



**UNIVERSIDADE  
ESTADUAL DE LONDRINA**

---

DANIELE APARECIDA MAIA CLETO

**ANÁLISE DE SALIVA E DO FLUIDO SULCO GENGIVAL  
PELO MÉTODO DE FLUORESCÊNCIA DE RAIOS X POR  
REFLEXÃO TOTAL**

---

Londrina  
2013

DANIELE APARECIDA MAIA CLETO

**ANÁLISE DE SALIVA E DO FLUIDO SULCO GENGIVAL  
PELO MÉTODO DE FLUORESCÊNCIA DE RAIOS X POR  
REFLEXÃO TOTAL**

Dissertação apresentada ao curso de Pós-Graduação em Física da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Física.

Orientador: Prof. Dr. Avacir Casanova Andrello

Londrina  
2013

**Catálogo elaborado pela Divisão de Processos Técnicos da Biblioteca Central da  
Universidade Estadual de Londrina**

**Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)**

Cb34a Cleto, Daniele Aparecida Maia.  
Análise de saliva e do fluido sulco gengival pelo método de fluorescência de raios X por reflexão total / Daniele Aparecida Maia Cleto. – Londrina, 2013.  
85 f.: il.

Orientador: Avacir Casanova Andrello.  
Dissertação (Mestrado em Física) – Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Exatas, Programa de Pós-Graduação em Física, 2013.  
Inclui bibliografia.

. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Exatas. Programa de Pós-Graduação em Física. III. Título.

CDU 539.14

DANIELE APARECIDA MAIA CLETO

**ANÁLISE DE SALIVA E DO FLUIDO SULCO GENGIVAL PELO  
MÉTODO DE FLUORESCÊNCIA DE RAIOS X POR REFLEXÃO  
TOTAL**

Dissertação apresentada ao curso de Pós-Graduação em Física da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Física.

**BANCA EXAMINADORA**

---

Prof. Dr. Avacir Casanova Andrello  
UEL – Londrina - PR

---

Prof. Dr. Carlos Roberto Appoloni  
UEL- Londrina - PR

---

Prof. Dr. Fábio Luiz Melquiades  
UNICENTRO – Guarapuava - PR

Londrina, 30 de abril de 2013.

*A Deus, por ter aberto as portas e mostrado o caminho.  
A meus familiares e a todos que me ajudaram a chegar aqui...a meu pai que se foi,  
deixando para trás um imenso vazio onde antes contávamos com uma presença  
marcante, firme e segura. As saudades ainda são grandes, marcam a falta física  
de um sorriso, um afago, uma palavra. Foi, contudo, no meio dessa ausência que  
compreendi a dimensão do ser eterno, da porção que fica e que, apesar de  
invisível, é sensível e vive dentro de nós. Por isso, mesmo que hoje algumas  
lágrimas se vertam ante a falta de seu abraço, essas não serão suficientes para  
apagar a certeza de estarmos juntos a dividir toda a emoção deste momento.  
Hoje, neste dia tão importante, te sinto presente, dentro de mim, feliz por nossa  
vitória.*

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço ao meu orientador Avacir Casanova Andrello, pois sem ele a qualidade deste trabalho e a formação desta mestranda estariam comprometidas. Agradeço pela dedicação, por ter me aceitado como aluna de mestrado e pela paciência.

Gostaria de agradecer a minha mãe pelo apoio que me deu durante toda minha jornada. Aos meus irmãos (Beto, Rodrigo, Carlos) e minha irmã Eliane, e todos os meus sobrinhos.

Gostaria de agradecer a minha prima Cristiane pelo apoio físico e mental, por ter me ajudado nos momentos bons e nos mais difíceis durante toda a minha jornada.

Ao Prof. Dr. Carlos Roberto Appoloni e ao Prof. Dr. Otávio Portezan Filho por aceitarem participar sem hesitar da composição da banca examinadora de qualificação, ajudando na melhora do andamento deste trabalho.

Ao Prof. Fábio Luiz Melquiades e novamente ao Prof. Appoloni por aceitarem a participar da banca examinadora deste trabalho.

Ao profissional Ítalo J. Vitturino Netto pela ajuda nas coletas das amostras de saliva.

Ao Laboratório de Física Nuclear Aplicada (LFNA) pela utilização do espaço físico e da infraestrutura para a obtenção dos espectros de fluorescência. E também a todos que fazem parte dele, pois contribuíram direta e indiretamente com a realização deste trabalho. Especialmente ao Madson, Eduardo, Lucas e Thiago Milani pela amizade e pela companhia.

Agradeço aos meus amigos e amigas que fizeram parte de minha longa jornada.

Agradeço a Jesus Cristo pelo amor que me faz querer viver melhor a cada dia.

**“Bom mesmo é ir a luta com determinação,  
abraçar a vida e viver com paixão,  
perder com classe e vencer com ousadia,  
pois o triunfo pertence a quem se atreve...  
E a vida é muito para ser insignificante.**

**Charles Chaplin**

CLETO, Daniele Aparecida Maia. **Análise de saliva e do fluido sulco gengival pelo método de fluorescência de raios X por reflexão total**. 2013. 85f. Dissertação (Mestrado em Física) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2013.

## RESUMO

O estudo de amostras biológicas líquidas com o uso das mais variadas técnicas vem se tornando cada vez mais rotineiro nos dias atuais. A saliva vem sendo um objeto de estudo para a correlação de elementos químicos encontrados nas amostras com algum distúrbio no organismo humano. A saliva é um fluido aquoso, hipotônico e transparente, produzida por uma variedade de glândulas secretórias (parótida, submandibular, sublingual e glândulas menores).

O presente trabalho utiliza a técnica de fluorescência de raios X por reflexão total (TXRF) na análise de amostras de saliva coletada na saída do ducto da glândula parótida e no sulco entre os dentes 46 e 47 de sete indivíduos escolhidos aleatoriamente. O objetivo deste trabalho foi de determinar o protocolo de coleta e avaliar qualitativa e quantitativamente os resultados obtidos através da técnica TXRF.

Os elementos químicos observados nas amostras de saliva e sulco gengival foram P, S, Cl, K, Ca, Ti, Mn, Fe, Ni, Cu, Zn, Br, Rb, e Pb. Embora tenham sido observados vários elementos nas amostras analisadas, nem todos os elementos são encontrados nos espectros das amostras de saliva dos indivíduos em estudo. Comparando os resultados obtidos para as amostras de saliva e sulco, pode-se observar que nas amostras de saliva coletadas no sulco, é possível identificar alguns elementos não encontrados nas amostras de saliva coletadas na glândula parótida. Portanto, o protocolo de coleta e análise utilizado é satisfatório para identificar os elementos na saliva da glândula e do sulco. A TXRF apresentou-se como uma boa técnica de análise de amostras de saliva.

**Palavras-chaves:** Fluorescência de raios X por reflexão total. Saliva. Sulco gengival.

CLETO, Daniele Aparecida Maia. **Saliva and gingival groove fluid analysis by total reflection X-ray fluorescence method**. 2012. 85f. Master's Degree Paper (Physics Post-graduation) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2013.

### **ABSTRACT**

The study of liquid biological samples has increase in the present day. Several techniques have been used to analyze these samples. One of these samples is the saliva, that has been studied to obtain a correlation between the changes of chemical elements and some disorder in the human organism. Saliva is a watery fluid, hypotonic and transparent, which is produced by a various of secretory glands (parotid, submandibular, sublingual and glands smaller).

The present work apply the total reflection X-ray fluorescence (TXRF) technique for saliva samples analysis. Seven persons choose randomly were sampled. The saliva samples were collected in the duct of parotid gland and in the gingival groove in the midst of teeth 46 and 47. The aim of this work was to determine the sampling protocol and evaluate quali-quantitatively the obtained results by TXRF technique.

The chemical elements identified in the saliva and gingival groove samples were P, S, Cl, K, Ca, Ti, Mn, Fe, Ni, Cu, Zn, Br, Rb, e Pb. Although various elements have been identified in the analyzed samples, not all elements are found in the saliva samples spectra of all persons studied. Comparing the results obtained for saliva samples of parotid gland and gingival groove, it can be observed that saliva samples of gingival groove present some elements not found in saliva samples of parotid gland. So, the sampling protocol and analysis utilized is satisfactory to identify the elements present in the saliva samples of parotid gland and crevice. The TXRF technique is a good tool to analyze saliva samples

**Key-words:** Total Reflection X-Ray Fluorescence, Saliva, Gingival Groove

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

<b>Figura 1</b>	–	Tubo de Coolidge usado para produção de raios X.....	27
<b>Figura 2</b>	–	Espectro de raios X do molibdênio.....	27
<b>Figura 3</b>	–	(a) representação esquemática da emissão dos raios X característicos, b) subníveis e transferência dos elétrons.....	28
<b>Figura 4</b>	–	Etapas básicas da análise por ED-XRF.....	29
<b>Figura 5</b>	–	Representação esquemática da refração e reflexão de um feixe de radiação monoenergético em função do ângulo crítico de incidência.....	31
<b>Figura 6</b>	–	Geometria de excitação/detecção da TXRF, com linhas contínuas representando os raios X incidentes e espalhados, e os tracejados os raios X característicos.....	32
<b>Figura 7</b>	–	Refletividade e profundidade de penetração calculada para o raio X Mo- $k_{\alpha}$ incidindo sobre um suporte de quartzo..	34
<b>Figura 8</b>	–	(a) Porta amostra de acrílico, (b) suporte para deposição das amostras e (c) suporte para secagem das amostras.....	37
<b>Figura 9</b>	–	Esquema da saída do ducto da glândula parótida.....	38
<b>Figura 10</b>	–	a) amostras guardadas no papel e esquema do porta amostra confeccionado para armazenagem das amostras, a) porta amostra inteiro e b) divisões do porta amostra onde cada amostra é colocada.....	38
<b>Figura 11</b>	–	Esquema das posições dos dentes onde foram retiradas as amostras de saliva do sulco gengival.....	39
<b>Figura 12</b>	–	Estufa para secagem das amostras com uma temperatura e tempo de secagem de 55 °C e 35 minutos, respectivamente aproximados. ....	39
<b>Figura 13</b>	–	Sistema de TXRF, a) espectrometro e b) computador.....	40
<b>Figura 14</b>	–	Esquema do espectrômetro do TXRF e suas subdivisões: unidade eletrônica, gerador de raios X, monocromador, detector e trocador de amostras. ....	41
<b>Figura 15</b>	–	Janela aberta do Software SPECTRA com o espectro do elemento manganês apresentando o FWHM do pico.....	42

<b>Figura 16</b> –	a) Espectro referente ao branco com um tempo de irradiação de 500 s (live time) e b) gráfico do branco.....	43
<b>Figura 17</b> –	Espectro referente ao branco deixado em cima da geladeira por 30 dias .....	44
<b>Figura 18</b> –	Espectro de saliva da parótida, referente às amostras dos indivíduos 1, 2 e 3.....	45
<b>Figura 19</b> –	Espectro de saliva da parótida, referente às amostras dos indivíduos 4, 5 e 6.....	46
<b>Figura 20</b> –	Espectro de saliva do sulco referente às amostras dos indivíduos 1, 2 e 3.....	47
<b>Figura 21</b> –	Espectro de saliva do sulco referente às amostras dos indivíduos 4, 5 e 6.....	47
<b>Figura 22</b> –	Espectro das amostras de saliva retirado na saída glandula parótida repetido (R) referente às amostras dos indivíduos 1, 2 e 3.....	48
<b>Figura 23</b> –	Espectro das amostras de saliva retirado na saída glandula parótida repetido (R) referente às amostras dos indivíduos 4, 5 e 6.....	49
<b>Figura 24</b> –	Espectro das amostras de sulco repetido (R) referente às amostras dos indivíduos 1, 2 e 3.. .....	49
<b>Figura 25</b> –	Espectro das amostras de sulco repetido (R) referente às amostras dos indivíduos 4, 5 e 6 .....	50
<b>Figura 26</b> –	Gráfico de saliva da parótida e do sulco referente à medida no dia da coleta (M.C),.....	51
<b>Figura 27</b> –	Gráfico de saliva da parótida e do sulco referente à medida refeita (M.R).....	52
<b>Figura 28</b> –	Gráfico de saliva da parótida e do sulco referente à medida da coleta (M.C) e da medida refeita (M.R), elementos com identificação 1 é (M.C) e elementos com identificação 2 é (M.R).....	53

<b>Figura 29 –</b>	Desvio estatístico percentual das amostras de saliva da parótida para todos os seis indivíduos, onde A significa medida no dia da coleta e B medida refeita após 45 dias da coleta..	57
<b>Figura 30 –</b>	Desvio estatístico percentual das amostras de saliva do sulco para todos os seis indivíduos, onde A significa medida no dia da coleta e B medida refeita após 45 dias da coleta..	58
<b>Figura 31 –</b>	Espectro das amostras de saliva coletadas na parótida, referente às amostras dos indivíduos 1, 2, 3.	59
<b>Figura 32 –</b>	Espectro das amostras de saliva coletadas na parótida, referente às amostras dos indivíduos 4, 5, 6 e 7.	59
<b>Figura 33 –</b>	Espectro das amostras de saliva coletadas no sulco, referente às amostras dos indivíduos 1, 2 e 3..	60
<b>Figura 34 –</b>	Espectro das amostras de saliva coletadas no sulco, referente às amostras dos indivíduos 4, 5, 6 e 7.	61
<b>Figura 35 –</b>	Espectro da repetição (R) das amostras de saliva coletadas na parótida, referente às amostras dos indivíduos 1, 2 e 3.....	62
<b>Figura 36 –</b>	Espectro da repetição (R) das amostras de saliva coletadas na parótida, referente às amostras dos indivíduos 4, 5, 6 e 7.....	62
<b>Figura 37 –</b>	Espectro da repetição (R) das amostras de saliva coletadas no sulco, referente às amostras dos indivíduos 1, 2, 3 .....	63
<b>Figura 38 –</b>	Espectro da repetição (R) das amostras de saliva coletadas no sulco, referente às amostras dos indivíduos 4, 5, 6 e 7 .....	63
<b>Figura 39 –</b>	Gráfico da saliva da parótida e do sulco referente à medida no dia da coleta (M.C).....	64
<b>Figura 40 –</b>	Gráfico da saliva da parótida e do sulco referente à medida refeita (M.R).....	64
<b>Figura 41 –</b>	Gráfico da saliva da parótida e do sulco referente à medida da coleta (M.C) e a medida refeita (M.R), elementos com identificação 1 é (M.C) e elementos com identificação 2 é (M.R).....	65

- Figura 42** – Desvio estatístico percentual das amostras de saliva da parótida para todos os sete indivíduos, C significa medida no dia da coleta e D medida refeita após 30 dias da coleta.....69
- Figura 43** – Desvio estatístico percentual das amostras de saliva do sulco para todos os sete indivíduos, C significa medida no dia da coleta e D medida refeita após 30 dias da coleta.....69
- Figura 44** – Gráfico do elemento químico fósforo (P) para todos os indivíduos, onde G1 é a medida da glândula parótida na primeira etapa e G2 na segunda etapa, e S1 é a medida do sulco na primeira etapa e S2 na segunda etapa. G1R, G2R, S1R e S2R são as medidas refeitas da glândula e do sulco.....71
- Figura 45** – Gráfico do elemento químico enxofre (S) para todos os indivíduos, onde G1 é a medida da glândula parótida na primeira etapa e G2 na segunda etapa, e S1 é a medida do sulco na primeira etapa e S2 na segunda etapa. G1R, G2R, S1R e S2R são as medidas refeitas da glândula e do sulco.....72
- Figura 46** – Gráfico do elemento químico cloro (Cl) para todos os indivíduos, onde G1 é a medida da glândula parótida na primeira etapa e G2 na segunda etapa, e S1 é a medida do sulco na primeira etapa e S2 na segunda etapa. G1R, G2R, S1R e S2R são as medidas refeitas da glândula e do sulco.....73
- Figura 47** – Gráfico do elemento químico potássio (K) para todos os indivíduos, onde G1 é a medida da glândula parótida na primeira etapa e G2 na segunda etapa, e S1 é a medida do sulco na primeira etapa e S2 na segunda etapa. G1R, G2R, S1R e S2R são as medidas refeitas da glândula e do sulco.....74
- Figura 48** – Gráfico do elemento químico cálcio (Ca) para todos os indivíduos, onde G1 é a medida da glândula parótida na primeira etapa e G2 na segunda etapa, e S1 é a medida do sulco na primeira etapa e S2 na segunda etapa. G1R, G2R, S1R e S2R são as medidas refeitas da glândula e do sulco.....75

- Figura 49** – Gráfico do elemento químico ferro (Fe) para todos os indivíduos, onde G1 é a medida da glândula parótida na primeira etapa e G2 na segunda etapa, e S1 é a medida do sulco na primeira etapa e S2 na segunda etapa. G1R, G2R, S1R e S2R são as medidas refeitas da glândula e do sulco.....76
- Figura 50** – Gráfico do elemento químico zinco (Zn) para todos os indivíduos, onde G1 é a medida da glândula parótida na primeira etapa e G2 na segunda etapa, e S1 é a medida do sulco na primeira etapa e S2 na segunda etapa. G1R, G2R, S1R e S2R são as medidas refeitas da glândula e do sulco.....77

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1 –</b>	Composição da Saliva .....	26
<b>Tabela 2 –</b>	Razão Sulco/Saliva dos 6 indivíduos.....	53
<b>Tabela 3 –</b>	Limites Mínimos de Detecção (LLD) das amostras de saliva retirada na parótida dos seis indivíduos da primeira etapa, medida no dia da coleta A e das medidas refeitas B, com intervalo de confiança de 95 %.....	55
<b>Tabela 4 –</b>	Limites Mínimos de Detecção (LLD) das amostras de saliva do sulco dos seis indivíduos da primeira etapa, medida no dia da coleta A e das medidas refeitas B, com intervalo de confiança de 95 %.....	55
<b>Tabela 5 –</b>	Limites de Quantificação (LQ) das amostras de saliva retirada na parótida dos seis indivíduos da primeira etapa, medida no dia da coleta A e das medidas refeitas B, respectivamente.....	56
<b>Tabela 6 –</b>	Limites de Quantificação (LQ) das amostras de saliva retirada na parótida dos seis indivíduos da primeira etapa, medida no dia da coleta A e das medidas refeitas B, respectivamente.....	56
<b>Tabela 7 –</b>	Razão Sulco/Saliva dos 7 indivíduos .....	66
<b>Tabela 8 –</b>	Limites Mínimos de Detecção (LLD) das amostras de saliva retirada na parótida dos sete indivíduos da segunda etapa, medida no dia da coleta C e das medidas refeitas D, com intervalo de confiança de 95 %.....	67
<b>Tabela 9 –</b>	Limites Mínimos de Detecção (LLD) das amostras de saliva retirada no sulco dos sete indivíduos da segunda etapa, medida no dia da coleta C e das medidas refeitas D, com intervalo de confiança de 95 %.....	67
<b>Tabela 10 –</b>	Limites de Quantificação (LQ) das amostras de saliva retirada na parótida dos sete indivíduos da primeira etapa, medida no dia da coleta C e das medidas refeitas D, respectivamente.....	68

<b>Tabela 11 –</b>	Limites de Quantificação (LQ) das amostras de saliva retirada no sulco dos seis indivíduos da primeira etapa, medida no dia da coleta C e das medidas refeitas D, respectivamente.....	68
<b>Tabela 12 –</b>	Hábitos dos indivíduos.....	78
<b>Tabela 13 –</b>	Áreas líquidas (contagem) dos elementos observados na saliva retirado na parótida e do sulco referente a medida da coleta (M.C) e a medida refeita (M.R), elementos com identificação 1 é (M.C) e elementos com identificação 2 é (M.R), valores obtidos da primeira etapa.....	84
<b>Tabela 14 –</b>	Áreas líquidas (contagem) dos elementos observados na saliva retirado na parótida e do sulco referente a medida da coleta (M.C) e a medida refeita (M.R), elementos com identificação 1 é (M.C) e elementos com identificação 2 é (M.R), valores obtidos da segunda etapa.....	85

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

<b>XRF</b>	Fluorescência de raios X
<b>EDXRF</b>	Fluorescência de raios X por dispersão em energia
<b>WDXRF</b>	Fluorescência de raios X por dispersão de comprimento de onda
<b>TXRF</b>	Fluorescência de raios X por reflexão total
<b>μEDXRF</b>	Microfluorescência de raios X
<b>PXRF</b>	Fluorescência de raios X portátil
<b>ppb</b>	Parte por bilhão
<b>AXIL</b>	Analysis of X-ray Spectra by Iterative Least Squares Fitting
<b>FWHM</b>	Largura total a meia altura máxima
<b>LLD</b>	Limite mínimo de detecção
<b>LQ</b>	Limite de Quantificação
<b>σ<sub>B</sub></b>	Desvio padrão da área líquida
<b>LFNA</b>	Laboratório de Física Nuclear Aplicada
<b>M.C</b>	Medida no dia da coleta
<b>M.R</b>	Medida Repetida
<b>UEL</b>	Universidade Estadual de Londrina

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	18
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	21
<b>3</b>	<b>REVISÃO NA LITERATURA</b> .....	22
<b>4</b>	<b>FUNDAMENTOS TEÓRICOS</b> .....	25
4.1	SALIVA .....	25
4.2	COMPOSIÇÃO DA SALIVA.....	25
4.3	PRODUÇÃO DE RAIOS X.....	26
4.4	TUBO DE RAIOS X .....	29
4.5	FLUORESCÊNCIA DE RAIOSX.....	29
4.6	TXRF - FLUORESCÊNCIA DE RAIOS X POR REFLEXÃO TOTAL .....	30
4.6.1	Ângulo Crítico .....	32
4.7	LLD – LIMITE MÍNIMO DE DETECÇÃO E LQ – LIMITE DE QUANTIFICAÇÃO .....	34
<b>5</b>	<b>MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	36
5.1	PORTA AMOSTRA UTILIZADO .....	36
5.2	PREPARAÇÃO DAS AMOSTRAS.....	36
5.3	SISTEMA DE FLUORESCÊNCIA DE RAIOS X POR REFLEXÃO TOTAL .....	40
5.3.1	ESPECTRÔMETRO .....	40
5.3.2	COMPUTADOR.....	41
5.4	MEDIDAS DE FLUORESCÊNCIA DE RAIOS X POR REFLEXÃO TOTAL .....	42
<b>6</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÕES</b> .....	43
6.1	ESPECTRO DO BRANCO .....	43
6.2	PRIMEIRA ETAPA.....	44
6.2.1	Primeira Coleta ( Saliva 100s) .....	44
6.2.2	Primeira Coleta (Sulco 100s).....	46
6.2.3	Repetição da Primeira Coleta (Saliva 100s) .....	47
6.2.4	Repetição da Primeira Coleta (Sulco 100s).....	49

6.3	LLD – LIMITE MÍNIMO DE DETECÇÃO E LQ – LIMITE DE QUANTIFICAÇÃO PARA 100 S.....	54
6.4	DESVIO ESTATÍSTICO PROPAGADO PARA 100 S .....	56
6.5	SEGUNDA ETAPA.....	58
6.5.1	Segunda Coleta (Saliva 500s) .....	58
6.5.2	Segunda Coleta (Sulco 500s).....	60
6.5.3	Repetição da Segunda Coleta (Saliva 500s) .....	61
6.5.4	Repetição da Segunda Coleta (Sulco 500s).....	62
6.6	LLD – LIMITE MÍNIMO DE DETECÇÃO E LQ – LIMITE DE QUANTIFICAÇÃO PARA 500 S.....	66
6.7	DESVIO ESTATÍSTICO PROPAGADO PARA 500 S .....	68
6.8	PRINCIPAIS ELEMENTOS ENVOLVIDOS NO PROCESSO BIOLÓGICO .....	68
6.8.1	Fósforo (P).....	70
6.8.2	Enxofre (S).....	71
6.8.3	Cloro (Cl) .....	72
6.8.4	Potássio (K) .....	73
6.8.5	Cálcio (Ca).....	74
6.8.6	Ferro (Fe).....	75
6.8.7	Zinco (Zn) .....	76
6.9	HÁBITOS DOS INDIVÍDUOS EM ESTUDO .....	77
<b>7</b>	<b>CONCLUSÃO</b> .....	<b>79</b>
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>80</b>
	<b>ANEXOS</b> .....	<b>83</b>
	ANEXO A ÁREAS LÍQUIDAS ETAPA 1 .....	84
	ANEXO B ÁREAS LÍQUIDAS ETAPA 2 .....	85

## 1 INTRODUÇÃO

A saliva é um dos fluidos biológicos mais complexos, versáteis e importantes para o corpo humano, sendo eficaz na preservação da saúde bucal facilitando a mastigação, digestão dos alimentos e na lubrificação da estrutura da boca e orofaringe. Também desempenha outras funções tais como, defesa local e sistêmica da cavidade bucal, da região da orofaringe e do trato gastrointestinal superior. (LIMA, F. O. de; RAMALHO, M. J. P.; RUMMLER, M. do C. O. e RODRIGUEZ, T. T., 2008)

A saliva é secretada de três principais glândulas secretórias, parótida, submandibular, sublingual, além de milhares de glândulas menores. Essas glândulas armazenam uma ampla variedade de proteínas que podem ser úteis para a detecção de doenças bucais, tais como: tumor, síndrome de Sjögren e doenças sistêmicas como câncer de mama e de pulmão (HUA, X., 2012). O organismo produz uma quantidade total de aproximadamente 1 a 1,5 L de saliva ao dia. (MÖLLER, P. et al., 2003)

Tendo como componente principal a água, com aproximadamente 99,5%, os constituintes restantes da saliva são componentes sólidos representados por moléculas orgânicas e inorgânicas, variando de um indivíduo para outro ou até diversas vezes ao dia para um mesmo indivíduo. (EDGAR, W. M., 1992)

Tanto a coleta quanto o manuseio da saliva é mais fácil quando comparado a coleta de sangue, e devido a isso vários pesquisadores tem se interessado na análise da saliva como diagnóstico de doenças ou disfunções do organismo humano. (DAWES, C., 1993)

A coleta de saliva pode ser feita de forma estimulada ou não. O estímulo da produção de saliva pode ser feito de forma mecânica (goma de mascar, parafina, látex) ou química (ácido cítrico). A estimulação afeta a quantidade da saliva produzida, portanto, alguns de seus constituintes também são alterados (MANDEL, 1990). A coleta não estimulada é feita sem estímulos exógenos e o fluxo salivar pode ser alterado por estímulos olfatórios, exposição à luminosidade e posição do corpo. (KAUFMAN. R, 2002)

A importância da compreensão de elementos traço na fisiologia humana levou, ao longo dos últimos anos, a uma maior necessidade de métodos

analíticos precisos para a análise de fluidos biológicos. A análise dos dados obtidos a partir desses estudos fornecem informações valiosas em campos da medicina, farmácia e controle ambiental. Para este objetivo, diferentes técnicas analíticas têm sido envolvidas.

