UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO-USP

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

Desenvolvimento de método para determinação de Ag, As, Cd, Co, Mn, Ni, Pb e Se em sangue por espectrometria de massas com fonte de plasma acoplado indutivamente (ICP-MS) utilizando diluição das amostras em meio alcalino

JULIANA ANDRADE NUNES

Ribeirão Preto
2009

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO-USP

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

Desenvolvimento de método para determinação de Ag, As, Cd, Co, Mn, Ni, Pb e Se em sangue por espectrometria de massas com fonte de plasma acoplado indutivamente (ICP-MS) utilizando diluição das amostras em meio alcalino

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

Área de Concentração: Toxicologia

JULIANA ANDRADE NUNES

Orientador: Prof. Dr. FERNANDO BARBOSA JÚNIOR

Ribeirão Preto
2009

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.

Ficha Catalográfica

Nunes, Juliana Andrade

Desenvolvimento de método para determinação de Ag, As, Cd, Co, Mn, Ni, Pb e Se em sangue por espectrometria de massas com fonte de plasma acoplado indutivamente (ICP-MS) utilizando diluição das amostras em meio alcalino
Ribeirão Preto, 2009. p 77 il; 30 cm.

Dissertação de Mestrado, apresentada à Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP- Area de concentração Toxicologia.

Orientador: Prof. Dr. Fernando Barbosa Júnior

1. ICP-MS 2. Sangue 3. Preparo de amostras 4. TMAH

FOLHA DE APROVAÇÃO

Juliana Andrade Nunes

Desenvolvimento de método para determinação de Ag, As, Cd, Co, Mn, Ni, Pb e Se em sangue por espectrometria de massas com fonte de plasma acoplado indutivamente (ICP-MS) utilizando diluição das amostras em meio alcalino.

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

Área de Concentração: Toxicologia

Orientador: Prof. Dr. Fernando Barbosa Júnior

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____Assinatura:_____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____Assinatura:_____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____Assinatura:_____

DEDICATÓRIA

À Deus, fonte de vida e sabedoria.
Aos meus pais, João Batista e Rita
Maria pelo incentivo confiança, amor e
por me darem o alicencer neceesário
em toda caminhada.

AMO VOCÊS

DEDICATÓRIA

Aos Meus queridos irmãos, João Carlos
e Fabiana pela amizade, carinho e
alegrias que me proporcionaram em
todos os momentos de minha vida.
À minha doce e carinhosa Avó Lourdes
e à Tia Crisitina pelos exemplos de vida
e palavras de sabedoria que
auxiliaram.

AMO VOCÊS

AGRADECIMENTOS

*Ao meu orientador, **Prof. Dr. Fernando Barbosa Junior** pela paciência, incentivo e por partilhar de seus conhecimentos, contribuindo de forma inestimável para concretização deste trabalho e também para minha formação acadêmica.*

*À **Profa Dra Márcia Mesquita** sempre presente com seus ensinamentos fundamentais à realização deste projeto.*

*Aos meus colegas e amigos de Pós-Graduação, **Bruno, Denise, Fabiana, Gustavo, Jairo, Juliana, Kátia e Samuel** pelo companherismo e amizade que levarei por toda a vida em especial ao **Jairo, Bruno** e **Samuel** pela ajuda e por toda troca de conhecimento, importantes durante a execução deste trabalho.*

*À técnica do laboratório e amiga, **Vanessa** pela atenção e disponibilidade para ajudar seja nas análises ou com palavras de incentivo.*

*Ao **Prof. Dr. José Anchieta Gomes** Neto pelas análises de amostras de sangue por GF AAS.*

*Aos amigos de hoje e sempre, **Daniel, Daniela, Juliana e Michelle** por dividirem comigo minhas alegrias e minhas tristezas.*

*Ao **Eduardo** por sempre me incentivar e me apoiar, sendo peça fundamental para meu crescimento pessoal e profissional.*

*A todos os meus familiares **tios, tias, primos** e **prima**s pelo carinho e por estarem sempre presentes*

*A todos os **funcionários da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto** que contribuíram direta ou indiretamente para a realização deste trabalho em especial às funcionárias da Pós-graduação **Ana Lúcia e Rosana**, pelo carinho e por todo auxílio durante esse dois anos.*

*À **FAPESP** pelo apoio financeiro.*

"Ainda que eu falasse as línguas dos homens e dos anjos, se nao tiver amor, sou como o bronze que soa, ou como um címbalo que tine. Mesmo que eu tivesse o dom da profecia e conhecesse todos os mistérios e toda a ciência; e tivesse toda a fé, a ponto de remover montanhas, se não tiver amor, não sou nada. E ainda, que distribuísse todos os meus bens em sustento dos pobres e entregasse o meu corpo para ser queimado, se não tiver amor, de nada valeria."

São Paulo de Tarso (I cor 13, 1-3)

RESUMO

NUNES, J. A., **Desenvolvimento de método para determinação de Ag, As, Cd, Co, Mn, Ni, Pb e Se em sangue por espectrometria de massas com fonte de plasma acoplado indutivamente (ICP-MS) utilizando diluição das amostras em meio alcalino.** 2009. 77f, Dissertação (mestrado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto-Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2009.

A técnica analítica mais utilizada para o monitoramento de exposição a metais tóxicos ou para avaliação de deficiência a elementos essenciais é a espectrometria de absorção atômica chama (FAAS) ou com forno de grafite (GF AAS). Entretanto, cada vez mais os laboratórios de pesquisa na área clínica estão mudando seus métodos de análise, baseados nestas técnicas, para a utilização da espectrometria de massas com plasma acoplado (ICP-MS). Isso vem acontecendo porque o ICP-MS permite a determinação de elementos químicos, em diversas matrizes, numa ampla faixa de concentração (ng L^{-1} a mg L^{-1}), além de possibilitar alta rapidez de análise, capacidade multielementar e limites de detecção menores que outras técnicas analíticas. Uma das principais características do método a ser utilizado para a análise de elementos químicos em rotina por ICP-MS é que ele seja rápido, com o mínimo de manipulação da amostra. Neste sentido, métodos que propõem a análise direta de amostra são mais atrativos. Todavia, ainda é limitado o número de métodos que propõem análise direta de fluidos biológicos por ICP-MS. Neste sentido, o presente trabalho teve como objetivo o desenvolvimento de um método para análise direta de sangue por ICP-MS para determinação de Ag, As, Cd, Co, Mn, Ni, Pb e Se. Para isso, amostras de sangue (200 µL) foram misturadas com 500 µL de hidróxido de tetrametilamônio (TMAH) (10% v/v) e incubadas por 10 minutos. Posteriormente, a solução resultante foi diluída para 10 mL com uma solução contendo 0,05% m/v EDTA; 0,005% v/v Triton® X-100. Em seguida, as amostras foram analisadas diretamente por ICP-MS (ELAN DRC II). Ródio (Rh) foi usado como padrão interno e a calibração das amostras foi feita por meio de ajuste de matriz com sangue base ovino. Os limites de detecção (LD) do método foram de 0,008; 0,02; 0,004; 0,009; 0,003; 0,09; 0,04; 0,1 µg L^{-1} para Ag, As, Cd, Co, Mn, Ni, Pb and Se, respectivamente. A validação dos resultados foi realizada com análise de um material de referência de sangue do Programa de Proficiência do *Institut National de Santé Publique du Quebec*, no Canadá. Validação adicional foi obtida pela comparação dos resultados obtidos pela análise de 20 amostras de sangue pelo método proposto e pela técnica de GF AAS. O método foi também comparado a outros dois existentes na literatura e comumente utilizados em laboratórios dos Estados Unidos e Suécia, apresentando limites de detecção comparáveis ou melhores e melhores exatidão e precisão.

Palavras Chaves: ICP-MS, amostra de sangue, método de preparo, TMAH

ABSTRACT

NUNES, J. A., **Development of a high-throughput method for assessment of Ag, As, Cd, Co, Mn, Ni, Pb and Se in blood samples by inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS)**, 2009. 77f, Dissertação (mestrado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto- Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2009.

The most used analytical technique for monitoring the exposure to toxic metals or for the assessment of the deficiency of essentials elements is the atomic absorption spectrometry with flame (FAAS) or graphite furnace (GF AAS). However, more and more clinical laboratories are changing their methods of analysis, based on this technique, to methods using inductively coupled plasma-mass spectrometry (ICP-MS). It occurs because ICP-MS allows the determination of chemical elements in various types of samples, at concentrations in a wide linear range (ng L^{-1} to mg L^{-1}), providing high-throughput analysis with multielemental capability with lower detection limits. However, for routine porpuses the method of choice must be fast with minimal sample manipulation.On the other hand, the number of methods proposing direct introduction of biological fluids to the ICP-MS are still limited. This work aimed the development of a method for the direct analysis of blood samples by ICP-MS for the determination of Ag, As, Cd, Co, Mn, Ni, Pb and Se. For this, blood samples (200 µL) were mixed with 500 µL of tetramethylammonium hydroxide (TMAH) (10% v/v) and left at room temperature during 10 minutes. Subsequently, the resulting solution was diluted to 10 mL with a solution containing 0.05% m/v EDTA + 0005% v / v Triton ® X-100. Thus the samples were analyzed directly by ICP-MS (ELAN DRC II). Rhodium (Rh) was used as internal standard with matrix matching calibration. The method detection limits were: 0.008, 0.02, 0.004, 0.009, 0.003, 0.09, 0.04, 0.1 µg L^{-1} for Ag, As, Cd, Co, Mn, Ni , Pb, and Se respectively. Method validation was acquired with the analysis of blood reference material provided by the *Institut National de Santé Publique* du Quebec, Canada. Furthermore, for additional validation 20 ordinary blood samples were analyzed by the proposed method and by GF AAS. The method was also compared with two existing methods in the literature and commonly used in laboratories in the United States and Sweden where comparable or better detection limits and better accuracy and precision were obtained.

