

Identificação da proposta

AVALIAÇÃO CLÍNICA DA EFICÁCIA DO USO DE ÁGUAS TERMAIS NO TRATAMENTO DE AFECÇÕES CUTÂNEAS E SUAS IMPLICAÇÕES RADIOLÓGICAS

Programa 2 - APLICAÇÕES DAS RADIAÇÕES IONIZANTES

Atividade 230 - Fontes Radioativas e Aplicações das Radiações na Saúde

Programa 3 - CIÊNCIA E TECNOLOGIA NUCLEARES

Atividade 330 - Metrologia das Radiações Ionizantes

Atividade 340 – Radiometria Ambiental

1. Qualificação do principal problema a ser abordado

As águas minerais constituem um dos mais antigos métodos de tratamento para diferentes tipos de enfermidades e vêm sendo utilizadas pelo homem ao longo do tempo em todas as partes do mundo (Routh et al., 1996).

De acordo com o Código de Águas Minerais do Brasil, águas minerais são classificadas como aquelas “águas provenientes de fontes naturais ou artificialmente captadas, que possuam composição química ou propriedades físicas ou físico-químicas distintas das águas comuns, com características que lhes confirmam uma ação medicamentosa” (DNPM, 1966).

A água mineral é um tipo particular de água subterrânea cuja formação resulta da ressurgência das águas das chuvas infiltradas a grandes profundidades através de fraturas e falhas, em velocidade muito lenta, e impulsionada pelo peso da coluna de água superposta ou por gases e vapores nelas presentes. A composição química destas águas, portanto, reflete a percolação em camadas geológicas, isto é, em seu percurso descendente, a água fica submetida a temperaturas e pressões elevadas, solubilizando rochas e minerais (Martins et al., 2002).

Águas minerais naturais cuja composição físico-química seja indicada ao uso terapêutico são chamadas de águas minero-medicinais e sua utilização é conhecida como crenoterapia ou balneoterapia (Coccheri et al., 2008). Esta prática, utilizada há vários séculos, refere-se ao conjunto de atividades terapêuticas desenvolvidas no espaço de um estabelecimento termal e que tem como agente terapêutico o uso de águas minerais com propriedades que podem prevenir e tratar vários tipos de patologias (Bender et al., 2007; Falagas et al., 2009; Kılıçoğlu

et al., 2010; Keller et al., 2014; Cantone et al., 2015, Vieira et al., 2016; Kovacs et al., 2016). Embora no Brasil ainda não seja bem aceita como uma terapia complementar, esta prática é frequentemente utilizada em outros países. Estes tratamentos são realizados em estâncias termais, balneários e spas e geralmente estão associados aos setores de hotelaria e comércio.

As águas minerais são classificadas, de acordo com o Código das Águas Minerais, decreto de lei Nº 7841 de 8 de agosto de 1945, (DNPM, 1945), quanto à composição química em: oligominerais, radíferas, alcalino-bicarbonatadas, alcalino-terrosas (alcalino-terrosas cálcicas, alcalino-terrosas magnesianas), sulfatadas, sulfurosas, nitradas, cloretadas, ferruginosas, carbogaseosas e radioativas. Águas radíferas são aquelas que contêm substâncias radioativas dissolvidas que lhes atribuem radioatividade permanente (isótopos de urânio, de tório, de rádio, potássio, entre outros). Radioativas são aquelas que contêm radônio dissolvido sendo classificadas em fracamente radioativas, radioativas, fortemente radioativas e toriativas.

O Código das Águas Minerais também reconhece a ação medicamentosa das águas minerais, bem como, sua utilização em crenologia. As águas minero-medicinais são produtos naturais provenientes de um manancial e que mantêm as características de pureza original da fonte ou emergência. Não são estéreis, posto que podem possuir um microbiota característica de cada aquífero. Cada manancial possui uma composição química específica (constituintes em quantidades macro, micro e traço, elementos radioativos e gases dissolvidos, dependendo do tipo de água) e que deve se manter estável ao longo do tempo.

O uso de recursos hidrotermais para prevenção e tratamento da saúde é amplamente difundido nos países europeus, onde contribui com mais de 1 milhão de empregos diretos e indiretos atraindo anualmente mais de 5 milhões de pessoas (Bouvier, 2014), e em diversas outras regiões. Estes tratamentos são baseados em ingestão da água, banhos e imersões em águas minerais termais e na inalação dos gases presentes na água. O tratamento termal provoca um conjunto de efeitos que se obtêm devido à composição específica da água minero-medicinal coadjuvado pelos efeitos derivados do ambiente termal, da aplicação das técnicas termais e também de outras terapias. Os efeitos terapêuticos destas águas resultam, além das suas qualidades físicas, químicas e biológicas, também da via de administração e técnicas de aplicação. Apesar das várias aplicações terapêuticas e recomendações ao uso de águas termais na prevenção e/ou tratamento de diversas afeções nas mais diversas áreas, vários estudos confirmaram a capacidade das águas termais para melhorar determinadas afeções cutâneas (Harari et al., 2012; Martin et al., 2015; Klim et al., 2016).

Entre os gases inalados encontra-se o radônio, que em proteção radiológica está geralmente associado, juntamente com seus produtos de decaimento, a exposição à dose de radiação e seu risco potencial ao câncer de pulmão (ICRP-32, 1981, Porstendorfer, 1993). No entanto, diversos centros termais o utilizam, há décadas, como agente terapêutico, principalmente no tratamento de doenças reumáticas (Tempfer et al., 2005).

No Brasil existem diversas localidades em que a água é utilizada como recurso terapêutico, tais como as cidades de Amparo, Pedreira, Serra Negra, Lindóia, Socorro e São Pedro, no

estado de São Paulo; Cambuquira, Caxambu, Lambari, Águas de Santa Barbara e São Lourenço em Minas Gerais; Rio Quente, Santa Lagoa em Goiás; Águas Mornas em Santa Catarina; Foz do Iguaçu e Itaipulândia no Paraná; Cipó, Caldas do Jorro e Paulista Piratininga na Bahia; entre outras. Nas cidades de Águas de Lindóia (SP), Águas de São Pedro (SP) e Poços de Caldas (MG) os tratamentos crenoterápicos estão integrados ao Sistema Único de Saúde (SUS), atendendo milhares de pacientes anualmente (comunicação pessoal).

