

**UNIVERSIDADE DE SOROCABA
PRÓ-REITORIA ACADÊMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

Antonio Ademar Poles Junior

**ESTUDO DA COMPOSIÇÃO QUÍMICA DA SALIVA DE FUMANTES E NÃO
FUMANTES UTILIZANDO A TÉCNICA DE FLUORESCÊNCIA DE RAIOS-X.**

Sorocaba/SP

2016

Antonio Ademar Poles Junior

ESTUDO DA COMPOSIÇÃO QUÍMICA DA SALIVA DE FUMANTES E NÃO FUMANTES UTILIZANDO A TÉCNICA DE FLUORESCÊNCIA DE RAIOS-X.

Dissertação apresentada à Banca Examinadora do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade de Sorocaba, como exigência parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Orientador: Prof. Dr. José Martins de Oliveira Junior

Sorocaba/SP

2016

Antonio Ademar Poles Junior

ESTUDO DA COMPOSIÇÃO QUÍMICA DA SALIVA DE FUMANTES E NÃO FUMANTES UTILIZANDO A TÉCNICA DE FLUORESCÊNCIA DE RAIOS-X.

Dissertação aprovada como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre no Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade de Sorocaba.

Aprovado em: ___/___/___

BANCA EXAMINADORA:

Prof. Dr. José Martins de Oliveira Junior
Universidade de Sorocaba

Profa. Dra. Valquiria Miwa Hanai Yoshida
Universidade de Sorocaba

Prof. Dr. Vitor Manuel Cardoso Figueiredo Balcão
Universidade de Sorocaba

Dedico este trabalho
à memória de meu pai, Ademar,
o qual foi o primeiro a me incentivar ao mestrado.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus, Senhor onipotente, onisciente e onipresente, por nunca me deixar esmaecer.

A minha família, que é a minha base, meu alicerce.

Aos amigos que conheci ao longo desses dois anos de estudos, práticas e imenso aprendizado, em especial, aos amigos da Prefeitura Municipal de Araçoiaba da Serra por toda ajuda e companheirismo.

Aos docentes do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Uniso por compartilhar o conhecimento e por sempre estarem tão receptivos.

E em especial ao meu orientador, Prof. José Martins, pela ajuda, direcionamento, compreensão, paciência, e acima de tudo, pela oportunidade.

Meu grande obrigado!

*“A menos que modifiquemos a nossa maneira de pensar,
não seremos capazes de resolver os problemas causados
pela forma como nos acostumamos a ver o mundo.”*

(Albert Einstein)

RESUMO

O cigarro é um sério problema de saúde pública. Segundo os dados da Organização Mundial da Saúde, estima-se que atualmente mais de 1,2 bilhões de pessoas em todo o mundo faça uso do tabaco e esse é responsável por aproximadamente 6 milhões de mortes a cada ano. Com a atenção voltada a isso, se faz necessário buscar meios preventivos e prognósticos de tentar reduzir esses números e alertar a população de um modo geral sobre o perigo e os malefícios do seu uso. Desta maneira, o objetivo do presente trabalho é avaliar e comparar a composição química da saliva coletada de indivíduos fumantes e não fumantes através da técnica de Fluorescência de Raios-X. A metodologia baseou-se na seleção de 32 indivíduos, sendo 16 indivíduos que faziam uso do cigarro diariamente e outros 16 que nunca fumaram. A saliva foi coletada com ajuda de uma pipeta de Pasteur descartável e as amostras encaminhadas ao Laboratório de Física Nuclear Aplicada da UNISO (LAFINAU), onde foram realizadas as análises. Os indivíduos que aceitaram participar da pesquisa, responderam um questionário para delimitar o perfil de inclusão e assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido (Parecer do CEP nº 831.753 de 09/10/2014). Os resultados, demonstraram que existem diferenças nas concentrações dos elementos químicos, quando comparamos o resultado das análises das amostras de salivas de fumantes e não fumantes. As maiores discrepâncias foram encontradas nas concentrações dos elementos químicos Enxofre, Fosforo, Cloro e Potássio e diferenças menores na concentração dos elementos Cálcio, Manganês, Ferro, Cobre, Titânio, Vanádio e Níquel. Os resultados indicam que o hábito de fumar, produz mudanças mais significativas na saliva das mulheres do que na dos homens, aumentando a concentração de alguns elementos na saliva das mulheres fumantes, muito mais do que na dos homens fumantes. O tempo de uso do cigarro também parece influenciar mais na composição da saliva das mulheres do que na dos homens, indicando que os danos produzidos pelo uso do cigarro, podem ser maiores nas mulheres do que nos homens.

Palavras-chave: Fluorescência de Raios-X. Raios-X. Saliva. Tabaco. Fumantes Homens. Fumantes Mulheres.

ABSTRACT

Cigarette smoking is a serious public health problem. According to data from the World Health Organization, it is estimated that currently more than 1.2 billion people worldwide do tobacco use and this accounts for about 6 million deaths every year. With attention to this, it is necessary to seek preventive and prognostic of trying to reduce these numbers and alert the public in general about the danger and the harm caused by its use. Thus, the objective of this study is to evaluate and compare the chemical composition of the collected saliva of smokers and nonsmokers by X-ray Fluorescence technique. The methodology was based on the selection of 32 individuals, 16 individuals who used cigarette daily and 16 who have never smoked. Saliva was collected with the help of a disposable Pasteur pipette and samples sent to Applied Nuclear Physics Laboratory of UNISO (LAFINAU), where analyzes were performed. Individuals, who agreed to participate of this study, answered a questionnaire to define the profile of inclusion and signed an informed consent form (CEP Protocol nº 831.753 of 09/10/2014). The results showed that there are differences in the concentrations of the chemical elements, when we compare the test results of samples of saliva of smokers and nonsmokers. The biggest discrepancies were found at concentrations of the chemical elements Sulfur, Phosphorus, Chlorine and Potassium and smaller differences in the concentration of the elements Calcium, Manganese, Iron, Copper, Titanium, Vanadium and Nickel. The results indicate that smoking produces more significant changes in the saliva of women than in men, increasing the concentration of some elements in the saliva of women smokers, much more than in the male smokers. The cigarette usage time also appears to influence over the composition of the saliva of women than in men, indicating that the damage caused by cigarette use, may be higher in women than in men.

Keywords: Fluorescence X-rays. X-ray. Saliva. Tobacco. Men smokers. Women smokers.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Incidência do feixe de radiação sobre o elétron.	17
Figura 2	Ilustração dos saltos quânticos realizados pelos elétrons.	18
Figura 3	Coleta. (a) Pipetas descartáveis e (b) Ilustração da coleta.	24
Figura 4	Sistema de ED-XRF. (a) Detector e sistema discriminador X-123SSD da marca Amptek Inc. e (b) Fonte de raios-X da marca Hamamatsu.	26
Figura 5	Gráfico gerado pelo software DppMCA, para uma placa de aço 316, usada na calibração em energia do sistema de fluorescência.	27
Figura 6	Tabela Periódica mostrando a energia dos raios-X característicos, emitidos pelos elementos químicos para as excitações principais, destacando os átomos de Fe e Mo.	28
Figura 7	Espectro típico fornecido pelo programa XRF-FP.	29
Figura 8	Relatório típico gerado pelo programa XRF-FP, ao final de cada análise.	29
Figura 9	Gráfico da concentração verdadeira de Enxofre (ppm) em função do número de raios-X característicos que chega no detector, em cont/s.	33
Figura 10	Gráfico da concentração verdadeira de Cloro (ppm) em função do número de raios-X característicos que chegam no detector, em cont/s.	33
Figura 11	Gráfico da concentração verdadeira de Potássio (ppm) em função do número de raios-X característicos que chegam no detector, em cont/s.	34
Figura 12	Gráfico da concentração verdadeira de Cromo (ppm) em função do número de raios-X característicos que chegam no detector, em cont/s.	34
Figura 13	Gráfico mostrando o LMD (ppm) em função do Número Atômico do elemento químico analisado.	35
Figura 14	Concentração de Enxofre nas amostras.	37
Figura 15	Concentração de Níquel nas amostras.	38

Figura 16	Concentração de Fósforo nas amostras.	39
Figura 17	Concentração de Cloro nas amostras.	39
Figura 18	Concentração de Potássio nas amostras.	40
Figura 19	Concentração de Cálcio nas amostras.	40
Figura 20	Concentração de Cromo nas amostras.	41
Figura 21	Concentração de Manganês nas amostras.	42
Figura 22	Concentração de Ferro nas amostras.	42
Figura 23	Concentração de Cobre nas amostras.	43
Figura 24	Concentração de Titânio nas amostras.	44
Figura 25	Concentração de Vanádio nas amostras.	44
Figura 26	Gráfico de concentração média (ppm) dos elementos químicos: S, P, Cl e K, encontrados nas amostras de saliva de fumantes e não fumantes.	45
Figura 27	Gráfico de concentração média (ppm) dos elementos químicos: Ca, Mn, Fe, Cu, Ti, V e Ni, encontrados nas amostras de saliva de fumantes e não fumantes.	46
Figura 28	Gráfico de concentração média (ppm) dos elementos químicos encontrados nas amostras de saliva de indivíduos não fumantes divididos por sexo. (a) Elementos: S, P, Cl e K. (b) Elementos: Ca, Mn, Fe, Cu, Ti, V e Ni.	47
Figura 29	Gráfico de concentração média (ppm) dos elementos químicos encontrados nas amostras de saliva de indivíduos fumantes e não fumantes divididos por sexo. (a) Elementos: S, P, Cl e K. (b) Elementos: Ca, Mn, Fe, Cu, Ti, V e Ni.	49
Figura 30	Comparativo de concentração x tempo de consumo em fumantes femininos.	50
Figura 31	Comparativo de concentração x tempo de consumo em fumantes masculinos.	51
Figura 32	Gráfico da Concentração (ppm) em função do número de cigarros consumidos por dia. A reta que melhor se ajusta aos dados experimentais e seu desvio quadrático médio é mostrado no gráfico, para o elemento químico Enxofre, de indivíduos fumantes dos sexos masculinos (M) e femininos (F).	52

Figura 33	Gráfico da Concentração (ppm) em função do número de cigarros consumidos por dia. A reta que melhor se ajusta aos dados experimentais e seu desvio quadrático médio é mostrado no gráfico, para o elemento químico Potássio, de indivíduos fumantes dos sexos masculinos (M) e femininos (F).	52
Figura 34	Gráfico da Concentração (ppm) em função do número de cigarros consumidos por dia. A reta que melhor se ajusta aos dados experimentais e seu desvio quadrático médio é mostrado no gráfico, para o elemento químico Cálcio, de indivíduos fumantes dos sexos masculinos (M) e femininos (F).	53
Figura 35	Gráfico da Concentração (ppm) em função do número de cigarros consumidos por dia. A reta que melhor se ajusta aos dados experimentais e seu desvio quadrático médio é mostrado no gráfico, para o elemento químico Níquel, de indivíduos fumantes dos sexos masculinos (M) e femininos (F).	53
Figura 36	Gráfico da Concentração (ppm) em função do número de cigarros consumidos por dia. A reta que melhor se ajusta aos dados experimentais e seu desvio quadrático médio é mostrado no gráfico, para o elemento químico Cloro, de indivíduos fumantes dos sexos masculinos (M) e femininos (F).	54
Figura 37	Gráfico da concentração (ppm) dos elementos S, P, Cl e K obtidos neste trabalho, comparados com dados de ABRAHAM et al., (2010).	55
Figura 38	Gráfico da Concentração (ppm) dos elementos Ca, Mn, Fe, Cu, Ti, V e Ni obtidos neste trabalho, comparados com dados de ABRAHAM et al., (2010).	56

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Elementos e concentrações presentes na amostra certificada de Aço 316.	32
Tabela 2	Caracterização dos participantes.	36
Tabela 3	Comparação dos valores obtidos (concentração média) entre os sexos masculino e feminino em indivíduos fumantes e não fumantes.	48

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

As	Arsênio
Br	Bromo
Cd	Cádmio
Ca	Cálcio
CEP-Uniso	Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade de Sorocaba
Cl	Cloro
Cr	Cromo
Cu	Cobre
Fe	Ferro
Fu	Fumante
K	Potássio
LAFINAU	Laboratório de Física Nuclear Aplicada da Uniso
LMD	Limite Mínimo Detectável
Mn	Manganês
Mo	Molibdênio
NF	Não fumante
Ni	Níquel
OMS	Organização Mundial de Saúde
P	Fósforo
ppb	Partes por bilhão
ppm	Partes por milhão
S	Enxofre
Ti	Titânio
V	Vanádio
Zn	Zinco
Sr	Estrôncio

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	15
1.1	O tabagismo.....	15
1.2	A ação do cigarro no organismo	16
1.3	Saliva	16
1.4	Fluorescência de Raios X.....	17
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	19
3	OBJETIVOS	22
3.1	Objetivo geral	22
3.2	Objetivos específicos	22
4	MATERIAIS E MÉTODOS.....	23
4.1	Amostras.....	23
4.1.1	Critérios de inclusão	23
4.1.2	Critérios de exclusão	24
4.2	Coleta	24
4.3	Análise do material	25
4.4	Obtenção dos dados.....	27
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	31
5.1	Escolha de parâmetros ideais e calibração do sistema.....	31
5.2	Amostras de Controle.....	32
5.3	Caracterização das amostras	35
5.4	Resultados das análises por fluorescência de raios-X.....	37
5.4.1	Enxofre	37
5.4.2	Níquel	38
5.4.3	Fósforo.....	38
5.4.4	Cloro	39

5.4.5	Potássio	40
5.4.6	Cálcio	40
5.4.7	Cromo	41
5.4.8	Manganês	41
5.4.9	Ferro	42
5.4.10	Cobre	43
5.4.11	Titânio.....	43
5.4.12	Vanádio.....	44
5.5	Análise comparativa dos resultados.....	45
6	CONCLUSÃO.....	57
	REFERÊNCIAS.....	59
	APÊNDICE A – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO.....	63
	APÊNDICE B – QUESTIONÁRIO.....	64
	ANEXO A – PARECER DO CEP.....	65
	ANEXO B – AUTORIZAÇÃO DA SECRETARIA DE SAUDE DE ARAÇOIABA DA SERRA/SP	68
	ANEXO C – APRESENTAÇÃO DO TRABALHO NA 38ª REUNIÃO DE TRABALHO SOBRE FÍSICA NUCLEAR NO BRASIL.....	69

1 INTRODUÇÃO

1.1 O tabagismo

O Brasil, segundo dados do LENAD (Levantamento Nacional de Álcool e Drogas) de 2012, tem aproximadamente 20 milhões de fumantes, porém no passado esse número era maior. Em pesquisa realizada em 2006, 20,8% da população dizia fumar diariamente em média 12,9 cigarros por dia; seis anos mais tarde este número diminuiu, contudo, o consumo diário aumentou para aproximadamente 14,1 cigarros e os fumantes passaram a representar 16,9% da população (INCA, 2014).

Nos últimos anos a expectativa de vida e o poder aquisitivo do brasileiro têm aumentado e isso refletiu diretamente ao estilo de vida da população. O perfil do fumante no país está em transição; os homens ainda são os maiores consumidores de cigarro, cerca de 65% em relação as mulheres. A região sul é onde concentra maior número de fumantes, 20,2%, visto também que é a região com mais indústrias de beneficiamento de tabaco e, dentre as classes socioeconômicas, a D e E, que juntas a renda não ultrapassa um salário mínimo, tem a proporção de fumantes na faixa de 19,9%, a maior registrada no país (IBGE, 2004; INCA, 2014; MADRUGA et al., 2010).

A segunda maior causa de morte no mundo, segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), é o tabagismo. Associado a mais de 50 tipos de doenças, o ato de fumar além de prejudicar o próprio fumante, causa malefícios àqueles que o cercam também. Por ano, acredita-se que aproximadamente 6 milhões de pessoas morrem vítimas de doenças associadas ao fumo e a perspectiva para 2030 é que esse número ultrapasse os 8 milhões (INCA, 2014).

Medidas socioeducativas e preventivas fazem parte da política de saúde pública, as crianças e os jovens são os principais alvos das campanhas antitabaco e leis estão sendo criadas a fim de diminuir cada vez mais a exposição a fumaça alheia. Como ocorreu em 2009, com a criação da Lei estadual nº 13.541 que aboliu o chamado fumódromo e tornou proibido em todo estado de São Paulo, fumar em ambientes fechados de uso coletivo, seja público ou privado. Visto a elegibilidade e sucesso de tal medida, o Governo Federal aprovou e, em dezembro de 2014, estendeu-a a todo território brasileiro (LEI ANTIFUMO, 2014).

1.2 A ação do cigarro no organismo

No cigarro estão presentes inúmeras substâncias químicas potencialmente tóxicas. Acredita-se que sejam mais de mil componentes entre substâncias carcinogênicas e gases e metais tóxicos (GUNNERBECK et al., 2014). A fumaça do tabaco, quando tragada, é inalada para os pulmões, que possuem um grande fluxo sanguíneo, as substâncias então, passam a barreira alveolar e, em aproximadamente 10 segundos, são distribuídas pelo sistema circulatório até atingir o cérebro. Tal velocidade chega a ser comparada a uma aplicação intravenosa de medicamento (RANG et al., 2007).

O principal componente do cigarro que causa a dependência é a nicotina, encontrada em todo derivado de tabaco, é uma substância psicoativa que age no núcleo *accumbens* no Sistema Nervoso Central, região que quando estimulada, defere sensação de prazer, o que explica a satisfação que o fumante tem ao fumar. Com o consumo contínuo e prolongado da nicotina, o cérebro se adapta e passa a precisar de doses cada vez maiores para manter o mesmo nível de satisfação que tinha no início. Esse efeito é chamado de tolerância à droga. Com o passar do tempo, o fumante passa a ter necessidade de consumir cada vez mais cigarros (RANG et al., 2007).

Essa exposição crônica aos mais diversos compostos químicos é o responsável pelas patologias associadas ao tabagismo. Segundo dados da OMS, 30% das mortes por câncer estão diretamente ligadas ao cigarro, assim como, 90% do câncer de pulmão. Além disso, o infarto agudo do miocárdio, acidente vascular cerebral, hipertensão arterial e principalmente as próprias patologias das vias respiratórias, como a DPOC (Doença Pulmonar Obstrutiva Crônica). Mais de 85% dos pacientes diagnosticados com DPOC eram ou ainda são fumantes (OMS, 2014; RANG et al., 2007).

1.3 Saliva

Produzida por diferentes glândulas no interior da cavidade oral, a saliva tem um importante papel na manutenção da saúde bucal. Composta por 95% de água, a saliva é um fluido heterogêneo que armazena células mortas, proteínas, compostos orgânicos e inorgânicos (ABRAHAM et al., 2010; CLETO, 2013; SÁNCHEZ et al.,

2008). A saliva além de desempenhar importante papel no auxílio da mastigação é responsável por dar início ao processo de digestão através da quebra de amido ainda na boca pela enzima α -amilase e promover importante papel na manutenção da integridade dos tecidos e dentes (LIMA et al., 2008).

Estima-se que um ser humano adulto produza em média 1 a 1,5 litros de saliva ao dia o que faz surgir grande interesse por este material tão abundante e de fácil coleta (SÁNCHEZ et al., 2008; LIMA et al., 2008).

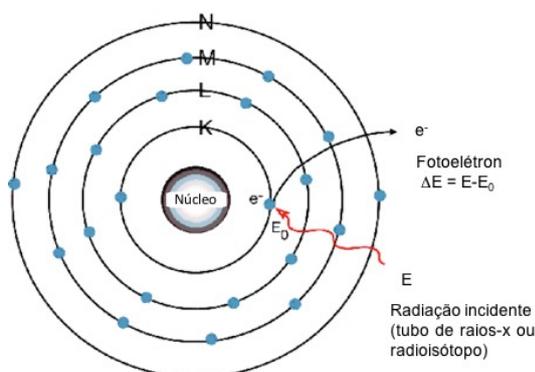
Segundo Cleto (2013), hoje em dia há diversas linhas de pesquisa utilizando amostras de saliva para fins diagnósticos, para marcadores de doenças e identificação de disfunções do organismo.

1.4 Fluorescência de Raios X

A Fluorescência de Raios X (XRF) é um tipo de análise multielementar que consiste na leitura espectrométrica dos raios-X característicos provenientes da excitação dos átomos de uma amostra. Esta técnica qualitativa e quantitativa permite identificar e estabelecer a proporção dos elementos de maneira não destrutiva, viabilizando a empregabilidade nas mais diversas áreas (ESTEVAM, 2005; PARREIRA, 2006).

Para que ocorram as transições eletrônicas que originarão os raios-X característicos é necessário retirar os elétrons das camadas mais internas do átomo, as chamadas camadas K, L, M, através da incidência de um feixe de radiação sobre a amostra analisada (Figura 1) (SÁNCHEZ et al., 2008; PARREIRA, 2006).

