



CONSUMO DE ETANOL UTILIZANDO MODELO ANIMAL: DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO ELEMENTAR APLICANDO ATÉCNICA DE ANÁLISE POR ATIVAÇÃO NEUTRÔNICA

**Beatriz Cancelier Ribeiro¹, Renato Elias Moreira Júnior², Ana Lúcia Brunialti Godard²,
Maria Ângela de B. C. Menezes¹.**

¹Centro de Desenvolvimento da Tecnologia Nuclear, Avenida Antônio Carlos, 6627, UFMG - Pampulha - 31270-901

²Intituto de Ciências Biológicas, Avenida Antônio Carlos, 6627, UFMG - Pampulha - 31270-901

beatriz.ribeiro@cdtn.br
renatoelias@hotmail.com
brunialti@ufmg.br
menezes@cdtn.br

Palavras-Chave: Ativação neutrônica; biomarcadores; método k_0

RESUMO

O transtorno pelo uso de álcool é caracterizado por um consumo excessivo e patológico de álcool, resultando em várias alterações sistêmicas, como depressão do sistema nervoso central, desregulação de neurotransmissores (ácido gama-aminobutírico, dopamina, glutamato e serotonina), falhas no metabolismo hepático e comprometimento da absorção intestinal, entre outros. Estudos farmacológicos que buscam tratar e/ou aliviar os efeitos do transtorno tradicionalmente se concentram em medicamentos sintéticos que agem sobre neurotransmissores, neuromoduladores e a sinalização neuroimune. Esses tratamentos podem ter efeitos colaterais e não são totalmente eficazes na redução dos efeitos negativos da abstinência, levando muitas vezes ao abandono das terapias e à recaída. Nesse contexto, os probióticos têm sido investigados como uma alternativa para reduzir o consumo e a preferência por etanol, bem como para mitigar os efeitos negativos da abstinência sem causar efeitos colaterais. No entanto, há uma carência de biomarcadores que possam acompanhar a eficácia dos tratamentos, a saúde intestinal e a internalização dos metabólitos produzidos pelos probióticos. Para usar elementos químicos como biomarcadores, é necessário investigar se há mudanças em suas concentrações que se correlacionem com o diagnóstico ou tratamento da doença. Uma técnica que permite avaliar a concentração de vários elementos de forma simultânea e individualizada é a ativação neutrônica pelo método k_0 . Essa análise multielementar é realizada em reatores nucleares e envolve a irradiação de núcleos atômicos por nêutrons, tornando os átomos das amostras radioativos. Esses núcleos decaem emitindo radiação gama, que é medida por detectores. Essa técnica não necessita de padrões, pois as concentrações dos elementos são calculadas a partir de constantes específicas para cada radionuclídeo, parâmetros espectrais na posição de irradiação no reator e equações específicas.

1. INTRODUÇÃO

Os elementos químicos são essenciais para o desenvolvimento do ser humano, em termos biológicos e fisiológicos. Esses elementos estão ligados com a capacidade de crescimento e reprodutiva do corpo humano, sendo providos principalmente pela dieta e na capacidade do desenvolvimento celular, respiração celular e até mesmo apoptose [1].

Os elementos são classificados como macroelementos, aqueles que são essenciais para vida humana, e devem ser encontrados em quantidades razoáveis. E os microelementos, que ajudam no metabolismo de reações enzimáticas. Macroelementos são o cálcio, fósforo, potássio, sódio,



magnésio, ferro, zinco, flúor, estrôncio, molibdênio, cobre, bromo, silício, manganês, alumínio, chumbo, cádmio, boro, rubídio. E os microelementos são o selênio, cobalto, vanádio, cromo, arsênio, níquel, lítio, bário, estanho, mercúrio, escândio, zircônio, bismuto, antimônio [2].

O transtorno pelo uso de álcool (*Alcohol Use Disorder*, AUD) afeta várias vias metabólicas, causando condições patológicas em órgãos essenciais a sobrevivência como cérebro, fígado, rim e coração. Devido aos seus efeitos nocivos, o etanol, provindo da bebida alcoólica, é responsável direta e indiretamente por um total de 5,3% das mortes no mundo e por 5,1% de todas as doenças e lesões. Entre os anos de 2000 e 2019, a Organização Mundial de Saúde (OMS), registrou um aumento do consumo de álcool por pessoa entre 9,4L e 11,9L, para o ano de 2025 é estimado um aumento para 12,7L [3].