Embora o Código das Águas Minerais estabeleça que a ação medicamentosa das águas minerais deva ser comprovada de maneira incontestada e do atendimento aos pacientes do SUS, principalmente para problemas de afecções cutâneas (comunicação pessoal), são praticamente inexistentes os trabalhos científicos que busquem esta comprovação. Desta forma, este projeto propõe um estudo do tratamento de psoríase com a utilização das águas minero-medicinais das fontes termais das cidades de Águas de Lindóia, Águas de São Pedro e Poços de Caldas em modelo animal.

A psoríase é uma doença inflamatória comum, caracterizada por hiperproliferação da epiderme. Na patogênese interagem condições genéticas e respostas imunológicas aos fatores externos, os quais são necessários tanto ao aparecimento quanto à evolução. Trata-se de doença incurável, caracterizada por períodos de remissões e exacerbações, cujo diagnóstico é fundamentalmente clínico. Entretanto, a balneoterapia com água mineral tem mostrado melhorar quadros de psoríase sem modalidades adicionais de tratamento, apresentando efeitos químicos, térmicos, mecânicos e imunomodulatórios (Peroni et al., 2008; Taboli et al., 2009).

O modelo experimental da indução de psoríase pela droga Imiquimode tem sido amplamente usado para estudos em modelo animal com camundongos (Van de Fits et al, 2009, Lee et al., 2014). A aplicação de Imiquimode induz a expressão epidérmica das Interleucinas 23 e 17 e aumenta a produção de células Th17, consideradas importantes agentes na patogenia da doença (Van der Fits et al., 2009).

Adicionalmente, será também realizada a completa caracterização química e radiológica destas águas pela determinação de seu teor de elementos radioativos, maiores e traço. Entre os elementos radioativos será dada atenção principalmente ao teor de radônio, tanto dissolvido na água, quanto ao atmosférico no local onde são feitos os tratamentos.

O ^{222}Rn é formado como um produto da série radioativa do ^{238}U a partir do decaimento alfa do ^{226}Ra e possui a capacidade alta capacidade de difusão para o ar, sendo as águas minerais e/ou termais fontes importantes deste gás ^{222}Rn (Tabar e Yakut, 2014), pois após a exalação pode ser inalado pelos indivíduos juntamente com

aquele que se difunde do solo e das paredes do local (Maduar et al., 2011, Campos e Pecequilo, 2003).

O ^{238}U representa 99,27% do urânio natural que é encontrado em toda a crosta terrestre na forma de minérios de urânio e em quantidades traço em todos os tipos de rochas e minerais. Já tório natural é composto por 100% de ^{232}Th . Os radionuclídeos das séries naturais do ^{238}U e do ^{232}Th estão presentes nos solos, rochas e sedimentos e dissolvem-se nas águas subterrâneas. O ^{40}K representa aproximadamente 0,0119 % do potássio encontrado na natureza com uma atividade específica de aproximadamente $3 \cdot 10^4$ Bq/kg (Einsenbud, 1987).

Os materiais dissolvidos e particulados da água têm composição determinada pela geologia local, cobertura vegetal e uso do solo, carregando assim, a assinatura geoquímica da região (Bricker e Jones, 1995). Desta forma, a disponibilidade dos recursos hídricos para determinados tipos de uso, incluindo seu uso terapêutico, depende fundamentalmente de sua qualidade físico-química, biológica e radiológica.

Vários estudos mundiais sobre os níveis de radionuclídeos naturais em balneários têm mostrado níveis elevados da concentração desses elementos (Radolić et al., 2005, Campos et al., 2010, Oner et al., 2013). Uma vez que os balneários de Águas de Lindóia e Poços de Caldas são conhecidos por suas águas radioativas (Bonotto, 2016) verificar-se-á também a influência da composição da água em suas propriedades terapêuticas.

2. Objetivos a serem alcançados

O presente projeto pretende avaliar os efeitos do banho em água mineral medicinal de Águas de Lindóia, Águas de São Pedro e Poços de Caldas à resposta dérmica e imunológica de psoríase induzida em um modelo experimental com camundongos. O perfil da pele e de citocinas do sangue serão comparados entre camundongos submetidos à balneoterapia com água mineral medicinal de Águas de Lindóia, Águas de São Pedro e de Poços de Caldas e submetidos ao banho com água deionizada, como reportado em Lee et al. (2014). Também serão avaliados cortes histológicos da evolução da doença e após a aplicação das imersões dos camundongos em águas.

Além disso, caracterizar-se-á as águas em estudo quanto às suas propriedades físico-químicas, teor de elementos radioativos, maiores e traço: temperatura, pH, Eh, oxigênio dissolvido, sólidos totais, alcalinidade, ^{226}Ra , ^{228}Ra , ^{210}Pb , ^{222}Rn , As, Ba, Br, Ce, Cl, Cs, Co, Cr, Eu, Fe, Hf, K, La, Lu, Mg, Mn, Mo, Na, Pd, Nd, Rb, Sb, Sc, Se, Sm, Ta, Tb, Th, Ti, U, V, Yb, Zn e Zr. Nos ambientes onde são realizados os tratamentos serão determinados também os níveis de ^{222}Rn no ar para avaliação da exposição dos indivíduos que o frequentam para tratamento, lazer e para trabalho.

3. Centros do IPEN participam da proposta InterCentros

CRPq – Paulo Sergio Cardoso da Silva

CMR – Marcelo Francis Máduar

CB – Patrick Jack Spencer

4. Metodologia a ser empregada

4.1 Amostragem

Para as análises físico-químicas, químicas, radionuclídeos e de teor de ^{222}Rn dissolvido as amostras serão coletadas nos Balneários Municipais de Águas de Lindóia, Águas de São Pedro e Poços de Caldas, quatro vezes ao ano, em períodos correspondentes às diferentes estações do ano para incluir as variações dos períodos de chuva, durante dois anos.

Para as análises físico-químicas as amostras serão coletadas em frascos previamente descontaminados com HNO_3 e as medidas de temperatura, pH, Eh e oxigênio dissolvido serão realizadas no próprio local de coleta. Uma amostra será levada ao laboratório para determinação de sólidos totais, e alcalinidade.

Para as análises químicas e radiométricas as amostras serão coletadas em frascos previamente descontaminados com HNO_3 e aciduladas em pH 2 no laboratório do IPEN.

