UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE FÍSICA

SBI-IFUSP

305M810T3672

Estudo da incorporação de urânio em ossos de ratos WISTAR e cães BEAGLE, utilizando técnicas nucleares.

Tese apresentada como parte dos requisitos para a obtenção do grau de Doutor em Física, orientada pelo Prof. Dr João Dias de Toledo Arruda Neto.

María Victoria Manso Guevara

Comissão Examinadora:

Prof. Dr. João Dias de Toledo Arruda Neto (orientador)
Prof. Dr. Manoel Tiago Cruz (IFUSP)
Prof. Dr. Dirceu Pereira (IFUSP)
Prof. Dr. Ana Maria Figueiredo (IPEN)
Prof. Dr. Elizabete Jose Vicente (ICBUSP)

São Paulo
2002

Prof. Armando Corbani Ferraz
Presidente da Comissão de Pós Graduação

INSTITUTO DE FÍSICA
Serviço de Biblioteca e Informação
Tombo: 3672 ex. 1

539.7
M289e
D
ex. 1

FICHA CATALOGRÁFICA
Preparada pelo Serviço de Biblioteca e Informação do Instituto de Física da Universidade de São Paulo

Manso Guevara, María Victoria

Estudo da Incorporação de Urânio em Ossos de Ratos Wistar e Cães Beagle, utilizando Técnicas Nucleares.
São Paulo 2002.

Tese (Doutoramento) - Universidade de São Paulo
Instituto de Física – Departamento Física Experimental

Orientador: Prof. Dr. João Dias de Toledo Arruda Neto
Área de Concentração: Física Nuclear

Unitermos: 1. Transferência; 2. Urânio; 3. Ossos.

USP/IF/SBI-031/2002

A minha filha Alis, porque acima de qualquer outro motivo, você é o mais importante.

"... Em que casa de Hogwarts deverão ficar.
Quem sabe sua morada é a Grifinoria, casa onde habitam os corações indômitos.Ousadia, sangue frio e nobreza destacam os alunos da Grifinoria dos demais.
Quem sabe é na Lufa Lufa que você vai morar; onde seus moradores são justos e leais, pacientes, sinceros, sem medo da dor.
Ou será a velha e sabia Corvinal, a casa dos que tem a mente sempre alerta, onde os homens de grande espírito e saber, sempre encontrarão companheiros seus iguais.
Ou quem sabe a Sonserina será a sua casa e ali fará seus verdadeiros amigos; homens de astúcia que usam quaisquer meios para atingir os fins que antes colimaram..."

J.K. Rowling

"Harry Potter e a Pedra Filosofal"

Agradecimentos

A meus pais, porque deles aprendi como extrair da vida, a quota de sacrifício e esforços que se precisa para alcançar objetivos como estes, longe de minha filha, e do calor de meu lar.

A meus irmãos por seu carinho e apoio.

A Oscar, que mesmo não compreendendo a diferença entre motivar um estudante e uma esposa, sendo em essência um físico, confiou e estimulou minha entrada à física. A você por ser um ótimo pai, e um grande companheiro na vida, obrigada.

A Guzman, por ser sempre meu amigo, sem seu apoio e ajuda teria resultado impossível este doutorado. Ele resgatou-me do entorno laboral de uma entidade com um comportamento neoliberal em relação à pesquisa, e abriu-me as portas da Academia.

A meu orientador, Professor Arruda, por seu estimulo, esforço e paciência ao longo destes anos de trabalho. Por seu carinho aos cubanos, ele teve a gentileza de acreditar em mim.

A meus amigos brasileiros e cubanos, que constituíram minha família em todo este tempo, e aos quais não vou enumerar com o convencimento de que ao lerem esta tese todos se vejam refletidos.

À divisão do CRPq do IPEN, especialmente as doutoras Mitiko Saiki e Cibele Zamboni, sem sua colaboração teria sido difícil obter dados para um volume grande de amostras.

A meus colegas do LAL, donde validei finalmente minha velha suspeita de que todos os físicos (russos, brasileiros, argentinos ou cubanos) são muito parecidos.

Um último agradecimento à CPG/IFUSP e a CNPq pela bolsa com que apoiaram este doutorado durante quatro anos, e à USP que apareceu como Sancho Panza no universo da física nuclear cubana, quando um grupo de Quixotes no ISCTN, saíram prestes a enfrentar moinhos.

RESUMO

Grupos de ratos Wistar e cães Beagle foram submetidos a dietas com dopagem de urânio, iniciando-se no desmame do animal e prolongando-se até sua maturidade.

O conteúdo de urânio em ossos foi determinado por duas técnicas nucleares: nêutron-fissão e análise por ativação neutrônica, obtendo-se microdistribuição e conteúdos totais, respectivamente.

O conteúdo total de U em ossos de ratos, em função da quantidade ingerida (medida em ppm de U na ração), exibiu um comportamento tendendo à saturação para doses de urânio na vizinhança de 20 ppm, sendo verificado também ser este o limiar toxicológico do U em ratos. Observou-se uma alteração do regime de saturação para outro, linear crescente, em dosagens superiores a 20 ppm. Esta ocorrência foi discutida em termos de uma provável falência renal de origem toxicológica.

A microdistribuição de U em seções transversais do colo femoral de Beagles mostrou que, contrariamente ao que ocorre em situações de ingestão aguda e única, esse radionuclídeo distribui-se igualmente tanto no córtex quanto na medula óssea. Vários "hot spots" de U foram observados na região próxima ao endósteo.

Foi desenvolvido um modelo biocinético para descrever a acumulação de U em função do tempo, e esse modelo foi validado *vis-a-vis* dados obtidos neste trabalho com ossos de Beagles. Com isso obteve-se, por extrapolação, que a saturação óssea de U ocorreria num período igual ou superior a 8 anos.

Doses internas e microdoses foram calculadas para a região da medula óssea, e as possíveis conseqüências radiobiológicas foram discutidas, tomando-se como exemplo ilustrativo a recente questão do urânio depletado disperso, via operações militares, nas regiões do Golfo Pérsico e Balcans.

ABSTRACT

Groups of Wistar rats and Beagle dogs were submitted to uranium doped diets, starting in the post-weaning period and extending till maturity.

The uranium content in bones was determined by means of two techniques: neutron-fission and neutron activation analysis, to obtain microdistributions and total contents, respectively.

The total content of U in bones of Wistar rats, as a function of the ingested amount (measured in terms of ppm of U in the food), showed a trend toward saturation for U dosages around to 20 ppm, which also represents the toxicological threshold of U in Wistar rats, as verified in this work. It was also observed, at dosages higher than 20 ppm, a change of the saturation regime into another linearly increasing. This fact was discussed in terms of a possible toxicologically originated renal failure.

The U microdistribution in transverse sections of Beagle femoral shafts, showed that this radionuclide is equally distributed all along the cortex and marrow, which is at variance with experimental situations of single and acute dosages. Several U hot spots were observed at locations near to the endosteo.

It was developed a biokinetical model to describe accumulation as a function of time, and this model was validated by comparison with data for Beagle bones obtained in this work. We came to the conclusion, by extrapolation of the model, that the U saturation in bone would take place after a period equal or higher to 8 years.

Internal and microdoses imparted to the central bone marrow were calculated, and the possible radiobiological consequences were discussed, where the recent issue of depleted uranium dispersed in the environment, by means of military operations in the Gulf and Balkans regions, was used as a working example.

Índice

Capítulo I. Introdução 01

I.1. Urânio na Cadeia Alimentar 01
I.1.A. Urânio Natural 01
I.1.B. Urânio originado de atividades humanas 02
I.1.C. Toxicidade química e radiobiológica 03

I.2. Urânio no organismo 04

I.3. O que já se sabe! 05

I.4. O que não se sabe? 07

I.5. Propostas deste trabalho 08
I.5.A. Experimento com ratos Wistar 08
I.5.B. Experimento com Beagles 08
I.5.C. Subsídios para melhor avaliar o problema de DU no meio ambiente 09

Referências 10

Capítulo II. Objetivos 12

II.1. Objetivos Gerais 12
II.2. Objetivos Específicos 12

Capítulo III. Descrição do Experimento 14

III.1. Dopagem de Urânio em ratos Wistar 14
III.2. Dopagem de Urânio em cães Beagle 16
III.3. Preparação de amostras de Ossos 18
III.3.A. Preparação de amostras de Ossos para uso em reações (n,f) 20
III.3.B. Preparação de amostras de Ossos em reações (n,γ) 22

Referências 27

Capítulo IV. Resultados e Discussão 28

IV.1. Ratos 28
IV.1.A. Concentração integrada no tempo e diferenciada na dose 28
IV.1.B. Resultados das análises clínicas e

exames laboratoriais 32
IV.1.C. Coeficiente de transferência 33
IV.1.D. Implicações Radiobiológicas 37

IV.2. Cães 39
IV.2.A. Macrodistribuição de Urânio em diferentes tipos de Ossos 39
IV.2.B. Dependência temporal de Urânio em Ossos de cães em crescimento 43
IV.2.C. Biocinética e processos de acumulação a longo prazo 45
IV.2.D. Microdistribuição de Urânio em seções correspondentes ao colo femoral de Beagles 48
IV.2.E. Implicações radiobiológicas 59
IV.2.F. Resultados das análises clínicas 62

Referências 63

Capítulo V. Conclusões 64

Anexo A. Método de AANI, usando estandardização relativa 66

A.1. Descrição do Método AANI 67
A.2. Formalismo do AANI 68
A.3. Métodos de estandardização em AANI 70
A.3.A. Métodos de estandardização relativa 70
A.3.B. Avaliação de Incertezas na AANI 72
Referências 73

Anexo B. Técnica de Registro de Traços 74

B.1. Descrição 74
B.2. Mecanismo de formação de traços 74
Referências 79

Anexo C. Certificado da solução de Urânio. 80

CAPÍTULO I. INTRODUÇÂO.

I.1. Urânio na cadeia alimentar

I.1.A- Urânio natural

Dos radionuclídeos mais importantes para estimativas de doses devidas à contaminação interna, podemos ressaltar o urânio.

O urânio é um elemento radioativo que encontra-se na natureza em forma de mineral. Rochas, solos, água superficial e subterrânea, o ar, as plantas e os animais, contém quantidades variáveis de urânio, em concentrações típicas da ordem de algumas partes por milhão (ppm). Constitui um dos elementos tóxicos mais pesados encontrados na natureza, além de ser um dos principais precursores de radionuclídeos naturais, emissor de partículas alfa, caracterizadas por ter alto LET ("Linear Energy Transfer").

O urânio existe em vários estados de oxidação, mas a forma hexavalente é a mais comumente encontrada nas exposições ambientais.

Algumas rochas e solos podem também conter quantidades maiores de urânio **[1-8]**. Se a quantidade for suficientemente grande, o urânio pode ser aproveitado comercialmente, ser extraído, e convertido em dióxido ou outras formas do produto. O resíduo desta série de processos mineralógicos também contém uma pequena quantidade de urânio, assim como outros produtos de rejeitos naturalmente radioativos tais como rádio e tório.

É comum achar o urânio como constituinte de rochas fosfáticas, e elas são usadas na fabricação de fertilizantes e suplementos dietéticos para animais.

Vale mencionar, por exemplo, o fosfato bicálcico (DCP). O DCP é obtido através de um processo de desfluorinização, como é mostrado na equação 1. Após este processo, o DCP pode conter concentrações tão altas quanto 200 ppm **[9]**.

$$\underset{\text{(rocha calcárea)}}{Ca_3(PO_4)_2.CaF_2} + H_3PO_4 \xrightarrow[\text{desfluorinização}]{} \underset{\text{(DCP)}}{CaHPO_4} \qquad (1)$$

No Brasil, o suplemento de cálcio na dieta de ovelhas, frangos, etc, inclui um consumo de 72 g de DCP. Se considerarmos então que a fração de DCP consumida é da ordem de 3 %, a quantidade de urânio ingerida estará aproximadamente entre 5 e 6 ppm. Humanos são consumidores do leite e da carne desses animais.

Outros estudos envolvendo análises de 15 tipos de solos brasileiros, **[2]** acharam concentrações totais de urânio na faixa de 2 e 3 ppm, assim como em **[10]** reportaram-se as mesmas quantidades em água mineral proveniente de regiões de alto background no Brasil.

Em outros lugares do planeta podem ser achadas concentrações na água potável tão altas quanto 200 μg-U/l **[11]**, como no caso da antiga URSS, e de 3000 μg-U/l como na Finlândia **[12]**.

Assim, das vias de entrada de radionuclídeos no corpo humano, a ingestão pode considerar-se uma das mais efetivas, por estar diretamente relacionada a hábitos alimentares.

I.1.B- <u>Urânio originado de atividades humanas.</u>

Nos últimos cinqüenta anos, e em decorrência do desenvolvimento da industria nuclear, além do urânio natural (99,27% de ^{238}U, 0,72% de ^{235}U e 0,0054% de ^{234}U) originou-se uma nova fonte de urânio no meio ambiente, conhecida como urânio empobrecido (em inglês: depleted uranium, 99,8%

de ^{238}U, 0,2% de ^{235}U e 0,0006% de ^{234}U), que é considerado resíduo radioativo de baixa atividade, e deve ser confinado e manipulado com as devidas precauções.

O urânio empobrecido (DU) tem sido usado para fins militares nas guerras do Golfo (1991), Bósnia (1994-1995), Kósovo (1999) e Afganistão, e nos últimos cinco anos constitui a causa de múltiplas pesquisas e polêmicas quanto ao impacto na saúde (avaliação de risco).

De fato, ogivas de munição pesada, revestimentos de tanques, contrapeso de aviões, têm sido confeccionados com DU metálico. O principal problema está em que quando se produz o impacto do projétil com algum alvo se formam aerossóis **[11]**, constituídos por partículas de óxidos de urânio de poucas micras de tamanho, que podem ser transportadas pelo vento e pelos efluentes líquidos. Essas partículas são suficientemente estáveis para passar facilmente ao trato respiratório (pulmões), e também se dispersar, contaminando águas, vegetais, gado e outros alimentos. Uma vez acumulado em órgãos, o U leva mais de dez anos para ser eliminado do organismo, e isto é uma questão de máxima preocupação em termos radiológicos.

I.1.C- Toxicidade química e radiológica.

Os manuais de toxicidade química e radiológica recomendam níveis de ingestão para a população em geral, derivados da avaliação de exposições agudas ou simples.

Para compostos solúveis de urânio (são os mais abundantes no meio ambiente), e mesmo no caso de exposições crônicas à radiação, se recomenda não exceder o limite de 0,5 μg-U por kg de peso por dia **[11]**. Isto implica intake toleráveis que oscilam entre 30 e 35 μg-U/d para

mulheres e homens adultos, respectivamente. No caso de compostos insolúveis se admitem intakes toleráveis dez vezes maiores.

Ainda assim, afirma-se na literatura **[18]** não haver dados suficientes para avaliar quanto do intake tolerável pode ser excedido a longo prazo, sem que esse fato implique risco à saúde.

I.2. Urânio no organismo.

O organismo humano contém em média 90 μg de urânio **[11]**, incorporados através do consumo normal de água e alimento, e também por ar inalado. Aproximadamente 66 % se encontra no esqueleto, 16% no fígado, 8% em rins e 10 % em outros tecidos.

Na excreção urinária ou nas fezes elimina-se mais de 95 % do U que entra no corpo.

Tipicamente, entre 0,2 e 2 % do urânio contido nos alimentos e na água é absorvido pelo trato gastrointestinal. Do U que é absorvido no sangue, aproximadamente 67 % é filtrado pelos rins e excretado pela urina, nas primeiras 24 horas.

Compostos solúveis do urânio são melhor absorvidos do que compostos insolúveis, porque a mobilidade do íon uranila (UO_2^{2+}) é similar à mobilidade do cátion Ca^{2+}.

O urânio, assim como também outros metais pesados, têm grande afinidade pelo osso. Desta forma, este órgão é um dos mais importantes acumuladores biológicos de radionuclídeos de vida longa. Por outro lado, é preocupante que dentro dele se concentrem as células hematopoiéticas da medula óssea e células progenitoras do osso.

Por estas razões, o estudo do metabolismo de U em tecidos ósseos, em quantidades que sejam suficientemente baixas, para não induzir um efeito severo imediato por toxicidade química ou radiológica em outros órgãos, é fundamental para avaliar riscos à saúde a longo prazo, principalmente em etapas de crescimento do individuo.

I.3. O que já se sabe!

As informações referentes à acumulação óssea de U foram obtidas exclusivamente de experimentos com animais adultos, aos quais administrou-se dose única.

Mais recentemente, Austin e colaboradores **[13-16]** investigaram intensamente a distribuição de actinídeos em cortes do colo femoral de ratos Wistar. Na figura 1.1 mostramos uma versão adaptada dos principais resultados de Austin.

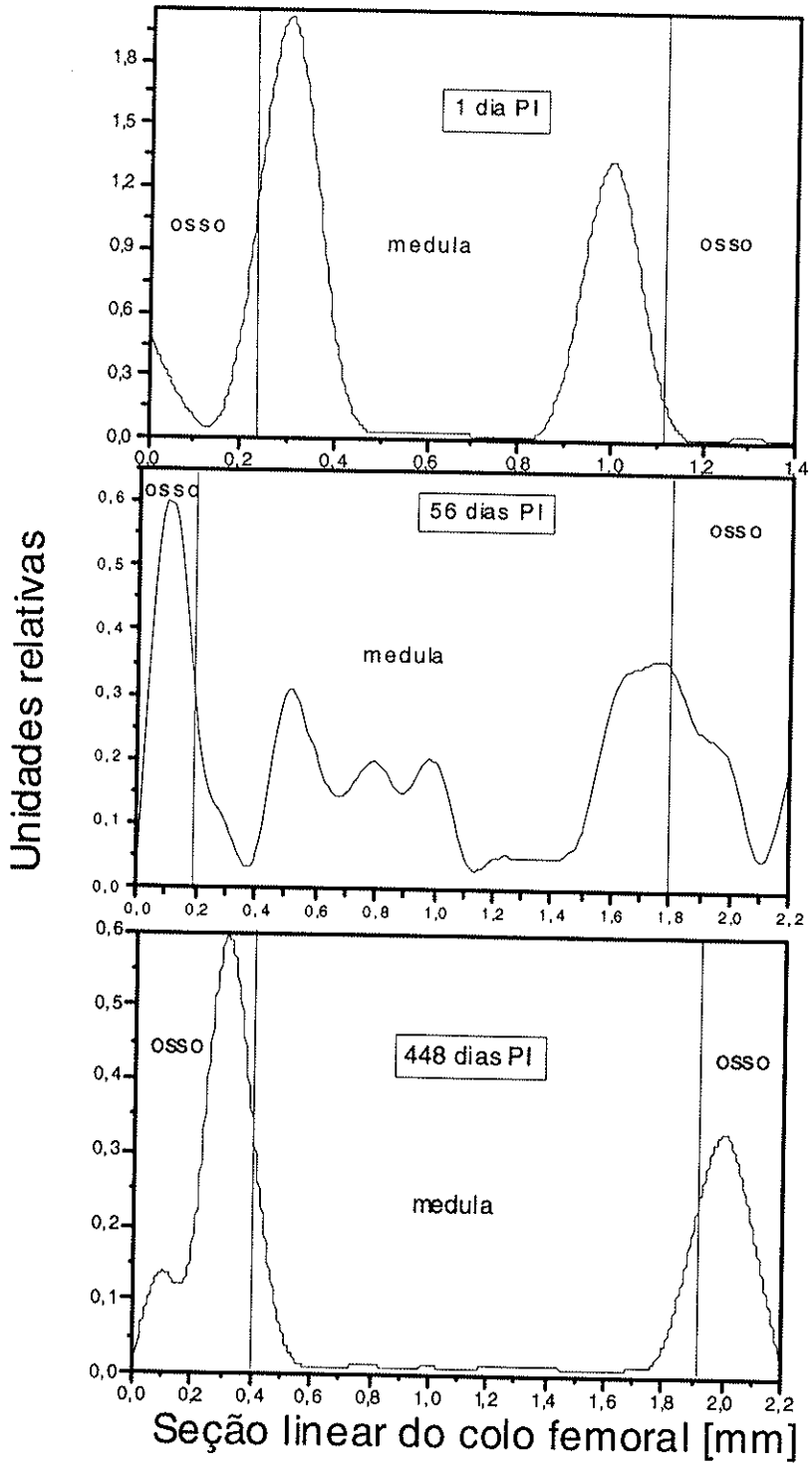

1 dia PI
osso
medula
osso
56 dias PI
osso
medula
osso
448 dias PI
osso
medula
osso
Unidades relativas
Seção linear do colo femoral [mm]

Figura 1.1.