Além das patologias que podem ser analisadas por exames sanguíneos e de imagem, também há desbalanceamento dos elementos químicos desses órgãos, afetando as macros e micromoléculas que são essenciais para vida do ser humano; porém uma das formas de diagnósticos da AUD é a análise comportamental do ser humano que podem estar ligados a transtornos psicológicos. Assim, considerando as dificuldades associadas ao diagnóstico do AUD e acompanhamento dos recentes tratamentos, são necessários estudos que investiguem novos e biomarcadores relacionados a doença. Dessa forma, um biomarcador permite identificar o quanto o tratamento afetou um órgão específico [4;5].

Para se aplicar elementos químicos como biomarcador, é necessário investigar se há alterações nas suas concentrações que se correlacionam com o diagnóstico ou tratamento da doença. Uma técnica que possibilita a avaliação da concentração de vários elementos simultaneamente de forma individualizada é a ativação neutrônica sendo o método k_0 , o mais eficiente [6].

Nesta pesquisa, foi desenvolvido um modelo animal que após ter sua dieta rica em açúcar e gordura denominada HSB (*High Sugar and Butter*) pela qual desenvolvem compulsão substituída por uma dieta padrão e serem submetidos ao paradigma da livre escolha por etanol, apresentaram alto consumo e preferência pela bebida. Assim, o presente estudo objetiva identificar elementos químicos que poderão representar novos biomarcadores no fígado para o alto consumo de etanol, para os efeitos da administração de linhagens probióticas utilizadas na tentativa de reverter esse comportamento, utilizando como base o modelo animal desenvolvido pelo grupo de pesquisa. Os resultados desse estudo poderão permitir o estabelecimento de novas formas de diagnosticar e indivíduos com AUD, o que representaria um avanço na prática clínica envolvendo a terapia de doenças de origem comportamental.

Para a determinação dos elementos químicos, foi aplicada a técnica analítica nuclear de ativação neutrônica, utilizado o reator nuclear de pesquisa TRIGA Mark I IPR-R1, localizado no Centro de Desenvolvimento da Tecnologia Nuclear, Belo Horizonte.

2. METODOLOGIA

Animais

O modelo animal em estudo constou de 12 camundongos machos livres de patógenos específicos, com seis semanas de idade, que foram fornecidos pelo Biotério da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG). Os camundongos foram alojados individualmente em mini-isoladores em um rack ventilado (ALESCO, São Paulo, Brasil) sob um ciclo claro/escuro de 12h/12h e acesso irrestrito a água e comida. Este estudo foi aprovado pelo comitê de ética para



uso animal (CEUA), da UFMG (protocolo nº 73/2021) e todos os esforços foram feitos para minimizar o sofrimento animal.

Desenho Experimental

Os camundongos tiveram dietas baseadas em alto nível de açúcar e gordura pela qual desenvolvem compulsão substituída por uma dieta padrão e foram submetidos ao paradigma da livre escolha por etanol. Após a eutanásia, os fígados foram coletados para o presente estudo e liofilizados.

Análise por Ativação Neutrônica

Os fígados já liofilizados foram pesados em balança analítica já acondicionados em frascos de polietileno adequados para a irradiação. As amostras e monitores foram irradiados por 6 horas no reator de pesquisa TRIGA Mark I IPR-R1 no CDTN, potência de 100kW e fluxo médio térmico de $6,35 \times 10^{11}$ nêutrons $\text{cm}^{-2} \text{s}^{-1}$ na mesa giratória e parâmetros espectrais f (razão entre o fluxo térmico e epitérmico) igual a 22,32, e α (medida do perfil de nêutrons epitérmicos na posição de irradiação) igual a -0,0022 [7;8]. Junto às amostras, monitores de Al-(0,1%) Au (liga certificada IRMM-530R fornecida pelo *Institute for Reference Materials and Measurements*, Bélgica [9], foram colocados de forma intercalada com as amostras. Como controle de qualidade do método, uma alíquota da amostra de Referência Certificada NIST 1577b, Bovine Liver, foi preparada de forma semelhante às amostras e irradiada junto elas.

