



ANÁLISE POR ATIVAÇÃO DE ELEMENTOS TRAÇOS EM AMOSTRAS DE TECIDO PULMONAR

Sizue Ota Rogero
Mitiko Saiki

Divisão de Radioquímica - IPEN-CNEN/SP

Miriam Lemos Daliberto
Paulo Hilário Saldiva Nascimento

Laboratório de Poluição Atmosférica Experimental-FMUSP

SUMÁRIO

O objetivo do presente trabalho consiste em aplicar o método instrumental de análise por ativação com neutrons na determinação de elementos traços em amostras de pulmões de autópsias de fumantes e não fumantes.

Neste trabalho estabeleceram-se as condições adequadas para tratamento e análise das amostras. As amostras foram congeladas, homogeneizadas, liofilizadas e irradiadas em uma fonte de ^{60}Co para esterilização. As amostras com os padrões sintéticos foram irradiadas no reator IEA-R1 sob um fluxo de $3,7 \times 10^{11} \text{ n.cm}^{-2}.\text{s}^{-1}$ por 30 min para determinação de Cl, K, Mn e Na e por 16 h sob fluxo de $10^{13} \text{ n.cm}^{-2}.\text{s}^{-1}$ para determinação de Au, Br, Co, Cs, Fe, Rb, Sc, Se e Zn. As contagens foram realizadas no detetor de (Ge) hiperpuro ligado a um analisador multicanal de 4096 canais acoplado a um microcomputador.

Os resultados indicam uma boa reprodutibilidade. A exatidão do método foi estudada usando materiais de referências Bowen's Kale do IUPAC e Bovine Liver do NIST.

ABSTRACT

The purpose of this work is to apply the method of instrumental neutron activation analysis to determine the trace elements in lung samples from autopsy of smoker and non smoker individuals.

In this preliminary study, the adequate conditions for analysis and preparation of lung samples had been established. The frozen samples were homogenized, lyophilized and sterilized using ^{60}Co source. The samples and the standards were irradiated in the IEA-R1 reactor under a thermal neutron flux of $3.7 \times 10^{11} \text{ n.cm}^{-2}.\text{s}^{-1}$ for 30 min to determine Cl, K, Mn and Na. By irradiation of 16 h and flux of $10^{13} \text{ n.cm}^{-2}.\text{s}^{-1}$, Au, Br, Co, Cs, Fe, Rb, Sc, Se and Zn were determined. The countings were carried out with a hiperpure(Ge) detector connected to a 4096 channels analyser and a microcomputer.

The results obtained indicate a good reproducibility. The accuracy of the method was evaluated analysing reference materials Bowen's Kale from IUPAC and Bovine Liver from NIST.

INTRODUÇÃO

Nos últimos anos a análise de elementos químicos nos tecidos biológicos tem sido objeto de grande interesse na área médica para correlacionar a presença de certos elementos com as doenças humanas.

A caracterização de elementos traços em tecidos pulmonares tem sido realizada para estudo da relação entre os efeitos da poluição ambiental, ocupacional ou do fumo com as doenças pulmonares.

Com relação aos elementos presentes nos tecidos pulmonares estes podem ser de origem exógena ou endógena.

As várias formas de materiais que se encontram na atmosfera são aspirados pelo sistema respiratório sendo que no caso dos aerossóis estes se depositam nos diferentes estágios do sistema respiratório dependendo da densidade, tamanho e forma dos particulados. As partículas maiores que 10 μ sofrem impactação e se depositam nos septos nasais e vias aéreas superiores. As partículas de 1 a 2 μ são as que apresentam maior grau de deposição. Já as partículas menores que 0,1 μ , se forem retidas, são depositadas nas pequenas vias aéreas e alvéolos.

Em geral os métodos analíticos empregados na análise de materiais biológicos devem ter o caráter de alta sensibilidade e a ativação com neutrons é um dos métodos largamente utilizado na análise de vários elementos.

Dentre os vários trabalhos apresentados na literatura sobre a análise elemental de tecidos pulmonares destaca-se o trabalho de Vanoeteren e colaboradores⁽¹⁾ que aplicando os métodos de análise por ativação com neutrons e de espectrometria de absorção atômica foram determinados 23 elementos a saber: Au, Br, Ca, Ce, Co, Cr, Cs, Cu, Eu, Fe, Hg, K, La, Mo, Na, Pb, Rb, Sb, Sc, Se, Sm, V e Zn e concluíram que estes elementos não estão distribuídos de maneira homogênea nos pulmões.