Um das dessas técnicas é a fluorescência de raios X (XRF) que é uma técnica de análise multielementar, não destrutiva e simultânea que mede as intensidades dos raios X característicos emitidos pelos elementos químicos de uma dada amostra quando devidamente excitada. A XRF possui as seguintes variantes: fluorescência de raios X por dispersão de energia (EDXRF - *Energy Dispersive X-Ray Fluorescence*), fluorescência de raios X por dispersão de comprimento de onda (WDXRF- *Wave-Length Dispersive X-Ray Fluorescence*) e as sub-variantes da EDXRF, denominadas fluorescência de raios X por reflexão total (TXRF - *total reflection X-ray fluorescence*), microfluorescência de raios X ( $\mu$ EDXRF) e a fluorescência de raios X portátil (PXRF).

No sistema WDXRF, os raios X característicos são selecionados por um cristal difrator de acordo com seus comprimentos de onda, obedecendo a Lei de Bragg. (LACHANCE et al., 1995)

O desenvolvimento rápido dos semicondutores contribuiu com o desenvolvimento dos detectores de Si(Li) de alta sensibilidade, capazes de discriminar raios X de energias próximas, tornando possível o uso do método EDXRF. Com a EDXRF pode-se investigar a composição química dos mais variados tipos de amostras, como por exemplo, amostras biológicas e geológicas.

Uma variante da EDXRF, denominada TXRF, vem sendo utilizada principalmente para identificação de elementos traço na faixa de  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  (BAUR et al, 2001) em amostras líquidas e sólidas, em pesquisas de monitoramento ambiental, oceanografia, biologia, medicina, indústria, entre outras. (NASCIMENTO FILHO, V. F.; 1999).

Uma vantagem da técnica TXRF sobre outras técnicas é que ela permite uma análise não-destrutiva das amostras, multielementar e uma determinação de vários elementos químicos da amostra na ordem de grandeza de ppb. Devido a esse fato, esta técnica é utilizada neste trabalho para as análises de saliva.

A TXRF é uma técnica muito eficaz, permitindo uma boa detecção para uma pequena quantidade de amostra (SANCHEZ, H. J. et al., 2008). Por ser

uma técnica mais sensível quando comparada com a técnica convencional de fluorescência de raios X, os pesquisadores implementaram esta técnica em laboratórios espectroquímicos para uma análise mais precisa nas caracterizações multielementares dos elementos traços e ultra-traços para vários tipos de amostras. (SANCHEZ, H. J., 2002)

TXRF é uma técnica bem adequada para estudar concentrações de elementos traços em amostras biomédicas, pois permite observar contaminação de elementos pesados com o uso da espectroscopia de raios X. (KUBALA-K, A. BRAZIEWICZ, J., PAJEK, M., 2004)

Está técnica tem a vantagem de detectar um fundo muito baixo mesmo com fontes de excitação poli-energética. No entanto, há possibilidades de uma maior redução do fundo fazendo o uso da radiação monocromática ou a utilização da radiação Síncrotron. (RIEDER., R. et al., 1993)

Com o objetivo de verificar a aplicabilidade do TXRF na análise de saliva, amostras de saliva foram retiradas na saída no ducto da glândula parótida e do sulco gengival de alguns indivíduos escolhidos aleatoriamente, que serão apresentados nos item 6.2 e 6.3.

## 2 OBJETIVOS

O objetivo geral deste trabalho é aplicar a metodologia de fluorescência de raios X por reflexão total nas análises de saliva coletadas na saída do ducto da glândula parótida e amostras de saliva de sulco coletadas entre os dentes 46 e 47.

Os objetivos específicos são:

- Determinação de um protocolo de coleta de saliva;
- Análise quali - quantitativa dos resultados;

### 3 REVISÃO NA LITERATURA

Sánchez, H. J. et al (2008) analisou amostras de saliva e sulco gengival pela técnica TXRF usando guias de feixe construídos com refletores de silício com uma fonte de raios X de 3 kW e as amostras foram irradiadas a 40 keV e 25 mA durante um tempo de 2000 s cada amostra. Os objetivos principais do trabalho foram as análises de cálcio e de elementos traços presentes nos fluidos orais, e utilizados como indicadores de condições da saúde, fazendo correlação entre as concentrações dos elementos traços presentes na saliva e no fluido gengival com a gravidade da osteoporose e/ou doença periodontal. Selecionaram 30 pacientes mulheres que foram separadas em três grupos (controle, osteopenia e osteoporose). Vários elementos foram encontrados nas amostras analisadas tais como P, S, Cl, K, Ca, Cr, Fe, Ni, Cu, e Zn. Dentre os elementos mostrados, citaram que o cálcio e o zinco apresentam comportamentos muito distinguíveis e podem ser utilizados para estudar as diferentes fases da osteoporose. Concluíram que a técnica de TXRF parece ser um método promissor para avaliar a evolução de osteoporose e as doenças orais.

Abraham, J. A.; et al (2010), estudaram trinta indivíduos separados por dois grupos: quinze fumantes e quinze não fumantes (grupo controle). As amostras foram medidas pela técnica TXRF utilizando radiação síncrotron e foram realizadas no LNLS (Laboratório Nacional de Luz Síncrotron) localizado em Campinas. Os elementos químicos encontrados nas amostras foram: P, S, Cl, K, Ca, Ti, Mn, Fe, Cu, e Zn. O sistema era constituído de um detector de Si(Li) e as amostras foram irradiadas por um tempo de 300 s e a análise foi realizada pelo pacote Axil. As amostras de saliva foram coletadas a partir da parte inferior da boca e do sulco gengival dos dentes frontais superiores. Os resultados das amostras pertencentes ao grupo dos fumantes demonstraram que o fumo afeta a composição mineral dos fluidos com relação aos valores referentes ao grupo de controle.

Bellisola, G. et al. (1999) utilizaram um espectrômetro de raios X, modelo TX 2000, para analisar amostras de plasma sanguíneo e de urina de indivíduos saudáveis. O tubo de raios X foi operado a uma tensão de 40 kV e corrente a 30 mA. Em ambas amostras, os elementos encontrados foram Cu, Zn, Se, Br e Rb. Comparando esses elementos, com exceção do Rb, os resultados do plasma sanguíneo estiveram bem próximos em relação ao da literatura.

Kubala-Kukus, A. Braziewicz, J., Pajek, M., (2004) discutem detalhadamente os seguintes tópicos: aspectos experimentais de aplicação da técnica TXRF nos estudos de elementos traços em amostras biomédicas; caráter log-normal e log-estável das distribuições da concentração dos elementos traços; análise dos limites de detecção e dos não detectáveis por TXRF, uma abordagem do método Kaplan-Meier para explicar os limites de detecção do TXRF e uma comparação dos dados dos dois métodos. As amostras de placenta (tecido materno), membranas fetais, glândulas de tecido mamário, tecido pulmonar, tecido tireoidiano, sangue e tecido do intestino foram analisadas através da técnica TXRF. Analisando os resultados referentes aos dados encontrados, os autores afirmam que as distribuições das concentrações dos elementos traços são geralmente do tipo log-normal, mas também pode ser descrita pela distribuição log-estável. Os autores obtiveram os valores do limite de detecção através do método Kaplan-Meier e conclui que pode-se usar o teste log-rank para a comparação dos dados dos dois grupos.

Griesel, S. et al (2006), investigaram com a técnica TRXF elementos minerais e elementos traços em amostras de sangue de focas situadas no mar de Wadden no intuito de complementar o diagnóstico do estado de saúde das focas. O sistema utilizado de TXRF da marca Atômica e modelo 8030C foi operado a 2,5 kW, 50 kV e 38 mA com tempo de exposição de 1000 s para cada amostra. Foram coletadas amostras de sangue de 81 focas em 3 localidades diferentes: Friedrichskoog, Lorenzenplate e Romo na Dinamarca. Os autores encontraram vários elementos, mas analisaram somente P, S, K, Ca, Fe, Cu, Zn, Se, Rb e Sr. Obtiveram bons resultados com o uso da técnica e mostraram a possibilidade do mesmo como uma ferramenta de biocontrole das focas.

Tarsoly, G.; Óvári, M.; Zárny, Gy. (2010), analisaram a determinação de flúor em água, utilizando o espectrômetro TXRF Wobistrax localizado em Viena, Áustria, com o sistema sendo operado a 30 kV e 30 mA com um tempo de irradiação para cada amostra de 500 s. As amostras foram pipetadas sobre substrato de quartzo e todas as medidas foram realizadas 12 vezes. Os seguintes parâmetros foram investigados: limite de detecção, intervalo de linearidade, quantidade de amostra, precisão de medição e o efeito da matriz causada pelo cloro, bromo, iodo e sulfato. Os resultados obtidos mostraram que o uso da técnica TXRF pode ser

utilizado para a determinação do flúor e uma melhora no comportamento analítico tem que ser feito principalmente para o limite de detecção.

Menegário, A. A. et al (2003) estudaram amostras de saliva humana e amostras de água do rio utilizando o sistema TXRF composto de um tubo de raios X com alvo de molibdênio e filtro de zircônio, operado a 40 kV e 20 mA e um detector de Si(Li) com janela de Be(modelo SL 30165, EG & G Ortec). As amostras foram depositadas em um suporte de acrílico e colocadas em um forno para secagem com temperatura de  $60 \pm 5$  °C, após a secagem as amostras foram irradiadas com um tempo de exposição de 500 s cada amostra. Os elementos identificados nas amostras de água foram: Co, Cu, Mn, Ni, Pb e Zn nas concentrações de  $19,9 \pm 1,5 \mu\text{g l}^{-1}$ ,  $86,7 \pm 6,3 \mu\text{g l}^{-1}$ ,  $117 \pm 22 \mu\text{g l}^{-1}$ ,  $25,6 \pm 0,9 \mu\text{g l}^{-1}$ ,  $28,1 \pm 1,6 \mu\text{g l}^{-1}$ ,  $60,1 \pm 3,4 \mu\text{g l}^{-1}$ , respectivamente. Os elementos identificados nas amostras de saliva foram os mesmos elementos encontrados nas amostras de água, suas concentrações foram  $60,6 \pm 5,0 \mu\text{g l}^{-1}$  (Cu),  $40,0 \pm 7,0 \mu\text{g l}^{-1}$  (Mn),  $14,8 \pm 5,6 \mu\text{g l}^{-1}$  (Ni),  $219 \pm 12 \mu\text{g l}^{-1}$  (Zn). Os elementos Co e Pb ficaram abaixo do limite de detecção. As análises foram realizadas pelo programa AXIL. Os valores medidos tanto da amostra de saliva humana quanto para a água do rio ficaram em concordância com os valores certificados.

## 4 FUNDAMENTOS TEÓRICOS

### 4.1 SALIVA

A cavidade oral apresenta uma das mais concentradas e variadas populações microbianas, cuja localização principal está no dorso da língua, no sulco gengival e na placa dental. A concentração microbiana no sulco gengival e na placa dental apresenta aproximadamente 200 bilhões de células por gramas. No entanto os microrganismos da saliva apresentam números que variam de 43 milhões a 5,5 bilhões por mililitro com uma média de aproximadamente 750 milhões. Este valor representa, principalmente, microorganismos presentes na língua.

A saliva é um fluido aquoso, hipotônico e transparente, que é produzida por uma variedade de glândulas secretórias (parótida, submandibular, sublingual e glândulas menores), sendo um dos mais complexos, versáteis e importantes fluidos do corpo, suprimindo um largo espectro de necessidades fisiológicas. A saliva umedece os tecidos moles e duros da cavidade bucal, facilitando a fala, mastigação, deglutição, sensibilidade gustativa, proteção das mucosas contra a penetração de diversas substâncias, regulação do pH bucal e na formação da placa bacteriana (JENKINS, 1970; DAWES, 1993). O pH da saliva varia de 5,7 a 7,0, podendo ocorrer variações devido à mastigação, fadiga, alteração na velocidade de respiração e influências metabólicas gerais. Além disso, a saliva impede o atrito entre a mucosa oral e outros (como dentes, próteses e alimentos) durante a mastigação e a fala. Isto acontece pela ação das proteínas chamadas mucinas que fazem a lubrificação das estruturas da boca e orofaringe. Ela também é importante para o paladar e auxilia no início da digestão dos alimentos. Também previne infecções bucais e tem propriedades cicatrizantes.

### 4.2 COMPOSIÇÃO DA SALIVA

A saliva secretada pelas glândulas salivares é composta de ar, o que lhe dá o aspecto espumoso. O principal componente químico da saliva é a água aproximadamente 99,5%, e o restante é constituído por íons (cálcio, fósforo, flúor, zinco, etc.) e proteínas, entre elas as enzimas e as imunoglobulinas (anticorpos), como apresentado na tabela 1. Sabe-se que sua composição sofre muitas

alterações devido a vários fatores fisiológicos e não fisiológicos, tais como: ritmo circadiano, natureza e duração do estímulo, condições de higiene bucal, tipo de dieta alimentar, uso de medicamentos entre outros fatores (DAWES, 1993).

**Tabela 1** - Composição da Saliva

Água	Substâncias Inorgânicas		Substâncias Orgânicas
	Ânions	Cátions	
99,5 %	$Cl^-$	$Na^+$	Proteínas
	$H_2PO_4^-$	$K^+$	Carboidratos
	$HPO_4^{2-}$	$Ca^{+2}$	Uréia
	$HCO_3^-$	$NH_4$	Lisozima
	$S^{2-}$	$Mg^{+2}$	Amônia
	$F^-$	$Cu^{+2}$	Aminoácidos
	Outros		Vitaminas
Ânions		Enzimas microbianas.	
		Componentes sanguíneos; etc.	

**Fonte:** George S. Schuster, p. 242

#### 4.3 PRODUÇÃO DE RAIOS X

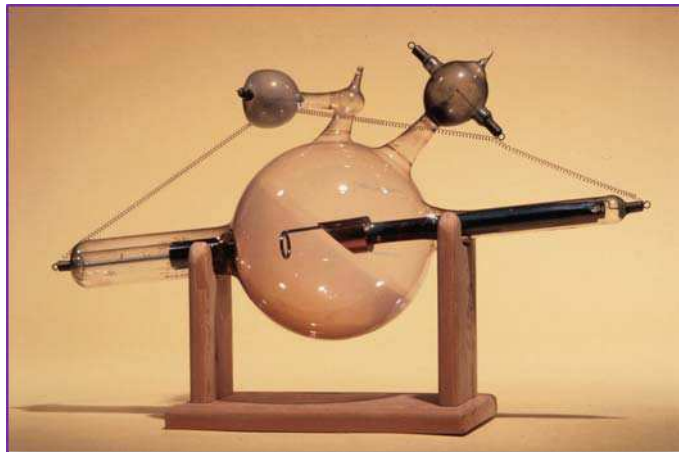
Wilhelm Conrad Rontgen descobriu os raios X em 1895. Ele observou que a incidência de raios catódicos (feixe de elétrons) em um alvo produzia uma radiação mais penetrante do que a luz visível.

Os raios X produzidos no alvo de um tubo de raios X, como apresentado na figura 1, são gerados através de dois processos que ocorrem em nível atômico: *Bremsstrahlung* e *raios X característicos*. *Bremsstrahlung* ocorre quando elétrons em alta energia são acelerados por uma diferença de potencial e sofrem uma colisão com o alvo. Esses elétrons são desacelerados e emitem um espectro contínuo de radiação eletromagnética como apresentado na figura 2. Os raios X característicos originam-se através da transição eletrônica dos elétrons. O elétron acelerado ioniza o átomo nos níveis mais internos (K, L, M), deixando uma vacância nesses níveis. A desexcitação ocorre quando um elétron de um dos subníveis preenche essa vacância e emite um raios X de energia igual a diferença

de energia de ligação entre os dois níveis (EISBERG e RESNICK,1979 pag. 67 e 428).

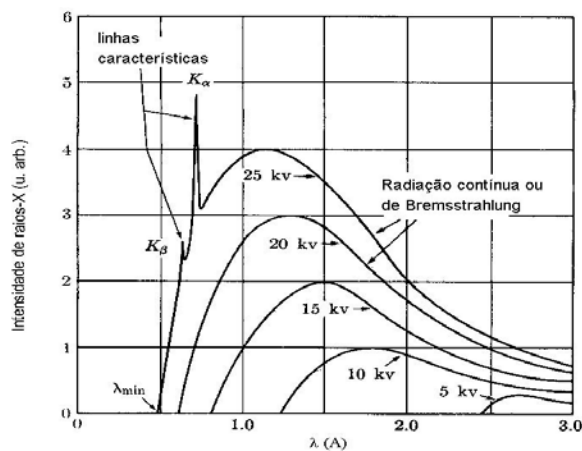
A Figura 2 ilustra a transição quando a vacância está no nível K e é preenchida por um elétron proveniente do nível L. O raios X emitido são chamados de  $K_{\alpha}$ . Se o elétron sai do nível M e preenche o nível K, o raios X emitido são chamados de  $K_{\beta}$ . Se a vacância estiver no nível L e for preenchida pelo elétron proveniente do nível M, o raios X é chamado de  $L_{\alpha}$ , e se sair do nível N será  $L_{\beta}$  e assim por diante. Cada nível é dividido em subníveis, por esta razão a radiação  $K_{\alpha}$  pode ser dividida em  $K_{\alpha 1}$  e  $K_{\alpha 2}$ ,  $K_{\beta}$  em  $K_{\beta 1}$  e  $K_{\beta 2}$  e assim por diante.

**Figura 1** – Tubo de Coolidge usado para produção de raios X.



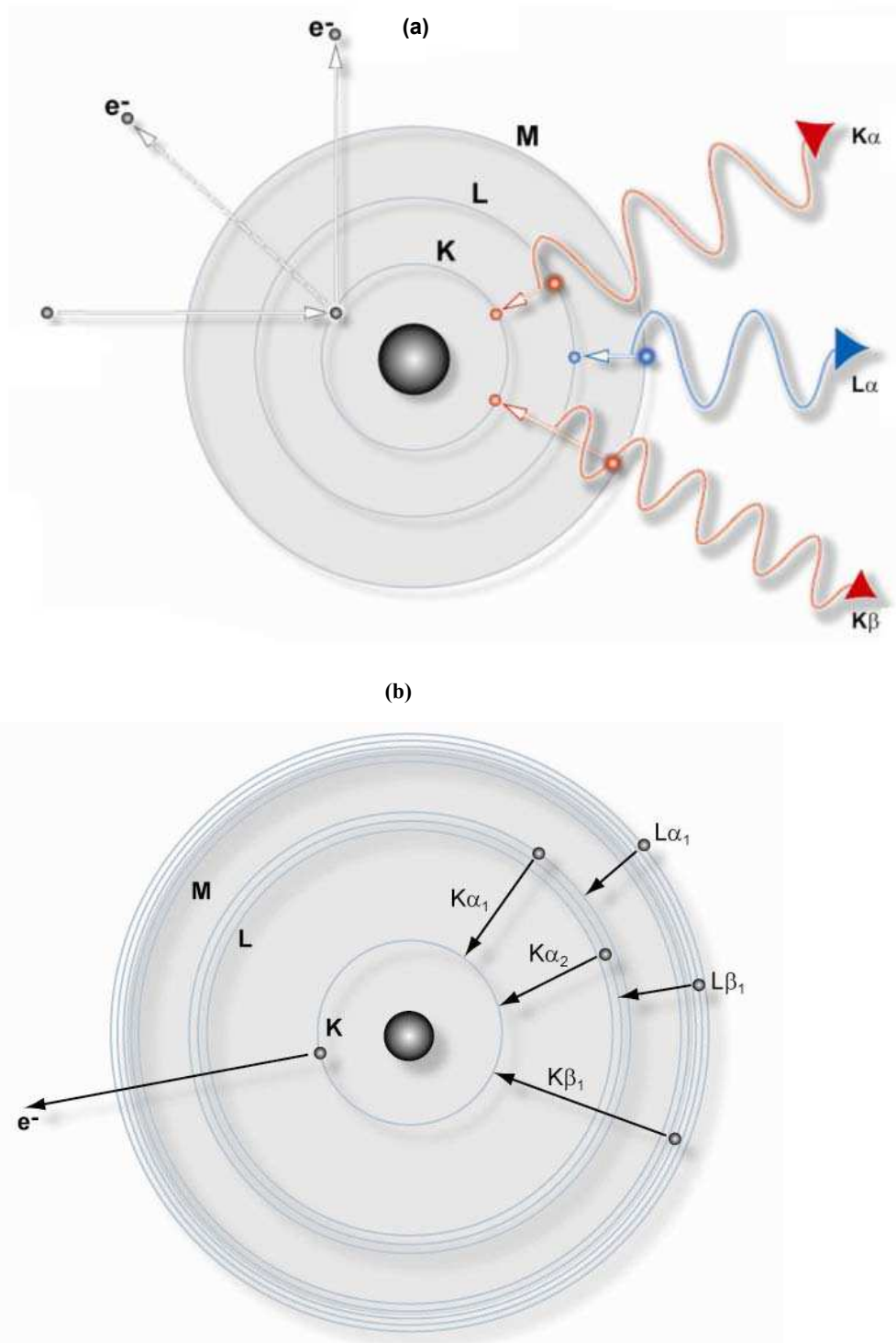
Fonte: Kravetz (2001)

**Figura 2** – Espectro de raios-X do Molibdênio.



Fonte: <http://www.ifsc.usp.br>

**Figura 3** – (a) representação esquemática da emissão dos raios X característicos, (b) subníveis e transferência dos elétrons.



Fonte: Manual S2 Picofox

#### 4.4 TUBO DE RAIOS X

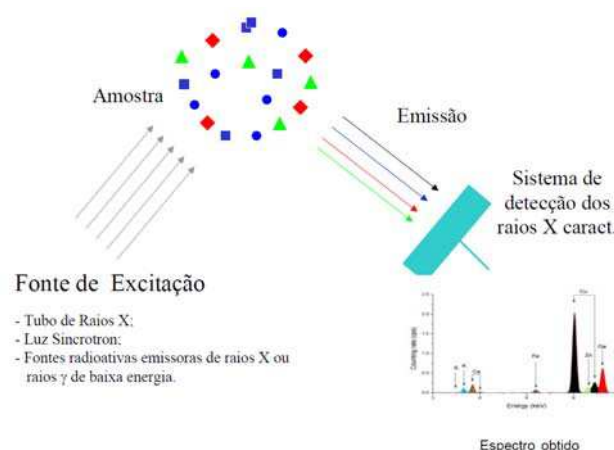
O tubo de Coolidge como apresentado na figura 1, também conhecido como tubo de raios X, consiste basicamente de um tubo de vidro (ampola) com seu interior evacuado que permite acelerar os elétrons. Um dos extremos possui um filamento (cátodo) feito, por exemplo, de tungstênio, e no outro extremo um anteparo (alvo), que também pode ser de tungstênio (ânodo). No momento em que a corrente elétrica circula através do filamento, aquece-o a alta temperatura, libera elétrons, os quais são acelerados em direção ao ânodo. Do outro lado o ânodo, ao ser polarizado a uma alta tensão positiva, atrai os elétrons à altíssimas velocidades, que ao atingirem o anteparo, interagem com os átomos que constituem o material do anteparo e produzem os raios X. O alvo converte cerca de 99% da energia dos elétrons em calor e 1% em raios X.

#### 4.5 FLUORESCÊNCIA DE RAIOS X

A Espectrometria de Fluorescência de Raios X (XRF) é uma técnica não destrutiva que permite não só uma análise qualitativa (identificação dos elementos presentes numa amostra), mas também quantitativa, permitindo estabelecer a proporção em que cada elemento se encontra presente.

A XRF consiste de três etapas: excitação dos elementos químicos que constituem a amostra, emissão dos raios X dos elementos e, por fim, a detecção dos raios X. A figura 4 ilustra o esquema simplificado dessa metodologia.

**Figura 4** - Etapas básicas da análise por ED-XRF.



**Fonte:** Parreira (2007).

Na fluorescência de raios X, pode-se excitar o material a ser analisado de várias maneiras: partículas carregadas aceleradas (elétrons, prótons ou íons), partículas alfa e beta, raios X e raios gama de baixa energia. A emissão dos raios X ocorre como descrito no item 4.3. Os raios X característicos emitidos podem ser detectados pelos seguintes detectores: proporcional, cristal cintilador de iodeto de sódio NaI(Tl), semicondutores de Si(Li), Si(PIN) e Ge(Li).

Em um experimento de XRF, a amostra é excitada por um feixe primário de raios X e os elementos excitados presentes na amostra emitem as linhas espectrais com energias características de cada elemento (NASCIMENTO FILHO, V. F., 1999). A fluorescência emitida pela amostra (feixe secundário) é detectada e os elementos são identificados de acordo com sua energia. O espectro de fluorescência fornece informações sobre concentrações de elementos na amostra, presença ou não de determinado elemento, perfis de profundidade de filmes finos, mapeamento químico (análise localizada da concentração de elementos na amostra) e várias outras informações, de acordo com sua aplicação.

Existem várias formas de realizar um experimento de XRF, cada qual tenta otimizar uma medida, minimizar efeitos indesejados, realizar análise localizada, etc. Dentre essas formas de realização de um experimento de XRF existem as seguintes variantes: EDXRF, WDXRF e a sub-variante da EDXRF, a fluorescência de raios X por reflexão total (TXRF). O presente trabalho utilizou a TXRF para análises de saliva.

#### 4.6 TXRF- FLUORESCÊNCIA DE RAIOS X POR REFLEXÃO TOTAL

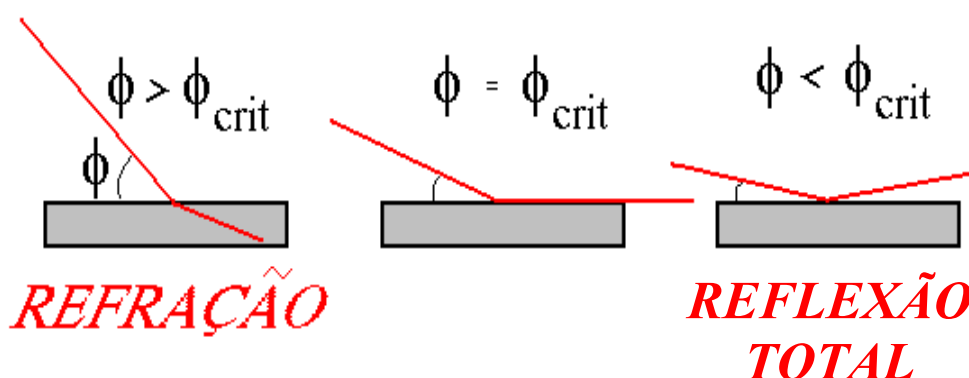
No eletromagnetismo, quando um feixe de radiação monoenergético passa de um meio (ar ou vácuo) e atinge uma superfície plana de um dado material, pode ocorrer a *refração*, penetrando no material, ou a *reflexão*, sendo refletido pela sua superfície em um ângulo do feixe emergente igual ao ângulo do feixe de incidência. Quando uma onda eletromagnética monocromática se propaga de um meio mais refringente para um meio menos refringente com um ângulo de incidência  $i$  maior que o ângulo crítico  $\phi_c$  ocorre o fenômeno da refração, se o ângulo de incidência for menor que o ângulo crítico, o feixe incidente não penetra no segundo meio, ou seja, ele é completamente refletido ao meio de origem. A esse fenômeno, dá-se o nome de *reflexão total*, conforme apresenta a figura 5.

