



AUTARQUIA ASSOCIADA À UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

**DETERMINAÇÃO *IN VITRO* DE CONSTITUINTES
INORGÂNICOS EM TECIDOS ÓSSEOS PELO MÉTODO DE
ATIVAÇÃO COM NÊUTRONS**

MARCELO KAZUO TAKATA

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

Orientadora:
Dra. Mitiko Saiki

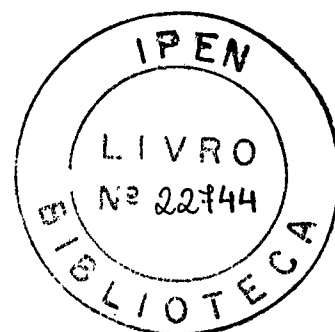
**São Paulo
2003**

INSTITUTO DE PESQUISAS ENERGÉTICAS E NUCLEARES

Autarquia associada à Universidade de São Paulo

**DETERMINAÇÃO *IN VITRO* DE CONSTITUINTES INORGÂNICOS
EM TECIDOS ÓSSEOS PELO MÉTODO DE ATIVAÇÃO COM
NÊUTRONS**

MARCELO KAZUO TAKATA



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

Orientadora:

Dra. Mitiko Saiki

SÃO PAULO

2003

Aos meus pais, Shideyuki (*in memorian*) e Miyoko
Às minhas irmãs, Cristiane e Luciane
Aos meus padrinhos, Sérgio e Sumika (*in memorian*)
À Livia

Com todo amor e carinho

AGRADECIMENTOS

À Dra. Mitiko Saiki, pela orientação e dedicação na elaboração desta dissertação.

Ao Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares (IPEN-CNEN/SP), pela possibilidade de realização da pós-graduação.

À FAPESP e ao CNPq, pela concessão da bolsa de estudos.

À Faculdade de Medicina da USP (FMUSP), pela oportunidade concedida para coleta de amostras.

À Dra. Marina Beatriz Agostini Vasconcellos, chefe da Supervisão de Radioquímica do IPEN, pelo apoio e incentivo para a realização desta dissertação.

À Dra. Ana, Dr. Casimiro, Dra. Déborah, Dra. Maria José, Dra. Rosemeire e Dra Vera pelos conselhos, apoio e agradável convivência.

Ao Dr. Nairo Massakazu Sumita pelo auxílio na coleta de amostras.

Ao Makoto e Lena, pelas sugestões referentes à preparação de amostras.

Ao Rubens, pelas sugestões referentes à interpretação estatística dos resultados obtidos nesta dissertação.

Ao Amilton, Claudio, Irene e Edson Alves pela convivência e amizade.

Aos meus grandes amigos Andreza, Claudia, Edson Moreira, Luciana, Marília, Regina, Ricardo, Roberto e Suzana pelo auxílio, conselhos e, principalmente, pela amizade.

À Livia, pelo amor e apoio nos momentos mais difíceis.

À todas as pessoas que, de alguma forma, contribuíram para a realização deste trabalho.

SUMÁRIO

	Página
1. INTRODUÇÃO	09
1.1 Objetivo do trabalho	18
2. CONSIDERAÇÕES GERAIS SOBRE TECIDO ÓSSEO HUMANO	19
2.1 Composição do tecido ósseo	19
2.2 Remodelação óssea	23
2.3 Doenças ósseas	23
3. ANÁLISE POR ATIVAÇÃO COM NÊUTRONS	26
3.1 Princípio do método de análise por ativação com nêutrons (AAN)	26
3.2 Equação fundamental da análise por ativação com nêutrons	28
3.3 Método comparativo de análise por ativação	31
3.4 Vantagens e desvantagens do método	33
4. PARTE EXPERIMENTAL	34
4.1 Preparação de padrões dos elementos	34
4.1.1 Preparação das soluções padrão estoques de elementos	34
4.1.2 Preparação dos padrões sintéticos dos elementos	36
4.2 Coleta das amostras de ossos de animais (bovinos e suínos)	38
4.3 Coleta das amostras de ossos humanos	38
4.4 Tratamento das amostras de ossos	42
4.4.1 Secagem das amostras de tecido ósseo por liofilização	43
4.4.2 Tratamento de amostras por calcinação	46
4.5 Análise dos materiais biológicos de referência certificados	47
4.5.1 Materiais de referência analisados	47
4.5.2 Determinações das percentagens de perda de peso na secagem dos materiais de referência	48
4.6 Procedimento para análise por ativação dos materiais	48
4.6.1 Irradiação curta	49
4.6.2 Irradiação longa	53

	Página
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	54
5.1 Análises dos materiais biológicos de referência certificados	54
5.2 Análises de uma amostra de costela bovina em replicatas	62
5.3 Análises de costelas de bovinos e suínos	65
5.4 Análises de ossos humanos	71
6. CONCLUSÕES	79
APÊNDICE 1	81
APÊNDICE 2	85
APÊNDICE 3	91
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	100

DETERMINAÇÃO *IN VITRO* DE CONSTITUINTES INORGÂNICOS EM TECIDOS ÓSSEOS PELO MÉTODO DE ATIVAÇÃO COM NÊUTRONS

Marcelo Kazuo Takata

RESUMO

Nos últimos anos, houve um crescente interesse na análise de tecido ósseo pelo fato do osso ser um depósito de elementos essenciais e tóxicos, além da função de suporte e proteção de órgãos internos vitais. Além disso, análises de constituintes inorgânicos em ossos têm sido realizadas para estudo de doenças como a osteoporose e tumores ósseos. Neste trabalho foi estabelecido um procedimento experimental adequado para o tratamento de tecido ósseo, e a análise por ativação com nêutrons instrumental foi aplicada nas determinações de elementos traço em tecidos cortical e trabecular liofilizados e tecido total calcinado de animais (suínos e bovinos) e costelas de humanos. Foram utilizadas irradiações curtas e longas realizadas no reator nuclear de pesquisa IEA-R1 e foram determinados os elementos Ba, Br, Ca, Cl, Fe, K, Mg, Mn, Na, P, Rb, Sb, Sr e Zn em tecido ósseo. Para validação da metodologia analítica foram analisados materiais biológicos de referência certificados e os resultados obtidos mostraram boa precisão e exatidão. A análise de osso bovino apresentou dados precisos para a maioria dos elementos com desvios padrão relativos inferiores a 14 %. Estes resultados mostraram que o procedimento definido para tratamento de tecido ósseo foi apropriado para obtenção de amostras homogêneas. Entretanto, a calcinação não foi apropriada para o tratamento do osso total devido à perda de Br e Cl. O teste t foi aplicado para comparar os resultados obtidos para diferentes tecidos do osso bem como para duas espécies de animais. As comparações entre os resultados obtidos para os tecidos ósseos suínos e bovinos apresentaram diferentes concentrações. Além disso, os tecidos cortical e trabecular de humanos apresentaram concentrações distintas para todos os elementos analisados neste trabalho. Estes resultados indicam que os elementos traço em amostras de ossos devem ser estudados separadamente.

***IN VITRO* DETERMINATION OF INORGANIC CONSTITUENTS IN BONE
TISSUES USING NEUTRON ACTIVATION ANALYSIS**

Marcelo Kazuo Takata

ABSTRACT

In the past years, there has been an increasing interest in bone analyses since they are deposits of essential and toxic elements. Besides they have supporting function of human body and protect vital organs. Besides, analyses of inorganic constituents in bones have been carried out to study bone diseases such as osteoporosis and tumors in bones. In this work, an adequate experimental procedure was established for bone tissue treatment, and instrumental neutron activation analysis was applied to trace element determinations in freeze-dried cortical and trabecular tissues and whole bone ash from animal (porcine and bovine) and human ribs. Using short and long-period irradiations at the IEA-R1 nuclear research reactor, the elements Ba, Br, Ca, Cl, Fe, K, Mg, Mn, Na, P, Rb, Sb, Sr and Zn were determined in bone tissues. To validate the analytical methodology, biological certified reference materials were analyzed and their results showed good precision and accuracy. Besides analyses of a bovine rib bone presented precise data for most elements with relative standard deviations lower than 14 %. This result demonstrated that the procedure defined for bone tissue treatment was appropriate to obtain homogeneous samples. However, the calcinations was not suitable for whole bone treatment due to loss of Br and Cl. Statistical t test was applied to compare the results obtained for different tissues of bone and also the results found for ribs of two animal species. Comparisons between the results obtained for correspondent tissues of porcine and bovine ribs present different element concentration. Moreover, cortical and trabecular tissues of humans presented different concentrations for all the elements analyzed in this work. These findings indicate that trace elements in bone samples have to be separately studied.

1. INTRODUÇÃO

Nos últimos anos, tem havido um crescente interesse nas determinações de elementos-traço em tecidos biológicos para elucidar as suas funções nos organismos vivos e também devido à possibilidade de detecção de suas baixas concentrações ($\mu\text{g kg}^{-1}$) com o aperfeiçoamento das técnicas analíticas.

No caso de tecidos ósseos, as análises neste tipo de matriz também têm aumentado consideravelmente, face à sua importância no que se refere à função dos ossos na sustentação e movimentação do corpo humano, proteção dos órgãos internos vitais e também pelo fato do osso funcionar como depósito de elementos essenciais e tóxicos. Além disso, análises de elementos nos ossos têm sido realizadas para o estudo de diversos tipos de doenças como a osteoporose, tumores nos ossos, doenças renais e doenças crônicas relacionadas com a idade dos indivíduos (SCANCAR *et al.*, 2000).

A osteoporose é uma doença que causa a diminuição da massa óssea tornando o osso suscetível a fraturas. Esta doença está associada à velhice e a menopausa e ela atinge cerca de quatro vezes mais os indivíduos do sexo feminino do que o masculino. Trata-se, portanto, de um mal tipicamente feminino, pois o risco de adquirir a osteoporose aumenta com a menopausa. Hoje no Brasil, mais de 10 milhões de pessoas acima de 60 anos sofrem desta doença. Este mal não tem cura, mas pode ser evitado por meio de exames preventivos e atualmente a densitometria óssea é utilizada para a sua diagnose e prevenção.

Além da área médica, determinações de elementos em ossos tem sido utilizadas na arqueologia para o estudo da correlação existente entre os elementos encontrados nos ossos dos povos antigos com a sua dieta.

Relativamente à composição do osso convém salientar que ele é um tecido

formado de componentes orgânicos e inorgânicos. Os componentes inorgânicos de interesse para as análises fazem parte da estrutura cristalina de hidroxiapatita $[Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2]$ considerada como o principal reservatório de minerais dos seres humanos. Esta parte inorgânica representa cerca de 50 % do peso da matriz óssea. Os íons comumente encontrados são os de fosfato, de cálcio, e íons presentes em baixas concentrações como o bicarbonato, magnésio, potássio, sódio e citrato. A parte orgânica da matriz óssea é formada de fibras colágenas e a associação de hidroxiapatita com estas fibras colágenas é responsável pela dureza e resistência do tecido ósseo (JUNQUEIRA e CARNEIRO, 1974).

Fazendo um levantamento de estudos sobre determinações de elementos em tecidos ósseos, verifica-se que apesar do seu grande interesse, dados sobre estas análises neste tipo de matriz vem sendo divulgados somente nos últimos anos devido à dificuldade na amostragem bem como na sua análise química.

No caso da análise de ossos de humanos, há ainda as dificuldades ligadas às implicações médico legais para a obtenção das amostras. O tratamento das amostras de ossos requer também uma série de cuidados. No esqueleto adulto se encontram dois tipos de tecidos ou compartimentos: cortical (externo) que se encontra numa forma mais compacta e trabecular (interno) que é a parte mais porosa, e a separação desses dois tipos de tecidos não é uma etapa simples para obtenção de amostras representativas. Isto é, nem todos os ossos podem ser classificados rigorosamente como cortical e trabecular devido a presença de tipos intermediários de porosidade que dificultam a classificação. Desta maneira, trabalhos sobre a distribuição de elementos nestes dois tipos de tecidos são escassos (TANDON *et al.*, 1998).

Relativamente às metodologias analíticas utilizadas nas análises de ossos, convém salientar que as técnicas nucleares vêm sendo muito utilizadas e com sucesso por meio de testes *in vivo* e *in vitro*. As demais técnicas analíticas que vem sendo usadas na análise deste tipo de matriz são a espectrometria de absorção atômica (AAS), espectrometria de massa com fonte de plasma induzida (ICP-MS) e espectrometria de emissão atômica (ICP-AES).

Nos testes *in vivo*, técnicas analíticas como a análise instrumental por ativação com nêutrons (INAA), espectrometria de fluorescência de raios X (XRF), análise instrumental por ativação com raios gama (IGAA), tomografia computadorizada quantitativa (QCT), e os métodos baseados na absorção de fótons vêm sendo utilizados.

ZAICHICK e SNETKOV (1998) utilizaram a análise por ativação com nêutrons *in vivo* e *in vitro*, para obter uma estimativa dos teores de elementos presentes em ossos de crianças saudáveis do grupo controle e crianças raquíticas antes e durante o tratamento desta doença. Seus resultados mostraram que o tratamento efetuado com vitamina D e drogas contendo Ca, P bem como o Mg contribuiu muito na renovação óssea mais rápida de modo a aumentar a composição elementar do osso a um nível correspondente ao do grupo controle.

ZAICHICK e MORUKOV (1998) avaliaram os teores de minerais nos ossos da espinha dorsal, fêmur, tíbia, antebraço, calcânhar, mãos e pés de nove voluntários utilizando os métodos de tomografia computadorizada quantitativa (QCT), de absorção de fótons duplos (DPA), absorção de fótons simples (SPA) e análise por ativação com nêutrons *in vivo* (IVNAA), contudo estes pesquisadores não verificaram uma concordância entre os resultados obtidos por estes diferentes métodos de análise. Estes pesquisadores enfatizaram a necessidade dos estudos sobre exatidão dos resultados obtidos pelos métodos *in vivo* para a determinação mineral óssea. Seus resultados permitiram concluir que as perdas de minerais são mais altas nos ossos inferiores, principalmente nos pés.

As técnicas de XRF *in vivo* e IVNAA foram utilizadas para a determinação das concentrações dos elementos Ag, Ba, Br, Ca, Cl, Co, Cr, Cs, Fe, Hg, K, Mg, Mn, Na, P, Pb, Rb, Sb, Sc, Se, Sr, Tb e Zn, e em tecidos ósseos de indivíduos normais para comparação com aqueles obtidos para indivíduos portadores de diferentes tipos de doenças ósseas como a osteomielite, osteoblastoma e sarcoma osteogênico. Os resultados desta pesquisa demonstraram que os teores de elementos nos ossos variam com o tipo de doença (ZAICHICK, 1994).

Diversas técnicas analíticas têm sido empregadas nos testes *in vitro* de tecidos ósseos.

AKESSON *et al.* (1994) determinaram por meio de testes *in vitro* Ca e P nos ossos da cabeça do fêmur de cinco pacientes com osteoartrose usando a técnica de fluorescência de raios X com energia dispersiva (ED-XRF) para comparação de resultados com aqueles obtidos por INAA e espectrometria de emissão acoplado com fonte de plasma indutivamente (ICP-ES). Estes pesquisadores concluíram que a ED-XRF é uma técnica analítica precisa e exata uma vez que resultados obtidos por esta técnica apresentaram uma boa concordância com aqueles obtidos pelos métodos de INAA e ICP-ES.

HYVÖNEN-DABEK *et al.* (1981) utilizaram a técnica da análise de emissão de raios X induzido por partículas (PIXE), para analisar os elementos Br, Cr, Cu, Fe, Mn, Ni, Pb, Sr e Zn em ossos de 15 cadáveres humanos, com o objetivo de aplicar adequadamente esta metodologia na análise neste tipo de matriz e fornecer dados preliminares de teores de elementos-traço em ossos considerados “normais”, ou seja, de indivíduos sem nenhum histórico de doença óssea. Num outro trabalho HYVÖNEN-DABEK (1981) aplicou a técnica de análise da emissão de raios gama pronto induzida por prótons (PIGE) na determinação de teores de elementos traço em ossos humanos, e por esta técnica foram detectados elementos leves tais como o Al, B, Ca, F, Li, Mg, N, Na, O e P. A técnica PIGE possibilitou a determinação de elementos leves, ao contrário dos métodos PIXE e INAA.

Uma outra publicação de destaque é a de PORTE *et al.* (1997a) que aborda a análise de fósforo em amostras de ossos pelo método por ativação com nêutrons. Estes autores estudaram a medida deste elemento e de possíveis problemas de interferências na análise. A análise de fósforo pela análise por ativação com nêutrons é dificultada porque o radioisótopo ^{32}P formado por captura neutrônica é um emissor de partículas beta puro (β^-) sem a emissão de raios gama. Uma possibilidade de obter o teor de P nas amostras de ossos é medir a atividade gama do ^{28}Al , que é formado numa reação $^{31}\text{P}(n,\alpha)^{28}\text{Al}$, entretanto esse radioisótopo ^{28}Al pode se originar de outros dois tipos de reações nucleares: $^{27}\text{Al}(n,\gamma)^{28}\text{Al}$ e $^{28}\text{Si}(n,p)^{28}\text{Al}$. Portanto se a amostra contém Al e Si dependendo dos seus teores com relação ao do P, estes dois elementos podem interferir na análise do P. No caso do silício, a ocorrência da interferência pode ser verificada pela medida dos raios gama do ^{29}Al ($E_\gamma=1273,3$ keV; $T_{1/2}=6,5$ minutos), formada na reação $^{29}\text{Si}(n,p)^{29}\text{Al}$. Desta maneira, os autores desse trabalho estabeleceram um protocolo para análise de P medindo a radiação

de freamento “bremsstrahlung” produzida pelas partículas β^- do ^{32}P num espectrômetro com supressor Compton, após irradiação da amostra por 2 minutos e fazendo a medida após um período de decaimento de 7 dias. Foram obtidos resultados de P com uma boa precisão e exatidão e as interferências induzidas pelas reações $^{32}\text{S}(n,p)^{32}\text{P}$ e $^{35}\text{Cl}(n,\alpha)^{32}\text{P}$ puderam ser desprezadas devido aos baixos teores destes elementos no osso.

Num outro trabalho, PORTE *et al.* (1997b) analisaram materiais biológicos de referência NIST 1486 Bone Meal proveniente do National Institute of Standards and Technology e IAEA Milk Powder A-11 da Agência Internacional de Energia Atômica utilizando a técnica de ativação com nêutrons seguida de espectrometria com supressor Compton ou anti-Compton para avaliar a exatidão dos resultados e a validade do método para análise de osso. Foram determinados 13 elementos nestes materiais e os seus resultados obtidos foram concordantes com valores certificados ou valores informativos.

MILLER *et al.* (1992) salientaram sobre a vantagem de se utilizar a ativação com nêutrons (NAA) na determinação do cálcio principalmente em ossos pela medida do ^{49}Ca devido a rapidez na análise e a precisão nos resultados.

DEIBEL *et al.* (1995), que analisaram Pb em ossos humanos utilizando as técnicas de análise da emissão de raios X induzido por partículas (PIXE) e espectrometria de absorção atômica em forno de grafite (GFAAS), afirmam que o osso é também um reservatório de elementos tóxicos como o Pb e Al. O efeito tóxico do Pb neste tecido não é conhecido, entretanto existem evidências de que o Pb do osso pode se mobilizar para o sangue ou leite materno ocasionando exposição deste elemento ao feto ou ao bebê.

YOSHINAGA *et al.* (1989) analisaram Al, C, Ca, Cd, Co, Cr, Cu, Fe, K, Mg, Mn, N, Na, Ni, P, Pb, Sr, Ti, V e Zn em ossos de costelas de uma população japonesa com idade média de 42,6 anos, utilizando as técnicas de espectrometria de absorção atômica (AAS), espectrometria de emissão atômica com fonte de plasma acoplado indutivamente (ICP-AES) e análises de carbono e nitrogênio, para investigar a variação nas concentrações destes elementos com a idade e sexo dos indivíduos. Seus resultados mostraram que as concentrações de Al, Fe, Na, Pb e Zn no osso aumentam com a idade enquanto que as concentrações de Mg diminuem. O fator sexo dos indivíduos nas concentrações de elementos nos ossos foi estudado para os elementos Fe e P, com doadores cujas idades

variaram de 15 a 44 anos. Para este grupo foi verificado que ossos dos indivíduos do sexo feminino apresentam concentrações mais altas de P e mais baixas de Fe quando comparados com aqueles obtidos para indivíduos do sexo masculino. Entretanto, para indivíduos com idades acima dos 45 anos foi verificado que o fator sexo não influi nos teores de elementos acumulados no ossos.

Posteriormente, o grupo de YOSHINAGA *et al.* (1995) determinaram os elementos Ba, Ca, Fe, K, Mg, Na, P, Pb, Sn, Sr e Zn em amostras de costelas humanas de idosos japoneses, utilizando as técnicas de espectrometria de absorção atômica (AAS), espectrometria de emissão atômica com fonte de plasma acoplado indutivamente (ICP-AES) e espectrometria de massa com fonte de plasma acoplado indutivamente (ICP-MS). Um dos objetivos destas determinações foi contribuir para o aumento de dados sobre a composição elementar em ossos humanos com a análise de um número maior de seus elementos constituintes para posterior uso destes dados no estudo do estado patológico dos indivíduos.

EL-AMRI e EL-KABROUN (1997) utilizaram a NAA para determinação de Ba, Br, Ca, Fe, Sr e Zn em ossos considerados normais coletados de pacientes com as idades variando de 3 a 80 anos com o objetivo de avaliar o desempenho da metodologia analítica e obter dados de análises de ossos. Seus resultados foram avaliados em função da idade e sexo do indivíduo bem como foram comparados com valores das análises de ossos apresentados na literatura. Foi verificado que a concentração de Br aumenta com a idade e as de Ba, Ca, Sr e Zn foram mais baixos nos grupos dos mais velhos. Com relação ao sexo dos indivíduos, as mais altas concentrações de Ba, Ca e Zn foram obtidas para o grupo do sexo feminino e as mais altas de Br, Fe e Sr nos ossos do grupo do sexo masculino.

