



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Campus de Botucatu



PG-BGA

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

"Julio de Mesquita Filho"

INSTITUTO DE BIOCIÊNCIAS DE BOTUCATU

ANÁLISE MULTIELEMENTAR PELA TÉCNICA DE FLUORESCÊNCIA DE
RAIOS-X DE AMOSTRAS DE CÓLON DE ROEDORES COM COLITE E
TRATADOS COM PREDNISOLONA

KÁTHIA TAKEDA DA SILVA

Orientador: Prof. Dr. Joel Mesa Hormaza

Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências, Campus de Botucatu, UNESP, para obtenção do título de Mestre no Programa de Pós-Graduação em Biologia Geral e Aplicada.

BOTUCATU – SP
2014

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÊC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE - CRB 8/5651

Silva, Káthia Takeda.

Análise multielementar pela técnica de fluorescência de raios-X de amostras de cólon de roedores com colite tratados com prednisolona / Káthia Takeda Silva.
- Botucatu, 2014

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências de Botucatu

Orientador: Joel Mesa Hormaza

Capes: 20000006

1. Colite ulcerativa. 2. Intestinos - Doenças inflamatórias. 3. Radiação síncrotrônica. 4. Roedor como animal de laboratório.

Palavras-chave: Análise multielementar; Colite ulcerativa; Prednisolona; Radiação síncrotron; TXRF.

Aos meus avós, Milto e Junko e
aos meus pais, Andréa e Evandro.

Agradecimentos

Agradeço a Deus pela dádiva da vida e por todas as oportunidades de aprendizado e crescimento.

Aos meus avós, Milto e Junko, minha tia Débora, e à minha mãe Andréa, por toda dedicação, por todo amor e por estarem sempre presentes fazendo o possível e o impossível para que todos os meus sonhos se concretizem.

Ao meu pai, Evandro, sua esposa Ana e meus irmãos Brenda e Vitor, por me receberem de portas abertas sempre que precisei e por todo o carinho.

Aos tios, padrinhos, primos, todos os familiares que sempre me deram apoio em todas as minhas decisões.

Ao meu namorado, amigo e companheiro, Ray, por todo o amor e paciência ao longo desses quase três anos.

Ao pessoal do laboratório, Guilherme (Culpado), Ana Flávia e Luiz Augusto (Chokito) pela amizade e o convívio diário, e especialmente à Leticia Diniz (Skalar), por ser uma amiga extraordinária de muitos anos. “Lê” (rs!), sem você esse trabalho não existiria.

À “turma do gordão”, Carlos (Pituta), Natália (Chita), Guilherme, Fábio (Kuíka), Rafael (Dóri), Paulinha, Thiago (Batz), Pedro (Berinjela), Juliana (Franga/Vó), Frey, Rafael (Inhonho) por proporcionarem muitos momentos engraçados. Um agradecimento especial à turminha do almoço de todo dia.

Não poderia deixar de agradecer por todo apoio e amizade das minhas amadas amigas da Rep. Erva Doce, Beatriz (Dóthi), Roberta (Bucuva), Bárbara (Cta), Mayra (Ari), Mariana (Friboi), Isabela (Schabowy), Lilian (Madonna), Ana Flávia (Rebram), Lounan (Meidin), Giulia (Sequóia) e Amanda (Pig). Vocês me acolheram em momentos muito difíceis e sou eternamente grata a vocês.

À minha querida amiga Mayara (Avenk). Em pouco tempo tivemos muitas histórias pra contar. Sou grata pela amizade especial que construímos.

À querida Tâmara, por ser uma amiga tão generosa e com um coração maravilhoso. Às minhas eternas companheiras Milena (Trabuco) e Maria Teresa (Tetê), vocês sempre vão ter um espaço só de vocês no meu coração.

Às minhas amigas de longa data Mariana (Ameba), Mariana Porto, Isabela, Luciana e Marília por serem pessoas maravilhosas e não permitirem que nem o tempo e nem a distância enfraqueçam nossos laços.

Ao pessoal do circo, Marília, Ana Cecília, Ana Maria, Cíntia, Isadora, Ana Luíza, Luíza e Luana. As sextas-feiras são muito mais felizes com vocês.

Aos meninos da Rep. Xiqero, Giovani (Jomar), Lucas (Sauim), Felipe (Rala) e suas respectivas namoradas Stéfanie (Mijoleta), Karen (Cuaiada) e Roberta (Bucs) por serem muito queridos.

Sou grata também ao Dr. Carlos Alberto Perez, pela atenção e toda a ajuda durante as medidas no LNLS.

Aos professores do Departamento de Física e Biofísica Ney Lemke, Roberto Fernandez, Vladimir Costa, Paulo Ramos, Marcos Fontes, Mário de Oliveira e Marcos Rezende.

E, por último, mas não menos importante, ao professor Joel por toda paciência e ensinamentos ao longo desses anos.

*“A vida é breve, mas cabe nela muito mais do que somos,
capazes de viver.” (José Saramago)*

Resumo

A colite ulcerativa faz parte de um grupo de Doenças Inflamatórias Intestinais (DII) e é caracterizada por uma disfunção nas células T da mucosa, inflamação celular e produção anormal de citocinas, que resultam em um dano na mucosa do cólon. As DII acometem uma grande parcela da população mundial, tendo uma prevalência maior nos países desenvolvidos, atingindo cerca de 1,4 milhões de pessoas nos Estados Unidos e 2,2 milhões na Europa. No Brasil, devido às dificuldades diagnósticas e reduzido número de amostras, os dados disponíveis são restritos, mas pode-se afirmar que há uma tendência crescente no número de casos no país. Apesar de vários estudos na área, a causa da colite ulcerativa é ainda desconhecida. Neste sentido, a contribuição deste trabalho no esclarecimento dessa problemática está centrada no estudo da composição multielementar do tecido do cólon de animais com colite ulcerativa induzida. Neste trabalho apresentamos um estudo pelo método analítico não-destrutivo de fluorescência de raios-X por reflexão total (TXRF), utilizando radiação síncrotron, de amostras de tecidos de cólon de roedores sem e com indução de colite e submetidos ao uso de prednisolona, um dos medicamentos mais utilizados no tratamento de colite ulcerativa. As análises quantitativas foram realizadas na linha D09B – XRF no Laboratório Nacional de Luz Síncrotron – LNLS, que faz parte do Centro Nacional de Pesquisa em Energia e materiais (CNPEM), em Capinas – SP. Foi possível determinar as concentrações dos elementos P, S, Cl, K, Ca, Ti, Cr, Mn, Fe, Ni, Cu, Zn, Se, Br e Rb a partir da intensidade das correspondentes linhas $K\alpha_1$, utilizando o elemento Ga como padrão interno. As correspondentes correlações de Pearson entre as concentrações dos elementos foram também determinadas. Nesta análise, apesar de as amostras apresentarem diferentes correlações entre os elementos P e S, e Ca e Ti, nos diferentes grupos, não há na literatura dados que confirmem a correlação entre esses elementos e a presença ou a neutralização da colite.

Palavras-chave: análise multielementar, colite ulcerativa, prednisolona, TXRF, radiação síncrotron

Abstract

Ulcerative colitis is part of a group of Inflammatory Bowel Disease (IBD) and is characterized by dysfunction of mucosal T cells, abnormal cell inflammation and cytokine production that result in damage to the mucosa of the colon. IBD affects a large portion of the world population, with a higher prevalence in developed countries, affecting about 1.4 million people in the United States and 2.2 million in Europe. In Brazil, the available data are restricted due to diagnostic difficulties and the small number of samples, but it can be stated that the number of cases in the country is increasing. Although there are several studies, the cause of ulcerative colitis is until now unknown. In this sense, the contribution of this work in clarifying this issue is focused on the study of the multielemental composition of the colon tissues from animals with induced ulcerative colitis. We studied samples of rodent colon tissues in three situations: healthy tissue, tissue with induced colitis without pre-treatment and tissue with induced colitis and pre-treated with prednisolone, one of the medications most applied in ulcerative colitis treatment. For the analysis, we used the non-destructive analytical method of X-ray fluorescence by total reflection (TXRF) realized in line D09B - XRF at the Brazilian Synchrotron Light Laboratory - LNLS/CNPEM, Campinas- SP. It was possible to determine the concentrations of P, S, Cl, K, Ca, Ti, Cr, Mn, Fe, Ni, Cu, Zn, Se, Br and Rb elements from the intensity of the corresponding $K_{\alpha 1}$ lines, by using Ga as internal standard. The corresponding Pearson correlations between the concentrations of the elements were also determined. In this analysis, although the samples have different correlations between P and S, Ca and Ti elements in the different groups, there is no data in the literature to confirm this relation of these elements with colitis's presence or neutralization.

Key-words: multielemental analysis, ulcerative colitis, prednisolone, TXRF, synchrotron radiation

Lista de Figuras

Figura 1: Ilustração dos processos básicos da XRF (Serpa, 2007).....	17
Figura 2: Energia de ligação ou corte de absorção dos elétrons das camadas K, L e M em função do número atômico (Nascimento-Filho, 1999).....	18
Figura 3: Diagrama de transições quânticas entre os níveis K, L, M e N (Serpa, 2007).	19
Figura 4: Ilustração da emissão dos raios-X característicos.	20
Figura 5: Representação esquemática do efeito Auger (Nascimento-Filho, 1999)	21
Figura 6: Rendimento da fluorescência dos níveis K, L e M em relação ao número atômico (Nascimento-Filho, 1999).....	21
Figura 7: Representação esquemática da fluorescência de raios-X por dispersão de comprimento de onda e por dispersão de energia (Nascimento-Filho, 1999).	23
Figura 8: Geometria de excitação-deteção da EDXRF, com linhas contínuas representando os raios-X incidentes e espalhados; e os tracejados, os raios-X característicos (Nascimento-Filho, 1999)	23
Figura 9: Geometria de excitação-deteção da TXRF, com linhas contínuas representando os raios-X incidentes e espalhados, e os tracejados são os raios-X característicos (Nascimento-Filho, 1999).....	25
Figura 10: Representação da refração e reflexão de um feixe de radiação em função do ângulo de incidência.....	26
Figura 11: Visão do anel de armazenamento de partículas do LNLS.	30
Figura 12: Critério para avaliação da gravidade e extensão da lesão colônica (Bell <i>et al.</i> , 1995).	32
Figura 13: Esquema representativo da preparação de amostras.....	33

Figura 14: Aparato experimental da Linha D09B – XRF (LNLS).	34
Figura 15: Espectro característico de uma amostra de cólon de roedor submetido à indução de colite (grupo controle)	37
Figura 16: Curva de sensibilidade relativa	39
Figura 17: Limite de detecção calculado a partir das amostras certificadas. ...	39

Lista de Tabelas

Tabela 1: Constituição das diferentes diluições da solução padrão, e suas respectivas concentrações (ppm).....	38
Tabela 2: Concentração elementar obtida ($\mu\text{g.g}^{-1}$) das amostras de cólon utilizando SR-TXRF.....	41
Tabela 3: Coeficiente de correlação de Pearson para amostras de cólon do grupo branco (fortes correlações foram destacadas).	42
Tabela 4: Coeficiente de correlação de Pearson para amostras de cólon do grupo controle (fortes correlações foram destacadas).	43
Tabela 5: Coeficiente de correlação de Pearson para amostras de cólon do grupo tratado (fortes correlações foram destacadas).	44
Tabela 6: Correlações de Pearson superiores a 70 % entre os elementos das amostras.....	47

SUMÁRIO

1 – Introdução	13
1.1 Doença inflamatória intestinal	13
1.2 Composição multielementar	14
2 – Objetivo	16
3 – Fundamentos Teóricos	17
3.1 Fluorescência de raios-X	17
3.1.1 Análise por XRF	22
3.2 Fluorescência de raios-X por reflexão total	25
3.2.1 Limite de detecção	28
3.3 Radiação síncrotron associada à técnica de TXRF	29
4 – Materiais e Métodos	31
4.1 Amostras	31
4.1.1 Preparação das amostras de cólon	31
4.2 Arranjo experimental	33
4.2.1 Análise quantitativa	33
4.3 Análise estatística	35
4.4 Análise do coeficiente de correlação de Pearson	35
5 – Resultados e Discussão	37
5.1 Cálculo das sensibilidades relativas	37
5.2 Limite de detecção	38

5.3 Análise das amostras	40
7 – Perspectivas Futuras	49
8 – Referências Bibliográficas	50

1 – Introdução

1.1 Doença inflamatória intestinal

O termo doença inflamatória intestinal (DII) é utilizado para designar desordens inflamatórias crônicas que atingem o trato gastrointestinal e que ainda não apresentam causas totalmente esclarecidas (Souza, Troncon, Rodrigues *et al.*, 2002).

As DII afetam grande parte da população mundial, apresentando ocorrência predominante nos países desenvolvidos, atingindo cerca de 2,2 milhões de pessoas na Europa e 1,4 milhões de pessoas nos Estados Unidos (Loftus, 2004). No Brasil, embora os dados disponíveis sejam muito restritos, pode-se afirmar que o número de casos desta doença esteja crescendo. (Souza, Troncon, Rodrigues *et al.*, 2002).

Os diagnósticos mais comuns de DII são a doença de Crohn (DC) e a retocolite ulcerativa (RCU) (Kiesslich, Fritsch, Holtmann *et al.*, 2003) e, que, apesar de compartilharem etiologia e epidemiologia, essas doenças apresentam diferenças em sua fisiopatologia (Steidler, 2001).

