

Projeto *InterCentros*

**Projeto:**  
**Dosagem de íons em amostras de saliva utilizando técnicas analíticas nucleares de AAN e FRX: procedimentos alternativos para prática clínica**

Coordenadora: Dra. Cibele Bugno Zamboni

**Área da Atuação:** CIÊNCIA E TECNOLOGIA NUCLEARES

**Centros Participantes e Responsáveis**

CRPq: Dra. Cibele Bugno Zamboni

CQMA: Dra. Vera Lucia Ribeiro Salvador

**Síntese**

A execução de análises bioquímicas (dosagem de íons), em amostras de fluidos corpóreos, é de grande relevância no âmbito da saúde pública, uma vez que estas fornecem uma avaliação entre as interações metabólicas existentes entre os macro e microelementos no organismo, permitindo diagnósticos e/ou de monitoramento de tratamento de disfunções diversas. Nos últimos anos, com o apoio do CNPq e da FAPESP, as técnicas de Análise por ativação com Nêutrons (AAN) e de Fluorescência de Raios-X (FRX) passaram a ser testadas no CRPq (Laboratório de Espectroscopia e Espectrometria das radiações - LEER) e no CQMA (Laboratório de Fluorescência de Raios X - FRX) para a realização dessas análises. Foram investigadas amostras de sangue e soro de seres humanos e de animais de experimentação bem como fluidos de animais invertebrados que são vetores de diversas doenças<sup>1-10</sup>. Este investimento científico resultou em Inovação Tecnológica para prática clínica com vasta aplicação (medicina preventiva e de diagnóstico, clínica pediátrica, monitoramento de dialisados, triagem de bancos de sangue, realização de testes pré-clínicos “in vivo” de insumos médico, dentre outros) além de levar ao desenvolvimento de procedimentos clínicos com melhor relação custo-efetividade<sup>11-16</sup>. Dando continuidade, neste projeto pretende-se dosar íons na saliva humana, estabelecendo-se os valores de referência (intervalo de normalidade) para uso em prática clínica. Esta alternativa irá constituir um método simples e não invasivo de coleta quando comparada ao uso de sangue, além de agregar maior eficiência no pré-diagnóstico de disfunções bucais de alta prevalência na população brasileira. Atualmente, as disfunções bucais afetam vários grupos da população: é de alta prevalência na população idosa, em pacientes obesos, na doença falciforme, dentre outras. Disponibilizar atendimento à saúde fazendo uso desta alternativa para prática clínica trará benefícios tanto no âmbito econômico como social, isto é, redução de custo de no mínimo 50% e melhorias na qualidade de vida.

**Palavras Chave:** saliva, íons, Fluorescência de Raios X (FRX), análise por Ativação com Nêutrons (AAN), valores de referência

## Motivações Relacionadas à Proposição do Projeto

A saliva é um fluido aquoso, transparente, que é secretado pelas glândulas salivares diretamente na cavidade bucal. É constituída principalmente de água (98%), enzimas e minerais. Dentre as funções que desempenha, tem-se o controle da quantidade de água do organismo; manutenção da acidez da boca (o que previne a cárie dentária); participa na digestão e na manutenção do equilíbrio que regula a excreção de fluidos corporais e também segrega um hormônio que tem um papel importante no desenvolvimento do paladar<sup>17,18</sup>. Nos seres humanos há três pares de grandes glândulas salivares (parótida, submandibular e sublingual) e numerosas glândulas menores, localizadas principalmente na mucosa bucal, e que contribuem para a formação de saliva. A glândula submandibular contribui com cerca de 70-75% da secreção, enquanto a glândula parótida segrega cerca de 20-25%, e apenas pequenas quantidades são secretadas a partir de outras glândulas salivares. Saliva total é a mistura destas secreções glandulares e outros componentes, tais como bactérias e células epiteliais<sup>19,20</sup>.