Um outro trabalho bastante interessante foi apresentado pelos pesquisadores italianos Pietra e colaboradores⁽²⁾ que determinaram pela ativação com neutrons vários elementos nas amostras de pulmão, urina, sangue e unha de um indivíduo que desenvolveu pneumoconiose por terras raras. No caso, aplicando o método destrutivo e não destrutivo de ativação com neutrons foi verificado que há um acúmulo anormal de terras raras no tecido pulmonar bem como um baixo grau de mobilidade destes elementos para as demais partes do corpo.

Mais recentemente Sabbioni e colaboradores⁽³⁾ analisaram as soluções de lavado broncoalveolar usando os métodos de análise por ativação, de espectroscopia de plasma induzido e de absorção atômica eletrotérmica. Estes pesquisadores sugerem a associação da análise por ativação dos lavados broncoalveolares aos exames clínicos para diagnóstico das doenças ocupacionais.

O objetivo do presente trabalho consiste em aplicar o método instrumental de análise por ativação com neutrons em amostras de pulmão (tecido pulmonar e linfonodos) de dois grupos de indivíduos, fumantes e não fumantes.

Nesta primeira fase do trabalho, foram definidas as condições adequadas para tratamento e a análise das amostras, tendo sido determinados Au, Br, Cl, Co, Cs, Fe, K, Mn, Na, Rb, Sb, Sc, Se e Zn em amostras de tecido pulmonar de indivíduos não fumantes.

Uma vez estabelecido o método analítico, este será aplicado nas análises de tecido pulmonar dos fumantes bem como nas análises de linfonodos.

MATERIAL E MÉTODO

Coleta das Amostras de Pulmão. As amostras foram coletadas de autópsias pelos pesquisadores do Laboratório de Poluição Atmosférica Experimental da Faculdade de Medicina da USP. Foram obtidos tecido pulmonar e linfonodos de indivíduos fumantes e não fumantes, cujas causas das mortes não foram por doenças pulmonares crônicas. As autópsias foram realizadas dentro de 6 a 12 horas post mortem sendo seccionados 10 a 30 g do tecido pulmonar macroscopicamente normal do lobo inferior direito e coletados linfonodos do hilo pulmonar para posterior análise. As amostras foram embrulhadas em folha de alumínio limpo e imediatamente congeladas em nitrogênio líquido. Foram enviadas amostras com as características (sexo, idade, procedência, hábito de fumar, profissão, causa da morte) dos indivíduos conforme mostra a Tabela 1.

Tratamento Prévio das Amostras. Para obtenção das amostras na forma sólida adequada para irradiação no reator foi feita homogeneização e desidratação a baixa temperatura adaptando as técnicas apresentadas por Iyengar e Kasperek⁽⁴⁾, Zeisler e colaboradores⁽⁵⁾ e Donev⁽⁶⁾.

A homogeneização foi feita numa "glove box" para evitar a contaminação do material. Inicialmente o tecido pulmonar congelado foi fragmentado com o auxílio de uma faca de titânio. Para o caso dos linfonodos foi removido o tecido adiposo envolvente e em seguida lavados com água bidestilada. Estas amostras foram moídas manualmente num almofariz de ágata em banho de nitrogênio líquido. Em seguida o material homogeneizado congelado foi transferido para um bequer para desidratação num liofilizador na temperatura de -40 a -50°C e pressão de 4×10^{-2} mm de Hg por um período de 30 h. A perda do peso na liofilização foi de cerca de 82%. A seguir a amostra foi transferida para um frasco de polietileno para esterilização num irradiador de ^{60}Co GAMMA CELL 220 com a taxa de dose de $9,51 \times 10^2$ Gy/h durante 20 horas. As amostras foram mantidas num dessecador.

Preparação dos Padrões Sintéticos. Os padrões sintéticos foram preparados pipetando alíquotas das soluções dos elementos sobre tiras de papel de filtro Whatman 42 e secando-as sob lâmpadas de raios infra vermelhos ou num dessecador. Estas soluções foram preparadas dissolvendo-se os elementos na forma metálica, sais ou óxidos de grau p.a com reagentes apropriados. A massa de cada elemento no padrão foi de cerca de 20 vezes maior que a massa do elemento na amostra.

Procedimento para Análise. Pesaram-se cerca de 50 mg de cada amostra em invólucros de plástico (20 X 20 mm) previamente limpos com solução de ácido nítrico 1:10 ou com álcool etílico p.a e foram irradiados no reator IEA-R1 juntamente com os padrões sintéticos. Foram realizadas duas séries de irradiações. Com a irradiação de 30 min sob fluxo de neutrons de $3,7 \times 10^{11}$ n.cm⁻².s⁻¹ e tempo de decaimento de cerca de 90 min foram analisados os elementos Cl, K, Mn e Na. Na irradiação longa de 16 h sob fluxo de 10^{13} n.cm⁻².s⁻¹ e com as contagens realizadas após 5 d e 15 d foram analisados Au, Br, Co, Cs, Fe, Rb, Sc, Se e Zn.

