

INSTITUTO DE PESQUISAS ENERGÉTICAS E NUCLEARES
AUTARQUIA ASSOCIADA A UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

**ESTUDO E APLICAÇÃO DA ANÁLISE POR ATIVAÇÃO SEM SEPARAÇÃO QUÍMICA
E DA CROMATOGRAFIA DE ÍONS PARA A DETERMINAÇÃO
DE SÓDIO E POTÁSSIO EM TECIDO MUSCULAR**

Esther Piltcher Haber

Dissertação apresentada como parte dos
requisitos para obtenção do Grau de
"Mestre na Área de Concentração em
Tecnologia Nuclear Básica".

Orientadora: Dra. Laura Tognoli Atalla

SÃO PAULO
1984

INSTITUTO DE PESQUISAS ENERGÉTICAS E NUCLEARES
AUTARQUIA ASSOCIADA A UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

**ESTUDO E APLICAÇÃO DA ANÁLISE POR ATIVAÇÃO SEM SEPARAÇÃO QUÍMICA
E DA CROMATOGRAFIA DE ÍONS PARA A DETERMINAÇÃO
DE SÓDIO E POTÁSSIO EM TECIDO MUSCULAR**

Esther Piltcher Haber

**Dissertação apresentada como parte dos
requisitos para obtenção do Grau de
"Mestre na Área de Concentração em
Tecnologia Nuclear Básica".**

Orientadora: Dra. Laura Tognoli Atalla

SÃO PAULO

1984

AGRADECIMENTOS

- Dr. Durvaldo Gonçalves
Superintendente do Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares - CHEN/SP
- Prof. Dr. Fausto Walter de Lima
Diretor de Aplicações de Técnicas Nucleares
- Dr. Paolo Bartolini
Chefe da Divisão de Medicina
- Dra. Maria José Coutinho Nastasi
Chefe da Divisão de Radioquímica
- Dr. Alcidio Abrão
Chefe do Departamento de Engenharia Química
- Dr. Júlio Kieffer
- Célia da Silva Requejo, M.Sc.
- Dra. Marina Beatriz Agostini Vasconcellos
- Dr. José Roberto Rogero
- Maria Aparecida Faustino Pires, M.Sc.
- Colegas da Divisão de Radioquímica, Divisão de Monitoração Pessoal e Divisão de Reatores e Experimentação Nucleares

- Colegas do Departamento de Engenharia Química
- Colegas da Divisão de Medicina e Divisão de Radiobiologia

A todos agradeço pela orientação,
sugestões, colaboração e
estímulo.

À Dra. Laura Tognoli Atalla,
orientadora da dissertação,
um agradecimento especial pelo
apoio, constante interesse,
estímulo e auxílio no decorrer
desta dissertação.

A meus avôs,

A minha mãe

e a minha irmã,

pelo apoio constante

e compreensão.

SUMARIO

	página
RESUMO.....	I
ABSTRACT.....	III
CAPITULO I - INTRODUÇÃO.....	1
CAPÍTULO II - TÉCNICAS ANALÍTICAS USADAS E SUAS APLI- CAÇÕES MÉDICAS.....	9
II.1. Análise por Ativação.....	9
II.1.1. Princípio.....	9
II.1.2. Aplicações Médicas.....	11
A. Na determinação da concentração de elementos em tecidos e fluídos cor- póreos.....	12
B. Na investigação da relação entre a concentração anormal de determinado elemento com uma certa doença.....	12
C. Na investigação em estudos epidemi- lógicos.....	13
D. No estudo das funções metabólicas..	15
E. Na investigação em toxicologia.....	15
F. No uso de traçadores estáveis e aná- lise por ativação para diagnósticos " in vivo ".....	16
G. Na investigação individual.....	18
H. Nas aplicações da análise por ati- vação " in vivo ".....	18

	página
II.2. Cromatografia de Íons.....	20
III.2.1. Princípio.....	20
II.3. Vantagens e desvantagens das duas técnicas analíticas.....	22
CAPÍTULO III - PARTE EXPERIMENTAL.....	26
III.1. Análise por Ativação.....	26
III.1.1. Equipamento.....	26
III.1.2. Identificação e Cálculo das áreas dos picos.....	27
III.1.3. Cálculo da concentração dos elementos.....	27
III.1.4. Padrões utilizados.....	28
III.1.5. Preparação das amostras para a irradiação.....	29
III.1.6. Procedimentos para a irradiação.....	30
III.1.7. Limite de determinação.....	32
III.1.8. Comparação dos espectros de raios gama obtidos no cintilador de NaI(Tl) e detector de Ge(Li).....	33
III.2. Cromatografia de Íons.....	34
III.2.1. Equipamento.....	34
III.2.2. Reagentes.....	36
III.2.3. Digestão química das amostras e do padrão.....	36

	página
III.2.4. Identificação e Quantificação dos pi cos.....	37
III.2.5. Procedimentos para a análise por Cro matografia de Íons.....	38
CAPÍTULO IV - RESULTADOS.....	44
CAPÍTULO V - DISCUSSÃO E CONCLUSÕES.....	58
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	62

ESTUDO E APLICAÇÃO DA ANÁLISE POR ATIVAÇÃO SEM SEPARAÇÃO QUÍMICA E DA CROMATOGRAFIA DE IONS PARA DETERMINAÇÃO DE SÓDIO E POTÁSSIO EM TECIDO MUSCULAR.

Esther Piltcher Haber

RESUMO

Apresenta-se a possibilidade da determinação simultânea de Na e K em pequenas amostras de tecido muscular por dois métodos que permitem a obtenção de resultados num período de tempo curto: Análise por Ativação e Cromatografia de Ions.

Para a Análise por Ativação usaram-se irradiações de 30 minutos em fluxo de $5 \times 10^{11} \text{ n cm}^{-2} \text{ s}^{-1}$ e as atividades do ^{24}Na e ^{42}K induzidas foram determinadas, sem separação química, num detector de Ge(Li) acoplado a um multi-analisador, permitiu analisar e comparar os espectros de raios gama registrados para as amostras e os padrões.

Para as análises por Cromatografia de Íons, as amostras e os padrões foram dissolvidos e as soluções foram injetadas no aparelho. Os íons foram separados por um sistema de colunas trocadoras de íons e as concentrações foram medidas por condutividade.

Apresentam-se as vantagens e desvantagens dos dois métodos em comparação com outros também usados na determinação de Na e K em amostras biológicas.

Os dois métodos analíticos aplicados foram comparados entre si no que diz respeito à sensibilidade, exatidão e precisão de cada um, tempo exigido para a análise, simplicidade e custo.

Do ponto de vista da confiabilidade dos resultados, as duas técnicas são excelentes e podem ser de grande valia em pesquisas médicas.

STUDY AND APPLICATION OF ION CHROMATOGRAPHY AND ACTIVATION
ANALYSIS WITHOUT CHEMICAL SEPARATION FOR THE DETERMINATION OF
SODIUM AND POTASSIUM IN MUSCLE TISSUE.

Esther Piltcher Haber

ABSTRACTS

The simultaneous determination of Na and K in small amounts of muscular tissue by use of two methods, namely Activation Analysis and Ion Chromatography, is presented.

For the Activation Analysis the samples were irradiated for 30 minutes in a $5 \times 10^{-11} \text{ n cm}^{-2} \text{ s}^{-1}$ flux. The induced activities of ^{24}Na and ^{42}K were determined, without chemical separation, using a Ge(Li) detector equipped with a 4096 channel analyser on-line with a computer. The gamma ray spectra registered from the samples and standards were analysed and compared by the computer.

For the Ion Chromatography analysis the samples and standards in solution were injected into the apparatus. The ions were separated by an ion-exchange system of columns and the concentrations were measured by conductivity.

In addition, the two analytical methods were compared in regard to sensitivity, precision and accuracy as well as simplicity, cost and working time involved in the analysis.

From the point of view of the reliability of the results confidence, both techniques proved to be excellent and might be of great value in medical research.

CAPÍTULO I

INTRODUÇÃO

As alterações do metabolismo de água e eletrólitos, nas fases iniciais de seu estudo, eram interpretadas a partir do conhecimento da concentração de eletrólitos no plasma ou no soro. Observou-se, porém, com o correr do tempo, que tal processo não era satisfatório porque, não raramente, a concentração de íons no plasma ou no soro parecia não manter relação com sua quantidade total presente no corpo. Deixava também a desejar o fato de as interpretações desses distúrbios serem baseadas apenas na concentração de eletrólitos no plasma, que é uma porção relativamente pequena do volume do líquido extracelular, o qual, por sua vez, é uma fração do volume de água total no corpo.

Aos poucos, aprimoraram-se os conhecimentos a respeito do metabolismo hidroeletrolítico na espécie humana pelo uso de três conjuntos de métodos laboratoriais : 1) balanço de água, eletrólitos e outras substâncias ; 2) medidas das quantidades totais de água por método de diluição de certas substâncias como antipirina, água deuterada e de trício e de eletrólitos pela administração dos respectivos isótopos radioativos e 3) análise do teor de água e eletrólitos em tecidos.

Com relação à análise em tecidos na espécie humana, as mensurações nas biópsias de músculo irão contribuir na investigação dos distúrbios do fluido intracelular e no balanço de eletrólitos em pacientes com miopatias metabólicas (doenças musculares) e distúrbios ácido-base incluindo insuficiência renal.

Pela abundância de tecido muscular, bastante acessível e de composição relativamente constante, ambos os metabolismos, hidrossalino e energético, podem ser facilmente estudados nesse tipo de tecido.

Grande número de pesquisadores, há mais ou menos quatro décadas, tem se preocupado com as mais variadas condições e diferentes aspectos do metabolismo do sódio e potássio.

A utilização da técnica do balanço metabólico na maioria dos trabalhos realizados não permitiu verificar, até agora, a existência de modificações na distribuição de água e eletrólitos que por ventura possam ocorrer entre os diferentes compartimentos teciduais. Segundo Machado⁽⁴⁹⁾, a avaliação das alterações que se processam ao nível dos tecidos só pode ser feita por meio da análise direta destes tecidos.

Nas décadas de 50 e 60, diversos pesquisadores, interessados nas repercussões metabólicas pós-traumáticas, realizaram trabalhos baseados na análise das alterações hidroeletrólíticas teciduais, utilizando principalmente o tecido muscular como representativo da massa celular corpórea. Tendo em vista as dificuldades técnicas no estudo

do teor de sódio e potássio tecidual, apresentam-se na Tabela I-1 os resultados obtidos em alguns trabalhos, a fim de dar ao leitor uma noção genérica dos valores observados em condições normais de saúde. A técnica de amostragem utilizada por esses autores consiste em retirar um fragmento de tecido por meio de biópsia ou durante uma operação eletiva após o que esses fragmentos são submetidos à dosagem do teor de sódio e potássio tecidual. Observa-se, na Tabela I-1, que os valores obtidos por meio das mais variadas técnicas de dosagem do sódio e do potássio muscular diferem pouco entre si.

Com a introdução por Bergstrom⁽¹³⁾ da técnica de biópsia por agulha, tornou-se possível obter pequenas amostras (8 a 30 mg de material fresco) sem uma operação cirúrgica e sem trauma excessivo ao paciente. Alguns cuidados, porém, devem ser tomados com estas amostras para remover o tecido conectivo e o sangue pois a presença destes causa variações nos resultados.

Litchfield e Gaddie⁽⁴⁷⁾ alegam que a composição da amostra é constante e independe do local de sua remoção. Dubois e Collard⁽³³⁾ concordam com este argumento, desde que não haja muito tecido conectivo e gordura no fragmento considerado.

Tendo em vista a pequena massa de amostra disponível, torna-se necessário o uso de um método analítico bastante sensível para a determinação do elemento de interesse. Além disso, é muito vantajoso um método que permita a análise simultânea de vários elementos, levando em conta que o fator tempo é muito importante na obtenção de

um diagnóstico. Com este objetivo, apresenta-se no presente trabalho a possibilidade de aplicação de dois métodos alternativos para a análise de Na e K em material biológico: análise por ativação com nêutrons e cromatografia de íons. De um modo geral, os dois métodos permitem analisar sódio e potássio simultaneamente com boa sensibilidade, precisão e exatidão.

A análise por ativação já foi usada em 1957 por Reiffel e Stone⁽⁶⁵⁾ que foram os primeiros a aplicar essa técnica não-destrutiva para determinar Na e K em pequenas amostras de tecido de músculo obtidas com biópsia de agulha. O tempo de irradiação usado por esses pesquisadores foi de 12 horas em um reator com fluxo de nêutrons de $1,3 \times 10^{13} \text{ n cm}^{-2} \text{ s}^{-1}$. As atividades induzidas de ^{24}Na e ^{42}K foram determinadas com o emprego de um contador Geiger-Müller e filtros de absorção adequados.

Em 1962, Bergstrom⁽¹³⁾ determinou Na e K não-destrutivamente em amostras de tecido muscular de adulto obtidas por biópsia de agulha. O tempo de irradiação da amostra foi de 40 minutos, em um reator nuclear com fluxo de $6 \times 10^{11} \text{ n cm}^{-2} \text{ s}^{-1}$. Por meio de espectrometria gama foi possível medir a radiação gama emitida pelo ^{24}Na . As contagens foram feitas utilizando um cristal de NaI(Tl) acoplado a um analisador de altura de pulsos mono-canal, após 8 horas de resfriamento. A baixa resolução do detector não permitiu a discriminação entre o ^{24}Na e o ^{42}K formados, porque o foto-pico do ^{42}K (1,51 MeV) é próximo ao do ^{24}Na (1,37 MeV) e a atividade do ^{42}K é baixa comparada com a atividade do ^{24}Na . Um contador Geiger com filtros de absorção adequados foi

usado para a mensuração da atividade beta do ^{42}K , à semelhança do método empregado por Reiffel e Stone⁽⁶⁵⁾ para a discriminação entre Na e K em material biológico.