A DC é caracterizada por inflamação crônica que pode ser observada em todo o trato gastrointestinal. Essa inflamação se propaga por toda a parede intestinal, possibilitando o aparecimento de perfurações (Gasche, 2000; Veronesi, 2003).

Já na RCU, a inflamação é restrita ao cólon, essencialmente à região reto-ânus (distal), estendendo-se progressivamente até a região proximal e se caracteriza por afetar predominantemente camadas superficiais da parede intestinal (Veronesi, 2003).

Apesar das DII não possuírem causas totalmente conhecidas, os fatores ambientais são provavelmente tão importantes quanto à composição genética para seu desenvolvimento. Dentre os fatores ambientais estão a dieta, o fumo, a ocupação e o estresse (Fiocchi, 1998; Hanauer, 2006).

As DII estão associadas com o risco de câncer colorretal e essa associação é fortemente aumentada com a grande extensão da lesão, a longa duração da doença e sua ocorrência em pessoas jovens. Este risco é maior com a presença da RCU quando comparado com a presença da DC (Kiesslich, Fritsch, Holtmann *et al.*, 2003, Veronesi, 2003).

No tratamento das DII, um dos medicamentos mais utilizados é pertencente ao grupo dos glicocorticoides, tais como a prednisolona e a prednisona.

O mecanismo de ação desses fármacos consiste na ligação da molécula de glicocorticoide com os receptores intracelulares que controlam a transcrição gênica. O complexo receptor-glicocorticoide favorece a formação de dímeros que migram para o núcleo celular e se ligam ao DNA, promovendo uma modificação na transcrição gênica, induzindo a síntese de algumas proteínas e inibindo a síntese de outras, e, assim, afetando as funções de várias células que participam do processo inflamatório. (Marx, 1995).

A administração de glicocorticoides reduz, ainda, a incidência de diarreia, provavelmente devido a capacidade de melhorar a absorção de sódio e água no cólon de pacientes com colite (Sandle *et al.*, 1986).

1.2 Composição multielementar

A análise da composição multielementar de amostras biológicas é importante e necessária, pois determina quais são seus elementos químicos constituintes, assim como a proporção com a qual os mesmos aparecem. Estes elementos têm um papel fundamental em todos os sistemas biológicos, participando de todos os processos metabólicos, como componentes de diferentes enzimas, catalisando interações químicas em células vivas (Ivyengar, Kollmer e Browen, 1970; Carvalho, Magalhães, *et al.*, 2007).

A classificação dos elementos químicos varia de acordo com os níveis de concentrações presentes em uma determinada amostra, sendo denominados elementos ultra-traço, quando sua concentração é menor que 0,01 µg/g; elementos

traço, quando a concentração está entre 0,01 e 100 µg/g; e elementos majoritários, quando a concentração é maior que 100 µg/g (Lindhu, 1991).

No organismo humano, 15 elementos são considerados essenciais, sendo eles: Ca, Cu, Cl, F, I, Fe, Mg, Mn, Mo, N, P, K, Na, S e Zn (Tolgyessy, Havranek e Dejmekova, 1990). Sabe-se que todos os tecidos do corpo apresentam uma composição semelhante destes elementos, que varia de acordo com a atividade que exercem. Além disso, é reconhecido também que portadores de certas doenças apresentam excesso ou a deficiência dos elementos essenciais, com relação ao nível fisiológico humano (Cesareo, 1988).

Mesmo que nem todos os elementos químicos presentes nas amostras tenham suas funções biológicas totalmente descritas, grande parte deles é responsável por importantes atividades no metabolismo humano e, portanto, estão diretamente relacionados com a manutenção da saúde e o funcionamento adequado do organismo (Yamashita, 2006).

Alguns elementos químicos apresentam atividades relacionadas diretamente com a neutralização da colite. De acordo com alguns estudos, elementos como Zn, Ca e Se apresentam efeitos positivos no tratamento e prevenção da colite ulcerativa (Jacobs, 1988, Galloway *et al.*, 1987, Hadjiolov e Grueva, 1986).

2 – Objetivo

Este trabalho tem como objetivo estudar a aplicação do método analítico não-destrutivo de fluorescência de raios-X por reflexão total (TXRF) em amostras de cólon de roedores e, assim, determinar as concentrações elementares nos tecidos de cólon sem e com colite induzida e verificar possíveis elementos como bioindicadores para a determinação da patologia. Além disso, analisar as diferenças entre as concentrações das amostras de cólon com colite induzida e submetido ao uso de Prednisolona, um dos medicamentos mais utilizados no tratamento da doença.

3 – Fundamentos Teóricos

3.1 Fluorescência de raios-X

A técnica analítica de fluorescência de raios-X (XRF – *X-Ray Fluorescence*) foi introduzida na década de 50 e vem sendo utilizada para a avaliação quali-quantitativa da composição química em diversos tipos de amostras. Por ser uma técnica de baixo custo e que permite uma análise eficaz e simultânea de diversos elementos, pode ser aplicada em múltiplas áreas a fim de se obter uma correlação entre os elementos componentes de uma amostra.

Dentre os métodos de análise por XRF, pode-se citar a fluorescência de raios-X por dispersão de comprimento de onda (WDXRF – *Wavelength Dispersive X-Ray Fluorescence*), a fluorescência de raios-X por dispersão de energia ou energia dispersiva (ED-XRF – *Energy Dispersive X-Ray Fluorescence*), a fluorescência de raios-X por reflexão total (TXRF – *Total Reflection X-Ray Fluorescence*) e a microfluorescência de raios-X (μ -XRF – *Micro X-Ray Fluorescence*) (Tertian e Claisse, 1982).

A análise por fluorescência se baseia em medir as intensidades (números de raios-X detectados por unidade de tempo) de radiação emitidas pelos componentes constituintes de uma determinada amostra quando um elemento químico é devidamente excitado, ocorrendo emissão de uma radiação característica (Figura 1).

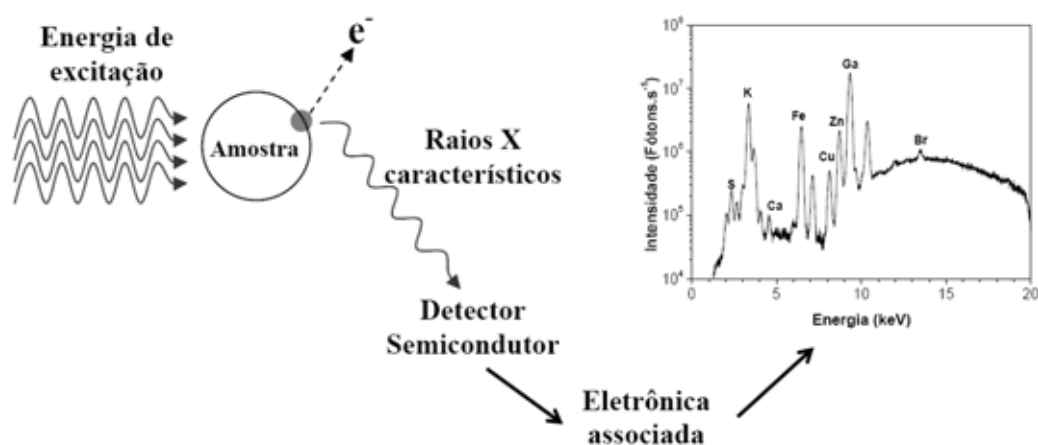


Figura 1: Ilustração dos processos básicos da XRF (Serpa, 2007).

Quando um elemento presente na amostra é irradiado por um feixe de fóton com energia equivalente ou superior à energia de ligação característica de um elétron localizado em um determinado orbital, este tende a ejetar os elétrons do interior dos níveis dos átomos, os quais se encontram instáveis. Essa energia de excitação pode ser chamada também de energia de corte de absorção e é denominado, por exemplo, E_K , o corte de absorção de um elétron do nível K (Figura 2).

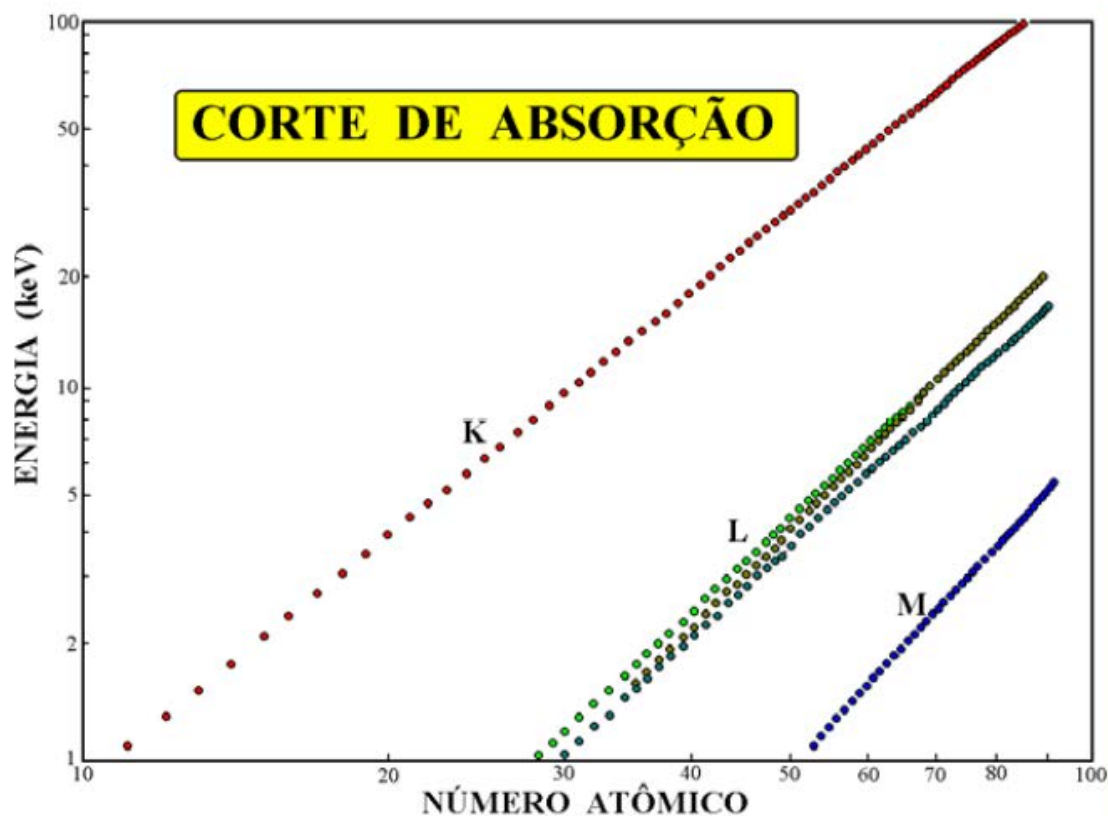


Figura 2: Energia de ligação ou corte de absorção dos elétrons das camadas K, L e M em função do número atômico (Nascimento-Filho, 1999).

Em geral, encontra-se a denominação de energia crítica de excitação referindo-se à energia de ligação, visto que essa representa a menor energia necessária para que elétrons sejam ejetados de um átomo. Nessa condição, o átomo, com carência de um elétron, fica instável, e, então, elétrons dos níveis mais afastados realizam um salto quântico para preencher a vacância. Por exemplo, se um elétron localizado no nível K é ejetado, a lacuna pode ser preenchida por elétrons situados nas camadas L, M, N e cada transição eletrônica constitui na perda de energia do elétron, que é emitida na forma de um fóton de raios-X (raios-X

característicos), de energia característica e bem definida para cada elemento (Figura 3) (Nascimento-Filho, 1999).