Para determinação do teor de ^{222}Rn dissolvido, as amostras serão coletadas visando minimizar ao máximo a perda de radônio. A coleta será realizada com o auxílio de uma seringa de vidro e as amostras colocadas diretamente nos frascos cintiladores contendo o coquetel de cintilação. De acordo com (Salonen, 1993), uma quantidade de amostra:coquetel, na razão 10:12, preenche quase que totalmente o frasco, diminuindo assim a perda de radônio para o ar. Depois de coletadas, as amostras são tampadas e agitadas aproximadamente por um tempo de 1 minuto. As amostras serão mantidas em ausência de luz ultravioleta (solar e fosforescente) e sob refrigeração por um período de aproximadamente 30 dias, tempo necessário para que ocorra o equilíbrio $^{226}\text{Ra}/^{222}\text{Rn}$ (Salonen, 1993). O teor de ^{222}Rn será determinado pela diferença entre o ^{226}Ra medido no frasco de cintilação e o ^{226}Ra medido separadamente em uma amostra sem o ^{222}Rn .

Para utilização do modelo experimental em modelo animal para tratamento de psoríase, as amostras de água serão colocadas em recipientes de polietileno previamente lavados com ácido clorídrico diluído e água destilada e, antes da amostragem, com a própria água das fontes. Os recipientes de polietileno devem ser mergulhados em solução de hipoclorito a 25% por 30 minutos, tomando cuidado para não formar bolhas de ar e mantidos fechados por este período. Passados os 30 minutos os frascos serão enxaguados três vezes com água purificada e então, secos em estufa, para não haver recolonização de bactérias devido à umidade residual. Os recipientes devem ser armazenados vedados até o momento da coleta. Esta desinfecção é válida por sete dias.

Nos locais de coleta, os recipientes serão inicialmente lavados com água das fontes e então preenchidos até a borda, tampados hermeticamente para evitar a entrada do ar e evaporação, rotulados com a data e a hora da amostragem e levados ao laboratório do IPEN (Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, São Paulo), onde as amostras serão armazenadas a 4°C. Uma vez que a amostra não será esterilizada e deverá ser usada "*in natura*" o menor tempo entre a coleta e a atividade experimental deve ser priorizado, para que as propriedades da água não alterem muito. No momento de serem usadas para os tratamentos propostos, as amostras de água serão aquecidas até a temperatura que apresentavam no momento da coleta.

4.2 Estudo clínico do tratamento de psoríase em modelo animal

4.2.1 Animais

O estudo será realizado utilizando 30 camundongos C57BL/6, machos e fêmeas de 20 a 30 g, do laboratório do biotério do IPEN, com idades variando entre 6 e 8 semanas. Os animais serão mantidos sob condições controladas com um período de luz-escuridão de 12:12 h, temperatura de 24 ± 1 °C e a uma dieta comercial e água *ad libidum*. Os animais terão um período de adaptação de 2 semanas em suas gaiolas individuais e todos os procedimentos utilizados no presente estudo cumprirão os procedimentos aprovados pelo Comitê de Ética da Comissão do IPEN e conformado com as normas internacionais (em anexo está a aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animais).

4.2.2 Indução de psoríase em modelo experimental por Imiquimode

Completada as 6 - 8 semanas de idade, os camundongos (n=30) receberão uma dose tópica diária de 6,25 mg de creme de Imiquimode (IMQ) comercialmente disponível (Aldara, 3M Pharmaceuticals, St. Paul, MN, EUA). O protocolo a ser seguido será baseado naquele estabelecido por Lee et al. (2014), pois estes autores

são os únicos que descrevem a ação de imersão de camundongos em água após a indução de IMQ, com a diferença de que utilizam uma quantidade de 4,15 mg de creme IMQ em cada aplicação. Esta alteração foi proposta visto que a literatura em geral cita a aplicação de 6,25 mg de IMQ no dorso do animal, equivalente a 3,125 mg de princípios ativos, como a quantidade necessária para indução de inflamação cutânea em camundongos com melhores resultados em termos de reprodutibilidade (van der Fits et al., 2009).

Todas as aplicações tópicas deverão cobrir uma área de 10% da pele dorsal posterior, tricotomizada, durante 5 dias consecutivos. Imediatamente após o período de aplicação do IMQ terá início o tratamento com as águas termais propostas. Durante o período de tratamento (duas semanas), a avaliação das lesões (evolução ou regressão) será feita fotografando-se o dorso do animal aos dias 1º, 4º, 7º, 10º e 14º do tratamento. Para que os animais sejam fotografados, estes serão anestesiados com cetamina (75 – 100 mg/kg de peso) e xilazina (6 – 10 mg/kg peso). Uma fotografia do dorso do animal, já tricotomizado, também será feita antes da aplicação do IMQ. A partir destas imagens serão avaliados, independentemente numa escala de 0 a 4, eritema, descamação e espessamento da pele, com base na clínica Área de Psoríase e Índice de Severidade (PASI), sendo 0, nenhum; 1, ligeiro; 2, moderado; 3, severo; 4, muito severo. O nível de eritema será avaliado utilizando uma tabela de pontuação com manchas vermelhas por um médico dermatologista não integrante da equipe desta pesquisa.

4.2.3 Tratamento

Um grupo composto por 5 animais receberá o creme IMQ e após o aparecimento das lesões na pele serão sacrificados para constituírem o grupo controle positivo de lesão. Cinco camundongos receberão creme de vaselina (Unilever, Greenwich, CT, EUA) e após o mesmo período de aplicações também serão sacrificados como controle negativo da lesão. O sacrifício consistirá da administração, por via intraperitoneal, de uma sobredosagem de cetamina 300mg/kg + xilazina 30mg/kg. Para o tratamento, cinco camundongos comporão o grupo teste de imersão em água mineral de Águas de Lindóia (Grupo A); cinco, de Águas de São Pedro (Grupo B); cinco, de Poços de Caldas (Grupo C) e cinco animais receberão tratamento com água deionizada que consistirá no controle de tratamento em água. Todas as amostras de águas serão mantidas nas mesmas condições de temperatura do momento da coleta na torneira em cada balneário quando de seu uso durante a terapia experimental.