Dubois e Collard⁽³³⁾, em 1966, empregaram o mesmo método usado por Bergstrom para a análise de tecido muscular em crianças. Após 30 minutos de irradiação em um reator nuclear com fluxo de $4 \times 10^{11} \text{ n cm}^{-2} \text{ s}^{-1}$, as medidas da atividade de ^{24}Na foram feitas em um detector de NaI (Tl) de $7,5 \times 7,5 \text{ cm}$, acoplado a um analisador de 400 canais. A atividade do ^{42}K foi medida num contador Geiger-Müller. Nessas condições, os autores obtiveram resultados concordantes com os obtidos por meio de fotometria de chama que é um dos métodos analíticos clássicos.

Com a introdução do detector de estado sólido de Ge(Li), Rancitelli⁽⁶⁴⁾, em 1969, pôde desenvolver um método de análise por ativação com nêutrons puramente instrumental em uma variedade de amostras biológicas como tecido muscular humano, músculos de boi e de peixe. As amostras foram irradiadas em um fluxo de $2 \times 10^{15} \text{ n cm}^{-2} \text{ s}^{-1}$ e as atividades de ^{24}Na e ^{42}K induzidas foram determinadas por meio de um detector de Ge(Li). Graças ao poder de resolução deste detector, ficou minimizado um dos maiores problemas da análise por ativação multielementar que era o da interferência entre radioisótopos que emitem raios gama com energias muito próximas.

A partir de então, vários autores^(51, 52, 63) utilizaram-se deste método para a determinação de diferentes elementos em amostras de tecidos musculares.

A sensibilidade da análise por ativação é suficientemente alta para permitir a análise quantitativa de elementos que se encontram abaixo do limiar de detecção de outras técnicas de química analítica clássica, possibilitando assim a análise de pequenas amostras de músculo tais como as obtidas por biópsia de agulha.

O uso dos detectores de Ge(Li) apresenta vantagens e desvantagens em relação ao uso dos cristais de NaI(Tl). Os detectores de Ge(Li), pela sua alta resolução, permitem registrar as atividades do ^{24}Na e do ^{42}K sem interferência mútua; por outro lado, o tempo de contagem deve ser bem maior porque a eficiência é relativamente baixa.

Levando em conta que cerca de 48 horas são necessárias para o preparo da amostra que envolve secagem, pulverização e homogeneização do material, é importante a escolha de um método analítico rápido. Por este motivo, optou-se pelo uso de detector de Ge(Li) que, embora exija um tempo de contagem maior, permite a análise direta da amostra, sem qualquer separação química.

Os tempos de irradiação, resfriamento e contagem das amostras são determinados em função da meia-vida dos radionuclídeos que se formam na irradiação e da secção de choque e concentração dos elementos que serão analisados.

Os padrões usados nesta pesquisa foram escolhidos em função da concentração de Na e K nos padrões disponíveis na Divisão de Radioquímica do IPEN-CNEN/SP. Além disso, tomou-se o cuidado de escolher um padrão cuja composição química se aproximasse da composição das amostras de mús

culo em pó. O mesmo padrão foi usado para os dois métodos analíticos estudados.

O segundo método, a cromatografia de íons, é uma nova técnica analítica onde os íons a serem analisados são separados em uma coluna de troca iônica. Uma vez separados, os íons são detectados e medidos por condutividade elétrica. A sensibilidade do método para Na e K é bastante alta, permitindo a determinação simultânea de partes por milhão de cada um desses elementos na solução da amostra.

A cromatografia de íons foi pouco usada no campo das ciências médicas. Foi aplicada por Anderson⁽⁵⁾, em 1976, para a análise de fluídos biológicos e por Rehfeld e Loken⁽⁶⁶⁾, em 1980, na determinação de alguns elementos em soro sanguíneo. É uma técnica bastante rápida porque, para ser aplicada, só exige a dissolução da amostra. Nesta operação devem ser tomados os cuidados indispensáveis para evitar a contaminação da amostra.

Todos esses fatores - tempo, facilidade operacional, qualidade dos resultados quanto à precisão e exatidão - foram considerados no desenvolvimento do presente trabalho com o objetivo de apresentar um método analítico para Na e K que seja compatível com o tamanho das amostras de que se pode dispor e com a confiabilidade exigida nos resultados.

TABELA I-1. QUADRO SINÓTICO DOS TEORES DE SÓDIO E POTÁSSIO ENCONTRADOS POR VÁRIOS AUTORES EM FRAGMENTOS DE TECIDO MUSCULAR ESQUELÉTICO SECO.

POTÁSSIO %	SÓDIO %	TÉCNICA USADA	REFERÊNCIA
1,91	0,267	FC	50
1,83	0,320	FC	47
1,74	0,260	AN	13
1,73	0,593	AN	33
1,44	0,302	AN	65
1,14	0,173 *	AN	64
1,70	0,350	AN	10

(*) Músculo de boi

Todos os demais valores referem-se a músculos humanos.

FC = Fotometria de chama

AN = Ativação com nêutrons

CAPITULO II

TÉCNICAS ANALÍTICAS USADAS E SUAS APLICAÇÕES MÉDICAS.

Faz-se neste Capítulo uma descrição breve das duas técnicas analíticas usadas e suas aplicações em pesquisas na área das ciências médicas. Faz-se também uma apreciação das vantagens e desvantagens das duas técnicas em relação a outras técnicas analíticas.

II-1. Análise por Ativação (AA)

II.1.1. Princípio

Quando determinado material é exposto ao bombardeio com nêutrons térmicos, os elementos presentes na amostra podem ser determinados, qualitativa e quantitativamente, pelas radiações emitidas por radioelementos formados pela ativação neutrônica.

A natureza e as energias das radiações emitidas, bem como as meias-vidas dos radioelementos formados permitem uma análise qualitativa.

A determinação quantitativa é fundamentada no fato de que , em condições bem definidas de irradiação e de contagem, a atividade do radioelemento formado é proporcional à massa do elemento pai que foi ativado.

No método de análise por ativação comparativa, um padrão de massa conhecida do elemento de interesse é irradiado simultaneamente com a amostra.

Tem-se então :

$$\frac{A_a}{A_p} = \frac{M_a}{M_p} \quad \therefore \quad M_a = \frac{A_a}{A_p} \cdot M_p$$

onde :

A_a = atividade do elemento ativado na amostra

A_p = atividade do elemento ativado no padrão

M_a = massa do elemento na amostra

M_p = massa do elemento no padrão

As atividades induzidas na amostra e no padrão devem ser determinadas no mesmo detector e nas mesmas condições de geometria, isto é, devem ser medidas com o mesmo coeficiente de eficiência.

II-1.2. Aplicações Médicas

Algumas técnicas de análise química permitem a determinação de elementos constituintes apenas em grandes amostras. Quando podem se obter apenas amostras com alguns miligramas, como é o caso da punção de líquidos, em olhos e biópsias de tecidos, é necessário um método com alta sensibilidade. A técnica da ativação com nêutrons parece especialmente indicada para este propósito e tem sido usada com sucesso por diferentes autores para a determinação de vários elementos, entre os quais sódio e potássio. Todos os elementos conhecidos como essenciais ao homem (Ca, Cl, Co, Cr, Cu, Fe, I, K, Mg, Mn, Mo, Na, P, S, Se e Zn) têm sido determinados por análise por ativação.

Spencer, Mitchell e King⁽⁷⁴⁾ descrevem o uso do método na análise de elementos presentes no sangue. Trabalhos semelhantes discutem o uso da AA na determinação de elementos de interesse para o estudo dos músculos esquelético e cardíaco^(46,63), em tecidos da placenta⁽²⁹⁾ e em saliva⁽¹²⁾ e urina⁽¹⁵⁾. Nixon e cols⁽⁵⁶⁾ e Samsbhl e Soremark⁽⁶⁸⁾ dão informações gerais sobre o uso do método da AA para analisar o conteúdo de alguns elementos nos dentes.

Nos últimos anos, os pesquisadores nas áreas médicas e biológicas têm levado mais em consideração a possibilidade de certos elementos terem função importante na fisiologia e patologia. Conseqüentemente, a análise por ativação foi usada para resolver vários tipos de problemas que são descritos a seguir.

A. Na determinação da concentração de elemen
tos em tecidos e fluidos corpóreos.

Bowen⁽¹⁸⁾ compilou, em 1963, uma listagem de 62 elementos conhecidos por estarem presentes no sangue, eritrócitos, plasma e soro. Essa publicação é de importância considerável pois fornece os níveis de concentração dos ele
mentos nos materiais citados e tem servido como guia no uso
da análise por ativação para determinar os níveis dos elemen
tos em vários tecidos humanos e de animais e em fluidos cor
póreos.

Em adição a este estudo, Wester⁽⁷⁹⁾ publicou
um trabalho de determinação simultânea de quantidades mui
to baixas (microgramas ou menos) de As, Sb, Ba, Br, Cd, Ca,
Cl, Cs, Co, Cu, Au, P, K, Na, Ag e Zn em coração de bois (te
cido condutivo e tecido muscular), Feldman e outros⁽³⁴⁾ usa
ram a análise por ativação para a microdeterminação de vários
elementos, especialmente fluor, em meio bacteriológico.

B. Na investigação da relação entre a concentra
ção anormal de determinado elemento com
uma certa doença.

Recentemente, vários pesquisadores observaram
uma aparente relação entre o teor de elementos e cer
tos tipos de doenças. Como resultado, diversas hipóteses tem

sido desenvolvidas sobre o papel de certos elementos na incidência do câncer, hipertensão, artrite, esclerose múltipla, fibrose cística, desidratação por gastro-enterite aguda e outras doenças. Alguns pesquisadores consideram a análise por ativação como a técnica mais importante para este tipo de pesquisa, por ser sensível e requerer apenas pequenas quantidades de material para uma análise. Algumas aplicações importantes da análise por ativação na área de pesquisas médicas relacionadas com este tipo de estudo se encontram na Tabela II-1.

C. Na investigação em estudos epidemiológicos.

O estudo das relações existentes entre os elementos no ambiente e várias doenças de caráter epidêmico tornou-se importante para certos pesquisadores médicos. Alguns trabalhos nesta área mostraram que a técnica de ativação com nêutrons pode ser vantajosamente usada em investigações epidemiológicas. Os resultados de um estudo epidemiológico em cáries dentárias realizado entre as crianças escolares no Estado de Oregon mostraram que o selênio presente no leite pode ser o fator responsável no aumento da suscetibilidade às cáries dentárias⁽³⁷⁾. Em outros estudos, Allaway e Cary⁽²⁾ mostraram que a atividade biológica do selênio, em certas dietas para animais, pode estar relacionada com a prevenção de distrofias musculares e doenças nutricionais.

TABELA II-1 - APLICAÇÕES DA ANÁLISE POR ATIVAÇÃO NA INVESTIGAÇÃO DA RELAÇÃO ENTRE A CONCENTRAÇÃO NORMAL DE DETERMINADO ELEMENTO COM UMA CERTA DOENÇA.

DOENÇA	TECIDO OU FLUÍDO ANALISADO	ELEMENTO DE INTERESSE	PESQUISADORES
Fibrose cística em crianças.	unhas	Na, Cl	ANDERSEN, GAREIS (4) BABB e Cols. (8)
Câncer de mama	tecidos	Cu, Mg, S, Ca, P	DE JORGE e Cols. (30)
	tecidos	Na, Br, Zn, Cr	ALLEN e Cols. (3)
Leucemia	leucócitos	Cd, Sb, Ce	BOWEN (17)
Desordens hidroeletrólíticas.	músculo	Na, Cl	DUBOIS e Cols. (33) BERGSTROM (13)
Doenças Ósseas	osso	Ca, Na, K	HISLOP e Cols. (38) BRATTER e Cols. (19)
Doenças Pulmonares	tecido pulmonar	Fe, Co, Br, P, Se, Ag, Zn, Cs, Sc, V e Sb	PERKINS e Cols. (59)
Necrose hepática	fígado	Cu, Zn	DANG e Cols. (28)
Aterosclerose	vasos sanguíneos	V, Zn	STRAIN e Cols. (76)

D. No estudo das funções metabólicas

Existe bastante interesse na aplicação da técnica de ativação com nêutrons para obter informações sobre as alterações químicas que ocorrem nos organismos vivos e por meio das quais a energia é liberada para as atividades e processos vitais. Como exemplo podem ser citados os trabalhos de Cottino e cols.⁽²⁵⁾ sobre o metabolismo do iodo no homem; de Sklavenitis e Comar⁽⁷⁰⁾ para esclarecer o metabolismo do brometo também no homem e o de Sabbioni e cols.⁽⁶⁷⁾ para estudar o comportamento do vanádio no sangue humano.

E. Na investigação em toxicologia

Alguns pesquisadores já estabeleceram o método de análise por ativação como uma técnica ideal para estudos em toxicologia. Nesse campo, podem ser citados os trabalhos de Leniham e Smith⁽⁴²⁾, Christell e cols.⁽²²⁾ e Sjöstrand⁽⁶⁹⁾ que concluíram que a técnica de análise por ativação é excelente para investigar os casos de intoxicação por arsênio. Aplicando esta mesma técnica, Sjöstrand⁽⁶⁹⁾, Smith⁽⁷²⁾ e Westermarck e Sjöstrand⁽⁸⁰⁾ estudaram a toxidez de Sb, Cd e Hg.