Após a irradiação, as amostras, material certificado e monitores foram submetidos à espectrometria gama em espectrômetro gama composto de detector HPGe (CANBERRA) com 50% de eficiência nominal, eletrônica associada e microcomputador. As amostras de fígado e a amostra de referência certificada foram submetidas à espectrometria gama por três vezes, sendo a primeira dois dias após a irradiação (para determinar os radionuclídeos de meias vidas menores do que 2 dias), a segunda após uma semana de irradiação (para determinar os radionuclídeos com meias vidas entre 3 e 7 dias) e, por último, após 3 semanas da data de irradiação, para determinar os radionuclídeos com meias vidas maiores do que 10 dias. Os espectros gama foram adquiridos pelo software Genie 2000 (CANBERRA) e posteriormente deconvoluídos com o programa HyperLab [10]. Os cálculos das concentrações elementares foram executados com o software Kayzero for Windows [11].

Os resultados experimentais da amostra de Referência Certificada NIST 1577b, Bovine Liver [12] foram submetidos à avaliação estatística E_n -score [13] em relação aos valores certificados. O critério de avaliação $|E_n| \leq 1$ indica que os resultados têm 95% de probabilidade de se encontrarem dentro da faixa de valores corretos (intervalo de confiança) e que o método de análise aplicado é adequado. Se $|E_n| > 1$, significa que os resultados não são satisfatórios.

Para determinar se o método analítico foi realizado de maneira satisfatória, é necessário aplicar testes estatísticos para confirmação, e nesse trabalho foi calculado o E_n -score. O E_n leva em consideração a incerteza expandida da análise do experimento e os valores que são já certificados da amostra padrão com um fator de confiança igual $k=2$ (95% do intervalo de confiança). As equações aplicadas para o cálculo do E_n foram:

$$E_n = \frac{\text{Value}_{\text{Experimental}} - \text{Value}_{\text{Assigned}}}{\sqrt{U_{\text{Experimental}}^2 + U_{\text{Assigned}}^2}} \quad (1)$$



Onde $U_{Experimental}$ e $U_{Assigned}$ são as expansões das incertezas ($k=2$) dos resultados experimentais e do resultado atribuído, respectivamente, e

$$U_{Experimental} = 2 \cdot u_{Lab_Comb} \quad (2)$$

$$u_{Lab_Comb} = \sqrt{u_{AREA}^2 + u_{method}^2} \quad (3)$$

onde u_{AREA} é a incerteza da área líquida sob o pico gama de interesse e $u_{método}$ é a incerteza total do k_0 -NAA estabelecido no CDTN/CNEN como 3,5% com um fator de cobertura de $k=1$. Este é o valor recomendado pelo software Kayzero for Windows®.

3. RESULTADOS

A Tab. 1 mostra os valores experimentais e certificados da amostra NIST 1577b e os resultados da avaliação estatística.

Tab. 1. Valores experimentais e certificados da amostra de referência certificada NIST 1577b [12] e os resultados da avaliação estatística E_n -score [13]

Elementos	NIST 1577b, <i>Bovine Liver</i>		E_n -score
	Valores Experimentais (mg kg ⁻¹)	Valores Certificados (mg kg ⁻¹)	
Br	9,48 ± 0,34	(9,7)	-
Co	0,27 ± 0,01	(0,25)	-
Fe	189 ± 8	184 ± 1,5	0,32
Mo	3,54 ± 0,23	3,5 ± 0,3	0,07
Rb	12,3 ± 0,5	13,7 ± 1,1	0,91
Sb	0,028 ± 0,003	(0,003)	-
Se	0,78 ± 0,09	0,73 ± 0,06	0,26
Zn	118 ± 4	127 ± 16	0,47

(), Valores Informativos

Observa-se que os resultados da avaliação estatística E_n -score são todos menores do que 1, indicando que o método k_0 de ativação neutrônica aplicado está adequado para a determinação das concentrações elementares em um material biológico, objeto deste estudo.

A caracterização elementar das amostras de fígado de camundongos realizada pela técnica de ativação neutrônica via método k_0 , indicou a presença de elementos já reportados em fígado de humanos do grupo AUD [2] na literatura. Os elementos químicos determinados e citados nas referências bibliográficas [1;2] incluem: Fe, K, Na, Se e Zn. Os mesmos elementos foram encontrados neste trabalho, porém tendo como diferencial o Rb e o Mo, que pertencem ao grupo dos macroelementos. A Tab. 2 mostra os elementos encontrados nas amostras analisadas e suas concentrações médias.

Tab. 2. Concentrações médias dos elementos encontrados nas amostras.