Nos últimos anos, o uso da saliva como um fluido de diagnóstico tem aumentado. Investigações de vazão salivar, pH, componentes moleculares e inorgânicos, hormônios e proteínas têm apresentado progresso significativo em ensaios clínicos para o diagnóstico<sup>21</sup>. Entre os elementos inorgânicos da saliva, Na, K e Cl são majoritários e responsáveis manutenção da osmolaridade enquanto íons de Ca, P e Mg (constituintes secundários), bem como Cl, aumentam a resistência do esmalte à cárie. Os níveis de Ca na saliva também atuam como um indicador de processo inflamatório da gengiva<sup>21,22</sup>, que tem alta incidência na população brasileira, enquanto que níveis elevados de Br, Fe, I, S e Zn podem ser relacionados a ingestão medicamentos e drogas ilícitas (doping), estimulantes, suplementos alimentares e fortificantes<sup>23-25</sup>.

As principais vantagens para utilização de saliva em diagnósticos específicos (comparativamente ao soro e plasma) são relacionadas ao acesso fácil e a simplicidade na coleta (não-invasivo). Outra vantagem está relacionada às quantidades: o ser humano pode produzir de 1 a 2 litros de saliva por dia (o fluxo de saliva de um adulto saudável é aproximadamente 0,4 mL/min<sup>25</sup>). Além disso, o uso de procedimentos alternativos, como as técnicas analíticas nucleares de AAN e FRX, compõem procedimentos não-destrutivos (as análises podem ser repetidas sempre que necessário).

A investigação de íons na saliva humana é alvo de estudos no Laboratório de Espectroscopia e Espectrometria das Radiações (LEER) do IPEN, juntamente com outros fluidos corpóreos (sangue total, soro, urina), cujo foco principal é a proposição de intervalo de normalidade para sua utilização em prática clínica (dosagem de íons). Estudos com a população brasileira já foram realizados utilizando a técnica de Análise por Ativação com Nêutrons (AAN) gerando resultados preliminares promissoras para diagnóstico de doenças bucais<sup>26-28</sup>. Estes estudos fazem parte de uma linha de pesquisa multidisciplinar, de âmbito Institucional, denominado “Estudo da Distribuição de Metais e Íons em Amostras Biológicas por técnicas Analíticas: obtenção dos valores de referência”, em andamento no LEER (IPEN) em colaboração com o CRMQ (parceiro do IPEN) e com Bancos de Sangue e Laboratórios Hematológicos de diferentes regiões do Brasil, Universidades e Centros de Pesquisas.

Nos últimos anos, estas investigações foram realizadas com o apoio financeiro da FAPESP e CNPq. Neste contexto, foi possível otimizar o uso de equipamento portátil baseado na tecnologia de Fluorescência de Raios X para a execução de análises clínicas (dosagem de Ca, Cl, Fe e K) em sangue e soro. Esta metodologia alternativa mostrou-se bastante promissora para uso em várias áreas da saúde, além de agregar a possibilidade de uso fora das dependências

laboratoriais. Neste projeto pretende-se ampliar a capacidade de uso deste espectrômetro portátil (modelo X-123 SDD, alvo de Ag da Amptek) para execução de testes bioquímicos em amostras de saliva, bem como avaliar o uso de alvo de Rh (solicitado neste projeto). No âmbito geral, os conhecimentos gerados levarão à introdução de novos procedimentos de diagnóstico no mercado nacional, para prática clínica, com benefício direto na qualidade de vida de grupos da população com disfunções bucais.

### **Justificativa**

A identificação de possíveis biomarcadores na saliva pode estimular o seu uso em procedimentos laboratoriais com vantagens (comparativamente ao soro e plasma) isto é, fácil acesso e simplicidade na coleta (não necessita do uso de reagentes e anticoagulantes). Além disso, a relação custo/benefício utilizando amostras de saliva pode ser mais competitiva do que as análises realizadas em sangue, para algumas disfunções específicas de alta prevalência na população brasileira<sup>29-34</sup>.