Além disso, a análise por ativação tem

sido aplicada para determinar e controlar a ocorrência de riscos à saúde de trabalhadores de minas e indústrias de manufatura. Exemplos típicos deste tipo de aplicação são encontrados nos trabalhos publicados por Leniham, Smith e Chalmers⁽⁴³⁾ que determinaram arsênio em detergentes; por Christell e cols.⁽²²⁾ na determinação de mercúrio em vários tipos de produtos industriais, na Suécia; por Twitty e Bobach⁽⁷⁷⁾ sobre a determinação de tório em urina em trabalhadores expostos a este elemento; por Clemente e cols.⁽²³⁾ sobre a composição de elementos traços no cabelo de habitantes de diferentes regiões da Itália, já que, segundo os autores, o cabelo pode ser considerado um indicador prático tanto da influência orgânica quanto da exposição a poluentes ambientais; por Jervis e Tiefenbach⁽³⁹⁾ sobre o acúmulo de arsênio em trabalhadores e indivíduos que moram próximo a fundições de ouro; por Brune e cols.⁽²⁰⁾ sobre o acúmulo de metais pesados em organismos de trabalhadores que foram expostos a estes elementos na indústria; por Atalla e cols.⁽⁷⁾ sobre a concentração de arsênio em vários materiais (sangue, urina, unhas e cabelos), colhidos em trabalhadores de usinas de arsênio.

F. No uso de traçadores estáveis e análise por ativação para diagnósticos "in vivo".

Alguns pesquisadores consideram impraticável o uso de traçadores radioativos em estudos para diagnós

ticos de funções corpóreas, especialmente quando estas funções devem ser avaliadas em recém-nascidos e mulheres grávidas. Em conseqüência, optaram por administrar oralmente ou injetar endovenosamente traçadores biológicos compostos de amostras altamente enriquecidas de um isótopo de baixa abundância para efetuar os diagnósticos. A investigação por meio do traçador biológico estável difere daquela que faz uso de traçador biológico radioativo pelo fato de que este último é geralmente detectado " in vivo " por detectores de radiação externa, enquanto que a concentração do traçador estável é determinada em uma amostra removida do paciente pelo método de análise por ativação.

Greene⁽³⁶⁾ revisou o uso de traçadores estáveis e análise por ativação para a investigação de diagnóstico. Elementos de interesse biológico, tais como cálcio, cromo, ouro, ferro, selênio e estrôncio têm sido usados nos trabalhos com traçadores estáveis. Por exemplo, Peisach e Pretoris⁽⁵⁹⁾ aplicaram cálcio enriquecido isotopicamente em ^{48}Ca , no estudo do metabolismo mineral do homem. Bethard e cols.⁽¹⁴⁾ publicaram um trabalho sobre o uso de isótopos de cálcio e da análise por ativação para estudar o metabolismo do cálcio em crianças. Lowman e Knivt⁽⁴⁸⁾ realizaram experimentos com ferro enriquecido em ^{58}Fe para determinar o teor de Fe no plasma. Laconi, Brancato e Melfi⁽⁴⁰⁾ aplicaram o ^{197}Au coloidal em experimentos para medir o fluxo sanguíneo hepático. Wagner, Nelp e Dowling⁽⁷⁸⁾ usaram como traçadores isótopos estáveis de iodo e ativação com nêutrons para estudar a captação de iodo na glândula tireóide.

G. Na identificação individual

A eficiência do método para estabelecer características individuais foi demonstrada nos estudos feitos por Smith, Forshufvud e Wassen⁽⁷³⁾ sobre o conteúdo de arsênio no cabelo de Napoleão I e suas interpretações com respeito à doença do imperador durante o período de 1806 a 1821. A partir dessa publicação, vários pesquisadores têm examinado cabelo, unhas e outros materiais no intuito de auxiliar a identificação de indivíduos para atender investigações relacionadas com a ciência forense. Os estudos feitos por Bates e Dyer⁽⁹⁾ contêm uma quantidade considerável de informações nesta área. Entre eles destacam-se os estudos extensivos sobre os vários procedimentos que devem ser usados para remover e caracterizar os contaminantes da superfície do cabelo para que este material possa ser usado na identificação de indivíduos. Lima e cols.⁽⁴⁵⁾ também contribuíram neste campo com algumas investigações a cerca do problema de individualização do cabelo humano.

H. Nas aplicações de análise por ativação " in vivo "

Alguns pesquisadores médicos sugerem a

análise por ativação " in vivo " como um excelente método não-destrutivo que pode ser usado para (a) medir o conteúdo de elementos presentes no organismo em baixas concentrações e que são considerados importantes à saúde do homem ou (b) de determinar a quantidade total de um elemento em um órgão.

A ativação com nêutrons " in vivo " quer seja corpórea total ou de determinados órgãos, pode ser feita com nêutrons derivados de cíclotrons, geradores de nêutrons ou fontes radioativas isotópicas tais como ^{252}Cf . As partes do corpo selecionadas para ativação com nêutrons corpórea parcial são a mão, o braço e o tronco. A escolha entre as várias técnicas de ativação corpórea total e corpórea parcial depende do objetivo do estudo e da disponibilidade de equipamento apropriado⁽²⁴⁾.

Os estudos realizados por Anderson e cols.⁽⁶⁾, Battye e cols.⁽¹¹⁾, Newton⁽⁵⁵⁾ e Spinks e cols.⁽⁷⁵⁾ relacionam-se com a medida do conteúdo total de sódio, cálcio e cloro no organismo humano. Em estudos semelhantes, Palmer e cols.⁽⁵⁷⁾ e Nelp e cols.⁽⁵⁴⁾ demonstraram as possibilidades de aplicação do método para determinar a quantidade total de sódio e cálcio no organismo.

Chamberlain e cols.⁽²¹⁾ bem como Spinks e cols.⁽⁷⁵⁾ usaram a análise por ativação " in vivo " e contador de corpo inteiro para diagnosticar desordens do esqueleto para medição do cálcio. Semelhantemente, Nelp e seus colegas⁽⁵⁴⁾ mediram a taxa de descalcificação do esqueleto em osteoporose e osteomalácia. Lenham e cols.⁽⁴¹⁾ e Boddy e Alexander⁽¹⁶⁾ aplicaram a técnica de análise por ativação " in vivo " para determinar a quantidade de iodo presente na glândula tireóide.

II.2. Cromatografia de Íons

II-2.1. Princípio

Há poucos anos, Small e colaboradores⁽⁷¹⁾ desenvolveram a cromatografia de íons como técnica analítica. Esta técnica usa o princípio clássico da troca iônica para separar os íons de interesse em uma amostra, geralmente com duas colunas em série. A primeira coluna contém uma resina de pequena capacidade (do tipo pelicular) cuja função é separar os íons da amostra depois de dissolvida. A solução passa, em seguida, por uma segunda coluna que contém resina com alta capacidade de troca, denominada "coluna supressora". A função da coluna supressora é remover ou suprimir os íons do eluente usado para a separação transformando as espécies eluídas numa forma que não interfira na medida da condutividade elétrica dos íons de interesse (ácidos ou bases diluídas). Os picos correspondentes são registrados e/ou integrados.

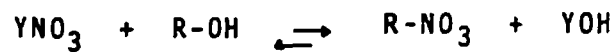
Para ilustrar a supressão dos íons no eluente vamos considerar, por exemplo, a análise de uma amostra biológica contendo Na^+ , NH_4^+ e K^+ . Depois de injetar a solução da amostra (100 μL), bombeia-se ácido nítrico diluído através da coluna de separação. Esta contém um trocador catiônico na forma ácida, onde o H^+ será trocado por Na^+ , NH_4^+ e K^+ . Os íons são separados no leito de troca iônica de acor

do com a sua seletividade e saem da coluna como nitratos, em tempos diferentes. Quando essa mistura de íons e o eluente entram na segunda coluna que contém uma resina aniônica forte na forma OH^- , acontecem duas reações importantes.

(a) com o eluente:



(b) os nitratos dos metais alcalinos e NH_4^+ são convertidos em hidróxidos:



onde R = resina; Y = Na^+ , K^+ , NH_4^+ , etc.

Assim, os ânions do eluente são removidos e somente a solução dos hidróxidos passa para a célula de condutividade onde os cátions são identificados pela medida do tempo de retenção e quantificados pela altura ou área do pico.

Para a separação de uma série de ânions usa-se um trocador aniônico na forma HCO_3^- na coluna separadora e NaHCO_3 como eluente. Neste caso, os íons Na^+ do eluente são

trocados pelos íons H^+ na resina supressora, deixando H_2CO_3 no efluente. A coluna supressora também converte os ânions da amostra em ácidos antes destes atingirem o detector.

As reações que ocorrem são:



(onde $X = F^-, Cl^-, PO_4^{-3}, SO_4^{-2}, \dots$)

II-3. Vantagens e desvantagens das duas técnicas analíticas.

A técnica de ativação com nêutrons pode ser realizada com a ajuda de separação radioquímica ou diretamente na amostra sem qualquer tratamento. A análise por ativação com separação radioquímica exige um gasto maior de tempo e de reagentes, além de maior exposição do operador à radiação. Por esses motivos, para análises de rotina de grande número de amostras, a ativação com nêutrons e análise instrumental da amostra é mais aconselhável.

Alguns pesquisadores enfatizam o uso do mê todo instrumental ou não-destrutivo de análise, como sendo uma técnica ideal para certas determinações. O método de análise por ativação não-destrutivo é limitado, porém, à

determinação de apenas alguns elementos e é altamente dependente da composição da amostra e da resolução do detector usado.

A análise por ativação instrumental de materiais biológicos, empregando espectrometria de raios gama com detectores de estado sólido de Ge(Li), tem se mostrado um método sensível, exato e preciso de análise dos elementos constituintes. Segundo Nadkarni ⁽⁵²⁾, a versatilidade do método permite a determinação de cerca de 36 elementos, dentre os quais Na e K, em uma simples amostra de material biológico, sem recorrer a separações químicas.

Uma técnica analítica alternativa à análise por ativação, bastante usada em laboratórios médicos, é a fotometria de chama. É um método sensível, econômico e mais rápido se apenas um elemento deve ser analisado. No entanto, o tempo para uma análise multi-elementar é menor com a análise por ativação, fator de importância quando há necessidade de um grande número de análises, especialmente quando estas envolvem amostras muito pequenas de tecido ou se há necessidade de um método não-destrutivo. Alguns autores ^(10,13,33,61) compararam as duas técnicas analíticas e obtiveram resultados concordantes.

Dois outras técnicas analíticas, espectroscopia de emissão e de absorção atômica, têm sido usadas em análises de material biológico. Entretanto, requerem um tratamento prévio da amostra com consequentes riscos de contaminação. A análise por ativação instrumental envolve um mínimo de manuseio da amostra antes da irradiação e não requer qualquer manuseio pós-irradiação exceto o acondicionamento da amostra para a contagem.

Por outro lado, a análise por ativação não é capaz de resolver problemas relacionados com alguns elementos constituintes do material biológico tais como o C, H, O e N. Esses elementos podem ser analisados por técnicas clássicas ou por ativação com outros tipos de partículas, como fótons e partículas carregadas tais como prótons, dêutrons e partículas alfa. Qualquer tipo de análise por ativação não fornece, porém, informação sobre a forma em que os elementos se encontram na amostra.

A análise por ativação é, sem dúvida, uma das técnicas de análise de maior sensibilidade. Como a literatura apresenta diferentes critérios para a determinação da sensibilidade, a comparação entre as várias técnicas torna-se difícil. Segundo De Soete e cols.⁽³¹⁾, a maioria dos elementos do sistema periódico pode ser determinada na faixa de partes por milhão (ppm) sendo que alguns até em partes por bilhão (ppb) por análise por ativação com nêutrons térmicos, quando a amostra é submetida a um fluxo de aproximadamente $10^{12} \text{ n cm}^{-2} \text{ s}^{-1}$. Embora a sensibilidade do método aumente com a intensidade do fluxo, o uso de fluxos muito altos é limitado pelo custo elevado de tais irradiações e pelos problemas que surgem com as altas doses de nêutrons e de raios gama, nas próprias amostras e respectivos invólucros.

A exatidão dos resultados obtidos em análise por ativação também é um fator muito importante a ser considerado. Por este motivo, o método é usado com frequência em conjunto com outras técnicas de alta exatidão, baseadas em princípios diferentes como a espectrometria de mas

sa, para a preparação de padrões com valores certificados.

Ao mesmo tempo, tem sido enfatizado que ne nhum outro método analítico pode dar informações simultâneas sobre a concentração de um grande número de elementos numa amostra com boa precisão em poucas horas de trabalho⁽⁵¹⁾.

A cromatografia de íons apresenta os mesmos inconvenientes que as demais técnicas analíticas quanto à preparação da amostra, isto é, existe o risco de contaminação. Este é o único aspecto negativo dessa técnica em relação à análise por ativação, porque, em particular para Na e K, as determinações são simultâneas. Depois de preparada a solução da amostra, são suficientes 30 minutos para obter os resultados das análises.

A cromatografia de íons é uma técnica multi-elementar que alia as vantagens da cromatografia clássica a um método de detecção imediato. Assim, é possível separar e determinar formas iônicas que se comportam de modo diferente numa coluna cromatográfica como por exemplo, os produtos de degradação do fosfato de tri-n-butila (TBP)⁽⁶²⁾, que é de grande interesse no ciclo do combustível nuclear.

É uma técnica ainda não muito explorada mas com grandes possibilidades de aplicação. Além disso, exige um equipamento simples que pode ser instalado em qualquer laboratório de análises.

CAPITULO III

PARTE EXPERIMENTAL

III-1. Análise por Ativação

III.1.1. Equipamento

Usaram-se três conjuntos para a detecção da radiação gama. O primeiro é constituído de um detector de Ge-Li de marca ORTEC, série 16-3911, modelo nº 8001-1022 V com resolução de 3,4 KeV para fótons de 1,33 MeV do ^{60}Co , acoplado a um multi-analisador de 4096 canais em linha com um mini-computador 2001, ambos da marca HEWLETT-PACKARD. Os espectros de raios gama foram analisados pelo programa FALA desenvolvido na Divisão de Radioquímica do IPEN-CNEN/SP por Lima e Atalla⁽⁴⁴⁾, em linguagem BASIC.