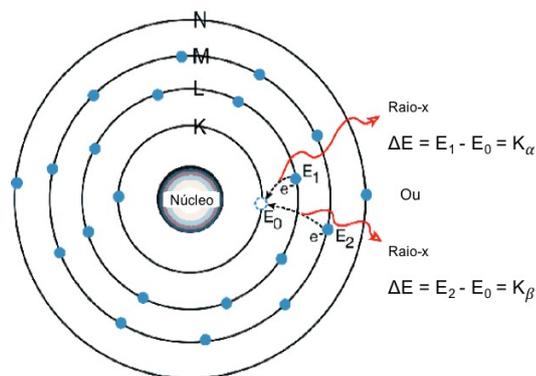
Figura 1 – Incidência do feixe de radiação sobre o elétron.



Fonte: Adaptado de AMPTEK. Disponível em: <<http://www.amptek.com/xrf/>>. Acesso em: 01 fev. 2016a.

Quando estas transições são provocadas, os elétrons superiores tendem a realizar um salto quântico para preencher o espaço deixado, com isso se emite uma partícula de energia muito bem definida denominada fóton (Figura 2). O fóton então, que é característico de cada elemento químico que o emitiu, é detectado por um detector que possui alta resolução em energia, conseguindo com isso, separar os raios-X característicos dos diferentes elementos emissores, permitindo assim a identificação e quantificação dos elementos químicos presentes na amostra. Esta técnica é denominada Fluorescência de Raios X por Dispersão de Energia (EDXRF) (CLETO, 2013).

Figura 2 – Ilustração dos saltos quânticos realizados pelos elétrons.



Fonte: Adaptada de AMPTEK. Disponível em: <<http://www.amptek.com/xrf/>>. Acesso em: 01 fev. 2016a.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

A técnica de Fluorescência por Raios-X (XRF) já está bastante difundida na área da saúde. Diversos autores se utilizam deste método, baseado na física nuclear, para corroborar com pesquisas e meios mais rápidos e reprodutíveis para análises diagnósticas das mais variadas áreas. Dessa forma, assegurando no futuro, um leque maior de opções no momento de fechar um laudo ou diagnóstico de maneira precisa e segura.

Em contrapartida, o uso da XRF tradicionalmente está empregado nos mais diversos setores, desde a mineração até na restauração de obras de arte (PARREIRA, 2006; CESAREO, 2013). Mas, sem dúvida nas áreas biológicas é que se tem ganhado destaque e, pensando nesse aumento do poderio experimental, diversas pesquisas envolvendo a técnica de XRF tem sido realizadas com resultados bastante promissores (SANCHÉZ et al., 2008).

Concomitantemente a tudo isso, o emprego de XRF no campo socioambiental, agricultura, bem-estar e pesquisa está em ascensão. Rios no interior do estado do Paraná, por exemplo, foram monitorado a fim de avaliar propriedades físico-químicas e medir íons metálicos encontrados de suas águas. Este trabalho de Espinoza-Quiñones (2010) teve como objetivo completar um catálogo de avaliação ambiental, utilizando-se desta tecnologia fundamentada na excitação de elétrons.

MELQUIADES et al. (2011) avaliou o capim em que o gado pastava e se alimentava, com auxílio da XRF, e encontrou a presença de chumbo em uma extensa área de pastagem.

Marguí; Queralt; Hidalgo (2009) também ressaltaram a importância dessa técnica para a dosagem de metais nas matrizes vegetais em áreas ambientais e industriais. Uma excelente forma que avaliar risco de contaminação ou simplesmente processos biológicos da planta. Ainda, segundo os autores, além de possuir uma ampla faixa dinâmica, alto rendimento e baixo custo por determinação, a XRF se destaca na quantificação de P, S, Cl e Br, pois são elementos difíceis de determinar por outros métodos analíticos.

Zamburlini et al. (2007), por exemplo, realizou análise *in vivo* para dosar os níveis de estrôncio (Sr) depositados nos ossos 22 indivíduos através da XRF, um elemento que se deposita uniformemente nos ossos, da mesma maneira que o

cálcio, e está naturalmente presente na água e solo. Os locais escolhidos para a amostragem foi o dedo indicador e a articulação tibial do tornozelo, o tempo de análise foi de 30 min a $E=35,5$ keV. Neste estudo eles conseguiram observar níveis maiores desse elemento em pessoas de origem asiática e sugerem estar ligado a dieta.

Nie et al. (2011) também realizou experimentos com a XRF *in vivo*, o objetivo foi investigar uma metodologia e a viabilidade desta, para quantificar a presença de chumbo depositado nos ossos.

Alguns autores, como Cleto (2013) e Sánchez et al. (2008), realizaram testes com a saliva e também com o fluido do sulco gengival coletado direto da glândula. No caso dos experimentos de Cleto (2013) que teve como o objetivo de avaliar a diferença do fluido em relação a saliva bruta extraída da região bucal, constatou-se algumas diferenças relevantes quando comparadas para alguns elementos pesquisados.

Já Sánchez et al. (2008) aprofundou seus estudos analisando os fluidos orais de mulheres afetadas pela osteoporose e osteopenia, doença que afeta na sua maioria o sexo feminino na faixa etária de 50 anos e é caracterizada pela baixa da densidade óssea. Os resultados obtidos foram bastante reveladores, dentre os inúmeros elementos químicos encontrados nas amostras, em especial o Ca e Zn, que são essências para estruturação óssea, aparecem em maior quantidade quando comparado ao grupo controle (mulheres saudáveis), esse resultado deixa claro que esses elementos não estão sendo reabsorvidos pelos ossos como seria o correto, sendo encontrados assim, numa concentração maior em outras áreas do corpo. E destacam ainda que com esforços para melhorar a estatísticas das análises por XRF, colaboraram muito para estudar diferentes fases da doença no futuro.

Experimentalmente, Lima et al. (2008) utilizando a técnica de Fluorescência de raios-x pelo método de Reflexão total (TXRF) verificou o aumento da concentração do íon cálcio na saliva de ratos com hipotireoidismo.

Ensaio com saliva de fumantes envolvendo a XRF já foi realizado anteriormente, porém com uma metodologia diferente. Abraham et al. (2010) utilizou-se de TXRF usando radiação Síncrotron, na ocasião os autores conseguiram mensurar diferenças nos valores de átomos presentes na saliva e no fluido gengival de pessoas que faziam uso do tabaco e da população controle.

Alguns trabalhos, avaliaram também a composição química do próprio cigarro de diferentes marcas comercializadas em países como México, China, Paquistão e Estados Unidos. Embora, não seja resultados tão assustadores em nível quantitativo, traços de elementos potencialmente tóxicos foram encontrados (Cu, Zn, Ba, Sr e Ti) (MARTINEZ, et al., 2008). Contudo, análises em cigarros paquistaneses, realizadas por Ajab et al (2014) demonstraram elevados níveis de chumbo e traços de cádmio e cromo.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Analisar através da técnica de fluorescência de raios X, amostras de saliva de indivíduos fumantes e não fumantes de ambos os sexos.

3.2 Objetivos específicos

Avaliar qualitativamente e quantitativamente os elementos químicos presentes nas amostras de saliva.

Comparar os valores dos diferentes elementos químicos encontrados na saliva dos indivíduos fumantes e não fumantes.

Identificar a presença de elementos químicos nocivos a saúde humana. Fazer as correlações necessárias a fim de identificar malefícios do hábito de fumar.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Amostras

Foram selecionados 32 indivíduos adultos, sendo 16 fumantes e 16 não fumantes, que aceitaram voluntariamente participar desta pesquisa mediante assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (APÊNDICE A), onde afirmaram ter compreendido com clareza o objetivo do estudo e estarem cientes dos procedimentos que seriam realizados.

Foi também aplicado um questionário aos participantes (APÊNDICE B), para assim traçarmos o perfil dos voluntários.

A participação nesta pesquisa se resumia em conceder uma amostra única de saliva, coletada pelo próprio participante ou com auxílio do pesquisador, num volume mínimo de 1,5 mL.

Como todo experimento que envolve a pesquisa com seres humanos, este projeto foi submetido antecipadamente ao Comitê de Ética em Pesquisa da Uniso (CEP-Uniso), obtendo aprovação para ser realizado segundo consta no Parecer nº 831.753 emitido pelo CEP em 09 de outubro de 2014 (ANEXO A).

A seleção dos participantes e coleta das amostras foi realizada entre os meses de Outubro/2014 a Março/2015, nas Unidades Básicas de Saúde do município de Araçoiaba da Serra, estado de São Paulo, com autorização prévia da Secretaria de Saúde local, conforme ANEXO B.

4.1.1 Critérios de inclusão

Como critérios de inclusão deste estudo foram adotados os seguintes parâmetros: maiores de 18 anos, saudáveis e todos aqueles que se enquadraram dentro do grupo de fumantes ou não fumantes.

Segundo a OMS, é considerado fumante todo aquele que inala a fumaça da combustão de derivados de tabaco atualmente e já fumou 100 cigarros na vida. E, desta forma, para este estudo padronizamos como sendo não fumantes aqueles que nunca fizeram uso do tabaco.

4.1.2 Critérios de exclusão

Foram utilizados como critério de exclusão, os indivíduos que se declararam ex-fumantes; portadores de alguma patologia crônica ou algum tipo de enfermidade na região bucal; aqueles que faziam uso diário de medicamentos ou que estivessem expostos rotineiramente a agentes tóxicos.

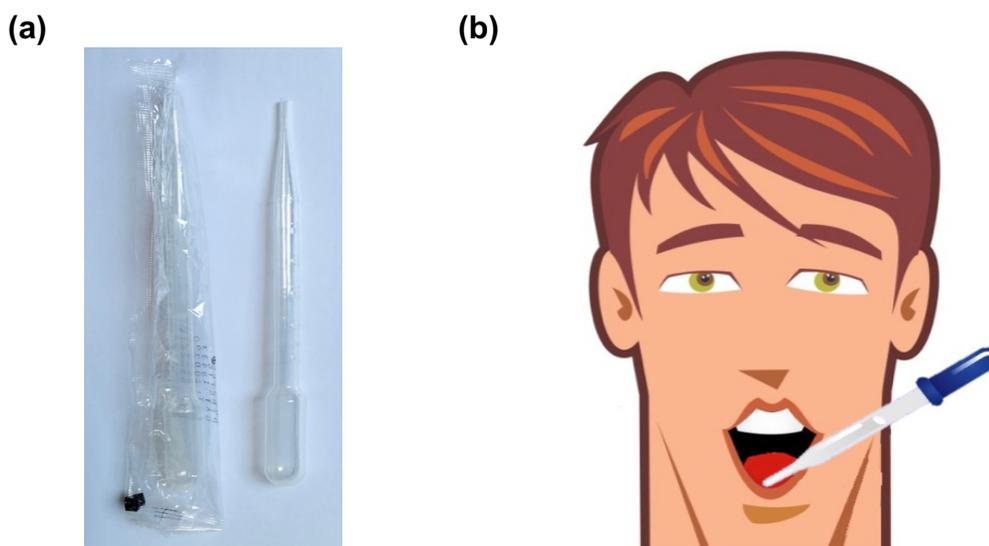
Em específico para os indivíduos não fumantes, foi considerado critério de exclusão, aqueles que declararam estar expostos indiretamente a fumaça de cigarro regularmente (fumante passivo).

4.2 Coleta

As amostras foram coletadas com o auxílio de uma pipeta de Pasteur graduada (3mL), descartável e estéril (Figura 3a), diretamente da cavidade bucal dos participantes, sendo um procedimento pouco invasivo e indolor (Figura 3b).

Os indivíduos não deveriam ter se alimentado ou realizado nenhum método de higiene bucal nas últimas horas que antecederam a coleta, para assim, evitar interferentes, como por exemplo, o carbonato de cálcio que está presente em cremes dentais, dentre outros elementos.

Figura 3 – Coleta. (a) Pipetas descartáveis e (b) Ilustração da coleta.



Fonte: (a) Elaboração Própria.

(b) Adaptada de Vlab. Disponível em: <<http://www.vidrariadelaboratorio.com.br/observacao-de-celulas-da-mucosa-bucal-microscopio/>>. Acesso em: 01 fev. 2016.

4.3 Análise do material

Uma vez coletada, a pipeta com a amostra era levada até o Laboratório de Física Nuclear Aplicada (LAFINAU), localizado na Universidade de Sorocaba (Uniso), sito a Rodovia Raposo Tavares Km 92.5, Cidade Universitária Prof. Aldo Vannucchi, 18023-000, Sorocaba, SP, e transferida para um recipiente de polipropileno (PP) de aproximadamente 20 mm de diâmetro e 5 mm de profundidade.

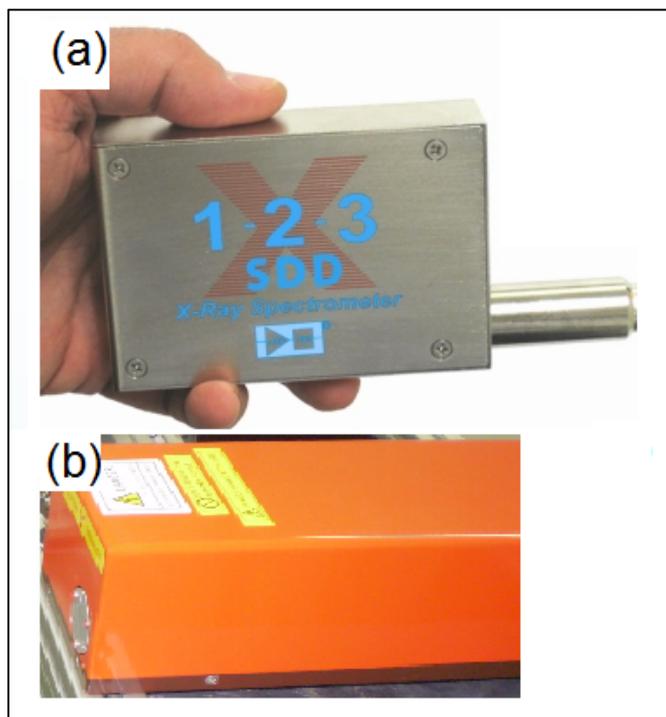
Em seguida as amostras eram excitadas, usando-se uma fonte de raios-X com alvo de Tungstênio, fabricada pela empresa Hamamatsu Photonics K. K., modelo L-6731-01, podendo ser operada na faixa de tensões entre 20KV e 80 KV e no intervalo de corrente entre 0 e 100 μ A. Após a excitação das amostras, os raios-X característicos foram lidos e discriminados por um sistema de fluorescência comercializado pela empresa Amptek Inc., modelo X-123SSD. A Figura 4a mostra uma fotografia do sistema de detecção dos raios-X característicos e a Figura 4b mostra uma fotografia da fonte de raios-X.

O tempo de leitura de cada amostra foi de 1800 segundos, a tensão e corrente de operação da fonte de raios-X foram ajustados para 25 kV e 99 μ A. Estes parâmetros foram escolhidos após análise da melhor configuração, que produzisse a melhor estatística na produção de raios-X característicos, dos elementos de interesse presentes nas amostras de saliva.

O sistema de fluorescência composta pela fonte de raios-X mais sistema de detecção eram ligados sempre com pelo menos uma hora antes do início das análises, a fim de estabilizar os sistemas eletrônicos e, por consequência, diminuir ruídos e flutuações dos componentes eletrônicos, garantindo assim tomadas de dados mais uniformes e confiáveis.

Os resultados qualitativos e quantitativos foram analisados via software XRS-FP, fornecido pela Amptek.

Figura 4 – Sistema de ED-XRF. (a) Detector e sistema discriminador X-123SSD da marca Amptek Inc. e (b) Fonte de raios-X da marca Hamamatsu.



Fonte: (a) AMPTEK. Disponível em: <<http://amptek.com/product/x-123sdd-complete-x-ray-spectrometer-with-silicon-drift-detector-sdd/>>. Acesso em: 19 jan. 2016b.
(b) Hamamatsu Photonics K. K., Disponível em :
<<http://doc.chipfind.ru/hamamatsu/l673101.htm>> . Acesso em: 19 jan. 2016.

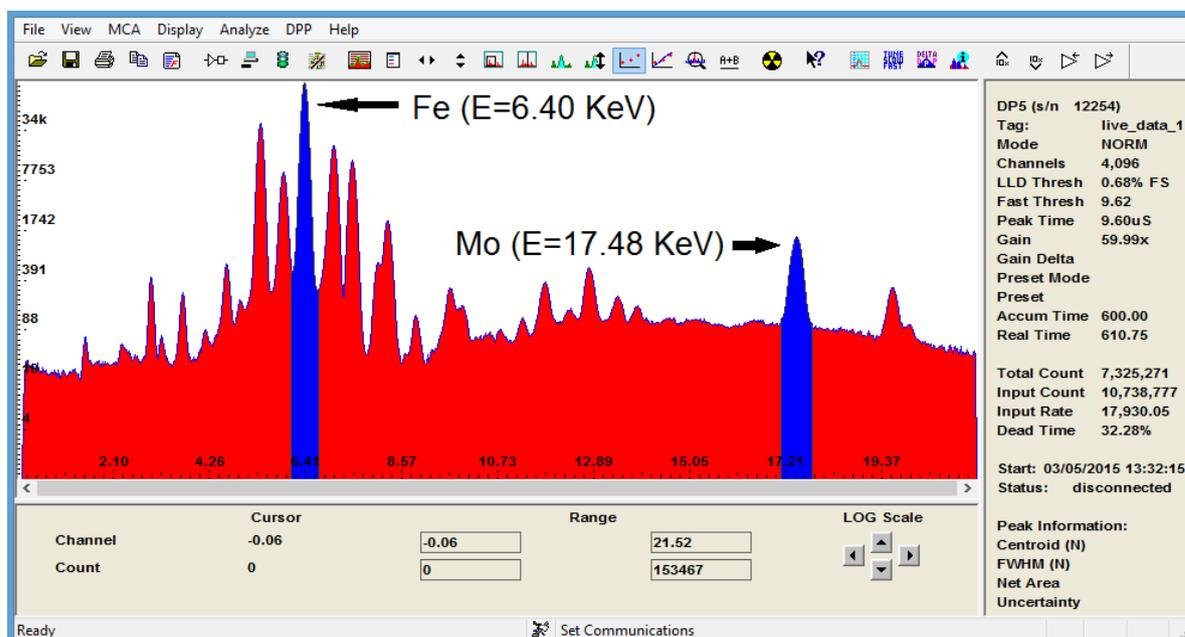
O sistema de fluorescência foi calibrado através do uso de amostras padronizadas e de controle. As amostras de controle foram produzidas no LAFINAU, usando-se elementos químicos com alto grau de pureza, diluídos em água ultrapura, obtida via sistema de purificação Mili-Q[®], com diferentes concentrações. As amostras foram feitas com os mesmos elementos químicos que se pretendia medir nas amostras de saliva, a fim de calibrarmos o sistema de detecção e obtermos os limites mínimos detectáveis (LMD) para os elementos químicos de interesse. As amostras de saliva foram acomodadas em porta amostras feitos de Polipropileno, que é um polímero composto por átomos de carbono e hidrogênio [fórmula química: $(C_3H_6)_n$], que ao serem excitados, não produzem raios-X característicos, com energia suficiente para ser detectados pelo sistema de fluorescência, não interferindo, portanto, no resultado da análise elementar.

4.4 Obtenção dos dados

Os dados experimentais contendo informações sobre os raios-X característicos, provenientes da excitação de cada amostra, eram visualizados, calibrados em energia e apresentados na forma de espectros, através do software DppMCA (Amptek Inc.), conforme mostra a Figura 4, onde no eixo das abscissas temos a energia dos raios-X característicos e no eixo das ordenadas a quantidade de eventos. Os picos mostrados na Figura 4, representam elementos químicos presentes na amostra em análise.

A identificação e correlação dos picos com os elementos químicos presentes, é feita através da análise da energia dos raios-X característicos emitidos. Na Figura 5, mostramos um espectro feito de uma placa de aço (Aço 316), usada na calibração em energia do sistema de fluorescência, sendo que o primeiro pico destacado corresponde a uma das excitações do elemento Ferro ($E = 6.40 \text{ KeV}$) e o segundo pico a uma das excitações do elemento Molibdênio ($E = 17.48 \text{ KeV}$). Na Figura 6 mostramos uma carta contendo todos os elementos químicos e as energias principais, dos raios-X característicos emitidos por estes elementos.

Figura 5 – Gráfico gerado pelo software DppMCA, para uma placa de aço 316, usada na calibração em energia do sistema de fluorescência.



Nota: Os picos destacados correspondem aos raios-X característicos emitidos pelos elementos Ferro e Molibdênio, respectivamente.

Fonte: Elaboração Própria.

Figura 6 – Tabela Periódica mostrando a energia dos raios-X característicos, emitidos pelos elementos químicos para as excitações principais, destacando os átomos de Fe e Mo.