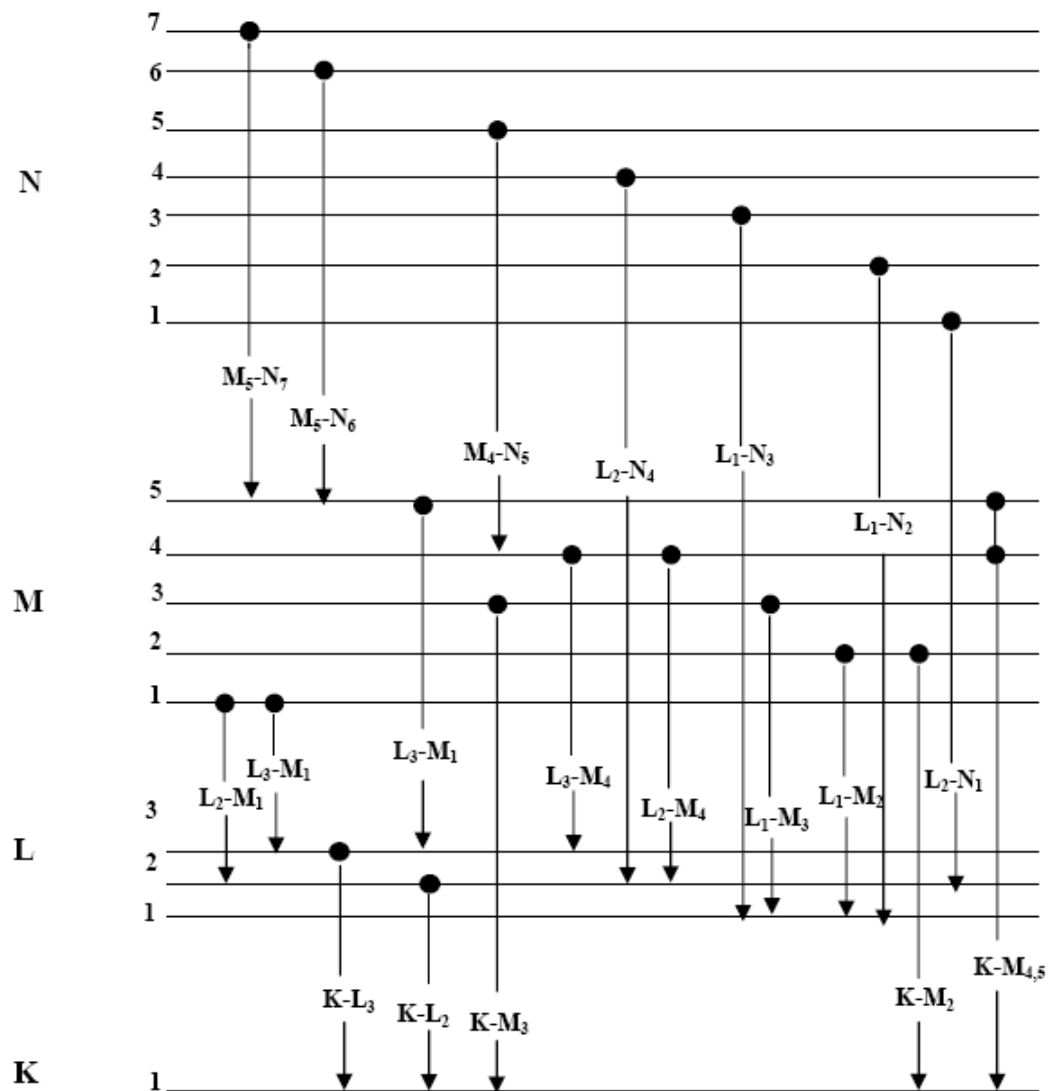


Figura 3: Diagrama de transições quânticas entre os níveis K, L, M e N (Serpa, 2007).

De modo resumido, a análise por XRF se resume em três etapas:

- Excitação dos elementos presentes em uma amostra;
- Dispersão dos raios-X característicos emitidos;
- Detecção da radiação característica.

Os raios-X emitidos por um determinado elemento são denominados de acordo com as transições eletrônicas descritas anteriormente. Assim, recebem o nome de K_α e K_β , os raios-X provenientes das transições $L \rightarrow K$ e $M \rightarrow K$, respectivamente. Da mesma maneira ocorre com os outros níveis, sendo assim, $M \rightarrow L$ e $N \rightarrow L$ emitem raios-X L_α e L_β e, assim, sucessivamente (Figuras 4).

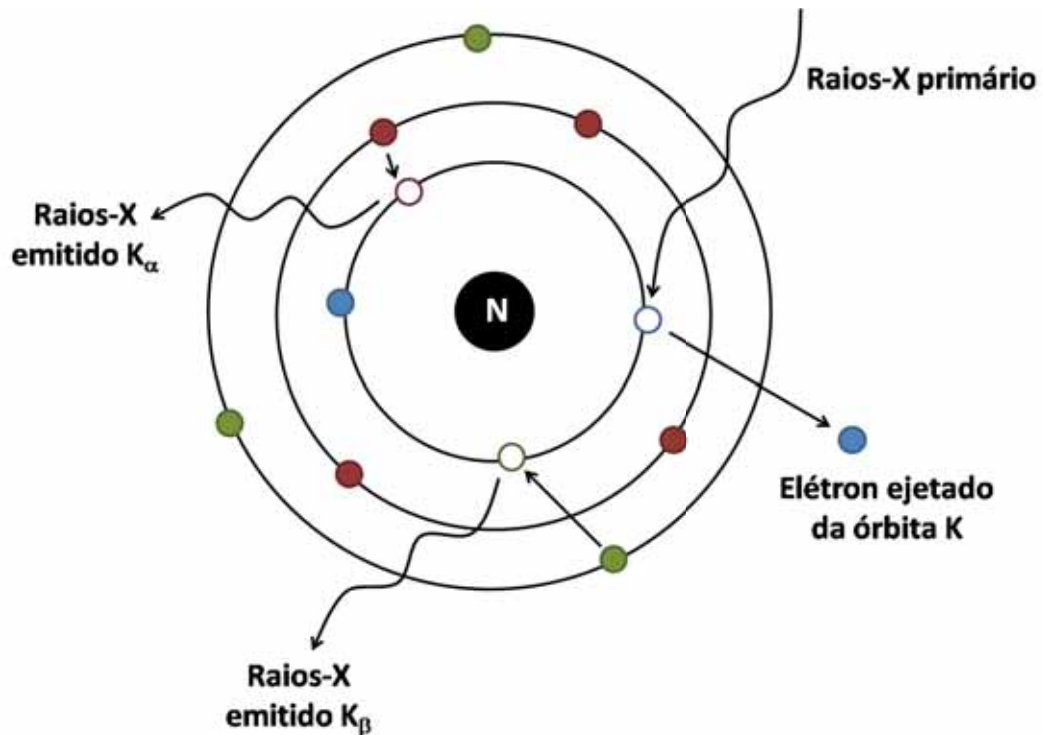


Figura 4: Ilustração da emissão dos raios-X característicos.

A radiação característica emitida pode, ocasionalmente, interagir com elétrons de níveis mais externos desse mesmo átomo. Com isso, ao invés de ocorrer emissão de radiação característica, são emitidos elétrons (elétrons Auger) de energias também conhecidas. Como consequência desse efeito denominado Auger, as linhas espectrais de uma dada série não se apresentam tão intensas por conta do número de vacâncias criadas no orbital associado (Figura 5) (Nascimento-Filho, 1999).

A fluorescência pode ter seu rendimento definido como sendo o número de raios-X efetivamente emitidos em relação ao número de vacâncias produzidas em um determinado orbital do átomo (Figura 6). Pode-se perceber que o rendimento da fluorescência na camada K é menor para elementos de número baixo atômico

(abaixo de 20), na camada L para elementos até 60 e na camada M para praticamente todos os elementos.

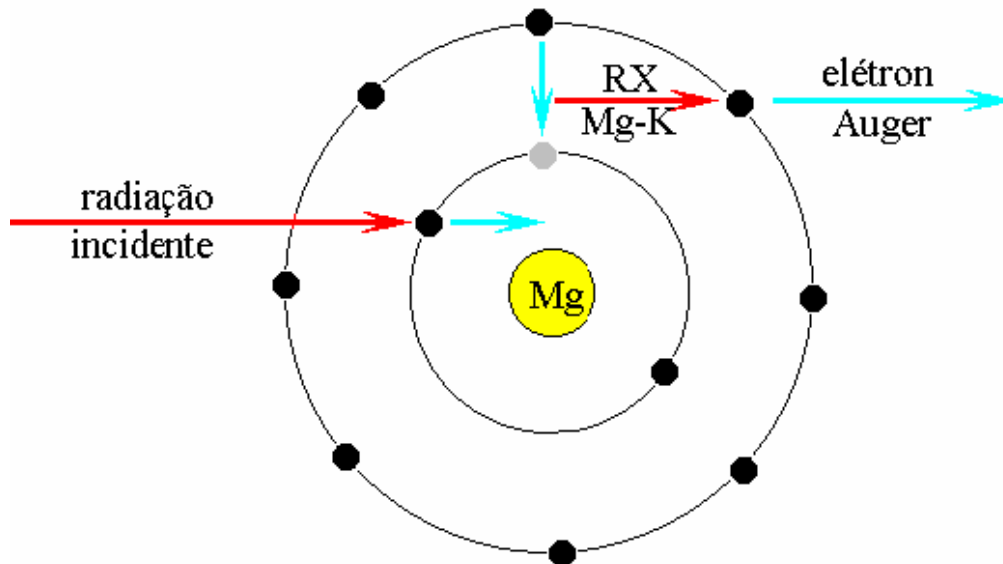


Figura 5: Representação esquemática do efeito Auger (Nascimento-Filho, 1999)

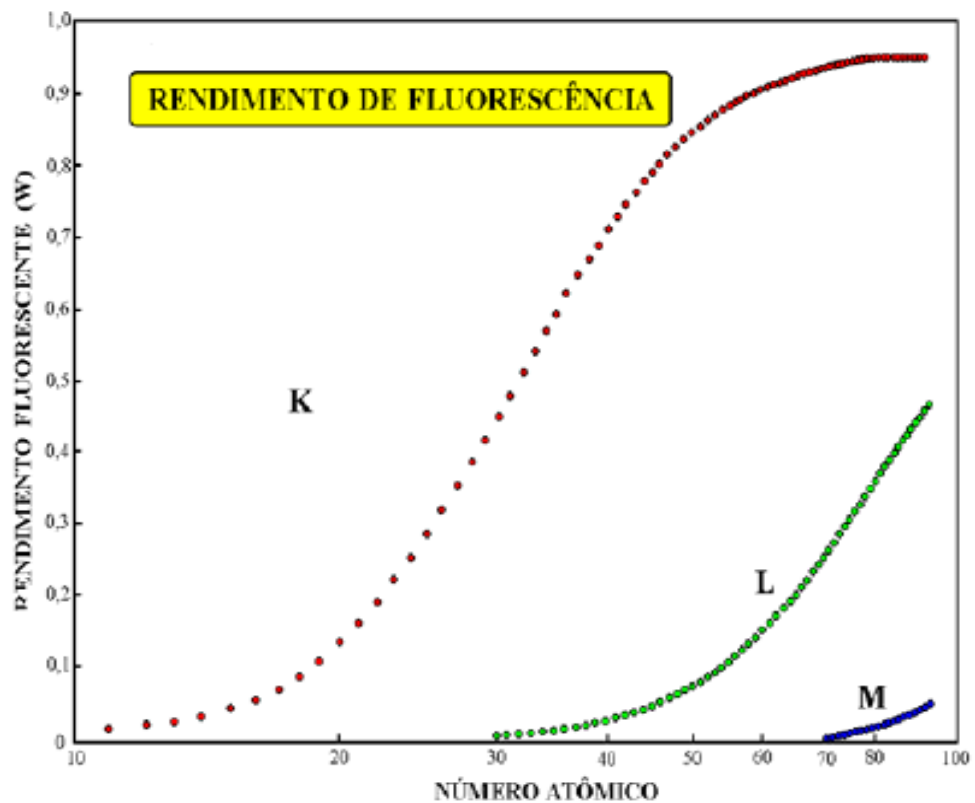


Figura 6: Rendimento da fluorescência dos níveis K, L e M em relação ao número atômico (Nascimento-Filho, 1999).

3.1.1 Análise por XRF

O primeiro tipo de análise utilizando a XRF foi a fluorescência de raios-X por dispersão de comprimento de onda (WDXRF – *Wavelength Dispersive X-ray Fluorescence*) com o uso de espectrômetros. Essa técnica é baseada na lei de Bragg (relaciona o ângulo da radiação incidente, a distância entre planos num cristal e o comprimento de onda da radiação incidente) e necessita de um movimento preciso e sincronizado entre o cristal difrator e o detector (Figura 7) (Jenkins, 1981; Nascimento-Filho, 1999).

A utilização da WDXRF possibilitou, por exemplo, a determinação da composição química de plantas, a fim de estimar o impacto das emissões que ocorrem nas queimadas, uma das maiores causas da poluição atmosférica. Garivait *et al* (1997) quantificaram, através da WDXRF, as concentrações de Na, Mg, P, S, Cl, Ca, K, Mn, Fe, que são elementos nutrientes das plantas, e também analisaram as concentrações de Si como possível contaminante.

O surgimento de um detector semicondutor de Si(Li), capaz de discriminar raios-X de energias próximas, tornou possível o desenvolvimento de uma nova variante da técnica de fluorescência de raios-X muito empregada na atualidade, denominada fluorescência de raios-X por dispersão de energia (EDXRF – *Energy Dispersive X-ray Fluorescence*), também conhecida como fluorescência de raios-X não dispersiva (Figuras 7 e 8) (Revenko, 1994; Potts, Ellis, *et al.*, 2002).

Este método de análise é mais comum na determinação das concentrações elementares de amostras sólidas sem a necessidade de pré-tratamento químico. Para tornar a medida viável em amostras líquidas, pode-se recorrer a uma pré-concentração ou ao emprego de troca iônica, precipitação, quelação, etc (Nascimento-Filho, 1999).