O segundo conjunto compõe-se de um detector de Ge-Li, série WIN 15 modelo nº 8001-1521W série nº 17-3491, com resolução de 2,50 KeV no pico em 1,33 MeV do espectro de raios gama do ^{60}Co , acoplado a um multi-analisador de 4096 canais de marca ORTEC modelo 6240-B. Um computador PDP-11, em linha com o multianalisador, permitiu analisar os espectros de raios gama por meio do programa GAMMA 2, em linguagem CRACL, fornecido pela ORTEC.

O terceiro é um espectrômetro de raios gama que consiste de um analisador de 400 canais, TMC, modelo

406-2 acoplado a um cristal de cintilação NaI(Tl) (HARSHAW) tipo poço de 7,5 x 7,5 centímetros.

III-1.2. Identificação e cálculo das áreas dos picos

Os picos correspondentes às energias dos raios gama emitidos pelo ^{24}Na e ^{42}K foram identificados nos espectros, consultando-se as tabelas de Adams e Dams⁽¹⁾.

Seguindo-se à identificação dos picos do ^{24}Na e ^{42}K , as atividades foram determinadas calculando-se a área total sob o fotopico e subtraindo dessa área aquela que corresponde ao trapézio situado na base do fotopico, conforme o método de Covell⁽²⁶⁾.

Em todos os casos em que se comparavam as atividades das amostras e do padrão, as atividades foram referidas ao mesmo tempo de decaimento radioativo.

III.1.3. Cálculo da concentração dos elementos

A massa de cada elemento presente nas amostras foi obtida por meio da relação clássica da análise por ativação, apresentada no Capítulo II.

III.1.4. Padrões utilizados

Dentre os padrões disponíveis na Divisão de Radioquímica do IPEN-CNEN/SP, foi escolhido o V-4 (dried potatoes), fornecido pela Agência Internacional de Energia Atômica (AIEA), por apresentar concentrações de sódio e potássio da mesma ordem de grandeza das existentes no músculo. Além disso, por se tratar de análise de material biológico, procurou-se um padrão cuja composição fosse semelhante à das amostras. Os teores de Na e K no padrão V-4, de acordo com a referência (35), são apresentadas na Tabela III-1.1.

A porcentagem de K no padrão V-4 foi confirmada por meio do padrão geológico GSP-1, fornecido pelo U.S. Geological Survey. Os resultados obtidos para o K em V-4, após comparação dos dois padrões, estão de acordo com os apresentados na referência(35).

Em relação ao teor de Na no padrão V-4, usando-se como padrão alíquotas de uma solução com concentração conhecida de NaCl, verificou-se que os resultados obtidos eram discordantes do valor certificado. O valor encontrado foi de 942 ppm, ao invés de 1740 ppm conforme especificado na referência(35). Para confirmar esta discordância recorreu-se à determinação do teor de Na neste padrão por cromatografia de íons, fotometria de chama e ativação com nêutrons com os seguintes padrões: NaCl (solução e sólido), Na₂CO₃ (solução) e o padrão GSP-1 que apresenta valor certificado para o Na. Os valores encontrados são todos concordantes entre si e sua média corresponde a 54,3% do valor especificado no relatório da AIEA(35).

Considerando-se o valor de 945 ± 26 ppm de Na no padrão V-4 como sendo certo, a análise do teor de Na em amostras de músculo de ratos e bois apresentou resultados concordantes com os da literatura, conforme será visto no Capítulo IV.

Ao final da fase experimental, foi possível obter um novo padrão da AIEA, o H-4, constituído de músculo de animal em pó. Os teores de Na e K neste padrão, apresentados no relatório da AIEA⁽⁵⁸⁾ e transcritos na Tabela III-1.2, foram confirmados por análises por ativação com nêutrons e por meio de cromatografia de íons, antes de serem usados neste trabalho.

A comparação entre os dois padrões, V-4 e H-4, confirmou o teor de 945 ppm de Na no padrão V-4.

Em vista de irregularidade observada no padrão V-4, todos os resultados apresentados no Capítulo IV foram relacionados com o padrão H-4.

III-1.5. Preparação das amostras para a irradiação

Três (3) amostras de músculo quadríceps de rato, respectivamente R1, R2 e R3 e duas (2) amostras de músculo glúteo de boi, respectivamente B1 e B2, foram dissecadas e foi usada uma massa muscular interna, livre de qualquer contaminação superficial. Foram utilizados instrumentos de aço inoxidável e placas de vidro previamente limpos com solução de ácido nítrico diluído em água destilada (aproximadamente 10% v/v).

madamente 1:10 v/v) e depois com água destilada e desionizada. Foram removidos os resíduos de gordura e aponevrose. Os fragmentos musculares obtidos foram rapidamente lavados com água destilada e desionizada e secos com papel de filtro para remoção de sangue aderente, restando apenas a parte carnosa do tecido muscular.

Em virtude de ser universalmente empregada a normalização das análises de músculo para material seco, era mister padronizar o procedimento de secagem do material a ser ativado. A obtenção de amostras secas se impunha, igualmente, em virtude dos padrões utilizados serem representados por material seco.

Os fragmentos musculares, obtidos do material fresco, foram pesados em balança analítica " METTLER H-16 " e, a seguir, foram colocados em estufa a 50°C para perda de água, até atingirem peso constante, o que requer cerca de 24 horas. As amostras secas foram, então, pulverizadas e homogeneizadas em almofariz de ágata até obtenção de granulometria adequada (80 mesh). A amostra pulverizada foi armazenada em frascos de vidro previamente lavados com ácido nítrico diluído e água desionizada e destilada. Depois de secos, os frascos foram arrolhados e conservados em dessecador a vácuo.

III.1.6. Procedimentos para a irradiação

Acondicionaram-se aproximadamente 25 mg de músculo em pó e de padrão em envelopes individuais de polie

tileno selados a quente. Deste modo, pode-se irradiar e de
terminar a atividade de cada amostra no próprio invólucro
sem necessidade de transferência do pó radioativo.

Esses envelopes de plástico foram irradiados previamente para verificar a presença de elementos, principalmente de sódio, que pudessem interferir na análise do músculo. Examinando-se o espectro de raios gama do polietileno irradiado, verificou-se não haver contribuição dos radioisótopos de interesse na contagem final da amostra.

Envelopes de polietileno de aproximadamente um centímetro quadrado foram usados para as amostras e os padrões.

Um conjunto de um padrão e duas amostras de cada lado era colocado noutro envelope de plástico de maneira a manter as amostras e padrão bem próximos um do outro durante a irradiação.

O conjunto de quatro amostras e padrão era colocado em recipientes de irradiação constituídos por tubos de polipropileno com cerca de 10,0 centímetros de comprimento e 2,5 centímetros de diâmetro. Esses recipientes são enviados diretamente do laboratório para o reator por meio de um sistema pneumático.

A disposição das amostras e padrões nos recipientes de irradiação constitui um problema de alta importância. Uma das maiores fontes de erro, em análise por ativação, é a exposição das amostras e padrões a diferentes fluxos de nêutrons em virtude da concentração do ^{135}Xe no caroço e das posições das barras de controle do reator que são os elementos que modificam o valor do fluxo no local de irradiação. Se as dimensões das amostras forem grandes ou,

também, quando não se tem o cuidado de manter o padrão e amostra bem próximos um do outro, pode ocorrer uma variação na intensidade do fluxo que atinge o padrão e as amostras.

As amostras e padrões foram irradiados por um período de 30 minutos no reator IEA-R1, sendo submetidos a um fluxo de nêutrons de aproximadamente $5 \times 10^{11} \text{ n cm}^{-2} \text{ s}^{-1}$.

III-1.7. Limite de determinação

O limite de determinação do método depende de muitos fatores como: fluxo de nêutrons disponível, períodos de ativação e decaimento, secção de choque para a reação, eficiência de contagem e definição de erro admitido na análise. A menos que estas condições sejam precisamente definidas, os limites de determinação não podem ser comparados por diferentes pesquisadores.

Para calcular o limite de determinação do método para sódio e potássio, adotou-se o critério de Currie⁽²⁷⁾, já usado em outros trabalhos na área de Radioquímica do IPEN-CNEN/SP. Chamando-se L_Q , o limite de sensibilidade para determinações quantitativas, Currie deduziu a seguinte fórmula :

$$L_Q = 50 \left\{ 1 + \left[1 + \frac{u_b}{12,5} \right]^{1/2} \right\} \quad (\text{III-1})$$

onde u_b é o valor da contagem de fundo do aparelho.

Como o cálculo das áreas dos picos foi obtido aplicando o método de Coveil⁽²⁶⁾, ao valor u_b foi adicionada a atividade u_t correspondente à parte da área do trapézio que corresponde ao efeito Compton.

$$L_Q = 50 \left\{ 1 + \left[1 + \frac{u_b + u_t}{12,5} \right]^{1/2} \right\} \quad (\text{III-2})$$

O menor valor determinável quantitativamente para cada elemento foi calculado admitindo-se um desvio padrão relativo de 10%, conforme o critério adotado por Currie⁽²⁷⁾.

Sob fluxo de $5 \times 10^{11} \text{ n cm}^{-2} \text{ s}^{-1}$, 30 minutos de irradiação, tempo de decaimento = 3 h e tempo de contagem = 1000 s no detector de Ge(Li) as quantidades mínimas determináveis são para o sódio $5 \times 10^{-7} \text{ g}$ e para o potássio $4 \times 10^{-5} \text{ g}$. As massas de músculo seco e fresco necessárias para cobrir os menores valores determináveis de sódio e potássio são de 1,5 mg de músculo seco ou 6 mg de músculo fresco, o que é suficiente para as necessidades futuras que visam utilizar amostras de 8 a 15 mg de material fresco.

III-1.8. Comparação dos espectros de raios gama obtidos no cintilador de NaI(Tl) e detector de Ge(Li).

A Figura III-1 mostra um intervalo do es

pectro de raios gama obtido no cintilador NaI(Tl) e no detector de Ge(Li) onde se encontram os picos dos radioisótopos de interesse.

Comparando-se os espectros obtidos nos dois detectores, verifica-se que o uso do cintilador NaI(Tl) não é adequado para discriminar os fotopicos do ^{24}Na e ^{42}K formados, sendo o fotopico do ^{42}K parcialmente mascarado pelo fotopico do ^{24}Na . O detector de Ge(Li) tem poder de resolução capaz de discernir os picos de ^{24}Na e ^{42}K , sem necessidade de processamento químico prévio da amostra. Observou-se que a resolução para o fotopico do ^{24}Na com o NaI(Tl) é de 100 KeV e com o detector de Ge(Li) que apresenta melhor resolução é de 3 KeV. Observou-se também que a eficiência do detector de Ge(Li) é suficiente para permitir a análise simultânea de Na e K nas amostras, nas condições de irradiação e contagem descritas.

III-2. Cromatografia de Ions

III-2.1. Equipamento

Utilizou-se, na realização deste trabalho, um cromatógrafo de íons modelo 10 da DIONEX, instalado no Departamento de Engenharia Química.

Detalhes das colunas, eluentes, etc., usados na análise da amostra biológica estão sumarizados na Tabela III-2.1.

TABELA III-2.1: CONDIÇÕES APLICADAS NO CROMATÓGRAFO DE ÍONS
DIONEX - MODELO 10 PARA A DETERMINAÇÃO DE
 Na^+ E K^+ .

Eluente:	HNO_3 0,005 N
Pressão da Bomba :	480 PSI
Fluxo :	150 mL/h
Colunas Analíticas :	pré-coluna: $\varnothing = 3$ mm h = 50 mm separadora $\varnothing = 3$ mm catiônica: h = 200 mm
Coluna Supressora :	$\varnothing = 9$ mm h = 100 mm
Sensibilidade do Detector:	10 μ mho
Volume de Injeção :	100 μ L
Solução regenerante :	NaOH 0,5N
Ajuste de Sensibilidade do registrador :	500 mV a 5 V

III-2.2. Reagentes

- Ácido Nítrico concentrado, 65%, Carlo Erba p.a.
- Ácido Clorídrico 8 N, Merck, p.a.
- Ácido Perclórico 70%, Carlo Erba p.a.

Prepararam-se os padrões de sódio e potássio a partir da dissolução dos cloretos correspondentes em água bidestilada nas concentrações necessárias para a análise ($\text{Na}^+ = 4,2 \mu\text{g/mL}$; $\text{K}^+ = 5,84 \mu\text{g/mL}$).

III-2.3. Digestão química das amostras e do padrão

Foi realizada uma digestão química prévia das amostras de músculo em pó R1, R2, R3, B1 e B2 e do padrão H-4 com uma mistura de ácido nítrico concentrado (65%), ácido clorídrico 8N e ácido perclórico (70%).

Para a massa de 100 mg de amostra, acrescentavam-se inicialmente 5 mL de HNO_3 . Aquecia-se até quase a secura, acrescentando-se, então, mais 2 mL de HNO_3 , 2 mL de HCl e 4 mL de HClO_4 e continuava-se o aquecimento. Se a solução não ficasse clara, repetia-se a adição de ácidos e o aquecimento. Evaporava-se então até secura completa (eliminação total de fumos brancos do HClO_4).

A seguir, o resíduo era dissolvido em água bidestilada, transferido para um balão volumétrico de 50 mL e o volume era completado com água bidestilada. As amostras, deste modo, estavam prontas para serem submetidas à análise por cromatografia de íons.

Prepararam-se duas soluções de cada amostra e obtiveram-se cinco resultados para cada solução.

Para eliminar possíveis interferências quanto à contaminação dos reagentes usados foram feitas provas em branco. Na prova em branco o procedimento foi o mesmo descrito para o tratamento das amostras, porém sem a adição desta.

III-2.4. Identificação e Quantificação dos picos

Para um conjunto de colunas bem determinado e vazão constante, cada tipo de íon tem um tempo de retenção na coluna bem definido. A posição dos picos no cromatograma permite assim a identificação dos íons. Uma vez identificados, a quantificação é feita por comparação das respostas do detector para a amostra e para o padrão.