Considerando-se ainda, que há muitas controvérsias na literatura sobre as indicações, a periodicidade e o tipo de triagem laboratorial a ser aplicada na infância, o desenvolvimento de alternativas diagnósticas menos invasivas e menos traumáticas poderiam facilitar a triagem laboratorial pediátrica levando a diagnóstico eficaz e precoce. Além disso, dados da Pesquisa Nacional de Saúde<sup>27</sup> reforçam a necessidade de políticas e ações que minimizem as desigualdades em saúde bucal, garantindo acesso aos subgrupos populacionais mais vulneráveis de acordo com suas necessidades de saúde.

### **Objetivos**

- ✓ Realizar um mapeamento dos componentes inorgânicos (íons e metais) em amostras de saliva de adultos e crianças saudáveis
- ✓ Identificar íons e metais que possam estar relacionados a disfunções bucais de alta prevalência na população brasileira (prioritariamente halitose, gengivite e doença periodontal)
- ✓ Desenvolvimento de tecnologia com transferência de know-how: Otimizar o uso de um sistema portátil baseado na técnica de FRX, associado a um procedimento eficaz, rápido e de baixo custo, para prática clínica em saliva
- ✓ Elaboração de novos protocolos clínicos de diagnóstico de disfunção bucais
- ✓ Fortalecer o atendimento à saúde de grupos com disfunções bucais de alta prevalência bem para grupos populacionais que se encontram em condições de vulnerabilidade

## Metodologia

### *Análise por Ativação com Nêutrons*

O princípio da técnica de ativação neutrônica<sup>35</sup> está em expor o material a ser analisado a um bombardeio de nêutrons, de modo que ocorra a formação de núcleos radioativos por meio de reações nucleares. Desta forma, a partir da medida da radiação gama emitida por esses núcleos radioativos é possível realizar análises (qualitativas e quantitativas) dos elementos inorgânicos presentes na amostra. Dentre as reações com nêutrons, particularmente a do tipo  $(n,\gamma)$  é de grande interesse, pois para a grande maioria dos elementos essa é a reação mais favorável para nêutrons térmicos (caso do reator de pesquisas IEA - R1 disponível no IPEN/CNEN-SP). Normalmente, os produtos dessa reação ao decaírem emitem raios gama característicos, que podem ser eficientemente detectados permitindo, além da identificação da composição da amostra, sua quantificação.

*Método Instrumental (INAA).* Neste processo de ativação a amostra e o padrão (matriz com teor conhecido do elemento a ser determinado) devem ser irradiados sob a mesma intensidade do feixe de nêutrons garantindo as mesmas condições de ativação. Desta forma, as concentrações dos elementos na amostra são obtidas a partir das concentrações estabelecidas no padrão inserindo um fator de correção (devido à diferença de tempo entre a medida da radiação gama do padrão e da amostra) e expressa pela equação:

$$C_{amostra} = \frac{A_{amostra} C_{padrão} m_{padrão} e^{\lambda(te)}}{A_{padrão} m_{amostra}}$$

$C_{amostra}$	concentração do elemento na amostra
$A_{amostra}$	taxa de contagem da amostra
$C_{padrão}$	concentração do elemento no padrão
$m_{padrão}$	massa do padrão
$A_{padrão}$	taxa de contagem do padrão
$m_{amostra}$	massa da amostra
$\lambda$	constante de desintegração
$T_e$	tempo de espera entre o término da contagem do padrão e início da contagem da amostra

A ativação da amostra é feita na estação pneumática de irradiação e/ou no núcleo do reator IEA-R1 do CRPq/IPEN. A amostra é acondicionada no interior do dispositivo de irradiação (confeccionado em material plástico com as seguintes dimensões: 2,5 cm diâmetro interno e 7,0 cm de comprimento) juntamente com o padrão (material de referência certificado). Concluída a irradiação, amostra e padrão são levados para contagem no espectrômetro- $\gamma$ , permitindo a identificação e cálculo das áreas das transições- $\gamma$  de interesse. A concentração dos elementos é obtida através do software *Ativação*<sup>36</sup>.

