



UNIVERSIDADE  
ESTADUAL DE LONDRINA

---

MARCELO ESTEVAM

**AVALIAÇÃO *IN VIVO* DE Fe NA PELE HUMANA E DE  
CAMUNDONGOS SWINS ATRAVÉS DA TÉCNICA DE  
FLUORESCÊNCIA DE RAIOS X**

---

Londrina  
2005

MARCELO ESTEVAM

**AVALIAÇÃO *IN VIVO* DE Fe NA PELE HUMANA E DE  
CAMUNDONGOS SWINS ATRAVÉS DA TÉCNICA DE  
FLUORESCÊNCIA DE RAIOS X**

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

Orientador: Prof. Dr. Carlos Roberto Appoloni

Londrina  
2005

MARCELO ESTEVAM

**AVALIAÇÃO *IN VIVO* DE Fe NA PELE HUMANA E DE  
CAMUNDONGOS SWINS ATRAVÉS DA TÉCNICA DE  
FLUORESCÊNCIA DE RAIOS X**

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

**BANCA EXAMINADORA**

---

Prof<sup>o</sup> Dr. Carlos Roberto Appoloni  
UEL – Londrina – PR

---

Prof<sup>o</sup> Dr. Paulo Sérgio Parreira  
UEL – Londrina – PR

---

Prof<sup>a</sup> Dra. Orgheda L.A.D. Zucchi  
USP – São Paulo

Londrina, \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_.

**DEDICATÓRIA**

A Deus e à minha família.

## AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar a todos que confiaram em mim e em minha pesquisa submetendo-se às medidas de XRF *in vivo*.

Ao Professor Carlos Roberto Appoloni pela paciência, confiança, amizade e ensinamentos.

Ao Professor Phileo Pinge-Filho pela confiança e amizade.

Ao Professor Fábio Luis Melquiades pela ajuda nas horas de dificuldades e companhia nas novas pesquisas.

Ao Professor Paulo Sérgio Parreira pela amizade e ensinamentos.

A Celso L. Borges e Aparecida Malvezi pela ajuda nas medidas *in vivo* no Laboratório de Imunologia e pelos dados de pesquisa.

Ao corpo docente da Especialização em Biologia Aplicada à Saúde que compreenderam minha estada pela Biologia.

A Dra. Cristina Faune do Hemocentro do Hospital Universitário da UEL pelo apoio.

Ao meu grande amigo e Físico Marco Aurélio Toledo da Silva pela amizade e pelo apoio financeiro.

A todos os amigos e companheiros do Laboratório de Física Nuclear da UEL

A todos meus amigos e colegas de trabalho do Departamento de Física e Biologia da UEL.

Finalmente aos meus grandes amigos da Republica “BleckAut” Netto, Fernando e Thalita.

ESTEVAM, Marcelo. **Avaliação *in vivo* de Fe na pele humana e de camundongos swins através da técnica de fluorescência de raios x.** 2005.96 p. Dissertação (Mestrado em Física) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2005.

## RESUMO

Recentes melhoramentos tecnológicos permitem que um método de XRF *in vivo* forneça sensibilidade para diagnósticos ou monitorando em aplicações biomédicas. Em casos de desordens sanguíneas hereditárias como a  $\beta$ -Thalassaemia ou uma desordem genética como a Haemochromatosis, há uma alta concentração de elementos como Fe, Zn e Cu na pele e órgãos internos, devido ao tratamento dessas anormalidades ou devido à própria deficiência orgânica causada pela doença. Os níveis de Fe relacionados com os pacientes portadores da  $\beta$ -Thalassaemia são determinados, no momento, medindo-se uma proteína da corrente sanguínea, chamada ferritina. O monitoramento da proteína é ineficaz em várias situações, como quando o paciente sofre qualquer alteração no seu quadro clínico. Atualmente, as principais formas de medir os níveis desses metais é através da biópsia do fígado, que é invasiva e potencialmente perigosa, apresentando uma taxa de mortalidade de 0,1 %, e por suscetibilidade magnética que emprega um supercondutor quântico, esta é altamente cara e há apenas três principais centros médicos no mundo que dispõe desse equipamento. Este trabalho investiga o uso de um detector SiPin-diodo e uma fonte de  $^{238}\text{Pu}$  (13 e 17 keV; 13 %; 95,2 mCi; 86 anos) para a medida de níveis de Fe na pele compatível com os níveis associados à doença  $\beta$ -Thalassaemia. Foram analisados espectros de XRF usando um grupo de programas do AXIL - WinQXAS elaborados e disseminados pela IAEA. O coeficiente de determinação do modelo de calibração (curva de sensibilidade) foi de 0,97. Medidas em simulados de pele que contém concentrações de Fe de 15 a 150 partes por milhões (ppm), indicam que se pode medir Fe em níveis da ordem de 13 ppm, usando-se períodos de medida de 50 segundos e dose na superfície da pele de menos de 10 mSv. A literatura informa níveis de Fe na pele de 15,0 a 60,0 ppm em pessoas normais e de 70 a 150 ppm em pacientes portadores da  $\beta$ -Thalassaemia. Não há registro na literatura sobre níveis de Fe na pele de portadores de *Trypanosoma cruzi*. Assim, a metodologia empregada permite a medida *in vivo*, na pele, da concentração de Fe nos níveis desejados.

**Palavras-chaves:** XRF. *In vivo*. Pele. Fe.

ESTEVAM, Marcelo. ***In vivo* evaluation of Fe in the skin human and skin mice swiss through the technique of x rays fluorecence.** 2005. 96 p. Dissertation (Master in Physics) – Universidad Estadual de Londrina, Londrina, 2005.

### ABSTRACT

Recent technological improvements allow the method of *in vivo* XRF to supply useful sensibility for diagnostics or monitoring in biomedical applications. In cases of hereditary sanguine disorders as the  $\beta$ -Thalassaemia or a genetic disorder like Haemochromatosis, there is a high concentration of elements as Fe, Zn and Cu in the skin and internal organs, due to the treatment of those abnormalities or due to the own dysfunction caused by the disease. The levels of Fe related to the patient bearers of the  $\beta$ -Thalassaemia are determined, at the moment, measuring a protein in the sanguine current, called ferritin. The monitoring of the protein is ineffective in several situations, such as when the patient suffers any disturbance of health. Nowadays, the main forms of measuring the levels of those metals through hepatic storage are the biopsy of the liver, that is invasive and potentially dangerous, presenting a rate of mortality of 0,1%, and through magnetic susceptibilities that employs a quantum superconductor, which is highly expensive and there are only three main world medical centers with this equipment. This work investigates the use of a Si PIN-diode detector and a  $^{238}\text{Pu}$  source (13 and 17keV; 13%; 95.2mCi; 86y) for the measurement of Fe skin levels compatible with those associated to the disease  $\beta$ -Thalassaemia. XRF spectra were analyzed using a set of AXIL-WinQXAS programs elaborated and disseminated by the IAEA. The determination coefficient of the calibration model (sensitivity curve) was 0.97. Measurements on skin phantoms containing concentrations of Fe in the range from 15 to 150 parts per million (ppm), indicate that we are able to detect Fe at levels of the order of 13 ppm, using monitoring periods of 50 seconds and skin entrance dose less than 10 mSv. The literature reports skin Fe levels from 15.0 to 60.0 ppm in normal persons and from 70 to 150 ppm in thalassaemics patients. So, the employed methodology allows the *in vivo* measurement of the skin Fe concentration in wanted levels.

**Key-words:** XRF. *In vivo*. Skin. Fe.

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> – Notação Espectroscópica para o número quântico $l$ .....	35
<b>Tabela 2</b> – Notação Espectroscópica para o número quântico $n$ .....	36
<b>Tabela 3</b> – Comparação entre as curvas de sensibilidade para os dois grupos de simulados com tempo de medida de 50 s .....	55
<b>Tabela 4</b> – Comparação da sensibilidade e precisão dos softwares PMCA e WinQxas.....	58
<b>Tabela 5</b> – Concentração dos simulados teste (confeccionada e medida) e diferença percentual .....	59
<b>Tabela 6</b> – Concentrações confeccionadas ( $C_c$ ) e medidas ( $C_m$ ) e diferença percentual para medidas de 50 s.....	60
<b>Tabela 7</b> – Hematologia dos camundongos infectados.....	75

## LISTA DE FIGURA

<b>Figura 1</b> – (a) glóbulos vermelhos que apresentam deformação devido a $\beta$ -Thalassaemia comparados com glóbulos vermelhos normais e (b) vista em profundidade dos glóbulos afetados .....	15
<b>Figura 2</b> – Portador de $\beta$ -Thalassaemia sem tratamento adequado .....	16
<b>Figura 3</b> – Ciclo biológico do <i>Trypanosoma cruzi</i> .....	17
<b>Figura 4</b> – Foto clássica do Sinal de Romaña.....	18
<b>Figura 5</b> – Tipos de espalhamento envolvidos quando uma radiação monoenergética incide sobre a amostra .....	20
<b>Figura 6</b> – Energia dos raios X em função do número atômico .....	22
<b>Figura 7</b> – Representação esquemática da fluorescência de raios X com dispersão por comprimento de onda.....	23
<b>Figura 8</b> – Representação esquemática da fluorescência de raios X com dispersão de energia. ....	24
<b>Figura 9</b> – Transições eletrônicas, produção de raios-X, Gama e luz .....	30
<b>Figura 10</b> – Dependência da energia para vários raios gama nos processos de interação do iodeto de sódio.....	32
<b>Figura 11</b> – Esquema da situação inicial (esquerda) e final (direita) do espalhamento Compton.....	33
<b>Figura 12</b> – Diagrama parcial dos níveis de energia que conduzem à emissão das linhas espectrais das séries K e L de um elemento. ....	36
<b>Figura 13</b> – Taxa de absorção de energia por unidade de massa na parede (taxa de dose, $\dot{D}$ ) é igual ao produto da intensidade incidente e coeficiente de absorção de energia por unidade de massa. ....	38
<b>Figura 14</b> – Gráfico do coeficiente de absorção de energia por unidade de massa versus energia do fóton.....	39
<b>Figura 15</b> – Geometria anelar da fonte de Pu. ....	41
<b>Figura 16</b> – Obtenção dos ângulos de $\alpha$ e $\theta$ geometricamente. Obtendo $\beta$ e $\omega$ geometricamente .....	42
<b>Figura 17</b> – Obtenção de $\beta$ e $\omega$ geometricamente.....	42

<b>Figura 18</b> – Gráfico da dose versus tempo de exposição obtido através da equação 20.....	43
<b>Figura 19</b> – Camadas da pele, epiderme, derme e subcutânea. ....	46
<b>Figura 20</b> – O detector XR-100CR, da AMPTEK inc e o suporte acrílico para acoplamento da fonte e amostra.....	46
<b>Figura 21</b> – Vista geral de todo o sistema de aquisição de dados.....	47
<b>Figura 22</b> – Tela do software PMCA para Windows .....	49
<b>Figura 23</b> – Tela do software WinQxas versão 1.23. ....	50
<b>Figura 24</b> – Janela com parâmetros da análise realizada pelo software WinQxas versão 1.23. ....	51
<b>Figura 25</b> – Espectro do simulado de 150 ppm, análise da área do simulado no software PMCA.....	52
<b>Figura 26</b> – Espectros da água pura, análise da área da água pura no software PMCA.....	52
<b>Figura 27</b> – Sobreposição dos espectros e subtração (em azul) dos espectros de água pura e simulado de 150 ppm, análise do espectro líquido no software PMCA. Observação: durante a operação com espectros o eixo horizontal fica com valores de canal .....	52
<b>Figura 28</b> – Espectro de calibração de Cu no software PMCA, a janela no canto superior direito é a curva de calibração do software.....	53
<b>Figura 29</b> – software WINQXAS – definindo a energia de calibração.....	54
<b>Figura 30</b> – Espectro obtido através do software PMCA, para a amostra "branca" com um tempo de medida (de baixo para cima) de 400 s, 1000 s e 1600 segundos.....	56
<b>Figura 31</b> – Espectros obtidos através do software PMCA, de cima para baixo os simulados de 150 ppm, 70 ppm de Fe e branco com um tempo de medida de 400 segundos. A linha destacada no eixo vertical mostra o pico do Fe (6,4 keV).....	57
<b>Figura 32</b> – Espectro obtido através do software WinQxas, para o simulados de 150 ppm de Fe com um tempo de medida de 50 segundos, em destaque os picos $K\alpha$ (esquerda) e $K\beta$ (direita) do Fe .....	57
<b>Figura 33</b> – Curva de sensibilidade para medidas de 50 s.....	60
<b>Figura 34</b> – Medida de XRF <i>in vivo</i> na pele da mão .....	61

<b>Figura 35</b> – Variação dos níveis ferro na pele humana sadios e de portadores de $\beta$ -Thalassaemia medidos por XRF <i>in vivo</i> .....	62
<b>Figura 36</b> – Coleta de 0,5 a 1 mL de sangue contaminado com <i>Trypanosoma cruzi</i> .....	68
<b>Figura 37</b> – Procedimento de diluição do sangue contaminado .....	68
<b>Figura 38</b> – Inoculação dos protozoários em camundongos sadios.....	69
<b>Figura 39</b> – Camundongo sendo anestesiado com pentabarbital.....	70
<b>Figura 40</b> – Fixação dos camundongos com fita adesiva .....	71
<b>Figura 41</b> – Medida <i>in vivo</i> de um camundongo. ....	71
<b>Figura 42</b> – Medida <i>in vivo</i> de um camundongo, vista lateral.....	72
<b>Figura 43</b> – Curva de parasitemia da infecção de camundongos Swiss. ....	73
<b>Figura 44</b> – Taxa de mortalidade dos camundongos Swiss infectados .....	73
<b>Figura 45</b> – Concentração de Fe na pele dos camundongos Swiss em função dos dias após a infecção.....	74

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	13
1.1 $\beta$ THALASSAEMIA E HAEMOCHROMATOSIS .....	13
1.2 DOENÇA DE CHAGAS .....	16
1.3 FLUORESCÊNCIA DE RAIOS X .....	19
<b>2 OBJETIVOS</b> .....	25
<b>3 REVISÃO DA LITERATURA</b> .....	26
<b>4 INTERAÇÃO DA RADIAÇÃO COM A MATÉRIA</b> .....	29
4.1 ABSORÇÃO FOTOELÉTRICA .....	29
4.2 ESPALHAMENTO COMPTON .....	33
4.3 ESPALHAMENTO COERENTE .....	34
4.4 LINHAS ESPECTRAIS DE FLUORESCÊNCIA .....	35
<b>5 CÁLCULO DE ABSORÇÃO DE ENERGIA E TRANSFERÊNCIA DE ENERGIA</b> .....	37
5.1 FONTE DE RAIOS GAMA OU X - EXPOSIÇÃO EM AR .....	38
<b>6 MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	44
6.1 SIMULADOS E ATENUAÇÃO DA PELE .....	44
6.2 SISTEMA DE AQUISIÇÃO DE DADOS E DETECTOR SI PIN-DIODO .....	46
6.3 METODOLOGIA DE ANÁLISE .....	47
6.3.1 Software de Análise de Espectros e Aquisição de Dados "Pmca" .....	48
6.3.2 Software de Análise de Espectros "Winqxas" .....	49
6.3.4 Espectro Líquido .....	51
<b>7 RESULTADOS</b> .....	53
7.1 CALIBRAÇÃO DO SOFTWARE PMCA .....	53
7.2 CALIBRAÇÃO DO SOFTWARE WINQXAS .....	54
7.3 COMPARAÇÃO E VALIDAÇÃO DAS CURVAS DE SENSIBILIDADE .....	55
7.4 COMPARAÇÃO DOS SOFTWARES PMCA E WINQXAS .....	56

7.5 ANÁLISE COM O SOFTWARE WINQXAS PARA O TEMPO DE MEDIDA DE 10 S .....	58
7.6 ANÁLISE COM O SOFTWARE WINQXAS PARA O TEMPO DE MEDIDA DE 50 S .....	59
<b>8 NÍVEIS DE Fe PARA HUMANOS SADIOS E PORTADORES DE <math>\beta</math>- THALASSAEMIA.....</b>	<b>61</b>
<b>9 ANIMAIS .....</b>	<b>64</b>
9.1 PARASITAS E INFECCÃO.....	64
9.2 ANÁLISE HEMATOLÓGICA DOS ANIMAIS NORMAIS E INFECTADOS.....	64
9.3 CONTAGEM DO NÚMERO TOTAL DE HEMÁCIAS.....	65
9.4 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE HEMOGLOBINA (HB): MÉTODO DA CIANOMETAHEMOGLOBINA .....	65
9.5 PREPARAÇÃO DAS SOLUÇÕES PADRÃO.....	66
9.6 CONTAGEM TOTAL DE LEUCÓCITOS .....	67
9.7 CÁLCULO DA CÂMARA DE NEUBAUER PARA O NÚMERO TOTAL DE LEUCÓCITOS .....	67
<b>10 MEDIDAS DE Fe NA PELE DOS CAMUNDONGOS SWISS     INFECTADOS.....</b>	<b>70</b>
10.1 NÍVEIS DE FE NA PELE DE CAMUNDONGOS SWISS INFECTADOS COM O T. CRUZI .....	72
10.2 CURSO DA INFECCÃO EXPERIMENTAL .....	72
10.3 ANÁLISE HEMATOLÓGICA .....	74
<b>11 CONCLUSÕES.....</b>	<b>76</b>
11.1 CONCLUSÕES - $\beta$ -THALASSAEMIA .....	76
11.2 CONCLUSÕES - DOENÇA DE CHAGAS.....	77
<b>REFERÊNCIA.....</b>	<b>78</b>
<b>ANEXO.....</b>	<b>84</b>
ANEXO 1 Termo de Consentimento Livre e Esclarecido .....	85
ANEXO 2 Parecer do Comitê de Ética .....	86
ANEXO 3 Artigo Publicados .....	88

## 1 INTRODUÇÃO

As circunstâncias tecnológicas atuais da EDXRF permitem explorar uma série de aplicações potenciais, envolvendo a medida de elementos pesados localizados em tecidos superficiais da pele onde há baixa sensibilidade à radiação por não serem vascularizados.

O emprego da Fluorescência de Raios X (XRF) *in vivo*, realizada neste trabalho, mostrou que esta pode ter sensibilidade para diagnósticos ou monitoramento em aplicações biomédicas mas, também, mostrou estar sujeito a diversos fatores que podem influenciar o sucesso de sua aplicação, como quantidade, número atômico e níveis de profundidade dos elementos de interesse, energia do raio incidente, dose de radiação, tempo de media, entre outros.

Existe uma alta correlação entre níveis de ferro na pele e níveis de ferro no fígado de camundongo. Segundo Porter (1996) a concentração de ferro *in vivo* pode ser usada como um indicador relacionado a desordens orgânicas. Um estudo em camundongos sugere que a pele possa agir como um marcador útil. O resultado em camundongos é significativo porque a porcentagem de absorção de ferro diária em um camundongo é 0,38 considerando que em humanos é de 0,03.

Acredita-se que a sobrecarga férrea do organismo é proporcional à concentração de ferro na pele. (OLIVIERI e BRITTENHAM, 1997).

### 1.1 $\beta$ THALASSAEMIA E HAEMOCHROMATOSIS

Uma aplicação potencial da Fluorescência de Raios X envolve o monitoramento da eficácia do tratamento de quelação de Fe, uma terapia que controla a tendência ao acúmulo de ferro no organismo como resultado do tratamento da desordem hereditária do sangue chamada  $\beta$ -Thalassaemia. Já a Haemochromatosis é uma doença genética caracterizada pela alta absorção de ferro nas últimas porções do aparelho digestivo, sendo sua patologia semelhante a causada pelo tratamento da  $\beta$ -Thalassaemia. (ADAMS *et al*, 1991).

O portador da  $\beta$ -Thalassaemia apresenta uma anemia por falta ou má formação da hemoglobina que esta no interior dos glóbulos vermelhos. O tratamento da  $\beta$ -Thalassaemia é feito retirando-se o sangue do paciente (flebotomia) e transfundindo glóbulos vermelhos sadios para o mesmo. Nesse processo cada 1mL de glóbulos vermelhos transfundido contém cerca de 1 mg de Fe. (THALASSAEMIA INTERNATIONAL FEDERATION, 2005). Este ferro não pode ser retirado do sangue porque faz parte da hemoglobina, de que o corpo necessita. Por sua própria natureza, o corpo só pode eliminar uma pequena quantidade de ferro, portanto, se a pessoa faz transfusões regularmente, o ferro gradualmente se acumula no corpo. Ele se acumula em certos órgãos, especialmente no fígado, coração e glândulas endócrinas.

O ferro comporta-se como um corpo estranho e depois de algum tempo causa prejuízo aos órgãos onde está depositado. Há drogas que podem retirar o excesso ferro do corpo, chamadas quelantes, eliminado-o através da urina e das fezes. No momento a única droga usada, regularmente, é a deferoxamina, também chamada Desferal. Se o doente usa Desferal regularmente, ela pode manter a quantidade de ferro no seu corpo a um nível seguro 10 até 20 ng/mL. (THALASSAEMIA INTERNATIONAL FEDERATION, 2005).

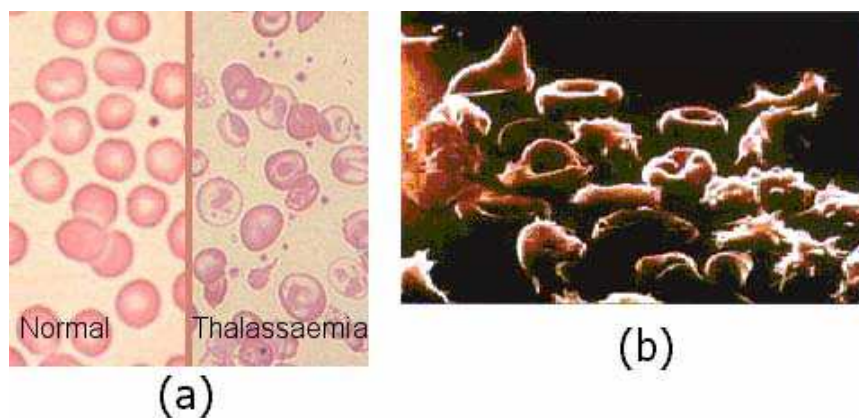
O portador da Haemochromatosis apresenta o mesmo quadro clínico descrito para o portador de  $\beta$ -Thalassaemia quando realiza o tratamento de transfusão de glóbulos vermelhos, ou seja, sobrecarga de ferro. A diferença é a origem dessa sobrecarga, para o portador de  $\beta$ -Thalassaemia é através do tratamento de transfusão e para o portador de Haemochromatosis é devido a elevada absorção de ferro pelo sistema digestivo.

Para verificar a eficiência do processo de quelação do ferro, tanto no portador de  $\beta$ -Thalassaemia quanto no de Haemochromatosis, é retirado sangue do paciente e é determinada a quantidade de ferro no organismo através de uma proteína do sangue chamada ferritina. Esse procedimento, além de ser invasivo, apresenta um sério problema: o nível de ferritina é muito sensível a qualquer alteração do quadro clínico do paciente, uma simples virose, por exemplo, é capaz de alterar significativamente os níveis de ferritina no sangue. (THALASSAEMIA INTERNATINOL FEDERATION, 2005).

As principais formas alternativas de medida dos níveis de ferro nos portadores de  $\beta$ -Thalassaemia e Haemochromatosis são através da biópsia do fígado, que é invasiva e perigosa, apresentando uma taxa de mortalidade de 0,1%, e através de susceptibilidade magnética que usa um supercondutor quântico, mas esse equipamento é muito caro e há apenas três centros mundiais envolvidos com tal metodologia. (FARQUHARSON e BRADLEY, 1999; ANGELUCCI *et al*, 1997).