ZHANG *et al.* (1999) analisaram os elementos Ba, Ca, F, K, Mg, Mn, Na e Sr no osso da crista ilíaca de coelhos com osteoporose pelo método de NAA, com o objetivo de estudar a função destes constituintes inorgânicos nos pacientes com a doença osteoporose. Seus resultados indicaram que as concentrações de F no grupo experimental de animais com osteoporose são mais elevadas que no grupo controle, ao contrário do Mg que as suas concentrações mais baixas foram obtidos para o grupo experimental. Para os elementos K, Na, Ca, Ba, Mn e Sr não foram verificados diferenças significativas entre os dois grupos.

SCANCAR *et al.* (2000), fizeram uma comparação entre os resultados obtidos pelos métodos de espectrometria de absorção atômica por chama (FAAS) e a espectrometria de absorção atômica eletrotérmica (ETAAS), bem como dos procedimentos de dissolução de amostras na análise de ossos da crista íliaca de humanos. No caso foram analisados ossos obtidos durante a autópsia de 12 indivíduos adultos não urêmicos, com o objetivo de desenvolver um método analítico rápido e seguro para a determinação de Al, Ca, Cu, Fe, Pb, Rb, Sr e Zn em tecido ósseo. A validade do método com relação a exatidão foi comprovada pela análise do material biológico de referência NIST 1486 Bone Meal.

KUO *et al.* (2000) determinaram Ag, Al, As, Ca, Cd, Co, Cr, Cu, Fe, Mg, Mn, Ni, Pb e Zn em ossos de um grupo de 70 indivíduos de Taiwan, utilizando a técnica de ICP-AES. Estes elementos foram determinados para estudo da sua correlação com a idade dos indivíduos, lesões ósseas e consumo de tabaco, bebidas e alimentos. Seus resultados indicaram que os teores de Cd e Pb nos ossos depende da idade dos doadores e estes autores enfatizam a importância da determinação do Cd devido a sua toxicidade. Para estudar o efeito das lesões ósseas nas concentrações dos elementos no osso foram considerados quatro grupos de amostras a saber, com diagnósticos de fratura do pescoço do fêmur, necrose isquêmica da cabeça do fêmur, osteoartrite do quadril e do joelho e de “outras lesões” e foi verificado que estatisticamente não há diferenças significativas entre as concentrações de elementos e a etiologia das doenças ósseas. O grupo de “outras lesões” apresentaram concentrações ligeiramente altas de Ag, As, Cd, Cr, Mg, Mn e Zn quando comparadas com as de outros três grupos. O grupo de indivíduos com osteoartrite apresentaram concentrações mais baixas de As, Cd, Co, Mg e Mn com relação às obtidas por outros três grupos. Relativamente aos fatores nutricionais e tabagismo, KUO *et al.* verificaram que há uma correlação entre o fator frequência do consumo de frutos do mar com as concentrações de Ag, Al, Ca, Co, Cr, Mg, Mn e Ni nos ossos, enquanto que a frequência do consumo de enlatados, leite, chá e tabaco não apresentaram nenhuma correlação com os 14 elementos analisados nos ossos.

ZAICHICK e TZAPHLIDOU (2002) analisaram Ca e P por INAA em tecido cortical do pescoço do fêmur de indivíduos vítimas de acidentes automobilísticos, de quedas e com excessivo consumo de álcool entre outras causas. Estes autores concluíram que o sexo e a idade dos indivíduos contribuem para a variação das concentrações de Ca e P. ZAICHICK e TZAPHLIDOU estimaram a razão Ca/P obtidas nas amostras e

verificaram que esta relação é constante quando comparados com os valores individuais de concentrações destes elementos, o que torna o uso da razão Ca/P mais confiável no diagnóstico de doenças ósseas. ZAICHICK e TZAPHLIDOU afirmam que a fase mineralizada do osso é constituída principalmente de hidroxiapatita mas que também contém pequena quantidade de colágeno, medula, gordura, proteínas não colágenas e água, de modo que as concentrações de Ca e P obtidas nas amostras não podem ser atribuídas somente à hidroxiapatita.

Dentre os trabalhos sobre a determinação da composição elementar em cada subcompartimento do tecido ósseo isoladamente, tem-se o trabalho de ARAS *et al.* (1999) que analisaram subcompartimentos ósseos da crista ilíaca e das costelas de humanos pelo método de NAA. Os resultados obtidos para a crista ilíaca indicaram que há significativas diferenças entre os teores de elementos encontrados no tecido trabecular e cortical para As, Ba, Br, Cd, Cr, Eu, Fe, K, La, Rb e Ta. Apesar destas diferenças nas concentrações elementares dos tecidos trabecular e cortical estes autores afirmam que, de maneira geral, as concentrações de elementos traço não diferem significativamente entre esses dois tipos de tecidos. Esses autores ressaltam ainda a importância da etapa do tratamento e preparo do tecido ósseo visto que esses pontos não são abordados claramente em muitos trabalhos publicados. Devido à dificuldade na obtenção de ossos humanos, este trabalho sugere o uso de ossos de animais principalmente dos ratos, para avaliar os efeitos de elementos-traço no metabolismo ósseo e a osteoporose.

BIGI *et al.* (1997) verificaram que há diferenças na caracterização estrutural e química dos tecidos cortical e trabecular em ossos de ratos, e como resultado dessa investigação foram observadas diferenças nos teores de componentes inorgânicos presentes no tecido cortical e trabecular, isto é, as quantidades dos componentes da fase inorgânica foram ligeiramente menores no osso trabecular do que no osso cortical. Além disso foi verificado que a apatita do osso trabecular contém uma baixa quantidade de íons carbonato e portanto uma baixa razão molar de Ca/P em relação a do osso cortical.

SAMULDRAWAR e ROBERTSON (1993) analisaram, utilizando os métodos PIXE e PIGE, amostras de costelas e medulas de humanos e de animais bem como o material de referência IAEA CRM Animal Bone (H-5). Seus resultados não indicaram, de maneira geral, diferenças significativas entre teores de elementos encontrados nos tecidos

corticais e medulares com exceção dos resultados obtidos para Fe, Zn, Ba, Br e Pb nos ossos de humanos. Estes autores concluíram que as técnicas PIXE e PIGE são apropriadas para a determinação de concentrações de traço, menores e maiores de elementos em tecido ósseo devido a sua simplicidade, rapidez, caráter multielementar e não destrutivo da análise. Além disso essas técnicas permitem a análise de uma superfície seletiva das amostras biológicas não homogêneas.

Portanto, trabalhos publicados sobre a análise do osso cortical e trabecular separadamente [ARAS *et al.* (1999), BIGI *et al.* (1997), SAMULDRAWAR e ROBERTSON (1993)] evidenciam a importância de se determinar os elementos-traço em cada um dos tecidos, separadamente, devido principalmente à diferenças nas suas composições elementares.

Além disso o levantamento bibliográfico realizado mostrou que há poucos dados de análises multielementares de elementos traço em ossos humanos e que possam ser utilizados como valores normais ou de referência para estudos de doenças ósseas. Verificou-se também que a dificuldade na comparação entre dados obtidos por diferentes pesquisadores está associada ao uso de procedimentos distintos de tratamento de ossos para as análises.

Dentro deste contexto, julgou-se de suma importância neste trabalho definir um procedimento para determinação *in vitro* de constituintes inorgânicos aplicando o método de análise por ativação com nêutrons.

Com relação aos métodos analíticos empregados nas análises de ossos, verifica-se que o método instrumental de análise por ativação, o qual foi utilizado no presente trabalho, vem sendo muito utilizado devido às suas vantagens na análise deste tipo de matriz com relação à qualidade nos resultados analíticos, alta sensibilidade e a possibilidade de uma análise multielementar sem a necessidade de realizar a dissolução da amostra.

1.1. Objetivo do trabalho

O objetivo do trabalho foi estabelecer um procedimento adequado para tratamento de amostra de ossos e determinar a composição elementar dos tecidos cortical e trabecular (separadamente) de costelas humanas, aplicando o método de análise por ativação com nêutrons.

Este estudo será de grande interesse para contribuir para o posterior estabelecimento dos valores normais de elementos nos ossos humanos para usos nas pesquisas da área médica, da nutrição e exposição ocupacional.

Para o estabelecimento das condições experimentais adequadas foram analisados, inicialmente, ossos de costelas de animais (bovinos e suínos). Utilizando estas amostras, foi definido o procedimento para o tratamento de tecido cortical e trabecular por liofilização e de osso da costela total por calcinação. Analisando as costelas de animais foi examinada a homogeneidade das amostras preparadas e foi feita também a comparação entre as concentrações de elementos obtidas para ossos de bovinos e suínos.

Para avaliar a qualidade dos resultados analíticos com relação a exatidão e precisão foram analisados os materiais de referência NIST 1400 Bone Ash, NIST 1486 Bone Meal, NIST 1577b Bovine Liver, NIST 1547 Peach Leaves e IAEA 336 Lichen.

Uma vez estabelecidas as condições experimentais adequadas, foram analisadas amostras de tecido cortical e trabecular liofilizadas e de osso total calcinado de costelas humanas. Estas amostras foram coletadas no Serviço de Verificação de Óbitos da Capital (SVOC-USP) da Faculdade de Medicina da USP (FMUSP).

Apresentam-se, neste trabalho, as determinações dos elementos Ba, Br, Ca, Cl, Cr, Fe, K, Mg, Mn, Na, P, Rb, Sb, Sc, Sr e Zn nos ossos e o estudo comparativo realizado entre as concentrações destes elementos encontrados nesses três tipos de tecido ósseo.

2. CONSIDERAÇÕES GERAIS SOBRE TECIDO ÓSSEO HUMANO

Neste Capítulo, serão feitas considerações sobre a composição elementar do tecido ósseo, seu metabolismo e as suas principais doenças por se considerar que estes conhecimentos são de grande interesse para o desenvolvimento deste trabalho.

O tecido ósseo é o principal constituinte do esqueleto que serve de suporte para as partes moles do corpo humano, de proteção de órgãos internos vitais, além de alojar e proteger a medula óssea, formadora das células do sangue. Dentre os tecidos constituintes do corpo humano, o ósseo é um dos mais resistentes e rígidos e é um tipo de tecido conjuntivo formado pela matriz óssea que por sua vez contém células e material intercelular calcificado (JUNQUEIRA e CARNEIRO, 1974).

O tecido ósseo é constituído de duas partes, a saber: osso compacto ou cortical e o osso esponjoso ou trabecular.

A maior parte do esqueleto (80%) é constituída de osso cortical. As diáfises, ou partes médias, dos ossos longos são primariamente osso cortical. O remanescente é osso trabecular, que ocorre nas saliências terminais dos ossos longos, na crista íliaca da pelve, nos punhos, escápulas e vértebras. O osso trabecular é esponjoso e menos denso que o osso cortical e é caracterizado em algumas áreas por espículas longas de apatita (MAHAN e SCOTT-STUMP, 1998).

2.1. Composição do tecido ósseo

Os ossos funcionam como depósitos de íons cálcio, fosfato e outros os quais são armazenados ou liberados de maneira controlada, para manter constante as concentrações desses íons nos líquidos corporais.

A matriz óssea é constituída de uma parte inorgânica e outra orgânica. A parte inorgânica representa cerca de 50% do peso da matriz óssea e contém os íons bicarbonato,

magnésio, potássio, sódio e citrato em pequena quantidade e os íons fosfato e cálcio em quantidades mais abundantes. O cálcio e o fósforo formam cristais e sua análise pela difração de raios X tem indicado a presença de uma estrutura da hidroxiapatita, de composição $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$.

A parte orgânica da matriz é formada por fibras colágenas (95%) constituídas de colágeno do tipo I e por uma pequena quantidade de substância fundamental amorfa que contém agregados de proteoglicanas e glicoproteínas. A associação de hidroxiapatita com fibras colágenas é responsável pela dureza e resistência característica do tecido ósseo (JUNQUEIRA e CARNEIRO, 1974).

O cálcio é o principal elemento que forma o osso e o seu baixo teor neste tecido pode estar associado, em alguns casos, à ocorrência do grande número de fraturas de risco e também ao desenvolvimento da doença osteoporose.

Relativamente ao conteúdo de **cálcio** nos ossos, PARR e IYENGAR (1999) afirmam que há um grande número de trabalhos publicados sobre o assunto, onde são encontrados argumentos a favor e também contra alto consumo de cálcio. A principal razão dessa divergência de opiniões está no fato da osteoporose ser uma doença cuja causa pode estar ligada também a presença ou ausência de outros nutrientes e componentes alimentares tais como a vitamina D, proteínas, cafeína, sais, Mg e P juntamente com parâmetros genéticos e fatores de estilo de vida tais como atividade física, tabagismo e consumo excessivo de álcool. Há estudos que indicam que fraturas nos ossos do quadril são mais comuns nos países onde o consumo de cálcio é considerado alto, representando dessa maneira, um efeito negativo na ingestão deste elemento. Por outro lado, há estudos que mostram efeitos positivos da suplementação de cálcio em mulheres no período de pós-menopausa bem como os efeitos benéficos a curto prazo da suplementação de cálcio em crianças.

No caso do **magnésio**, convém salientar que ABBOTT *et al.* (1994) mostraram que a deficiência do Mg no organismo ocorre frequentemente em pessoas com alcoolismo crônico o qual pode contribuir para o desenvolvimento de doenças cardiovasculares e a osteoporose. A deficiência de Mg apresenta efeitos sobre a homeostase mineral e pode contribuir para o aumento de perda óssea, de modo que a

osteoporose é predominante na população de alcoólatras. Estes autores concluíram que indivíduos com alcoolismo crônico, e, portanto, com escassez de Mg no organismo, apresentam uma velocidade reduzida da formação do osso bem como uma mineralização óssea danificada de modo que estas alterações são, provavelmente, responsáveis pelo aumento da incidência da osteoporose na população de alcoólatras.

Baseando-se no trabalho de BEATTIE e AVENELL (1992), serão apresentados, a seguir, as possíveis funções ou efeitos tóxicos de outros elementos tais como Zn, Cd, Cu, B, Si e Pb presentes no osso.

Com relação ao **zinco**, grande proporção deste elemento encontrado no corpo humano está concentrada no tecido ósseo e sua deficiência está associada a alguns tipos de anormalidades do esqueleto. Muitos dos efeitos da deficiência de Zn sobre o metabolismo ósseo podem ser relacionados à deterioração generalizada do ácido nucleico e do metabolismo proteico.

O **cádmio** é um elemento altamente tóxico quando encontrado em grande quantidade no organismo humano. O Cd e o Ca possuem características químicas semelhantes porém, são mutuamente antagônicos e, portanto, os efeitos tóxicos do Cd aumentam quanto mais deficiente for o teor de Ca nos ossos. As deficiências de vitamina D e proteínas em combinação com a falta de Ca agravam a toxicidade de Cd e tal combinação de fatores tem influenciado na etiologia da doença itai-itai, doença desenvolvida pela população de uma área limitada do Japão. Esta doença se caracteriza pela combinação da osteoporose e osteomalacia o que resulta numa extrema fragilidade e fraturas múltiplas dos ossos. Portanto, fatores que afetam as reservas de Ca nos ossos, tais como gravidez e lactação contribuem para o agravamento dos efeitos de Cd.

O efeito de **cobre** nos ossos depende do seu teor. A deficiência de cobre inibe o crescimento do osso e promove mudanças patológicas características da osteoporose. Estudos histológicos e bioquímicos realizados com ossos de animais deficientes de Cu têm indicado que a função dos osteoblastos é inibida enquanto que a atividade dos osteoclastos não é afetada, o qual resulta na inibição da formação do osso. Por outro lado, altas doses de Cu podem promover o desenvolvimento do raquitismo bem como perda generalizada da densidade óssea.

No que concerne ao **boro**, não há evidências de que este elemento possui um papel essencial em ossos de animais, entretanto, há trabalhos que mostram efeitos benéficos do boro presente nas dietas nos ossos de ratos. O interesse na determinação do B nos ossos é devido, provavelmente, à falta de evidências sobre o efeito direto deste elemento nos ossos.

O **silício** é um elemento essencial para a formação normal da matriz óssea e provavelmente também para a mineralização do osso. Os sinais da deficiência de Si incluem baixo crescimento dos ossos, anormalidades do crânio, anormalidades dos ossos da perna e redução da flexibilidade.

Com relação ao **chumbo** convém salientar que a maior parte deste elemento encontrado no corpo humano concentra-se nos ossos. Como o chumbo pode atravessar a placenta, ele pode ser acumulado no esqueleto do feto e depois prosseguir o acúmulo deste elemento até a velhice. Portanto, resultados anormais de Pb nos ossos podem indicar que o indivíduo foi exposto a este elemento.

O **alumínio** é considerado tóxico e em geral ele é proveniente de poluentes ambientais. Atualmente há um grande interesse na determinação deste elemento para estudar os seus efeitos tóxicos em doenças cerebrais como a doença de Alzmeir (PARR e IYENGAR, 1999).

As determinações de elementos tóxicos como Al, Ba, Cd e Pb nos ossos são de interesse na avaliação da exposição integral destes elementos ao longo do tempo.

Sobre o **ferro**, a sua deficiência não causa nenhum efeito no metabolismo do osso, entretanto, a ingestão de altas doses deste elemento tem mostrado uma redução no conteúdo mineral nos ossos. O acúmulo de Fe no ossos tem se verificado principalmente nos pacientes que fazem tratamento de diálise.

Além dos elementos traço acima abordados, outros têm sido considerados importantes para o estudo nos ossos. Os elementos F, K, Mn, Na, P e Sr são considerados essenciais ou possivelmente essenciais. O interesse na análise de **flúor** nos ossos é devido ao fato deste elemento apresentar o papel de aumentar a densidade óssea em pacientes em

estado avançado de osteoporose. O F substitui o íon hidroxiapatita e fica incorporado no osso durante a formação.

Segundo PARR e IYENGAR (1999), para investigações de doenças ósseas, são de particular interesse as determinações de B, Cu, F, K, Mg, Mn, Sr e Zn.

2.2. Remodelação óssea

A remodelação óssea é um processo no qual o osso é continuamente desmanchado por meio de células destruidoras dos ossos denominadas osteoclastos e continuamente reformado pelos osteoblastos que são as células formadoras de novos ossos. Os osteoclastos reabsorvem tanto os componentes minerais quanto os componentes orgânicos do osso, formando pequenas cavidades nas superfícies ósseas interna e externa, as quais são, então, preenchidas com osso novo pela ação dos osteoblastos (MAHAN e ESCOTT-STUMP, 1998).

O osso é submetido continuamente ao processo de remodelagem para manter sua resistência e adaptar-se ao corpo na fase de crescimento. O osso novo é formado continuamente em todos os ossos vivos.

Os dois tipos de osso, cortical e trabecular, estão sujeitos ao processo de remodelagem, embora este processo ocorra em maior extensão no osso trabecular, o qual está localizado em áreas sujeitas a maiores estresses por suporte de peso. A remodelagem do osso cortical ocorre em resposta a fraturas microscópicas que ocorrem com a deterioração gradual das células que formam a matriz orgânica.

2.3. Doenças ósseas

Existem diversos tipos de doenças que afetam o metabolismo normal do tecido ósseo sendo que a mais importante e conhecida é a osteoporose.

Os ossos de indivíduos com osteoporose se tornam menos resistentes, mas a causa não é a deficiência nutricional de cálcio nem de vitamina D. Na osteoporose a

concentração de cálcio na matriz orgânica é normal, mas a massa do tecido ósseo é menor (JUNQUEIRA e CARNEIRO, 1995).

Em um adulto é natural a perda de massa óssea e este processo se estende até a velhice com a composição elementar do osso inalterada, mas a massa e a densidade diminuem. A osteoporose ocorre quando essa perda de densidade torna-se tão aguda que o próprio esqueleto é incapaz de sustentar estresses ordinários, uma condição marcada pela ocorrência de fraturas. Essas fraturas causadas pela fragilidade óssea são a marca registrada da osteoporose, sendo mais freqüente nos ossos do pulso, coluna e quadris.

O risco de uma fratura devida a osteoporose aumenta consideravelmente com a idade do indivíduo. Aos 80 anos, uma em cada três mulheres e um em cada cinco homens tem a possibilidade de fraturar o quadril. No Brasil, há cerca de 100 mil fraturas por ano devido à osteoporose. Embora a osteoporose seja mais freqüente em indivíduos idosos do sexo feminino, ela pode também afetar os homens e ocorrer em qualquer idade a partir da infância. Os fatores de risco para osteoporose incluem idade, raça, sexo, constituição corpórea, história da família, menopausa prematura, limitada ingestão de cálcio ao longo da vida, exercício limitado, consumo de cigarros, consumo de álcool e uso prolongado de hormônio tireóideo exógeno, em excesso. Os brancos e asiáticos sofrem mais fraturas osteoporóticas que os negros e hispânicos, que têm uma maior densidade óssea. Mulheres pequenas ou magras, particularmente de origem não europeia, são mais suscetíveis à osteoporose.

Ainda não existe tratamento seguro e eficiente para substituir o osso que já foi perdido, porém, há maneiras de se evitar o desenvolvimento da doença se ela for diagnosticada com uma certa antecedência, assim as medidas poderão ser tomadas para prevenir uma perda óssea posterior. Uma avaliação clinicamente útil é a determinação da massa óssea, pelo exame da densitometria mineral óssea, também chamada de densitometria óssea, já que a baixa massa óssea é um forte indicio da presença da doença. A densitometria óssea mede a massa óssea baseada na absorção tecidual de fótons produzidos por um radionuclídeo ou por uma sonda de raios-X (MAHAN e ESCOTT-STUMP, 1998).

Com relação às outras doenças ósseas tem-se o raquitismo que é uma doença óssea que se desenvolve em crianças. Nesta doença a matriz óssea não se calcifica normalmente, de modo que as espículas ósseas se deformam, por não suportarem as pressões normais exercidas sobre elas pelo peso corporal e pela ação muscular e como conseqüência os ossos não crescem normalmente.