### *Fluorescência de Raios-X Por Dispersão de Energia*

A técnica de Fluorescência de Raios X por Dispersão de Energia (EDXRF)<sup>37</sup> é não destrutiva permitindo a análise qualitativa e quantitativa dos elementos químicos do Na ao U simultaneamente e de modo rápido. Baseia-se na medida das radiações características

emitidas pelos elementos da amostra, quando excitados com tubo de raios X. Estas radiações têm energias conhecidas para cada elemento químico e sua intensidade depende da sua concentração na amostra.

As amostras podem ser analisadas na forma de depósito em papel de filtro, na forma de pó solto acondicionado em porta amostra de polietileno com fundo de polipropileno de 5 micra de espessura.

No equipamento (modelo EDX-720 da Shimadzu) os raios X provenientes da amostra são selecionados por meio de pulsos eletrônicos produzidos por um detector Si-Li e identificados pelas suas energias características de raios X. Para a quantificação dos elementos pode ser usado o método de curva de calibração ou o método de parâmetros fundamentais (FP), que permite determinar a composição química de uma amostra dispensando o uso de padrões similares. Utilizando parâmetros instrumentais (tubo de raios X, detector, geometria e outros) e parâmetros fundamentais (distribuição espectral primária, coeficientes de absorção fotoelétrica e de massa e rendimento de fluorescência) é possível construir curvas de sensibilidade instrumental. A sensibilidade instrumental de um elemento químico é a relação das intensidades fluorescentes medidas e teóricas. Dessa forma, é possível montar uma biblioteca de sensibilidade para vários elementos químicos. Espectrômetros comerciais incluem bibliotecas de sensibilidade baseadas em intensidades fluorescentes medidas a partir de elementos puros (óxidos e metálicos) de composição conhecida. A determinação da sensibilidade de elementos químicos não medidos é realizada pela interpolação.

#### *Coleta e Preparo das Amostras*

**Adultos e adolescentes:** As amostras de saliva total não estimulada são coletadas de indivíduos saudáveis, para o maior intervalo de faixa etária possível e em função de gênero. Antes da coleta os doadores realizam uma prévia lavagem com água destilada. A coleta é realizada próximo da hora do almoço (10:00-12:00hs), espontaneamente (sem estimulação), diretamente em recipientes de plástico esterilizados. A saliva é coletada por profissional habilitado.

**Crianças:** A população que será submetida ao estudo é composta pelos pacientes do Ambulatório de Pediatria do Hospital Universitário da Universidade de São Paulo (HU-USP), também colaborador de LEER. Os pacientes são atendidos pelos médicos residentes da residência médica em pediatria, sob supervisão de médicos pediatras.

Após a coleta, a saliva será mantida refrigerada até seu uso. Serão preparados dois tipos de amostras: líquidas que são depositadas em papel de filtro Whatman-nº42 (200µL, em duplicata) e amostras liofilizadas fazendo uso de todo o material biológico restante da coleta. As amostras serão utilizadas nas medidas de FRX e AAN (métodos não destrutivos). Todos os pacientes e seus responsáveis receberão esclarecimento detalhado sobre os objetivos do trabalho e procedimentos que serão submetidos, e serão convidados a confirmar sua participação no estudo através de termo de consentimento (livre e esclarecido). Desde 2017 amostras estão sendo coletadas, de acordo com o normativo vinte (CAAE: 51110315.1.0000.0076) e estão armazenadas no banco de amostras do LEER. As amostras são divididas em dois grupos: doadores saudáveis (grupo de controle) e com disfunção bucal.