Elemento	Concentração média (mg kg ⁻¹)
Br	1,21
Co	0,11



Fe	244,1
Mo	2,18
Rb	4,1
Sb	0,08
Se	3,05
Zn	108,9

Para discussões sobre os elementos encontrados nas amostras, serão necessárias a amostragem e a análise química similar do padrão de fígado de camundongos. Esta etapa da pesquisa, assim como de outro grupo de camundongos submetidos a AUD, já se encontra em desenvolvimento.

4. CONCLUSÃO

Este estudo está em fase inicial, mas os resultados encontrados são promissores. Quanto ao método analítico aplicado nesse trabalho, ativação neutrônica via método k_0 , este se mostrou adequado para a determinação de elementos químicos nas amostras de fígado de camundongos. Isso foi demonstrado na avaliação estatística E_n -score realizada em amostra de referência certificada de fígado bovino.

AGRADECIMENTOS

Agradeço à CAPES por me fornecer apoio nesse trabalho. Ao CDTN por toda infraestrutura. À minha orientadora Maria Ângela e aos meus coorientadores Renato e Ana Lúcia. Agradeço também o SENCIR por estar oferecendo a oportunidade de expor esse trabalho para a comunidade científica.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] Baj, Jacek, et al. "Assessment of the Concentration of 51 Elements in the Liver and in Various Parts of the Human Brain—Profiling of the Mineral Status". *Nutrients*, vol. 15, no 12, janeiro de 2023, p. 2799. [www.mdpi.com, https://doi.org/10.3390/nu15122799](https://doi.org/10.3390/nu15122799).
- [2] Baj, Jacek, et al. "Chronic Alcohol Abuse Alters Hepatic Trace Element Concentrations-Metallomic Study of Hepatic Elemental Composition by Means of ICP-OES". *Nutrients*, vol. 14, no 3, janeiro de 2022, p. 546. *PubMed*, <https://doi.org/10.3390/nu14030546>.
- [3] WHO. Global Health Observatory Data Repository. Available online: <https://apps.who.int/gho/data/view.main.A1029SDG3v?lang=en&showonly=GISAH> (accessed on 20 September 2021).
- [4] Ziomber-Lisiak, A., et al., The New Markers of Early Obesity-Related Organ and Metabolic Abnormalities. *Int J Mol Sci*, 2022. 23(21).
- [5] de Salles, P.M.B., et al., Elemental composition of dietary supplements most consumed in Belo Horizonte, Brazil, analysed by k_0 -INAA. *Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry*, 2017. 312: p. 421-431.
- [6] Menezes MABC, Sabino CVS, Jaćimović R (2023) k_0 -Neutron Activation Analysis at CDTN, Brazil: 27 years of history, development and main achievements., *J Radioannal Nucl Chem*; 1:1-12 <https://doi.org/10.1007/s10967-023-08804-9>



- [7] Menezes, M. Â. B. C & Jaćimović, R. k₀-INAA quality assessment by analysis of soil reference material GBW07401 using the comparator and neutron flux monitor approaches. *Appl. Radiat. Isot.* 69: 1057–1063, 2011.
- [8] Menezes, M. Â. B. C. e Jaćimović, R. Optimised k₀-instrumental neutron activation method using the TRIGA MARK I IPR-R1 reactor at CDTN/CNEN, Belo Horizonte Brazil. *Nuclear Instruments and Methods in Physical Research*, 564:707-715, 2006.
- [9] IRRM – Institute for Reference Materials and Measurements. Certificate of analysis: certified reference material IRMM-530R. Geel: (gold mass fraction in Al-(0.1%) Au Alloy), 2002.
- [10] HyperLab 2002 System (2002) Installation and Quick Start Guide, HyperLabs software, Budapest, Hungary. http://www.hlabsoft.com/web/support/hl2002_2003-02.php. Accessed 20 Jul 2022.
- [11] KAYZERO FOR WINDOWS. User’s manual, for reactor neutron activation analysis (NAA) using the k₀ standardisation method, Versão 2.42. k₀-ware, Heerlen, 2011.
- [12] National Institute of Standards e Technology. Certificate of Analysis. Standard Reference Material 1577b, bovine liver. August 27, 1991.
- [13] ISO 13528:2015, 2015, “Statistical methods for use in proficiency testing by interlaboratory comparisons”, Second edition 2015-08-01, issued by ISO-Geneva (CH), International Organization for Standardization.