AMPTEK

Amptek K and L Emission Line Lookup Chart

XR-100CR / XR-100T-CdTe / GAMMA-8000 / X-123
X-Ray and Gamma Ray Detectors

Key to Energy Values in keV
K_{α1} K_{α2}
Au 79
L_{α1} L_{α2}

Group IA	Key to Energy Values in keV																Key to Energy Values in keV					VIIA
H 1	Key to Energy Values in keV																Key to Energy Values in keV					He 2
0.002 Li 3	Key to Energy Values in keV																Key to Energy Values in keV					0.051 Ne 10
0.110 Be 4	Key to Energy Values in keV																Key to Energy Values in keV					0.851 Ar 18
1.04 1.07 Na 11	Key to Energy Values in keV																Key to Energy Values in keV					1.48 1.65 Al 13
1.25 1.30 Mg 12	Key to Energy Values in keV																Key to Energy Values in keV					1.74 1.83 Si 14
3.31 3.59 K 19	Key to Energy Values in keV																Key to Energy Values in keV					2.02 2.14 P 15
3.59 4.01 Ca 20	Key to Energy Values in keV																Key to Energy Values in keV					2.31 2.46 S 16
4.00 4.40 Sc 21	Key to Energy Values in keV																Key to Energy Values in keV					2.62 2.82 Cl 17
4.51 4.93 Ti 22	Key to Energy Values in keV																Key to Energy Values in keV					2.82 2.82 Ar 18
4.95 5.43 V 23	Key to Energy Values in keV																Key to Energy Values in keV					2.96 3.19 K 19
5.41 5.95 Cr 24	Key to Energy Values in keV																Key to Energy Values in keV					3.19 3.46 Ca 20
5.95 6.49 Mn 25	Key to Energy Values in keV																Key to Energy Values in keV					3.46 3.69 Sc 21
6.49 7.06 Fe 26	Key to Energy Values in keV																Key to Energy Values in keV					3.69 3.92 Ti 22
7.06 7.64 Co 27	Key to Energy Values in keV																Key to Energy Values in keV					3.92 4.15 V 23
7.64 8.25 Ni 28	Key to Energy Values in keV																Key to Energy Values in keV					4.15 4.38 Cr 24
8.25 8.83 Cu 29	Key to Energy Values in keV																Key to Energy Values in keV					4.38 4.61 Mn 25
8.83 9.41 Zn 30	Key to Energy Values in keV																Key to Energy Values in keV					4.61 4.84 Fe 26
9.41 10.00 Ga 31	Key to Energy Values in keV																Key to Energy Values in keV					4.84 5.07 Co 27
10.00 10.58 Ge 32	Key to Energy Values in keV																Key to Energy Values in keV					5.07 5.30 Ni 28
10.58 11.16 As 33	Key to Energy Values in keV																Key to Energy Values in keV					5.30 5.53 Cu 29
11.16 11.74 Se 34	Key to Energy Values in keV																Key to Energy Values in keV					5.53 5.76 Zn 30
11.74 12.32 Br 35	Key to Energy Values in keV																Key to Energy Values in keV					5.76 6.00 Ga 31
12.32 12.90 Kr 36	Key to Energy Values in keV																Key to Energy Values in keV					6.00 6.23 Ge 32
12.90 13.48 Rb 37	Key to Energy Values in keV																Key to Energy Values in keV					6.23 6.47 As 33
13.48 14.06 Sr 38	Key to Energy Values in keV																Key to Energy Values in keV					6.47 6.70 Se 34
14.06 14.64 Y 39	Key to Energy Values in keV																Key to Energy Values in keV					6.70 6.94 Br 35
14.64 15.22 Zr 40	Key to Energy Values in keV																Key to Energy Values in keV					6.94 7.17 Kr 36
15.22 15.80 Nb 41	Key to Energy Values in keV																Key to Energy Values in keV					7.17 7.41 Rb 37
15.80 16.38 Mo 42	Key to Energy Values in keV																Key to Energy Values in keV					7.41 7.64 Sr 38
16.38 16.96 Tc 43	Key to Energy Values in keV																Key to Energy Values in keV					7.64 7.88 Y 39
16.96 17.54 Ru 44	Key to Energy Values in keV																Key to Energy Values in keV					7.88 8.11 Zr 40
17.54 18.12 Rh 45	Key to Energy Values in keV																Key to Energy Values in keV					8.11 8.35 Nb 41
18.12 18.70 Pd 46	Key to Energy Values in keV																Key to Energy Values in keV					8.35 8.58 Mo 42
18.70 19.28 Ag 47	Key to Energy Values in keV																Key to Energy Values in keV					8.58 8.82 Tc 43
19.28 19.86 Cd 48	Key to Energy Values in keV																Key to Energy Values in keV					8.82 9.05 Ru 44
19.86 20.44 In 49	Key to Energy Values in keV																Key to Energy Values in keV					9.05 9.29 Rh 45
20.44 21.02 Sn 50	Key to Energy Values in keV																Key to Energy Values in keV					9.29 9.52 Pd 46
21.02 21.60 Sb 51	Key to Energy Values in keV																Key to Energy Values in keV					9.52 9.76 Ag 47
21.60 22.18 Te 52	Key to Energy Values in keV																Key to Energy Values in keV					9.76 10.00 Cd 48
22.18 22.76 I 53	Key to Energy Values in keV																Key to Energy Values in keV					10.00 10.23 In 49
22.76 23.34 Xe 54	Key to Energy Values in keV																Key to Energy Values in keV					10.23 10.47 Sn 50
23.34 23.92 Ba 56	Key to Energy Values in keV																Key to Energy Values in keV					10.47 10.70 Sb 51
23.92 24.50 La 57	Key to Energy Values in keV																Key to Energy Values in keV					10.70 10.94 Te 52
24.50 25.08 Ce 58	Key to Energy Values in keV																Key to Energy Values in keV					10.94 11.17 I 53
25.08 25.66 Pr 59	Key to Energy Values in keV																Key to Energy Values in keV					11.17 11.41 Xe 54
25.66 26.24 Nd 60	Key to Energy Values in keV																Key to Energy Values in keV					11.41 11.64 Ba 56
26.24 26.82 Pm 61	Key to Energy Values in keV																Key to Energy Values in keV					11.64 11.88 La 57
26.82 27.40 Sm 62	Key to Energy Values in keV																Key to Energy Values in keV					11.88 12.11 Ce 58
27.40 27.98 Eu 63	Key to Energy Values in keV																Key to Energy Values in keV					12.11 12.35 Pr 59
27.98 28.56 Gd 64	Key to Energy Values in keV																Key to Energy Values in keV					12.35 12.58 Nd 60
28.56 29.14 Tb 65	Key to Energy Values in keV																Key to Energy Values in keV					12.58 12.82 Pm 61
29.14 29.72 Dy 66	Key to Energy Values in keV																Key to Energy Values in keV					12.82 13.05 Sm 62
29.72 30.30 Ho 67	Key to Energy Values in keV																Key to Energy Values in keV					13.05 13.29 Eu 63
30.30 30.88 Er 68	Key to Energy Values in keV																Key to Energy Values in keV					13.29 13.52 Gd 64
30.88 31.46 Tm 69	Key to Energy Values in keV																Key to Energy Values in keV					13.52 13.76 Tb 65
31.46 32.04 Yb 70	Key to Energy Values in keV																Key to Energy Values in keV					13.76 14.00 Dy 66
32.04 32.62 Lu 71	Key to Energy Values in keV																Key to Energy Values in keV					14.00 14.23 Ho 67
32.62 33.20 Hf 72	Key to Energy Values in keV																Key to Energy Values in keV					14.23 14.47 Er 68
33.20 33.78 Ta 73	Key to Energy Values in keV																Key to Energy Values in keV					14.47 14.70 Tm 69
33.78 34.36 W 74	Key to Energy Values in keV																Key to Energy Values in keV					14.70 14.94 Yb 70
34.36 34.94 Re 75	Key to Energy Values in keV																Key to Energy Values in keV					14.94 15.17 Lu 71
34.94 35.52 Os 76	Key to Energy Values in keV																Key to Energy Values in keV					15.17 15.41 Hf 72
35.52 36.10 Ir 77	Key to Energy Values in keV																Key to Energy Values in keV					15.41 15.64 Ta 73
36.10 36.68 Pt 78	Key to Energy Values in keV																Key to Energy Values in keV					15.64 15.88 W 74
36.68 37.26 Au 79	Key to Energy Values in keV																Key to Energy Values in keV					15.88 16.11 Re 75
37.26 37.84 Hg 80	Key to Energy Values in keV																Key to Energy Values in keV					16.11 16.35 Os 76
37.84 38.42 Tl 81	Key to Energy Values in keV																Key to Energy Values in keV					16.35 16.58 Ir 77
38.42 39.00 Pb 82	Key to Energy Values in keV																Key to Energy Values in keV					16.58 16.82 Pt 78
39.00 39.58 Bi 83	Key to Energy Values in keV																Key to Energy Values in keV					16.82 17.05 Au 79
39.58 40.16 Po 84	Key to Energy Values in keV																Key to Energy Values in keV					17.05 17.29 Hg 80
40.16 40.74 At 85	Key to Energy Values in keV																Key to Energy Values in keV					17.29 17.52 Tl 81
40.74 41.32 Rn 86	Key to Energy Values in keV																Key to Energy Values in keV					17.52 17.76 Pb 82
41.32 41.90 Fr 87	Key to Energy Values in keV																Key to Energy Values in keV					17.76 18.00 Bi 83
41.90 42.48 Ra 88	Key to Energy Values in keV																Key to Energy Values in keV					18.00 18.23 Po 84
42.48 43.06 Ac 89	Key to Energy Values in keV																Key to Energy Values in keV					18.23 18.47 At 85
43.06 43.64 Th 90	Key to Energy Values in keV																Key to Energy Values in keV					18.47 18.70 Rn 86
43.64 44.22 Pa 91	Key to Energy Values in keV																Key to Energy Values in keV					18.70 18.94 Fr 87
44.22 44.80 U 92	Key to Energy Values in keV																Key to Energy Values in keV					18.94 19.17 Ra 88
44.80 45.38 Np 93	Key to Energy Values in keV																Key to Energy Values in keV					19.17 19.41 Ac 89
45.38 45.96 Pu 94	Key to Energy Values in keV																Key to Energy Values in keV					19.41 19.64 Th 90
45.96 46.54 Am 95	Key to Energy Values in keV																Key to Energy Values in keV					19.64 19.88 Pa 91
46.54 47.12 Cm 96	Key to Energy Values in keV																Key to Energy Values in keV					19.88 20.11 U 92
47.12 47.70 Bk 97	Key to Energy Values in keV																Key to Energy Values in keV					20.11 20.35 Np 93
47.70 48.28 Cf 98	Key to Energy Values in keV																Key to Energy Values in keV					20.35 20.58 Pu 94
48.28 48.86 Es 99	Key to Energy Values in keV																Key to Energy Values in keV					20.58 20.82 Am 95
48.86 49.44 Fm 100	Key to Energy Values in keV																Key to Energy Values in keV					20.82 21.05 Cm 96
49.44 50.02 Md 101	Key to Energy Values in keV																Key to Energy Values in keV					21.05 21.29 Bk 97
50.02 50.60 No 102	Key to Energy Values in keV																Key to Energy Values in keV					21.29 21.52 Cf 98
50.60 51.18 Lr 103	Key to Energy Values in keV																Key to Energy Values in keV					21.52 21.76 Es 99
51.18 51.76 Actinides 89-103	Key to Energy Values in keV																Key to Energy Values in keV					21.76 22.00 Fm 100
51.76 52.34 Actinides 89-103	Key to Energy Values in keV																Key to Energy Values in keV					22.00 22.23 Md 101
52.34 52.92 Actinides 89-103	Key to Energy Values in keV																Key to Energy Values in keV					22.23 22.47 No 102
52.92 53.50 Actinides 89-103	Key to Energy Values in keV																Key to Energy Values in keV					22.47 22.70 Lr 103
53.50 54.08 Actinides 89-103	Key to Energy Values in keV																Key to Energy Values in keV					22.70 22.94 Actinides 89-103
54.08 54.66 Actinides 89-103	Key to Energy Values in keV																Key to Energy Values in keV					22.94 23.17 Actinides 89-103
54.66 55.24 Actinides 89-103	Key to Energy Values in keV																Key to Energy Values in keV					23.17 23.41 Actinides 89-103
55.24 55.82 Actinides 89-103	Key to Energy Values in keV																Key to Energy Values in keV					23.41 23.64 Actinides 89-103
55.82 56.40 Actinides 89-103	Key to Energy Values in keV																Key to Energy Values in keV					23.64 23.88 Actinides 89-103
56.40 56.98 Actinides 89-103	Key to Energy Values in keV																Key to Energy Values in keV					23.88 24.11 Actinides 89-103
56.98 57.56 Actinides 89-103	Key to Energy Values in keV																Key to Energy Values in keV					24.11 24.35 Actinides 89-103
57.56 58.14 Actinides 89-103	Key to Energy Values in keV																Key to Energy Values in keV					24.35 24.58 Actinides 89-103
58.14 58.72 Actinides 89-103	Key to Energy Values in keV																Key to Energy Values in keV					24.58 24.82 Actinides 89-103
58.72 59.30 Actinides 89-103	Key to Energy Values in keV																Key to Energy Values in keV					24.82 25.05 Actinides 89-103
59.30 59.88 Actinides 89-103	Key to Energy Values in keV																Key to Energy Values in keV					25.05 25.29 Actinides 89-103
59.88 60.46 Actinides 89-103	Key to Energy Values in keV																Key to Energy Values in keV					25.29 25.52 Actinides 89-103
60.46 61.04 Actinides 89-103	Key to Energy Values in keV																Key to Energy Values in keV					25.52 25.76 Actinides 89-103
61.04 61.62 Actinides 89-103	Key to Energy Values in keV																Key to Energy Values in keV					25.76 26.00 Actinides 89-103
61.62 62.20 Actinides 89-103	Key to Energy Values in keV																Key to Energy Values in keV					26.00 26.23 Actinides 89-103
62.20 62.78 Actinides 89-103	Key to Energy Values in keV																Key to Energy Values in keV					26.23 26.47 Actinides 89-103
62.78 63.36 Actinides 89-103	Key to Energy Values in keV																Key to Energy Values in keV					26.47 26.70 Actinides 89-103
63.36 63.94 Actinides 89-103	Key to Energy Values in keV																Key to Energy Values in keV					26.70 26.94 Actinides 89-103
63.94 64.52 Actinides 89-103	Key to Energy Values in keV																Key to Energy Values in keV					26.94 27.17 Actinides 89-103
64.52 65.10 Actinides 89-103	Key to Energy Values in keV																Key to Energy Values in keV					27.17 27.41 Actinides 89-103
65.10 65.68 Actinides 89-103	Key to Energy Values in keV																Key to Energy Values in keV					27.41 27.64 Actinides 89-103
65.68 66.26 Actinides 89-103	Key to Energy Values in keV																Key to Energy Values in keV					27.64 27.88 Actinides 89-103
66.26 66.84 Actinides 89-103	Key to Energy Values in keV																Key to Energy Values in keV					27.88 28.11 Actinides 89-103
66.84 67.42 Actinides 89-103	Key to Energy Values in keV																Key to Energy Values in keV					28.11 28.35 Actinides 89-103
67.42 68.00 Actinides 89-103	Key to Energy Values in keV																Key to Energy Values in keV					28.35 28.58 Actinides 89-103
68.00 68.58 Actinides 89-103	Key to Energy Values in keV																Key to Energy Values in keV					28.58 28.82 Actinides 89-103
68.58 69.16 Actinides 89-103	Key to Energy Values in keV																Key to Energy Values in keV					28.82 29.05 Actinides 89-103
69.16 69.74 Actinides 89-103	Key to Energy Values in keV																Key to Energy Values in keV					29.05 29.29 Actinides 89-103
69.74 70.32 Actinides 89-103	Key to Energy Values in keV																Key to Energy Values in keV					29.29 29.52 Actinides 89-103
70.32 70.90 Actinides 89-103	Key to Energy Values in keV																Key to Energy Values in keV					29.52 29.76 Actinides 89-103
70.90 71.48 Actinides 89-103	Key to Energy Values in keV																Key to Energy Values in keV					29.76 30.00 Actinides 89-103
71.48 72.06 Actinides 89-103	Key to Energy Values in keV																Key to Energy Values in keV					30.00 30.23 Actinides 89-103
72.06 72.64 Actinides 89-103	Key to Energy Values in keV																Key to Energy Values in keV					30.23 30.47 Actinides 89-103
72.64 73.22 Actinides 89-103	Key to Energy Values in keV																Key to Energy Values in keV					30.47 30.70 Actinides 89-103
73.22 73.80 Actinides 89-103	Key to Energy Values in keV																Key to Energy Values in keV					30.70 30.94 Actinides 89-103
73.80 74.38 Actinides 89-103	Key to Energy Values in keV																Key to Energy Values in keV					30.94 31.17 Actinides 89-103
74.38 74.96 Actinides 89-103	Key to Energy Values in keV																Key to Energy Values in keV					31.17 31.41 Actinides 89-103
74.96 75.54 Actinides 89-103	Key to Energy Values in keV																Key to Energy Values in keV					31.41 31.64 Actinides 89-103
75.54 76.12 Actinides 89-103	Key to Energy Values in keV																Key to Energy Values in keV					31.64 31.88 Actinides 89-103
76.12 7																						

O procedimento de análise descrito acima foi conduzido para todas as amostras de saliva (indivíduos fumantes e não fumantes), e os resultados obtidos serão apresentados e discutidos na sequência, levando-se em consideração os objetivos inicialmente propostos.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Escolha de parâmetros ideais e calibração do sistema

Iniciamos este trabalho, procurando qual seria a configuração ideal do sistema de fluorescência, a fim de detectarmos e quantificarmos os diferentes elementos químicos presentes na saliva humana. Existem na literatura trabalhos envolvendo a detecção destes componentes, porém usando uma outra técnica de fluorescência de raios-X, diferente da que utilizamos neste estudo. A técnica escolhida por nós, é denominada Fluorescência de Raios-X por Dispersão em Energia (EDXRF), que embora menos sensível que outras já utilizadas para análise de saliva, como a técnica de Fluorescência de Raios-X por Reflexão Total (TXRF), a EDXRF pode ser facilmente implementada em laboratórios de pesquisa de pequeno porte.

Como os elementos de interesse presentes na saliva, na sua grande maioria, possuem número atômico baixo (S, Cl, P, K, etc.) optamos por trabalhar com uma fonte de raios-X, que usa como alvo na produção dos raios-X o elemento químico Tungstênio (W). Neste caso, podemos utilizar os raios-X das transições L deste elemento, que possuem energia relativamente baixas ($E = 8.40 \text{ KeV}$ e $E = 9.67 \text{ KeV}$) ideais para a excitação dos elementos leves presentes nas amostras de saliva.

A fim de termos a estatística de eventos suficientes, o tempo de excitação de cada amostra foi escolhido com sendo de 1800 segundos. Após, definimos os demais parâmetros do sistema de aquisição de dados, como tensão de operação da fonte de raios-X, escolhida para $V=25 \text{ KV}$ e a corrente da fonte de raios-X, ajustada para a máxima suportada pela fonte, ou seja, $i=99 \mu\text{A}$, iniciamos a tomada de dados das amostras de controle.

Antecedendo cada tomada de dados, era feito a calibração em energia do sistema de fluorescência, usando para isso uma amostra certificada de Aço 316, fornecida com o equipamento. Esta amostra de Aço 316, segundo o fabricante, contém os elementos e concentrações mostrados na Tabela 1.

Tabela 1 – Elementos e concentrações presentes na amostra certificada de Aço 316.

Elemento químico	Valores Certificados (NIST) * (%)
Cr	18.450±0.25
Mn	1.630±0.01
Fe	65.190±0.07
Ni	12.180±0.05
Cu	0.169±0.001
Mo	2.380±0.01

Nota: * NIST- National Institute of Standards and Technology.

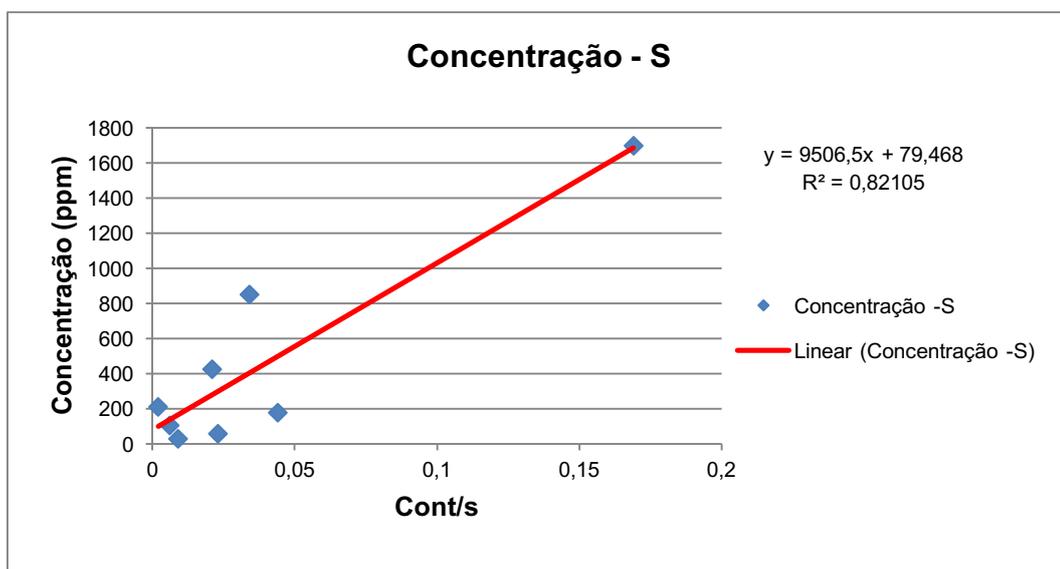
Fonte: Elaboração própria.