O portador da Haemochromatosis ou Thalassaemia é assim porque recebeu de pelo menos um de seus pais a mesma mutação em um gene específico, um erro originado há muito tempo em um único indivíduo na Europa. Esta mutação foi, então, carregada de geração em geração por seus descendentes. O ancestral comum, que viveu há muito tempo, é conhecido como fundador dessa população e seu legado genético é chamado de mutação fundadora.

O motivo pelo qual a Thalassaemia se espalhou foi causado pelas sucessivas epidemias de malária que infectava até não muitos anos atrás as costas do mar Mediterrâneo. Os portadores dessa deficiência genética resistiam mais que as pessoas saudáveis à malária; em consequência, à medida que, com o passar dos anos, sempre mais pessoas saudáveis morriam de malária, aumentava-se o número de portadores de  $\beta$ -Thalassaemia. (SCIENTIFIC AMERICAN, 2005). O motivo pelo qual a Haemochromatosis se espalhou pelo mundo todo é a alta resistência dos portadores dessa desordem a anemia. Portanto, os portadores de Haemochromatosis possuem uma proteção contra anemia. (SCIENTIFIC AMERICAN, 2005).



**Figura 1** – (a) glóbulos vermelhos que apresentam deformação devido a  $\beta$ -Thalassaemia comparados com glóbulos vermelhos normais e (b) vista em profundidade dos glóbulos afetados.

**Fonte:** THALASSAEMIA INTERNATIONAL FEDERATION (2005).

Os sinais da anemia ficam aparentes na infância onde as crianças afetadas ficam pálidas, tem problemas de sono, perda de apetite e subdesenvolvimento físico. A anemia causa expansão dos ossos, fígado e baço.



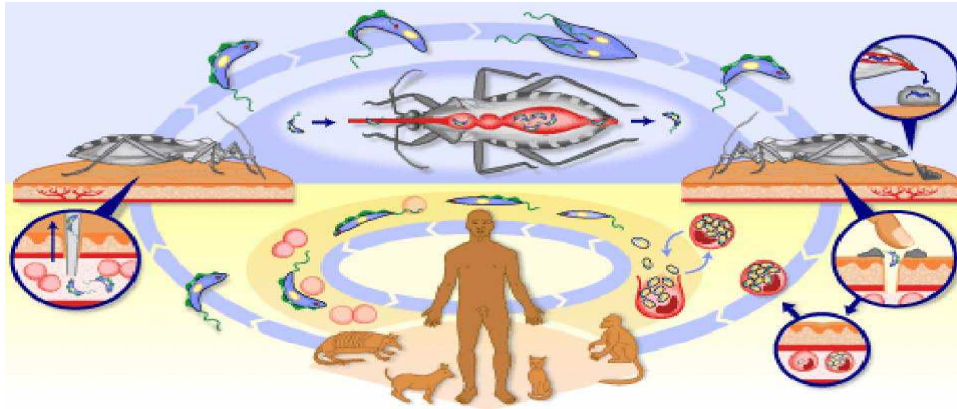
**Figura 2** – Portador de  $\beta$ -Thalassaemia sem tratamento adequado.  
**Fonte:** THALASSAEMIA INTERNATIONAL FEDERATION (2005).

## 1.2 DOENÇA DE CHAGAS

Outra aplicação da Fluorescência de Raios X é determinar a variação do elemento Fe em camundongos portadores da doença de Chagas causada pelo protozoário *Trypanosoma cruzi*. Correlacionando-se essa variação ao metabolismo do protozoário, ou seja, se o protozoário utiliza o ferro do organismo do hospedeiro a seu favor e como ele utiliza esse elemento.

Essa doença causa, dentre outras alterações no quadro clínico do paciente, uma severa anemia, contrário ao quadro patológico relacionado com o tratamento da  $\beta$  - Thalassaemia e ao apresentado pelo portador da Haemochromatosis.

O protozoário causador da doença de Chagas é da classe dos flagelados, essa doença também é conhecida como Tripanossomiase americana. É uma doença de evolução crônica, debilitante, caracterizada por cardiopatias e distúrbios digestivos incuráveis. Está intimamente relacionada às más condições das moradias, pois as mesmas favorecem a nidificação dos insetos vetores conhecidos vulgarmente como “barbeiros”. Cerca de 18 milhões de pessoas estão infectadas na América Latina, sendo que o número de casos no Brasil chega a 8 milhões, ocorrendo principalmente nas regiões Nordeste, Sudeste e Sul. (RASSI *et al*, 1996).



**Figura 3** – Ciclo biológico do *Trypanosoma cruzi*.  
**Fonte:** INSTITUTO PASTEUR (2005).

O homem se infecta quando o barbeiro (triatomíneos dos gêneros *Triatoma infestans*, *Panstrongylus sp* e *Rhodnius sp*) elimina as formas tripomastigotas metacíclicas do *Trypanosoma cruzi* em suas fezes, durante ou logo após alimentar-se do sangue humano. Estas formas infectantes podem penetrar por abrasões da pele provocados pelo ato de coçar, pelo orifício da picada do barbeiro ou ainda pelas mucosas, quando o homem, inadvertidamente, leva as mãos contaminadas aos olhos ou nariz. Logo após a penetração, os tripomastigotas metacíclicos são fagocitados por macrófagos, perdem o flagelo e a membrana ondulante, tornando-se amastigotas, forma sob a qual se reproduzem por divisão binária até que os macrófagos fiquem repletos de amastigotas. Os parasitos então re-adquirem o flagelo e a membrana ondulante, tornando-se tripomastigotas que rompem a célula hospedeira e disseminam-se para o restante do organismo pela circulação sanguínea. Quando chegam ao coração, esôfago ou cólon, principais órgãos atingidos, penetram nas fibrilas musculares desses órgãos e repetem o ciclo intracelular. Os tripomastigotas podem, ainda, ser fagocitados por macrófagos nos órgãos do sistema fagocitário mononuclear (fígado, baço, linfonodos, medula óssea), onde se reproduzem novamente como amastigotas. Quando os triatomíneos (barbeiros) alimentam-se do sangue de uma pessoa infectada, ingerem os tripomastigotas que se convertem em epimastigotas e se reproduzem por divisão binária no tubo digestivo do inseto, voltando à forma tripomastigota quando chegam à porção terminal do intestino do barbeiro. Estas novas formas tripomastigotas, altamente móveis, delgadas e infectantes, são as formas metacíclicas eliminadas nas fezes do vetor. (COURA e CASTRO, 2002).

A doença apresenta duas fases, uma aguda, correspondente à infecção e disseminação do protozoário no organismo, e uma crônica, relacionada à reprodução

sistêmica do parasito. Na fase aguda, apesar de freqüentemente assintomática, o paciente pode apresentar febre, poliadenite, mal-estar e inflamação do ponto de inoculação do protozoário, denominado “chagoma”. Se o chagoma ocorre na mucosa palpebral, há edema de uma ou ambas as pálpebras, conhecido como Sinal de Romaña. (COURA e CASTRO, 2002).



**Figura 4** – Foto clássica do Sinal de Romaña.  
**Fonte:** INSTITUTO PASTEUR (2005).

A fase crônica da doença tem evolução de 15 anos ou mais e os sintomas são muitas vezes indeterminados. Entretanto, em cerca de 30% dos casos há o comprometimento do coração, especialmente a cardiomegalia (“coração de boi”) e nestes casos o paciente pode apresentar arritmias cardíacas, insuficiência circulatória, edemas dos membros, cansaço, dispnéia e morte súbita por falência cardíaca. As alterações digestivas ocorrem em torno de 10% dos casos e os pacientes podem apresentar dificuldades de deglutição, digestão ou defecação, conforme a porção do sistema digestório afetada (megaesôfago, megacólon). (RASSI *et al*, 1996).

O diagnóstico parasitológico pode ser feito pela visualização dos tripomastigotas em distensões sangüíneas ou das amastigotas em biópsias de linfonodos (quando houver poliadenite) durante a fase aguda da doença. Os métodos de imunodiagnóstico, especialmente a imunofluorescência, ELISA e hemaglutinação, são utilizados na fase crônica. Métodos complementares como o diagnóstico por imagem também podem ser utilizados.

O tratamento para a doença é apenas sintomático e, infelizmente, ainda não há cura, pois as drogas disponíveis, como o benznidazol, têm apenas atividade parcial sobre o protozoário. (RASSI *et al*, 1996).

### 1.3 FLUORESCÊNCIA DE RAIOS X

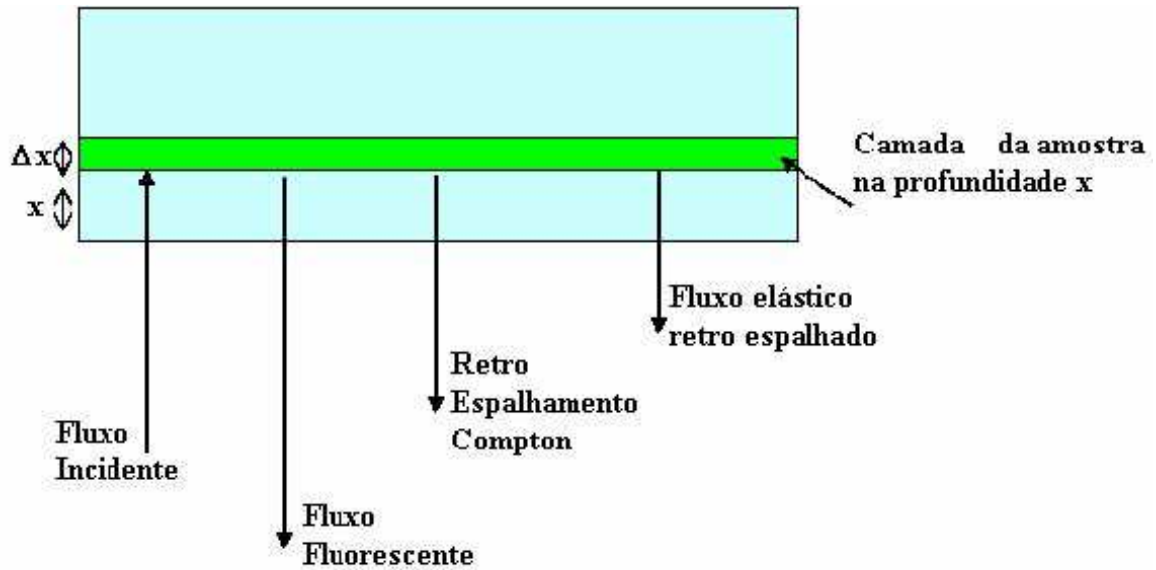
A fluorescência de raios X é um método analítico baseado nas medidas de energia e intensidade (número de raios X detectados por unidade de tempo) dos raios X característicos emitidos pelos elementos que constituem uma amostra.

Quando uma amostra é irradiada os elementos irradiados que a constituem podem ser excitados por raios X emitidos por um tubo de raios X, ou acelerador Síncrotron ou fonte radioativa e raios gama que também são emitidos por uma fonte radioativa. Quando um elemento da amostra é excitado, este tende a ejetar os elétrons do interior dos níveis do átomo, e como consequência disto, elétrons dos níveis mais afastados realizam um salto quântico para preencher a vacância. Cada transição constitui uma perda de energia para o elétron, e esta energia é emitida na forma de fótons de raios X com energia característica e bem definida, permitindo a identificação dos elementos na amostra. A intensidade destes fótons é diretamente proporcional à concentração do elemento na amostra. (RAO e CHATT, 1993).

A análise por fluorescência de raios X consiste em três fases: excitação dos elementos que constituem a amostra, dispersão dos raios X emitidos pela amostra e detecção dos mesmos.

A excitação dos elementos pode ser realizada de várias maneiras: excitação por elétrons, prótons ou íons, partículas alfa, partículas beta, excitação por raios X ou gama emitidos por radioisótopos, através de um tubo de raios X ou luz síncrotron.

No espectro de raios X também estão presentes espalhamentos elásticos e inelásticos pela amostra. Na Figura 5, considera-se uma radiação incidente monoenergética entrando na amostra normal à superfície e a radiação espalhada composta de espalhamento elástico, espalhamento Compton e raios X característicos, todos deixando a amostra também normal à superfície. (BACON, *et al* 1999).



**Figura 5** – Tipos de espalhamento envolvidos quando uma radiação monoenergética incide sobre a amostra

O fluxo fluorescente de um elemento genérico  $a$  em uma camada de massa por unidade de área  $\rho\Delta x$  ( $\text{g}/\text{cm}^2$ ) a uma profundidade  $x$  depende dos seguintes fatores. (CESAREO, 1992):

$$\Delta N_a = N_0 K \omega_a(E_0) \left(1 - \frac{1}{J_a}\right) c_a \rho \Delta x e^{-\mu_t(E_0)\rho x} e^{-\mu_t(E_{a0})\rho x} \quad (1)$$

onde:

$\Delta N_a$  – número de fótons de fluorescência por unidade de área e tempo dos raios X do elemento  $a$

$N_0$  – fluxo incidente de fótons

$K$  – Fator geométrico

$\omega_a$  – taxa fluorescente do elemento  $a$  na camada de interesse

$(1-1/J_a)$  – Fator de “branching ratio” que corresponde à intensidade dos raios X na linha de interesse em relação à intensidade total dos raios X

$c_a$  – concentração do elemento  $a$  (% de peso)

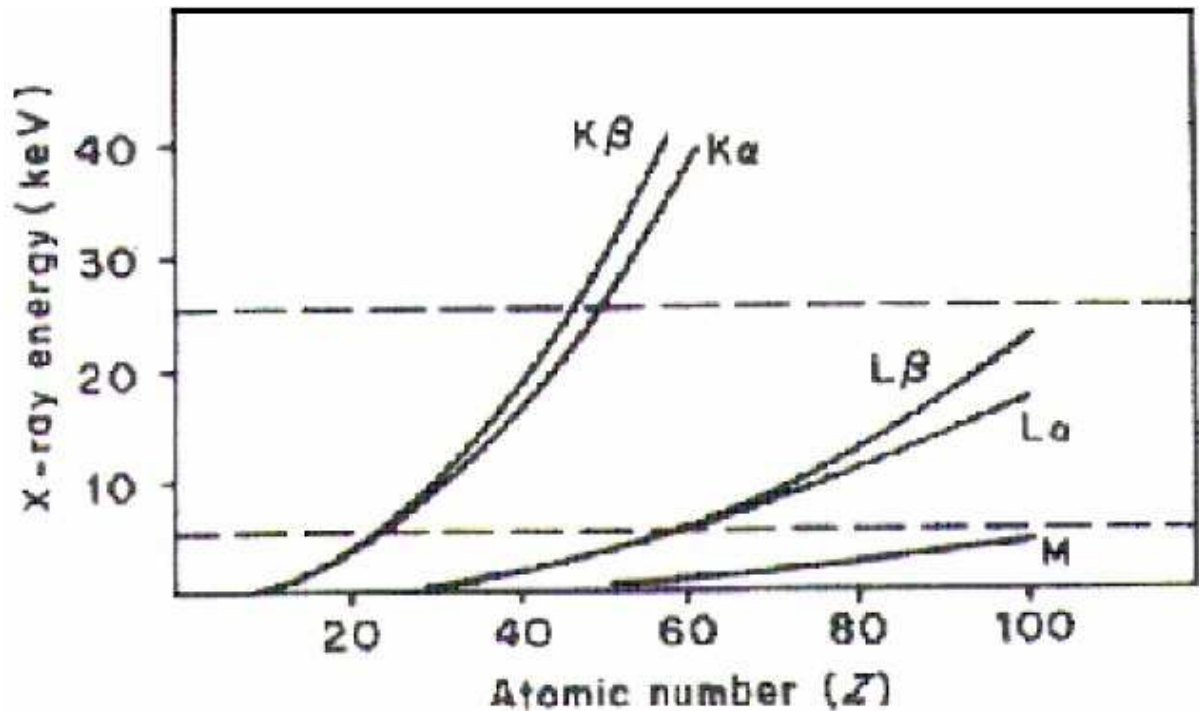
$\mu_t(E)$  – coeficiente de absorção de massa total da amostra para energia  $E$

Para haver produção de raios X característicos há necessidade de se retirar elétrons localizados nas camadas mais internas, e para isto a energia mínima incidente deve ser superior a energia de ligação do elétron nessa camada. Esta energia pode ser calculada de modo aproximado (NASCIMENTO FILHO, 1993), para elétrons das camadas K e L dos átomos de um elemento, de acordo com a equação:

$$E = K \left( \frac{Z - b}{n} \right)^2 \quad (2)$$

onde  $E$  é a energia do raio X;  $K$  é uma constante com valor de 13,65 eV;  $b$  é a constante de Moseley com os valores: 1 para a camada K e 7,4 para a camada L;  $Z$  é o número atômico do elemento e  $n$  é o número quântico principal do nível eletrônico ( $n=1$  para a camada K,  $n=2$  para a camada L etc.).

Através da Equação 2 pode ser observado que a energia de ligação para uma dada camada é diretamente proporcional ao quadrado no número atômico do elemento, de modo que a radiação, por exemplo, a série K tem menor energia para os elementos mais leves, conforme a figura 6.



**Figura 6** – Energia dos raios X em função do número atômico.  
 Fonte: KNOLL (2000).

A energia característica dos raios X emitidos pela amostra, após a excitação, depende da diferença de energia do elétron nos níveis quânticos, ou seja:

$$E_x = E_{ni} - E_{nf} \quad (3)$$

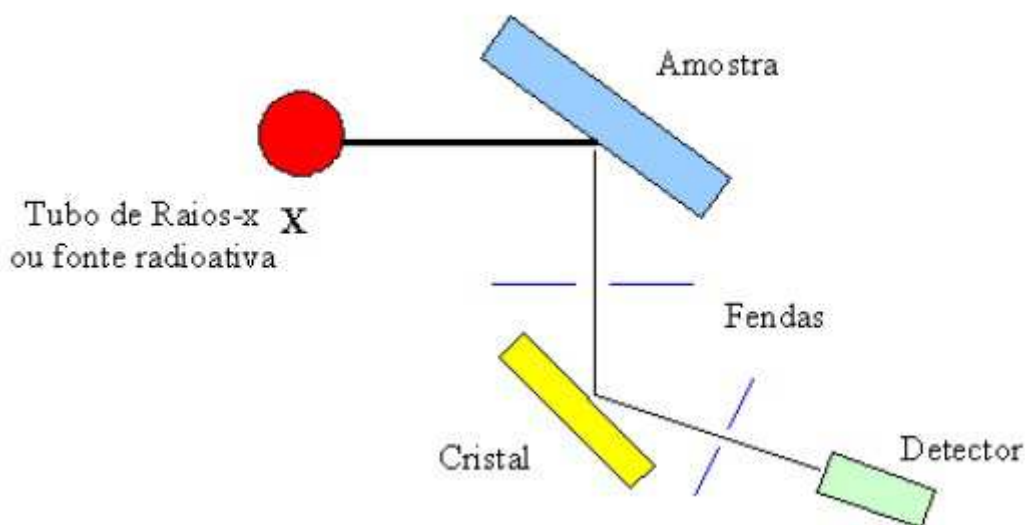
onde  $E_x$  é a energia do raio x característico,  $E_{ni}$  e  $E_{nf}$  são as energias do elétron nos níveis inicial e final, respectivamente.

Os métodos de dispersão usados na maioria dos espectrômetros de raios X podem ser classificados em duas categorias: dispersão por comprimento de onda e por dispersão de energia. (BUCHAM, 1974; CESAREO *et al*, 1992).

Na fluorescência de raios X por dispersão de comprimento de onda (WDXRF), que é uma técnica mais antiga, os raios X emitidos pela amostra são dispersos espacialmente com base em seus comprimentos de onda por difração em um cristal antes da detecção. Os raios X característicos são selecionados por um cristal analisador, de acordo com seus comprimentos de onda, obedecendo a lei de Bragg da difração (VANDECASTEELE e BLOCK, 1995; KAPLAN, 1963).

$$n \lambda = 2 d \sin(\theta) \quad (4)$$

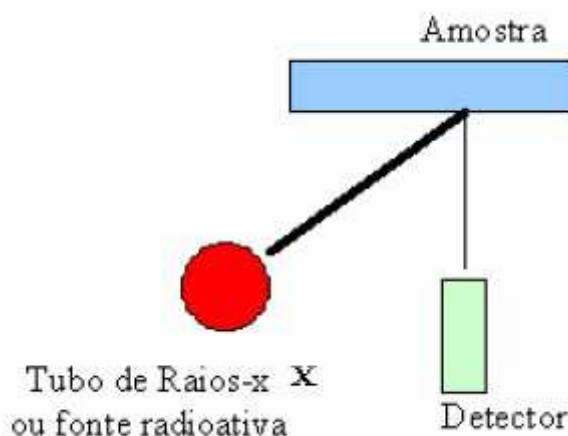
onde  $n$  é um número inteiro,  $\lambda$  é o comprimento de onda considerado,  $d$  é a distância interplanar do cristal e  $\theta$  é o ângulo de incidência e de emergência da radiação considerada. A Figura 7 mostra um arranjo experimental para WDXRF.



**Figura 7** – Representação esquemática da fluorescência de raios X com dispersão por comprimento de onda.

Já na fluorescência de raios X com dispersão de energia (EDXRF), o detector recebe todas as linhas de raios X da amostra diretamente. Os raios X são selecionados através de pulsos eletrônicos produzidos em um detector apropriado, estes pulsos são diretamente proporcionais às energias dos raios X. Sendo os detectores mais usados são o de Si(Li), Ge(Li) e GeHP. A Figura 8 mostra um arranjo experimental para EDXRF.

Em equipamentos de fluorescência de raios X, que fazem uso da dispersão de energia com detectores semicondutores, a Equação 3 é fundamental para se entender a proporcionalidade entre a energia (ou amplitude do pulso produzido no detector) e o elemento a ser analisado. (CUNHA E SILVA, 2004).



**Figura 8** – Representação esquemática da fluorescência de raios X com dispersão de energia

A sensibilidade da XRF depende de muitos fatores, por exemplo: a energia (espectro) e intensidade da radiação incidente, a geometria dos instrumentos utilizados (ângulo sólido para excitação e detecção), a refletividade do cristal analisador (no caso de WDXRF) e a eficiência do detector. (CUNHA E SILVA, 2004). O limite mínimo de detecção (LLD) depende da sensibilidade e da radiação de fundo “background” na região da linha de interesse. (BERTIN, 1975). Então, para o caso da curva de sensibilidade elaborada através da intensidade líquida das medidas relacionadas com a concentração de ferro dos simulados, a intensidade correspondente ao LLD é dada pela equação 5 e o limite mínimo de detecção é calculado inserindo o valor desta intensidade na equação de parametrização da curva de sensibilidade.

$$I_{LLD} = 3 \frac{\sqrt{F}}{t} \quad (5)$$

Onde  $I_{LLD}$  = intensidade correspondente ao LLD, F é radiação de fundo “background” na região da linha de interesse e t é o tempo de excitação/detecção.

## 2 OBJETIVOS

Levantar o "estado da arte" da metodologia de Fluorescência de Raios X (XRF) *in vivo* com aplicações biomédicas.

Compreender os processos orgânicos e biomédicos envolvidos nas doenças:  $\beta$ -Thalassaemia, Haemochromatosis e Chagas.

Aplicar a metodologia de XRF *in vivo* no monitoramento da eficácia do tratamento de quelação do ferro em portadores de  $\beta$ -Thalassaemia empregando-se um equipamento de XRF portátil na quantificação do elemento ferro existente na pele humana de portadores de  $\beta$ -Thalassaemia e verificar o risco à saúde do paciente devido a quantidade e acúmulo de ferro no organismo.

Compreender o papel do elemento ferro na infecção experimental da doença de Chagas em camundongos da raça Swins, portadores da doença de Chagas, analisar a quantidade de ferro presente na pele através da metodologia de XRF *in vivo*.

Possibilitar um trabalho em colaboração com outras áreas ligadas ao monitoramento e tratamento de portadores de  $\beta$ -Thalassaemia e portadores das doença de Chagas.