Destacamos aí três fases principais:

Fase-1: corresponde ao primeiro dia subseqüente à administração da dose única. Nela observa-se que devido à maior vascularização da medula, esta funciona como "porta de entrada" principal do U no fêmur.

Fase-2: corresponde a 56 dias após a incorporação e mostra a migração do U para o osso.

Fase-3: O U maximiza-se e estabiliza-se na parte mineralizada, permanecendo um resíduo de urânio na medula.

A partir daí, o processo de depuração óssea encarrega-se de remover boa parte do U contido na parte mineralizada, ocorrendo isso com uma vida média de 1795 dias no caso de cães **[17]**.

I.4. O que não se sabe?

A- A distribuição de U nos ossos em decorrência de ingestão crônica e por longos períodos de vida animal, a baixas doses.

B- Também não existem trabalhos que cubram o período de desenvolvimento animal a partir do desmame, estendendo-se até a fase adulta, o que implica desconhecer a biocinética com o crescimento.

A importância em se dar respostas a essas questões pode ser resumida em dois itens fundamentais:

a) Para realizar avaliações de risco radiobiológico precisam-se de dados obtidos de cenários de ingestão crônica, já discutidos nos itens 1.A e 1.B.

b) A fase de "construção" do esqueleto é a etapa que mais cálcio o organismo precisa. Logo, como a velocidade de acumulação é bem diferente da velocidade de depuração, mais urânio deve ser conduzido aos ossos.

I.5. Propostas deste trabalho

I.5.A- Experimento com ratos Wistar.

Estudar a acumulação integrada no tempo e diferenciada na dose desde o desmame até o animal chegar à fase adulta, permitindo obter coeficientes de transferência para incorporação crônica a baixas doses.

I.5.B- Experimento com BEAGLES.

a) Estudar a acumulação integrada na dose e diferenciada no tempo (também na etapa de crescimento) em animais que possuam características fisiológicas e anatômicas similares aos humanos, evitando o uso de extrapolações.

b) Obter duas categorias de dados: macrodistribuição e microdistribuição, usando duas técnicas nucleares analíticas diferentes.

c) Obter o comportamento cinético do U nos ossos utilizando o MESMO animal, que é um procedimento original e vantajoso porque sempre existem flutuações metabólicas entre os animais, difíceis de avaliar.

I.5.C- Oferecer subsídios para melhor avaliar o problema de DU no meio ambiente.

A questão principal associada à Síndrome do Golfo (dos Balcans, etc) consiste, fundamentalmente, em saber qual é o destino final (no osso) do urânio depletado disperso no meio ambiente, que é ingerido cronicamente pelas populações locais: córtex?, medula? ou ambos?. Os resultados deste trabalho podem dar resposta a essa questão, bem como redirecionar algumas normas radiobiológicas.

REFERÊNCIAS.

[1] Ledvina R. et al. (1996). *Uranium, thorium and some other elements in topsoils of the Trebon region from the aspect of production contamination.* Rostlina Vyroba **42**(2), 73-78.

[2] Perez D.V. et al. (1998). *Total concentration of uranium and thorium in some Brazilian soils.* Pesquisa Agropecuária Brasilera **33** (8), 1417-1423.

[3] Singh A.K. et al. (1998). *Microanalysis of U in Indian soil samples using solid state nuclear track detection technique.* J. Radioanal. Nucl. Chem. **238** (1-2), 21-24.

[4] Reimann C. et al. (1998). Environmental geochemical Atlas of the central Barents region. Geological Survey of Norway, Trodheim, Norway.

[5] Kadunas V. et al. (1999). Geochemical Atlas of Lithuania. Geologijos Institutas, Vilnius, Lithuania.

[6] Bou-Rabee (1995). *Estimating the concentration of U in some environmental samples in Kuwait after the 1991 Gulf War.* Applied Radiation Isotopes,**46**, 217-220.

[7] Brajnik D. et al. (1988). *Sources of technologically enhanced natural radioactivity and their impact in Slovenia (Yugoslavia).* Radiation Protection Dosimetry, **24**, 551-554.

[8] British Geological Survey, 1997. *Regional geochemistry of part of North-West England and North-Wales.* British Geological Survey, Keyworth, Nottingham, UK.

[9] Arruda-Neto J.D.T.et al. (1997). *Concentrations of uranium in animal feed supplements: Measurements and dose estimates.* J. Radioanal. Nucl. Chem. **221**, 97-104.

[10] DeCamargo I.M.C. et al. (1996). *Determination of U and Th isotopes in mineral spring water.* J. Radioanal. Nuclear Chem. Letters. **212**(4), 251-258.

[11] WHO/SDE/PHE/01.1. (2001). *Depleted Uranium, sources, exposure and health effects.* WHO, Geneva.

[12] Reimann C. et al. (1996). *Radon, fluoride and 62 elements as determined by ICP-MS in 145 Norwegian hard rock groundwater samples.* The Science of the Total Environment. **192**,1-19.

[13] Austin, A. L. et al. (2000). *A biokinetic model for alpha-emitting bone surface-seeking radionuclides in the mouse skeleton.* Radiat. Prot. Dosim. **92**, 233-238.

[14] Austin, A. L. et al. (1998). *Microdosimetry for leukaemogenic target cells for bone-incorporated alpha-emitting radionuclides.* Radiat. Prot. Dosim. **79**, 391-394.

[15] Austin, A. L. et al. (1999).*Temporal change in microdosimetry to bone marrow and stromal progenitor cells from alpha-particle-emitting radionuclides incorporated in bone.* Radiat. Res. **152**, 538-542.

[16] Austin, A. L. et al. (2000). *Microdistribution and localized dosimetry of the alpha-emitting radionuclides ^{239}Pu, ^{241}Am and ^{233}U in mouse femoral shaft.* Int. J. Radiat. Biol. **76**, 101-111.

[17] Stevens W. et al. (1980). *The distribution and retention of hexavalent ^{233}U in the Beagle.* Radiation Research. **83**,109-126.

[18] NCRP report. No 117 (1993). *Research Needs for Radiation Protection.*

CAPITULO II. OBJETIVOS.

Como o urânio está normalmente presente na água e nos alimentos em pequenas quantidades, e acumula-se preferencialmente em ossos, a **motivação** deste trabalho reside em que sua incorporação diária é considerada ingestão crônica a baixas doses, constituindo um fato mais comum do que tem sido considerado.

O **propósito de nossa pesquisa** é então obter informações que contribuam para melhorar a compreensão do metabolismo do urânio em animais, e facilitem a extrapolação a humanos, permitindo calcular doses devidas à incorporação crônica de radiação com alto LET, e com atividades suficientemente baixas para que simulem ingestão diária em níveis ambientais.

Para atingir esse propósito estabelecemos os seguintes objetivos de ordem metodológica.

II. 1 - Objetivos gerais:

a) Quantificar a concentração de urânio em ossos de Beagles e ratos Wistar.

b) Estudar a dependência temporal da concentração de urânio no osso.

c) Avaliar possíveis riscos radiobiológicos.

II. 2 - Objetivos específicos:

a) Obtenção experimental da "topografia" da distribuição de urânio em cortes transversais de fêmures de Beagles.

b) Cálculo de microdoses ao longo da estrutura transversal dos fêmures.

c) Avaliação do efeito dos "hot-spots".

d) Determinar o coeficiente de transferência para baixas doses.

e) Discutir a questão referente à contaminação ambiental devida ao uso militar de urânio empobrecido no Golfo Pérsico e nos Bálcans.

Desta forma, o trabalho encontra-se dividido em cinco capítulos e três anexos.

As tabelas e figuras são numeradas por ordem de citação e as referências apresentadas por capítulo.

CAPÍTULO III. Descrição do experimento.

O estudo da incorporação de urânio em órgãos é descrito na literatura através de experimentos com animais adultos e até com humanos [1-6]. Tais experiências envolvem situações de incorporação aguda, bem como altas doses de radiação, e seus resultados são usados para estudos de avaliação de risco na saúde, realizando extrapolações para baixas doses ou para incorporações crônicas. Contudo, na fase de crescimento de um organismo altera-se não só a absorção de qualquer substância pelo trato gastrointestinal, assim como também se alteram as conclusões derivadas de tais experiências.

Por isso, com o objetivo de elucidar as principais dúvidas sobre biodistribuição de urânio no esqueleto planejamos dois experimentos, com relativamente baixos níveis de incorporação, situação esta que simula um cenário comum de vida, durante a fase de crescimento do animal. Um desses experimentos foi executado com ratos da raça Wistar na Faculdade de Veterinária da UNESP, em Araçatuba, e o outro com cães Beagles no Laboratório UNITOX da Faculdade de Biomedicina da UNISA, em São Paulo.

III.1 Dopagem de urânio em ratos Wistar.

Quinze ratos Wistar, com 15 dias de idade e peso aproximado de 25-30 g, foram isolados em 7 gaiolas metabólicas, formando 6 grupos de dois animais cada, e um último grupo com 3 animais.

Os ratos do primeiro ao sexto grupo foram dopados com uma solução de nitrato de uranila, misturada diariamente ao alimento nas seguintes concentrações (em partes por milhão): 0,5; 2; 10; 20; 50 e 100 ppm.

O sétimo grupo ou grupo de controle, só recebeu ração.

Os animais foram controlados e mantidos em condições de fotoperíodo natural, recebendo uma ração enriquecida em 12 mg de cálcio, 10 mg de ferro, 60 mg de manganês, 2 mg de cobre, 50 mg de zinco, 2 mg de iôdo, 0,1 mg de selênio e 10 mg de anti-oxidantes (por kg de ração).

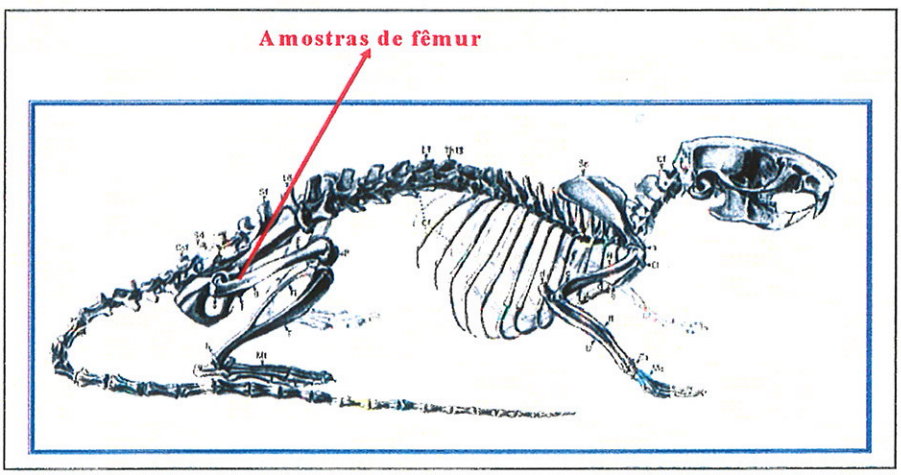
Foram adotados os seguintes procedimentos durante o experimento:

1. Controle diário do consumo de ração, assim cómo controle do peso do animal.
2. Coleta e análise de urina e fezes, procurando observar qualquer variação não esperada na concentração de proteínas, pH, ou presença de sangue oculto na urina, parâmetros estes que se consideram indicativos de falência renal ou de efeitos toxicológicos severos.
3. Avaliação freqüente de outras características.

Os animais foram sacrificados por decapitação após um período experimental de 60 dias, quando alcançaram a maturidade.

Após a necropsia, os órgãos (incluindo amostras de fêmur - figura 3.1) foram pesados e segregados em lâminas de alumínio, para serem mantidos à temperatura de aproximadamente -20 °C até seu processamento inicial.

Figura 3.1 Amostras de ossos tomadas de ratos wistar.



Em concordância com o protocolo inicial do experimento, todas as amostras provenientes desta experiência seriam analisadas através da técnica de fragmentos de fissão, e deveriam ser misturadas aos pares (aquelas provenientes de um mesmo grupo), exceto no caso do grupo de controle que tinha três animais. Assim, as amostras de todos os órgãos foram incineradas à temperatura de 500 ^{o}C, durante 4 horas, com posterior dissolução em solução de ácido nítrico a 2%. Amostras de cada órgão em forma de solução foram enviadas ao LAL do IFUSP, para serem analisadas usando técnicas nucleares.

III.2 Dopagem de urânio em cães Beagles.

Sete cães da raça Beagle com três meses de idade e peso aproximado de 5 kg foram alimentados com ração FOXY, apresentando as seguintes características nutricionais: 21% de proteína bruta, 8 % de extrato etéreo, 4 % de matéria fibrosa, 10% em minerais, 1,8% de cálcio, 1% em fósforo, 17 % em proteínas de origem animal e 1,7 % de ácido linoléico.

Os cães foram classificados em três grupos:

Grupo I - grupo de controle, com três cães: só recebeu ração FOXY.

Grupo II, com um cão: recebeu diariamente em jejum, durante 279 dias, um biscoito de ração dopado com 12 mg-U /d (em adiante será nomeado este grupo como grupo de 20 ppm).

Grupo III, com três cães: também recebeu em jejum ração dopada com urânio durante 279 dias, correspondendo sua ingestão a 60 mg-U/d (grupo de 100 ppm).

A concentração expressada em ppm corresponde à quantidade de U relativa à massa total de alimentos ingeridos (ração + biscoito).

Os estudos de absorção de urânio em animais indicam que a incorporação pela circulação sistêmica depende da forma química do

composto utilizado e das condições em que é administrado [7-10]. Assim, animais que não tenham sido alimentados previamente absorvem melhor que animais que já o foram. Do mesmo modo, se sabe que a absorção decresce com o decremento da solubilidade do composto químico [11]. Portanto, a administração de um biscoito dopado com urânio aos cães em jejum, garantiu a máxima absorção e o controle da massa de urânio na ração administrada.

Por outro lado, trabalhos desenvolvidos principalmente na década de 80, analisados e resumidos pelo Task Group do ICRP, estimam que a absorção de urânio pelo trato gastrointestinal está na faixa de 0,02 e 2 % da quantidade ingerida [11].

Durante 279 dias, com freqüência quinzenal, os seguintes procedimentos foram verificados:

1. Avaliação das condições clínicas do animal (temperatura, peso, comportamento, etc).
2. Controle e análise de urina e fezes com o objetivo de observar possíveis variações no pH, concentração de proteínas ou sangue oculto na urina, que podem ser indicadores do alto poder toxicológico do urânio.

Além desses controles, foram colhidas amostras (via incisão cirúrgica) correspondentes à falange do primeiro dedo da pata dianteira, aos 82 e 180 dias de iniciada a experiência, com o objetivo de determinar o conteúdo de urânio nesses ossos.

Após um período de 279 dias (equivalente ao primeiro ano de vida), os cães foram anestesiados e sacrificados através do método de sangria. As necropsias ocorreram imediatamente após o sacrifício. Órgãos e ossos foram removidos, classificados e pesados. As amostras foram conservadas em bolsas plásticas a temperatura adequada (- 20 °C) até o processamento.

III.3 Preparação de amostras de ossos.

As peculiaridades do tratamento de amostras de ossos são ditadas pelas técnicas de medição adotadas para as análises.

Como é explicado no Anexo B, a técnica de fragmento de fissão é conveniente para a análise de amostras biológicas por apresentar um limite de detecção baixo (~ ppb), mas requer alvos suficientemente finos e homogêneos, quando tratar-se de quantificar.

Mas, como já foi comentado no item III.1, tinha-se planejado analisar as amostras de ratos, usando a técnica de fragmentos de fissão, especificamente, usando amostras em forma de soluções e depositando estas sob lâminas de Makrofol E. Este método é conhecido na literatura como método seco [12].

Ocorre que conseguir um alvo fino, homogêneo e não higroscópico, no caso de osso, é um procedimento que exige algumas separações químicas e material apropriado para esse fim. Portanto, foi considerada a possibilidade de realizar a quantificação usando a técnica de análise por ativação neutrônica instrumental (AANI) (ver anexo A), que permite usar alvos sólidos.

Assim, as soluções de ossos obtidas da experiência com ratos (~10 ml de solução de diferentes concentrações de urânio) foram evaporadas pela segunda vez, num forno doméstico a temperaturas entre 150 e 200 ^{0}C, durante aproximadamente 3 horas. A massa recuperada de ossos após a desidratação foi incinerada em um forno a 900 ^{0}C, durante 3 horas também. O objetivo da incineração a essa temperatura foi garantir a degradação do material orgânico contido nas amostras. O material recuperado (cinzas) foi pesado (peso seco das amostras de ossos).

Aproximadamente 100 mg de cinzas de cada amostra foram utilizadas na análise via ativação neutrônica (AANI – ver Anexo A), medindo as linhas gamas do ^{239}Np, formadas pela reação:

$$^{238}U(n,\gamma)^{239}U \underset{23m}{\overset{\beta^-}{\rightarrow}} {}^{239}Np \underset{2,35d}{\overset{\beta^-}{\rightarrow}} {}^{239}Pu \underset{24000a}{\overset{\alpha}{\rightarrow}} {}^{237}Np$$

As três linhas gamas do ^{239}Np foram medidas com um detector de Germânio de 75 cm^3 de alta resolução (FWHM<1,87 keV para a linha de 1,32 MeV do ^{60}Co).

No caso do tratamento de ossos correspondentes a cães, foi necessário primeiro utilizar uma solução de peróxido de hidrogênio a 40 % para tirar o excesso de carne. Depois de limpas, as amostras foram secadas usando lâmpada infravermelha, para facilitar sua incineração ou corte. Este material foi totalmente tratado no laboratório de química do departamento de Física Experimental do IFUSP.

O procedimento "corte" ou "incineração" refere-se ao tratamento dado às amostras para cumprir com os objetivos traçados no Capítulo II (microdistribuição e distribuição temporal, respectivamente), portanto, depende da técnica experimental usada para a análise.

Desta forma, antes de se proceder à incineração, foram feitos cortes transversais de fêmures de Beagles, correspondentes ao chamado colo femoral, para serem colocados entre lâminas de Makrofol E. O objetivo deste procedimento foi obter a microdistribuição de urânio usando a técnica (n,*f*).

III.3.A- Preparação de amostras de osso para uso em reações (n, f).

Tendo-se em conta a técnica de registro de traços de fissão descrita no Anexo B, secções transversais (figura 3.2) do colo femoral de Beagles (região da epífise), de aproximadamente 1,5 – 2 mm de espessura, foram cortadas e colocadas entre lâminas de Makrofol E de 200 μm (três cortes por fêmur para cada cão), para serem irradiadas durante 5 min de acordo com o arranjo experimental mostrado na figura 3.3, na posição EIRA-24B do reator IEA-R1, a um fluxo de $1{,}23(13).10^{13}$ $n/cm^2.s$ (quando o reator opera a 2 MW de potência), durante 5 minutos.

Figura 3.2. Corte transversal de um osso longo.