A imersão de pacientes com psoríase que procuram as águas termias de Águas de Lindóia, Poços de Caldas ou Águas de São Pedro costuma durar 20 minutos diários, por uma semana. Assim, seria interessante proceder a terapia experimental em uma imersão individual do camundongo em água correspondente ao seu grupo por igual período de tempo. Entretanto, o protocolo de Lee et al. (2014) para modelo animal sugere banhos de imersão de cinco minutos por dia, por duas semanas. Esta duração está de acordo com a balneoterapia em psoríase que preconiza banhos por duas (Boros et al., 2013; Galve et al., 2012) ou três semanas (Seite et al., 2016). Desta forma, para o protocolo proposto para este trabalho, os camundongos serão tratados por suas semanas com imersões de 5 minutos.

Para as imersões, os animais serão colocados em um recipiente cilíndrico, com diâmetro aproximadamente igual ao comprimento de seu corpo e altura de pelo menos três vezes o seu tamanho, em pé, para evitar que este tenha condições de sair do recipiente durante o banho. Para construção destes recipientes serão utilizados canos de PVC empregados em instalações hidráulicas. A quantidade de água adicionada será a suficiente para cobrir o dorso do animal de forma que este fique com a cabeça fora da água.

4.2.4 Dosagem de citocinas

Após o período de tratamento da psoríase induzida por IMQ (incluindo os grupos controle positivo, não tratado e controle negativo, tratado com vaselina) com as diferentes águas em análise, os animais pertencentes a cada grupo serão eutanaziados e amostras de soro serão coletadas e estocadas a -70°C para análise de IFN- γ , IL-4, IL-5 e IL-17a por imunoenensaio a ser realizado no laboratório de Imunologia da Faculdade de Medicina Veterinária.

4.2.5 Avaliação histológica

Após o período de tratamento de duas semanas, a pele dorsal de cada camundongo sacrificado (controles positivo, controle negativo e testes) será retirada e submetida à avaliação histológica no Laboratório de Microscopia (Laboratório de Matriz celular – Reumatologia USP), quanto à alteração da derme, epiderme e células imunológicas. Será indicado ao laboratório o protocolo sugerido por Lee et al (2014) que consiste em fixar as amostras de pele com paraformaldeído a 10% e incorporadas em parafina. Para remover a parafina das secções de tecido que foram nela embebidas será empregado xileno como solvente e em seguida as amostras serão reidratadas numa série graduada de solução de álcool. As lâminas serão coradas com hematoxilina padrão (Sigma-Aldrich Chemical Co., St Louis, MO, EUA) e eosina

(Sigma-Aldrich Chemical Co.). A espessura da epiderme também poderá ser examinada sob um microscópio óptico.

4.3 Determinação da concentração de ^{222}Rn na água por meio da técnica de detecção por cintilação líquida.

A determinação da concentração de ^{222}Rn na água será feita espectrometria de cintilação líquida (LSC), que é uma metodologia comumente empregada para a quantificação do ^{222}Rn em água desde os anos 80 (Salonen, 1997). É uma técnica que permite analisar um grande número de amostras em série, de maneira fácil, rápida e precisa. Sua aplicação para a determinação de ^{222}Rn em águas subterrâneas e de abastecimento público tem sido descrita na literatura (Salonen 1993; Salonen e Hukkanen, 1997; López et al. 2004).

O Laboratório de Radiometria Ambiental do IPEN possui o espectrômetro Perkin Elmer Quantulus 1220. Este espectrômetro de cintilação líquida possui um analisador de forma de pulso (PSA) o qual permite a separação de emissões α/β e ainda possibilita baixíssimos níveis de background, características necessárias para a determinação de ^{222}Rn na água.

4.4 Determinação da concentração de ^{238}U e ^{232}Th e composição química da água por meio da técnica de análise por ativação neutrônica instrumental

As determinações das concentrações elementares serão realizadas por NAA. Esta técnica consiste no bombardeamento de um dado material seguido da medida da radioatividade induzida. Em geral, a irradiação é feita com nêutrons térmicos e a radioatividade resultante é medida usando-se a espectrometria dos raios gama emitidos pelos radioisótopos formados (IAEA, 2001).

A análise por ativação com nêutrons instrumental (AANI) é um método de análise não destrutivo e multielementar. O tempo de irradiação das amostras depende dos elementos que se deseja analisar, no caso dos elementos a serem analisados neste trabalho as amostras são irradiadas por períodos de 20 segundos (irradiação curta) e de 8 horas (irradiação longa), sob um fluxo de nêutrons de $10^{12}\text{n cm}^{-2}\text{ s}^{-1}$. Na irradiação curta as amostras serão contadas após um tempo de resfriamento de 2 minutos para determinação dos elementos Mg, V e Ti e novamente após um tempo de resfriamento de 1,5 horas para determinação de Mn, Na, Cl, K e Pd. Na irradiação longa as amostras serão contadas após um tempo de resfriamento de 5 a 6 dias para determinação de As, Br, La, Nd, Sb, Sm e U e novamente após um período de 13 a 15 dias para determinação dos elementos Ba, Ce, Cs, Co, Cr, Eu, Fe, Hf, Lu, Rb, Sc, Se, Ta, Tb, Th, Yb, Zn e Zr.

Uma vez que cada radioisótopo produzido no processo de ativação possui características de emissão (meia vida e energia das partículas ou radiação gama emitidas) é possível efetuar determinações por comparação com padrões certificados.

A concentração é obtida pela comparação das áreas de picos, obtidos nos espectros gama das amostras irradiadas e dos materiais de referência que são irradiados juntamente com as amostras.

A preparação das amostras de água para irradiação seguirá o seguinte procedimento: aproximadamente 1L de amostra será pesado e colocado em chapa aquecedora para concentração por evaporação até aproximadamente 20 a 30 mL, que serão resfriados à temperatura ambiente e posteriormente pesados para determinação do fator de concentração. Da solução final, aproximadamente 1 mL (também pesado) será transferida para papel de filtro com auxílio de micropipeta e deixada para secar sob lâmpada infravermelha. Após a secagem do papel, este será dobrado e embalado em sacos plásticos de polietileno e enviados para irradiação.

Como padrões serão utilizados soluções sintéticas, preparadas por diluição a partir de soluções padrão (SPEX CERTIPREP).