Key Words: ICP-MS, blood samples, prepare method, TMAH.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1: Esquema de um espectrômetro de massas com fonte de plasma acoplado indutivamente (ICP-MS)..... 13

Figura 2: Sistema de introdução de amostra em ICP-MS 14

Figura 3: Representação dos processos que ocorrem no plasma..... 15

Figura 4: Esquema de uma tocha..... 16

Figura 5: Configuração do cone de amostragem..... 17

Figura 6: Esquema de um analisador de massas quadrupolar..... 18

Figura 7: Estudo do coeficiente de variação das medidas em diferentes dias de análise (n=10) utilizando o método proposto de preparo de amostras com TMAH... 43

Figura 8: Curvas de calibração por ajuste de matriz utilizando o método proposto . 45

Figura 9: Curvas analíticas de calibração em meio aquoso (-) e com ajuste de matriz (- -) para As, Cd e Co 47

Figura 10: Curvas analíticas de calibração em meio aquoso (-) e com ajuste de matriz (- -) para Pb, Mn e Ni..... 48

Figura 11: Curvas analíticas de calibração em meio aquoso (-) e com ajuste de matriz (- -) para Ag e Se..... 49

Figura 12: Estudo do coeficiente de variação das medidas no mesmo dia de análise (n=3) e em diferentes dias (n=10) para os métodos de Palmer et al. (a), Barany et al. (b) e o método proposto (c), para Ag e As em sangue por ICP-MS..... 52

Figura 13: Estudo do coeficiente de variação das medidas no mesmo dia de análise (n=3) e em diferentes dias (n=10) para os métodos de Palmer et al. (a), Barany et al. (b) e o método proposto (c), para Co e Cd em sangue por ICP-MS 53

Figura 14: Estudo do coeficiente de variação das medidas no mesmo dia de análise (n=3) e em diferentes dias (n=10) para os métodos de Palmer et al. (a), Barany et al. (b) e o método proposto (c), para Mn e Ni em sangue por ICP-MS 54

Figura 15. Estudo do coeficiente de variação das medidas no mesmo dia de análise (n=3) e em diferentes dias (n=10) para os métodos de Palmer et al. (a), Barany et al. (b) e o método proposto (c), para Pb e Se em sangue por ICP-MS..... 55

Figura 16: Comparação da intensidade do sinal analítico para o método proposto com a utilização de solventes orgânicos no diluente (etanol e propanol) em relação ao diluente sem adição do solvente 62

Figura 17: Comparação dos valores obtidos para Cd e Mn com as diferentes técnicas: ICP-MS *versus* ETAAS em 20 amostras de sangue humano 64

Figura 18 Comparação dos valores obtidos para Pb e Se com as diferentes técnicas: ICP-MS *versus* ETAAS em 20 amostras de sangue humano 65

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Limites de detecção dos elementos químicos. As, Al, Cd, Co, Cr, Cu, Li, Mn, Ni, Pb, Se, Tl, Zn, em plasma, pelas técnicas ICP-MS, ICP-OES, FAAS, GF AAS, e suas concentrações normais em plasma 12

Tabela 2: Principais interferentes na determinação de alguns elementos químicos por ICP-MS 20

Tabela 3: Valores de energia de ionização para os diferentes elementos químicos 28

Tabela 4: Instrumentação e parâmetros otimizados para o método proposto 33

Tabela 5: Coeficientes angulares e lineares das curvas de calibração para o método proposto 44

Tabela 6: Limites de detecção (LD) e de quantificação (LQ), para os métodos Palmer et al. (2006), Barany et al. (1997) e para o método proposto..... 51

Tabela 7: Análise do Material de Referência (ICP-07B03) por três diferentes métodos 57

Tabela 8: Avaliação da adição de solventes orgânicos (butanol e isopropanol) para determinação de Ag, As, Cd, Co, Mn, Ni, Pb e Se no material de referência de sangue (INSP ICP 07B03 e INSP ICP 07B06) 59

Tabela 9: Avaliação da adição de solventes orgânicos (etanol e metanol) para determinação de Ag, As, Cd, Co, Mn, Ni, Pb e Se no material de referência de sangue (INSP ICP 07B03 e INSP ICP 07B06) 60

Tabela 10. Análise do material de referência de sangue (INSP ICP 07B03 e ICP 07B06) com o método proposto sem a utilização dos solventes orgânicos no diluente 61

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

µg Micrograma(s).

µL Microlitros(s).

ABNT Associação Brasileira de Normas Técnicas.

ANVISA Agência Nacional de Vigilância Sanitária.

CA Corrente Alternada.

CC-ICP-MS Espectrometria de massas com fonte de plasma acoplado indutivamente equipado com cela de colisão.

CDC Centro de Controle e Prevenção de Doenças dos Estados Unidos.

CV Coeficiente de Variação.

DMA Dimetil Arsênio.

DRC-ICP-MS Espectrometria de massas com fonte de plasma acoplado indutivamente equipado com cela de reação dinâmica.

EDL Lâmpada de descarga de elétrons.

EDTA Ácido etilenodiamino tetra-acético.

EPA Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos .

ETAAS Espectrometria de absorção atômica com atomização eletrotérmica.

FAAS Espectrometria de absorção atômica com chama.

FCC Fonte de corrente contínua.

FCFRP Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto.

g Grama(s).

GF AAS Espectrometria de absorção atômica com forno de grafite.

GSH Glutationa.

HCL Lâmpada de Catodo Oco.

HR-ICP-MS Espectrometria de massas com fonte de plasma acoplado indutivamente de alta resolução.

IARC Agência Internacional de Pesquisa em Câncer.

ICP OES Espectrometria de emissão optica com fonte de plasma acoplado.

ICP-MS Espectrometria de massas com fonte de plasma acoplado indutivamente.

ID-ICP-MS Espectrometria de massas com fonte de plasma acoplado indutivamente utilizando diluição isotópica.

INSP *Institut National de Santé Publique du Quebec.*

K Kelvin.

L Litro(s).

LD Limite de Detecção.

LQ Limite de Quantificação.

m/v Massa/volume.

mg Miligramas(s).

mL Mililitro(s).

MMA Monometil Arsênio.

MR Material de Referência.

NIOSH Instituto Nacional de Segurança e Saúde Ocupacional dos Estados Unidos.

ºC Graus Celsius.

R Coeficiente linear da reta.

SD Desvio Padrão.

SE Solução Estoque.

SI Solução Intermediária.

TMAH Hidróxido de tetrametil amônio.

u.m.a Unidade de Massa Atômica.

V Volts.

v/v Volume/volume.

δALAD Enzima ácido aminolevulínico dehidratase.

SUMÁRIO

1-INTRODUÇÃO 1
1.1 Biomonitoramento de Elementos Químicos Essenciais e Tóxicos 2
1.2 Importância do estudo dos elementos químicos 3
1.2.1 Elementos Químicos de alta toxicidade 4
1.2.1.1 Arsênio (As) 4
1.2.1.2 Cadmio (Cd) 5
1.2.1.3 Chumbo (Pb) 6
1.2.1.4 Níquel (Ni) 7
1.2.2 Elementos Químicos de baixa toxicidade 8
1.2.2.1 Prata (Ag) 8
1.2.3 Elementos Químicos Essenciais com potencial tóxico 9
1.2.3.1 Cobalto (Co) 9
1.2.3.2 Manganês (Mn) 9
1.2.3.3 Selênio (Se) 10
1.3 Espectrometria de massas com fonte de plasma acoplado indutivamente (ICP-MS) 11
1.3.1 Componentes do ICP-MS 13
1.3.1.1 Introdução de amostras 14
1.3.1.2 Fonte de ionização (tocha e plasma) 14
1.3.1.3 Interface 16
1.3.1.4 Analisador de massas quadrupolar 17
1.3.1.5 Sistema de detecção 18
1.3.2 Interferências em ICP-MS 18

2-REVISÃO BIBLIOGRÁFICA 22

3-OBJETIVOS 29

4-MATERIAL E MÉTODOS 31
4.1 Material 32
4.1.1 Instrumentação 32
4.1.2 Reagentes 34

4.2 Métodos 35
4.2.1 Preparo das amostras 35
4.2.1.1 Método Proposto 35
4.2.1.2 Método de Barany e colaboradores (1997) 35
4.2.1.3 Método de Palmer e colaboradores (2006) 36
4.2.1.4 Método proposto utilizando solventes orgânicos 36
4.2.1.5 Método para análise por ETAAS 37
4.3 Validação do método proposto 37
4.3.1 Curvas de calibração 37
4.3.2 Linearidade 38
4.3.3 Precisão 38
4.3.4 Exatidão 38
4.3.5 Reprodutibilidade 39
4.3.6 Limites de Detecção e Limites de Quantificação 39