As contagens foram realizadas no detetor de Ge hiperpuro ligado a um analisador multicanal de 4096 canais e a um microcomputador da linha IBM/PC. A resolução do detetor utilizado foi 2,4 keV para o pico de 1332 keV do ^{60}Co e 1,15 keV para 122 keV do ^{57}Co . As análises dos espectros de raios gama foram realizadas usando programa de computação TFR, nova versão do Programa FALA⁽⁷⁾, em linguagem Pascal. A identificação dos radioisótopos pela meia vida e energia dos raios gama foi feita consultando Adams e Dams⁽⁸⁾.

Os radioisótopos com as respectivas energias dos raios gama, em keV, utilizados foram: ^{198}Au (411), ^{82}Br (777), ^{38}Cl (1642), ^{60}Co (1173), ^{134}Cs (795), ^{59}Fe (1099), ^{42}K (1524), ^{140}La (1596), ^{56}Mn (846), ^{24}Na (1368), ^{86}Rb (1077), ^{122}Sb (564), ^{46}Sc (889), ^{75}Se (264) e ^{65}Zn (1115).

Análise dos Materiais de Referência. Para examinar a exatidão e a precisão do método foram analisados os materiais de referência, a saber: Bovine Liver N° 1577 da National Institute of Standards and Technology (NIST) e Bowen's Kale da International Union of Pure and Applied Chemistry (IUPAC).

No cálculo de concentrações dos elementos nestes materiais foram consideradas as perdas de peso obtidas nas secagens executadas conforme descrito nos seus certificados (9,10). As porcentagens de perda obtidas no processo executado para Bovine Liver foi de 5,5% e para Bowen's Kale 12,8%.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Para examinar a precisão do método bem como a eficiência do pré tratamento das amostras quanto a sua homogeneização, foram realizadas pelo menos três determinações do tecido pulmonar na amostra n° 5741 e os resultados obtidos para os elementos Br, Cl, Co, Cs, Fe, K, Mn, Na, Rb, Sb, Sc, Se e Zn apresentados na Tabela 2 indicam uma boa reprodutibilidade com desvios padrões relativos variando de 2,1% a 10,5%. Somente para o elemento Au a precisão foi de 14,6% devido provavelmente a baixa concentração deste elemento na amostra ($< 1,0 \mu\text{g}/\text{kg}$). A reprodutibilidade dos resultados mostrou também que o procedimento adotado para a homogeneização foi adequado.

Na Tabela 3 são apresentados os resultados das análises dos materiais de referência Bowen's Kale e Bovine Liver juntamente com os valores dos seus certificados. Os resultados obtidos para os elementos Br, Cl, Fe, K, Mn, Na, Rb e Zn apresentaram, de um modo geral, uma boa concordância com os valores dos certificados. Os resultados menos satisfatórios foram obtidos para Au, Co, Cs e Se devido a problemas de interferências espectrais e ao erro associado a baixa estatística de contagens.

Os resultados das análises do tecido pulmonar de indivíduos não fumantes apresentados na Tabela 4 mostram que os valores encontrados estão dentro das faixas de concentração apresentadas na literatura (1,2,11). O método proposto está sendo aplicado nas demais amostras da Tabela 1.

Os resultados obtidos neste trabalho permitiram concluir que o método instrumental de análise por ativação pode ser aplicado satisfatoriamente nas análises de Au, Br, Cl, Co, Cs, Fe, K, Mn, Na, Rb, Sb, Sc, Se e Zn presentes em tecido pulmonar. Os elementos tóxicos como As, Cu, Cd e Hg não puderam ser detectados pelo método instrumental devido ao baixo teor encontrado na amostra e a alta atividade dos radioisótopos ^{82}Br , ^{38}Cl , ^{24}Na e ^{32}P (emissor beta).

AGRADECIMENTOS

Ao CNPq e a FAPESP pelo apoio financeiro.