Na TXRF os raios X são incididos com um ângulo rasante à superfície de tal forma que ocorra a reflexão total. Devido a reflexão total, a ausência de espalhamento pelo suporte, reduz o espalhamento do feixe primário com uma significativa redução da radiação do fundo no espectro de pulsos produzidos pelo detector. O feixe incidente não interage com o suporte, mas atravessa todo o filme fino formado pela deposição da amostra, com isto há grande probabilidade de excitar os átomos da superfície da amostra gerando raios X característicos cuja fluorescência é detectada por detectores posicionados muito próximos a amostra, como apresentado na figura 6. (PRANGE, 1989).

O efeito da reflexão total é aplicado para minimizar a intensidade da radiação de fundo, obtendo uma melhora no sinal de fluorescência. A baixa radiação de fundo resulta, principalmente, da menor profundidade de penetração com ângulos inferiores ao ângulo crítico de reflexão total (KLOCKEMKÄMPER et al.; 1996). Outra característica marcante do TXRF é a pequena distância entre a amostra e o detector, de apenas alguns milímetros, resultando em um ângulo grande, obtendo uma eficiente detecção do sinal de fluorescência proveniente da amostra.

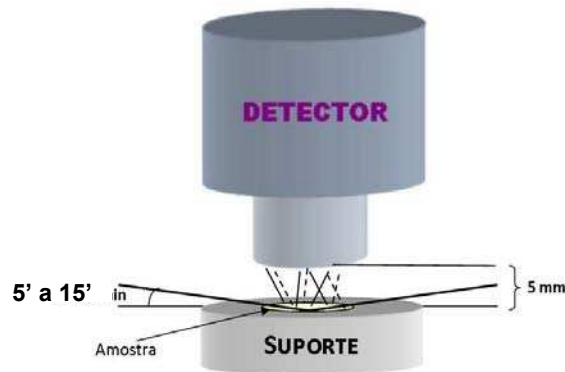
A técnica TXRF está sendo muito utilizada nos últimos anos e vem sendo aplicada principalmente na análise de elementos traços (na faixa de ppb) em amostras líquidas da ordem de microlitros. Esta técnica apresenta muitas vantagens, excitação da amostra por interferência dos fótons dos feixes incidentes e refletido, possui excelentes níveis de detecção e detecta a maioria dos elementos da tabela periódica.

**Figura 5 –** Representação esquemática da refração e reflexão de um feixe de radiação monoenergético em função do ângulo crítico de incidência.



**Fonte:** Nascimento Filho (1999).

**Figura 6 -** Geometria de excitação/detecção da TXRF, com linhas contínuas representando os raios X incidentes e espalhados, e os tracejados os raios X característicos.



**Fonte:** Adaptado de Nascimento Filho (1999).

O efeito de excitação em XRF utilizando a reflexão total pode ser caracterizada mediante a três parâmetros que seguem os princípios da radiação eletromagnética: o ângulo crítico, a refletividade e a profundidade de penetração.

#### 4.6.1 Ângulo Crítico

O valor do ângulo crítico depende, por exemplo, da energia do feixe incidente e da densidade do material, assim cada material tem um ângulo crítico diferente para uma mesma energia de feixe incidente, com o índice de refração sendo dado por:

$$n = 1 - \delta - i\beta \quad 1$$

onde  $\delta$  é a parte real e representa a dispersão, pois depende da densidade do material e  $\beta$  a parte imaginária, representa atenuação na matéria e depende do coeficiente de absorção. Cada parâmetro é representado por:

$$\delta = \frac{ne^2\lambda^2}{2\pi mc^2} \quad 2$$

e

$$\beta = \frac{\mu\lambda}{4\pi} \quad 3$$

sendo  $n$  densidade eletrônica,  $e$  e  $m$  é respectivamente, carga e massa do elétron,  $c$  é a velocidade da luz,  $\mu$  coeficiente de absorção e  $\lambda$  comprimento de onda. (Handbook of X Ray Spectrometry, 1993)

A densidade eletrônica pode ser escrita através da equação 4.

$$n = \frac{N_A \rho Z}{A} \quad 4$$

onde:

$N_A$  = número de Avogadro =  $6,023 \cdot 10^{23}$  átomos.átomo-g<sup>-1</sup>);

$\rho$  = densidade do material (g.cm<sup>-3</sup>);

$Z$  = número de elétrons em um átomo ou molécula do material,

$A$  = átomo-grama ou molécula-grama do material (g. mol<sup>-1</sup>).

Os valores de  $\delta$  e  $\beta$  são valores pequenos, onde o valor de  $\beta$  é bem menor que  $10^{-6}$ . Podemos encontrar o valor do ângulo crítico pela lei de Snell.

$$\cos \phi_c = 1 - \delta \quad 5$$

Para valores pequenos usa-se a expansão em série no cosseno, então tem-se:

$$\phi_c = \sqrt{2\delta} \quad 6$$

Substituindo as equações 2 e 4 em 6, obtemos a equação do ângulo crítico.

$$\phi_c = \frac{99,1}{E_c} \sqrt{\frac{Z\rho}{A}} \quad 7$$

onde:

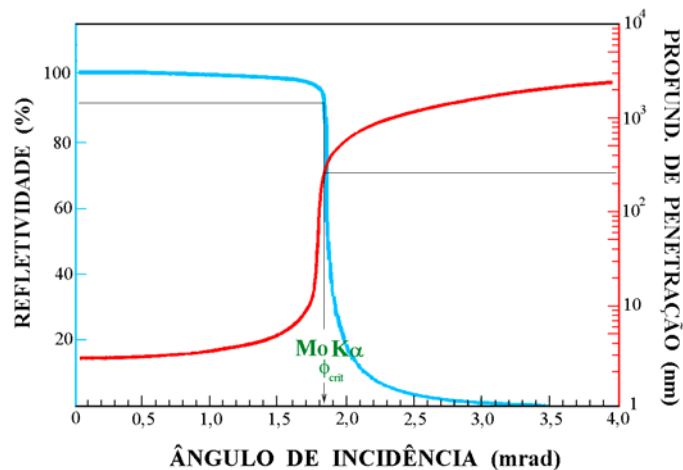
$\phi_c$  = ângulo crítico (minutos) de grau;

$E$  = energia de radiação (keV);

#### 4.6.2 Refletividade e Profundidade de Penetração

A refletividade representa a razão entre as intensidades do feixe refletido e incidente, podendo ser calculada através do ângulo de incidência, como apresentado na figura 7. Outra característica também utilizada na reflexão é a profundidade de penetração, definida como a profundidade (distância normal à superfície) a ser atravessada pelo feixe incidente para que a sua intensidade seja reduzida a 36,8%. A profundidade de penetração também pode ser calculada pelo ângulo de incidência, como ilustrado na figura 7. (Nascimento Filho, 1999). Para ângulos maiores que o ângulo crítico a refletividade cai e a profundidade cresce rapidamente.

**Figura 7** - Refletividade e profundidade de penetração calculada para o raios X Mo-K $\alpha$  incidindo sobre um suporte de quartzo.



**Fonte:** Nascimento Filho (1999).

#### 4.7 LLD - LIMITE MÍNIMO DE DETECÇÃO E LQ - LIMITE DE QUANTIFICAÇÃO

Limite mínimo de detecção (LLD) é uma grandeza importante para análises quantitativas. O LLD representa a menor quantidade (concentração, massa, volume, etc.) que pode ser discriminada estatisticamente de uma medida em relação ao background.

Os LLD's para a técnica de TXRF são menores que o da fluorescência convencional, devido a três fatores: baixa intensidade do background sob os picos característicos, fluxo da radiação primária disponível para a excitação da amostra é mais efetivo e a proximidade entre a amostra e o detector de raios X. O LLD<sub>i</sub> (contagem) para cada elemento *i* está diretamente relacionado com a

intensidade do background (contagem) sob o pico desse elemento. Como o branco é conhecido, a equação utilizada para a obtenção dos valores do LLD é: (Currie, L. A.; 1968)

$$LLD_i = 2,71 + 3,29\sqrt{F_i} \quad 8$$

onde  $F_i$  é o fundo sob o pico considerado (contagem). Essa equação determina qual o valor mínimo da contagem que pode obter um grau de confiança de 95%.

Outra grandeza a ser considerada é o limite de quantificação (LQ). O limite de quantificação é definido como a menor concentração do elemento da amostra, que pode ser quantificada com exatidão e precisão aceitáveis. O limite de quantificação (LQ) pode ser expresso pela equação: (Currie, L. A.; 1968).

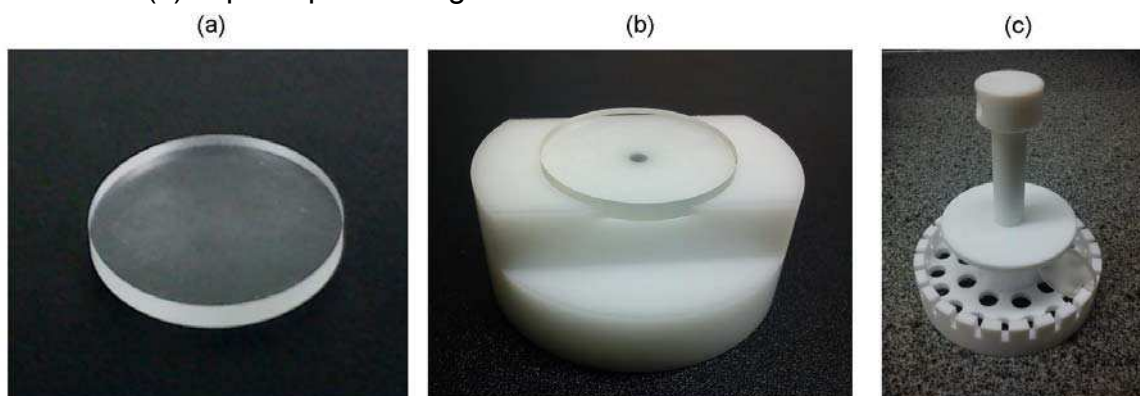
$$LQ = 50 \left\{ 1 + \left[ 1 + \frac{F}{25} \right]^{1/2} \right\} \quad 9$$

## 5 MATERIAIS E MÉTODOS

### 5.1 PORTA AMOSTRA UTILIZADO

O porta amostra utilizado para as análises das amostras de saliva no sistema TXRF é do tipo pastilha cilíndrica de acrílico com diâmetro de 3 cm, fornecido pelo fabricante do sistema, a empresa Bruker S.A. Esse porta amostra tem películas protetoras para não haver contaminação do mesmo, as quais são retiradas sempre antes da deposição das amostras para análise. Para a deposição da amostra, o porta amostra de acrílico é colocado sobre um suporte que contém uma marca no centro. A Figura 8 apresenta este porta amostra e seu suporte para deposição.

**Figura 8** – (a) Porta amostra de acrílico, (b) suporte para deposição das amostras e (c) suporte para secagem das amostras.



**Fonte:** da autora

### 5.2 PREPARAÇÃO DAS AMOSTRAS

Neste trabalho, utilizou-se amostras de saliva coletadas na saída do ducto da glândula parótida e no sulco gengival entre os dentes 46 e 47, conforme apresenta a figura 9. As coletas de saliva foram realizadas em sete indivíduos voluntários escolhidos aleatoriamente. Um profissional da área de odontologia, o dentista Ítalo José Vitorino Neto, fez a coleta das amostras com ajuda de uma micropipeta de 10  $\mu\text{L}$ . Os indivíduos permaneceram em jejum absoluto aproximadamente uma hora antes da coleta.

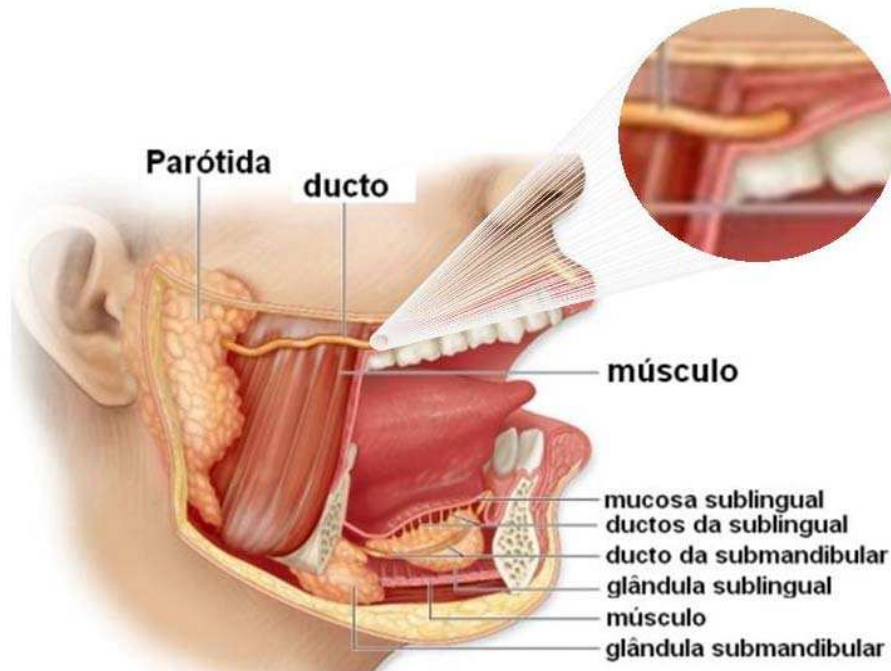
A primeira coleta foi realizada no dia 20/06/2012 na sala do Laboratório de Física Nuclear Aplicada (LFNA) às onze horas da manhã. Cada amostra dos indivíduos era

colocada sobre o porta amostra de acrílico que contém dois lados usáveis e um dos lados continha uma pequena marcação na superfície para diferenciar as amostras de saliva retirada na parótida e as amostras de saliva retirada no sulco, e outra marcação na lateral com os números dos indivíduos.

As amostras foram secas ao ar livre por aproximadamente 2 horas antes da análise por TXRF, que teve início no mesmo dia após o horário de almoço. Com o término das medidas, as amostras foram colocadas sobre um papel e foram embrulhadas de forma que elas ficassem separadas uma das outras como apresentado na figura 10 (a). Essas amostras foram armazenadas na própria sala de aquisição. A segunda coleta foi realizada no dia 04/10/12, às nove horas da manhã, no consultório odontológico do dentista localizado na Avenida Maringá, na cidade de Londrina-PR. O procedimento dessa coleta foi igual ao da primeira, mas o modo de armazenagem foi diferente. Para essa coleta, foi confeccionado um suporte para os portas amostra de acrílico, desenvolvido na Oficina de Mecânica do Departamento de Física da UEL e está ilustrado na figura 10 (b). Esse porta amostra é dividido em 10 partes iguais, com capacidade para 10 amostras, cujas dimensões são aproximadamente 22,5 cm de comprimento e 3,2 cm de diâmetro de forma que os portas amostras não saiam de suas posições. As pequenas divisões do porta amostra possui aproximadamente 3,0 cm comprimento de modo que as amostras ficam separadas uma das outras como apresentado na figura 10 (c).

As amostras de salivas foram primeiramente retiradas na saída do ducto da glândula parótida com a micropipeta e foram sendo depositadas sobre o porta amostra com aproximadamente 5  $\mu$ l de amostra para as análises de TXRF.

**Figura 9** – Esquema da saída do ducto da glândula parótida.



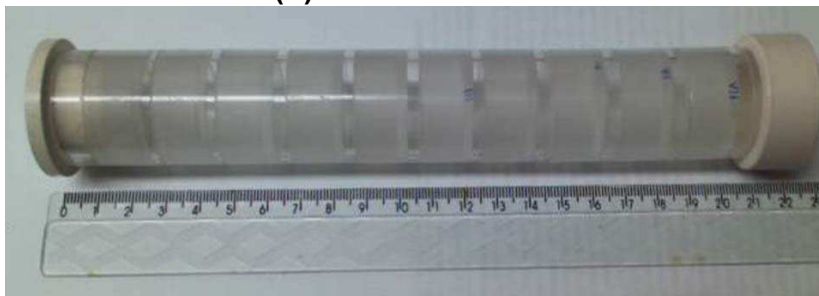
Fonte: <http://useblocker.blogspot.com.br>

**Figura 10** – a) amostras guardadas no papel e esquema do porta amostra confeccionado para armazenagem das amostras, b) porta amostra inteiro e c) divisões do porta amostra onde cada amostra é colocada.

(a)



(b)



(c)

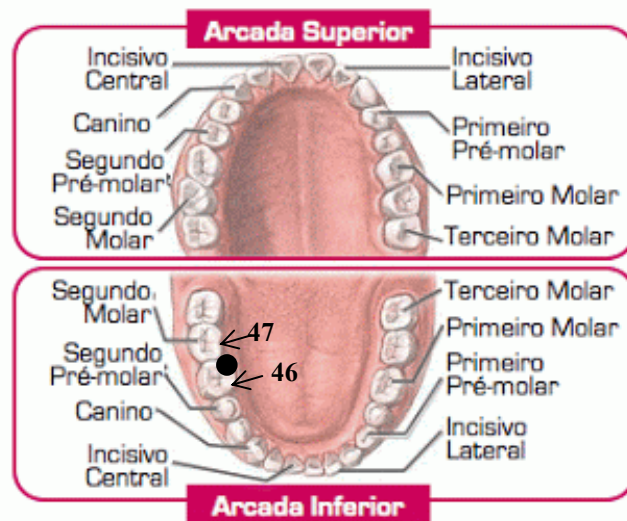


Fonte: da autora.

Em seguida foram retiradas as amostras de saliva do sulco gengival entre os dentes 46 e 47 como apresentado no esquema da figura 11. A coleta das

amostras foram realizadas da mesma forma que as amostras de saliva coletadas na parótida. Após a coleta de todas as amostras (parótida e sulco) dos sete indivíduos, os portas amostras de acrílico foram colocados em uma estufa do tipo autoclave Cristofoli para secagem com temperatura aproximada de 55 °C com um tempo aproximado de 35 minutos de secagem, conforme apresenta a figura 12.

**Figura 11** – Esquema das posições dos dentes onde foram retiradas as amostras de saliva do sulco gengival.



Fonte: <http://marcileneleao.blogspot.com.br/2013/01/extracao-do-dente-siso.html>

**Figura 12** – Estufa para secagem das amostras com uma temperatura e tempo de secagem a 55 °C e 35 minutos, respectivamente aproximados.

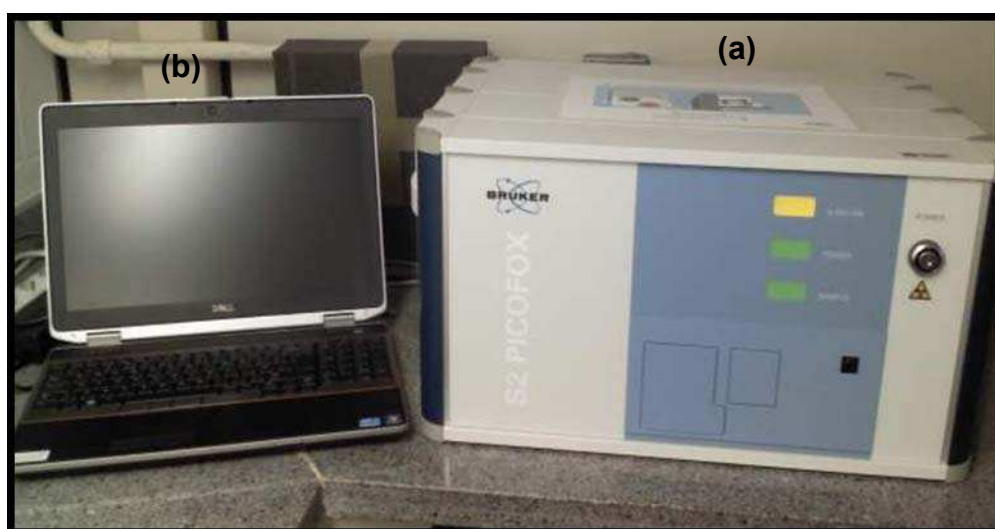


Fonte: da autora

### 5.3 SISTEMA DE FLUORESCÊNCIA DE RAIOS X POR REFLEXÃO TOTAL

O sistema utilizado para as análises de TXRF é do tipo S2 Picofox da Bruker S.A. O sistema usado encontra-se no Laboratório de Física Nuclear Aplicada (LFNA) da Universidade Estadual de Londrina (UEL) e é composto por dois componentes: espectrômetro e computador. A figura 13 apresenta o sistema utilizado.

**Figura 13** - Sistema de TXRF, a) espectrômetro e b) computador.

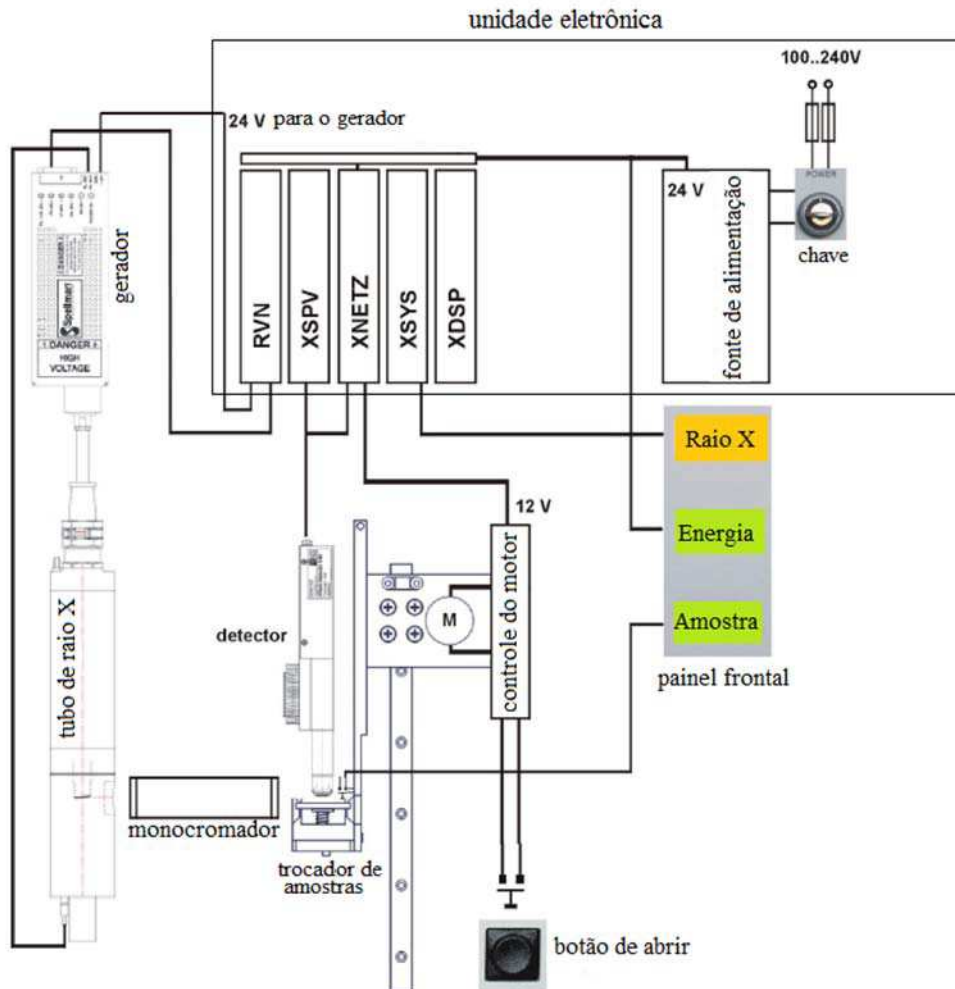


**Fonte:** da autora

#### 5.3.1 Espectrômetro

O espectrômetro de fluorescência de raios X é um instrumento que determina quantitativamente os elementos presentes em uma determinada amostra. É um equipamento portátil destinado à micro análises multielementares, em fases líquidas ou sólidas, utilizando a técnica de espectroscopia de fluorescência de raios X por reflexão total. O espectrômetro pode ser subdividido nos seguintes componentes principais: unidade eletrônica, gerador de raios X, monocromador, detector e trocador de amostras, conforme apresentado na figura 14.

**Figura 14 –** Esquema do espectrômetro do TXRF e suas subdivisões: unidade eletrônica, gerador de raios X, monocromador, detector e trocador de amostras.



**Fonte:** Manual S2 picofox

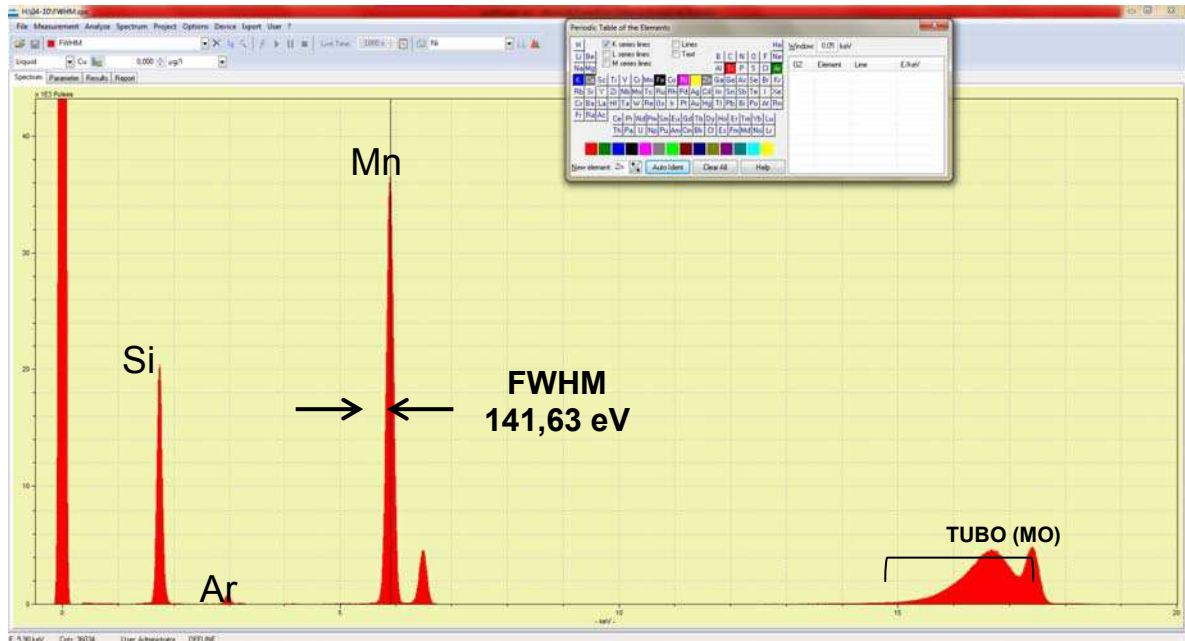
O tubo de raios X opera com uma potência de 50 W, o anodo e o monocromador são de molibdênio e o detector usado é de silício drift com resolução de 150 eV. O feixe que colide com a amostra possui um ângulo  $\approx 0,1^\circ$ .