5-RESULTADOS E DISCUSSÃO 40
5.1 Primeira fase do estudo 41
5.1.1 Escolha do diluente 41
5.1.2 Avaliação da concentração de EDTA 42
5.1.3 Exatidão, variação das medidas durante vários dias, limites de detecção e aplicabilidade do método 42
5.1.4 Linearidade do método 44
5.2 Segunda Fase do estudo 46
5.3 Terceira Fase do estudo 58
5.4 Quarta Fase do estudo 63

6-CONCLUSÃO 66

7-REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 68

INTRODUÇÃO

1-INTRODUÇÃO

1.1 Biomonitoramento de Elementos Químicos Essenciais e Tóxicos.

Elementos essenciais são elementos químicos utilizados para manter as funções fisiológicas normais. Na deficiência destes elementos, um organismo não pode completar seu ciclo de vida normal ou manter um crescimento saudável, já que muitos estão presentes em proteínas que exercem funções biológicas específicas. Os elementos essenciais são subdivididos de acordo com a concentração em que são encontrados em fluidos ou em tecidos. Elementos essenciais em concentrações em torno de 1 mg L^{-1} em fluidos biológicos ou < 100 mg Kg^{-1} em tecidos são chamados de elementos “maiores”. Estes incluem: sódio, potássio, cálcio, magnésio, ferro, silício, fósforo, enxofre e cloro. Já os elementos químicos encontrados em concentrações menores que 10 µg L^{-1} em fluidos biológicos ou menores que 100 mg Kg^{-1} em tecidos corporais são definidos como elementos “traço”. Ainda existe mais uma subclassificação; os chamados elementos “ultra-traço” que são encontrados em concentrações menores que 1 µg L^{-1} em fluidos biológicos.

Entretanto, alguns elementos químicos não apresentam nenhuma função fisiológica conhecida. Estes elementos são conhecidos como elementos não essenciais. Muitos deles, tais como chumbo, cádmio, mercúrio e arsênio exercem algum efeito tóxico mesmo em concentrações traço (SAVORY, WILLS 1992).

A prática de análise de fluidos biológicos para determinação das concentrações de elementos essenciais e tóxicos ao organismo, visando à avaliação do estado nutricional e/ou a exposição a elementos tóxicos está cada vez mais sendo utilizada em laboratórios clínicos. Tal prática é conhecida com biomonitoramento.

Nos últimos anos, o biomonitoramento tem se tornado uma prática comum em países desenvolvidos, sendo uma importante ferramenta para a manutenção da saúde do indivíduo e cuja concentração de um elemento em sangue pode, com freqüência, ser utilizada como um biomarcador de dose interna, uma vez que o sangue humano é a principal matriz utilizada para o biomonitoramento (NEEDHAM; CALAFAT; BARR; 2007, CLARKSON et al., 1988, BARBOSA et al., 2005, PALMER et al., 2006).

Métodos analíticos para a determinação de elementos tais como Pb, Cd, Zn, Se e Hg, estão cada vez mais bem estabelecidos e validados, e os valores de referência para estes elementos químicos estão sendo obtidos em muitos países. Entretanto, a utilização de métodos mais sensíveis e, principalmente, mais simples e rápidos é essencial para estudos de biomonitoramento (PALMER et al., 2006, HEITLAND et al., 2006, NIXON et al., 1995 NIXON et al., 2002 HEITLAND et al., 2006, RUKGAUER; KLEIN; KRUSE-JARRES, 1997, CDC, NCEH, 2003-2004).

No Brasil, o biomonitoramento ainda é uma prática incipiente. Neste sentido, existe uma necessidade crescente de se desenvolver métodos analíticos rápidos e simples que permitam operações em rotina nos laboratórios clínicos brasileiros para detecção de metais semimetais e não metais em amostras biológicas.

1.2 Importância do estudo dos elementos químicos.

O estudo da toxicidade dos elementos químicos deve levar em consideração muitas características dos grupos de toxicantes. Enquanto todos os elementos químicos são tóxicos em algum grau de exposição, muitos são nutrientes essenciais para a saúde humana. Assim, uma distinção deve ser feita entre um minímo necessário de exposição e uma exposição tóxica. Metais denominados tóxicos ou não essenciais são aqueles no qual não se conhece nenhum efeito benéfico ao organismo. Este grupo inclui arsênio, berílio, cádmio, chumbo, mercúrio, tálio, titânio e urânio (CASARETT; DOULL'S, 2001).

Os elementos químicos também podem ser classificados de acordo com o grau de toxicidade, podendo ser altamente tóxicos, onde mesmo em concentrações traço em fluidos ou em tecidos biológicos, podem exercer algum efeito tóxico (ex. arsênio, cádmio, chumbo e mercúrio). Os elementos químicos também podem ser classificados como de média e baixa toxicidade (incluindo elementos essenciais), onde concentrações maiores do metal são necessárias para gerar um efeito tóxico ex. Co, Cu, Fe, Mg, Mn, Mo, Se, Zn, Al, Bi, Ga, Au, Li, Pt, Sn, Ba, Ge, In, Ag, Te, Tl, Ti, U, V (SAVORY, 1992, CASARETT; DOULL'S, 2001).

1.2.1 Elementos Químicos de alta toxicidade

1.2.1.1 Arsênio (As)

O trióxido de arsênio é um dos mais antigos tóxicos conhecidos pelo homem, cujo efeitos e doses foram descritos no período pré-cristão, muito usado para envenenamentos. Entretanto, nos dias de hoje ainda existem relatos de homicídios relacionados ao arsênio e seus composos (SEIZE OGA 2003).

Atualmente, o arsênio inorgânico é liberado na natureza por uma série de fontes antropogênicas como fundição de chumbo, zinco e cobre, indústrias de vidro, indústrias químicas, e de praguicidas. Estudos conduzidos pela *Enviromental Protection Agency* (EPA) mostraram que em regiões não influenciadas por fundição de cobre, a concentração de arsênio no ar não ultrapassa 0,1 $\mu g\ m^{-3}$, já em regiões próximas às áreas de fundição a concentração pode exceder 1,0 $\mu g\ m^{-3}$ (CASARETT; DOULL'S 1996).

A ingestão diária de arsênio pela população varia amplamente e é influenciada pelo consumo de alimentos de origem marinha e de água contaminada (SEIZE OGA 2003). A água potável no Brasil deve conter concentrações abaixo de 10 $\mu g\ L^{-1}$ de arsênio (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2000). Acredita-se que cerca de 350.000 pessoas nos Estados Unidos bebam água com valores superiores a 50$\mu g\ L^{-1}$ de As. Concentrações superiores a 50$\mu g\ L^{-1}$ têm sido encontradas em águas de consumo em Bangladesh, China, Japão, Taiwan, Argentina (CASARETT; DOULL'S 1996).

Os compostos arsenicais são transportados pelo ar e absorvidos pelo sistema respiratório, sua absorção é dependente do tamanho da partícula e forma química. A absorção gastrintestinal se dá por alimentos e água contaminada. A biotransformação do arsênio acontece primeiro por uma reação de redução de As (V) a As(III) envolvendo possivelmente uma glutationa (GSH) e depois ocorre processo de metilação do arsênio inorgânio ao ácido monometilarsênico (MMA) e ácido dimetilarsínico (DMA). A principal via de excreção do metabólito é a urinária, porém o arsênio inorgânico tem predileção por pele, unhas e cabelo. Sua determinação em amostras de unha e cabelo pode evidenciar exposições passadas (CASARETT; DOULL'S 2001, SEIZE OGA 2003, STOTNICK et al., 2006).

O arsênio possui efeito citotóxico, tem afinidade por grupos sulfidrila interferindo na atividade de enzimas e proteínas que contenham esse grupamento,

como a glutationa. O arsênio também interfere na respiração celular por acumular-se na mitocôndria (CASARETT; DOULL'S 2001).

Ingestão de altas doses de arsênio (70 a 180mg) pode ser fatal e os sintomas de intoxicação consistem de febre, anorexia, hepatomegalia, melanose, arritmia cardíaca, problemas respiratórios e neuropatia periférica entre outros (CASARETT; DOULL'S 2001).

Os compostos de arsênio têm sido avaliados *pela International Agency for Research on Cancer* (IARC) como grupo 1 da tabela de carcinogenicidade, ou seja, são carcinógenos para humanos (Volume 84 IARC 2004).

1.2.1.2 Cádmio (Cd)

O nome cádmio foi dado a uma substância peculiar encontrada próximo ao Mar Negro, em homenagem a Cadmos rei da Fenícia. A primeira descrição dos efeitos tóxicos se deu em 1858 por Sovet (SEIZE OGA, 2003).

Cádmio é um dos mais importantes contaminantes ambientais. Ele é encontrado em atividades de metalurgia e siderurgia, em indústrias de fertilizantes, baterias, plásticos entre outros, mas sua principal emissão, na atmosfera, é causada pela incineração de lixo e combustíveis. Em 1983, foi estimada uma emissão de cerca de 7.570 toneladas de cádmio em todo o planeta. Em 1950 no Japão foram feitos os primeiros estudos associando a exposição ao cádmio por alimentos contaminados a uma doença caracterizada por osteomalácia e proteinúria. Desde então, o cádmio tornou-se um dos metais mais pesquisados em relação à exposição e efeitos adversos associados. Em 1966 ocorreram mais de 100 mortes causadas por doença óssea denominada *Itai-Itai* , na bacia de do rio Jinzo, no Japão, onde se localizava uma mina de Cádmio (SEIZE OGA 2003).