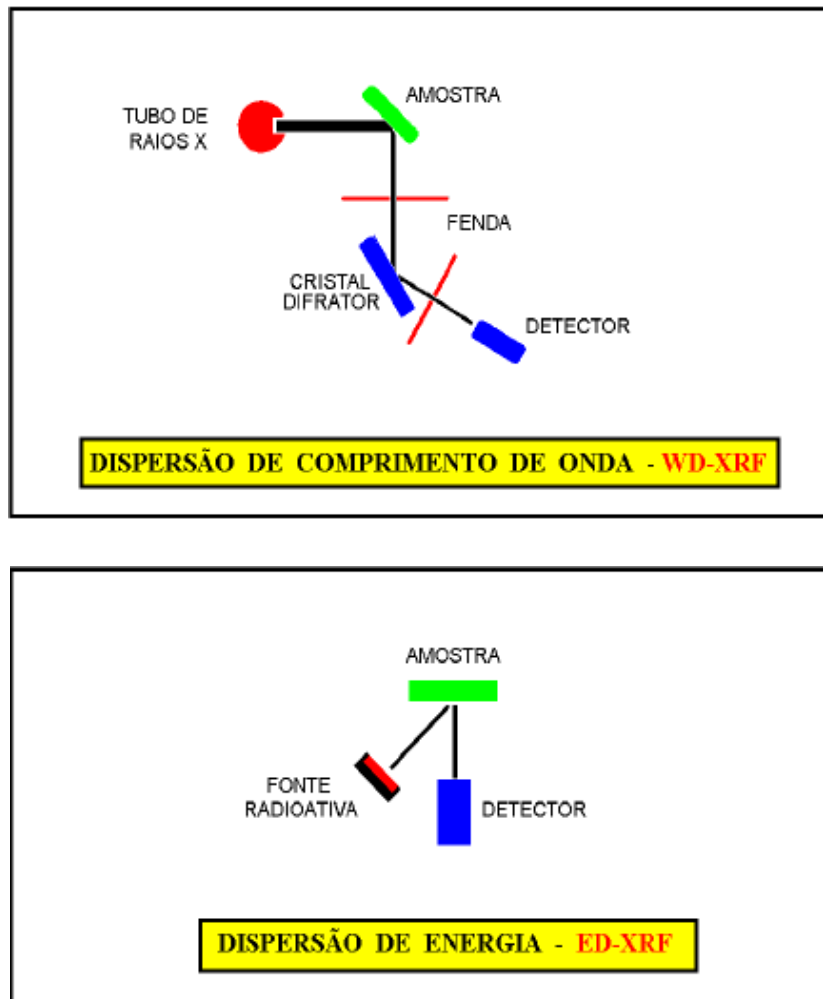


Figura 7: Representação esquemática da fluorescência de raios-X por dispersão de comprimento de onda e por dispersão de energia (Nascimento-Filho, 1999).

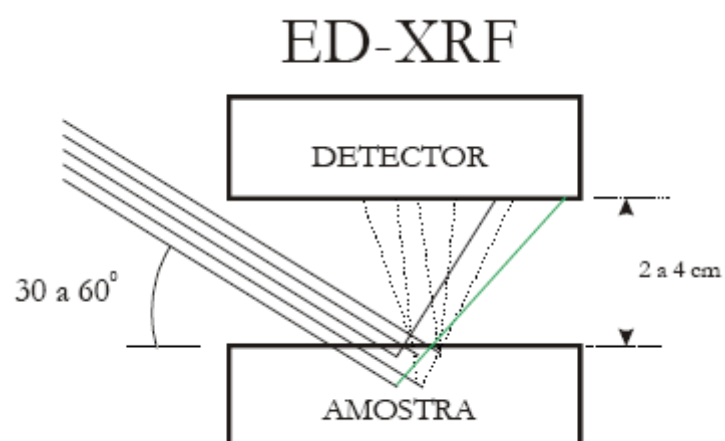


Figura 8: Geometria de excitação-deteção da EDXRF, com linhas contínuas representando os raios-X incidentes e espalhados; e os tracejados, os raios-X característicos (Nascimento-Filho, 1999)

A técnica apresenta uma alta velocidade analítica para avaliação semi-quantitativa de amostras de interesse biológico quando são utilizados tubos de raios-X na excitação. Além disso, o emprego de fontes radioativas emissoras de raios-X e/ou gama de baixa energia (principalmente fontes de ^{55}Fe , ^{57}Co , ^{109}Cd , ^{238}Pu , ^{241}Am) pode substituir o uso de tubos de raios-X, o que torna a análise mais rápida, barata e de maior facilidade na operação. Entretanto, a consequência disso é a perda de sensibilidade na análise (Alvarez, Van Espen e Quintana, 2004; Singh e Puri, 2006). Ainda assim, a ED-XRF empregada com o uso de fontes radioativas possui inúmeras aplicações em amostras que não necessitam de uma alta sensibilidade analítica.

Utilizando o a técnica de ED-XRF portátil com o emprego de fontes radioativas (Cd^{109} e Am^{241}), Sitko *et al.* (2004) estudaram, por exemplo, as concentrações de Zn e Pb em amostras de solo e os resultados obtidos foram comparados com os encontrados no uso da técnica de WDXRF, sendo as diferenças insignificantes.

Ivanova *et al.* (1999) determinaram, utilizando diferentes fontes radioativas (Pu^{238} e Cd^{109}), a toxicidade dos elementos em plantas. Os resultados mostraram como bioindicadores de poluição ambiental os elementos Br, Ca Fe, K, Mn, Rb, Sr e Zn e não foi possível detectar os elementos tóxicos As, Cd, Cu, Cr, Hg, Ni, Se e Pb devido às suas baixas concentrações.

Além de amostras ambientais, a técnica permite a determinação elementar de amostras biológicas. Joseph *et al.* (2013), por exemplo, analisaram amostras de osso femoral de pacientes com osteoporose, utilizando ED-XRF induzida por Cd^{109} e detector Si(Li), encontrando, predominantemente, Ca e Sr.

Embora apresente inúmeras vantagens, em análises quantitativas, a técnica de ED-XRF tem como desvantagem a necessidade de métodos para correção do efeito de matriz, como absorção e reforço (*enhancement*) dos raios-X característicos, devido às interações entre os elementos presentes na amostra (Karjou, 2007).

Em outra variação da fluorescência de raios-X, denominada fluorescência de raios-X por reflexão total (TXRF – *Total Reflection X-ray Fluorescence*), estes

tipos de efeito não ocorrem. Nesta técnica são utilizadas quantidades muito pequenas de amostras ($< 10 \mu\text{l}$ de amostras líquidas e evaporadas ou $< 10 \mu\text{g}$ de amostras sólidas) depositadas em um suporte, de modo a formar um filme fino. Sendo assim, não há necessidade de correção para o efeito matriz, podendo-se utilizar nas análises quantitativas uma relação direta entre as intensidades dos raios-X e as concentrações dos elementos presentes nas amostras (Nascimento-Filho, 1999).

3.2 Fluorescência de raios-X por reflexão total

A técnica de TXRF se baseia na excitação de raios-X característicos de uma amostra por radiação eletromagnética, por exemplo, os raios-X gerados em tubos ou através da radiação síncrotron (Figura 9) (Nascimento-Filho, 1999).

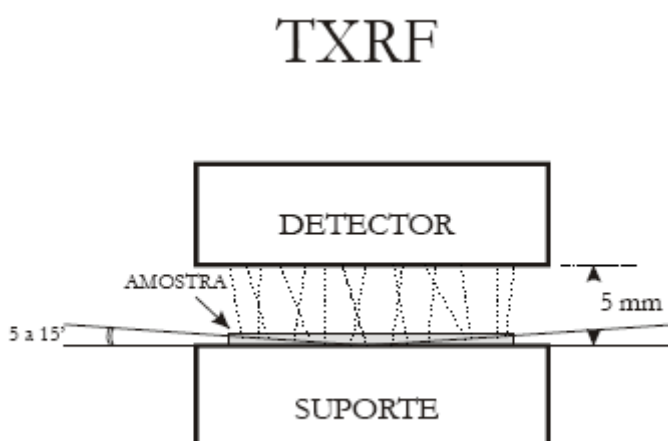


Figura 9: Geometria de excitação-deteção da TXRF, com linhas contínuas representando os raios-X incidentes e espalhados, e os tracejados são os raios-X característicos (Nascimento-Filho, 1999).

Quando um feixe de radiação monoenergético passa de um meio (ar ou vácuo) e atinge uma determinada superfície plana de certo material, pode adentrar, ocorrendo a refração, ou pode ser refletido pela superfície com ângulo de emergência igual ao de incidência, o que caracteriza a reflexão. O que faz com que ocorra um ou outro processo é a energia da radiação incidente, o ângulo de

incidência dessa radiação e a densidade eletrônica do material (Nascimento-Filho, 1999).

Na reflexão total de raios-X, o ângulo de refração tende a zero e o feixe refratado tangencia a interface entre os meios. Assim, é necessário que haja um ângulo de incidência mínimo (ângulo crítico) para que não ocorra a refração e toda a radiação incidente sofra reflexão total (Figura 10) (Nascimento-Filho, 1999).

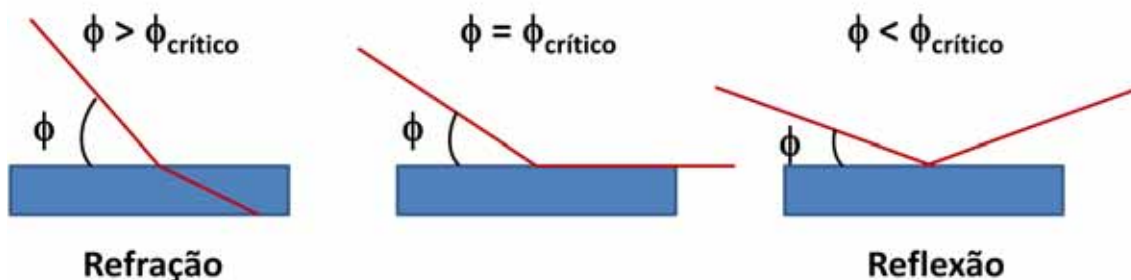


Figura 10: Representação da refração e reflexão de um feixe de radiação em função do ângulo de incidência

Desta maneira, pode-se afirmar que na TXRF a radiação incidente não interage com o suporte, atravessando a amostra tanto na incidência como na reflexão, e, portanto, aumentando a probabilidade de que os átomos dos elementos constituintes da amostra sejam excitados. Com isso, se faz relevante a espessura da amostra a ser analisada, que, neste caso, é considerada um filme fino (da ordem de microlitros), o que torna possível desprezar os efeitos de absorção da radiação presentes em outros tipos de análise por XRF (Nascimento-Filho, 1999).

Desse modo, a equação básica para análise quantitativa é a relação entre a intensidade fluorescente da linha característica K_{α} (salto quântico da camada L para camada K) e a concentração de um elemento de interesse, que pode ser escrito na forma:

$$I_i = C_i \cdot S_i \quad (1)$$

em que I_i representa a intensidade líquida (cps) da linha característica K_{α} emitida; C_i a concentração (ppm ou $\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$) na solução pipetada no suporte; e S_i a sensibilidade elemental do sistema (cps/ppm) para o elemento de interesse i (Nascimento-Filho, 1999).

Para calcular as concentrações dos elementos presentes nas amostras é necessário que um padrão interno seja adicionado a cada uma delas, garantindo a vantagem de se corrigir as instabilidades do sistema, tais como, flutuações no gerador, problemas na emissão e detecção dos raios-X e erros operacionais, como posicionamento das amostras e pipetagem.

Os elementos utilizados como padrões internos devem ser adicionados nas amostras em quantidades muito pequenas, sendo os mais utilizados o Ge (germânio) e o Ga (gálio), nas amostras líquidas, e o Co (cobalto) e o Y (ítrio) em outros tipos de amostras (Nascimento-Filho, 1999).

Dessa forma, com a utilização do padrão interno, é possível calcular as concentrações dos elementos utilizando-se a equação 2:

$$\frac{I_i}{I_p} = \frac{S_i}{S_p} \cdot \frac{C_i}{C_p} \quad (2)$$

em que, i representa o elemento de interesse, p o elemento utilizado como padrão interno, C a concentração (ppm), S a sensibilidade relativa elementar (em relação ao elemento utilizado como padrão interno) e I a intensidade dos raios-X característicos (cps).

Para calcular a sensibilidade de cada elemento, utiliza-se um padrão multielementar constituído dos mais variados elementos em baixa concentração (na faixa de ppm) e emissores de raios-X com energias não muito próximas para que não haja sobreposição de picos (Nascimento-Filho, 1999).

Partindo da segunda equação, tem-se:

$$\frac{I_i}{I_p} \cdot C_p = \frac{S_i}{S_p} \cdot C_i \quad (3)$$

Fazendo:

$$R_i = \frac{I_i}{I_p} \cdot C_p \quad (4)$$

e

$$S_{Ri} = \frac{S_i}{S_p} \quad (5)$$

e substituindo 4 e 5 na equação 3, tem-se a equação 6:

$$R_i = S_{Ri} \cdot C_i \quad (6)$$

em que, R_i representa a intensidade relativa e S_{Ri} a sensibilidade relativa para o elemento i .

Existe ainda uma forte correlação matemática entre a sensibilidade elementar e o número atômico dos elementos químicos. Dessa forma, com base nas sensibilidades elementares dos elementos contidos na solução padrão multielementar, torna-se possível estimar a sensibilidade para um elemento presente na amostra e que não está contido na solução padrão. E, dessa maneira, estimar sua concentração na amostra de interesse (Nascimento-Filho, 1999).

3.2.1 Limite de detecção

Na análise pela técnica de TXRF, outro parâmetro que deve ser considerado é o limite de detecção, que representa a menor quantidade que pode ser determinada estatisticamente em relação à radiação de fundo (BG – *Background*) de uma medida.

Em cada espectro de raios-X é possível observar uma linha aproximadamente contínua sob os picos característicos que constituem a amostra. Tal linha é consequência principalmente das interações das radiações espalhadas pela amostra com o detector e, também, das próprias radiações características emitidas por cada elemento. Deste modo, em cada pico no espectro de raios-X, há uma área como consequência, em parte, à intensidade dos raios-X característicos de um elemento i e, em parte, ao *background* naquela região i (Nascimento-Filho, 1999).