A calibração em energia é feita identificando-se picos e fixando a energia dos raios-X característicos emitidos por estes elementos, conforme mostrado na Figura 4.

5.2 Amostras de Controle

Após a calibração em energia, iniciamos a calibração do Programa XRF-FT, usando amostras de controle especialmente construídas para esta finalidade, contendo elementos químicos com concentrações conhecidas, em soluções de: Enxofre (S), Cloro (Cl), Potássio (K), Cromo (Cr), Manganês (Mn), Fósforo (P), Cálcio (Ca), Ferro (Fe), Cobre (Cu), Titânio (Ti) e Níquel (Ni), dentre outros. Para todos os elementos foram feitas amostras, com no mínimo 3 concentrações distintas, permitindo com isso a construção de curvas de calibração, relacionando a concentração verdadeira da solução (ppm) com o número de contagens por segundo (cont/s), obtidos pelo sistema de fluorescência, conforme mostrado nas Figuras 9, 10, 11 e 12 para os elementos S, Cl, K e Cr, respectivamente. Gráficos como estes foram feitos para todos os elementos de interesse.

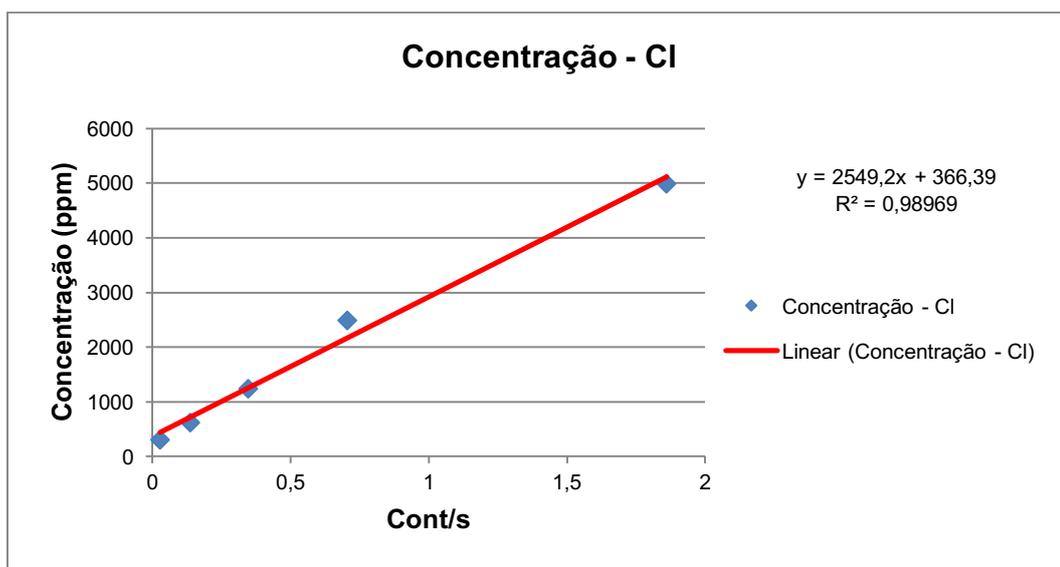
Figura 9 – Gráfico da concentração verdadeira de Enxofre (ppm) em função do número de raios-X característicos que chega no detector, em cont/s.



Nota: A linha vermelha mostra a reta que melhor se ajusta aos dados experimentais e seu respectivo desvio quadrático médio.

Fonte: Elaboração Própria.

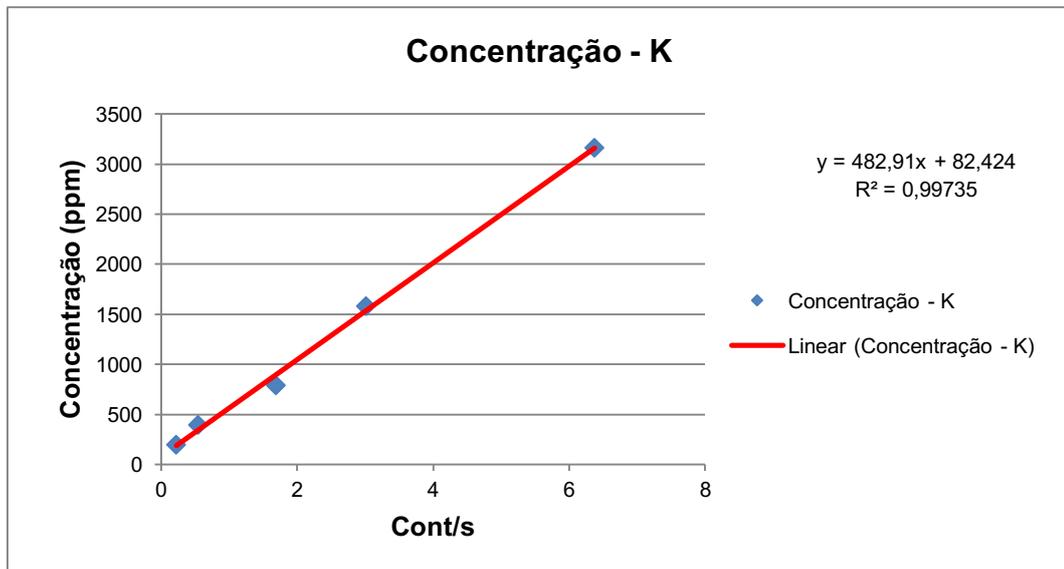
Figura 10 – Gráfico da concentração verdadeira de Cloro (ppm) em função do número de raios-X característicos que chegam no detector, em cont/s.



Nota: A linha vermelha mostra a reta que melhor se ajusta aos dados experimentais e seu respectivo desvio quadrático médio.

Fonte: Elaboração Própria.

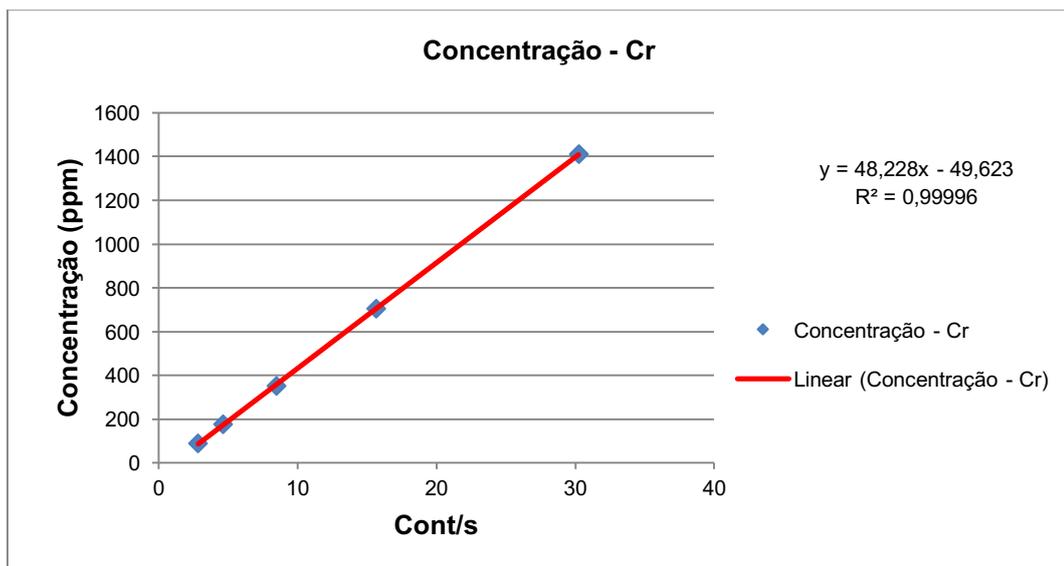
Figura 11 – Gráfico da concentração verdadeira de Potássio (ppm) em função do número de raios-X característicos que chegam no detector, em cont/s.



Nota: A linha vermelha mostra a reta que melhor se ajusta aos dados experimentais e seu respectivo desvio quadrático médio.

Fonte: Elaboração Própria.

Figura 12– Gráfico da concentração verdadeira de Cromo (ppm) em função do número de raios-X característicos que chegam no detector, em cont/s.

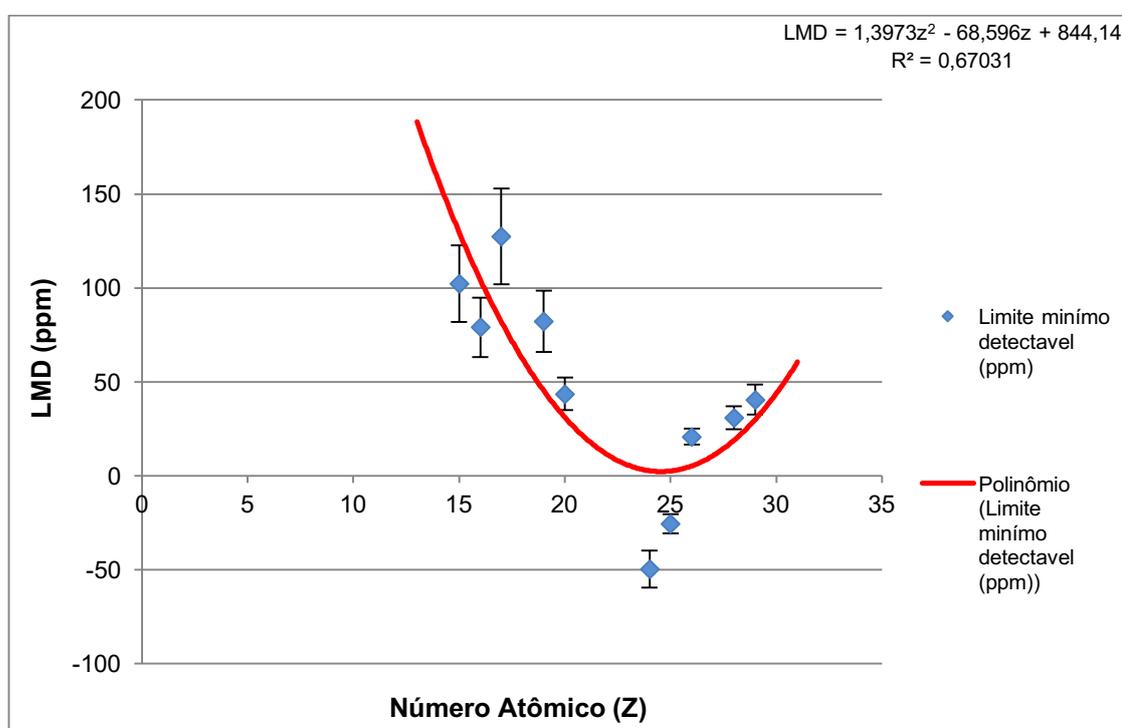


Nota: A linha vermelha mostra a reta que melhor se ajusta aos dados experimentais e seu respectivo desvio quadrático médio.

Fonte: Elaboração Própria.

Uma vez obtidas as retas de calibração, o ponto onde esta reta cruza o eixo das ordenadas, nos fornece o Limite Mínimo Detectável (LMD) para aquele elemento, ou seja, analisando as figuras 8, 9, 10 e 11 obtemos para o LMD, 79.468, 366.39, 82.424 e -49.623 ppm, respectivamente. Como o gráfico referente ao elemento Cromo cruza o eixo das ordenadas abaixo do zero (negativo), significa que temos sensibilidade de partes por bilhão (ppb) na detecção deste elemento. Os LMD para todas as amostras usadas na calibração do sistema de fluorescência são mostrados na Figura 13.

Figura 13 – Gráfico mostrando o LMD (ppm) em função do Número Atômico do elemento químico analisado.



Fonte: Elaboração própria.

5.3 Caracterização das amostras

Para caracterização dos indivíduos participantes, foi montado o quadro abaixo de modo de traçar o perfil dos sujeitos de estudo para futura comparação de dados (Tabela 2).

Tabela 2 – Caracterização dos participantes.

Amostragem					
Amostra	Sexo (M/F)	Idade (anos)	Fumante (Fu) / Não fumante (NF)	Tempo (anos)	Quantidade (Cigarros/dia)
1	M	30	NF	-	-
2	F	55	NF	-	-
3	F	56	Fu	43	30
4	F	27	NF	-	-
5	F	46	Fu	20	20
6	F	43	NF	-	-
7	F	54	NF	-	-
8	M	27	NF	-	-
9	M	52	NF	50	-
10	F	35	Fu	17	10
11	F	20	Fu	3	15
12	F	51	Fu	30	20
13	F	59	Fu	40	20
14	F	65	Fu	42	15
15	F	19	NF	-	-
16	F	34	NF	-	-
17	F	23	NF	-	-
18	F	33	NF	-	-
19	F	42	NF	-	-
20	F	31	NF	-	-
21	F	26	NF	-	-
22	M	27	NF	-	-
23	F	26	NF	-	-
24	M	48	Fu	28	20
25	M	36	Fu	15	10
26	M	41	Fu	26	20
27	F	53	Fu	12	20
28	F	49	Fu	35	30
29	F	46	Fu	26	16
30	M	33	Fu	17	30
31	M	24	Fu	4	10
32	M	21	Fu	6	20

Fonte: Elaboração própria.

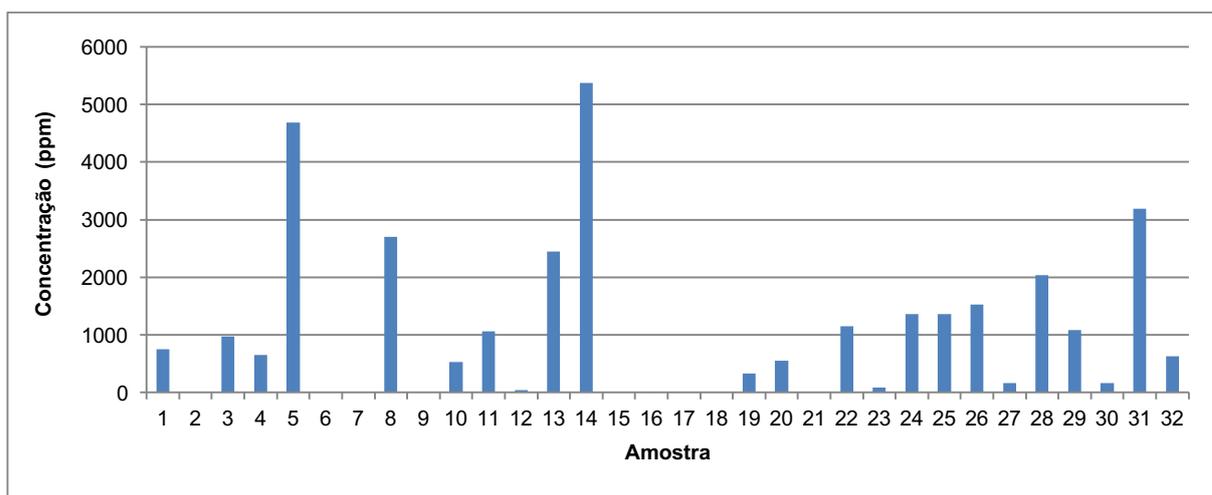
5.4 Resultados das análises por fluorescência de raios-X.

Como o tempo de análise para cada amostra era relativamente longo, fizemos apenas algumas medidas em triplicada, para termos parâmetros para fixarmos o erro envolvido nas medidas de fluorescência. Após obter o espectro de fluorescência das 32 amostras, o software XRF-FP, nos forneceu quais os elementos que estavam presentes e a suas respectivas quantidades em ppm.

5.4.1 Enxofre

Como pode ser visto na Figura 14, ocorre uma grande variação na quantidade de enxofre entre os indivíduos analisados. Em alguns indivíduos não detectamos a presença deste elemento, provavelmente por ter ficado abaixo do LMD, que para o Enxofre era de 79 ppm. A concentração média de enxofre em todas as amostras analisadas foi de 1369 ± 1416 ppm. O desvio padrão da média neste caso é enorme mostrando uma grande variabilidade do elemento, nas diferentes amostras analisadas.

Figura 14 – Concentração de Enxofre nas amostras.

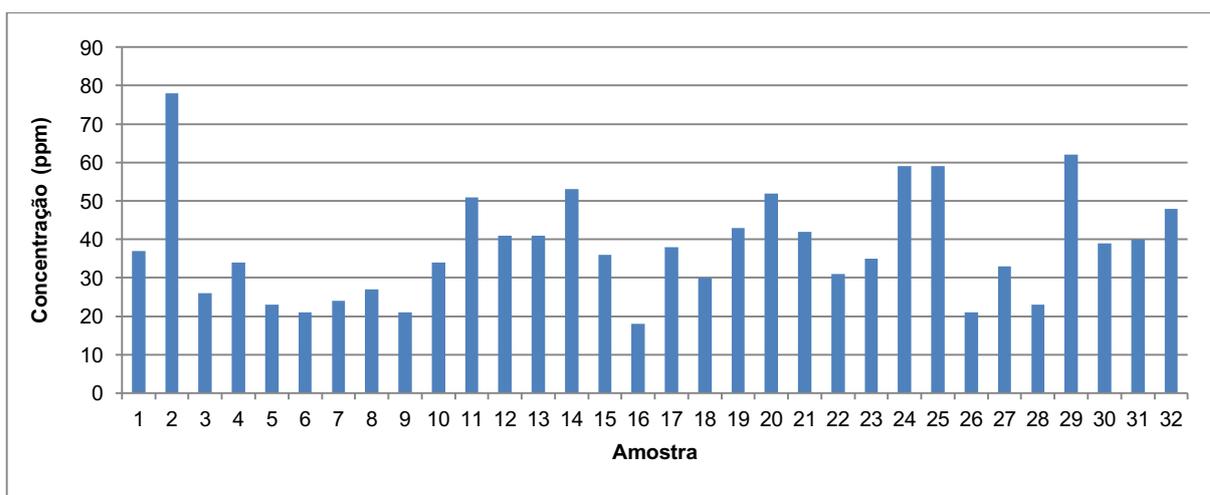


Fonte: Elaboração própria.

5.4.2 Níquel

Para todas as amostras o elemento Níquel foi detectado em concentrações próximas ao LMD que era de 31 ppm, conforme mostra a Figura 15. A concentração média de Níquel foi de 38 ± 14 ppm.

Figura 15 – Concentração de Níquel nas amostras.

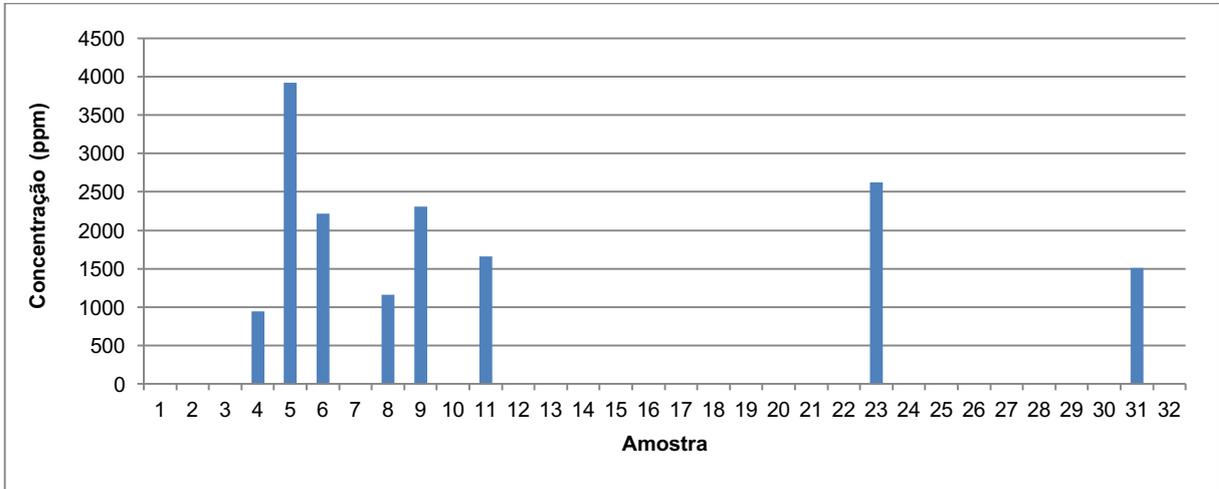


Fonte: Elaboração própria.

5.4.3 Fósforo

O elemento Fósforo foi encontrado apenas em 8 amostras, conforme mostra a Figura 16. O LMD para este elemento era de 100ppm. A concentração média considerando apenas as amostras onde o fósforo foi detectado foi de 2041 ± 953 ppm.

Figura 16 – Concentração de Fósforo nas amostras.