A principal fonte não ocupacional de exposição ao cádmio do ar se dá por cigarros, que contêm cerca de 1 a 2 μg deste elemento. Do total ingerido pelo ser humano por via respiratória, cerca de 15 a 30% é absorvido. A absorção por via gastrintestinal é menor (5 a 8%) e é influenciada pela ingestão de proteínas, cálcio e ferro. Após a absorção o cádmio é transportado por eritrócitos e proteínas plasmáticas, e distribuído primeiramente para o fígado e rins sendo em seguida excretado na urina (CASARETT; DOULL'S 2001).

O cádmio é um elemento nefrotóxico, pois se acumula principalmente nos rins formando um complexo com a proteína metalotioneína, desta forma diminui a

filtração glomerular levando a proteinúria e glicosúria. Neste ele pode permanecer armazenado por décadas, afetando o metabolismo e excreção do cálcio e desencadeando problemas no sistema ósseo (SEIZE OGA 2003, CASARETT; DOULL'S 2001).

Estudos em crianças determinaram valores de referência de cádmio em sangue menores que 1μg L^{-1} para crianças não expostas (CARVALHO et al., 1987).

O consumo de alimentos com altas concentrações de cádmio (>16mg L^{-1}) pode levar a dores abdominais, cólicas, náuseas e vômitos (CASARETT; DOULL'S 2001). Já a inalação de altas concentrações pode levar a distúrbios respiratórios como pneumonia ou até ser letal (ATSDR, 1998). Os principais efeitos de uma exposição crônica ao cádmio incluem doenças pulmonares, renais, cardíacas e do sistema ósseo (CASARETT; DOULL'S 2001).

O cádmio é classificado no Grupo 1 de carcinógenos da IARC, ou seja, é um elemento com potencial carcinogênico (volume 58 IARC 1997).

1.2.1.3 Chumbo (Pb)

O chumbo é um dos metais do grupo de transição mais abundantes na crosta terrestre e provavelmente é um dos contaminantes mais antigos já estudados. Evidências de exposição a este elemento químico podem ser encontradas mesmo antes do Império Romano. Nesta época, era comum armazenar alimentos e bebidas, como o vinho, em potes que continham chumbo em sua composição (EPA 1985).

Nas últimas duas décadas a concentração de chumbo na atmosfera tem diminuido significantemente, já que muitos países têm removido o chumbo tetraetila da gasolina (THOMAS et al., 1999). No entanto, os humanos podem estar expostos ao chumbo por alimentos e água de consumo contaminados, poeira doméstica e por atividades industriais como indústrias de reciclagem e indústrias de bateria (BARBOSA et al., 2005).

A absorção de chumbo por via gastrintestinal depende de fatores nutricionais e idade. Uma dieta rica em cálcio e ferro diminui a absorção de chumbo. As crianças absorvem cerca de 50% do chumbo ingerido enquanto adultos absorvem de 10% a 15%. O chumbo ingerido por exposição inalatória pode ser absorvido dependendo de seu tamanho e forma química. Uma vez absorvido, 90% do chumbo vai para os eritrócitos onde se associa com a enzima ácido aminolevulínico dehidratase (δALAD), apresentando uma meia vida biológica de 40 dias (CASARETT; DOULL'S

2001). O chumbo é distribuído para todos os órgãos por meio do sangue e do plasma, porém apresenta maior afinidade por tecidos calcificados, uma vez que substitui o cálcio dos ossos e dentes, locais onde pode ficar armazenado por décadas, podendo voltar a corrente sanguínea, durante o remodelamento ósseo. Isto dificulta um diagnóstico de exposição recente ou em longo prazo (BARBOSA et al., 2005).

Os efeitos tóxicos de exposição ao chumbo inorgânico envolvem vários órgãos e atividades bioquímicas. Vários estudos mostraram que o principal alvo toxicológico do chumbo, tanto em crianças quanto em adultos, é o sistema nervoso central, podendo levar crianças a disfunções neurológicas, incluindo a redução da capacidade intelectual mesmo em concentrações menores que 10μg dL^{-1} no sangue (BARBOSA et al., 2005, CANFIELD et al. 2003, JUSKO et al. 2007, WAKEFIELD, 2002). O chumbo interfere na síntese do Heme, levando a anemias e doenças cardiovasculares. Devido à semelhança em tamanho com o íon cálcio, o íon chumbo divalente também pode interferir no metabolismo e homeostase de cálcio e assim alterar síntese e liberação de hormônios como hormônio paratireóide, vitamina D e outros que são influenciados pela homeostase de cálcio (CASARETT; DOULL'S 2001).

O chumbo inorgânico é classificado na tabela de carcionagenicidade da IARC como 2A (provável agente carcinogênico para humanos) (volume 87 IARC 2004).

1.2.1.4 Níquel

O níquel é um metal extensivamente utilizado em indústrias de bateria, aço, utensílios domésticos, equipamentos médicos, ligas metálicas, jóias e outros (SEIZE OGA, 2003). A exposição humana pode ocorrer por inalação, ingestão e contato dérmico. A principal via de exposição ocupacional é por inalação e em menor grau via dérmica. O consumo de alimentos contaminados é a principal fonte de exposição não ocupacional. A Agência de Proteção Ambiental Americana (EPA) estima que a ingestão na população americana seja de 100 a 300μg de níquel por dia (CASARETT; DOULL'S, 2001).

Do total de níquel inalado, aproximadamente 35% é absorvido. A distribuição de níquel no organismo humano e mecanismo de ação tóxica ainda não são bem conhecidos, mas acredita-se que o níquel forme complexos com quelantes, cisteína, histidina e ácido aspártico (CASARETT; DOULL'S, 2001).

Exposições cutâneas podem levar a dermatites. A inalação de vapores contendo níquel pode levar a asma, bronquites, câncer de pulmão e outras complicações do trato respiratório (CASARETT; DOULL'S, 2001). Os valores de referência em indivíduos não expostos são menores que 5μg L^{-1} em sangue e 1 a 3 μg L^{-1} em urina. Estudos demonstram que trabalhadores expostos podem apresentar concentrações superiores a 10μg L^{-1} em urina (MASSARO, 1997, YOSHIOKA et al., 2008)

Compostos de níquel são classificados como carcinógenos pela IARC (grupo 1). Níquel metálico é classificado com possível carcinógeno grupo 2B (volume 49 IARC, 1997).

1.2.2 Elementos Químicos de baixa toxicidade

1.2.2.1 Prata (Ag)

A prata ocorre na natureza como minério de prata frequentemente associado com depósitos de ouro e cobre. Apresenta apenas uma valência (Au^{+}). A exploração de prata em minas é relatada desde 2500 anos antes de Cristo na Ásia Menor. O principal uso industrial da prata ocorre em indústrias de halogenato de prata e indústrias fotográficas. Outros usos são em jóias, moedas e utensílios domésticos. Nitrato de prata e sais de prata são utilizados como anti-sépticos e adstringentes (MASSARO, 1997, CASARETT; DOULL'S, 2001).

A prata pode ser absorvida por via oral, por inalação e pela pele. Em populações não expostas a concentração média de prata no sangue é inferior a 2,4μg L^{-1} (RUNGBY, 1990). A prata tem a capacidade de atravessar a barreira hematoencefálica se depositando nos lisossomas das células neuronais. (RUNGBY, 1990).

O principal efeito de uma absorção excessiva e uma exposição ocupacional crônica é uma impregnação local ou generalizada em tecidos onde a prata permanece como um composto fibroso insolúvel, aparecendo manchas de cor azul acinzentada (CASARETT; DOULL'S, 2001).

As concentrações em ambiente de trabalho, onde há exposição a este elemento, não podem exceder mais de 0,1 mg m^{-3} do metal e 0,01 mg m^{-3} de compostos solúveis de prata (ATSDR 2008).

1.2.3 Elementos Químicos essenciais com potencial tóxico.

1.2.3.1 Cobalto (Co)

O cobalto é um componente essencial da vitamina B_{12} requerida para a síntese de células vermelhas e prevenção de anemia perniciosa. A deficiência de cobalto pode levar a anemia, perda de peso e retardamento do crescimento. Os sais de cobalto são bem absorvidos por via oral principalmente em jejum. Cerca de 80% do cobalto ingerido é excretado na urina, sendo que, a concentração normal em sangue e urina é de 1,0 e 0,18 $\mu g\ L^{-1}$, respectivamente (CASARETT; DOULL'S, 2001).

A administração oral crônica de cobalto para tratamento de anemia em altas doses pode levar a formação de bócio endêmico. Cardiopatias também têm sido associadas à alta ingestão de cobalto (> 10mg dia^{-1}) (CASARETT; DOULL'S, 2001).

Inalação ocupacional de cobalto pode levar a problemas respiratórios e em casos de alta exposição a pneumonias e fibrose (0,1mg m^{-3}) (CASARETT; DOULL'S, 2001). A NIOSH determina, em uma jornada de trabalho de oito horas, uma exposição menor que 0,05mg m^{-3} (NIOSH, 2008).