Assim, para calcular o limite de detecção, a área sob o pico de cada elemento de interesse é ajustada, obtendo-se as intensidades do *background*. Com

esses valores, o cálculo é feito utilizando a equação 7 (Streli, Wobrauschek, *et al.*, 2008):

$$LD_i = 3 \cdot \frac{C_i}{I_i} \cdot \sqrt{BG_i} \quad (1)$$

em que, LD_i representa o limite de detecção do elemento de interesse i (*cps*), C_i a concentração desse elemento (*ppm*), I_i a intensidade desse elemento (*cps*) e BG_i a intensidade do *background* (*cps*), sob o pico do elemento de interesse i .

Geralmente, os limites de detecção para a TXRF são bem menores que os da EDXRF. Isto ocorre devido, principalmente, à baixa intensidade do *background*, referente à baixa transferência de energia ao suporte da amostra em relação à EDXRF; ao fluxo da radiação primária disponível para a excitação da amostra, devido ao feixe refletido, que é muito mais efetivo do que na EDXRF; e à distância entre a amostra e o detector de Si que é muito maior que na EDXRF, aumentando, portanto, a eficiência de detecção dos raios-X característicos (Nascimento-Filho, 1999).

3.3 Radiação síncrotron associada à técnica de TXRF

A radiação síncrotron associada à técnica de TXRF (SR-TXRF - *Synchrotron Radiation Total Reflection X-Ray Fluorescence*) é mais utilizada quando o interesse do estudo é fazer uma análise quantitativa das amostras. Ela consiste em uma intensa radiação eletromagnética emitida por partículas carregadas aceleradas em direção ao centro de uma órbita circular. Quando essas partículas têm sua direção modificada por dipolos magnéticos, elas emitem radiação, denominada síncrotron (Gordon, Hanson, *et al.*, 1990).

Esse tipo de radiação tem como característica alto brilho espectral, que proporciona um aumento na intensidade dos raios-X primários se comparados aos gerados em tubos de raios-X convencionais. Além disso, sua alta polarização possibilita um reduzido *background* e sua elevada amplitude espectral abrange do infra-vermelho aos raios-X. O uso como fonte de excitação permite, ainda, o alcance

de baixos limites de detecção quando comparados com os obtidos através do uso de tubos de raios-X de alta potência (Klockenkämper, 1990, Görgl *et al.*, 1997).

Por conta dessas propriedades, a radiação síncrotron pode ser aplicada em diversos campos de pesquisa, como, por exemplo, geologia, arqueometria, ciências médicas e biológicas, dentre outras.

A aplicação da TXRF com uso de radiação síncrotron apresenta as seguintes vantagens:

- Necessita de uma pequena quantidade de amostra para análise;
- Técnica não destrutiva;
- Redução da radiação de fundo;
- Análise rápida e de baixo custo.

No Brasil, o uso desse tipo de radiação pode ser realizado no Laboratório Nacional de Luz Síncrotron (LNLS) (Figura 11), localizado na cidade de Campinas-SP. O LNLS faz parte do CNPEM – Centro Nacional de Pesquisa em Energia e Materiais e é constituído por 15 linhas de luz, com feixes de raios-X, infra-vermelho ou radiação ultravioleta. Por ser o único laboratório da América Latina, atrai diversos usuários brasileiros e do exterior com o intuito de desenvolver diferentes linhas de pesquisa (LNLS, 2007).



Figura 11: Visão do anel de armazenamento de partículas do LNLS.

4 – Materiais e Métodos

4.1 Amostras

A indução da colite e preparação das amostras de cólon dos roedores foram realizadas com a colaboração da equipe do Laboratório de Fitomedicamentos do Instituto de Biociências – UNESP/Botucatu.

4.1.1 Preparação das amostras de cólon

No estudo das composições elementares dos tecidos de cólon com colite induzida e tratados com diferentes fármacos, foram utilizados ratos machos da raça Wistar (180–220 g), provenientes do Biotério ANILAB – Paulínia/SP.

Os animais foram mantidos no biotério do Departamento de Farmacologia do Instituto de Biociências de Botucatu, UNESP, por pelo menos cinco dias antes do início dos experimentos. As condições controladas do biotério incluem alimentação dos animais com ração PanLab S.I. e água corrente *ad libitum*, ciclo de claro-escuro de 12 horas controlado e temperatura controlada de $21 \pm 2^{\circ}\text{C}$. O estudo seguiu um protocolo experimental aprovado pela Comissão de Ética em Experimentação Animal deste Instituto.

Neste trabalho foram criados 3 grupos, contendo 7 animais cada, de acordo com o uso ou não de pré-tratamento. O primeiro grupo (branco) foi composto por animais submetidos ao estresse do experimento, porém sem indução de colite e sem uso de pré-tratamento. No grupo 2 (controle), foram selecionados animais que seriam submetidos à indução de colite, porém não receberiam nenhum tipo de medicamento. O grupo 3 foi composto por animais com colite induzida e tratados com prednisolona.

Para induzir o processo inflamatório, foi utilizado o método descrito por Morris *et al.* (1989), com algumas alterações. Todos os animais do experimento foram submetidos a um período de 24 horas de jejum e, em seguida, anestesiados com éter. O ácido utilizado na indução de colite, o 2,4,6 trinitrobenzenosulfônico (TNBS), foi previamente preparado e a administração foi realizada por via retal (intracolônica). Uma solução de 0,25 ml contendo 10 mg de TNBS em etanol a 50%

(v/v) foi inserida através de um catéter de teflon (diâmetro de 2 mm) introduzido pelo ânus do animal até uma profundidade de 8 cm. Desde a introdução do catéter até a remoção, os animais são mantidos em posição vertical (de cabeça para baixo), até que desapareçam os efeitos da anestesia.

Os animais do grupo branco, como não tiveram colite induzida, receberam administração de solução salina ao invés do TNBS.

As doses de tratamento (2 mg/kg de prednisolona) foram administradas 96, 72, 48, 24 e 2 horas antes da indução da colite, por via oral, através de uma sonda esofágica. Os animais dos grupos branco (sem colite e sem tratamento) e controle (com colite e sem tratamento) foram utilizados como padrão comparativo e receberam solução salina por via oral, já que não receberam o pré-tratamento. Todos os animais foram sacrificados 48h após a indução da colite e tiveram os cólons retirados e analisados macroscopicamente, quanto aos danos intestinais causados, e posteriormente tiveram suas composições elementares estudadas.

A análise macroscópica dos cólons leva em consideração o comprimento e peso do cólon, assim como a severidade e extensão da lesão causada no intestino de acordo com uma escala descrita por Bell *et al.* (1995) (Figura 12).

Escore	Critério
0	Sem prejuízo
1	Hiperemia, sem úlceras
2	Úlcera linear sem inflamação significativa
3	Úlcera linear com inflamação em um sítio
4	Dois ou mais sítios de ulceração/inflamação
5	Dois ou mais sítios de ulceração e inflamação ou um sítio de inflamação maior que 1 cm ao longo da extensão do cólon
6-10	Se o prejuízo cobrir mais que 2 cm ao longo da extensão do cólon (o escore é aumentado em 1 ponto para cada centímetro adicional)

Figura 12: Critério para avaliação da gravidade e extensão da lesão colônica (Bell *et al.*, 1995).

Nessa análise, foi constatada a presença de lesões em todas as amostras dos grupos controle e tratado (escore ≥ 4) e o grupo branco apresentou escore 0, não apresentando lesões colônicas.

Após serem analisados macroscopicamente, os cólons foram divididos, cada um, em seis fragmentos longitudinais. Três desses fragmentos foram novamente divididos em pequenas porções, desta vez na região lesionada do cólon. Em seguida, as amostras foram digeridas em ácido nítrico, utilizando HNO_3 – 63%, e aquecidas em banho-maria a 60°C durante 2 horas. Logo após, as amostras foram diluídas em água deionizada.

Para a análise quantitativa das composições elementares das amostras, foi pipetada uma alíquota de $25\ \mu\text{L}$ de cada amostra em recipientes contendo $25\ \mu\text{L}$ de Ga (padrão interno). Desse total de $50\ \mu\text{L}$, foram pipetados $5\ \mu\text{L}$, em triplicata, sobre suportes de Si e em seguida levados para secagem em estufa a 60°C (figura 13).

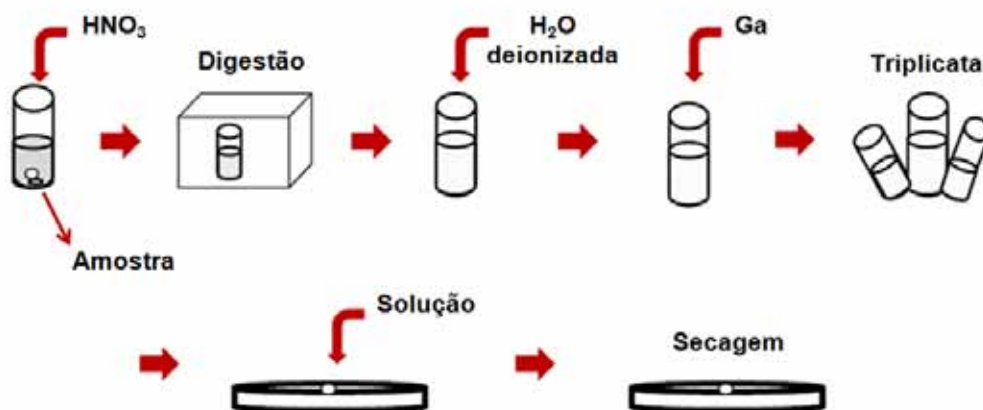


Figura 13: Esquema representativo da preparação de amostras.

4.2 Arranjo experimental

4.2.1 Análise quantitativa

As análises quantitativas foram realizadas na linha D09B – XRF no Laboratório Nacional de Luz Síncrotron – LNLS, que faz parte do Centro Nacional de

Pesquisa em Energia e materiais (CNPEM), em Capinas – SP (figura 14) (Pérez et al., 1999).

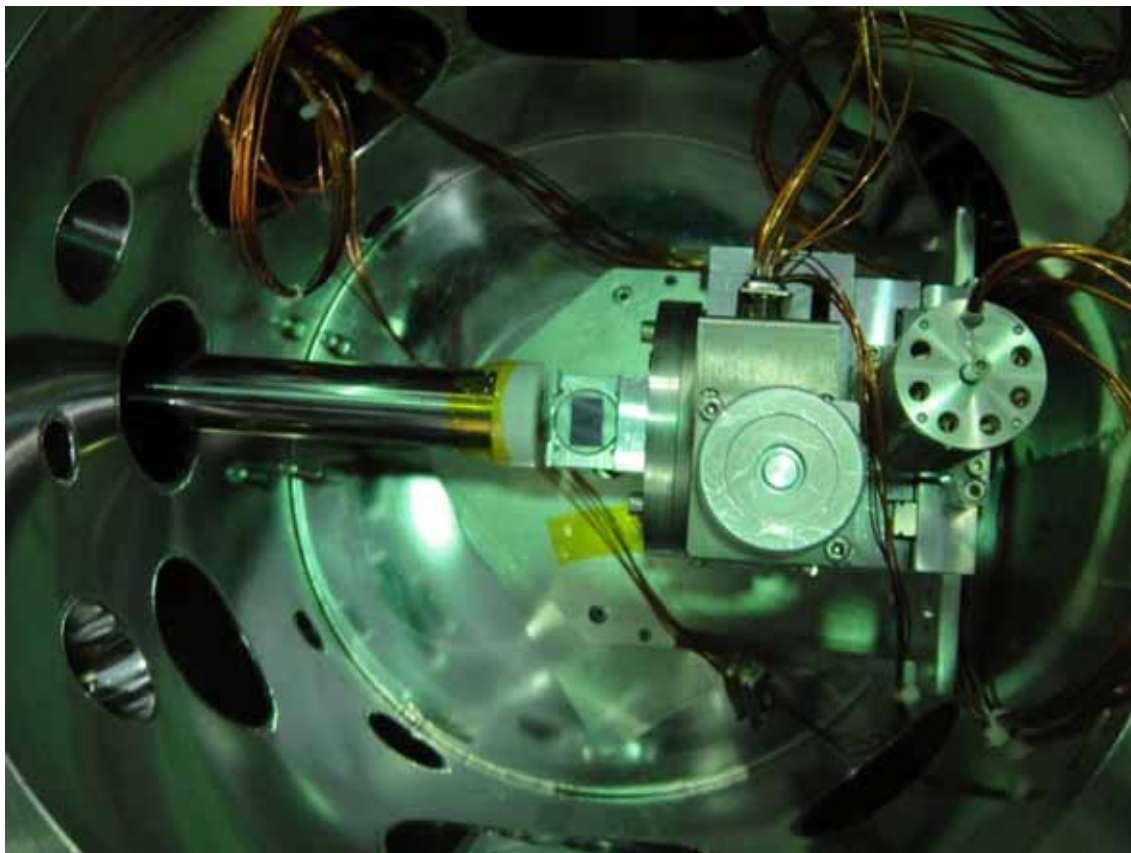


Figura 14: Aparato experimental da Linha D09B – XRF (LNLS).

A irradiação das amostras, depositadas em suportes de Si, foi realizada utilizando-se radiação síncrotron (feixe de 16,5 keV) e os raios-X característicos emitidos pelas amostras foram detectados através de detector de Si(Li). Em cada medida, o tempo de aquisição adotado foi de 100 s.