A resposta do detector é um gráfico onde se medem a área ou a altura do pico. A medida da altura do pico é muito precisa (erro de $\pm 0,5\%$); a precisão da medida da área, quando é feita por integração eletrônica, é da mesma ordem de grandeza.

A resposta do detector (altura do pico) está diretamente relacionada com a massa da espécie analisada.

III-2.5. Procedimento para a análise por Cromatografia de Íons.

Após o tratamento químico descrito no ítem III-2.3., 100 μ L da solução de cada amostra (R1, R2, R3, B1 e B2) foram injetados no cromatógrafo de íons e os picos característicos de Na^+ e K^+ foram registrados.

A Figura III-2.1. apresenta o cromatograma do padrão utilizado para a análise das amostras biológicas e a Figura III-2.2. apresenta o cromatograma característico de uma amostra.

Em todas as amostras injetadas no cromatógrafo de íons, foi observada a presença de um pico provocado por um íon cujo tempo de retenção corresponde ao de NH_4^+ . A presença desse íon foi confirmada por reação com reagente de Nessler.

A análise de Na^+ e K^+ foi feita inicialmente com o emprego de uma pré-coluna e uma sô coluna separadora. Nessas condições, observou-se uma sobreposição do pico correspondente ao NH_4^+ no pico do K^+ , o que dificultava a sua quantificação (Figura III-2.2.). Quando foram usadas duas colunas separadoras, houve melhora de resolução dos picos, reduzindo a interferência do NH_4^+ sobre o pico do K^+ .

Na Figura III.2.2. estão registrados os picos de sódio, amônia e potássio, que são os únicos observados sob estas condições. O tempo de análise para cada amostra injetada foi de aproximadamente 20 minutos.

TABELA III-1.1. CONCENTRAÇÃO DE Na E K NO PADRÃO V-4

ELEMENTO	MÉTODO EMPREGADO	VALOR ESPERADO* (mg/g)	VALOR ENCONTRADO (mg/g)
K	AAN	9,8	9,6
Na	AAN	1,74	0,95
	FC		0,94
	CI		0,94

* - Valores especificados no relatório da AIEA⁽³⁵⁾.

OBS - AAN - Análise por Ativação com Nêutrons

FC - Fometria de chama

CI - Cromatografia de Íons

TABELA III-1.2. CONCENTRAÇÃO DE Na E K NO PADRÃO H-4

ELEMENTO	MÉTODO EMPREGADO	VALOR ESPERADO* (mg/g)	VALOR ENCONTRADO (mg/g)
K	AAN	1,58	1,53
	CI		1,56
Na	AAN	0,206	0,201
	CI		0,199

* = Valores especificados no relatório da AIEA⁽⁵⁸⁾.

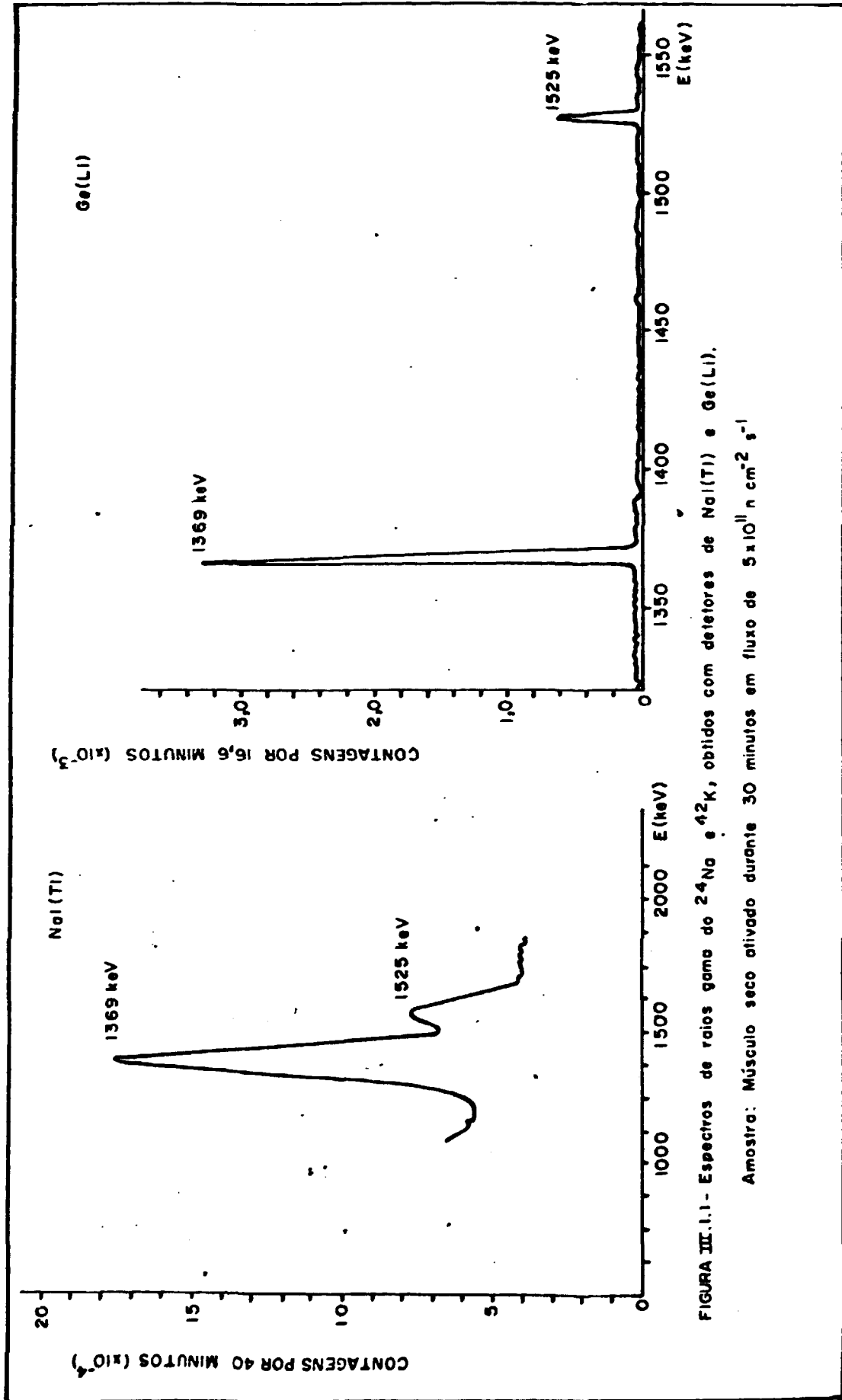


FIGURA III.1.1 - Espectros de raios gama do ²⁴Na a 42K, obtidos com detectores de NaI(Tl) e Ge(Li).

Amostra: Músculo seco ativado durante 30 minutos em fluxo de $5 \times 10^{11} \text{ n cm}^{-2} \text{ s}^{-1}$

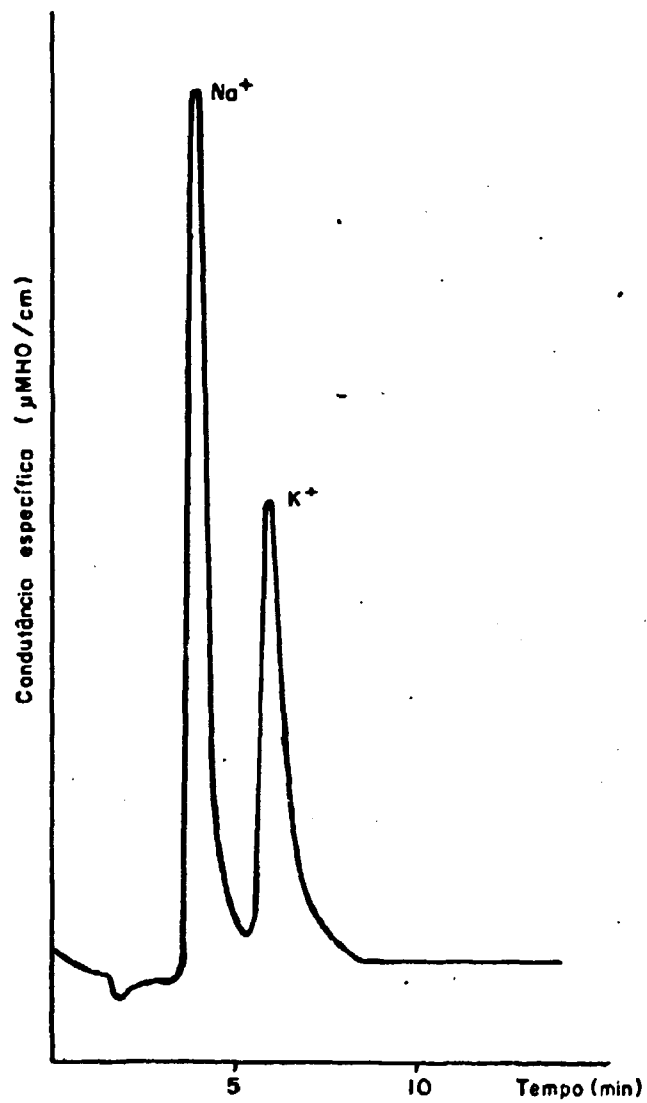


Figura III.2.1 - Cromatograma do padrão.

Condições de análise: Uma coluna separadora

Sensibilidade do detector : 10 µMHO

Sensibilidade do registrador : 2 V

Volume injetado : 100 µl

Concentração dos íons : Na^+ - 4,2 µg/ml

K^+ - 5,48 µg/ml

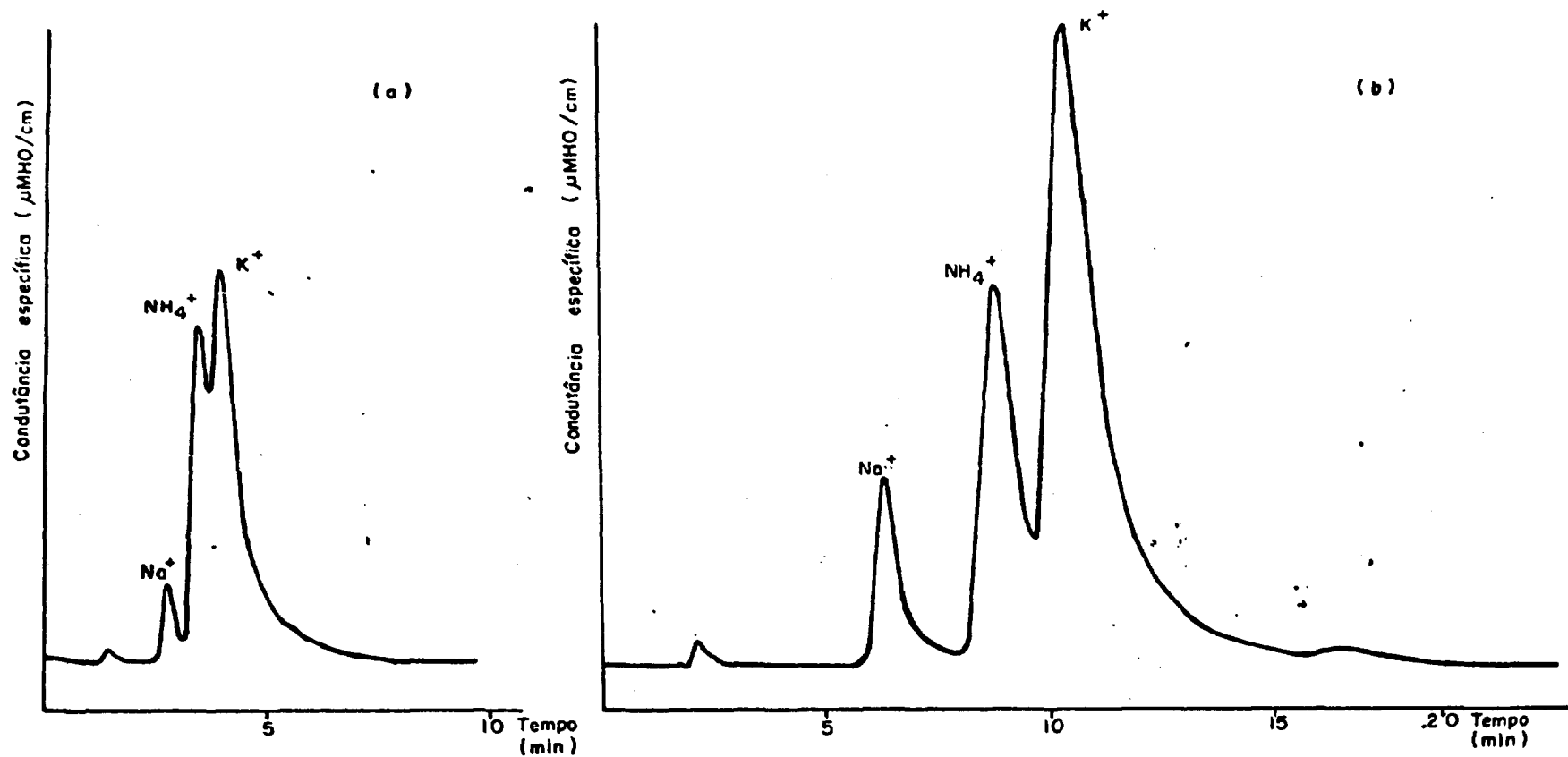


FIGURA III.2.2 - Cromatogramas de uma amostra biológica.
 a) com uma coluna separadora
 b) com duas colunas separadoras

Condições de análise :
 Sensibilidade do detector : 10 µMHO
 Sensibilidade do registrador : 2 V
 Volume injetado : 100 µl

CAPITULO IV

RESULTADOS

Apresentam-se inicialmente os resultados das análises de sódio e potássio no padrão H-4 pelos métodos de análise por ativação e cromatografia de íons. Obtiveram-se oto resultados para cada elemento, conforme as Tabelas IV-1 e IV-2. Calcularam-se as médias \bar{x}_i ($i = 1$ e 2), os desvios-padrões s_{x_i} e os desvios padrões das médias $s_{\bar{x}_i}$. Em todos os resultados apresentados, o índice $i = 1$ refere-se à análise por ativação e o índice $i = 2$ refere-se aos resultados obtidos por cromatografia de íons.