## Principais contribuições

No âmbito científico:

- ✓ Utilização de marcadores específicos contribuindo para o diagnóstico precoce e monitoramento de patologias bucais diversas.
- ✓ Elaboração de novos protocolos clínicos fazendo uso de fluido salivar

No âmbito tecnológico/econômico

- ✓ Viabilidade de uso de um sistema portátil e de fácil transporte agregando menor custo-benefício a prática clínica
- ✓ Procedimento eficaz, não-evasivo e rápido para prática clínica

Além disso, a realização de parcerias com Universidades e Centros de Ciências na área da saúde poderão criar um facilitador que permite estender seu uso em áreas diversas da saúde (Toxicologia, Medicina esportiva, Nutrição e outras) disponibilizando para mercado/sociedade, em médio-longo prazo, atendimento para realização desses exames clínicos.

No âmbito de ação social

Possibilidade de melhorias na condição de saúde de grupos com disfunções bucais de alta prevalência bem como para grupos populacionais que se encontram em condições de vulnerabilidade como: populações ribeirinhas e de localidades desprovidas de atendimento básico a saúde bucal.

## Cronograma

O projeto foi dimensionado para ser realizado em 24 meses, em duas etapas.

Previsão da 1ª etapa: 12 meses

- ✓ Continuidade da coleta e preparo das amostras (início em 2017)
- ✓ Obtenção dos valores de referência de íons na saliva: Medidas AAN (CRPq)\* e FRX (CQMA) para amostra depositadas em papel e amostras liofilizadas
- ✓ Estudo comparativo entre as técnicas para os íons determinados
- ✓ Estudo comparativo entre as amostras de controle e disfunção:
  - estabelecimento de biomarcadores para halitose
  - estabelecimento de biomarcadores para disfunção periodontal

\*em andamento

Previsão 2ª etapa: 12 meses

- ✓ Otimização do método fazendo uso de espectrômetro compacto de FRX:
  - Montagem de um arranjo com geometria detecção vertical (entre amostra - detector) para o instrumental compacto de FRX (X-123 SDD, alvos de Ag e Rh) para facilitar as análises de amostras liofilizadas.
  - Elaboração de padrões internos específicos (essenciais em prática clínica) fazendo uso de material certificado disponível no mercado (saliva artificial e soluções e padrões certificados) para execução das medidas utilizando o espectrômetro X-123 SDD (alvos de Ag e Rh)
  - Estudo comparativo dos resultados utilizando os alvos de Ag e Rh

## **Participantes do Projeto**

Dra. Cibele Bugno Zamboni, coordenadora

Dra. Vera Lucia Ribeiro Salvador

Dr. Dalton Giovanni Nogueira da Silva

Dra. Sabrina Metairon

Dr. Hugo Roberto Lewgoy

Dra. Ivone Mulako Sato

Dr. Marcos Antonio Scapin

Dr. José Agostinho Gonçalves de Medeiros, UNICID

MSc. Ilca Marly Moitinho Amaral Medeiros

Estudante de Iniciação Científica: Viviane Megumi Miura

## **Infraestrutura**

Instalações do CRPq (LEER)

1) Espectrômetro gama de alta resolução:

Constituído por um detector semicondutor HPGe de 190cm<sup>3</sup>, posicionado no interior de uma blindagem de chumbo e eletrônica em energia associada: amplificador (ORTEC – 671) e multicanal ADCAM (ORTEC – 919).

2) Espectrômetro Portátil de Fluorescência de Raios X

O espectrômetro compacto de FRX (modelo X-123 SDD Complete X-Ray Spectrometer - Amptek) é constituído de um mini tubo de RX (alvo de Ag), com tensões variáveis de 10 a 50 KV e corrente de 5-200 µA e um detector semicondutor de Silício do tipo “Si Drift” (25 mm<sup>2</sup> x 500 µm, com janela de Berílio de 12,5 µm) o qual é acoplado a um sistema de refrigeração. Esta adaptação (refrigeração do detector) foi feita para possibilitar o uso do espectrômetro por longos períodos (horas consecutivas de aquisição); trata-se de uma recomendação do fabricante. O pXRFS pesa da ordem 750 g e o conjunto espectrômetro mais PC requer pouco espaço e pode ser utilizando em locais desprovidas de energia elétrica fazendo uso de bateria.