A posterior análise dos espectros gerados foi realizada através dos programas AXIL e WinQxas (IAEA, 2006), possibilitando, assim, obter os valores necessários para os cálculos das concentrações dos elementos que constituem as amostras.

Para determinar as sensibilidades relativas dos elementos, foram utilizadas como padrões multielementares, amostras da solução *Multielement Atomic Spectroscopy Solution*, da marca Fluka, com composições conhecidas e em

diferentes diluições. Essas amostras receberam acréscimo de Ga como padrão interno e foram analisadas sob as mesmas condições das outras amostras com concentrações elementares a serem determinadas.

Essas amostras padrão também foram utilizadas para determinar o limite de detecção para cada elemento constituinte das amostras.

4.3 Análise estatística

Após a determinação das concentrações dos elementos presentes nas amostras estudadas, os dados foram analisados e apresentados na forma de média $\pm$ desvio padrão da média.

Para fazer a comparação entre duas amostras, os valores médios encontrados foram analisados através do teste “t” de Student e para comparação entre mais de duas amostras, foi feita a Análise de Variância (ANOVA).

As análises foram complementadas com o teste de comparações múltiplas de Tukey-Kramer, adotando um nível de significância de 5%. Neste tipo de análise, leva-se em consideração o seguinte critério: para valores de $p < 0,0001$, a diferença entre as médias é extremamente significativa; para valores de $p < 0,001$, a diferença é considerada muito significativa; para valores de $p < 0,05$, é significativa; e para valores de $p > 0,05$, as diferenças são consideradas não-significantes.

Os cálculos estatísticos foram realizados através do programa Minitab, versão 14.20.0.0 (State College, USA).

4.4 Análise do coeficiente de correlação de Pearson

Após a determinação das concentrações dos elementos constituintes das amostras e das análises estatísticas, foi ainda calculado o coeficiente de correlação de Pearson ρ , que indica o grau de correlação (e se ela é positiva ou negativa) entre duas variáveis.

Os valores desse coeficiente variam entre -1 e 1, podendo também ser expressos em termos de porcentagem, assumindo o valor 1 (100 %) como sendo indicativo de uma correlação perfeita positiva entre as duas variáveis em questão, isto é, quando uma delas aumenta, a outra também aumenta, e quando uma delas diminui, a outra também diminui. Quando o coeficiente apresenta valor -1, significa que as variáveis apresentam uma correlação negativa (ou anti-correlação de 100 %), isto significa que, se uma variável aumenta, a outra diminui e vice-versa. Se o valor encontrado for igual a 0, as variáveis não apresentam correlação, são totalmente independentes (pelo menos linearmente).

Para determinar o coeficiente de correlação, utiliza-se a seguinte equação:

$$\rho = \frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})(y_i - \bar{y})}{\sqrt{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2} \sqrt{\sum_{i=1}^n (y_i - \bar{y})^2}} \quad (8)$$

em que, n é o número de dados, x_i e y_i são os valores medidos de cada variável e $\bar{x}_i$ e $\bar{y}_i$ são os valores médios de cada variável.

Para a análise de correlação geralmente adota-se o seguinte critério: para valores iguais ou maiores que 70 % positivo (negativo), há uma forte correlação (anti-correlação) entre as variáveis; para valores entre 30 % a 70 % positivo (negativo), existe uma correlação (anti-correlação) moderada e para valores de 0 a 30 % positivo (negativo), há uma fraca correlação (anti-correlação).

Os cálculos da correlação de Pearson foram implementados no programa Mathcad, versão 14.0 (Needham, Massachusetts, USA).

5 – Resultados e Discussão

Com o objetivo de analisar a composição das amostras de cólon, suas concentrações elementares foram obtidas utilizando SR-TXRF. Um típico espectro é apresentado na figura 15, que ilustra a presença dos elementos P, S, Cl, K, Ca, Ti, Cr, Mn, Fe, Ni, Cu, Zn, Se, Br, e Rb.

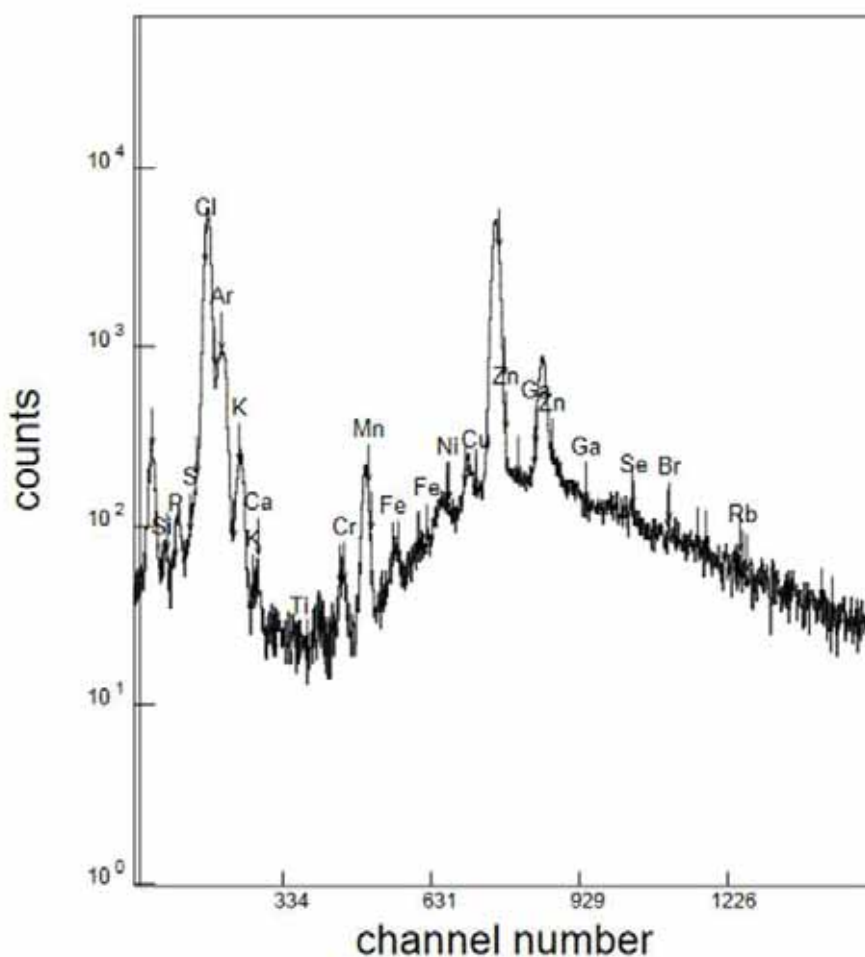


Figura 15: Espectro característico de uma amostra de cólon de roedor submetido à indução de colite (grupo controle)

5.1 Cálculo das sensibilidades relativas

Para determinar as sensibilidades relativas, foi utilizada uma solução padrão em 6 diluições diferentes, contendo elementos e concentrações conhecidos. Em todas as diluições, o elemento Ga está presente, utilizado como padrão interno nas amostras a serem analisadas (Tabela 1).

Tabela 1: Constituição das diferentes diluições da solução padrão, e suas respectivas concentrações (ppm)

Elemento	Solução padrão					
	D1	D2	D3	D4	D5	D6
K (Z=19)	100,00	81,82	72,73	63,64	54,54	45,45
Ca (Z=20)	10,00	8,20	7,27	6,36	5,45	4,5
Cr (Z=24)	50,00	40,9	36,36	31,82	27,27	22,73
Mn (Z=25)	10,00	8,20	7,27	6,36	5,45	4,5
Fe (Z=26)	10,00	8,20	7,27	6,36	5,45	4,5
Ni (Z=28)	50,00	40,90	36,36	31,82	27,27	22,73
Cu (Z=29)	10,00	8,20	7,27	6,36	5,45	4,5
Zn (Z=30)	10,00	8,20	7,27	6,36	5,45	4,5
Ga (Z=31)	9,32	9,32	9,32	9,32	9,32	9,32
Sr (Z=38)	10,00	8,20	7,27	6,36	5,45	4,5

A partir da relação entre intensidade relativa e concentração elementar, foi possível obter a sensibilidade relativa para cada elemento que constitui a solução padrão. Com isto, foi determinada a curva de sensibilidade relativa em função do número atômico para a linha K (Figura 16).

Com a equação ajustada da curva, pode-se determinar o valor da sensibilidade relativa de qualquer elemento.

5.2 Limite de detecção

O limite de detecção para cada constituinte da amostra foi calculado a partir dos espectros obtidos através da amostra e utilizando a equação 7 para fazer o cálculo para cada elemento da amostra, que possui composição conhecida. Com

os valores obtidos, foi possível determinar a curva do limite de detecção em função do número atômico (Figura 17).

$$\ln(S_i) = -511,69Z^5 + 91,99Z^4 - 6,53Z^3 + 0,24Z^2 - 4,17 \times 10^{-3}Z + 2,89 \times 10^{-5}$$

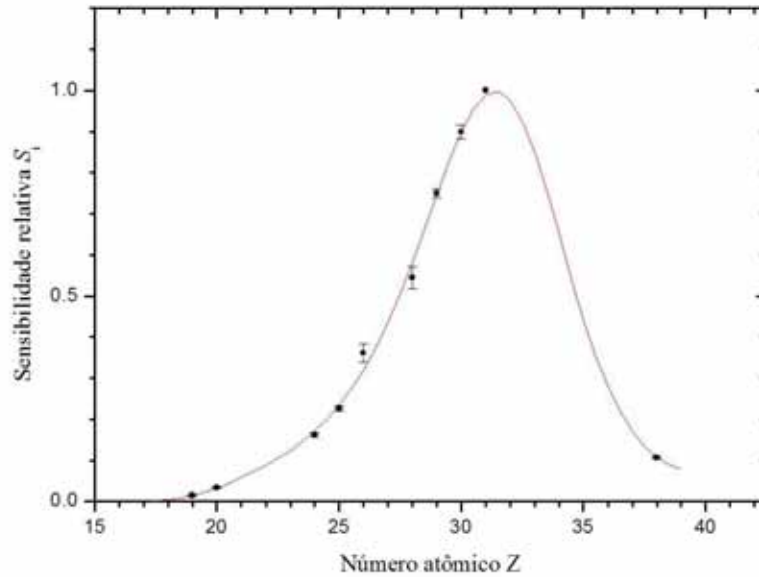


Figura 16: Curva de sensibilidade relativa

$$\ln(LD) = -1,22 \times 10^{-5} Z^5 + 1,70 \times 10^{-3} Z^4 - 9,80 \times 10^{-2} Z^3 + 2,70 Z^2 - 36,96 Z + 200,49$$

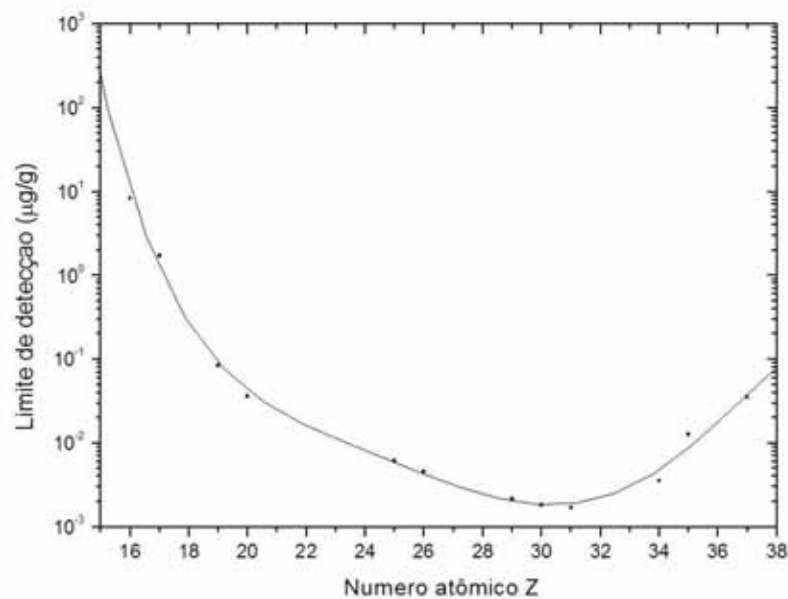


Figura 17: Limite de detecção calculado a partir das amostras certificadas.

Com a equação da curva ajustada, pode-se determinar o limite de detecção para qualquer elemento.

5.3 Análise das amostras

Após a obtenção dos espectros de cada amostra e das sensibilidades relativas, as concentrações dos elementos constituintes foram calculadas em função do elemento padrão.

Na tabela 2 são apresentados os valores de concentração em $\mu\text{g.g}^{-1}$ obtidos para os elementos P, S, Cl, K, Ca, Ti, Cr, Mn, Fe, Ni, Cu, Zn, Se, Br e Rb na forma valor médio $\pm$ desvio padrão da média.

Ao analisar os valores médios das concentrações dos elementos constituintes das amostras de cólon, pode ser observado que os elementos P, S, K, Ti, Cr, Fe, Cu, Se e Rb apresentaram maiores concentrações nas amostras do grupo controle, composto por animais submetidos à indução de colite, mas sem uso de pré-tratamento. Pode ser observado também que o elemento Br só foi detectado nesse grupo.

Os elementos Cl, Ca e Ni apresentaram maiores concentrações nas amostras do grupo branco, composto por animais submetidos ao estresse do experimento, porém sem indução de colite e sem uso de pré-tratamento. O elemento Mn só foi detectado nesse grupo.

