

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

WELLINGTON TAVARES DE SOUSA JÚNIOR

Avaliação do uso de microamostragem volumétrica absorviva para
determinação de elementos químicos no sangue por ICP-MS

Ribeirão Preto

2020

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

Avaliação do uso de microamostragem volumétrica absorviva para
determinação de elementos químicos no sangue por ICP-MS

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-
Graduação em Toxicologia da Faculdade de Ciências
Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP para obtenção do
Título de Mestre em Ciências

Área de Concentração: Toxicologia

Orientado: Wellington Tavares de Sousa Júnior

Orientador: Prof. Dr. Fernando Barbosa Júnior

Versão corrigida da Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-
Graduação em Toxicologia em 05/02/2020. Versão original encontra-se disponível na
Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP.

Ribeirão Preto

2020

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Sousa Júnior, Wellington Tavares de

Avaliação do uso de microamostragem volumétrica absorviva para determinação de elementos químicos no sangue por ICP-MS. Ribeirão Preto, 2020.

83 p. : il. ; 30 cm.

Dissertação de Mestrado, apresentada à Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP – Área de concentração: Toxicologia.

Orientador: Barbosa Júnior, Fernando.

1. VAMS. 2. DBS. 3. ICP-MS. 4. Sangue.

Nome: Wellington Tavares de Sousa Júnior

Título: Avaliação do uso de microamostragem volumétrica absorviva para determinação de elementos químicos no sangue por ICP-MS.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Toxicologia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Aprovado em: ___/___/_____

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer primeiramente a Deus, pois sem ele nada é possível. Aos meus pais por todo o apoio ao longo desses anos. São minha fonte de inspiração e força.

Ao professor Fernando, pelo acolhimento em seu laboratório, ajuda e ensinamentos. Seu entusiasmo pela ciência nos contagia e nos incentiva.

Gostaria de agradecer a minha melhor amiga Déborah, por toda ajuda no trabalho e por fazer meus dias mais felizes.

Aos colegas de trabalho Bruno, Silvana, Vanessa, Mariana, Cidinha, Paula, Cecília, William, Cibele, Marília e João pelas dicas e ajudas ao longo do trabalho.

Aos professores e funcionários da Faculdade de Ciências Farmacêutica, em especial a Rose, Vanessa e Cidinha.

Às agências de fomento CAPES, CNPq e FAPESP pela ajuda financeira para a realização deste trabalho.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

Sousa Júnior WT. **Avaliação do uso de microamostragem volumétrica absorvativa para determinação de elementos químicos no sangue por ICP-MS**. 2020. 83f. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2020.

RESUMO

Os elementos químicos desempenham um papel fundamental na saúde humana. Assim, é importante monitorar os níveis destes, a fim de avaliar a exposição da população. O uso de coletas alternativas têm sido proposta para determinação de elementos químicos, como o *Dried Blood Spot* (DBS). As análises quantitativas empregando este sistema apresentam duas limitações: efeito do hematócrito e não-homogeneidade do analito. Diante destas limitações, outras técnicas de coleta foram criadas, como o VAMS (microamostragem volumétrica absorvativa). Este dispositivo consiste em uma ponta branca absorvente ligada a uma haste de plástico, projetada para absorver um volume fixo de amostra, de 10 ou 20 μL . Este sistema supera as desvantagens do DBS e tem sido utilizado na determinação de uma ampla variedade de analitos. Os métodos propostos para análises de elementos químicos com VAMS limitam-se à determinação de poucos analitos e/ou utilizam técnicas analíticas mais complexas e de maior custo. Assim, o presente trabalho objetivou desenvolver e validar uma metodologia com VAMS de 20 μL , para determinação de Li, Be, Mg, Mn, Co, Ni, Zn, Cu, As, Se, Rb, Sr, Cd, Cs, Ba, Hg, Tl, Pb e Bi no sangue total, por meio de espectrometria de massas com plasma indutivamente acoplado (ICP-MS), e estabelecer um protocolo de descontaminação para viabilizar a reutilização do dispositivo. O método apresentou valores adequados de linearidade, limite de detecção e limite de quantificação, bem como valores satisfatórios de recuperação (próximos a 100%) e precisão ($< 10\%$). Dentre os analito estudados, foi encontrado uma contaminação importante de Li e Ni. O volume de sangue absorvido pelo polímero não apresentou diferença estatística ($p > 0,05$) comparado ao relatório de conformidade do fabricante, no entanto, apresentou diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) de uma pipeta calibrada. O uso do banho de ultrassom por 30 minutos mostrou-se uma boa opção para processamento do VAMS, por ser eficiente na extração de todos os analitos (recuperações próximas de 100%) e permitir o preparo de um maior número de amostras em um tempo relativamente curto. Os dispositivos foram submetidos a um processo de descontaminação, o que possibilitou a quantificação de Ni e Li, bem como dos demais elementos químicos. O método desenvolvido é uma opção para simplificar os processos de coleta de sangue e de preparo de amostra, sendo uma boa alternativa para estudos de biomonitoramento humano em larga escala em populações vulneráveis, principalmente em países com vasta extensão geográfica e áreas de difícil acesso, como o Brasil.

PALAVRAS-CHAVE: VAMS, DBS, ICP-MS, Sangue.

Sousa Júnior WT. **Evaluation of volumetric absorptive microsampling for chemical elements determination in blood by ICP-MS**. 2020. 83f. Dissertation (Master). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2020.

ABSTRACT

The chemical elements play a key role in human health. Thus, it is important to monitor their levels to assess the exposure of the population. Alternative collections have been proposed for the determination of chemical elements, such as Dried Blood Spot (DBS). Quantitative analyzes employing DBS has two limitations: hematocrit effect and non homogeneity. Given these limitations, other collection techniques were created, such as VAMS (volumetric absorptive microsampling). This device consists of an absorbent tip attached to a plastic holder designed to absorb a fixed sample volume of 10 or 20 μL . The VAMS system overcomes the disadvantages of DBS and has been used to determine different analytes. The proposed methods for chemical analysis with VAMS are limited to the determination of few analytes or use a complex and costly analytical technique. Thus, the present work aimed to develop and validate a methodology using VAMS for the determination of Li, Be, Mg, Mn, Co, Ni, Zn, Cu, As, Se, Rb, Sr, Cd, Cs, Ba, Hg, Tl, Pb and Bi in whole blood by ICP-MS and establish a decontamination protocol to enable a reuse of the device. The method presented adequate values of linearity, limit of detection and limit of quantification, as well as satisfactory values of recovery (close to 100%) and precision (<10%). An important contamination of Li and Ni was found. The volume of blood absorbed by the polymer showed no statistical difference ($p > 0.05$) to the manufacturer's certificate of conformance, however, it showed a statistically significant difference ($p < 0.05$) from a calibrated pipette. The ultrasound bath for 30 minutes proved to be a good option for VAMS processing, with efficient extraction (recoveries close to 100%) and preparation of a larger number of samples in a relatively short time. The VAMS devices were subjected to a decontamination process, which made it possible to quantify Ni and Li, as the other chemical elements. The developed method is an option to simplify blood collection and sample preparation processes, and is a good alternative for large-scale human biomonitoring studies in vulnerable populations, especially in countries with large geographical areas and hard-to-reach areas such as Brazil.

KEYWORDS: VAMS, DBS, ICP-MS, Blood.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Imagens de coleta por Dried Blood Spot e procedimento de perfuração do cartão, para determinação do volume amostrado	14
Figura 2. À esquerda, procedimento de coleta com o VAMS e, à direita, dispositivo VAMS em sua embalagem comercial, após a coleta da amostra	17
Figura 3. Etapas de avaliação do dispositivo VAMS	23
Figura 4. Etapas da avaliação das condições de extração.....	25
Figura 5. Etapas para descontaminação do dispositivo VAMS, visando a sua reutilização	28
Figura 6. Curvas de calibração dos elementos químicos. Legenda: Eixo x corresponde à concentração ($\mu\text{g L}^{-1}$). Eixo Y corresponde às contagens por segundo (cps). Estão representadas as respectivas equações da reta, bem como os coeficientes de correlação.....	29
Figura 6. Curvas de calibração dos elementos químicos. Legenda: Eixo x corresponde à concentração ($\mu\text{g L}^{-1}$). Eixo Y corresponde às contagens por segundo (cps). Estão representadas as respectivas equações da reta, bem como os coeficientes de correlação.....	30
Figura 7. Comparação do volume coletado pela pipeta, volume absorvido pelo dispositivo VAMS experimentalmente e informado pelo fabricante. Eixo y representa o Volume (μL) e eixo x representa a média \pm desvio padrão ($n=6$), obtidas com pipeta de 20 μL calibrada e com a coleta com o dispositivo VAMS. Linha tracejada vermelha representa a média do volume absorvido informada por Neoteryx [®] . * representa diferença estatística ($p < 0,05$).	34
Figura 8. Avaliação das condições de extração para o material de referência Seronorm. Eixo y representa recuperação (%). Eixo x representa as diferentes condições de extração estudadas. Os valores estão representados como média \pm desvio padrão para triplicata. Linhas tracejadas vermelhas representam valor máximo e mínimo de recuperação. Linha tracejada azul representa recuperação alvo (100%). * representa diferença estatística ($p < 0,05$), quando confrontado com valor certificado	36
Figura 8. Avaliação das condições de extração para o material de referência Seronorm. Eixo y representa recuperação (%). Eixo x representa as diferentes condições de extração estudadas. Os valores estão representados como média \pm	

desvio padrão para triplicata. Linhas tracejadas vermelhas representam valor máximo e mínimo de recuperação. Linha tracejada azul representa recuperação alvo (100%).

* representa diferença estatística ($p < 0,05$), quando confrontado com valor certificado

.....37

Figura 9. Avaliação do material de referência de sangue Q-B-1506, utilizando banho de ultrassom por 30 minutos. Eixo y representa recuperação (%). Eixo x representa duas formas diferentes de análise com o referido material de referência, método convencional (pipeta) e preparo com o VAMS. Os valores estão representados como média \pm desvio padrão para triplicata. Linhas tracejadas vermelhas representam valor máximo e mínimo de recuperação. Linha tracejada azul representa valor alvo de recuperação (100%).....40

Figura 9. Avaliação do material de referência de sangue Q-B-1506, utilizando banho de ultrassom por 30 minutos. Eixo y representa recuperação (%). Eixo x representa duas formas diferentes de análise com o referido material de referência, método convencional (pipeta) e preparo com o VAMS. Os valores estão representados como média \pm desvio padrão para triplicata. Linhas tracejadas vermelhas representam valor máximo e mínimo de recuperação. Linha tracejada azul representa valor alvo de recuperação (100%).....41

Figura 10. Avaliação do material de referência de sangue BE 07-08, utilizando banho de ultrassom por 30 minutos. Eixo y representa recuperação (%). Eixo x representa duas formas diferentes de análise com o referido material de referência, método convencional (pipeta) e preparo com o VAMS. Os valores estão representados como média \pm desvio padrão para triplicata. Linhas tracejadas vermelhas representam valor máximo e mínimo de recuperação. Linha tracejada azul representa valor alvo (100%)42

Figura 11. Avaliação ao longo de 5 dias, utilizando o dispositivo VAMS, com a condição de extração banho ultrassom por 30 minutos. Eixo y representa concentração obtida ao longo de 5 dias. Eixo x representa os cinco dias de análises. Os valores estão representados como média \pm desvio padrão para triplicata. Linhas tracejadas vermelhas representam valor máximo e mínimo de concentração. Linha tracejada azul representa recuperação alvo (100%)43

Figura 11. Avaliação ao longo de 5 dias, utilizando o dispositivo VAMS, com a condição de extração banho ultrassom por 30 minutos. Eixo y representa concentração obtida ao longo de 5 dias. Eixo x representa os cinco dias de análises.

Os valores estão representados como média \pm desvio padrão para triplicata. Linhas tracejadas vermelhas representam valor máximo e mínimo de concentração. Linha tracejada azul representa recuperação alvo (100%)44

Figura 12. Comparação do volume absorvido pela ponteira do VAMS antes e depois do processo de descontaminação. Eixo y representa o Volume (μL) e eixo x representa a média \pm desvio padrão ($n=6$), obtidas com VAMS novo (dispositivo nunca utilizado) e com a coleta com o dispositivo proveniente de reutilização. Linha tracejada vermelha representa a média do volume absorvido informada por Neoteryx®47

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Lista de prioridade ATSDR 2017	2
Tabela 2. Estudos prévios utilizando VAMS para a determinação de elementos químicos.....	19
Tabela 3. Parâmetros instrumentais e operação do ICP-MS.....	22
Tabela 4. Limites de detecção e quantificação estimados pela curva de calibração (n=10)	31
Tabela 5. Valores de branco obtidos para os Lotes 1 e 2 e valor de referência em populações para os respectivos analitos. Os valores estão representados como média \pm desvio padrão para quintuplicata. ND significa abaixo do limite de detecção. * representa diferença estatística significativa ($p < 0,05$), ao comparar o Lote 1 com o Lote 2.....	32
Tabela 6. Precisão Intra dia (n=3) e Inter dia (n=5) para análise dos materiais de referência, com a condição de extração banho ultrassom por 30 minutos.....	45
Tabela 7. Comparação do Branco do VAMS anterior a descontaminação e após o processo de descontaminação. Os valores estão representados como média \pm desvio padrão. Lote 1 e Lote 2 (n=5) e VAMS descontaminado (n=10). ND significa abaixo do limite de detecção	46
Tabela 8. Valores de recuperação obtidos após o processo de descontaminação do dispositivo VAMS. Extração realizada em banho de ultrassom por 30 minutos. Os valores estão representados como média \pm desvio padrão para triplicata.	48

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ICP-MS	Espectrometria de Massas com Plasma Indutivamente Acoplado
MC-ICP-MS	Multicoletor Espectrometria de Massas com Plasma Indutivamente Acoplado
q-ICP-MS	Espectrometria de Massas com Plasma Indutivamente Acoplado modo padrão
ICP-MS/MS	Espectrometria de Massas triplo quadrupolo com Plasma Indutivamente Acoplado
hTISIS ICP-MS	Sistema Integrado de Introdução de Amostra com Tocha de Alta temperatura por ICP-MS
VAMS	<i>Volumetric Absorptive Microsampling</i>
DBS	<i>Dried Blood Spot</i>
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
ATSDR	<i>Agency for Toxic Substances and Disease Registry</i>
CDC	<i>Centers for Disease Control and Prevention</i>
(v/v)	Volume por volume
HNO ₃	Ácido nítrico
FCFRP	Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto
USP	Universidade de São Paulo
INSPQ	<i>Institut National de Santé Publique du Quebec</i>
LD	Limite de Detecção
LQ	Limite de Quantificação

LISTA DE SÍMBOLOS

%	Porcentagem
±	Mais ou menos
®	Marca registrada
h	Horas
>	Maior que
<	Menor que

SUMÁRIO

RESUMO	i
ABSTRACT	ii
LISTA DE FIGURAS	iii
LISTA DE TABELAS	vi
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	vii
LISTA DE SÍMBOLOS	viii
1. INTRODUÇÃO	1
1.1. Elementos Químicos	1
1.1.1. Arsênio (As).....	2
1.1.2. Bário (Ba).....	3
1.1.3. Berílio (Be).....	3
1.1.4. Bismuto (Bi).....	4
1.1.5. Cádmio (Cd).....	4
1.1.6. Césio (Cs).....	5
1.1.7. Chumbo (Pb).....	5
1.1.8. Cobalto (Co).....	5
1.1.9. Cobre (Cu).....	6
1.1.10. Estrôncio (Sr).....	7
1.1.11. Lítio (Li).....	7
1.1.12. Magnésio (Mg).....	8
1.1.13. Manganês (Mn).....	8
1.1.14. Mercúrio (Hg).....	9
1.1.15. Níquel (Ni).....	9
1.1.16. Rubídio (Rb).....	10
1.1.17. Selênio (Se).....	11
1.1.18. Tálcio (Tl).....	11
1.1.19. Zinco (Zn).....	12
1.2. Biomonitoramento Humano	13
1.3. Dried Blood Spot (DBS)	14
1.4. VAMS (Volumetric Absorptive Microsampling)	16

2.	JUSTIFICATIVA	20
3.	OBJETIVOS	20
3.1.	Objetivo Geral	20
3.1.1.	Objetivos específicos	20
4.	MATERIAL E MÉTODOS	21
4.1.	Materiais e Reagentes	21
4.2.	Instrumentação	21
4.3.	Desenvolvimento do Estudo	23
4.4.	Análise do Branco	23
4.5.	Volume Absorvido	24
4.6.	Determinação das Condições de Extração	24
4.7.	Validação Analítica	26
4.8.	Avaliação da Reutilização do VAMS	27
4.9.	Análise dos Resultados	28
5.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	28
5.1.	Linearidade	28
5.2.	Limite de Detecção (LD) e Limite de Quantificação (LQ)	30
5.3.	Avaliação do Branco	31
5.4.	Volume Absorvido pelo VAMS	34
5.5.	Condições de Extração	35
5.6.	Reutilização	45
5.7.	Considerações sobre o método proposto	49
6.	CONCLUSÃO	50
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	51

1. INTRODUÇÃO

1.1. Elementos Químicos

Os elementos químicos são encontrados em todos os organismos vivos e desempenham uma variedade de papéis. Podem ser elementos estruturais, estabilizadores de estruturas biológicas, ativadores ou componentes de sistemas redox, agentes de sinalização celular, etc. (NORDBERG et al., 2014). Nos últimos anos, as funções dos elementos e suas espécies em sistemas biológicos têm sido de crescente interesse, devido ao seus efeitos fisiológicos e propriedades tóxicas (SPERLING; KARST, 2013).

Alguns elementos podem ser considerados essenciais, como zinco, selênio e magnésio. A deficiência destes elementos pode resultar no comprometimento das funções biológicas. Por outro lado, quando em excesso, podem ser tóxicos (NORDBERG et al., 2014). Os elementos podem também ser considerados não essenciais, como aqueles que não possuem uma função biológica bem definida. Alguns destes elementos não essenciais não apresentam uma toxicidade aparente, enquanto outros podem ser tóxicos, mesmo em baixas concentrações, como no caso do arsênio e mercúrio (MARET, 2016).

Os efeitos adversos e a toxicidade dos elementos químicos dependem da concentração, forma química (espécie), da via de exposição, tempo de exposição e susceptibilidade do indivíduo (NORDBERG et al., 2014).

Pode-se notar o destaque mundial dado aos elementos químicos, por meio da *Agency for Toxic Substances and Disease Registry* (ATSDR), órgão norte-americano responsável pela elaboração da lista de prioridade das substâncias tóxicas, classificando-as com base na frequência ou ocorrência, toxicidade e potencial exposição humana de cada uma (Tabela 1).

Dentre os dez primeiros colocados da referida lista, quatro são elementos químicos, sendo importante ressaltar que as três primeiras colocações são ocupadas por elementos químicos tóxicos, o arsênio, chumbo e mercúrio (EUA, 2017), ressaltando a necessidade de estudos de exposição aos elementos químicos em populações. Nos próximos tópicos serão discutidos com mais

detalhes os aspectos nutricionais e toxicológicos dos elementos estudados no trabalho.

Tabela 1. Lista de prioridade ATSDR 2017

Classificação	Substância
1	arsênio
2	chumbo
3	mercúrio
4	cloreto de vinil
5	bifenilas policloradas
6	benzeno
7	cádmio
8	benzo(a)pireno
9	hidrocarbonetos aromáticos policíclicos
10	benzo(b)fluoranteno

Fonte: EUA, 2017.

1.1.1. Arsênio (As)

O arsênio ocupa a primeira posição da lista de prioridades de substâncias tóxicas (Tabela 1). É classificado quimicamente como um metaloide, ocorrendo na forma orgânica ou inorgânica, podendo se apresentar em dois estados de oxidação: forma trivalente, arsenito (As_2O_3 ; As III) e uma forma pentavalente, arsenato (As_2O_5 ; As V). O arsênio trivalente se apresenta como a forma mais tóxica que a pentavalente, enquanto o arsênio orgânico é considerado de menor toxicidade (RATNAIKE, 2003).

A exposição ao arsênio ocorre por inalação, absorção pela pele e, principalmente, pela ingestão de água ou alimentos contaminados. A principal causa da toxicidade humana por As se dá através da contaminação da água potável por fontes geológicas naturais (RATNAIKE, 2003). Além disto, compostos de arsênio podem entrar na cadeia alimentar vegetal, a partir de produtos agrícolas ou de solo irrigado com água contaminada (TAMAKI; FRANKENBERGER, 1992; RATNAIKE, 2003), como no caso da contaminação do arroz por arsênio (ABEDIN; COTTER-HOWELLS; MEHARG, 2002).

A exposição crônica ao arsênio inorgânico está associada ao desenvolvimento de câncer de pele, bexiga, rins, pulmões e fígado, além de levar a complicações circulatórias e neurológicas (MANDAL; OGRA; SUZUKI, 2001; ABDUL et al., 2015).

1.1.2. Bário (Ba)

O bário apresenta diversos usos. É utilizado na indústria do petróleo, fabricação de tintas, cerâmicas, vidros e pesticidas. As formas insolúveis de Ba são empregados na medicina em exames de raio-x (BOURGEOIS, 2015).

O bário e os sais de bário insolúveis, como o sulfato de bário, não são considerados tóxicos, enquanto os compostos de bário que podem se dissolver na água, incluindo cloreto de bário, carbonato de bário, nitrato de bário, acetato de bário e sulfato de bário, são tóxicos (BOWEN et al., 2010; TAO et al., 2016).

A principal via de exposição em humanos é através da ingestão de alimentos e água contaminada (BOURGEOIS, 2015), porém a intoxicação aguda por bário não é comum (BOWEN et al., 2010; TAO et al., 2016).

Os mecanismos envolvidos na toxicidade do Ba estão relacionados ao controle metabólico dos níveis de potássio. Altos níveis de bário no sangue resultam na diminuição do potássio no sangue (hipocalemia), que pode causar efeitos adversos cardiovasculares e musculares, como taquicardia, aumento ou diminuição da pressão arterial, fraqueza muscular e paralisia (EUA, 2007).

