laboratoriais*. 10 ed. Vol. I, 1982.
- [4] SCHMIDT-NIELSEN, K. *Fisiologia animal: adaptação e meio ambiente*. Ed.Santos, São Paulo, 1996.
- [5] FIRESTONE, R.B., *Table of Isotopes*, 8 Ed. New York, N.Y.: Wiley, 1996.
- [6] LABORATÓRIO FLEURY. *Manual de exames do laboratório Fleury*. São Paulo, 1996.
- [7] RAV, I.; FREEDMAN, A.; MENNUCCI, L. *Bioquímica: fundamentos para as ciências biomédicas*. São Paulo: Mc Graw-Hill, 1981.
- [8] WILLIAMS. *Tratado de endocrinologia*, 7 ed. São Paulo: Manole.
- [9] DUARTE, C.L. *Estudo das medidas terapêuticas para redução da contaminação interna por radionuclídeos*. 1992. Dissertação (Mestrado) – Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, IPEN, São Paulo.

- [10] CALABREYSSE, J. *Toxicologie de l'uraniu naturel: essai d'évaluations de la contamination interne chez l'homme*. Gif-sur-Yvette, Service Central de Documentation, Mars, 1968. (CEA - R - 3361).
- [11] SAENZ, M.D.L. Toxicologia del uranio natural: contribución al control de contaminación interna. *Energ. Nucl.*, 13(62), 511-525, 1969.
- [12] YUILE, C.L. Animal experiments. n: HODGE, H.C.; HURSH, J.B.; STANNARD, J.N. eds. *Uranium – plutonium – transplutonic elements*. Berlin, Springer, p. 165-194, 1973. (Handbook of experimental pharmacology, 36).
- [13] BERLIN, M. & RUDELL, B. Uranium. In: FRIBERG, L.; NORDBERG, G.F.; VOUK, V.B. eds. *Handbook on the toxicology of metals*. 2 ed. Amsterdam, Elsevier, p. 623-637, 1986.
- [14] STEVENS, W.; BRUENGER, F.W.; ATHERTON, D.R.; SMITH, J.M.; TAYLOR, G.N. The distribution and retention of hexavalent ^{233}U in the beagle. *Radiat. Res.*, 83 (1): 109-126, 1980.
- [15] STANNARD, J.N. The concepts of critical organ and radiation dose as applied to plutonium. *Health Phys.*, 29:539-550, 1975.
- [16] INTERNATIONAL COMMISSION ON RADIOLOGICAL PROTECTION. *Limits for intakes of radionuclides by workers*. Oxford, Pergamon, 1978. (ICRP – 30, part 1).
- [17] KATHREN, R.L.; McINROY, J.F.; MOORE, R.H.; DIETERT, S.E. Uranium in the tissues of an occupationally exposed individuals. *Health Phys.*, 57(1): 17-21, 1989.
- [18] DURBIN, P.W. & WRENN, M.E. Metabolism and effects of uranium in animals. *Conference on Occupational Health Experience with Uranium, held in Virginia, 1975*. Arlington, Stouffer national Center, 1975, p. 67-129. (ERDA – 93)

- [19] LUESSENHOP, A.J.; GALLIMORE, J.C.; SWEET, W.H.; STRUXNESS, E.G.; ROBINSON, J. The toxicity in man of hexavalent uranium following intravenous administration. *Am. J. Roentgenol. Radium Ther. Nucl. Med.*, 79(1): 83-100, 1958.
- [20] HOWLAND, J.W. Studies on human exposures to uranium compounds. In: VOEGTLIN, C. & HODGE, H.C. eds. *Pharmacology and toxicology of uranium compounds*. New York. McGraw - Hill, p. 993-1017, 1949 (National nuclear energy series. Manhattan Project Technical section, vol. 6).
- [21] HURSH, J.B. & SPOOR, N.L. Data on man. In: HODGE, H.C.; HURSH, J.B.; STANNARD, J.N. eds. *Uranium - plutonium - transplutonic elements*. Berlin, Springer, p. 197-239, 1973. (Handbook of experimental pharmacology, 36).
- [22] KOCHER, D.C. relationship between kidney burden and radiation dose from chronic ingestion of U: implications for radiation standards for the public. *Health Phys.*, 57(1), 9-15, 1989.
- [23] KONIG, L.A. & SHIEFERDECKER, H. Assessment of uranium and plutonium body burden. Methods and techniques. *At. Energy Rev.*, 12:343-417, 1974.]
- [24] HODGE, H.C. A history of uranium poisoning (1824-1942). In: HODGE, H.C.; HURSH, J.B. STANNARD, J.N. eds. *Uranium - plutonium - transplutonic elements*. Berlin, Springer, p. 5-56, 1973. (Handbook of experimental pharmacology, 36).
- [25] BOTHE, W. Zur Methodik der Neutronensondem. *Z. Phys.*, 120: 437, 1943.
- [26] SILVA, A.A. *Espectroscopia de nêutrons com o detector cintilador orgânico líquido Ne-213*. Rio de Janeiro, Universidade Federal do Rio de Janeiro, 1980.
- [27] THOMAS, P.M.; HARRISON, K.G.; SCOTT, M.C. A multisphere neutron spectrometer using a central ^3He detector. *Nucl. Instr. Meth Phys. Res.*, 224: 225-32, 1984.
- [28] KNOLL, G.F. *Radiation detection and measurements*. New York, NY, Wiley, 1979.

