

Artigo / Article

## Avaliação de multielementos em amostras de sangue humano usando SR-TXRF *Evaluation of multielements in human blood samples using synchrotron radiation*

Nivia Graciele V. Pinto<sup>1</sup>

Carla L. S. Mota<sup>1</sup>

Regina Cely R. Barroso<sup>2</sup>

Silvana Moreira<sup>3</sup>

Delson Braz<sup>4</sup>

*A técnica de fluorescência de raios X por reflexão total usando radiação síncrotron (SR-TXRF) é uma poderosa ferramenta utilizada para a determinação das concentrações elementares presentes em amostras biológicas. O objetivo deste estudo é avaliar as possíveis alterações causadas por processos de irradiação na concentração de elementos-traço em amostras de sangue humano. As amostras de sangue foram coletadas no Laboratório de Análises Clínicas Dr. Elilel Figueiredo, Rio de Janeiro, e divididas em dois grupos. O primeiro grupo foi irradiado com doses de 1.500, 2.500 e 3.000 cGy, utilizando o irradiador Gammacell 220 Excel, e o segundo foi irradiado com doses que variaram de 2 cGy a 100 cGy, utilizando uma bomba de cobalto Theratron 780 C do Inca, Rio de Janeiro. Todas as amostras de sangue total, plasma e matriz celular foram então liofilizadas e, em seguida, passaram pelo procedimento padrão de digestão. Todas as medidas foram realizadas na linha de fluorescência de raios X do Laboratório Nacional de Luz Síncrotron (LNLS), em Campinas, Brasil. Não se verificou variação significativa na concentração de Ca e, em contrapartida, o K foi o único elemento que sofreu alterações significativas para todas as amostras analisadas em função da dose. A concentração de Fe diminuiu apenas para as amostras de sangue total e plasma. A concentração de Zn apresentou uma diminuição significativa somente para as amostras de sangue total. Rev. Bras. Hematol. Hemoter. 2010;32(3):195-202.*

**Palavras-chave:** Células sanguíneas; radiação ionizante; fluorescência.

### Introdução

As radiações ionizantes são caracterizadas por sua capacidade de excitar e ionizar átomos da matéria com a qual interage. A probabilidade de ocorrência de mecanismos de interação, isto é, de alteração na energia ou direção dos fótons, depende de sua energia e do número atômico do meio. A radiação ionizante (RI) é conhecida potencialmente por interferir nas funções celulares em todos os níveis de organização celular. A sensibilidade dos órgãos do corpo humano está relacionada ao tipo de células que os compõem. Por exemplo, se as células formadoras do sangue são as mais

sensíveis devido à sua taxa de reprodução ser rápida, os órgãos formadores do sangue são os mais sensíveis à radiação.<sup>1,2</sup>

A radiação pode alterar as concentrações de alguns elementos químicos.<sup>3</sup> A análise quantitativa de tais elementos tem um papel importante na área biomédica, uma vez que estes elementos podem ser essenciais à fisiologia dos tecidos biológicos. Qualquer elemento, seja ele essencial ou não, pode ser tóxico a partir de determinadas concentrações, podendo, em alguns casos, provocar até a morte do indivíduo. Estudos das concentrações elementares em amostras de sangue vêm sendo realizados justamente por ele funcionar

<sup>1</sup>Física. Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Instituto de Física, Campus Francisco Xavier – Rio de Janeiro-RJ.

<sup>2</sup>Física. Professor Adjunto da Universidade do Estado do Rio de Janeiro – Uerj – Rio de Janeiro-RJ.

<sup>3</sup>Física. Professora Titular na Universidade Estadual de Campinas – Unicamp – Campinas-SP.

<sup>4</sup>Físico. Professor Adjunto da Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ) e professor adjunto do Instituto Alberto Luiz Coimbra de Pós-graduação e Pesquisa de Engenharia – Rio de Janeiro-RJ.

Uerj-IF, UFRJ-Coppe e Unicamp-FEC.

**Correspondência:** Nivia G. Villela Pinto  
R. São Francisco Xavier, 524, 3º andar, Bloco B, Sala 3019  
20550-013 – Rio de Janeiro-RJ – Brasil  
E-mail: nitatag@gmail.com  
Doi: 10.1590/S1516-84842010005000073

com um eficiente sistema de transporte do organismo humano.

A técnica analítica de fluorescência de raios X (XRF) tem sido utilizada para a avaliação qualiquantitativa da composição química em vários tipos de amostras. Esta técnica, por permitir a análise de vários elementos simultaneamente de modo rápido e a baixo custo, tem um elevado potencial de aplicação em várias áreas, onde há necessidade de correlação entre os elementos essenciais e tóxicos. A fluorescência de raios X por reflexão total (TXRF) vem se desenvolvendo de forma bastante expressiva nos últimos anos, com grande aplicação na análise de elementos-traço, na faixa de nanogramas ou ppb.<sup>4</sup>

Atualmente, uma das técnicas mais utilizadas para análise por fluorescência de raios X é a utilização de luz Síncrotron. A associação de luz Síncrotron à TXRF possibilita que sejam atingidos limites de detecção mais baixos do que quando se utiliza um tubo de raios X de alta potência. Sendo assim, esse trabalho tem como objetivo estudar alterações elementares em amostras de sangue irradiadas utilizando SR-TXRF.