### 3 REVISÃO DA LITERATURA

Em um estudo Farquharson e Bradley (1999) e Bradley e Farquharson (2000) utilizaram simulados de pele constituídos de sulfato de ferro ( $\text{FeSO}_4$ ), e posteriormente utilizando peles de ratos investigaram relações entre níveis de ferro na pele e ingestão de Fe. Utilizaram um sistema XRF *in vivo* com as seguintes características:

Fonte: Tubo Cometa 160 kV, resfriamento à água.

Alvo: tungstênio.

Colimador: diafragma de 10mm de diâmetro.

Operação: 20 kV e 20 mA.

Filtro chapa de 0,15 mm de cobre 99,9 % puro.

Energia do pico 8,4 keV.

Detector: EG&G

Ortec alta-pureza de germânio GLP.

Ângulo: entre o detector e o raio incidente 90°.

Tempo morto mantido abaixo de 10 %

Em um estudo sobre o número de portadores de *Thalassaemia* e de *Haemochromatosis* Edwards (1999) verificou que há no mundo aproximadamente 26000 nascimentos por ano de indivíduos portadores de *Thalassaemia* major ou  $\beta$ , e 1,6% da população mundial é portadora de algum tipo de *Thalassaemia*. Na população Caucasiana a frequência de mutação para *Haemochromatosis* é aproximadamente 0,5% e entre 10 e 13% são portadores que manifestam a patologia.

Fischer *et al* (1999) utilizando susceptibilidade magnética, que usa um supercondutor quântico por um dispositivo de interferência (LULA), tiveram êxito em quantificar ferro *in vivo* em pele de maneira sensível, mas o equipamento é extremamente caro e só disponível em três centros mundiais.

Em um estudo utilizando técnicas de construção de imagem (MRI) para avaliar a quantidade de ferro no corpo e quantificar a relação entre ferro do fígado e ferro mensurável por MRI, Ito *et al* (1999) observaram que a técnica MRI não foi suficientemente sensível na gama crítica de concentração *in vivo* observada em sobrecarga férrea.

Em um estudo sobre o risco de danos nos tecidos em casos de sobrecarga férrea Olivieri e Brittenham (1997) verificaram que estes danos são proporcionais à concentração de ferro nos tecidos. Concluíram que uma melhor avaliação de Fe, assim como

uma relação entre essas quantidades de Fe entre os tecidos, havia necessidade de uma biopsia do fígado.

Shukri *et al* (1995) desenvolveram um estudo com soluções de (FeSO<sub>4</sub>), simulados de pele, depositados em camadas sobre filtros de papel utilizando um sistema de XRF *in vivo* transportável, com as seguintes características: Fonte: (alvo secundário) <sup>109</sup>Cd / raio X de 22,1 KeV. Alvo: Ag. Tempo de contagem: 1200s. Dose: 5 mSv. Precisão: mínima concentração detectável (MDCs) 119 µg g<sup>-1</sup>.

George *et al* (1994) concluíram que a relação entre ferritina e o ferro armazenado no organismo não é adequada se foram administradas mais de 100 unidades de glóbulos vermelhas em transfusões, no tratamento da β-Thalassaemia. Na maioria dos casos de β-Talassemia essa quantidade é excedida. Outra avaliação mais precisa do armazenamento de ferro no corpo é realizada através de amostras do fígado (biópsia), mas repetidas biópsias são altamente indesejáveis e tem uma taxa de mortalidade associada de 0,1%. (FARQUHARSON e BRADLEY, 1999).

Green *et al* (1994) realizaram estudos envolvendo trabalhadores expostos a concentrações aerotransportadas de metais pesados. Utilizaram um sistema de XRF *in vivo* para estudos em ossos contaminados por Chumbo de grupos de trabalhadores expostos, com as seguintes características: Tempo de contagem: 1500s.

Dose: 0,5 mSv.

Grupo de controle: 27,8 µg (Pb) g<sup>-1</sup>.

Grupo exposto: 74,2 µg (Pb) g<sup>-1</sup>.

Precisão: ± 4,9 a ± 14,2 µg (Pb) g<sup>-1</sup>.

Gorodetsky *et al* (1990) desenvolveram um sistema portátil de XRF *in vivo* utilizado para detecção de elementos como Fe, Zn e Cu em portadores da β-Thalassaemia, utilizando:

Fonte: monoenergética de fótons com 11,4KeV.

Dose: 10 mSv.

Obtendo os seguintes resultados:

Tecido normal: (5,6 a 14,0) ppm de Fe.

Tecido β-Thalassaemia: (13,7 a 150,0) ppm de Fe.

Usando um método de XRF *in vivo* para examinar níveis de Fe, Cu e Zn em prurigo nodularis, doença auto-imune, Sheskin *et al* (1986) notaram que há uma redução na

quantidade de Zn na pele afetada durante o tratamento com a droga thalidomine. Investigaram também níveis de Fe, Cu e Zn em tecidos cancerosos e pré-cancerosos. Obtiveram os seguintes resultados para tecidos acometidos de neoplasias.  $10,2 \pm 2,5$  ppm de Fe  $4,5 \pm 1,7$  ppm de Zn e  $0,8 \pm 0,3$  ppm de Cu em monitoramento de tecidos normais do abdômen, braço, axila e baixas regiões do pescoço. Elevações de Fe e Zn foram notadas para estes mesmos tecidos, em associação com dermatite solar, keratosis solar, basal e squamous carcinoma de células, pigmentação nevi e melanoma malignos.

Michaelsson *et al* (1980) usaram espectroscopia de absorção atômica (AAS), foram investigadas a epiderme e a derme de pacientes saudáveis, encontrando níveis de Zn em acordo com valores de contraparte informados na investigação de Molin e Wester (1973).

Molin e Wester (1973) desenvolveram um sistema de análise de ativação *in vitro* por nêutrons (NAA) para investigar concentrações de Fe em amostras normais, obtendo:

$26,53 \pm 6,73 \mu\text{g g}^{-1}$  (de epiderme normal).

Posteriormente encontraram os seguintes valores para Zn:

$39,3 \pm 12,4 \mu\text{g g}^{-1}$  (de epiderme normal).

E para Cu, encontraram:

$3,76 \pm 0,83 \mu\text{g g}^{-1}$  (de epiderme normal).

## 4 INTERAÇÃO DA RADIAÇÃO COM A MATÉRIA

Um grande número de mecanismos de interação da radiação com a matéria são conhecidos. Três possuem um papel muito importante em medidas de radiação: absorção fotoelétrica, espalhamento Compton, e produção de pares. Nestes processos há transferência parcial ou total da energia do fóton de raio X para o elétron, resultando em mudanças súbitas e abruptas no fóton de raio X, o fóton ou desaparece ou se espalha por um ângulo significativo. Nas medidas de EDXRF basicamente são de interesse a absorção fotoelétrica e os espalhamentos elásticos e inelásticos. Esses processos estão detalhados nos itens 4.1, 4.2 e 4.3 a seguir.

### 4.1 ABSORÇÃO FOTOELÉTRICA

No processo de absorção fotoelétrica, um fóton sofre uma interação com um átomo do material absorvedor no qual o fóton desaparece completamente. Em seu lugar, um fotoelétron é ejetado pelo átomo de uma de suas camadas. Fótons com energia suficiente dão origem ao processo, desencadeando os fotoelétrons que estão firmemente ligados ao átomo. A energia do fotoelétron é dada pela equação 6.

$$E_{e^-} = h\nu - E_b \quad (6)$$

Onde  $E_b$  representa a energia de ligação do fotoelétron em sua camada original e  $h\nu$  é a energia do fóton incidente, onde  $h$  é a constante de Planck e  $\nu$  é a frequência do fóton incidente. Para energias maiores que algumas centenas de keV ( $1\text{keV} = 1,6 \cdot 10^{-19}\text{J}$ ), o fotoelétron fica com a maior parte da energia original do fóton. (KNOLL, 2000; APPOLONI, 2003).

Além do fotoelétron, a interação cria um átomo ionizado com uma vacância em uma de suas camadas. Esta vacância é preenchida rapidamente por um elétron livre ou por um elétron de outra camada do átomo. Então, também pode ser gerado um fóton de raio X característico do átomo. Embora na maioria dos casos os fótons são reabsorvidos perto do

local original por absorção fotoelétrica. Em alguns casos, a emissão de um elétron Auger, pode substituir um raio X característico, levando a energia de excitação atômica. O efeito Auger é bastante significativo para elementos de baixo Z, onde após a transição eletrônica, ao invés de ocorrer a emissão de um raio X característico, ocorre a emissão de um elétron. (KNOLL, 2000; APPOLONI, 2003).



**Figura 9** – Transições eletrônicas, produção de raios-X, Gama e luz.  
**Fonte:** OBSERVATÓRIO NACIONAL (2004).

Como um exemplo da complexidade destas interações, considere fótons com energia de 30 keV incidentes em átomos de Xenônio sofrendo absorção fotoelétrica. Aproximadamente 86% interagem por absorção na camada-K do átomo de xenônio. Destes, 87,5% resultam em raios-X característicos (ou "fluorescência") da camada-K (uma 30 mistura de K- $\alpha$  e K- $\beta$ ) e 12,5% resultam na emissão de elétrons Auger. Os 14% dos fótons incidentes que não sofrem interações na camada-K são absorvidos por interação fotoelétrica na camada-L ou M, resultam em raios X característicos e elétrons Auger de baixa energia, estes são reabsorvidos muito perto do local da interação original. (KNOLL, 2000).

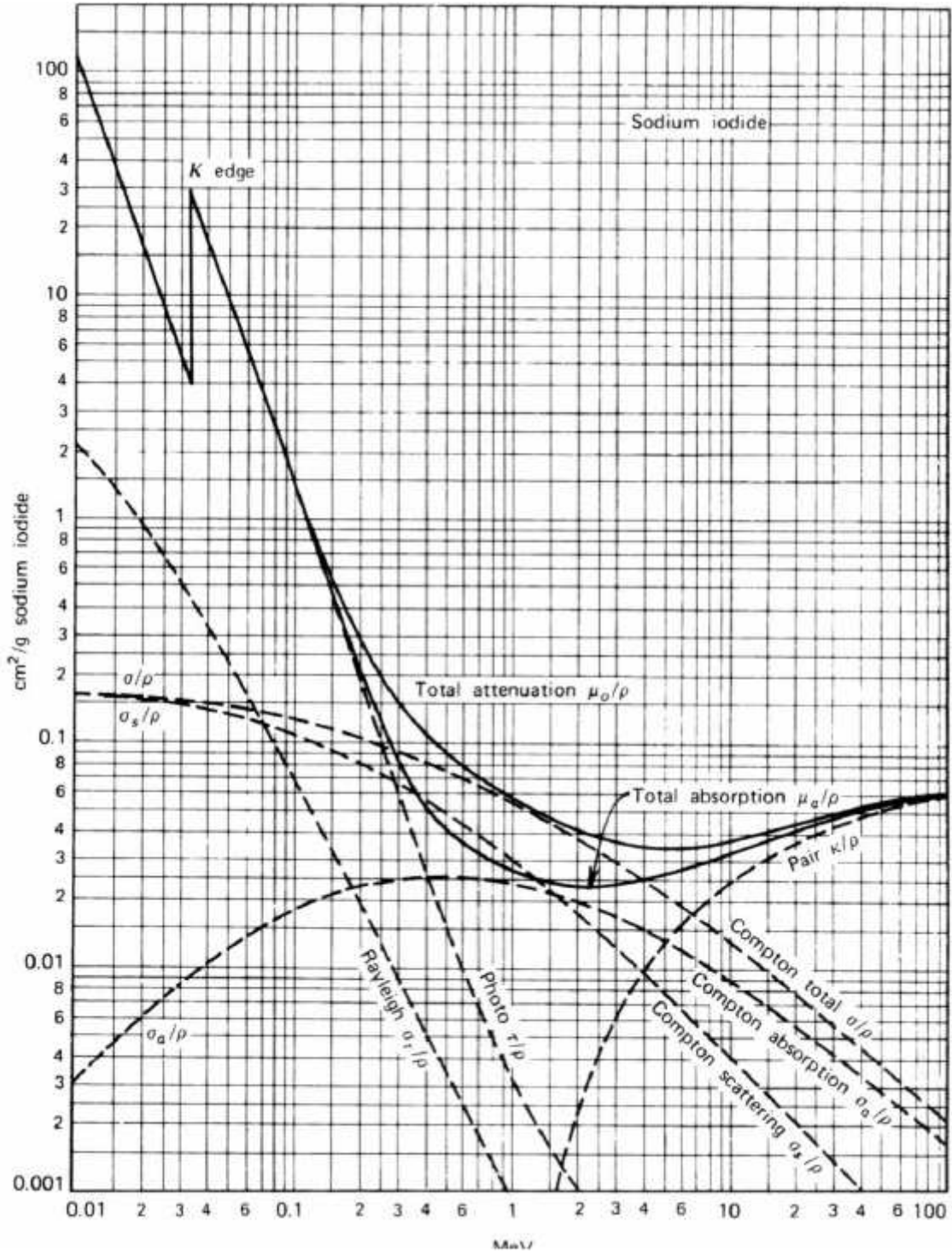
O processo fotoelétrico é predominante nas interações de raios gama ou raios X de baixa energia e para materiais de alto número atômico ( $Z$ ).

Há várias expressões analíticas para a probabilidade de absorção fotoelétrica por um átomo em todas as gamas de  $E\gamma$  e  $Z$ , mas uma boa aproximação é dada pela equação 6:

$$\tau \cong \text{constante} \times \frac{Z^n}{E_\gamma^{3,5}} \quad (6a)$$

Onde o expoente  $n$  varia entre 4 e 5 na região de energia do raio gama de interesse. Esta dependência da probabilidade de absorção fotoelétrica com o número atômico do absorvente é uma razão primária para a preponderância de materiais com alto  $Z$  em proteções de raio gama, é por esta razão que muitos detectores usados para espectroscopia de raio gama são escolhidos com componentes de alto valor de  $Z$ . (TURNER, 1995; KNOLL, 2000; APPOLONI, 2003).

Na região de baixa-energia da figura 10 aparecem descontinuidades na curva para energias de raios gama, que correspondem às energias de ligação de elétrons nas várias camadas do átomo. Para energia de raios gama ligeiramente maior que a descontinuidade, o fóton tem energia suficiente para sofrer uma interação fotoelétrica na qual um elétron K é ejetado do átomo. Para energias de raios gama ligeiramente abaixo ou na descontinuidade, este processo não é mais energeticamente possível, assim a probabilidade de interação cai abruptamente. Limiares de absorção semelhantes acontecem em energias mais baixas relativas as camadas L, M, do átomo. (KNOLL, 2000).



**Figura 10** – Dependência da energia para vários raios gama nos processos de interação do iodeto de sódio.

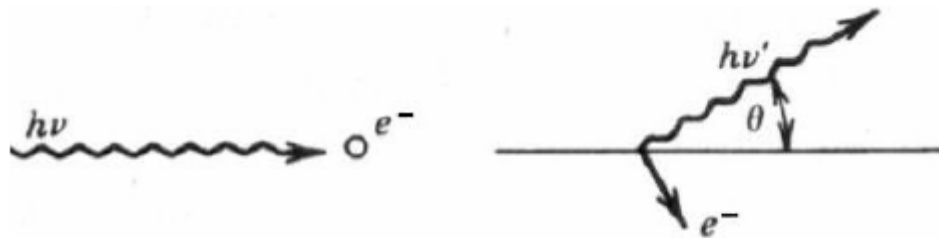
Fonte: KNOLL (2000).

## 4.2 ESPALHAMENTO COMPTON

O processo de interação Compton é freqüentemente o mecanismo de interação predominante para energias de raios X típicos de fontes de radioisótopos.

No efeito Compton, o fóton do raio X incidente é desviado por um ângulo  $\theta$  com respeito a sua direção original. O fóton transfere uma parte de sua energia ao elétron (assumindo este inicialmente em repouso) que é então denominado elétron de recuo. Já que todos os ângulos de espalhamento são possíveis, a energia transferida ao elétron pode variar de zero a uma fração grande da energia do raio X. (KNOLL, 2000; APPOLONI, 2003).

A expressão que relaciona a transferência de energia e o ângulo de espalhamento para qualquer interação, pode simplesmente ser derivada escrevendo as equações simultâneas para a conservação de energia e de momento. Usando os símbolos definidos na figura 11, abaixo:



**Figura 11** – Esquema da situação inicial (esquerda) e final (direita) do espalhamento Compton.  
**Fonte:** KNOLL (2000).

Que pode ser equacionada, assim:

$$h\nu' = \frac{h\nu}{1 + \frac{h\nu}{m_0c^2}(1 - \cos\theta)}$$

(7)

Onde  $m_0c^2$  é a energia de repouso do elétron ( $0,511 \text{ MeV}$ ). Para pequenos ângulos  $\theta$  de espalhamento, pouca energia é transferida. Uma fração da energia original sempre é retida pelo fóton incidente, até mesmo no extremo de  $\theta = \pi$ . (KNOLL, 2000).

A probabilidade de haver espalhamento Compton no átomo do absorvedor depende do número de elétrons disponíveis para o espalhamento e este aumenta linearmente com  $Z$ . A distribuição angular de raios X espalhados é predita pela fórmula de Klein-Nishina para a diferencial do espalhamento da seção transversal  $d\sigma/d\Omega$ :

$$\frac{d\sigma}{d\Omega} = Zr_0^2 \left( \frac{1}{1 + \alpha(1 - \cos\theta)} \right)^2 \left( \frac{1 + \cos^2\theta}{2} \right) \left( 1 + \frac{\alpha^2(1 - \cos\theta)^2}{(1 + \cos^2\theta)[1 + \alpha(1 - \cos\theta)]} \right) \quad (8)$$

Onde  $\alpha = hv/m_0c^2$  e  $r_0$  é o raio do elétron clássico. A distribuição é mostrada no gráfico da figura 10 e ilustra a forte tendência de espalhamento para ângulos dianteiros com valores altos da energia dos raios X. (KNOLL, 2000; TURNER, 1995).

### 4.3 ESPALHAMENTO COERENTE

Além do efeito Compton, também chamado de espalhamento inelástico, podem acontecer outros tipos de espalhamento no qual o fóton do raio gama interage coerentemente com o átomo, ou seja, realiza espalhamento elástico. Nestes processos o fóton espalhado tem a mesma energia do fóton incidente. Podemos ter o espalhamento Rayleigh, o espalhamento Thomson e mais dois que não serão comentados, espalhamento por ressonância nuclear e espalhamento pelo campo eletromagnético do núcleo (espalhamento Delbruck ou Potencial). Se a interação for com os elétrons do átomo do absorvente, este é chamado espalhamento Rayleigh. Já o espalhamento Thomson se dá por espalhamento elástico pela carga nuclear. Estes processos são freqüentemente negligenciados em discussões básicas de interações dos raios gama, e também não trataremos deles nas discussões que seguem. (KNOLL, 2000).

A probabilidade de ocorrer espalhamento coerente só é significativa para fótons de baixa energia (tipicamente abaixo de alguns keV para materiais comuns) e é observado em absorvedores com alto- $Z$ . As diminuições do ângulo de desvio comuns em

energia crescente, restringem a importância prática de se espalhar coerentemente a baixas energias.

Podemos escrever a seção de choque eficaz do espalhamento Rayleigh da forma:

$$d\sigma_R = \left( \frac{\mu_0 e^2}{4\pi m} \right) |f_\theta|^2 \frac{1 + \cos^2 \theta}{2} d\Omega \quad (9)$$

Onde  $f_\theta$  é o fator de espalhamento atômico.

Para  $\lambda$  grande,  $f_\theta \rightarrow Z$

Para  $\lambda$  pequenos (aproximação relativística menos válida) o espalhamento Rayleigh se concentra em ângulos dianteiros (Teoria da Difração). Por exemplo, a difração de raios X por cristais é um espalhamento Rayleigh. (APPOLONI, 2003).

#### 4.4 LINHAS ESPECTRAIS DE FLUORESCÊNCIA

Através das transições eletrônicas ocorre a produção do raio X característico do elemento em questão, essas transições obedecem uma regra de seleção que esta será descrita neste item e pode ser observada na figura 12.

Os números quânticos associados a cada estado energético do átomo, em notação Espectroscópica, estão descritos nas tabelas 1 e 2.

**Tabela 1** – Notação Espectroscópica para o número quântico  $l$ .

$l$	0	1	2	3	4	5	6	...
Notação Espectroscópica	<i>s</i>	<i>p</i>	<i>d</i>	<i>f</i>	<i>g</i>	<i>b</i>	<i>i</i>	...

Fonte: EISBERG, 1974.

**Tabela 2** – Notação Espectroscópica para o número quântico  $n$ .

$N$	1	2	3	4	5	...
Notação Espectroscópica	$K$	$L$	$M$	$N$	$O$	...

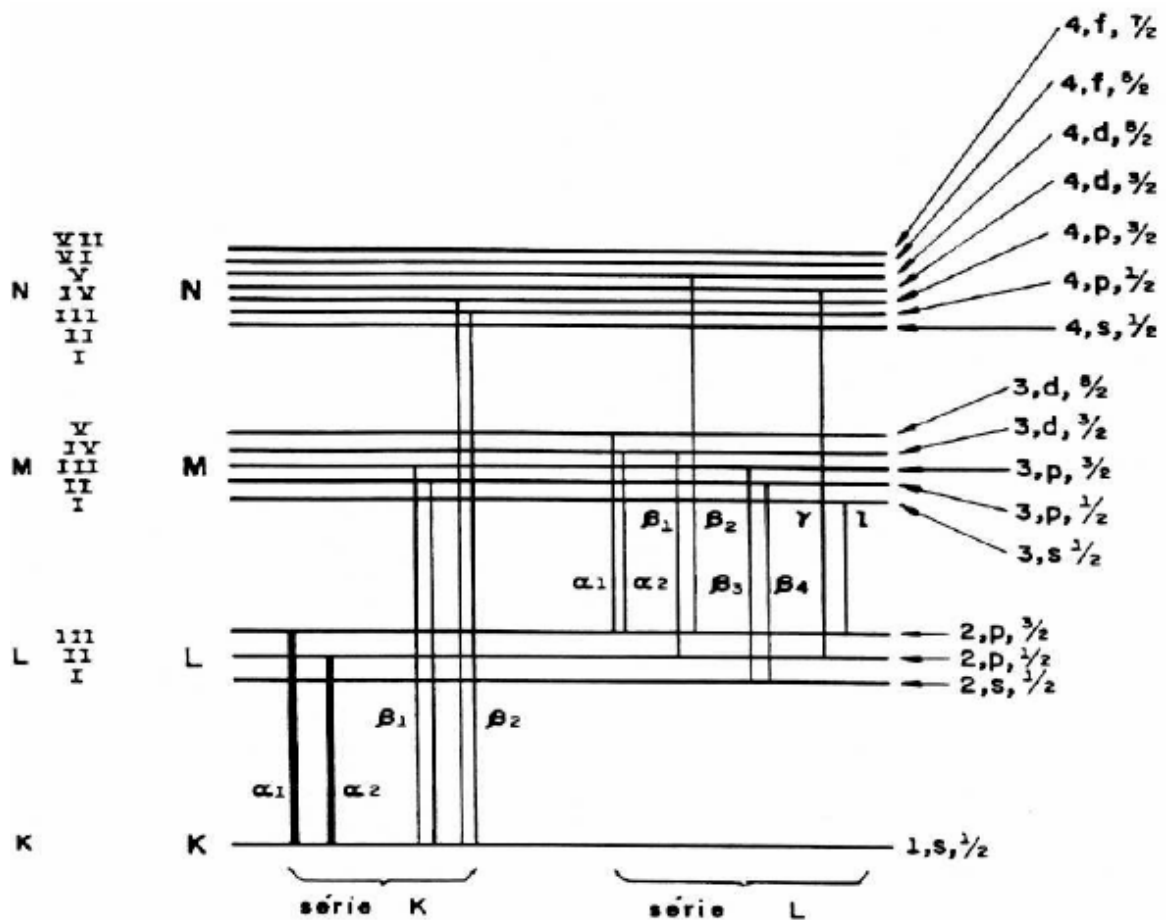
Fonte: EISBERG, 1974.