Foi aplicado o teste $t^{(53)}$ para verificar se os valores das médias achadas podem ser considerados iguais ao valor esperado. Verificou-se que, num nível de significância 0,05, os valores experimentais podem ser considerados exatos.

Em todos os testes estatísticos aplicados neste trabalho, adotou-se o nível de significância 0,05.

Fez-se uma comparação da precisão dos dois métodos, aplicando o teste $F^{(53)}$ às variâncias $s_{x_1}^2$ e $s_{x_2}^2$. Como o valor de F achado é menor do que o valor de F tabelado, os dois métodos podem ser considerados igualmente precisos.

A seguir, apresentam-se os resultados obtidos

dos nas análises das amostras de músculos. Nas Tabelas IV-3 a IV-7 encontram-se os valores obtidos para Na e nas Tabelas IV-8 a IV-12 encontram-se os valores obtidos para K em todas as amostras. As Tabelas foram divididas em duas partes: a) resultados obtidos por análise por ativação e b) resultados das análises por cromatografia de íons. Nas Tabelas constam também as médias de cada série de resultados, a média geral de todos os resultados (\bar{X}_i), o desvio padrão dos resultados (s_{x_i}) e o desvio padrão da média ($s_{\bar{x}_i}$).

O conjunto das médias das seis séries de resultados obtidos por análise por ativação foi examinado pela análise da variância⁽⁵³⁾. Depois de ter sido comprovada a homogeneidade dos resultados, foi calculada a média geral \bar{X}_1 e o respectivo desvio padrão $s_{\bar{x}_1}$.

No caso da cromatografia de íons, por serem somente duas séries de resultados, a comparação entre as duas médias foi feita pela aplicação do teste t. Depois de ter sido verificada a igualdade das duas médias, calculou-se a média geral \bar{X}_2 e o seu desvio padrão $s_{\bar{x}_2}$.

Feito isso, compararam-se as médias \bar{X}_1 e \bar{X}_2 de cada Tabela por meio do teste t. Em todos os casos, observou-se que as médias dos resultados obtidos pelos dois métodos são estatisticamente iguais, no nível de significância adotado.

TABELA IV-1 - RESULTADOS OBTIDOS NAS DETERMINAÇÕES DE
Na NO PADRÃO H-4.

VALOR ESPERADO : 0,206 %

Na (%)	
AAN	CI
0,192	0,201
0,210	0,201
0,199	0,201
0,200	0,186
0,216	0,186
0,215	0,207
0,195	0,207
0,182	0,207
$\bar{x}_1 = 0,201$	$\bar{x}_2 = 0,199$
$s_{x_1} = 0,012$	$s_{x_2} = 0,009$
$s_{\bar{x}_1} = 0,004$	$s_{\bar{x}_2} = 0,003$

TABELA IV-2 - RESULTADOS OBTIDOS NAS DETERMINAÇÕES DE
K NO PADRÃO H-4.

VALOR ESPERADO: 1,58 %

K (%)	
AAN	CI
1,59	1,66
1,55	1,66
1,46	1,57
1,48	1,60
1,62	1,49
1,47	1,58
1,44	1,43
1,63	1,51
$\bar{x}_1 = 1,53$ $s_{x_1} = 0,08$ $s_{\bar{x}_1} = 0,03$	$\bar{x}_2 = 1,56$ $s_{x_2} = 0,08$ $s_{\bar{x}_2} = 0,03$

TABELA IV-3 - RESULTADOS OBTIDOS NAS DETERMINAÇÕES DE
Na NA AMOSTRA R1.

a) ANÁLISE POR ATIVAÇÃO (6 SÉRIES)

Na (%)					
I	II	III	IV	V	VI
0,165	0,159	0,160	0,178	0,160	0,171
0,160	0,150	0,158	0,174	0,172	0,165
0,157	0,158	0,159	0,160	0,164	0,159
0,134	0,163	0,155	0,173	0,168	0,157
$\bar{x}_I = 0,154$	$\bar{x}_{II} = 0,158$	$\bar{x}_{III} = 0,158$	$\bar{x}_{IV} = 0,171$	$\bar{x}_V = 0,166$	$\bar{x}_{VI} = 0,163$
$\bar{x}_1 = 0,162$		$s_{x_1} = 0,009$		$s_{\bar{x}_1} = 0,002$	

b) CROMATOGRAFIA DE IONS (2 SÉRIES)

Na (%)		
I	II	
0,148	0,163	
0,148	0,163	
0,154	0,154	
0,163	0,154	
0,163	0,172	
$\bar{x}_I = 0,155$	$\bar{x}_{II} = 0,161$	
$\bar{x}_2 = 0,159$	$s_{x_2} = 0,008$	$s_{\bar{x}_2} = 0,003$

TABELA IV-4 - RESULTADOS OBTIDOS NAS DETERMINAÇÕES DE
Na NA AMOSTRA R2.

a) ANÁLISE POR ATIVAÇÃO (6 SÉRIES)

Na (%)					
I	II	III	IV	V	VI
0,115	0,109	0,106	0,112	0,115	0,109
0,117	0,113	0,111	0,115	0,112	0,117
0,117	0,120	0,111	0,110	0,117	0,108
0,113	0,111	0,120	0,120	0,113	0,112
$\bar{x}_I = 0,115$	$\bar{x}_{II} = 0,113$	$\bar{x}_{III} = 0,112$	$\bar{x}_{IV} = 0,114$	$\bar{x}_V = 0,114$	$\bar{x}_{VI} = 0,112$
$\bar{x}_1 = 0,113$		$s_{x_1} = 0,004$		$s_{\bar{x}_1} = 0,001$	

b) CROMATOGRAFIA DE IONS (2 SÉRIES)

Na (%)		
I	II	
0,102	0,120	
0,102	0,108	
0,111	0,108	
0,111	0,108	
0,114	0,112	
$\bar{x}_I = 0,108$	$\bar{x}_{II} = 0,111$	
$\bar{x}_2 = 0,110$	$s_{x_2} = 0,005$	$s_{\bar{x}_2} = 0,002$

TABELA IV-5 - RESULTADOS OBTIDOS NAS DETERMINAÇÕES DE
Na NA AMOSTRA R3.

a) ANÁLISE POR ATIVAÇÃO (6 SÉRIES)

Na (%)					
I	II	III	IV	V	VI
0,140	0,136	0,124	0,137	0,130	0,127
0,136	0,129	0,126	0,134	0,137	0,128
0,135	0,124	0,123	0,129	0,138	0,139
0,130	0,118	0,128	0,131	0,119	0,135
$\bar{x}_I = 0,135$	$\bar{x}_{II} = 0,127$	$\bar{x}_{III} = 0,125$	$\bar{x}_{IV} = 0,133$	$\bar{x}_V = 0,131$	$\bar{x}_{VI} = 0,131$
$\bar{x}_1 = 0,130$		$s_{x_1} = 0,006$		$s_{\bar{x}_1} = 0,001$	

b) CROMATOGRAFIA DE IONS (2 SÉRIES)

Na (%)	
I	II
0,132	0,126
0,132	0,126
0,138	0,134
0,138	0,134
0,130	0,138
$\bar{x}_I = 0,134$	$\bar{x}_{II} = 0,132$
$\bar{x}_2 = 0,133$ $s_{x_2} = 0,004$ $s_{\bar{x}_2} = 0,001$	

TABELA IV-6 - RESULTADOS OBTIDOS NAS DETERMINAÇÕES DE
Na NA AMOSTRA B1.

a) ANÁLISES POR ATIVAÇÃO (6 SÉRIES)

Na (%)					
I	II	III	IV	V	VI
0,269	0,247	0,254	0,279	0,245	0,259
0,265	0,250	0,265	0,272	0,262	0,249
0,259	0,269	0,276	0,277	0,277	0,252
0,281	0,278	0,263	0,274	0,280	0,252
$\bar{x}_I = 0,268$	$\bar{x}_{II} = 0,261$	$\bar{x}_{III} = 0,264$	$\bar{x}_{IV} = 0,276$	$\bar{x}_V = 0,266$	$x_{VI} = 0,253$
$\bar{x}_1 = 0,260$		$s_{x_1} = 0,010$		$s_{\bar{x}_1} = 0,002$	

b) CROMATOGRAFIA DE IONS (2 SÉRIES)

Na (%)		
I	II	
0,263	0,260	
0,248	0,260	
0,263	0,276	
0,248	0,272	
0,269	0,272	
$\bar{x}_I = 0,258$	$\bar{x}_{II} = 0,268$	
$\bar{x}_2 = 0,263$	$s_{x_2} = 0,010$	$s_{\bar{x}_2} = 0,003$

TABELA IV-7 - RESULTADOS OBTIDOS NAS DETERMINAÇÕES DE
Na NA AMOSTRA B2.

a) ANÁLISE POR ATIVAÇÃO (6 SÉRIES)

Na (%)					
I	II	III	IV	V	VI
0,213	0,232	0,241	0,217	0,209	0,245
0,218	0,229	0,207	0,226	0,235	0,237
0,235	0,246	0,234	0,242	0,240	0,228
0,251	0,241	0,248	0,235	0,230	0,217
$\bar{x}_I = 0,229$	$\bar{x}_{II} = 0,237$	$\bar{x}_{III} = 0,232$	$\bar{x}_{IV} = 0,230$	$\bar{x}_V = 0,228$	$\bar{x}_{VI} = 0,232$
$\bar{x}_1 = 0,231$		$s_{x_1} = 0,012$		$s_{\bar{x}_1} = 0,002$	

b) CROMATOGRAFIA DE IONS (2 SÉRIES)

Na (%)	
I	II
0,219	0,227
0,219	0,218
0,217	0,230
0,220	0,242
0,225	0,214
$\bar{x}_I = 0,220$	$\bar{x}_{II} = 0,226$
$\bar{x}_2 = 0,223$ $s_{x_2} = 0,008$ $s_{\bar{x}_2} = 0,002$	

TABELA IV-8 - RESULTADOS OBTIDOS NAS DETERMINAÇÕES DE
K NA AMOSTRA R1.

a) ANÁLISE POR ATIVAÇÃO (6 SÉRIES)

K (%)					
I	II	III	IV	V	VI
1,66	1,49	1,54	1,57	1,63	1,56
1,48	1,61	1,54	1,59	1,58	1,51
1,45	1,54	1,62	1,38	1,54	1,60
1,24	1,60	1,45	1,58	1,63	1,47
$\bar{x}_I = 1,46$	$\bar{x}_{II} = 1,56$	$\bar{x}_{III} = 1,54$	$\bar{x}_{IV} = 1,53$	$\bar{x}_V = 1,60$	$\bar{x}_{VI} = 1,54$
$\bar{x}_1 = 1,54$		$s_{x_1} = 0,09$		$s_{\bar{x}_1} = 0,02$	

b) CROMATOGRAFIA DE IONS (2 SÉRIES)

K (%)		
I	II	
1,66	1,69	
1,66	1,69	
1,62	1,52	
1,52	1,52	
1,50	1,65	
$\bar{x}_I = 1,57$	$\bar{x}_{II} = 1,61$	
$\bar{x}_2 = 1,59$	$s_{x_2} = 0,08$	$s_{\bar{x}_2} = 0,03$

TABELA IV-9 - RESULTADOS OBTIDOS NAS DETERMINAÇÕES DE
K NA AMOSTRA R2.

a) ANÁLISE POR ATIVAÇÃO (6 SÉRIES)

K (%)					
I	II	III	IV	V	VI
1,62	1,34	1,31	1,42	1,53	1,45
1,54	1,41	1,39	1,41	1,42	1,41
1,45	1,51	1,42	1,38	1,46	1,46
1,48	1,56	1,53	1,47	1,38	1,40
$\bar{x}_I = 1,52$	$\bar{x}_{II} = 1,45$	$\bar{x}_{III} = 1,41$	$\bar{x}_{IV} = 1,42$	$\bar{x}_V = 1,45$	$\bar{x}_{VI} = 1,43$
$\bar{x}_1 = 1,45$		$s_{x_1} = 0,07$		$s_{\bar{x}_1} = 0,01$	

b) CROMATOGRAFIA DE IONS (2 SÉRIES)

K (%)	
I	II
1,43	1,55
1,45	1,49
1,37	1,51
1,50	1,51
1,50	1,46
$\bar{x}_I = 1,45$	$\bar{x}_{II} = 1,50$
$\bar{x}_2 = 1,50$	$s_{x_2} = 0,03$
	$s_{\bar{x}_2} = 0,01$

TABELA IV-10 - RESULTADOS OBTIDOS NAS DETERMINAÇÕES DE
K NA AMOSTRA R3.

a) ANÁLISE POR ATIVAÇÃO (6 SÉRIES)

K (%)					
I	II	III	IV	V	VI
1,69	1,48	1,70	1,60	1,57	1,53
1,65	1,55	1,62	1,64	1,65	1,47
1,58	1,52	1,57	1,58	1,65	1,67
1,44	1,56	1,65	1,52	1,43	1,63
$\bar{x}_I = 1,59$	$\bar{x}_{II} = 1,53$	$\bar{x}_{III} = 1,64$	$\bar{x}_{IV} = 1,58$	$\bar{x}_V = 1,58$	$\bar{x}_{VI} = 1,58$
$\bar{x}_1 = 1,58$		$s_{x_1} = 0,08$		$s_{\bar{x}_1} = 0,02$	

b) CROMATOGRAFIA DE IONS (2 SÉRIES)