Já o elemento Zn apresentou maior concentração nas amostras do grupo tratado, composto por animais com colite induzida e pré-tratados com prednisolona.

Pode ser observado também que o elemento que apresenta maior concentração nas amostras dos três grupos analisados é o S.

Apesar de diferenças nas concentrações, pode ser observado que somente o grupo controle apresentou diferença significativa ($p < 0,005$) na concentração de K mais alta em relação aos grupos branco e tratado.

Adicionalmente, foi calculado o coeficiente de correlação de Pearson entre os diferentes elementos para cada tipo de amostra (Tabelas 3-5).

Tabela 2: Concentração elementar obtida ($\mu\text{g.g}^{-1}$) das amostras de cólon utilizando SR-TXRF.

	Branco	Controle	Tratado
P (Z=15)	58916 ± 19864^a	267860 ± 141633^a	77265 ± 21658^a
S (Z=16)	134455 ± 70396^a	361710 ± 223323^a	294076 ± 77876^a
Cl (Z=17)	45338 ± 18449^a	43559 ± 9786^a	14830 ± 3785^a
K (Z=19)	$23,17 \pm 8,40^a$	$145,9 \pm 33,8^b$	$65,1 \pm 13,5^a$
Ca (Z=20)	$18,89 \pm 7,53^a$	$5,91 \pm 2,00^a$	$11,65 \pm 3,71^a$
Ti (Z=22)	$1,808 \pm 0,508^a$	$2,08 \pm 1,13^a$	$0,340 \pm 0,307^a$
Cr (Z=24)	$69,4 \pm 40,1^a$	$225,1 \pm 89,2^a$	$72,0 \pm 26,8^a$
Mn (Z=25)	$0,23 \pm 0,0128$	Nd	Nd
Fe (Z=26)	$0,459 \pm 0,125^a$	$2,18 \pm 1,54^a$	$0,770 \pm 0,451^a$
Ni (Z=28)	$16,27 \pm 7,30^a$	$12,67 \pm 3,13^a$	$4,409 \pm 0,906^a$
Cu (Z=29)	$265,8 \pm 91,1^a$	544 ± 173^a	457 ± 122^a
Zn (Z=30)	$0,638 \pm 0,223^a$	$0,758 \pm 0,193^a$	$0,909 \pm 0,190^a$
Se (Z=34)	$0,0228 \pm 0,0136^a$	$0,492 \pm 0,302^a$	$0,449 \pm 0,329^a$
Br (Z=35)	Nd	$0,1172 \pm 0,0967$	Nd
Rb (Z=37)	$1,524 \pm 0,740^a$	$6,17 \pm 3,12^a$	$1,571 \pm 0,368^a$

^{a, b}: letras diferentes representam diferenças estatísticas ($p < 0.05$) entre as concentrações do mesmo elemento em diferentes amostras. Nd: elemento não determinado.

Tabela 3: Coeficiente de correlação de Pearson para amostras de cólon do grupo branco (fortes correlações foram destacadas).

	P	S	Cl	K	Ca	Ti	Cr	Mn	Fe	Ni	Cu	Zn	Se	Rb
P	1,000													
S	0,827	1,000												
Cl	0,172	-0,170	1,000											
K	0,162	-0,038	0,697	1,000										
Ca	0,109	-0,122	0,228	0,207	1,000									
Ti	-0,008	-0,285	0,133	-0,151	0,093	1,000								
Cr	-0,045	-0,120	0,206	0,291	0,070	-0,155	1,000							
Mn	-0,132	-0,062	-0,110	-0,115	-0,120	-0,026	-0,087	1,000						
Fe	-0,446	-0,275	-0,360	-0,484	-0,009	0,421	-0,256	0,255	1,000					
Ni	0,219	-0,162	0,993	0,641	0,252	0,186	0,183	-0,106	-0,360	1,000				
Cu	0,147	-0,122	0,879	0,942	0,270	-0,057	0,336	-0,118	-0,411	0,837	1,000			
Zn	0,111	-0,127	0,858	0,838	0,177	0,119	0,006	-0,079	-0,371	0,819	0,884	1,000		
Se	-0,185	-0,101	-0,160	-0,192	-0,117	0,302	-0,106	-0,098	0,217	-0,176	-0,223	0,037	1,000	
Rb	-0,188	-0,140	0,711	0,432	-0,034	-0,242	0,306	-0,047	-0,163	0,656	0,615	0,581	-0,052	1,000

Tabela 4: Coeficiente de correlação de Pearson para amostras de cólon do grupo controle (fortes correlações foram destacadas).

	P	S	Cl	K	Ca	Ti	Cr	Fe	Ni	Cu	Zn	Se	Br	Rb
P	1,000													
S	0.489	1,000												
Cl	0.396	-0.300	1,000											
K	0.364	-0.312	0.909	1,000										
Ca	-0.249	-0.152	-0.16	0.047	1,000									
Ti	0.028	-0.170	0.095	0.248	0.724	1,000								
Cr	0.074	-0.196	0.205	0.244	-0.208	-0.027	1,000							
Fe	-0.148	-0.114	-0.182	-0.113	0.536	0.592	-0.103	1,000						
Ni	0.428	-0.283	0.945	0.953	-0.063	0.159	0.172	-0.161	1,000					
Cu	0.581	-0.234	0.730	0.811	0.176	0.502	0.192	0.031	0.814	1,000				
Zn	-0.006	-0.199	0.317	0.191	0.523	0.333	-0.181	0.304	0.232	0.302	1,000			
Se	-0.166	-0.147	-0.033	0.050	0.625	0.189	0.115	-0.129	-0.038	0.065	0.506	1,000		
Br	-0.107	-0.111	-0.033	0.246	0.441	0.589	0.013	-0.101	0.158	0.261	0.204	0.407	1,000	
Rb	0.088	-0.164	0.076	0.153	0.460	0.692	0.012	0.836	0.112	0.352	0.250	-0.114	-0.131	1,000

Tabela 5: Coeficiente de correlação de Pearson para amostras de cólon do grupo tratado (fortes correlações foram destacadas).

	P	S	Cl	K	Ca	Ti	Cr	Fe	Ni	Cu	Zn	Se	Rb
P	1,000												
S	0.961	1,000											
Cl	-0.234	-0.290	1,000										
K	-0.295	-0.286	0.799	1,000									
Ca	-0.284	-0.287	0.177	0.272	1,000								
Ti	-0.082	-0.200	0.760	0.282	-0.019	1,000							
Cr	0.063	-0.008	0.265	0.363	0.089	0.168	1,000						
Fe	-0.102	-0.062	0.260	0.609	0.066	-0.095	0.112	1,000					
Ni	-0.226	-0.218	0.882	0.906	0.104	0.515	0.442	0.419	1,000				
Cu	-0.205	-0.255	0.920	0.845	0.055	0.703	0.406	0.407	0.940	1,000			
Zn	-0.359	-0.308	0.707	0.805	0.488	0.311	0.062	0.426	0.719	0.668	1,000		
Se	-0.098	-0.051	-0.004	-0.059	0.200	-0.075	-0.069	-0.041	-0.110	-0.131	0.096	1,000	
Rb	-0.164	-0.075	0.129	0.547	0.363	-0.227	0.320	0.528	0.410	0.315	0.514	0.237	1,000

Analisando os resultados, as amostras de cólon não apresentaram nenhuma anti-correlação forte (superior a 70 %) entre os elementos encontrados em nenhum dos grupos. As fortes correlações apresentadas foram grifadas nas tabelas e são descritas a seguir.

Os elementos P e S só apresentaram fortes correlações entre si nas amostras do grupo branco (83 %) e nas amostras do grupo tratado (96 %). No grupo controle, não apresentaram forte correlação entre si e com nenhum dos outros elementos encontrados nas amostras.

O elemento Cl apresentou correlações com os elementos Ni (99 %), Cu (88 %), Zn (86 %) e Rb (71 %) nas amostras do grupo branco. Para as amostras do grupo controle, apresentou correlações com os elementos K (91 %), Ni (95 %) e Cu (73 %). Para as amostras do grupo tratado, foram obtidas correlações relevantes com os elementos K (80 %), Ti (76 %), Ni (88 %), Cu (92 %) e Zn (71 %).

Para o elemento K há correlações com Cu (94 %) e Zn (84%) nas amostras do grupo branco. Nas amostras do grupo controle, o K apresentou correlação de 91 % com Cl, de 95 % com Ni e de 81 % com Cu. Já nas amostras do grupo tratado, o elemento apresentou correlações com Cl (80 %), Ni (91 %), Cu (85 %) e Zn (81 %).

O elemento Ca só apresentou correlação forte com o elemento Ti (72 %) nas amostras do grupo controle. Nos demais grupos, não apresentou nenhuma correlação forte com os outros elementos encontrados.

Além da correlação de 72 % com o Ca nas amostras do grupo controle, o Ti também apresentou forte correlação com Cl (76 %) e Cu (70 %) nas amostras do grupo tratado. Já no grupo branco, o elemento não apresentou nenhuma correlação superior a 70 % com os outros elementos encontrados nas amostras.

O elemento Fe não apresentou nenhuma correlação forte com os outros elementos das amostras dos grupos branco e tratado. Este elemento só apresentou correlação com o Rb (84 %) nas amostras do grupo controle.

Já o elemento Ni apresentou correlações em todos os grupos analisados. Há correlações com Cl (99 %), Cu (84 %) e Zn (82 %) nas amostras do grupo branco; com Cl (95 %), K (95 %) e Cu (81 %) nas amostras do grupo controle; e com Cl (88 %), K (91 %), Cu (94 %) e Zn (72 %) nas amostras do grupo tratado.

O elemento Cu também apresentou correlações em todos os grupos. No grupo branco, apresentou correlações com Cl (88 %), K (94 %), Ni (84 %) e Zn (88 %). No grupo controle, há correlações com Cl (73%), K (81 %) e Ni (81 %). E nas amostras do grupo tratado, apresenta correlações com Cl (92 %), K (85 %), Ti (70 %) e Ni (94 %).

O elemento Zn apresentou correlações com Cl (86 %), K (84 %), Ni (82 %) e Cu (88 %) nas amostras do grupo branco. Nas amostras do grupo tratado, apresentou correlações com Cl (71 %), K (81 %) e Ni (72 %). Já nas amostras do grupo controle, o elemento não apresentou fortes correlações.

O elemento Rb só apresentou correlações com Cl (71 %) nas amostras do grupo branco e com Fe (84 %) nas amostras do grupo controle.

Os elementos Cr e Se não apresentaram correlações superiores a 70 % com os outros elementos das amostras de nenhum dos grupos analisados.

Os elementos Mn e Br só foram detectados nas amostras do grupo branco e controle, respectivamente, e também não apresentaram correlações fortes com os outros elementos das amostras.

As fortes correlações entre os elementos constituintes das amostras dos grupos analisados estão resumidamente apresentadas na tabela 6.

Tabela 6: Correlações de Pearson superiores a 70 % entre os elementos das amostras.

	Correlação forte (%)		
	Branco	Controle	Tratado
P (Z=15)	S (83)	-	S (96)
S (Z=16)	P (83)	-	P (96)
Cl (Z=17)	Ni (99), Cu (88), Zn (86), Rb (71)	K (91), Ni (95), Cu (73)	K (80), Ti (76), Ni (88), Cu (92), Zn (71)
K (Z=19)	Cu (94), Zn (84)	Cl (91), Ni (95), Cu (81)	Cl (80), Ni (91), Cu (85), Zn (81)
Ca (Z=20)	-	Ti (72)	-
Ti (Z=22)	-	Ca (72)	Cl (76), Cu (70)
Cr (Z=24)	-	-	-
Mn (Z=25)	-	-	-
Fe (Z=26)	-	Rb (84)	-
Ni (Z=28)	Cl (99), Cu (84), Zn (82)	Cl (95), K (95), Cu (81)	Cl (88), K (91), Cu (94), Zn (72)
Cu (Z=29)	Cl (88), K (94), Zn (82), Ni (84)	Cl (73), K (81), Ni (81)	Cl (92), K (85), Ti (70), Ni (94)
Zn (Z=30)	Cl (86), K, (84), Ni (82), Cu, (88)	-	Cl (71), K (81), Ni (72)
Se (Z=34)	-	-	-
Br (Z=35)	-	-	-
Rb (Z=37)	Cl (71)	Fe (84)	-

6 – Conclusão

Este trabalho apresentou resultados da composição multielementar de amostras de cólon de roedores sem e com indução de colite e submetidos ao uso de prednisolona, um dos medicamentos mais utilizados no tratamento da doença. Para a análise, foi utilizada a técnica de TXRF, utilizando radiação síncrotron.

A técnica de SR-TXRF foi eficiente na determinação das concentrações dos elementos P, S, Cl, K, Ca, Ti, Cr, Mn, Fe, Ni, Cu, Zn, Se, Br e Rb.

Nos resultados obtidos, foi empregado o teste estatístico de Tukey, com significância estabelecida de 5 %. O teste foi realizado comparando amostras duas a duas, apresentando a significância, ou não, entre as diferenças dos valores médios das concentrações dos elementos constituintes das amostras. Nas análises de cólon, apesar de os elementos terem apresentado diferenças em suas concentrações, somente a concentração do elemento K foi estatisticamente significativa ($p < 0.05$).