## Material e Método

### Preparação de amostras

As amostras de sangue doadas foram acondicionadas em tubos contendo o anticoagulante EDTA (Ácido etileno-diamino tetra-acético). As amostras utilizadas nesse estudo foram autorizadas pelo titular, respeitando a condição de que a identidade dos doadores não seria fornecida. Após a coleta, as amostras foram acondicionadas em geladeira a uma temperatura de 4°C.

As amostras foram divididas em dois grupos para irradiação: O primeiro grupo foi irradiado com doses de 1.500, 2.500 e 3.000 cGy no irradiador Gammacell 220 Excel, fabricado pela Nordion. E o segundo grupo foi encaminhado à irradiação em uma bomba de cobalto Theratron 780 C, instalado no Instituto Nacional do Câncer. As amostras foram irradiadas com as seguintes doses: 2, 4, 8, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 100 cGy, usando um campo 15 x 15 cm a uma distância fonte-superfície (SSD) igual a 80 cm.

Após a irradiação, o conjunto total de amostras foi dividido em sangue total (ST), plasma (PL) e matriz celular (MC). Para realizar a separação do plasma da matriz celular, as amostras ficaram em repouso e, assim, devido à gravidade, os mais pesados se depositaram no fundo do tubo, enquanto o plasma, mais leve, ficou sobrenadante. O plasma e os elementos figurados foram retirados dos tubos por aspiração utilizando-se uma pipeta.

Em seguida, todas as amostras foram liofilizadas por 48 horas a uma temperatura de -60°C, e uma pressão de -780 mmHg. Na liofilização, as amostras biológicas são submetidas à baixa temperatura e pressão, fazendo com que a água presente se transforme em gelo que, em seguida, devido à baixa pressão, sublima.

Após a liofilização aferiram-se as massas das amostras e então encaminhadas à digestão química com adição de ácido nítrico. Uma solução de Ga (9,32 µg/mL<sup>-1</sup>) foi usada como padrão interno. As amostras foram analisadas na linha de fluorescência de raios X (XRF) no Laboratório Nacional de Luz Síncrotron (LNLS), Campinas.

Todas as medidas foram realizadas em triplicata com um tempo de excitação igual a 100s, resultando em 300s por amostra. Os espectros de raios X obtidos foram analisados com o auxílio do programa computacional AXIL (*Analysis of X-ray spectra by Iterative Least squares fitting*). Este programa faz parte do pacote Quantitative Xray Analysis System - QXAS, distribuído pela Agência Nacional de Energia Atômica (IAEA), o mais utilizado na área de fluorescência de raios X (disponível em [http://www.iaea.org/OurWork/ST/NA/NAAL/pci/ins/xrf/downloads/QXAS\\_Manual.pdf](http://www.iaea.org/OurWork/ST/NA/NAAL/pci/ins/xrf/downloads/QXAS_Manual.pdf))

### Medidas de SR-TXRF

A partir do uso de filmes finos para análise, o efeito matriz, que normalmente requer correções na fluorescência de raios X convencional, não ocorre na TXRF.<sup>5,6</sup> Desse modo, a equação básica para análise quantitativa é a relação entre a intensidade fluorescente da linha característica e a concentração de um elemento de interesse e pode ser obtida conforme a equação 1.

$$C_i = (I_i/I_{Ga}) \times (C_{Ga}/S_{ri}) \quad (1)$$

Onde:

- $I_i$  = intensidade do elemento i na amostra (cps);
- $C_i$  = concentração do elemento i na amostra (µg.mL<sup>-1</sup>);
- $I_{Ga}$  = intensidade do padrão interno na amostra (cps);
- $C_{Ga}$  = concentração do padrão interno na amostra (µg.mL<sup>-1</sup>);
- $S_{ri}$  = sensibilidade relativa para o elemento i (adimensional).

A Figura 1 mostra os espectros obtidos para as amostras de sangue total (ST), matriz celular (MC) e plasma (PL), respectivamente. Para calcular as sensibilidades relativas foram utilizadas cinco soluções padrão contendo elementos conhecidos e em diferentes concentrações (mg/L), acrescidas do elemento Gálio (Ga), utilizado como padrão interno.

A partir das soluções padrão foi determinada a sensibilidade para cada elemento e, em seguida, feito o ajuste dos valores experimentais com a finalidade de se obter uma curva da sensibilidade em função do número atômico para os elementos na faixa de energia de interesse. A Figura 2 mostra a curva de sensibilidade para a série K.