K (%)		
I	II	
1,49	1,74	
1,49	1,52	
1,59	1,52	
1,62	1,60	
1,62	1,60	
$\bar{x}_I = 1,56$	$\bar{x}_{II} = 1,60$	
$\bar{x}_2 = 1,58$	$s_{x_2} = 0,08$	$s_{\bar{x}_2} = 0,03$

TABELA IV-11 - RESULTADOS OBTIDOS NAS DETERMINAÇÕES DE
K NA AMOSTRA B1.

a) ANÁLISE POR ATIVAÇÃO (6 SÉRIES)

K (%)					
I	II	III	IV	V	VI
1,20	1,58	1,41	1,39	1,51	1,54
1,25	1,65	1,59	1,38	1,32	1,58
1,20	1,20	1,55	1,48	1,34	1,47
1,39	1,37	1,47	1,47	1,42	1,41
$\bar{x}_I = 1,26$	$\bar{x}_{II} = 1,45$	$\bar{x}_{III} = 1,50$	$\bar{x}_{IV} = 1,43$	$\bar{x}_V = 1,40$	$\bar{x}_{VI} = 1,50$
$\bar{x}_1 = 1,42$		$s_{x_1} = 0,13$		$s_{\bar{x}_1} = 0,03$	

b) CROMATOGRAFIA DE ÍONS (2 SÉRIES)

K (%)		
I	II	
1,64	1,63	
1,52	1,50	
1,52	1,42	
1,44	1,42	
1,44	1,50	
$\bar{x}_I = 1,51$	$\bar{x}_{II} = 1,49$	
$\bar{x}_2 = 1,50$	$s_{x_2} = 0,08$	$s_{\bar{x}_2} = 0,03$

TABELA IV-12 - RESULTADOS OBTIDOS NAS DETERMINAÇÕES DE
K NA AMOSTRA B2.

a) ANÁLISE POR ATIVAÇÃO (6 SÉRIES)

K (%)					
I	II	III	IV	V	VI
1,33	1,41	1,35	1,56	1,47	1,31
1,41	1,53	1,35	1,49	1,62	1,34
1,34	1,63	1,47	1,46	1,44	1,41
1,32	1,59	1,42	1,43	1,54	1,49
$\bar{X}_I = 1,35$	$\bar{X}_{II} = 1,54$	$\bar{X}_{III} = 1,40$	$\bar{X}_{IV} = 1,48$	$\bar{X}_V = 1,52$	$\bar{X}_{VI} = 1,39$
$\bar{X}_1 = 1,45$		$s_{x_1} = 0,09$		$s_{\bar{x}_1} = 0,02$	

b) CROMATOGRAFIA DE IONS (2 SÉRIES)

K (%)		
I	II	
1,58	1,56	
1,47	1,64	
1,42	1,62	
1,57	1,52	
1,57	1,48	
$\bar{X}_I = 1,52$	$\bar{X}_{II} = 1,56$	
$\bar{X}_2 = 1,54$	$s_{x_2} = 0,07$	$s_{\bar{x}_2} = 0,02$

CAPITULO V

DISCUSSÃO E CONCLUSÕES

Em primeiro lugar, chama-se a atenção para a irregularidade apresentada pelo padrão V-4 quanto ao teor de Na, conforme foi discutido no Capítulo III. Ficou provado que, embora o padrão seja acompanhado de um certificado, é fundamental a verificação de sua validade antes de ser usado como referência.

A exatidão dos métodos analíticos aplicados foi examinada por meio do padrão H-4 depois de ter sido verificado que os teores de Na e K neste padrão são dignos de confiança. As Tabelas IV-1 e IV-2 apresentam os resultados obtidos para os teores desses dois elementos. Uma comparação entre cada uma das médias (\bar{X}_1 e \bar{X}_2) com o valor esperado indicou que os valores experimentais não diferem do valor esperado, num nível de confiança de 0,95. Nesse mesmo nível de confiança, verificou-se que as médias obtidas pelos dois métodos são estatisticamente iguais.

Por meio do padrão H-4, ficou assim provado que as duas técnicas analíticas são exatas. Comparando as variâncias dos dois métodos, pelo teste F, tanto nas determinações de Na como nas de K, verificou-se que os dois métodos são igualmente precisos.

Uma vez estabelecida a precisão e exatidão dos dois métodos, passou-se à análise das amostras. As

Tabelas IV-3 a IV-12 apresentam os resultados obtidos para Na e K por meio da análise por ativação e da cromatografia de íons.

Comparando-se os resultados obtidos nas seis séries de irradiações de cada amostra, conclui-se que os valores das médias são estatisticamente iguais no nível de confiança adotado.

É importante observar que para essas análises usaram-se 25 mg de amostra para evitar que houvesse discordância entre os resultados, provocada por falta de homogeneidade da própria amostra. Como a finalidade do trabalho não é provar a homogeneidade entre amostras muito pequenas, evitou-se essa fonte de erro, embora alguns autores^(10,33,47) já tenham afirmado que não há variação apreciável entre amostras colhidas de um mesmo tecido muscular.

No caso da cromatografia de íons, usaram-se 100 mg de amostra para cada solução de 50 mL. Os mesmos resultados podem ser obtidos com amostras 10 ou 100 vezes menores desde que se mantenha a mesma concentração da amostra e que as amostras sejam homogêneas. Comparando-se as médias e as variâncias das duas séries de resultados obtidos por cromatografia de íons, conclui-se que são estatisticamente iguais.

Comparando-se, finalmente, as médias e as variâncias obtidas pelos dois métodos analíticos, chega-se à conclusão de que os dois métodos são equivalentes em relação à exatidão e precisão dos resultados, confirmando o resultado obtido com o padrão H-4.

Quanto à sensibilidade, usando as condi

ções descritas no presente trabalho, é possível determinar 5×10^{-7} g de Na e 4×10^{-5} g de K por análise por ativação sem separação química, conforme foi visto no Capítulo III. A sensibilidade da cromatografia de íons, de acordo com o manual do aparelho⁽³²⁾, é de 5×10^{-8} g de Na e 10^{-7} g de K por mililitro de solução. A sensibilidade varia com a complexidade da amostra e pode acontecer que sejam necessárias separações químicas para ser possível a obtenção dos resultados. No caso das amostras examinadas, o único íon interferente é o NH_4^+ , mas a sua interferência pode ser evitada aumentando o comprimento da coluna separadora de íons.

Pode-se concluir, então, que, quanto à sensibilidade, as duas técnicas satisfazem a finalidade do trabalho.

Outro fator que deve ser considerado é o tempo exigido para as análises. O tempo de preparo das amostras até a secagem é o mesmo para as duas técnicas. A partir da obtenção da amostra seca, o tempo necessário para a análise por cromatografia de íons é menor, porque a dissolução da amostra leva cerca de uma hora e a análise da solução requer aproximadamente 30 minutos. No caso da análise por ativação são necessários de 20 a 30 minutos de irradiação, 2 a 4 horas para o decaimento dos radioisótopos de meia-vida curta e cerca de 30 minutos de contagem.

Quanto à simplicidade e custo da análise, a técnica de cromatografia de íons oferece vantagens. Uma vez adquirido o equipamento, a única despesa provém das resinas e dos ácidos necessários para decompor a amostra. Como o volume de ácidos usados é pequeno, a contribuição do

preço dos reagentes no custo da análise é irrisória. As resinas são regeneradas depois de cada análise mas, com o tempo, podem perder sua capacidade de troca e, neste caso, devem ser substituídas. Como são resinas especiais, do tipo pelicular, seu custo é bastante elevado. Basicamente, pode-se afirmar então que o custo de uma análise por cromatografia de íons depende do desgaste das resinas. Pela experiência adquirida no Departamento de Engenharia Química do IPEN-CNEN/SP, verificou-se que estas resinas são de longa duração desde que o operador tenha o cuidado de não injetar soluções que contêm excesso de íons, mesmo que estes íons não interfiram na análise.

A técnica da análise por ativação é mais elaborada e depende da possibilidade da utilização de um reator nuclear. Nos centros de pesquisas nucleares, justifica-se o uso da análise por ativação, principalmente quando se deseja a determinação simultânea de muitos elementos. Para estes casos, as duas técnicas não podem ser comparadas porque as possibilidades de análise por ativação são bem conhecidas enquanto que a técnica da cromatografia de íons ainda está em desenvolvimento.

No caso particular da determinação de Na e K, o uso da cromatografia de íons é mais vantajoso por requerer um equipamento simples que pode ser instalado em qualquer laboratório analítico.

Do ponto de vista da confiabilidade dos resultados, as duas técnicas são excelentes e podem ser de grande valia em pesquisas médicas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1. ADAMS, F. & DAMS, R. A compilation of precisely determined gamma-transition energies of radionuclides produced by reactor irradiation. J. Radional. Chem., 3:99-125, '1969.
2. ALLAWAY, W. H. & CARY, E. E. Determination of submicrogram amounts of selenium in biological materials. Anal.Chem., 36:1359-62, 1964.
3. ALLEN, R.O.; STEINNER, E.; BAKER, M.D. The use of INNA in studying trace element changes induced by cancer therapy in nuclear activation techniques in the life sciences. In: INTERNATIONAL ATOMIC ENERGY AGENCY. Nuclear activation techniques in the life sciences: proceedings of the international symposium, Vienna, May 22-26, 1978. Vienna, 1979. p. 447-65.
4. ANDERSEN, G.H. & GARFIS, J.H. The possible detection of cystic fibrosis by means of the neutron activation analysis of fingernails. Trans. Amer. Nucl. Soc., 10:57, '1967.

5. ANDERSON, C. Ion chromatography: a new technique for clinical chemistry.
Clin. chem. 22(9): 1424-6, 1976.
6. ANDERSON, J.; OSBORN, S.B.; TOMILSON, R.W.; NEWTON, D.; RUNDO, J.; SALMON, L.; SMITH, J. W. Neutron activation analysis in man in vivo, in medical investigation.
Lancet, 2:1201-5, 1964.
7. ATALLA, L. T.; SILVA, C.M.; LIMA, F.W. Activation analysis of arsenic in human hair. Some observation on the problems of external contamination.
An. Acad. Bras. Cienc., 37:433-41, 1965.
8. BABB, A. L.; WOODNUFF, G.L.; WILSON JR, W.E.; HEINTZ, P. A.; MILLER, W.P. The use of neutron activation analysis in the early diagnosis of cystic fibrosis in children.
Trans. Am. Nucl. Soc., 9:591-2, 1966.
9. BATE, L.C. & DYER, F.F. Trace elements in human hair.
Nucleonics, 23(10): 74-81, 1965.
10. BATRA, G. L.; BEWLEY, D.K.; EDWARDS, R.T.H.; JONES, D.A. Analysis of muscle biopsy for sodium, chlorine, potassium and phosphorus by neutron activation.
Int. J. Appl. Radiat. Isotop., 27:267-71, 1976.

11. BATTYE, C.K.; TOMLINSON, R.W.S.; ANDERSON, J.; OSBORN, S. B. Experiments relating to whole-body activation analysis man in vivo using 14-mev incident neutrons . In: INTERNATIONAL ATOMIC ENERGY AGENCY. Nuclear activation techniques in the life sciences, proceedings of an international symposium held in Vienna, May 8-12, 1967. 1967. p.573-82.
12. BECK, D. J. & GILLINGS, B.R.D. Investigation of the usefulness of neutron activation analysis for studying trace elements in saliva. J. Dent. Res., 40:383, 1961.
13. BERGSTRÖM, J. Muscle electrolytes in man. Scand. J. Clin. Lab. Invest., 14 (68): 1-110, 1962.
14. BETHARD, W.F.; SCHMITT, R.A.; OLEHY, D.A.; KAPLAN, S.A.; LING, S.M.; MOLLE, E.D. Enriched stable isotopes of calcium for the study of calcium metabolism in children. In: INTERNATIONAL ATOMIC ENERGY AGENCY. Nuclear activation analysis techniques in the life sciences, proceedings of the international symposium, held in Amsterdam, May 8-12, 1967. Vienna, 1967. p.533-44.
15. BIRD, E.D.; ELLIS, W.H.; THOMAS, W.C. Activation analysis of urine for trace elements. In: Modern trends in activation analysis: proceedings of the international conference held in Texas, April 19-22, 1965. p.216-9. (CONF-650405).

16. BODDY, K. & ALEXANDER, W.D. Clinical experience of in-vivo activation analysis of iodine in the thyroid gland. In : INTERNATIONAL ATOMIC ENERGY AGENCY. Nuclear activation techniques in the life sciences: proceedings of an international symposium held in Amsterdam. May 8-12 1967. Vienna, 1967. p.583-97.
17. BOWEN, H.J.M. The determination of antimony, cadmium, cerium, iridium and silver in biological material by radioactivation. Analyst. 92:118-123, 1967.
18. BOWEN, H.J.M. & GIBBONS, D. Radioactivation analysis. Oxford, Clarendon, 1963.
19. BRÄTTER, P.; GRAWLICK, D.; LAUSCH, J.; ROSICK, U. On the distribution of trace elements in human skeleton. J. Radioanal. Chem., 37:393-403, 1977.
20. BRUNE, D.; NORDBERG, G.P.; WESTER, P.O.; BIVERED, B. Accumulation of heavy metals in tissues of industrially exposed workers. In. INTERNATIONAL ATOMIC ENERGY AGENCY. Nuclear activation techniques in the life sciences: proceedings of an international symposium held in Vienna, May 22-26, 1978. Vienna, 1979. p.643-56.
21. CHAMBERLAIN, M.J.; FREMLIN, J.H.; PETERS, D.K.; PHILLIP, H. Measurements of whole body calcium and sodium by neutron activation analysis in the living subjects. Brit. Med. J., 2:581-3, 1968.