A partir dos dados obtidos, foi calculada também a correlação de Pearson, que mede o grau de correlação entre os elementos constituintes das amostras. Nesta análise foi observado que os grupos branco e tratado apresentaram correlações entre os elementos P e S, diferentemente do grupo controle. Outra diferença é a correlação entre os elementos Ca e Ti encontrada apenas no grupo controle, o que possivelmente poderia caracterizá-los como bioindicadores da colite. Apesar disso, não há na literatura dados que confirmem tal relação.

Embora alguns estudos relacionem os elementos Zn, Ca e Se com a neutralização da colite (Jacobs, 1988, Galloway *et al.*, 1987, Hadjiolov e Grueva, 1986), os resultados apresentados neste trabalho não demonstram correlações entre eles nas amostras dos grupos analisados.

7 – Perspectivas Futuras

Com o intuito de dar seguimento a este estudo, algumas propostas são sugeridas:

- Analisar um maior número de amostras a fim de conferir a reprodutibilidade dos resultados, dando maior ênfase nos elementos com atividades comprovadamente relacionadas com a neutralização da colite.
- Analisar os cólons por microfluorêscência de raios-X, para mapeamento da distribuição multielementar na região da lesão para diferentes tipos de tratamento de colite.
- Analisar amostras de diferentes tipos de medicamentos utilizados no tratamento da doença digeridos em meio ácido.

8 – Referências Bibliográficas

ALVAREZ, R. P.; VAN ESPEN, P.; QUINTANA, A. A. Assessing scattering effects in annular radioisotope excited XRF. **X-Ray Spectrometry**, v. 33, n. 1, p. 74-82, 2004.

ANJOS, M. J. *et al.* Trace elements determination in red and white wines using total reflection X-ray fluorescence. **Spectrochimica Acta Part B**, v. 58, p. 2227-2232, 2003.

BELL CJ, *et al.* Disruption of colonic electrolyte transport in experimental colitis. **American Journal of Physiology**. v.268, p.G622-G630, 1995

BOHLEN, A. *et al.* Microanalysis of solid samples by total-reflection X-ray fluorescence spectrometry. **Analytical Chemistry**, v. 59, p. 2551-2555, 1987.

BOHLEN, A. *et al.* Qualitative survey analysis of thin layers of tissue samples: heavy metals traces in human lung tissue. **International Archives of Occupational and Environmental Health**, v. 59, p. 403-411, 1987.

BOHLEN, A. *et al.* Microtome sections of biomaterials for trace analysis by TXRF. **Fresenius' Journal of Analytical Chemistry**, v. 331, p. 454-458, 1988.

CARVALHO, M. L. *et al.* Trace elements distribution and post-mortem intake in human bones from Middle Age by total reflection X-ray fluorescence. **Spectrochimica Acta Part B**, v. 59, p. 1251-1257, 2004.

CARVALHO, M. L. *et al.* Trace elements in human cancerous and healthy tissues: a comparative study by EDXRF, TXRF, synchrotron radiation and PIXE. **Spectrochimica Acta Part B**, v. 62, p. 1004-1011, 2007.

CESAREO, R. Techniques and instrumentation in analytical chemistry. In: CESAREO, R. **Nuclear analytical techniques in medicine**. Amsterdam: Elsevier, v. 8, 1988.

FIOCCHI, C. Inflammatory bowel disease: etiology and pathogenesis. **Gastroenterology**, v.115, n.1, 182-205, 1998.

GALLOWAY, D. J., JARRET, F., BOYLE, P. *et al.* Morphological and cell kinetic effects of dietary manipulation during colorectal carcinogenesis. **Gut**, v.28, p.754-763, 1987.

GARIVAIT, S. *et al.* Multi-element analysis of plants by WDXRF using the scattered radiation correction method. **X-Ray Spectrometry**, v. 26, p. 257-264, 1997.

GASCHE, C. Complications of inflammatory bowel disease. **Hepatogastroenterology**, v.47, n.31, p.49-56, 2000.

GORDON, B. M. *et al.* The application of synchrotron radiation to microprobe trace-element analysis of biological samples. **Nuclear Instruments and Methods in**

Physics Research Section B: Beam Interactions with Materials and Atoms, v. 45, n. 1-4, p. 527-531, 1990.

GÖRGL, R.; WOBRAUSCHEK, P.; KREGSAMER, P.; STRELI, CH. et al. Total ReÑection X-Ray Fluorescence Analysis Excited by Synchrotron Radiation (SR-TXRF): Variation of Excitation Conditions and Sample Geometries. **X-Ray Spectrometry**, v.26, p.189-194, 1997.

HADJIOLOV, D. & GRUEVA, D. Effect of combined tigason and selenium treatment on colon carcinogenesis. **Journal of Cancer Research and Clinical Oncology**, v.112, n.3, p.285-6,1986.

HANAUER, S. B. Inflammatory bowel disease: epidemiology, pathogenesis, and therapeutic opportunities. **Inflammatory bowel diseases**, v.12, p.S3-9, 2006.

IAEA. **International Atomic Energy Agency**. Quantitative X-ray analysis system (QXAS) software package, 2006. Disponivel em: <<http://www.iaea.org>>. Acesso em 16 de setembro, 2013.

IVANOVA, J.; DJINGOVA, R.; KULEFF, I. Possibilities of ED-XRF with radionuclide source for analysis of plants. **Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry**, v. 242, n. 2, p. 569-575, 1999.

IVYENGAR, G. V.; KOLLMER, W. E.; BROWEN, H. J. M. **The elemental composition of human tissues and body fluids**. Weinheim: Verlag Chemie, 1970.

JACOBS, L. R. Role of dietary factors in cell replication and colon cancer. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v.48, p.775-9, 1988.

JENKINS, R. **Quantitative X-ray spectrometry**. New York: Marcel Dekker, 1981.

JOSEPH, D. et al. Analysis of trace elements in bone by radioisotope induced EDXRF. **Mapana - Journal of Sciences**, v. 12, n. 1, p. 9-15, 2013.

KARJOU, J. Matrix effect on the detection limit and accuracy in total reflection X-ray fluorescence analysis of trace elements in environmental and biological samples. **Spectrochimica Acta Part B - Atomic Spectrometry**, v. 62, n. 2, p. 177-181, 2007.

KHUDER, A. et al. Determination of trace elements in Syrian medicinal plants and their infusions by energy dispersive X-ray fluorescence and total reflection X-ray fluorescence spectrometry. **Spectrochimica Acta Part B**, v. 64, p. 721-725, 2009.

KIESSLICH, R.; FRITSCH, J.; HOLTSMANN, M. et al. Methylene blue-aided chromoendoscopy for the detection of intraepithelial neoplasia and colon cancer in ulcerative colitis. **Gastroenterology**, v.124, p.880-8, 2003.

KLOCKENKÄMPER, R. Total reflection X-ray fluorescence spectrometry: principles and applications. **Spectroscopy International**, v. 2, n. 2, p. 26-37, 1990.

LINDHU, U. Nuclear microscopy. Its role and future in medicine and trace-element biology. **Nuclear Instruments and Methods in Physics Research B**, v. 54, p. 160-170, 1991.

LOFTUS, E. V. JR. Clinical epidemiology of inflammatory bowel disease: Incidence, prevalence, and environmental influences. **Gastroenterology**, v.126, n.6, p.1504-17, 2004.

LNLS. **Laboratório Nacional de Luz Síncrotron**, 2007. Disponível em: <www.lnls.cnpm.br>. Acesso em: 16 setembro 2013.

MAGALHÃES, T. *et al.* Study on trace elements behaviour in cancerous and healthy tissues of colon, breast and stomach: Total reflection X-ray fluorescence applications. **Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy**, v. 65, n. 6, p. 493-498, 2010.

MARCO, L. A. P.; HERNANDEZ-CARABALLO, E. A. Direct analysis of biological samples by total reflection X-ray fluorescence. **Spectrochimica Acta Part B-Atomic Spectrometry**, v. 59, n. 8, p. 1077-1090, 2004.

MARX, J. How the glucocorticoids suppress the immunity. **Science**, v.270, n.13,1995.

MICHAELIS, W. Multielement analysis of environmental samples by total-reflection X-ray fluorescence spectrometry, neutron activation analysis and inductively coupled plasma optical emission spectroscopy. **Fresenius' Zeitschrift für analytische Chemie**, v. 324, n. 7, p. 662-671, 1986.

MICHAELIS, W. *et al.* Trace analytical capabilities of total reflection. **Advances in X-Ray Analysis**, v. 28, p. 75-79, 1985.

MORRIS, G.P. *et al.* Hapten-induced model of chronic inflammation and ulceration in the rat colon. **Gastroenterology**, v.96, p.795-803, 1989.

NASCIMENTO-FILHO, V. F. Centro de Energia Nuclear na Agricultura - CENA. **Técnicas analíticas nucleares de fluorescência de raios-X por dispersão de energia (ED-XRF) e por reflexão total (TXRF)**, 1999. Disponível em: <www.cena.usp.br/apostilas/Virgilio/cen-5723/EDXRF_TXRF.doc>. Acesso em: 31 ago. 2013.

PÉREZ, C. A.; RADTKE, M.; SÁNCHEZ, H. J. *et al.* Synchrotron Radiation X-Ray Fluorescence at the LNLS: Beamline Instrumentation and Experiments. **X-Ray Spectrometry**, v.28, p.320–326, 1999.

POTTS, P. J. *et al.* Atomic spectrometry update: X-ray fluorescence spectrometry. **Journal of Analytical Atomic Spectrometry**, v. 17, n. 10, p. 1439-1455, 2002.

REVENKO, A. G. Preparation of natural material samples for EDXRF analysis. **Industrial Laboratory**, v. 60, n. 11, p. 649-660, 1994.

SALVADOR, M. J. *et al.* Quality control of commercial tea by x-ray fluorescence. **X-Ray Spectrometry**, v. 31, n. 2, p. 141-144, 2002.

SANDLE, G.I. *et al.* Effect of glucocorticoids on rectal transport in normal subjects and patients with ulcerative colitis. **Gut**, v.27, p.309-316, 1986

SCHWENKE, H.; KNOTH, J. A highly sensitive energy dispersive X-ray spectrometer with multiple total reflection of the exciting beam. **Nuclear Instruments and Methods in Physics Research**, v. 193, p. 239-243, 1982.

SERPA, R. F. B. Análise multielementar de tecidos cerebrais através da microfluorescência de raios-X e fluorescência de raio-X por reflexão total. **Tese (Doutorado)**, UFRJ - Rio de Janeiro, 2007. p.185.

SERPA, R. F. B. *et al.* Elemental concentration analysis in brain structures from young, adult and old Wistar rats by total reflection X-ray fluorescence with synchrotron radiation. **Spectrochimica Acta Part B**, v. 61, n. 10-11, p. 1205-1209, 2006.

SILVA, M. P. *et al.* Determination of Ca, Fe, Cu and Zn and their correlations in breast cancer and normal adjacent tissues. **X-Ray Spectrometry**, v. 38, p. 103-111, 2009.

SINGH, N.; PURI, S. Recent experimental studies of photon-atom scattering in the X-ray energy region. **Radiation Physics and Chemistry**, v. 75, n. 12, p. 2221-2227, 2006.

SITKO, R. *et al.* Determination of high Zn and Pb concentrations in polluted soils using energy-dispersive X-ray fluorescence spectrometry. **Polish Journal of Environmental Studies**, v. 13, n. 1, p. 91-96, 2004.

SOUZA, M. H. L. P.; TRONCON, L. E. A.; RODRIGUES, C. M. *et al.* Evolução da ocorrência (1980-1999) da doença de Crohn e da retocolite ulcerativa idiopática e análise das suas características clínicas em um hospital universitário do sudeste do Brasil. **Arquivos de Gastroenterologia**, v.39, n.2, p.98-105, 2002.

STEIDLER, L. Microbiological and immunological strategies for treatment of inflammatory bowel disease. **Microbes and Infection**, v.3, n.13, p.1157-66, 2001.

STRELI, C.; WOBRAUSCHEK, P.; MEIRER, F. *et al.* Synchrotron radiation induced TXRF. **Journal of Analytical Atomic Spectrometry**, v. 23, p. 792-798, 2008.

TERTIAN, R.; CLAISSE, F. **Principles of quantitative x-ray fluorescence analysis**. London: Ed. Heyden, 1982.

TOLGYESSY, T.; HAVRANEK, E.; DEJMKOVA, E. **Radionulide X-ray fluorescence**. Amsterdam: Elsevier, 1990.

VERONESI, J. Inflammatory bowel disease. **Registered Nurse**, v.66, n.5, p.38-45, 2003.

WOBRAUSCHEK, P.; AIGINER, H. Analytical application of total reflection and polarized X-ray. **Fresenius Journal of Analytical Chemistry**, v. 324, p. 865-874, 1986.

YAMASHITA, C. I. **Estudo sobre os constituintes inorgânicos presentes em diferentes espécies da planta medicinal do gênero Casearia coletadas em regiões distintas da Mata Atlântica, SP**. 2006. 130p. Dissertação (Mestrado). Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares - Universidade de São Paulo, São Paulo, 2006.

YONEDA, Y.; HORIUCHI, T. Optical flats for use in X-ray spectrochemical microanalysis. **Reviews Scientific Instruments**, v. 42, p. 1069-1071, 1971.

ZUCCHI, O. L. A. D. *et al.* Multielement analysis of soft drinks by X-ray fluorescence spectrometry. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, p. 7863-7869, 2005.