### 5.3.2 Computador

O computador utilizado para obtenção dos espectros possui um processador Intel Pentium com frequência superior a 1.5 GHz, memória ram 512 MB e sistema de operação Windows 7. O software usado foi o SPECTRA e com ele podemos modificar o tempo de irradiação na amostra, introduzir elementos

identificados, desconvolução de picos sobrepostos e outros fatores. A figura 15 apresenta a janela do software SPECTRA.

**Figura 15** – Janela aberta do Software SPECTRA com o espectro do elemento manganês Mn apresentando o FWHM do pico.



**Fonte:** da autora

#### 5.4 MEDIDAS DE FLUORESCÊNCIA DE RAIOS X POR REFLEXÃO TOTAL

O sistema (eletrônica e tubo de raios X) foi ligado uma hora antes das análises para estabilização do mesmo, e logo após a estabilização foi realizada a calibração do sistema e as medidas das amostras.

As medidas das amostras já secas foram realizadas com um tempo de irradiação de 100 s para a primeira coleta (1ª etapa), com uma medida para cada amostra e de 500 s para a segunda coleta (2ª etapa), também com uma medida para cada amostra. A voltagem utilizada no tubo foi de 50 kV e 602  $\mu$ A para as etapas.

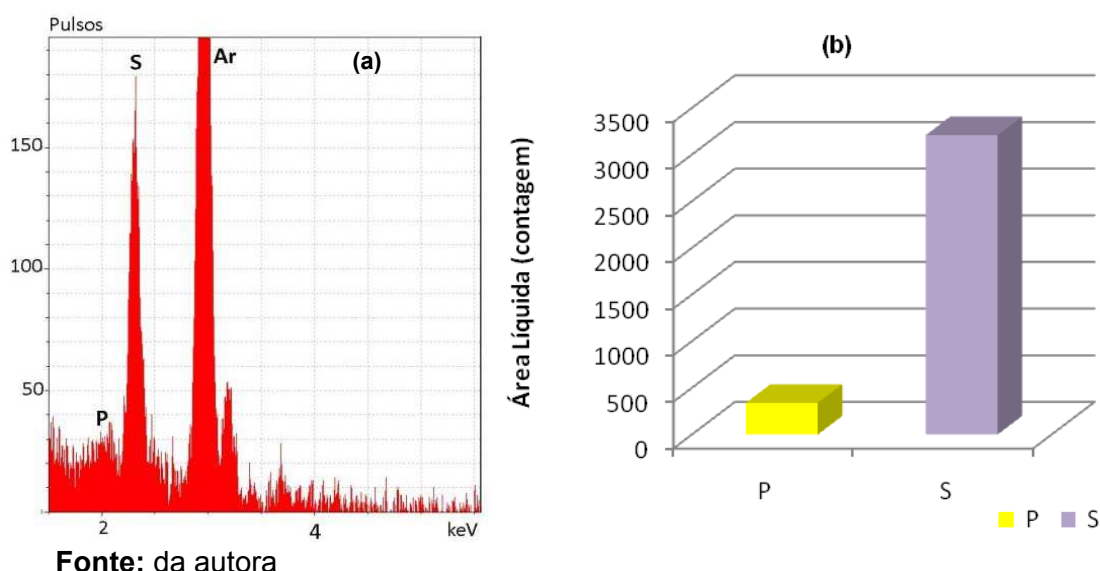
## 6 RESULTADOS E DISCUSSÕES

### 6.1 ESPECTRO DO BRANCO

Branco de amostra é uma matriz igual à da amostra, mas sem as substâncias que você deseja analisar. Serve para verificar se existem interferências no procedimento analítico. No presente trabalho o branco utilizado é o próprio porta amostra de acrílico.

A Figura 16 (a) ilustra o espectro do branco. Utiliza-se o branco para fazer a subtração dos elementos pré-existentes no porta amostra dos elementos encontrados no espectro obtido das amostras. Os elementos observados foram: potássio, enxofre e argônio. O argônio é um elemento inerte, presente no ar, e desse modo encontra-se dentro do sistema, visto que a medida não é realizada em vácuo. Desse modo, o elemento químico Ar está presente em todos os espectros das amostras. Nas análises de todas as amostras o Ar foi desconsiderado. A figura 16 (b) mostra a quantidade da área líquida dos elementos do branco.

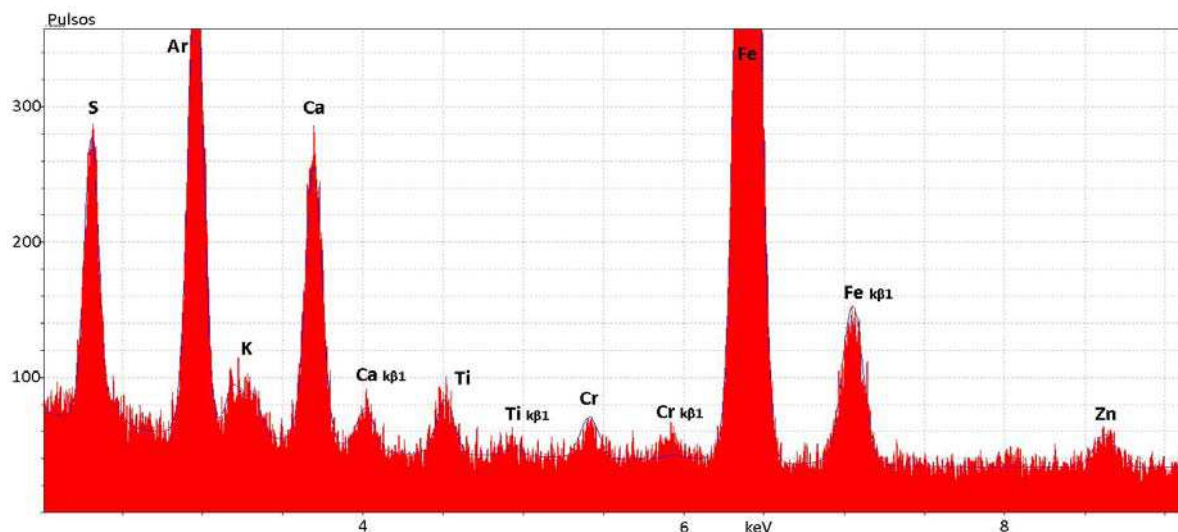
**Figura 16** – a) Espectro referente ao branco com um tempo de irradiação de 500 s (live-time) e b) gráfico do branco.



Após a medida do branco, o porta amostra foi deixado em cima da geladeira dentro da sala onde encontra-se o sistema de TXRF para observar os elementos espúrios presentes e acumulados na sala de aquisição. O porta amostra

foi exposto por um tempo de 30 dias. Após analisar esse porta amostra pode-se observar que o armazenamento incorreto das amostras causa problemas nas análises dos dados. A figura 17 mostra o espectro do branco após o período de exposição, com seus respectivos elementos.

**Figura 17** – Espectro referente ao branco deixado em cima da geladeira por 30 dias.



**Fonte:** da autora

## 6.2 PRIMEIRA ETAPA

Nesta etapa, apresentam-se os resultados das primeiras amostras que foram coletadas. Essas amostras foram medidas logo após a coleta e repetições foram realizadas com as mesmas amostras após 45 dias de armazenamento na sala de aquisição. As medidas foram irradiadas com um tempo de exposição de 100 s cada amostra.

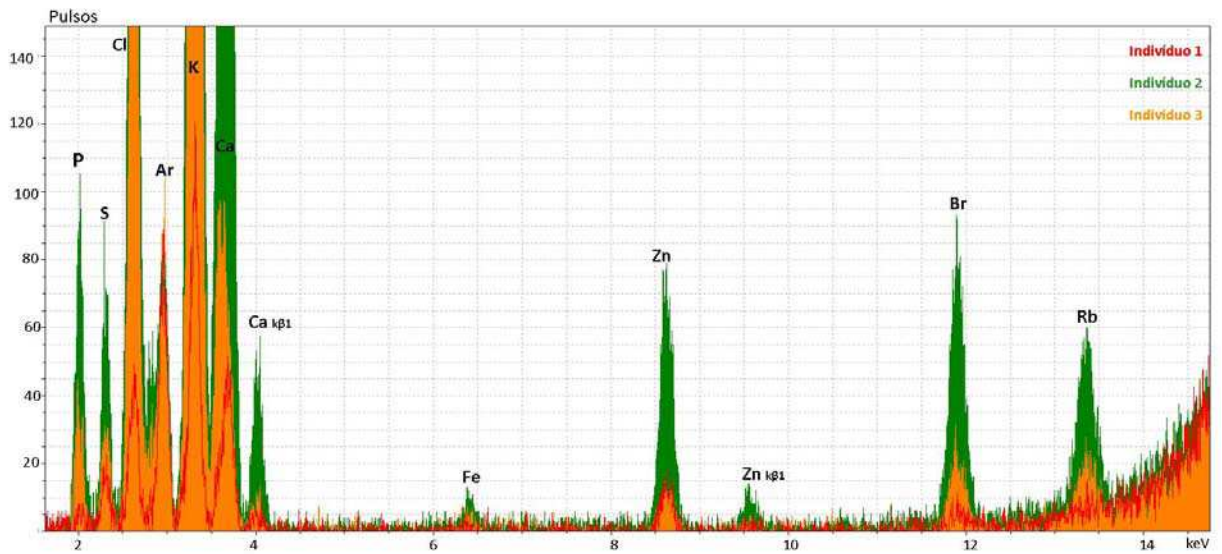
### 6.2.1 Primeira Coleta (saliva 100 s)

A aquisição dos espectros das amostras de saliva da glândula parótida e da saliva do sulco gengival foram realizadas através do software S2 Picofox no mesmo dia da coleta, após a secagem das amostras ao ar livre por aproximadamente 2 horas. As figuras 18 e 19 ilustram os espectros das amostras de saliva retiradas na saída do ducto da glândula parótida dos seis indivíduos aleatórios. Pode-se notar que o indivíduo 1 possui uma baixa intensidade de todos

os elementos. Além dessa baixa intensidade para todos os picos, o Fe não foi observado. Tanto para o indivíduo 1 quanto para o indivíduo 3, o elemento S não foi observado nas amostras de saliva, uma vez que o pico que aparece no espectro é devido ao porta amostra de acrílico, como referido no item 5.1.

Através do elemento S pode-se monitorar se o indivíduo está com doença periodontal ou não, como relata ZAMBONI, C.B. e et all.

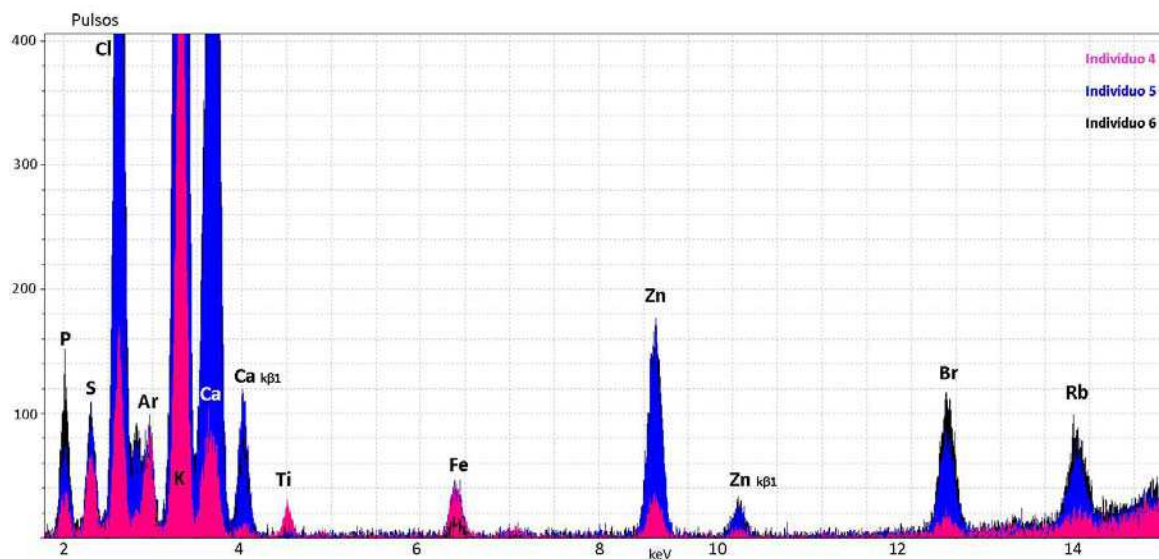
**Figura 18** – Espectro de saliva da parótida, referente às amostras dos indivíduos 1, 2 e 3.



**Fonte:** da autora

A Figura 19 ilustra os espectros de saliva das amostras dos indivíduos 4, 5, 6. Nota-se que o elemento Ti só foi observado no indivíduo 4.

**Figura 19** – Espectro de saliva da parótida, referente às amostras dos indivíduos 4, 5 e 6.



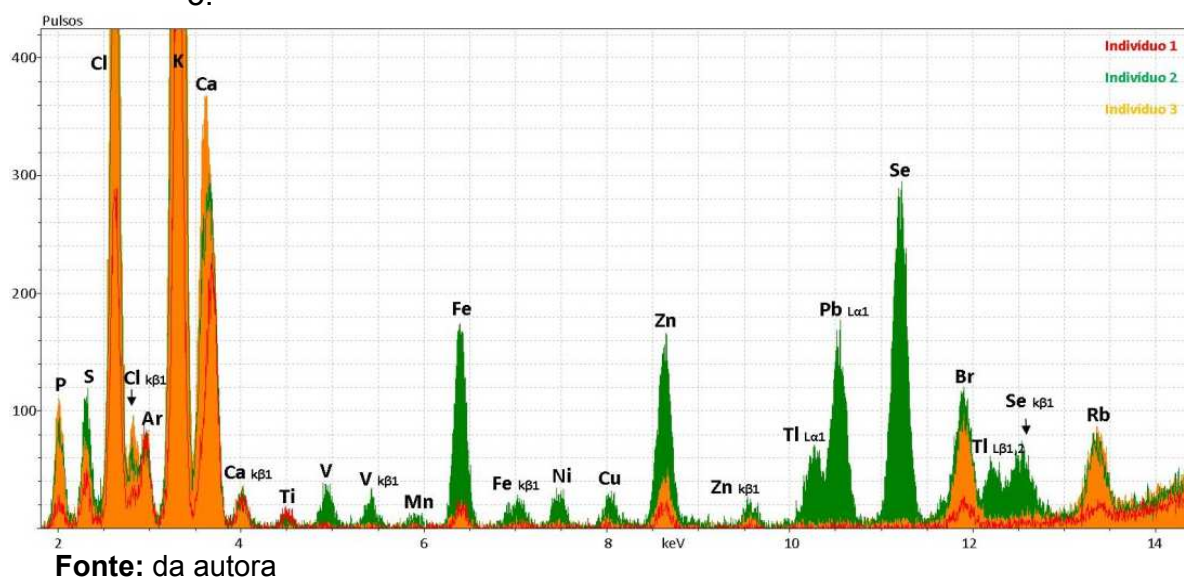
**Fonte:** da autora

### 6.2.2 Primeira Coleta (sulco 100 s)

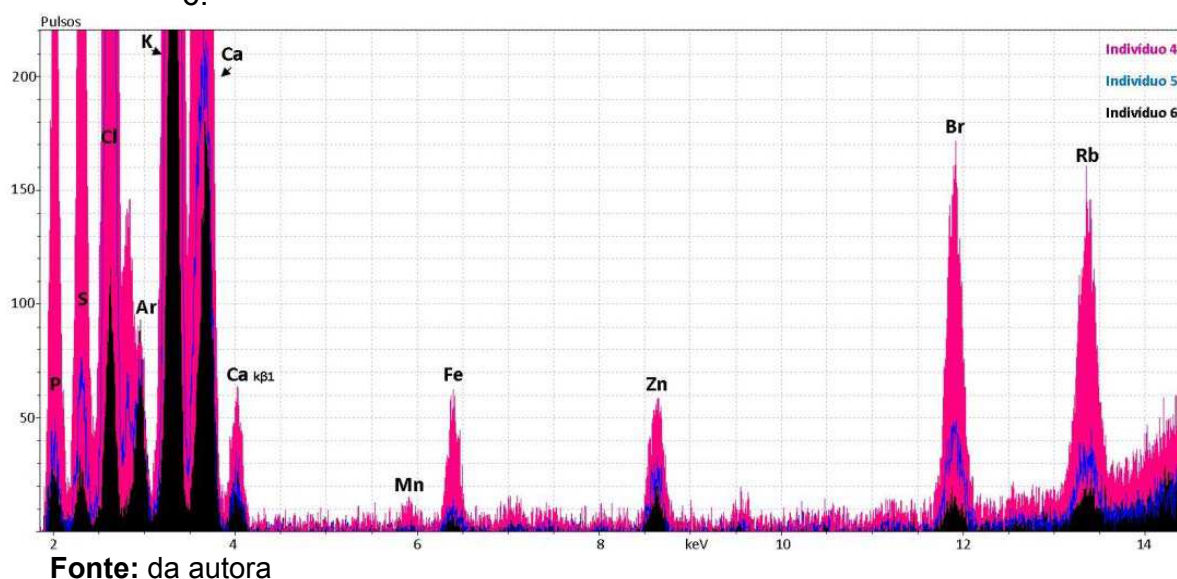
As Figuras 20 e 21 apresentam os espectros da saliva coletada no sulco entre os dentes 46 e 47. Nas amostras de sulco, foram observados os mesmos elementos encontrados nas amostras da parótida, que são o P, S, Cl, K, Ca, Fe, Zn, Br e Rb. Além dos mesmos elementos químicos observados nas amostras da parótida para os indivíduos 1, 2 e 3, como apresentado na figura 19, o indivíduo 2 apresenta outros elementos não observados nas amostras da parótida que são: V, Mn, Ni, Cu, Tl, Pb e Se.

Nas amostras de sulco da figura 21 aconteceu o mesmo fato das amostras da figura 19, além dos mesmos elementos observados nas amostras da parótida, a amostra do indivíduo 4 foi observado o elemento Mn.

**Figura 20** – Espectro de saliva do sulco referente às amostras dos indivíduos 1, 2 e 3.



**Figura 21** – Espectro de saliva do sulco referente às amostras dos indivíduos 4, 5 e 6.



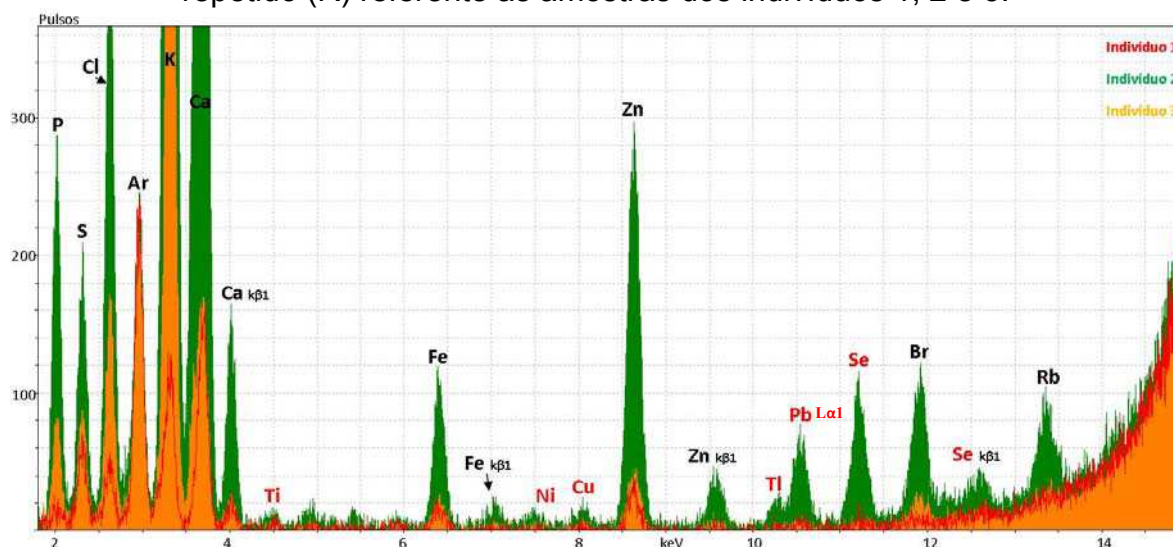
### 6.2.3 Repetição da Primeira Medida (saliva 100 s)

Para uma comparação com os espectros medidos no dia da coleta, realizou-se novamente medidas após 45 dias. As amostras guardadas foram medidas e seus resultados estão apresentados a seguir. A figura 22 ilustra o espectro de saliva medido novamente, rotulado de repetição (R). Essa repetição foi realizada tanto para as amostras de saliva da glândula parótida quanto para as amostras de saliva do sulco gengival de todos os indivíduos. Os elementos

encontrados nessa medida foram diferentes dos elementos observados na medida realizada no dia da coleta. Podemos observar uma diminuição do pico do Fe para o indivíduo 2. O enxofre não havia sido observado na primeira medida, mas foi observado na medida de repetição. Os elementos Ti, Ni, Cu, Tl, Pb e Se não tinham sido observados na primeira medida do indivíduo 2, mas foram observados na repetição e estão em destaque nesse caso na cor vermelha como apresentado na figura 22. Nota-se também que o pico do rubídio desaparece da amostra dos indivíduos 1 e 3.

Em relação aos elementos P, Cl, K, Fe, Zn e Br, tanto na primeira medida quanto na medida refeita, estes apareceram nas duas medidas de todas as amostras, mas o elemento S que não havia sido observado no indivíduo 1 e 3 na medida refeita foi observado.

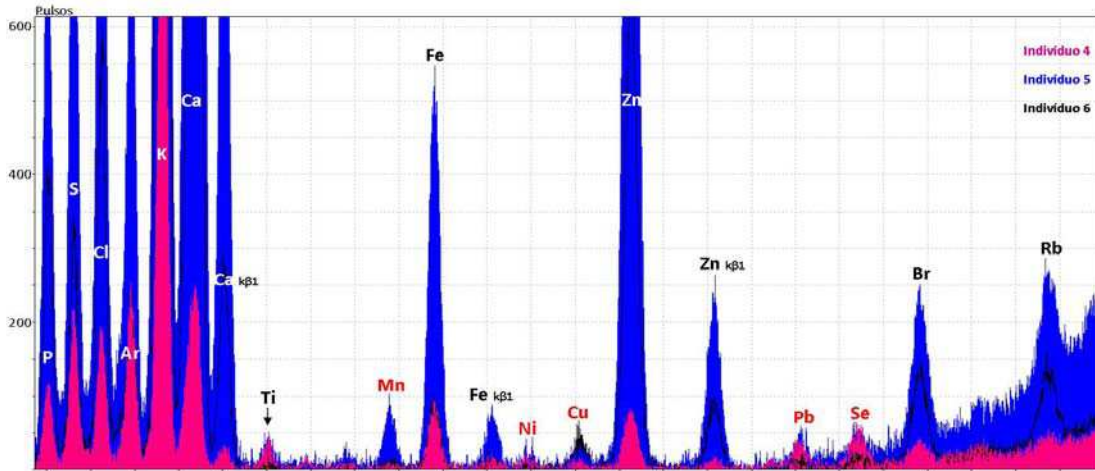
**Figura 22** – Espectro das amostras de saliva retirado na saída glandula parótida repetido (R) referente às amostras dos indivíduos 1, 2 e 3.



**Fonte:** da autora

No caso do espectro de saliva repetido (R), conforme apresenta a figura 23, comparando-o com o resultado da amostra medida no dia da coleta, pode-se notar que surgem alguns picos que não haviam sido observados anteriormente e estão destacados em vermelhos.

**Figura 23 –** Espectro das amostras de saliva retirado na saída glandula parótida repetido (R) referente às amostras dos indivíduos 4, 5 e 6.

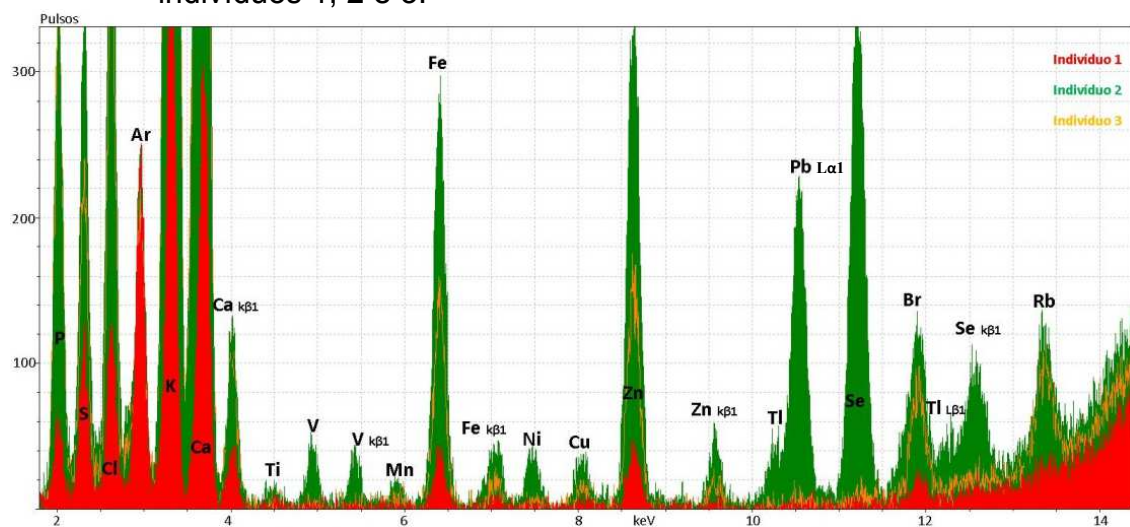


Fonte: da autora

#### 6.2.4 Repetição da Primeira Medida (sulco 100 s)

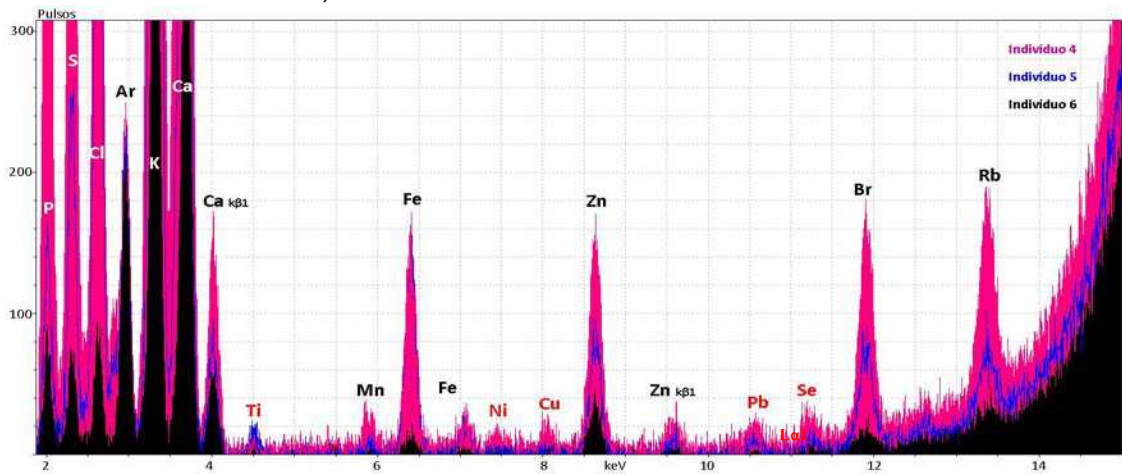
Nota-se que a figura 24 não teve alterações em relação aos elementos observados na primeira medida realizada no dia da coleta. Na figura 25, os espectros da amostra de sulco dos indivíduos 4, 5, 6 apresentam os elementos Mn, Ni, Cu, Pb e Se que não foram observados no dia da coleta e estão destacados em vermelho.