O limite de detecção (LD) foi calculado baseado no espectro da radiação de fundo, área abaixo do pico de cada elemento de interesse, nas amostras medidas por 100s. Foi realizado o ajuste dos pontos experimentais a fim de se obter a curva do limite de detecção em função do número atômico

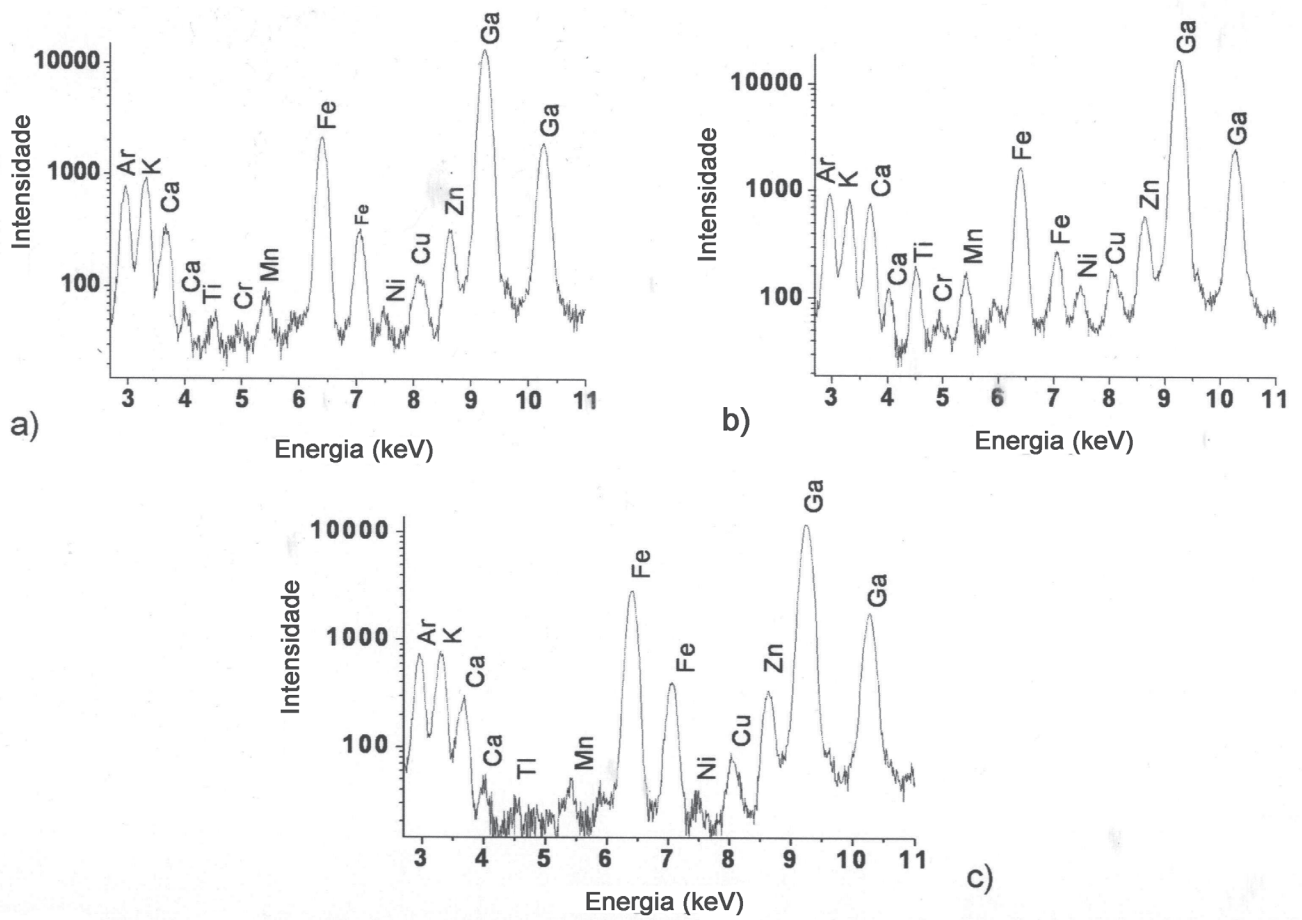


Figura 1. Espectro característico a) para o sangue total, b) para plasma e c) para matriz celular