3) Laboratório para preparo de amostras

Liofilizador (Thermo Electron Corporation, modelo Micro Modulo 115)

Centrifuga, Osciloscópio, Balança analítica de precisão Freezer, Desumificadores e Sistema de vácuo EDWARDS modelo RV12

Dispositivos de plásticos (POSTHUMS) de vários tamanhos para irradiação de material, além de muflas, capelas, estufas, vidrarias, reagentes, soluções padrões certificados (NIST National Institute of Standards and Technology -USA) e AIEA

4) Reator de Pesquisa e Serviços de apoio:

Reator IEA-R1 e estação pneumática de irradiação

Equipe de Proteção Radiológica

Laboratório de Dosimetria

Laboratório para manipulação de material radioativo

Equipe de manutenção: oficina eletrônica, informática, elétrica, refrigeração

Fornecimento de gás

### Instalações do CQMA

- 1- Espectrômetro de Fluorescência de Raios X por dispersão de energia modelo 720 da Shimadzu, com tubo de raios X de Rh (máximo de 50 KW e 1000 $\mu$ A), detector de Si-Li.
- 2- Laboratório de Preparação de Amostras
  - Homogeneizador mecânico
  - Prensa Hidráulica
  - Balança Analítica
  - Estufa, Mufla, estufas, vidrarias, reagentes, soluções padrões certificados (NIST)

### Produção de C&T

- ✓ Publicação dos resultados ao termino de cada etapa do trabalho
- ✓ Desenvolvimento de processo com transferência de know-how
- ✓ Elaboração de novos protocolos no âmbito da prática clínica
- ✓ Participação em eventos (previsão de participação em dois congressos) no âmbito de química analítica e no âmbito odontológico
- ✓ Seminários de divulgação tanto na área de saúde pública como odontológica
- ✓ Formação de Recursos Humanos

### Referências

1. ZAMBONI, C.B.; SALVADOR, V.L.R.; SATO, I.M.; R.Z. MENDONÇA; WEN, F.H.; SIMONS, S.M. Multielemental Analyses of *Lonomia obliqua* (Lepidoptera, Saturniidae) Caterpillar Using XRF and NAA Techniques. In: EXRS 2018, 2018, Ljubljana. Proceedings EXRS2018. v. 1. p. 295, 2018
2. REDÍGOLO, M.M.; SATO, I.M.; METAIRON, S.; ZAMBONI, C.B. Comparative study of inorganic elements determined in whole blood from Dmd<sup>mdx/J</sup> mice strain by EDXRF and NAA analytical techniques. Applied Radiation and Isotope, v. 110, p. 189-192, 2016
3. ZAMBONI, C. B.; METAIRON, S.; SATO, IVONE M.; RIZZUTTO, M.A. New strategy to evaluate the effectiveness of new treatments using animal models. Review of Applied Physics, v. 3, p. 40-43, 2014
4. SIMONS, S. M.; ZAMBONI, C.B.; SATO, IVONE M.; SALVADOR, V.L.R.; C.L. DUARTE; OLIVEIRA, D.G.L. Analytical techniques to investigate caterpillars with suspected pesticide contamination. In: Proceedings of XXXVII RTFNB, v. 1. p. 39, 2014
5. SATO, I.M.; ZAMBONI, C B.; OLIVEIRA, D.G.L.; CHUDZINSKI- TAVASSI, A M.; SIMONS, S. M. Investigation of inorganic elements in saliva from amblyomma cajannense species from Brazil by the EDXRF technique. In: Fifth International Congress of the Federation of the European Societies for trace Elements and Minerals, v. 1. p. 65, 2013
6. REDÍGOLO, M.M.; AGUIAR, R.O.; ZAMBONI, C.B.; SATO, I.M. Determination of reference interval values for inorganic elements in whole blood samples of humans and laboratory animals by X-ray fluorescence spectrometry. Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry , v. 297, p. 463-467, 2013
7. REDÍGOLO, MARCELO M.; SATO, IVONE M.; METAIRON S; ZAMBONI, C.B. Comparative study of inorganic elements determination in whole blood from DMD MDX/J mice