**Figura 24 –** Espectro das amostras de sulco repetido (R) referente às amostras dos indivíduos 1, 2 e 3.



Fonte: da autora

**Figura 25** – Espectro das amostras de sulco repetido (R) referente às amostras dos indivíduos 4, 5 e 6.

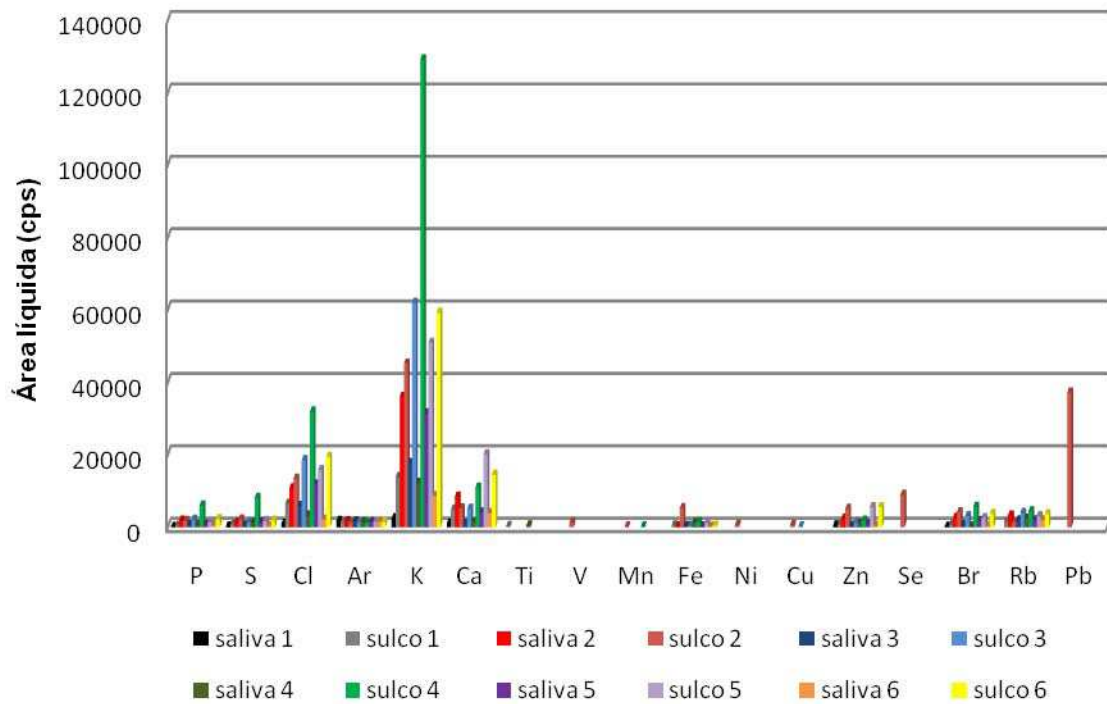


Fonte: da autora

Para uma melhor visualização foram feitos gráficos de todos os elementos com suas respectivas áreas líquidas.

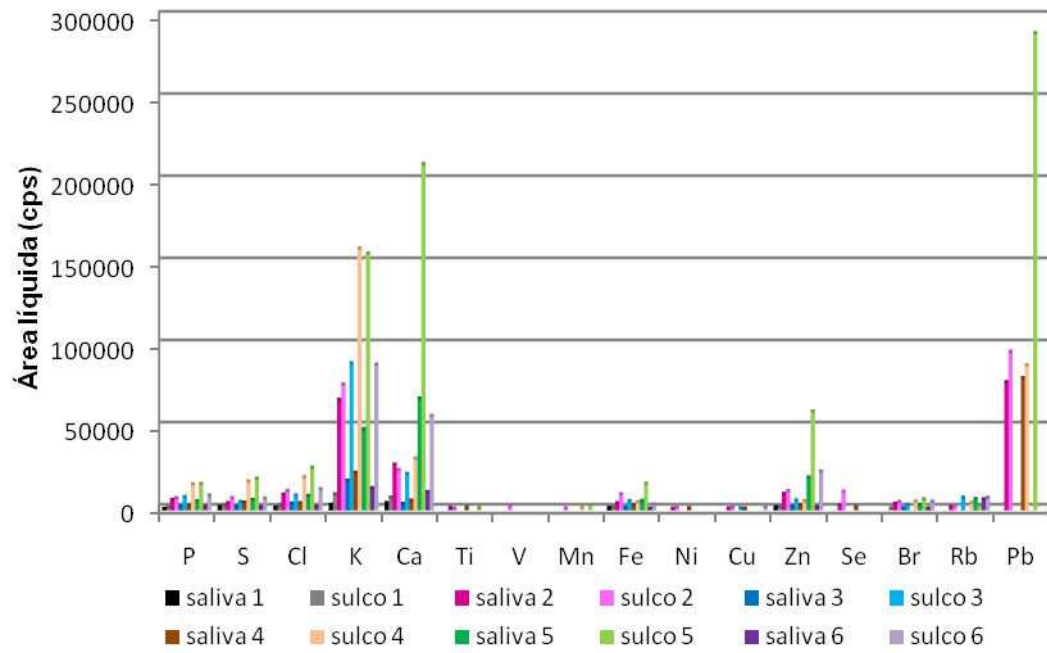
O gráfico das figuras 26 e 27, apresentam respectivamente, as áreas líquidas dos elementos observados na saliva e no sulco das amostras medidas no dia da coleta e das medidas refeitas. A figura 28 apresenta as áreas líquidas dos elementos versus os elementos observados na medida feita no dia da coleta e da medida refeita. Os elementos com índice 1 são os elementos observados na medida realizada no dia da coleta (M.C) e para índice 2 são os da medida refeita (M.R). Por exemplo, P1 significa fósforo medido na amostra cujo espectro foi adquirido no dia da coleta e P2 significa fósforo medido na amostra cujo espectro foi adquirido 45 dias após a coleta.

**Figura 26** – Gráfico de saliva da parótida e do sulco referente à medida no dia da coleta (M.C).



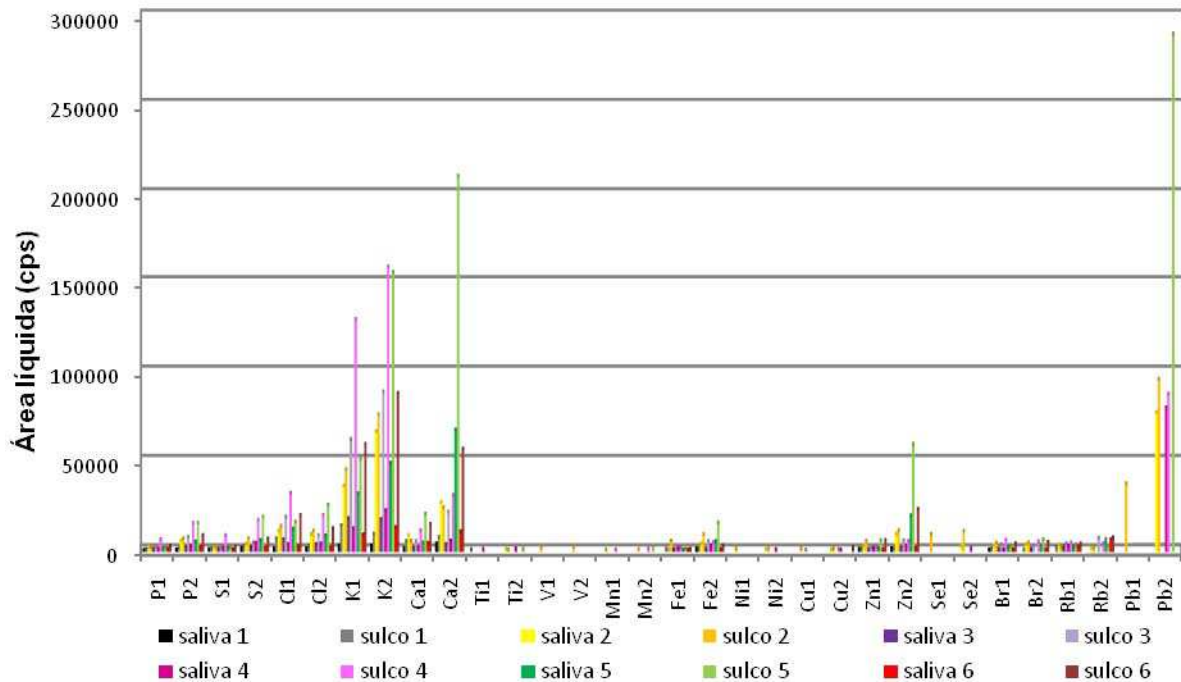
Fonte: da autora.

**Figura 27** – Gráfico de saliva da parótida e do sulco referente à medida refeita (M.R)



**Fonte:** da autora.

**Figura 28** – Gráfico de saliva da parótida e do sulco referente à medida da coleta (M.C) e da medida refeita (M.R), elementos com identificação 1 é (M.C) e elementos com identificação 2 é (M.R).



Fonte: da autora.

A tabela 2 mostra a razão sulco/saliva dos seis indivíduos em relação aos elementos encontrados em todas as amostras, referente à medida feita no dia da coleta (coluna A) e medida refeita (coluna B). Com o valor da razão, podemos saber a quantidade do elemento no sulco em relação à quantidade do mesmo na saliva.

**Tabela 2** - Razão Sulco/Saliva.

1ªcoleta (A)	RAZÃO SULCO/SALIVA											
	Indivíduo 1		Indivíduo 2		Indivíduo 3		Indivíduo 4		Indivíduo 5		Indivíduo 6	
1ªrefeita (B)	A <sup>1</sup>	B <sup>2</sup>	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B
Elementos												
P	-	-	1,10	1,26	3,40	4,59	9,68	6,72	0,53	0,20	0,22	0,18
S	-	2,71	2,16	1,96	-	3,92	10,60	4,78	0,72	2,47	-	0,13
Cl	6,95	-	1,24	1,22	3,14	2,49	9,88	5,35	1,33	3,11	9,08	8,28
K	5,62	3,59	1,25	1,14	3,48	5,16	10,53	7,14	1,62	3,19	6,86	6,92
Ca	4,73	1,95	0,62	0,88	5,06	6,48	7,88	5,92	4,94	3,12	3,73	5,43
Fe	-	1,78	18,84	2,56	1,35	8,15	1,29	1,68	4,43	3,10	3,16	7,48
Zn	-	-	0,40	1,20	-	-	1,69	1,99	6,13	3,08	-	-
Br	-	-	-	1,34	-	-	-	-	1,49	2,23	11,58	15,07
Rb	-	-	-	1,34	2,02	-	-	-	-	-	-	-
Pb	-	-	-	1,24	-	-	-	1,10	-	-	-	-

<sup>1</sup> Resultados dos espectros medidos no dia da coleta.

<sup>2</sup> Resultados dos espectros medidos 45 dias após a coleta.

Fonte: da autora.

O traço representado na tabela acima significa que o elemento não foi observado na saliva ou no sulco e também significa que o elemento não foi observado em nenhuma das amostras.

Pode-se concluir que, para essa primeira etapa, houve muita variação em relação aos elementos observados nas amostras guardadas no papel com as amostras guardadas no suporte de amostra confeccionado. Supõe-se que as amostras guardadas no papel não podem ser guardadas dessa forma, ocasionando assim um armazenamento de forma irregular, onde pôde ser encontrado a presença de elementos não observados na medida no dia coleta, ou no caso do Rb que não foi constatado seu pico nos indivíduos 1 e 3 na (M.R). Isso pode ser devido ao fato que nem todas as amostras guardadas incorretamente tiveram contato com o papel.

### 6.3 LLD – LIMITE MÍNIMO DE DETECÇÃO E LQ – LIMITE QUANTIFICAÇÃO PARA 100 S

As tabelas 3 e 4 mostram os resultados obtidos para o Limite Mínimo de Detecção (LLD) das amostras de saliva coletada na parótida e das amostras de saliva do sulco, respectivamente, calculados como descrito no item 4.7, para os elementos químicos de interesse P, S, Cl, K, Ca, Ti, V, Mn, Fe, Ni, Cu, Zn, Pb, Br, Rb. Todos os resultados estão em um intervalo de 95 % de confiança.

Na tabela 3 e 4 o símbolo “-” significa que o elemento não foi observado na amostra de saliva e de sulco e o símbolo “ \* ” significa que os valores da área líquida ficaram  $3\sigma$  abaixo do fundo.

Analisando os resultados dos LLDs, podemos notar que a primeira etapa (A) medidas realizadas no dia da coleta e (B) medidas realizadas após 45 dias da coleta, cujos valores são diferentes para todos os elementos encontrados, tanto para os valores das amostras da parótida quanto para os valores das amostras de sulco.

**Tabela 3** – Limites Mínimos de Detecção (LLD) (contagem) das amostras de saliva retirada na parótida dos seis indivíduos da primeira etapa, medidas no dia da coleta (A) e das medidas refeitas (B), respectivamente, com intervalo de confiança de 95%.

Elementos	Indivíduo 1		Indivíduo 2		Indivíduo 3		Indivíduo 4		Indivíduo 5		Indivíduo 6	
	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B
P	*	*	76	133	63	97	67	119	79	168	59	99
S	*	102	85	143	*	103	75	*	87	173	64	105
Cl	59	*	90	150	73	107	79	127	93	176	69	*
K	57	101	88	149	71	105	78	125	88	176	71	109
Ca	50	95	78	135	62	97	69	115	73	165	63	101
Fe	-	*	*	94	*	*	55	100	*	126	*	*
Zn	*	*	57	109	*	*	57	106	55	134	*	*
Br	*	-	77	*	*	*	*	-	73	*	*	*
Rb	-	-	111	*	96	-	*	-	*	*	*	*
Pb	-	-	-	114	-	-	-	113,55	-	-	-	-

- Elemento não observado

\* Valores  $\leq$  que o LLD

Fonte: da autora

**Tabela 4** – Limites Mínimos de Detecção (LLD) (contagem) das amostras de saliva do sulco dos seis indivíduos da primeira etapa, medidas no dia da coleta (A) e das medidas refeitas (B), respectivamente, com intervalo de confiança de 95%.

Elementos	Indivíduo 1		Indivíduo 2		Indivíduo 3		Indivíduo 4		Indivíduo 5		Indivíduo 6	
	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B
P	73	107	102	170	102	156	142	196	97	290	*	170
S	*	*	*	178	110	165	155	208	105	302	*	*
Cl	84	*	115	179	116	170	159	211	111	308	123	182
K	83	111	107	170	112	165	147	198	114	308	119	183
Ca	78	100	93	157	95	148	125	179	105	291	105	170
V	-	-	73	*	-	-	-	-	-	-	-	-
Fe	*	*	71	130	*	115	92	*	71	223	*	*
Zn	*	*	85	139	77	125	*	*	72	236	81	139
Se	-	-	111	166	-	-	-	-	-	-	-	-
Br	*	*	*	*	109	*	125	*	95	*	*	183
Pb	-	-	96	151	-	-	-	160	-	251	-	-

- Elemento não observado

\* Valores  $\leq$  a LLD

Fonte: da autora.

As tabelas 5 e 6 mostram os valores dos limites de quantificação calculados através da equação 9, como descrito no item 4.7.

**Tabela 5** – Limites de Quantificação (LQ) das amostras de saliva da parótida dos seis indivíduos da primeira etapa, medidas no dia da coleta (A) e das medidas refeitas (B), respectivamente.

Elemento	Indivíduo 1		Indivíduo 2		Indivíduo 3		Indivíduo 4		Indivíduo 5		Indivíduo 6	
	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B
P	-	-	280	450	239	342	251	408	287	554	228	347
S	-	356	307	480	-	360	275	-	312	571	-	-
Cl	228	-	319	500	270	371	288	431	327	580	257	-
K	221	353	313	499	265	366	283	426	315	581	263	377
Ca	203	334	284	455	238	340	257	395	269	547	241	354
Fe	-	-	-	333	-	-	216	350	-	428	-	-
Zn	-	-	222	377	-	-	221	369	216	453	-	-
Br	-	-	282	-	-	-	-	-	270	-	-	-
Rb	-	-	684	-	404	-	-	-	-	-	-	-
Pb	-	-	-	391,91	-	-	-	391	-	-	-	-

Fonte: da autora.

**Tabela 6** – Limites de Quantificação (LQ) das amostras de saliva do sulco dos seis indivíduos da primeira etapa, medidas no dia da coleta (A) e das medidas refeitas (B), respectivamente.

Elemento	Indivíduo 1		Indivíduo 2		Indivíduo 3		Indivíduo 4		Indivíduo 5		Indivíduo 6	
	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B
P	270	371	356	561	355	517	477	640	342	926	-	561
S	-	-	-	584	381	546	515	675	364	962	-	-
Cl	302	-	394	589	397	562	529	685	384	980	418	598
K	300	382	372	562	385	547	490	647	393	980	408	600
Ca	284	350	330	521	335	493	426	589	366	929	364	561
V	-	-	271	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Fe	-	-	264	441	-	396	327	-	256	721	-	-
Zn	-	-	306	468	282	424	-	-	267	762	294	467
Se	-	-	383	549	-	-	-	-	-	-	-	-
Br	-	-	-	-	376	-	425	-	335	-	-	601
Pb	-	-	337	505	-	-	-	531	-	807	-	-

Fonte: da autora

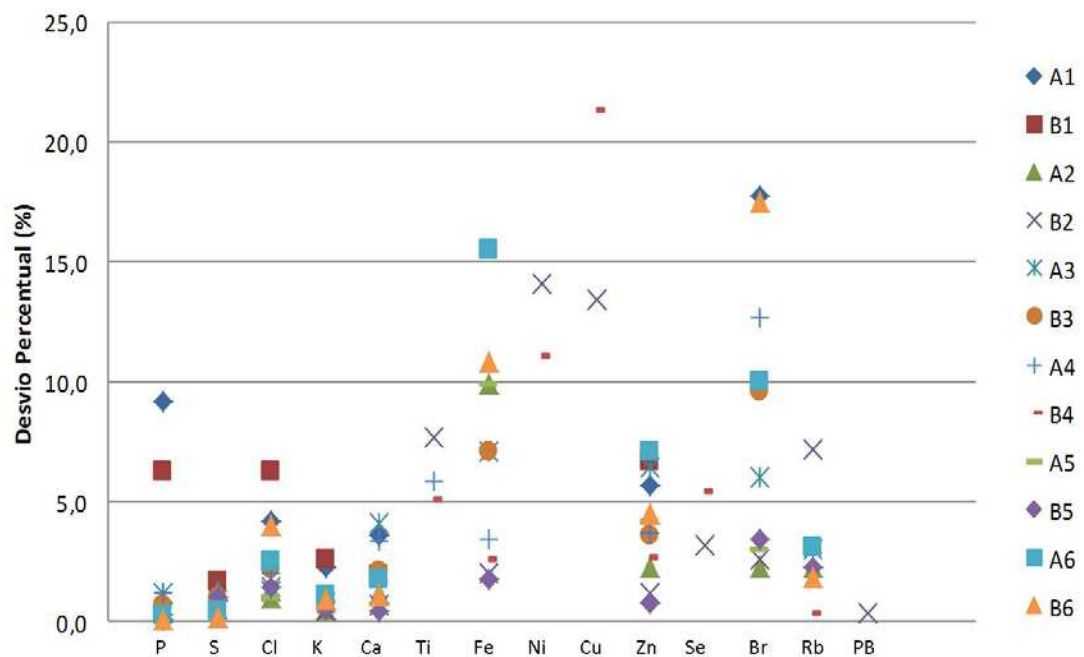
#### 6.4 DESVIO ESTATÍSTICO PROPAGADO PARA 100 S

A Figura 29 e 30 ilustram os desvios percentuais referente a área líquida versus os elementos encontrados nas amostras de saliva da parótida e das amostras de saliva do sulco, respectivamente, dos seis indivíduos em estudo. O índice A é para a medida realizada no dia da coleta e o B para a medida refeita após 45 dias da coleta. Pode-se notar que os resultados dos desvios estatísticos da figura 29 ficaram divididos em 3 grupos; um grupo que concentra os valores de 0 % a 5 %, um grupo que concentra valores entre 5 % e 10 % e o último grupo que concentra os

valores de 10 % a 25 %. A grande maioria dos valores determinado ficam entre 0 % a 10 %.

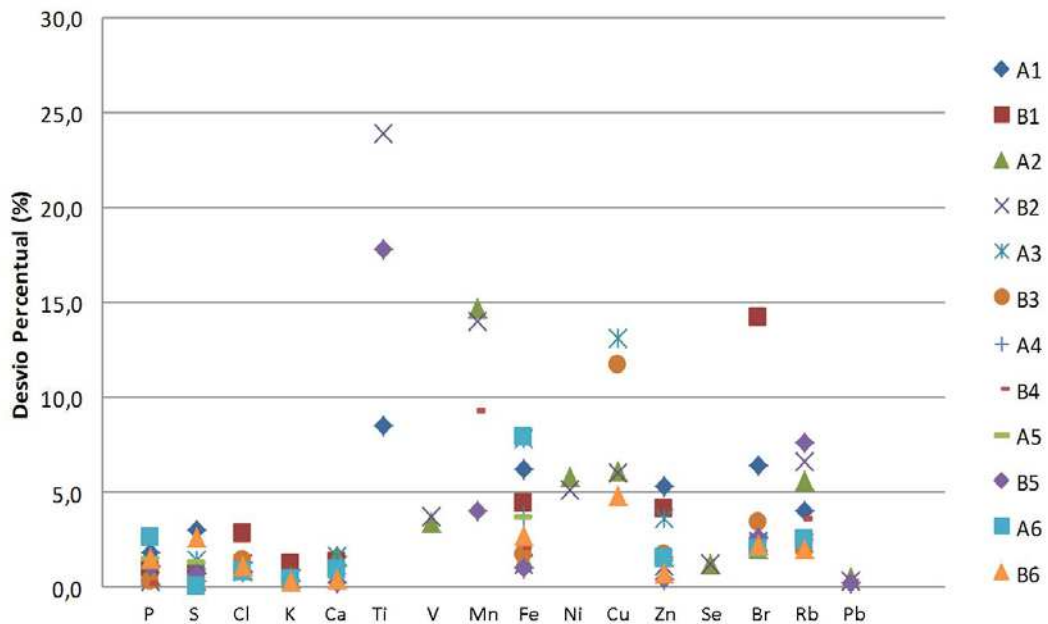
Na Figura 30 nota-se dois grupos distintos de valores, um de 0 % a 10 % e o outro 10 % a 25 %, com a maior concentração dos desvios estatísticos percentuais no intervalo de 0% a 10 %.

**Figura 29** – Desvio estatístico percentual das amostras de saliva da parótida para todos os seis indivíduos, onde A significa medida no dia da coleta e B medida refeita após 45 dias da coleta.



Fonte: da autora

**Figura 30 –** Desvio estatístico percentual das amostras de saliva do sulco para todos os seis indivíduos, onde A significa medida no dia da coleta e B medida refeita após 45 dias da coleta.



**Fonte:** da autora

## 6.5 SEGUNDA ETAPA

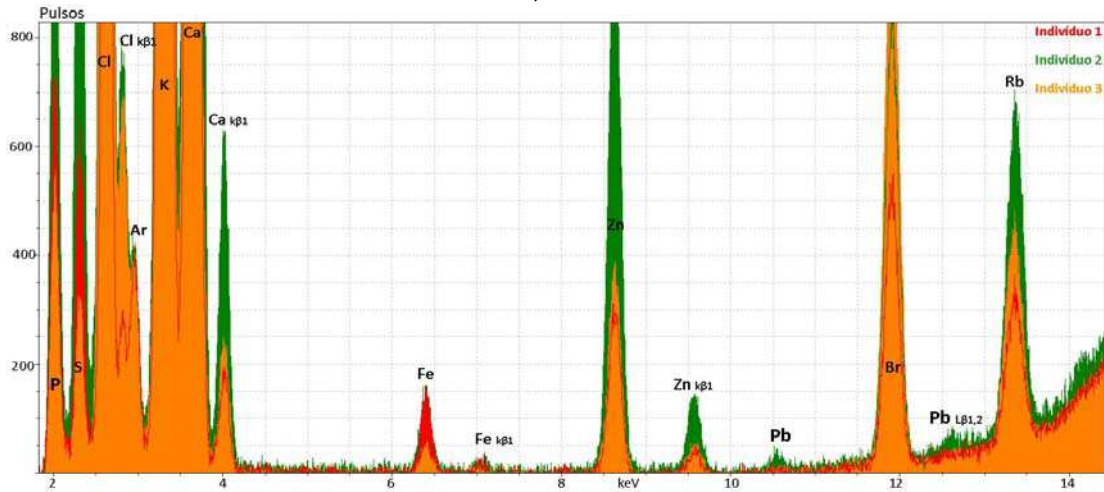
Nesta etapa, vamos discutir os resultados das amostras que foram coletadas no consultório do dentista e secas em estufa tipo autoclave, medidas logo após a secagem e também das repetições realizadas com as mesmas amostras após 30 dias de armazenamento no suporte confeccionado. As medidas foram irradiadas com um tempo de exposição de 500 s cada. Nesta etapa, foram coletadas amostras de saliva na glândula parótida e de saliva do sulco gengival de sete indivíduos, dentre os quais seis indivíduos são os mesmos da primeira etapa. As ordens dos indivíduos permaneceram as mesmas incluindo apenas a sétima pessoa, que estava grávida.