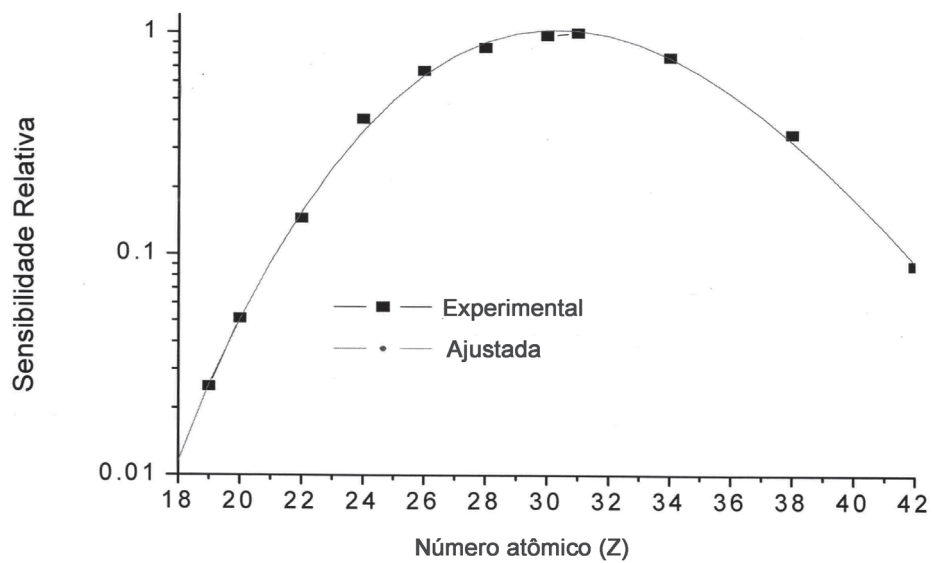


Figura 2. Curva de sensibilidade para série K

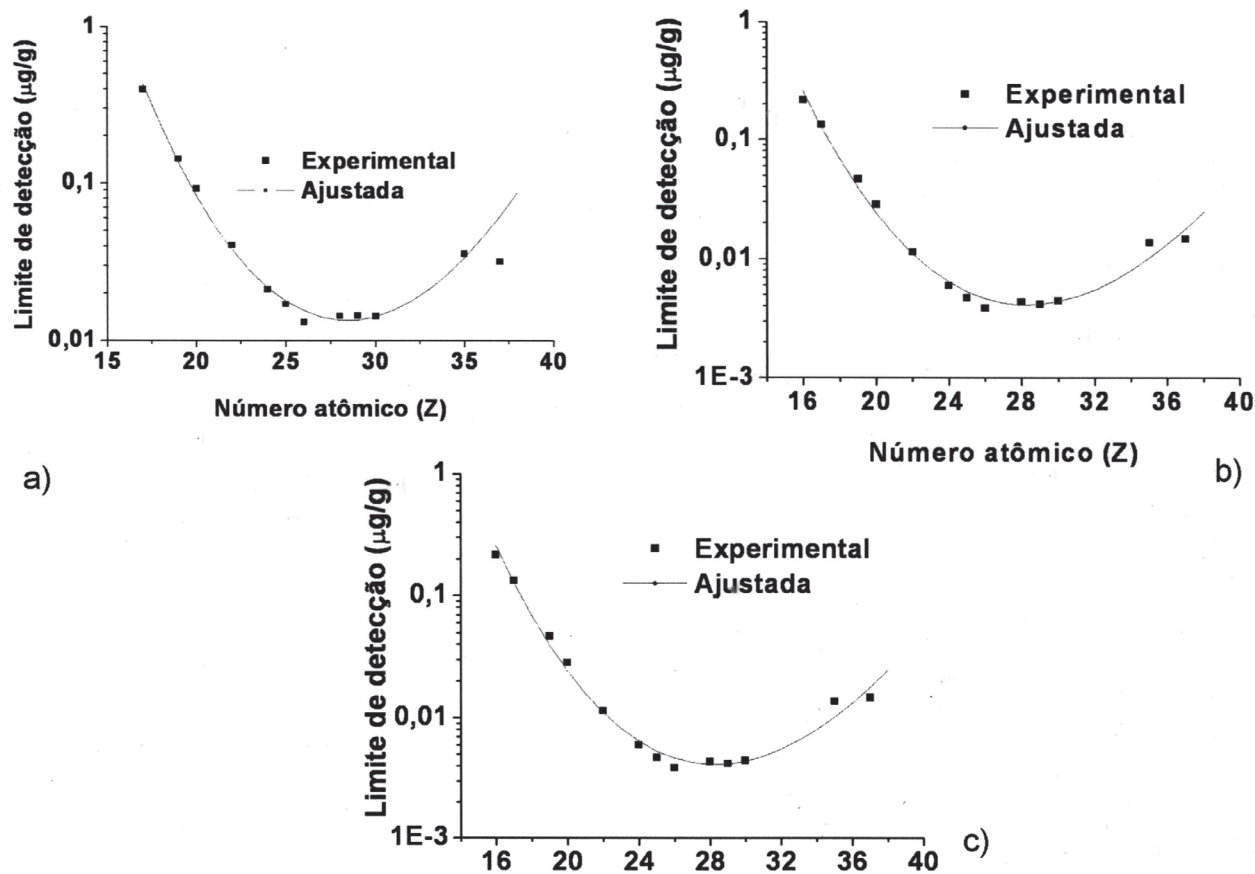


Figura 3. Limite de detecção para a) plasma b) matriz celular c) sangue total

para os elementos da série K. As curvas obtidas são apresentadas na Figura 3.

A calibração do sistema de SR-TXRF foi verificada através da determinação da concentração elementar em uma amostra certificada de água mineral (NIST/SEM 1640) e em uma amostra certificada de solo (NIST/SEM 2709), ambas preparadas por digestão, seguindo o mesmo procedimento usado para o preparo das amostras de sangue. As concentrações são mostradas nas Tabelas 1 e 2. É válido ressaltar que foram utilizados no presente estudo dois padrões certificados diferentes com o objetivo de avaliar a eficiência do processo de digestão, e esses valores apresentaram desvios padrões relativos inferiores a 10% para a maioria dos elementos.