- strain by EDXRF and NAA analytical techniques. In: Fifth International Congress of the FESTEM for trace elements and Minerals, v. 1. p. 71, 2013
8. BAPTISTA, TATYANA S.; REDÍGOLO, MARCELO M.; ZAMBONI, CIBELE B.; SATO, IVONE M. ; MARCELINO, JOSE R. Comparative study of inorganic elements determination in whole blood from Crioula breed horse by EDXRF and NAA analytical techniques. *Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry*, v. 291, p. 399-403, 2012
  9. ZAMBONI, CB. KOVACS, L; OLIVEIRA, L.; Salvador, VLR; SATO, I M; AZEVEDO, MR Analysis of serum and whole blood using NAA for clinical investigation. *Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry*, v. 278, p. 543-545, 2008.
  10. REDIGOLO, M.M.; ZAMBONI, C.B.; V.L.R. Salvador; SATO, I.M. Inorganic elements determination in whole blood from healthy Brazilian individuals by EDXRF Technique. In: IX Latin American Seminary of Analysis by X- Ray Techniques, 2008, Cabo Frio. *Proceedings of SARX2008. RJ*, v .1 p.1, 2008
  11. ZAMBONI CB, AZEVEDO MR, METAIRON S. Raios-X para dosagem de ferro em sangue, 1ª ed. Editora Novas Edições Acadêmicas, 2018.
  12. METAIRON, S.; ZAMBONI, C B; GIOVANNI, D.N.S.; SUZUKI, M.F.; BUENO, CARLOS R. ; RIZZUTTO, M A . Iron Determination in Whole Blood Samples of Dystrophic Mouse Strains Using X-Ray Fluorescence Spectrometry. *Journal of Musculoskeletal Disorders and Treatment*, v. 3, p. 39, 2017
  13. METAIRON, S.; ZAMBONI, C. B.; SUZUKI, M. F.; DA SILVA, L. F. F. LOPES; RIZZUTTO, M. A. . Inorganic elements in blood of mice immunized with snake venom using NAA and XRF techniques. *Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry*, v. 307, p. 10.1007/s10967-, 2016
  14. ZAMBONI, CIBELE B.; METAIRON, SABRINA; SUZUKI, MIRIAM F.; BAHOVSKI, VANESSA; RIZZUTTO, MARCIA A. Determination of iron content in whole blood in different mouse strains using a portable XRF spectrometer. *Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry*, v. 309, p. 333-336, 2016.
  15. ZAMBONI, C. B.; METAIRON, S.; KOVACS, L.; MACEDO, D. V.; RIZZUTTO, M. A. Determination of Fe in blood using portable X-ray fluorescence spectrometry: an alternative for sports medicine. *Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry*, v. 306, p. 1-3, 2015
  16. ZAMBONI, C. B.; METAIRON, S.; SATO, IVONE M.; RIZZUTTO, M A. New strategy to evaluate the effectiveness of new treatments using animal models. *Review of Applied Physics*, v. 3, p. 40-43, 2014
  17. EPSTEIN JB, SXULLY C. The role of saliva in oral health and the causes and effects of xerostomia. *Can. Dental. Association* 58(3): 217-221, 1992
  18. CRIVELLO, OJR, Nicolau J, Fundamentos de Odontologia Fundamentos de Bioquímica Oral, Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, RJ, 1ª ed, 12-30, 2009
  19. CROUCH DJ. Oral fluid collection: The neglected variable in oral fluid testing. *Forensic Sci. Int.* 150:164-173, 2005
  20. CHOO R E, HUESTIS MA. Oral fluid as a diagnostic tool. *Clin. Chem. Lab. Med.* 42:1273-1287, 2004
  21. STRECKFUS CF, BIGLER LR. Saliva as a diagnostic fluid. *Oral Dis.* 8:69-76, 2002
  22. SEWÓN LA, KARJALAINEN SM, SAINIO M, SEPPÄ O. Calcium and other salivary factors in periodontitis-affected subjects prior to treatment. *J. Clin. Periodontol.* 22(4): 267-270, 1995
  23. SLAVKIN HC. Toward molecularly based diagnostics for the oral cavity. *JADA* 129: 1138-1143, 1998
  24. SCHUTZEMBERGER ME, SOUZA R T, PETRUCCI R E, NAVAL MACHADO M, PAPALEXIOU V, BRANCHER J A. Prevalence of anterior and posterior crossbite in 13-17-year-old schoolchildren attending municipal public schools in the city of Campina Grande (PBR. *S. B. O.* 4(1): 46-52, 2007