1.1.3. Berílio (Be)

O Be é um elemento químico amplamente utilizado na indústria, principalmente na forma de liga metálica, composta de cobre e berílio, na produção de equipamentos eletrônicos, aeronaves e naves espaciais (EUA, 2002; ABRITIS; HARBISON, 2015).

A exposição ocupacional ao berílio é justamente a mais preocupante, pois pode causar problemas pulmonares e de pele, e, quando a exposição é crônica, o indivíduo pode vir a desenvolver a Doença Crônica do Berílio, consequência da resposta imune ao elemento químico (TINKLE et al., 2003).

1.1.4. Bismuto (Bi)

O bismuto elementar é um metal macio, pesado, sólido, quebradiço e insolúvel em água. O bismuto existe nos estados trivalente e pentavalente, sendo o primeiro mais estável e abundante. Muitos compostos de bismuto são insolúveis em água e minimamente absorvidos. Devido à baixa toxicidade típica do bismuto e seus compostos, o uso farmacológico é a principal fonte de informações sobre a potencial toxicidade do bismuto (JONMAIRE, 2015).

Os compostos de Bi têm sido utilizados principalmente em problemas gastrointestinais, incluindo azia, indigestão, náusea, dor de estômago e diarreia (GORDON, 1995). Os sais ou complexos de bismuto utilizados são diversos, incluindo compostos como subnitrito de bismuto, subgalato de bismuto, subsalicilato de bismuto, subcarbonato de bismuto e subcitrato de bismuto (BRADLEY; SINGLETON; PO, 1989).

O mecanismo de ação da toxicidade do bismuto não é totalmente compreendida (JONMAIRE, 2015). Os efeitos tóxicos dependem de cada composto de Bi. Dentre os efeitos tóxicos em humanos atribuídos aos compostos de bismuto, estão: nefropatia, encefalopatia, osteoartropatia, gengivite, estomatite, colite e hepatite (SLIKKERVEER; DE WOLFF, 1989).

1.1.5. Cádmio (Cd)

O Cd ocupa a sétima posição da lista de prioridades de substâncias tóxicas (Tabela 1). A exposição ao cádmio pode ocorrer através ingestão de alimentos ou água contaminada. No entanto, o tabagismo é considerado a fonte de exposição humana mais significativa ao cádmio (BERNHOF, 2013).

Os rins, ossos e pulmões são os tecidos mais afetados pela toxicidade crônica do Cd. Os sintomas do trato respiratório ocorrem naqueles expostos ao fumo ou poeira contendo Cd, exibindo características clínicas de bronquite crônica, enfisema e fibrose pulmonar (JOHRI; JACQUILLET; UNWIN, 2010). O rim é considerado o órgão mais afetado pelo Cd, consequência da deposição deste elemento no órgão, podendo ser observado dano glomerular, proteinúria e glicosúria (JOHRI; JACQUILLET; UNWIN, 2010).

1.1.6. Césio (Cs)

A toxicidade do césio depende diretamente do seu isótopo, sendo o ^{137}Cs radioativo. Essa forma possui a capacidade de se dissolver em água e possui meia vida de decaimento de 30 anos (MIRÓ et al., 2012). O elemento químico é utilizado em aparelhos de radiologia e pela indústria nuclear. Acidentes que provocam o contato com o ^{137}Cs , como ocorrido em Goiânia (DA CRUZ et al., 1994) e Fukushima (AWUAL et al., 2014), são as formas mais comuns de exposição a esse elemento químico.

Os efeitos deletérios que envolvem o Cs estão intimamente envolvidos no fato do elemento químico ocupar o lugar do potássio em processos biológicos (MOORE, 1911; MIRÓ et al., 2012). A exposição ao Cs tem sido associada ao desenvolvimento de câncer na tireoide (EBNER; RITTER; NAVRATIL, 2001; SHAHWAN; ERTEN, 2002).

1.1.7. Chumbo (Pb)

O chumbo foi um dos primeiros metais descobertos. Propriedades únicas do chumbo, como maciez, alta maleabilidade, flexibilidade, baixo ponto de fusão e resistência à corrosão resultaram em seu uso generalizado em diferentes indústrias, como a de automóveis, tintas, cerâmicas, plásticos, etc. (FLORA; GUPTA; TIWARI, 2012).

Os seres humanos também podem ser expostos ao Pb através de alimentação, água e poeira doméstica e através de atividades industriais, como reciclagem de metais e indústria de baterias (BARBOSA JR, 2005).

A exposição prolongada ao chumbo tem sido associada a anemia e aumento na pressão arterial, principalmente em pessoas de meia idade e idade avançada. Danos severos ao cérebro e rins, tanto em adultos quanto em crianças, foram relacionados à exposição à altos níveis de chumbo. Além disto, em mulheres grávidas, a alta exposição ao chumbo pode levar ao aborto espontâneo. Distúrbios sanguíneos e danos ao sistema nervoso são as principais ocorrências em toxicidade por chumbo. (WANI; ARA; USMANI, 2015).

1.1.8. Cobalto (Co)

O cobalto é um componente da cianocobalamina, vitamina essencial (vitamina B12) necessária para a produção dos eritrócitos. Assim, a baixa

ingestão de Co pode levar a anemia (BARCELOUX; BARCELOUX,1999a; PAUSTENBACH et al., 2013).

A exposição ocupacional ao Co é importante, dada às suas inúmeras aplicações na indústria como: produção de metais resistentes e produção de cerâmica e corantes. Nas últimas décadas, o uso de próteses metálicas, contendo Co, criou uma nova fonte de exposição a este elemento (SIMONSEN; HARBAK; BENNEKOU, 2012). Produtos cosméticos como lápis de olho, sombra para os olhos e batom podem apresentar Co em sua composição (BOCCA et al., 2014; LEYSSENS et al., 2017).

As pessoas são expostas também a pequenas quantidades de cobalto, inalando ar contaminado ou consumindo água ou alimentos contaminados (LISON, 2014). Existem poucos relatos de casos relacionados à toxicidade aguda de Co após a ingestão oral. No entanto, a exposição oral subcrônica e crônica humana têm sido associadas principalmente a efeitos hematológicos, tireoidianos e efeitos no sistema cardiovascular (PAUSTENBACH et al., 2013).

1.1.9. Cobre (Cu)

O cobre é um micronutriente essencial, necessário em diversos processos metabólicos (FLEMMING; TREVORS, 1989). O Cu funciona como um cofator e é necessário para propriedades estruturais e catalíticas de diversas enzimas envolvidas em uma série de processos biológicos necessários para o crescimento, desenvolvimento e manutenção (GAETKE; CHOW, 2003).

Este elemento está presente nos centros catalíticos de diferentes enzimas redox e, portanto, sua presença é essencial para a função fisiológica normal, como respiração celular, defesa de radicais livres, síntese de pigmento de melanina, biossíntese de tecido conjuntivo e metabolismo celular do ferro (UAUY; OLIVARES; GONZALEZ,1998).

O cobre está presente em diversos alimentos e a ingestão diária inadequada do elemento não é suficiente para provocar a sua deficiência em humanos (HOFFMAN; PHYLIKY; FLEMING,1988). No entanto, a deficiência de Cu pode ocorrer em casos de cirurgias gastrointestinais, má absorção, como na doença celíaca, ou excesso de ferro e zinco (JAISER; WINSTON, 2010). As manifestações clínicas mais frequentes de deficiência de cobre são anemia, neutropenia e anormalidades ósseas (UAUY, R; OLIVARES; GONZALEZ,1998).

Apesar de ser um elemento essencial, em níveis elevados o Cu se torna tóxico (FLEMMING; TREVORS, 1989). Embora sejam estabelecidos quantidades seguras de cobre em alimentos e água potável, a incidência de intoxicação por cobre na população em geral é baixa. Existem relatos ocasionais de intoxicação aguda, em casos de contaminação de bebidas ou de utilização de recipientes contendo cobre, podendo apresentar sintomas como gosto metálico, náusea, diarreia, icterícia, hemoglobinúria, hematúria, anúria e oligúria (CHUTTANI, et al., 1965; BREMNER, 1998).

A intoxicação crônica provavelmente é a mais preocupante, sendo caracterizada por um acúmulo hepático gradual de cobre que resulta eventualmente em danos no fígado, e, em casos extremos, a morte (BREMNER, 1998).

1.1.10. Estrôncio (Sr)

O estrôncio ocorre naturalmente na crosta terrestre como uma mistura de quatro isótopos estáveis (^{88}Sr , ^{86}Sr , ^{87}Sr e ^{84}Sr) (EUA, 2004). É o elemento traço mais abundante da água oceânica, podendo chegar a 8 mg L^{-1} . A água e alimentos como cereais, grãos e comidas do mar são as principais fonte de exposição ao Sr (CABRERA et al., 1999; COHEN-SOLAL, 2002).

O Sr é um metal divalente e pode atuar de forma mimética ao cálcio. Sua essencialidade é controversa, algumas pesquisas sugerem que o Sr pode reduzir fraturas osteoporóticas, no entanto são necessários mais estudos (NIELSEN, 2004).

Não são relatados efeitos nocivos do estrôncio estável em humanos nos níveis normalmente encontrados no ambiente. A única forma química de estrôncio estável que é muito prejudicial pela inalação é o cromato de estrôncio, mas isso se deve ao crômio e não ao próprio estrôncio. Problemas com o crescimento ósseo podem ocorrer em crianças expostas à níveis altos de estrôncio, especialmente se a dieta for pobre em cálcio e proteína (EUA, 2004).

1.1.11. Lítio (Li)

A exposição ao lítio por meio da água potável ocorre em países da América do Sul, como Argentina (CONCHA et al., 2010) e Chile (ZALDIVAR, 1980) com diferentes concentrações do metal. Além desses, países como

Estados Unidos (Estado do Texas), Japão, Inglaterra e Áustria também apresentaram valores altos de Li na água de beber (KABACS et al., 2011; KAPUSTA et al., 2011; BLÜML et al., 2013; SUGAWARA et al., 2013).

O sal de lítio é utilizado no tratamento da bipolaridade, causando a exposição ao Li. O consumo desse elemento pode causar diminuição da produção dos hormônios tireoidianos, o que acarreta em hipotireoidismo e formação de bócio (GRANDJEAN; AUBRY, 2009), e, por isso, a monitorização terapêutica deste elemento químico é importante.

1.1.12. Magnésio (Mg)

O Mg é um elemento químico essencial para a manutenção da homeostasia, atuando em funções fisiológicas do cérebro, coração e músculos esqueléticos (DE BAAIJ; HOENDEROP; BINDELS, 2015). Dezenas de enzima dependem do Mg como cofator ou ativador (EBEL; GÜNTHER, 1980; DE BAAIJ; HOENDEROP; BINDELS, 2015).

A deficiência de Mg está associada à depressão (SOWA-KUCMA et al., 2013), além de estar sendo relacionada a sua ausência com a presença de inflamação (NIELSEN, 2018). Foi encontrada uma associação entre a presença de Mg na dieta e a diminuição da ocorrência eventos cardiovasculares, como doença cardíaca coronária, acidente vascular cerebral e mortalidade por doença cardíaca (QU et al., 2013).

Apesar de rara, a hipermagnesemia (excesso de Mg no sangue) pode ser observada. Dentre as consequências estão dor de cabeça, náusea, vômito, podendo causar ainda problemas cardíacos graves, como braquicardia e hipotensão. A forma mais grave pode causar coma e parada cardiorrespiratória (DE BAAIJ; HOENDEROP; BINDELS, 2015). Uma das formas de tratamento do excesso de Mg é a administração de sais de cálcio, devido ao seu antagonismo nos efeitos cardíacos (RUDE, 2009).

1.1.13. Manganês (Mn)

O manganês é um elemento essencial em diversos processos biológicos, como funcionamento do sistema imunológico, crescimento ósseo e do tecido conjuntivo, coagulação do sangue, metabolismo de aminoácidos, lipídios, proteínas e carboidratos (ERIKSON; ASCHNER, 2003; ERIKSON et al., 2005;

ASCHNER, 2007). Além disso, atua como cofator em enzimas antioxidantes presentes no cérebro (HURLEY; KEEN, 1987; ASCHNER, 2007).

Por outro lado, em altas concentrações, o Mn pode ser neurotóxico e está associado ao aparecimento de sintomas parecidos com a doença de parkinson. A exposição a altas concentrações de Mn está associado principalmente ao ambiente ocupacional. Ademais, pode-se observar déficits cognitivos, como comprometimento na memória e redução na capacidade de aprendizado (JOSEPHS, 2005; ASCHNER, 2007).

1.1.14. Mercúrio (Hg)

O mercúrio pode sofrer biomagnificação (acúmulo ao longo da cadeia trófica) e bioacumulação. Isso ocorre devido ao ciclo do mercúrio, onde o elemento químico está em sua forma Hg^{2+} dissolvido na água ou no sedimento de corpos hídricos, podendo ser transformado pela microbiota em Hg^0 , e ser evaporado, ou ser transformado em metilmercúrio. Os peixes ingerem o metilmercúrio por meio da alimentação, e assim ocorre a sua bioacumulação. Ao longo da cadeia alimentar, ocorre a biomagnificação do metilmercúrio (DRISCOLL et al., 1994).

Assim, o ser humano pode entrar em contato com o mercúrio por meio da ingestão de peixes (metilmercúrio), ingestão da água (Hg^{2+} ou metilmercúrio) e inalação do mercúrio elementar (Hg^0) pelo garimpo de ouro ou por atividade vulcânica (DRISCOLL et al., 1994; STEPHEN, 2015).

Os efeitos da intoxicação aguda ao Hg dependem da sua forma, dosagem e via de exposição, contudo todas as suas formas apresentam toxicidade (STEPHEN, 2015). Quando ingerido, pode causar desde vômito com sangue, dor abdominal ou até a morte (SONG; LI, 2007). A inalação do Hg pode causar dor de cabeça, tosse e problemas pulmonares, como fibrose pulmonar (ASANO et al., 2000). Na intoxicação crônica podem ocorrer problemas relacionados aos rins e ao sistema nervoso central (STEPHEN, 2015).

1.1.15. Níquel (Ni)

O níquel é um elemento metálico que está naturalmente presente na crosta terrestre. Devido às suas propriedades físicas e químicas, o níquel e seus compostos são amplamente utilizados na indústria moderna (DENKHAUS;

SALNIKOW, 2002). O níquel é utilizado na produção de aço inoxidável, ligas de níquel e ferro fundido de níquel que são usados em moedas, equipamentos elétricos, ferramentas, máquinas, armamentos, eletrodomésticos e utensílios domésticos (BARCELOUX; BARCELOUX, 1999b).

A essencialidade do Ni ainda não é muito bem elucidada. No entanto, a sua deficiência pode prejudicar a absorção de ferro no intestino. Além disto, baixa ingestão de Ni está associada a diminuição da atividade de enzimas que participam do metabolismo de carboidratos e aminoácidos. Acredita-se também que seja importante para a microbiota intestinal. (DENKHAUS; SALNIKOW, 2002).

A exposição humana ao níquel ocorre principalmente por inalação e ingestão (DENKHAUS; SALNIKOW, 2002). O níquel pode entrar na cadeia alimentar através da absorção pelas plantas e da lixiviação do níquel de equipamentos de processamento e utensílios (BARCELOUX; BARCELOUX, 1999b).

A inalação de pós contendo níquel em ambientes ocupacionais pode resultar em exposições mais altas ao níquel, associadas à toxicidade e carcinogenicidade no trato respiratório. O efeito mais comum do níquel na população em geral é a dermatite de contato após a exposição dérmica (PRUEITT; GOODMAN, 2015).

1.1.16. Rubídio (Rb)

Este elemento é amplamente distribuído em depósitos minerais e pode ser extraído de pedras como lepidolita (FIEVE, 1973). O rubídio é utilizado para aplicações químicas e eletrônicas, além de ser utilizado em fogos de artifício, devido a sua coloração roxa (NATIONAL RESEARCH COUNCIL, 2005). Este elemento pode ser obtido na dieta através de alimentos como frutas, vegetais (especialmente aspargos), aves, peixes (NIELSEN, 2003).

Como o rubídio se assemelha ao potássio, ele pode ter um papel semelhante ao mesmo (NIELSEN, 2003). O rubídio pode atuar benéficamente como um substituto do potássio em casos de deficiência (NATIONAL RESEARCH COUNCIL, 2005).

No entanto, sua toxicidade também está relacionada a sua ação mimética ao potássio. O mecanismo para a toxicidade do rubídio provavelmente está na

substituição ineficiente do potássio em funções bioquímicas críticas, podendo ser observadas sinais e sintomas de arritmia cardíaca e convulsões generalizada (NATIONAL RESEARCH COUNCIL, 2005; MELTZER, 1991).

1.1.17. Selênio (Se)

O elemento químico selênio é um nutriente essencial de fundamental importância para a biologia humana (RAYMAN, 2000). A grande importância biológica do selênio está relacionada à sua presença em sítios ativos de diversas enzimas e proteínas (KIELISZEK; BŁAŻEJAK, 2013).

O Se faz parte das chamadas selenoproteínas, as quais são selênio dependentes e contém selenocisteína em seus sítios ativos, possuindo funções enzimáticas importantes no organismo (O'DELL; SUNDE, 1997), como a função antioxidante, desempenhando este papel através de enzimas como a glutatationa peroxidase (GPx) (SPALLHOLZ; BOYLAN; LARSEN, 1990).

A dieta é a principal fonte pela qual os humanos obtêm selênio e, assim, o nível de ingestão deste elemento depende da sua concentração nos alimentos consumidos (VALDIGLESIAS et al., 2010).

A deficiência ao Se, pode ocorrer em áreas onde existem baixas disponibilidades deste elemento no solo. A baixa ingestão de Se, está associada a cardiomiopatias da chamada Doença de Keshan, observada em determinadas áreas da China (YANG et al., 1988; WHO, 1996).

A exposição crônica ao Se é caracterizado principalmente por perda de cabelo e alterações na morfologia das unhas (YANG et al., 1983; WHO, 1996). A toxicidade deste elemento está associada a oxidação de grupos sulfidríla, o que pode resultar no efeito inibitório da biossíntese de proteínas (WHO, 1996).

1.1.18. Tálio (Tl)

O Tl é um elemento não essencial, não desempenhando nenhum papel no metabolismo humano, vegetal ou animal (CVJETKO; CVJETKO; PAVLICA, 2010). Este elemento é amplamente distribuído no ambiente, embora geralmente esteja presente em concentrações muito baixas (GALVÁN-ARZATE; SANTAMARÍA, 1998).

O tálio é obtido como subproduto do processo de refino de ferro, cádmio e zinco. O pó de combustão dessa indústria é processado para recuperar

quantidades comerciais do metal e posteriormente utilizado como catalisador em certas ligas, lentes ópticas, joias, termômetros de baixa temperatura, semicondutores e corantes (GALVÁN-ARZATE; SANTAMARÍA, 1998).

Além disso, os sais de tálio ainda são utilizados como raticidas e inseticidas em alguns países (GALVÁN-ARZATE; SANTAMARÍA, 1998). Embora sejam reconhecidos como tóxicos, os compostos de tálio ainda estão disponíveis em alguns países (LUCKIT et al., 1990; GALVÁN-ARZATE; SANTAMARÍA, 1998).

O mecanismo exato de toxicidade do Tl não é bem estabelecido. O tálio interfere na produção de energia em etapas essenciais da glicólise, do ciclo de Krebs e da fosforilação oxidativa. Efeitos adicionais incluem inibição da Na^+/K^+ -ATPase e ligação a grupos sulfidríla (HOFFMAN, 2003).

Os sintomas da intoxicação por tálio são diversos e inespecíficos sendo que a característica mais proeminente da intoxicação é a perda de cabelo (CVJETKO; CVJETKO; PAVLICA, 2010).

1.1.19. Zinco (Zn)

O Zn é um elemento químico essencial, fundamental para muitos processos biológicos responsáveis pela homeostasia (SANDSTEAD, 1995), sendo cofator ou componente de mais de 200 metaloenzimas (JOHNSON, 2015). A deficiência de Zn pode levar ao retardo de crescimento, hipogonadismo masculino, alterações da pele, falta de apetite, dentre outras complicações ligadas ao sistema imunológico (PRASAD, 1996). Por isso, quando a deficiência de zinco é detectada, recomenda-se a suplementação (WHO, 2003).

A toxicidade aguda ao Zn está associada a ingestão acidental ou proposital de sais de zinco, utilizados na suplementação. Pode ocorrer febre, náusea, vômito, cólicas estomacais e diarreia (WHO, 2003). A toxicidade crônica está relacionada com a suplementação oral prolongada, podendo levar a diminuição da absorção de outros metais, como cobre, magnésio e cádmio, levando a sinais e sintomas da deficiência de cobre e magnésio e diminuindo a absorção do cádmio (elemento tóxico) (JOHNSON, 2015).

1.2. Biomonitoramento Humano

De acordo com o CDC (*Centers for Disease Control and Prevention*), o Biomonitoramento Humano (BH) é definido como um método para avaliar a exposição humana às substâncias químicas, através da mensuração da própria substância e/ou metabólitos ou produtos de reação em matrizes biológicas (EUA, 2005).

O uso de indicadores de exposição biológica desenvolveu-se ao longo das últimas décadas, em particular no contexto ocupacional, mas também para avaliar os níveis de poluentes ambientais na população em geral (NISSE et al., 2017). Assim, análises das concentrações dos elementos químicos na urina, sangue ou cabelo têm sido cada vez mais utilizadas, para fins de monitorar a exposição (CORNELIS; NORDBERG, 2014).

Programas de biomonitoramento humano vêm sendo implantados principalmente em países desenvolvidos, como Estados Unidos (*National Health and Nutrition Examination Survey*, NHANES) (EUA, 2014), Canadá (*Canadian Health Measures Survey*, CHMS) (CANADÁ, 2013) e Alemanha (*German Environmental Surveys*, GerES) (BECKER et al., 2007; SCHULZ et al., 2007). Estes programas visam acompanhar a exposição de crianças e adultos através da mensuração de elementos químicos e outras substâncias em amostras biológicas.