**Resultados**

Diversos trabalhos<sup>7-9</sup> citam elementos essenciais ao ser humano, bem como os efeitos da variação da concentração dos mesmos. Para a realização desse trabalho foram escolhidos quatro elementos químicos a serem analisados:

Tabela 1. Comparação dos valores medidos e certificados da amostra de referência "Trace Elements in Natural Water" (NIST/SRM 1640) medidos por SR-TXRF e o erro relativo (Er) entre essas medidas

| Elementos | Certificado (µg/mL) | Er (%) |
|-----------|---------------------|--------|
| Ca*       | 6,40 ± 0,08*        | 0,9    |
| K         | 903,64 ± 24,00      | 8,7    |
| V         | 11,81 ± 0,33        | 0,2    |
| Cr        | 35,09 ± 0,91        | 3,1    |
| Mn        | 110,45 ± 1,00       | 9,8    |
| Co        | 18,44 ± 0,28        | 15     |
| Ni        | 24,91 ± 0,73        | 24     |
| Cu        | 77,45 ± 1,09        | 11     |
| Zn        | 48,36 ± 0,91        | 3,1    |
| Rb        | 19,96 ± 0,20        | 5,8    |
| Sr        | 112,91 ± 0,64       | 9,0    |

\*mg/kg

Potássio (K), Cálcio (Ca), Ferro (Fe) e Zinco (Zn).

Os resultados obtidos para cada dose foram comparados com os obtidos para as amostras de controle utilizando-se teste t-Student. Foram considerados estatisticamente diferentes quando  $p < 0,05$ , com um grau de confiança de 95% ( $\alpha = 0,05$ ).

*Análise quanto à baixa dose*

O teste de hipótese utilizado foi o teste-t de Student cuja finalidade é estabelecer um critério que permita distinguir entre diferenças amostrais e diferenças reais. A partir dos dados de *p-value*, foi possível construir os gráficos a seguir (Figuras 4, 5 e 6), relacionando a concentração relativa (de cada elemento que sofreu mudança significativa com as amostras não irradiadas) com cada dose estudada.

Como resultado deste trabalho, para o grupo de baixa dose, a análise estatística utilizada mostrou que a variação do nível de Ca encontrada não é significativa ( $p > 0,05$ ) nem para o sangue total nem para hemocomponentes.

Podem-se verificar alterações nas concentrações de potássio (K) para todas as amostras analisadas. A concentração de ferro (Fe) apresentou variações significativas apenas para as amostras de sangue total e plasma, enquanto a concentração de zinco apresentou variação significativa somente para as amostras de sangue total.

Nas amostras de sangue total, os resultados mostraram uma diminuição da concentração do potássio (K), ferro (Fe) e do zinco (Zn) quando comparados com as amostras não irradiadas, em função do aumento de dose dentro de todo o intervalo estudado (de 2 a 100cGy).

Nas amostras de matriz celular, pode-se verificar uma diminuição da concentração de K somente a partir de 20cGy. Para as doses abaixo de 20cGy não houve mudança significativa entre as amostras irradiadas e as não irradiadas.

Para as amostras de plasma, a concentração de K aumentou a partir de 4cGy. Entretanto, o nível de Fe diminuiu para todas as doses analisadas.

Analisando os elementos minerais, potássio (K) e cálcio (Ca), e os elementos traço essenciais, ferro (Fe) e zinco (Zn), no sangue total, na matriz celular e no plasma humano, conclui-se que mais informações a respeito do balanceamento dos eletrólitos e da condição nutricional do paciente devem ser consideradas.

Tabela 2. Comparação dos valores medidos e certificados da amostra de referência "San Joaquim Soil" (NIST/SRM 2709) e o erro relativo (Er) entre essas medidas

| Elementos | Medido (µg/mL) | Certificado (µg/mL) | Er (%) |
|-----------|----------------|---------------------|--------|
| Ca        | 17916 ± 1006   | 18900 ± 500         | 5,2    |
| V         | 113 ± 8        | 112 ± 5             | 0,9    |
| Cr        | 141 ± 6        | 130 ± 4             | 8,5    |
| Mn        | 549 ± 6        | 538 ± 17            | 2,0    |
| Fe        | 35836 ± 2000   | 35000 ± 1100        | 2,4    |
| Cu        | 36,4 ± 3,0     | 34,6 ± 0,7          | 5,2    |
| Zn        | 104 ± 5        | 18900 ± 500         | 24     |