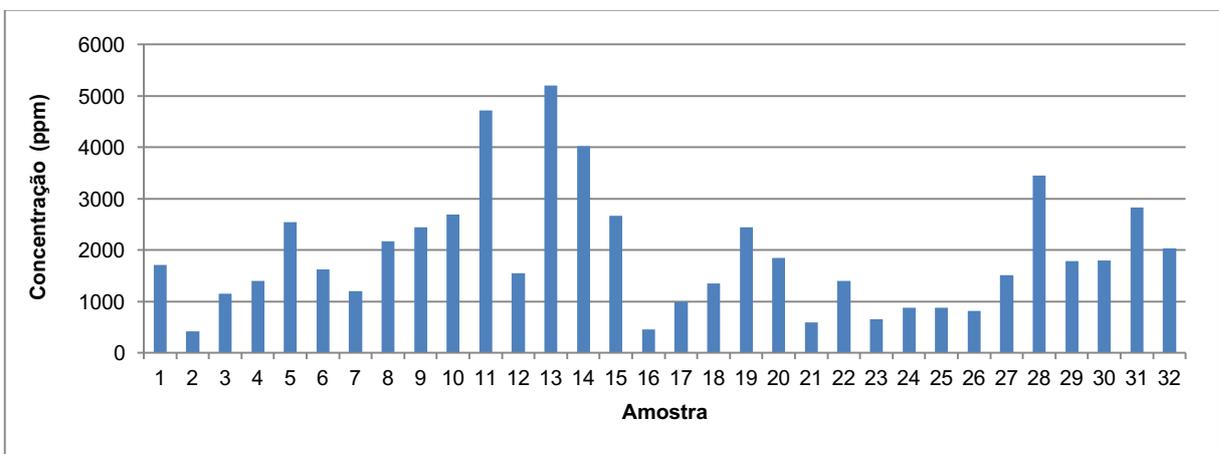


Fonte: Elaboração própria.

5.4.4 Cloro

O elemento Cloro foi encontrado em todas as amostras analisadas, conforme mostra a Figura 17. O LMD para este elemento era de 127 ppm. A concentração média de cloro foi de 1912 ± 1175 ppm.

Figura 17 – Concentração de Cloro nas amostras.

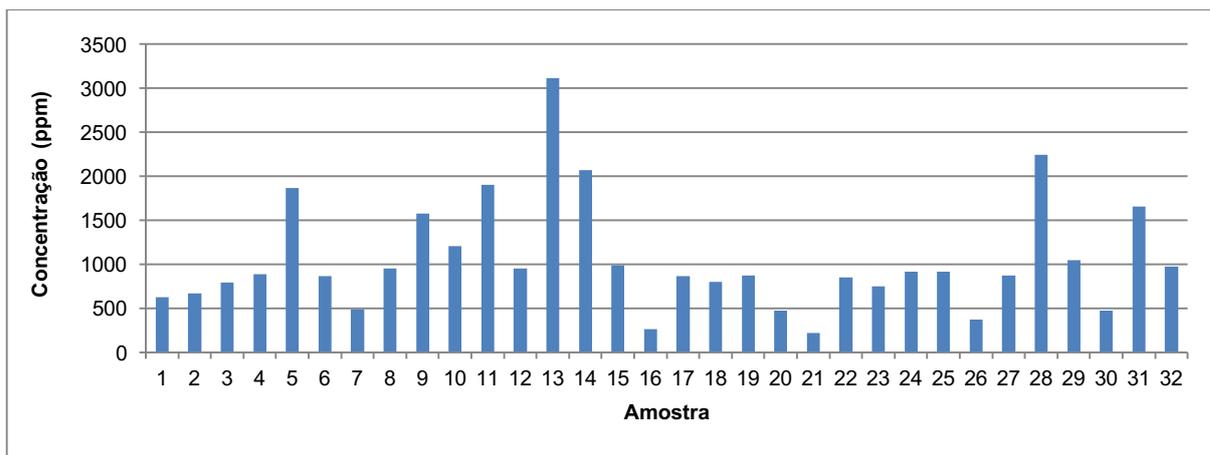


Fonte: Elaboração própria

5.4.5 Potássio

O elemento Potássio foi detectado em todas as amostras, conforme mostra a Figura 18. O LMD para este elemento era de 82 ppm. A concentração média de Potássio encontrada nas amostras foi de 9048 ± 630 ppm.

Figura 18 – Concentração de Potássio nas amostras.

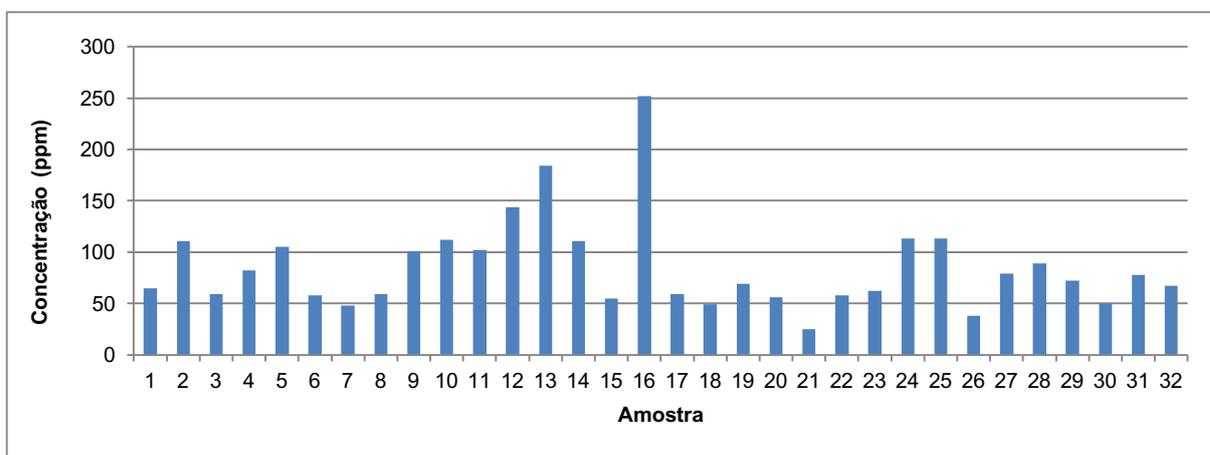


Fonte: Elaboração própria.

5.4.6 Cálcio

O elemento cálcio foi detectado em todas as amostras, conforme mostra a Figura 19. O LMD para este elemento era de 44 ppm. A concentração média de Cálcio foi de 85 ± 44 ppm.

Figura 19 – Concentração de Cálcio nas amostras.

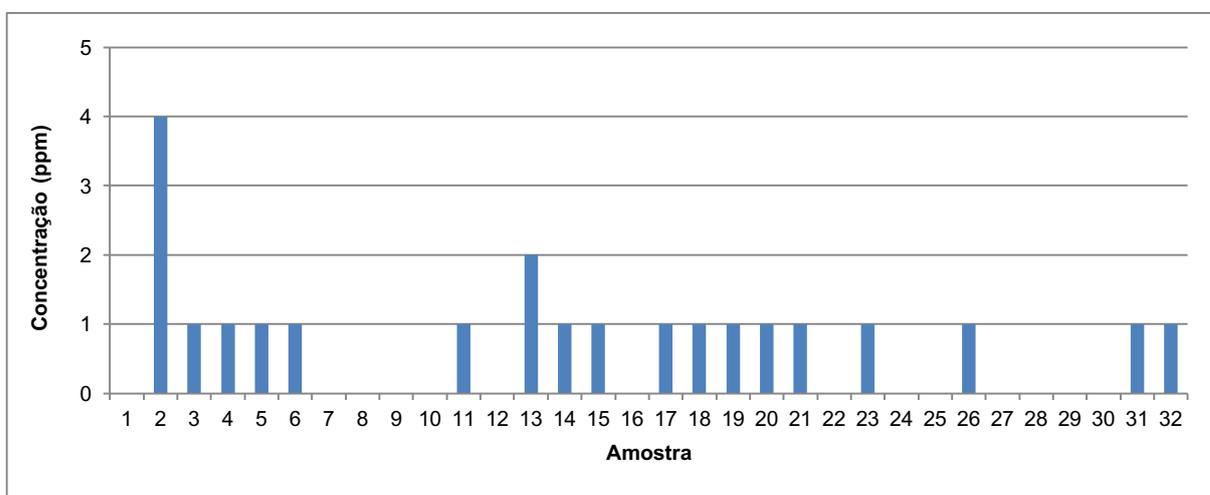


Fonte: Elaboração própria.

5.4.7 Cromo

O elemento Cromo foi detectado apenas como elemento traço, ou seja, em baixíssima concentração, conforme mostra a Figura 20. Porém o LMD para este elemento foi de 950 ppb, indicando que tínhamos sensibilidade para detectar quantidades da ordem de 1 ppm, conforme mostra a Figura 13. Dentre as amostras onde este elemento foi detectado, a média encontrada foi de 1.2 ± 0.7 ppm.

Figura 20 – Concentração de Cromo nas amostras.

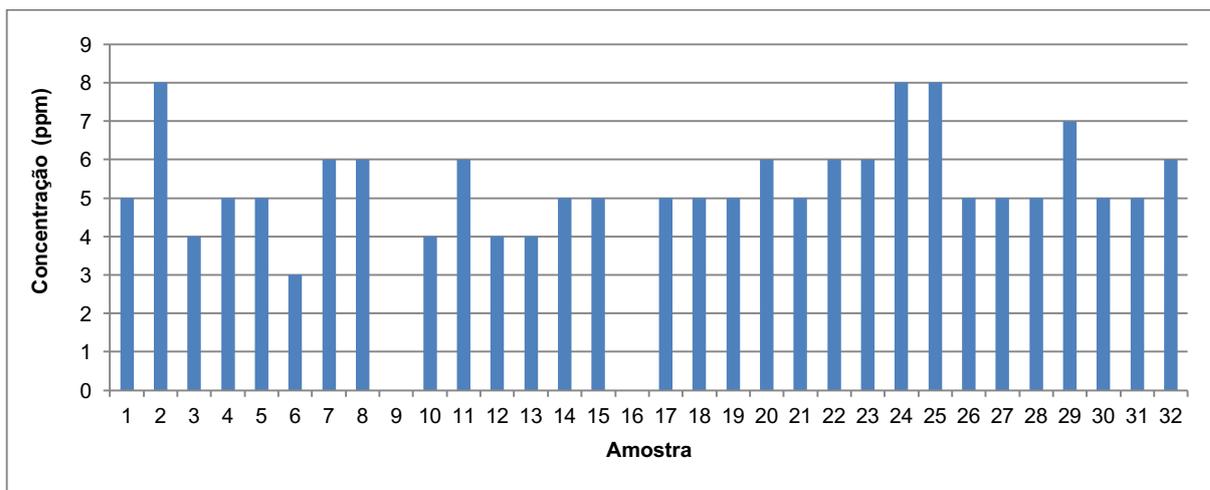


Fonte: Elaboração própria.

5.4.8 Manganês

A Figura 21 mostra as concentrações do elemento Manganês nas amostras analisadas. O sistema de fluorescência também se mostrou muito sensível na detecção do Manganês, sendo o LMD de 999,97 ppb. A concentração média de Manganês foi de 5.1 ± 1.7 ppm.

Figura 21 – Concentração de Manganês nas amostras.

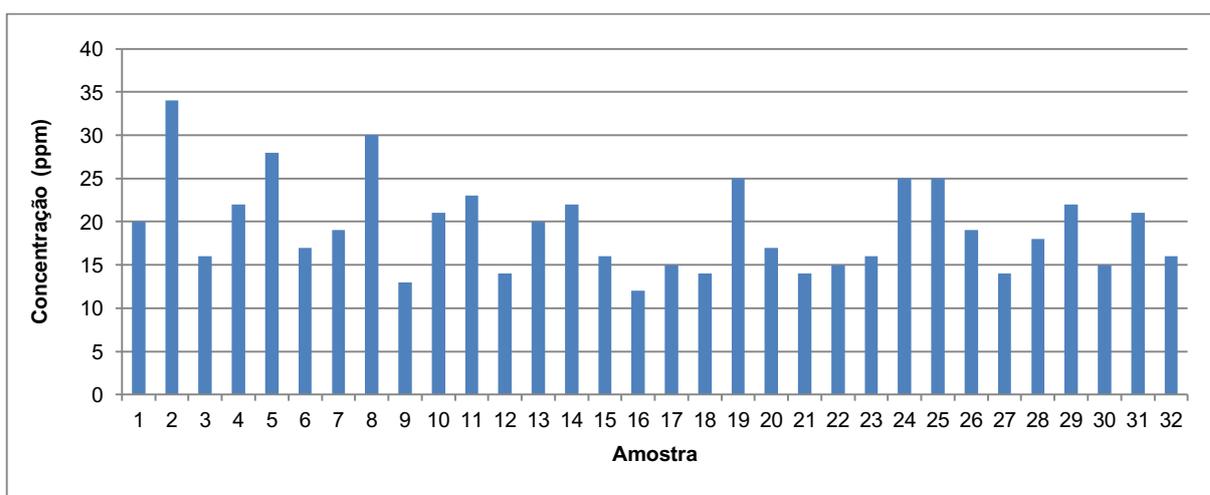


Fonte: Elaboração própria.

5.4.9 Ferro

O elemento Ferro apresentou pouca variabilidade dentre as amostras analisadas. O LMD para o Ferro era de 21 ppm. A Figura 22 mostra que para vários indivíduos o valor detectado estava abaixo do LMD, indicando um erro maior no valor determinado. O valor médio encontrado foi de 19 ± 5 ppm.

Figura 22 – Concentração de Ferro nas amostras.

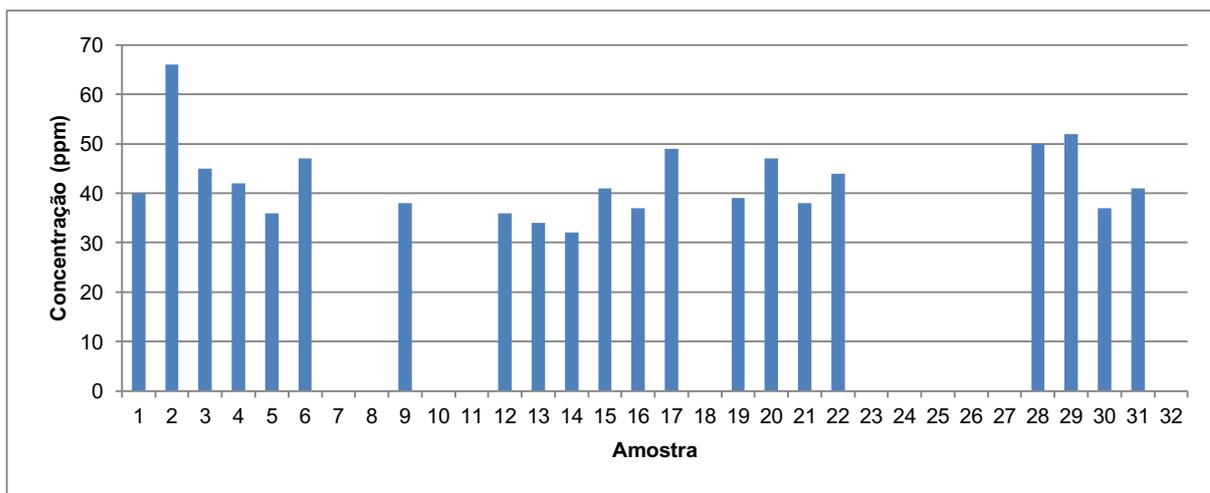


Fonte: Elaboração própria.

5.4.10 Cobre

A Figura 23 mostra as concentrações obtidas para o elemento Cobre. O LMD para este elemento era de 40 ppm. A média encontrada para este elemento foi de 42 ± 7 ppm.

Figura 23 – Concentração de Cobre nas amostras.

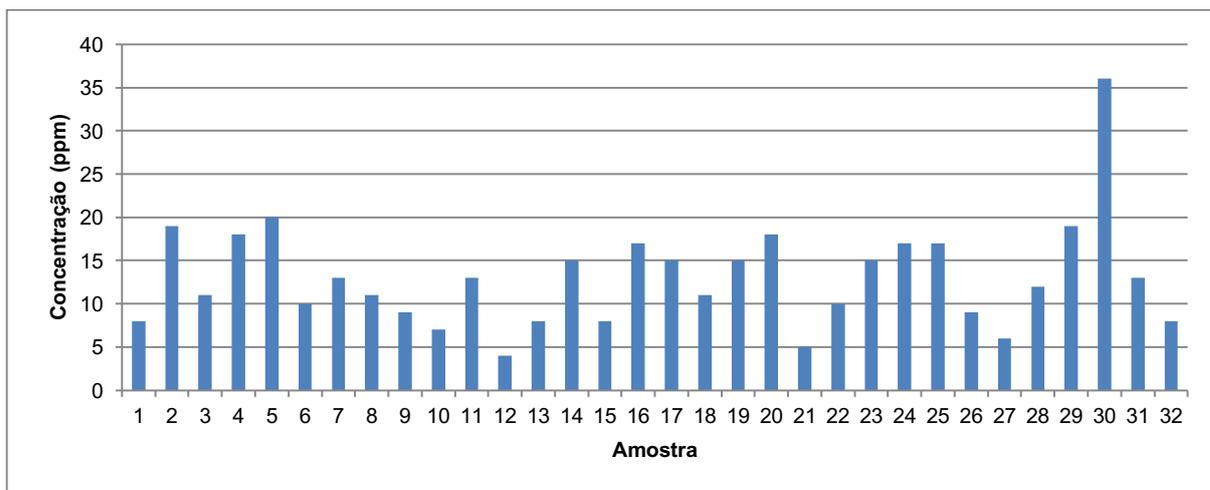


Fonte: Elaboração própria.

5.4.11 Titânio

A Figura 24 mostra as concentrações obtidas para o elemento Titânio. O LMD para este elemento não foi determinado experimentalmente, porque o mesmo é pouco solúvel em água e nas concentrações que deveríamos fazer as calibrações, o mesmo se depositava no fundo do recipiente, impossibilitando a medida. O Valor do LMD obtido utilizando a curva de calibração $LMD = 1.3973z^2 - 68.596z + 844.14$ foi de 11 ppm. O valor médio encontrado para este elemento foi de 13 ± 6 ppm.

Figura 24 – Concentração de Titânio nas amostras.

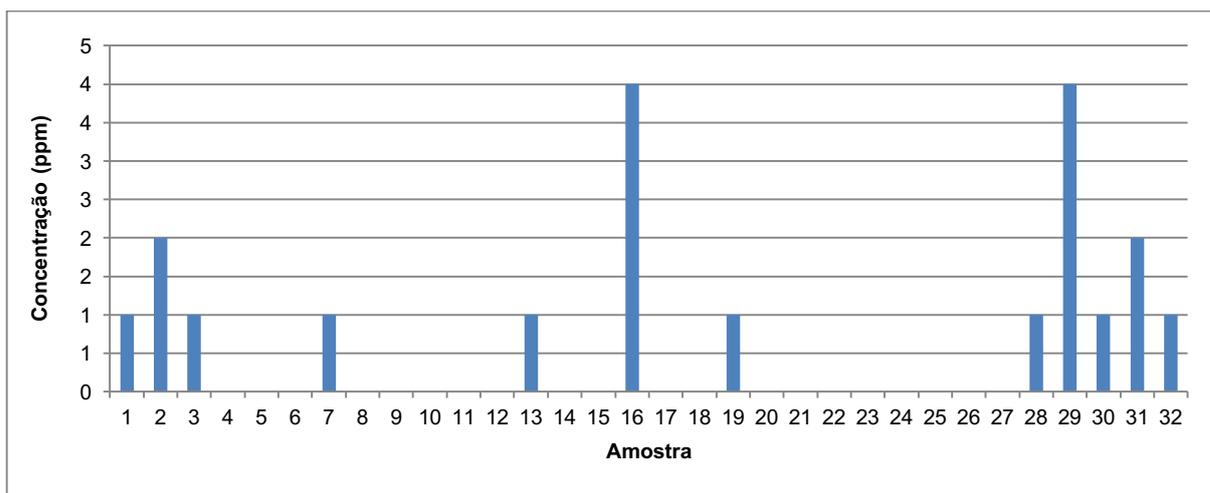


Fonte: Elaboração própria.

5.4.12 Vanádio

O elemento Vanádio foi encontrado em poucas amostras e em concentrações muito baixas, conforme mostra a Figura 25.

Figura 25 – Concentração de Vanádio nas amostras.