25. DELANGHE G, GHYSELEN J, BOLLEN C, VAN STEENBERGHE D, VANDEKERCKHOVE BN, FEENSTRA L. An inventory of patient's response to treatment at a multidisciplinary breath odor clinic. *Quintessence Int.* 30:307-310, 1999
26. ZAMBONI CB, METAIRON S, MEDEIROS IMMA, LEWGOY, HR. Investigation of saliva of patients with periodontal disease using NAA. *AIP* 1529: 70-72 , 2013
27. LEWGOY HR, ZAMBONI CB METAIRON S. Quantitative study of non-stimulated human whole saliva using NAA. *J Rad Nucl Chem* 296 (1): 573-577, 2013
28. DE MEDEIROS JAG, ZAMBONI CB, KOVACS L, LEWGOY HR. Investigation of Fe and Ca in non-stimulated human saliva using NAA. *Journal of Physics* 630: 012006, 2015
29. FONSECA EP, FERREIRA EF, ABREU MHNG, PALMIER AC, DUARTE VARGA AMD. The relationship between gingival condition and socio-demographic factors of adolescents living in a Brazilian region *Ciênc. Saúde Colet.* 20 (11): 3375-3384, 2015
30. IQUEJIRI MH, ZÁRATE-PEREIRA P. Influência dos aspectos socioeconômicos na incidência da gengivite. *Rev. Int. de Periodontia Clínica* 2(6/7):107-114, 2005
31. BASSANI D, LUNARDELLI AN. Condições Periodontais. In: ANTUNES JLF, PERES MA, organizadores. *Epidemiologia da Saúde Bucal.* Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p. 68-78, 2006
32. AUSTREGÉSILO SC, LEAL MCC, MARQUES APO, VIEIRA JCM, ALENCAR DL. Elderly's accessibility to oral health services: an integrative review. *Rev. Bras. Geriatr. Gerontol.*, 18(1):189-199, 2015
33. [http://bvsm.s.saude.gov.br/bvs/publicacoes/doenca\\_falciforme\\_saude\\_bucal\\_prevencao.pdf](http://bvsm.s.saude.gov.br/bvs/publicacoes/doenca_falciforme_saude_bucal_prevencao.pdf)
34. NICO LS, ARAÚJO ANDRADE SSC, MALTA DC, Jr PUCCA GA, PERES MA, Self-reported oral health in the Brazilian adult population: results of the 2013 National Health Survey *Ciência & Saúde Coletiva*, 21(2):389-398, 2016
35. ZAMBONI, CB. *Fundamentos da Física de Nêutrons.* 1ª. ed. São Paulo: Livraria da Física, 2007.
36. MEDEIROS, JAG, ZAMBONI, CB, ZAHN, GS, OLIVEIRA, LC, DALAQUA, L Jr. Software para realização de análises hematológicas utilizando processo radioanalítico. 39º Congresso Brasileiro de Patologia Clínica / Medicina Laboratorial, São Paulo – SP, Brasil, 2005.
37. POTTS PJ, ELLIS AT, KREGSAMER P, *et al.* Atomic spectrometry update: X-ray fluorescence spectrometry. *J. of Analytical Atomic Spectrometry*, v.19, n.10, p.1397, 2004.