O cobalto e seus compostos são classificados pela IARC como 2B ou seja, são possíveis carcinógenos humanos (volume 86 IARC 2003).

1.2.3.2 Manganês (Mn)

O manganês está presente em todos os organismos vivos, sendo cofator de diversas reações enzimáticas, particularmente nas que envolvem fosforilação, colesterol, e síntese de ácidos graxos. A principal enzima na qual é cofator é a superóxido dismutase (SOD) que é uma das enzimas do sistema antioxidante encontrada no citosol das células e capaz de catalisar a reação de dismutação do radical superóxido (O_2^-) em oxigênio (O_2) e peróxido de hidrogênio (H_2O_2) (CASARETT; DOULL'S, 2001, SEIZE OGA, 2003).

As principais fontes de manganês em alimentos são os grãos, nozes, algumas frutas e pimentas. A ingestão diária de manganês na população varia de 2 a 9 mg. (CASARETT; DOULL'S, 2001) Este metal também é utilizado em indústrias de fertilizante, rações animais, cerâmica, vidros e baterias. O atual interesse no estudo da toxicologia do manganês é causado pela exposição ao metal vindo da gasolina

onde é utilizado em alguns países como aditivo substituindo o uso do chumbo (CASARETT; DOULL'S, 2001).

Cerca de 5% do manganês ingerido é absorvido por via gastrintestinal. Após absorção é distribuído em todo o organismo vinculado a proteína plasmática *B_1-globulina.* O manganês se concentra na mitocôndria e em tecidos ricos nessa organela. Sua meia vida biológica é de 37 dias no organismo, especialmente no sistema nervoso. A excreção ocorre principalmente pelas fezes podendo ser reabsorvido no intestino (CASARETT; DOULL'S, 2001).

A carência de manganês pode causar fragilidade óssea, degeneração de ovários ou testículos entre outros efeitos (MASSARO, 1997, SEIZE OGA, 2003). Existem poucos casos documentados de intoxicação por ingestão de manganês. Sua principal toxicidade é causada por inalação crônica em minas, siderúrgicas e indústrias químicas de óxido de manganês. Nestes casos pode ocorrer pneumonites e/ou doenças respiratórias, além de distúrbios do sistema nervoso central como irritabilidade, dificuldade em caminhar, distúrbios da fala e comportamento compulsivo (CASARETT; DOULL'S, 2001).

1.2.3.3 Selênio (Se)

O selênio aparece na natureza e em sistemas biológicos como selenato (Se^{6+}), selenito (Se^{4+}), selênio elementar (Se^{0}) e seleneto (Se^{2-}). O selênio é um elemento essencial aos animais e está presente em alimentos tais como leite, frutas, sementes, carnes em concentrações que variam de 0,1 a 1mg Kg^{-1}, dependendo da origem do alimento (MASSARO, 1997).

Os selenatos são compostos solúveis e são prontamente absorvidos (>50%) por via gastrintestinal. As formas de selênio elementar e selenito não são absorvíveis devido à insolubilidade destas espécies. Após absorção o selênio é distribuído para todo o organismo pelos eritrócitos associado com a glutationa peroxidase e outras selenoproteínas. Sua concentração nos eritrócidos é de duas a três vezes maior que em plasma. Sua excreção é feita principalmente por via urinária (CASARETT; DOULL'S, 2001).

O selênio está envolvido com diversas enzimas de caráter antioxidante. A selenometionina e selenocisteína são ambas cofatores da glutationa peroxidase. As enzimas iodotironina deiodinase, hemeproteína que catalisa a oxidação do radical iodeto a iodo, e selenoproteina P contêm uma unidade de selenocisteína em seus

sítios catalíticos, ou seja, deficiência de selênio pode levar a hipotireoidismo e diminuição da atividade do sistema antioxidante. Além dessas alterações, a deficiência de selênio pode levar a cardiomiopatia, esterilidade, e infecções (CASARETT; DOULL'S, 2001). Em casos de deficiência de selênio as concentrações, em sangue, são inferiores a 40 µg L^{-1} (MASSARO, 1997).

Intoxicações por selênio acontecem quando há um excesso de ingestão deste elemento químico. Os primeiros sintomas são visão embaçada, diminuição de apetite, enfraquecimento de unhas e cabelo, problemas cardiorespiratórios, hálito semelhante a alho, depressão respiratória que pode progredir a óbito (CASARETT; DOULL'S, 2001).

Estudo realizado com a população amazônica demonstrou que a concentração média de Se em sangue dessa população é muito superior a outras populações, tendo uma média de 284µg L^{-1} (LEMIRE et al., 2008). Já um estudo com a população da Alemanha mostrou concentrações no sangue variando de 85 a 182 µg L^{-1} (HEITLAND; KÖSTER, 2006).

1.3 Espectrometria de massas com fonte de plasma acoplado indutivamente (ICP-MS)

Existe uma corrente tendência em torno dos laboratórios clínicos, especializados em análises de elementos químicos, de mudança nos métodos de análise baseados nas técnicas de espectrometria de absorção atômica (AAS) com chama (FAAS) ou eletrotérmica (ETAAS), para métodos baseados na espectrometria de massas com fonte de plasma acoplado (ICP-MS) (NIXON; MOYER, 2002, ZHOU et al., 2002, PALMER et al., 2006, AMARASIRIWARDENA et al., 1998). Esta transição está ocorrendo porque os equipamentos de ICP-MS têm se tornado cada vez mais acessíveis. Além disso, o ICP-MS oferece a possibilidade de análise simultânea de vários elementos químicos em concentrações inferiores a 1 µg L^{-1} de forma rápida, além de proporcionar uma ótima exatidão e precisão, tornando a técnica altamente atrativa para o biomonitoramento em rotina. Devido a sua ampla faixa linear de calibração e excelente sensibilidade, esta técnica possibilita a determinação dos elementos de interesse nutricional-toxicológico no plasma e sangue na faixa de 0,1 a 1000 µg L^{-1} de forma multielementar simultânea ou quase simultânea, com elevada taxa de amostragem (PARSONS; BARBOSA 2007).

Recentemente, Rodrigues et al. (2008) demonstraram ser possível uma análise em rotina de amostras de cabelo na qual 500 amostras foram solubilizadas e analisadas em 3 dias (8hs/dia). Cabe ressaltar ainda, que devido às baixas concentrações em fluidos biológicos, muitos elementos químicos essenciais ou tóxicos só podem ser detectados e quantificados nestas matrizes com a utilização desta técnica (BARBOSA et al., 2005, PARSONS; BARBOSA, 2007).

Na Tabela 1 podem-se observar as diferenças entre os limites de detecção médios em $\mu g\ L^{-1}$ para as técnicas de espectrometria de massas com plasmas acoplado (ICP-MS), espectrometria de emissão óptica com plasma acoplado (ICP OES), espectrometria de absorção com chama (FAAS) e forno de grafite (GF AAS) e as concentrações comumente observadas em plasma humano.

Tabela 1. Limites de detecção dos elementos químicos. As, Al, Cd, Co, Cr, Cu, Li, Mn, Ni, Pb, Se, Tl, Zn, em plasma, pelas técnicas ICP-MS, ICP-OES, FAAS, GF AAS, e suas concentrações normais em plasma (TYLER 1994).

Elemento	**ICP-MS ($\mu g\ L^{-1}$)**	**ICP OES ($\mu g\ L^{-1}$)**	**FAAS ($\mu g\ L^{-1}$)**	**GF AAS ($\mu g\ L^{-1}$)**	**Concentrações considerados normais no plasma sanguíneo ($\mu g\ L^{-1}$)**
As	0,05	20	500	1,0	< 1,0
Al	0,01	3	50	0,5	< 1,0
Cd	0,01	3	5	0,03	< 0,1
Co	0,005	10	10	0,5	< 0,3
Cr	0,005	10	10	0,15	< 0,2
Cu	0,01	5	5	0,5	<1000
Li	0,02	1	5	0,5	< 0,8
Mn	0,005	0,5	5	0,06	< 0,5
Ni	0,005	10	20	0,5	<1,0
Pb	0,005	20	20	1,0	<1,0
Se	0,1	50	1000	1,0	<100
Tl	0,01	30	40	1,5	<1,0
Zn	0,02	1,0	2	0,01	<1000

A espectrometria de massas é uma técnica analítica que permite separar espécies iônicas pela razão massa/carga (m/z). Sua capacidade de identificação é usada para íons de elementos compostos simples e moléculas complexas. É possível utilizá-la tanto em uma análise qualitativa quanto em uma análise quantitativa.

No começo dos anos 80 iniciou-se a comercialização do ICP-MS, que com o decorrer dos anos cresceu e se tornou uma das técnicas mais importantes para análise elementar. O significante crescimento de publicações científicas com a técnica se deu a partir de 1980 (MONTASER, 1998).

1.3.1 Componentes de um ICP-MS

Um espectrômetro de massas com fonte de plasma acoplado indutivamente (ICP-MS) é composto de 5 partes principais:

- Um sistema de introdução de amostras, normalmente um nebulizador.
- Uma fonte de íons, neste caso o plasma acoplado (ICP) que é uma fonte de alta temperatura que promove a ionização.
- A interface que promove a focalização dos íons, nesta se encontram o cone de amostragem e o *skimmer*.
- Um sistema analisador de massas (quadrupolo).
- E um sistema de detecção de íons (Detector multiplicador de elétrons).