Segundo Angerer, Ewers e Wilhelm (2007), para que o biomonitoramento seja efetivo, os materiais biológicos devem ser facilmente acessíveis, em quantidades suficientes, sob condições de rotina e sem desconforto e risco para a saúde do indivíduo.

O momento da coleta, principalmente de sangue, pode ser uma etapa crítica do BH. Como observado por Gouveia e colaboradores (2014), os indivíduos alvos de uma pesquisa podem demonstrar baixa aceitabilidade para doação do material biológico, como o sangue, quando coletado por punção venosa, fato observado principalmente em crianças. Entretanto, para coleta de sangue capilar observa-se uma maior aceitação. Dentre outras dificuldades encontradas, estes mesmos autores destacam as dificuldades logísticas, como o armazenamento e transporte das amostras, sendo este mais um dos desafios que devem ser levados em conta para fins de otimização nos estudos de

biomonitoramento humano, principalmente em países com ampla extensão territorial como o Brasil (GOUVEIA et al., 2014).

Neste sentido, para facilitar as coletas de sangue capilar, encontram-se as técnicas como o DBS e o VAMS, que vêm ganhando destaque como alternativas para simplificar o processo de coleta, transporte e armazenamento das amostras biológicas, principalmente em estudos de grande extensão populacional.

1.3. Dried Blood Spot (DBS)

Um dos sistemas de coleta de sangue capilar mais utilizados até o momento é o *Dried Blood Spot* (DBS) (Figura 1). Este sistema consiste na coleta de pequenas gotas de sangue através de uma picada no dedo ou calcanhar, utilizando um suporte de papel-filtro (MCDADE; WILLIAMS; SNODGRASS, 2007).

Figura 1. Imagens de coleta por *Dried Blood Spot* e procedimento de perfuração do cartão, para determinação do volume amostrado



Fonte: Google imagens

Em 1963, foi proposto pela primeira vez a coleta de gotas de sangue utilizando um papel filtro. O sangue seco no papel (DBS) foi usado como amostra clínica para triagem da fenilcetonúria em recém-nascidos no Reino Unido. Devido às suas vantagens inerentes, este método tem se tornado cada vez mais

popular nos últimos anos, sendo proposto em uma ampla variedade de contextos bioanalíticos (GUTHRIE; SUSI, 1963; ARAMENDÍA et al., 2012).

As principais vantagens do uso do DBS são: o volume de sangue reduzido em comparação com a punção venosa convencional; diminuição do risco potencial de contaminação bacteriana e/ou hemólise, quando comparado com o método tradicional; a coleta de sangue é fácil, minimamente invasiva e mais econômica; e, a depender da substância de análise, as manchas de sangue podem ser conservadas por longos períodos (GRÜNER; STAMBOULI; ROSS, 2015; GUPTA; MAHAJAN, 2018). Além disto, os cartões contendo a amostra, são fáceis de armazenar e transportar e podem ser utilizadas na criação de biobancos (RESANO et al., 2018).

No Brasil, o uso do DBS é empregado no chamado “Teste do Pezinho”, utilizado para a triagem da Fenilcetonúria, Hipotireoidismo Congênita, Fibrose Cística e Anemia Falciforme, exigido por meio do Programa Nacional de Triagem Neonatal (PNTN), criado e implementado pela Portaria do Ministério da Saúde MG/MS n.º 822/01 (BRASIL, 2001), tendo como objetivo detectar e tratar precocemente estas doenças (DA SILVA; LACERDA, 2003).

Ao contrário de muitas situações de diagnóstico clínico, nas quais são necessárias apenas informações qualitativas ou de triagem, as análises quantitativas utilizando este sistema ainda apresentam desafios analíticos (RESANO et al., 2018).

As principais desvantagens utilizando o DBS estão relacionadas ao chamado efeito do hematócrito (porcentagem de volume de células sanguíneas no sangue total) e à não homogeneidade do analito (também chamado de efeito cromatográfico) (SIMÕES, 2016).

O hematócrito determina a viscosidade do sangue e, portanto, afeta a difusão do mesmo no papel filtro, assim, diferenças no hematócrito entre as amostras resultam na amostragem de volumes de sangue inconstantes e, portanto, um viés de ensaio. Para contornar este problema, é utilizado um perfurador, o que possibilita determinar o volume da área perfurada (DENNIFF; SPOONER, 2010; KESEL, 2014; KOK; FILLET, 2018).

No entanto, é relatada a não-homogeneidade dos analitos através da mancha de sangue, devido a uma possível interação do analito e/ou do sangue com o papel filtro, o que também afeta a quantificação dos compostos de

interesse, caso, por meio de um perfurador, somente uma parte da mancha de sangue seja analisada (DENNIFF; SPOONER, 2010; KESEL, 2014; KOK; FILLET, 2018).

Para poder evitar esta influência na distribuição não uniforme dos analitos através do papel, a forma mais simples é a análise da mancha total do DBS, em vez de utilizar apenas uma porção perfurada. Entretanto, ao se analisar a mancha total de sangue, significa que não será possível reanalisar a amostra, a não ser que exista uma segunda mancha que corresponda a uma réplica igual a primeira (LI; TSE, 2010; KESEL et al., 2013; SIMÕES, 2016).

Por outro lado, a análise da totalidade da mancha envolve necessariamente a aplicação de um volume exato de sangue nos cartões, através da utilização de uma pipeta, por exemplo, o que implica que a coleta deve ser realizada preferencialmente em ambiente controlado e por pessoal qualificado (LI; TSE, 2010; KESEL et al., 2013; SIMÕES, 2016).

Além das desvantagens do chamado efeito do hematócrito e da não homogeneidade dos analitos, o uso do DBS para a análise de elementos químicos apresenta um outro desafio, que é a utilização de perfuradores, produzidos de materiais metálicos, os quais eventualmente podem contaminar as amostras para determinados analitos (KOK; FILLET, 2018).

1.4. VAMS (Volumetric Absorptive Microsampling)

Diante das limitações apresentadas frente a utilização do DBS, outros dispositivos de microamostragem foram desenvolvidos, como o VAMS (Figura 2) (*Volumetric Absorptive Microsampling*, em português microamostragem volumétrica absorptiva).

Figura 2. À esquerda, procedimento de coleta com o VAMS e, à direita, dispositivo VAMS em sua embalagem comercial, após a coleta da amostra



Fonte: Neoteryx® (CA, USA).

O VAMS é um dispositivo recém introduzido no mercado e comercializado pela Neoteryx® (CA, USA). O dispositivo consiste em uma ponta branca absorvente ligada a uma haste de plástico. A ponta hidrofílica porosa foi projetada para absorver por capilaridade um volume fixo de amostra, com capacidade de absorção de 10 ou 20 μL de matriz biológica, a depender da apresentação do fabricante (DENNIFF; SPOONER, 2014; SPOONER et al., 2015; KOK; FILLET, 2018).

Uma de suas vantagens com relação ao DBS, está na capacidade de absorver um volume fixo de sangue, independentemente do hematócrito (SPOONER et al., 2015). Além disto, a coleta com o VAMS não apresenta o efeito da não homogeneidade do analito, uma vez que todo o polímero absorvente é utilizado para o processar a amostra, podendo esta também ser considerada uma limitação do dispositivo, pois são necessárias mais de uma coleta para um mesmo indivíduo, caso seja necessário reanalisar a amostra, já que o mesmo só pode ser processado por uma única vez (KOK; FILLET, 2018).

Ademais, o VAMS não necessita do perfurador como no caso do DBS, retirando uma fonte de contaminação importante para análises quantitativas de elementos químicos (KOK; FILLET, 2018).

O VAMS, assim como o DBS, oferece vantagens, como: (a) simplificação da coleta de amostras, (b) coleta minimamente invasiva de sangue capilar através de picada no dedo ou no calcanhar, (c) amostragem de volumes reduzidos de fluidos biológicos, (d) simplificação dos métodos de preparo de amostra, (e) melhor conservação da amostra sob condições ambientais devido

ao efeito estabilizador do DBS e VAMS, (f) redução de espaço e custos de armazenamento e transporte e (g) transporte facilitados das amostras para o laboratório (BOLEA-FERNANDEZ et al., 2016; KIP et al., 2017).

A coleta de sangue pode ser realizada através da picada no dedo. A ponta do VAMS, de 10 ou 20 μL , deve ser encostado no sangue, em um ângulo de 45° , até seu completo preenchimento em poucos segundos. Esta é uma etapa importante, pois deve-se evitar mergulhar toda a ponteira do VAMS no sangue para evitar a amostragem de um volume maior (KOK; FILLET, 2018).

Apesar do VAMS ter sido desenvolvido principalmente para coleta de sangue, alguns autores têm empregado o VAMS para coleta de outras matrizes biológicas. Mercolini e colaboradores (2016) validaram uma metodologia para determinação de catinona e análogos em plasma, urina e saliva. Protti e colaboradores (2018) também obtiveram êxito para determinação de oxicodona e seus principais metabólitos em plasma e urina.

Após a coleta, o dispositivo deve passar pelo processo de secagem, de 2 a 3 horas, conforme a orientação do fabricante, geralmente feito em temperatura ambiente. Por conseguinte, os analitos devem ser extraídos para a sua quantificação. Assim, deve ser feita a seleção do solvente. Nos estudos preliminares com VAMS, as soluções extratoras empregadas tem variado desde o uso somente de água, até o uso de solventes orgânicos (KOK; FILLET, 2018).

Após a seleção do solvente, devem ser otimizadas as condições de extração dos analitos. Idealmente, o procedimento de extração deve resultar em uma recuperação máxima e reprodutível dos analitos de interesse, com baixa recuperação de outros compostos, para minimizar os efeitos da matriz. As condições ideais vão depender dos analitos de interesse e da técnica de análise. (KOK; FILLET, 2018).

Apesar de relativamente novo no mercado, o VAMS já é aplicado em diversas áreas de estudo, como em estudos de farmacocinética (LUO et al., 2015), monitoramento terapêutico (MARAHATTA et al., 2016), determinação de drogas ilícitas (PROTTI et al., 2017), metabolômica (CALA; MEESTERS, 2017) e determinação de proteínas (ANDERSEN et al., 2018). Em algumas áreas o uso da técnica ainda tem sido pouco explorada, como no caso da determinação de elementos químicos, possuindo apenas quatro publicações até o presente momento (Tabela 2).

Tabela 2. Estudos prévios utilizando VAMS para a determinação de elementos químicos

Elemento químico	Matriz analisada	Técnica	Referência
Ti, V, Co, Sr e Zr	Sangue total Venoso	ICP-MS/MS	BOLEA-FERNANDEZ et al., 2016
Fe	Sangue total Venoso/Sangue capilar	MC-ICP-MS	ANOSHKINA; COSTAS-RODRÍGUEZ; VANHAECKE, 2017
Be, V, Cr, Mn, Cu, As, Se, Cd, Sb, Tl e Pb.	Sangue total Venoso	hTISIS-ICP-MS	CAÑABATE et al., 2017
Co	Sangue total Venoso	q-ICP-MS	CAPIAU et al., 2019

Fonte: Autor.

A primeira proposta para análise de elementos químicos empregando o VAMS foi elaborada por Bolea-Fernandez e colaboradores (2016). No estudo foi desenvolvida e validada uma metodologia para análise de metais liberados por próteses metálicas no sangue, utilizando um ICP-MS/MS. Os analitos estudados foram: titânio (Ti), vanádio (V), cobalto (Co), estrôncio (Sr) e zircônio (Zr). Nesse sentido, Anoshkina, Costas-Rodríguez e Vanhaecke (2017) propuseram uma metodologia para determinação isotópica do ferro no sangue total por MC-ICP-MS, além de avaliar sua aplicabilidade em análises de sangue capilar.

Uma das desvantagens do uso do VAMS está no pequeno volume disponível para ser analisado por ICP-MS, assim, Cañabate e colaboradores (2017) desenvolveram uma metodologia empregando o chamado Sistema integrado de introdução de amostras com tocha de alta temperatura (hTISIS) por ICP-MS, permitindo assim, a análise de pequenos volumes de sangue e a quantificação de um número maior de elementos químicos.

Mais recentemente Capiou e colaboradores (2019) desenvolveram uma metodologia para determinação de cobalto (Co) liberado por próteses metálicas, utilizando um q-ICP-MS, com objetivo de tornar a técnica menos complexa que a metodologia proposta por Bolea-Fernandez e colaboradores (2016).

2. JUSTIFICATIVA

O dispositivo VAMS tem se mostrado uma boa opção para coleta de amostras biológicas, superando as limitações do DBS. No entanto, análise de elementos químicos, utilizando este dispositivo, foram pouco exploradas até o momento. Os poucos trabalhos disponíveis na literatura limitam-se à determinação de poucos elementos químicos e/ou utilizam técnicas de análise mais onerosas e complexas.

Diante disto, fica evidente a necessidade do desenvolvimento de metodologias capazes de quantificar um número maior de analitos, utilizando técnicas mais simples de preparo de amostra, para que no futuro a metodologia possa ser aplicada em estudos de biomonitoramento humano no nosso país.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo Geral

Avaliar o uso do dispositivo *Volumetric Absortive Microsampling* (VAMS) para determinação de elementos químicos no sangue, por espectrometria de massa com plasma indutivamente acoplado (ICP-MS).

3.1.1. Objetivos específicos

- Desenvolver e validar uma metodologia, utilizando o dispositivo VAMS para determinação de Li, Be, Mg, Mn, Co, Ni, Zn, Cu, As, Se, Rb, Sr, Cd, Cs, Ba, Hg, Tl, Pb e Bi no sangue total;

- Estabelecer um protocolo de descontaminação do dispositivo VAMS, para possibilitar a sua reutilização na análise de elementos químicos no sangue.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Materiais e Reagentes

Foi utilizado água ultrapura, com resistividade de 18.2 MΩ.cm (a 25°C), obtida por meio de sistema de purificação de água Milli-Q® (Millipore RiOs-DITM®, Bedford, MA, EUA), HNO₃ (Synth, Diadema, Brasil) bidestilado, triton® X-100 ultrapuro (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA), padrão multielementar 10 mg L⁻¹ e solução de ródio (Rh) 1000 mg L⁻¹ (Perkin Elmer, EUA). Para as análises foram empregados tubos cônicos de polipropileno livre de metais (BD, EUA). Demais materiais utilizados foram previamente descontaminados através de banho com HNO₃ 10% (v/v) por 24 horas e lavagem com água ultra pura.

Para o estudo foram utilizados dispositivos VAMS de 20 µL (*Volumetric Absorptive Microsampling*), obtidos da Neoteryx® (CA, USA). No presente estudo, para fins de validação, as análises foram realizadas empregando os seguintes materiais de referência (MRs) de sangue: Seronorm® *Trace elements Whole Blood L-2*, BE 07-08 proveniente do *Wadsworth Center – New York State Department of Health* (EUA, Whole Blood NYSDOH) e QM-B-Q1511 e QM-B-Q1506 obtidos de *Institut National de Santé Publique du Quebec* (INSPQ - *Centre de toxicologie*, Canadá, Québec).

4.2. Instrumentação

As determinações dos elementos químicos foram realizadas por espectrometria de massa com plasma indutivamente acoplado (PerkinElmer, NexION® 2000, Waltham EUA), utilizando argônio de alta pureza (99,999%). O equipamento é mantido isolado em sala limpa, conectado ao *Software Syngistix®* (PerkinElmer, Waltham EUA) para ICP-MS, utilizado para controlar o equipamento e processar os resultados.

O sistema de introdução de amostras utilizado é composto por câmara de nebulização de quartzo ciclônica e um nebulizador Meinhard®, conectado por tubos Tygon® à bomba peristáltica. O equipamento foi operado com cone de amostragem e *skimmer* de platina e *hiper skimmer* de alumínio adquiridos da PerkinElmer. Todas as operações foram realizadas em uma sala limpa classe

1000. Os parâmetros instrumentais foram otimizados diariamente, a fim de otimizar a sensibilidade do equipamento e diminuir a formação de óxido e íons dupla carga. As condições operacionais estão contidas na Tabela 3.

Previamente as análises com o dispositivo VAMS, foram testados 3 padrões internos: ^{89}Y , ^{103}Rh e ^{193}Ir na concentração de $10 \mu\text{g L}^{-1}$. O ^{103}Rh foi escolhido por apresentar valores satisfatórios de recuperação (próximos a 100%) para todos os analitos do MR Seronorm. Além disto, para cobre, zinco e selênio foram testados os isótopos ^{63}Cu e ^{65}Cu , ^{64}Zn e ^{66}Zn , ^{78}Se e ^{82}Se . Assim, foram selecionados os isótopos ^{65}Cu , ^{64}Zn e ^{82}Se por apresentarem valores satisfatórios de recuperação (próximos a 100%) para o Seronorm.

Tabela 3. Parâmetros instrumentais e operação do ICP-MS

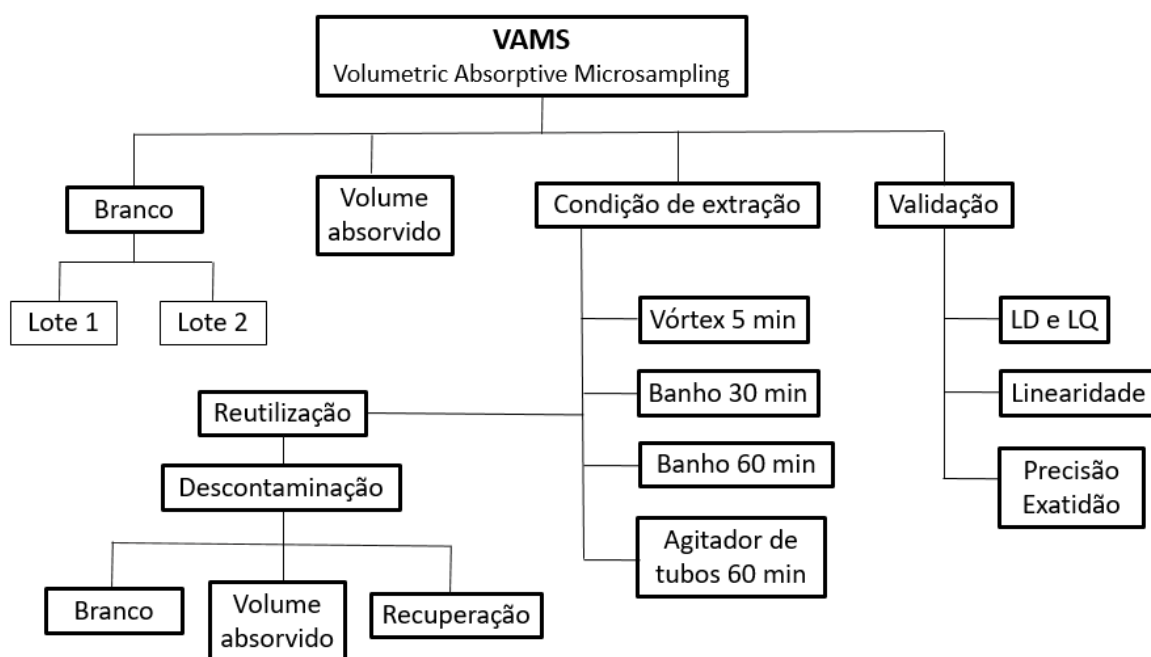
Modelo e Marca	<i>PerkinElmer</i> NexION® 2000
Potência do Plasma (W)	1350
Vazão do gás do plasma (L min^{-1})	15
Vazão do gás auxiliar (L min^{-1})	1,2
Vazão de nebulização (L min^{-1})	0,95 a 1,0
Processamento do sinal	Área sobre pico
Tempo de integração (ms)	750
Vazão de introdução da amostra ($\mu\text{L min}^{-1}$)	330
<i>Sweeps</i>	15
<i>Dwell time</i> (ms)	50
Replicatas	3
Padrão Interno	^{103}Rh
Isótopo monitorado	^7Li , ^9Be , ^{24}Mg , ^{55}Mn , ^{59}Co , ^{60}Ni , ^{64}Zn , ^{65}Cu , ^{75}As , ^{82}Se , ^{85}Rb , ^{88}Sr , ^{111}Cd , ^{133}Cs , ^{138}Ba , ^{202}Hg , ^{205}Tl , ^{208}Pb , ^{209}Bi .
Equações de correção	Ba= $^{138}\text{Ba} - (0,002838 \times ^{140}\text{Ce} -$ $0,000901 \times ^{139}\text{La})$ Se= $^{82}\text{Se} - (1,007833 \times ^{83}\text{Kr})$ Zn= $^{64}\text{Zn} - (0,035297 \times ^{60}\text{Ni})$

Fonte: Autor.

4.3. Desenvolvimento do Estudo

O desenvolvimento do presente estudo foi realizado no Laboratório de Toxicologia e Essencialidade de Metais, localizado na Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto (FCFRP), Universidade de São Paulo (USP). A Figura 3 resume, de forma esquemática, as etapas da realização do presente estudo. Os próximos tópicos detalham todas essas etapas.

Figura 3. Etapas de avaliação do dispositivo VAMS



Fonte: Autor.

4.4. Análise do Branco

A primeira etapa do estudo foi a avaliação do branco dos dispositivos. Para este teste, foram testados dois lotes distintos. Assim, seis dispositivos de cada lote foram selecionados aleatoriamente e colocados em contato com 1 mL da solução extratora, composta por HNO₃ 0,2%, (v/v), triton-X100 0,05% (v/v) e Rh 10 µg L⁻¹.

Os dispositivos ficaram em contato com a solução por 1 hora, subsequentemente foram submetidos a banho de ultrassom por 30 minutos. A

solução resultante foi injetada diretamente no ICP-MS. A solução extratora foi utilizada para a construção da curva de calibração.

4.5. Volume Absorvido

Este teste foi realizado com o objetivo de avaliar possíveis diferenças no volume de sangue absorvido no dispositivo VAMS. Foi usado procedimento similar ao proposto por Mercolini e colaboradores (2016). Os testes de volume foram realizados utilizando uma balança analítica (FA2104N, Bioprecisa®, Curitiba, PR, Brasil). Uma alíquota de 1 mL do material de referência de sangue foi colocada em tubo cônico de polipropileno e a massa foi registrada. Com isso, 20 µL do sangue foi removido do tubo, utilizando uma pipeta calibrada, por 6 vezes (n=6), registrando-se a massa.