Regras de Seleção para os números quânticos:

$$\Delta l = \pm 1$$

$$\Delta n \geq 1$$

$$\Delta J = 0, \pm 1$$



**Figura 12** – Diagrama parcial dos níveis de energia que conduzem à emissão das linhas espectrais das séries K e L de um elemento.

Fonte: SANTOS (1999).

## 5 CÁLCULO DE ABSORÇÃO DE ENERGIA E TRANSFERÊNCIA DE ENERGIA

Através dos cálculos apresentados a seguir será possível calcular a dose de radiação utilizada neste trabalho, no final dos cálculos (item 5.1) será inserido valores referentes à distância fonte amostra e valores correspondentes à fonte de Pu.

Considerando uma parede espessa, paralela a fótons considerados monoenergéticos na figura 13, primeiro se determina a taxa à qual a energia é absorvida na parede, determinando a descrição do campo do fóton incidente. (TURNER, 1995).

Começamos assumindo que a parede é estreita comparada com o livre caminho dos fótons incidentes e secundários, de forma que (1) o espalhamento múltiplo de fótons na parede é desprezível e (2) virtualmente todos fótons de fluorescência e fótons de bremsstrahlung escapam da parede, (TURNER, 1995). Por outro lado, assumimos que os elétrons secundários produzidos pelos fótons são parados na parede. Considerando estas condições, a intensidade transmitida na figura 13 é determinada por:

$$\dot{\Psi} = \dot{\Psi}_0 e^{-\mu_{en}x} \quad (10)$$

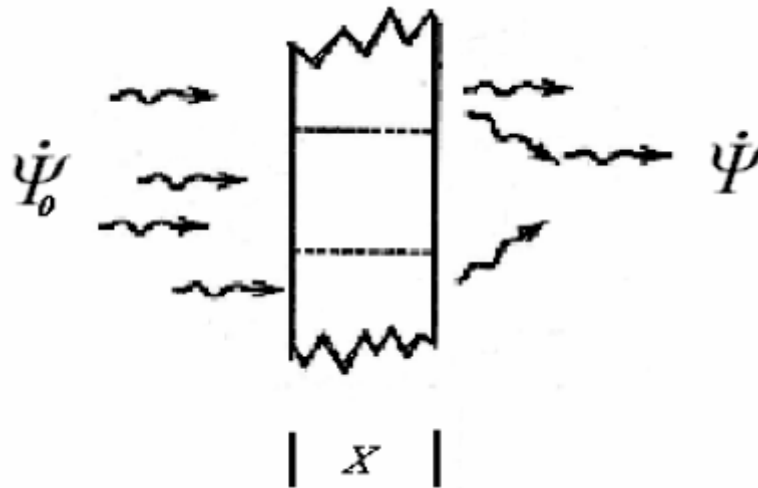
Onde  $\mu_{en}$  é o coeficiente de absorção de energia, e  $x$  é a espessura da parede. Para  $\mu_{en}x \ll 1$  que é consistente com nossas suposições podemos escrever:  $\exp(-\mu_{en}x) \approx 1 - \mu_{en}x$ . Da equação 10, obtemos:

$$\dot{\Psi}_0 - \dot{\Psi} = \dot{\Psi}_0 \mu_{en}x \quad (11)$$

Com referência à figura 13, a taxa à qual a energia é absorvida na parede correspondente a uma área  $A$  é  $(\dot{\Psi}_0 - \dot{\Psi})A = \dot{\Psi}_0 \mu_{en}xA$ . Como a massa da parede nesta área é  $\rho Ax$  onde  $\rho$  é a densidade da parede, a taxa de absorção de energia por unidade de massa,  $\dot{D}$ , na parede é:

$$\dot{D} = \frac{\dot{\Psi}_0 \mu_{en} \chi A}{\rho A x} = \dot{\Psi}_0 \frac{\mu_{en}}{\rho} \quad (12)$$

A quantidade que  $\dot{D}$  é, por definição, a taxa de dose comum na parede.



**Figura 13** – Taxa de absorção de energia por unidade de massa na parede (taxa de dose,  $\dot{D}$ ) é igual ao produto da intensidade incidente e coeficiente de absorção de energia por unidade de massa.

Fonte: TURNER (1995).

### 5.1 FONTE DE RAIOS GAMA OU X - EXPOSIÇÃO EM AR

Adaptando-se a fórmula para calcular a taxa de exposição no ar de uma fonte de raios gama ou X, com atividade C que emite um fóton de energia E por desintegração. A taxa de liberação de energia na forma de fótons de raios gama que escapam da fonte é CE. (TURNER, 1995). Desconsiderando a atenuação no ar, podemos escrever para a taxa de fluxo de energia, ou intensidade, pela superfície de uma esfera de raio r centrada

sobre a fonte  $\dot{\Psi}_0 = CE/(4\pi r^2)$ , ou para uma fonte irradiando em 180° (que é a situação

real da fonte)  $\dot{\Psi}_0 = CE/(2\pi r^2)$ . Onde 2π diz respeito à fonte de geometria anelar.

(ESTEVAM, 2003)

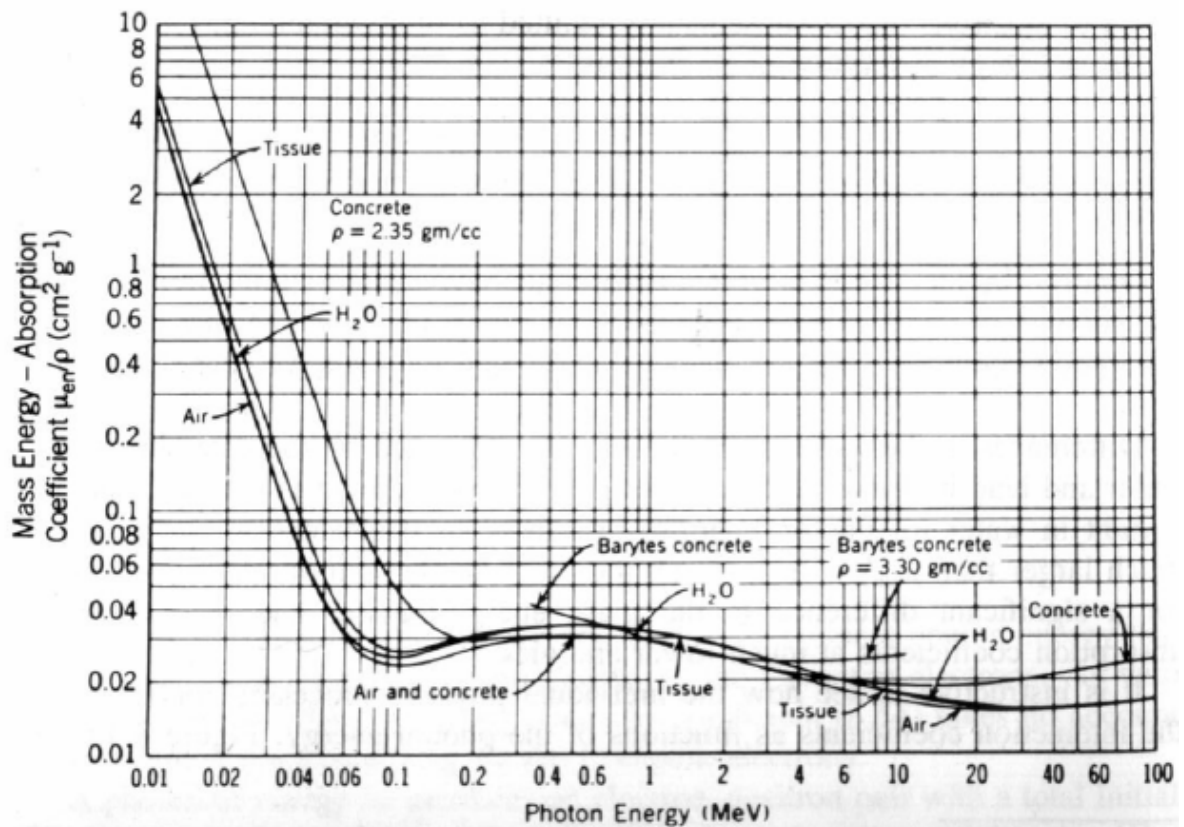
$$\int_0^{\pi/2} \sin \theta d\theta \int_0^{2\pi} d\varphi = 2\pi$$

Para fótons quase monoenergéticos, segue a equação 13:

$$\dot{D} = \frac{\dot{\Psi}_0 \mu_{en} xA}{\rho Ax} = \dot{\Psi}_0 \frac{\mu_{en}}{\rho} \quad (13)$$

Assim a taxa de dose absorvida no ar à distância r da fonte é:

$$\dot{D} = \dot{\Psi}_0 \frac{\mu_{en}}{\rho} = \frac{CE}{(2\pi r^2)} \frac{\mu_{en}}{\rho} \quad (14)$$



**Figura 14** – Gráfico do coeficiente de absorção de energia por unidade de massa versus energia do fóton.

Fonte: TURNER (1995).

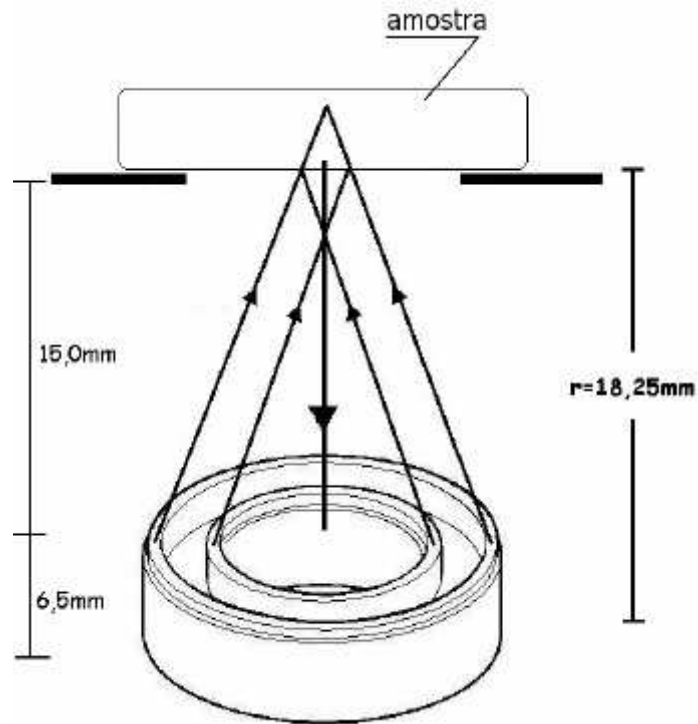
Aqui,  $\mu_{en}/\rho$ . é o coeficiente de absorção de energia por unidade de massa. Considerando o caso da dose absorvida na pele pelos fótons do  $^{238}\text{Pu}$  pode-se verificar, na figura 14, o valor do coeficiente de absorção de energia por unidade de massa para o ar (meio correspondente ao espaço amostra-fonte) e o valor para tecidos (correspondente à amostra), assim com o valor para  $\text{H}_2\text{O}$  (correspondente aos simulados de pele) para a energia média da fonte de  $^{238}\text{Pu}$  que é 17,2 KeV. Essa energia pode ser escrita em unidades de MeV como 0,015 MeV, verifica-se que para a energia de 0,015 MeV podemos considerar o mesmo valor do coeficiente de absorção de energia por unidade de massa para as três situações (ar, tecido e água), esse valor é aproximadamente  $1,2 \text{ cm}^2 / \text{g}$  que pode ser convertido para  $0,12 \text{ m}^2 / \text{kg}$ . Inserindo esse valor do coeficiente de absorção de energia por unidade de massa na equação 14, obtém-se:

$$\dot{D} = \dot{\Psi}_o \frac{\mu_{en}}{\rho} = \frac{CE}{r^2} \frac{0,12}{2\pi} \text{m}^2 / \text{Kg} \quad (15)$$

Conhecendo a atividade da fonte de  $^{238}\text{Pu}$  que era 100 mCi (valor inicial para controle de máximo) e convertendo essa em Bq ( $\text{s}^{-1}$ ), convertendo a energia de MeV para J, e convertendo o valor da distância r em m, obtemos a dose em  $\text{Gy s}^{-1}$ , que para raios X equivale a  $\text{Sv s}^{-1}$ . Esta relação pode ser escrita de forma mais conveniente. (ESTEVAM, 2003).

$$\dot{D} = \frac{\left\{ 100 \times 10^{-3} \frac{\text{Ci}}{\text{s}} \left[ 3,7 \times 10^{10} \frac{\text{Bq}}{\text{Ci}} \right] \right\} \left\{ 17,2 \times 10^3 \text{eV} \left[ 1,6 \times 10^{-19} \frac{\text{J}}{\text{eV}} \right] \right\} \left\{ 0,12 \frac{\text{m}^2}{\text{kg}} \right\}}{2\pi r^2} \text{Svs}^{-1} \quad (16)$$

Inserindo o valor da distância fonte-amostra (r) na equação, como mostra a figura 15:

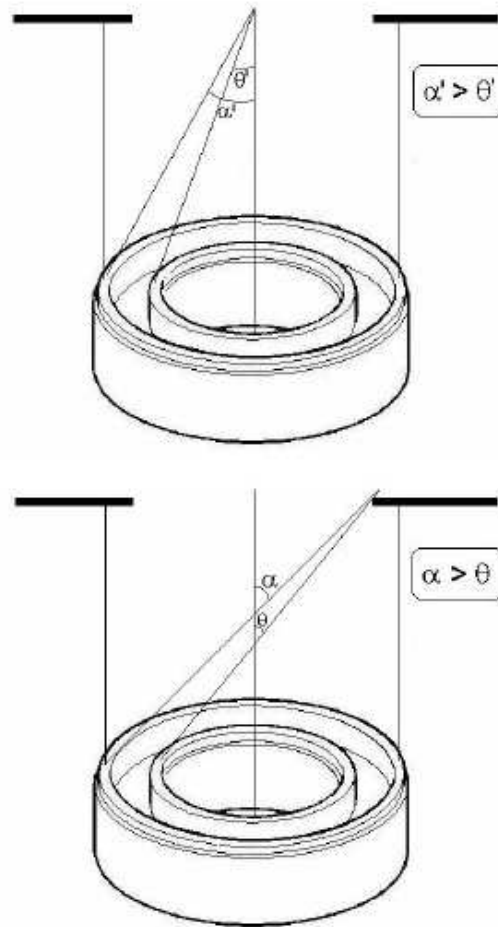


**Figura 15** – Geometria anelar da fonte de Pu.

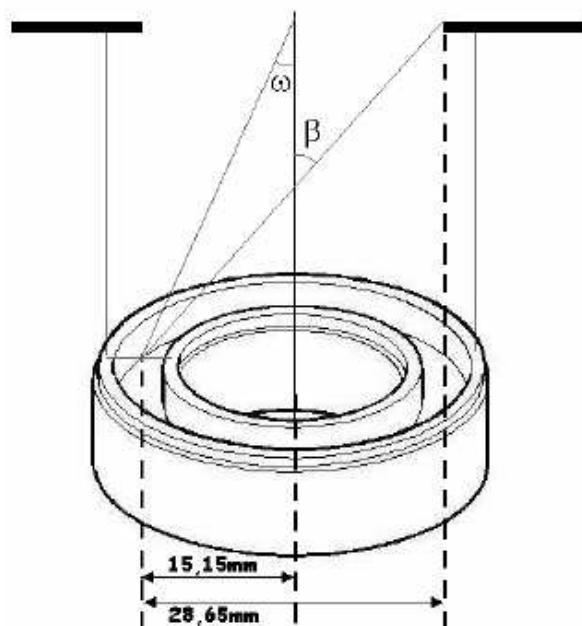
Inserindo também a correção de ângulo sólido na equação, temos:

$$\dot{D} = \dot{\Psi}_0 \cdot \frac{\mu_{en}}{\rho} d\Omega \quad \text{onde:} \quad d\Omega = \int_{\omega}^{\beta} \text{sen}\eta \cos\eta \, d\eta \int_0^{2\pi} d\varphi \quad (17)$$

Onde  $\beta$  e  $\omega$  são ângulos obtidos dos valores médios da base anelar (figura 17), o valor de  $\alpha$  e  $\theta$ , que são ângulos de variação máxima do espalhamento da radiação, podem ser obtidos geometricamente (figura 16):



**Figura 16** – Obtenção dos ângulos de  $\alpha$  e  $\theta$  geometricamente. Obtendo  $\beta$  e  $\omega$  geometricamente (figura 17):



**Figura 17** – Obtenção de  $\beta$  e  $\omega$  geometricamente

Obtendo a correção de ângulo sólido  $d\Omega$ :

$$d\Omega = \int_{0,25\pi}^{0,34\pi} \text{senn}\eta \cos\eta \, d\eta \int_0^{2\pi} d\varphi = 0,842 \quad (18)$$

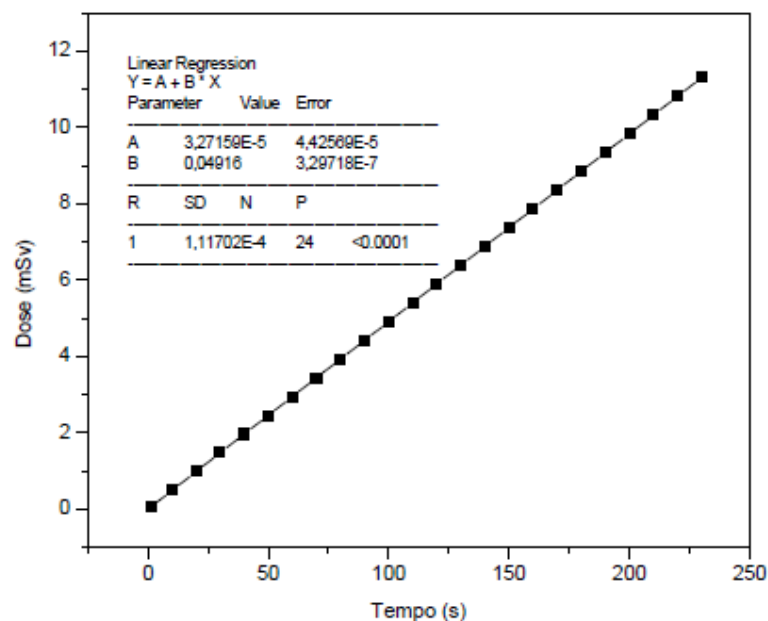
Adequando a equação de dose 16, para a geometria descrita, obtemos a equação 19 :

$$\dot{D} = \frac{\left\{ 100 \times 10^{-3} \frac{\text{Ci}}{\text{s}} \left[ 3,7 \times 10^{10} \frac{\text{Bq}}{\text{Ci}} \right] \right\} \left\{ 17,2 \times 10^3 \text{ eV} \left[ 1,6 \times 10^{-19} \frac{\text{J}}{\text{eV}} \right] \right\} \left\{ 0,12 \frac{\text{m}^2}{\text{kg}} \right\}}{2\pi r^2} \cdot 0,842 \text{ Sv s}^{-1} \quad (19)$$

Obtendo a equação 20, para dose de radiação pela fonte anelar de Pu em função do tempo:

$$\dot{D} = 4,9163 \times 10^{-5} \text{ Sv s}^{-1} \quad (20)$$

Construindo um gráfico com os valores para a dose em diversos tempos ( $r = \text{cte}$ ), realiza-se a relação linear entre dose e tempo (figura 18):



**Figura 18** – Gráfico da dose versus tempo de exposição obtido através da equação 20.

## 6 MATERIAIS E MÉTODOS

No caso de metais pesados a viabilidade da XRF *in vivo* pode ser atribuída ao alto rendimento e penetração dos raios X fluorescentes nas amostras.

Enquanto é aparente que o sistema de XRF é mais bem adaptado à detecção de elementos com número atômico alto, a metodologia XRF *in vivo* pode ser ainda mais valiosa em outras situações, como por exemplo, medindo níveis elevados de elementos com número atômico relativamente baixo que estão presentes na camada da epiderme da pele.

### 6.1 SIMULADOS E ATENUAÇÃO DA PELE

Os simulados de pele são constituídos de soluções aquosas acrescidas de Fe, colocados em recipientes plásticos (lavados com Ácido Nítrico HNO<sub>3</sub> (1%), durante 24 horas e lacrados com filme fino. (ESTEVAM, 2003).

Vários simulados de pele foram confeccionados. O primeiro, "branco", com água pura (destilada e deionizada), os demais acrescidos de solução de Fe, de 15 ppm, 40 ppm, 70 ppm, 100 ppm e 150 ppm de Fe. Também foram confeccionados simulados testes com concentrações de Fe de 30 ppm, 50 ppm e 120 ppm.

Também foram confeccionados simulados de pele acrescidos de solução de sulfato de Fe (FeSO<sub>4</sub>7H<sub>2</sub>O) com PM = 278,01 da LABSYNTH Ltda. Com essa solução foram elaborados simulados de 15 ppm, 40 ppm, 70 ppm, 100 ppm e 150 ppm de sulfato de ferro. Novamente foram confeccionados simulados testes com 30 ppm 50 ppm e 120 ppm de sulfato de ferro.

As curvas de calibração ou de sensibilidade para os simulados de ferro e de sulfato de ferro foram comparadas através do erro apresentado pelos simulados testes e pelo coeficiente de determinação R<sup>2</sup>.

Os valores dos simulados foram escolhidos, de acordo com Gorodetsky *et al* (1990), que obtiveram para pele normal valores de 5,6 a 14,0 ppm de Fe e para tecido de portadores de  $\beta$ -Thalassaemia valores variando de 13,7 a 150,0 ppm de Fe.

Com as medidas feitas com o primeiro e segundo grupo de simulados criou-se um modelo de calibração, através de uma regressão linear dos pontos correspondentes às

concentrações e às intensidades líquidas (contagens / tempo de medida). Através desta curva de sensibilidade foram verificadas as concentrações dos simulados testes e calculado o seu desvio. (ESTEVAM, 2003), calculando-se, também, o limite de detecção (LLD) do sistema para diversos tempos.

O erro na concentração de Fe nos simulados, determinado pela precisão no equilíbrio químico e devido a erros durante a confecção dos mesmos foi estimado como de  $\pm 5$  ppm.

A espessura dos simulados foi calculada para conhecer a profundidade de interação dos raios X com a amostra, o cálculo é mostrado a seguir.

Segundo Berger e Hubbell (1987) o coeficiente de atenuação linear da pele para uma energia de 8,4 keV é  $\mu = 9,036 \text{ cm}^{-1}$

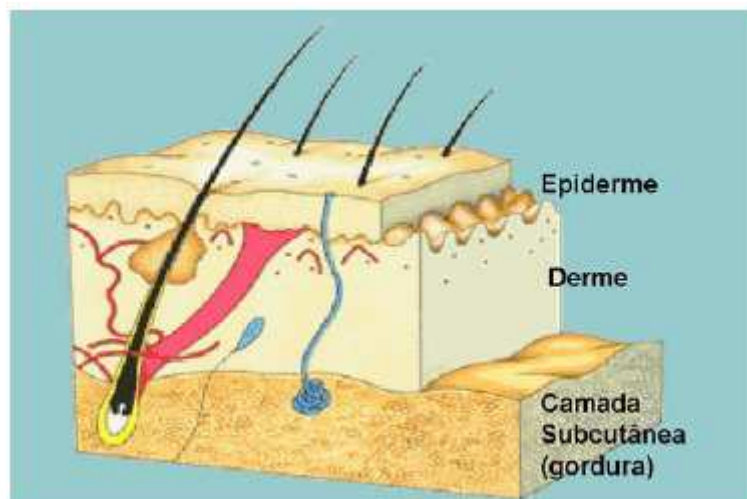
A equação aproximada da passagem da radiação eletromagnética através da matéria se caracteriza por uma absorção exponencial:

$$I = I_0 e^{-\mu x} \quad (21)$$

Onde  $I$  ou  $\Psi$  é a intensidade de radiação emergente da matéria e  $I_0$  ou  $\Psi_0$  é a intensidade de radiação incidente.