TABELA I

Identificações das Amostras com as Características dos Indivíduos

Identif. Amostra nº	Sexo	Idade	Procedência	Hábito de Fumar	Profissão	Causa da Morte	Doença
5741	M	61 a	São Paulo	Não		Edema Agudo dos Pulmões	Infarto Agudo do Miocárdio. Hipertrofia Septal. Assimetria do Coração.
5742	M	52 a	São Paulo	Sim		Edema Agudo dos Pulmões	Insuficiência Cardíaca Congestiva Descompensada. Broncopneumonia Bilateral
5744	F	64 a	São Paulo	Não	Prendas Domésticas	Acidente Vascular Cerebral	Hipertensão Arterial Sistêmica. Arterioesclerose.
5766	F	~ 9 meses Nati-morto	São Paulo	Não		Indeterminada	
5767	F	43 a	São Paulo	Não		Indeterminada	Doença de Chagas. Miocardite Chagásica.
5770	M	44 a	São Paulo	Não	Mecânico	Edema Cerebral	Acidente Vascular Cerebral. Trombolismo Cardíaco.
6457	F	58 a	São Paulo	Não	Prendas Domésticas	Edema Agudo dos Pulmões	Infarto do Miocárdio.
6459	F	74 a	São Paulo	Não		Infarto Agudo do Miocárdio	Cardiopatia Hipertensiva.
6460	M	53 a	São Paulo	Sim	Servente Pedreiro	Edema Agudo dos Pulmões	Broncopneumonia.
6464	M	48 a	São Paulo	Sim	Pedreiro	Edema Agudo dos Pulmões	Acidente Vascular Cerebral. Cardiopatia Hipertensiva.
6535	F	62 a	São Paulo	Sim		Infarto Agudo do Miocárdio	Arterioesclerose Coronariana.

M = Masculino F = Feminino

TABELA 2

Resultados da Análise de Tecido Pulmonar nº 5741 pelo
Método Instrumental de Ativação com Neutrons

Elemento	Concentração (*) (mg/Kg)	Elemento	Concentração (*) (mg/Kg)
Au	0,00074 ± 0,00011 (4)	Mn	0,20 ± 0,02 (3)
Br	2,3 ± 0,2 (4)	Na	1953 ± 197 (5)
Cl	2368 ± 249 (5)	Rb	4,5 ± 0,1 (4)
Co	0,014 ± 0,001 (4)	Sb	0,041 ± 0,003 (4)
Cs	0,1316 ± 0,0015 (4)	Sc	0,00019 ± 0,00009 (4)
Fe	332 ± 10 (4)	Se	0,090 ± 0,004 (4)
K	1126 ± 63 (6)	Zn	9,5 ± 0,3 (4)

(*) Os resultados são os valores médios das determinações e são dados em relação ao peso do material não seco.
Os números entre parenteses indicam o número de determinações.

TABELA 3

Resultados da Análise dos Materiais de Referência
Bowen's Kale e Bovine Liver

Elemento	Bowen's Kale		Bovine Liver	
	Presente Trabalho (n = 3)	Ref (10)	Presente Trabalho (n = 2)	Ref (9)
Au ($\mu\text{g/Kg}$)	2,61 \pm 0,23	1,91 \pm 0,61	4,9 \pm 1,5	(4,9 \pm 2,3)
Br (mg/Kg)	19,1 \pm 5,9	24,6 \pm 2,3	6,8 \pm 0,2	(9,1 \pm 1,2)
Cl (mg/Kg)	**	3650	2808 \pm 159	2700
Co ($\mu\text{g/Kg}$)	110 \pm 17	62,4 \pm 11	250 \pm 10	180
Cs ($\mu\text{g/Kg}$)	91,2 \pm 5,9	77,3 \pm 0,6	18,5 \pm 9,3	(14,8 \pm 2,3)
Fe (mg/Kg)	110 \pm 10	116 \pm 17	**	268 \pm 8
K (g/Kg)	27,4 \pm 0,3	24,250	10,04 \pm 0,65	9,7 \pm 0,6
La ($\mu\text{g/Kg}$)	79,7 \pm 18,3	87,9 \pm 15,0	*	16 \pm 3
Mn (mg/Kg)	15,4 \pm 2,9	14,95	11,1 \pm 0,6	10,3 \pm 1
Na (g/Kg)	2,74 \pm 0,15	2,392	2,5 \pm 0,1	2,43 \pm 0,13
Rb (mg/Kg)	52,7 \pm 7,5	52,9 \pm 4,4	12,0 \pm 0,4	18,3 \pm 1,0
Se (mg/Kg)	0,14 \pm 0,07		0,66 \pm 0,06	1,1 \pm 0,1
Zn (mg/Kg)	34,9 \pm 2,3	32,7 \pm 2,3	130,6 \pm 0,5	130 \pm 13

* - Não detectado

** - Não determinado

Os valores entre parenteses são de referência.

n - Número de determinações.