\*mg/kg

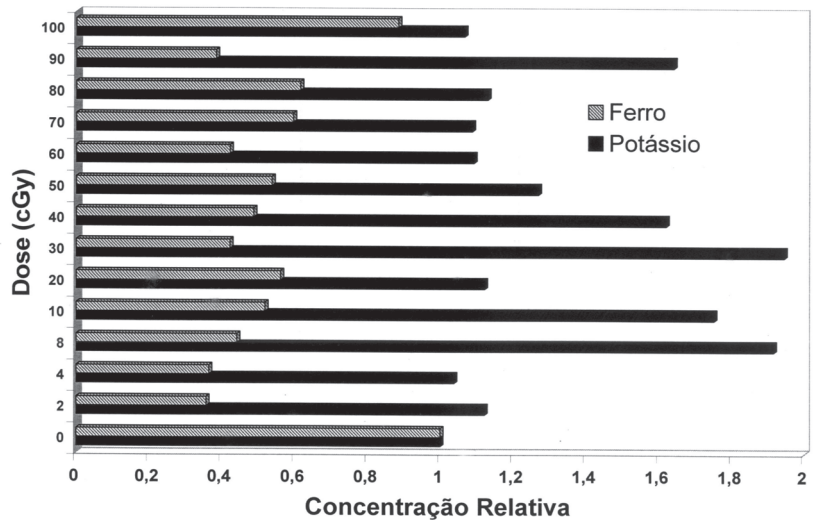


Figura 4. Concentrações relativas para o plasma

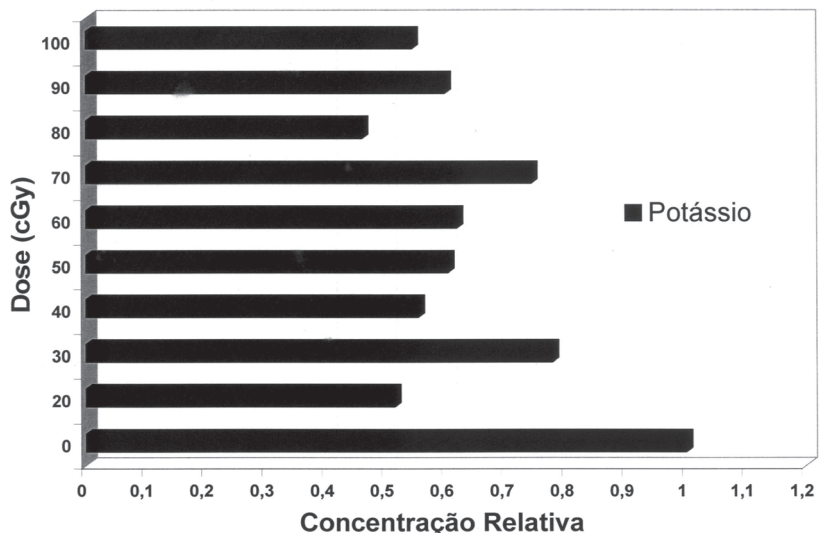


Figura 5. Concentrações relativas para a matriz celular

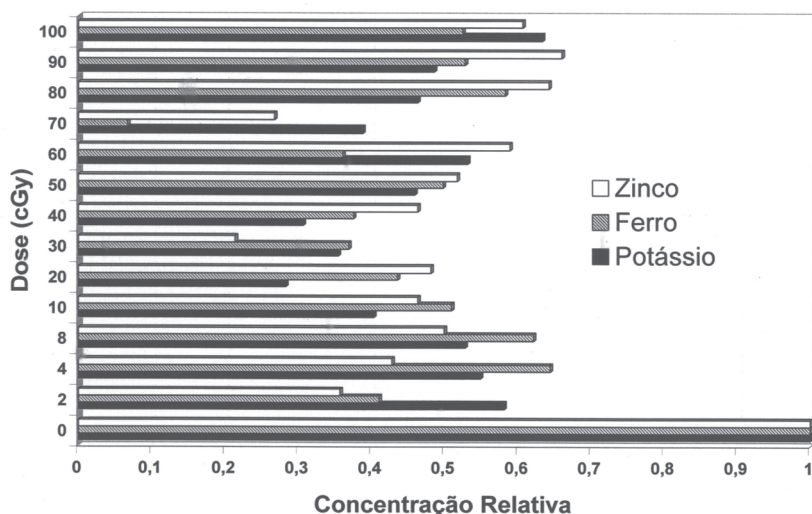


Figura 6. Concentrações relativas para Sangue Total

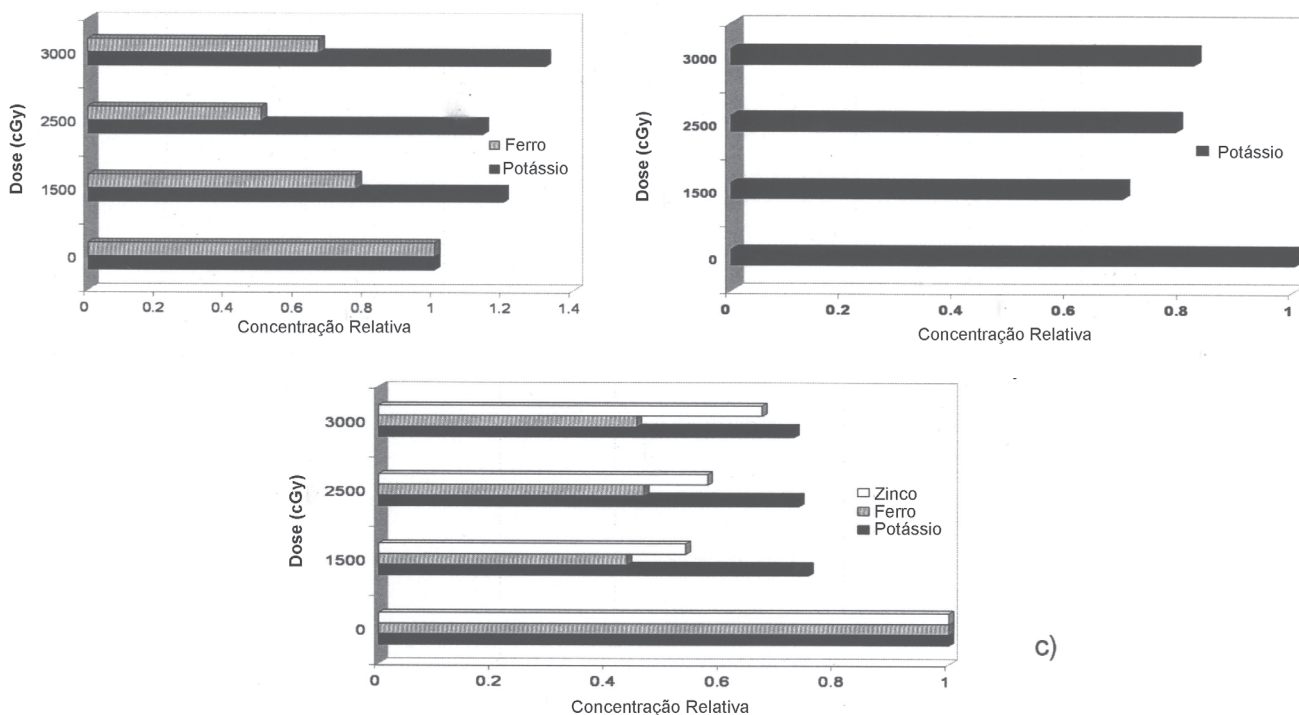


Figura 7. Concentrações relativa para a) Plasma, b) matriz celular e c) sangue total

*Análise quanto à alta dose*

A Figura 7 mostra as concentrações relativas dos elementos que apresentaram diferenças significativas quando comparados com as amostras de controle.

Pode-se observar que o zinco (Zn) apresentou uma diminuição de sua concentração quando comparado com as amostras de controle apenas para o sangue total.

Para as concentrações de ferro (Fe) foi possível observar

diferenças quando comparadas com amostras não irradiadas para o sangue total e para o plasma. No sangue total e no plasma, os resultados mostraram uma diminuição em sua concentração para os valores de dose analisadas.

Para as concentrações de potássio (K) pode-se verificar que este foi o único elemento que sofreu alterações significativas em sua concentração para todos os tipos de amostras analisadas (ST, MC e PL). Os resultados obtidos

mostram uma diminuição em sua concentração para a matriz celular e para o sangue total e um aumento no plasma.

#### *Análise do Cálcio (Ca)*

A variação do nível de Ca para essas amostras não apresentou mudança significativa. Dentro do nível de confiança estabelecido ( $\alpha=0,05$ ), não se verificou variação significativa na concentração em função da dose, considerando o intervalo de doses estudado, para nenhum grupo de amostras quando comparado com as amostras de controle (0Gy) como mostram as Tabelas 3, 4 e 5.

#### **Conclusões**

Esse trabalho permitiu concluir que a variação do nível de Ca para as amostras estudadas não apresentou mudança significativa. A concentração de potássio variou em todas as amostras estudadas independente do intervalo de dose, sendo que, na matriz celular, o potássio (K) só apresentou sensibilidade à radiação a partir de 20 cGy. O zinco (Zn) se mostrou sensível somente nas amostras de sangue total analisadas neste trabalho. A concentração de ferro (Fe) variou significativamente nas amostras de sangue total e plasma. Além disso, esse trabalho abre novas perspectivas quanto ao estudo de avaliação do efeito de dose em amostras de sangue humano.

Tabela 3. Comparação das concentrações de cálcio para as amostras de matriz celular

| Cálcio (Ca) |                        |                                  |         |
|-------------|------------------------|----------------------------------|---------|
| Dose (cGy)  | Número de amostras (n) | Concentração ( $\mu\text{g/g}$ ) | p-value |
| 0           | 19                     | 100±56                           |         |
| 2           | 6                      | 110±110                          | 0,767   |
| 4           | 4                      | 130±63                           | 0,350   |