22. CHRISTELL, R.; ERWALL, L.G.; LJUNGREEN, K.; SJÖSTRAND, B. ; WESTERMARK, T. Methods of activation analysis for mercury in the biosphere and in foods. In: Modern trends in activation analysis: proceedings of the international conference held in Texas, April 19-22, 1965. p.380-2. (CONF-650405).
23. CLEMENTE, G.F.; ROSSI, L.C.; SANTORINI, G.P. Trace element composition of hair in the Italian population. In: INTERNATIONAL ATOMIC ENERGY AGENCY. Nuclear activation techniques in the life sciences: proceedings of an international symposium held in Vienna, May 22-26, 1978. Vienna, 1979. p.527-44.
24. COHN, S.H. The present state of in vivo neutron activation analysis in clinical diagnosis and therapy. At. Energy Rev., 18(3):599-659, 1980.
25. COTTINO, F.; MAGRO, J.R.; MALVANO, R. Neutron activation analysis for the study of iodine balance in man. In: INTERNATIONAL ATOMIC ENERGY AGENCY. Nuclear activation techniques in the life sciences, proceedings of a symposium held in Amsterdam, May 8-12, 1967. Vienna, 1967. p.419-25.
26. COVELL, D.F. Determination of gamma-ray abundance directly from the total absorption peak. Anal. Chem., 31:1785-1790, 1959.

27. CURRIE, L.A. Limits for qualitative detection and quantitative determination. Application to radiochemistry. Anal. Chem., 40:586-93, 1968.
28. DANG, H.S.; JAISWAL, D.D.; WANDHWANI, C.N.; SOMASUNDARAN, S. Studies on the role of copper and zinc in liver disorders. In: INTERNATIONAL ATOMIC ENERGY AGENCY. Nuclear activation techniques in the life sciences proceedings of an international symposium, held in Vienna, May 22-26, 1978. Vienna, 1979. p.283-92.
29. DAWSON, E.B.; MENON, M.P.; WAINERDI, R.E.; GANITY, W. J. Activation analysis of placental trace metals. J. Nucl. Med., 9:160-162, 1968.
30. DE JORGE, F.B.; GOES JR., J.S.; GUEDES, J.L.; CINTRA, A.B.U. Biochemical studies on copper, copper oxidase, magnesium, sulfur, calcium and phosphorus in cancer of the breast. Clin. Chim. Acta. 12:403-406, 1965.
31. DE SOETE, O.; GĪJBELS, R.; HOSTE, J. Neutron activation analysis. New York, Wiley-Interscience, 1972. (Chemical analysis: a series of monographs on analytical chemistry and its applications, 34).
32. DIONEX CORPORATION. Operation and maintenance manual Ion Chromatography. Model 10/14. Sunnyvale, California, 1979. (Catálogo).

33. DUBOIS, J.; COLARD, J.; VIS, H.L. The study of hydroelectrolytic metabolism in man by muscular biopsies analysis (with special reference to neutron activation). J. Nucl. Biol. Med., 39(10):39-51, 1966.
34. FELDMAN, M.H. & BATTISTONE, G.C. Fluorine microdetermination by neutron activation analysis, application to bacteriological media. J. Nucl. Med., 7:140-9, 1966.
35. GÖRSKI, L.; HEINONEN, J.; SUNNY, O. Final report of the intercomparison of trace element analysis in dried animal whole blood (A-2), calcinated animal bone (A-3/1) powdered milk (A-8), wheat flour (V-211) and dried potatoes (V-4). IAEA, Vienna, 1974. (IAEA-RL-25).
36. GREENE, R.E. Tracing with activable tracers. Isotop. Radiat. Technol., 5(4):269-77, 1968.
37. HADJMARKOS, D.M. Selenium content of human milk: possible effect on dental caries. J. Pediatr., 63:273-5, 1963.
38. HISLOP, J.S. & WILLIAMS, D.R. The use of gamma activation to study the behaviour of certain metals, in particular lead, during the dry ashing of bone. In: INTERNATIONAL ATOMIC ENERGY AGENCY. Nuclear activation techniques in the life sciences, proceedings of an international symposium held in Bled, Jugoslavia, Apr., 10-14, 1972. Vienna, 1972. p. 51-62.

39. JERVIS, R.E. & TIEFENBACH, B. Arsenic accumulation in people working with and living near a gold smelter: In: INTERNATIONAL ATOMIC ENERGY AGENCY. Nuclear activation techniques in the life sciences: proceedings of an international symposium, Vienna, May 22-26, 1978. Vienna, 1979. p.627-42.
40. LACONI, A.; BRANCATO, G.; MELFI, F. Dosimetria del radio-oro colloidale mediante analisi per attivazione neutronica com reattore de piccola potentia. Radiol. Med., 51:1112-22, 1965.
41. LENIHAM, J.M.A.; COMAR, D.; RIVIERE, R.; KELLERSHOHN, C. Estimating thyroid iodine by activation analysis in vivo. J. nucl. Med., 9(3):110-5, 1967.
42. LENIHAM, J.M.A. & SMITH, H. Activation analysis and public health. In: INTERNATIONAL ATOMIC ENERGY AGENCY. Nuclear activation techniques in the life sciences, proceedings of an international symposium held in Amsterdam, May 8-12, 1967. 1967. p.601-14.
43. LENIHAM, J.M.A.; SMITH, H.; CHALMERS, J.G. Arsenic in detergents. Nature. 181:1463-4, 1958.
44. LIMA, F.W. & ATALLA, L.T. A simple program in "Basic" language for analysis of gamma spectra using an on-line mini computers. J. Radio anal. Chem., 20:769-77, 1974.

45. LIMA, F.W.; SHIBATA, H.; ATALLA, L.T. Activation analysis applied to forensic investigation: some observations on the problem of human hair individualization. In: INTERNATIONAL ATOMIC ENERGY AGENCY. Radiochemical method of analysis: proceedings of a symposium held in Salzburg, 19-23 Oct., 1964. Vienna, 1965. v.1.p.119-36.
46. LINEKIN, D.M.; BALCIUS, J.F.; COOPER, R.D.; BROWNELL, G.L. Multielement analysis of pathological tissues. In: DE VOE, J.R. Modern trends in activation analysis: proceedings of the 1968 international conference held in Gaithersburg, Maryland, Oct. 7-11, 1968. NBS, 1969, v.1. p.110-3, (NBS-SP-312).
47. LITCHFIELD, J.A. & GADDIE, R. The measurement of the phase distribution of water and electrolyte in skeletal muscle by the analysis of small sample. Clin. Sci., 17:483-97, 1958.
48. LOWMAN, J.T. & KNIVIT, W. New in vivo tracer method with the use of nonradioactive isotopes and activation analysis. J. Lab. Clin. Med., 61:1042-8, 1963.
49. MACHADO, M.C.C. Comportamento do nitrogênio total hepático e muscular após queimaduras. Estudo experimental em ratos. São Paulo, 1967. (Tese de Doutorado, Faculdade de Medicina USP).

50. MOKOTOFF, R.; ROSSI, G.; LEITER, L. The electrolyte content of skeletal muscle in congestive heart failure: a comparison of results with inulin and chloride as reference standards for extracellular water. J. Clin. Invest., 31:291-9, 1952.
51. NADKARNI, R.A. Role of neutron activation analysis in biomedical and environmental studies. Radiochem. Radioanal. Letters. 19(1):17-24, 1974.
52. NADKARNI, R.A. & MORRISON, G.H. Multielement instrumental neutron activation analysis of biological materials. Anal. Chem., 45(11):1957-60, 1973.
53. NALIMOV, V.V. The application of mathematical statistics to chemical analysis. Reading Mass., Addison-Wesley, 1963.
54. NELP, W.B.; MURANO, R.; PAILTHROP, K.; PALMER, H.E.; RICH, L.; WILLIAMS, J.L.; RUDD, T.G.; HINN, G. Measuring total body calcium by in vivo neutron activation analysis. Trans. Amer. Nucl. Soc., 12(2):459-60, 1969.
55. NEWTON, D. Activation analysis in vivo using 5 Mev incident neutrons. Int. J. Appl. Radiat. Isot., 20:61-8, 1969.
-

56. NIXON, G.S.; SMITH, H.; LIVINGSTON, H.D. Trace elements in human tooth enamel. In: INTERNATIONAL ATOMIC ENERGY AGENCY. Nuclear activation techniques in the life sciences: proceedings of a symposium held in Amsterdam, May 8-12, 1967. Vienna, 1967. p.455-62.
57. PALMER, H.E.; NELP, W.B.; MURANO, R.; RICH, C. The feasibility of in vivo neutron activation analysis of total body calcium and other elements of body composition. Phys. Med. Biol., 13:269-79, 1968.
58. PARR, R.M. Intercomparison of minor and trace elements in animal muscle (H-4). Vienna, IAEA, 1980. (IAEA-RL/69).
59. PEISACH, M. & PRETORIUS, R. Isotopic determination of calcium by proton activation. Anal.Chem., 38:956-9, 1966.
60. PERKINS, K.W.; HALLER, W.A.; THORPE, J.D. Trace element analysis of human lung tissue by neutron activation and instrumental analysis. In: INTERNATIONAL ATOMIC ENERGY AGENCY. Nuclear activation techniques in the life sciences: proceedings of a symposium, held in Amsterdam, May 8-12, 1967. IAEA, Vienna, 1967, p.557-66.
61. PIJCK, J. & HOSTE, J. The determination of sodium and potassium in biological materials by neutron activation analysis. Clin. Chim. Acta., 7:5-12, 1962.

62. PIRES, M.A.F. Resolução analítica da mistura TBP-HDBP-H₂MBP H₃PO₄. Aplicação ao sistema UO₂(NO₃) - HNO₃ -TBP-Diluyente. São Paulo, 1983. (Dissertação de mestrado, IPEN-CNEN/SP).
63. PLANTIN, L.O. A method for the determination of Mn, Cu, Zn, K and Na in small tissue biopsies by neutron activation analysis. J. Radioanal. Chem., 12:441-9, 1972.
64. RANCITELLI, L.A.; COOPER, J.A.; PERKINS, R.W. The multielement analysis of biological materials by neutron activation and direct instrumental technique. In: DE VOE, J.R. ed. Modern trends in activation analysis proceedings of the 1968 international conference held in Gaithersburg, Maryland, Oct. 7-11, 1968. v.1, p.101-9 . (NBS-SP-312).
65. REIFFEL, L. & STONE, C.A. Neutron activation analysis of tissue measurement of sodium, potassium and phosphorus in muscle. J. Lab. Clin. Med., 49(2):286-91, 1957.
66. REHFELD, F.R. & LOKEN, H.F. Improved ion-chromatography method for determining Mg⁺² and Ca⁺² in serum. Clin. Chem., 26(8):1232-33, 1980.
67. SABBIONI, E.; MARAFANTE, E.; PIETRA, R.; GOETZ, L.; GIRARDI, F.; OVINI, E. The association of vanadium with the iron transport system in human blood a determined by gel filtration and neutron activation analysis. In: INTERNATIONAL ATOMIC ENERGY AGENCY. Nuclear activation
-

- techniques in the life sciences, proceedings of a symposium, held in Vienna, May 22-26, 1978. Vienna, IAEA, 1979. p.179-192.
68. SAMSAHL, K. & SOREMARK, R. Comparative and absolute measurements of 11 inorganic constituents of 38 human tooth samples with gamma-ray spectrometry. In: BROWN, M.W. ed. Modern trends in activation analysis, proceedings of the international conference on..., held in Texas, December 1961. 1962. p.149-54.
69. SJÖSTRAND, B. Simultaneous determination of mercury and arsenic in biological and organic materials by activation analysis. Anal. Chem., 36:814-9, 1964.
70. SKLAVENITIS, H. & COMAR, H. L'analyse par activation appliquée à l'étude du métabolisme du brome chez l'homme. In: INTERNATIONAL ATOMIC ENERGY AGENCY. Nuclear activation techniques in the life sciences: proceedings of a symposium held in Amsterdam, May 8-12, 1967. IAEA, Vienna, p. 435-444.
71. SMALL, H.; STEVENS, T.V.; BAUMAN, W.C. Novel ion exchange chromatographic method using conductimetric detection. Anal. Chem., 47(11):1801-9, 1975.
72. SMITH, H. Estimation of mercury in biological material by neutron activation analysis. Anal. Chem., 35:635-6, 1963.

73. SMITH, H.; FORSHUFVUD, S.; WASSEN, A. Distribution of arsenic in Napoleon's hair. Nature, 194:725-6, 1962.
74. SPENCER, R.P.; MITCHELL, T.G.; KING, R.E. Medical application of NAA. Int. J. Appl. Radiat. Isotop., 3:104-12, 1958.
75. SPINKS, T.J.; BEWLEY, D.K.; JOPLIN, G.F.; EVANS, I.M.A.; VLOTIDES, J.; PAOLILLO, M.; RENICAR, A.S.O. Observations on total-body calcium in humans with bone disease. In : INTERNATIONAL ATOMIC ENERGY AGENCY. Nuclear activation techniques in the life science: proceedings of an international symposium held in Vienna, May 22-26, 1978. Vienna, 1979. p.763-74.
76. STRAIN, W.H.; ROB, C.G.; POIRIER, W.J.; HENNESSEN, J.A.; MONTOYA, J.; BARBIER, W. Nuclear methods for the study of zinc metabolism. Trans. Am. Nucl. Soc., 10:60-1, 1967.
77. TWITTY, B.L. & BOBACH, M.N. The determination of thorium in urine by thermal neutron activation analysis. Trans. Am. Nucl. Soc., 10:57-8, 1967.
78. WAGNER, H.N.; NELP JR, W.B.; DOWLING, J.H. Use of neutron activation analysis for studying stable iodide uptake by the thyroid. J. Clin. Invest., 40:1984-92, 1961.
-

79. WESTER, P.O. Concentration of 24 trace elements in human heart tissue determined by neutron activation analysis. Scan. J. Clin. Lab. Invest., 17:357-70, 1963.

 80. WESTERMARK, J. & SJÖSTRAND, B. Activation analysis of cadmium in small biopsy sample. Int. J. Appl. Radiat. Isotop., 9:78, 1960.
-