A Figura 1 mostra, em detalhes um esquema de um ICP-MS convencional.

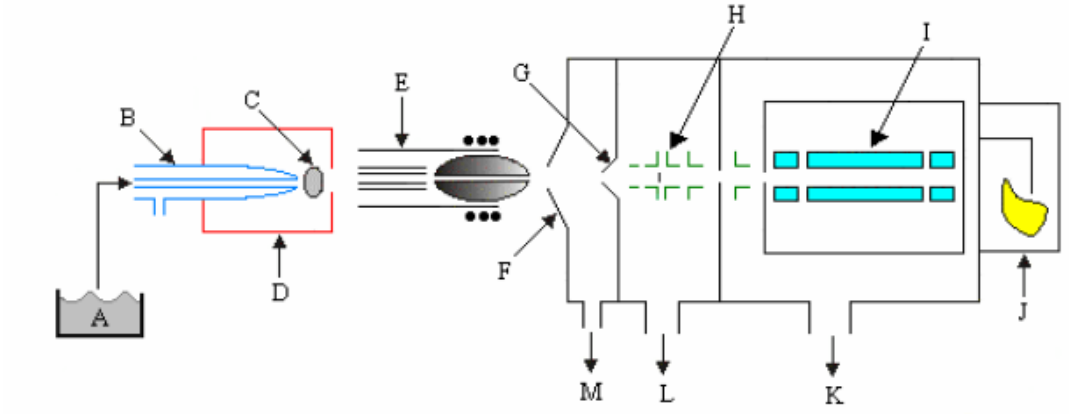


Figura 1. Esquema de um espectrômetro de massas com fonte de plasma acoplado indutivamente (ICP-MS). A) Amostra líquida. B) Nebulizador. C) Aerossol. D) Câmara de nebulização. E) Tocha F) Cone amostrador. G) *Skimmer.* H) Lentes Iônicas I) Analisador de massas, J) Detector. K) e L) Bombas de vácuo turbo-molecular. M) Bomba de vácuo mecânica (SKOOG; HOLLER; NIEMAN, 2002).

1.3.1.1 Introdução de amostras

A forma convencional de introdução de amostras no ICP-MS é como um líquido, pois apresenta vantagens de homogeneidade, facilidade de manipulação e disponibilidade de soluções de referência para calibração, mas também podem ser em alguns casos, introduzidas amostras nas formas sólidas e gasosas. O sistema típico de introdução de amostras consiste de uma bomba peristáltica, um nebulizador e uma câmara de nebulização. A amostra é bombeada até o nebulizador que transforma a amostra líquida em um aerossol fino. O aerossol chega à câmara de nebulização que separa as gotas maiores das menores e um fluxo de argônio carrega a amostra já vaporizada até a tocha do ICP, onde a amostra é ionizada (GINÉ-ROSIAS, 1999, MONTASER, 1998).

A Figura 2 mostra o esquema de um sistema de introdução de amostra.

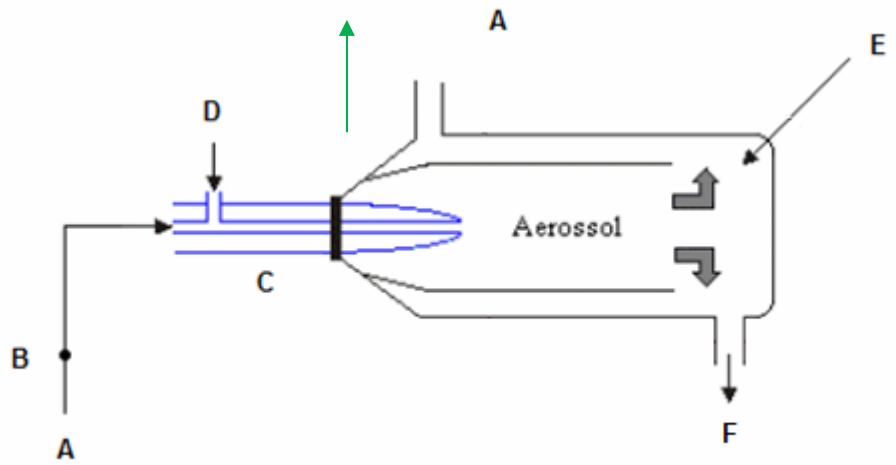


Figura 2. Sistema de introdução de amostra em ICP-MS. A) Amostra B) Bomba peristáltica. C) Nebulizador D) Gás de arraste. E) Câmara de nebulização. F) Descarte (DOS SANTOS, 2007 com modificações).

1.3.1.2. Fonte de ionização (tocha e plasma)

As características do plasma acoplado indutivamente (ICP) como uma fonte de íons tem sido largamente descrita desde 1977 por Fassel, depois em 1987 por Montaser e em 1989 por Moore (JARVIS; GRAY; HOUK, 1992).

O plasma acoplado indutivamente por ter uma alta temperatura (6000-8000K) o qual é uma fonte apropriada para a atomização e ionização de espécies

elementares. A sua formação ocorre a partir de uma radiofrequência gerada por um filamento metálico (bobina) que fica no topo da tocha. Campos elétricos e magnéticos oscilantes são gerados permitindo a excitação do elemento para formar íons (MONTASER, 1998, JARVIS; GRAY; HOUK, 1992).

O plasma é formado na tocha e nele a amostra sofre rapidamente os processos de dessolvatação, vaporização, atomização e ionização (Figura 3). A tocha consiste de três tubos concêntricos para o transporte de gás (Figura 4). O fluxo de gás externo evita o superaquecimento protegendo as paredes da tocha. O fluxo auxiliar introduzido no tubo intermediário, é utilizado para estabilizar o plasma durante a introdução de amostra. O gás interno também chamado de gás de arraste transporta a amostra nebulizada até o plasma (MONTASER, 1998).

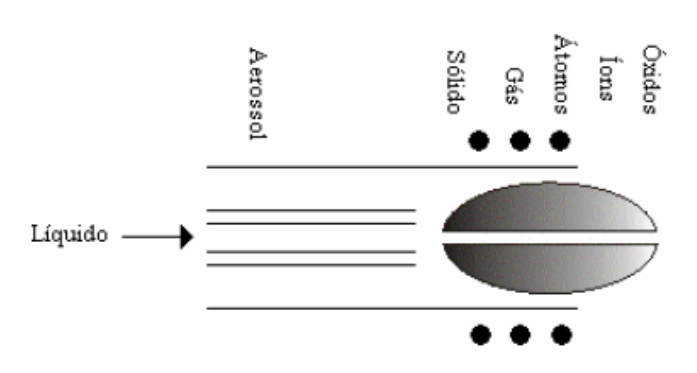


Figura 3. Representação dos processos que ocorrem no plasma (GINÉ-ROSIAS, 1999).

a)

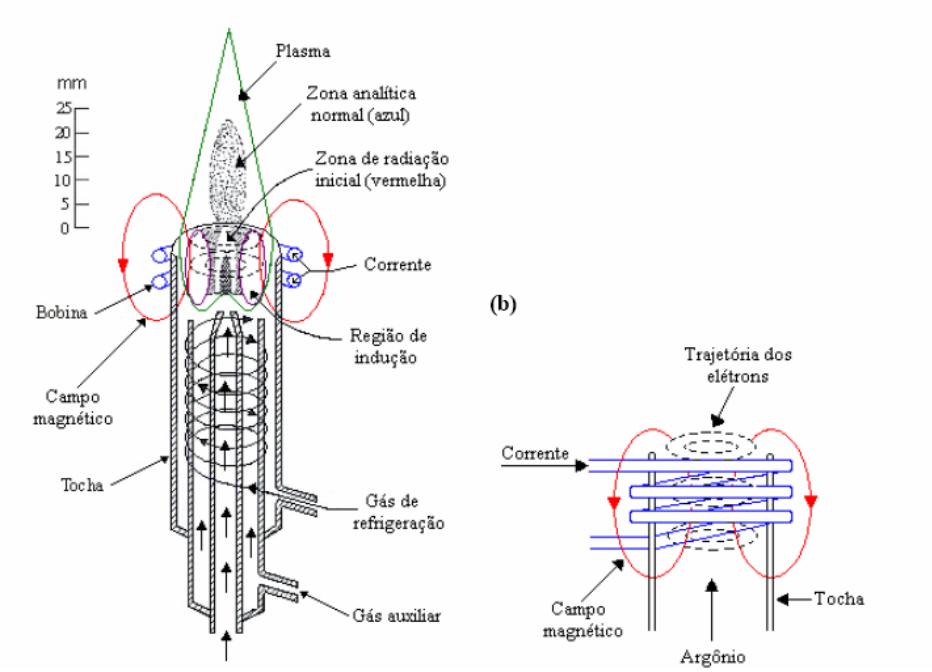


Figura 4. Esquema de uma tocha. Representação: a) Dos três tubos concêntricos, acoplados a uma bobina de indução de um gerador de RF, b) Do campo magnético (JARVIS; GRAY; HOUK, 1992).