Foi seguido o mesmo protocolo para a coleta com o dispositivo VAMS. Foi registrado a massa inicial de um tubo cônico de polipropileno contendo 1 mL de sangue, seguido da coleta com o dispositivo VAMS, o qual foi cuidadosamente encostado na amostra, em ângulo de 45°, até seu completo preenchimento da ponta, conforme orientação do fabricante, sendo então registrado a massa do tubo. Este procedimento foi realizado com 6 dispositivos (n=6). O volume absorvido foi calculado com a seguinte fórmula (1):

$$VM = \frac{MMV}{MMP} \times 20 \quad (1)$$

Onde, VM: volume médio de sangue na ponta absorvente do VAMS (µL)

MMV: massa média de sangue na ponta do VAMS (mg)

MMP: massa média de sangue em alíquota de 20 µL (mg).

4.6. Determinação das Condições de Extração

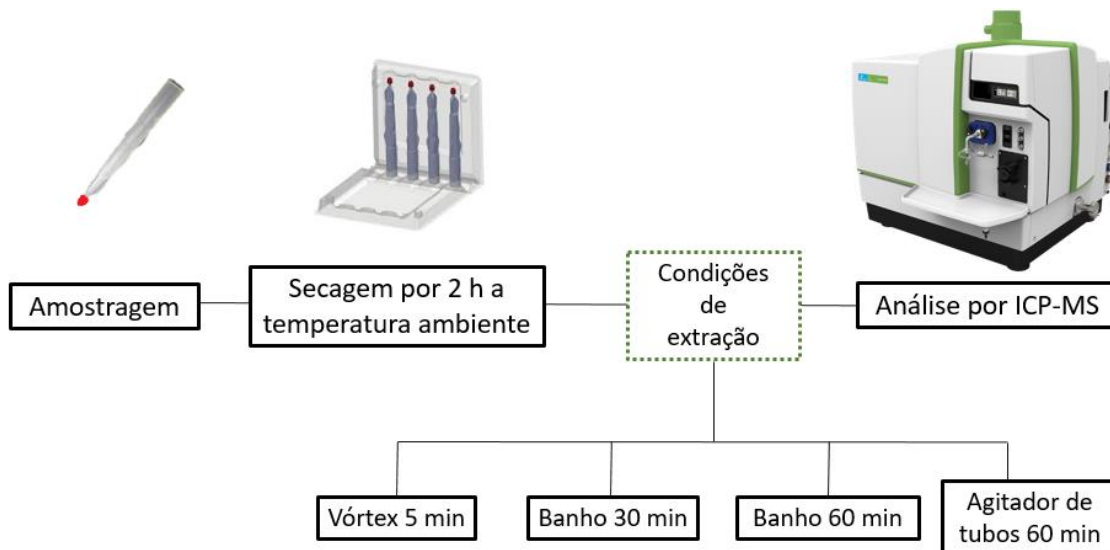
A condição de extração do analito é uma etapa crucial para a qualidade dos resultados quantitativos. Até o momento, as condições de extração de elementos químicos em amostras de sangue, coletadas por meio do VAMS, têm empregado metodologias relativamente simples. Assim, no presente trabalho,

foram testadas 4 condições de extração, adequando-se a rotina de trabalho de um laboratório de biomonitoramento humano.

Inicialmente, foram realizadas as coletas do material de referência Seronorm empregando os dispositivos VAMS, conforme as orientações do fabricante. Os dispositivos foram encostados cuidadosamente no sangue, em ângulo de 45°, até seu completo preenchimento. Em seguida, foram acondicionados em recipientes adequados, por 2 horas em temperatura ambiente, para promover a secagem do sangue. Após a secagem, os dispositivos foram colocados em tubos cônicos de polipropileno de 15 mL contendo a solução extratora e submetidos às seguintes condições (Figura 4):

- a) Agitação por Vórtex 5 minutos;
- b) Banho de ultrassom por 30 minutos;
- c) Banho de ultrassom por 60 minutos;
- d) Agitador de tubos por 60 minutos.

Figura 4. Etapas da avaliação das condições de extração



Fonte: Autor.

A comercialização do dispositivo VAMS é realizada em caixas com 4 dispositivos (conforme a Figura 4). Para cada condição de extração, foi utilizada uma caixa, sendo 3 dispositivos utilizados para amostrar o material de referência e 1 utilizado como branco para cada condição. Além destas quatro condições,

foi realizado o preparo de amostra de acordo com o método convencional, empregando uma micropipeta calibrada de 20 µL para efeito de comparação. Após definida a melhor condição, a metodologia foi empregada para análise dos materiais BE 07-08 e QM-B-Q1506.

A solução extratora foi composta por HNO₃ 0,2% (v/v), triton-X100 0,05% (v/v) e Rh 10 µg L⁻¹, mesmo diluente utilizado na metodologia de injeção direta de sangue, proposta por Batista e colaboradores (2009), que foi utilizada como base neste trabalho para as análises por ICP-MS, com as devidas modificações necessárias. Assim resumidamente, foi utilizado 980 µL da solução extratora, para manter a diluição 1:50. Após a extração, a solução resultante foi injetada diretamente no ICP-MS. A mesma solução extratora foi utilizada para a construção da curva de calibração, empregando ajuste de matriz, também na diluição 1:50.

4.7. Validação Analítica

A validação analítica foi realizada conforme Bolea-Fernandez e colaboradores (2016). Foram avaliados os seguintes parâmetros: linearidade, exatidão, precisão, limite de detecção e limite de quantificação. A linearidade foi avaliada através da construção da curva de calibração. As curvas foram construídas nas concentrações 0,5 – 20 µg L⁻¹ para Li, Be, Mn, Co, Ni, As, Se, Sr, Cd, Cs, Ba, Hg, Tl, Pb e Bi e de 10 – 100 µg L⁻¹ para Mg, Zn, Cu e Rb. Como Padrão Interno foi o utilizado o Rh 10 µg L⁻¹. As curvas foram construídas com pelo menos 5 níveis de concentração para cada analito, em triplicata independentes.

A exatidão foi expressa por meio da recuperação, obtido através da comparação do resultado analítico com os valores de referência dos materiais Seronorm, BE 07-08, QM-B-Q1506 e QM-B-Q1511. A recuperação foi calculada com a fórmula (2):

$$\text{Recuperação (\%)} = \frac{\text{Valor observado}}{\text{valor esperado}} \times 100 \% \quad (2)$$

A precisão foi expressa por meio do Desvio Padrão Relativo (DPR) a partir de análise em triplicata do material de referência Seronorm no mesmo dia (intra-dia), e ao longo de cinco dias (inter-dia). O Desvio Padrão Relativo foi calculado com a seguinte fórmula (3):

$$\text{DPR (\%)} = \frac{\text{desvio padrão} \times 100 \%}{\text{concentração média experimental}} \quad (3)$$

O limite de detecção e quantificação foram estimados a partir da curva de calibração empregando as fórmulas (5) e (6):

$$\text{LD} = \frac{3,3 \times \text{DPB}}{\text{IC}} \quad (5)$$

$$\text{LQ} = \frac{10 \times \text{DPB}}{\text{IC}} \quad (6)$$

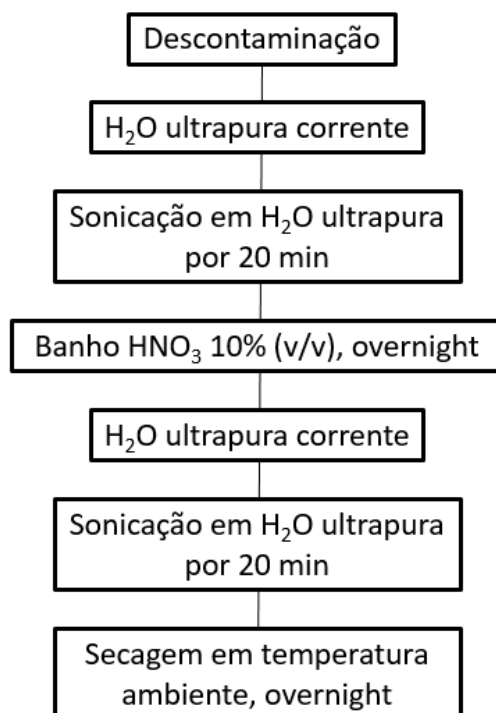
Onde, DPB: desvio padrão da leitura de 10 brancos

IC: inclinação (*slope*) da curva de calibração.

4.8. Avaliação da Reutilização do VAMS

Foi realizado o estudo para possível reutilização dos dispositivos após a análise de sangue, com o objetivo de avaliar se um protocolo simples de descontaminação poderia melhorar a quantificação dos analitos, bem como reduzir os custos. Para isso, os dispositivos já submetidos aos processos de coleta, secagem, extração e análise, foram descontaminados seguindo o protocolo esquematizado na Figura 5. Após estes procedimentos, foram avaliadas novamente o branco, volume absorvido e a extração dos analitos, conforme descrito em 4.4., 4.5. e 4.6. deste documento, respectivamente.

Figura 5. Etapas para descontaminação do dispositivo VAMS, visando a sua reutilização



Fonte: Autor.

4.9. Análise dos Resultados

Os resultados foram analisados no software GraphPad Prisma[®] e submetidos ao testes *t* pareado com confiança estatística de 95%, confrontando os resultados analíticos com os valores alvo dos materiais de referência. Os resultados foram expressos como média ± desvio padrão (DP).

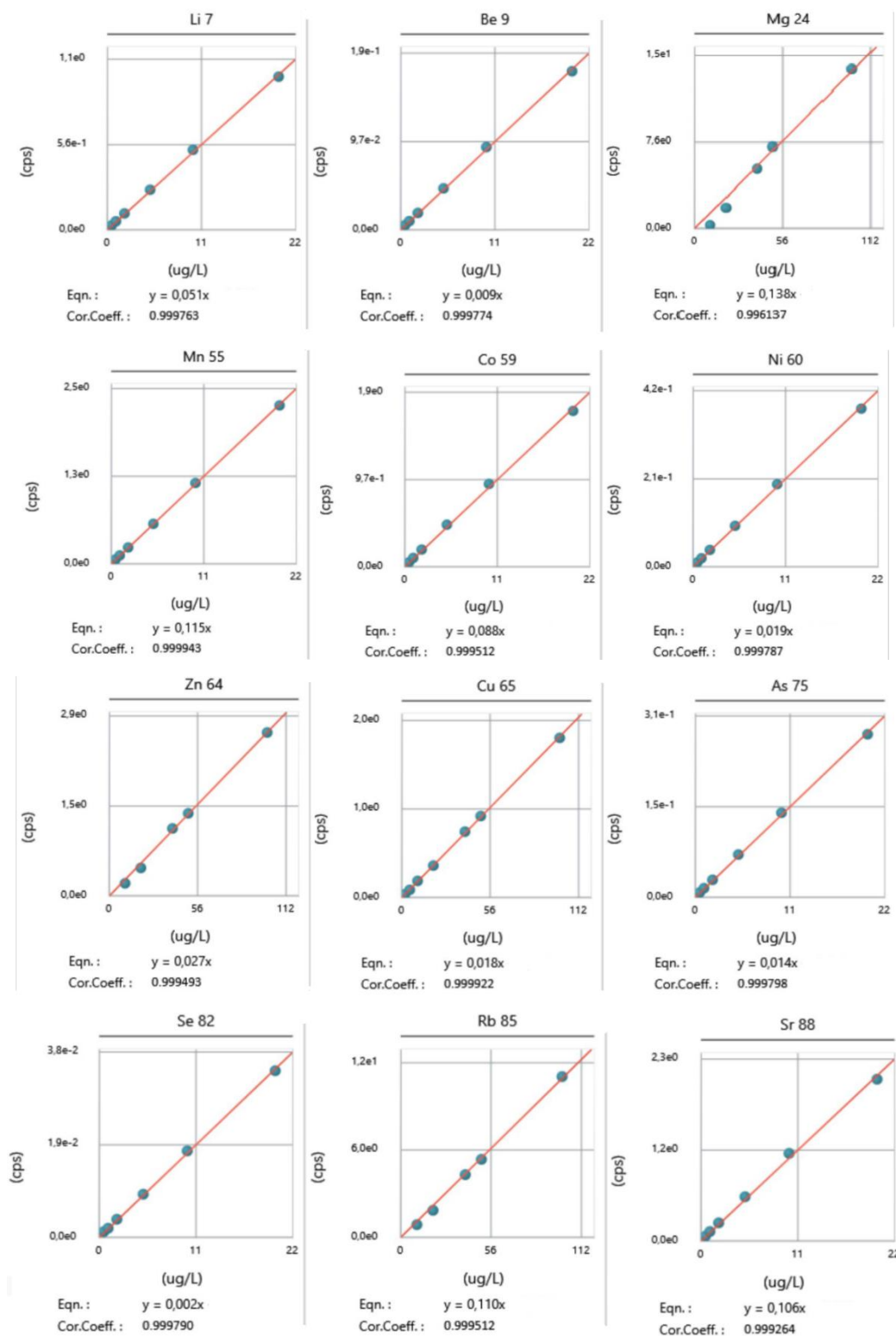
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Linearidade

A Figura 6 mostra as curvas de calibração para os 19 analitos estudados. Todas as curvas apresentaram um coeficiente de correlação linear (*r*) superior a 0,99 indicando uma linearidade satisfatória.

Figura 6. Curvas de calibração dos elementos químicos. Legenda: Eixo x corresponde à concentração ($\mu\text{g L}^{-1}$). Eixo Y corresponde às contagens por segundo (cps). Estão representadas as respectivas equações da reta, bem como os coeficientes de correlação

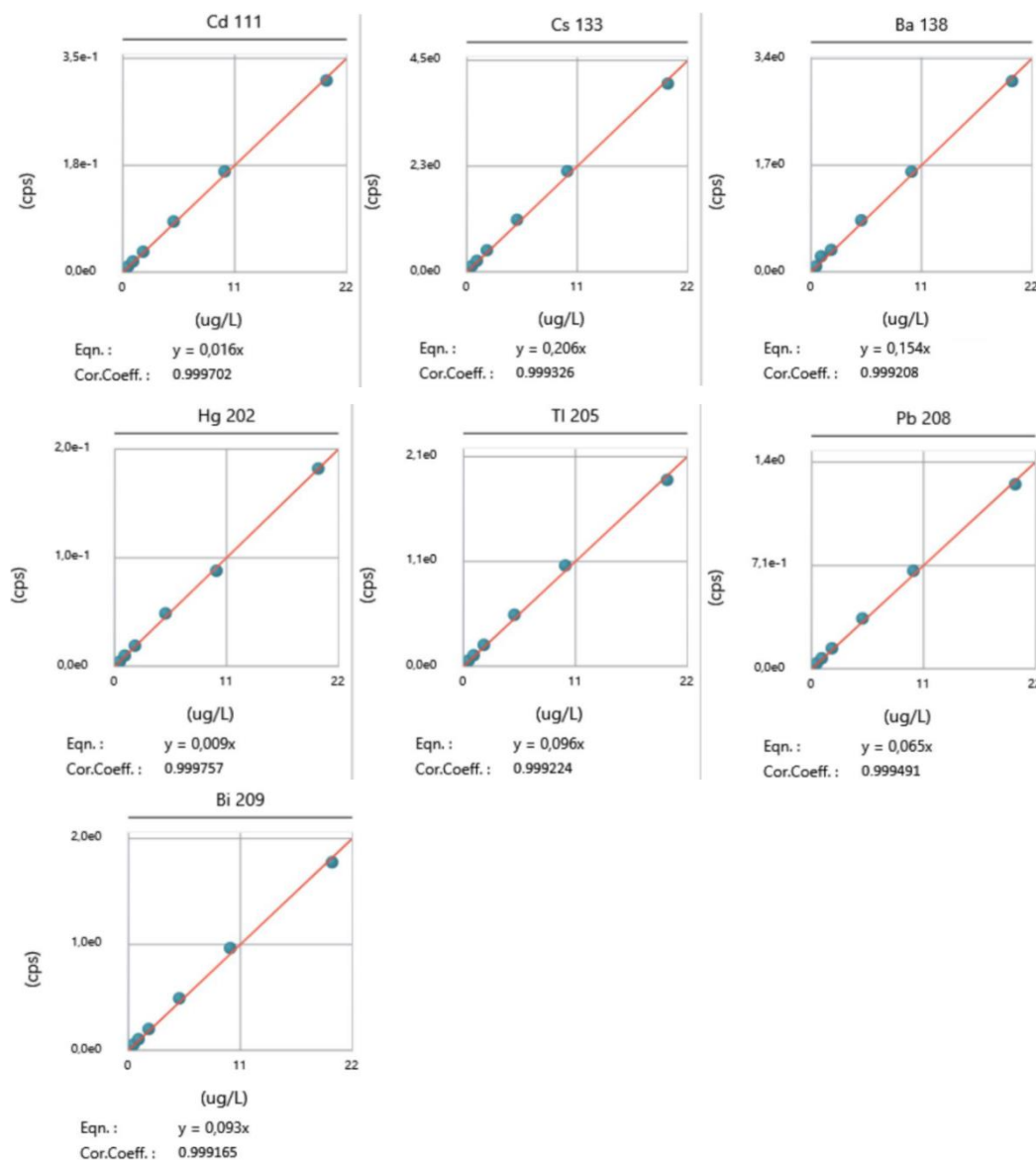
(continua)



Fonte: Curvas de calibração geradas pelo Software Syngistix®.

Figura 6. Curvas de calibração dos elementos químicos. Legenda: Eixo x corresponde à concentração ($\mu\text{g L}^{-1}$). Eixo Y corresponde às contagens por segundo (cps). Estão representadas as respectivas equações da reta, bem como os coeficientes de correlação

(conclusão)



Fonte: Curvas de calibração geradas pelo Software Syngistix®.

5.2. Limite de Detecção (LD) e Limite de Quantificação (LQ)

Os limites de detecção e quantificação do método foram estimados por meio da curva analítica. Os valores mostraram-se apropriados para a detecção e quantificação dos analitos em sangue total devido aos valores encontrados

estarem muito abaixo das concentrações em geral encontradas em humanos. A Tabela 4 mostra os valores calculados de LD e LQ, expressos em ng L⁻¹.

Tabela 4. Limites de detecção e quantificação estimados pela curva de calibração (n=10)

Analito	LD (ng L⁻¹)	LQ (ng L⁻¹)
Li	0,30	0,95
Be	0,70	2,10
Mg	12,6	38,2
Mn	20,5	62,1
Co	0,45	1,35
Ni	1,60	4,90
Zn	29,2	88,6
Cu	4,55	13,8
As	2,15	6,50
Se	26,9	81,7
Rb	0,15	0,50
Sr	0,65	2,00
Cd	0,40	1,15
Cs	0,25	0,70
Ba	0,55	1,65
Hg	3,10	9,35
Tl	0,10	0,35
Pb	18,2	55,2
Bi	0,35	1,05

Fonte: Autor.

5.3. Avaliação do Branco

A primeira etapa do estudo com o dispositivo foi a avaliação do branco, com o objetivo de determinar suas concentrações e identificar possíveis contaminações que poderiam interferir nas análises. Para tal, foram avaliados dois lotes distintos. Os valores dos brancos obtidos nas análises estão contidos na Tabela 5.

Tabela 5. Valores de branco obtidos para os Lotes 1 e 2 e valor de referência em populações para os respectivos analitos. Os valores estão representados como média \pm desvio padrão para quintuplicata. ND significa abaixo do limite de detecção. * representa diferença estatística significativa ($p < 0,05$), ao comparar o Lote 1 com o Lote 2.

Analito	Lote 1 (Média ($\mu\text{g L}^{-1}$) \pm Desvio Padrão)	Lote 2 (Média ($\mu\text{g L}^{-1}$) \pm Desvio Padrão)	Valor de Referência ($\mu\text{g L}^{-1}$)
Li *	0,070 \pm 0,060	0,2 \pm 0,07	1,9-145 ^[4]
Be	ND	0,010 \pm 0,006	0,02-0,09 ^[1]
Mg	12,2 \pm 5,3	8,30 \pm 0,80	61395,9 ^[5]
Mn *	1,00 \pm 0,30	0,50 \pm 0,20	5,0-12,8 ^[1] ; 9,0 ^[2] ; 9,6 ^[3]
Co	0,070 \pm 0,065	0,02 \pm 0,1	0,04-0,64 ^[1] ; 0,19 ^[2] ; 0,98 ^[5]
Ni	105 \pm 210	13,60 \pm 6,55	0,09-4,18 ^[1] ; 0,11 ^[2] ; 2,1 ^[3]
Zn	7,55 \pm 2,06	16,10 \pm 10,30	12127,0 ^[5]
Cu	1,30 \pm 0,40	1,70 \pm 0,80	1042 ^[2] ; 890 ^[3] ; 1989,8 ^[5]
As	0,015 \pm 0,003	0,012 \pm 0,004	2,6-17,8 ^[1] ; 0,93 ^[2] ; 1,1 ^[3] ; 12,59 ^[5]
Se	ND	ND	89-154 ^[1] ; 133 ^[2] ; 89,3 ^[3] ; 132,2 ^[5]
Rb	0,04 \pm 0,01	0,02 \pm 0,01	1289-2358 ^[1] ; 2408 ^[2]
Sr	0,65 \pm 0,50	0,25 \pm 0,08	9-41 ^[1] ; 20 ^[2]
Cd	0,011 \pm 0,007	0,006 \pm 0,003	0,15-2,04 ^[1] ; 0,57 ^[2] ; 0,4 ^[3] ; 1,31 ^[5]
Cs	0,001 \pm 0,0007	ND	3,6 ^[2]
Ba	0,75 \pm 0,50	1,35 \pm 0,20	46,4-77,6 ^[1]
Hg	ND	ND	0,94-8,13 ^[1] ; 1,4 ^[2] ; 8,23 ^[5]
Tl	ND	ND	0,011-0,035 ^[1] ; 0,019 ^[2]
Pb	1,00 \pm 0,20	0,80 \pm 0,11	11,4-62,8 ^[1] ; 22 ^[2] ; 65,4 ^[3] ; 58,8 ^[5]
Bi	0,0080 \pm 0,0020	0,01 \pm 0,005	0,001-0,007 ^[1]

Fontes: [1] GOULLÉ et al. (2005); [2] HEITLAND; KÖSTER (2006); [3] NUNES et al. (2010); [4] HARARI et al. (2015); [5] LOPES et al. (2019).