Nos adultos, a falta de cálcio nos ossos leva a osteomalacia, que se caracteriza pela calcificação deficiente da matriz óssea neoformada e descalcificação parcial da matriz já calcificada, com a conseqüente fragilidade óssea (JUNQUEIRA e CARNEIRO, 1995).

3. ANÁLISE POR ATIVAÇÃO COM NÊUTRONS

O método de ativação com nêutrons consiste na produção de radionuclídeos artificiais a partir de elementos estáveis para sua análise qualitativa e quantitativa. As amostras são irradiadas com um fluxo de nêutrons provenientes de um reator nuclear que interagem com os núcleos dos isótopos dos elementos presentes na amostra formando os nuclídeos radioativos. Estes nuclídeos radioativos decaem segundo a sua meia vida emitindo os chamados raios gama de decaimento, os quais são medidos num detector. A análise qualitativa consiste na identificação do elemento que deu origem a este radioisótopo pelas suas energias dos raios gama emitidos e meia vida. Portanto, trata-se de uma técnica analítica que permite a determinação de vários elementos presentes num determinado tipo de amostra.

A primeira aplicação da medida da radioatividade artificial para as análises ocorreu em meados de 1936 por Hevesy e Levy que determinaram quantidades traço de disprósio por meio da ativação com nêutrons.

Inicialmente, fontes de radionuclídeos foram usadas para produção de nêutrons, mas devido ao seu baixo fluxo, teve uma aplicação limitada na análise por ativação. Entretanto, com a disponibilidade dos chamados geradores de nêutrons relativamente baratos e de reatores nucleares de pesquisa esta técnica progrediu significativamente tornando-se uma das mais importantes ferramentas para determinação de elementos traço de interesse nas diversas áreas da ciência e tecnologia.

3.1. Princípio do método de análise por ativação com nêutrons (AAN)

A análise por ativação com nêutrons se baseia na medida de radioatividade induzida nos elementos da amostra pela irradiação com nêutrons de um reator nuclear. Tal fenômeno é possível por meio de uma reação nuclear, que ocorre com bombardeamento do núcleo alvo com nêutrons. Desta maneira, pela medida dos radioisótopos formados, é

possível realizar uma determinação qualitativa e quantitativa de elementos presentes na amostra. A identificação do radionuclídeo formado é feita pela energia dos raios gama emitidos e pela meia-vida.

A seqüência de eventos que ocorrem numa reação nuclear típica utilizada na análise por ativação com nêutrons inicia quando um nêutron interage com um núcleo alvo por meio de uma colisão inelástica, formando um núcleo composto num estado excitado. A energia de excitação do núcleo composto é devida à energia de ligação do nêutron com o núcleo. O núcleo composto formado quase que instantaneamente adquire uma configuração mais estável por meio da emissão de raios gama prontos característicos. Em muitos casos, esta nova configuração produz um núcleo radioativo que também sofre um relaxamento por emissão de um ou mais raios gama de decaimento, mas a uma velocidade mais lenta, de acordo com o tempo de meia-vida do núcleo radioativo. Esta seqüência de eventos é ilustrada na Figura 1 (IAEA, 1990).

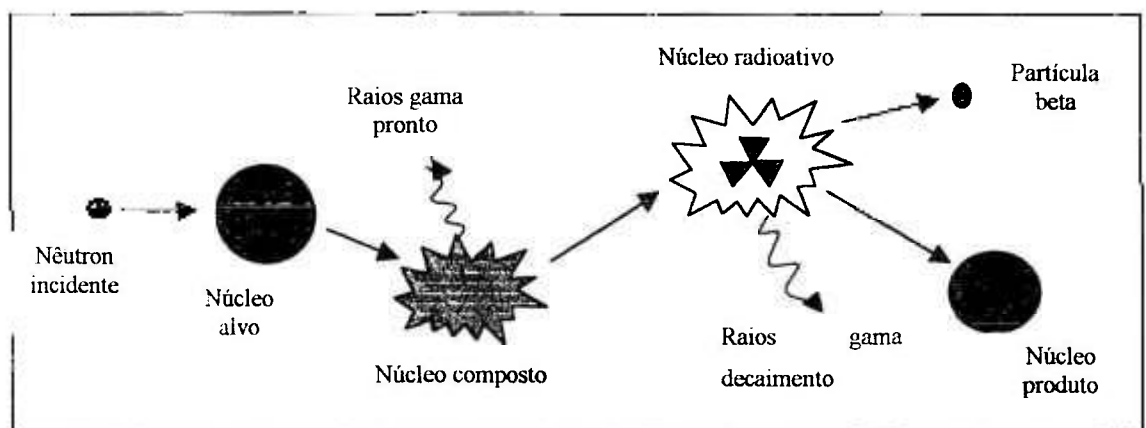
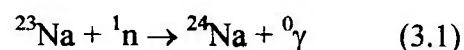
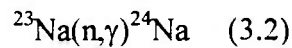


Figura 1. Diagrama ilustrativo da seqüência de eventos de uma reação típica (n,γ).

A seguir, é apresentado um exemplo de uma reação nuclear com um núcleo do isótopo natural ^{23}Na :



A notação usual de uma reação nuclear exemplificando a reação nuclear é a seguinte:



Ou, de uma forma geral:



Onde:

a = isótopo do elemento a;

x = partícula utilizada no bombardeamento do núcleo alvo;

y = partícula emitida após a reação;

b = nuclídeo produzido (geralmente radioativo).

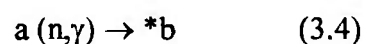
A probabilidade para que ocorra uma reação nuclear é dada pela secção de choque, σ , que é uma área de superfície fictícia do núcleo atômico. Este valor de σ depende do núcleo atômico, da reação considerada, do tipo de partícula ativadora e da sua energia.

Na reação $a(x,y)b$, o radionuclídeo b produzido decai formando um núcleo produto estável.

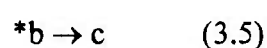
3.2. Equação fundamental da análise por ativação com nêutrons

Os dois fenômenos que ocorrem na análise por ativação com nêutrons, são:

- 1) Formação do radionuclídeo, representado por meio de uma reação nuclear:



- 2) Decaimento do radionuclídeo formado:



O número de radionuclídeos formado N_b é proporcional à secção de choque (σ) para ativação, ao fluxo de nêutrons (ϕ) e ao número de átomos do núcleo alvo (N_a).

Sendo assim, a taxa de formação do radionuclídeo b em função do tempo pode ser expressa da seguinte relação:

$$(d N_b/d_t) = N_a \phi \sigma \quad (3.6)$$

Onde:

N_a = número de átomos do núcleo alvo a;

N_b = número de átomos do radionuclídeo b formado;

ϕ = fluxo de nêutrons em $n \text{ cm}^{-2} \text{ s}^{-1}$;

σ = secção de choque para ativação, em cm^2 .

Mas o radionuclídeo N_b sofre decaimento a uma taxa de $\lambda_b N_b$, portanto a formação total de N_b será:

$$(d N_b/d_t) = N_a \phi \sigma - \lambda_b N_b \quad (3.7)$$

Onde λ_b é a constante de decaimento do radionuclídeo formado.

A relação (3.7) é uma equação de Leibnitz e a solução desta equação diferencial nos fornece a relação:

$$N_b = \{ N_a \phi \sigma [1 - e^{-\lambda_b t_i}] + N_{b0} e^{-\lambda_b t_i} \} / \lambda_b \quad (3.8)$$

Sendo que t_i é o tempo de irradiação, considerando-se que para $t_i = 0$, $N_{b0} = 0$, uma vez que nenhum N_b havia sido formado antes da irradiação, a relação (3.8) pode ser escrita como sendo:

$$N_b = N_a \phi \sigma [1 - e^{-\lambda_b t_i}] / \lambda_b \quad (3.9)$$

Essa equação nos permite calcular o número de átomos radioativos formados (N_b) para um tempo de irradiação qualquer (t_i), desde que se conheça os valores de λ_b , N_a , ϕ e σ .

A atividade D do radionuclídeo *b em termos de desintegrações por segundo é expressa por:

$$D = \lambda_b N_b \quad (3.10)$$

D é a atividade de *b em termos de desintegrações por segundo (dps) no final da irradiação por um tempo t_i . Substituindo-se a equação (3.10) em (3.9), tem-se:

$$D = N_a \phi \sigma [1 - e^{-\lambda_b t_i}] \quad (3.11)$$

Sendo A , a atividade medida experimentalmente, em taxas de contagens, tem-se:

$$A = z D = z \lambda N \quad (3.12)$$

Onde z é o coeficiente de detecção, que depende do arranjo experimental da medida e da eficiência do detector.

Sendo assim, pode-se considerar a expressão geral para o cálculo da atividade em termos da taxa de contagem produzida após um certo tempo de irradiação (t_i) como:

$$A = z N \phi \sigma [1 - e^{-\lambda t_i}] \quad (3.13)$$

Onde $-\lambda t_i = -0,693 t_i / t_{1/2}$ e $t_{1/2}$ = tempo de meia vida do radioisótopo formado. Portanto:

$$A = z N \phi \sigma [1 - e^{-0,693 t_i / t_{1/2}}] \quad (3.14)$$

A relação (3.14) nos fornece a atividade em taxa de contagens em função do número de átomos. Para calcular a massa do elemento presente na amostra, substituindo N em função do número de Avogadro, tem-se:

$$N = (N_{AV} m f) / M \quad (3.15)$$

Onde:

N_{AV} = número de Avogadro;

m = massa do elemento presente na amostra;

f = abundância isotópica do núcleo alvo e,

M = massa atômica do elemento.

Substituindo-se a equação (3.15) em (3.14), obtém-se a fórmula para o cálculo da chamada atividade absoluta de massa de um elemento após o tempo t_i de irradiação:

$$A = z \phi \sigma N_{AV} m f [1 - e^{-0,693 t_i / t_{1/2}}] / M \quad (3.16)$$

3.3. Método comparativo de análise por ativação

No método comparativo de análise por ativação, amostra e padrão de um elemento a ser analisado são irradiados juntos sob um mesmo fluxo de nêutrons e se as medidas das atividades gama são realizadas na mesma geometria.

Considerando estas condições, pode-se escrever a equação (3.16) para um mesmo elemento da amostra e padrão:

$$A_a^0 = z \phi \sigma N_{AV} m_a f [1 - e^{-0,693 t_i / t_{1/2}}] / M \quad (3.17)$$

$$A_p^0 = z \phi \sigma N_{AV} m_p f [1 - e^{-0,693 t_i / t_{1/2}}] / M \quad (3.18)$$

Onde os índices a e p se referem à amostra e padrão, respectivamente. A_a^0 e A_p^0 são as taxas de contagens para tempo de decaimento $t_d = 0$.

Dividindo-se a equação (3.17) pela equação (3.18), temos:

$$A_a^o/A_p^o = m_a / m_p \quad (3.19)$$

Onde os m são as massas do elemento.

Como na prática, amostra e padrão são medidos em diferentes tempos de decaimento e sendo:

$$A = A_o e^{-\lambda t} \quad (3.20)$$

Tem-se a relação (3.20) pela lei do decaimento (FRIEDLANDER *et al.*, 1981) e o t é o tempo de decaimento. Substituindo a relação (3.20) em (3.19) tem-se a relação seguinte:

$$m_a = m_p \cdot A_a e^{\lambda(t_a - t_p)} / A_p \quad (3.21)$$

Onde $\lambda = 0,693 / t_{1/2}$; e t_a e t_p são tempos de decaimento da amostra e padrão, respectivamente; A_a é a taxa de contagens do radioisótopo da amostra para tempo de decaimento t_a e A_p é a taxa de contagens do mesmo radioisótopo no padrão para tempo de decaimento t_p .

Chamando de C_a a concentração do elemento na amostra, a relação 3.21 pode ser dada por:

$$C_a = A_a m_p e^{0,693(t_a - t_p)/t_{1/2}} / A_p M_a \quad (3.22)$$

Onde:

$C_a = m_a / M_a$ (3.23);

M_a é a massa total da amostra;

m_p é massa do elemento no padrão

A equação (3.22) foi utilizada no presente trabalho para o cálculo das concentrações dos elementos.

3.4. Vantagens e desvantagens do método

A análise por ativação com nêutrons é uma técnica analítica que apresenta muitas vantagens quando comparada a outros métodos analíticos existentes. Possui uma alta especificidade, que é a característica de poder correlacionar diretamente e de forma específica o sinal obtido com o elemento procurado e é também uma técnica com uma boa seletividade devido à possibilidade de se medir o elemento em questão na presença de outros que emitem sinais da mesma natureza.

Além disso, a análise por ativação é considerada como um dos métodos analíticos mais adequados para a análise de elementos traço. Uma das vantagens deste método é a sua capacidade de determinar vários elementos em baixas concentrações da ordem de ppb ($\mu\text{g kg}^{-1}$). Quanto ao tempo necessário para análise, ele depende do elemento. Pode-se ter o resultado em algumas horas para os elementos cujos radioisótopos apresentam meia-vidas curtas bem como após 20 dias para os elementos de meia-vidas longas. O método também apresenta alta exatidão e precisão podendo ainda utilizar uma quantidade pequena de amostra, em torno de 100 a 150 mg.

Entre as desvantagens desta técnica tem-se a impossibilidade de identificar a forma química do elemento, de determinar elementos como oxigênio, nitrogênio, hidrogênio e outros elementos que não possuem características favoráveis para a ativação, pode ocorrer o problema de interferências devido as reações nucleares de interferência e interferências espectrais devida a superposição de picos ou pelo efeito Compton.

A análise por ativação com nêutrons se diferencia do grande número de métodos analíticos usuais, em virtude de basear-se em reações que ocorrem com os núcleos atômicos e não com os elétrons orbitais. Outras desvantagens são: a não identificação da forma química do elemento, exposição do analista à radiação e a necessidade da utilização de um reator nuclear de pesquisa.

4. PARTE EXPERIMENTAL

Neste capítulo será apresentada a parte experimental do trabalho que consistiu de etapas, a saber: preparação de padrões de elementos, coleta de amostras de ossos, seu tratamento para as análises e o procedimento experimental de análise por ativação com nêutrons.

4.1. Preparação de padrões dos elementos.

Como neste trabalho foi utilizado o método comparativo de análise por ativação com nêutrons, foi necessária a preparação de padrões dos elementos a serem irradiados juntamente com as amostras e posterior uso na quantificação dos elementos.

4.1.1. Preparação das soluções padrão estoques de elementos.

As soluções padrão estoques dos elementos Ba, Br, Cl, Na e Sr foram preparadas a partir da dissolução destes elementos na forma de sais, todos de grau p.a. da Merck, com água destilada em aparelho de quartzo. As dissoluções dos sais foram feitas em béqueres e a diluição em balões volumétricos de 25 mL. Os balões volumétricos e os pipetadores automáticos utilizados neste trabalho foram previamente verificados quanto a sua precisão e exatidão de seu volume. Os sais utilizados e a concentração de cada elemento nas soluções padrão preparadas são apresentados na TAB. 4.1. No caso específico do NaCl, este sal foi previamente calcinado a 800°C por duas horas, para eliminação de carbonatos eventualmente nele presentes.

Para a preparação da solução padrão estoque de manganês, o Mn na forma de pó metálico de grau p.a. foi dissolvido com ácido acético p.a. da Merck e gotas de peróxido de hidrogênio 30% também da Merck, a quente. A concentração do Mn na solução padrão preparada foi de 1,81 mg mL⁻¹. Todas as soluções padrão estoques foram preparadas numa faixa de concentrações superiores a 1,0 mg mL⁻¹, para evitar perda dos elementos por adsorção na superfície dos recipientes.

TABELA 4.1. Soluções estoques de Ba, Br, Cl, Na e Sr preparadas a partir da dissolução de sais.

Elemento	Sal do elemento utilizado	Concentração do elemento na solução (mg mL ⁻¹)
Ba	Ba(NO ₃) ₂	5,075
Br	KBr	3,021
Cl	NaCl	20,044
Na	NaCl	12,998
Sr	Sr(NO ₃) ₂	9,998

As soluções padrão dos elementos Ca, Cr, Fe, K, Mg, Rb, Sb, Sc e Zn foram adquiridas da Spex Certi Prep. Na TAB. 4.2 apresentam-se a matriz do elemento na solução em que se encontram estes elementos nestas soluções padrão bem como suas respectivas concentrações.

TABELA 4.2. Soluções padrão adquiridas da Spex Certi Prep.

Elemento	Matriz	Lote	Concentração do elemento (µg mL ⁻¹)
Ca	HNO ₃ /H ₂ O	L4-183C4	10034
Cr (III)	HNO ₃ /H ₂ O	5-32CR	998
Fe	HNO ₃ /H ₂ O	14-92FE	10034
K	HNO ₃ /H ₂ O	L4-206K	10024
Mg	HNO ₃ /H ₂ O	J4-153MG	10039
Rb	HNO ₃ /H ₂ O	5-44RB	997
Sb	ácido tartárico/HNO ₃ /H ₂ O	5-108SB	1002
Sc	HNO ₃ /H ₂ O	4-282SC	1001
Zn	HNO ₃ /H ₂ O	4-247ZN	1001

A partir dessas soluções padrão foram preparadas soluções diluídas (exceto para o cálcio) multielementares utilizando água destilada e estas soluções foram colocadas em frascos de polietileno e guardadas na geladeira. Para o preparo destas soluções padrão multielementares, os elementos foram escolhidos de tal maneira que não ocorresse a interferência dos picos de energias de raios gama próximos, quando na medida dos radioisótopos formados na ativação.

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, sendo que neste caso foi utilizado o sal sem a sua dissolução, isto é, pesando-o diretamente no invólucro de polietileno a fim de se obter aproximadamente 15 mg de P.

4.1.2. Preparação dos padrões sintéticos dos elementos.

Os padrões sintéticos dos elementos para ativação no reator foram preparados pipetando-se alíquotas de 50 ou 100 μL das soluções mistas ou simples sobre tiras de papel de filtro Whatman nº 40 cortadas com uma tesoura de aço inoxidável, em dimensões aproximadas de 2,0 x 5,5 cm. Estas tiras de papel com as alíquotas de soluções foram colocadas num dessecador para sua secagem à temperatura ambiente.

Após a secagem, estas tiras foram dobradas com o auxílio de pinças e colocadas em invólucros de polietileno. Esses invólucros foram confeccionados usando uma seladora elétrica e folhas de polietileno transparentes e incolores, previamente lavadas com uma solução de ácido nítrico p.a. Merck diluído e água destilada. Os invólucros com os padrões foram selados utilizando um ferro elétrico para solda e com auxílio de uma folha de celofane.

Os padrões sintéticos simples e multielementares foram codificados e na TAB. 4.3 são apresentadas as massas de cada um dos elementos.

TABELA 4.3. Código e massas dos elementos dos padrões sintéticos.

Códigos dos padrões	Elementos presentes no padrão	Massa do elemento (μg)
CFRZ	Ca	1003,4
	Fe	501,70
	Rb	4,985
	Zn	50,05
CRSB	Cr	3,992
	Sb	1,002
SCK	Sc	0,0600
	K	1002,4
BR	Br	6,043
ES	Sr	499,852
BA	Ba	253,765
NC1	Na	649,891
	Cl	1002,21
NC2	Na	64,989
MKC	Ca	1003,4
	Mg	1003,9
	K	1002,4
MN	Mn	2,117
P	P	15000

Para irradiação curta foram utilizados os padrões ES, BA, NC1, MKC, MN e P e para irradiação longa foram utilizados os padrões CFRZ, CRSB, SCK, BR, ES, BA e NC2.

4.2. Coleta das amostras de ossos de animais (bovinos e suínos).

Foram adquiridas 6 amostras de costela bovina e 6 de costela suína de animais adultos de um açougue da capital de São Paulo. Essas amostras de costelas bovina e suína foram codificadas como Bn e Sn, com o n variando de 1 a 6. As análises de tecido ósseo de animais foram realizadas para definição das condições experimentais adequadas para tratamento e análise deste tipo de matriz.

4.3. Coleta das amostras de ossos humanos

Foram coletadas 18 amostras de ossos humanos no Serviço de Verificação de Óbitos da Capital (SVOC-USP), SP, em colaboração com os pesquisadores da Faculdade de Medicina da USP (FMUSP) e técnicos de autópsia. A parte do esqueleto escolhida para coleta foi a costela pelo fato desse osso estar localizado numa região do corpo humano de fácil acesso e também pelo fato da costela ser um osso menor, facilitando seu manuseio e tratamento. Devido ao uso de ossos humanos este projeto de pesquisa foi submetido e aprovado pelos comitês de Ética em Pesquisa da FMUSP e do Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, IPEN-CNEN/SP, conforme requerido na Resolução 196 de outubro de 1996 do Conselho Nacional da Saúde.

Após a coleta, as amostras foram envoltas com filme plástico e posteriormente colocadas em invólucros plásticos e devidamente identificadas. Estas amostras foram colocadas em uma caixa de isopor com gelo para seu transporte para o laboratório.

No Laboratório de Análise por Ativação Neutrônica do IPEN-CNEN/SP, estas amostras receberam os códigos do laboratório, registradas e guardadas em um freezer, a uma temperatura média de $-19\text{ }^{\circ}\text{C}$, até o início de seu tratamento. A TAB. 4.4 apresenta as características dos doadores de ossos humanos, cujas informações foram obtidas diretamente da secretaria do SVOC-USP.

TABELA 4.4. Características dos doadores de tecido ósseo humano. Amostras coletadas durante o período de 2000 a 2001.