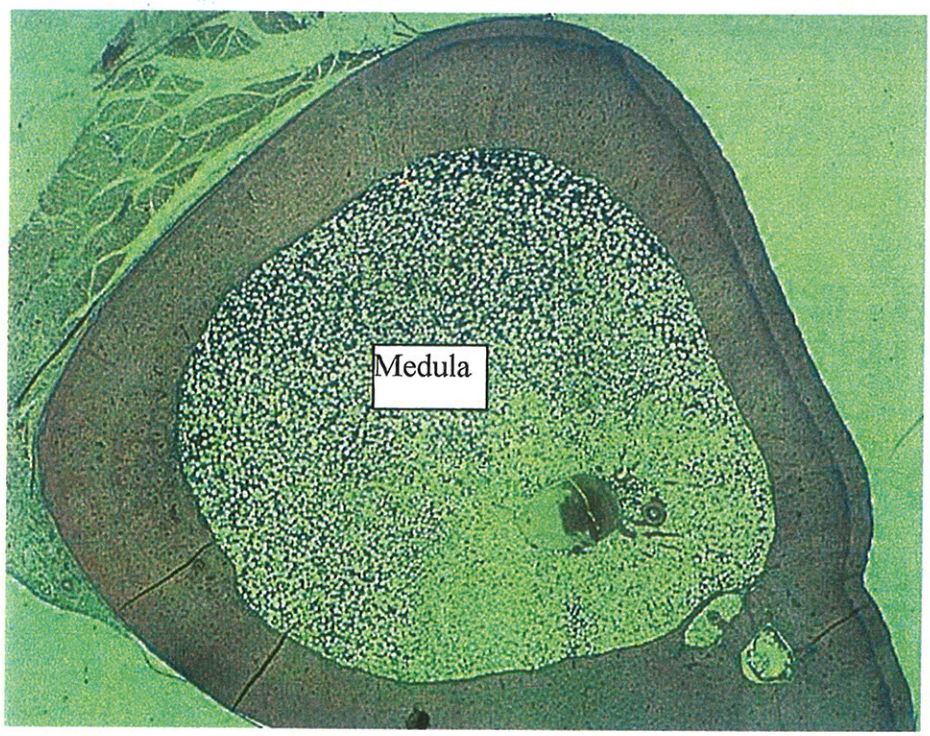
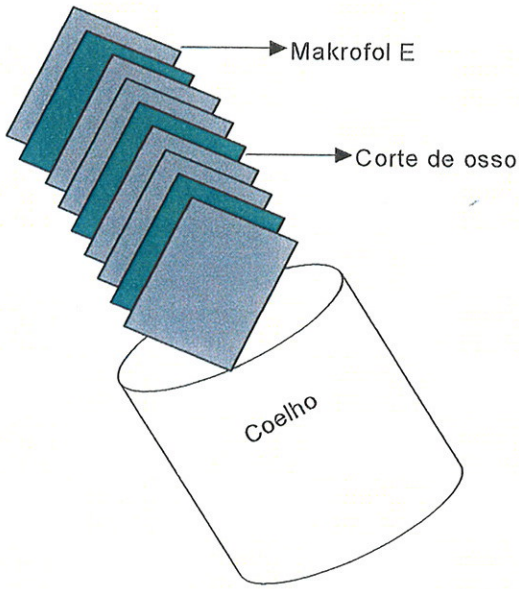


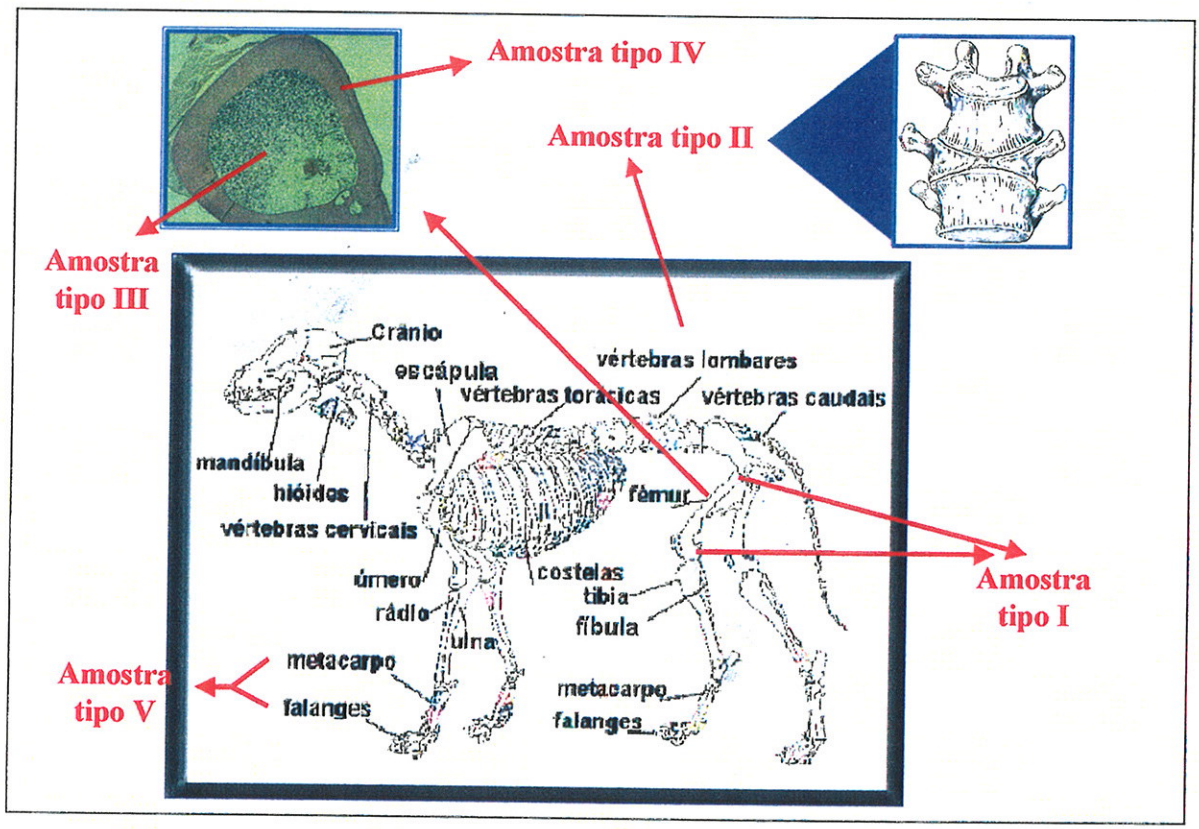
Figura 3.3. Ilustração do arranjo experimental usado para irradiação de amostras do colo femoral de Beagles (colocado na posição de irradiação EIRA 24B do reator do IPEN).



Após a irradiação, as lâminas de Makrofol E (duas por amostra) foram reveladas em solução de 1M de hidróxido de potássio (KOH) a 65 °C em banho térmico, durante 7 min, secadas e montadas para serem lidas num microscópio óptico de projeção. A melhor resolução de imagem conseguiu–se com lente de 63x de aumento, que permitiu contar o número de traços induzidos por fissão com o escaneamento de campos de 0,18 x 0,18 mm^2, os quais definiram a resolução da microdistribuição de urânio em osso, que denominaremos "Topografia do urânio".

III.3.B- Preparação de amostras de osso para uso em reações (n, γ).

Foram calcinadas durante um período de 4 horas a 900°C, sendo a seguir pulverizadas e homogeneizadas, as seguintes amostras de ossos: cabeça de fêmur + parte inferior desse osso (**amostras tipo I**), vértebras (**amostras tipo II**), medula óssea (**amostras tipo III**), córtex femoral ou parte calcificada do fêmur (**amostras tipo IV**) e metacarpo + falanges (**amostras tipo V**), e somente fêmur no caso de ratos.



No caso de ratos as cinzas foram misturadas aos pares (exceto o grupo de controle constituído por três ratos). No caso de Beagles foram processadas individualmente tanto amostras provenientes de um mesmo cão, quanto amostras procedentes de diferentes cães de um mesmo grupo.

Para medir a concentração de urânio (ratos e cães), aproximadamente 100 mg de cinzas de cada amostra foram seladas e pesadas em envelopes de polietileno. Cada amostra foi pesada com desvios da ordem de 0,71 mg, que provocaram erros relativos nas massas das amostras inferiores ao 0,8%. Alíquotas de solução padrão de U de 50,29(15) µl de volume (com certificado da SPEX CERTIPREP, INC. no Anexo C), com concentração bem conhecida (102,0(22) µg-U/ml), foram pipetadas em papel de filtro tipo Whatman n° 40 de 1 cm^2, e secadas em lâmpada infravermelha. O padrão também foi selado em cápsula de polietileno para ser irradiado, simultaneamente com um limitado número de amostras, na mesma posição de irradiação.

Procedimentos de preparação do padrão.

Partindo de uma solução de 1003 µg-U/ml foi tomado com um pipetador automático, um volume de 2,54(2) ml que foi diluído em água destilada até completar um volume de 24,92(48) ml, num balão volumétrico adequadamente calibrado. Este procedimento gerou um erro na nova concentração do padrão de 2,2%.

Irradiação.

Todas as amostras foram colocadas dentro do coelho de irradiação envolvidas por um cilindro de Cd de 1 mm de espessura.

Os invólucros (coelho) contendo entre 6 e 7 amostras, incluindo um padrão em cada coelho, foram irradiados durante 8 horas com nêutrons nas proximidades do núcleo do reator do IPEN, com fluxo de $2.10^{13} n/cm^2.s$, (operando a 2 MW de potência). Este é um reator de tipo piscina, de 5 MW, com elementos combustíveis do tipo MTR (Material Testing Reactor), compostos por 20 placas planas paralelas, contendo uma liga de U-Al. A figura 3.4 apresenta um esquema simplificado da disposição dos elementos constituintes do núcleo do reator.

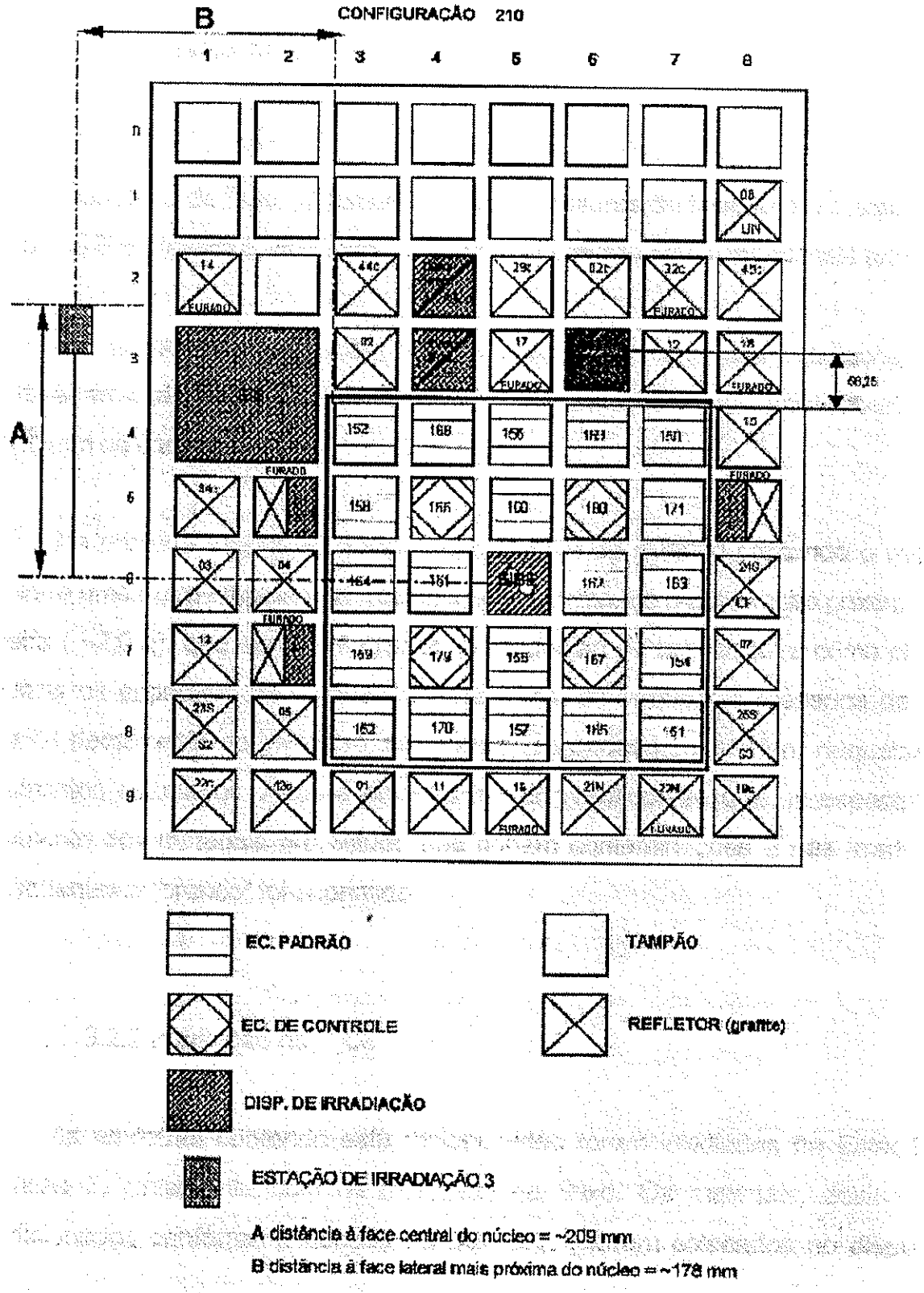


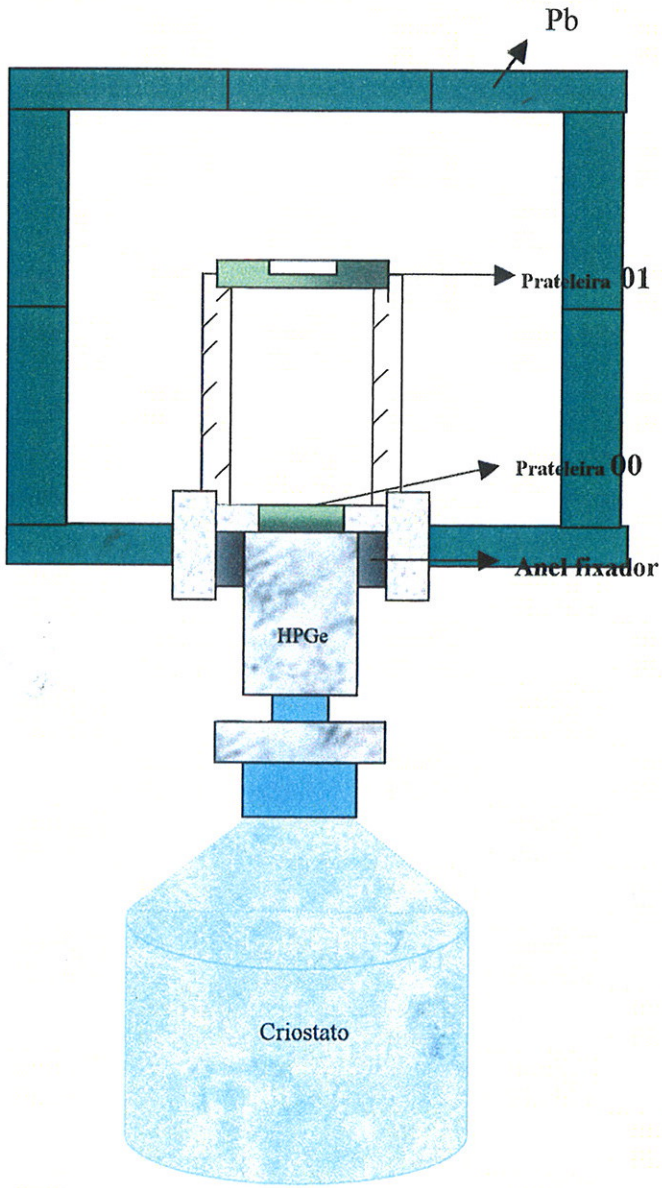
Figura 3.4 Esquema simplificado do núcleo do reator IEA-R1m

Após a irradiação cada amostra foi medida utilizando um espectrômetro gama (Modelo GEM 20190-P), montado numa câmara de baixo fundo blindada com Pb do Laboratório de Análise de amostras ambientais e biológicas da divisão de CRPq do IPEN. Este laboratório está devidamente certificado (ISO-9002) para estes fins. O sistema espectrométrico é conhecido como sistema TRUMP.

O detector, que possui um cristal com diâmetro de 57,6 mm, operou com uma voltagem de 2100 V (com polaridade positiva) e um amplificador 672 (FG= 1,3; CG= 20) da ORTEC em modo de empilhamento de pulsos.

Amostras e padrões foram medidos na mesma geometria de detecção, usando um suporte tipo degrau (prateleira 00, figura 3.5). As atividades das amostras foram determinadas usando o Método Relativo de AANI (anexo A). Amostras correspondentes ao primeiro dedo para t=82 e t=180 dias, juntamente com o padrão correspondente a essa irradiação foram medidos na prateleira 01 (figura 3.5), afastados do detector, para que a correção por ângulo sólido no caso deste tipo de amostras fosse inferior ao 3 %. As medidas foram feitas após uma média vida de decaimento do ^{239}Np. O tempo de medida para cada amostra oscilou entre 1 e 6 horas. Os erros relativos na determinação da atividade dos padrões foram inferiores também ao 1%, em todos os casos.

Figura 3.5. Esquema do detector com a geometria usada.



REFERÊNCIAS

[1] Tandon, L. et al.(1998). *A review of radiologically important trace elements in human bones.* Appl. Radiat. Isot. **49**,903-910.

[2] Sullivan M.F. et al (1982). *Further studies on the absorption of actinide elements from the gastrointestinal tract of neonatal animals.* Health Phys. **43**, 509-519.

[3] La Touche Y.D. et al. (1987). *Absorption and biokinetics of U in rats following an oral administration of uranyl nitrate solution.* Health Phys.**53**,147-162.

[4] Sullivan M.F. et al. (1980). *Absorption of actinide elements from the gastrointestinal tract of rats, guinea pigs and dogs.* Health Phys. **38**,159-171.

[5] Ubios A.M. et al. (1998). *Effect of biphosphonates on abnormal mandibular growth of rats intoxicated with uranium.* Health Phys. **75**,610-613.

[6] Kathren R.L. et al. (1989). *Uranium in the tissues of an occupationally exposed individual.* Health Phys. **57,**17-21.

[7] Wrenn M. E. et al (1985). *Metabolism of U ingested and Ra.* Health Phys. **48,** 601-603.

[8] Bhattacharyya M.H. et al. (1989). *Gastrointestinal absorption of plutonium and uranium in fed and fasted adult baboons and mice: Application to humans.* Radiat. Protect. Dosim. **26,** 159-165.

[9] Harrison J.D. et al. (1991). *The gastrointestinal absorption of the actinide elements.* Sci. Total Environ. **100**, 43-60.

[10] Leggett R.W. and Harrison J.D. (1995). *Fractional Absorption of ingested uranium in humans.* Health Phys. **68,** 484-498.

[11] ICRP 69. (1995). *Age- dependent doses to members of the public from intake of radionuclides: Part III Ingestion Dose Coefficients.* Annals of the ICRP **25** (1).

[12] Tanaka, E. (1978). *Desenvolvimento da técnica de registro de traços de fragmentos de fissão para a determinação de contaminação de urânio.* Dissertação de mestrado. São Paulo. E.P Escola Politécnica.

CAPÍTULO IV. Resultados e discussão.

IV.1. Ratos.

IV.1.A- Concentração integrada no tempo e diferenciada nas doses.

O objetivo principal deste experimento foi estudar pela primeira vez a distribuição de urânio em ossos de ratos, submetidos à incorporação crônica controlada de urânio, em concentrações crescentes a partir de níveis iguais aos encontrados no meio ambiente, e conseqüentemente na cadeia alimentar, durante toda a etapa de crescimento do animal.

Para a quantificação de U foram irradiadas total de 21 amostras de fêmures (uma amostra e duas réplicas), acondicionadas em invólucros de cádmio.

Os espectros foram analisados com o programa VISPECT2 [2] e o calculo das concentrações foi feito com o programa ESPECTRO [3]. As concentrações reportadas referem-se ás médias das três réplicas, usando as três linhas do Np^{239}.