TABELA 4

Resultados das Análises de Tecidos Pulmonares
de Três Indivíduos Não Fumantes pelo Método
Instrumental de Ativação com Neutrons

Resultados em mg/Kg

Elemento	Pulmão 5741	Pulmão 5767	Pulmão 6457	Ref (1,2,11)
Au	0,00074 \pm 0,00011	0,00183	0,00189	0,00011-0,52 (a)
Br	2,3 \pm 0,2	2,7	4,5	0,4-26,18 (b)
Cl	2368 \pm 249	1978	1782	1700-1200 (c)
Co	0,014 \pm 0,001	0,018	0,021	0,0011-1,03 (a)
Cs	0,0316 \pm 0,0015	0,05366	0,05888	0,0031-0,100 (a)
Fe	332 \pm 10	429	302	40-1510 (a)
K	1126 \pm 63	1275	1627	82-3300 (b)
Mn	0,20 \pm 0,02	0,19	0,21	3,1-1,7 (c)
Na	19 53 \pm 197	973	843	940-5620 (b)
Rb	4,5 \pm 0,1	5,6	7,1	0,77-22,0 (a)
Sb	0,041 \pm 0,003	0,04	0,06	0,0035-1,0 (a)
Sc	0,00019 \pm 0,00009	0,00276	0,00665	0,0001-0,100 (a)
Se	0,090 \pm 0,004	0,094	0,102	0,041-5,72 (a)
Zn	9,5 \pm 0,3	17	13	0,16-330 (a)

Os resultados com os desvios padrões são as médias das determinações e sem os desvios padrões indicam que foi feita uma única determinação

a - Ref (2)

b - Ref (1)

c - Ref (11)

REFERÊNCIAS

1. VANOETEREN, C.; CORNELIS, R.; VERSIECK, J.; HOSTE, J.; De ROOSE, J. Trace Element Patterns in Human Lung Tissues. In: J. Radioanal. Chem., 70(1,2): 219-38, 1982.
2. PIETRA, R.; SABBIONI, E.; UBERTALLI, L.; ORVINI, E.; VOCATURO, G.; COLOMBO, F.; ZANONI, M. Trace Elements in Tissues of a Worker Affected by Rare Earths Pneumoconiosis. A Study Carried out by Neutron Activation Analysis. In: J. Radioanal. Chem., Articles, 92(2): 241-59, Nov. 1985.
3. SABBIONI, E.; PIETRA, R.; MOUSTY, F.; COLOMBO, F.; RIZZATO, G. Trace Metals in Human Lung as Determined by Neutron Activation Analysis of Bronchoalveolar Lavage. In: J. Radioanal. Nucl. Chem., Articles, 110(2): 595-601, 1987.
4. IYENGAR, G.V.; KASPERECK, K. Application of the Brittle Fracture Technique (BGT) to Homogenise Biological Samples and Some Observations Regarding the Distribution Behaviour of the Trace Elements at Different Concentration Levels in a Biological Matrix. In: J. Radioanal. Chem., 39: 301-6, 1977.
5. ZEISLER, R.; LANGLAND, J.K.; HARRISON, S.H. Criogenic Homogenization of Biological Tissues. In: Anal. Chem., 55: 2431-4, 1983.
6. DONEV, I.Y. Rapid Homogenization and Drying of Biological Materials. In: J. Radioanal. Chem., 39: 317-22, 1977.
7. LIMA, F.W.; ATALLA, L.T. A Simple Program in "Basic" Language for Analysis of Gamma Spectra Using an on-Line Minicomputer. In: J. Radioanal. Chem., 20: 769-77, 1974.
8. ADAMS, F.; DAMS, R. A Compilation of Precisely Determined Gamma - Transition Energies of Radionuclides Produced by Reactor Irradiation. In: J. Radioanal. Chem., 3: 99-125, 1969.
9. GLADNEY, E.S.; BURNS, C.E.; PERRIN, D.R.; ROELANDTS, I.; GILLS, T.E. 1982 Compilation of Elemental Concentration Data for NBS Biological, Geological and Environmental Standard Reference Materials. NBS Special Publications: 260-288, 1984.
10. Reference Material for Trace Analysis by Radioanalytical Methods: Bowen's Kale. International Union of Pure and Applied Chemistry. Houston, USA, 1979.
11. TERAJ, M.; AKABANE, A.; MATSUMOTO, M.; HASHIMOTO, K. An Application of Neutron Activation Analysis to Biological Materials. III Natural Abundance of Small and Micro Amounts of Elements and Their Interactions on Human Tissues. In: Bull. Chem. Soc. Japan, 52(10): 2892-6, 1979.