### 6.5.1 Segunda Coleta (saliva 500 s)

Esta coleta foi realizada no consultório odontológico do profissional Ítalo localizado na Avenida Maringá situado em Londrina - PR. A figura 31 mostra o espectro de saliva das amostras dos indivíduos 1, 2, 3. Comparando este resultado

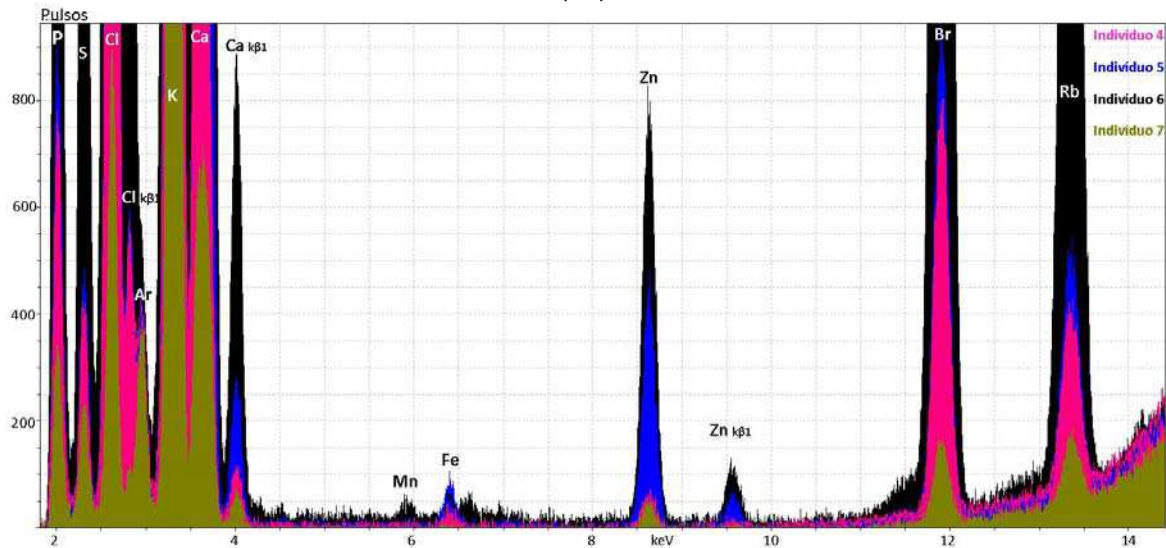
com o da primeira coleta, podemos notar que os picos de P e S estão mais intensos e foram observados nos três indivíduos, assim como o Fe observado no indivíduo 1 e o Pb para o indivíduo 2. A figura 32 ilustra os espectros de saliva dos indivíduos 4, 5, 6 e 7.

**Figura 31** – Espectro das amostras de saliva coletada na parótida referente às amostras dos indivíduos 1, 2 e 3.



Fonte: da autora

**Figura 32** – Espectro das amostras de saliva coletada na parótida referente às amostras dos indivíduos 4, 5, 6 e 7.



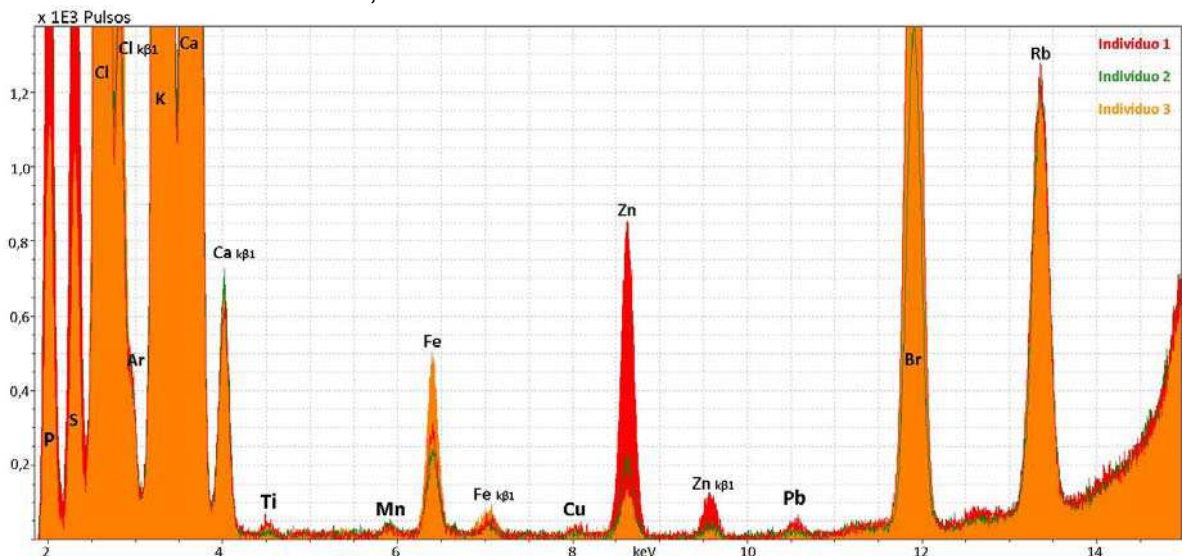
Fonte: da autora

### 6.5.2 Segunda Coleta (sulco 500 s)

A Figura 33 é referente aos espectros de sulco dos indivíduos 1, 2 e 3. Fazendo a comparação destes espectros com os espectros encontrados na primeira etapa, nota-se que os elementos V, Mn, Ni, Tl e Se encontrados na amostra do indivíduo 2 não aparece nessa etapa, assim como para os outros dois indivíduos os elementos observados se mantém os mesmos mudando somente seus valores de contagens.

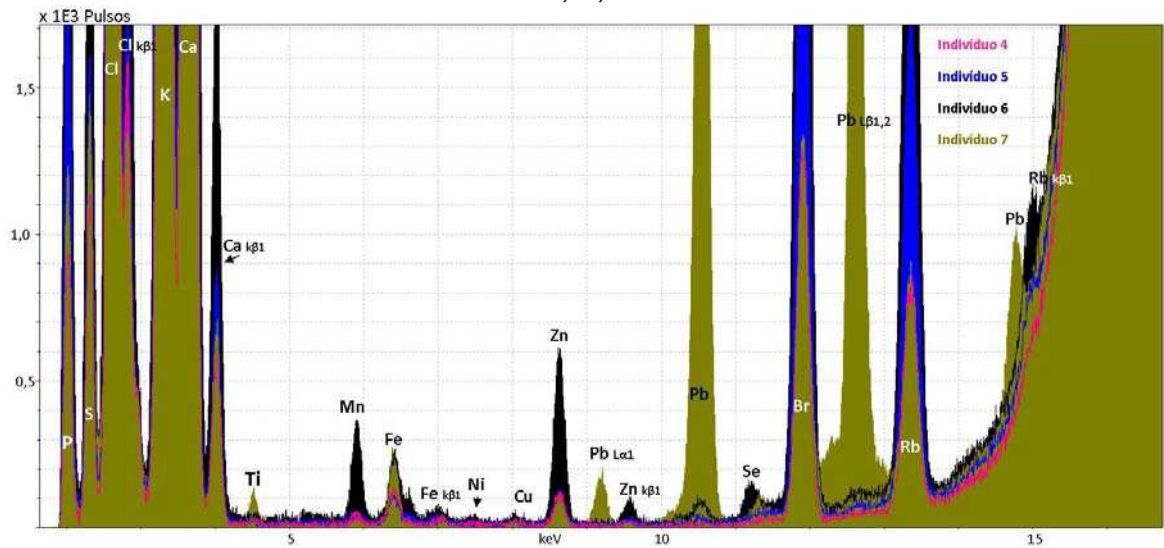
A Figura 34 apresenta os espectros de sulco dos indivíduos 4, 5, 6 e 7. O elemento químico Mn e Se não foi observado para o indivíduo 6 na primeira etapa, porém foram observados nesta. O Pb encontrado na amostra de sulco do indivíduo 7 foi observado em todas as linhas de energia em que o detector possa detectar. Como o indivíduo 7 trabalha no consultório odontológico em frente da avenida, estando assim parte do dia exposta a poluição ambiental, este fato pode estar associado ao grande fluxo de veículos que transitam pela Avenida Maringá, visto que esta avenida é muito movimentada o dia todo. (da Silva, A. T. C.; Marra, M. C. e Richter. E. M., 2010.)

**Figura 33** – Espectro das amostras de saliva coletadas no sulco, referente aos indivíduos 1, 2 e 3.



Fonte: da autora.

**Figura 34** – Espectro das amostras de saliva coletadas no sulco, referente às amostras dos indivíduos 4, 5, 6 e 7.

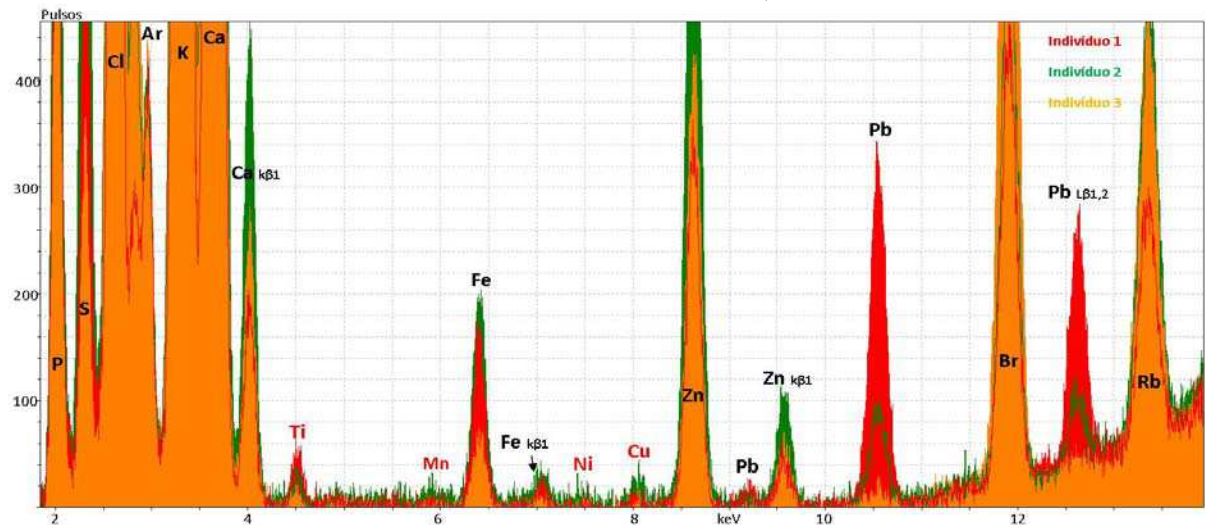


**Fonte:** da autora.

### 6.5.3 Repetição da Segunda Medida (saliva 500 s)

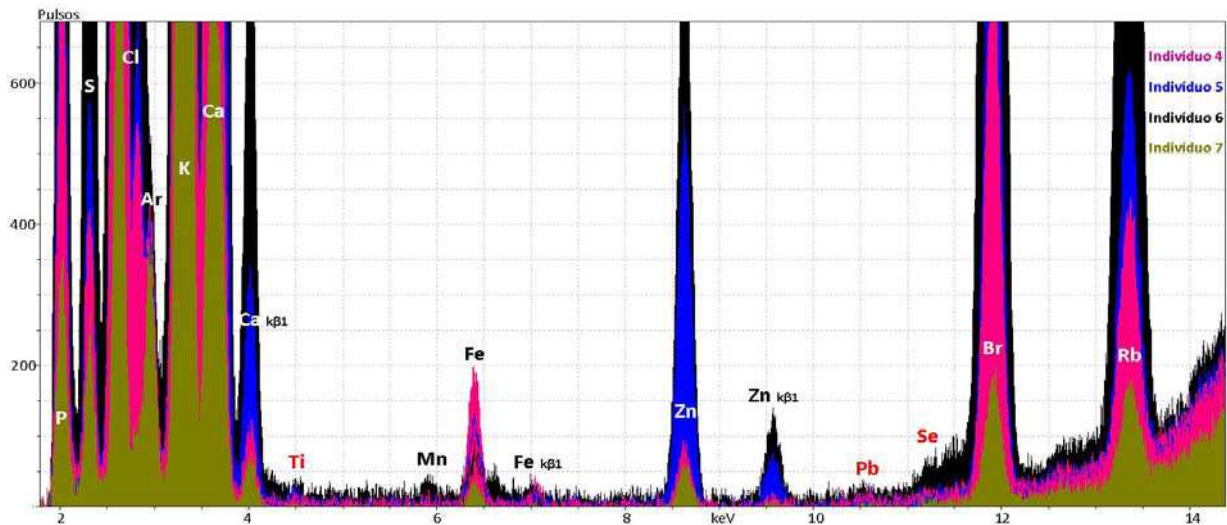
Os resultados das contagens líquidas dos elementos encontrados na medida no dia da coleta são semelhantes aos valores das contagens líquidas da medida repetida, com a diferença de que para o indivíduo 1, como apresentado na figura 35, não havia sido observado o pico do Ti e do Pb no espectro da medida no dia da coleta. O mesmo acontece com os elementos Pb e Se do indivíduo 6 e o Fe do indivíduo 7, como ilustrado na figura 36. Os elementos observados na medida refeita que não foram observados na medida no dia da coleta estão em destaque de vermelho.

**Figura 35** – Espectro da repetição das amostras de saliva coletadas na parótida, referente às amostras dos indivíduos 1, 2 e 3.



Fonte: da autora

**Figura 36** – Espectro da repetição das amostras de saliva coletadas na parótida, referente às amostras dos indivíduos 4, 5, 6 e 7.

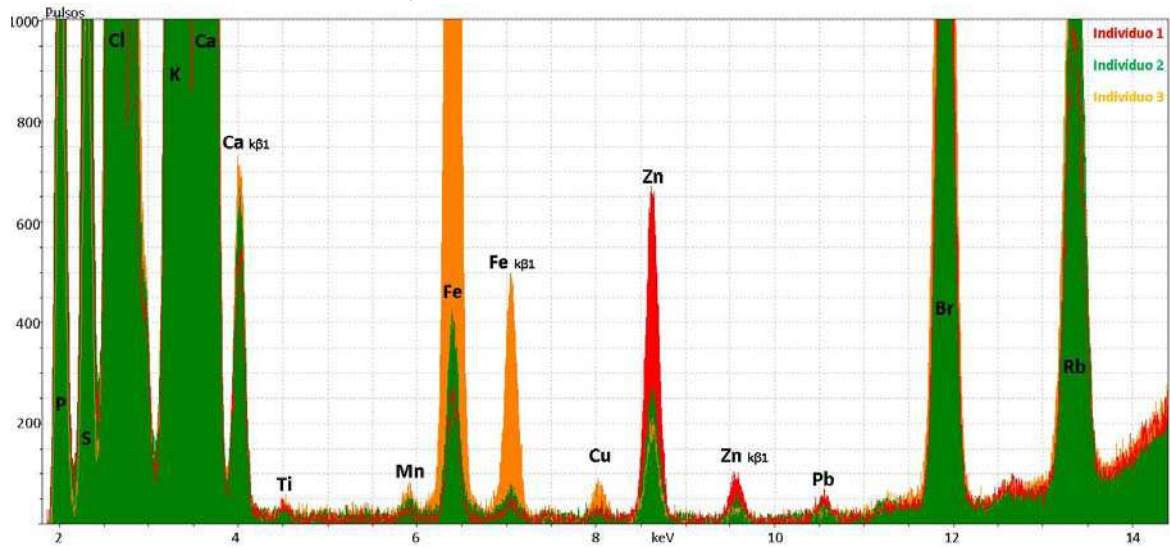


Fonte: da autora

#### 6.5.4 Repetição da Segunda Medida (sulco 500 s)

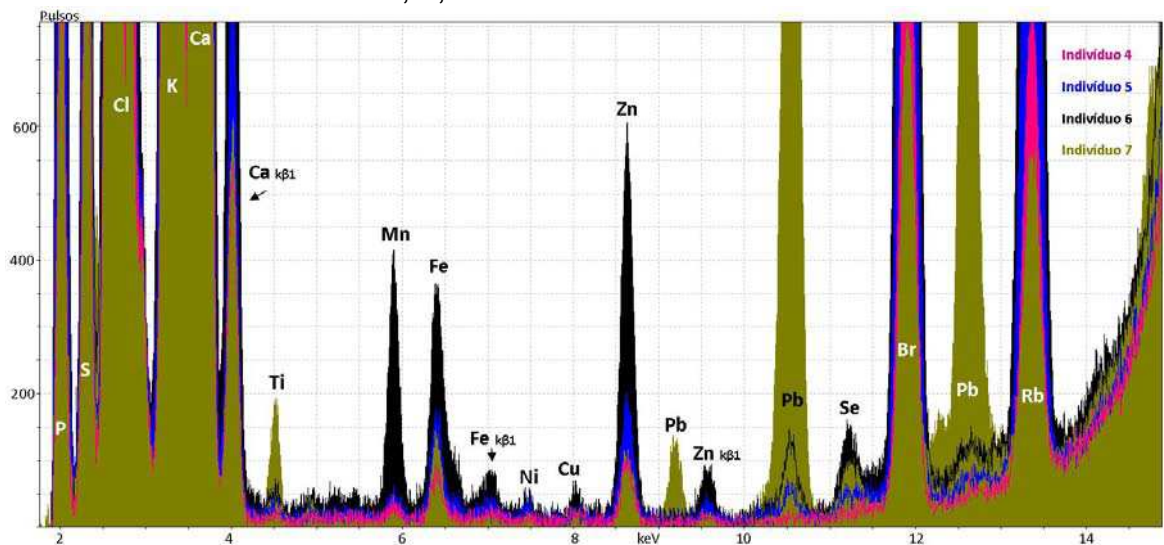
Além das contagens líquidas serem semelhantes, conforme as figuras 37 e 38, os elementos observados para os indivíduos 1, 2, 3, 4, 5, 6 e 7 são os mesmos, com exceção do Se que está destacado em vermelho para o indivíduo 7, como apresentado na figura 38.

**Figura 37** – Espectro da repetição das amostras de sulco referente às amostras dos indivíduos 1, 2 e 3.



Fonte: da autora.

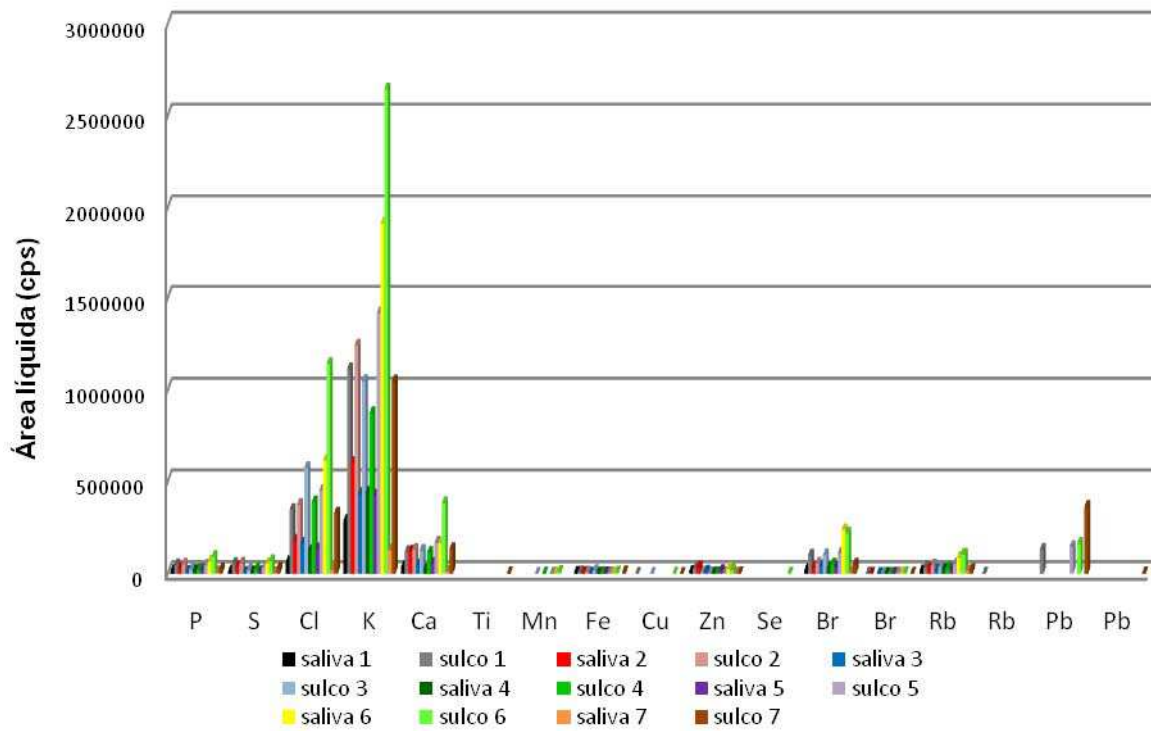
**Figura 38** – Espectro da repetição das amostras de sulco referente às amostras dos indivíduos 4, 5, 6 e 7.



Fonte: da autora

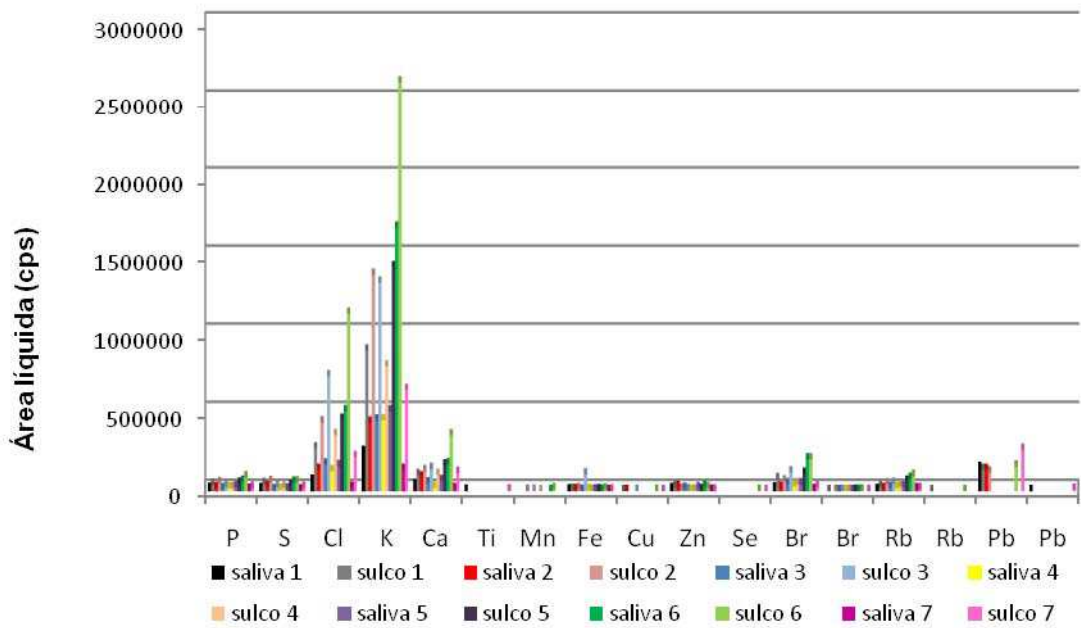
A Figura 39 mostra o gráfico de saliva e de sulco dos elementos encontrados nas amostras de todos os indivíduos versus as áreas líquidas da medida no dia da coleta, assim como o gráfico da figura 40 que é da medida refeita. O gráfico da figura 41 é a junção das duas medidas para uma melhor visualização e comparação dos elementos encontrados para os sete indivíduos.

**Figura 39** – Gráfico da saliva e do sulco referente à medida no dia da coleta (M.C).



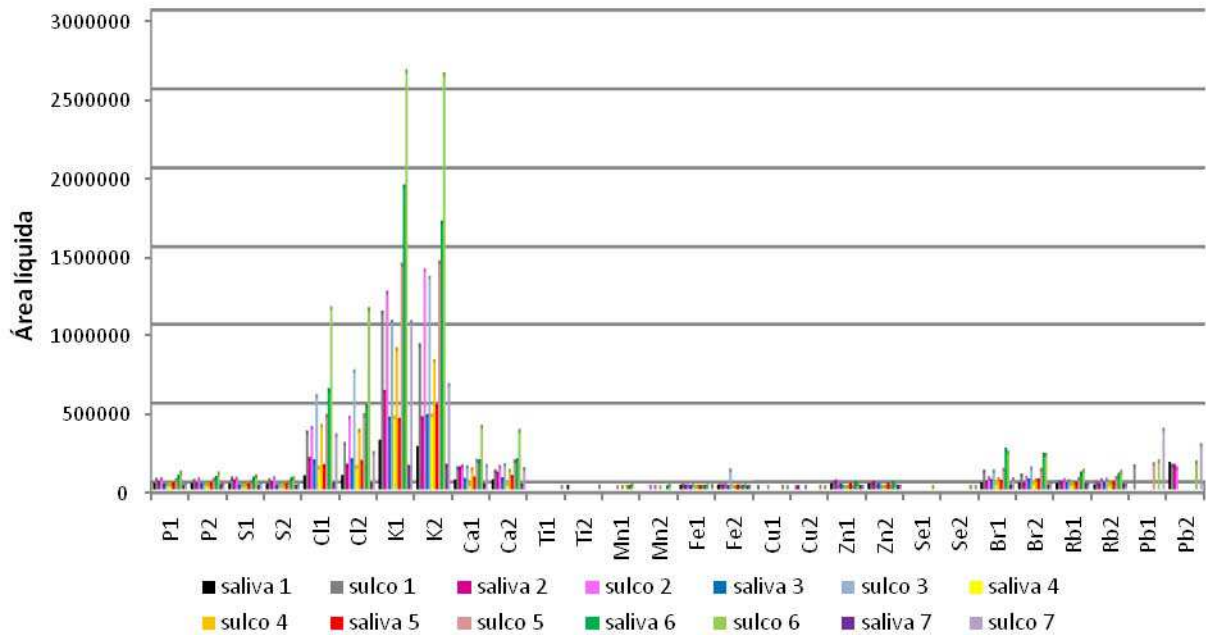
Fonte: da autora.

**Figura 40** – Gráfico da saliva e do sulco referente à medida refeita (M.R).



Fonte: da autora.

**Figura 41** – Gráfico da saliva e do sulco referente à medida da coleta (M.C) e a medida refeita (M.R), elementos com identificação 1 é (M.C) e elementos com identificação 2 é (M.R).



**Fonte:** da autora.

Os valores das razões sulco/saliva da segunda etapa são apresentados na tabela 7.

Nota-se que os resultados da segunda etapa ficaram bem próximos, com exceção do valor do Rb para o indivíduo 1 e 2, do Fe para o indivíduo 3 e 4 e do Mn para o indivíduo 6. Isso também ocorre para todos os valores das razões do indivíduo 7, sendo que o único elemento que não sofreu discrepância foi o P.

**Tabela 7 - Razão Sulco/Saliva dos 7 indivíduos.**

2ª coleta (C)		RAZÃO SULCO/SALIVA													
2ª refeita (D)		Indivíduo 1		Indivíduo 2		Indivíduo 3		Indivíduo 4		Indivíduo 5		Indivíduo 6		Indivíduo 7	
Elementos	C <sup>1</sup>	D <sup>2</sup>	C	D	C	D	C	D	C	D	C	D	C	D	
P	3,19	3,08	2,19	2,87	2,23	2,38	1,26	1,14	2,42	2,06	1,40	1,48	3,92	2,81	
S	5,56	4,96	1,45	2,43	6,79	6,92	4,32	3,82	4,97	3,72	1,28	1,04	24,68	18,13	
Cl	5,55	4,15	2,10	3,23	3,51	4,33	3,15	2,82	3,37	2,85	1,86	2,22	17,07	10,30	
K	3,87	3,60	2,06	3,17	2,42	2,96	1,98	1,76	3,33	2,81	1,38	1,56	8,22	4,75	
Ca	3,30	2,76	1,09	1,46	2,69	2,82	5,70	4,97	3,11	2,56	2,33	2,10	11,67	9,52	
Mn	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	8,56	13,87	-	-	
Fe	1,98	1,73	1,77	1,95	12,09	55,79	3,48	0,38	1,24	1,67	4,18	5,37	1,48	6,29	
Zn	2,60	1,95	0,20	0,32	0,30	0,41	1,59	1,23	0,26	0,33	0,75	0,65	9,93	1,76	
Br	5,22	4,84	1,75	2,95	2,53	2,82	1,81	1,52	3,21	2,58	0,92	1,00	1,48	4,24	
Rb	2,29	4,67	1,74	3,62	2,09	2,48	1,38	1,57	2,38	2,51	1,20	1,25	-	1,07	
Pb	-	0,91	-	0,89	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	

Fonte: da autora.