São apresentados na Tabela 5 os valores de referência no sangue para cada analito. Os valores de referência em populações gerais apresentam concentrações encontradas em diferentes estudos, como em voluntários na França (GOULLÉ, J. P. et al., 2005), Norte da Alemanha (HEITLAND; KÖSTER,

2006), grávidas residentes na Argentina (HARARI et al., 2015), adultos brasileiros, residentes nos estados de São Paulo, Minas Gerais, Goiás, Pará e Rio Grande do Sul (NUNES, J. A. et al., 2010) e adultos do Sul do Brasil (LOPES et al., 2019).

Quando comparados aos demais elementos, Mg e Zn foram os que apresentaram maiores valores de branco em ambos os lotes, com as concentrações de $12,2 \pm 5,3 \mu\text{g L}^{-1}$ e $8,30 \pm 0,80 \mu\text{g L}^{-1}$ para Mg e $7,55 \pm 2,06 \mu\text{g L}^{-1}$ e $16,10 \pm 10,30$ para Zn. Apesar destas concentrações serem mais altas, ao comparar com os valores de referência encontrados no sangue em indivíduos do Brasil para Mg ($61395 \mu\text{g L}^{-1}$) e Zn ($12127 \mu\text{g L}^{-1}$), estes valores são considerados insignificantes.

Os valores obtidos na avaliação do branco para Cu, Rb e Ba também são considerados insignificantes, quando comparado aos valores normalmente encontrado no sangue, já que estão bem abaixo do referido valor.

Foram observados valores muito baixos para determinados elementos, sendo alguns abaixo do limite de detecção em ambos os lotes, como Se, Hg e Tl. Os elementos Li, Be, Mn, Co, As, Sr, Cd, Cs, Pb e Bi apresentaram valores iguais ou inferiores a $1 \mu\text{g L}^{-1}$. Apesar destes valores serem considerados baixos, seus respectivos valores de referência também são baixos. Desta maneira, é importante que estes valores de branco sejam levados em conta no cálculo final. Os valores de branco para estes elementos mostraram-se constantes, com baixos valores de desvio padrão, podendo ser utilizados como brancos das amostras, para a correta quantificação destes analitos.

Dentre os elementos estudados, o Ni foi o analito que apresentou uma importante contaminação. No lote 1 foi observada concentração alta de Ni, com valores de $105 \pm 210 \mu\text{g L}^{-1}$. Já no lote 2 foi observado um valor menor, de $13,60 \pm 6,55 \mu\text{g L}^{-1}$. Os valores de ambos os lotes se sobrepõem aos valores de Ni encontrado no sangue da população brasileira, que é de $2,1 \mu\text{g L}^{-1}$.

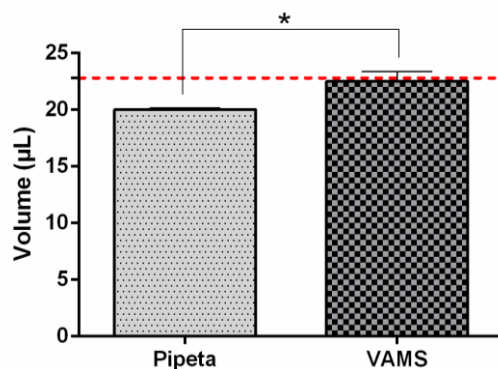
Ao analisarem o mesmo isótopo de Ni, os resultados obtidos por Bolea-Fernandez e colaboradores (2016) corroboram com os resultados observados no presente estudo, mostrando uma contaminação de Ni. Entretanto, seu valor obtido foi de $4,90 \pm 3,90 \mu\text{g L}^{-1}$, inferior ao obtido neste trabalho. Segundo os autores, esta contaminação pode estar relacionada ao uso de Ni como catalisador no processo de polimerização durante a produção do VAMS.

Ratificando os achados de Bolea-Fernandez e colaboradores (2016), esta contaminação impede a quantificação com exatidão para Ni, descrito com mais detalhes no tópico “5.5. Condições de extração” deste trabalho.

5.4. Volume Absorvido pelo VAMS

O VAMS utilizado neste trabalho é comercializado em caixas contendo 4 ponteiros com volume de absorção de 20 μL . Porém, ele não absorve exatamente este volume, como observado na Figura 7. O volume de sangue absorvido na ponteira do dispositivo apresentou um valor médio de $22,50 \pm 0,80$ μL , sendo estatisticamente diferente ($p < 0,05$) do volume de uma micropipeta de 20 μL calibrada.

Figura 7. Comparação do volume coletado pela pipeta, volume absorvido pelo dispositivo VAMS experimentalmente e informado pelo fabricante. Eixo y representa o Volume (μL) e eixo x representa a média \pm desvio padrão ($n=6$), obtidas com pipeta de 20 μL calibrada e com a coleta com o dispositivo VAMS. Linha tracejada vermelha representa a média do volume absorvido informada por Neoteryx[®]. * representa diferença estatística ($p < 0,05$).



Fonte: Autor.

Embora tenha apresentado esta diferença com a micropipeta, este acréscimo no volume de sangue absorvido é apresentado no relatório de conformidade, disponibilizado pelo fabricante. Assim, quando confrontado o valor obtido experimentalmente neste trabalho com a média estabelecida pelo fabricante de 22,80 μL , não foi observada diferença estatística ($p > 0,05$),

mostrando que o volume obtido neste trabalho está dentro do erro já previamente estabelecido.

A avaliação do real volume absorvido é importante, pois essa variação no volume deve ser levada em conta nos cálculos de diluição, para a correta quantificação dos analitos. Sendo assim, este valor médio de 22,50 μL foi utilizado nos cálculos da diluição nos testes seguintes.

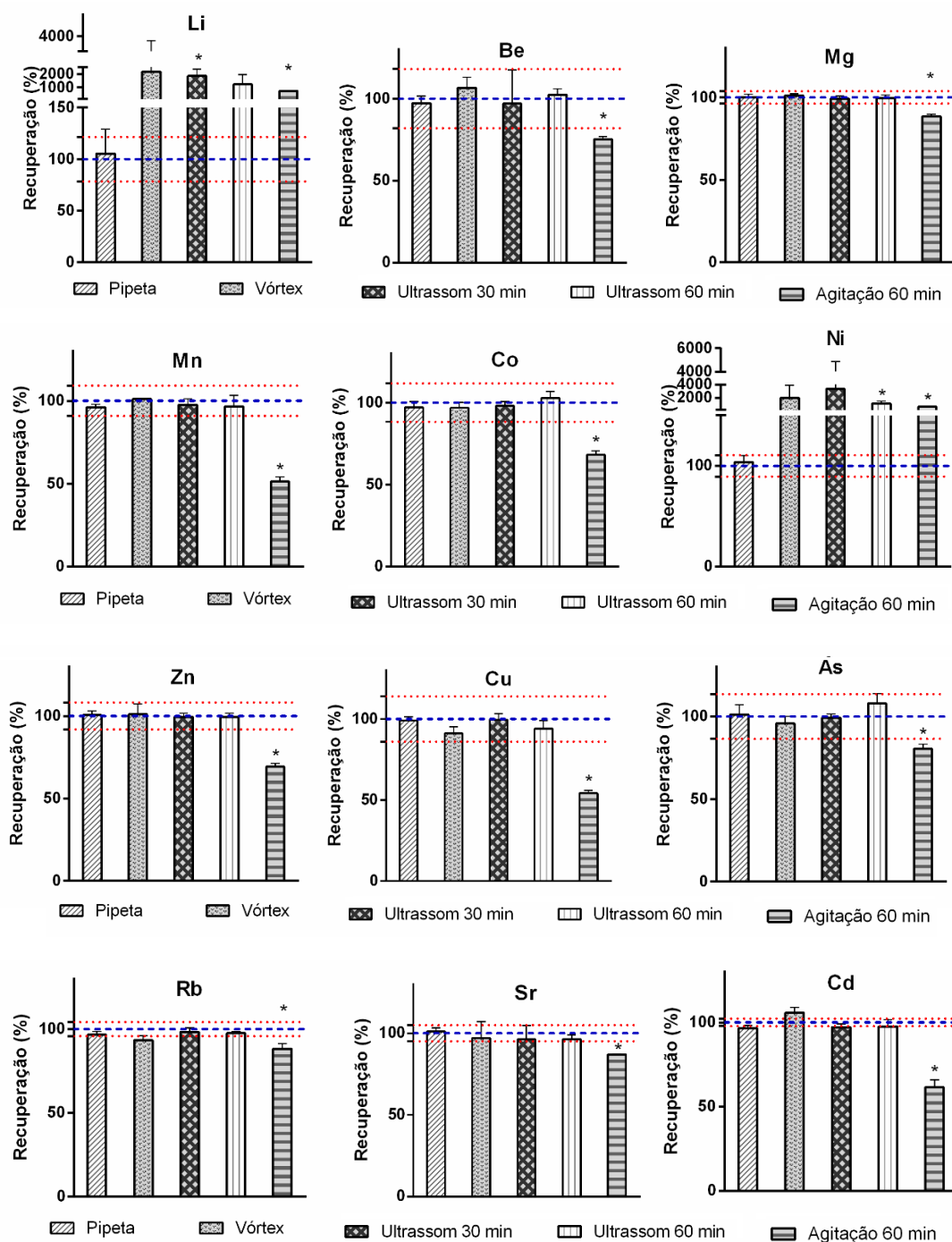
5.5. Condições de Extração

Após as etapas de coleta e secagem do sangue por 2 horas, o dispositivo VAMS deve passar por processos que permitam extrair os analitos de interesse para serem determinados quantitativamente. No presente estudo, foram testadas quatro condições diferentes: vórtex por 5 minutos, banho de ultrassom por 30 ou 60 minutos e agitação dos tubos por 60 minutos. A Figura 8 mostra os resultados das quatro condições avaliadas, bem como o preparo convencional da amostra, empregando uma micropipeta. Os valores determinados para cada condição foram expressos em função da recuperação.

Dentre as 4 metodologias empregadas, a que se mostrou mais ineficiente na extração dos analitos foi a utilização do agitador de tubos por 60 minutos. O uso desta técnica apresentou baixos valores de recuperação para a maioria dos analitos avaliados, sendo os menores valores encontrados para Mn, Bi, Cu e Hg com valores de $51,40 \pm 2,70\%$, $54,30 \pm 1,60\%$, $57,20 \pm 2,00\%$ e $49,00 \pm 2,50\%$, respectivamente. Todos os analitos apresentaram diferença estatística significativa, quando comparada as recuperações obtidas com os valores de referência ($p < 0,05$). O aumento no tempo de agitação poderia aumentar a recuperação dos analitos, porém, no presente trabalho, foi priorizado o uso de técnicas de preparo de amostra mais rápidas. Assim, as outras condições de extração estudadas mostraram-se mais promissoras (Figura 8).

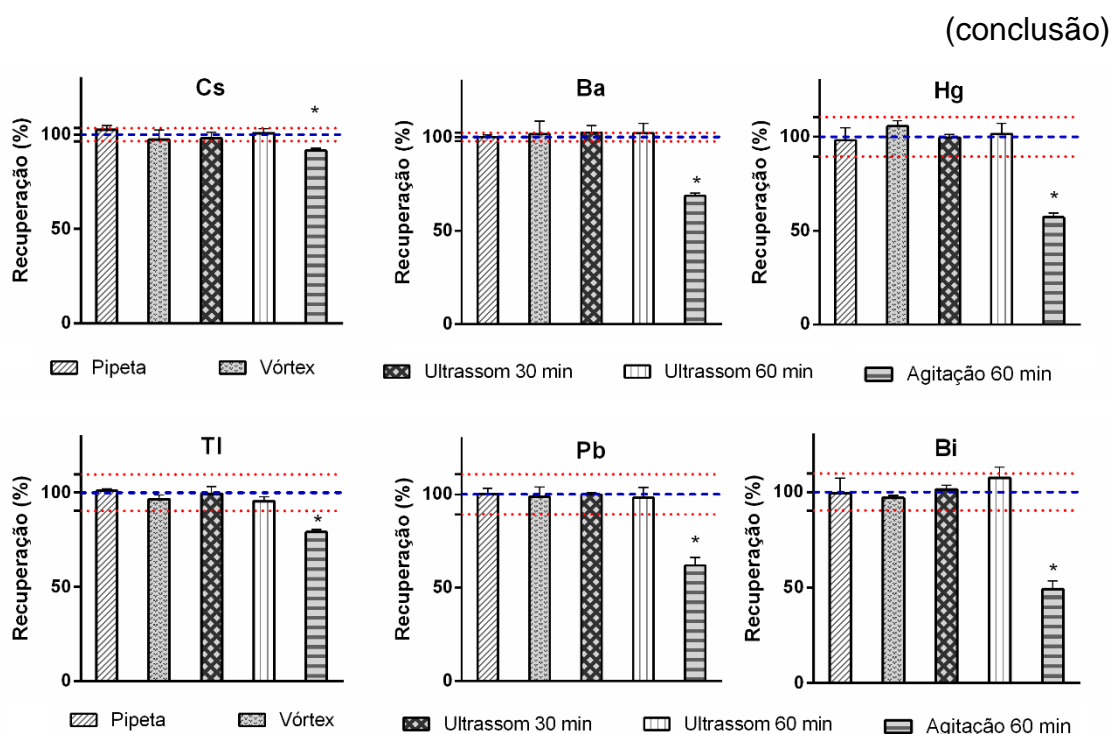
Figura 8. Avaliação das condições de extração para o material de referência Seronorm. Eixo y representa recuperação (%). Eixo x representa as diferentes condições de extração estudadas. Os valores estão representados como média \pm desvio padrão para triplicata. Linhas tracejadas vermelhas representam valor máximo e mínimo de recuperação. Linha tracejada azul representa recuperação alvo (100%). * representa diferença estatística ($p < 0,05$), quando confrontado com valor certificado

(continua)



Fonte: Autor.

Figura 8. Avaliação das condições de extração para o material de referência Seronorm. Eixo y representa recuperação (%). Eixo x representa as diferentes condições de extração estudadas. Os valores estão representados como média \pm desvio padrão para triplicata. Linhas tracejadas vermelhas representam valor máximo e mínimo de recuperação. Linha tracejada azul representa recuperação alvo (100%). * representa diferença estatística ($p < 0,05$), quando confrontado com valor certificado



Fonte: Autor.

Ao contrário da agitação de tubos, a agitação com vórtex se mostrou uma boa opção para o preparo da amostra com VAMS, devido a uma boa eficiência na extração dos analitos (próximos a 100%). Com exceção do Li e do Ni, não foram observadas diferenças estatísticas ($p > 0,05$), quando comparada aos valores de referência.

Além dos valores de recuperação satisfatórios, a técnica apresenta a vantagem de ser mais rápida na extração, sendo necessário somente 5 minutos. Os resultados deste teste corroboram com os resultados obtidos por Bolea-Fernandez e colaboradores (2016), que realizaram a extração de Ti, V, Co, Sr e

Zr, utilizando vórtex por 2 minutos, e com Anoshkina, Costas-Rodríguez e Vanhaecke (2017), que realizaram a extração de Fe com vórtex por 5 minutos.

É importante destacar também as vantagens práticas do uso do vórtex no VAMS sobre o DBS. O uso de vórtex por 5 minutos não danificou o polímero (ponta absorvente) do dispositivo, ao contrário do que pode ocorrer quando se utiliza o DBS para coleta de amostra. O uso do vórtex no DBS, a depender do material e o tempo de vórtex, pode levar a desintegração do papel, acarretando prejuízos na análise. No ICP-MS, pedaços de papel podem entupir o sistema de introdução da amostra. Logo, quando o vórtex é utilizado no preparo de amostras que estão contidas no DBS, pode ser necessário uma etapa de preparação de amostra adicional, como uma centrifugação, por exemplo.

Em uma análise sistemática do uso do DBS para análise multielementar, Caran (2016) imergiu o círculo de DBS em líquido extrator por pelo menos 60 minutos, seguido de agitação por um curto período de tempo (10 segundos), com auxílio de vórtex. O tempo de agitação de vórtex utilizado pela autora, provavelmente, foi escolhido para evitar desintegração do papel. Ainda, este procedimento acaba elevando o tempo de preparo de amostra.

Observou-se como desvantagem o contato do líquido extrator com a haste do dispositivo no momento em que o mesmo é agitado por vórtex. Este fato se faz importante, visto que pode ocorrer contaminação, proveniente da manipulação da haste no momento da coleta da amostra. Desta maneira, se essa condição for escolhida para o preparo de amostra, deve-se manipular somente as partes superiores do dispositivo, para que não haja contaminação.

O uso do vórtex na preparação de amostra do VAMS se mostra uma boa opção para um pequeno número de amostras. No entanto, em laboratórios de biomonitoramento humano são processadas grandes lotes de amostras diariamente, desta maneira optou-se por avaliar o uso do banho de ultrassom.

Visando o processamento de um maior número de amostras ao mesmo tempo, foi testado o banho de ultrassom, inicialmente por 60 minutos, conforme descrita por Cañabate e colaboradores (2017) para a extração de Be, V, Cr, Mn, Cu, As, Se, Cd, Sb, Tl e Pb do dispositivo VAMS. Assim como o vórtex, o uso do banho de ultrassom por 60 minutos mostrou-se uma boa condição de extração, apresentando valores satisfatórios de recuperação (próximos a 100%), não

sendo observada diferença estatística ($p > 0,05$) entre os valores obtidos e valores certificados para a maioria dos analitos, com exceção do Li e Ni.

Visando diminuir o tempo de preparo da amostra, foi avaliado o uso do banho de ultrassom por 30 minutos. Assim como o tempo de 60 minutos, a extração foi eficiente, apresentando valores satisfatórios de recuperação, não sendo observada diferença estatística ($p > 0,05$), quando confrontada com os valores do material de referência Seronorm.

O contrário foi observado no estudo de Caran (2016) com DBS, na qual o uso de banho de ultrassom por 30 minutos se mostrou ineficiente na extração dos elementos As, Cd, Hg, Pb, Cu, Mn, Se e Zn dos papéis de DBS.

Em todas as condições de extração, o níquel e o lítio apresentaram recuperação insatisfatória do material Seronorm, chegando a $3340 \pm 1500\%$ e $2170 \pm 1650\%$, respectivamente. Como previamente avaliado no branco, foi observado uma contaminação de Ni, que pode estar relacionado ao seu uso como catalisador na fabricação do dispositivo (BOLEA-FERNANDEZ et al., 2016). Dentre as 4 condições avaliadas, todas apresentaram valores superiores a faixa de aceitabilidade do referido material, impedindo a quantificação com exatidão, conforme descrito por Bolea-Fernandez e colaboradores (2016).

Outro elemento que apresentou valores superiores ao valor alvo foi o Li. No entanto, ao contrário do Ni, não foi observada contaminação para o Li na avaliação do branco em ambos os lotes (Tabela 5). Com isso, imaginou-se a possibilidade do analito não ter sido extraído no teste do branco, mesmo que a metodologia utilizada tenha sido banho de ultrassom por 30 minutos, semelhante a metodologia aplicada na análise do Li no Seronorm.

Além disto, experimentos independentes da avaliação do branco apresentaram valores muito semelhantes ao reportado na Tabela 5. Ao avaliar a recuperação de Li obtida com o método convencional (coleta e diluição com micropipeta), observou-se que os valores de recuperação estão de acordo com o valores alvo nos MRs (Figura 8).

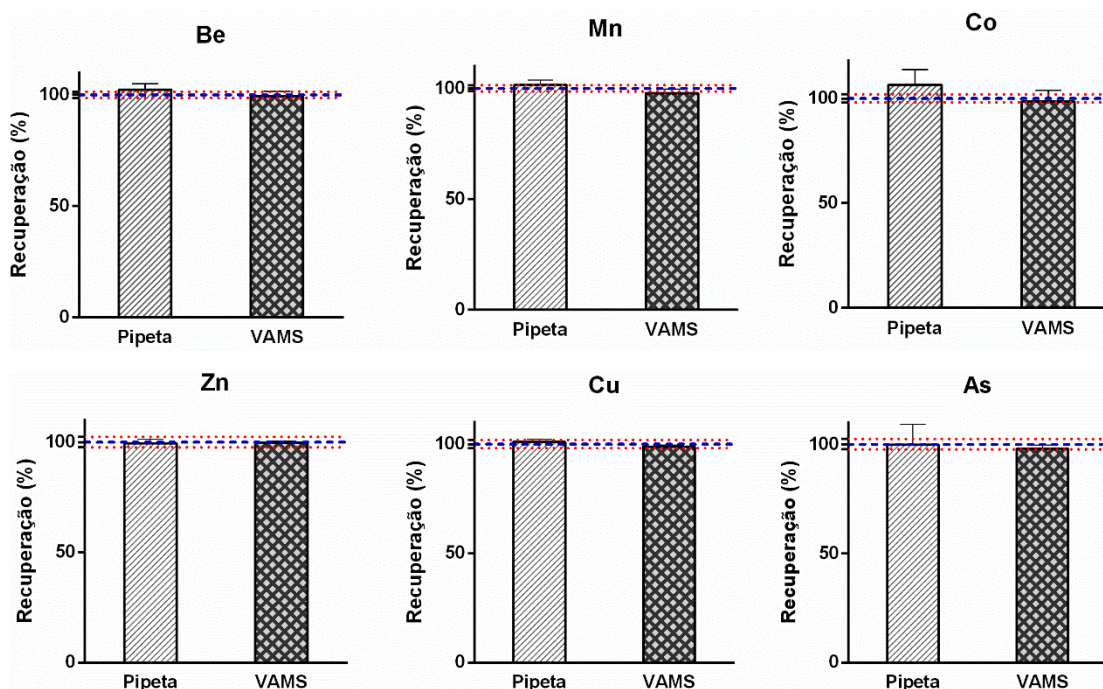
Desta maneira, a hipótese é que exista uma contaminação de Li e que o mesmo não é observado na extração do branco, causada por uma forte interação entre o elemento químico e o polímero. Quando em contato com o sangue, o Li passa a interagir com componentes da matriz, sendo então extraído com o sangue no momento em que é submetido a extração. Acredita-se que a fonte de

contaminação de Li seja semelhante àquela discutida para Ni, uma vez que o mesmo pode ser utilizado também como catalisador em reações de polimerização. Devido as razões explanadas, não foi possível realizar a quantificação de Li e Ni com exatidão.