| 8           | 4                      | 160±64                           | 0,070   |
| 10          | 5                      | 69±31                            | 0,251   |
| 20          | 4                      | 66±19                            | 0,251   |
| 30          | 6                      | 130±52                           | 0,257   |
| 40          | 4                      | 120±59                           | 0,526   |
| 50          | 5                      | 71±24                            | 0,276   |
| 60          | 5                      | 110±46                           | 0,718   |
| 70          | 7                      | 150±58                           | 0,057   |
| 80          | 4                      | 49±22                            | 0,092   |
| 90          | 4                      | 74±12                            | 0,374   |
| 100         | 5                      | 56±19                            | 0,102   |
| 1500        | 15                     | 126±45                           | 0,153   |
| 2500        | 11                     | 124±36                           | 0,214   |
| 3000        | 13                     | 109±59                           | 0,665   |

Tabela 4 . Comparação das concentrações de cálcio para as amostras de sangue total.

| Cálcio (Ca) |                        |                                  |         |
|-------------|------------------------|----------------------------------|---------|
| Dose (cGy)  | Número de amostras (n) | Concentração ( $\mu\text{g/g}$ ) | p-value |
| 0           | 19                     | 400±260                          |         |
| 2           | 4                      | 354±202                          | 0,744   |
| 4           | 4                      | 260±76                           | 0,306   |
| 8           | 4                      | 200±65                           | 0,148   |
| 10          | 3                      | 150±89                           | 0,121   |
| 20          | 5                      | 214±45                           | 0,131   |
| 30          | 2                      | 72±50                            | 0,098   |
| 40          | 3                      | 130±79                           | 0,095   |
| 50          | 6                      | 186±48                           | 0,084   |
| 60          | 4                      | 125±11                           | 0,050   |
| 70          | 2                      | 318±338                          | 0,682   |
| 80          | 5                      | 186±32                           | 0,084   |
| 90          | 4                      | 151±33                           | 0,074   |
| 100         | 4                      | 124±32                           | 0,056   |
| 1500        | 10                     | 308±187                          | 0,332   |
| 2500        | 13                     | 385±124                          | 0,848   |
| 3000        | 13                     | 398±144                          | 0,980   |