Código SVOC-USP	Código laboratório	Iniciais do doador	Doença principal	Causa do óbito	Sexo	Cor	Idade (anos)
VO* 2000/5289	H1	OWV	Aterosclerose complicada	Aneurisma roto de artéria aorta	M	Branca	65
VO 2000/5300	H2	RCL	Tromboembolismo pulmonar	Edema agudo de pulmão	F	Branca	56
HC** 2001/801	H3	AJ	Broncopneumonia	Septicemia	M	Negra	60
VO 2001/7712	H4	AIC	Tromboembolismo pulmonar	Infarto pulmonar	M	Parda	67
VO 2001/7700	H5	DSS	Alcoolismo crônico	Pneumonia lobar	M	Branca	43
VO 2001/8047	H6	JST	Indefinido	Cardiopatia isquêmica	M	Branca	55
VO 2001/8084	H7	IR	Coronarioesclerose	Infarto cicatrizado do miocárdio	M	Branca	52

*(VO) código do Serviço de Verificação de Óbitos ** (HC) código do Hospital das Clínicas de SP;

TABELA 4.4. Continuação.

Código SVOC-USP	Código laboratório	Nome do doador	Doença principal	Causa do óbito	Sexo	Cor	Idade (anos)
VO 2001/8076	H8	JCSF	Alcoolismo (dados de história)	Pneumonia panlobular	M	Parda	67
HC 2001/838	H9	HAD	Broncopneumonia bilateral	Septicemia	M	Branca	66
VO 2001/8086	H10	PRS	Alcoolismo (dados de história)	Pneumonia panlobular	M	Parda	48
VO 2001/8090	H11	ACS	Hipertensão arterial sistêmica	Cardiopatia hipertensiva	M	Negra	42
VO 2001/8079	H12	JFS	Indefinido	Pneumonia lobar	M	Parda	68
VO 2001/8091	H13	MJA	Cardiopatia hipertensiva	Edema agudo dos pulmões	M	Branca	30
HC 2001/870	H14	ZMSM	Broncopneumonia bilateral	Choque séptico	F	Branca	41

TABELA 4.4. Continuação.

Código SVOC-USP	Código laboratório	Nome do doador	Doença principal	Causa do óbito	Sexo	Cor	Idade (anos)
VO 2001/8312	H15	CAG	Diabetes mellitus (dados de história)	Indefinido	M	Branca	38
VO 2001/8326	H16	PFS	Não tem	Cardiomiopatia crônica descompensada	M	Branca	69
VO 2001/8315	H17	MEP	Coronarioesclerose grave	Cardiomiopatia isquêmica descompensada	F	Branca	80
VO 2001/8325	H18	ET	Hemorragia meníngea difusa	Acentuado edema cerebral	M	Amarela	41

4.4. Tratamento das amostras de ossos.

Durante o tratamento das amostras de ossos, foram tomados uma série de cuidados para evitar a contaminação das amostras e, no caso de ossos humanos, para evitar a contaminação do analista por doenças como a hepatite B e AIDS. Luvas cirúrgicas sem talco e máscaras foram utilizadas durante o manuseio destas amostras.

Inicialmente, removeu-se o músculo externo (tecido perióstio), do tecido ósseo total com curetas de uso odontológico previamente limpas com álcool etílico p.a e este músculo foi descartado. O tecido ósseo total (tecido cortical + tecido trabecular) foi cortado com um disco diamantado acoplado a um motor de baixa rotação de uso odontológico da marca Driller Maxitorque e foram obtidos duas porções da parte central de cada amostra. A primeira porção foi utilizada para análise de tecidos cortical e trabecular separadamente após a liofilização e a segunda porção foi utilizada para análise do tecido ósseo total após a calcinação. A separação do tecido cortical do trabecular foi efetuada com o auxílio de curetas. Na FIG. 4.1, o tecido cortical é a parte externa do osso, que se apresenta numa forma mais compacta, ao contrário do tecido trabecular, que é a parte interna porosa.

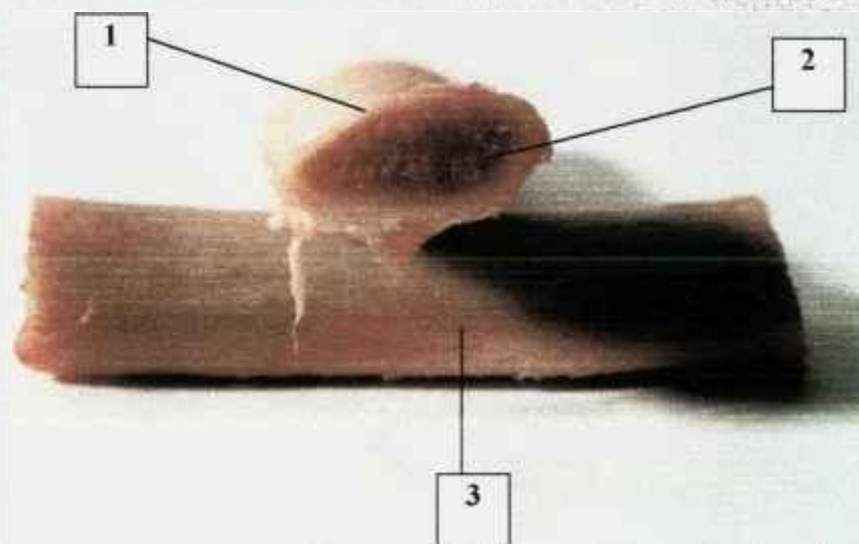


FIGURA 4.1. Foto de tecido ósseo.

1-Tecido cortical; 2-Tecido trabecular; 3-Parte central da costela utilizada para as análises.

O osso cortical foi reduzido na forma de pequenas lascas para se obter este tecido de forma mais homogênea bem como para possibilitar a pesagem de uma pequena alíquota desse material. No caso dos suínos, o osso cortical foi quebrado manualmente e no de bovinos e humanos, foi utilizado um disco diamantado acoplado ao motor de baixa rotação. Na FIG. 4.2. é apresentada a foto da costela bovina e o tecido cortical e trabecular separadamente.

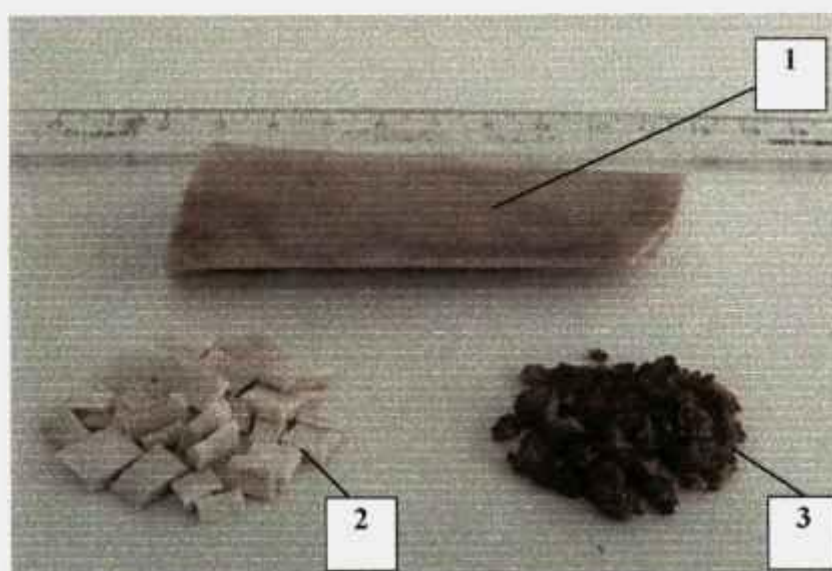


FIGURA 4.2. Foto de tecido ósseo bovino e seus subcompartimentos.

1-Costela bovina; 2-Tecido cortical; 3-Tecido trabecular

Os tecidos ósseos total e cortical foram lavados novamente com água destilada ou água tratada no Sistema de Purificação de Água da marca Millipore e colocados para uma secagem prévia à temperatura ambiente em uma placa de Pétri. Dois processos de tratamento das amostras foram utilizados, a saber: liofilização e calcinação.

No Apêndice 1 deste trabalho está apresentado o protocolo e materiais utilizados para tratamento das amostras de osso.

4.4.1. Secagem das amostras de tecido ósseo por liofilização

No processo de liofilização, foram feitas as secagens do tecido trabecular e das lascas do tecido cortical colocados em copos plásticos e usando o liofilizador de marca

EDWARDS, modelo Micro Modulyo 10-F105-01-880, a uma pressão de 6×10^{-2} mbar por um período de cerca de 8 horas.

As percentagens de perda de peso obtidas na secagem das amostras de tecido ósseo bovino, suíno e de humanos por liofilização estão apresentadas nas TAB. 4.5, 4.6 e 4.7.

TABELA 4.5. Percentagens de perda de peso obtidas na liofilização de tecidos trabecular e cortical de costelas bovinas.

Código da amostra	% Perda de peso de tec. trabecular	% Perda de peso de tec. cortical
B1	38,18	14,17
B2	19,93	10,98
B3	38,14	12,36
B4	56,03	14,21
B5	18,10	24,78
B6	19,71	14,86
Média	31,7	15,2

TABELA 4.6. Percentagens de perda de peso obtidas na liofilização de tecidos trabecular e cortical de costela suína.

Código da amostra	% Perda de peso de tec. trabecular	%Perda de peso de tec. cortical
S1	38,94	17,26
S2	41,80	23,18
S3	22,43	23,31
S4	14,36	20,04
S5	38,09	21,89
S6	49,91	20,32
Média	34,3	21,0

TABELA 4.7. Percentagens de perda de peso obtidas na liofilização de tecidos trabecular e cortical de costelas de humanos.

Código da amostra	% Perda de peso de tec.trabecular	%Perda de peso de tec. cortical
H1	41,38	21,60
H2	19,30	12,69
H3	46,77	14,81
H4	49,65	17,62
H5	58,49	14,79
H6	47,34	16,31
H7	52,31	13,47
H8	59,43	12,50
H9	46,81	11,53
H10	65,86	13,06
H11	41,49	12,57
H12	74,11	17,98
H13	58,43	14,08
H14	59,20	15,01
H15	42,15	11,54
H16	58,37	15,44
H17	57,04	21,53
H18	37,23	19,55
Média	50,9	15,3

4.4.2. Tratamento de amostras por calcinação.

O processo de calcinação foi usado para o tecido ósseo total (cortical + trabecular). A amostra colocada num cadinho de platina foi calcinada usando a mufla de marca THERMOLINE, modelo F1930-1 a uma temperatura inicial de 100°C aumentando gradualmente até atingir a temperatura de 800 °C, temperatura na qual a amostra permaneceu por um período de aproximadamente 8 horas. Após este tempo, o cadinho contendo a amostra permaneceu na mufla até atingir uma temperatura mais baixa que facilitasse o manuseio do cadinho com a amostra. A amostra calcinada foi triturada manualmente usando um almofariz de ágata para a obtenção da amostra na forma de pó. A limpeza prévia do almofariz foi feita utilizando ácido nítrico diluído, onde o almofariz permaneceu mergulhado por cerca de 3 horas e posteriormente ele foi lavado com água destilada.

Na TAB. 4.8 são apresentadas as percentagens de perda de peso obtidas na secagem por calcinação das costelas bovinas e suínas e na Tabela 4.9 as perdas de peso obtidas na secagem das costelas de humanos também por calcinação.

TABELA 4.8. Percentagens de perda de peso na calcinação de tecido ósseo total de costelas bovinas e suínas.

Osso Bovino		Osso Suíno	
Código da amostra	Perda de peso, %	Código da amostra	Perda de peso, %
B1	52,09	S1	71,70
B2	54,27	S2	75,38
B3	57,22	S3	70,73
B4	49,22	S4	68,06
B5	53,13	S5	58,59
B6	57,81	S6	66,17
Média	54,0	Média	68,4

TABELA 4.9. Percentagens de perda de peso na calcinação de tecido ósseo total de costelas humanas.

Código da amostra	Perda de peso, %	Código da amostra	Perda de peso, %
H1	81,31	H10	75,09
H2	70,71	H11	63,27
H3	68,58	H12	74,21
H4	75,29	H13	69,93
H5	70,15	H14	66,82
H6	72,27	H15	73,18
H7	76,10	H16	74,86
H8	68,16	H17	78,99
H9	67,41	H18	75,58
Média = 72,3			

Os dados obtidos indicaram uma ampla variabilidade nas percentagens de perda de peso obtidas para as diferentes amostras principalmente no caso da liofilização dos tecidos cortical e trabecular devido em parte à diferença na quantidade de água absorvida pela amostra durante o tratamento. Na liofilização do tecido cortical de humanos esta percentagem variou de 11,5 a 21,5 % e no trabecular variou de 19,3 a 74,1 %. Na calcinação do conjunto tecido cortical + trabecular, a percentagem de perda média encontrada foi de 72,3 %.

4.5. Análise dos materiais biológicos de referência certificados.

4.5.1. Materiais de referência analisados.

Para avaliar a exatidão e a precisão dos resultados foram analisados os materiais de referência certificados NIST 1400 Bone Ash, NIST 1486 Bone Meal, NIST 1577b Bovine Liver e NIST 1547 Peach Leaves provenientes do National Institute of

Standards & Technology, USA, e IAEA 336 Lichen da International Atomic Energy Agency, Austria.

Para avaliar a exatidão de alguns elementos que não tem valores certificados nos materiais Bone Ash e Bone Meal, foram analisados tipos de matrizes diferentes das de ossos. No caso foram analisados o Bovine Liver, Peach Leaves e Lichen.

4.5.2. Determinações das percentagens de perda de peso na secagem dos materiais de referência.

As determinações das percentagens de perda de peso na secagem dos materiais de referência foram realizadas para utilizar estes dados nos cálculos dos teores dos elementos na base seca do material.

Para estas determinações, pesaram-se cerca de 200 mg de cada material em um pesa filtro previamente tarado e a secagem foi realizada numa estufa de esterilização universal da marca FABBE-PRIMAR, modelo 219, a uma temperatura de 80°C. A primeira pesagem foi realizada após 16 horas de secagem e posteriormente foram efetuadas as secagens até obter massa constante. Tendo as massas do material antes e após a secagem, foi calculada a percentagem de perda do material. Na secagem foram obtidos os seguintes valores para as porcentagens de perda média de peso: 0,40 % para Bone Ash; 1,94 % para Bone Meal; 8,39 % para o Bovine Liver; 9,53 % para o Lichen; e 7,86 % para o Peach Leaves. Estes valores das porcentagens de perda de peso foram utilizados nos cálculos das concentrações dos elementos na base seca do material.

4.6. Procedimento para análise por ativação dos materiais.

Pesou-se uma massa de cerca de 100 a 150 mg de cada uma das amostras de ossos e de materiais de referência em invólucros de polietileno utilizando-se uma balança analítica da marca METTLER, modelo tipo H16 com uma precisão de 0,00005 g, calibrada por um laboratório pertencente a Rede Brasileira de Calibração. Estes invólucros de polietileno com as amostras foram selados usando ferro elétrico para solda.

Estes materiais pesados em invólucros de polietileno foram irradiados juntamente com os padrões sintéticos dos elementos em dispositivos apropriados, chamados de “coelhos”, no reator nuclear de pesquisa IEA-R1 do IPEN. Foram realizadas duas séries de irradiações: curtas e longas.

4.6.1. Irradiação curta.

Os padrões e as amostras foram colocados juntos num invólucro de polietileno que por sua vez foi acondicionado em um “coelho” de polietileno, utilizando como calço, espuma de nylon. O tempo de irradiação utilizado foi de 4 minutos sob fluxo de nêutrons térmicos de $4,5 \times 10^{11} \text{ n cm}^{-2} \text{ s}^{-1}$ para a determinação de Ba, Ca, Cl, K, Mg, Mn, Na, P e Sr. Foram colocadas duas amostras e seis padrões em cada dispositivo de polietileno. A FIG. 4.3 mostra os dispositivos “coelhos” utilizados na irradiação.

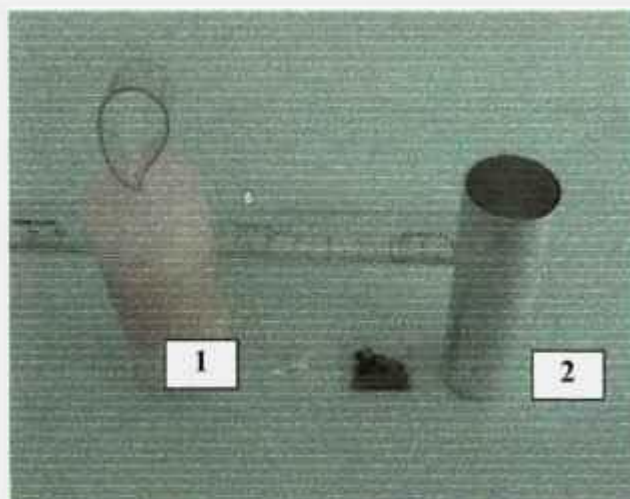


FIGURA 4.3. Foto de dispositivos utilizados na irradiação no reator.

(1) “coelho” de polietileno; (2) “coelho” de alumínio.

Para as medidas das atividades gama, as amostras e padrões foram fixadas em pranchetas (panelinhas) de aço inoxidável e as medidas foram realizadas utilizando-se um detector de Ge hiperpuro modelo 20190-P conectado a uma placa ACE8K, ambos da EG & G Ortec, a um microcomputador e eletrônica associada. A resolução (FWHM) do sistema utilizado foi de 0,96 keV para o fotopico de 121,97 keV do ^{57}Co e de 1,82 keV para o fotopico de 1332,0 keV do ^{60}Co . Diariamente foi realizado o teste de verificação do

sistema de contagem para avaliar o seu funcionamento com relação a reprodutibilidade nas medidas das taxas de contagens, resolução e energia dos raios gama.

Foram realizadas três séries de medidas para as amostras e duas para os padrões para diferentes tempos de decaimento, sendo que na primeira série, cada amostra e padrão foram medidos por 200 segundos, onde o início e o fim das contagens foram registradas para correção do tempo de decaimento durante a medida. Na segunda série as amostras e os padrões foram medidos por um período de 600 e 300 segundos, respectivamente, e na última série foram medidas somente as amostras por um período de 1.800 segundos para determinação de Na e K. A segunda e a terceira medida foram realizadas na mesma geometria.

Para aquisição dos dados foi utilizado o programa MAESTRO II da EG & G Ortec e os dados foram gravados em disquetes. Para a análise destes espectros foi utilizado o programa VISPECT2 (PICCOT, 1989) o qual nos fornece os valores de energias dos raios gama dos picos e as taxas de contagens. A identificação dos radioisótopos foi feita pelas energias dos raios gama, meias vidas e consultando os dados nucleares dos radioisótopos (IAEA, 1990). Na TAB. 4.10 são apresentadas as características nucleares dos radioisótopos utilizados no presente trabalho.

As medidas da atividade beta (β^-) de 1,71 MeV do ^{32}P de $t_{1/2} = 14,28$ dias das amostras e do padrão de P foram feitas em um contador Geiger Muller acoplado a um analisador monocal, uma fonte de alta tensão, amplificador e um pré-amplificador. Estas medidas foram feitas após um período de decaimento de aproximadamente 14 dias.

Como as medidas para análise do fósforo foram realizadas num contador Geiger Muller que fornece a atividade beta total, foram feitas as medidas das taxas de contagens de uma amostra de Bone Meal para diferentes tempos de decaimento para a determinação da meia vida e verificar se as taxas de contagens obtidas são devidas apenas do ^{32}P . A determinação desta meia vida foi feita elaborando o gráfico do logaritmo das taxas de contagens em função do tempo de decaimento. Sendo A, a taxa de contagem para tempo de decaimento $t = 0$, para a taxa de contagem $A/2$ foi obtido o valor da meia vida de 14 dias, bastante próximo do valor de meia vida tabelado do ^{32}P que é de 14,28 dias.

As concentrações dos elementos foram calculadas pelo método comparativo de análise por ativação utilizando um programa de computação que utiliza a relação (3.22).

TABELA 4.10. Características nucleares dos radioisótopos utilizados neste trabalho. (IAEA, 1990).

Elemento	Radioisótopo Medido	Meia-Vida	Energia dos Raios Gama (keV)
Ba	^{139}Ba	84,63 minutos	165,9
	^{131}Ba	11,8 dias	496,3
Br	^{82}Br	35,3 horas	776,5
Ca	^{49}Ca	8,72 minutos	3084,5
	^{47}Ca	4,54 dias	1297,1
	^{47}Sc ($^{47}\text{Ca} \rightarrow ^{47}\text{Sc}$)	3,5 dias	159,4
Cl	^{38}Cl	37,24 minutos	1642,7
Cr	^{51}Cr	27,7 dias	320,1
Fe	^{59}Fe	44,5 dias	1099,2/1291,6
K	^{42}K	12,36 horas	1524,6
Mg	^{27}Mg	9,46 minutos	843,8/1014,4
Mn	^{56}Mn	2,58 horas	846,8/1810,7
Na	^{24}Na	14,96 horas	1368,6
P	^{32}P	14,28 dias	1700 (partículas beta)
Rb	^{86}Rb	18,7 dias	1076,6
Sb	^{124}Sb	60,2 dias	602,7/1691,0
	^{122}Sb	2,70 dias	564,2
Sc	^{46}Sc	83,81 dias	889,3
Sr	$^{87\text{m}}\text{Sr}$	2,81 horas	388,4
	^{85}Sr	64,84 dias	514,0
Zn	^{65}Zn	243,6 dias	1115,6

4.6.2. Irradiação longa

Os invólucros de polietileno contendo os padrões e as amostras foram envolvidos com folhas de alumínio e colocados em dispositivo “coelho” de alumínio para irradiação. Em cada irradiação, foram colocados duas amostras e sete padrões no “coelho”. Na FIG. 4.3, tem-se uma foto do dispositivo (coelho) de alumínio utilizado na irradiação longa.

O tempo de irradiação utilizado foi de 16 horas sob fluxo de nêutrons térmicos de $2,1 \times 10^{12} \text{ n cm}^{-2} \text{ s}^{-1}$ para análise de Ba, Br, Ca, Cr, Fe, K, Na, Rb, Sb, Sc, Sr e Zn.