Na tabela **4.1** são mostrados os resultados, expressados em μg de U por Kg de cinza e por unidade de peso úmido das amostras, como função da dose de U administrada. Aqui foi considerado que 1 Kg de peso úmido de osso é igual a 0,350 Kg de peso de cinzas.

Tabela 4.1. Concentrações de U em ossos de ratos.

Dosagem [ppm]	**Consumo diário** [μg-U/d]	**C** - cinzas [μg-U/ kg]	**C** - úmido [μg-U/ kg]
0	0	-	-
0,5	24	127(14)	44,3 (66)
2	100	184(18)	64,4(90)
10	530	312(17)	109(12)
20	1110	315(29)	110(15)
50	2800	794(45)	278(32)
100	5200	1525(49)	534(56)

Na figura **4.1** mostram-se os resultados para a concentração de U em ossos de ratos Wistar C (amostras úmidas) junto aos resultados obtidos no trabalho [1] para outros órgãos de ratos. A curva desenhada é para "guiar os olhos", destacando assim o comportamento diferenciado nas doses.

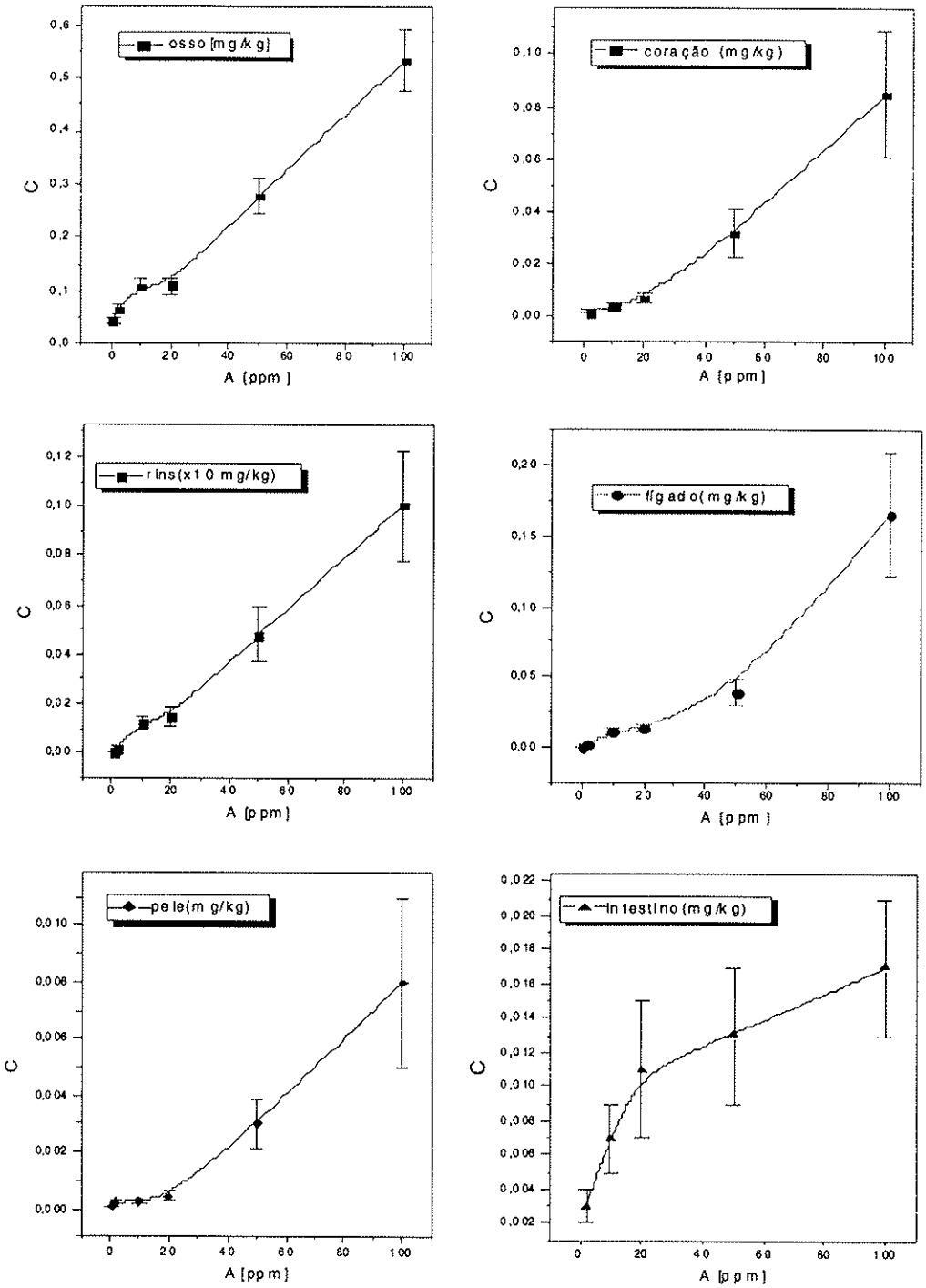


Fig. 4.1- Concentração de urânio em órgãos de ratos em função do intake.

A acumulação óssea de U (figura **4.1**) exibe um comportamento hiperbólico, como na maioria dos processos biológicos, para incorporações inferiores a 20 ppm, destacando-se uma inflexão nesse valor, e acima dele o comportamento é linear crescente. O mesmo comportamento foi observado para os demais órgãos, exceto o intestino.

É importante esclarecer que a quantificação de urânio para outros órgãos, tomada da referência [1], foi feita usando a técnica de registro de traços de fissão (Anexo B), enquanto que o osso foi medido usando AANI (Anexo A). Isto permite inferir que a "irregularidade" observada em 20 ppm não está relacionada com a metodologia experimental usada.

Para interpretar a mudança no regime de acumulação consideremos o seguinte:

1. O uptake de minerais na matriz óssea é função da afinidade do metal com a matriz extracelular e também da concentração desse metal no plasma.
2. Por outro lado, quando o metal interage com as células do osso seu metabolismo pode modificar-se, já que essa "transferência" altera a função de osteoclastos e osteoblastos. Um exemplo esclarecedor deste comportamento é mostrado pelos fosfatos, compostos constituintes da parte mineralizada do osso, que do mesmo modo que carregam Ca e outros metais ao osso, também são inibidores da função dos osteoclastos, visto que sua valência (fósforo) muda com o pH do meio.
3. Nestes processos de regulação e/ou transporte intervêm três sistemas de órgãos: o trato intestinal (onde se produz a reabsorção), o esqueleto (que é o depósito fundamental) e os rins (filtro).

Portanto, uma explicação coerente para a modificação do regime de acumulação observada na vizinhança de 20 ppm, poderia encontrar-se nos resultados das análises clínicas e exames laboratoriais, a seguir discutidos.

IV.1.B- Resultados das análises clínicas e exames laboratoriais.

- A urina coletada nos últimos 15 dias da experiência, dos ratos pertencentes aos grupos de 50 e 100 ppm-U, ficou visivelmente mais escura que aquela procedente de animais de outros grupos; porém, os exames laboratoriais revelaram que o pH, a concentração de proteínas, nitratos, bilirrubina, urobilinogêneo e a presença de corpos cetônicos, estavam dentro da faixa considerada normal.
- Também se observou que os dois grupos de maior concentração de U mostraram mais agressividade, o que é considerado um indicador de toxicidade.
- Foi encontrado sangue nas amostras de urina dos grupos alimentados com 20, 50, e 100 ppm-U em exames feitos no último terço do período experimental, em concentrações de 50 glóbulos vermelhos/µl, aproximadamente.

  Este fato revela prováveis lesões nos túbulos renais, causadas por exposição do lúmen tubular e/ou capilares peritubulares.
- Em compensação, durante todo o período experimental os animais ganharam peso, considerando-se seu desenvolvimento normal para ratos Wistar.

  Como a diminuição de peso do animal também pode ser manifestação do efeito severo da toxicidade, essa possibilidade foi descartada.

Desta forma, pode concluir-se que a inflexão na função de acumulação em 20 ppm é o resultado da passagem do regime de tendência à saturação para outro de crescimento linear, provocado por lesões de origem toxicológica em rins (vide acima). Isso sugere a seguinte explicação:

1. os rins passaram a filtrar menos urânio;
2. em decorrência, a concentração de U aumenta na circulação sistêmica consideravelmente; e
3. assim, maior quantidade de U é transportada aos órgãos, fazendo com que a acumulação cresça linearmente com a dose.

IV.1.C- Coeficiente de transferência.

Um dos objetivos deste trabalho é conseguir extrapolar aos humanos os resultados de incorporação crônica obtidos em animais. Para isso é apropriado definir uma outra grandeza denominada Coeficiente de Transferência.

Este termo é usado para descrever a fração da concentração do radionuclídeo que passa ao compartimento objeto de análise, quando se está em equilíbrio com uma taxa de ingestão constante do radionuclídeo. Suas dimensões então são consistentes com unidades tempo/massa.

Formalmente, no caso de considerar só o compartimento osso:

$$\frac{dC(A,t)}{dt} = \gamma A - \lambda_m C(A,t) \qquad (1)$$

onde *C(A,t)* é a concentração de U no órgão , medida em [g-U/kg] no tempo t. O último termo da equação representa a perda de U do compartimento osso por depuração metabólica, unicamente.

A(t) é a taxa de ingestão do contaminante medida em [g-U/d], e γ a fração de U que é absorvida pelo osso.

A equação (1) é uma equação diferencial linear de primeiro ordem, cuja solução formal é:

$$C(t) = \gamma\, e^{-\lambda t} \int_0^t e^{\lambda t'} A(t')dt', \qquad (2)$$

no caso de considerar a condição inicial de não existir urânio no compartimento osso para t=0. Para uma taxa de ingestão constante ***A***:

$$C(t) = \frac{\gamma}{\lambda} A(1 - e^{-\lambda t}), \qquad (3)$$

Para t $\rightarrow \infty$, ***C(t)*** se aproxima rapidamente do equilíbrio, obtendo-se $C_e = (\gamma A/\lambda) \equiv f\, A$, onde $f = \gamma/\lambda$ é o coeficiente de transferência.

O coeficiente de transferência para o urânio é facilmente determinado pela relação $f = C/A$, onde $C = C_e$ é a quantidade de U medida no osso por unidade de peso úmido, no equilíbrio, e ***A*** é a quantidade de U incorporado diariamente pelo animal (intake diário).

Os resultados da tabela 4.2 e da figura **4.2** correspondem a um tempo t_f= 60 dias (fase adulta do animal), onde se espera tenha ocorrido a saturação ($C(t) \rightarrow C_e$). Para o cálculo foi considerado um erro de 10 % no intake.

Tabela 4.2 Coeficiente de Transferência da dieta ao osso.

Dosagem [mg-U/kg]	Intake diário [µg-U/d]	**C** - úmido [µg-U/ kg]	*f* [d/kg].
0,5	24	44,3 (66)	1,85(33)
2	100	64,4(90)	0,64(11)
10	530	109(12)	0,206(31)
20	1110	110(15)	0,099(17)
50	2800	278(32)	0,099(15)
100	5200	534(56)	0,103(15)

Para conseguir extrapolar a humanos é conveniente obter uma função que ajuste tais dados até incorporações de 20 ppm, visto que acima deste valor foram observadas modificações no regime de acumulação, devidas às lesões renais de origem toxicológica.

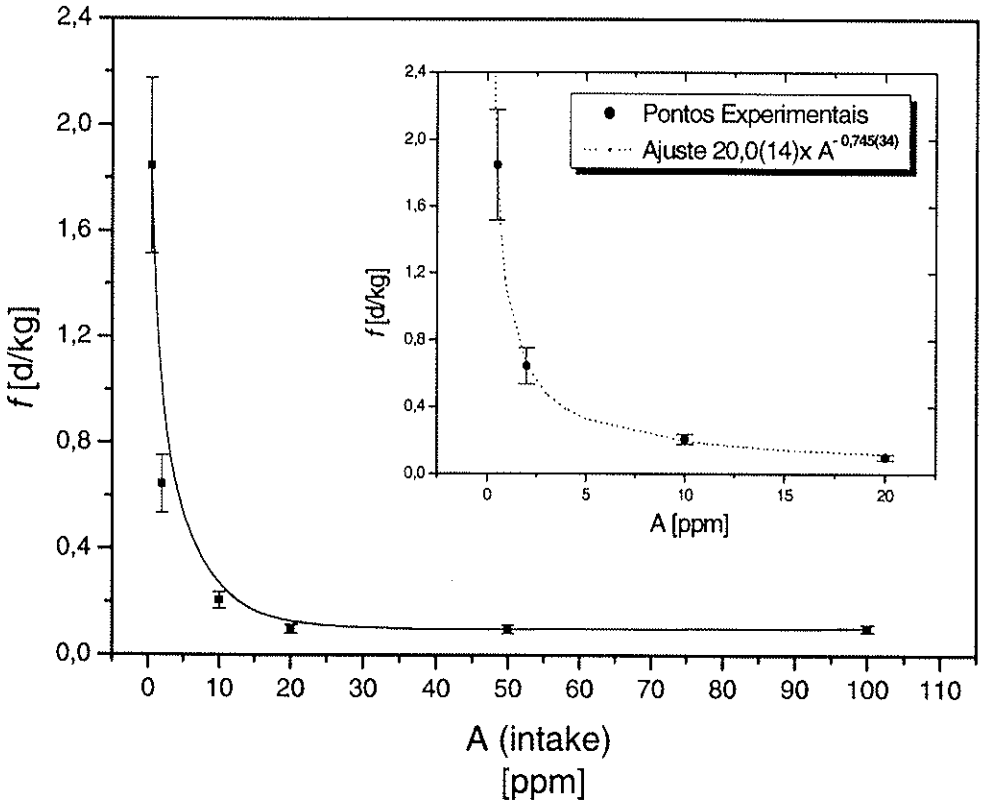


Figura 4.2 Comportamento do coeficiente de transferência em osso. A curva é apenas para guiar os olhos, mas no "insert" a curva é resultado de ajuste.

A tendência à saturação é claramente mostrada na figura 4.2 para A< 20 ppm, onde o coeficiente de transferência decresce com o aumento de A. De fato, uma vez que $f = C/A$, aumentos em A levando a pequenos aumentos em C na saturação, resultam em f decrescente com A.

Portanto, se propõe para C uma função hiperbólica, da forma $C=aA^b$, conforme discutido acima, onde A é o intake expressado em µg-U/d e a e b são parâmetros a ajustar.

Assim, $f = C/A = a\,A^{b-1}$.

Do ajuste dessa expressão aos pontos experimentais mostrados no gráfico inserido na figura 4.2 obtivemos ***a=20,0(14) d/kg*** e ***b-1= -0,745(34)***, com um χ^2_{red}= 0,27 e uma probabilidade de 76,4%.

Agora, observemos os seguintes dados reportados em [4]. Os autores, tentando determinar a quantidade de U presente na água potável consumida por três grupos populacionais nos Estados Unidos, acharam quantidades que excedem 8, 15 e 30 μg-U/l para cada grupo, respectivamente. Supondo um consumo de água de 1,5 l/d no inverno e 3 l/d no verão, teremos uma ingestão média de 12; 22,5; e 45 μg-U/d no inverno, ou de 24, 45 e 90 μg-U/d no verão, respectivamente.

Do mesmo modo, um levantamento feito na antiga URSS [4] reportou um conteúdo de urânio na água de até 212 μg-U/l, gerando taxas de ingestão diária de urânio de 318 e 636 μg-U/d, no inverno e no verão, respectivamente.

Usando a função ajustada, notamos que para um intake diário de 12 μg-U/d, a fração diária em equilíbrio com essa taxa de ingestão constante incorporada por kg de osso (f) é 3,13 d/kg; isso implica um uptake no osso de 37,5 μg-U por kg de peso úmido. No caso de 45 μg-U/d, o coeficiente de transferência será 1,17 d/kg obtendo-se um uptake de 53 μg-U/kg-úmido de osso. A discussão do ponto de vista radiobiológico é apresentada abaixo.

A figura 4.1 então mostra que a acumulação é mais efetiva para baixas concentrações de U no alimento do que para altas, fato este melhor observado no coeficiente de transferência.

O coeficiente de transferência corresponde a uma medida da eficiência de acumulação de U por um determinado órgão. Usando o último exemplo

discutido acima, em que f=1,17 d/kg, verificamos que para cada μg de U ingerido por dia, acumula-se 1,17 μg-U por kg de órgão. Para baixas doses observa-se que para a mesma ingestão unitária (1 μg-U/d) muito mais urânio acumula-se no órgão

IV. 1.D- Implicações radiobiológicas.

O significado radiobiológico das concentrações reportadas na tabela 4.1 pode ser avaliado pela relação da dose absorvida (D) no tecido com a fração de células que sobrevivem (S) (ver tabela 4.3).

Como o conteúdo de urânio no esqueleto foi determinado com base em concentrações médias, a estimativa das doses dependerá da atividade integral no alvo.

A dose média no tecido é definida por:

$$D = \frac{\int \varepsilon_R . q_a(t) dt}{m_T}, \qquad (4)$$

onde m_T é a massa do órgão analisado,

ε_R é a energia transferida por cada partícula α ao tecido, e

$$q_a(t) = \frac{dN}{dt} = \lambda_\alpha \cdot N_A, \qquad (5)$$

sendo λ_α a constante de decaimento das partículas α, e

N_A o número de nuclídeos radioativos no órgão alvo.

Para o ^{238}U a atividade integrada no tempo será:

$$q_a(t) = \frac{m_U}{238} \lambda_{U^{238}} \cdot N_0, \qquad (6)$$

Resultando que a atividade equivalente de 1μg-^{238}U é igual a 0,012Bq.

Supondo que uma célula estrutural típica é um cilindro de aproximadamente 60 μm de altura, 35 μm de diâmetro e densidade 1 g/cm^3, e

que uma partícula alfa de energia média entre 4 e 5 MeV pode deixar sua energia em 4 células estruturais, obtemos que $\Delta m_T=2,6.10^{-7}$ g, sendo Δm_T a fração da massa do alvo que absorveu a energia de uma partícula alfa.

Seguindo tais considerações foram calculadas as taxas de doses que são mostradas na tabela a seguir:

Tabela 4.3. Estimativas para as doses absorvidas em osso de ratos.

U dosagem [ppm]	Dose absorvida [Gy/d]	S
0,5	1,3	0,74
2	1,9	0,40
10	2,4	0,25
20	2,7	0,18
50	8,9	0,0004
100	17,1	$1x10^{-7}$

Para se ter uma idéia do significado dessas taxas de doses, comparamos com alguns resultados para dose aguda da literatura, [6,7]. Nessas referências se reportam taxas de doses críticas para humanos entre 0,5-1 Gy/d, que são suficientes para que a taxa de morte celular na linha eritropoiética da medula óssea não seja compensada pela taxa de nascimento celular.

Na realidade, o tecido ósseo está composto por duas populações de células proliferativas ou indiferenciadas, tais como as hematopoiéticas ou "stem cells", e as progenitoras do osso (osteoblastos).

Experimentalmente, como resultado de irradiações ***in vitro*** ou ***in vivo***, é possível obter curvas de Sobrevida-Dose, mas também podem se obtidas teoricamente supondo que existem zonas sensíveis ("alvos") onde incide a radiação, para que a célula morra ou perca sua função. Dessa forma, são descritos na literatura [8] diferentes modelos teóricos. O mais simples deles é o

exponencial, segundo o qual a fração do número de células que sobrevivem é dada por $S(D) = e^{-kD}$, onde $k = 1/D_0$ e D_0 é a dose necessária para reduzir a sobrevida de um fator 1/e , (37%). Como uma população de células pode estar composta por duas ou mais sub-populações, cada uma se ajustaria a uma exponencial. Então,

$S(D) = ae^{-kaD} + be^{-kbD} + ...$, onde ***a*** e ***b*** são as proporções das respectivas sub-populações no sistema objeto de estudo.

Portanto, supondo que todas as células são do mesmo tipo, e que a taxa de dose crítica D_0=1 Gy/d [6], obtém-se os valores de S reportados na tabela acima. Notem que, considerando uma taxa de dose de 1 Gy/d, ainda se está subestimando o dano, porque não se levou em conta a maior radiosensibilidade de algumas células ("stem cells"), por outro lado estamos considerando que o conteúdo de urânio no osso longo é o mesmo que o conteúdo de urânio na medula e em outros tipos de ossos.