Para  $x = 1\text{mm}$ ,  $I = 0,40 I_0$ . Como para fluorescência do ferro, temos  $K\alpha = 6,4 \text{ keV}$ , decorre que  $\mu = 20,4 \text{ cm}^{-1}$ , assim obtemos  $I = 0,13I_0$ .

Portanto apenas 13% dos fótons de fluorescência da camada K gerados a uma profundidade de 1mm emergem da pele. A detecção do Fe por XRF é predominante nas camadas mais superficiais da pele, uma vez que aproximadamente 87% dos fótons de fluorescência são gerados em profundidades inferiores a 1mm. A interação da radiação com a matéria acontece somente na camada da epiderme da pele, que é pouco vascularizada (figura 19):



**Figura 19** – Camadas da pele, epiderme, derme e subcutânea.  
Fonte: PHARM (2004).

## 6.2 SISTEMA DE AQUISIÇÃO DE DADOS E DETECTOR SI PIN-DIODO

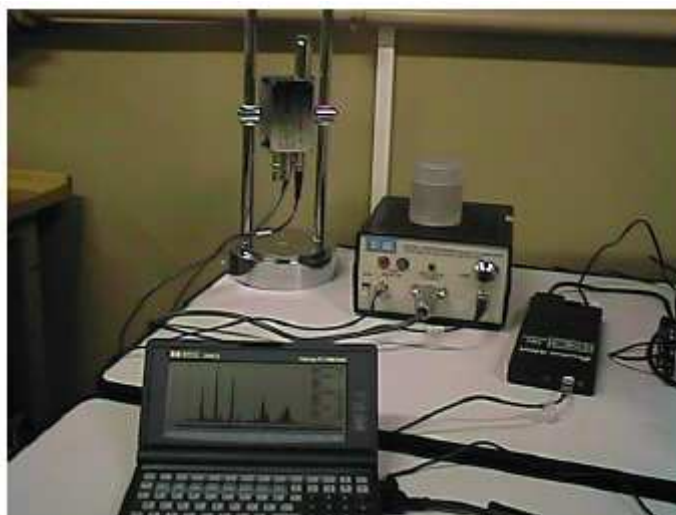
O Modelo XR-100CR é um detector de raios X de alta performance, com pré-amplificador, e com um sistema de resfriamento termoelétrico por efeito Peltier e Si-PIN Fotodiodo. Estes componentes resistem até aproximadamente  $-30^{\circ}\text{C}$ , e podem ser monitorados por um sensor de temperatura interno. O revestimento TO-8 do detector 47 possui uma abertura para detecção com uma janela de Berílio de 1 mil ( $25\mu\text{m}$ ). (POCKET MCA, 2000).



**Figura 20** – O detector XR-100CR, da AMPTEK inc e o suporte acrílico para acoplamento da fonte e amostra.

O sinal do XR-100CR é formatado pelo amplificador PX2CR. O sistema de XR-100CR/PX2CR assegura o estado de operação em menos de um minuto.

A resolução para o pico de 5,9 eV do  $^{55}\text{Fe}$  é de 220 eV FWHM com "rise time" de 12 $\mu\text{s}$  (padrão) e 186 eV FWHM com "rise time" de 20 $\mu\text{s}$  (opcional). (OPERATING MANUAL, 1998).



**Figura 21** – Vista geral de todo o sistema de aquisição de dados.

### 6.3 METODOLOGIA DE ANÁLISE

A análise dos espectros de energia dos raios X é bastante complexa, uma vez que na região de uma determinada linha característica K pode ocorrer a contribuição dos raios X das linhas L de elementos mais pesados. Também pode ocorrer superposição de picos  $K\alpha$  do elemento adjacente, de número atômico menor. Desta forma é necessário um aplicativo que realize a desconvolução de todos os possíveis picos das várias linhas de raios X existentes no espectro. Foram utilizados dois softwares para a análise, o PMCA da AMPTEK inc e o WinQxas da IAEA. Esses softwares são descritos nos itens 6.3.1 e 6.3.2

### 6.3.1 Software de Análise de Espectros e Aquisição de Dados "Pmca"

Este software é fornecido por "AMPTEK inc" empresa que desenvolve equipamentos e softwares de aplicação em Física Nuclear, (<http://www.amptek.com/>).

O Software PMCA "multichannel analyzer pocket mca" versão 2.0.1, permite aquisição de dados e análises de espectros. Este software possui a opção de seleção da região de interesse (ROI), calibração de energia (inserida pelo usuário de fontes externas), procura de picos, informação sobre picos (livraria), espectros múltiplos, e operações matemáticas com os espectros.

O Software de PMCA adquire e exhibe todos os dados transmitidos pelo MCA8000A (analisador multicanal com 16K de canais): dados espectrais, tempo real e tempo "vivo", e parâmetros de funcionamento, inclusive o estado da bateria se estiver sendo usada

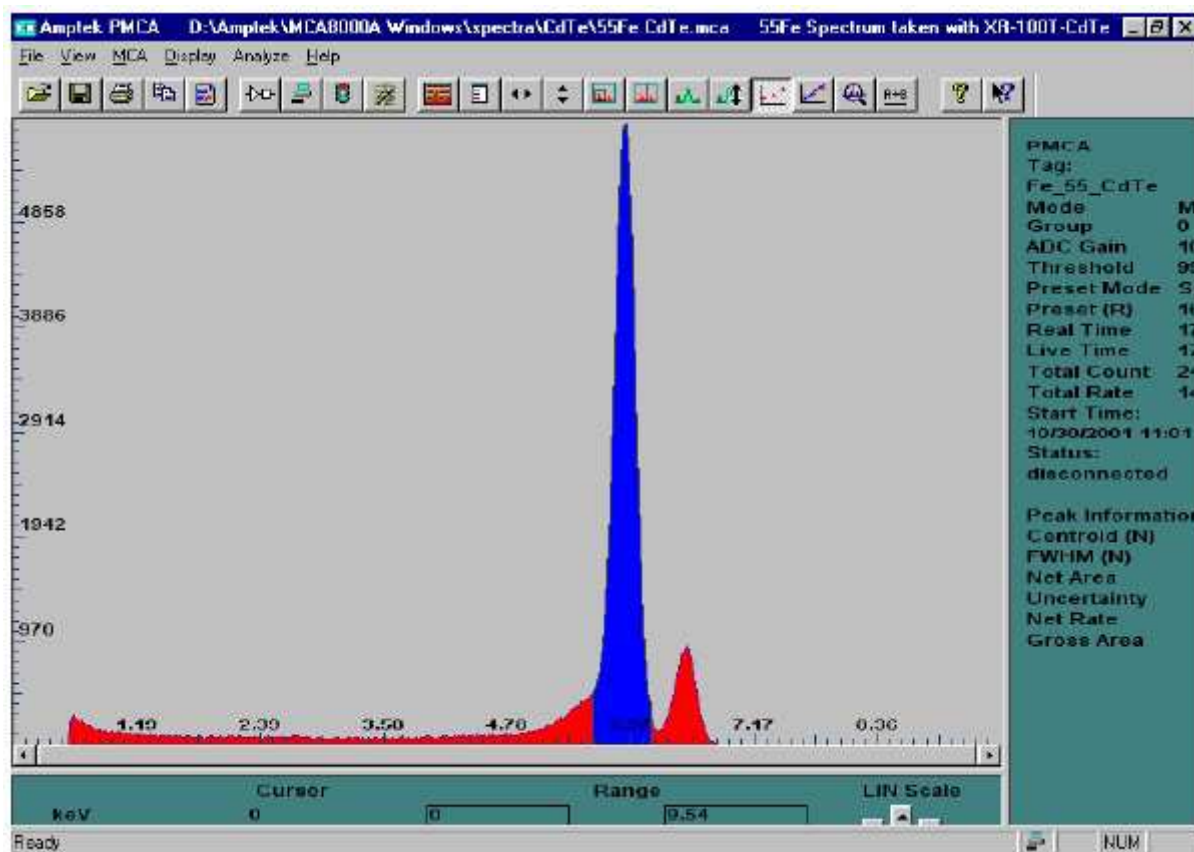
Entre as ferramentas primárias do Software PMCA, existe uma rotina de procura de pico semi-automática que marca os cumes identificados com os ROIs inseridos pelo usuário. Cálculos com os picos são automáticos FWHM "Full Width - Half Maximum" e exibidos em canais ou unidades de calibração definidas pelo usuário.

A versão do Windows do Software PMCA inclui uma biblioteca isotópica e listas de linhas de emissão de raio X. As informações sobre o pico são mostradas no painel e automaticamente é sugerido o isótopo ou linha de raio X mais próximo ao pico. Podem ser exibidos múltiplos espectros simultaneamente e podem ser executadas operações matemáticas nos espectros. (AMPTEK, 2004).

Depois de concluído o ajuste do espectro esse programa fornece informações descrevendo, entre outras informações, a área total e a área líquida do espectro.

Este software apresenta uma desvantagem comparado ao programa WinQxas "Quantitative X-Ray Analysis System" (versão Windows), pois não realiza o ajuste interativo até estabelecer um espectro com os picos desconvolucionados, levando em conta a superposição de linhas. Esta rotina é capaz de ajustar o espectro de forma que a diferença entre as intensidades calculadas e experimentais seja mínima.

A figura 22 mostra uma visão geral do software PMCA sendo utilizado.



**Figura 22** – Tela do software PMCA para Windows.

### 6.3.2 Software de Análise de Espectros "WinqXas"

Este software é fornecido pela Agência Internacional de Energia Atômica, (<http://www.iaea.or.at/>).

WinQXAS (v.1.23) é uma versão adaptada para Windows do software QXAS (ambiente DOS). Este software, que foi desenvolvido na Universidade da Antuérpia, Bélgica, denominado AXIL (Analysis of X Ray Spectra by Iterative Least Squares Fitting). (ESTEVA, 2005 a)

Após a obtenção dos espectros de raios X esses passam por um ajuste matemático para se obter as áreas líquidas sob os picos. 51

Este software possui os mesmos recursos descritos no item anterior relacionado ao software PMCA, acrescido da rotina responsável pelas operações matemáticas de desconvolução dos picos no espectro.

Para utilizar esse software é necessário criar um modelo (arquivo .MOD), ou seja, fornecer ao programa os elementos que estão presentes em uma amostra conhecida, as condições de excitação que foram utilizadas, as características do detector, calibração do detector (relação entre a energia e o número de canais) e o tipo de espectro contínuo mais adequado. (ESTEVAM, 2005 a).

Feito isso, o software realiza o ajuste interativo dos demais espectros utilizando o espectro de calibração como modelo, até estabelecer um espectro teórico, onde a soma dos quadrados da diferença entre as intensidades calculadas e experimentais seja mínima (quantidade denominada qui-quadrado e representada por  $\chi^2$ ). (ESTEVAM, 2005 a).

Depois de concluído o ajuste espectral, o programa fornece um relatório contendo as informações referentes à energia, área líquida dos picos, desvio padrão e valor do  $\chi^2$ , para cada linha espectral dos elementos analisados.

A figura 23 mostra uma visão geral do funcionamento do software WinQxas, a figura 24 mostra alguns parâmetros da análise feita pelo software.

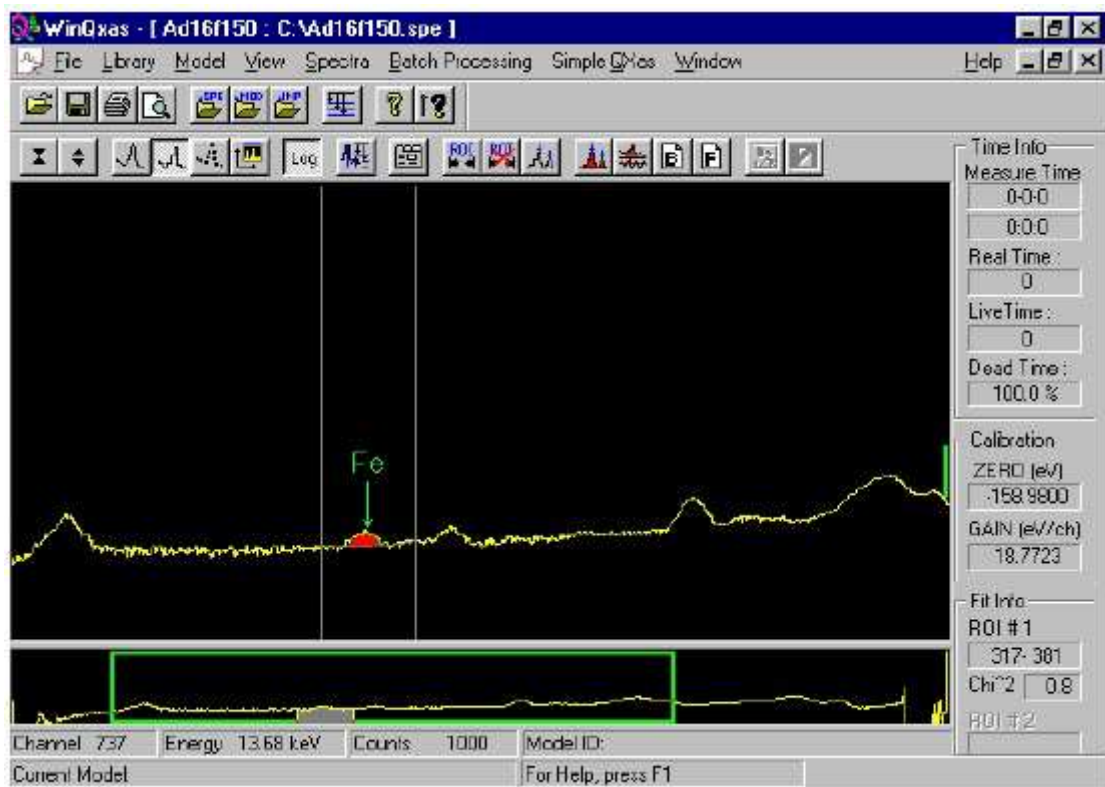
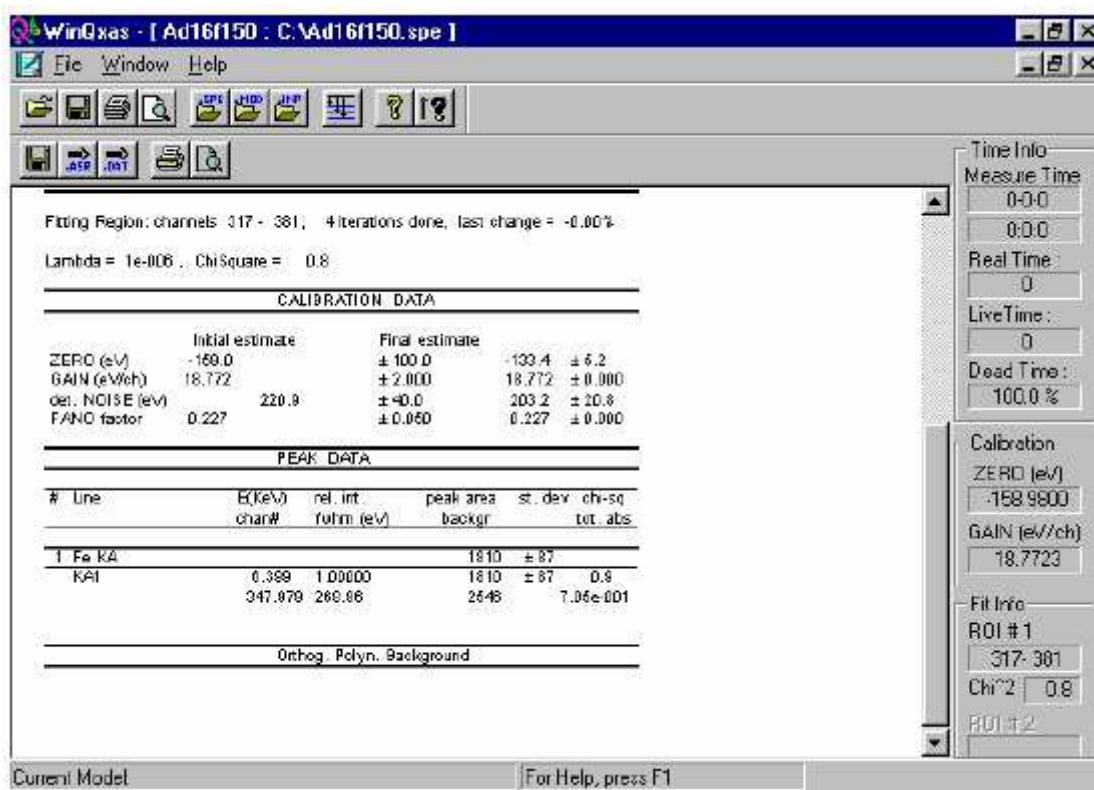


Figura 23 – Tela do software WinQxas versão 1.23.



**Figura 24** – Janela com parâmetros da análise realizada pelo software WinQxas versão 1.23.

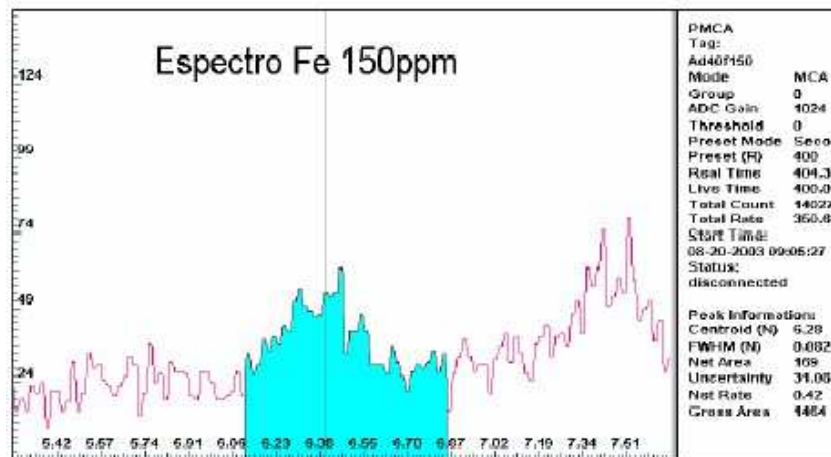
### 6.3.4 Espectro Líquido

A obtenção das áreas líquidas foi realizada no softwares PMCA e no software Origin para os espectros analisados pelo WinQxas. A seguir o procedimento ilustrado no software PMCA da obtenção das áreas líquidas.

A análise utilizando esse software consiste em três fases: (1) definir um ROI adequado para o pico do ferro - como esse software não possui uma rotina capaz de distinguir os picos  $K\alpha$  e  $K\beta$ , o ROI foi definido englobando um aparente pico entre

"vales" laterais da energia  $K\alpha$ . Através desse ROI são obtidas duas áreas: a total ou "gross area" e a líquida ou "net area"; (2) mantendo esse mesmo ROI obtêm-se a área total e líquida no espectro da água pura; (3) subtraem-se os espectros, função existente neste software, assim obtêm-se um espectro líquido, que é analisado com o mesmo ROI. (ESTEVAM, 2003).

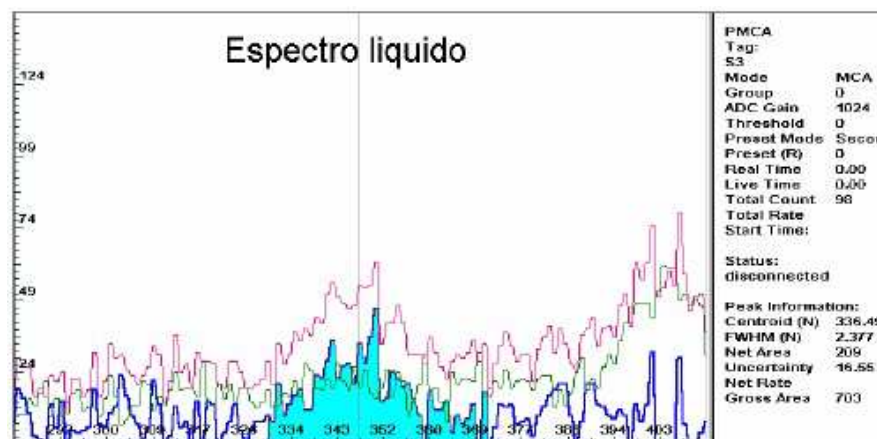
A seqüência de tratamento dos espectros no software PMCA é mostrada nas figuras 25, 26 e 27 a seguir:



**Figura 25** – Espectro do simulado de 150 ppm, análise da área do simulado no software PMCA.



**Figura 26** – Espectros da água pura, análise da área da água pura no software PMCA



**Figura 27** – Sobreposição dos espectros e subtração (em azul) dos espectros de água pura e simulado de 150 ppm, análise do espectro liquido no software PMCA. Observação: durante a operação com espectros o eixo horizontal fica com valores de canal.

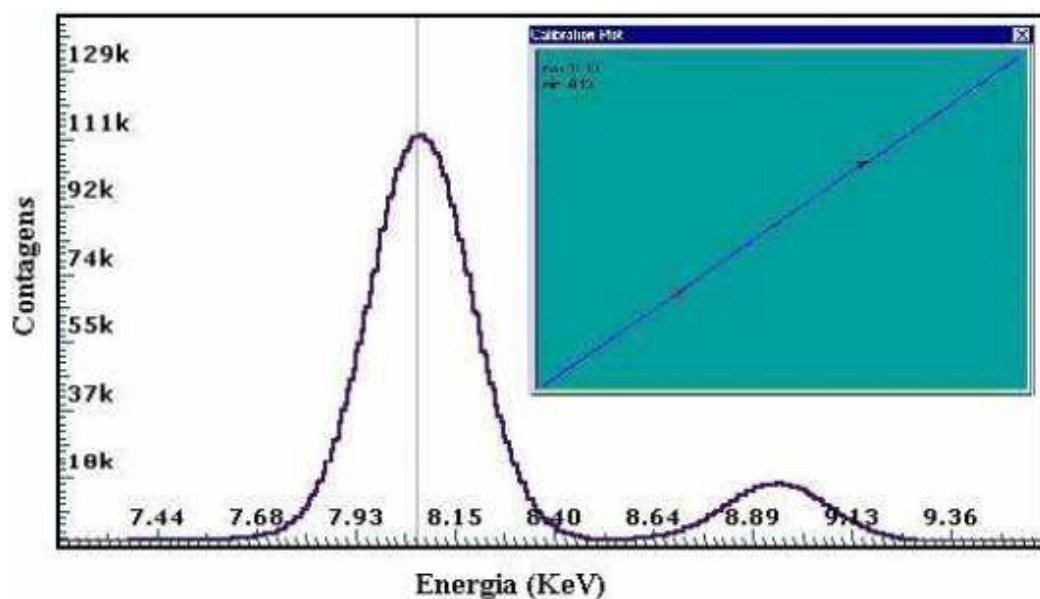
## 7 RESULTADOS

### 7.1 CALIBRAÇÃO DO SOFTWARE PMCA

Antes de analisar qualquer espectro com o software é necessário que este seja calibrado. Calibrar o software é relacionar o canal de aquisição com a energia correspondente.

Uma calibração incorreta ou a não calibração do software significa uma falsa análise, ou seja, os picos selecionados não irão corresponder as suas respectivas energias.

O software PMCA possui um comando de calibração onde deve ser inserido pelo menos dois valores referentes a canais e energias. Quanto mais informações corretas de energias de picos e seus respectivos canais melhor será a calibração. Para realizar essa calibração foram utilizados dois espectros. O primeiro espectro foi obtido através de uma amostra de água contendo Cu, o segundo com uma amostra contendo Pb. A calibração realizada pelo espectro de Cu foi inserida como modelo para o espectro de Pb para diminuir o erro, esse novo modelo foi utilizado na análise do software PMCA. A figura 28 mostra o espectro de calibração do software PMCA. (ESTEVAM, 2003).