Para a medida de atividade, as amostras e os padrões foram fixados em pranchetas (panelinhas) de aço inoxidável. Depois de adequados tempos de decaimento as medidas das atividades gama induzidas aos elementos da amostra e padrões foram feitas no detector de Ge hiperpuro modelo GX 2020 da Canberra, acoplado a um Processador Integrado de Sinais Modelo 1510 e o analisador multicanal System 100 também da Canberra e a um microcomputador. A resolução do sistema (FWHM) utilizado foi de 1,02 keV para o fotopico de 121,97 keV do ^{57}Co e de 1,85 keV para o fotopico de 1332,0 keV do ^{60}Co . Para a aquisição dos dados foi utilizado o programa S100 da Canberra e para a análise dos espectros foi utilizado o programa VERSAO2, uma nova versão do programa VISPECT2 (PICCOT, 1989) em linguagem TURBO BASIC.

Foram realizadas três séries de medidas para amostras e padrões. Cada padrão foi medido por um período de 5.400 segundos e para cada amostra, utilizou-se um tempo de medida de 20.000 segundos para a primeira medida e 40.000 segundos para a segunda e terceira medidas.

As concentrações dos elementos foram calculadas pelo método comparativo de análise por ativação utilizando-se o programa de computação ESP2000 desenvolvido no Laboratório.

Os materiais biológicos de referência foram analisados utilizando o mesmo procedimento adotado na análise de ossos.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

No presente Capítulo serão apresentados os resultados obtidos nas análises dos materiais certificados de referência, das amostras de ossos de animais (bovinos e suínos) e de humanos pelo método instrumental de análise por ativação com nêutrons.

5.1. Análises dos materiais biológicos de referência certificados

Na TAB. 5.1 são apresentados os resultados obtidos na análise do material de referência NIST 1486 Bone Meal juntamente com os valores certificados. Foram determinadas as concentrações dos elementos Ba, Ca, Cl, Fe, Mg, Mn Na, P, Sr e Zn e os resultados apresentam, em geral, uma boa precisão com desvios padrão relativos variando de 3,7 a 13,4 %. Na determinação do Fe, as baixas taxas de contagens e os erros das medidas obtidas para os picos de 1099 e 1292 keV do ^{59}Fe contribuíram para a baixa precisão dos resultados encontrados para este elemento. Também os resultados da TAB. 5.1 indicam uma boa concordância com os valores certificados com percentagens de erros relativos inferiores a 12,7 %.

TABELA 5.1. Concentrações de elementos no material de referência NIST 1486 Bone Meal em $\mu\text{g g}^{-1}$ a menos que esteja indicado.

Elemento	$\bar{x} \pm s$	n	s_r (%)	e_r (%)	(NIST, 1992)
Ba	247 ± 15	6	5,9		
Ca (%)	$25,6 \pm 1,5$	8	5,9	3,7	$26,58 \pm 0,24$
Cl	197 ± 8	5	4,0		
Fe	$86,4 \pm 11,4$	4	13,4	12,7	99 ± 8
Mg (%)	$0,45 \pm 0,02$	4	3,7	3,4	$0,466 \pm 0,017$
Mn ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	1028 ± 108	5	10,5		1000 (N)*
Na	5148 ± 209	7	4,1		5000 (N)
P (%)	$13,1 \pm 1,3$	4	9,8	6,5	$12,30 \pm 0,19$
Sr	270 ± 11	7	4,2	2,3	264 ± 7
Zn	134 ± 15	4	10,8	8,8	147 ± 16

*(N) – indica valor informativo

\bar{x} = média aritmética; s = desvio padrão individual; n = número de determinações;

s_r = desvio padrão relativo; e_r = erro relativo, em percentagens.

Os resultados obtidos para o material de referência NIST 1400 Bone Ash, apresentados na TAB. 5.2, indicam uma boa precisão com desvios padrão relativos variando de 1,7 a 8,5 %, e uma boa exatidão com erros relativos inferiores a 6,8 %.

TABELA 5.2. Concentrações de elementos no material de referência NIST 1400 Bone Ash em $\mu\text{g g}^{-1}$ a menos que esteja indicado.

Elemento	$\bar{x} \pm s$	n	s_r (%)	e_r (%)	(NIST, 1992)
Ba	249 ± 8	8	3,1		
Ca (%)	$35,6 \pm 2,0$	9	5,5	6,8	$38,18 \pm 0,13$
Cl	242 ± 10	4	4,2		
Fe	660 ± 11	3	1,7	0	660 ± 27
Mg (%)	$0,65 \pm 0,02$	5	3,2	5,0	$0,684 \pm 0,013$
Mn	$16,5 \pm 0,9$	5	5,2		17 (N)
Na	5800 ± 333	8	5,7		6000 (N)
P (%)	$17,0 \pm 1,2$	3	7,2	5,1	$17,91 \pm 0,19$
Sb ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	585 ± 50	4	8,5		
Sr	248 ± 8	5	3,3	0,4	249 ± 7
Zn	177 ± 9	4	4,8	2,2	181 ± 3

Na TAB. 5.3, apresentam-se os resultados do material de referência IAEA 336 Lichen, onde foram encontrados resultados satisfatórios quanto a precisão e exatidão, com desvios padrões relativos variando de 3,2 a 11,4 % e percentagens de erros relativos inferiores a 4,1 %.

TABELA 5.3. Concentrações de elementos no material de referência IAEA 336 Lichen, em $\mu\text{g g}^{-1}$.

Elementos	$\bar{x} \pm s$	n	s_r (%)	e_r (%)	IAEA, 1999
Br	$12,4 \pm 1,4$	2	11,4	3,9	12,9 (11,2-14,6)**
Cl	1863 ± 62	8	3,3	-	1900 (1600-2200) (N)
Fe	444 ± 15	5	3,5	3,3	430 (380-480)
K	1838 ± 93	9	5,1	0,1	1840 (1640-2040)
Mn	65 ± 3	11	3,9	3,2	63 (56-70)
Na	333 ± 11	9	3,3	4,1	320 (280-360)
Rb	$1,8 \pm 0,1$	4	6,6	-	1,76 (1,54-1,98) (N)
Sb	$0,073 \pm 0,010$	5	8,0	0	0,073 (0,063-0,083)
Zn	$31,4 \pm 1,6$	4	3,2	3,3	30,4 (27,0-33,8)

**Intervalo de confiança;

No material de referência NIST 1577b Bovine Liver foram analisados os elementos Cl, Fe, K, Mn, Na, P, Rb e Zn e estes resultados são apresentados na TAB. 5.4. Foram obtidos resultados precisos com desvios padrão relativos variando de 3,4 a 9,1 % e percentagens de erros relativos inferiores a 5,4 %.

TABELA 5.4. Análise do material de referência NIST 1577b Bovine Liver. Resultados em $\mu\text{g g}^{-1}$ a menos que esteja indicado.

Elemento	$\bar{x} \pm s$	n	$s_r(\%)$	$e_r(\%)$	(NIST, 1991)
Cl (%)	$0,263 \pm 0,012$	10	4,7	5,4	$0,278 \pm 0,006$
Fe	183 ± 9	4	5,0	0,5	184 ± 15
K (%)	$0,990 \pm 0,030$	10	3,4	0,4	$0,994 \pm 0,002$
Mn	$10,5 \pm 0,4$	10	3,4	0	$10,5 \pm 1,7$
Na	$0,24 \pm 0,01$	11	5,0	0,8	$0,242 \pm 0,006$
P (%)	$1,07 \pm 0,06$	5	5,7	2,7	$1,10 \pm 0,03$
Rb	$13,5 \pm 1,1$	4	8,3	1,5	$13,7 \pm 1,1$
Zn	125 ± 11	5	9,1	1,6	127 ± 16

Para avaliar a exatidão na análise do elemento Ba, pois não há valor certificado em nenhum dos quatro materiais de referência apresentados anteriormente, foi analisado o material de referência NIST 1547 Peach Leaves. Os resultados obtidos para este elemento estão apresentados na TAB. 5.5 e indicaram um desvio padrão relativo de 9,4 % e uma boa concordância com valor certificado, com percentagem de erro relativo de 0,8 %.

TABELA 5.5. Análise do material de referência NIST 1547 Peach Leaves.

Elemento	$\bar{x} \pm s$	n	$s_r(\%)$	$e_r(\%)$	(NIST, 1992)
Ba ($\mu\text{g g}^{-1}$)	125 ± 12	4	9,4	0,8	124 ± 4

Para visualizar a exatidão dos resultados obtidos na análise dos materiais de referência foram calculados os valores normalizados das concentrações para os elementos que apresentam valores certificados. Os valores normalizados e os seus desvios padrão relativos foram calculados em relação aos valores certificados.

Nas FIG. 5.1 a 5.5 estão os valores normalizados para cada um dos materiais de referência analisados. Nestas Figuras, o elemento com valor normalizado mais próximo da unidade indica resultado com maior exatidão, ou seja, mais concordante com o valor certificado. Também pode se observar nestas Figuras que para a maioria dos resultados os valores normalizados estão dentro de um erro de 10%.

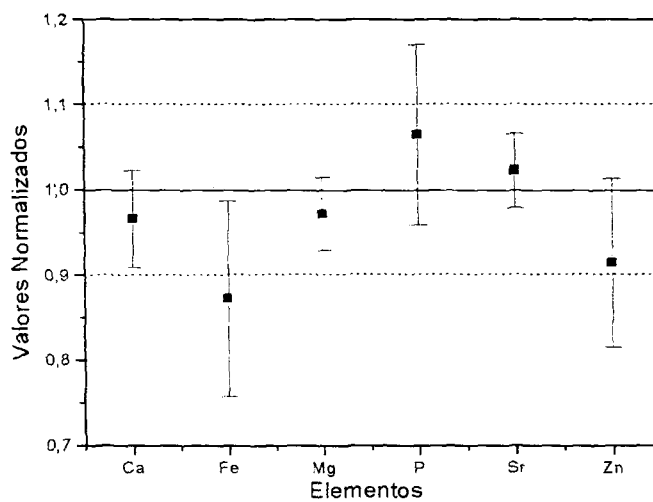


FIGURA. 5.1. Valores normalizados das concentrações dos elementos no material de referência NIST 1486 Bone Meal.

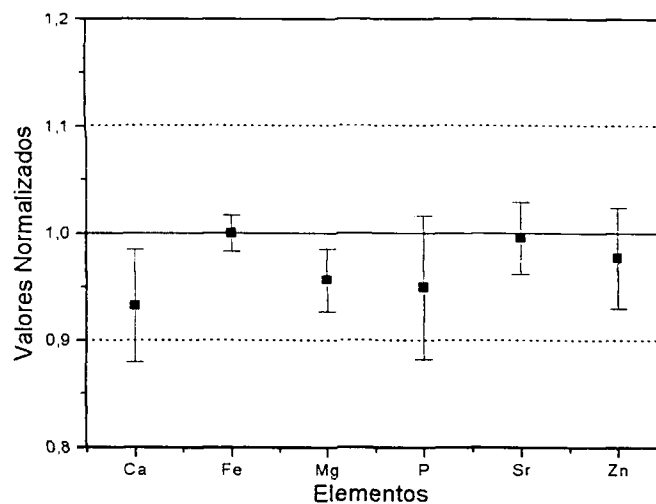


FIGURA 5.2. Valores normalizados das concentrações dos elementos no material de referência NIST 1400 Bone Ash.

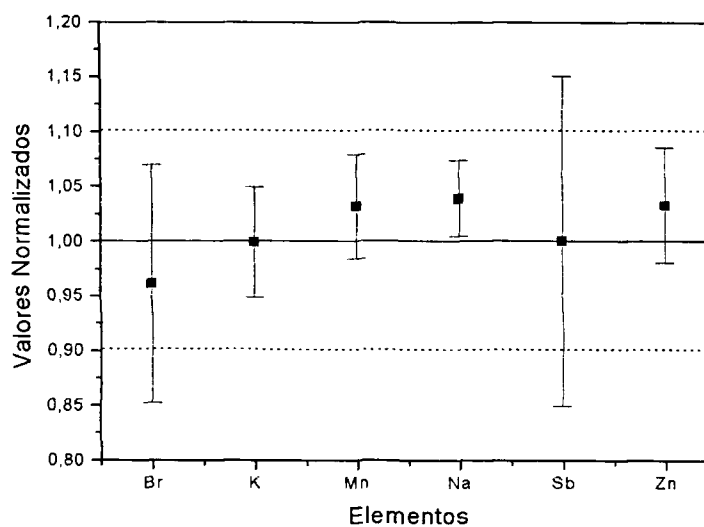


FIGURA 5.3. Valores normalizados das concentrações dos elementos no material de referência IAEA 336 Lichen.

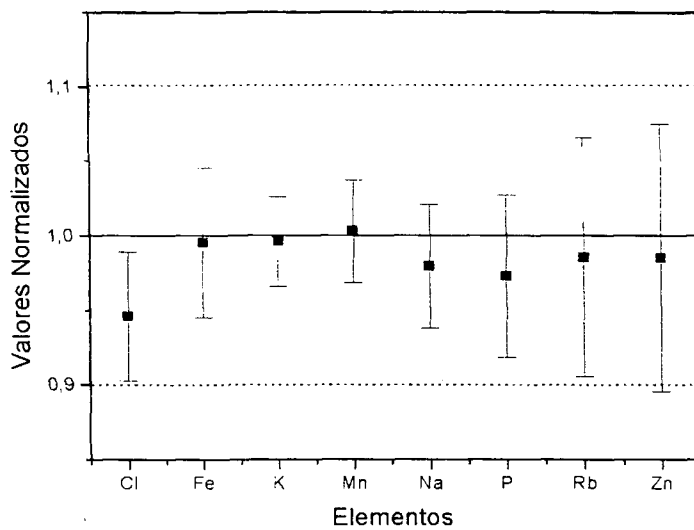


FIGURA 5.4. Valores normalizados das concentrações dos elementos no material de referência NIST 1577b Bovine Liver.

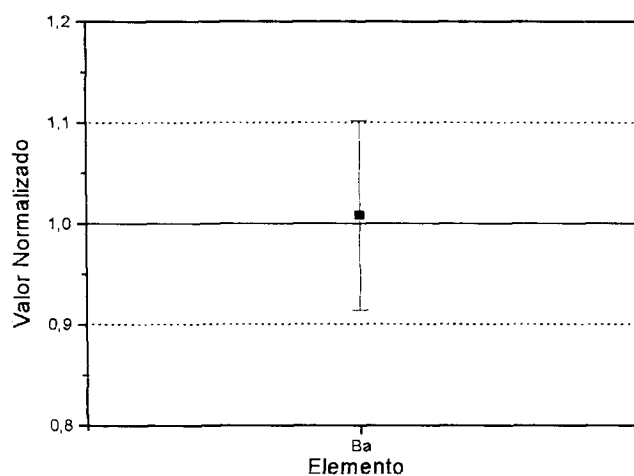


FIGURA. 5.5. Valor normalizado da concentração do elemento Ba no material de referência NIST 1547 Peach Leaves.

5.2. Análises de uma amostra de costela bovina em replicatas.

Para verificar a homogeneidade das amostras preparadas foram realizadas análises em replicatas de uma amostra de osso total calcinado e de ossos cortical e trabecular liofilizados separadamente.

Nas TAB. 5.6, 5.7 e 5.8, estão os resultados obtidos, respectivamente, para o osso total calcinado, cortical e trabecular de costela bovina onde se pode observar uma boa reprodutibilidade dos dados obtidos, podendo-se concluir que o procedimento adotado é adequado. Os desvios padrão relativos foram inferiores a 14 %, com exceção do elemento Mn no tecido trabecular da costela bovina, que apresentou desvio padrão relativo de 20,6 %, devido à má estatística de contagens do pico de 846,8 keV do ^{56}Mn .

TABELA 5.6. Médias das concentrações de elementos em tecido ósseo total de costela bovina calcinada, em replicatas. Resultados na base seca do material expressos em $\mu\text{g g}^{-1}$ a menos que esteja indicado.

Elemento	$\bar{x} \pm s$	n	s_r (%)
Ba	477 ± 19	9	4,0
Ca (%)	$33,8 \pm 2,5$	8	7,4
Cl	239 ± 3	4	1,4
Fe	$56,5 \pm 3,5$	2	6,1
K	857 ± 46	3	5,3
Mg	6335 ± 206	6	3,3
Mn ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	383 ± 16	5	4,3
Na	8686 ± 554	5	6,4
P (%)	$27,7 \pm 3,6$	4	13,0
Sr	284 ± 13	5	4,4
Zn	$96,4 \pm 5,3$	3	5,5

TABELA 5.7. Médias das concentrações de elementos em tecido cortical de costela bovina liofilizada, em replicatas. Resultados na base seca do material expressos em $\mu\text{g g}^{-1}$ a menos que esteja indicado.

Elemento	$\bar{x} \pm s$	n	s_r (%)
Ba	128 ± 2	6	1,2
Br	$0,59 \pm 0,08$	2	14,4
Ca (%)	$21,8 \pm 1,2$	9	5,4
Cl	227 ± 3	5	1,4
K	815 ± 7	4	0,9
Mg	4097 ± 79	4	1,9
Mn ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	436 ± 55	5	12,7
Na	5601 ± 116	4	2,1
P (%)	$7,04 \pm 0,56$	6	7,9
Rb	$3,96 \pm 0,19$	2	4,9
Sb ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	135 ± 1	2	0,5
Sr	309 ± 9	8	3,6
Zn	$53,6 \pm 0,4$	3	0,7

TABELA 5.8. Médias das concentrações de elementos em tecido trabecular de costela bovina liofilizada, em replicatas. Resultados na base seca do material expressos em $\mu\text{g g}^{-1}$ a menos que esteja indicado.

Elemento	$\bar{x} \pm s$	n	s_r (%)
Ba	118 \pm 4	5	3,5
Br	1,73 \pm 0,12	3	6,7
Ca (%)	15,2 \pm 1,6	6	10,6
Cl	816 \pm 85	3	10,4
Cr ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	4,24 \pm 0,05	3	1,2
Fe	121,0 \pm 0,0	2	0,0
K	1589 \pm 181	3	11,4
Mg	3333 \pm 403	3	12,1
Mn ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	313 \pm 65	3	20,6
Na	4102 \pm 561	6	13,7
P (%)	7,58 \pm 0,60	3	8,0
Rb	9,14 \pm 0,48	3	5,2
Sb ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	59,0 \pm 0,8	2	1,4
Sr	242 \pm 20	5	8,2
Zn	70,3 \pm 2,3	3	3,3

5.3. Análises de costelas de bovinos e suínos.

Nas TAB. 5.9 e 5.10 estão os resultados da média aritmética das concentrações de elementos nas amostras de costelas bovinas e suínas, respectivamente. Nestas Tabelas os resultados obtidos na base seca foram convertidos para base úmida para uma comparação entre os resultados obtidos para os diferentes tipos de tecidos. Para obter os resultados na base úmida foram utilizados os valores das percentagens de perda de peso obtidos nos tratamentos de liofilização e calcinação. Conforme mostram os resultados

destas Tabelas, os elementos Ca e P foram obtidos ao nível de percentagens, o Ba, Br, Cl, Fe, K, Mg, Na, Rb, Sr e Zn ao nível de $\mu\text{g g}^{-1}$ e o elemento Mn da ordem de $\mu\text{g kg}^{-1}$. O elemento Ba não foi detectado nas amostras de tecido ósseo suíno. Os resultados individuais para cada amostra de bovinos e suínos estão apresentados no Apêndice 2.

TABELA 5.9. Média aritmética das concentrações de elementos obtidas nas costelas bovinas. Resultados expressos na base úmida.

Elementos	Tec. Cortical	Tec. Trabecular	Tec. Total
	$\bar{x} \pm s (n)^*$	$\bar{x} \pm s (n)$	$\bar{x} \pm s (n)$
Ba ($\mu\text{g g}^{-1}$)	101 \pm 43 (6)	48 \pm 23 (6)	113 \pm 45 (6)
Br ($\mu\text{g g}^{-1}$)	0,75 \pm 0,38 (6)	1,91 \pm 1,16 (6)	0,38 \pm 0,14 (6)
Ca (%)	18,3 \pm 1,2 (6)	7,33 \pm 1,79 (6)	14,7 \pm 1,98 (6)
Cl ($\mu\text{g g}^{-1}$)	316 \pm 103 (6)	749 \pm 468 (6)	394 \pm 180 (6)
Fe ($\mu\text{g g}^{-1}$)	n.d.**	196,5 \pm 25,0 (4)	31,3 \pm 18,5 (6)
K ($\mu\text{g g}^{-1}$)	550 \pm 248 (6)	1062 \pm 727 (5)	1003 \pm 480 (4)
Mg ($\mu\text{g g}^{-1}$)	3140 \pm 591 (6)	1515 \pm 376 (6)	2917 \pm 441 (6)
Mn ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	277 \pm 79 (6)	157 \pm 30 (6)	295 \pm 73 (6)
Na ($\mu\text{g g}^{-1}$)	3879 \pm 381 (6)	2304 \pm 494 (6)	4271 \pm 464 (6)
P (%)	4,95 \pm 0,62 (6)	3,09 \pm 1,03 (6)	8,67 \pm 1,91 (6)
Rb ($\mu\text{g g}^{-1}$)	n.d.	4,84 \pm 3,29 (4)	n.d.
Sr ($\mu\text{g g}^{-1}$)	193 \pm 57 (6)	88 \pm 44 (6)	194 \pm 66 (6)
Zn ($\mu\text{g g}^{-1}$)	51,8 \pm 5,4 (6)	36,7 \pm 9,5 (6)	49,1 \pm 6,6 (6)

(n)* = número de amostras; n.d.** – não detectado

TABELA 5.10. Média aritmética das concentrações de elementos em costelas suínas. Resultados expressos na base úmida.