Uma vez que as concentrações elementares são geralmente muito baixas nestas amostras torna-se necessário um estudo detalhado do branco do procedimento analítico. Para verificar possíveis interferências serão determinadas as atividades resultantes da ativação do papel de filtro e dos reagentes utilizados (HNO_3) na determinação das concentrações dos elementos presente em amostra.

4.5 Determinação da concentração de ^{226}Ra ^{228}Ra e ^{210}Pb na água em contador proporcional de fluxo gasoso:

A determinação da atividade do ^{226}Ra e ^{228}Ra em água será realizada pela contagem alfa total e beta total de um precipitado de $\text{Ba}(\text{Ra})\text{SO}_4$ em detector proporcional de fluxo gasoso com baixa radiação de fundo. A determinação da concentração de ^{210}Pb em água será realizada pela medida beta total de um precipitado de PbCrO_4 em detector proporcional de fluxo gasoso com baixa radiação de fundo.

Adiciona-se a 1 litro de amostra 1mL de carregador de Ba^{+2} e 1mL de carregador de Pb^{+2} , com concentração 20 mg mL^{-1} . Em seguida adiciona-se gotas de indicador vermelho de metila e 10 mL de ácido cítrico 1 M. Em seguida, sob agitação, adiciona-se NH_4OH concentrado até a viragem do indicador de vermelho para amarelo.

A solução será levada a aquecimento até quase a ebulição e adiciona-se sob agitação, 50 mL de H_2SO_4 3 M e deixa-se decantar até o dia seguinte. Da solução obtida, descarta-se o sobrenadante e o precipitado é então centrifugado, lavado com H_2SO_4 0,1 M e novamente centrifugado. Em seguida, adiciona-se ao precipitado 2g de titriplex I (NTA – ácido nitrilotriacético), 40 mL de água deionizada e 7mL de NaOH 6 M e a mistura é aquecida, em banho Maria, até a dissolução total. À solução obtida, adiciona-se 5 mL de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, com concentração 25 mg mL^{-1} , e o pH é ajustado entre 4,5 e 5,0 com ácido acético glacial. O precipitado obtido nesta etapa é deixado em repouso por um dia e centrifugado. O sobrenadante é separado para determinação do ^{210}Pb e o precipitado para determinação de ^{226}Ra e ^{228}Ra .

O precipitado obtido na etapa anterior para a determinação de ^{226}Ra e ^{228}Ra é dissolvido a quente, pela adição 2,0 g de EDTA (ácido etileno diaminatetracético) e 5mL de NH_4OH concentrado. Em seguida são adicionados 5 mL de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, com concentração de 25 mg mL^{-1} , e gotas de vermelho de metila. Ajusta-se, então o pH com ácido acético. Anota-se dia e hora da precipitação. O precipitado é filtrado no dia seguinte e contado vinte e um dias após a precipitação no detector. O rendimento do químico do processo é obtido gravimetricamente.

À solução separada anteriormente contendo ^{210}Pb é adicionado 1mL de Na_2S 1 M a quente e deixa-se em aquecimento por 10 minutos. O precipitado obtido é lavado com água deionizada, centrifugado e dissolvido com gotas de HNO_3 concentrado. A solução é filtrada e o pH ajustado entre 4,5 e 5,0 com acetato de amônio 40%. Adiciona-se 2,5 mL de Na_2CrO_4 30% a quente para que ocorra a precipitação do ^{210}Pb , anota-se dia e hora da precipitação e o ^{210}Pb e contado após 10 dias no detector. O rendimento químico do processo é determinado gravimetricamente.

O equipamento de medida é um detector proporcional de fluxo gasoso de baixa radiação de fundo, marca EG&G Berthold, modelo LB770-2, com dez detectores de 60 mm de diâmetro e um contador de guarda em anticoincidência. O gás utilizado é o P-10, uma mistura de 90% de argônio e 10% metano, e as medições são feitas simultaneamente nos dez detectores durante 200 minutos.

4.6 Determinação da concentração de ^{222}Rn no ar por meio da técnica de detecção passiva com detectores de traços nucleares

Existem vários métodos para se medir a concentração de radônio no ar (NCRP-97, 1988); esses métodos podem ser agrupados em duas técnicas básicas: detecção ativa e detecção passiva. Na técnica de detecção ativa, por meio de bombeamento, uma amostra de vários litros do ar ambiente é coletada em um filtro e

este é então medido. Na técnica de detecção passiva não existe um processo de coleta de ar, os detectores são simplesmente expostos ao ar ambiente.

A escolha do método de medida é baseada no tipo de informações necessárias, nas características do local monitorado, no tempo de amostragem, na sensibilidade dos instrumentos e nos custos do projeto. Neste trabalho, será utilizado o método de detecção passiva com detectores de traços nucleares de estado sólido, para a determinação da concentração de radônio no ar (Manocchi et al., 2014). Este método consiste na exposição dos detectores ao ar ambiente e posterior tratamento químico do detector e leitura dos traços produzidos na sua superfície por meio de um microscópio óptico. A análise de detectores traços pode ser classificada como manual ou automática; essa última se dá pela associação de um microscópio óptico e uma câmara de vídeo acoplada a um computador com “softwares” previamente definidos. Esses “softwares” realizam a contagem automática dos traços através dos tons de cinza presentes na imagem, tornando a leitura um processo mais rápido, confiável e confortável para o operador.

A determinação da concentração de radônio no ar com detectores de traços apresenta muitas vantagens, tais como: o baixo custo, a facilidade de manuseio, a alta sensibilidade, a simplicidade da técnica de contagem dos traços, a discriminação das partículas de acordo com o tipo de ionização primária e a estabilidade em condições ambientais adversas.

A determinação da concentração de ^{222}Rn no local de estudo será feita pelo método de detecção passiva utilizando-se uma câmara de difusão (dosímetro tipo NRPB). O dosímetro tipo NRPB é composto por duas partes plásticas, a inferior e a superior, que se encaixam fechando-se numa câmara. Esta técnica utiliza o princípio da câmara de difusão, em que apenas o gás radônio é capaz de se difundir para o interior do dosímetro, através de pequenos “gaps” entre as partes superior e inferior, onde está posicionado o detector.

O cálculo das concentrações de radônio (^{222}Rn) no ar será feito considerando-se a densidade traços obtida, o tempo durante o qual os detectores ficam expostos e fatores de conversão que relacionam as densidades de traços obtidas e as concentrações dos radionuclídeos de interesse no ar.