**Figura 28** – Espectro de calibração de Cu no software PMCA, a janela no canto superior direito é a curva de calibração do software.

## 7.2 CALIBRAÇÃO DO SOFTWARE WINQXAS

Para calibrar o software é necessário realizar uma medida utilizando amostras padrão, de preferência com intervalo de energias de picos englobando as energias dos picos das amostras a serem analisadas. Essa medida deve ocorrer com um tempo razoavelmente alto para minimizar os erros.

O software foi calibrado como uma amostra de Fe e Cu, e um tempo de medida de 50 segundos.

O espectro da calibração esta no formato “spe”, deve-se reconhecer visualmente no software cada um dos picos  $K\alpha$  e  $K\beta$  de cada elemento. (ESTEVAM, 2005 a).



**Figura 29** – software WINQXAS – definindo a energia de calibração.

Os dois primeiros picos correspondem a  $K\alpha$  e  $K\beta$  do Fe, os dois seguintes correspondem a  $K\alpha$  e  $K\beta$  do Cu, a calibração é feita ou utilizando o maior número de picos (quatro no caso) ou utilizando a maior separação entre os picos, ou seja, escolhendo  $K\alpha$  do Fe e  $K\beta$  do Cu. (ESTEVAM, 2005 a).

### 7.3 COMPARAÇÃO E VALIDAÇÃO DAS CURVAS DE SENSIBILIDADE.

Cada concentração química dos simulados corresponde a uma determinada intensidade líquida (contagens / tempo de medida). Construindo-se gráficos de concentração dos simulados versus intensidades líquidas, foi obtida uma curva de sensibilidade. Podemos validar a curva de sensibilidade obtida, utilizando as intensidades líquidas dos simulados teste.

Toda a comparação entre as curvas foi realizada para um tempo de medida de 50 s, tempo que foi utilizado na medidas *in vivo*.

Os simulados de pele foram confeccionados com soluções aquosas de água destilada e deionizada dopadas com solução de Fe para o 1º grupo e o 2º grupo foi dopado com solução de sulfato de Fe ( $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ) com PM = 278,01 da LABSYNTH Ltda. Os resultados são mostrados na tabela 3.

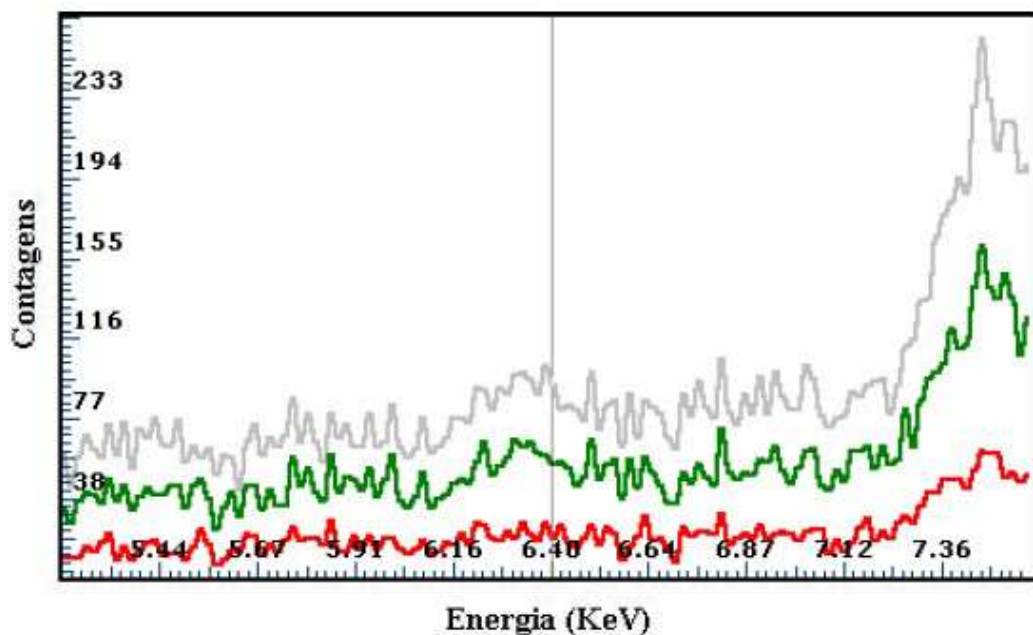
**Tabela 3** – Comparação entre as curvas de sensibilidade para os dois grupos de simulados com tempo de medida de 50 s.

	Simulado de 30 ppm	Simulado de 50 ppm	Simulado de 120 ppm	LLD médio	Coefficiente de determinação ( $R^2$ )
Grupo 1	60 ppm	56 ppm	141 ppm	76 ppm	0,76
Grupo 2	37 ppm	56 ppm	129 ppm	13 ppm	0,97

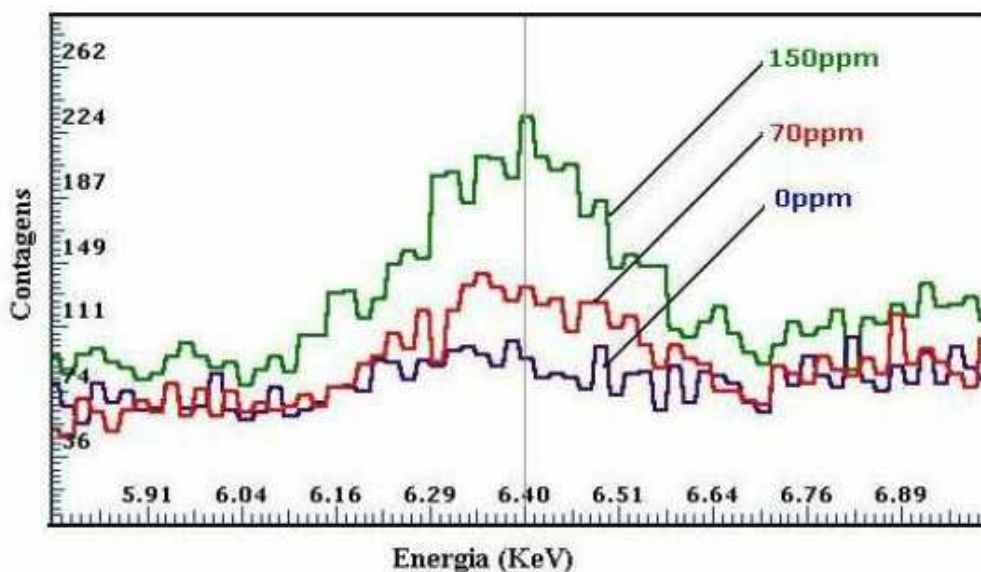
Os resultados da tabela 3 mostram que o grupo 2 apresentou maior coeficiente de correlação, menor LLD e um erro menor para os simulados testes. Desta forma a curva de sensibilidade utilizada nas medidas *in vivo* foi elaborada com os resultados do grupo 2.

#### 7.4 COMPARAÇÃO DOS SOFTWARES PMCA E WINQXAS

Todos os espectros foram analisados com o software PMCA, com exceção dos espectros com tempo de medida de 10 segundos, uma vez que esse software não apresentou sensibilidade suficiente para tais análises, o software PMCA não discriminou área líquida do Fe para nenhum dos espectros obtidos com tempo de 10 59 segundos, esses espectros foram analisados apenas pelo software WinQxas. As figuras 30 e 31 mostram os espectros medidos para diferentes concentrações dos simulados e diferentes tempos de medida. Em destaque na figura 31, no eixo vertical os picos do Fe (6,4 keV), mostrando que o "branco" - amostra de água destilada e deionizada - contém uma pequena quantidade de Fe. (ESTEVAM, 2003).

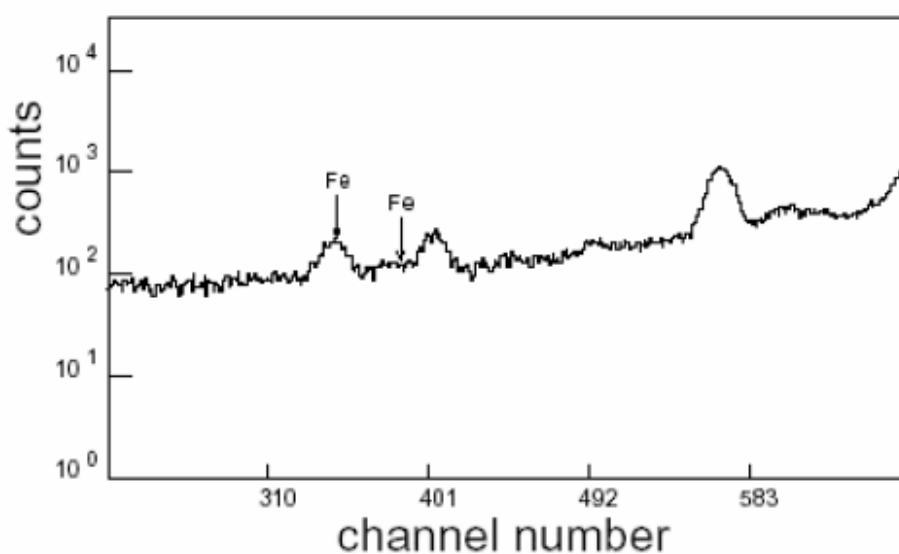


**Figura 30** – Espectro obtido através do software PMCA, para a amostra "branca" com um tempo de medida (de baixo para cima) de 400 s, 1000 s e 1600 segundos.



**Figura 31** – Espectros obtidos através do software PMCA, de cima para baixo os simulados de 150 ppm, 70 ppm de Fe e branco com um tempo de medida de 400 segundos. A linha destacada no eixo vertical mostra o pico do Fe (6,4 keV).

Todos os espectros foram analisados pelo software WinQxas. Este Software não possui uma rotina presente no PMCA, ele não abre dois espectros simultaneamente, portanto, não permite realizar operações com espectros, como por exemplo, o cálculo de área líquida. Estes cálculos foram feitos exportando os dados dos espectros para outro software, o Origin da Microcal.



**Figura 32** – Espectro obtido através do software WinQxas, para o simulados de 150 ppm de Fe com um tempo de medida de 50 segundos, em destaque os picos  $K\alpha$  (esquerda) e  $K\beta$  (direita) do Fe.

**Tabela 4** – Comparação da sensibilidade e precisão dos softwares PMCA e WinQxas.

Software	Tempo de medida								
	400 s			1000 s			1600 s		
Simulados (ppm)	30	50	120	30	50	120	30	50	120
Erro percentual do WinQxas	15%	10%	5%	50%	0%	4%	13%	4%	2%
Erro percentual do PMCA	----	----	6%	77%	24%	1%	7%	2%	2%

Fonte: ESTEVAM (2003).

Quanto à precisão os dois softwares apresentaram valores próximos, erros que vão de 1% até 77%, mas o software WinQxas apresenta uma maior sensibilidade porque possui a rotina de desconvolução dos picos e o PMCA não. Assim somente o WinQxas apresentou valores para as medidas de 30 ppm e 50 ppm de Fe para tempos de medida abaixo de 400s, Este foi o software utilizado na análise das medidas *in vivo*.

#### 7.5 ANÁLISE COM O SOFTWARE WINQXAS PARA O TEMPO DE MEDIDA DE 10 S

Buscando uma dose mínima de radiação foram analisados os resultados para um tempo de medida de 10 s. Na tabela 5 são apresentados os valores da concentração dos simulados confeccionados (Cc), concentração medida (Cm) e diferença percentual entre elas.

**Tabela 5** – Concentração dos simulados teste (confeccionada e medida) e diferença percentual.

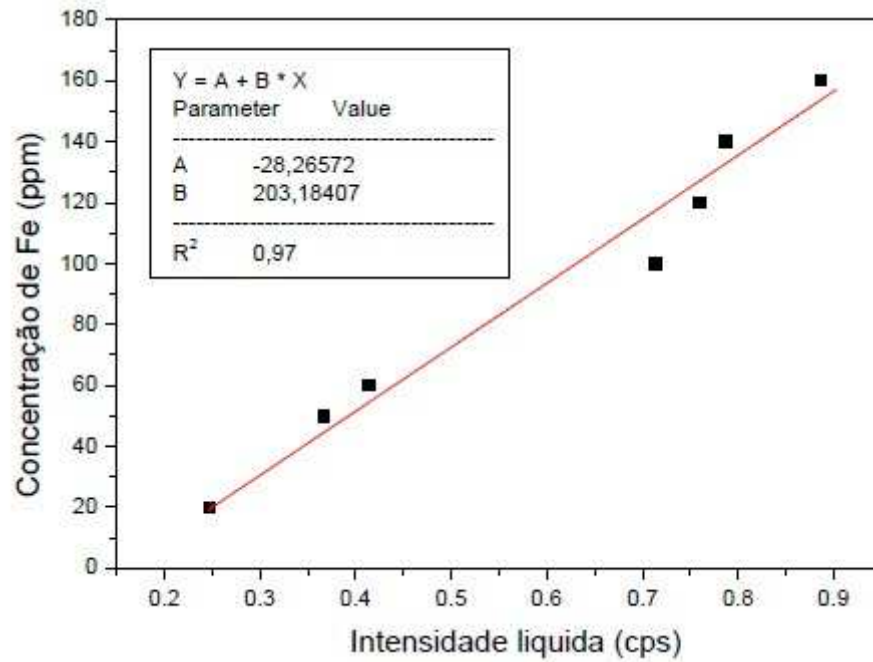
Concentração dos simulados teste confeccionados (Ctc) (ppm)	Concentração medida dos simulados teste (Cm) (ppm)	Diferença (Cm - Ctc)%
30 ± 5	65 ± 19	- 117
50 ± 5	40 ± 5	-20
120 ± 5	127 ± 9	+6

Student,  $p < 0,05$ .

A medida com 10 s apresenta *in vivo* uma dose de aproximadamente 2 mSv, mas este tempo de medida apresentou um erro de 117% para medidas de 30 ppm de ferro. (ESTEVAM, 2003). Aumentando-se o tempo de medida, para 50 s, em busca de um melhor resultado a dose máxima alcançada é 10 mSv, segundo Gorodetsky *et al* (1990) pessoas sadias podem apresentar quantidades menores que 30 ppm de ferro na pele. Os 62 resultados para as medidas de 50 s são apresentados na tabela 3 da página 56 e no item 7.6 a seguir.

#### 7.6 ANÁLISE COM O SOFTWARE WINQXAS PARA O TEMPO DE MEDIDA DE 50 S

As medidas de 50 s apresentam dose menor que 10 mSv. A figura 33, a seguir, apresenta a curva de sensibilidade para calibração do sistema com ajuste linear e coeficiente de determinação 0,97.



**Figura 33** – Curva de sensibilidade para medidas de 50 s.

Na tabela 6 são apresentados os valores da concentração dos simulados confeccionados (Cc), concentração medida (Cm) e diferença percentual entre elas. 63

**Tabela 6** – Concentrações confeccionadas (Cc) e medidas (Cm) e diferença percentual para medidas de 50 s.

Cc (ppm)	30	50	120
Cm (ppm)	37	56	129
Diferença percentual	+23 %	+12 %	+8 %

## 8 NÍVEIS DE Fe PARA HUMANOS SADIOS E PORTADORES DE $\beta$ -THALASSAEMIA.

As medidas de XRF *in vivo* em pele humana, da mão, foram realizadas no Hemocentro do HU da UEL e no Laboratório de Física Nuclear Aplicada também da UEL, sendo supervisionadas pelo professor Dr. Carlos Roberto Appoloni.

Foram medidas 4 pessoas sadias e 1 portador de  $\beta$ -Thalassaemia. Todos os voluntários medidos assinaram um termo de consentimento livre e esclarecido (Anexo 1).

O presente trabalho foi previamente submetido e aprovado pelo Comitê de Ética, com o parecer de aprovação (Anexo 2).

As medidas foram realizadas em triplicata. A figura 33 mostra a medida sendo realizada em uma pessoa sadia.

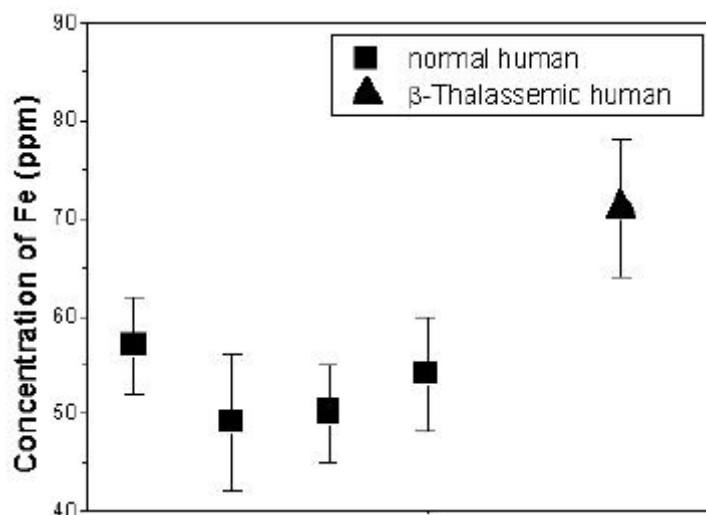


**Figura 34** – Medida de XRF *in vivo* na pele da mão.

As medidas do portador de  $\beta$ -Thalassaemia foram realizadas no Hemocentro. As medidas foram de 50 s o paciente permaneceu deitado no leito padrão do Hemocentro, esta posição foi escolhida para não causar desconforto ao paciente.

Antes de realizar as medidas, a pele da mão dos participantes foi limpa com sabão cirúrgico inerte durante 5 minutos.

A figura 35 mostra os níveis de ferro medidos em humanos normais e portadores de  $\beta$ -Thalassaemia.



Student,  $p < 0,05$ .

**Figura 35** – Variação dos níveis ferro na pele humana sadios e de portadores de  $\beta$ -Thalassaemia medidos por XRF *in vivo*.

Fonte: ESTEVAM (2005 b).

Através dos resultados apresentados na figura 35 foi possível verificar que o portador de  $\beta$ -Thalassaemia possui uma maior concentração de ferro na pele. Esse excesso de ferro decorrente do tratamento da doença é levado para o interior do organismo através da hemoglobina que está no interior dos glóbulos vermelhos transfundidos para o corpo do portador de  $\beta$ -Thalassaemia.

Portanto, através desse tratamento o paciente tem o nível de glóbulos vermelhos normalizado mas o ferro do interior da hemoglobina que esse paciente produz precariamente somado ao ferro proveniente das transfusões, causa um aumento do nível do ferro no corpo todo. Esse aumento também pode ser observado na pele (figura 35).

O ferro em excesso é levado para todo o corpo através da corrente sanguínea que é responsável pela troca de nutrientes das células, por exemplo, assim esse ferro chega até a pele por capilares sub cutâneos.

O valor médio do nível de ferro das pessoas normais medidas foi de  $53 \pm 14$  ppm e o nível de ferro do portador de  $\beta$ -Thalassaemia foi de  $74 \pm 6$  ppm. 66

Esse resultado sugere que os níveis de ferro da pele podem corresponder aos níveis de ferro do corpo como um todo, podendo estar correlacionados com os níveis de ferro de órgãos e aos níveis de ferritina da corrente sanguínea.

Correlacionando os níveis de ferro da pele com níveis de ferro de órgãos como o fígado medidos por biopsia ou níveis de ferro obtidos através da medida da ferritina é possível utilizar a XRF *in vivo* como meio alternativo para o monitoramento da eficácia do tratamento de quelação em pacientes portadores de  $\beta$ -Thalassaemia.

## 9 ANIMAIS

Utilizamos camundongos Swiss machos de 8 a 12 semanas de idade, obtidos Biotério Central do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Estadual de Londrina Os camundongos foram mantidos no Biotério do Departamento de Ciências Patológicas da UEL em gaiolas coletivas, comportando de 5 animais cada. Água e ração foram distribuídos “ad libitum”. Camundongos dos grupos experimentais e controles possuíam aproximadamente a mesma idade.

### 9.1 PARASITAS E INFECÇÃO

Os animais foram infectados por via intraperitoneal (ip), com 5000 formas tripomastigotas sanguícolas de *Trypanosoma cruzi* (Cepa Y) (Figuras 35-37), obtidas por sangria retro-orbital de camundongos Swiss inoculados semanalmente pela via intraperitoneal com 200.000 formas sanguícolas, usadas para a manutenção de *T. cruzi in vivo*.

A avaliação da concentração de parasitas circulantes foi realizada através de contagem em microscópio óptico, do número de parasitas presentes em 5µl de sangue, retirados da cauda dos camundongos. Os resultados foram expressos em número de parasitas/mL de sangue.

### 9.2 ANÁLISE HEMATOLÓGICA DOS ANIMAIS NORMAIS E INFECTADOS

Para a realização da análise hematológica, 1,0 mL de sangue heparinizado (Figuras 36 e 37) de cada camundongo foi obtido através da punção cardíaca.

Em todos os experimentos realizados para determinar os parâmetros hematológicos dos animais infectados, consideramos como valores normais, aqueles obtidos com camundongos Swiss, não infectados mantidos nas mesmas condições dos grupos experimentais (Malvezi *et al*, 2004).

### 9.3 CONTAGEM DO NÚMERO TOTAL DE HEMÁCIAS

A contagem de hemácias obtidas de camundongos normais e infectados (dias 0, 7 e 14, pós-infecção) foram realizadas manualmente (Malvezi *et al*, 2004). Amostras de sangue heparinizadas ( $v= 5\mu\text{L}$ ) foram cuidadosamente transferidas para tubos de ensaio 12 x 75mm contendo 1,0 mL de citrato trissódico (diluição 1:200). A seguir, esta solução era homogeneizada e transferida para um hemocitômetro de Neubauer (Hirschmann, Techcolor), mantida por 10 minutos em câmara úmida à temperatura ambiente antes do início da contagem em microscópio (Olympus, CH30), aumento final de 400X. O número de hemácias foi calculado da seguinte maneira:

---


$$[\text{Fator de diluição} \times \text{Fator de profundidade} = \text{Fator final}]$$

$$[\text{Fator final} \times \text{células contadas em 80 quadrados menores da área central da câmara} = \text{células}/\text{mm}^3 (\mu\text{l})]$$


---

### 9.4 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE HEMOGLOBINA (HB): MÉTODO DA CIANOMETAHEMOGLOBINA

A dosagem de hemoglobina foi realizada pelo método da cianometahemoglobina. Em tubos de ensaio 15 x 100mm foram colocados 2,5 mL do reagente de Drabkin (Analisa Diagnóstica). Um dos tubos foi usado como branco, em outros três tubos foram colocados 10  $\mu\text{L}$  de sangue hemolizado com concentrações conhecidas que foram utilizados como padrão, para ser determinado o fator de calibração. E nos outros tubos foram colocados 10  $\mu\text{L}$  das amostras de sangue desconhecidas, heparinizadas, previamente homogeneizadas, onde ocorreram as seguintes reações:

1) Transformação do Ferro da hemoglobina em Ferricianeto, formando a metahemoglobina que por sua vez, 2) combinou com o cianeto de potássio e produziu o pigmento estável, a cianometahemoglobina. A cianometahemoglobina pode então ser quantificada pela absorção da luz em 540 nm, em espectrofotômetro (Pharmacia Biotech, modelo Ultrospec 2000), gentilmente cedido pela Dra. Márcia Furnaleta do Departamento de

Microbiologia do CCB da UEL. A comparação da leitura do instrumento com a solução de referência (padrão) permite calcular a Hb, o que é feito de forma mais conveniente com uma curva padrão ou uma tabela de conversão. A concentração de Hb foi expressa em gramas/dL. Os cálculos foram realizados conforme as equações abaixo:

**Cálculo para o fator de calibração:**

$$\frac{\text{Concentração do Padrão}}{\text{Densidade Óptica do Padrão}} = \text{Fator de Calibração}$$

**Cálculo para a determinação da concentração da hemoglobina:**

Concentração da hemoglobina = Fator de calibração x Densidade Óptica do teste.