Elementos	Tec. Cortical	Tec. Trabecular	Tec. Total
	$\bar{x} \pm s$ (n)	$\bar{x} \pm s$ (n)	$\bar{x} \pm s$ (n)
Br ($\mu\text{g g}^{-1}$)	0,37 \pm 0,09 (5)	0,89 \pm 0,55 (6)	n.d.
Ca (%)	16,5 \pm 1,2 (6)	7,8 \pm 1,8 (6)	10,3 \pm 1,7 (6)
Cl ($\mu\text{g g}^{-1}$)	178 \pm 60 (6)	554 \pm 240 (6)	129 \pm 36 (6)
Fe ($\mu\text{g g}^{-1}$)	n.d.	61,0 \pm 6,6 (6)	29,9 \pm 6,5 (6)
K ($\mu\text{g g}^{-1}$)	643 \pm 268 (6)	1110 \pm 464 (6)	696 \pm 336 (6)
Mg ($\mu\text{g g}^{-1}$)	3563 \pm 359 (6)	1613 \pm 326 (6)	2352 \pm 455 (6)
Mn ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	326 \pm 88 (6)	196 \pm 21 (6)	230 \pm 26 (6)
Na ($\mu\text{g g}^{-1}$)	3639 \pm 217 (6)	2056 \pm 387 (6)	2819 \pm 461 (6)
P (%)	7,09 \pm 1,46 (6)	4,20 \pm 0,92 (6)	6,47 \pm 0,84 (6)
Rb ($\mu\text{g g}^{-1}$)	1,61 \pm 0,04 (3)	2,32 \pm 0,96 (6)	n.d.
Sr ($\mu\text{g g}^{-1}$)	216 \pm 115 (6)	118 \pm 60 (6)	166 \pm 71 (6)
Zn ($\mu\text{g g}^{-1}$)	119 \pm 17 (6)	64 \pm 14 (6)	77 \pm 23 (6)

Para verificar se há diferenças significativas entre as concentrações de elementos presentes em animais de espécies distintas, foi aplicado o teste t de Student, a um nível de significância de 5 % para os três tipos de tecidos: cortical, trabecular e total. Quando o valor calculado de t, em valor absoluto, for igual ou maior do que o valor de t tabelado, significa que as médias não são iguais, ao nível de significância estabelecido (VIEIRA, 1997). Na TAB. 5.11 estão os resultados do teste t aplicado aos dados obtidos no tecido cortical de bovinos e suínos onde foi verificado que as concentrações dos elementos Ca, Cl, P e Zn presentes nestas duas espécies de animais são significativamente diferentes, por outro lado, as concentrações de Br, K, Mg, Mn, Na e Sr do tecido cortical de bovinos e suínos não diferiram estatisticamente. Na TAB. 5.12 são apresentados os resultados do teste t aplicado para os resultados obtidos nas análises de tecido trabecular das costelas bovinas e suínas. Além do Ba que não foi detectado, os elementos Fe, Mn e Zn no tecido

trabecular dos suínos foram obtidos em concentrações significativamente diferentes das de bovinos. Os parâmetros estatísticos do teste t aplicado aos resultados do tecido total calcinado de bovinos e suínos apresentados na TAB. 5.13 mostram que as concentrações dos elementos Ca, Na, P e Zn do tecido total de bovinos são estatisticamente diferentes das de suínos.

TABELA 5.11. Parâmetros estatísticos obtidos a partir das concentrações de elementos no tecido cortical de costelas de bovinos e suínos.

Elementos	Bovinos		Suínos		teste t***	
	\bar{x} (n)*	V**	\bar{x} (n)	V	t calculado	t tabelado
Br	0,75 (6)	0,14	0,37 (5)	0,01	2,17	2,26
Ca	18,3 (6)	1,52	16,5 (6)	1,36	2,55	2,23
Cl	316 (6)	10613,69	178 (6)	3625,48	2,84	2,23
K	550 (6)	61561,87	643 (6)	71682,70	0,62	2,23
Mg	3140 (6)	349507,37	3563 (6)	128548,80	1,50	2,23
Mn	277 (6)	6204,24	326 (6)	7730,67	1,02	2,23
Na	3879 (6)	145447,77	3639 (6)	46920,41	1,34	2,23
P	4,95 (6)	0,38	7,07 (6)	2,19	3,25	2,23
Sr	193 (6)	3290,46	216 (6)	13239,47	0,45	2,23
Zn	51,8 (6)	29,15	118,8 (6)	274,90	9,41	2,23

\bar{x} – média aritmética dos resultados; (n)* - número de amostras; V** – variância.

teste t*** - teste t aplicado ao nível de significância de 5%;

TABELA 5.12. Parâmetros estatísticos obtidos a partir das concentrações de elementos no tecido trabecular de costelas de bovinos e suínos.

Elementos	Bovinos		Suínos		teste t	
	\bar{x} (n)	V	\bar{x} (n)	V	t calculado	t tabelado
Br	1,91 (6)	1,34	0,89 (6)	0,31	1,94	2,23
Ca	7,3 (6)	3,20	7,8 (6)	3,09	0,46	2,23
Cl	749 (6)	218724,96	554 (6)	57454,11	0,91	2,23
Fe	197 (4)	623,73	61 (6)	44,17	12,98	2,31
K	1062 (5)	529241,50	1110 (6)	215704,97	0,13	2,26
Mg	1515 (6)	141340,97	1613 (6)	105994,17	0,48	2,23
Mn	157 (6)	868,61	196 (6)	429,35	2,65	2,23
Na	2304 (6)	243777,07	2056 (6)	149602,27	0,97	2,23
P	3,09 (6)	1,06	4,20 (6)	0,84	1,96	2,23
Rb	4,84 (4)	10,81	2,32 (6)	0,93	1,82	2,31
Sr	88 (6)	1910,62	118 (6)	3615,52	0,99	2,23
Zn	36,7 (6)	89,95	63,7 (6)	190,21	3,95	2,23

TABELA 5.13. Parâmetros estatísticos obtidos a partir das concentrações de elementos no tecido total de costelas de bovinos e suínos.

Elementos	Bovinos		Suínos		teste t	
	\bar{x} (n)	V	\bar{x} (n)	V	t calculado	t tabelado
Ca	14,7 (6)	3,91	10,3 (6)	2,84	4,22	2,23
Cl	394 (6)	32346,50	129 (6)	1315,13	3,53	2,23
Fe	31,3 (6)	340,91	29,9 (6)	41,79	0,17	2,23
K	1003 (4)	230510,92	696 (6)	112633,07	1,20	2,31
Mg	2917 (6)	194418,27	2352 (6)	206786,27	2,18	2,23
Mn	295 (6)	5374,89	230 (6)	654,16	2,04	2,23
Na	4271 (6)	215491,60	2819 (6)	212598,41	5,44	2,23
P	8,67 (6)	3,63	6,47 (6)	0,70	2,59	2,23
Sr	194 (6)	4347,19	166 (6)	4974,56	0,69	2,23
Zn	49,1 (6)	43,06	77,1 (6)	545,11	2,83	2,23

Na TAB. 5.14 são apresentados os resultados de tecido ósseo cortical de suínos calculados na base seca do material juntamente com os valores apresentados no trabalho de SAMUDRALWAR e ROBERTSON (1993) para comparação. As concentrações dos elementos Ca, Mg, Na, P, Rb e Zn encontrados no tecido cortical são próximos dos valores da literatura. O resultado mais discrepante foi obtido para o Sr.

Esta comparação não foi feita para o tecido trabecular e total de suínos devido à falta de valores da literatura para estes dois tipos de tecidos para o caso de costelas. Também não foram encontrados valores da literatura para o caso das costelas bovinas.

TABELA 5.14. Comparação entre as concentrações de elementos obtidas em tecido ósseo cortical de costelas suínas com valores da literatura.

Elementos	Tecido Cortical	
	Este Trabalho	SAMUDRALWAR e ROBERTSON (1993)
	$\bar{x} \pm s$	$\bar{x} \pm s$
Br ($\mu\text{g g}^{-1}$)	$0,5 \pm 0,1$	$1,4 \pm 0,3$
Ca (%)	$21,0 \pm 1,4$	$20,3 \pm 1,4$
Fe ($\mu\text{g g}^{-1}$)	n.d.	29 ± 7
Mg ($\mu\text{g g}^{-1}$)	4512 ± 453	4800 ± 1200
Mn ($\mu\text{g g}^{-1}$)	$0,4 \pm 0,1$	$1,2 \pm 0,8$
Na ($\mu\text{g g}^{-1}$)	4607 ± 266	5200 ± 1000
P (%)	$9,0 \pm 2,0$	$11 \pm 1,8$
Rb ($\mu\text{g g}^{-1}$)	$1,9 \pm 0,2$	$1,3 \pm 0,6$
Sr ($\mu\text{g g}^{-1}$)	274 ± 144	33 ± 4
Zn ($\mu\text{g g}^{-1}$)	151 ± 23	158 ± 13

5.4. Análises de ossos humanos

Na TAB. 5.15 são apresentadas as médias das concentrações dos elementos obtidas para tecidos ósseos cortical e trabecular liofilizados e total calcinado de 18 amostras de costelas humanas. As Tabelas com os resultados individuais destas determinações estão apresentadas no Apêndice 3. Os elementos Ca e P foram encontrados ao nível de percentagens, Ba, Br, Cl, Fe, K, Mg, Na, Rb, Sr e Zn ao nível de $\mu\text{g g}^{-1}$ e o Mn ao nível de $\mu\text{g kg}^{-1}$. Como o tecido cortical e trabecular se apresentam em proporções diferentes no osso, o resultado obtido para o tecido total não poderá ser comparado com a soma das concentrações de elementos do osso cortical e trabecular. Entretanto os resultados obtidos para tecido total devem estar entre aqueles encontrados para tecidos cortical e trabecular. Com relação ao elemento Fe encontrado somente nos ossos trabecular

e total, convém salientar que este elemento provavelmente se origina do fluido sanguíneo presente nestes dois tecidos. O Br não foi detectado no tecido total calcinado devido à possível volatilização deste elemento durante o processo de secagem por calcinação. Provavelmente o mesmo ocorre com o Cl que foi obtido em concentrações menores no osso calcinado do que encontrados nos tecidos trabecular e cortical liofilizados.

TABELA 5.15. Média aritmética das concentrações dos elementos no tecido cortical, trabecular e total de humanos. Resultados expressos na base úmida do material.

Elementos	Tec. Cortical	Tec. Trabecular	Tec. Total
	$\bar{x} \pm s (n)^*$	$\bar{x} \pm s (n)$	$\bar{x} \pm s (n)$
Ba ($\mu\text{g g}^{-1}$)	n.d.	$6,8 \pm 5,6 (10)$	n.d.
Br ($\mu\text{g g}^{-1}$)	$0,56 \pm 0,21 (17)$	$0,86 \pm 0,34 (18)$	n.d.
Ca (%)	$18,9 \pm 2,5 (18)$	$4,0 \pm 1,5 (18)$	$9,6 \pm 1,5 (18)$
Cl ($\mu\text{g g}^{-1}$)	$457 \pm 142 (18)$	$862 \pm 302 (18)$	$131 \pm 62 (18)$
Fe ($\mu\text{g g}^{-1}$)	n.d.	$188 \pm 85 (18)$	$114 \pm 51 (16)$
K ($\mu\text{g g}^{-1}$)	$487 \pm 172 (14)$	$1319 \pm 360 (18)$	$460 \pm 126 (17)$
Mg ($\mu\text{g g}^{-1}$)	$2017 \pm 289 (18)$	$599 \pm 226 (18)$	$1149 \pm 211 (18)$
Mn ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	n.d.	$99,0 \pm 53,7 (13)$	n.d.
Na ($\mu\text{g g}^{-1}$)	$4522 \pm 421 (18)$	$1595 \pm 346 (18)$	$2486 \pm 403 (16)$
P (%)	$8,48 \pm 2,47 (18)$	$1,74 \pm 0,92 (18)$	$4,98 \pm 1,52 (18)$
Rb ($\mu\text{g g}^{-1}$)	n.d.	$3,29 \pm 1,27 (18)$	n.d.
Sr ($\mu\text{g g}^{-1}$)	$94,9 \pm 31,4 (18)$	$20,4 \pm 6,8 (16)$	$48,7 \pm 19,2 (18)$
Zn ($\mu\text{g g}^{-1}$)	$96,6 \pm 13,2 (18)$	$34,8 \pm 9,8 (18)$	$60,4 \pm 14,8 (16)$

(n)* número de amostras

Para comparar os resultados obtidos para tecido cortical com o trabecular foi também aplicado o teste t de Student e na TAB. 5.16 estão os parâmetros estatísticos

obtidos que indicam que as concentrações de todos os elementos analisados do tecido cortical foram significativamente diferentes às do tecido trabecular.

TABELA 5.16. Parâmetros estatísticos obtidos a partir das concentrações de elementos no tecido cortical e trabecular de humanos.

Elementos	Tecido Cortical		Tecido Trabecular		teste t*	
	\bar{x} (n)	V	\bar{x} (n)	V	t calculado	t tabelado
Br	0,56 (17)	0,04	0,86 (18)	0,12	3,05	2,04
Ca (%)	18,9 (18)	6,38	4,0 (18)	2,11	21,66	2,03
Cl	457 (18)	20125,00	862 (18)	90972,02	5,15	2,03
K	487 (14)	29724,06	1319 (18)	129727,06	7,94	2,04
Mg	2017 (18)	83413,83	599 (18)	50859,60	16,42	2,03
Na	4522 (18)	177526,93	1595 (18)	119396,94	25,26	2,04
P (%)	8,48 (18)	6,12	1,74 (18)	0,86	10,83	2,03
Sr	94,9 (18)	986,85	20,4 (16)	46,83	9,28	2,04
Zn	95,5 (12)	169,32	34,8 (18)	96,95	14,54	2,05

teste t* - teste t ao nível de significância de 5%

Na TAB. 5.17 estão os resultados das concentrações médias de elementos do tecido cortical de costela humana calculadas na base seca do material juntamente com valores publicados por SAMUDRALWAR e ROBERTSON (1993). A análise destes resultados mostra que os resultados obtidos para o Ca, Mg, Na e P neste trabalho são similares aos valores da literatura.

TABELA 5.17. Concentrações de elementos traço em tecido ósseo cortical de humanos determinados neste trabalho e da literatura. Resultados na base seca do material.

Elementos	Tecido Cortical	
	SAMUDRALWAR e ROBERTSON	
	Este Trabalho	(1993)
	$\bar{x} \pm s$ (Idades entre 60 e 80 anos)	$\bar{x} \pm s$ (Idades entre 60 e 82 anos)
Ba ($\mu\text{g g}^{-1}$)	n.d.	36 ± 13
Br ($\mu\text{g g}^{-1}$)	$0,6 \pm 0,2$	$4,1 \pm 4,0$
Ca (%)	18 ± 2	21 ± 4
Fe ($\mu\text{g g}^{-1}$)	n.d.	23 ± 11
K ($\mu\text{g g}^{-1}$)	492 ± 129	-
Mg ($\mu\text{g g}^{-1}$)	1986 ± 247	2600 ± 400
Mn ($\mu\text{g g}^{-1}$)	n.d.	$1,2 \pm 0,2$
Na ($\mu\text{g g}^{-1}$)	4431 ± 335	5400 ± 1000
P (%)	$7,6 \pm 1,0$	$8,8 \pm 2,2$
Rb ($\mu\text{g g}^{-1}$)	n.d.	$2,1 \pm 3,0$
Sr ($\mu\text{g g}^{-1}$)	111 ± 26	62 ± 18
Zn ($\mu\text{g g}^{-1}$)	96 ± 8	180 ± 44

Neste trabalho, apesar do pequeno número de amostras analisadas, foi realizada uma análise dos dados obtidos com a idade dos indivíduos. A comparação dos resultados por faixa etária é importante devido a incidência de doenças degenerativas ósseas principalmente em indivíduos idosos. A análise destes resultados mostrou que há uma grande variabilidade nas concentrações dos elementos obtidas para cada grupo e não foi possível avaliar a influência da idade nas concentrações dos elementos nos ossos.

Com relação ao efeito da concentração dos elementos com a idade, EL-AMRI e EL-KABROUN (1997) mostraram que as concentrações de Ba, Ca, Sr e Zn nos ossos

diminuem com a idade e a de Br aumenta. YOSHINAGA *et al.* (1989) verificaram que no grupo de indivíduos com idades entre 20 e 39 anos, as concentrações de Ca e P são mais altas e diminuem gradualmente com a idade. Estes autores verificaram também que as concentrações de Al, Fe, Na, Pb e Zn aumentam nos idosos enquanto que a de Mg diminui. No trabalho de KUO *et al.* (2000) também foi verificado que a concentração de Pb aumenta assim como a de Cd nos indivíduos idosos, principalmente para aqueles com idades superiores a 80 anos.

Neste trabalho também foi verificado se há diferenças significativas entre teores de elementos nos ossos quando comparados entre o sexo dos indivíduos. Este estudo é importante devido à predominância de doenças ósseas em indivíduos do sexo feminino.

Nas TAB 5.21, 5.22 e 5.23 estão apresentados os parâmetros estatísticos calculados a partir das concentrações de elementos nos tecidos ósseos cortical, trabecular e total, respectivamente, comparados entre o sexo dos indivíduos, sendo 15 do masculino e 3 do feminino. Pelo teste t, a um nível de significância de 5 %, não foram encontradas diferenças significativas entre as concentrações de elementos com o sexo dos indivíduos com exceção do Ba, Br e Cl no tecido trabecular e K no tecido total. YOSHINAGA *et al.* (1995) verificaram que ossos dos indivíduos do sexo masculino apresentam concentrações mais altas de Na e Pb enquanto que as de Mg e Sn são mais altas nos indivíduos do sexo feminino. EL-AMRI e EL-KABROUN (1997) verificaram que os ossos dos indivíduos do sexo masculino apresentam concentrações mais elevadas de Ba, Ca e Zn quando comparados com os teores desses elementos nos indivíduos do sexo feminino, que por sua vez, apresentam concentrações mais elevadas de Br, Fe e Sr.

TABELA 5.21. Parâmetros estatísticos obtidos a partir das concentrações de elementos no tecido cortical de humanos.

Elementos	Tecido Cortical					
	Indivíduos Masculinos		Indivíduos Femininos		teste t	
	\bar{x} (n)	V	\bar{x} (n)	V	t calculado	t tabelado
Br	0,53 (14)	0,04	0,72 (3)	0,004	1,54	2,13
Ca (%)	19,0 (15)	5,88	18,1 (3)	12,01	0,57	2,12
Cl	430 (15)	7228,81	591 (3)	88133,67	1,93	2,12
K	477 (12)	19022,52	550 (2)	162239,17	0,56	2,16
Mg	2041 (15)	96824,18	1897 (3)	5191,83	0,78	2,12
Na	4518 (15)	186637,86	4541 (3)	201924,77	0,09	2,12
P (%)	8,06 (15)	4,52	10,53 (3)	12,70	1,66	2,12
Sr	95,3 (15)	873,17	92,8 (3)	2268,58	0,12	2,12
Zn	97,5 (15)	201,27	91,9 (3)	41,23	0,66	2,12

TABELA 5.22. Parâmetros estatísticos obtidos a partir das concentrações de elementos no tecido trabecular de humanos.

Elementos	Tecido Trabecular					
	Indivíduos Masculinos		Indivíduos Femininos		Teste t	
	\bar{x} (n)	V	\bar{x} (n)	V	t calculado	t tabelado
Ba	5,66 (9)	21,06	17,1 (1)	0	2,36	2,31
Br	0,78 (15)	0,08	1,21 (3)	0,23	2,19	2,12
Ca (%)	4,00 (15)	1,52	3,98 (3)	7,34	0,02	2,12
Cl	800 (15)	46871,53	1169 (3)	274949,09	2,13	2,12
Fe	200 (15)	7392,21	129 (3)	3310,16	1,35	2,12
K	1307 (15)	94321,50	1379 (3)	435955,02	0,31	2,12
Mg	601 (15)	41807,54	588 (3)	139455,12	0,09	2,12
Mn	96 (11)	3029,73	111 (2)	3882,57	0,35	2,20
Na	1549 (15)	50073,65	1821 (3)	572063,75	1,27	2,12
P (%)	1,74 (15)	0,85	1,74 (3)	1,31	0,002	2,12
Rb	3,46 (15)	1,43	2,43 (3)	2,30	1,31	2,12
Sr	19,7 (15)	41,52	31,1 (1)	0	1,71	2,15
Zn	35,2 (15)	92,53	32,9 (3)	169,74	0,36	2,12

TABELA 5.23. Parâmetros estatísticos obtidos a partir das concentrações de elementos no tecido total de humanos.

Elementos	Tecido Total				Teste t	
	Indivíduos Masculinos		Indivíduos Femininos		t calculado	t tabelado
	\bar{x} (n)	V	\bar{x} (n)	V		
Ba	123 (3)	4485,21	138 (2)	14490,83	0,18	3,18
Ca (%)	9,56 (15)	2,34	9,61 (3)	3,56	0,05	2,12
Cl	123 (15)	2723,28	173 (3)	10346,37	1,30	2,12
Fe	141 (15)	4331,66	67 (3)	274,52	1,88	2,12
K	483 (15)	12414,47	284 (2)	9310,67	2,39	2,13
Mg	1156 (15)	52893,74	1112 (3)	7509,96	0,32	2,12
Mn	86 (4)	1365,06	105 (2)	7449,32	0,39	2,78
Na	2476 (15)	144979,03	2516 (3)	227307,83	0,16	2,12
P (%)	4,89 (15)	2,66	5,45 (3)	0,59	0,57	2,12
Sr	51,01 (15)	400,03	36,88 (3)	98,46	1,17	2,12
Zn	60,23 (15)	198,76	61,24 (3)	322,78	0,11	2,12

6. CONCLUSÕES

Os resultados obtidos neste trabalho permitiram concluir que o procedimento adotado para o tratamento das amostras e o método analítico de ativação com nêutrons foram adequados para análise dos elementos Ba, Br, Ca, Cl, Fe, Mg, Mn, Na, P, Rb, Sr e Zn em matriz óssea.

As análises dos materiais certificados de referência indicaram uma boa qualidade dos resultados com relação a precisão e exatidão. Os desvios padrão relativos foram, em geral, inferiores a 10 % para a maioria dos elementos e os resultados apresentaram uma boa concordância com valores certificados com percentagens de erros relativos inferiores a 10%.