Os detectores serão expostos por um período de três meses, quando serão substituídos por outros até que seja completada a monitoração durante 1 ano, no mínimo. Após a troca, os detectores serão analisados no Laboratório de Radiometria

Ambiental do IPEN. A análise compreende o ataque químico feito com solução de hidróxido de potássio e a determinação da densidade de traços.

4.7 Dose efetiva comprometida

A metodologia para o cálculo da dose devido à inalação de radônio pode seguir duas abordagens distintas, a da dosimetria física (a partir da medida da dose absorvida nas células do epitélio bronquial) ou da avaliação epidemiológica (a partir da avaliação do detrimento sofrido pelos mineiros de ferro, carvão e urânio).

Neste projeto de pesquisa, a dose efetiva comprometida pela inalação de radônio será determinada seguindo-se os procedimentos da Comissão Internacional de Proteção Radiológica (ICRP) e adotando-se a abordagem epidemiológica, a partir da seguinte expressão:

$$E = C \times I \times t \times FCD \quad (1)$$

onde:

E - dose efetiva comprometida devido à inalação do radionuclídeo de interesse (mSv/a)

C - concentração do radionuclídeo de interesse (Bq/m³)

I - taxa anual de respiração média do homem referência (m³/h)

t - tempo de exposição (h/a)

FCD - fator de conversão de dose para a inalação do radionuclídeo de interesse (mSv/Bq)

4.8 Análise estatística

Todos os dados terão tratamento estatístico, em método a ser futuramente delineado em função dos dados apresentarem ou não distribuição paramétrica. Serão consideradas significativas as diferenças com $p < 0,05$.

5. Principais contribuições científicas ou tecnológicas da proposta

Pretende-se com este projeto verificar a eficácia do tratamento de psoríase com a utilização de tratamento por águas minero medicinais contribuindo desta forma para o desenvolvimento da balneoterapia englobada na Política Nacional de Práticas

Integrativas e Complementares, Portaria Nº 971, de 3 de maio de 2006 do Ministério da Saúde e a Portaria Nº 127 de 25 de março de 2011 do DEPARTAMENTO NACIONAL DE PRODUÇÃO MINERAL - DNPM.

Formação de recursos humanos com a formação de pelo menos dois alunos de mestrado e um aluno de iniciação científica com temas relacionados a este projeto.

6. Orçamento detalhado

O auxílio solicitado na forma de material permanente no país, material permanente importado, material de consumo importado, material de consumo no país e diárias encontra-se discriminado na planilha orçamentária em anexo.

Os reagentes analíticos e vidrarias, solicitados destinam-se à realização do preparo e tratamento químico das amostras analisadas.

Os frascos e solução cintiladora destinam-se às medidas da concentração de radônio na água pela técnica de cintilação líquida.

Soluções padrão para análise por ativação para utilização como padrões analíticos destas medidas.

Papel de filtro, para determinação dos sólidos totais nas amostras de água.

Frascos de polietileno para coleta e armazenamento das amostras de água.

A centrífuga destina-se à análise de ^{226}Ra , ^{228}Ra e ^{210}Pb nas amostras.

Balança semi-analítica para pesagem das amostras de água.

Chapa aquecedora para pré-concentração das amostras de água.

ASPEC-927 sistema de aquisição de dados para espectrometria gama. Embora o laboratório de análise por ativação neutrônica conte com um bom número de espectrômetros para medidas gama na análise por ativação, os sistemas são antigos, com mais de 20 anos, e baseados em interface ISA, hoje obsoletos e inexistentes nos computadores modernos, daí a necessidade de sua substituição.

O computador do tipo notebook destina-se à coleta de dados durante a pesquisa de campo.

Computador desktop: um deles destinado ao sistema de aquisição de dados da espectrometria gama na análise por ativação e o outro para redação de relatórios e cálculos, etc.

Geladeira para conservar as amostras de água.

Os detectores de traços nucleares do estado sólido do tipo CR-39 e as câmaras de difusão destinam-se às medidas da taxa de exalação de radônio pela técnica de câmara de acumulação e às medidas das concentrações de radônio e filhos no ar.

O medidor multiparâmetro destina-se à obtenção dos seguintes dados na água *in situ*: pH, Eh, O₂ dissolvido, condutividade, salinidade e temperatura.

O kit de citosinas inflamatórias destina-se à medição das concentrações de citosinas nos animais após a indução da psoríase e após o tratamento.

Imiquimode (IMQ), Aldara, 3M Pharmaceuticals; Creme de vaselina, Unilever; cetamina e xilazina destinam-se à indução da psoríase nos animais, controle positivo, analgesia e eutanásia dos animais.

As diárias destinam-se ao deslocamento até as cidades de Águas de Lindóia, Poços de Caldas e Águas de São Pedro para a coleta das amostras.

7. Cronograma físico

Pretende-se concluir o projeto de pesquisa em 24 meses (2019-2020), conforme discriminado a seguir:

- Determinação das concentrações de ²²²Rn no ar – 1 coleta por trimestre durante 2 os dois anos do projeto;
- Determinação das concentrações de ²²²Rn na água - 1 coleta por trimestre durante 2 os dois anos do projeto;
- Determinação das concentrações de ²³⁸U e ²³²Th na água - 1 coleta por trimestre durante 2 os dois anos do projeto;
- Determinação das concentrações de ²²⁶Ra, ²²⁸Ra e ²¹⁰Pb na água - 1 coleta por trimestre durante 2 os dois anos do projeto;
- Determinação dos elementos As, Ba, Br, Ce, Cs, Co, Cr, Eu, Fe, Hf, K, La, Lu, Na, Nd, Rb, Sb, Sc, Se, Sm, Ta, Tb, Yb, Zn e Zr - 1 coleta por trimestre durante 2 os dois anos do projeto;
- Indução de psoríase em modelo experimental por Imiquimode – 1º trimestre de 2020;
- Tratamento dos animais -1º trimestre de 2020;
- Sacrifício dos animais e análise histológica - 1º trimestre de 2020;
- Avaliação da dose de radiação recebida pelos trabalhadores e população que frequenta o local – 4º trimestre de 2020;

- Correlacionar os dados radiológicos com os dados hidrogeológicos – 4º trimestre de 2020;
- Compilação dos dados obtidos – 4º trimestre de 2020;
- Avaliação dos resultados e redação do relatório científico final – 4º trimestre de 2020.