Essa variação pode estar relacionada ao armazenamento das amostras. Mesmo com o suporte confeccionado, as amostras guardadas ainda obtiveram variação, de modo que o suporte das amostras precisa ser melhorado para melhor armazenagem.

#### 6.6 LLD - LIMITES MÍNIMOS DE DETECÇÃO E LQ – LIMITE DE QUANTIFICAÇÃO PARA 500 S

As tabelas 8 e 9 mostram os resultados obtidos para o Limite Mínimo de Detecção (LLD) (contagem) das amostras de saliva coletada na parótida e das amostras de saliva coletadas no sulco entre os dentes 46 e 47, respectivamente, calculados como descrito no item 4.7, para os elementos químicos de interesse P, S, Cl, K, Ca, Ti, Mn, Fe, Ni, Cu, Zn, Pb, Br, Rb, todos os resultados estão em um intervalo de confiança de 95 %.

As tabelas 10 e 11 mostram os resultados do LQ das amostras de saliva da parótida e das amostras de saliva do sulco, respectivamente, para os mesmos elementos químicos de interesse da parótida.

Na tabela 8 e 9 o símbolo “-” significa que o elemento não foi observado na amostra de saliva e de sulco e o símbolo “ \* “ significa que os valores da área líquida ficaram  $3\sigma$  abaixo do fundo, por esse motivo os valores não são confiáveis e foram desconsiderados dos dados das tabelas.

**Tabela 8** – Limites Mínimos de Detecção (LLD) (contagem) das amostras de saliva retirada na parótida dos sete indivíduos da segunda etapa, medidas no dia da coleta C e das medidas refeitas D, com intervalo de confiança de 95%.

Elementos	Indivíduo 1		Indivíduo 2		Indivíduo 3		Indivíduo 4		Indivíduo 5		Indivíduo 6		Indivíduo 7	
	C	D	C	D	C	D	C	D	C	D	C	D	C	D
P	*	*	*	*	*	*	*	*	*	282	454	*	*	*
S	*	*	350	*	*	*	*	*	277	*	*	480	*	*
Cl	270	265	365	322	293	296	294	289	290	309	516	496	198	194
K	253	246	338	297	278	277	274	274	275	297	465	452	189	187
Ca	220	213	299	270	233	236	228	227	234	260	387	374	163	160
Zn	168	169	206	198	160	168	*	*	169	180	228	255	*	*
Br	232	*	268	263	228	239	261	244	238	247	295	299	*	*
Rb	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	395	*	*
Pb	-	178	-	204	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Fonte: da autora

Fazendo a mesma comparação para os resultados da segunda etapa, (C) medidas realizadas no dia coleta e (D) medidas realizadas após 30 dias, os valores variam muito pouco. Isso ocorre tanto para os resultados de amostras de saliva coletadas na glândula parótida quanto para os resultados de amostras de saliva coletas no sulco gengival.

**Tabela 9** – Limites Mínimos de Detecção (LLD) das amostras de saliva do sulco dos sete indivíduos da segunda etapa, medidas no dia da coleta C e das medidas refeitas D, com intervalo de confiança de 95%.

Elementos	Indivíduo 1		Indivíduo 2		Indivíduo 3		Indivíduo 4		Indivíduo 5		Indivíduo 6		Indivíduo 7	
	C	D	C	D	C	D	C	D	C	D	C	D	C	D
P	377	351	381	394	*	*	*	*	400	*	535	520	*	*
S	412	383	419	433	*	*	*	*	*	440	*	*	*	*
Cl	427	396	436	452	410	458	382	367	455	454	597	581	433	373
K	382	355	392	405	371	416	349	340	418	421	537	529	402	341
Ca	323	301	333	332	316	351	300	289	356	357	469	459	343	296
Fe	*	*	*	196	199	229	*	*	*	*	*	*	*	*
Zn	216	206	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
Br	280	272	273	259	255	293	260	*	295	284	492	344	*	*
Rb	*	*	363	340	350	391	*	357	392	379	448	443	*	*
Pb	219	209	-	202	-	-	-	-	234	-	271	267	249	232

Fonte: da autora.

**Tabela 10 –** Limites de Quantificação (LQ) das amostras de saliva retirada na parótida dos sete indivíduos da segunda etapa, medidas no dia da coleta C e das medidas refeitas D, respectivamente.

Elementos	Indivíduo 1		Indivíduo 2		Indivíduo 3		Indivíduo 4		Indivíduo 5		Indivíduo 6		Indivíduo 7	
	C	D	C	D	C	D	C	D	C	D	C	D	C	D
P	-	-	-	-	-	-	-	-	-	900	1422	-	-	-
S	-	-	1108	-	-	-	-	-	885	-	-	1502	-	-
Cl	863	849	1152	1021	933	944	937	922	924	983	1612	1550	646	634
K	814	792	1071	946	887	886	877	877	878	947	1456	1417	617	614
Ca	713	692	952	863	752	760	736	734	756	835	1218	1181	540	530
Zn	553	559	670	646	531	555	-	-	558	593	738	702	-	-
Br	750	-	859	843	735	770	837	784	768	794	939	953	-	-
Rb	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1243	-	-
Pb	-	584	-	663	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Fonte: da autora.

**Tabela 11 –** Limites de Quantificação (LQ) das amostras de saliva retirada no sulco dos sete indivíduos da segunda etapa, medidas no dia da coleta C e das medidas refeitas D, respectivamente.

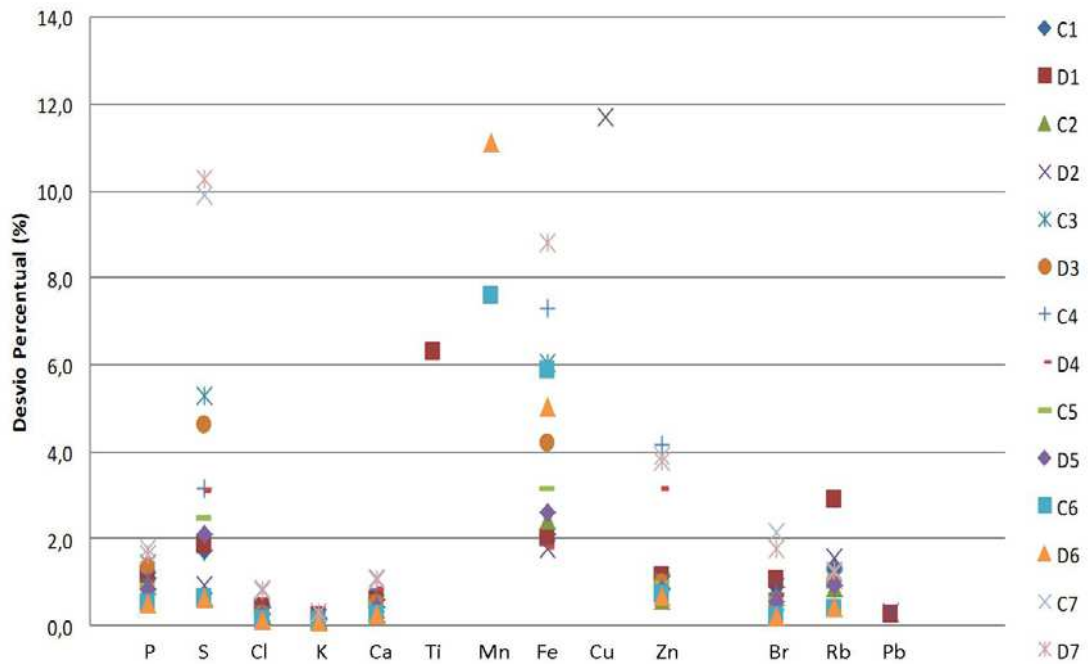
Elementos	Indivíduo 1		Indivíduo 2		Indivíduo 3		Indivíduo 4		Indivíduo 5		Indivíduo 6		Indivíduo 7	
	C	D	C	D	C	D	C	D	C	D	C	D	C	D
P	1188	1111	1201	1239	-	-	-	-	823	-	1422	1623	-	-
S	1294	1206	1316	1358	-	-	-	-	-	1379	-	-	-	-
Cl	1341	1246	1367	1416	933	1436	937	1158	924	1422	1612	1807	646	1175
K	1205	1121	1234	1272	887	1308	877	1077	878	1324	1456	1651	617	1081
Ca	1025	958	1056	1051	752	1109	736	923	756	1128	1218	1437	540	942
Fe	-	-	-	638	515	741	-	-	-	-	-	-	-	-
Zn	701	671	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Br	894	870	872	831	735	934	837	-	768	906	939	1088	-	-
Rb	-	-	1145	1077	1014	1230	-	1129	1062	1193	1203	1388	-	-
Pb	711	680	-	659	-	-	-	-	754	-	868	4017	1306	1153

Fonte: da autora

## 6.7 DESVIO ESTATÍSTICO PROPAGADO PARA 500 S

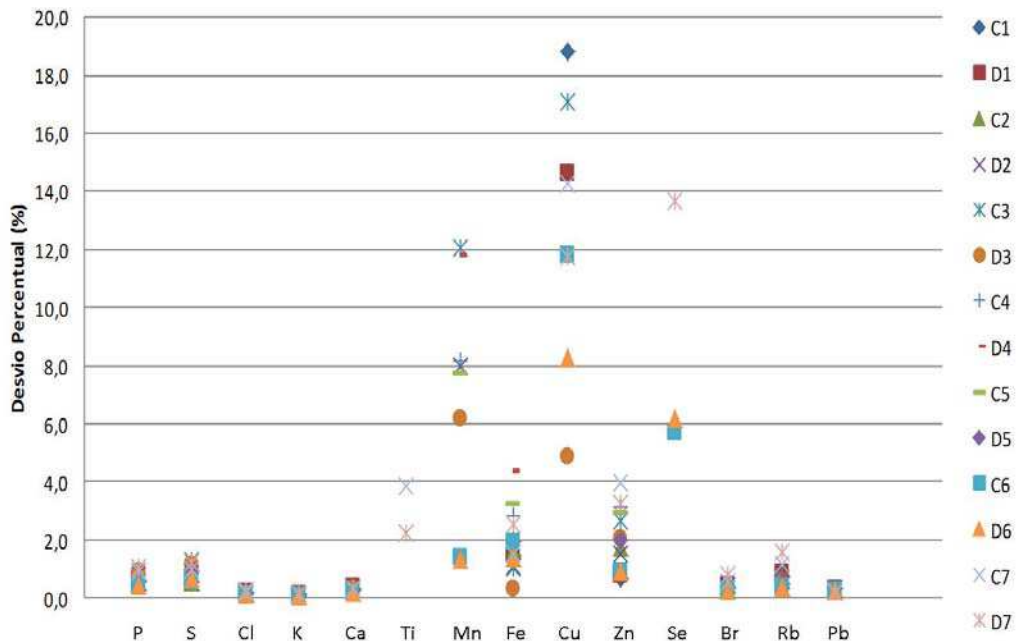
A Figura 42 e 43 ilustram os desvios estatístico percentuais referente as áreas líquidas versus os elementos encontrados nas amostras de saliva da parótida e das amostras de saliva do sulco, respectivamente, dos sete indivíduos em estudo. C significa medida no dia da coleta e D medida refeita após 30 dias da coleta. Nota-se que tem uma concentração dos desvios da figura 42 e 43 entre o intervalo de 0 % a 8 %, onde possui uma maior concentração entre o intervalo de 0 % a 4 %.

**Figura 42** – Desvio estatístico percentual da amostra de saliva da parótida para todos os sete indivíduos, onde C significa medida no dia da coleta e D medida refeita após 30 dias da coleta.



Fonte: da autora.

**Figura 43** – Desvio estatístico percentual da amostra de saliva do sulco para todos os sete indivíduos, onde C significa medida no dia da coleta e D medida refeita após 30 dias da coleta.



Fonte: da autora

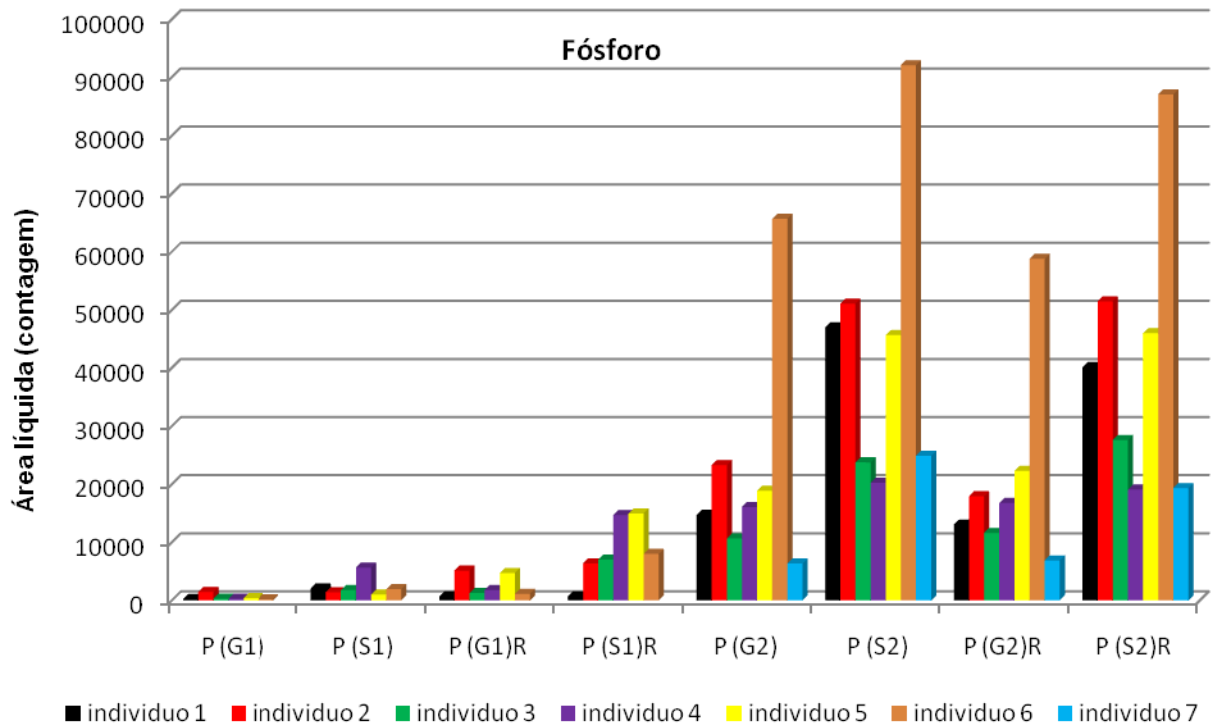
## 6.8 PRINCIPAIS ELEMENTOS ENVOLVIDOS NO PROCESSO BIOLÓGICO

Cada gráfico a seguir ilustra os elementos químicos encontrados nas amostras versus a área líquida de todos os indivíduos com suas respectivas funções. Os elementos escolhidos para obtenção dos gráficos foram os mais comuns em todas as amostras.

### 6.8.1 Fosforo (P)

O elemento químico fósforo é encontrado em todas as células, o que significa que todas as fontes alimentares (vegetais ou animais) são possíveis fontes de fósforo. De maneira geral, sua disponibilidade é maior nos produtos de origem animal do que nos de origem vegetal. Exemplos de alguns alimentos de origem animal são: carnes vermelhas e brancas, vísceras e produtos lácteos. (BOUR *et al.*, 1976) e (COZZOLINO, 2007). Também é encontrado na fabricação de cremes dentais. O fósforo tem como função, tamponar sistemas ácidos ou alcalinos, auxiliando na manutenção do pH e no armazenamento temporário de energia provinda do metabolismo de macronutrientes. (COZZOLINO, 2007). A figura 44 mostra o elemento P para todos os 7 indivíduos, sendo que (G1 e G2) é a amostra retirada na saída da glândula parótida e (S1 e S2) é a amostra retirada do sulco entre os dentes 46 e 47 e (G1R, G2R) e (S1R e S2R) são as medidas refeitas.

**Figura 44** – Gráfico do elemento químico fósforo (P) para todos os indivíduos, onde G1 é a medida da glândula parótida na primeira etapa e G2 na segunda etapa, e S1 é a medida do sulco na primeira etapa e S2 na segunda etapa. G1R, G2R, S1R e S2R são as medidas refeitas da glândula e do sulco.



Fonte: da autora

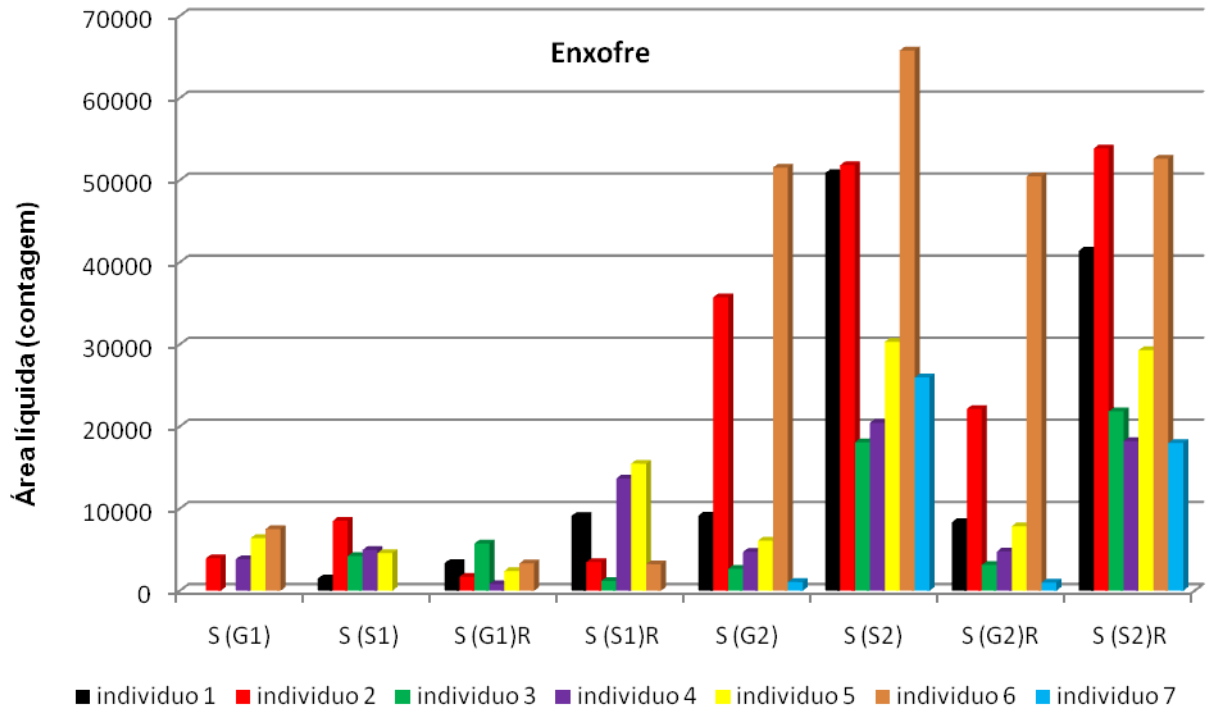
### 6.8.2 Enxofre (S)

O enxofre está presente em todas as células do nosso organismo, principalmente na pele, unhas e cabelos. É fundamental na molécula de insulina. Algumas das principais fontes de enxofre são: legumes, alho, cebola, gema de ovo cru, couve, repolho e quanto aos alimentos de origem animal são: carnes, leite e derivados, ovos, peixes etc...

Tem como função, auxiliar na formação de vitaminas, proteínas, coágulo sanguíneo, entre outros.

Pode-se notar que o enxofre não foi observado nas amostras dos indivíduos 1 e 3 no S(G1) e na amostra do indivíduo 6 em S(S1).

**Figura 45** – Gráfico do elemento químico enxofre (S) para todos os indivíduos, onde G1 é a medida da glândula parótida na primeira etapa e G2 na segunda etapa, e S1 é a medida do sulco na primeira etapa e S2 na segunda etapa. G1R, G2R, S1R e S2R são as medidas refeitas da glândula e do sulco.



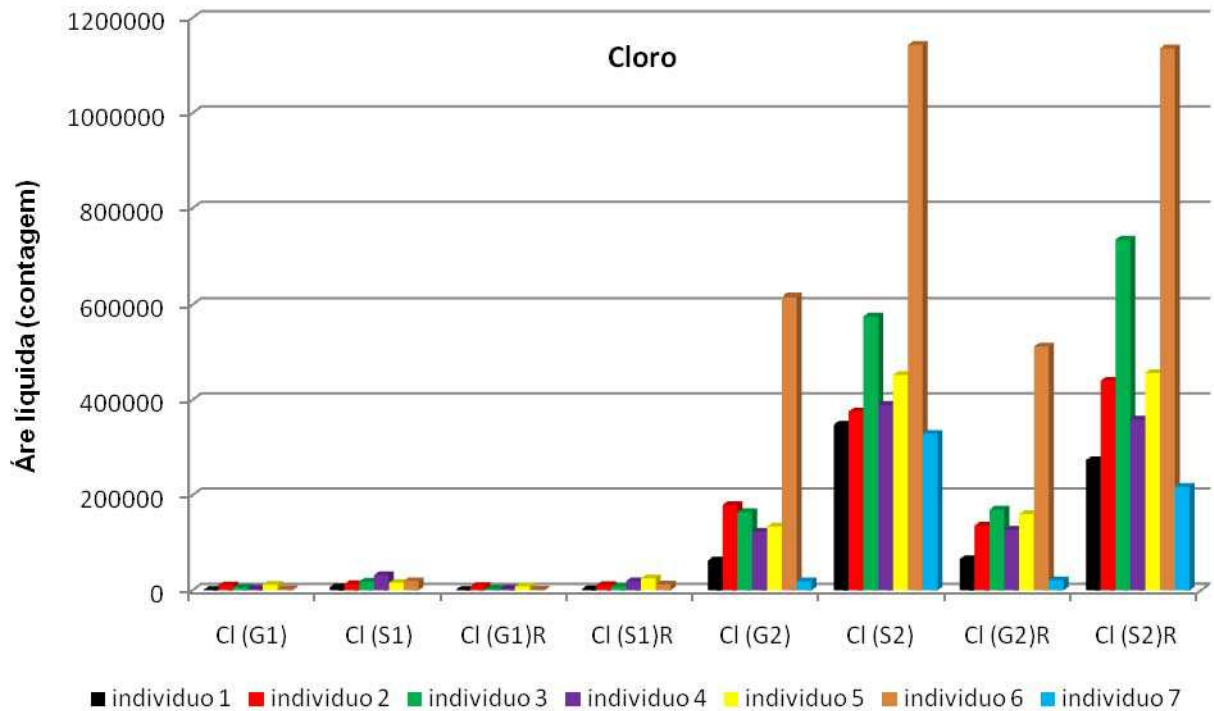
Fonte: da autora

### 6.8.3 Cloro (Cl)

O cloro é um dos elementos presentes no organismo com grande importância na formação dos sucos gástrico e pancreático, no equilíbrio ácido-básico do sangue e no funcionamento do fígado. Auxilia na digestão, pois ele forma o ácido clorídrico, que exerce a função de enzima digestiva. Pode ser encontrado no sal de cozinha, alimentos do mar, leite, carnes e ovos.

A Figura 46 mostra o gráfico do cloro para todos os indivíduos.

**Figura 46** – Gráfico do elemento químico cloro (Cl) para todos os indivíduos, onde G1 é a medida da glândula parótida na primeira etapa e G2 na segunda etapa, e S1 é a medida do sulco na primeira etapa e S2 na segunda etapa. G1R, G2R, S1R e S2R são as medidas refeitas da glândula e do sulco.

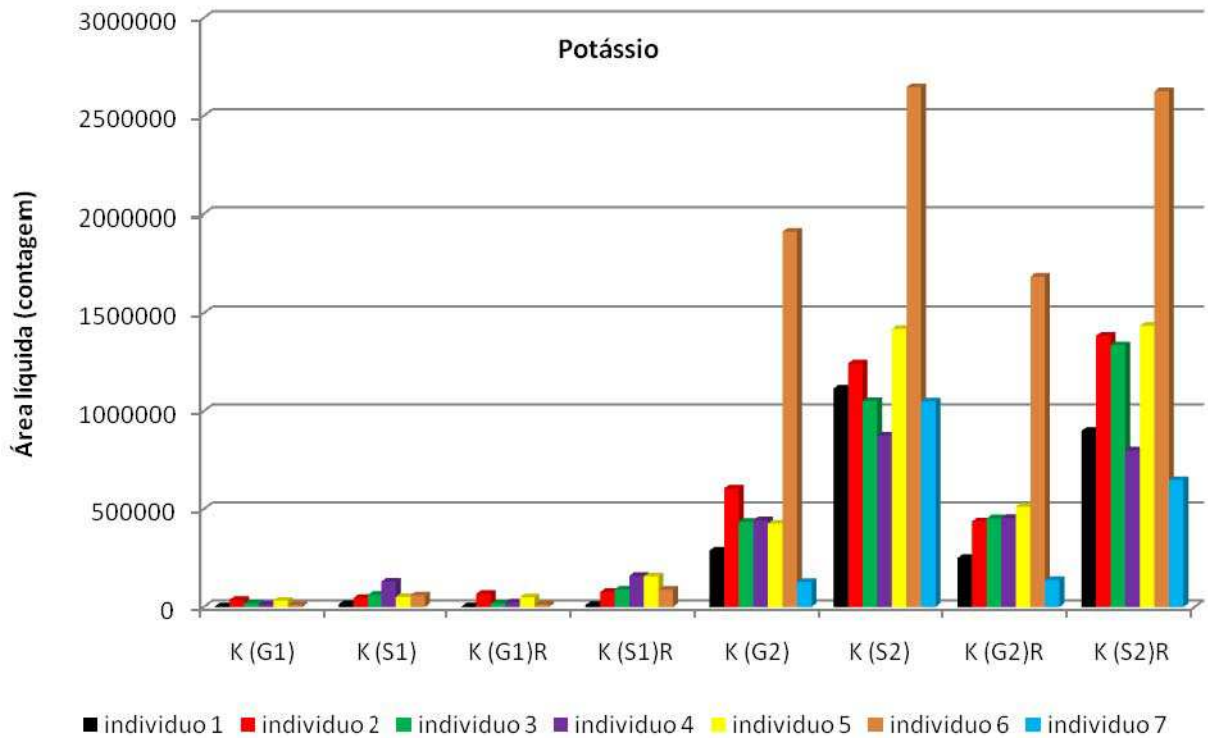


Fonte: da autora

#### 6.8.4 Potássio (K)

O potássio é encontrado em quase todos os tipos de alimentos. Encontra-se em maior concentração no interior celular, tem um papel importante no relaxamento muscular e na secreção de insulina através dos pâncreas. Podemos encontrar o potássio no bacalhau, frutos do mar, bananas, frutas cítricas, vegetais verdes escuros folhosos, vegetais crus ou cozidos entre outros. A figura 47 mostra o elemento potássio de todos os indivíduos.