De qualquer forma, os resultados apresentados apontam para o fato de que uma fração não desprezível da dose está sendo absorvida por células com funções primordiais no tecido, o que se traduz num dano radiológico apreciável (observar S). Este fato confirma a importância que tem a absorção de baixas taxas de doses.

IV.2 CÃES .

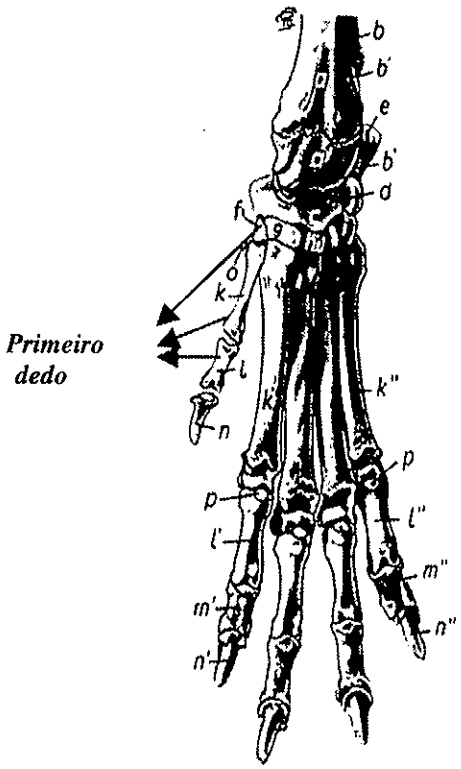
IV.2.A- Macrodistribuição de Urânio em diferentes tipos de ossos.

O experimento com cães atinge outros objetivos que são complementares àqueles obtidos com ratos, como por exemplo, saber em que partes do esqueleto o urânio se acumula, se a medula está realmente protegida, e como seria a componente temporal da deposição de urânio após um período de administração longo, cobrindo a etapa de crescimento do animal.

Cães Beagles são animais apropriados para experiências como estas, porque possuem características anatômicas e fisiológicas similares aos humanos [8].

Mas um experimento com Beagles é uma experiência cara. Portanto, obter uma dependência temporal de urânio no esqueleto (ver figura 4.6) requer geralmente o sacrifício dos animais. Para evitar isto, e mesmo assim conseguir um efeito diferenciado no tempo sem que a ação levasse ao sofrimento do animal em alguma etapa, foi preciso tirar por incisão cirúrgica o primeiro dedo das patas dianteiras de cada cão (dedo ergot) em diferentes instantes de tempo (ver figura 4.4).

Figura 4.4. Identificação da amostra.

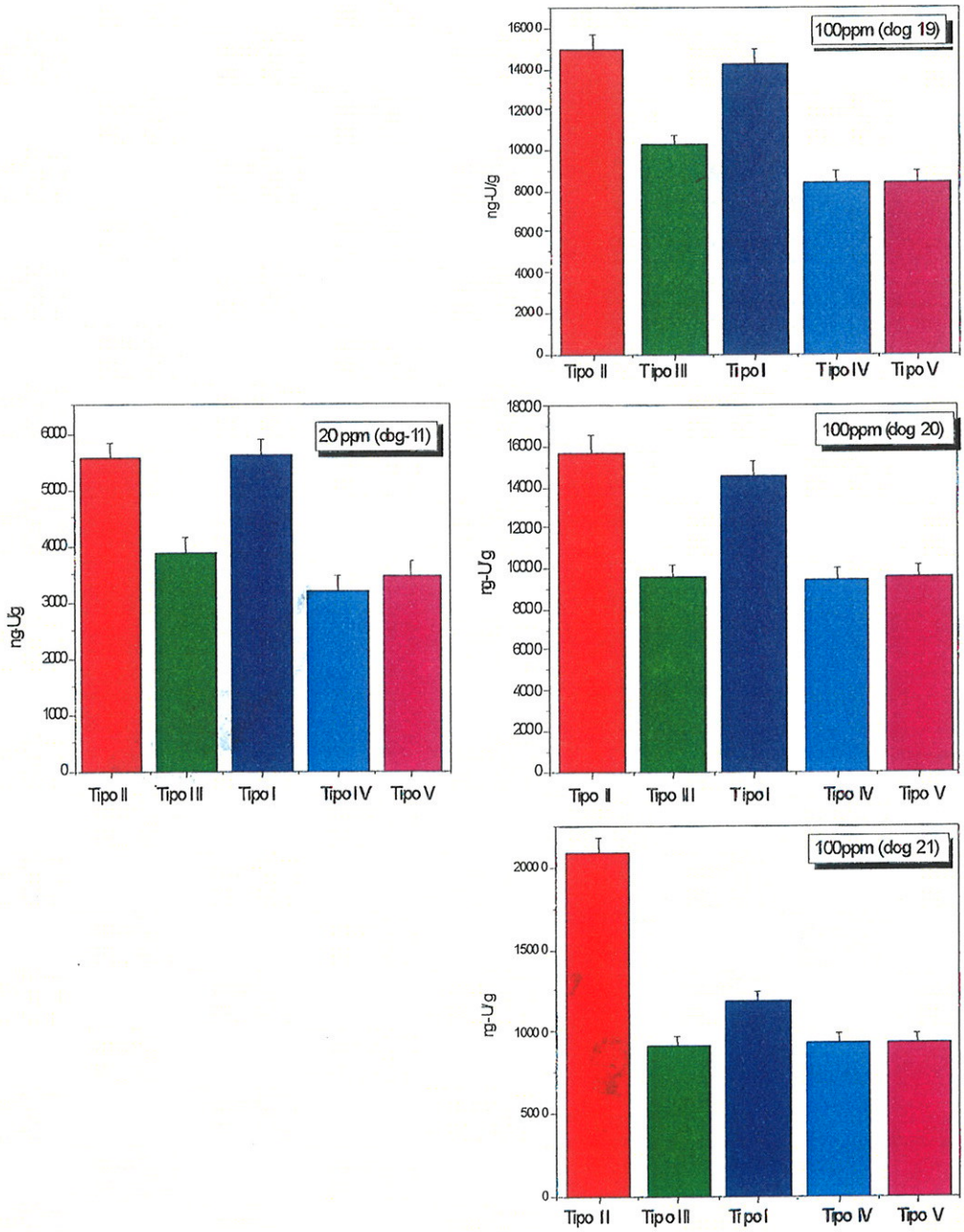


O fato de que essa terminação óssea seja representativa do tecido, foi constatado pela análise comparativa com amostras de: cabeça de fêmur + parte inferior desse osso (**amostras tipo I**), vértebras (**amostras tipo II**), medula óssea (**amostras tipo III**), córtex femoral ou parte calcificada do fêmur

(**amostras tipo IV**) e metacarpo + falanges (**amostras tipo V**), identificadas no capítulo III.

Este tipo de distribuição se conhece na literatura como "macrodistribuição". Para cumprir com este objetivo foram então irradiadas um total de 78 amostras. Os resultados obtidos aparecem graficados na figura **4.5**. Cada barra identifica o resultado da média de três replicas que caracterizam uma mesma amostra e o erro está dado pelo desvio padrão externo.

Figura 4.5- Macrodistribuicao de urânio em diferentes tipos de amostras de ossos.



A figura 4.5 exibe uma distribuição não homogênea para diferentes partes do osso. A cabeça do fêmur concentra aproximadamente a mesma quantidade de urânio que as vértebras. Em compensação, os conteúdos de urânio nos ossos longos (amostras tipo IV e tipo V) representam 2/3 do conteúdo encontrado nas vértebras para os cães de 100 e 20 ppm, exceto para o cão 21 onde o conteúdo de U na parte calcificada do osso longo é ½ do encontrado na vértebra. Neste sentido é importante destacar que no experimento foi controlada a massa de U que ingeria o animal diariamente, mas não a concentração de U no alimento.

Por outro lado, se verifica que não existem discrepâncias substanciais na avaliação do conteúdo de urânio em superfícies de ossos (parte cortical do osso) usando o primeiro dedo como amostra representativa. As quantidades determinadas nesse tipo de amostras são equivalentes aos conteúdos achados nas amostras tipo IV e V, desde que estes sejam ossos longos.

IV.2.B Dependência temporal de urânio em ossos de cães em crescimento.

Na figura 4.6 mostra-se a concentração de urânio em ossos de Beagles em função do tempo de duração do experimento. Aqui t=0 corresponde a uma idade de 3 meses dos cães. Os dados para os tempos t=82 e 180 dias foram obtidos usando os dedos ergots, enquanto que dados para t=279 dias correspondem a amostras que caracterizam a superfície calcificada do fêmur (amostras tipo IV), obtidas após a necropsia. Todos os resultados obtidos com os animais do grupo de controle foram compatíveis com concentrações de urânio iguais a zero (o limite de detecção corresponde a poucos ng-U/g).

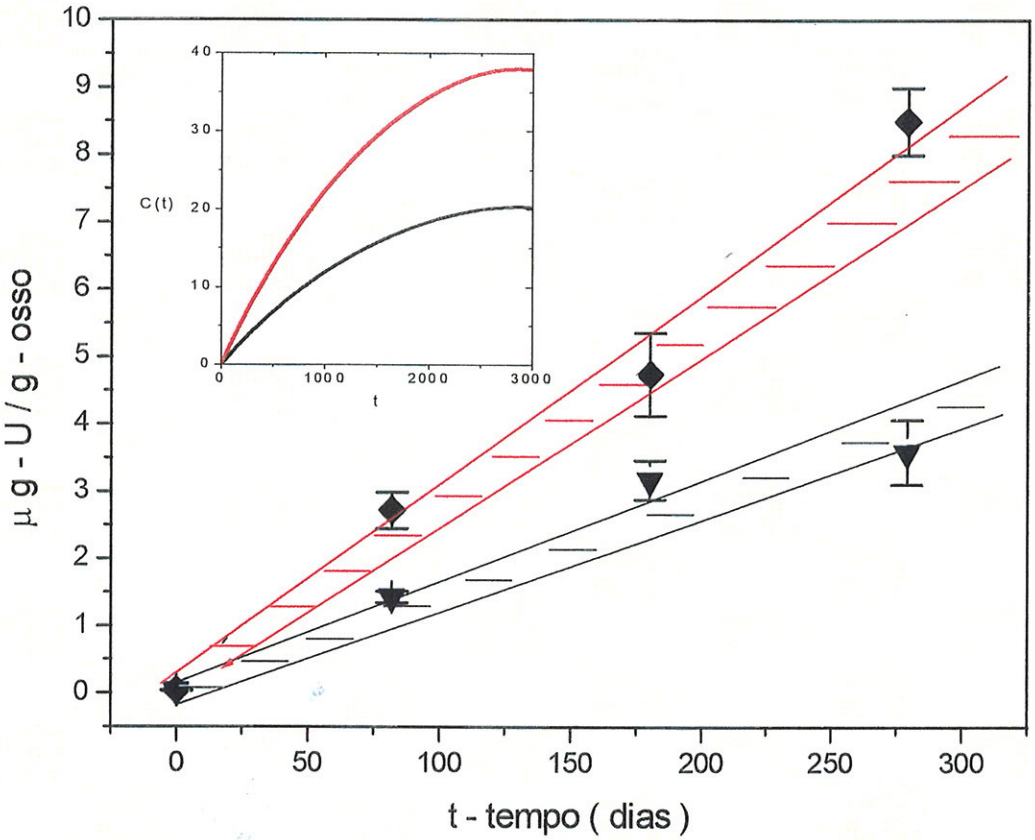
Os resultados referentes ás amostras da parte cortical do fêmur e amostras de metacarpo e falanges, para os três cães alimentados com 100 ppm de urânio, se consideram compatíveis. As pequenas diferenças

observadas são devidas às flutuações metabólicas; por isso, considerou-se favorável trabalhar com a média desses dados.

Tabela 4.6 Quantidade de urânio acumulado, por g de cinza de osso.

Tempo [dias]	Grupo de 20 ppm μg-U/g	Grupo de 100 ppm μg-U/g
0	0,038(13)	0,038(13)
82	1,42(16)	2,72(27)
180	3,17(29)	4,74(62)
279	3,58(48)	8,50(50)

Figura 4.6. Dependência temporal da acumulação de U em ossos de cães em crescimento.



IV.2.C Biocinética e processos de acumulação a longo prazo

A ausência na literatura de estimativas biocinéticas referentes à ingestão crônica de U motivou-nos desenvolver um modelo biocinético ***ad-hoc***, tendo como ponto de partida a equação de retenção óssea do U em Beagles proposta por Stevens et al. [9]. Essa equação pode ser escrita como:

$$R(t) = f\ D_0\ e^{-\lambda t}, \qquad (7)$$

onde $R(t)$ é a concentração do radionuclídeo no fêmur (µg-U/g), D_0 é a dose única (injetada, ingerida ou inalada), f é a fração de D_0 acumulada no fêmur diariamente, e λ é a constante de depuração biológica do radionuclídeo. Aqui, λ^{-1} é a vida média biológica.

Stevens et al. [9] determinaram $\lambda^{-1} \approx 1800$ dias para ^{233}U hexavalente em fêmur de Beagle, depois de terem administrado uma injeção de ~100 kBq-^{233}U/kg, que corresponde a ~0,25 ppm -^{233}U. È conveniente notar que a atividade alfa do ^{233}U é quatro ordens de grandeza maior do que a do ^{238}U.

Nosso modelo biocinético considera que:

a) C_n representa a concentração do radionuclídeo (µg-U/g) no fêmur, onde o tempo de desenvolvimento da experiência foi parametrizado como $t = n\delta$, com $n = 0,1,2,...$, e δ é o intervalo de tempo entre duas doses ($\delta = 1$ dia, neste caso),

b) $f\ D_0$ é uma constante ao longo de todo o período experimental.

A partir destas considerações e levando em conta a equação 6, pode estabelecer-se o seguinte sistema de equações

$$
\begin{aligned}
C_0 &= f D_0 \\
C_1 &= f\ D_0 e^{-\lambda\delta} + f\ D_0 \\
C_2 &= f\ D_0 e^{-2\lambda\delta} + f\ D_0 e^{-\lambda\delta} + f\ D_0 \\
&. \\
&. \\
&. \\
C_n &= f\ D_0 \sum_{i=0}^{n} e^{-i\delta\lambda} \quad .
\end{aligned}
\tag{8}
$$

A idéia central desta aproximação é simples: a concentração do radionuclídeo no órgão , C_n, para o tempo $t = n\delta$, é igual à fração da dose diária $f \cdot D_0$ mais a concentração para o tempo $t = (n-1)\delta$, C_{n-1}, multiplicada pelo fator de depuração $e^{-\lambda\delta}$ (ver eqn.6), ou seja, $C_n = C_{n-1}e^{-\lambda\delta} + f\,D_0$. O que significa que incorporação crônica está sendo tratada como a suma de n eventos discretos de ingestão aguda de urânio.

Expandindo-se $e^{-i\delta\lambda}$ obtém-se da eqn. 7:

$$C_n = f \cdot D_0 + f \cdot D_0 \sum_{i=1}^{n} \left(1 - i\lambda\delta + \frac{i^2\lambda^2\delta^2}{2} - \frac{i^3\lambda^3\delta^3}{6} + \ldots \right). \qquad (9)$$

Mas, $\sum_{i=1}^{n} i = \frac{1}{2}n(n+1)$ e $\sum_{i=1}^{n} i^2 = \frac{n(n+1)(2n+1)}{6}$; portanto,

$$C_n = (n+1) f \cdot D_0 \left(1 - \frac{n\lambda\delta}{2} + \frac{\lambda^2\delta^2 n(2n+1)}{12} - \ldots \right). \qquad (10)$$

A aproximação estabelecida considera $f \cdot D_0$ igual a uma constante, embora variações substanciais de f possam ocorrer quando o animal ainda é jovem.

As bandas mostradas na figura 4.6 foram obtidas a partir da eqn. 9 usando $\lambda^{-1} = 1795$ dias, como obteve Stevens et al. [9]. Neste caso, como $t_{max} \approx 280$ d, podem ser usados somente termos de primeira e segunda ordem da eqn. 8.

Usando $t = 82$ dias obteve-se diretamente o valor de $f \cdot D_0$, sendo igual a 0,016 µg-U/g e 0,029 µg-U/g para os grupos de 20 ppm e 100 ppm,

respectivamente. Este procedimento gerou incertezas entre 5 e 7%, representadas por bandas mostradas na figura 4.6. A concordância dos cálculos com os dados experimentais é muito boa.

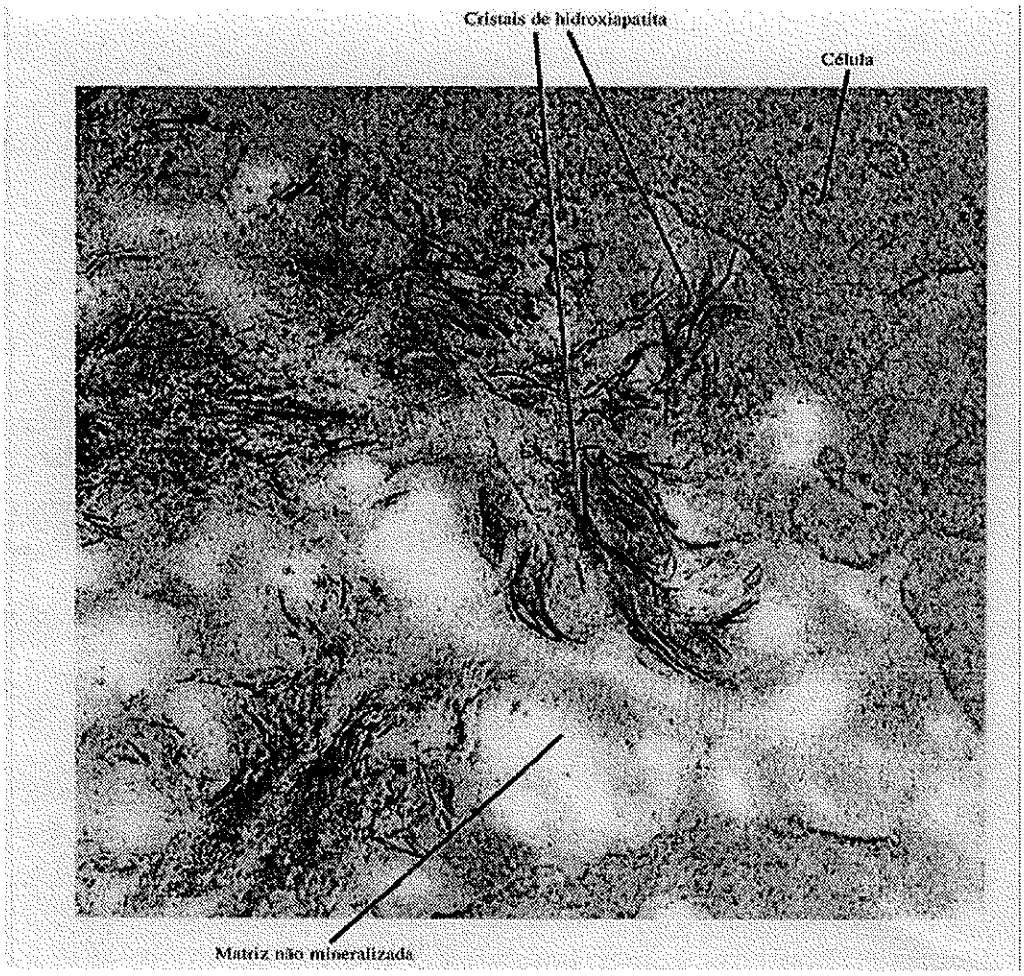
Devido à vida média longa de depuração ($\lambda^{-1} \approx 1800$ dias), a acumulação de U, $C(t)$, é linear até $t \approx 500$ dias, e a saturação é prevista pelo modelo para acontecer em t = 3000 dias (ver quadro inserido na figura 4.6).