8. Identificação dos demais participantes do projeto

Maurício Moralles – CRPq - Pesquisador

Marcia Pires de Campos – CMR – Pesquisadora colaboradora do IPEN

Cátia Heloisa Rosignoli Saueia - CMR – Pesquisadora colaboradora do IPEN

Zélia Maria Nogueira Britschka – Colaboradora externa

Lucas Sanzaneze Gonçalves de Souza – Aluno de mestrado – CRPq

9. Infraestrutura e apoio técnico para o desenvolvimento do projeto e anuência do responsável pela unidade do IPEN

Centro do Reator de Pesquisas – CRPq

O LAN – Laboratório de Análise por Ativação – conta com o apoio do Reator IEA-R1 para irradiação das amostras para determinações por análise por ativação, espectrômetros de raios gama das marcas CANBERRA e ORTEC para medidas por espectrometria gama das amostras irradiadas.

Centro de Metrologia das Radiações - CMR

Dois detectores proporcionais de fluxo gasoso marca Berthold, modelo LB 570-2, de baixa radiação de fundo para determinações de emissores alfa e beta.

Dois espectrômetros alfa Canberra Alpha Analyst, com oito câmaras cada um e detectores PIPS de baixa radiação de fundo para determinação de emissores alfa.

Dois espectrômetros Perkin Elmer Quantulus 1220 para determinação de emissores alfa e beta por Cintilação em Meio Líquido.

Um microscópio óptico marca Zeiss com câmera de vídeo acoplada e mesa automatizada utilizado na análise de detectores de traços para medida de ²²²Rn.

10. Quantidade prevista de produção de C&T

Publicação de pelo menos dois artigos em periódicos internacionais de alto fator de impacto;

Apresentação de trabalhos em pelo menos dois congressos, sendo um nacional e um internacional;

11. Disponibilização dos resultados da pesquisa para o mercado/sociedade

Além das publicações científicas em periódicos os resultados serão disponibilizados aos balneários, cujas águas serão utilizadas no trabalho, para divulgação entre seus pacientes, frequentadores, bem como, para o público em geral em suas respectivas cidades.

Referências Bibliográficas

BENDER T, NAGY G, BARNA I, TEFNER I, KÁDAS E, GÉHER P., 2007. The effect of physical therapy on beta-endorphin levels. *Eur J Appl Physiol* 100:371–382

BONOTTO, D M, 2016. Hydrogeochemical study of spas groundwaters from southeast Brazil. *Journal of Geochemical Exploration* 169: 60–72.

BOROS M, KEMÉNY Á, SEBŐK B, BAGOLY T, PERKECZ A, PETŐHÁZI Z, MAÁSZ G, SCHMIDT J, MÁRK L, LÁSZLÓ T, HELYES Z, SZOLCSÁNYI J, PINTÉR E, 2013. Sulphurous medicinal waters increase somatostatin release: It is a possible mechanism of anti-inflammatory effect of balneotherapy in psoriasis, *European Journal of Integrative Medicine*, 5(2): 109-118.

BOUVIER, C E, Balneotherapy in Europe – the current situation. *Annals of Physical and Rehabilitation Medicine* 57S, 2014, e159–e162.

BRICKER, O P, JONES, B F, 1995. Main factors affecting the composition of natural waters. In: Salbu, B., Steinnes, E (ed). *Trace Elements in Natural Waters*. CRC Press. Boca Camundongon. 1- 20.

CAMPOS, M P, PECEQUILO, B R S, 2003 Exposure assessment due to building materials in ordinary houses at São Paulo, Brazil. *Revista Brasileira de Pesquisa e Desenvolvimento*, São Paulo, v. 5, n. 2, p. 60-65.

CAMPOS, M P, PECEQUILO, B R S, MAZZILLI, B P, 2010. ²²²Rn and ²¹²Pb exposures at a Brazilian spa. *Radiation Protection Dosimetry*, v. 141, p. 210-214.

CANTONE E, MAIONE N, DI RUBBO V, ESPOSITO F, IENGO M. 2015. Olfactory performance after crenotherapy in chronic rhinosinusitis in the elderly. *Laryngoscope*, 125(7):1529–34.

COCCHERI S, GASBARRINI G, VALENTI M, NAPPI G, DI ORIO F, 2008. Has time come for a re-assessment of spa therapy? The NAIADE survey in Italy. *Int J Biometeorol* 52:231–237

DEPARTAMENTO NACIONAL DE PRODUÇÃO MINERAL - DNPM. Código de Águas Minerais: Decreto-Lei nº 1.985, de 29-1-1940. 3.ed. Rio de Janeiro, 1966.

DEPATAMENTO NACIONAL DE PRODUÇÃO MINERAL. Código de Águas Minerais, Decreto-Lei Nº 7.841 de 08 de Agosto de 1945.

EISENBUD, M., **Environmemtal Radioactivity**. 2nd ed. Academic Press, Orlando, 1987.

FALAGAS M E, ZARKADOULIA E, RAFAILIDIS P I, 2009. The therapeutic effect of balneotherapy: evaluation of the evidence from randomised controlled trials. *Int J Clin Pract* 63:1068–1084.

GALVE J J G, PEIRÓ P S, LUCAS M O, TORRES A H, GIL E S, PÉREZ M B, 2012. Quality of life and assessment after local application of sulphurous water in the home environment in patients with psoriasis vulgaris: A randomised placebo-controlled pilot study, *European Journal of Integrative Medicine*, 4(2): e213-e218.

HARARI M, CZARNOWICKI T, FLUSS R, RUZICKA T, INGBER A, 2012. Patients with early-onset psoriasis achieve better results following Dead Sea climatotherapy. *J Eur Acad Dermatol Venereol*, 26: 554-559.

IAEA – INTERNATIONAL ATOMIC ENERGY AGENCY. Use of research reactors for neutron activation analysis. 2001. (IAEA- TECDOC 1215).

ICRP-32. INTERNATIONAL COMMISSION ON RADIOLOGICAL PROTECTION. Limits for inhalation of radon daughters by workers. Pergamon Press. Oxford, 1981.