**Reagente de Drabkin (Líquido de Van Kempeu):**

---

KH <sub>2</sub> PO <sub>2</sub> .....	14,0 g
K <sub>3</sub> (CN) <sub>6</sub> .....	20,0 g
KCN.....	5,0 g
H <sub>2</sub> O (Destilada).....	1000 mL

---

## 9.5 PREPARAÇÃO DAS SOLUÇÕES PADRÃO

As amostras de sangue (V=2mL) obtidas de um “pool” de camundongos Swiss normais foram colocadas em tubo de ensaio 10 x 100mm e centrifugadas a 2500 r.p.m. durante 5 minutos. Após a centrifugação, os sobrenadantes foram descartados. As hemácias foram ressuspensas e lavadas (três vezes) por centrifugação (5 minutos, 2500 r.p.m) em solução salina a 85%. Após a 3ª centrifugação foi adicionado 1,5 mL de água destilada e agitado vigorosamente por dois minutos para completa lise das hemácias. Em seguida adicionou-se 2,5 mL de Clorofórmio e agitado vigorosamente por 2 minutos e centrifugado a 3000 r.p.m. por 15 minutos e removido o sobrenadante (hemolizado) com pipetta de Pasteur e

armazenado em tubo de ensaio com capacidade para 15 mL (Falcon) que foi mantido a  $-20^{\circ}\text{C}$  até o momento de uso.

Em seguida foi determinado as concentrações de hemoglobina das diferentes amostras, em equipamento Cell-Dyn 1600 (Abbott) e confirmado no equipamento Coulter T-890 (Coulter Eletronics).

## 9.6 CONTAGEM TOTAL DE LEUCÓCITOS

As contagens totais dos leucócitos totais foram realizadas manualmente. As amostras de sangue heparinizadas previamente homogeneizadas foram diluídas numa proporção de 1:20 no líquido de Turk (20 mL de ácido acético glacial, 1mL de azul de Cresil Brilhante e água destilada em q.s.p. (1000 mL). Esta solução provocou a lise das células anucleadas (hemácias).

A seguir, utilizou-se o seguinte procedimento: em tubos de ensaio 10 x 50mm foram colocados 95  $\mu\text{L}$  do líquido de Turk, 5  $\mu\text{L}$  de sangue heparinado seguido de agitação vagarosa e deixado em repouso por 5 minutos. Após mais um processo de homogeneização realizou-se a contagem dos leucócitos em hemocitômetro de Neubauer utilizando 4 quadrantes laterais da câmara e objetiva de 40x

## 9.7 CÁLCULO DA CÂMARA DE NEUBAUER PARA O NÚMERO TOTAL DE LEUCÓCITOS

O n.º. de leucócitos encontrados em 64 quadrados menores em um volume de  $0,4\text{mm}^3$  numa diluição de 1:20.

$$\text{N}^{\circ} \text{ de leucócitos encontrados} \times \frac{1\text{mm}^3}{0,4\text{mm}^3} \times 20 \text{ (diluição)}$$

$$\text{N}^{\circ} \text{ de leucócitos encontrados} \times 1\text{mm}^3 = \frac{20}{4}$$

$$\text{N}^{\circ} \text{ de leucócitos encontrados} \times 50 = 1\text{mm}^3$$



**Figura 36** – Coleta de 0,5 a 1 mL de sangue contaminado com *Trypanosoma cruzi*



**Figura 37** – Procedimento de diluição do sangue contaminado.



**Figura 38** – Inoculação dos protozoários em camundongos saudáveis.

## 10 MEDIDAS DE Fe NA PELE DOS CAMUNDONGOS SWISS INFECTADOS

Para a realização das medidas de Fe utilizando o detector XR-100CR, os camundongos foram anestesiados utilizando 30mg / mL de pentabarbital (40µl/camundongo), como mostra a figura 39. As medições eram realizadas em triplicata e com duração de 50 s cada.

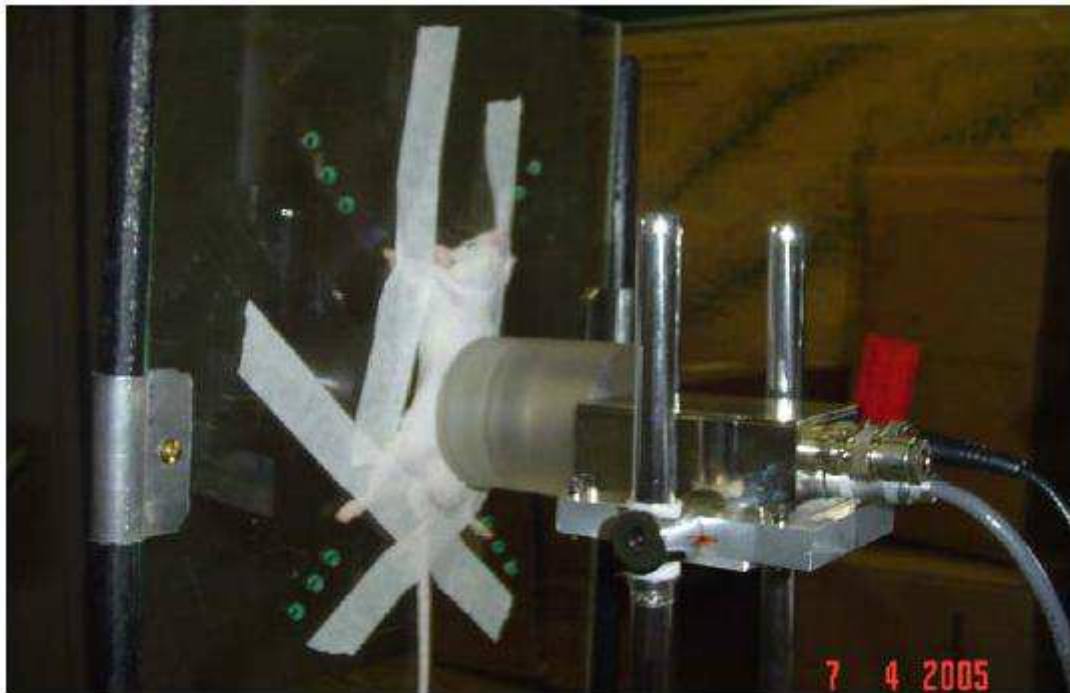


**Figura 39** – Camundongo sendo anestesiado com pentabarbital.

Os camundongos foram fixados com fita adesiva em um suporte acrílico como mostra a figura 40 e o local de medida foi à pele do abdômen (Figuras 41 e 42).



**Figura 40** – Fixação dos camundongos com fita adesiva



**Figura 41** – Medida *in vivo* de um camundongo.



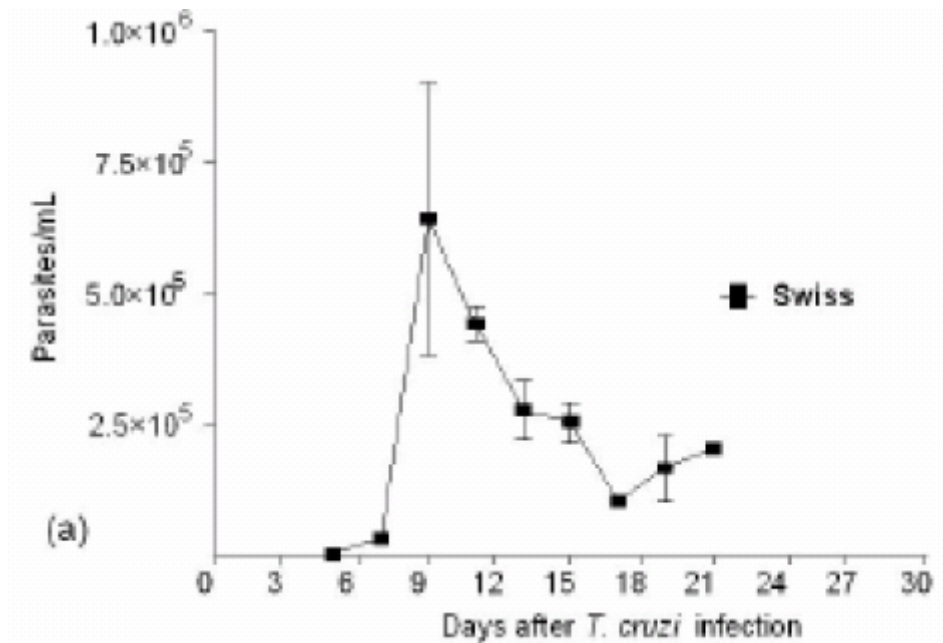
**Figura 42** – Medida *in vivo* de um camundongo, vista lateral.

#### 10.1 NÍVEIS DE FE NA PELE DE CAMUNDONGOS SWISS INFECTADOS COM O T. CRUZI

As medidas de XRF *in vivo* realizadas na pele de camundongos normais e infectados (dias 0, 7 e 14 pós-infecção) mostram que durante o curso da infecção há um aumento significativo ( $P < 0,01$ ) na concentração de Fe na pele dos camundongos infectados (Figura 43).

#### 10.2 CURSO DA INFECCÃO EXPERIMENTAL

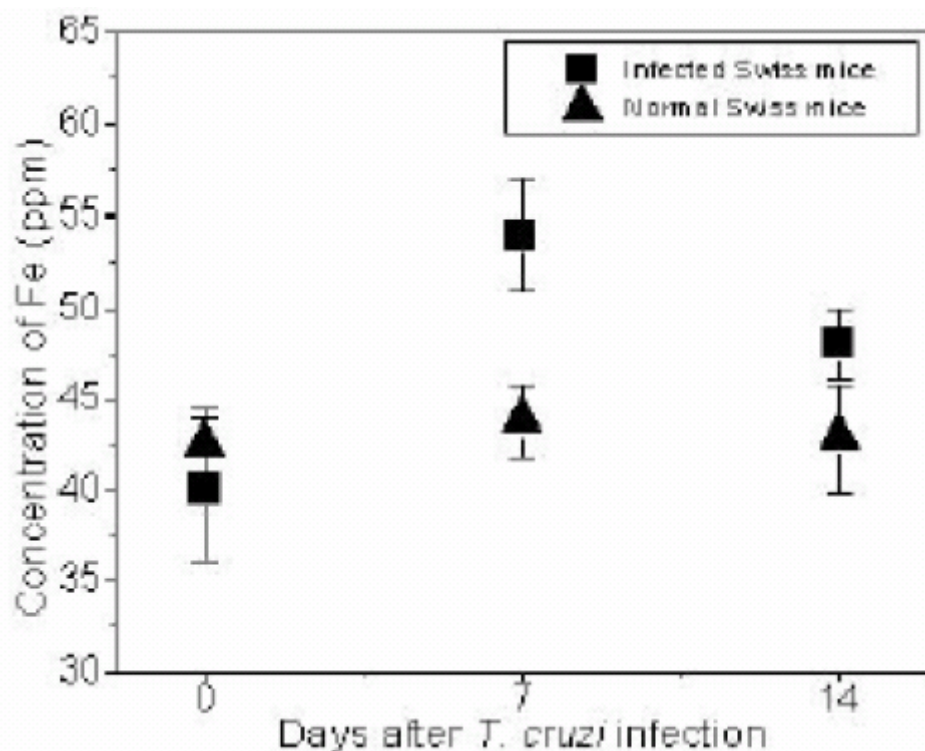
Com a finalidade de verificar o curso da infecção por *T. cruzi* em camundongos Swiss susceptíveis em grupos de 10 animais, foram infectados com 5000 formas tripomastigotas sanguícolas de *T. cruzi* (Cepa Y). A infecção de camundongos Swiss foi caracterizada por uma alta parasitemia (Figura 43) e alta mortalidade (Figura 44). A 76 parasitemia dos camundongos foi acompanhada diariamente até a morte dos animais. Com relação ao período pré-patente, isto é, o tempo entre a inoculação dos animais e a positividade da parasitemia, foi de 5 dias (Figura 43).



**Figura 43** – Curva de parasitemia da infecção de camundongos Swiss.  
 Fonte: Malvezi *et al*, 2000.



**Figura 44** – Taxa de mortalidade dos camundongos Swiss infectados.  
 Fonte: Malvezi *et al*, 2000.



Student,  $p < 0,05$ .

**Figura 45** – Concentração de Fe na pele dos camundongos Swiss em função dos dias após a infecção.

Fonte: Estevam *et al*, 2005c.

### 10.3 ANÁLISE HEMATOLÓGICA

A análise hematológica dos camundongos Swiss normais, mantidos em biotério convencional, não revelou nenhum indicativo da presença de anemia nos animais de 8 a 12 semanas de idade. Os parâmetros hematológicos e os desvios fisiológicos encontrados, foram utilizados como valores de referências para a realização de nossas investigações.

Os camundongos Swiss infectados com o *T. cruzi* apresentaram anemia discreta em relação aos animais controles (não infectados), as modificações nos índices hematológicos puderam ser detectadas a partir do dia 7 p.i, Tabela 7.

**Tabela 7** – Hematologia dos camundongos infectados.

Group	Haemoglobin (g/dl)	Hematocrit (%)	Erythrocytes ( $10^6$ )	Leukocytes ( $10^6$ )
C	13.8 ± 0.5	44.9 ± 1.3	7.0 ± 0.5	5.4 ± 0.7
I (Day 7)	12.9 ± 0.5	43.9 ± 1.9	7.5 ± 0.2	5.2 ± 1.4
I (Day 14)	10.8 ± 0.9*	35.5 ± 3.8*	6.4 ± 0.5	5.4 ± 1.5

Groups of Swiss mice were infected (I) with  $5 \times 10^3$  blood trypomastigotes Y strain *T. cruzi*.  
C= non-infected mice, P<0.05 when compared with C group.

Fonte: Malvezi *et al*, 2004

## 11 CONCLUSÕES

A geometria da fonte empregada reduz em 16 % a dose de radiação, como mostram os resultados para as correções de ângulo sólido da equação 18 do item 5.1 da página 41.

A dose de radiação para uma medida de 50 segundos é inferior a 10mSv, sendo considerada de baixo risco de acordo com a ICRP (1991) que apresenta uma resolução para limites permissíveis de doses que são: 50mSv por ano para humano público e 500mSv por ano para pesquisadores.

Os resultados da tabela 3 mostram que o grupo 2 de simulados apresentou maior coeficiente de determinação 0,97 comparado com o grupo 1 com 0,76. O grupo 2 apresentou um menor LLD (13 ppm) e um erro menor para os simulados testes.

Na comparação dos dois softwares com relação à precisão, ambos apresentaram valores próximos, mas o software WinQxas apresenta uma maior sensibilidade porque possui a rotina de desconvolução dos picos e outra que parametriza os picos utilizando uma ótima estatística e o PMCA não. Assim somente o WinQxas apresentou valores confiáveis para as medidas de 30 ppm e 50 ppm de Fe para tempos de medida de 10 s e 50 s.

Analisando os resultados da medida de 10 s, esta apresenta uma dose de aproximadamente 2 mSv, mas apresentou um erro de 117% para medidas de 30 ppm de ferro, provavelmente porque este valor está abaixo do seu LLD.

As medidas de 50 s apresentaram resultados compatíveis com os necessários para a análise de pele de pessoas normais (15 – 60 ppm de Fe) e de portadores de  $\beta$ -Thalassaemia (15 – 150 ppm de Fe). O LLD das medidas de 50 s foi 13 ppm de Fe, o ajuste linear da curva de sensibilidade apresentou coeficiente de determinação de 0,97.

### 11.1 CONCLUSÕES - $\beta$ -THALASSAEMIA

Foi possível verificar que portadores de  $\beta$ -Thalassaemia possuem uma maior concentração de ferro na pele devido ao tratamento. O paciente tem o nível de glóbulos vermelhos normalizado mas o ferro do interior da hemoglobina que esse paciente produz

precariamente somado ao ferro proveniente das transfusões, causa um aumento do nível do ferro no corpo todo.

O nível médio de ferro das pessoas normais medidas foi de  $53 \pm 14$  ppm e o nível de ferro do portador de  $\beta$ -Thalassaemia foi de  $74 \pm 6$  ppm.

Esse resultado sugere que correlacionando os níveis de ferro da pele com níveis de ferro de órgãos como o fígado medidos por biopsia ou níveis de ferro obtidos através da ferritina é possível utilizar a XRF *in vivo* como meio alternativo para o monitoramento da eficácia do tratamento de quelação em pacientes portadores de  $\beta$ -Thalassaemia

## 11.2 CONCLUSÕES - DOENÇA DE CHAGAS

Através da medida por XRF *in vivo* foi possível demonstrar o aumento de Fe durante o curso da infecção experimental com o *T. cruzi*. Nossos dados sugerem que há uma relação direta entre o aumento de íons ferro na pele e aumento da parasitemia (Figura 43 e Tabela 7) e com a alta susceptibilidade dessa linhagem de camundongo ao *T. cruzi* (Figura 44). De fato, camundongos C57BL/6 (resistentes à infecção) apresentam anemia transitória e sobrevivem ao inoculo de 5000 formas tripomastigotas de *T. cruzi*, utilizado em nossos ensaios (Lalonde e Holbein, 1984; Malvezi et al, 2004). Estes animais apresentam hipoferremia bifásica com pico no dia 28 pós-infecção (Lalonde e Holbein, 1984). A mortalidade desses animais aumentou em 23% quando esses eram receberam solução de ferro-dextarm e a depleção de Ferro com o quelante desferrioxamina B ou através de uma dieta pobre em Ferro, provocou a completa proteção dos camundongos C57BL/6 ao inoculo de *T. cruzi* (Lalonde e Holbein, 1984).

Assim sendo, nossos resultados completam os achados de Lalonde e Holbein (1984), mostrando que camundongos susceptíveis apresentam um aumento de Ferro nos primeiros dias de infecção e esse aumento pode explicar a alta letalidade observada após a infecção com *T. cruzi*.

Em adição, estudos *in vitro* demonstraram que o *T. cruzi* utiliza-se do Fe para o seu crescimento em meios de cultura (Lalonde e Holbein, 1984), mostrando que os efeitos dos tratamentos *in vivo* citados anteriormente correlacionam-se com as exigências do parasito *in vitro*.

Concluindo, nossos dados sugerem que a hiperferremia que ocorre na fase aguda da infecção no camundongo susceptível potencialmente aumenta a disponibilidade de ferro para o *T. cruzi* e colabora de maneira importante para a patogenicidade do *T. cruzi*.

## REFERÊNCIAS

ABNT – ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 6023**: referências: elaboração. Rio de Janeiro, 2002.

ADAMS, P C; SPEECHLEY, M; KERTESZ, A E. 1991. Long-term survival analysis in hereditary hemochromatosis. **Gastroenterology**, v. 101 p. 368-72 [Medline].

AMPTEK Disponível em: <<http://www.amptek.com>> Acesso em 05/2004

ANGELUCCI, E; GIOVAGNONI, A; VALERI, G; PACI, E; RIPALTI, M; MURETTO, P; McLAREN, C; BRITTENHAM, G M; LUCARELLI, G. 1997. Limitations of magnetic resonance imaging in measurement of hepatic iron. **Blood**, v 90, p.4736 - 42.

APPOLONI, C R. 2003. **Texto Experimental para a Disciplina de Física Nuclear**. Etapas 1, 2 e 3.

BACON, B R; POWELL, L W; ADAMS, P C; KRESINA, T F; HOOFNAGLE, J H. 1999. Molecular medicine and hemochromatosis: at the crossroads. **Gastroenterology**, v. 116 p.193-207 [Medline].

BERGER, M J; HUBBELL J H. 1987. **XCOM**: photon cross section on a personal computer. NSBIR 87-3597.

BERTIN, E.P. **Principles and practice of X-ray spectrometric analysis**. London: Plenum Press, 1975. 1079p.

BRANDÃO, R B. 2001. **Radiação**. Belo Horizonte. Disponível em : <<http://www.geocities.com/trabalhosmedicina>> Acesso em 08/2003.

BRADLEY, D A; FARQUHARSON, M J. 2000. X-ray fluorescence and the in-vivo evaluation of Fe, Cu and Zn in skin. **Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry**, v. 244 (1) p. 213-7.

BURCHAM, E M. **Física Nuclear**. 1974. Editorial Reverté, S.A.

CANZIAN, N S; AVANCINI, S S; DRAGO, V. 2002. **Detecção da radiação nuclear**. Santa Catarina. Disponível em : <<http://fsc.ufsc.br/~canzian/labfismod/>> Acesso em 06/2003.

CESAREO, R.; HANSON, A.L.; GIGANTE G.E., L.J. PEDRAZA; MAHTABOALLY, S.Q.G., Interaction of keV photons with matter and new applications, **Physics Reports**, 213(3), 1992. 83

COURA, J R; CASTRO, S L. 2002. A critical review on Chagas disease chemotherapy. **Mem Inst, Oswaldo Cruz**, v. 97 p. 3-24.

CUNHA E SILVA, R M; NASCIMENTO FILHO, V F; APPOLONI, C R. 2004. **Publicação técnica – PT 01/04 LFNA UEL - Fluorescência de Raios X por dispersão em energia**.

EDWARDS, C Q. 1999. Hemochromatosis Wintrobe's Clinical Hematology. v. 1 ed G R Lee, J.Forester, J. Lucens *et al* (Balimore, MD: Williams and Wilkins).

EISBERG, R; RESNICK, R. 1974. **Quantum physics of atoms, molecules, solids, nuclei and particles**. Versão Traduzida: Física Quântica. 15ª tiragem, Califórnia; Nova Iorque; Rio de Janeiro. Editora Campus Ltda. cap. 2, p. 51-75. cap. 9, p. 418-427. cap. 16, p. 698-735.

ESTEVA M, M. 2005 a. **Publicação técnica PT 02/05 LFNA UEL - Utilização de softwares em análises espectrais de XRF**.

ESTEVA M, M; APPOLONI, C R; MELQUIADES, F L; LOPES, F. 2005 b. **In vivo evaluation of Fe in human skin employing X-ray fluorescence methodology (XRF)**. Anais Eletronicos: VI Latin American Symposium on Nuclear, Physics and Applications. Argentina.

ESTEVA M, M; BORGES, C L; PINGE-FILHO, P; APPOLONI, C R. 2005 c. **Evaluation of Fe employing X-Ray Fluorescence Methodology (XRF) in mice skin during acute phase of experimental infection with Trypanosoma cruzi**. Anais Eletronicos: VI Latin American Symposium on Nuclear, Physics and Applications. Argentina.

ESTEVA M, M; APPOLONI, C R. 2003. **Medida in vivo de Fe na pele através da metodologia de fluorescência de raios X de baixa dose com detector SiPIN**. TCC. 90 p.– Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2003.

FARQUHARSON, M J; BRADLEY, D A. 1999. The feasibility of a sensitive low-dose method for the in vivo evaluation of Fe in skin using K-shell x-ray fluorescence (XRF). **Phy. Méd. Biol.**, v. 44 p. 955-965. Printed in the UK.

FISCHER, R; TIEMANN, C D; ENGELHARDT, R; NIELSEN, P; DURKEN, M; GABBE, E E; JANKA, G E. 1999. Assessment of iron stores in children with transfusion siderosis by biomagnetic liver susceptometry. **Am. J. Hematol.**, v. 60 p.289-99.

GEORGE, E; WONG, H B; GEORGE, R; ARRIFIN, W A. 1994. Serum ferritin concentrations in transfusion dependent beta-thalassaemia. **Singapore Méd. J.**, v. 48. p. 62-4.

GREEN, S; BRADLEY, D A; PALETHORPE, J E; MEARMAN, D H; CHETTLE, D R; LEWIS, A D; MOUNTFORD, P J e MORGAN, W D. 1994. Na enhanced senditivity K-shell x-ray fluorescence technique for tibial lead determination. **Phys. Méd. Biol.**, v. 38. p. 389-96.