- [29] YORIYAZ, H.; FANARO, L.C.C.B., DINIZ, R.; JEREZ, R. Methodology for evaluation and experimental measurements of parameters of the core of research reactor IEA-R1 using the Monte Carlo method. *IAEA Report , Progress Report 2*. October, 2000.
- [30] RANT, J. Measurements of neutron flux distribution by activation detectors. In: INTERNATIONAL ATOMIC ENERGY AGENCY. *Application of small computers to research reactor operation: international training course*. Ljubljana, 1-26, Jun., 1987.
- [31] BROWN Jr, M.L. & CONNOLY, J.J. Cadmium cutoff energies for resonance absorbers and reactivity measurements. *Nucl. Sci Eng.*, 24, 6-17, 1966.
- [32] MUECK, K. & BENSCH, F. Cadmium correction factors of several thermal neutron foil detectors. *J. Nucl. Eng.*, 27, 677-88, 1973.
- [33] MESTINICK Fº, J. *A distribuição espacial de fluxo de nêutrons no núcleo do reator IEA-R1, obtida por meio da ativação de folhas*. 1978. Dissertação (Mestrado) - Escola Politécnica, Universidade de São Paulo, São Paulo.
- [34] MCLEROY, W.N.; BERG, S.; CROCKETT, T.; HAWKINS, R.G. *SAND II - a computer-automated interactive method for neutron flux-spectra determination by foil activation*. AFWL-TR-67-41, Sept. 1967.
- [35] PROFIO, A.E. *Experimental reactor physics*. New York, NY, Wiley, 1976.
- [36] RITCHIE, R.H. & ELDRIDGE, H.B. Thermal neutron flux depression by absorbing foils. *Nucl. Sci. Eng.*, 8, 300-11, 1960.
- [37] TRAVESI, A. *Analisis por activation neutronica. Teoria práctica y aplicaciones*. Madrid: J.E.N., 1975.
- [38] PENTEADO Fº, A.C. *Irradiações no reator e cálculos de ativação*. IEA-Inf-23, São Paulo, 1972.

- [39] HELENE, O.A.M.; VANIN, V.R. *Tratamento Estatístico de dados em Física Experimental*. Ed. Edgard Blucher. 2 Ed. 1991.
- [40] INTERNATIONAL ATOMIC ENERGY AGENCY. *X-Ray and Gamma-Ray Standards for detector calibration*. Viena, 1991. (IAEA – TECDOC – 619).
- [41] GOUFFON, P. *Manual do programa Idefix*. Universidade de São Paulo, Instituto de Física, Laboratório do Acelerador Linear, São Paulo, 1987.
- [42] SINGH, N.P.; LEWIS, L.L.; WRENN, M.E. Utilization of femoral head for estimating the skeletal burden of U and Pu in humans. *Health Phys.*, 56(3), 341-343, 1989.
- [43] CRUZ, M.T.F. Universidade de São Paulo, Instituto de Física, Microsul. São Paulo, 2001. *Comunicação interna*.
- [44] SILVA, L.R.N. *Estudo de Programas de Computação para a Análise de Espectros de Raios Gama. Aplicação à Análise por Ativação de Amostras Geológicas*. 1998. Dissertação (Mestrado) – Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares - IPEN, São Paulo.