O uso do banho de ultrassom por 30 minutos no preparo do VAMS mostrou-se uma boa opção neste trabalho, porque além de ser eficiente na extração da maioria dos analitos, é possível preparar um número maior de amostra em um tempo relativamente curto. Após avaliação das condições para o material de referência Seronorm, o uso do banho de ultrassom por 30 minutos foi utilizado no preparo dos materiais de referência de sangue Q-B-1506 (Figura 9) e BE 07-8 (Figura 10).

Figura 9. Avaliação do material de referência de sangue Q-B-1506, utilizando banho de ultrassom por 30 minutos. Eixo y representa recuperação (%). Eixo x representa duas formas diferentes de análise com o referido material de referência, método convencional (pipeta) e preparo com o VAMS. Os valores estão representados como média \pm desvio padrão para triplicata. Linhas tracejadas vermelhas representam valor máximo e mínimo de recuperação. Linha tracejada azul representa valor alvo de recuperação (100%)

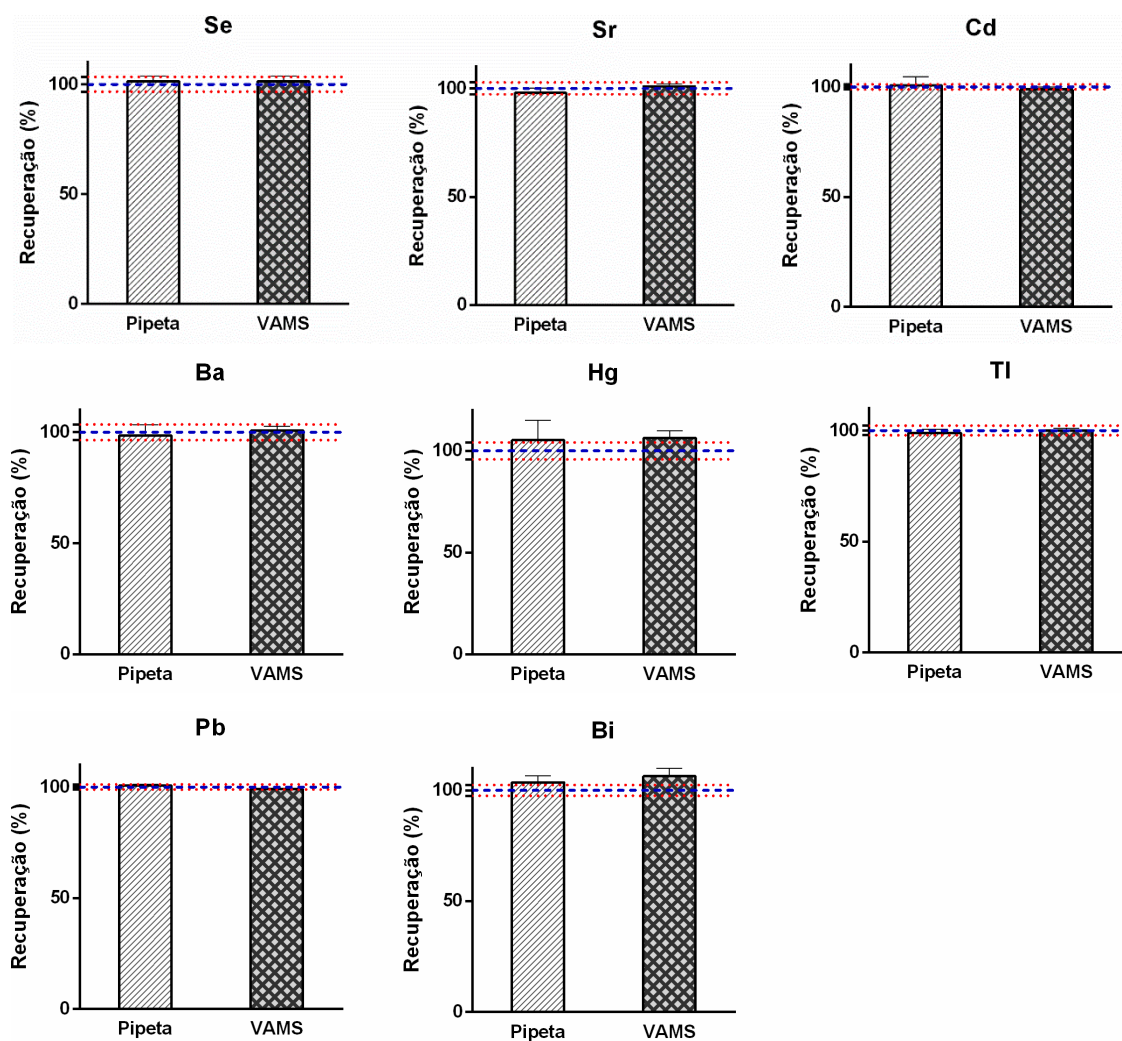
(continua)



Fonte: Autor.

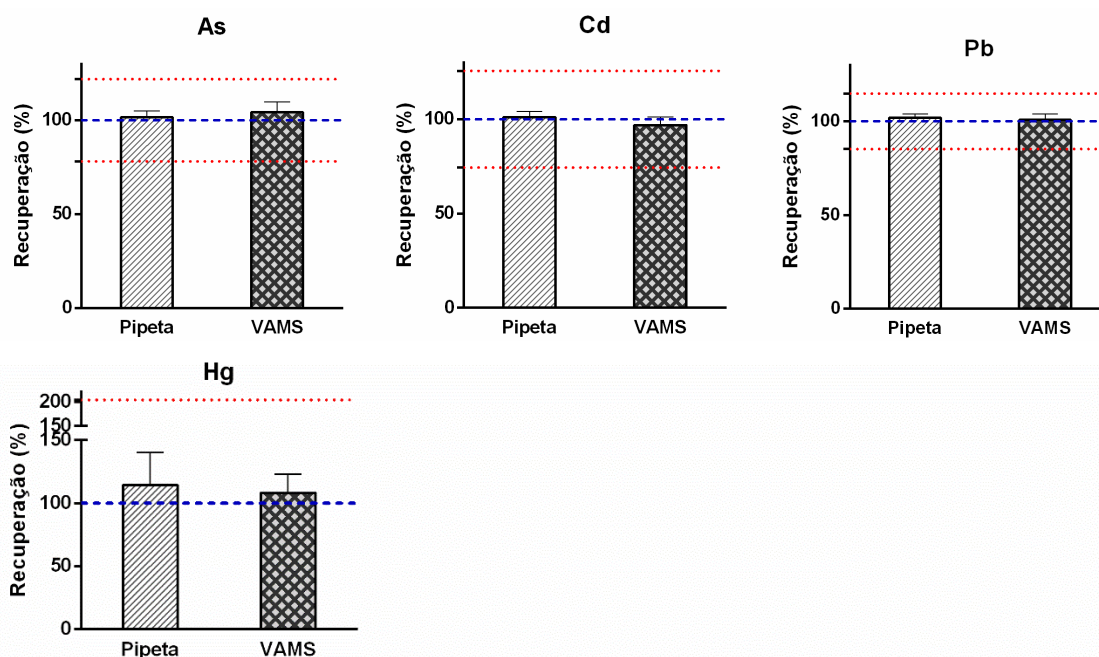
Figura 9. Avaliação do material de referência de sangue Q-B-1506, utilizando banho de ultrassom por 30 minutos. Eixo y representa recuperação (%). Eixo x representa duas formas diferentes de análise com o referido material de referência, método convencional (pipeta) e preparo com o VAMS. Os valores estão representados como média \pm desvio padrão para triplicata. Linhas tracejadas vermelhas representam valor máximo e mínimo de recuperação. Linha tracejada azul representa valor alvo de recuperação (100%)

(conclusão)



Fonte: Autor.

Figura 10. Avaliação do material de referência de sangue BE 07-08, utilizando banho de ultrassom por 30 minutos. Eixo y representa recuperação (%). Eixo x representa duas formas diferentes de análise com o referido material de referência, método convencional (pipeta) e preparo com o VAMS. Os valores estão representados como média \pm desvio padrão para triplicata. Linhas tracejadas vermelhas representam valor máximo e mínimo de recuperação. Linha tracejada azul representa valor alvo (100%)



Fonte: Autor.

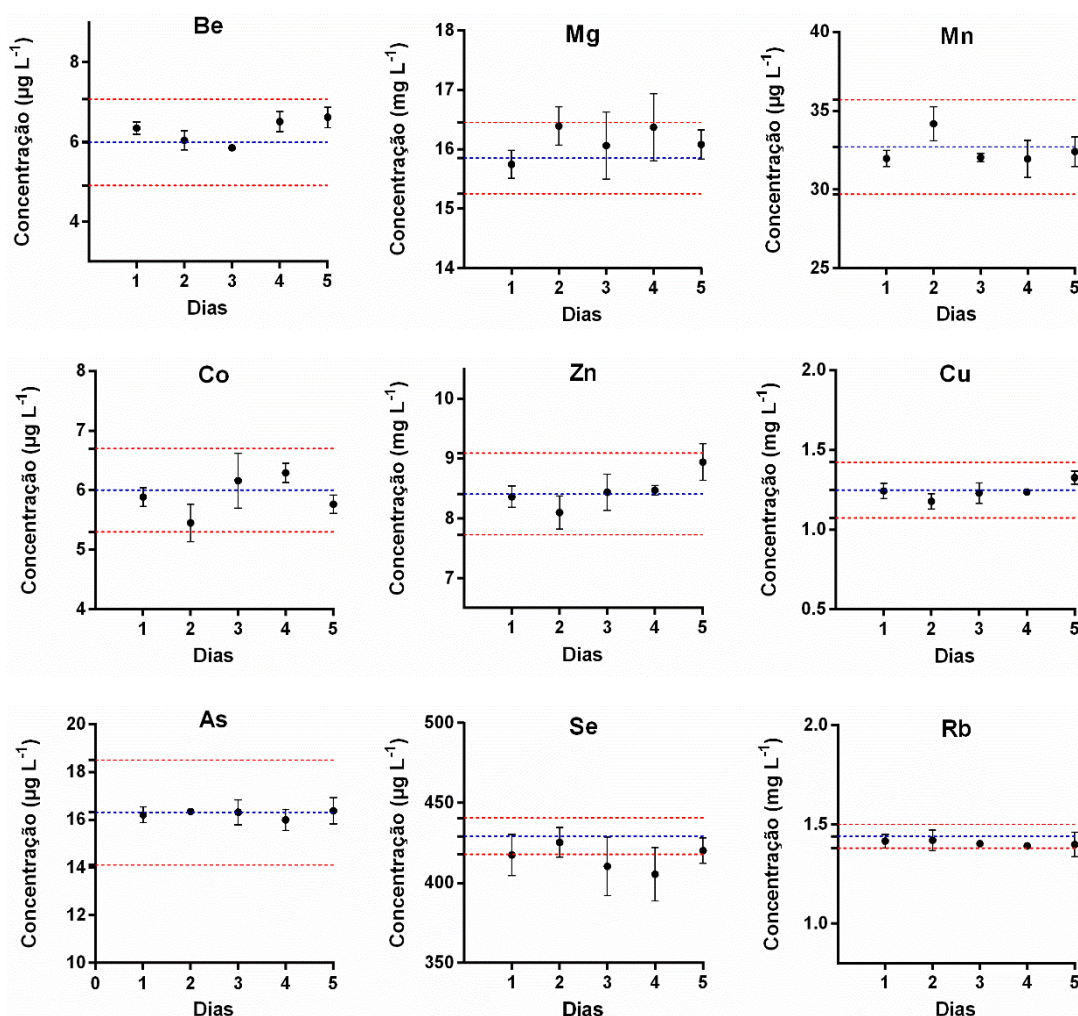
A escolha dos materiais de referência de sangue Q-B-1506 (Figura 9) e BE 07-8 (Figura 10) fez-se por apresentarem concentrações diferentes dos analitos estudados, frente ao material de referência de sangue do Seronorm. Assim como o resultado obtido para o Seronorm, foram obtidos valores satisfatórios de recuperação (próximos a 100%) em ambos os materiais, não sendo observado diferença estatística ($p > 0,05$), quando comparado aos valores alvo. Destaca-se também que os resultados empregando o VAMS não apresentaram diferença estatisticamente significativa ($p > 0,05$) quando comparado com o método convencional de preparo de amostra (micropipeta).

Após aplicação da extração, utilizando banho de ultrassom por 30 minutos nos materiais de referência Q-B-1506, BE 07-8 e Seronorm, o último material foi escolhido para análise em 5 dias distintos, por apresentar número maior de analitos com valores certificado. Para avaliação do selênio foi utilizado o material

de referência Q-B-1511. As concentrações obtidas ao longo desses 5 dias estão contidas na Figura 11.

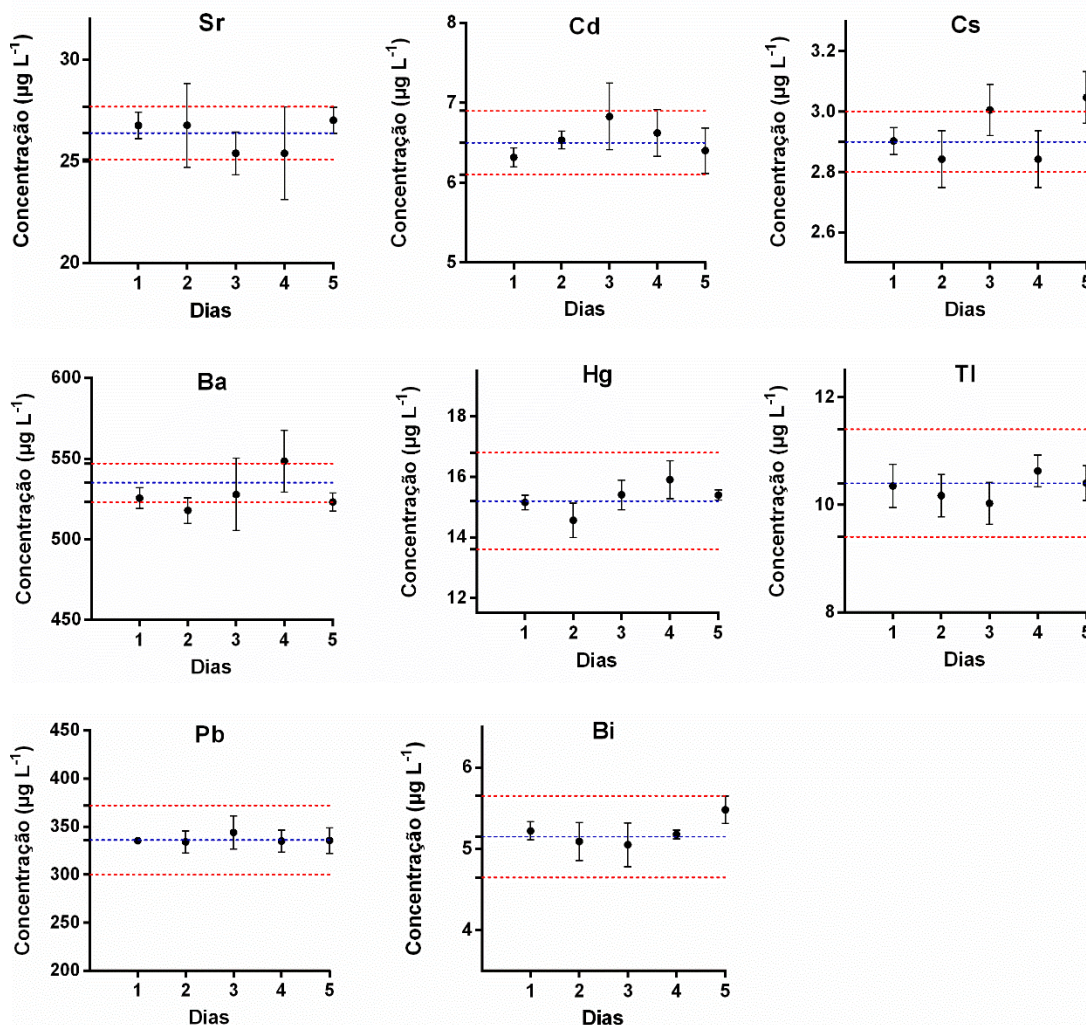
Figura 11. Avaliação ao longo de 5 dias, utilizando o dispositivo VAMS, com a condição de extração banho ultrassom por 30 minutos. Eixo y representa concentração obtida ao longo de 5 dias. Eixo x representa os cinco dias de análises. Os valores estão representados como média \pm desvio padrão para triplicata. Linhas tracejadas vermelhas representam valor máximo e mínimo de concentração. Linha tracejada azul representa recuperação alvo (100%)

(continua)



Fonte: Autor.

Figura 11. Avaliação ao longo de 5 dias, utilizando o dispositivo VAMS, com a condição de extração banho ultrassom por 30 minutos. Eixo y representa concentração obtida ao longo de 5 dias. Eixo x representa os cinco dias de análises. Os valores estão representados como média \pm desvio padrão para triplicata. Linhas tracejadas vermelhas representam valor máximo e mínimo de concentração. Linha tracejada azul representa recuperação alvo (100%) (conclusão)



Fonte: Autor.

Com base na observação dos valores obtidos, é possível verificar que o método apresenta uma exatidão satisfatória, por não apresentar diferença estatística, quando comparado aos valores de referência. Com as análises dos elementos químicos ao longo dos cinco dias, foi possível calcular a precisão intra dia e a precisão inter dia (Tabela 6). A precisão, avaliada por meio do desvio padrão relativo, foram inferiores a 10% para todos os analitos. Assim, pode-se

concluir que o método apresenta exatidão e precisão satisfatória para 17 dos 19 analitos estudados.

Tabela 6. Precisão Intra dia (n=3) e Inter dia (n=5) para análise dos materiais de referência, com a condição de extração banho ultrassom por 30 minutos

Analito	Precisão Intra dia (%)	Precisão Inter dia (%)
Be	2,45	9,55
Mg	1,50	2,65
Mn	1,60	3,50
Co	2,70	6,55
Zn	2,15	4,15
Cu	3,85	5,05
As	2,05	2,40
Se	3,10	5,00
Rb	2,45	7,30
Sr	2,45	5,60
Cd	1,90	4,50
Cs	1,55	4,00
Ba	1,20	3,05
Hg	1,55	3,90
Tl	3,90	3,65
Pb	0,90	3,25
Bi	2,20	4,25

Fonte: Autor.

5.6. Reutilização

Subsequente a utilização, os dispositivos passaram por um processo de descontaminação, conforme descrito na Figura 5. Os dispositivos foram lavados com água ultrapura corrente e depois sonicados por 20 min. Depois foram submetidos ao banho de HNO₃ 10% *overnight*, seguido de lavagem com água ultrapura e sonicação por 20 minutos. Após estas etapas, os dispositivos foram secados por 24 horas em temperatura ambiente. Novamente, avaliou-se as concentrações dos analitos nos dispositivos (avaliação do branco). Na Tabela 7 são mostrados os valores inicialmente obtidos para dois lotes distintos e os valores após a descontaminação.

De uma maneira geral, foi observada que a descontaminação foi eficiente, apresentando uma redução considerável nas concentrações dos analitos. Após

a descontaminação, 11 elementos químicos apresentaram valores abaixo do limite de detecção do método, sendo eles Be, Mn, Co, Se, Rb, Cd, Cs, Hg, Tl, Pb e Bi.

Elementos que haviam apresentado valores mais altos na avaliação inicial do branco, como Mg e Zn, em que os valores eram superiores a $10 \mu\text{g L}^{-1}$ em pelo menos um dos lotes, tiveram uma redução para $0,40 \mu\text{g L}^{-1}$ e $0,095 \mu\text{g L}^{-1}$, respectivamente.

Tabela 7. Comparação do Branco do VAMS anterior a descontaminação e após o processo de descontaminação. Os valores estão representados como média \pm desvio padrão. Lote 1 e Lote 2 (n=5) e VAMS descontaminado (n=10).