A análise de uma amostra de osso em replicatas mostrou que a amostra preparada é bastante homogênea indicando que o procedimento adotado para seu tratamento foi adequado. As análises de ossos bovinos e suínos foram importantes para o estabelecimento de um protocolo para tratamento e preparação de amostras de ossos, e também para definição das condições de irradiação e medidas adequadas para análise.

As baixas concentrações de Br e Cl obtidas na análise do tecido ósseo calcinado de animais e de humanos se deve à volatilização destes elementos no processo de tratamento desse material por calcinação. Portanto, apesar da calcinação ser bastante simples na preparação de amostras este método não pode ser utilizado para o caso da análise de elementos facilmente voláteis.

A comparação entre os resultados obtidos nos ossos de bovinos e suínos mostrou que há diferenças significativas para os elementos Ca, Cl, P e Zn no tecido cortical. Para o caso do tecido trabecular esta diferença foi verificada para Fe, Mn e Zn e no tecido total, para os elementos Ca, Na, P e Zn. Além disso o elemento Ba não foi

detectado nos tecidos ósseos suínos, este fato pode estar relacionado com o tipo de alimentação dos suínos que difere da de bovinos.

A comparação entre os resultados encontrados nos tecidos cortical e trabecular de costelas humanas indicou que estes dois tecidos apresentam diferentes concentrações dos elementos Br, Ca, Cl, K, Mg, Na, P, Sr e Zn.

A comparação das concentrações dos elementos obtidos nos ossos de indivíduos do sexo masculino com as do sexo feminino não indicou diferenças significativas para os elementos. As únicas exceções foram para o Ba, Br e Cl no tecido trabecular e K no tecido total.

Com relação ao número de amostras analisadas, que no presente trabalho foi de 18 indivíduos, consideramos de grande interesse estender estas análises para um número maior de amostras para um exame estatístico detalhado dos resultados.

APÊNDICE 1 - Protocolo e materiais necessários para tratamento das amostras de osso humano

Laboratório para o tratamento de amostra:

- Laboratório limpo, com capelas de fluxo laminar classe 100 para tratamento de amostras biológicas;

Equipamentos necessários:

- Mufla (Marca: Thermoline; Modelo: F1930-1, para uso na faixa de temperatura de 30°C a 1200°C);
- Liofilizador (Marca: Edwards; Modelo: Micro Modulyo 10-F105-01-880);
- Balança analítica (Marca: Mettler; Modelo: H16 com precisão de 0,00005 g);
- Motor de baixa rotação de uso odontológico (Marca: Driller Maxitorque);
- Sistema de purificação de água da Millipore.

Materiais necessários:

- Avental branco de manga comprida;
- Luvas cirúrgicas sem talco (Marca: Polymed ou similares);
- Máscara;
- Curetas de uso odontológico;
- Pinça de polietileno (Marca: Bibby);
- Espátula de material plástico;
- Béquer de vidro;
- Placa de Pétri;
- Papel de filtro (Marca: Whatman nº 40);
- Disco diamantado;
- Potes de plástico incolor;
- Cadinho de platina;
- Almofariz e pistilo de ágata;
- Para-filme;

- Frascos de polietileno (Marca: Nalgene);

Reagentes necessários:

- Água purificada no sistema de purificação de água da marca Millipore (para uso na lavagem das amostras);
- Álcool etílico p.a. (para uso na limpeza dos materiais utilizados para o manuseio e tratamento das amostras);
- Ácido nítrico p.a. para limpeza dos materiais de vidraria;

Etapas do procedimento:

1. Usar avental, luva cirúrgica sem talco e máscara durante todo o manuseio da amostra e efetuar todos os procedimentos abaixo descritos num laboratório limpo com capela de fluxo laminar classe 100 para evitar a contaminação;
2. Retirar a amostra do freezer e descongelar a amostra colocando-a num béquer contendo água purificada;
3. Cortar a costela usando o disco diamantado acoplado ao motor de baixa rotação e obter para análise a parte central da costela;
4. Retirar o tecido periosteal do osso utilizando as curetas e a seguir lavar dentro de um béquer usando água purificada;
5. Dividir a amostra em duas porções (1 e 2) utilizando o disco diamantado acoplado ao motor de baixa rotação (capela com exaustão);
6. Lavar cada uma das porções (1 e 2) com água purificada contida dentro de um béquer;
7. A amostra não utilizada e o tecido periosteal devem ser embalados em plásticos rotulada com os dizeres “osso humano a ser descartado”, guardar na geladeira para serem enviados a Faculdade de Medicina da USP, para incineração;
8. Procedimento para tratamento da porção 1 do osso por calcinação:
 - a. Secar superficialmente a amostra de osso colocado numa placa de Pétri forrada com papel de filtro;
 - b. Pesar a amostra num cadinho de platina previamente tarado;

- c. Submeter inicialmente a amostra ao tratamento por calcinação a 100 °C numa mufla e aumentar a temperatura gradualmente até chegar a 800 °C. Manter a amostra nesta temperatura de 800 °C por período de aproximadamente 8 horas. A mufla deverá estar instalada no interior de uma capela com exaustão;
 - d. Manusear a amostra do cadinho de platina após o seu esfriamento;
 - e. Efetuar a pesagem do conjunto amostra mais cadinho para avaliar a percentagem de perda de peso na calcinação;
 - f. Triturar manualmente a amostra num almofariz de ágata e guardar no frasco de polietileno com a tampa vedada com para-filme. O frasco com a amostra é rotulada e guardada no dessecador;
9. Procedimento para tratamento da porção 2 por liofilização:
- a. Cortar a amostra em fatias com o auxílio do disco diamantado acoplado ao motor de baixa rotação;
 - b. Lavar as amostras na forma de fatias com água purificada e em seguida separar o tecido cortical do trabecular utilizando espátula e curetas de uso odontológico;
- 9.1. Tecido Trabecular:
- a. Colocar o osso trabecular no pote plástico previamente tarado usando a pinça de polietileno e efetuar a sua pesagem;
 - b. Submeter o tecido trabecular congelado à secagem por liofilização, por um período de aproximadamente 8 horas sob uma pressão de 6×10^{-2} mbar;
 - c. Pesar a amostra seca e calcular a percentagem da perda de peso na secagem;
 - d. Transferir a amostra num frasco de polietileno Nalgene, vedar a tampa, rotular e guardar no freezer;
- 9.2. Tecido Cortical:
- a. Lavar o tecido cortical com água e obter na forma de pequenos fragmentos utilizando o disco diamantado acoplado ao motor de baixa rotação;
 - b. Lavar novamente a amostra com água e colocar numa Placa de Pétri forrada com papel de filtro para secagem superficial à temperatura ambiente;

- c. Transferir o tecido cortical no pote plástico usando a pinça de polietileno e pesar;
- d. Colocar a amostra no freezer para seu congelamento e depois submeter à secagem por liofilização, por um período de aproximadamente 8 horas sob uma pressão de 6×10^{-2} mbar;
- e. Pesar a amostra seca e obter a percentagem da perda de peso na secagem;

9.3. Colocar a amostra no frasco de polietileno, vedar sua tampa com para-filme, rotular e guardar no freezer;

APÊNDICE 2 - Resultados individuais das concentrações de elementos em tecidos ósseos de costelas bovinas e suínas.

TABELA 1. Concentrações de elementos em amostras de tecido ósseo bovino. Resultados na base úmida do material expressos em $\mu\text{g g}^{-1}$ a menos que esteja indicado.

Elemento	Amostra B1			Amostra B2		
	Cortical	Medular	Total	Cortical	Medular	Total
Ba	123,2 ± 5,4 ^(*)	56,6 ± 2,7	98,5 ± 8,2	92,6 ± 5,7	60,4 ± 3,7	84,3 ± 8,9
Br	0,50 ± 0,14	1,72 ± 0,04	0,40 ± 0,03	0,77 ± 0,30	3,14 ± 0,06	0,40 ± 0,04
Ca (%)	19,0 ± 0,6	7,0 ± 0,3	16,1 ± 0,7	17,1 ± 0,6	8,8 ± 0,3	15,8 ± 0,7
Cl	391 ± 28	1395 ± 51	518 ± 37	415 ± 29	770 ± 35	410 ± 32
Fe	8,7 ± 1,4	205,0 ± 3,1	32,8 ± 3,0	7,5 ± 1,1	168,2 ± 3,4	51,5 ± 3,1
K	722 ± 84	1735 ± 80	1653 ± 200	928 ± 77	1352 ± 73	1045 ± 169
Mg	3824 ± 224	1701 ± 63	3745 ± 121	2678 ± 249	1820 ± 216	2952 ± 116
Mn ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	361 ± 35	200 ± 27	369 ± 52	227 ± 36	168 ± 29	314 ± 58
Na	4073 ± 64	2724 ± 45	4747 ± 126	3798 ± 59	2658 ± 45	4759 ± 125
P (%)	4,85 ± 0,07	2,93 ± 0,04	10,28 ± 0,14	4,82 ± 0,07	3,50 ± 0,05	8,60 ± 0,12
Rb	1,24 ± 0,12	8,51 ± 0,22	n.d.	2,37 ± 0,14	6,73 ± 0,21	n.d.
Sb ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	116,6 ± 10,8	n.d.
Sc ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	n.d.	0,03 ± 0,01	n.d.	n.d.	n.d.	0,022 ± 0,001
Sr	176,3 ± 4,7	83,3 ± 2,9	204,6 ± 15,8	274,8 ± 4,9	144,8 ± 4,0	311,9 ± 18,0
Zn	60,4 ± 0,4	46,6 ± 0,4	54,9 ± 0,7	47,7 ± 0,4	48,0 ± 0,4	53,6 ± 0,4

n.d.* - indica não detectado.

* - incerteza calculada considerando erros nas medidas das taxas de contagens da amostra e padrão.

TABELA 1. Continuação.

Elemento	Amostra B3			Amostra B4		
	Cortical	Medular	Total	Cortical	Medular	Total
Ba	88,8 ± 4,8	29,3 ± 1,9	87,5 ± 8,0	38,9 ± 4,8	20,6 ± 1,7	69,3 ± 11,1
Br	1,31 ± 0,04	3,40 ± 0,03	0,32 ± 0,04	0,28 ± 0,05	0,35 ± 0,02	0,60 ± 0,05
Ca (%)	18,9 ± 0,6	5,2 ± 0,2	14,1 ± 0,7	17,7 ± 0,6	5,5 ± 0,2	17,2 ± 0,8
Cl	369 ± 28	1210 ± 46	389 ± 33	134 ± 19	224 ± 14	654 ± 48
Fe	n.d.	226,4 ± 3,0	47,2 ± 2,6	n.d.	186,3 ± 3,1	38,0 ± 2,6
K	581 ± 67	1659 ± 66	773 ± 89	380 ± 68	340 ± 44	540 ± 94
Mg	3692 ± 234	1070 ± 45	2612 ± 89	3230 ± 231	1082 ± 92	2957 ± 119
Mn (µg kg ⁻¹)	197 ± 37	149 ± 22	260 ± 47	225 ± 34	148 ± 17	343 ± 61
Na	4336 ± 67	2115 ± 35	3904 ± 107	3825 ± 59	1422 ± 24	4505 ± 124
P (%)	5,08 ± 0,07	1,93 ± 0,02	8,44 ± 0,12	5,92 ± 0,09	1,99 ± 0,03	11,37 ± 0,16
Rb	n.d.	2,09 ± 0,09	n.d.	n.d.	2,04 ± 0,08	n.d.
Sb (µg kg ⁻¹)	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Sc (µg kg ⁻¹)	n.d.	0,01 ± 0,001	n.d.	n.d.	0,051 ± 0,001	n.d.
Sr	196,0 ± 5,0	43,1 ± 2,0	178,7 ± 12,9	193,8 ± 5,1	57,6 ± 2,4	185,2 ± 14,1
Zn	54,2 ± 0,5	35,2 ± 0,3	45,9 ± 2,0	52,7 ± 0,5	29,3 ± 0,2	56,1 ± 1,9

TABELA 1. Continuação.

Elemento	Amostra B5			Amostra B6		
	Cortical	Medular	Total	Cortical	Medular	Total
Ba	95,8 ± 5,4	36,0 ± 2,8	155,2 ± 8,0	167,7 ± 6,8	82,0 ± 2,7	181,6 ± 7,1
Br	1,04 ± 0,04	1,52 ± 0,03	0,18 ± 0,04	0,57 ± 0,05	1,32 ± 0,05	0,39 ± 0,05
Ca (%)	17,0 ± 0,6	7,8 ± 0,3	13,3 ± 0,4	20,1 ± 0,7	9,7 ± 0,4	11,9 ± 0,4
Cl	312 ± 23	506 ± 28	175 ± 18	274 ± 24	390 ± 26	218 ± 17
Fe	n.d.	16,6 ± 1,6	10,0 ± 1,9	n.d.	17,7 ± 1,4	8,0 ± 1,7
K	450 ± 62	224 ± 49	n.d.	241 ± 68	n.d.	n.d.
Mg	2272 ± 186	1464 ± 64	2544 ± 67	3143 ± 281	1952 ± 211	2690 ± 76
Mn (µg kg ⁻¹)	267 ± 38	110 ± 28	165 ± 25	388 ± 47	166 ± 32	318 ± 32
Na	3210 ± 50	2282 ± 38	4053 ± 66	4033 ± 63	2625 ± 44	3658 ± 59
P (%)	3,99 ± 0,05	3,60 ± 0,05	7,04 ± 0,10	5,02 ± 0,07	4,61 ± 0,06	6,31 ± 0,07
Rb	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Sb (µg kg ⁻¹)	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Sc (µg kg ⁻¹)	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Sr	98,6 ± 5,2	60,0 ± 3,1	111,7 ± 7,5	216,7 ± 6,6	138,8 ± 3,1	168,7 ± 7,2
Zn	44,9 ± 0,5	23,8 ± 0,2	42,8 ± 0,5	50,9 ± 0,5	37,5 ± 0,2	41,2 ± 0,5

TABELA 2. Concentrações de elementos em amostras de tecido ósseo suíno. Resultados na base úmida do material expressos em $\mu\text{g g}^{-1}$ a menos que esteja indicado.

Elemento	Amostra S1			Amostra S2		
	Cortical	Medular	Total	Cortical	Medular	Total
Br	$0,48 \pm 0,06$	$0,34 \pm 0,02$	n.d.	$0,35 \pm 0,02$	$0,72 \pm 0,02$	$0,07 \pm 0,01$
Ca (%)	$15,8 \pm 0,5$	$8,5 \pm 0,3$	$8,9 \pm 0,4$	$15,5 \pm 0,5$	$5,6 \pm 0,2$	$8,2 \pm 0,4$
Cl	156 ± 22	195 ± 16	117 ± 14	229 ± 21	636 ± 28	181 ± 15
Fe	n.d.	$58,1 \pm 2,2$	$30,9 \pm 1,6$	n.d.	$68,9 \pm 2,2$	$29,7 \pm 1,5$
K	314 ± 59	584 ± 80	640 ± 93	613 ± 96	1386 ± 104	1052 ± 111
Mg	3250 ± 93	1682 ± 60	2014 ± 68	3506 ± 110	1167 ± 56	1866 ± 69
Mn ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	336 ± 38	198 ± 22	198 ± 29	349 ± 39	220 ± 28	258 ± 31
Na	3594 ± 60	1859 ± 31	2624 ± 72	3307 ± 55	1727 ± 41	2335 ± 64
P (%)	$6,06 \pm 0,08$	$3,76 \pm 0,05$	$5,99 \pm 0,08$	$7,96 \pm 0,12$	$2,94 \pm 0,04$	$5,58 \pm 0,08$
Rb	n.d.	$1,11 \pm 0,09$	n.d.	$1,66 \pm 0,27$	$2,83 \pm 0,11$	n.d.
Sr	66 ± 6	50 ± 6	70 ± 8	183 ± 7	105 ± 6	197 ± 9
Zn	$99,0 \pm 0,9$	$52,9 \pm 0,4$	$57,8$	$141,9 \pm 1,3$	$51,3 \pm 0,4$	$61,8 \pm 1,2$

TABELA 2. Continuação.

Elemento	Amostra S3			Amostra S4		
	Cortical	Medular	Total	Cortical	Medular	Total
Br	0,35 ± 0,02	1,24 ± 0,04	n.d.	0,41 ± 0,04	1,84 ± 0,05	n.d.
Ca (%)	15,3 ± 0,5	9,1 ± 0,3	10,8 ± 0,5	18,2 ± 0,6	9,1 ± 0,3	12,5 ± 0,6
Cl	178 ± 20	636 ± 34	161 ± 20	264 ± 30	914 ± 49	132 ± 20
Fe	n.d.	58,0 ± 2,5	23,8 ± 1,4	n.d.	69,8 ± 3,0	29,7 ± 1,5
K	991 ± 108	1820 ± 128	1157 ± 147	934 ± 118	1236 ± 129	314 ± 58
Mg	3413 ± 107	1958 ± 71	2628 ± 84	4172 ± 123	1766 ± 71,9	3090 ± 107
Mn (µg kg ⁻¹)	258 ± 32	177 ± 25	243 ± 29	272 ± 39	212 ± 29	207 ± 37
Na	3532 ± 58	2399 ± 40,3	2854 ± 84	3827 ± 59	2324 ± 37	3550 ± 104
P (%)	9,17 ± 0,13	5,38 ± 0,08	5,80 ± 0,08	7,92 ± 0,11	4,45 ± 0,06	6,48 ± 0,09
Rb	1,59 ± 0,15	3,65 ± 0,17	n.d.	1,58 ± 0,17	2,90 ± 0,16	n.d.
Sr	108 ± 9	58 ± 8	84 ± 9	348 ± 39	183 ± 9	214 ± 12
Zn	108,4 ± 1,1	65,8 ± 0,7	69,0 ± 1,7	135,3 ± 1,4	74,2 ± 0,7	70,9 ± 1,3

TABELA 2. Continuação.

Elemento	Amostra S5			Amostra S6		
	Cortical	Medular	Total	Cortical	Medular	Total
Br	n.d.	0,52 ± 0,04	0,18 ± 0,05	0,25 ± 0,04	0,70 ± 0,02	n.d.
Ca (%)	17,1 ± 3,0	9,0 ± 0,3	11,7 ± 0,4	17,3 ± 3,1	5,5 ± 0,2	9,4 ± 0,3
Cl	98 ± 18	502 ± 27	90 ± 13	142 ± 19	444 ± 22	95 ± 11
Fe	n.d.	54,1 ± 1,5	23,7 ± 1,8	n.d.	57,0 ± 2,1	41,4 ± 3,1
K	460 ± 63	686 ± 47	551 ± 86	543 ± 63	949 ± 75	464 ± 64
Mg	3250 ± 91	1849 ± 63	2408 ± 63	3787 ± 111	1255 ± 54	2108 ± 60
Mn (µg kg ⁻¹)	486 ± 45	203 ± 23	255 ± 24	257 ± 38	166 ± 19	220 ± 22
Na	3913 ± 61	2464 ± 41	3130 ± 54	3661 ± 57	1561 ± 26	2421 ± 42
P (%)	5,83 ± 0,09	5,00 ± 0,07	7,55 ± 0,11	5,60 ± 0,01	3,64 ± 0,05	7,41 ± 0,10
Rb	n.d.	1,56 ± 0,09	n.d.	n.d.	1,85 ± 0,12	n.d.
Sr	286 ± 10	192 ± 8	229 ± 7	307 ± 11	119 ± 6	206 ± 6
Zn	117,7 ± 1,1	85,0 ± 0,4	121,8 ± 2,3	110,6 ± 1,1	53,1 ± 0,5	81,2 ± 1,2

APÊNDICE 3 - Resultados individuais das concentrações de elementos obtidos em amostras de tecido ósseo de costela humana.

TABELA 3. Concentrações de elementos em tecido ósseo humano total. Resultados na base úmida do material expressos em $\mu\text{g g}^{-1}$ a menos que esteja indicado.

Elemento	H1	H2	H3	H4	H5	H6
Ca (%)	$6,9 \pm 0,3$	$11,3 \pm 0,4$	$10,2 \pm 0,4$	$7,9 \pm 0,3$	$9,5 \pm 0,3$	$8,8 \pm 0,3$
Cl	$52,9 \pm 2,7$	$179,4 \pm 6,5$	$141,8 \pm 5,1$	$85,9 \pm 3,9$	$103,2 \pm 4,2$	$85,9 \pm 4,0$
Fe	$171,4 \pm 3,4$	$65,9 \pm 2,5$	$133,5 \pm 3,5$	$295,2 \pm 4,4$	$96,1 \pm 2,2$	$197,7 \pm 24,8$
K	413 ± 26	353 ± 35	528 ± 38	470 ± 32	733 ± 37	385 ± 32
Mg	718 ± 24	1023 ± 40	1198 ± 42	947 ± 38	1197 ± 37	938 ± 40
Mn ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	$43,2 \pm 11,8$	$43,6 \pm 17,8$	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Na	1707 ± 4	2464 ± 7	2641 ± 9	2303 ± 7	2581 ± 8	2612 ± 6
P (%)	$3,55 \pm 0,05$	$6,27 \pm 0,09$	$6,17 \pm 0,09$	$4,45 \pm 0,06$	$4,67 \pm 0,07$	$4,44 \pm 0,06$
Sr	$30,8 \pm 2,3$	$48,2 \pm 3,7$	$50,0 \pm 3,0$	$31,1 \pm 2,9$	$54,3 \pm 2,6$	$61,3 \pm 3,2$
Zn	$52,0 \pm 0,6$	$81,5 \pm 0,9$	$48,5 \pm 0,6$	$51,7 \pm 0,5$	$52,1 \pm 0,4$	$68,6 \pm 2,7$

TABELA 3. Continuação.