**Figura 47** – Gráfico do elemento químico potássio (K) para todos os indivíduos, onde G1 é a medida da glândula parótida na primeira etapa e G2 na segunda etapa, e S1 é a medida do sulco na primeira etapa e S2 na segunda etapa. G1R, G2R, S1R e S2R são as medidas refeitas da glândula e do sulco.

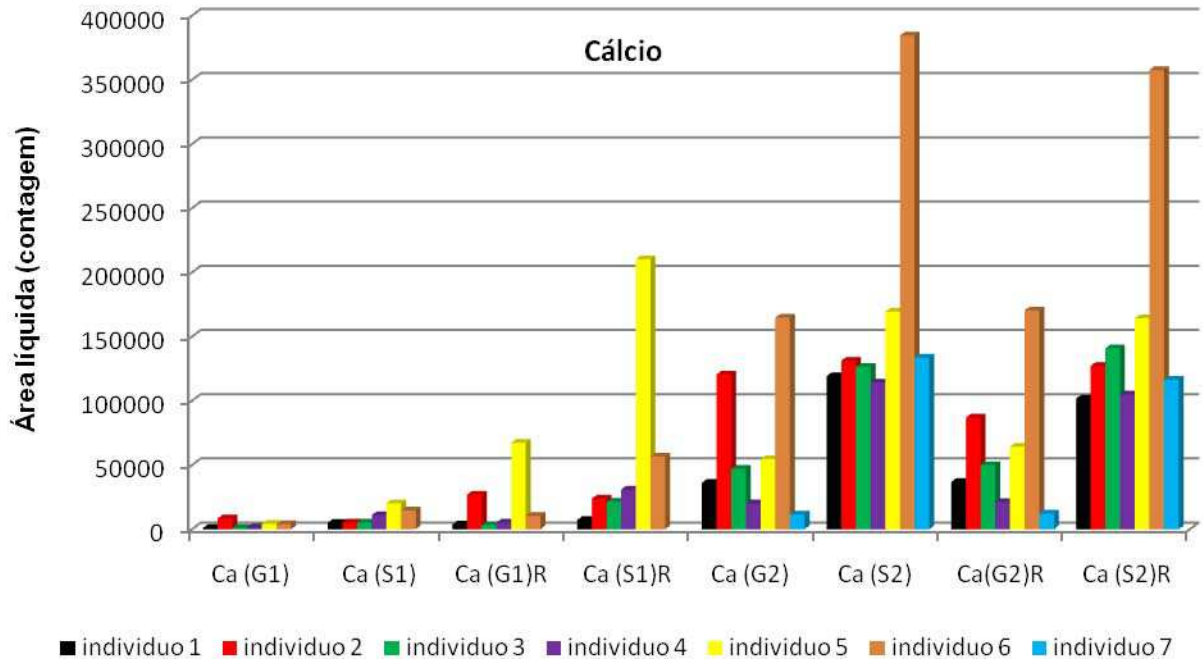


Fonte: da autora

### 6.8.5 Cálcio (Ca)

O elemento químico cálcio tem como função o fortalecimento de ossos e dentes, ajuda na coagulação do sangue e na atividade muscular. Pode ser encontrado em folhas verdes, leites e seus derivados, peixes, milhos, entre outros. A figura 48 mostra o Ca encontrado por todos os indivíduos nas duas etapas.

**Figura 48** – Gráfico do elemento químico cálcio (Ca) para todos os indivíduos, onde G1 é a medida da glândula parótida na primeira etapa e G2 na segunda etapa, e S1 é a medida do sulco na primeira etapa e S2 na segunda etapa. G1R, G2R, S1R e S2R são as medidas refeitas da glândula e do sulco.

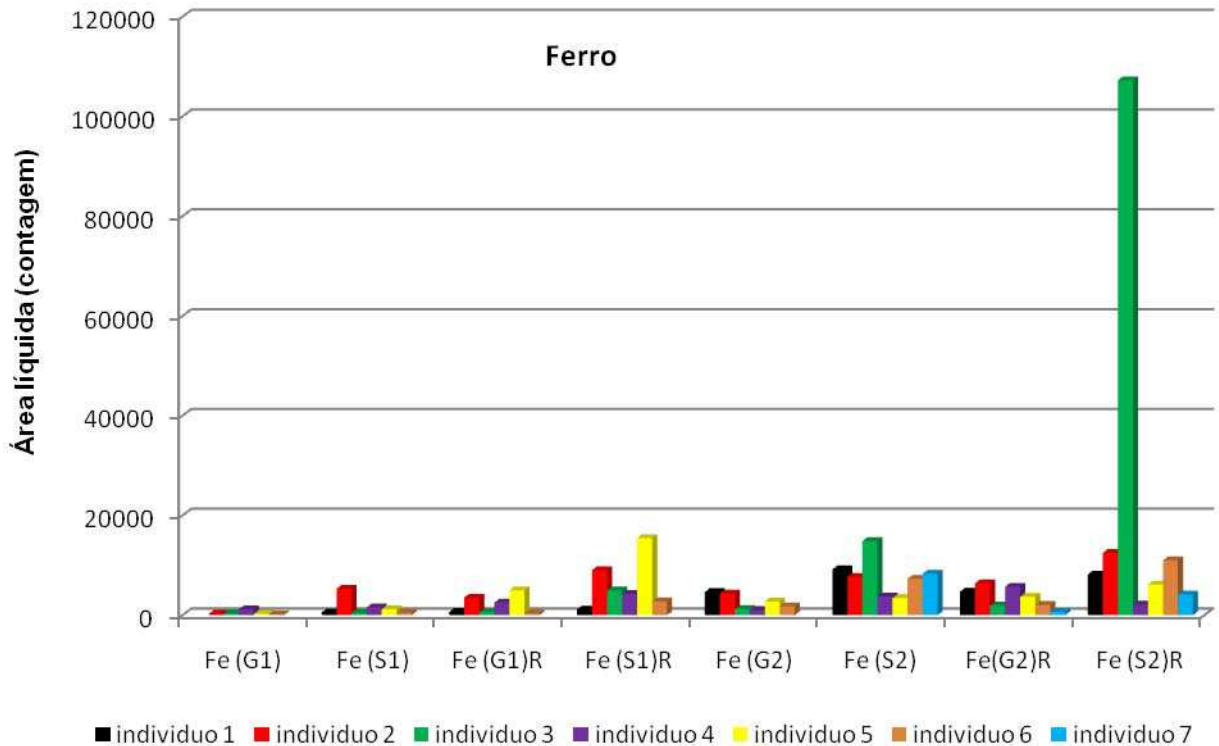


Fonte: da autora

#### 6.8.6 Ferro (Fe)

O elemento químico ferro é muito importante para o bom funcionamento do organismo. Sendo ele o componente da hemoglobina é responsável pelo transporte do oxigênio. Encontra-se nas ostras, feijão, carnes, gema de ovo, legumes e vegetais verdes. A figura 49 mostra o gráfico do Fe, onde nota-se que na primeira etapa, para a amostra do indivíduo 1, o Fe não foi observado na medida da glândula parótida (G1). Entretanto, na medida refeita (G1)R o Fe aparece, o que também ocorre na segunda etapa na medida da glândula parótida (G2) para o indivíduo 7. A ausência de Fe para o indivíduo 7 pode ser devido a sua gravidez.

**Figura 49** – Gráfico do elemento químico ferro (Fe) para todos os indivíduos, onde G1 é a medida da glândula parótida na primeira etapa e G2 na segunda etapa, e S1 é a medida do sulco na primeira etapa e S2 na segunda etapa. G1R, G2R, S1R e S2R são as medidas refeitas da glândula e do sulco.

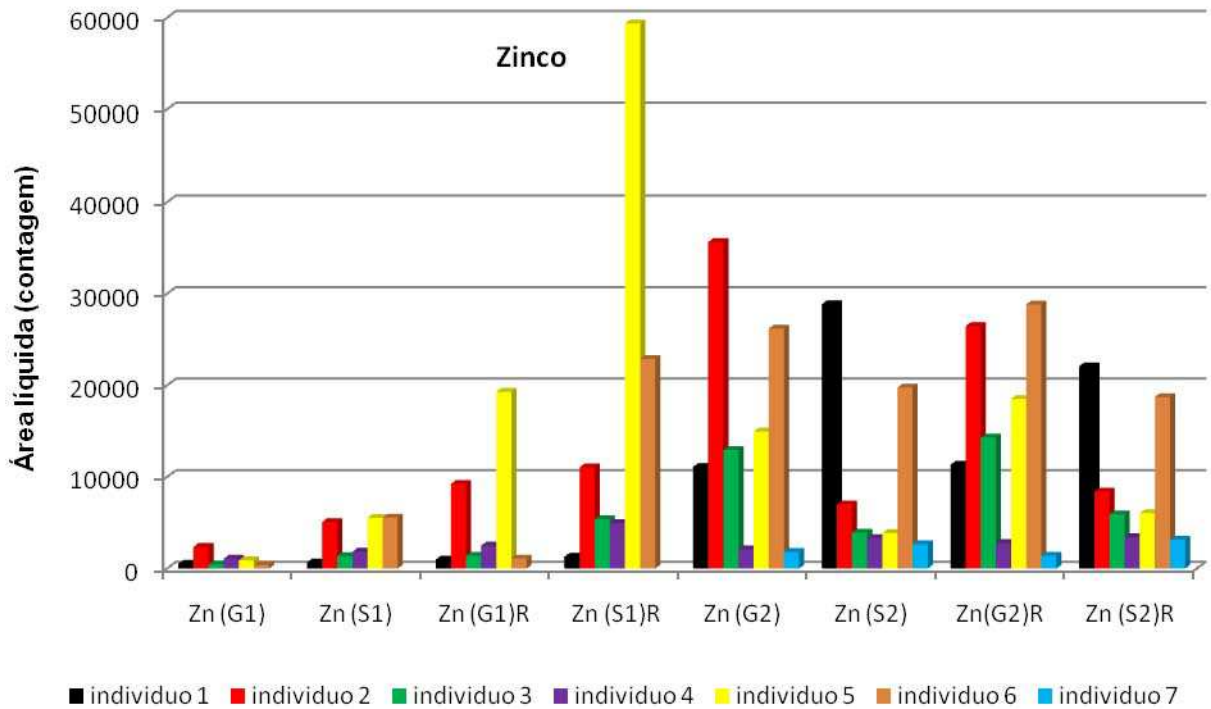


**Fonte:** da autora

### 6.8.7 Zinco (Zn)

Zinco é fundamental para a síntese de DNA e RNA (importante na gravidez). É importante na saúde da pele, cicatrização de feridas e no sistema imunológico. Algumas principais fontes são: carnes vermelhas, ovos, ostras, leguminosas (feijão, lentilhas,...). A figura 50 mostra o gráfico de Zn para as amostras de saliva e sulco dos indivíduos em estudo.

**Figura 50** – Gráfico do elemento químico zinco (Zn) para todos os indivíduos, onde G1 é a medida da glândula parótida na primeira etapa e G2 na segunda etapa, e S1 é a medida do sulco na primeira etapa e S2 na segunda etapa. G1R, G2R, S1R e S2R são as medidas refeitas da glândula e do sulco.



**Fonte:** da autora

## 6.9 HÁBITOS DOS INDIVÍDUOS EM ESTUDO

A Tabela 10 mostra um breve resumo dos hábitos alimentar e corriqueiros dos indivíduos em estudo.

**Tabela 12 – Hábitos dos indivíduos.**

Indivíduo	Gênero	Etnia	Idade	Hábitos
1	F	Branco	27	*Café da manhã: pão, café (sem leite), manteiga/margarina, iogurte; *almoço: arroz, feijão, verduras/legumes, carne, as vezes refrigerantes, *janta: geralmente igual ao almoço, mas pode variar entre pães, queijo, pizza ou lanches...*escova os dentes de 2 a 3 vezes ao dia, não usa enxaguante bucal, *ingeri 2 l de agua por dia... *usa fio dental 2 a 3 vezes por semana.. *creme dental geralmente <i>close up</i> , colgate ou oral-b, * tem gastrite.
2	M	Branco	23	*Almoço: arroz, feijão, verduras/legumes, carne, *não come muitos doces em geral, gosta bastante de frutas e verduras , como poucos “enlatados”... *escova os dentes 2 vezes ao dia...*usa enxaguante bucal raramente... *ingeri 3 l de agua ao dia... *não usa fio dental... *creme dental colgate.
3	F	Negro	25	*Café da manhã: shake (herbalife); *almoço: chá verde + shake (herbalife); *jantar: arroz, saladas diversas e carne vermelha ou frango ou peixe, *escova os dentes 3 vezes ao dia, *usa enxaguante bucal as vezes, *ingeri 2,5 l de água ao dia, *usa fio dental todas às vezes que escova os dentes. *creme dental: colgate ou sorriso.
4	M	Negro	24	*Café da manhã: pão, presunto, queijo, café, *almoço: arroz, feijão, carne, massa, frutas... *escova os dentes 3 vezes ao dia...*não usa enxaguante bucal e *ingeri 1 a 2 l de agua ao dia... *usa fio dental após o almoço... *usa colgate e *tem refluxo.
5	M	Branco	29	*arroz, feijão, verduras/legumes, carne, refrigerante, as vezes pizza e lanche, massas, (muito) café. *escova os dentes 3 vezes ao dia, *não usa enxaguante bucal, *ingeri 1,5 – 2 l de agua ao dia, *usa de fio dental duas vezes ao dia, *creme dental: sensodine, *faz o uso de medicamento: ritalina, *tem gastrite
6	M	Branco	26	*Café da manhã: café com pão, *almoço: shake herbalife, *lanche intermediário a tarde, *refeição leve a noite, *escova os dentes: 3, 4 vezes ao dia, *usa enxaguante bucal: periodicamente, *ingeri 2, 3 litros de agua ao dia, *usa fio dental periodicamente, ao menos uma vez ao dia, *creme dental colgate total 12.
7	F	Branco	29	* 4 refeições diárias, restrição a peixes e frutos-do-mar, * escova os dentes quatro vezes por dia, *não usa enxaguante bucal, *ingeri 2 a 2,5l por dia, *usa fio dental duas vezes ao dia, *creme dental: sorriso e colgate, *medicamento usado: Sulfato ferroso.

**Fonte:** da autora.

Averiguando possíveis diferenças entre os hábitos dos indivíduos com os resultados obtidos, não foi possível obter uma correlação entre os elementos observados tanto com os hábitos alimentares ou etnia quanto com a idade ou gêneros dos indivíduos. Essa falta de correlação pode ser devido ao fato do pequeno grupo de indivíduos amostrados, e, portanto, um número maior de indivíduos deveria ser amostrado para verificar tal correlação. Como o objetivo inicial do trabalho não era observar tal correlação não houve tempo hábil para estudar mais indivíduos.

## 7 CONCLUSÃO

Pode-se concluir que a técnica TXRF é um método muito promissor para analisar elementos em amostras de saliva, que a metodologia de coleta, preparo e análise mostrou-se adequada para o objetivo proposto neste trabalho, e que pode ser utilizado como protocolo de coleta de saliva para análise por TXRF. O interesse de se estudar a saliva através dessa técnica é de poder encontrar algum tipo de correlação entre os elementos químicos determinados na saliva e no sulco gengival com algum distúrbio físico ou biológico, ou mesmo de deficiência de minerais no organismo e até uma contaminação com algum metal nocivo ao organismo. A TXRF é uma técnica de alta sensibilidade que permite a determinação multielementar em uma única medida utilizando uma pequena quantidade de material.

As análises qualitativas mostraram ser de grande importância neste tipo de estudo, pois revela com rapidez em uma análise preliminar a presença ou ausência de elementos chaves na caracterização química elementar das amostras. Os elementos químicos observados nas amostras dos indivíduos em estudo foram P, S, Cl, K, Ca, Ti, Mn, Fe, Ni, Cu, Zn, Br, Rb e Pb. Nem todos esses elementos foram observados em todas as amostras. Os elementos Ti, Cu, V, Ni, Se, Pb e Mn são detectados mais nas amostras retiradas no sulco do que nas amostras retiradas na parótida.

Todos os elementos encontrados possuem uma quantidade maior no sulco do que na saliva. Os elementos K e o Cl são os que possuem maiores valores.

Para a primeira etapa, houve muita variação em relação aos elementos observados nas amostras guardadas no papel com as amostras guardadas no suporte de amostra confeccionado. Supõe-se que as amostras guardadas no papel não podem ser guardadas dessa forma, ocasionando assim um armazenamento de forma irregular.

Entretanto, mais dados são necessários para estabelecer uma melhor correlação entre os elementos encontrados. Comparando os resultados qualitativos obtidos para as amostras de saliva e sulco, observa-se que a concentração do elemento no sulco é superior a concentração na saliva, e que, em algumas amostras é possível identificar alguns elementos não encontrados nas amostras de saliva coletadas na parótida.

## REFERÊNCIAS

- ABRAHAM, J. A. et al. Influence of smoking on the Elemental Composition of Oral Fluids: a TXRF approach. **X-Ray Spectrometry**, v. 39, p. 372-375, 2010.
- BANCO DE APOSTILAS. 2006. Disponível em <<http://www.ifsc.usp.br/~lavfis/BancoApostilasImagens/ApRaios-X/apraios-x.pdf>>. Acesso em 01 de julho de 2013.
- BAUR K. et al. Recent advances and perspectives in synchrotron radiation TXRF. Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section A: Accelerators, Spectrometers, Detectors and Associated Equipment. v. 467- 468, p. 1198-1201. 2001.
- BELLISOLA, G. et al. The Use of Total Reflection X-Ray Fluorescence to Track the Metabolism and Excretion of Selenium in Humans. **Spectrochimica Acta Part B**, v. 54, p. 1481–1485, 1999.
- BLOCKER SAFE. 2010. Disponível em: <<http://useblocker.blogspot.com.br>>. Acesso em: 10 de out. de 2012.
- BLOG DA MARCY. 2010. Disponível em: <<http://marcileneleao.blogspot.com.br/2013/01/extracao-do-dente-siso.html>>. Acesso em: 02 de abril de 2013.
- CESAREO, R. X-Ray Physics: Interaction With Matter, Production, Detection, **Rivista del Nuovo Cimento**, Vol. 23, No 7, 2000.
- CURIE, L. A.; Limits for Quantitative Detection and Quantitative Determination. **Analytical Chemistry**, v.40, p.586-593, 1968.
- Da SILVA, A. T. C.; MARRA, M. C.; RICHTER, E. M. Análise de Metais Pesados em Saliva usando Microcélulas Eletroquímicas. **IX Encontro Interno & XIII Seminário de Iniciação Científica**, p. 1–10, 2010.
- DAWES, C. Considerations in the Development of Diagnostic Tests on Saliva. **Ann N Y Acad Sci**, v. 20, n. 694, p. 265–269, 1993.
- EDGAR, W. M. **Saliva**: its secretion, composition and functions. Brit Dent J, London, v. 172, n. 8, p. 305-312, Apr. 1992.
- EISBERG, R.; RESNICK, R. **Física Quântica: Átomos, Moléculas, Sólidos, Núcleos e Partículas**. 18ª Tiragem, Editora Campus, 1979, 67 e 428 p.
- GmbH, B. N. **Manual: TXRF Spectrometer for Element Analysis**. S2 PICOFOX, p. 25, 46, 76 2011.
- GRIESEL, S. et al. Mineral Elements and Essential Trace Elements in Blood of Seals of the North Sea Measured by Total Reflection X-ray Fluorescence Analysis. **Spectrochimica Acta Part B**, v. 61, p. 1158–1165, 2006.

- GRIEKEN, R. V.; MARKOWICZ, A. **Handbook of X Ray Spectrometry**. New York: M. Dekker. 2<sup>nd</sup> Edition. 2002
- LACHANCE, G. R.; CLAISSE, F. **Quantitative X- Ray Fluorescence Analysis: Theory and Application**. 1<sup>nd</sup> Edition. John Wiley & Sons, Inc., 1995, 492 p.
- JOHNS, H. E.; CUNNINGHAM, J. H. **The Physics of Radiology**. 4<sup>nd</sup>. Edition. Editora Charles C Thomas. 1983
- JENKINS, G. N. Saliva. **The physiologic and biochemistry of the mouth**. 4<sup>nd</sup>. Edition. Oxford: Blacwell Scientific Publications, 1978. p. 284-395.
- KAUFMAN, E.; LAMSTER, I. B. Analysis of Saliva for Periodontal Diagnosis – a review. **J Clin Periodontol**, v. 27, n. 7, p. 453-465, 2000.
- KUBALA-K, A. BRAZIEWICZ, J., PAJEK, M. Total Reflection X-Ray Fluorescence Studies of Trace Elements in Biomedical Samples. **Spectrochimica Acta Part B**, v. 59, n. 8, p. 1283-1289, 2004.
- KLOCKEMKÄMPER, R.; BOHLEN, A. Elemental Analysis of Enviromental Samples by Total Reflection Fluorescent. **X-Ray Spectrometry**, v. 25, p. 156-162, 1996.
- KRAVETZ, R. E. X-Ray Tube. **Elsevier Science**, v. 96, n. 4, p. 53–57, 2001.
- KNOLL, G. F. **Radiation Detection and Measurements**. 3<sup>nd</sup>. Edition. Nova York: John Wiley & Sons, 1999.
- LIMA, F. O. de. et al. Hipotireoidismo Altera Secreção e Composição Salivar em Ratos Sépticos. **Odonto Ciência**, v. 23, n. 1, p. 53–57, 2008.
- MANDEL, I. D. The Diagnostic Uses of Saliva. **J Oral Pathol Med**, v. 19, n. 3, p. 119-125, 1990.
- MENEGÁRIO, A. A. et al. On-line Preconcentration Flow System for Multi-Elemental Analysis by Total Reflection X-Ray Fluorescence Spectrometry. **Spectrochimica Acta Part B**, v. 58, p. 543-549, 2003.
- MÖLLER, P. et al. **Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology**, v. 97, n. 02, p. 173–189, 2004.
- NASCIMENTO FILHO V. F.; **Técnicas Analíticas Nucleares de Fluorescência de Raios X por Dispersão de Energia (ED-XRF) e por Reflexão Total (TXRF)**, CENA, Junho, 1999.
- PRANGE, A.; SCHWENKE, H. Sample Treatment for TXRF: Requirements and Prospects. **Adv. X-Ray Anal.**, v. 32, p. 211, 1989.
- PARREIRA, P. S.; **Metodologia de ED-XRF e Aplicações com um Sistema Portátil, Laboratório de Física Nuclear Aplicada** – Publicação técnica, 2007. Universidade Estadual de Londrina, Londrina – PR.

RIEDER, R. et al. Multifunctional Vacuum Chamber for Total Reflection X-Ray Fluorescence Analysis in Various Excitation and Detection Geometries for Detection Limits in the Femtogram Range. **Nuclear Instruments and Methods in Physics Research**, v. 327, n. 2-3, p. 594–599, 1993.

SANCHEZ, H. J. Total Reflection X-Ray Fluorescence Analysis Using Plate Beam-Guides. **Nuclear Instruments and Methods in Physics Research B**, v.194, p. 90–95, 2002.

SANCHEZ, H. J et al. Total Reflection X-Ray Fluorescence Analysis of Oral Fluids of Women Affected by Osteoporosis and Osteopenia. **Spectrochimica Acta Part B**, v. 63, n. 12, p. 1485–1488, 2008.

SCHUSTER, G. S. **Microbiologia Oral e Doenças Infecciosas**. 4<sup>nd</sup>. Edition. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1978. p.242

TARSOLY, G.; ÓVÁRI, M.; ZÁRAY, G. Determination of Fluorine by Total Reflection X-Ray Fluorescence Spectrometry. **Spectrochimica Acta Part B**, v.65, p. 287–290, 2010.

XIAO, H.; WONG, D. T. W., Method Development for Proteome Stabilization in Human Saliva. **Analytica Chimica Acta**, v. 722, p. 63–69, 2012.

ZAMBONI, C.B. et al. Investigation Of Saliva Of Patients With Periodontal Disease Using NAA. **XXXV Brazilian Workshop on Nuclear Physics**, p. 70-72, 2013.

**ANEXOS**

## ANEXO A

### Áreas Líquidas Etapa 1

A tabela 11 mostra as áreas líquidas (contagem) dos elementos observados nas amostras de saliva retiradas na glândula parótida e das amostras de saliva retirado no sulco entre os dentes 46 e 47 da primeira etapa.

**Tabela 13 –** Áreas líquidas (contagem) dos elementos observados na saliva retirado na parótida e do sulco referente a medida da coleta (M.C) e a medida refeita (M.R), elementos com identificação 1 é (M.C) e elementos com identificação 2 é (M.R).

Elementos	Indivíduo 1		Indivíduo2		Indivíduo 3		Indivíduo 4		Indivíduo 5		Indivíduo 6	
	saliva	sulco	saliva	sulco	saliva	sulco	saliva	sulco	saliva	sulco	saliva	sulco
P1	-	424	1816	1757	636	2122	627	5993	737	1353	545	2278
P2	-	1026	5461	6706	1616	7359	2130	15027	4712	15319	1486	8347
S1	-	-	1332	-	495	1301	1247	8183	1388	1743	419	1859
S2	1176	-	3585	6690	-	4397	-	16876	5619	18685	1263	6442
Cl1	940	6537	10791	13414	5929	18624	3240	32007	11902	15876	2147	19505
Cl2	-	-	8939	10931	3309	8239	3645	19500	8148	25344	1482	-
K1	2474	13893	36069	45245	17835	62009	12280	129296	31488	50985	8638	59273
K2	2527	9067	66523	75871	17216	88805	22221	158694	48715	155629	12701	87915
Ca1	1050	4965	8472	5236	1007	5094	1396	10995	4089	20207	3905	14573
Ca2	3666	7136	26945	23798	3301	21390	5214	30868	67340	210075	10426	56647
V1	-	-	-	1441	-	-	-	-	-	-	-	-
Fe1	-	-	-	5293	-	-	1194	1539	-	1205	-	-
Fe2	-	-	3521	9010	-	4956	2536	-	4988	15450	-	-
Zn1	-	-	2367	5089	-	1372	-	-	904	5546	-	-
Zn2	-	-	9240	11057	-	5392	-	-	19301	59387	-	-
Se1	-	-	-	8997	-	-	-	-	-	-	-	-
Se2	-	-	-	10679	-	-	-	-	-	-	-	-
Br1	-	-	2685	-	-	3128	-	5705	1745	2599	-	-
Rb1	-	-	3313	-	1969	-	-	-	-	-	-	-
Pb1	-	-	-	37239	-	-	-	-	-	-	-	-
Pb2	-	-	77187	95777	-	-	79775	87543	-	289759	-	-

A tabela 12 resulta nos valores obtidos dos desvios padrão para os elementos observados nas amostras de saliva coletada na glândula parótida e do sulco gengival da primeira etapa.