IV.2.D- Microdistribução de urânio em secções correspondentes ao colo femoral de Beagles.

Os tecidos que constituem o esqueleto, apesar de sua aparência inerte, apresentam vitalidade e capacidade de neoformação ou remodelação. Isso significa que os tecidos mineralizados mantêm relação com as células que os formaram.

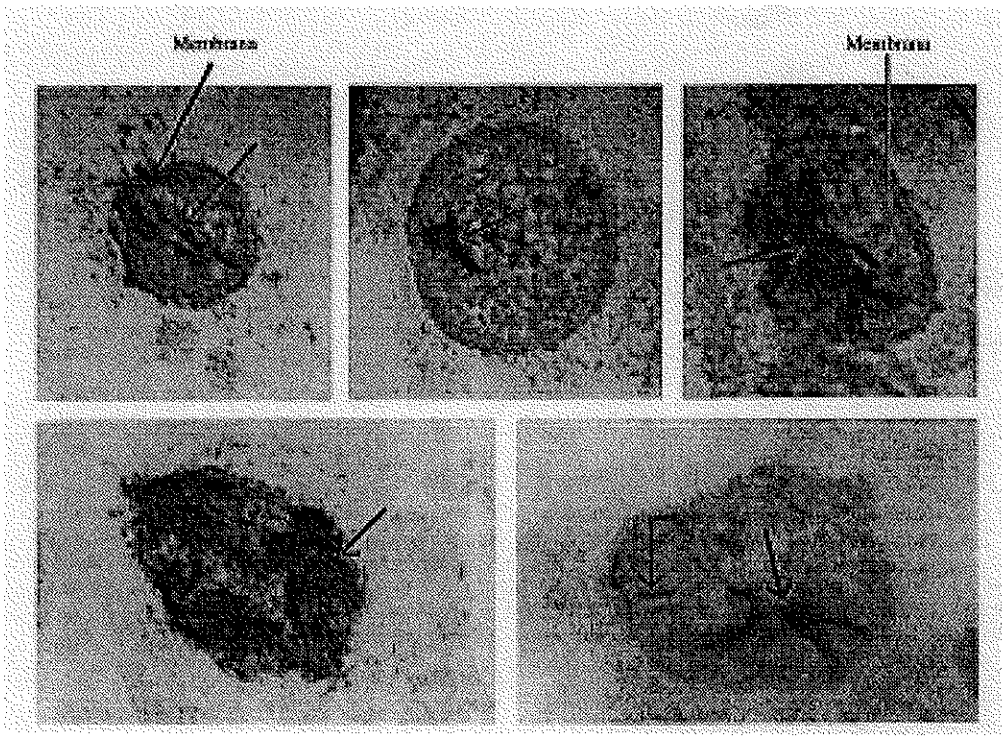
Revisando alguns conceitos de biomineralização podemos dizer que o processo de mineralização não consiste apenas na combinação dos íons cálcio e fosfato na matriz orgânica (colágeno fundamentalmente) sob a forma de fosfato de cálcio, ele é o resultado da interação de muitos fatores biológicos e físico-químicos que agiram estimulando ou inibindo esse processo altamente complexo.

Figura (a)- Corte do osso em formação, onde são indicados os cristais de hidroxiapatita na matriz não mineralizada.



Geralmente, os cristais de hidroxiapatita nos tecidos duros não têm estrutura perfeita, pois mostram consideráveis variações na sua composição, (possuem características de uma apatita deficiente em cálcio) embora sua fórmula básica seja $Ca_{10}(PO_4)_6OH_2$. Por isso alguns outros íons (carbonato, citrato, sódio, magnésio, potássio, cloreto e quantidades variáveis de flúor e outros elementos) são também associados à hidroxiapatita. Uma vista ao microscópio destes cristais (figura b) mostra que existem **fragmentos citoplasmáticos** (sítios de nucleação) contendo cristais de mineral na matriz orgânica da cartilagem em calcificação. Essas estruturas arredondadas estão envolvidas por uma membrana idêntica à membrana plasmática, e são denominadas ***vesículas de matriz***.

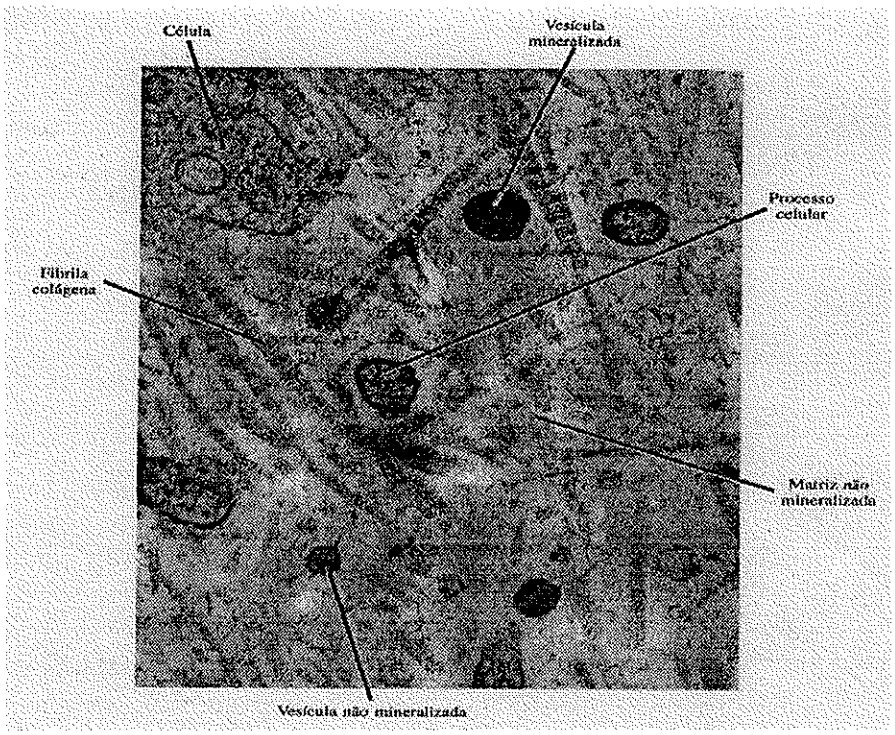
Figura (b)- Exemplos de vesículas, contendo quantidades variáveis de mineral (setas) que formam os cristais de hidroxiapatita.



Em partes do osso onde existe muita cartilagem, como é o caso da epífise (zona onde foi tomado o corte transversal do osso) as vesículas de matriz são detectadas facilmente.

INSTITUTO DE FÍSICA
Serviço de Biblioteca e Informação
Tombo: 3672 ex. 1

Figura (c) - Mostra as vesículas da matriz, onde primeiro são visualizados os cristais no processo de mineralização.



E o mais importante, essas vesículas de matriz se originam nas próprias células produtoras da matriz orgânica, isto é nos ***osteoblastos***, e ficam como estruturas independentes na matriz. Portanto, é de se esperar que a distribuição de qualquer outro mineral aconteça seguindo esta via, sempre que o osso seja imaturo.

A composição das vesículas da matriz inclui uma série de moléculas, muitas das quais têm relação com o processo de mineralização, como por exemplo, a fosfatase alcalina, que libera íons fosfatos e, como já foi dito podem intervir no processo de transporte de U ou de qualquer outro mineral. Portanto, é importante observar ao menos qualitativamente que aparência tem a distribuição do urânio num corte transversal do fêmur, onde existe muita cartilagem e onde se produz o crescimento do osso.

Usando um microscópio óptico com uma lente de 63x de aumento, foram lidas um total de oito laminas de Makrofol E para conformar a imagem correspondente a distribuição de urânio no colo femoral de 2 cães de 100 ppm, um cão de 20 ppm e de um dos cães de controle.

Cada lamina de Makrofol E foi lida na sua totalidade o que significa que foram barridas linhas de aproximadamente 60 campos na direção vertical e 120 campos na horizontal para alvos de 100 ppm, e de aproximadamente 60 x 60 campos para alvos de 20 ppm, onde cada campo tinha 0,18 mm de diâmetro.

As Figuras 4.7 e 4.8 exibem a topografia do urânio nesses cortes de fêmures correspondentes aos cães de 100 e 20 ppm respectivamente. Distribuições similares foram obtidas para um outro cão de 100 ppm

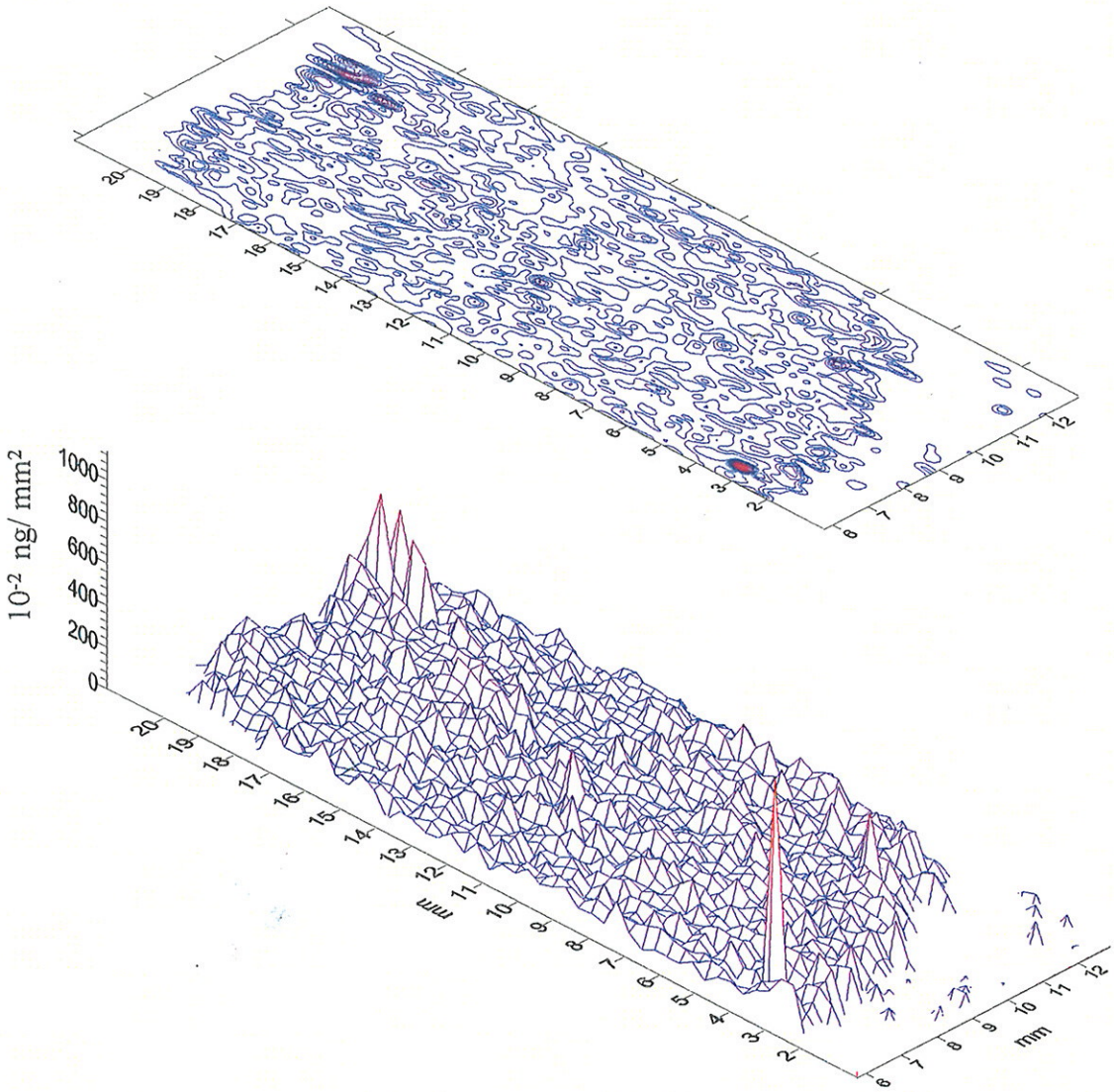


Figura 4.7- Topografia do Urânio: alvo correspondente a cão alimentado com 100 ppm.

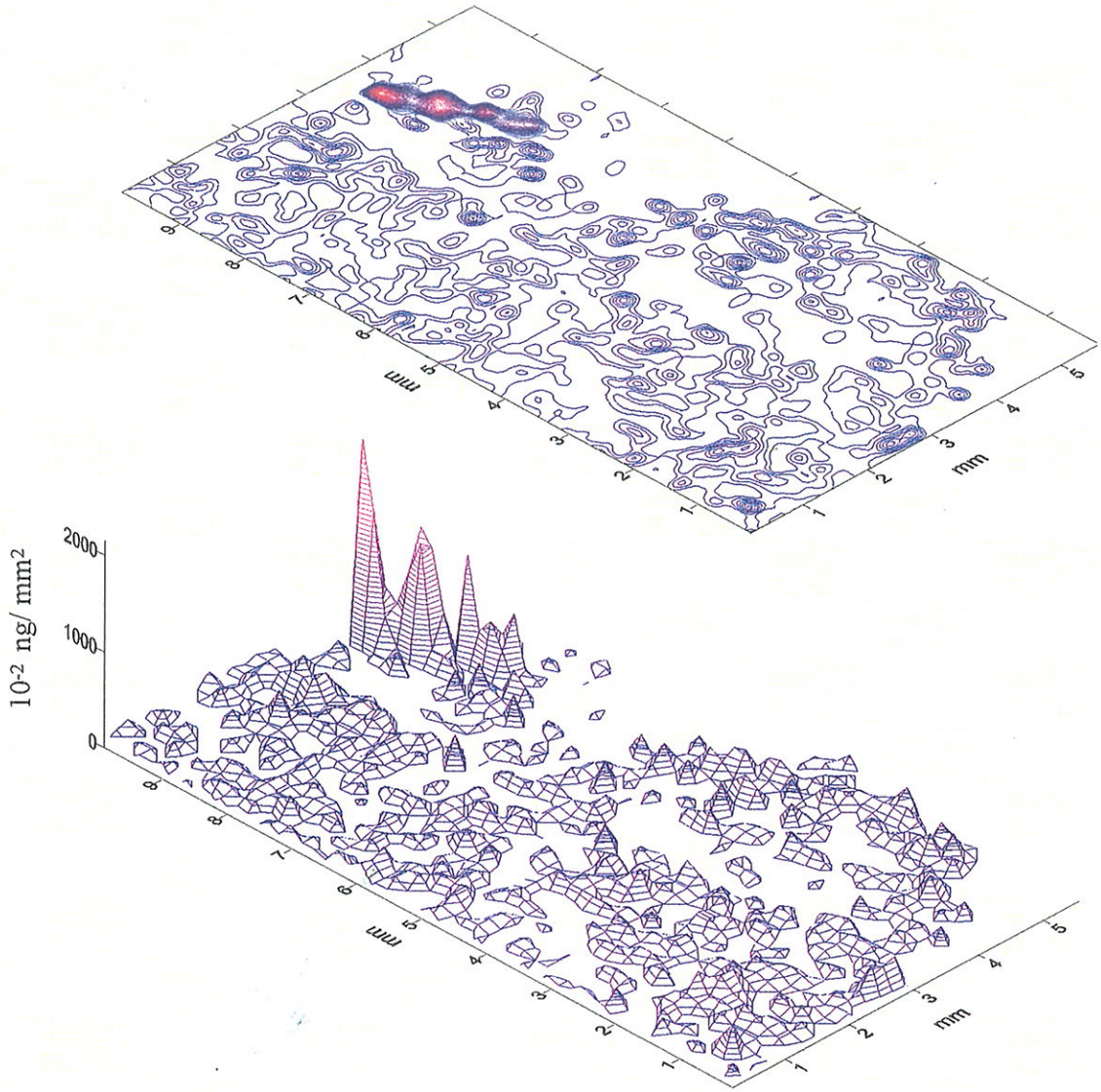


Figura 4.8- Topografia do Urânio: Alvo correspondente ao cão de 20 ppm

Dos resultados mostrados nas figuras 4.7 e 4.8 pode notar-se que a acumulação de urânio está igualmente distribuída em toda a secção transversal do fêmur, existindo alguns "hot spots" que aparecem aleatoriamente na região da medula perto do endósteo. O endósteo é a camada interna que envolve a cavidade medular do osso.

Entende-se aqui por "hot spots" todas aquelas localizações na amostra do colo femoral, em que o número de traços por unidade de área seja igual à média da distribuição mais 3σ (figura 4.9 (a) e (b)). Com esse critério adotado observamos que as concentrações de traço, caracterizando "hot spots", seriam iguais ou maiores do que 11 traços/campo e 20 traços/ campo, para os grupos de 20 e 100 ppm, respectivamente.

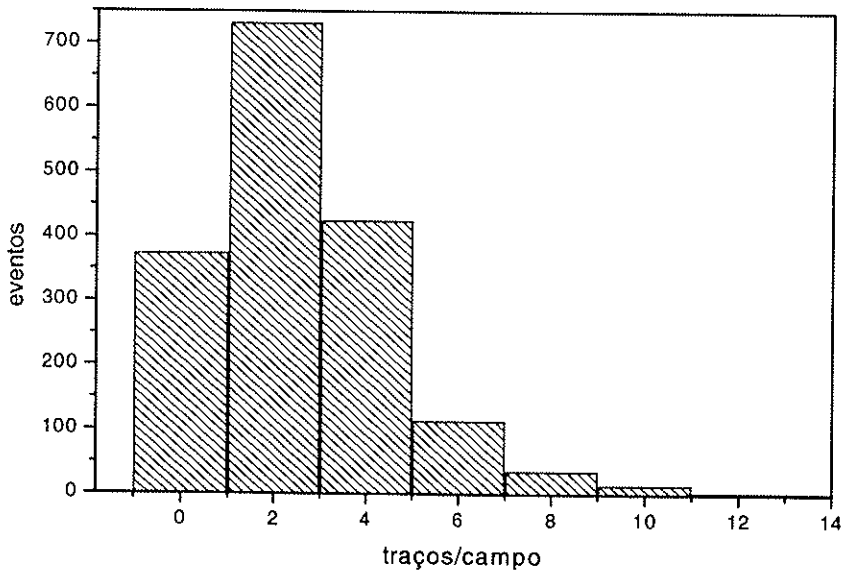


Figura 4.9 (a) Refere-se ao grupo de 20 ppm, com média da distribuição em 2,24 traços/campo (σ=2,91 e σ_m=0,07, para 1705 eventos).

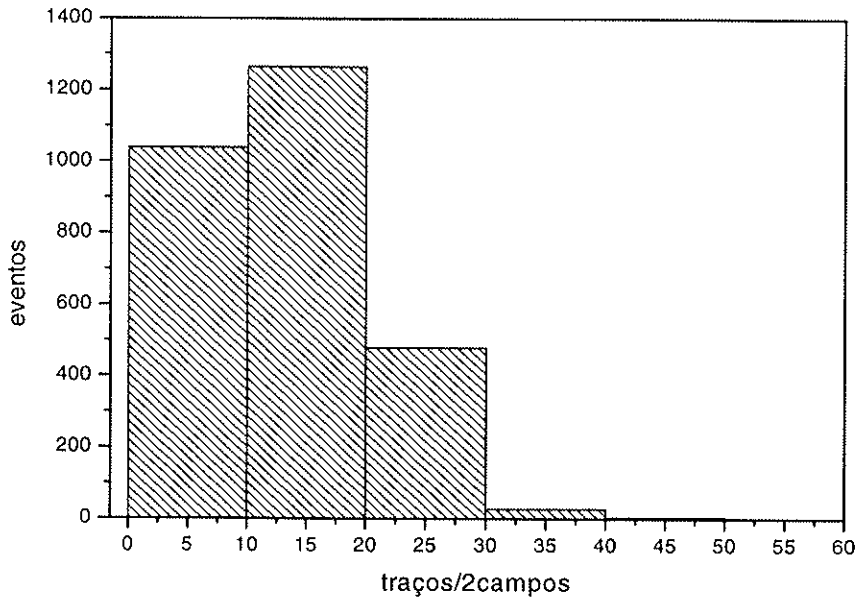


Figura 4.9 (b) Refere-se ao grupo de 100 ppm, com média da distribuição em 6,6 traços/campo (σ=4,4 e σ_m=0,08, para 2460 eventos).