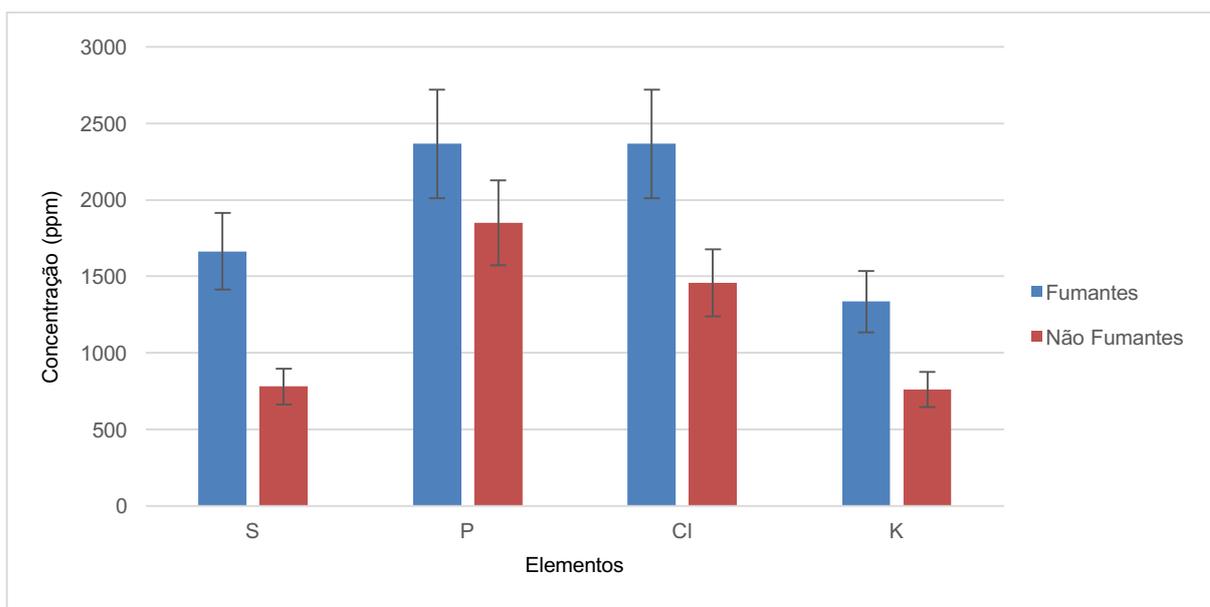
Fonte: Elaboração própria.

O LMD também não foi medido experimentalmente para o elemento Vanádio. O Valor do LMD obtido utilizando a curva de calibração $LMD = 1.3973z^2 - 68.596z + 844.14$ foi de 6 ppm. O valor médio encontrado para este elemento foi de 1.3 ± 1.2 ppm.

5.5 Análise comparativa dos resultados

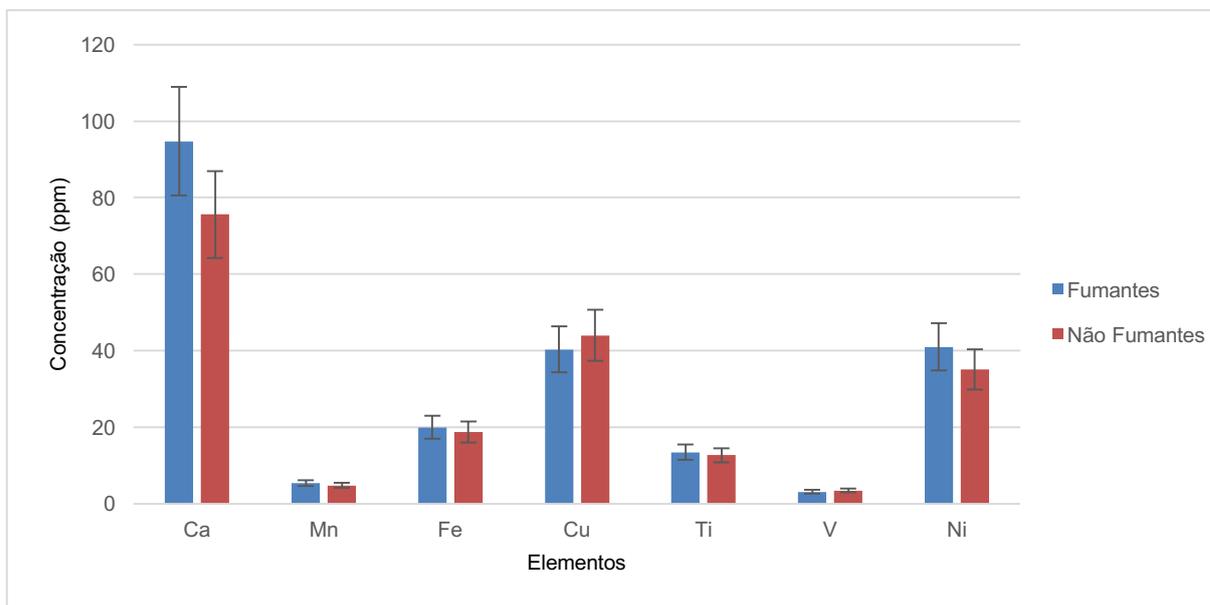
Uma vez identificado e quantificado os principais elementos presentes nas amostras, fizemos um estudo comparativo das concentrações encontradas nos dois grandes grupos utilizados neste trabalho, ou seja, indivíduos fumantes e não fumantes. Como as concentrações variam muito de elemento para elemento, para facilitar a visualização, os dados serão apresentados divididos em dois grupos, a saber: a) os de maior concentração envolvendo os elementos S, P, Cl e K e b) os que possuem concentração menor, envolvendo os elementos Ca, Mn, Fe, Cu, Ti, V e Ni. Os erros foram estimados das medidas feitas em triplicata, ficando entre 15% a 20%. As Figuras 26 e 27 mostram as concentrações dos elementos encontrados nas amostras de saliva de indivíduos fumantes e não fumantes.

Figura 26 – Gráfico de concentração média (ppm) dos elementos químicos: S, P, Cl e K, encontrados nas amostras de saliva de fumantes e não fumantes.



Fonte: Elaboração própria.

Figura 27 – Gráfico de concentração média (ppm) dos elementos químicos: Ca, Mn, Fe, Cu, Ti, V e Ni, encontrados nas amostras de saliva de fumantes e não fumantes.

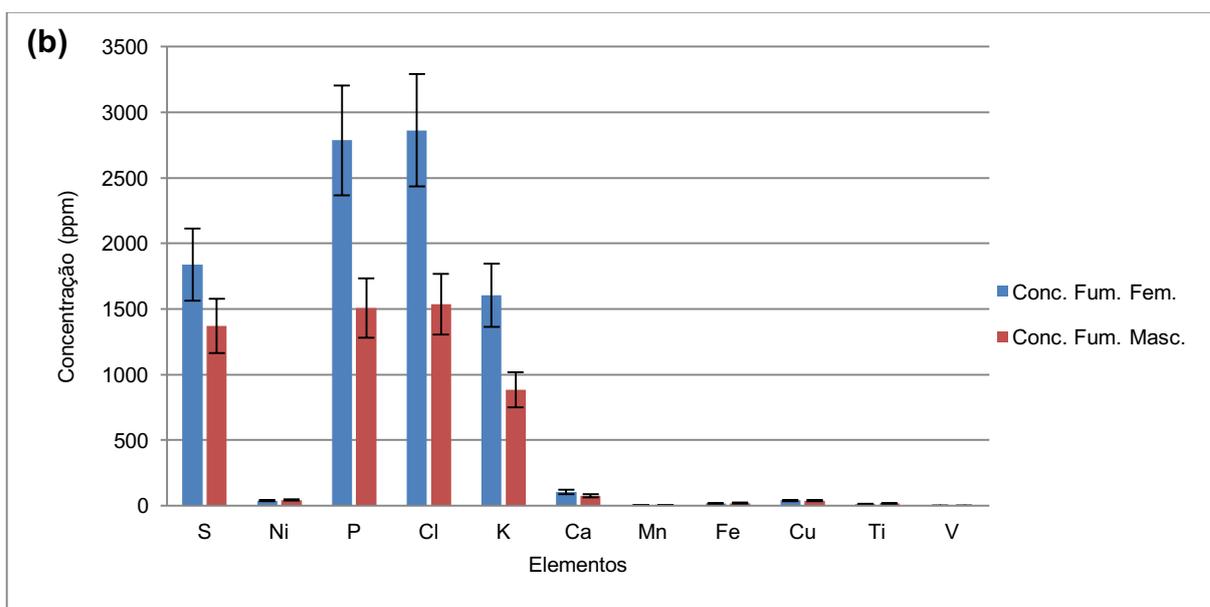
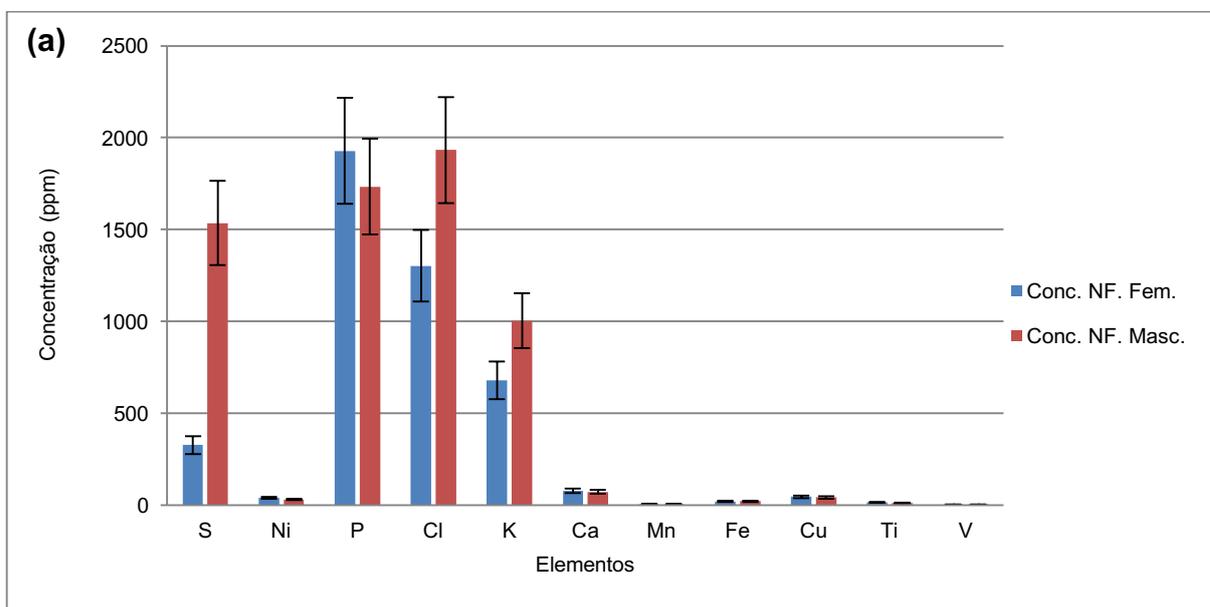


Fonte: Elaboração própria.

A Figura 26 mostra que a concentração dos elementos S, P, Cl e K aumentam com o hábito de fumar. Para os elementos que aparecem em menores concentrações, mostrados na Figura 27, ou seja, Ca, Mn, Fe, Cu, Ti, V e Ni o hábito de fumar parece interferir menos na concentração destes elementos, mas em média mostrando um pequeno acréscimo na concentração dos elementos na saliva dos fumantes.

Quando separarmos por sexo estes dois grupos e analisamos a concentração dos diferentes elementos químicos presentes na saliva dos fumantes masculinos e femininos, encontramos diferenças, conforme mostram as Figuras 28a e 28b.

Figura 28 – Gráfico de concentração média (ppm) dos elementos químicos encontrados nas amostras de saliva de indivíduos não fumantes divididos por sexo. (a) Elementos: S, P, Cl e K. (b) Elementos: Ca, Mn, Fe, Cu, Ti, V e Ni.



Legenda: Conc. Fum. Fem. = Concentração Fumante Feminino, Conc. NF. Fem. = Concentração Não Fumante Feminino, Conc. Fum. Masc. = Concentração Fumante Masculino, Conc. NF. Masc. = Concentração Não Fumante Masculino.

Fonte: Elaboração própria.

A Figura 28a mostra que em média a saliva dos não fumantes de ambos os sexos possuem concentrações próximas, com exceção do elemento S, que aparece

numa concentração maior na saliva dos homens. No entanto, analisando a Figura 28b, para os elementos de maior concentração (S, P, Cl e K), é evidente o aumento na concentração destes elementos na saliva dos indivíduos fumantes do sexo feminino, indicando que o hábito de fumar, parece influenciar mais na composição da saliva das mulheres do que na dos homens.

A Tabela 3 traz os valores mostrados nos gráficos das Figuras 27 e 28.

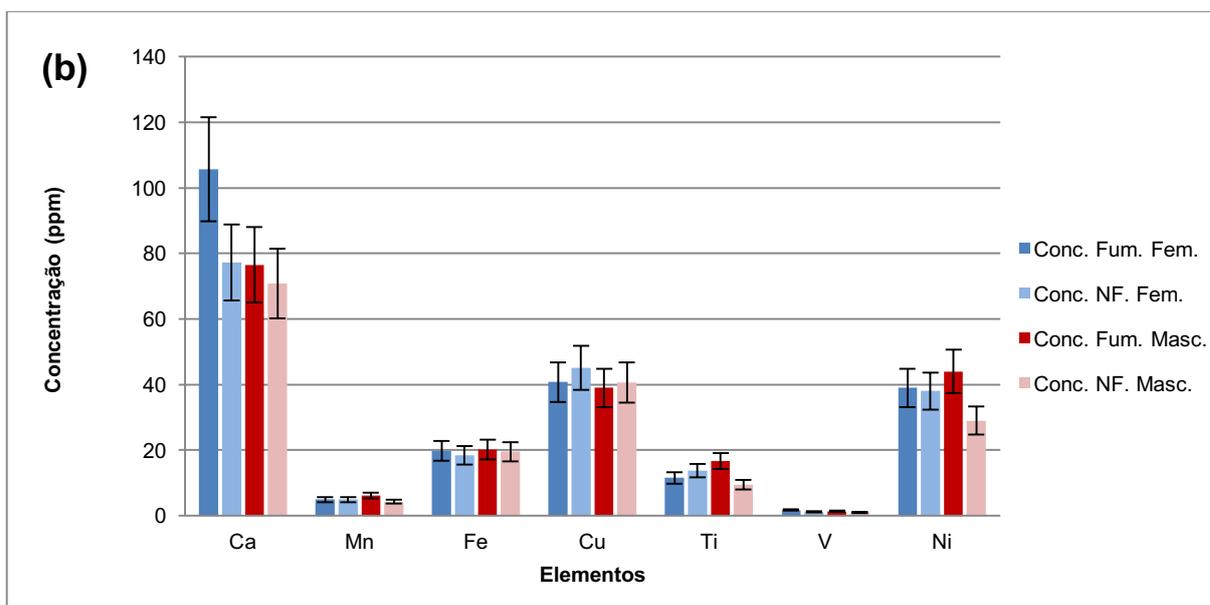
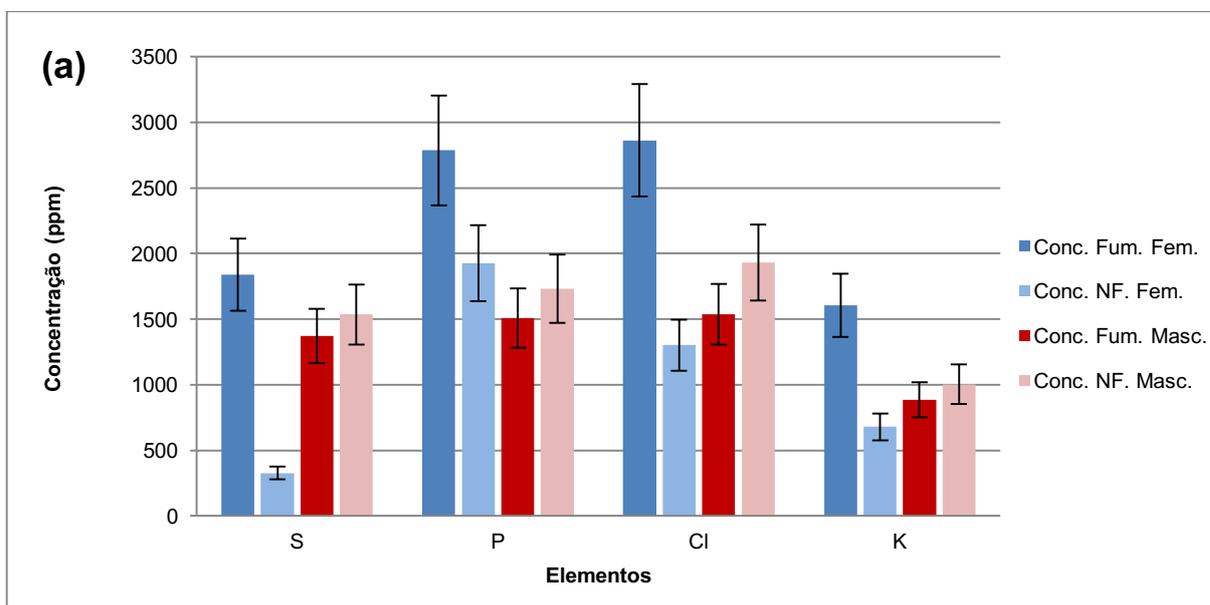
Tabela 3 – Comparação dos valores obtidos (concentração média e desvio) entre os sexos masculino e feminino em indivíduos fumantes e não fumantes.

Elemento químico	Fumante		Não Fumante	
	Masc.	Fem.	Masc.	Fem.
S	1371±205	1839±275	1535±230	326±49
P	1508±226	2786±417	1733±260	1927±289
Cl	1537±230	2863±429	1932±290	1301±196
K	885±132	1606±240	1002±150	679±102
Ca	76±11	105±15	71±11	77±12
Mn	6±1	5±1	4±1	5±1
Fe	20±3	20±3	20±3	18±3
Cu	39±6	41±6	41±6	45±7
Ti	17±3	12±2	10±2	14±2
V	1±0.2	2±0.3	1±0.2	1±0.2
Ni	44±7	39±6	29±5	38±6

Fonte: Elaboração própria.

As Figuras 29a e 29b, mostram todos os dados agrupados para uma melhor visualização do que ocorre, com a concentração dos elementos presentes na saliva, separados entre fumantes e não fumantes e divididos por sexo.

Figura 29 – Gráfico de concentração média (ppm) dos elementos químicos encontrados nas amostras de saliva de indivíduos fumantes e não fumantes divididos por sexo. (a) Elementos: S, P, Cl e K. (b) Elementos: Ca, Mn, Fe, Cu, Ti, V e Ni.



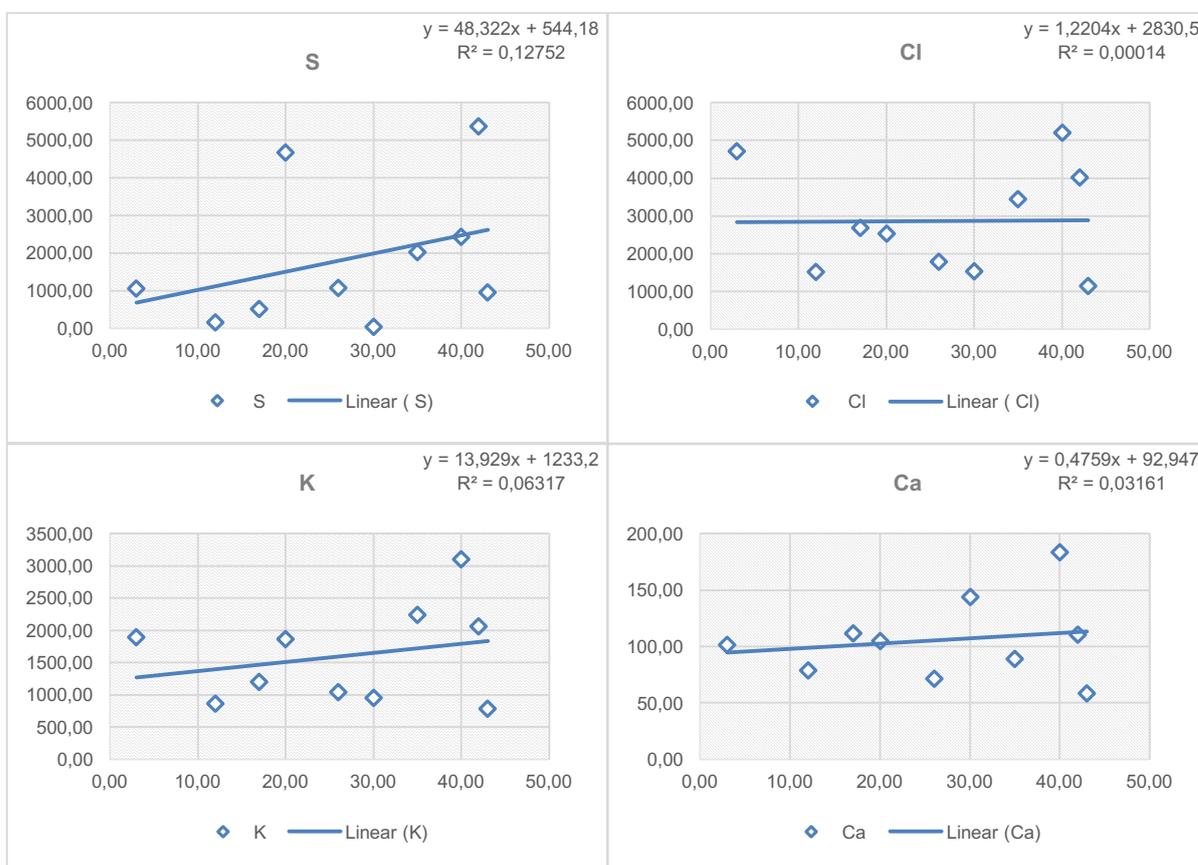
Legenda: Conc. Fum. Fem. = Concentração Fumante Feminino, Conc. NF. Fem. = Concentração Não Fumante Feminino, Conc. Fum. Masc. = Concentração Fumante Masculino, Conc. NF. Masc. = Concentração Não Fumante Masculino.