Elemento	H7	H8	H9	H10	H11	H12
Ca (%)	9,8 ± 0,6	12,6 ± 0,8	11,7 ± 0,6	8,5 ± 0,4	11,9 ± 0,7	8,7 ± 0,5
Cl	61,9 ± 4,6	159,4 ± 10,0	120,0 ± 7,8	155,9 ± 8,7	257,1 ± 14,9	98,9 ± 7,8
Fe	84,8 ± 2,0	107,2 ± 2,6	89,2 ± 2,4	134,9 ± 3,3	91,1 ± 3,1	133,0 ± 2,3
K	537 ± 60	556 ± 80	421 ± 63	687 ± 60	410 ± 67	352 ± 55
Mg	1243 ± 68	1498 ± 104	1336 ± 59	719 ± 50	1417 ± 83	1166 ± 73
Mn (µg kg ⁻¹)	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	133,5 ± 36,4	83,1 ± 26,7
Na	1994 ± 5	2790 ± 6	2863 ± 8	1895 ± 4	2934 ± 8	2591 ± 7
P (%)	3,24 ± 0,05	6,38 ± 0,09	4,73 ± 0,07	2,57 ± 0,04	8,73 ± 0,12	6,80 ± 0,10
Sr	20,7 ± 4,4	78,8 ± 7,6	51,7 ± 5,9	55,6 ± 5,2	60,2 ± 5,9	89,1 ± 6,4
Zn	57,2 ± 0,5	82,4 ± 0,7	67,9 ± 0,6	43,6 ± 0,5	94,7 ± 1,1	64,0 ± 0,4

TABELA 3. Continuação.

Elemento	H13	H14	H15	H16	H17	H18
Ca (%)	9,4 ± 0,4	10,0 ± 0,4	9,3 ± 0,4	8,9 ± 0,4	7,6 ± 0,3	9,4 ± 0,4
Cl	142,5 ± 7,8	270,7 ± 12,5	160,5 ± 8,6	143,2 ± 8,1	67,6 ± 4,6	70,0 ± 6,0
Fe	263,8 ± 5,4	84,0 ± 2,9	109,3 ± 3,0	71,2 ± 11,6	50,9 ± 7,1	131,3, ± 2,1
K	434 ± 54	n.d.	490 ± 54	357 ± 49	216 ± 2	475 ± 58
Mg	1295 ± 54	1196 ± 65	1188 ± 51	1195 ± 57	1118 ± 44	1285 ± 64
Mn (µg kg ⁻¹)	85,9 ± 31,6	165,5 ± 39,5	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Na	2925 ± 7	3017 ± 7	2692 ± 6	2264 ± 8	2068 ± 9	2347 ± 9
P (%)	3,06 ± 0,04	5,34 ± 0,08	5,09 ± 0,07	3,97 ± 0,06	4,74 ± 0,07	5,52 ± 0,08
Sr	39,9 ± 4,7	32,7 ± 7,3	34,9 ± 4,4	76,1 ± 5,4	29,8 ± 3,7	30,6 ± 4,6
Zn	59,7 ± 0,7	55,1 ± 0,6	65,0 ± 0,7	50,0 ± 1,5	47,2 ± 1,1	46,2 ± 0,3

TABELA 4. Concentrações de elementos em amostras de tecido ósseo cortical humano. Resultados na base úmida do material expressos em $\mu\text{g g}^{-1}$ a menos que esteja indicado.

Elemento	H1	H2	H3	H4	H5	H6
Br	$0,63 \pm 0,04$	$0,74 \pm 0,04$	$0,56 \pm 0,05$	$0,66 \pm 0,03$	$0,32 \pm 0,03$	$0,43 \pm 0,03$
Ca (%)	$17,5 \pm 0,6$	$18,2 \pm 0,6$	$17,3 \pm 1,0$	$16,8 \pm 1,0$	$19,9 \pm 0,6$	$21,0 \pm 0,7$
Cl	587 ± 16	822 ± 22	365 ± 13	370 ± 13	390 ± 27	368 ± 26
K	610 ± 65	835 ± 78	371 ± 60	596 ± 74	622 ± 140	517 ± 60
Mg	1719 ± 73	1813 ± 94	1774 ± 142	1650 ± 163	2385 ± 81	1878 ± 89
Na	4315 ± 9	5055 ± 11	5224 ± 14	5050 ± 7	5260 ± 8	4724 ± 11
P (%)	$6,79 \pm 0,09$	$9,82 \pm 0,14$	$8,71 \pm 0,12$	$7,76 \pm 0,11$	$9,33 \pm 0,13$	$8,13 \pm 0,12$
Sr	$89,3 \pm 6,0$	$99,3 \pm 6,9$	$83,0 \pm 5,9$	$70,5 \pm 7,0$	$89,1 \pm 5,3$	$98,6 \pm 5,6$
Zn	$89,9 \pm 1,0$	$85,0 \pm 1,0$	$85,4 \pm 1,0$	$96,2 \pm 1,0$	$120,0 \pm 1,2$	$114,8 \pm 1,0$

TABELA 4. Continuação.

Elemento	H7	H8	H9	H10	H11	H12
Br	$0,57 \pm 0,03$	$0,38 \pm 0,04$	$0,32 \pm 0,04$	n.d.	$0,26 \pm 0,03$	$0,80 \pm 0,03$
Ca (%)	$17,6 \pm 1,1$	$18,5 \pm 1,1$	$22,0 \pm 0,7$	$22,2 \pm 0,7$	$19,0 \pm 0,6$	$19,4 \pm 0,6$
Cl	391 ± 12	464 ± 15	518 ± 16	512 ± 17	367 ± 12	456 ± 14
K	707 ± 152	n.d.	375 ± 78	477 ± 74	208 ± 58	n.d.
Mg	2330 ± 86	2374 ± 105	2060 ± 83	1842 ± 94	1706 ± 78	2045 ± 93
Na	3941 ± 9	4290 ± 10	4381 ± 12	4838 ± 10	4505 ± 13	4059 ± 11
P (%)	$8,49 \pm 0,12$	$8,40 \pm 0,12$	$8,31 \pm 0,12$	$11,83 \pm 0,17$	$9,04 \pm 0,13$	$8,87 \pm 0,12$
Sr	$60,8 \pm 7,0$	$102,0 \pm 11,5$	$113,2 \pm 8,5$	$160,5 \pm 8,9$	$93,2 \pm 7,1$	$125,9 \pm 10,4$
Zn	$90,5 \pm 0,5$	$104,0 \pm 0,5$	$84,9 \pm 0,4$	$73,9 \pm 0,7$	$116,4 \pm 0,7$	$92,3 \pm 0,6$

TABELA 4. Continuação.

Elemento	H13	H14	H15	H16	H17	H18
Br	0,36 ± 0,03	0,77 ± 0,03	0,39 ± 0,04	0,96 ± 0,04	0,65 ± 0,04	0,74 ± 0,05
Ca (%)	23,0 ± 0,8	21,5 ± 0,7	19,1 ± 0,6	18,6 ± 0,6	14,6 ± 0,5	13,6 ± 0,4
Cl	414 ± 16	695 ± 23	450 ± 14	540 ± 17	256 ± 9	259 ± 10
K	444 ± 74	265 ± 78	411 ± 68	386 ± 65	n.d.	n.d.
Mg	2704 ± 95	1941 ± 107	2222 ± 81	2122 ± 92	1935 ± 71	1803 ± 76
Na	4045 ± 6	4347 ± 9	4363 ± 10	4701 ± 7	4222 ± 9	4072 ± 9
P (%)	10,95 ± 0,15	14,40 ± 0,20	4,73 ± 0,07	6,00 ± 0,08	7,38 ± 0,10	3,62 ± 0,05
Sr	71,7 ± 6,8	42,3 ± 7,2	67,3 ± 5,7	142,1 ± 7,0	136,9 ± 17,2	62,1 ± 13,9
Zn	77,2 ± 0,6	93,0 ± 0,6	105,6 ± 0,7	106,9 ± 0,9	97,7 ± 0,9	105,1 ± 0,9

TABELA 5. Concentrações de elementos em amostras de tecido ósseo trabecular humano. Resultados na base úmida do material expressos em $\mu\text{g g}^{-1}$ a menos que esteja indicado.

Elemento	H1	H2	H3	H4	H5	H6
Ba	$9,9 \pm 2,7$	$17,1 \pm 4,2$	$16,3 \pm 3,8$	$3,5 \pm 0,9$	$1,8 \pm 0,9$	$2,9 \pm 1,0$
Br	$0,83 \pm 0,02$	$1,77 \pm 0,02$	$1,03 \pm 0,02$	$0,67 \pm 0,02$	$0,37 \pm 0,01$	$0,78 \pm 0,02$
Ca (%)	$4,63 \pm 0,16$	$7,07 \pm 0,25$	$6,07 \pm 0,21$	$4,43 \pm 0,16$	$5,17 \pm 0,19$	$4,72 \pm 0,17$
Cl	1103 ± 27	1695 ± 41	620 ± 14	677 ± 16	443 ± 10	684 ± 16
Fe	224 ± 3	154 ± 3	244 ± 3	351 ± 3	194 ± 2	276 ± 3
K	1582 ± 64	2131 ± 90	1543 ± 69	1196 ± 55	1344 ± 52	1318 ± 55
Mg	667 ± 40	1017 ± 72	954 ± 49	848 ± 47	799 ± 34	534 ± 41
Mn ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	n.d.	n.d.	$98,0 \pm 19,7$	$41,5 \pm 15,4$	$71,0 \pm 13,7$	$111,8 \pm 18,0$
Na	1877 ± 4	2650 ± 7	1729 ± 5	1330 ± 2	1362 ± 2	1526 ± 3
P (%)	$1,66 \pm 0,02$	$2,76 \pm 0,04$	$2,24 \pm 0,03$	$1,91 \pm 0,03$	$3,82 \pm 0,05$	$2,88 \pm 0,04$
Rb	$2,73 \pm 0,10$	$4,03 \pm 0,14$	$1,95 \pm 0,10$	$3,97 \pm 0,10$	$3,80 \pm 0,09$	$3,55 \pm 0,10$
Sr	$22,6 \pm 3,5$	$31,1 \pm 5,7$	$29,5 \pm 3,8$	$17,1 \pm 2,9$	$22,4 \pm 2,3$	$19,7 \pm 3,0$
Zn	$39,6 \pm 0,3$	$47,7 \pm 33,9$	$39,8 \pm 0,3$	$31,4 \pm 0,2$	$46,4 \pm 0,3$	$42,7 \pm 0,3$

TABELA 5. Continuação.

Elemento	H7	H8	H9	H10	H11	H12
Ba	3,8 ± 1,0	n.d.	n.d.	4,4 ± 0,9	n.d.	3,5 ± 0,7
Br	0,96 ± 0,02	0,54 ± 0,02	0,72 ± 0,03	0,69 ± 0,01	0,54 ± 0,02	1,12 ± 0,01
Ca (%)	3,51 ± 0,11	4,61 ± 0,15	3,68 ± 0,15	3,16 ± 0,13	5,68 ± 0,19	1,96 ± 0,07
Cl	784 ± 19	825 ± 20	783 ± 19	1148 ± 26	716 ± 16	1019 ± 22
Fe	130 ± 2	151 ± 2	191 ± 3	82 ± 1	196 ± 3	184 ± 2
K	1375 ± 53	1177 ± 47	1425 ± 56	1010 ± 44	1279 ± 88	2104 ± 79
Mg	537 ± 30	712 ± 39	519 ± 41	259 ± 38	740 ± 40	363 ± 29
Mn (µg kg ⁻¹)	82,0 ± 16,1	n.d.	56,8 ± 15,0	53,9 ± 14,2	n.d.	185,6 ± 25,7
Na	1588 ± 3	1944 ± 6	1636 ± 7	1612 ± 7	1623 ± 4	1222 ± 4
P (%)	1,05 ± 0,01	1,47 ± 0,02	0,87 ± 0,01	0,92 ± 0,01	1,83 ± 0,02	0,92 ± 0,01
Rb	4,96 ± 0,14	2,60 ± 0,10	3,50 ± 0,12	2,12 ± 0,06	3,26 ± 0,11	6,32 ± 0,14
Sr	10,0 ± 2,6	26,8 ± 3,2	21,3 ± 3,2	23,1 ± 2,8	30,7 ± 4,9	14,7 ± 3,6
Zn	32,8 ± 0,3	49,3 ± 0,4	31,2 ± 0,3	24,1 ± 0,2	51,2 ± 0,3	18,1 ± 0,1

TABELA 5. Continuação.

Elemento	H13	H14	H15	H16	H17	H18
Ba	n.d.	n.d.	n.d.	4,9 ± 0,7	n.d.	n.d.
Br	0,94 ± 0,01	0,90 ± 0,02	0,43 ± 0,02	1,41 ± 0,01	0,97 ± 0,01	0,72 ± 0,01
Ca (%)	4,25 ± 0,15	2,83 ± 0,11	2,33 ± 0,09	2,28 ± 0,08	2,03 ± 0,08	3,48 ± 0,14
Cl	1115 ± 25	1166 ± 26	518 ± 12	881 ± 19	646 ± 15	687 ± 17
Fe	377 ± 4	170 ± 2	122 ± 2	86 ± 1	63 ± 1	187 ± 2
K	1402 ± 58	1113 ± 51	810 ± 38	1016 ± 40	894 ± 41	1033 ± 51
Mg	703 ± 38	416 ± 36	393 ± 28	323 ± 29	332 ± 27	665 ± 49
Mn (µg kg ⁻¹)	206,9 ± 21,4	155,8 ± 21,4	46,6 ± 12,3	109,0 ± 15,4	67,7 ± 13,7	n.d.
Na	1778 ± 4	1644 ± 4	1281 ± 5	1320 ± 2	1169 ± 2	1412 ± 2
P (%)	0,90 ± 0,01	0,50 ± 0,01	1,28 ± 0,02	1,14 ± 0,02	1,95 ± 0,03	3,18 ± 0,04
Rb	4,90 ± 0,13	1,01 ± 0,06	2,86 ± 0,12	2,96 ± 0,05	2,25 ± 0,05	2,37 ± 0,06
Sr	15,1 ± 2,5	n.d.	8,9 ± 2,3	15,9 ± 2,5	n.d.	17,5 ± 1,3
Zn	32,0 ± 0,2	27,8 ± 0,2	32,5 ± 0,2	23,0 ± 0,1	23,3 ± 0,1	34,2 ± 0,2

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABBOTT, L.; NADLER, J.; RUDE, R.K. Magnesium deficiency in alcoholism: possible contribution to osteoporosis and cardiovascular disease in alcoholics. *Alcohol. Clin. Exp. Res.*, v. 18, n. 5, p. 1076-1082, 1994.
- AKESSON, K.; GRYNPAS, M.D.; HANCOCK, R.G.V.; ODSELIUS, R.; OBRANT, K.J. Energy-dispersive x-ray microanalysis of the bone mineral content in human trabecular bone: a comparison with ICPEs and neutron activation analysis. *Calcified Tissue Int.*, v. 55, p. 236-239, 1994.
- ARAS, N.K.; YILMAZ, G.; ALKAN, S.; KORKUSUZ, F. Trace elements in human bone determined by neutron activation analysis. *J. Radioanal. Nucl. Chem.*, v. 239, n. 1, p. 79-86, 1999.
- BEATTIE, J.H.; AVENELL, A. Trace element nutrition and bone metabolism. *Nutr. Res. Rev.*, v. 5, p. 167-188, 1992.
- BIGI, A.; COJAZZI, G.; PANZAVOLTA, S.; RIPAMONTI, A.; ROVERI, N.; ROMANELLO, M.; NORIZ SUAREZ, K.; MORO, L. Chemical and structural characterization of the mineral phase from cortical and trabecular bone. *J. Inorg. Biochem.*, v. 68, p. 45-51, 1997.
- DEIBEL, M.A.; SAVAGE, J.M.; ROBERTSON, J.D.; EHMANN, W.D.; MARKESBERY, W.R. Lead determinations in human bone by particle induced X ray emission (PIXE) and graphite furnace atomic absorption spectrometry (GFAAS). *J. Radioanal. Nucl. Chem.*, v. 195, n. 1, p. 83-89, 1995.
- DE SOETE, D., GIJELS, R., HOSTE, J. *Neutron activation analysis*, Wiley-Interscience, London, 1972.
- EL-AMRI, F.A.; EL-KABROUN, M.A.R. Trace element concentrations in human bone using instrumental neutron activation analysis. *J. Radioanal. Nucl. Chem.*, v. 217, n. 2, p. 205-207, 1997.
- FRIEDLANDER, G.; KENNEDY, J.W.; MILLER, J.M. *Nuclear and radiochemistry*. New York: John Wiley & Sons, 1981.
- HYVÖNEN-DABEK, M. Proton induced prompt gamma ray emission for determination of light elements in human bone. *J. Radioanal. Nucl. Chem.*, v. 63, n. 2, p. 367-378, 1981.

- HYVÖNEN-DABEK, M.; RÄISANEN, J.; DABEK, J.T. Trace element study of human bone by X ray emission analysis using an external proton beam. *J. Radioanal. Nucl. Chem.*, v. 63, n. 1, p. 163-175, 1981.
- IAEA, INTERNATIONAL ATOMIC ENERGY AGENCY. *References Sheet, Reference Material IAEA-336 Lichen*, 1999.
- IAEA, INTERNATIONAL ATOMIC ENERGY AGENCY. *Practical aspects of operating a neutron activation analysis laboratory*, Vienna: IAEA, 1990 (IAEA – TECDOC – 564)
- JUNQUEIRA, L.C.; CARNEIRO, J. *Histologia básica*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1974.
- KUO, H.-W.; KUO, S.-M.; CHOU, C.-H.; LEE, T.-C. Determination of 14 elements in Taiwanese bones. *Sci. Total Environ.*, v. 255, p. 45-54, 2000.
- MAHAN, L.K.; ESCOTT-STUMP, S. *Krause: alimentos, nutrição & dietoterapia*. São Paulo: Roca, 1998. p. 584-596.
- MILLER, G.E.; CROFOOT, T.A.; MANEA-KRICHTEN, M.C.; NAULT, M. Neutron activation analysis (NAA) in the service of other analysis: determination of calcium. *J. Radioanal. Nucl. Chem.*, v. 160, n. 1, p. 55-61, 1992.
- NIST, NATIONAL INSTITUTE OF STANDARDS AND TECHNOLOGY. *Certificate of Analysis. Standard Reference Material 1577b Bovine Liver*, 1991.
- NIST, NATIONAL INSTITUTE OF STANDARDS AND TECHNOLOGY. *Certificate of Analysis. Standard Reference Material 1400 Bone Ash*, 1992.
- NIST, NATIONAL INSTITUTE OF STANDARDS AND TECHNOLOGY. *Certificate of Analysis. Standard Reference Material 1486 Bone Meal*, 1992.
- NIST, NATIONAL INSTITUTE OF STANDARDS AND TECHNOLOGY. *Certificate of Analysis. Standard Reference Material 1547 Peach Leaves*, 1992.
- PARR, R.M.; IYENGAR, G.V. The role of minerals and trace elements in osteoporosis. In: Vth CONFERENCE OF THE INTERNATIONAL SOCIETY FOR TRACE ELEMENT RESEARCH IN HUMANS. *Proceedings...*, 1999. p. 248-252.
- PICCOT, D. Comunicação Pessoal, 1989.

- PORTE, N.; MAUERHOFER, E.; DENSCHLAG, H.O. Determination of phosphorus by instrumental neutron activation and bremsstrahlung measurement in bone samples. *J. Radioanal. Nucl. Chem.*, v. 220, n. 1, p. 3-7, 1997a.
- PORTE, N.; MAUERHOFER, E.; DENSCHLAG, H.O. Test of multielement analysis of bone samples using instrumental neutron activation analysis (INAA) and anti-Compton spectrometry. *J. Radioanal. Nucl. Chem.*, v. 224, n^{os}. 1-2, p. 103-107, 1997b.
- SAMULDRAWAR, D.L.; ROBERTSON, J.D. Determination of major and trace elements in bones by simultaneous PIXE/PIGE analysis. *J. Radioanal. Nucl. Chem.*, v. 169, n. 1, p. 259-267, 1993.
- SCANCAR, J.; MILACIC, R.; BENEDIK, M.; BUKOVEC, P. Determination of trace elements and calcium in bone of the human iliac crest by atomic absorption spectrometry. *Clin. Chim. Acta*, v. 293, p. 187-197, 2000.
- TANDON, L.; IYENGAR, G.V.; PARR, R.M. A review of radiologically important trace elements in human bones. *Appl. Radiat. Isot.*, v. 49, n. 8, p. 903-910, 1998.
- VIEIRA, S., *Introdução à bioestatística*, Campus, Rio de Janeiro, 1997.
- YOSHINAGA, J.; SUZUKI, T.; MORITA, M. Sex – and age – related variation in elemental concentrations of contemporary Japanese ribs. *Sci. Total Environ.*, v. 79, p. 209-221, 1989.
- YOSHINAGA, J.; SUZUKI, T.; MORITA, M.; HAYAKAWA, M. Trace elements in ribs of elderly people and elemental variation in the presence of chronic diseases. *Sci. Total Environ.*, v. 162, p. 239-252, 1995.
- ZAICHICK, V.Y. Instrumental activation and x-ray fluorescent analysis of human bone in health and disease. *J. Radioanal. Nucl. Chem.*, v. 179, n. 2, p. 295-303, 1994.
- ZAICHICK, V.YE.; MORUKOV, B.V. *In vivo* bone mineral studies on volunteers during a 370-day antiorthostatic hypokinesia test. *Appl. Radiat. Isot.*, v. 49, n. 5/6, p. 691-694, 1998.
- ZAICHICK, V.; SNETKOV A. *In vivo* and *in vitro* neutron activation analysis for studying the bones of children with rickets-like diseases before and during treatment. *Appl. Radiat. Isot.*, v. 49, n. 5/6, p. 695, 1998.
- ZAICHICK, V.; TZAPHLIDOU, M. Determination of calcium, phosphorus, and the calcium/phosphorus ratio in cortical bone from the human femoral neck by neutron activation analysis. *Appl. Radiat. Isot.*, v. 56, p. 781-786, 2002.

ZHANG YX; LI DY; ZHUANG GS; ZHANG GL; WANG ZX; XIA JUN. Determination of inorganic elements in iliac crests of rabbits by NAA. *J. Radioanal. Nucl. Chem., Letters*, v. 240, n. 3, p. 939-941, 1999.