1.3.1.3. Interface

O ICP produz, eficientemente, íons monocarregados para o espectrômetro de massas (MS). Para transportar os íons para o MS, é usada uma interface com bomba de vácuo de múltiplo estágio. Os íons são extraídos do plasma, que se encontra a um pressão atmosférica, para o espectrômetro de massas à baixa pressão, através de um cone de amostragem de platina que se encontra refrigerado. O orifício deste cone tem aproximadamente 1,0 mm de diâmetro. Na região de baixa pressão atrás do cone ocorre expansão do gás, antes, uma fração dos íons passa através de outro cone, denominado *skimmer*, e a maior parte do $Ar_{(g)}$ é bombeada para fora. Os íons são focalizados diretamente no caminho do analisador de massas usando lentes que são eletrodos submetidos a diferentes voltagens (Figura 5). Nas lentes as partículas neutras são eliminadas pelas bombas de vácuo. (JARVIS; GRAY; HOUK, 1992)

A principal função da interface é reduzir a pressão e a densidade do feixe, minimizando a perda de íons. As lentes melhoram a sensibilidade e limites de detecção instrumental. (dos SANTOS, 2007)

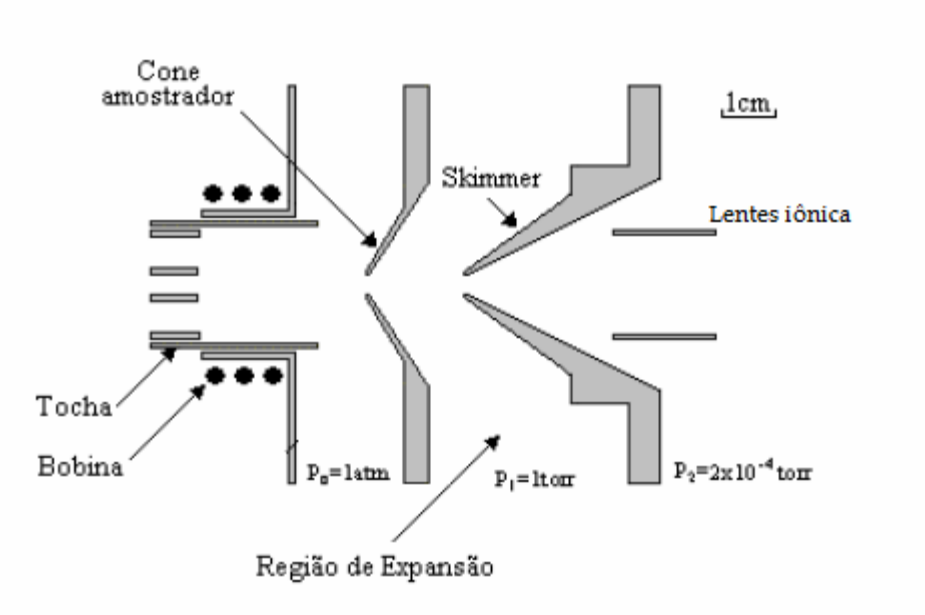


Figura 5. Configuração do cone de amostragem, do estágio de expansão e do cone skimmer (GINÉ-ROSIAS, 1999).

1.3.1.4 Analisador de massas quadrupolar:

Um analisador quadrupolar é composto por quatro hastes condutoras paralelas mantidas numa configuração duas a duas (Figura 6). As hastes opostas são conectadas eletricamente, sendo um par ligado ao lado positivo de uma fonte de corrente contínua (FCC) e outro ligado ao terminal negativo de uma fonte de corrente alternada (CA), estabelecendo assim, um campo quadrupolar bidimensional no plano x-y. Os íons que entram no espectrômetro são acelerados pelo potencial aplicado nos cilindros, de 5 a 10V, e viajam na direção z (MONTASER, 1998, SKOOG; HOLLER; NIEMAN, 2002).

A seletividade do filtro quadrupolar é estabelecida variando as magnitudes das voltagens CA e FCC simultaneamente de forma que sua razão seja mantida constante para cada par de hastes. A variação das voltagens provoca um movimento oscilatório do feixe de íons nas direções x e y. A dispersão do movimento depende da magnitude dos campos. Esta é uma propriedade da razão massa/carga (*m/z*) dos íons individuais. Portanto, íons com uma razão *m/z* específica reagirão igualmente em relação ao potencial elétrico imposto pelo arranjo quadrupolar. Normalmente, um instrumento quadrupolar consegue separar espécies que diferem por menos de uma unidade de massa (SKOOG; HOLLER; NIEMAN, 2002).

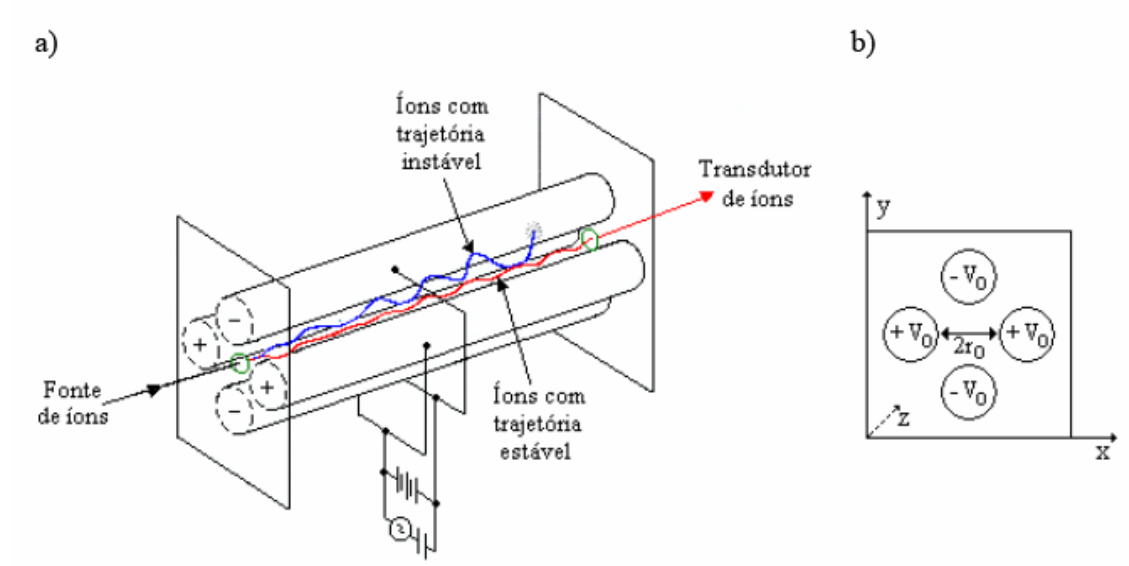


Figura 6. Esquema de um analisador de massas quadrupolar. A figura mostra também o movimento dos íons através do campo gerado entre as hastes b) vista frontal dos cilindros (SKOOG; HOLLER; NIEMAN, 2002).

1.3.1.5 Sistema de detecção

A detecção dos íons nos instrumentos mais antigos era feita com uma tela fluorescente. Hoje, as versões mais atualizadas de ICP-MS são dotadas de um sistema de detecção simultânea de íons, tais como o multiplicador de elétrons na qual os íons que atingem sua superfície ejetam elétrons que, a cada impacto, ejetam mais elétrons formando uma cascata (SKOOG; HOLLER; NIEMAN, 2002).

1.3.2 Interferências em ICP-MS

O ICP-MS não é livre de problemas, pois durante a análise os metais podem sofrer significativas interferências, as quais podem ser divididas em: interferências isobáricas, interferências de íons de dupla carga, e interferências poliatômicas.

A interferência isobárica acontece quando dois elementos possuem isótopos de mesma carga como ^{113}In e ^{113}Cd, ^{115}In e ^{115}Sn, ^{40}Ar e ^{40}Ca. Esta interferência pode ser facilmente corrigida escolhendo para análise outro isótopo livre de superposição isobárica, pois a maioria dos elementos possui mais de um isótopo (SKOOG; HOLLER; NIEMAN, 2002).

A interferência por íons de dupla carga acontece com elementos com baixo potêncial de ionização. O elemento se ioniza duas vezes formando um íon de dupla

carga (+2) e consequentemente seu espectro aparecerá com metade da massa esperada, podendo gerar perda de sinal e interferência com outros elementos. Este problema pode ser facilmente controlado aumentando a vazão do gás carregador e/ou diminuindo a potência de radio frequência (RF) (GINÉ-ROSIAS, 1999).

A interferência por íons poliatômicos acontece quando espécies presentes no plasma reagem entre si formando um novo íon. Esta interferência é uma das principais dificuldades em se trabalhar com amostras biológicas, devido a alguns interferentes como K^+, Na^+, e Cl^-, presentes nestas matrizes que podem formar íons poliatômicos tais como; $^{40}Ar^{23}Na^+$; $^{40}Ar^{35}Cl^+$, $^{35}Cl^{16}O$; $^{40}Ar^{12}C$; $^{37}Cl^{16}O_2$; $^{40}Ar^{34}S$; interferindo por exemplo, na detecção dos elementos ^{63}Cu, ^{75}As, ^{51}V, ^{52}Cr, ^{69}Ga, ^{74}Ge . Outro exemplo de interferências por íons poliatômicos pode ocorrer com os três isótopos do ferro, ^{54}Fe, ^{56}Fe, e ^{57}Fe, que sofrem interferência poliatômica com várias espécies de argônio, incluindo $^{40}Ar^{14}N^+$, $^{40}Ar^{16}O^+$, $^{40}Ar^{16}OH^+$, respectivamente (FIELD et al., 2003, MUNIZ et al.1999, TOWNSEND et al., 1998, AMASIRIWARDENA, et al., 1998).