Tabela 5 . Comparação das concentrações de cálcio para as amostras de plasma

| Cálcio (Ca) |                        |                                  |         |
|-------------|------------------------|----------------------------------|---------|
| Dose (cGy)  | Número de amostras (n) | Concentração ( $\mu\text{g/g}$ ) | p-value |
| 0           | 18                     | 550±230                          |         |
| 2           | 5                      | 496±22                           | 0,645   |
| 4           | 6                      | 622±151                          | 0,484   |
| 8           | 6                      | 600±174                          | 0,632   |
| 10          | 5                      | 720±260                          | 0,169   |
| 20          | 7                      | 697±178                          | 0,143   |
| 30          | 4                      | 785±265                          | 0,086   |
| 40          | 5                      | 717±375                          | 0,224   |
| 50          | 5                      | 430±150                          | 0,286   |
| 60          | 7                      | 530±350                          | 0,868   |
| 70          | 5                      | 570±93                           | 0,853   |
| 80          | 4                      | 450±120                          | 0,414   |
| 90          | 6                      | 500±100                          | 0,615   |
| 100         | 6                      | 410±160                          | 0,183   |
| 1500        | 15                     | 515±213                          | 0,656   |
| 2500        | 13                     | 406±170                          | 0,066   |
| 3000        | 11                     | 353±284                          | 0,050   |

**Abstract**

*Total-reflection X-ray fluorescence using synchrotron radiation (SR-TXRF) is a powerful analytical technique to study trace elements in biomedical samples. The aim of this study was to investigate possible changes in essential trace element concentrations caused by irradiation procedures. Fresh blood samples were obtained from the Dr. Eliel Figueiredo Laboratory, Rio de Janeiro. The samples were separated in two groups. The first was irradiated with doses of 1500, 2500 and 3000cGy, using a Gammacell 220 Exce irradiator, and the second was irradiated with doses of from 2 to 100 cGy, using gamma radiation in a Theraton 780 C irradiator. After irradiation, all samples were lyophilized to remove the water and then submitted to standard chemical digestion by adding nitric acid. All the measurements were carried out by X-Ray Fluorescence beamline at the Brazilian Synchrotron Light Laboratory (LNLS) in Campinas. While no positive association was found for variations in calcium, the variations in potassium were positively associated with the radiation dose for all analyzed samples. On the other hand, iron levels decreased for whole blood and plasma and zinc levels decreased only in whole blood as the dose increased. Rev. Bras. Hematol. Hemoter. 2010;32(3):195-202.*

**Key words:** Blood cells; radiation, ionizing; fluorescence.

9. Greaves E D, Marcó Parra L M, Rojas A, Sajo-Bohus L. Determination of platinum levels in serum and urine samples from pediatric cancer patients by TXRF. X-ray Spectrom. 2000;29(5), 349-53.

Suporte Financeiro: Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq

Avaliação: Editor e dois revisores externos  
Conflito de interesse: sem conflito de interesse

Recebido: 21/08/2009  
Aceito após modificações: 09/05/2010

**Agradecimentos**

*Os autores agradecem à agência brasileira CNPq pelo suporte financeiro e ao Laboratório de Análises Clínicas Dr. Eliel Figueiredo.*

**Referências Bibliográficas**

1. Okuno E. Radiação: Efeitos, Riscos e Benefícios, Editora Harbra, São Paulo, 1998, pp. 213-244.
2. Kondo S. Health Effects of Low-level Radiation, Medical Physics Publishing, Kinki University Press, Madison, Osaka, Japan, 1993.
3. Hosseinimehr S, Zakaryae V, Froughizadeh M. Oral oxymetholone reduces mortality induced by gamma irradiation in mice through stimulation of hematopoietic cells. Mol Cell Biochem. 2006;287(1-2):193-9.
4. Moreira S, Ficarís M, Vives A, Nascimento Filho V, Zucchi O, Barroso R, et al. Heavy metals in groundwater using synchrotron radiation total reflection X-ray analysis. Instrum Sci Technol. 2006;34(5):567-85.
5. Boumans P, Klockenkämper R. eds. Total reflection X-ray fluorescence spectrometry. Spectrochim Acta. 1989. 44B, 433.
6. Klockenkämper R, von Bohlen A. Elemental analysis of environmental samples by total reflection X-ray fluorescence: a review. X-ray Spectrom. 1996;25:156-62.
7. Ayala R, Alvarez E, Wobrauschek P. Direct determination of lead in whole human blood by total reflection X-ray fluorescence spectrometry. Spectrochim Acta. 1991;46B:1429-32.
8. Giaouque RD, Goulding FS, Jaklevic JM, Pehl RH. Trace element determination with semiconductor detector X-ray spectrometers. Anal Chem. 1973;45(4):671-81.