GORODETSKY, R; LOWENTHAL, E; GOLDFAB, A; RACHMILEWITZ, E A. 1990. Evaluation of iron load and clearnace in patients with beta- thalassemia. **Ann. NY Acad. Sci.**, v. 612. p. 568-72.

**Annals of the ICRP.** 1991.

INSTITUTO PASTEUR - FRANÇA Disponível em: <<http://www.pasteur.fr/>> Acesso em 11/2005.

ITO, K; MITCHELL, D C; GABATA, T; HANN, H L; KIM, P N; FUJITA, T; AWAYA, H; HONJO, K e MATSUNAGA, N; 1999. Hematocellular carcinoma. Association with increased iron deposition in the cirrhotic liver at MR imaging. **Radiology**, v. 212. p. 235-40.

KNOLL, G F. 2000. **Radiation Detection and Measurement.** 3. ed. Michigan. J. Wiley & Sons, INC. cap. 1, p. 11-16. cap. 2, p. 49-55. cap. 10, p. 308-312.

KAPLAN, I. 1963. **Física Nuclear.** Rio de Janeiro: Guanabara Dois S.A. cap. 15, p. 327-368.

LALONDE, R C; HOLBEIN, B E. 1984. **Role of iron in Trypanosoma cruzi infection of mice.** J. Clin. Invest. 73:470-476, 1984.

MALVEZI, A D; CECCHINI, R; SOUZA F; TADOKORO, C E; RIZZO, L V; PINGE-FILHO, P. 2004. Involvement of nitric oxide (NO) and TNF-a in the oxidative stress associated with anemia in experimental Trypanosoma cruzi infection. **Immunology and Medical Microbiology**, v.41 p. 69–77.

MICHAELSSON, G; LJUNGHALL, K; DANIELSON, B G; 1980. Acta Dermatovener (Stockholm). v. 60. p. 295.

MOLIN, L; WESTER, P O; 1973. Acta Dermatovener (Stockholm). v. 53 p. 473 e 477.

NASCIMENTO FILHO, V. 1993. **Técnicas analíticas nucleares na pesquisa agropecuária: fluorescência de raios X e ativação neutrônica**. Piracicaba, S.P. Seção Metodologia de Radioisótopos/CENA.

OLIVIERI, N F; BRITTENHAM, G M; 1997. Iron chelating therapy and the treatment of thalassemia. **Blood**. v, 89. p. 739-61.

ON OBSERVATÓRIO NACIONAL – Ministério da Ciência e Tecnologia. Disponível em: <<http://www.on.br>> Acesso em: 03/2004

OPERATING MANUAL – XR-100CR X RAY Detector System And PX2CR Power Supply / shaper. Revision 7 January, 1998 - AMPTEK inc.

PINGE-FILHO, P; TADOKORO, C E; ABRAHAMSOHN, I A. 1999. Prostaglandins Mediate Suppression of Lymphocyte Proliferation and Cytokine 85 Synthesis in Acute Trypanosoma cruzi Infection. **Cellular Immunology**, v. 193 p. 90–98.

PHARM & CHANTE Disponível em: <[www.pharmchange.com](http://www.pharmchange.com)> Acesso em 03/2004

POCKET MCA 8000A USER'S MANUAL Revision 1.40 March, 2000 – AMPTEK inc.

PORTER, J B. 1996. Evaluation of new iron chelators for clinical use. **Acta Haematol**, v. 95 p. 13-25.

RAO, R R; CHATT, A. 1993. Preconcentration neutron activation analysis of trace elements in sea water by coprecipitation with 1-(2-thiazolylazo)-2-naphthol, pyrrolidinedithiocarbamate and N-nitroso-phenylhydroxylamine. **Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry**, v. 168, n 2, p 439-448.

RASSI, A; LUQUETTI, A O; RASSI JUNIOR, A; RASSI, G G; SILVA, I G; NAVES, H A M; CARVALHO, E S D. 1996. **Tentativa de tratamento da infecção chagásica humana com alopurinol**. Arquivos Brasileiros de Cardiologia 67 (supl 1):Res 560.

SANTOS, A O. 1999. **Fluorescência de raios X por dispersão de energia (EDXRF) para medidas de pigmentos em cerâmica arqueológica**. 48p. TCC – Universidade Estadual de Londrina, Londrina.

SAÚDE NA REDE: Quelação. Disponível em  
<[http://www.saudenarede.com.br/ver\\_prod.php?codigo=59](http://www.saudenarede.com.br/ver_prod.php?codigo=59)> Acesso em 11/2003

SBCD SOCIEDADE BRASILEIRA DE CIRURGIA DERMATOLÓGICA. Guidelines SBCD Disponível em: <<http://www.sbcd.org.br/publico>> Acesso em 07/2003.

SCIENTIFC AMERICAN Brasil. 11/2005. **No rastro das mutações**. Ed. Duetto.

SHESKIN, J; GORODETSKY, E; LOEWINGER, A; WEINREB. 1986. Dematologica. v, 162.

SHUKRI, A; GREEN, S e BRADLEY, D A. 1995. A feasibility study: in vivo x-ray fluorescence of iron using 109Cd. **Appl. Radiat. Isto**, v. 46. p. 625.

THALASSAEMIA INTERNATIONAL FEDERATION Disponível em: <  
<http://www.thalassaemia.org.cy> > Acesso em 10/2005.

TURNER, J E. 1995. **Atoms, Radiation, and Radiation Protection**. 2. ed. New York. J. Wiley & Sons, INC. cap. 1, p. 2-11. cap. 3, p. 63-77. cap. 4 p. 82-87. cap. 8. p. 170- 199. cap 12 p. 366-373. 86

VANDECASTEELE, C; BLOCK, C B. 1995. **Modern methods for trace elements determination**, John Willey & Sons.

VAN ESPEN, P; JASSENS, P; SWENTERS, I. s/d. **Axil X Ray Analysis Software Users Manual**. Parc kard, Benelux. 72p.

VILLARD, P. 1999. Paul Villard and his Discovery of Gamma Rays. **Physics Perspective 1**. p. 367-383.

**ANEXO**

**ANEXO 1 – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido****Termo de Consentimento Livre e Esclarecido**

Eu, \_\_\_\_\_, portador do  
CPF: \_\_\_\_\_, depois de ouvir  
detalhadamente a proposta para participar como objeto de medida *in vivo* de  
Fluorescência de Raios X, para uma pesquisa de método alternativo de monitoramento  
do elemento ferro na pele conduzida por pesquisadores do Laboratório de Física  
Nuclear Aplicada (Depto. Física – UEL), tendo claro o tipo de efeito biológico de tal  
procedimento, e que as medidas serão realizadas na mão, em uma região menor que  
 $1\text{cm}^2$ , com uma dose de radiação de 10mSv (menor que uma radiografia comum),  
concordo fazer parte de tal pesquisa.

Londrina, \_\_\_ de \_\_\_\_\_ de 2004.

## ANEXO 2 – Parecer do Comitê de Ética



PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO  
DIRETORIA DE PESQUISA  
DIVISÃO DE CADASTRO E ACOMPANHAMENTO  
OF.DP.DCA. 233/2005 Londrina, 29 de Agosto de 2005.

Prezado Professor,

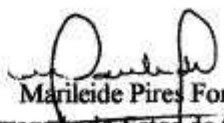
Encaminhamos em anexo a Vossa Senhoria, para ciência, cópia do parecer emitido pelo Comitê de Ética em Pesquisa da UEL, a respeito do projeto de pesquisa nº 12003/2005, do orientando Marcelo Estevam.

Sem mais, aproveitamos a oportunidade para enviar cordiais saudações.

Atenciosamente,



Paulo Sérgio Basoli  
Chefe da Divisão de Cadastro e Acompanhamento



Marileide Pires Fonseca  
Encarregada do Setor de Cadastro e Acompanhamento

Ilmo(a). Sr(a).  
Prof(a). **Carlos Roberto Appoloni**  
Departamento de Física  
CCE

OF.DP.DCA. 233/2005



## COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA ENVOLVENDO SERES HUMANOS

Parecer Nº 135/05

Londrina, 17 de agosto de 2005.

**PESQUISADOR(A): CARLOS ROBERTO APPOLONI**

Ilmo(a) Sr(a),

O Comitê de Ética em Pesquisa envolvendo Seres Humanos da Universidade Estadual de Londrina – CEP – UEL – de acordo com as orientações da Resolução 196/96 do Conselho Nacional de Saúde/MS, **APROVA** a realização do projeto: **“AVALIAÇÃO IN VIVO DE FE NA PELE HUMANA ATRAVÉS DA METODOLOGIA DE FLUORESCÊNCIA DE RAIOS-X (XRF)“**.

Informamos que deverá ser comunicado, por escrito, qualquer modificação que ocorrer no desenvolvimento da pesquisa.

Desejamos sucesso na realização da pesquisa.

Situação do Projeto: **APROVADO**

Atenciosamente,

  
 Profª. Dra. Nilza Maria Diniz  
 Comitê de Ética em Pesquisa  
 Coordenadora

## ANEXO 3 – Artigos Publicados

Acta Phys. Hung. A

---

---

**HEAVY ION  
PHYSICS**

---

---

*In vivo* evaluation of Fe in human skin employing X-Ray  
Fluorescence Methodology (XRF)M. Estevam<sup>a</sup>, C. R. Appoloni<sup>b</sup>State University of Londrina, Department of Physics,  
Londrina, PR, Brazil*Received 31 October 2005*

**Abstract.** Recent technological improvements allow the method of *in vivo* XRF to provide useful sensibility for diagnostics or monitoring in biomedical applications. In cases of hereditary sanguine disorders as the  $\beta$ -thalassaemia or a genetic disorder like Haemochromatosis [1], there is a high concentration of elements as Fe, Zn and Cu in the skin and internal organs, due to the treatment of those abnormalities or due to the own dysfunction caused by the disease. The levels of Fe related to the patient bearers of the  $\beta$ -thalassaemia are determined, at the moment, measuring a protein in the sanguine current, called ferritin. The monitoring of the protein is ineffective in several situations, such as when the patient suffers any disturbance of health. Nowadays, the main forms of measuring the levels of those metals through hepatic storage are the biopsy of the liver, that is invasive and potentially dangerous, presenting a rate of mortality of 0.1% [1], and by means of magnetic susceptibilities that employs a quantum superconductor, which is highly expensive and there are only three main world centers with this equipment. This work investigates the use of a Si PIN-diode detector and a  $^{238}\text{Pu}$  source (13 and 17keV; 13%; 95.2mCi; 86y) for the measurement of Fe skin levels compatible with those associated to the disease  $\beta$ -thalassaemia. XRF spectra were analyzed using a set of AXIL-WinQXAS programs elaborated and disseminated by the IAEA. The determination coefficient of the calibration model (sensitivity curve) was 0.97. Measurements on skin phantoms containing concentrations of Fe in the range from 10 to 150 parts per million (ppm), indicate that we are able to detect Fe at levels of the order of 15ppm, using monitoring periods of 50 seconds and skin entrance dose less than 10 mSv. The literature reports skin Fe levels from 15.0 to 60.0 ppm in normal persons and from 70 to 150 ppm in thalassaemics patients. So, the employed methodology allows the measurement of the skin Fe concentration [2].

*Keywords:* *in vivo* XRF; human skin; Fe*PACS:* see: <http://www.aip.org/pacs/>

1219-7580/04/ \$ 20.00

© 2004 Akadémiai Kiadó, Budapest

## 1. Introduction

Non-invasive techniques for determination of heavy metal concentrations *in vivo* have been developed during the last 25 years. In trace amounts, some metals are essential for the function of the human body. On the other hand, a number of metals are toxic to man if present in too high a concentration. It is important to increase our knowledge of the relations between metal concentrations in man and observable toxic effects. The extent to which an *in vivo* XRF method can provide useful sensitivity for diagnostic or monitoring applications in biomedicine is subject to a number of critical factors. These include the atomic numbers of the elements of interest, their levels in tissues, the incident beam energy, the degree to which incident and emerging beams are attenuated and the number of counts detected per unit dose [3].

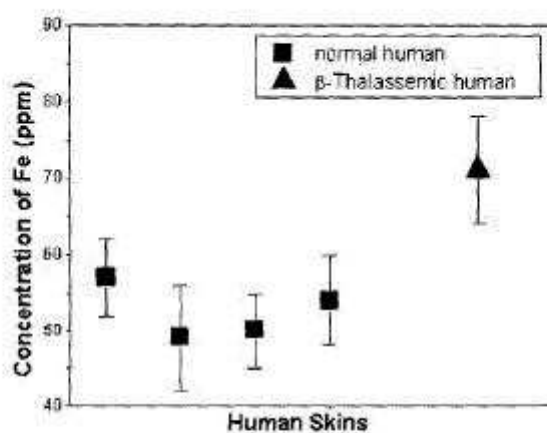
One potential application involves monitoring of the efficacy of chelation of Fe, a therapy used to alleviate the tendency of Fe to build-up as result of treatment of the hereditary blood disorder  $\beta$ -thalassaemia [2].

## 2. XRF Methodology

X-ray fluorescence spectrometry is used for elemental analysis based on the detection of emitted X-ray radiation from excited atoms. X-rays are short wavelength electromagnetic radiation, a conventional x-ray spectrometer generally utilizes the region of about 0.1-11 nm. This technique is a two-step process that begins with the removal of an inner shell electron of an atom. The resulting vacancy is filled by an outer shell electron. The second step is the transition from the outer shell electron orbital to an inner shell electron orbital. This transition is accompanied by emission of an X-ray photon [4]. The energy of the fluorescent photon is characteristic of the element and is equal to the energy difference between the two electron energy levels. Thus the energy of the fluorescent photon provides qualitative information concerning the element's identity. The number or intensity of fluorescent photons is characteristic of the amount or concentration of the elements present. The emission process is similar to other fluorescent measurement techniques. The photon energies are designated (anachronistically) as K, L, or M X-rays depending on the energy level being filled [5].

## 3. Levels of Fe

The measures of *in vivo* XRF were done on the skin of the hand of four healthy people and one bearer of  $\beta$ -Thalassaemia. All the measurements were accomplished in triplicate. The excitation / acquisition time of each measurement was 50 s. Figure 1 presents the obtained Fe concentration (ppm) for four normal humans and one  $\beta$ -thalassemic human by *in vivo* XRF.



**Fig. 1.** Concentration of Fe (ppm) for four normal human and one  $\beta$ -thalassaemic human by *in vivo* XRF.

#### 4. Conclusions

The *in vivo* XRF system can measure the difference between healthy people and bearers of  $\beta$ -Thalassaemia. The difference is of approximately 20 ppm of Fe. The low limit detection was below 15 ppm. The radiation dose was smaller than 10 mSv, which is 2 to 3 times smaller than the dose of a normal radiography of the thorax.

#### Notes

- a. E-mail: marceloestevam@yshoo.com.br
- b. E-mail: appoloni@uel.br

#### References

1. D. A. Bradley and M. J. Farquharson, *J. R. Nuclear Chemistry* **244** (2000) 213-17.
2. J. Börjesson, S. Mattsson, and M. Alpsten, *Appl. Radiat. Isot.* **49** (1998) 437-45.

3. W. Guo, R. P. Gardner, W. A. Metwally, *Nuc. Inst. and Methods in Physics Research B* 213 (2004) 574–78
4. Handbook of Instrumental Techniques for Analytical Chemistry Frank Settle, Editor: "X-Ray Fluorescence Spectrometry", G. J. Havrilla. Prentice Hall 1997.
5. Principles of Instrumental Analysis, 5th Edition by Skoog / Holler / Nieman, Saunders College Publishing 1998.

## Evaluation of Fe employing X-Ray Fluorescence Methodology (XRF) in mice skin during acute phase of experimental infection with *Trypanosoma cruzi*

M. Estevam<sup>1,2,a</sup>, A. D. Malvezi<sup>2</sup>, C. L. Borges<sup>2</sup>, P. Pinge-Filho<sup>2,b</sup>  
and C. R. Appoloni<sup>1,c</sup>

<sup>1</sup>State University of Londrina, Department of Physics,  
Londrina, PR, Brazil

<sup>2</sup>State University of Londrina, Department of Pathological Sciences,  
Londrina-PR, Brazil

Received 31 October 2005

**Abstract.** Recent technological improvements allow the method of *in vivo* XRF to provide useful sensibility for diagnostics or monitoring in biomedical applications as  $\beta$ -thalassaemia and another ailment that request invasive methods for diagnostic but they are high undesirable [1]. *Trypanosoma cruzi* is protozoan parasite causing widespread human disease in Latin America, known as Chagas' disease. We investigate the use of a Si PIN-diode detector and a 238 Pu source (13 and 17KeV; 13%; 95.2mCi) for measurement of Fe skin levels from Swiss mice infected with *T. cruzi*. XRF spectra were analyzed using a set of AXIL-WinQXAS programs elaborated and disseminated by the IAEA. The determination coefficient of the calibration model (sensitivity curve) was 0.97. Measurements on skin mice phantoms containing concentrations of Fe in the range from 10 to 150 parts per million (ppm), indicate that we are able to detect Fe at levels of the order of 8 ppm, using monitoring periods of 100 seconds and skin entrance dose less than 6 mSv. Measurements on skin from infected mice suggest that the pathogenicity of the *T. cruzi* correlated with its growth rate and with the amount of Fe available by XRF. So, the employed methodology allows the measurement of the skin Fe concentration during experimental Chagas' disease.

**Keywords:** *in vivo* XRF; mice skin; *Trypanosoma cruzi*; Fe  
**PACS:** see: <http://www.aip.org/pacs/>

1219-7580/04/ \$ 20.00

© 2004 Akadémiai Kiadó, Budapest

## 1. Introduction

The extent to which an *in vivo* XRF method can provide useful sensitivity for diagnostic or monitoring applications in biomedicine is subject to a number of critical factors. These include the atomic numbers of elements of interest, their levels in tissues, the incident beam energy, the degree to which incident and emerging beams are attenuated and the number of counts detected per unit dose [1].

One potential application involves monitoring of the efficacy of chelation of Fe, a therapy used to alleviate the tendency of Fe to build-up as result of treatment of the hereditary blood disorder  $\beta$ -thalassaemia [1]. We are seeking the capabilities of an *in vivo* XRF system for detection of Fe in mice skin during acute phase of experimental infection with *Trypanosoma cruzi*, protozoan parasite that causes Chagas' disease.

## 2. XRF Methodology

X-ray fluorescence spectrometry is used for elemental analysis based on the detection of emitted X-ray radiation from excited atoms. X-rays are short wavelength electromagnetic radiation, a conventional x-ray spectrometer generally utilizes the region of about 0.1-11 nm. This technique is a two-step process that begins with the removal of an inner shell electron of an atom. The resulting vacancy is filled by an outer shell electron. The second step is the transition from the outer shell electron orbital to an inner shell electron orbital. This transition is accompanied by emission of an X-ray photon [2]. The energy of the fluorescent photon is characteristic of the element and is equal to the energy difference between the two electron energy levels. Thus the energy of the fluorescent photon provides qualitative information concerning the element's identity. The number or intensity of fluorescent photons is characteristic of the amount or concentration of the elements present. The emission process is similar to other fluorescent measurement techniques. The photon energies are designated (anachronistically) as K, L, or M X-rays depending on the energy level being filled [3].

## 3. Infection Progress and Development of Anemia

Infection of Swiss mice (susceptible) with *T. cruzi* is characterized by exponential growth of Parasites (days 8 and 9 after infection, Figure 1) associated with discrete anemia (Table 1). The parasitemia decline after the day 10 pos infection and increased again on 18 day after infection. All mice were dead by day 22 post-infection (Figure 2). Interestingly, the intensity of the anemia is correlated with the degree of parasitemia and hypoferremic response (Figure 3).

Evaluation of Fe employing X-Ray Fluorescence Methodology (XRF) in mice skin during acute phase of experimental infection with *Trypanosoma cruzi* 3

**Table 1.** Hematological in *T. cruzi* -infected mice [2] [3].

Groups of Swiss mice were infected (I) with  $5 \times 10^5$  blood trypomastigotes Y strain *T. cruzi*

C =non-infected mice,  $P < 0.05$  when compared with C group

Group	Hemoglobin (g/dl)	Hematocrit (%)	Erythrocytes(10 <sup>9</sup> )	Leukocytes(10 <sup>6</sup> )
C	13.8 ± 0.5	44.9 ± 1.3	7.0 ± 0.5	5.4 ± 0.7
I(Day 7)	12.9 ± 0.5	43.9 ± 1.9	7.5 ± 0.2	5.2 ± 1.4
I(Day 14)	10.8 ± 0.9*	35.3 ± 3.8*	6.4 ± 0.5	5.4 ± 1.5

#### 4. Conclusions

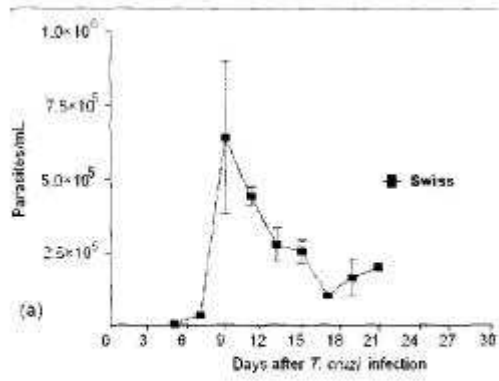
Measurements on skin from susceptible infected mice suggest that the pathogenicity of the *T. cruzi* is correlated with its growth rate and with the amount of Fe detectable by XRF. So, the employed methodology allows the measurement of the skin Fe concentration during experimental Chagas' disease.

#### Notes

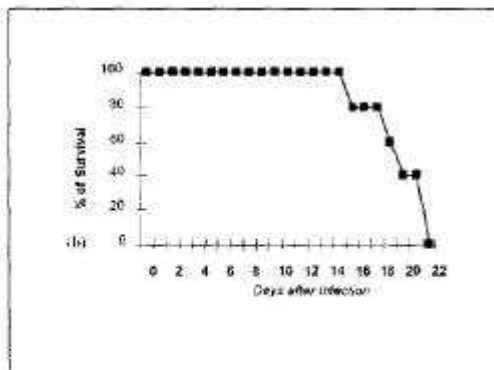
- a. E-mail: marceloestevam@yahoo.com.br
- b. E-mail: pingo@sercomtel.com.br
- c. E-mail: appoloni@uel.br

#### References

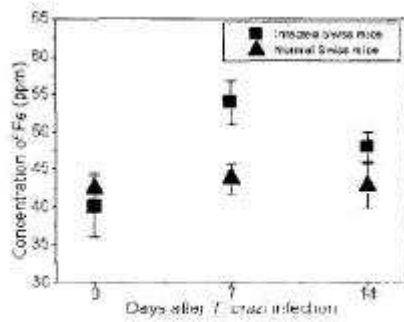
1. D. A. Bradley and M. J. Farquharson, *J. R. Nuclear Chemistry* **244** (2000) 213-17.
2. G.J. Havrilla. Handbook of Instrumental Techniques for Analytical Chemistry Frank Settle, Editor: "X-Ray Fluorescence Spectrometry". Prentice Hall 1997.
3. M. Estevam and C. R. Appoloni, in *SLAFNAP6*, Argentinean 2005.
4. R. C. Lalonde, B. E. Holbein, *J. Clin. Invest* **73** (1984) 470-76.
5. A. D. Malvezi *et al.*, *FEMS Immunol Med. Microbiol* **41**(2004) 69-77.



**Fig. 1.** Parasitemia of Swiss mice infected with  $5 \times 10^3$  blood trypomastigotes Y strain *T. cruzi*.



**Fig. 2.** Survival of Swiss mice infected with  $5 \times 10^3$  blood trypomastigotes Y strain *T. cruzi*.



**Fig. 3.** Concentration of Fe (ppm) in function of the days by XRF methodology.