Os resultados referentes à microdistribuição de urânio, lidos em traços/campo, são relativos ao controle. A normalização destes para µg-U/g foi obtida por comparação com os resultados das concentrações de fêmures medidas por AANI.

Observando os histogramas das figuras 4.9 (a) e 4.9 (b), nota-se que a densidade superficial média de traços que aparece no alvo mais um desvio padrão é igual a 5 traços/campo, para amostras correspondentes ao grupo de 20 ppm, e de 11 traços/campo para o grupo de 100 ppm. Considerando que a distância efetiva que pode percorrer um fragmento de fissão no osso para produzir traços no Makrofol é 40 µm, e que a densidade do tecido ósseo num animal adulto é 1,4 g/cm^3, a espessura efetiva do corte ósseo que produz traços (δ_{eff}) é 5,6.10^{-3} g-osso/cm^2. Este valor, multiplicado pela concentração média ($<C_{grupo}>$) de cada grupo, permite estimar quanto de urânio se tem em cada microlocalização do alvo.

Explícitamente:

$$\delta_{eff,f} <C_{20}>_{AAN}=<T_{20}> \ , \ \delta_{eff,f}.<C_{100}>_{AAN}=<T_{100}>,$$

onde $<C_{20}>_{AAN}$=3,42(14) µg-U/g-osso e $<C_{100}>_{AAN}$=8,50(50) µg-U/g-osso.

Para o alvo de 20 ppm, $\delta_{eff,f}.<C_{20}>_{AAN}$= 0,192µg-U/cm^2=2.10^{4}traços/cm^2.

Para o alvo de 100 ppm, $\delta_{eff,f}<C_{100}>_{AAN}$=0,476µg-U/cm^2=4,3.10^{4}traços/cm^2

Considerando então que um campo lido no Makrofol tem uma área de (2,54±0,04).10^{-4} cm^2, é determinado que 1 traço = 10^{-5}µg-U.

A figura 4.10 mostra linhas típicas de escaneamento, onde se destacam alguns "hot -spots" (elipses sombreadas).

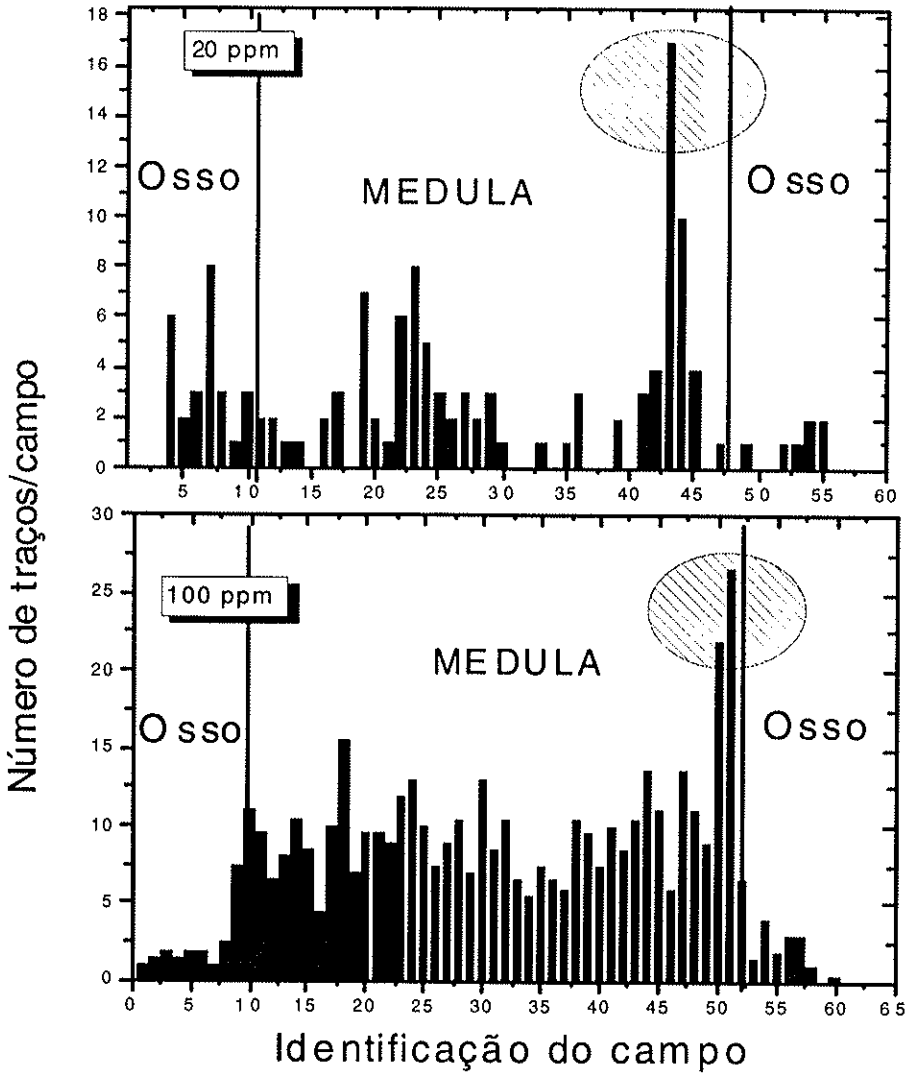


Figura 4.10. Distribuição de traços num alvo de Makrofol E de 20 e 100 ppm, correspondente a uma linha típica onde foram achados " hot spots".

O comprimento típico destas linhas corresponde à dimensão linear do corte do colo femoral, que contava com 50 ou 60 campos de escaneamento. Cada campo representa 0,18 mm de largura. Portanto, o diâmetro equivalente da secção considerada correspondente ao colo femoral destas amostras encontra-se entre 9 e 11 mm, com uma espessura aproximada de 1,5 mm para a parte calcificada do osso.

Uma explicação provável do fenômeno de empilhamento de U, que da origem aos "hot spots" seria: da mesma forma que o oxigênio livre oxida a uranila permitindo a formação de UO_2^{2+}, situação esta que facilita o transporte através de qualquer fluido corporal, cavidades ósseas que tenham pouco oxigênio livre permitiriam a sedimentação gradativa desses radicais (compondo sais de urânio), provocando o empilhamento.

Mesmo que isto não ocorra, o fato de se acumular U perto do endósteo é importante do ponto de vista radiológico, uma vez que grandes esforços são direcionados na avaliação da fração de energia absorvida pela medula quando esta é irradiada por radionuclídeos que tenham afinidade por osso ("bone-seeking").

IV. 2.E- Implicações radiobiológicas.

Considerando novamente o cilindro de ionização onde uma partícula alfa pode deixar sua energia (Δm_T), e calculando a dose absorvida devido ao urânio localizado nesses interstícios, como resultado de uma incorporação de 279 dias (ver figura 4.11) podemos observar que um "hot spot" com 0,01 μg-U/mm^2, localizado no endósteo de cães que comeram 100 ppm de urânio, transfere uma dose diária num mm^2 de 29 mGy/d, ou seja 11 Gy/a, no entorno desse "hot spot" . Já, no caso de 20 ppm, e por ser mais eficiente sua acumulação, a taxa de dose absorvida é então duas vezes maior (figura 4.12). Neste caso, vale a pena lembrar que a altura dos "hot spots" em 20 ppm é duas vezes maior àquela verificada no grupo de 100 ppm.

Figura 4.11. Curvas de isodose para o alvo de 100 ppm. A escala indica unidades em $Gy.a^{-1}mm^{-2}$.

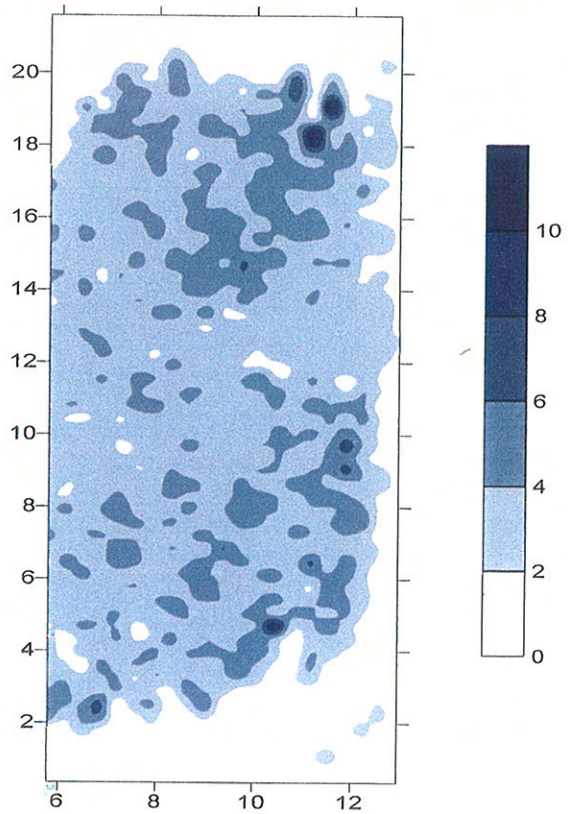
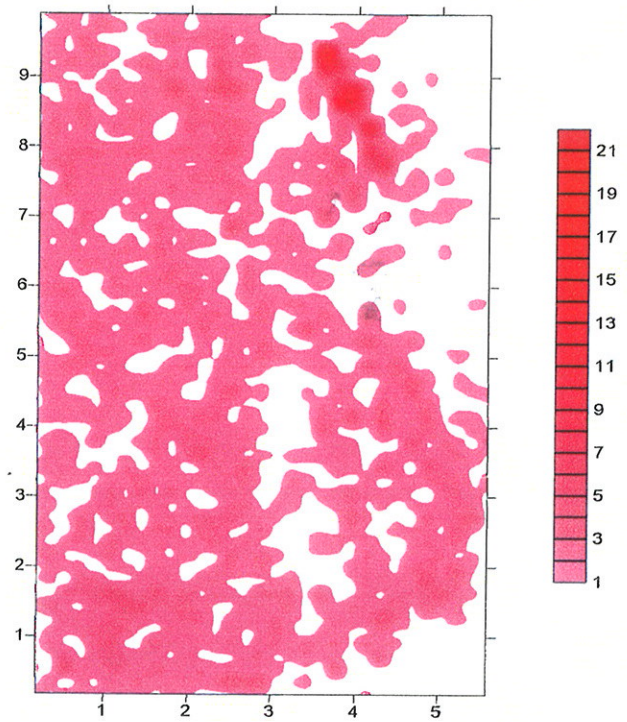


Figura 4.12. Curvas de isodose para o alvo de 20 ppm. A escala indica unidades em $Gy.a^{-1}mm^{-2}$.



Por outro lado observa-se que a distribuição média de dose no alvo de 100 ppm está na faixa de 2 - 4 Gy $a^{-1}mm^{-2}$ e de 1 – 3 Gy $a^{-1}mm^{-2}$ para o alvo de 20 ppm.

O risco de contrair osteosarcoma aumenta linearmente com a dose. Este tipo de malignância representa 5 % de todos os tipos de câncer em crianças, unicamente superados por leucemias, tumores em cérebro e linfomas. Por outro lado, é duas vezes mais comum em indivíduos do sexo masculino e tem se observado com doses inferiores a 10 Gy em animais [5]. Portanto, segundo nossos dados experimentais as doses liberadas nas células progenitoras do osso são intensas o suficiente para induzirem neoplasias em crianças submetidas à ingestão crônica de U (ou DU), após um prolongado período de exposição. Por exemplo, um sujeito ingerindo a pequena quantidade de 2 ppm-U por dia, após 3 anos acumularia uma dose superior a 6 Gy em células no entorno dos "hot spots".

É conveniente ressaltar que apesar de ter feito uma medida relativa, nossos cálculos de doses absorvidas podem considerar-se estimativas conservadoras, pois foram realizados levando em conta os resultados da concentração média de U em ossos longos (amostras Tipo IV, vide acima). Contudo, a concentração na cabeça do fêmur e cerca de 1,5 vezes maior.

Considerando então que:

a) O urânio se distribui ao longo da medula, onde se localizam as células hematopoiéticas e as células progenitoras do osso, estas últimas se encontram alinhadas no endósteo,

b) a acumulação de urânio no tecido ósseo é uma função que cresce abruptamente nos primeiros dois anos depois de iniciada a incorporação, ocorrendo a saturação em aproximadamente 8 anos (ver a figura inserida no gráfico 4.6),

c) a eficiência na acumulação de urânio no osso e na medula é maior para baixas doses. Um humano adulto ingerindo em média 1 mg de urânio por dia, pode chegar a acumular acima de 1 μg de urânio por g de medula após 5 anos, e que

d) os "hot spots" de urânio mostram intensidades similares na região do endósteo tanto para altas doses quanto para baixas,

é notável concluir que a medula de nenhuma forma esteja protegida da irradiação, em marcante contraste com o que é concluído nos trabalhos feitos a partir da incorporação aguda de soluções de nitrato de uranila **[10]**.

IV.2.F- Resultados das análises clínicas.

Os resultados das análises clínicas e exames histopatológicos no caso de cães foram feitos no Laboratório UNITOX da UNISA e revelaram que:

A urina coletada nos últimos três meses da experiência, dos cães pertencentes aos grupos de 100 ppm-U, ficou mais escura que aquela procedente do grupo de 20 ppm. Em concordância com isto, foi observada degeneração glomerular renal nos três cães de 100 ppm, lesão evidentemente associada ao tratamento com nitrato de uranila.

Não foram detectadas mudanças no comportamento dos animais, e seu desenvolvimento foi considerado normal.

REFERÊNCIAS

[1] Arruda Neto J.D.T. et al. (2002). *Uranium transfer to the bones of wistar rats: uptake, incorporation and absorbed doses.(U transfer to the bones of rats: uptake and doses).* Paper submitted to J. Appl. Radiat. Isot.

[2] Nogueira da Silva L.R. (1998). Estudo de programas de computação para analise de espectros de raios γ. Aplicação à Análises por Ativação de amostras geológicas. Dissertação de Mestrado. IPEN

[3] Programa ESPECTRO. Comunicação privada IPEN (1996)

[4] WHO (1998) World Health Organization. *Guidelines for drinking-water quality.* Addendum **a** e **b** to volume 1. Recommendations. WHO, Geneva, Switzerland.

[5] Rowland R. E. et al.(1978) *Dose-responsive relationships for female radium dial workers*, Radiat. Res., Vol. **76**: 368-383.

[6] Jablon S. et al. (1970). *Childhood cancer in relation to prenatal exposure to atomic - bomb radiation.* Lancet 2 (7681): 1000-1003.

[7] Stewart A.(1971). *Low dose radiation cancers in man.* Adv. Cancer Res. **14**: 359-390.

[8] Singh N. P. and Wrenn M. E. (1989). *Is the Beagle dog an appropriated experimental animal for extrapolating data to humans on organ distribution patterns of U, Th and Pu?.* Health Phys. **57**, 91-96.

[9] Stevens W. et al. (1980). *The distribution and retention of hexavalent ^{233}U in the Beagle.* Radiation Research. **83**, 109 –126.

[10] Austin, A.L. et al. (2000). *Microdistribution and localized dosimetry of the alpha-emitting radionuclides ^{239}Pu, ^{241}Am and ^{233}U in mouse femoral shaft.* Int. J. Radiat. Biol. **76**, 101-111 .

[11] Beddoe, A. H. et al, (1976). *Measurements of trabecular bone structure in man.* Phys. Med. Biol. **21** (4) 579-607.

CAPÍTULO V. Conclusões.

V.1- Acumulação óssea de U em função da dose ingerida em ratos.

1. A concentração de U no osso é crescente com a taxa de ingestão diária, tendendo à saturação para concentrações no alimento inferiores a 20 ppm (figura 4.2).

2. Lesões renais de origem toxicológica podem levar a mudanças do regime de acumulação. Em nosso caso, isso foi constatado pela mudança de tendência à saturação para um crescimento linear (figura 4.1).

3. A incorporação de urânio é muito mais eficiente em baixas doses. Isto leva à reconsideração de normas radiobiológicas.

4. Estabeleceu-se um limiar toxicológico na vizinhança de 20 ppm, para ingestão crônica de U em animais em crescimento.

V.2- Acumulação óssea de U em função do tempo (biocinética) para ingestão crônica.

1. A concentração de U nos ossos cresce linearmente com o tempo de vida do animal até a idade de 1,5 anos.

2. O modelo biocinético aqui proposto é validado pelos dados experimentais, e indica que a saturação ocorre a partir de 8 anos.

V.3- Microdistribuição de urânio em osso e medula.

1. A medula acumula tanto U quanto a parte calcificada, em grande contraste com o que ocorre em dose única.

2. A eficiência de incorporação do U aumenta de 100 para 20 ppm. Este fato também merece atenção do ponto de vista radiobiológico.

3. Aparecem "hot spots" que atingem células da medula óssea próximas do endósteo.

4. Em 20 ppm os "hot spots" são iguais ou mais altos do que os observados para 100 ppm,.

V.4- Microdoses e avaliação de riscos radiobiológicos.

1. As doses liberadas nas células progenitoras do osso são intensas o suficiente para induzirem neoplasias, após um prolongado período de exposição.

2. Indivíduos de populações que vivem em regiões contaminadas com urânio empobrecido (DU) enquadram-se na categoria de ingestão crônica e, portanto, estão sujeitos aos mesmos riscos radiobiológicos aqui deduzidos para ratos e cães.

ANEXO A. Método de AANI, usando estandardização relativa.

A depuração e refinamento de qualquer técnica analítica dependem da necessidade que se tenha em conhecer partes cada vez menores de algum elemento de interesse, isto é, do limite de detecção associado à técnica, da rapidez da análise, e da exatidão dos resultados.

Nestes princípios, foram desenvolvidas metodologias de análise que atualmente são muitas e variadas. Porém, com o aumento das densidades de fluxo neutrônico e o desenvolvimento de sistemas de detecção que usam semicondutores, unido a técnicas de automatização, a Análise por Ativação Neutrônica Instrumental (AANI) ganhou preferência como técnica analítica não destrutiva.

Para estes fins, o uso de reatores nucleares possui características muito atrativas.

O espectro de nêutrons em reatores nucleares moderados por água (como no reator do IPEN), pode ser dividido em três componentes básicas:

- Nêutrons sub-cádmicos ou térmicos, cuja energia mais provável é 0,025 eV, (à temperatura de 20,44°C).
- Nêutrons epitérmicos com energias na faixa da energia de corte do cádmio (0,55 eV para 1 mm de espessura de um cilindro de Cd, num fluxo isotrópico de nêutrons) até aproximadamente 1MeV e,
- Nêutrons rápidos com energias superiores a 1MeV.

Essas componentes são caracterizadas por suas respectivas densidades de fluxo de nêutrons, ϕ_{th} , ϕ_e e ϕ_r ($cm^{-2}\ s^{-1}$).

Portanto, a detecção de grande número de elementos é favorecida por altas secções de choque e altas taxas de fluência para nêutrons térmicos, e finalmente, porque esses nêutrons são produzidos em fluxos relativamente

homogêneos, sem interferir nas principais atividades desenvolvidas por um reator nuclear de pesquisa.

Assim, dependendo do nuclídeo irradiado, as reações nucleares induzidas por nêutrons térmicos com maior probabilidade de ocorrer são:

- (n,γ) com secções de choque entre 0,1 e milhares barn, que são muito vantajosas para a determinação de elementos traços pela alta sensibilidade na maioria dos radionuclídeos, exceto para alguns poucos elementos leves. Este tipo de reação é a mais importante na AANI
- (n,f)

Contudo, reações induzidas por nêutrons rápidos tais como (n,p), (n,α) e (n,2n), mesmo que ocorram não serão tratadas.

A.1-Descrição do método AANI, usando reações (n,γ).