ND significa abaixo do limite de detecção

Analito	Lote 1 (Média ($\mu\text{g L}^{-1}$) \pm Desvio Padrão)	Lote 2 (Média ($\mu\text{g L}^{-1}$) \pm Desvio Padrão)	VAMS descontaminado (Média ($\mu\text{g L}^{-1}$) \pm Desvio Padrão)
Li	$0,070 \pm 0,060$	$0,2 \pm 0,07$	$0,001 \pm 0,002$
Be	ND	$0,010 \pm 0,006$	ND
Mg	$12,2 \pm 5,3$	$8,30 \pm 0,80$	$0,40 \pm 0,20$
Mn	$1,05 \pm 0,30$	$0,50 \pm 0,20$	ND
Co	$0,070 \pm 0,065$	$0,02 \pm 0,1$	ND
Ni	105 ± 210	$13,60 \pm 6,55$	$0,30 \pm 0,15$
Zn	$7,55 \pm 2,06$	$16,10 \pm 10,30$	$0,095 \pm 0,085$
Cu	$1,30 \pm 0,40$	$1,70 \pm 0,80$	$0,045 \pm 0,083$
As	$0,015 \pm 0,003$	$0,012 \pm 0,004$	$0,008 \pm 0,001$
Se	ND	ND	ND
Rb	$0,04 \pm 0,01$	$0,02 \pm 0,01$	ND
Sr	$0,65 \pm 0,50$	$0,25 \pm 0,08$	$0,06 \pm 0,03$
Cd	$0,011 \pm 0,007$	$0,006 \pm 0,003$	ND
Cs	$0,001 \pm 0,0007$	ND	ND
Ba	$0,75 \pm 0,50$	$1,35 \pm 0,20$	$0,007 \pm 0,004$
Hg	ND	ND	ND
Tl	ND	ND	ND
Pb	$1,07 \pm 0,20$	$0,80 \pm 0,11$	ND
Bi	$0,0080 \pm 0,0020$	$0,01 \pm 0,005$	ND

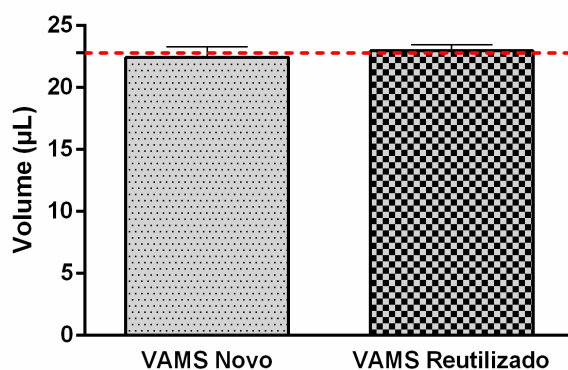
Fonte: Autor.

Como discutido anteriormente, o dispositivo apresenta uma contaminação importante de Ni, atingindo concentrações médias iguais a $105 \pm 210 \mu\text{g L}^{-1}$ no

lote 1 e $13,60 \pm 6,55 \mu\text{g L}^{-1}$ no lote 2, o que inviabilizou as análises desse elemento químico. Após a descontaminação, houve uma redução para $0,30 \pm 0,15 \mu\text{g L}^{-1}$, abaixo do valor normalmente encontrado no sangue de indivíduos brasileiros, que é de $2,10 \mu\text{g L}^{-1}$, conforme a Tabela 5. Para os demais elementos como Li, Cu, As, Sr e Ba também foi possível observar uma redução nas concentrações iniciais do dispositivo VAMS.

Foi também avaliado se o processo de descontaminação para reutilização do dispositivo, poderia modificar os volumes amostrados pelo polímero do VAMS. O volume absorvido encontrado no VAMS novo foi de $22,50 \pm 0,80 \mu\text{L}$, enquanto o VAMS reutilizado foi de $22,90 \pm 0,50 \mu\text{L}$ (Figura 12). Apesar desta pequena diferença, ambos os dispositivos não apresentaram diferença estatística ($p > 0,05$), indicando que o volume absorvido manteve-se após as etapas de amostragem, extração e descontaminação.

Figura 12. Comparação do volume absorvido pela ponteira do VAMS antes e depois do processo de descontaminação. Eixo y representa o Volume (μL) e eixo x representa a média \pm desvio padrão ($n=6$), obtidas com VAMS novo (dispositivo nunca utilizado) e com a coleta com o dispositivo proveniente de reutilização. Linha tracejada vermelha representa a média do volume absorvido informada por Neoteryx®



Fonte: Autor.

Após ser observado uma melhora no branco e que o volume de sangue absorvido pelo VAMS reutilizado não foi alterado, foram avaliadas recuperações dos analitos nos materiais de referência Seronorm e, para o Se, o material Q-B-1511, empregando, para fins de extração, o banho ultrassom por 30 minutos.

Além disto, devido a diminuição nas concentrações de Ni e Li com o processo de descontaminação do dispositivo VAMS, estes dois analitos foram novamente incluídos no método para avaliar suas respectivas recuperações.

Assim como observado nos experimentos iniciais, foram obtidos valores satisfatórios de recuperação para todos analitos (Tabela 8) (recuperações dos analito variaram de 96% a 106%), ampliando o método proposto para 19 analitos.

Com base nos resultados obtidos nesta etapa do estudo, foi também possível incluir os cálculos de precisão intra dia para Li e Ni, de 3,60% e 4,60%, respectivamente.

Tabela 8. Valores de recuperação obtidos após o processo de descontaminação do dispositivo VAMS. Extração realizada em banho de ultrassom por 30 minutos. Os valores estão representados como média \pm desvio padrão para triplicata.

Analito	Valor alvo ($\mu\text{g L}^{-1}$) \pm DP	Concentração encontrada ($\mu\text{g L}^{-1}$) \pm DP	Recuperação (%) \pm DP
Li	1,4 \pm 0,3	1,4 \pm 0,05	102,7 \pm 4,7
Be	5,988 \pm 1,084	6,3 \pm 0,3	104,8 \pm 6,2
Mg	15850 \pm 600	15532,8 \pm 262,2	98,0 \pm 1,6
Mn	32,7 \pm 3,0	34,0 \pm 0,9	104,0 \pm 2,9
Co	6,0 \pm 0,8	6,1 \pm 0,0	101,7 \pm 1,1
Ni	18,5 \pm 3,2	19,6 \pm 0,9	106,2 \pm 4,9
Zn	8406 \pm 682	8509,4 \pm 242,3	101,2 \pm 2,9
Cu	1248 \pm 174	1260,7 \pm 32,2	101,0 \pm 2,6
As	16,3 \pm 2,2	16,2 \pm 0,5	99,7 \pm 3,0
Se	417,9 \pm 11,4	439,0 \pm 11,5	102,3 \pm 2,7
Rb	1,44 \pm 0,06	1426,1 \pm 34,3	99,0 \pm 2,4
Sr	26,4 \pm 1,3	26,0 \pm 0,1	98,6 \pm 0,6
Cd	6,5 \pm 0,4	6,2 \pm 0,2	96,1 \pm 3,2
Cs	2,9 \pm 0,1	2,3 \pm 0,05	102,5 \pm 1,4
Ba	535 \pm 12	540,0 \pm 8,4	100,9 \pm 3,2
Hg	15,2 \pm 1,6	15,9 \pm 0,4	104,6 \pm 2,8
Tl	10,4 \pm 1,0	10,6 \pm 0,05	101,8 \pm 0,4
Pb	336 \pm 36	339,6 \pm 1,0	101,1 \pm 0,3
Bi	5,15 \pm 0,50	5,1 \pm 0,1	99,3 \pm 1,7

Fonte: Autor.

Após o processo de descontaminação, foi observada uma redução dos valores de branco. Além disto, a descontaminação não afetou o volume absorvido de sangue no dispositivo e ainda foram obtidos valores satisfatórios de recuperação para todos os analitos, incluindo Li e Ni. Diante deste resultado, o procedimento realizado neste trabalho para descontaminar o VAMS também podem ser utilizado como uma forma de pré-condicionamento de dispositivos novos, previamente à coleta, com o objetivo de reduzir valores de branco e evitar interferências que possam estar relacionadas à possíveis contaminações dos dispositivos.

Destaca-se ainda que são necessárias análises complementares de descontaminação microbiológicas, caso seja necessário o uso de dispositivos reutilizados na coleta de amostras biológicas.

5.7. Considerações sobre o método proposto

No presente trabalho foi desenvolvido um método para determinação de elementos químicos em sangue utilizando Microamostragem Volumétrica Absortiva. O dispositivo é relativamente novo no mercado, e, por esse motivo, a literatura apresenta poucos métodos para determinação desses analitos em sangue.

A metodologia proposta neste trabalho utilizou uma técnica mais simples e de menor custo, com o emprego de um equipamento de simples quadrupolo (q-ICP-MS), frente aos demais trabalhos, os quais utilizaram ICP-MS triploquadrupolo (ICP-MS/MS), como no estudo de Bolea-Fernandez e colaboradores (2016) ou ICP-MS do tipo multicoletor (MC-ICP-MS) empregada por Anoshkina, Costas-Rodríguez e Vanhaecke (2017).

No presente estudo, foi demonstrado que é possível uma análise de até 19 analitos empregando o sistema de introdução de amostra convencional, ou seja, utilizando câmara de nebulização ciclônica e nebulizador do tipo Meinhard®.

Cañabate e colaboradores (2017) utilizaram o chamado sistema integrado de introdução de amostras com tocha de alta temperatura, para diminuição do volume de injeção da amostra. No entanto, utilizando um dispositivo de 20 μ L, no presente trabalho, foi necessário um volume de 980 μ L de diluente para extrair os analitos do VAMS. Este volume é suficiente para realizar pelo menos duas

injeções de uma mesma amostra com leitura em triplicata para os 19 analitos, bem como a leitura do padrão interno.

Uma outra vantagem do método desenvolvido é a ampliação do número de analitos a serem quantificados frente aos demais estudos (BOLEA-FERNANDEZ et al., 2016; ANOSHKINA; COSTAS-RODRÍGUEZ; VANHAECKE, 2017; CAÑABATE et al., 2017), compreendendo a determinação de elementos essenciais, não essenciais e tóxicos, bem como a determinação de macro e microelementos, sendo esta uma metodologia mais adequada para ser aplicada em estudos de Biomonitoramento Humano.

No presente método foi priorizado a simplificação no preparo de amostra. A extração dos analitos foi realizada utilizando HNO₃ 0,2%, triton X-100 0,05%, juntamente com o padrão interno (ródio), que é o próprio diluente empregado na diluição das amostras, evitando assim, etapas adicionais de preparo de amostra, como acidificação ou adição de PI, pois permite a introdução direta da amostra no equipamento logo após a sua extração do dispositivo. Além disto, no trabalho evitou-se remover o polímero para o processamento da amostras enquanto outros autores utilizaram como etapa adicional a remoção do polímero absorvente (DE KESEL; LAMBERT; STOVE, 2015; JOHN, H. et al, 2016).

Na luz de nossos conhecimentos, ainda não foi demonstrando reutilização do dispositivo. No presente trabalho foi demonstrado a possibilidade da reutilização do dispositivo, utilizando um processo simples e rápido de descontaminação. Esse fato é de grande valia, visto que o dispositivo VAMS ainda é vendido por um preço relativamente caro quando comparado com o DBS. Sendo assim, a reutilização gera uma economia nos custos finais de análise. Além disto, a etapa de descontaminação aplicada no teste de reutilização pode ser utilizada como uma forma eficiente no pré-condicionamento de dispositivos VAMS, a fim de reduzir a contaminação dos dispositivos e garantir uma análise quantitativa com exatidão e precisão.

6. CONCLUSÃO

No presente trabalho foi desenvolvido e validado um método utilizando o dispositivo VAMS para determinação de Li, Be, Mg, Mn, Co, Ni, Zn, Cu, As, Se, Rb, Sr, Cd, Cs, Ba, Hg, Tl, Pb e Bi em sangue total por ICP-MS, sendo assim,

atingidos os objetivos propostos inicialmente. O método desenvolvido é uma opção para simplificar os processos de coleta de sangue e de preparo de amostra, sendo uma boa alternativa para estudos de biomonitoramento humano em larga escala em populações vulneráveis, principalmente em países com vasta extensão geográfica e áreas de difícil acesso, como o Brasil.

O método apresentou valores adequados de linearidade, limite de detecção e quantificação, bem como valores satisfatórios de recuperação e precisão.

Um processo simples de descontaminação dos dispositivos VAMS mostrou a possibilidade de reutilização dos mesmos, fato este que diminuirá os custos totais de análise.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDUL, K. S. M. et al. Arsenic and human health effects: A review. **Environmental toxicology and pharmacology**, v. 40, n. 3, p. 828-846, 2015.

ABEDIN, M.; COTTER-HOWELLS, J.; MEHARG, A. A. Arsenic uptake and accumulation in rice (*Oryza sativa* L.) irrigated with contaminated water. **Plant and soil**, v. 240, n. 2, p. 311-319, 2002.

ABRITIS, A. J.; HARBISON, R. D. In HARBISON, R. D.; BOURGEOIS, M. M.; JOHNSON, G. T. (Ed.). SECTION II: METALS AND METALLOIDS. 9: BERYLLIUM. **Hamilton and Hardy's industrial toxicology**, John Wiley & Sons, ed. 6, p. 63-64, 2015.

ANDERSEN, I. K. L. et al. Volumetric absorptive MicroSampling vs. other blood sampling materials in LC-MS-based protein analysis—preliminary investigations. **Journal of pharmaceutical and biomedical analysis**, v. 156, p. 239-246, 2018.

ANGERER, J.; EWERS, U.; WILHELM, M. Human biomonitoring: state of the art. **International journal of hygiene and environmental health**, v. 210, n. 3-4, p. 201-228, 2007.

ANOSHKINA, Y.; COSTAS-RODRÍGUEZ, M.; VANHAECKE, F. Iron isotopic analysis of finger-prick and venous blood by multi-collector inductively coupled plasma-mass spectrometry after volumetric absorptive microsampling. **Journal of Analytical Atomic Spectrometry**, v. 32, n. 2, p. 314-321, 2017.

ARAMENDÍA, M. et al. Direct trace-elemental analysis of urine samples by laser ablation-inductively coupled plasma mass spectrometry after sample deposition on clinical filter papers. **Analytical chemistry**, v. 84, n. 20, p. 8682-8690, 2012.

ASANO, S. et al. Acute inorganic mercury vapor inhalation poisoning. **Pathology International**, v. 50, n. 3, p. 169-174, 2000.

ASCHNER, M. et al. Manganese: recent advances in understanding its transport and neurotoxicity. **Toxicology and applied pharmacology**, v. 221, n. 2, p. 131-147, 2007.

AWUAL, M. R. et al. Radioactive cesium removal from nuclear wastewater by novel inorganic and conjugate adsorbents. **Chemical Engineering Journal**, v. 242, p. 127-135, 2014.

BARBOSA JR., F. et al. A critical review of biomarkers used for monitoring human exposure to lead: advantages, limitations, and future needs. **Environmental health perspectives**, v. 113, n. 12, p. 1669-1674, 2005.

BARBOSA JR., F. et al. Elevated blood lead levels in a riverside population in the Brazilian Amazon. **Environmental research**, v. 109, n. 5, p. 594-599, 2009.

BARCELOUX (a), D. G.; BARCELOUX, D. Cobalt. **Journal of Toxicology: Clinical Toxicology**, v. 37, n. 2, p. 201-216, 1999.

BARCELOUX (b), D. G.; BARCELOUX, Donald. Nickel. **Journal of Toxicology: Clinical Toxicology**, v. 37, n. 2, p. 239-258, 1999.

BATISTA, B. L. et al. Reference concentrations for trace elements in urine for the Brazilian population based on q-ICP-MS with a simple dilute-and-shoot procedure. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 20, n. 8, p. 1406-1413, 2009.

BECKER, K. et al. German Environmental Survey (GerES): human biomonitoring as a tool to identify exposure pathways. **International journal of hygiene and environmental health**, v. 210, n. 3-4, p. 267-269, 2007.

BERNHOF, R. A. Cadmium toxicity and treatment. **The Scientific World Journal**, v. 2013, 2013.

BLÜML, V. et al. Lithium in the public water supply and suicide mortality in Texas. **Journal of psychiatric research**, v. 47, n. 3, p. 407-411, 2013.

BOCCA, B et al. Toxic metals contained in cosmetics: a status report. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v. 68, n. 3, p. 447-467, 2014.

BOLEA-FERNANDEZ, E. et al. Determination of ultra-trace amounts of prosthesis-related metals in whole blood using volumetric absorptive micro-sampling and tandem ICP–Mass spectrometry. **Analytica chimica acta**, v. 941, p. 1-9, 2016.

BOURGEOIS, M. M. In HARBISON, R. D.; BOURGEOIS, M. M.; JOHNSON, G. T. (Ed.). SECTION II: METALS AND METALLOIDS. 8: BARIUM. **Hamilton and Hardy's industrial toxicology**, John Wiley & Sons, ed. 6, p. 57-62, 2015.

BOWEN, L. N. et al. Elementary, my dear Dr. Allen: the case of barium toxicity and Pa Ping. **Neurology**, v. 74, n. 19, p. 1546-1549, 2010.

BRADLEY, B.; SINGLETON, M.; PO, A. L. W. Bismuth toxicity—a reassessment. **Journal of clinical pharmacy and therapeutics**, v. 14, n. 6, p. 423-441, 1989.

BRASIL. Portaria GM/MS n.º 822, de 06 de junho de 2001. **Instituição do Programa Nacional de Triagem Neonatal, no âmbito do Sistema Único de Saúde, para Fenilcetonúria, Hipotireoidismo Congênito, Fibrose Cística e Hemoglobinopatias**. Ministério da Saúde, 2001.

BRASIL. Resolução da Diretoria Colegiada (RDC) nº 27, DE 17 DE MAIO DE 2012. **Dispõe sobre os requisitos mínimos para a validação de métodos bioanalíticos empregados em estudos com fins de registro e pós-registro de medicamentos**. Órgão emissor: AVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária. 2012. Disponível em: http://portal.anvisa.gov.br/documents/33880/2568070/rdc0027_17_05_2012.pdf/c6edeb56-200d-4482-8a19-99fa11c33fd3. Acesso em 25 de outubro de 2018, às 11h.

BRASIL. IBAMA (Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis). Laudo Técnico Preliminar: Impactos ambientais decorrentes do desastre envolvendo o rompimento da barragem de Fundão, em Mariana, Minas Gerais. 2015. Disponível em: https://www.ibama.gov.br/phocadownload/barragemdefundao/laudos/laudo_tecnico_preliminar_ibama.pdf. Acesso em 22 de novembro de 2018, às 15h.

BREMNER, I. Manifestations of copper excess. **The American journal of clinical nutrition**, v. 67, n. 5, p. 1069-1073, 1998.

CABRERA, W. E. et al. Strontium and bone. **Journal of Bone and Mineral Research**, v. 14, n. 5, p. 661-668, 1999.

CALA, M. P.; MEESTERS, R. J. W. Comparative study on microsampling techniques in metabolic fingerprinting studies applying gas chromatography–MS analysis. **Bioanalysis**, v. 9, n. 17, p. 1329-1340, 2017.

CANADÁ. Health Canada. Second Report on Human Biomonitoring of Environmental Chemicals in Canada: Results of the Canadian Health Measures Survey Cycle 2 (2009-2011). **Health Canada**, Ottawa, Ontario, 2013. Disponível em: <https://www.canada.ca/en/health-canada/services/environmental-workplace-health/reports-publications/environmental-contaminants/second-report-human-biomonitoring-environmental-chemicals-canada-health-canada-2013.html>. Acesso em 20 de novembro de 2018, às 13h.

CAÑABATE, Á. et al. Analysis of whole blood by ICP-MS equipped with a high temperature total sample consumption system. **Journal of Analytical Atomic Spectrometry**, v. 32, n. 1, p. 78-87, 2017.

CAPIAU, S. et al. Development, validation and application of an inductively coupled plasma–Mass spectrometry method to determine cobalt in metal-on-metal prosthesis patients using volumetric absorptive microsampling. **Talanta**, 2019.

CARAN, N. C. C. **Avaliação sistemática do uso do Dried Blood Spot para determinação de elementos químicos em sangue capilar visando estudos de biomonitoramento no Brasil**. 2016. Dissertação (Mestrado em Toxicologia) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2016. Acesso em 05 de novembro de 2019, às 15 horas.

CHRISTENSEN, J. Human exposure to toxic metals: factors influencing interpretation of biomonitoring results. **Science of the total environment**, v. 166, n. 1-3, p. 89-135, 1995.

CHUTTANI, H. K. et al. Acute copper sulfate poisoning. **The American journal of medicine**, v. 39, n. 5, p. 849-854, 1965.

COHEN-SOLAL, M. Strontium overload and toxicity: impact on renal osteodystrophy. **Nephrology Dialysis Transplantation**, v. 17, n. 2, p. 30-34, 2002.

CONCHA, G. et al. High-level exposure to lithium, boron, cesium, and arsenic via drinking water in the Andes of northern Argentina. **Environmental science & technology**, v. 44, n. 17, p. 6875-6880, 2010.

CORNELIS, R.; NORDBERG, M. In NORDBERG, G. F.; FOWLER, B. A.; NORDBERG, M. Chapter 2 General Chemistry, Sampling, Analytical Methods, and Speciation. **Handbook on the Toxicology of Metals, Academic press, Elsevier**, ed. 4, v. 1, p. 11-38, 2014.

CVJETKO, P.; CVJETKO, I.; PAVLICA, M. Thallium toxicity in humans. **Archives of Industrial Hygiene and Toxicology**, v. 61, n. 1, p. 111-119, 2010.

DA CRUZ, A. D. et al. Human micronucleus counts are correlated with age, smoking, and cesium-137 dose in the Goiania (Brazil) radiological accident. **Mutation Research/Environmental Mutagenesis and Related Subjects**, v. 313, n. 1, p. 57-68, 1994.

DA SILVA, M. B. G. M.; LACERDA, M. R. "Teste do Pezinho": Por que coletar na alta hospitalar?. **Revista Eletrônica de Enfermagem**, v. 5, n. 2, 2003.

DE BAAIJ, J. H. F.; HOENDEROP, J. G. J.; BINDELS, R. J. M. Magnesium in man: implications for health and disease. **Physiological reviews**, v. 95, n. 1, p. 1-46, 2015.

DE KESEL, P. M. M.; LAMBERT, W. E.; STOVE, C. P. Does volumetric absorptive microsampling eliminate the hematocrit bias for caffeine and paraxanthine in dried blood samples? A comparative study. **Analytica chimica acta**, v. 881, p. 65-73, 2015.

DENKHAUS, E.; SALNIKOW, K. Nickel essentiality, toxicity, and carcinogenicity. **Critical reviews in oncology/hematology**, v. 42, n. 1, p. 35-56, 2002.

DENNIFF, P.; SPOONER, N. The effect of hematocrit on assay bias when using DBS samples for the quantitative bioanalysis of drugs. **Bioanalysis**, v. 2, n. 8, p. 1385-1395, 2010.

DENNIFF, P.; SPOONER, N. Volumetric absorptive microsampling: a dried sample collection technique for quantitative bioanalysis. **Analytical chemistry**, v. 86, n. 16, p. 8489-8495, 2014.