Fonte: Elaboração própria.

Quando analisamos a concentração dos elementos químicos (S, Cl, K e Ca) dos fumantes dos sexos feminino e masculino, em função do tempo de uso do cigarro, também observamos uma tendência de aumento na concentração destes

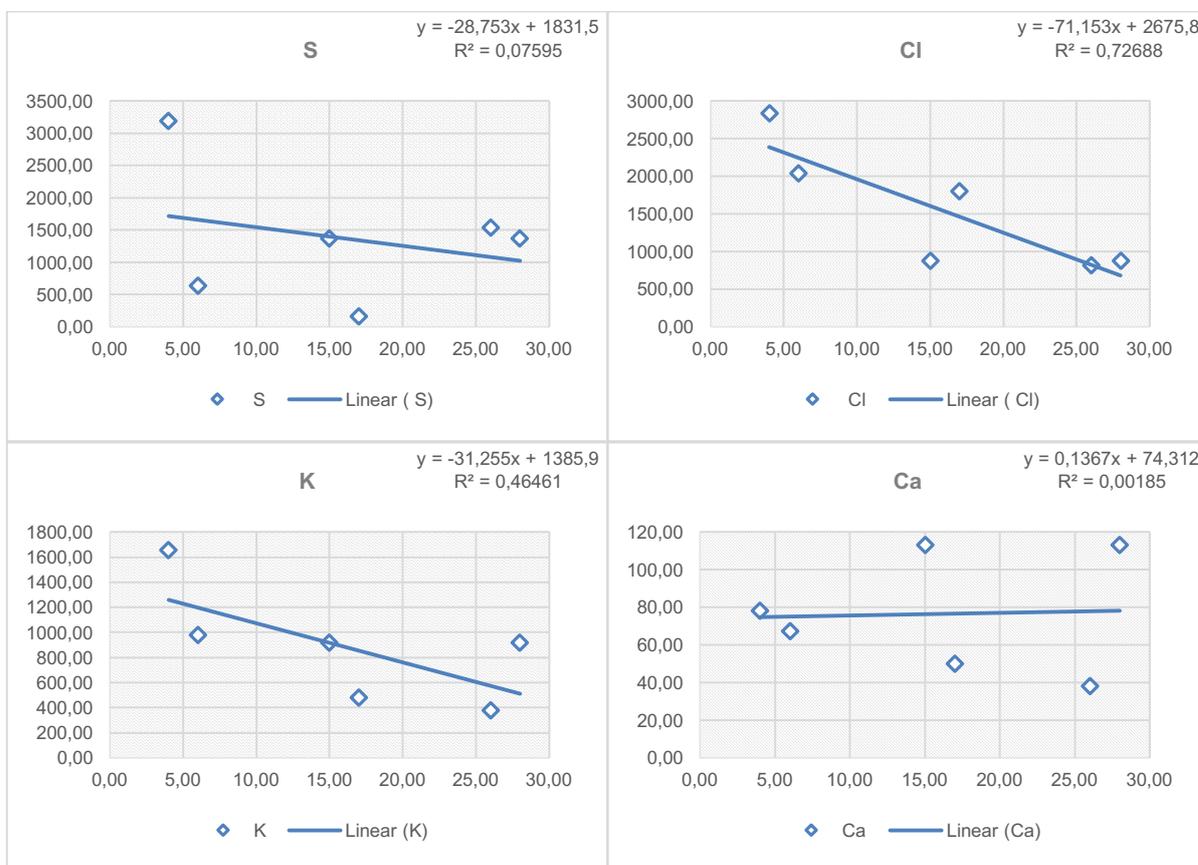
elementos em função do tempo de uso do cigarro para o sexo feminino e uma diminuição no caso do sexo masculino, conforme mostram as Figuras 30 e 31. Analisando-se o coeficiente angular da reta que melhor ajusta os dados experimentais, no caso dos fumantes do sexo feminino, todas apresentam um coeficiente angular positivo, indicando um aumento na concentração dos elementos analisados. No caso do sexo masculino, com exceção do ajuste linear relativo ao elemento Ca, as demais retas possuem coeficiente angular negativo, indicando diminuição da concentração com o tempo de uso do cigarro, para estes elementos.

Figura 30 – Comparativo de concentração x tempo de consumo em fumantes femininos.



Fonte: Elaboração Própria.

Figura 31 – Comparativo de concentração x tempo de consumo em fumantes masculinos.



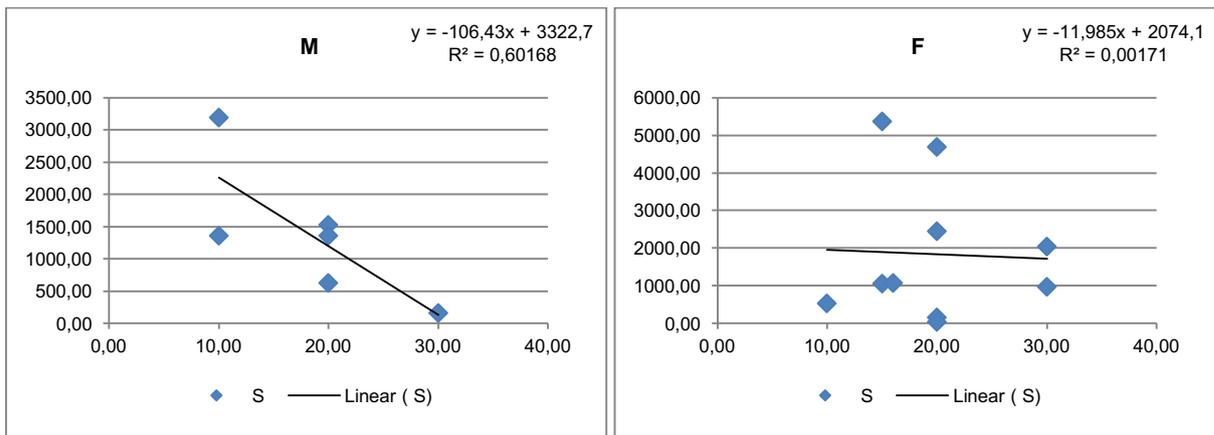
Fonte: Elaboração Própria.

Quando analisamos a concentração dos principais elementos presentes na saliva dos fumantes masculinos e femininos em função da quantidade de cigarros consumidos ao longo de um dia, verificamos que para o sexo masculino as concentrações tendem a diminuir em função do número de cigarros consumidos, muito mais do que a diminuição média encontrada para o sexo feminino, conforme mostram as Figuras 32, 33, 34, 35 e 36 para os elementos S, K, Ni e Cl, respectivamente.

Como o hábito de fumar para o público em geral (masculino e feminino), em média, aumenta a concentração de alguns elementos químicos presentes na saliva, as Figuras 32, 33, 34, 35 e 36 parecem indicar que o consumo de poucos cigarros diários, teria um efeito de aumentar a concentração destes elementos químicos, muito mais do que o consumo de muitos cigarros por dia. Por outro lado, o fumante

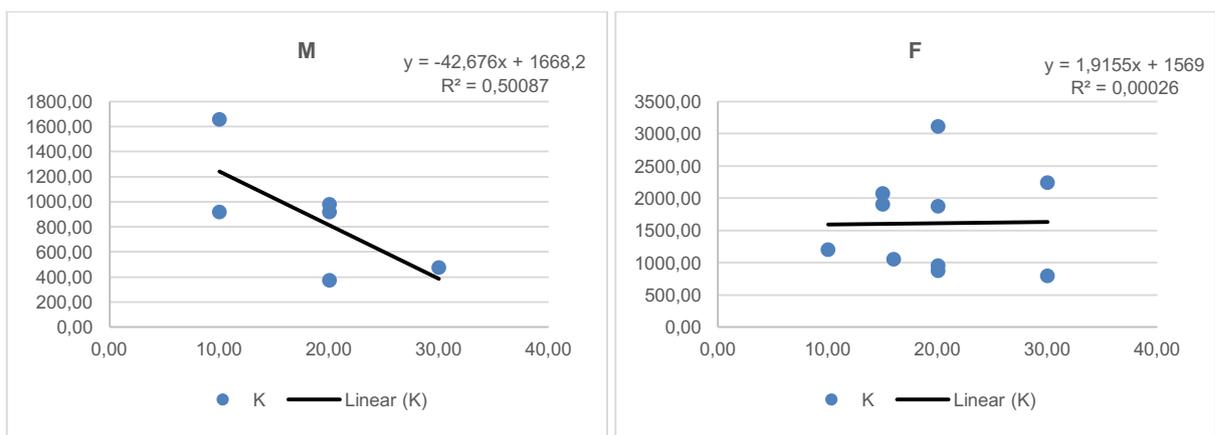
masculino que fuma vários cigarros diariamente, os dados mostram uma tendência de diminuição na concentração de alguns elementos, muito mais do que o verificado nos fumantes do sexo feminino, indicando que o hábito de fumar parece ser mais maléfico para o sexo feminino do que para o masculino.

Figura 32 – Gráfico da Concentração (ppm) em função do número de cigarros consumidos por dia. A reta que melhor se ajusta aos dados experimentais e seu desvio quadrático médio é mostrado no gráfico, para o elemento químico Enxofre, de indivíduos fumantes dos sexos masculinos (M) e femininos (F).



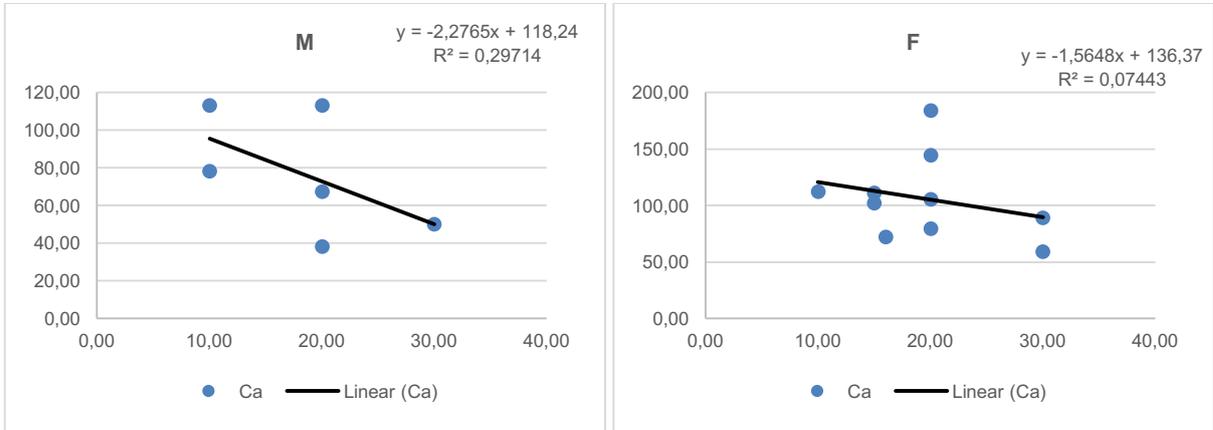
Fonte: Elaboração Própria.

Figura 33 – Gráfico da Concentração (ppm) em função do número de cigarros consumidos por dia. A reta que melhor se ajusta aos dados experimentais e seu desvio quadrático médio é mostrado no gráfico, para o elemento químico Potássio, de indivíduos fumantes dos sexos masculinos (M) e femininos (F).



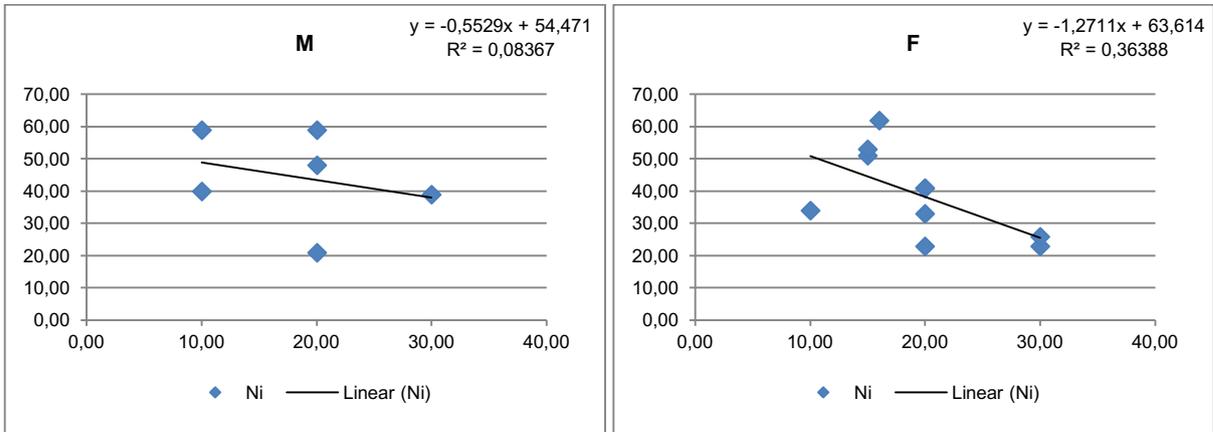
Fonte: Elaboração Própria.

Figura 34 – Gráfico da Concentração (ppm) em função do número de cigarros consumidos por dia. A reta que melhor se ajusta aos dados experimentais e seu desvio quadrático médio é mostrado no gráfico, para o elemento químico Cálcio, de indivíduos fumantes dos sexos masculinos (M) e femininos (F).



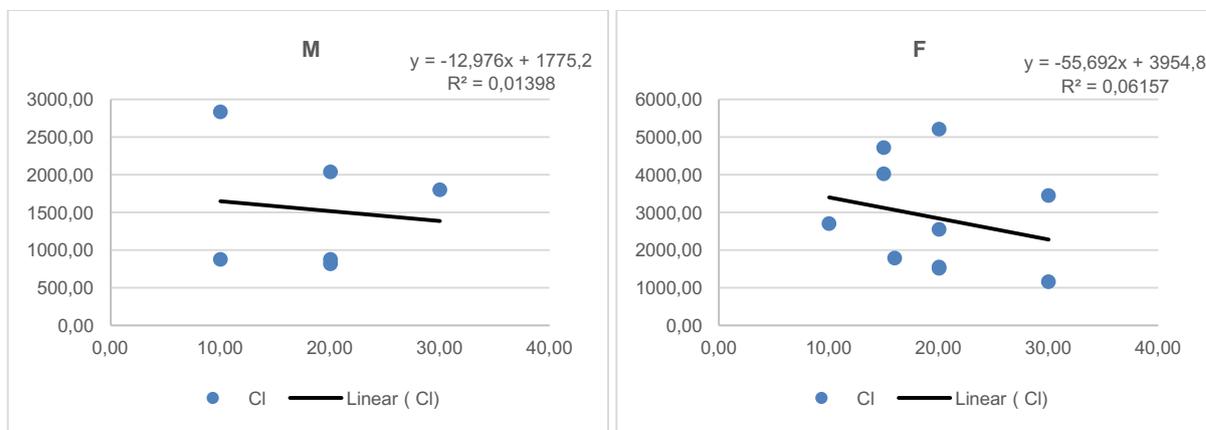
Fonte: Elaboração Própria.

Figura 35 – Gráfico da Concentração (ppm) em função do número de cigarros consumidos por dia. A reta que melhor se ajusta aos dados experimentais e seu desvio quadrático médio é mostrado no gráfico, para o elemento químico Níquel, de indivíduos fumantes dos sexos masculinos (M) e femininos (F).



Fonte: Elaboração Própria.

Figura 36 – Gráfico da Concentração (ppm) em função do número de cigarros consumidos por dia. A reta que melhor se ajusta aos dados experimentais e seu desvio quadrático médio é mostrado no gráfico, para o elemento químico Cloro, de indivíduos fumantes dos sexos masculinos (M) e femininos (F).

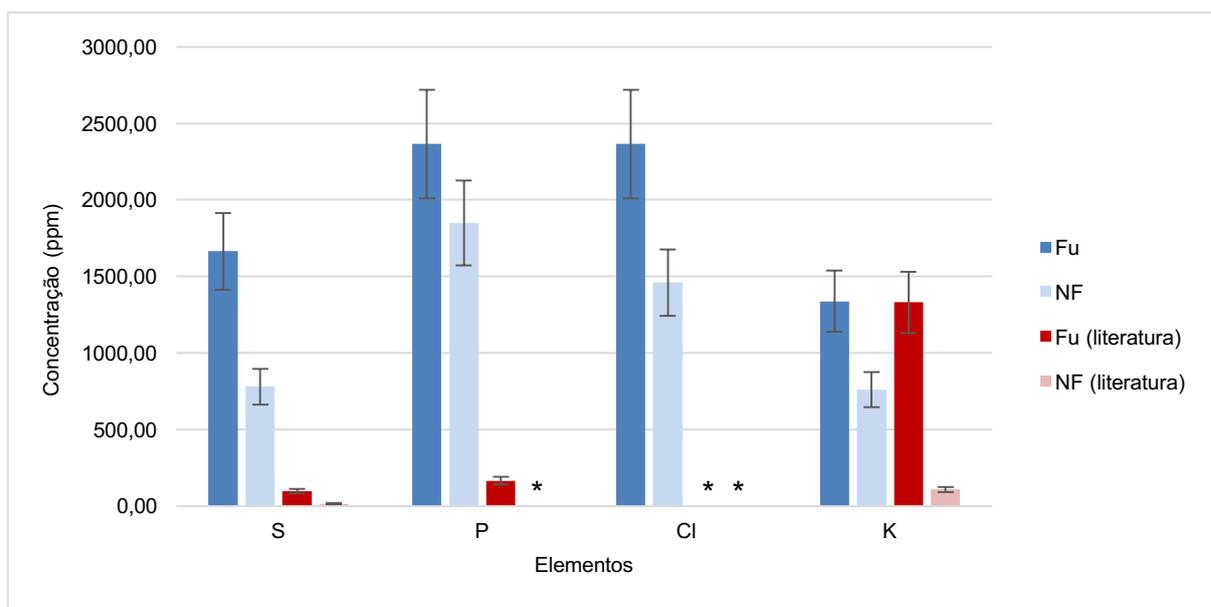


Fonte: Elaboração Própria.

A análise destes dados de forma geral indica que o hábito de fumar acarreta mudanças na concentração dos elementos químicos presentes na saliva. A mudança é mais significativa na concentração dos elementos S, P, Cl e K. Para os elementos Ca, Mn, Fe, Cu, Ti, V e Ni as mudanças encontradas por nós foram pequenas, e se consideramos os desvios envolvidos nestas medidas, não podemos afirmar que houve mudança na concentração destes elementos. Ao compararmos a saliva de fumantes e não fumantes as alterações nas concentrações são maiores na saliva dos fumantes do sexo feminino. Quando analisamos os dados em função do tempo em que o indivíduo faz uso do cigarro, os dados indicam que a concentração dos elementos tende a aumentar com o tempo do uso do cigarro para o sexo feminino e diminuir para o masculino. Por fim, a análise da concentração dos elementos em função do consumo de cigarros por dia, indica que em média, as concentrações de alguns elementos diminuem conforme o número de cigarros consumidos diariamente cresce, com uma diminuição maior para os fumantes do sexo masculino. Como para o público em geral, o consumo de cigarro tende a aumentar a concentração dos elementos, pode-se concluir que o hábito de fumar parecer ser mais prejudicial para o sexo feminino do que para o masculino.

As Figuras 37 e 38 mostram os resultados deste trabalho comparados com dados que Abraham et al., (2010) obteve para análise de saliva, usando a Técnica de Fluorescência de Raios-X por Reflexão Total (TXRF).

Figura 37 – Gráfico da concentração (ppm) dos elementos S, P, Cl e K obtidos neste trabalho, comparados com dados de Abraham et al., (2010).