Consideremos que a seqüência de eventos, onde ocorre uma reação de captura do nêutron pelo núcleo alvo, para um dado elemento X de número de massa A, inicie-se quando o nêutron incidente interage com o núcleo numa colisão inelástica. A seqüência descrita pelo esquema a seguir, leva à formação de um núcleo composto em estado excitado,

$$^{A}X + ^{1}n \rightarrow ^{A+1}X + ^{0}\gamma \quad \text{ou} \quad ^{A}X(n,\gamma)^{A+1}X.$$

Durante essa desexcitação, o núcleo chega a uma configuração mais estável por meio da emissão de um ou mais raios gama prontos(γ_p), característicos para cada espécie de núcleo alvo.

Em muitos casos esta nova configuração produzirá um núcleo radioativo que irá decair por meio da emissão de partículas, seguidas de um ou mais raios gama de decaimento (γ_d), também característicos.

Dependendo da espécie radioativa em questão, esse decaimento poderá apresentar uma meia-vida de frações de segundo até centenas de anos.

Para que a análise se torne viável, a probabilidade de que aconteça a reação nuclear, medida através da secção de choque, a abundância isotópica do nuclídeo alvo, e a meia vida do radioisótopo formado como produto da reação, devem ser da ordem de grandeza do limite de detecção da técnica.

Desta forma, aproximadamente 70% dos elementos químicos possuem propriedades favoráveis para permitir sua determinação via ativação de nêutrons [6].

A.2-Formalismo do AANI.

Considerando reações induzidas por nêutrons térmicos e epitérmicos, temos que a taxa de reação por núcleo (***R***) pode ser escrita como:

$$R = \phi_o \sigma_o + \phi_e I_o \qquad \text{(A-1)}$$

onde, ϕ_o é a taxa de fluência convencional para nêutrons térmicos,

σ_o é a seção de choque de ativação para nêutrons com energias de 0,025 eV,

ϕ_e é a taxa de fluência de nêutrons epitérmicos, e

I_o é a integral de ressonância dos núcleos que seguem a lei 1/v, em que v é a velocidade mais provável dos neutros térmicos, 2200 m/s.

Quando a amostra é irradiada em todo o espectro do reator, a fração mássica (c_m) do elemento de interesse está dada pela equação:

$$c_m = \frac{M_a \left(\frac{N_p / t_c}{SDCW} \right)_a}{N_a \theta_a \gamma_a \left(G_{th,a} \phi_o \sigma_{o,a} + G_{e,a} \phi_e I_{o,a}(\alpha) \right) \varepsilon_{p,a} Y_a} \qquad \text{(A-2)}$$

onde M – massa molar,

N_A- número de Avogadro,

θ - abundância isotópica relativa do núcleo alvo,

γ - probabilidade de emissão do isótopo,

N_p- número total de contagens do pico de absorção total,

t_c –tempo de contagem,

W – massa da amostra,

G_{th} – fator de correção por autoblindagem para nêutrons térmicos,

G_e – fator de correção por autoblindagem para nêutrons epitérmicos,

α - grau de desvio da densidade de fluxo epitérmico da distribuição 1/E, (a saber, $1/E^{1+\alpha}$),

ε_p – eficiência de detecção para o pico de absorção total, incluindo a correção por atenuação gama.

Y_a – probabilidade de ocorrer separação (no caso em que antes da irradiação tenha-se feito separação radioquímica); no nosso caso este fator é 1.

S, D, C –são fatores de saturação, decaimento e contagem, dados como segue:

$S = (1-e^{-\lambda t_i})$,

$D = e^{-\lambda t_d}$

$C = (1-e^{-\lambda t_c})/\lambda t_c$, onde λ é a constante de decaimento ($\ln 2/T_{1/2}$) ,e t_i ,t_d e t_c são os tempos de irradiação, decaimento e contagem, respectivamente.

A equação A-2 é sempre válida se não acontecerem mudanças significativas no número de átomos do nuclídeo alvo durante a irradiação (no burn-up), e se a taxa de fluência permanecer constante durante toda a irradiação.

No caso em que a amostra seja irradiada com nêutrons epitérmicos (dentro da cápsula de cádmio de 1 mm de espessura), o método recebe o nome de AAN epitérmico (AANE), e a equação terá a forma:

$$c_m = \frac{M_a \left(\frac{N_p / t_c}{SDCW} \right)_{Cd}}{N_a \theta_a \gamma_a \left(G_{e,a} \phi_e I_{o,a}(\alpha) \right) F_{Cd,a} \varepsilon_{p,a} Y_a} \qquad \text{(A-3)}$$

onde F_{Cd} é o fator de transmissão do Cd para nêutrons epitérmicos.

A.3- Métodos de estandardização em AANI.

Para a determinação de c_m, três tipos de estandardizações podem ser usados:

- Estandardização Relativa, que utiliza elementos padrões sintéticos ou matrizes primárias de materiais de referência certificados (MRC) [1].
- Método do Comparador simples, a qual freqüentemente usa a estandardização K_0 [2,3].
- Estandardização Absoluta, também conhecida como paramétrica [4].

Neste trabalho é aplicada a Estandardização Relativa.

A.3.A- Método de estandardização relativa.

Neste método o padrão (indexado st), com massa conhecida ***w*** de um elemento dado, é coirradiado com a amostra de massa conhecida ***W***, e ambos são contados na mesma geometria de detecção.

Desde que $M_a=M_{st}$, $\theta_a = \theta_{st}$, $\gamma_a = \gamma_{st}$, $S_a = S_{st}$, $\sigma_{0,a} = \sigma_{0,st}$, $\varepsilon_a = \varepsilon_{st}$ e a atenuação gama na amostra e no padrão não sejam diferentes, $F_{att,a}=F_{att,st}=1$, onde F_{att} é o fator de atenuação ,são obtidas as seguintes expressões para AAN e AANE, respectivamente.

$$c_m = \frac{\left(\dfrac{N_p / t_c}{DCW}\right)_a}{\left(\dfrac{N_p / t_c}{DCw}\right)_{st}} \qquad \text{(A-4)}$$

$$c_m = \frac{\left[\left(\dfrac{N_p / t_c}{DCW}\right)_{Cd}\right]_a}{\left[\left(\dfrac{N_p / t_c}{DCw}\right)_{Cd}\right]_{st}} \qquad \text{(A-5)}$$

A suposição de que $F_{att,a}=F_{att,st}=1$ é válida usualmente para raios-γ com energias superiores a 100 KeV, fontes de pequenas dimensões e grandes distancias fonte-detector.

Com a estandardização relativa não é preciso supor que a taxa de fluência neutrônica seja constante durante a irradiação, e também não é preciso considerar qualquer alteração por queimado no número de átomos (no burn-up), visto que esta ocorre da mesma forma no padrão e na amostra, no caso de irradiação simultânea.

Reescrevendo a relação A-5 para um mesmo elemento da amostra e padrão, irradiados nas mesmas condições, obtém-se:

$$C_m = \frac{N_a w_{st}}{N_{st} W_a} . e^{[(t_a - t_{st})\lambda]} \frac{\left(1 - e^{-\lambda . t_c^{st}}\right)}{\left(1 - e^{-\lambda . t_c^{a}}\right)} \frac{\lambda . t_c^{a}}{\lambda . t_c^{st}} \qquad \text{(A-6)}$$

A.3.B-Avaliação de incertezas na AANI.

Seguindo cada passo individual do método, as fontes de incertezas podem se agrupar de acordo com duas categorias, discutidas amplamente por GRENBERG e colaboradores em [5].

1. Preparação da amostra e do comparador: nela podemos incluir os desvios na determinação da massa da amostra e do padrão, o desvio na pureza ou concentração inicial do padrão, e também correções por presença do analito na cápsula de irradiação.
2. Medição espectrométrica dos raios gama: estatística de contagem na atividade da amostra e do padrão, incerteza devida à geometria de contagem, tempo morto e tempo de decaimento, e duração da contagem.

REFERÊNCIAS.

[1] Kucera J., et al. (1995). *Elemental characterization of new polish and US Nist geological, environmental and biological reference materials by NAA and comments on the methodology of interlaboratory comparisons.* Chem. Annal. **40**(3) 405-421.

[2] DeCorte F. et al. (1989). *K0- Measurements and related nuclear data compilation for (N-Gama) reactor neutron Activation Analysis.* J. Radional. Nucl. Chemestry Articles, **133** (1), 3-41.

[3] Herrera E. (1995). Higth Institute of Nuclear Sciences and Technology, Havana, Cuba. Dissertação de doutorado.

[4] Kruger P. (1971). *Principles of Activation Analysis.* Jonh Wiley-Interscience, New York.

[5] Greenberg R. R, et al. (1995). 9th Conf. Modern Trends in Activation Analysis (**MTAA-9**), Seul, September 24-30.

[6] Gascock C. (1999). *Chipped stone artifacts, source areas, and provenance studies of the Northerlan Belize chert-bearing zone.* J. Arch. Sciences. **26** (4), 389-397.

ANEXO B. Técnica de registro de traços.

B.1-Descrição.

A técnica de registro de traços de fragmentos de fissão se baseia no fato de que partículas carregadas são capazes de produzir, em certos materiais sólidos, danos permanentes identificados como traços [1,2]. Após ampliação, conhecida como revelação ou ataque químico [3], esses traços podem ser contados através de microscópios ópticos comuns ou através de sistemas automáticos de contagens.

Por terem massas relativamente grandes, os fragmentos de fissão apresentam uma eficiência de 100% no registro de traços, em quase todos os materiais detectores sólidos. Neste caso, é oportuno assinalar que o Makrofol E, Makrofol KG e outros polímeros, têm preferência sob outros detectores quanto às determinações quantitativas de urânio, por não possuírem traços fossilizados e nem impurezas de outros elementos fissionáveis, tal como o Tório, simplificando assim as análises a serem feitas.

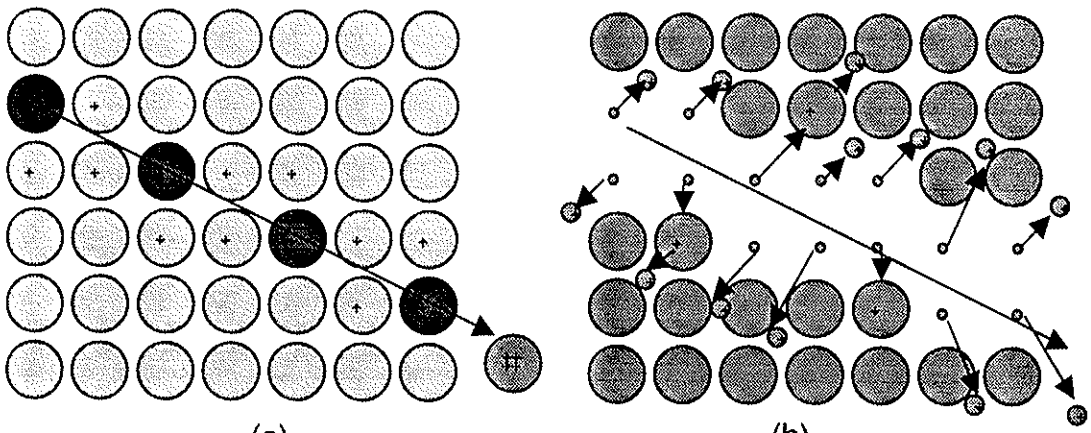
Vários outros fatores tornam os detectores de traços úteis para a pesquisa nos campos da ciência e da tecnologia. Entre eles estão:

1. Estabilidade dos traços sob condições ambientais extremas (temperatura, umidade, vibrações mecânicas, etc).
2. Alta sensibilidade, permitindo discriminar diferentes partículas.
3. Facilidade de manuseio e simplicidade das técnicas de contagem.
4. Capacidade de resistir a altos fluxos.
5. Baixo custo.

B.2-Mecanismo de formação de traços.

Fleischer e colaboradores [4] consideram que quando as partículas incidentes ionizam os átomos de um material detector, os íons formados se deslocam de suas posições normais em virtude da interação coulombiana

repulsiva entre eles, para posições intersticiais, produzindo vazios nas posições iniciais. Denominaram esse fenômeno "íon explosion".(figura 1).



(a) (b)

Ionização de átomos por uma partícula carregada

Repulsão coulombiana dos íons, separando-os de suas posições originais.

Figura 1. Mecanismo de formação de traços.

De acordo com esse modelo, a condição para que ocorram deslocamentos é a de que as forças coulombianas repulsivas (f) sejam superiores à força de ligação. Assim, materiais com tensão mecânica, constante dielétrica, e distância interatômica baixas, produzem traços mais facilmente que outros.

Desta forma, chega-se a que o quadrado do número médio de ionizações sofridas pelos átomos de um material detector (n^2) seja maior que o coeficiente de relaxação desse material (R), sendo este coeficiente em última instância uma medida da sensibilidade relativa dos materiais que produzem traços. Então,

$$R = \frac{Y\varepsilon.a^4}{10.e^2} = \frac{\sigma_m \varepsilon.a^4}{e^2} \quad , \qquad \text{(B-1)}$$

onde **Y** é o módulo de Young, ε é a constante dielétrica, a a distância interatômica , ***e*** é carga unitária dos elétrons e σ_m é tensão mecânica do material.

Ou seja, à medida que R diminui a sensibilidade aumenta.

Alguns valores do coeficiente de relaxação (R) para vários materiais detectores são apresentados na tabela 1.

Tabela 1. Valores do coeficiente de relaxação em ordem crescente de sensibilidade relativa.

Classe de detectores	**Grupo de detectores similares**	**R**
cristais	Quartzo, micas.	0,5
vidros	Sílica Sódio-Cálcio, Fosfato	0,7 0,5
plásticos	Makrofol E, Makrofol KG	0,01

Dependendo da natureza do material podem ocorrer recombinações dos íons formados, antes que ocorram os processos de deslocamentos, de modo a "apagar" os vestígios do traço através da recuperação de elétrons. Portanto, é preciso obedecer à condição adicional de que o número de elétrons atraídos pelos íons numa região determinada seja inferior ao número de íons formados nessa região. Tal condição pode ser expressa através da relação (B-2), que considera uma região cilíndrica de raio r, que envolve n_a íons ao longo da trajetória:

$$n_n a \pi r^2 < n_a \quad , \qquad \text{(B-2)}$$

onde n_a é o numero de íons formados e n_n é a densidade de elétrons nessa região.

Mas o tempo que levam esses elétrons em difundir-se na região cilíndrica definida, $t = r^2/D$, depende das características do meio material. D é o coeficiente de difusão dos elétrons no meio, que é função da mobilidade dos

elétrons (μ_m), da temperatura do meio (T), da constante de Boltzmann (K) e da carga unitária dos elétrons (e).

Assim, a densidade de elétrons nessa região pode ser expressa pela desigualdade:

$$n_n < \frac{en_a}{\pi a \mu_m KTt} \quad , \qquad \text{(B-3)}$$

que é obedecida apenas por alguns semicondutores e isolantes.

Um outro critério que determina se o traço é ou não observável num certo detector, é o de considerar a taxa crítica de perda de energia por unidade de comprimento $(dJ/dx)_c$ de íons primários e secundários nesse material, em função da energia da partícula incidente.

A perda de energia por unidade de comprimento devida a íons secundários é importante para materiais orgânicos como o Makrofol, já que nestes materiais podem quebrar-se ligações pela simples excitação dos átomos.

Quanto à evolução geométrica dos traços, pode-se dizer que o diâmetro médio dos traços de fragmentos de fissão em plásticos policarbonatados, (como o Makrofol E) não é superior a 25 μm, com valor médio entre 17 e 20 μm [6]. Por isso, é preciso ampliá-los para torná-los observáveis através de microscópios comuns. Isto é possível porque a região de dano é quimicamente mais reativa do que a região não danificada, ou seja, a velocidade de ataque ao longo da trajetória da partícula incidente (V_T) é maior do que a velocidade de ataque na direção normal à superfície não danificada do detector (V_G). A velocidade V_T é determinada pelo tipo de energia da partícula incidente e V_G pelo tipo, concentração e temperatura do reagente, para um dado material detector.

Neste sentido, admitindo-se que a região danificada seja homogênea, e que as velocidades de ataque não sejam afetadas pelos gradientes de

concentração devidos à difusão, tanto do reagente como dos produtos de ataque, a relação entre V_G e V_T é dada por:

$$\frac{V_G}{V_T} = \operatorname{sen}\theta = cte \ , \qquad \text{(B-4)}$$

onde θ é o ângulo de abertura do cone desenvolvido durante o processo de revelação dos traços.

Assim, o número de traços contados (N_T) em toda extensão da área de deposição, relaciona-se diretamente com o número total de fissões (N_f)ocorridas na amostra, da seguinte maneira,

$$N_T = kN_f \quad , \qquad \text{(B-5)}$$

onde *k* é a eficiência total de detecção, revelação e contagem.

REFERÊNCIAS.

[1] Price, P.B. and Walker, R.M. (1962). *Electron microscope observation of a radiation nucleated phase transformation in mica.* J.Appl.Phys., **33**(8), 2625-2628.

[2] Silk, E.C.H. and Barnes, R.S. (1959). *Examination of fission fragments tracks with and electron microscope.* Philos. Mag., **4**(44), 970-972.

[3] Price, P.B. and Walker, R.M. (1962).*Chemical etching of charged particle tracks in solids.* J. Appl. Phys. **33**(12), 3407-3412.

[4] Fleischer R.L, et al. (1965). *Ion explosion spike mechanism for formation of charged-particle tracks in solids.* J. Appl. Phys.,**36**(11), 3645-3652.

[5] Fleischer R. L., et al. (1964). *Track registration in various solid-state nuclear track detectors. Phys. Rev.*, **133**(5A),1443-1449.

[6] Endo, K. et.al. (1973). *Calibration of plastic nuclear track detectors for identification of heavy charged nuclei using fission fragments.* Nucl. Instrum. Meth. **111**, 29-37.

ANEXO C. Certificado da solução de Urânio usada para a preparação dos padrões para AANI.

ISO 9001

ASSURANCE™

CERTIFICATE OF ANALYSIS

Catalog Number: PLU2-2Y **Lot No. 5-80U**
Element and Matrix: U in HNO_3/H_2O

Starting Material: Uranium Oxide U_3O_8
Starting Material Lot No.: M1294U

Density: 1.0101 at 22.2°c

Trace Metallic Impurities in the Actual Solution via ICP Analysis:

Element	PPM	Element	PPM	Element	PPM
Ag	<0.001	Cr	<0.003	P	<0.03
Al	0.01	Cu	<0.001	Pb	0.002
As	<0.001	Fe	<0.05	Sb	<0.001
B	0.003	K	<0.05	Si	<0.3
Ba	<0.001	Li	<0.001	Sn	<0.001
Be	<0.001	Mg	0.02	Sr	0.001
Bi	<0.001	Mn	<0.001	Ti	<0.001
Ca	0.012	Mo	<0.001	Tl	<0.001
Cd	<0.001	Na	0.01	V	<0.001
Co	<0.001	Ni	<0.001	Zn	<0.02
				Zr	<0.001

Classical "Wet" Assay: 1,003 ppm.

Gravimetry: Evaporate to dryness, ignite and weigh as U_3O_8.

Instrumentation Analysis By Inductively Coupled Plasma [ICP] Spectrometer: 1,003 ppm via NIST SRM 3164.

Balances are calibrated with NIST weight sets NJ #92589 and #92550, according to NIST circular 547 3.4.3.

ASSURANCE reference standards are guaranteed stable and accurate to ± 0.5% of labeled concentration for one year from date of shipment. This value is the sum of cumulative errors associated with analytical determinations, pipetting and diluting to final volume. For these solutions we use high purity acids, 18 megohm double deionized water and triple rinsed bottles. All glassware used is class A.

N Kotsakota — Manufacturing Manager

OCT 9 6 ... — Date

SPEX CertiPrep

Printed on Recycled Paper

SPEX CERTIPREP, INC. 203 NORCROSS AVENUE METUCHEN, NJ 08840 908-549-7144 1-800-LAB-SPEX FAX: 908-603-9647