KILIÇOĞLU O, DÖNMEZ A, KARAGÜLLE Z, ERDOĞAN N, AKALAN E, TEMELLI Y, 2010. Effect of balneotherapy on temporospatial gait characteristics of patients with osteoarthritis of the knee. *Rheumatol Int* 30:739–747 .

KIM B K, PARK M, KIM J Y, LEE K H, WOO S Y, 2016. Heat shock protein 90 is involved in IL-17-mediated skin inflammation following thermal stimulation. *Int J Mol Med.*, 38(2): 650-658.

KOVÁCS C, BOZSIK Á, PECZE M, BORBÉLY I, FOGARASI A, KOVÁCS L, TEFNER IK, BENDER T. 2016. Effects of sulfur bath on hip osteoarthritis: a randomized, controlled, single-blind, follow-up trial: a pilot study. *Int J Biometeorol.* 60(11):1675-1680.

MARTINS, A. M.; MANSUR, K. L.; ERTHAL, F.; MAURÍCIO, R. C.; PEREIRA FILHO, J. C.; CAETANO, L. C., 2002. Águas Minerais do Estado do Rio de Janeiro. Niterói: DRM-RJ, p.121.

LEE, Y B; LEE, J Y; LEE, H J; YUN, S T; LEE, J T; KIM, H J; YU, D S; WOO, S Y, KIM, J W, 2014. Immunomodulatory Effects of Balneotherapy with Hae-Un-Dae Thermal Water on Imiquimod-Induced Psoriasis-Like Murine Model. *Ann Dermatol* 26(2) 221-230.

LÓPEZ, M G, SÁNCHEZ, A M, ESCOBAR, V G, 2004. Estimates of the dose due to ²²²Rn concentrations in water, *Radiat. Prot. Dosim.*, 111(1): 3–7.

MÁDUAR, M F, CAMPOS, M P, MAZZILLI, B P, VILLAVERDE, F L, 2011. Assessment of external gamma exposure and radon levels in a dwelling constructed with phosphogypsum plates. *Journal of Hazardous Materials*, 190: 1063–1067.

MANOCCHI, F K, CAMPOS, M P, DELLAMANO, J C , SILVA, G M, 2014. Radon exposure at a radioactive waste storage facility. *J. Radiol. Prot.* 34: 339–346.

MARTIN R, HENLEY JB, SARRAZIN P, SEITÉ S, 2015. Skin Microbiome in Patients With Psoriasis Before and After Balneotherapy at the Thermal Care Center of La Roche-Posay. *J Drugs Dermatol.* 14(12):1400-5.

NCRP-97. NATIONAL COUNCIL ON RADIATION PROTECTION AND MEASUREMENTS. Measurement of radon and radon daughter in air. Nov. 15, 1988.

ONER, F, YIGITOGLU, I, YALIM, H A, 2013. Measurements of radon concentrations in spa waters in Amasya, Turkey. *Radiation Protection Dosimetry*, 157(2), 221-224.

PERONI A, GISONDI P, ZANONI M, GIROLOMONI G. 2008. Balneotherapy for chronic plaque psoriasis at Comano spa in Trentino, Italy. *Dermatol Ther*, 21, Suppl. 1: S31-S38.

PORSTENDORFER, J. Properties and behaviour of radon and thoron and their decay products in the air. In: Proc. FIFTH INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON THE NATURAL RADIATION ENVIRONMENT, 1993, Luxembourg, Bélgica, p. 44-46, 1993.

RADOLIĆA, V, VUKOVIĆA, B, ŠMITB, G, STANIĆA, D, PLANINIĆA, J, 2005. Radon in the spas of Croatia. *Journal of Environmental Radioactivity*, 83 (2), 191–19.

ROUTH H B, BHOWMIK K R, PARISH L C, WITKOWSKI J A, 1996. Balneology, mineral water, and spas in historical perspective. *Clin Dermatol* 14: 551–554.

SALONEN L, HUKKANEN H, 1997. Advantages of low-background liquid scintillation alpha-spectrometry and pulse shape analysis in measuring ²²²Rn, uranium, ²²⁶Ra in groundwater samples. *Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry*, 226(1-2): 67-74.

SALONEN, L. Measurement of low levels of ²²²Rn in water with different commercial liquid scintillation counters and pulse-shape analysis. In: LIQUID SCINTILLATION SPECTROMETRY 1992 - INT. CONF. ON ADVANCES IN LSC, RADIOCARBON, p.361–372, 1993a.

KELLER S, KÖNIG V, MÖSGES R, 2014. Thermal Water Applications in the Treatment of Upper Respiratory Tract Diseases: A Systematic Review and Meta-Analysis, *Journal of Allergy*, Volume 2014: 1 – 17.

SEITE S, ORESAJO C, SEITE S, FLORES G E, HENLEY J B, SARRAZIN P, AINOUCHE R, FIERER N, MARTIN R, 2016. Skin microbiome in patients with psoriasis before and after balneotherapy at the thermal care center of La Roche-Posay, *Journal of the American Academy of Dermatology*, 74(5), Supplement 1, p. AB276.

TABAR, E, YAKUT, H, 2014. Radon measurements in water samples from the thermal springs of Yalova basin, Turkey. *Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry*, 299 (1): 311-319.

TABOLLI S, CALZA A, DI PIETRO C, SAMPOGNA F, ABENI D. Q, 2009. Quality of life of psoriasis patients before and after balneo -- or balneophototherapy. *Yonsei Med J*, 50: 215-221.

TEMPFER, H., SCHOBER, A., HOFMANN, W., LETTNER, H., STEGER, F., 2005. Biophysical mechanisms and radiation doses in radon therapy, *Radioactivity in the Environment*, 7, 640-648.

VAN DER FITS L, MOURITS S, VOERMAN J S, KANT M, BOON L, LAMAN J D, CORNELISSEN F, MUS AM, FLORENCIA E, PRENS EP, LUBBERTS E. 2009. Imiquimod-induced psoriasis-like skin inflammation in mice is mediated via the IL-23/IL-17 axis. *J Immunol*, 182: 5836-5845.

VIEIRA B L, LIM N R, LOHMAN M E, LIO P A. 2016. Complementary and Alternative Medicine for Atopic Dermatitis: An Evidence-Based Review. *Am J Clin Dermatol*, 17(6): 557-581.