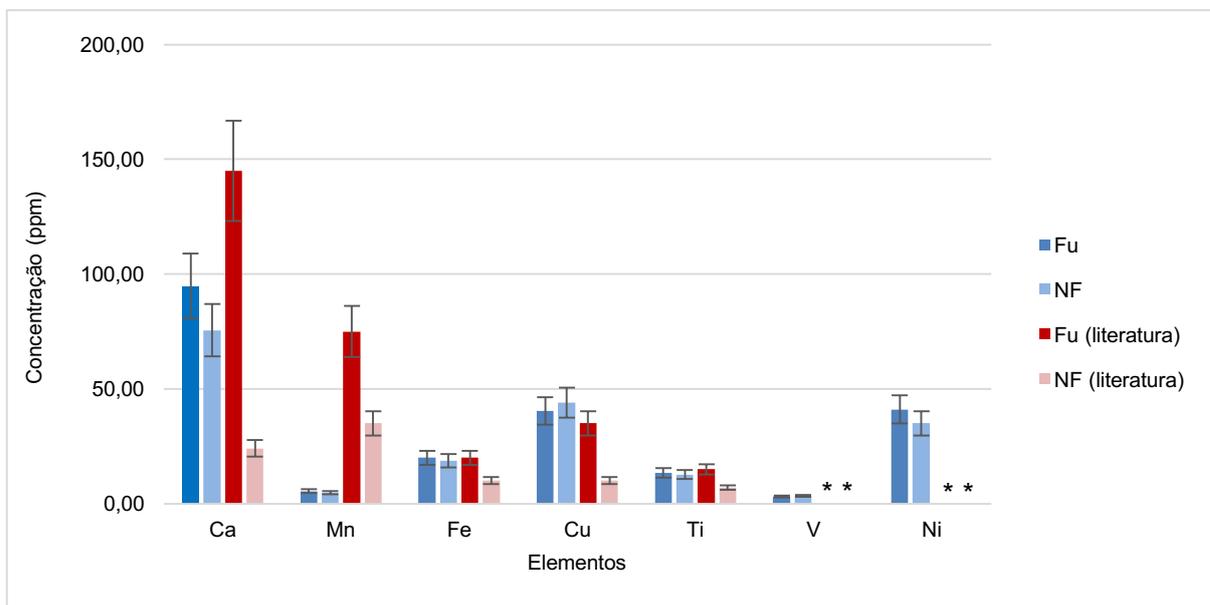


Nota: * Não apresenta resultado para esse elemento.

Legenda: Fu = Fumantes, deste trabalho; NF = Não fumantes, deste trabalho; Fu (literatura) = Fumantes, segundo dados de Abraham et al., (2010); NF (literatura) = Não Fumantes, segundo dados de Abraham et al., (2010).

Fonte: Elaboração Própria.

Figura 38 – Gráfico da Concentração (ppm) dos elementos Ca, Mn, Fe, Cu, Ti, V e Ni obtidos neste trabalho, comparados com dados de Abraham et al., (2010).



Nota: * Não apresenta resultado para esse elemento.

Legenda: Fu = Fumantes, deste trabalho; NF = Não fumantes, deste trabalho; Fu (literatura) = Fumantes, segundo dados de Abraham et al., (2010); NF (literatura) = Não Fumantes, segundo dados de Abraham et al., (2010).

Fonte: Elaboração Própria.

Para alguns elementos químicos os valores de concentração obtidos neste trabalho são iguais aos dados encontrados na literatura, como no artigo publicado por Abraham et al., (2010), exemplo são os elementos K, Ca, Fe, Cu e Ti para fumantes e Fe e Ti para não fumantes, porém há discrepâncias para as concentrações dos demais elementos tanto para fumantes como para não fumantes. Estas diferenças podem estar relacionadas à sensibilidade das técnicas utilizadas.

6 CONCLUSÃO

Mostramos neste trabalho que é possível utilizar a técnica de EDXRF para análise de saliva humana, em detrimento de outra técnica muito utilizada e até mais sensível denominada TXRF, porém de implementação mais trabalhosa para pequenos laboratórios de pesquisa.

Os resultados qualitativos obtidos da análise da saliva indicaram a presença dos seguintes elementos químicos: S, Ni, P, Cl, K, Ca, Cr, Mn, Fe, Cu, Ti e V. Em uma amostra de saliva, de um indivíduo do sexo feminino e não fumante foi detectado a presença do elemento Arsênico, na concentração de 47 ± 37 ppm. As maiores concentrações para os indivíduos fumantes foram dos elementos S, P, Cl e K, com valores acima de 1000ppm. Os demais elementos analisados para os indivíduos fumantes ficaram abaixo de 100ppm.

Os dados mostram que a concentração dos elementos encontrados na saliva, tende a ser maior para os indivíduos fumantes quando comparado aos não fumantes. Os dados indicam que ocorrem maiores mudanças na saliva dos indivíduos fumantes do sexo feminino. A diferença de concentração encontrada para os elementos S, P, Cl e K para a saliva de indivíduos do sexo feminino é maior que aquela vista para os indivíduos do sexo masculino.

Quando analisamos a concentração dos elementos químicos S, Cl, K e Ca dos indivíduos fumantes, em função do tempo de uso do cigarro, observamos uma tendência de aumento na concentração destes elementos em função do tempo de uso do cigarro para o sexo feminino e uma diminuição no caso do sexo masculino.

Quando analisamos a concentração dos elementos S, K, Ni e Cl presentes na saliva dos fumantes masculinos e femininos em função da quantidade de cigarros consumidos ao longo de um dia, verificamos que para o sexo masculino as concentrações tendem a diminuir em função do número de cigarros consumidos, muito mais do que a diminuição média encontrada para o sexo feminino.

Como o hábito de fumar para o público em geral (masculino e feminino), em média, aumenta a concentração de alguns elementos químicos presentes na saliva, os nossos resultados indicam que o consumo de poucos cigarros diários, teria um efeito de aumentar a concentração destes elementos químicos, muito mais do que o consumo de muitos cigarros por dia. Por outro lado, o fumante masculino que fuma

vários cigarros diariamente, os dados mostram uma tendência de diminuição na concentração de alguns elementos, muito mais do que o verificado nos fumantes do sexo feminino, indicando que o hábito de fumar parece ser mais maléfico para o sexo feminino do que para o masculino.

Por fim se compararmos os dados deste estudo com os encontrados na literatura, nossos dados corroboram para alguns elementos as medidas da literatura, mas aparecem algumas discrepâncias para a concentração de outros elementos.

REFERÊNCIAS

ABRAHAM, J. A. et al. Influence of smoking on the elemental composition of oral fluids: a TXRF approach. **X-Ray Spectrometry**, Malden, v. 39, n. 6, p. 372-375, 2010.

AJAB, H. et al. Characterization of toxic metals in tobacco, tobacco smoke, and cigarette ash from selected imported and local brands in Pakistan. **The Scientific World Journal**, v. 2014, p. 5, 2014.

ALVES, Marcelo Ribas. **Influência da nicotina, durante a gestação e lactação, na cicatrização da parede abdominal de ratos lactentes: Estudo tensiométrico, morfométrico e imunoistoquímico**. 2006. 142 f. Tese (Doutorado em Clínica Cirúrgica) – Programa de Pós-graduação em Clínica Cirúrgica do setor de Ciências da Saúde. Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2006.

AMPTEK. **What is XRF?** Disponível em: <<http://www.amptek.com/xrf/>>. Acesso em: 01 fev. 2016a.

AMPTEK. **X-123SDD Complete X-Ray Spectrometer with Silicon Drift Detector (SDD)**. Disponível em: <<http://amptek.com/product/x-123sdd-complete-x-ray-spectrometer-with-silicon-drift-detector-sdd/>>. Acesso em: 19 jan. 2016b.

AMPTEK. **Amptek K and L Emission Line Lookup Chart**

Disponível em: <<http://www.amptek.com/pdf/xraychrt.pdf>>. Acesso em: 20 jan. 2016c.

CARVALHO, Jandira Torreiro. **O tabagismo – Visto sob vários aspectos**. Rio de Janeiro: Medsi – Ed. Médica e Científica Ltda, 2010.

CESAREO, R. et al. Multilayered artifacts in the pre-Columbian metallurgy from the North of Peru. **Appl Phys A**. v. 113, p. 889-903, 2013.

CHRISTENSEN, A. M.; SMITH, M. A.; THOMAS, R. M. Validation of X-ray fluorescence spectrometry for determining osseous or dental origin of unknown material. **Journal of Forensic Sciences**, Malden, v. 57, n. 1, p. 47-51, 2012.

CLETO, Daniele Aparecida Maia. **Análise de saliva e do fluido sulco gengival pelo método de fluorescência de raios X por reflexão total**. 2013. 87 f. Dissertação (Mestrado em Física) – Programa de Pós-graduação em Física, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2013.

ESPINOZA-QUIÑONES et al. Water quality assessment of Toledo River and determination of metal concentrations by using SR-TXRF technique. **J Radioanal Nucl Chem**, v. 283, p. 465-470, 2010.

ESTEVAM, Marcelo. **Avaliação *In Vivo* de Fe na pele humana e de camundongo Swins através da técnica de fluorescência de raios X**. 2005. 97 f. Dissertação (Mestrado em Física) – Programa de Pós-graduação em Física, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2005.

FERRARI, M. B. G. **Impacto do programa de prevenção do tabagismo na escola**. 2003. 101 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Médicas) Programa de Pós-graduação em Medicina, Universidade Rio Grande do Sul, Passo Fundo, 2003.

GUNNERBECK, A. et al. Maternal snuff use and smoking and the risk of oral cleft malformations – A population-based cohort study. **Plos One**, São Francisco, v. 9, n. 1, jan. 2014.

HAMAMATSU. **Hamamatsu Photonics K. K.** Disponível em: <<http://doc.chipfind.ru/hamamatsu/l673101.htm>>. Acesso em: 19 jan. 2016.

IBGE. **Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística**. Disponível em: <<http://www.ibge.gov.br/home/presidencia/noticias/imprensa/ppts/00000015471711102013171529343967.pdf>>. Acesso em: 31 jul. 2014.

INCA. **Instituto Nacional do Câncer José Alencar Gomes da Silva**. Disponível em: <<http://inpad.org.br/lenad/resultados/tabaco/resultados-preliminares/>>. Acesso em: 31 jul. 2014.

LEI ANTIFUMO. **Portal da Lei Antifumo – Governo do Estado de São Paulo**.

Disponível em: <<http://www.leiantifumo.sp.gov.br/portal.php/lei>>. Acesso em: 31 jul. 2014.

LIMA, F. O. et al. Hipotireoidismo altera secreção e composição salivar em ratos sépticos. **Revista Odonto Ciência**, Porto Alegre, v. 23, n. 1, p. 23-27, 2008.

MADRUGA, C. S. et al. Tobacco use among the elderly: The first Brazilian National Survey (BNAS). **Aging & Mental Health**, Londres, v. 14, n. 6, p. 720-724, jun. 2010.

MARGUÍ, E.; QUERALT, I.; HIDALGO, M. Application of X-ray fluorescence spectrometry to determination and quantitation of metals in vegetal material. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 28, n. 3, p. 362-372, 2009.

MARTINEZ, T. et al. Application of the Total Reflection X-Ray Fluorescence technique to trace elements determination in tobacco. **Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy**, Philadelphia, v. 63, p. 1469-1472, 2008.

MELQUIADES, F. L. et al. Análise de Metais em Sangue de Bovinos e no Ambiente de Criação de Bovinos por XRF. **Revista Ciências Exatas e Naturais**, v. 13, n. 1, p. 9-21, Jun. 2011.

NIE, L. H. et al. *In Vivo* Quantification of Lead in Bone with a Portable X-ray Fluorescence (XRF) System – Methodology and Feasibility. **Phys Med Biol**. v. 56, n. 3, p. 39-51, fev. 2011.

OMS. **Organização Mundial de Saúde - Perguntas sobre o tabaco para pesquisas**. Disponível em:

<http://www.who.int/tobacco/publications/surveillance/tqs_po_final.pdf>. Acesso em: 31 jul. 2014.

PARREIRA, P. S. **Metodologia de EDXRF e aplicações com um sistema portátil**. 2006. 17 f. Publicação Técnica – Laboratório de Física Nuclear Aplicada, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2006

RANG, H. P. et al. **Rang & Dale – Farmacologia**. 6. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2007.

SÁNCHEZ, H. J. et al. Total reflection X-ray fluorescence analysis of oral fluids of women affected by osteoporosis and osteopenia. **Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy**, Philadelphia, v. 63, p. 1485-1488, 2008.

SBORGIA, R. C.; RUFFINO-NETTO, A. Tabagismo, saúde e educação. **Jornal Brasileiro de Pneumologia**, São Paulo, v. 31, n. 4, p. 371-372, ago. 2005.

VLAB. **Vidraria de laboratório**. Disponível em:

<<http://www.vidrariadelaboratorio.com.br/observacao-de-celulas-da-mucosa-bucal-microscopio/>>. Acesso em: 01 fev. 2016.

ZAMBURLINI, M. et al. *In vivo* study of an x-ray fluorescence system to detect bone strontium non-invasively. **Phys. Med. Biol.** v. 52, p. 2107-2122, 2007.

APÊNDICE A – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Convidamos o (a) Sr (a) para participar da Pesquisa **ESTUDO DA COMPOSIÇÃO QUÍMICA DA SALIVA DE FUMANTES E NÃO FUMANTES UTILIZANDO A TÉCNICA DE FLUORESCÊNCIA DE RAIOS-X**, sob a responsabilidade do pesquisador Prof. Dr. José Martins de Oliveira Jr e Antonio Ademir Poles Jr, a qual pretende analisar a composição química da saliva coletada de indivíduos fumantes e compará-la a saliva de indivíduos não fumantes.

Sua participação é voluntária e se dará por meio de fornecimento de amostra de saliva, a qual será coletada com o auxílio de uma pipeta de plástico descartável e estéril.

Os riscos decorrentes de sua participação na pesquisa são nulos, não podendo causar qualquer tipo de injúria. Se você aceitar participar, estará contribuindo com relevante auxílio à pesquisa. Nosso empenho está voltado para contribuição de métodos de diagnóstico precoce de doenças e de identificação de disfunções do organismo, a tempo de tratá-las.

Se depois de consentir em sua participação o (a) Sr(a). desistir de continuar participando, tem o direito e a liberdade de retirar seu consentimento em qualquer fase da pesquisa, seja antes ou depois da coleta dos dados, independente do motivo e sem nenhum prejuízo a sua pessoa. O (a) Sr(a). não terá nenhuma despesa e também não receberá nenhuma remuneração. Os resultados da pesquisa serão analisados e publicados, mas sua identidade não será divulgada, sendo guardada em sigilo. Para qualquer outra informação, o (a) Sr(a). poderá entrar em contato com o pesquisador pelo telefone (15) 99779-7072 ou no endereço: R. Maj. Martiniano Soares, 746, Dr. Laurindo, Tatuí/SP, CEP: 18271-630.

Consentimento Pós-Informação

Eu, _____, fui informado sobre o que o pesquisador quer fazer e porque precisa da minha colaboração, e entendi a explicação. Por isso, eu concordo em participar do projeto, sabendo que não vou ganhar nada e que posso sair quando quiser. Este documento é emitido em duas vias que serão ambas assinadas por mim e pelo pesquisador, ficando uma via com cada um de nós.

_____, _____ de _____ de 201__.
(Cidade) (Dia) (Mês)

Assinatura do participante

Assinatura do pesquisador

APÊNDICE B – QUESTIONÁRIO

1. Sexo: Masc. Fem.

2. Idade: _____anos

3. Possui alguma doença crônica?
 Sim Não Qual? _____

4. Profissão? _____

5. Está exposto a componentes tóxicos de alguma maneira?
 Sim Não

6. É fumante?
 Sim Não

Se a resposta for “sim”:

Há quanto tempo? _____

Quantos cigarros por dia? _____

Se a resposta for “não”:

Na sua residência tem alguém que fuma?

Sim Não

Tem contato direto com a fumaça de cigarro por algum período do dia?

Sim Não

ANEXO A – PARECER DO CEPUNIVERSIDADE DE
SOROCABA - UNISO**PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP****DADOS DO PROJETO DE PESQUISA**

Título da Pesquisa: Estudo da composição química da saliva de fumantes e não fumantes utilizando a técnica de Fluorescência de Raios X.

Pesquisador: Antonio Ademar Poles Junior

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 36825814.1.0000.5500

Instituição Proponente: Universidade de Sorocaba - UNISO

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 831.753

Data da Relatoria: 09/10/2014

Apresentação do Projeto:

Trata-se de uma análise através da técnica de Fluorescência de Raios X da saliva de fumantes e não fumantes. Os voluntários responderão um questionário para traçar o perfil do participante e, em seguida, doarão uma amostra de saliva.

Objetivo da Pesquisa:

Analisar através da técnica de fluorescência de raios-X, amostras de saliva de indivíduos fumantes e não fumantes.

Avaliar quali e quantitativamente os elementos químicos presentes nas amostras coletadas.

Comparar os valores encontrados entre indivíduos fumantes e não fumantes.

Identificar a presença ou não de elementos nocivos a saúde humana.

Fazer correlações entre as possíveis doenças apresentadas pelos indivíduos objetos desta pesquisa, com a presença de determinadas substâncias na saliva destes indivíduos e, com isso, criar mecanismos de prevenção de determinadas doenças a partir do diagnóstico precoce das mesmas, através da análise da saliva.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos – O presente trabalho não oferece risco à integridade dos indivíduos, sob nenhuma forma.

Benefícios - Os benefícios deste estudo é a possibilidade de gerar conhecimento para diagnosticar,

Endereço: Rodovia Raposo Tavares, km 92,5

Bairro: Vila Artura

CEP: 18.023-000

UF: SP

Município: SOROCABA

Telefone: (15)2101-7101

Fax: (15)2101-7073

E-mail: cep@uniso.br

UNIVERSIDADE DE
SOROCABA - UNISO



Continuação do Parecer: 831.753

entender e prevenir problemas que afetem o bem-estar dos sujeitos da pesquisa e da sociedade em geral. Entende-se também a escassez de trabalhos na literatura, que utilizam fluídos biológicos, obtidos de forma pouco invasiva, como a saliva, e que utilizam metodologias de análise rápidas, que não requerem preparação de amostras e com custos reduzidos, como a Fluorescência de Raios-X, proposta neste trabalho.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

A pesquisa é relevante, sendo que poderá trazer benefícios significativos considerando-se que ao final existe a possibilidade de gerar conhecimento para diagnosticar, entender e prevenir problemas que afetem o bem-estar dos sujeitos da pesquisa e da sociedade em geral.

Outro ponto a destacar é que destaca-se também a escassez de trabalhos na literatura, que utilizam fluídos biológicos, obtidos de forma pouco invasiva, como a saliva, e que utilizam metodologias de análise rápidas, que não requerem preparação de amostras e com custos reduzidos, como a Fluorescência de Raios-X, proposta neste trabalho.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Todos os termos estão de acordo.

Recomendações:

Vide item - Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

O referido projeto atende a todas solicitações.

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

Endereço: Rodovia Raposo Tavares, km 92,5
Bairro: Vila Artura **CEP:** 18.023-000
UF: SP **Município:** SOROCABA
Telefone: (15)2101-7101 **Fax:** (15)2101-7073 **E-mail:** cep@uniso.br

UNIVERSIDADE DE
SOROCABA - UNISO



Continuação do Parecer: 831.753

SOROCABA, 14 de Outubro de 2014

Assinado por:
ana laura schliemann
(Coordenador)

Endereço: Rodovia Raposo Tavares, km 92,5
Bairro: Vila Artura **CEP:** 18.023-000
UF: SP **Município:** SOROCABA
Telefone: (15)2101-7101 **Fax:** (15)2101-7073 **E-mail:** cep@uniso.br

ANEXO B – AUTORIZAÇÃO DA SECRETARIA DE SAÚDE DE ARAÇOIABA DA SERRA/SP



PREFEITURA MUNICIPAL DE ARAÇOIABA DA SERRA
UNIDADE BÁSICA DE SAÚDE
Rua: Antonio Antero de Oliveira, 19 - Centro
Araçoiaba da Serra/SP – CEP 18190-000
SECRETARIA DA SAÚDE
Fone (15) 3281-1000

Araçoiaba da Serra, 18 de Setembro de 2014.

Ao
Sr. Antonio Ademar Poles Jr.
Pesquisador Responsável
Universidade de Sorocaba - Uniso

AUTORIZAÇÃO

Eu, Maria do Carmo de O. Pelisão, Secretária de Saúde do município de Araçoiaba da Serra/SP, autorizo a realização da pesquisa intitulada “**Estudo da composição química da saliva de fumantes e não fumantes através da técnica de fluorescência de Raios-X**”, nas Unidades Básicas de Saúde municipais. O trabalho que tem como responsáveis o Dr. José Martins de Oliveira Junior e Antonio Ademar Poles Junior irão coletar dados e amostras junto aos pacientes para fins de pesquisa.

Sem mais,

Maria do Carmo de Oliveira Pelisão

Secretária de Saúde – Araçoiaba da Serra/SP

RG 22.552.440-5

CPF 104.265.060-99

ANEXO C – APRESENTAÇÃO DO TRABALHO NA 38ª REUNIÃO DE
TRABALHO SOBRE FÍSICA NUCLEAR NO BRASIL

XXXVIII Reunião de Trabalho sobre Física Nuclear no Brasil

CERTIFICADO

O Comitê Científico certifica que o trabalho *Study of elemental composition of oral fluids by X-ray fluorescence* de autoria de Antônio A. Poles Junior, José M. Oliveira Junior, Victor M. Balcão, Marta M. D. C. Vila, Norberto Aranha, Valquíria M. H. Yoshida, Marco V. Chaud foi apresentado na sessão *Instrumentation and Applied Nuclear Physics*, na XXXVIII Reunião de Trabalho sobre Física Nuclear no Brasil, realizada em Mangaratiba, RJ, de 07 a 11 de setembro de 2015, promovido pela Sociedade Brasileira de Física.

Mangaratiba, 10 de setembro de 2015.




Luiz Carlos Chamon
Coordenador