DRISCOLL, C. T. et al. The mercury cycle and fish in the Adirondack lakes. **Environmental Science & Technology**, v. 28, n. 3, p. 136-143, 1994.

EBEL, H.; GÜNTHER, T. Magnesium metabolism: a review. **Clinical Chemistry and Laboratory Medicine**, v. 18, n. 5, p. 257-270, 1980.

EBNER, A. D.; RITTER, J. A.; NAVRATIL, J. D. Adsorption of cesium, strontium, and cobalt ions on magnetite and a magnetite– silica composite. **Industrial & engineering chemistry research**, v. 40, n. 7, p. 1615-1623, 2001.

ESTEBAN, M.; CASTAÑO, A. Non-invasive matrices in human biomonitoring: a review. **Environment international**, v. 35, n. 2, p. 438-449, 2009.

ERIKSON, K. M. et al. Interactions between excessive manganese exposures and dietary iron-deficiency in neurodegeneration. **Environmental toxicology and pharmacology**, v. 19, n. 3, p. 415-421, 2005.

ERIKSON, K. M.; ASCHNER, M. Manganese neurotoxicity and glutamate-GABA interaction. **Neurochemistry international**, v. 43, n. 4-5, p. 475-480, 2003.

EUA. Toxicological Profile for Beryllium. U.S. DEPARTMENT OF HEALTH AND HUMAN SERVICES, Public Health Service, **Agency for Toxic Substances and Disease Registry (ATSDR)**, 2002. Disponível em: <https://www.atsdr.cdc.gov/ToxProfiles/tp4.pdf>. Acesso em 18 de novembro de 2018, às 15h.

EUA. TOXICOLOGICAL PROFILE FOR STRONTIUM. U.S. DEPARTMENT OF HEALTH AND HUMAN SERVICES, Public Health Service, **Agency for Toxic Substances and Disease Registry (ATSDR)**, 2004. Disponível em: <https://www.atsdr.cdc.gov/ToxProfiles/tp159.pdf>. Acesso em 10 de novembro de 2019, às 22h.

EUA. CDC (Centers for Disease Control and Prevention). Third National Report on Human Exposure to Environmental Chemicals. National Center for Environmental Health, **Centers for Disease Control and Prevention**, Atlanta, Georgia, USA, 2005. Disponível em: https://www.jhsph.edu/research/centers-and-institutes/center-for-excellence-in-environmental-healthtracking/Third_Report.pdf. Acesso em 20 de novembro de 2018, às 13h.

EUA. TOXICOLOGICAL PROFILE FOR BARIUM AND BARIUM COMPOUNDS. U.S. DEPARTMENT OF HEALTH AND HUMAN SERVICES, Public Health Service, **Agency for Toxic Substances and Disease Registry (ATSDR)**, 2007. Disponível em: <https://www.atsdr.cdc.gov/ToxProfiles/tp24.pdf>. Acesso em 10 de novembro de 2019, às 22h.

EUA. CDC (Centers for Disease Control). About the National Health and Nutrition Examination Survey. National Center for Environmental Health, **Centers for Disease Control and Prevention**, Atlanta, Georgia, USA, 2014. Disponível em: https://www.cdc.gov/nchs/nhanes/about_nhanes.htm. Acesso em 20 de novembro de 2018, às 15h.

EUA. ATSDR's Substance Priority List. Division of Toxicology and Human Health Sciences, **ATSDR (Agency for Toxic Substances and Disease Registry)**, Atlanta, Georgia, USA, 2017. Disponível em: <https://www.atsdr.cdc.gov/spl/index.html#2017spl>. Acesso em 22 de novembro de 2018, às 17h.

FIEVE, R. R. et al. Rubidium: biochemical, behavioral, and metabolic studies in humans. **American Journal of Psychiatry**, v. 130, n. 1, p. 55-61, 1973.

FLEMMING, C. A.; TREVORS, J. T. Copper toxicity and chemistry in the environment: a review. **Water, Air, and Soil Pollution**, v. 44, n. 1-2, p. 143-158, 1989.

FLORA, G.; GUPTA, D.; TIWARI, A. Toxicity of lead: a review with recent updates. **Interdisciplinary toxicology**, v. 5, n. 2, p. 47-58, 2012.

GAETKE, L. M.; CHOW, C. K. Copper toxicity, oxidative stress, and antioxidant nutrients. **Toxicology**, v. 189, n. 1-2, p. 147-163, 2003.

GALVÁN-ARZATE, S.; SANTAMARÍA, A. Thallium toxicity. **Toxicology letters**, v. 99, n. 1, p. 1-13, 1998.

GORDON, M. F. et al. Bismuth subsalicylate toxicity as a cause of prolonged encephalopathy with myoclonus. **Movement disorders: official journal of the Movement Disorder Society**, v. 10, n. 2, p. 220-222, 1995.

GOULLÉ, J. P. et al. Metal and metalloid multi-elementary ICP-MS validation in whole blood, plasma, urine and hair: Reference values. **Forensic science international**, v. 153, n. 1, p. 39-44, 2005.

GOUVEIA, N. et al. Projeto-piloto do Primeiro Inquérito Nacional de Populações Expostas a Substâncias Químicas, 2008-2009. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**, v. 23, p. 553-558, 2014.

GRANDJEAN, E. M.; AUBRY, J M. Lithium: updated human knowledge using an evidence-based approach. **CNS drugs**, v. 23, n. 5, p. 397-418, 2009.

GRÜNER, N.; STAMBOULI, O.; ROSS, R. S. Dried blood spots-preparing and processing for use in immunoassays and in molecular techniques. **JoVE (Journal of Visualized Experiments)**, n. 97, p. e52619, 2015.

GUPTA, K.; MAHAJAN, R. Applications and diagnostic potential of dried blood spots. **International Journal of Applied and Basic Medical Research**, v. 8, n. 1, 2018.

GUTHRIE, R.; SUSI, A. A simple phenylalanine method for detecting phenylketonuria in large populations of newborn infants. **Pediatrics**, v. 32, n. 3, p. 338-343, 1963.

HARARI, F. et al. Environmental exposure to lithium during pregnancy and fetal size: a longitudinal study in the Argentinean Andes. **Environment international**, v. 77, p. 48-54, 2015.

HEITLAND, P.; KÖSTER, H. D. Biomonitoring of 37 trace elements in blood samples from inhabitants of northern Germany by ICP–MS. **Journal of Trace Elements in Medicine and Biology**, v. 20, n. 4, p. 253-262, 2006.

HOFFMAN, H. N.; PHYLIKY, R.; FLEMING, C. R. Zinc-induced copper deficiency. **Gastroenterology**, v. 94, n. 2, p. 508-512, 1988.

HOFFMAN, R. S. Thallium toxicity and the role of Prussian blue in therapy. **Toxicological reviews**, v. 22, n. 1, p. 29-40, 2003.

HURLEY, L. S.; KEEN, C. L. Manganese In **Trace Elements in Human Health and Animal Nutrition**, Academic Press, New York, pp. 185-225, 1987.

JAISER, S. R.; WINSTON, G. P. Copper deficiency myelopathy. **Journal of neurology**, v. 257, n. 6, p. 869-881, 2010.

JOAS, A. et al. Human biomonitoring: Science and policy for a healthy future, April 17–19, 2016, Berlin, Germany. **International journal of hygiene and environmental health**, v. 220, n. 2, p. 299-304, 2017.

JOHN, H. et al. Procedures for analysis of dried plasma using microsampling devices to detect sulfur mustard-albumin adducts for verification of poisoning. **Analytical chemistry**, v. 88, n. 17, p. 8787-8794, 2016.

JOHNSON, G. T. In HARBISON, R. D.; BOURGEOIS, M. M.; JOHNSON, G. T. (Ed.). SECTION II: METALS AND METALLOIDS. 38: ZINC. **Hamilton and Hardy's industrial toxicology**, John Wiley & Sons, ed. 6, p. 277-281, 2015.

JOHRI, N.; JACQUILLET, G.; UNWIN, R. Heavy metal poisoning: the effects of cadmium on the kidney. **Biometals**, v. 23, n. 5, p. 783-792, 2010.

JONMAIRE, P. In HARBISON, R. D.; BOURGEOIS, M. M.; JOHNSON, G. T. (Ed.). SECTION II: METALS AND METALLOIDS. 10: BISMUTH AND RELATED COMPOUNDS. **Hamilton and Hardy's industrial toxicology**, John Wiley & Sons, ed. 6, p. 57-62, 2015.

JOSEPHS, K. A. et al. Neurologic manifestations in welders with pallidal MRI T1 hyperintensity. **Neurology**, v. 64, n. 12, p. 2033-2039, 2005.

KABACS, N. et al. Lithium in drinking water and suicide rates across the East of England. **The British Journal of Psychiatry**, v. 198, n. 5, p. 406-407, 2011.

KAPUSTA, N. D. et al. Lithium in drinking water and suicide mortality. **The British Journal of Psychiatry**, v. 198, n. 5, p. 346-350, 2011.

KESEL, P. M. M et al. Hemato-critical issues in quantitative analysis of dried blood spots: challenges and solutions. **Bioanalysis**, v. 5, n. 16, p. 2023-2041, 2013.

KESEL, P. M. M. et al. Current strategies for coping with the hematocrit problem in dried blood spot analysis. **Bioanalysis**, v. 6, n. 14, p. 1871-1874, 2014.

KIELISZEK, M; BŁAŻEJAK, S. Selenium: significance, and outlook for supplementation. **Nutrition**, v. 29, n. 5, p. 713-718, 2013.

KIP, A. E. et al. Volumetric absorptive microsampling (VAMS) as an alternative to conventional dried blood spots in the quantification of miltefosine in dried blood

samples. **Journal of pharmaceutical and biomedical analysis**, v. 135, p. 160-166, 2017.

KOK, M. G. M.; FILLET, M. Volumetric absorptive microsampling: current advances and applications. **Journal of pharmaceutical and biomedical analysis**, v. 147, p. 288-296, 2018.

LEMIRE, M. et al. Elevated levels of selenium in the typical diet of Amazonian riverside populations. **Science of the total environment**, v. 408, n. 19, p. 4076-4084, 2010.

LEYSSENS, L. et al. Cobalt toxicity in humans—A review of the potential sources and systemic health effects. **Toxicology**, v. 387, p. 43-56, 2017.

LI, W.; TSE, F. L.S. Dried blood spot sampling in combination with LC-MS/MS for quantitative analysis of small molecules. **Biomedical Chromatography**, v. 24, n. 1, p. 49-65, 2010.

LIMA, V. F.; MERÇON, F. Metais pesados no ensino de química. **Química nova na escola**, v. 33, n. 4, p. 199-205, 2011.

LISON, D. In NORDBERG, G. F.; FOWLER, B. A.; NORDBERG, M (Ed). Chapter 34 Cobalt. **Handbook on the Toxicology of Metals, Academic press, Elsevier**, ed. 4, v. 1, p. 743-763, 2014.

LOPES, A. A. et al. Blood reference values for metals in a general adult population in southern Brazil. **Environmental research**, v. 177, 2019.

LUCKIT, J. et al. Thrombocytopenia associated with thallium poisoning. **Human & experimental toxicology**, v. 9, n. 1, p. 47-48, 1990.

LUO, Y. et al. Evaluation of two blood microsampling approaches for drug discovery PK studies in rats. **Bioanalysis**, v. 7, n. 18, p. 2345-2359, 2015.

MANDAL, B.; OGRA, Y.; SUZUKI, K. T. Identification of dimethylarsinous and monomethylarsonous acids in human urine of the arsenic-affected areas in West Bengal, India. **Chemical research in toxicology**, v. 14, n. 4, p. 371-378, 2001.

MARAHATTA, A. et al. Stable-Isotope Dilution HPLC–Electrospray Ionization Tandem Mass Spectrometry Method for Quantifying Hydroxyurea in Dried Blood Samples. **Clinical chemistry**, v. 62, n. 12, p. 1593-1601, 2016.

MARCHISET-FERLAY, N.; SAVANOVITCH, C.; SAUVANT-ROCHAT, M.P. What is the best biomarker to assess arsenic exposure via drinking water?. **Environment international**, v. 39, n. 1, p. 150-171, 2012.

MARET, W. The metals in the biological periodic system of the elements: concepts and conjectures. **International journal of molecular sciences**, v. 17, n. 1, p. 66, 2016.

MCDADE, T. W.; WILLIAMS, S.; SNODGRASS, J. J. What a drop can do: dried blood spots as a minimally invasive method for integrating biomarkers into population-based research. **Demography**, v. 44, n. 4, p. 899-925, 2007.

MELTZER, H. L. A pharmacokinetic analysis of long-term administration of rubidium chloride. **The Journal of Clinical Pharmacology**, v. 31, n. 2, p. 179-184, 1991.

MERCOLINI, L. et al. LC–MS/MS and volumetric absorptive microsampling for quantitative bioanalysis of cathinone analogues in dried urine, plasma and oral fluid samples. **Journal of pharmaceutical and biomedical analysis**, v. 123, p. 186-194, 2016.

MIRÓ, C. et al. Caesium-137 and Strontium-90 temporal series in the Tagus River: experimental results and a modelling study. **Journal of environmental radioactivity**, v. 113, p. 21-31, 2012.

MOORE, B. In memory of Sidney Ringer [1835-1910]: some account of the fundamental discoveries of the great pioneer of the bio-chemistry of crystallo-colloids in living cells. **Biochemical Journal**, v. 5, n. 6-7, p. i. b3, 1911.

NATIONAL RESEARCH COUNCIL. OTHERS MINERALS. **Mineral tolerance of animals**. National Academies Press, v.2, p.;434,435, 2005.

NIELSEN, F. H. Trace elements. **Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition**, p. 5820-5828, 2003.

NIELSEN, S. P. The biological role of strontium. **Bone**, v. 35, n. 3, p. 583-588, 2004.

NIELSEN, F. H. Magnesium deficiency and increased inflammation: current perspectives. **Journal of inflammation research**, v. 11, p. 25, 2018.

NISSE, C. et al. Blood and urinary levels of metals and metalloids in the general adult population of Northern France: The IMEPOGE study, 2008–2010. **International journal of hygiene and environmental health**, v. 220, n. 2, p. 341-363, 2017.

NORDBERG, G. F.; FOWLER, B. A.; NORDBERG, M. Chapter 1 Toxicology of Metals: Overview, Definitions, Concepts, and Trends. **Handbook on the Toxicology of Metals, Academic press, Elsevier**, ed. 4, v. 1, p. 3-14, 2014.

NUNES, J. A. et al. A simple method based on ICP-MS for estimation of background levels of arsenic, cadmium, copper, manganese, nickel, lead, and selenium in blood of the Brazilian population. **Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A**, v. 73, n. 13-14, p. 878-887, 2010.

O'DELL, B. L.; SUNDE, R. A. Handbook of nutritionally essential mineral elements. **New York: Marcel Dekker Inc**, p. 493–556, 1997.

PASSOS, C. J. S. et al. Daily mercury intake in fish-eating populations in the Brazilian Amazon. **Journal of Exposure Science and Environmental Epidemiology**, v. 18, n. 1, p. 76, 2008.

PAUSTENBACH, D. J. et al. A review of the health hazards posed by cobalt. **Critical reviews in toxicology**, v. 43, n. 4, p. 316-362, 2013.

PRASAD, A. S. Zinc deficiency in women, infants and children. **Journal of the American College of Nutrition**, v. 15, n. 2, p. 113-120, 1996.

PROTTI, M. et al. Dried haematic microsamples and LC–MS/MS for the analysis of natural and synthetic cannabinoids. **Journal of Chromatography B**, v. 1044, p. 77-86, 2017.

PROTTI, M. et al. Determination of oxycodone and its major metabolites in haematic and urinary matrices: Comparison of traditional and miniaturised sampling approaches. **Journal of pharmaceutical and biomedical analysis**, v. 152, p. 204-214, 2018.

PRUEITT, R. L.; GOODMAN, J. E. In HARBISON, R. D.; BOURGEOIS, M. M.; JOHNSON, G. T. SECTION II: METALS AND METALLOIDS. 25: NICKEL. **Hamilton and Hardy's industrial toxicology**, John Wiley & Sons, ed. 6, p. 173-182, 2015.

QU, X. et al. Magnesium and the risk of cardiovascular events: a meta-analysis of prospective cohort studies. **PloS one**, v. 8, n. 3, 2013.

RATNAIKE, R. Acute and chronic arsenic toxicity. **Postgraduate medical journal**, v. 79, n. 933, p. 391-396, 2003.

RAYMAN, M. P. The importance of selenium to human health. **The lancet**, v. 356, n. 9225, p. 233-241, 2000.

RESANO, M. et al. Dried matrix spots and clinical elemental analysis. Current status, difficulties, and opportunities. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 99, p. 75-87, 2018.

RUDE, R. K. Magnesium depletion and hypermagnesemia. **Primer on the metabolic bone diseases and dis-orders of mineral metabolism. Hoboken (NJ): Wiley**, p. 325-8, 2009.

SANDSTEAD, H. H. Requirements and toxicity of essential trace elements, illustrated by zinc and copper. **The American journal of clinical nutrition**, v. 61, n. 3, p. 621-624, 1995.

SCHULZ, C. et al. The German human biomonitoring commission. **International journal of hygiene and environmental health**, v. 210, n. 3-4, p. 373-382, 2007.

SEGURA, F. R. et al. Potential risks of the residue from Samarco's mine dam burst (Bento Rodrigues, Brazil). **Environmental pollution**, v. 218, p. 813-825, 2016.

SHAHWAN, T.; ERTEN, H. N. Thermodynamic parameters of Cs⁺ sorption on natural clays. **Journal of radioanalytical and nuclear chemistry**, v. 253, n. 1, p. 115-120, 2002.

SONG, Y.; LI, A. Massive elemental mercury ingestion. **Clinical toxicology**, v. 45, n. 2, p. 193-193, 2007.

SOWA-KUĆMA, M. et al. Zinc, magnesium and NMDA receptor alterations in the hippocampus of suicide victims. **Journal of affective disorders**, v. 151, n. 3, p. 924-931, 2013.

SPALLHOLZ, J. E.; BOYLAN, L.; LARSEN, H. S. Advances in understanding selenium's role in the immune system. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 587, n. 1, p. 123-139, 1990.

SPERLING, M.; KARST, U. Metallomics: an emerging interdisciplinary Science. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 405, p. 1789–1790. 2013.

SPOONER, N. et al. A device for dried blood microsampling in quantitative bioanalysis: overcoming the issues associated blood hematocrit. **Bioanalysis**, v. 7, n. 6, p. 653-659, 2015.

SIMÕES, S. M. S. S. DBS – “*Dried Blood Spots*”: estudo sobre a sua aplicação na área da Toxicologia Forense. 2016. **Dissertação Mestrado em Medicina Legal e Ciências Forenses**. Universidade de Lisboa, Lisboa, Portugal.

SIMONSEN, L. O.; HARBAK, H.; BENNEKOU, P. Cobalt metabolism and toxicology—a brief update. **Science of the Total Environment**, v. 432, p. 210-215, 2012.

SLIKKERVEER, A.; DE WOLFF, F. A. Pharmacokinetics and toxicity of bismuth compounds. **Medical toxicology and adverse drug experience**, v. 4, n. 5, p. 303-323, 1989.

STEPHEN, F. D. In HARBISON, R. D.; BOURGEOIS, M. M.; JOHNSON, G. T. SECTION II: METALS AND METALLOIDS. 23: MERCURY. **Hamilton and Hardy's industrial toxicology**, John Wiley & Sons, ed. 6, p. 159-161, 2015.

SUGAWARA, N. et al. Lithium in tap water and suicide mortality in Japan. **International journal of environmental research and public health**, v. 10, n. 11, p. 6044-6048, 2013.

TAMAKI, S.; FRANKENBERGER, W. T. Environmental biochemistry of arsenic. In: **Reviews of environmental contamination and toxicology**. Springer, New York, NY, p. 79-110, 1992.

TAO, H et al. Inconceivable hypokalemia: a case report of acute severe barium chloride poisoning. **Case reports in medicine**, v. 2016, p. 1-4, 2016.

TINKLE, S. S. et al. Skin as a route of exposure and sensitization in chronic beryllium disease. **Environmental health perspectives**, v. 111, n. 9, p. 1202-1208, 2003.

TRETZEL, L. et al. Dried blood spots (DBS) in doping controls: a complementary matrix for improved in-and out-of-competition sports drug testing strategies. **Analytical Methods**, v. 7, n. 18, p. 7596-7605, 2015.

UAUY, R.; OLIVARES, M.; GONZALEZ, M. Essentiality of copper in humans. **The American journal of clinical nutrition**, v. 67, n. 5, p. 952-959, 1998.

VALDIGLESIAS, V. et al. *In vitro* evaluation of selenium genotoxic, cytotoxic, and protective effects: a review. **Archives of toxicology**, v. 84, n. 5, p. 337-351, 2010.

WANI, A. L.; ARA, A.; USMANI, J. A. Lead toxicity: a review. **Interdisciplinary toxicology**, v. 8, n. 2, p. 55-64, 2015.

WHO. Trace elements in human nutrition and health. **WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO)**, 1996. Disponível em: <https://www.who.int/nutrition/publications/micronutrients/9241561734/en/>. Acesso em 10 de outubro de 2019, às 13h.

WHO. Zinc in Drinking Water: Background Document for Development of WHO Guidelines for Drinking-Water Quality. **World Health Organization (WHO)**, p. 1-10, 2003. Disponível em: https://www.who.int/water_sanitation_health/dwq/chemicals/zinc.pdf. Acesso em 15 de outubro de 2019, às 20h.

YANG, G. et al. Endemic selenium intoxication of humans in China. **The American journal of clinical nutrition**, v. 37, n. 5, p. 872-881, 1983.

YANG, G. et al. Selenium-related endemic diseases and the daily selenium requirement of humans. **World review of nutrition and diet**, v. 55, p. 98-152 1988.

ZALDIVAR, R. High lithium concentrations in drinking water and plasma of exposed subjects. **Archives of toxicology**, v. 46, n. 3, p. 319-320, 1980.