Uma efetiva alternativa para diminuir as interferências espectrais é a utilização de um ICP-MS de alta resolução (HR-ICP-MS) (FIELD et al., 2003, MUNIZ et al.1999, TOWNSEND et al., 1998), o qual permite uma melhor separação entre as massas com melhor resolução entre os picos (Tabela 2). Contudo, os equipamentos de alta resolução são ainda de custo muito elevado e em muitos casos há perda de sensibilidade quando a operação ocorre em modo de alta resolução. (MONTASER 1998).

Tabela 2: Principais intereferentes na determinação de alguns elementos químicos por ICP-MS (MONTASER 1998).

Isotopo	Massa (u.m.a.)	Interferentes	Massa (u.m.a.)
^{28}Si	27,9769284	$^{14}N_2$	28,006148
^{31}P	30,9737634	$^{14}N^{16}O^{1}H$	31,005814
^{32}S	31,9720718	$^{16}O_2$	31,989829
^{39}K	38,9637079	$^{38}Ar^{1}H$	38,970557
^{40}Ca	39,9625907	^{40}Ar ^{40}K	39,962383 39,963999
^{48}Ti	47,9479467	$^{32}S^{16}O$ $^{32}S^{14}N$	47,966986 47,970942
^{51}V	50,9439625	$^{35}Cl^{16}O$ $^{37}Cl^{14}N$	50,963767 50,968977
^{52}Cr	51,9405097	$^{40}Ar^{12}C$ $^{35}Cl^{16}O^{1}H$	51,962383 51,971592
^{53}Cr	52,9406510	$^{37}Cl^{16}O$	52,960817
^{55}Mn	54,9380463	$^{40}Ar^{15}N$ $^{37}Cl^{18}O$ $^{40}Ar^{14}N^{1}H$	54,962492 54,965062 54,973282
^{56}Fe	55,9349393	$^{40}Ar^{16}O$	55,957298
^{58}Ni	57,9353471	$^{40}Ar^{18}O$	57,961542
^{59}Co	58,9331978	$^{40}Ar^{18}O^{1}H$	58,969368
^{63}Cu	62,9295992	$^{40}Ar^{23}Na$	62,952153
^{64}Zn	63,9291454	$^{32}S^{16}O_2$	63,961901
^{69}Ga	68,9255809	$^{37}Cl^{16}O_2$	68,955732
^{74}Ge	73,9211788	$^{40}Ar^{34}S$	73,930251
^{75}As	74,9215955	$^{40}Ar^{35}Cl$	74,931236
^{80}Se	79,9165205	$^{40}Ar_2$	79,924766

Recentemente, com o desenvolvimento de ICP-MS com celas de colisão (CC-ICP-MS) e reação dinâmica (DRC-ICP-MS), a técnica se mostra altamente favorável para a determinação de muitos elementos em matrizes complexas utilizando equipamentos de menor custo. (MANTON; ROTHENBERG; MANOLO, 2001, KOPPENAL; EIDEN; BARINAGA, 2004, BATISTA et al. 2009). A célula de reação dinâmica (DRC) é um acessório que pode ser acoplado ao ICP-MS para reduzir interferências espectrais entre íons e moléculas formadas pela combinação de espécies abundantes no gás do plasma, no solvente e na matriz da amostra, promovendo a reação íon-molécula entre o gás reativo e as espécies do feixe de íons. Assim compostos poliatômicos sofrem transferência de íons e geram compostos que não interferem na análise. Um exemplo comum de reação é mostrado abaixo (NEUBAUER; VALLKOPK, 1999):

$^{35}Cl^{16}OH^{+}$ (interferente na análise de ^{52}Cr) + NH_3 (gás de reação) $\rightarrow$ ClO + NH_4^{+}.

Entretanto, uma alternativa mais simples para a redução de possíveis interferências decorrentes da análise direta de amostras clínicas pode ser obtida pela combinação da diluição da amostra, uso de nebulizadores especiais, baixas taxas de aspiração da amostra e calibração das amostras por ajuste de matriz, uso de equações de correção e escolha apropriada do isótopo a ser monitorado (HEITLAND; KÖSTER, 2006ª, HEITLAND; KÖSTER, 2006b).

Revisão Bibliográfica

2-REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

A busca por métodos para biomonitoramento de elementos químicos utilizando o ICP-MS vem sendo documentada desde 1988, onde Lyon e Fell descreveram um método para determinação de Mg, Al, Cr, Fe, Ni, Cu, Zn e Se em amostras de plasma, urina e sangue, utilizando digestão em meio ácido. Os autores relataram neste trabalho que a técnica de ICP-MS era uma técnica promissora para a área clínica, por apresentar maior rapidez de análise, limites de detecção menores quando comparada a outras técnicas analíticas. No entanto, vários problemas de interferências poliatômicas foram observados para elementos com massa atômica inferior a 81 u.m.a.

Em 1995, Alimonti et al. desenvolveram um método para determinação da concentração de Cr e Ni em amostras de sangue por ICP-MS em pacientes italianos que apresentavam uma reação alérgica inesplicável. Mesmo utilizando digestão por microondas das amostras, para diminuir a carga de carbono do sangue, foi necessária a aplicação de equações de correção e ainda assim as leituras do isótopo de níquel 60 (^{60}Ni) sofriam interferência das espécies $^{35}Cl^{23}Na$ e $^{44}Ca^{16}O$.

Paschal et al. (1995) desenvolveram um método para determinação de Pb em amostras de sangue por diluição isotópica e espectrometria de massas com plasma acoplado (ID-ICP-MS). Para o preparo das amostras foi utilizada digestão assistida por microondas em meio ácido. Para validação dos resultados os autores analisaram diversos materiais de referência (MR), além de comparar os resultados obtidos entre o método proposto e com utilização de ICP-MS de alta resolução. Apesar de uma boa concordância entre os valores encontrados pelo método proposto e os de referência nos MRs, o método não seria muito viável para análise em rotina, devido a etapa utilizada de preparo de amostras.

Em 1999, Rodushkin, Ödman e Branth propuseram um método para a determinação de 50 elementos em sangue por ICP-MS de alta resolução (HR-ICP-MS) utilizando a digestão das amostras. Para validação do método os autores utilizaram comparação dos resultados com aqueles obtidos por ICP OES (P, Fe, cu, Zn e Si) e/ou GF AAS (Cd e Pb). Dos 50 elementos avaliados, 21 apresentaram resultados com boa concordância e boa precisão. Entretanto, uma das grandes limitações deste método está na utilização de um equipamento de elevado custo.

Nos laboratórios clínicos especializados no biomonitoramento existe uma constante busca pelo desenvolvimento e aplicação de métodos mais rápidos e mais simples para diagnóstico de deficiência mineral e exposição a elementos tóxicos, ou seja, métodos que minimizem a manipulação e o preparo das amostras. (CDC 2008) (BARANY et al. 1997, PALMER et al. 2006, HEITLAND; KÖSTER, 2006, NIXON et al., 1996, NIXON et al., 2002). Neste sentido, vários métodos de introdução direta de amostras clínicas no ICP-MS passaram a ser propostos a partir de 1996 sem a necessidade de uma etapa prévia de digestão de amostras.

Nixon et al. em 1996 já demonstravam uma preocupação no tempo das análises em rotina de amostras clínicas para fins de diagnóstico. Estes autores propuseram a análise direta de sangue e urina para determinação de Pb, As, Cd e Tl por ICP-MS. As amostras eram diluídas 1:10 em HNO_3 (v/v) e centrifugadas por 5 min. Em seguida, o sobrenadante era analisado diretamente no ICP-MS. Os resultados obtidos pelo método apresentaram bastante concordância com os obtidos por GF AAS para vários materiais de referência e de referência certificada. Apesar da preocupação com a análise direta, a utilização de uma etapa de centrifugação das amostras exige a operação com mais um acessório o que pode dificultar o uso deste método em larga escala.

Barany et al. (1997) avaliaram um método para determinação de Co, Ni, Cu, Zn, Ga, Se, Rb, Mo, Rh, Pd, Cd, Sn, Sb, W, Pt, Hg, Tl e Pb em sangue com introdução direta de amostras no ICP-MS. Neste método, um volume de 1000µL de sangue era diluído 1:10 em solução contendo 5g L^{-1} de amônia 25% (m/v); 0,5%(v/v) Triton® X-100 e 0,5g L^{-1} EDTA. Entretanto, apesar do grande número de elementos químicos estudados, foram obtidos resultados satisfatórios (boa exatidão e repetibilidade com análise dos materiais de referência) apenas para Cd, Co, Cu, Pb, Rb e Zn.

Em 2002, Nixon et al. propuseram a utilização de butanol no diluente para análise direta de amostras de sangue por ICP-MS e determinação de As, Pb, Cd, Hg, e Tl. As amostras de sangue eram diluídas com uma solução contendo 2.5% (v/v) de butanol e 0,5% (v/v) HCl. A utilização de álcoois no diluente permitiu uma maior eficiência de nebulização e diminuiu a formação de óxidos. Isto acontece porque os alcoóis são mais voláteis que a água, permitindo que mais solventes orgânicos entrem no plasma e diminuam as reações de transferência do carbono,

promovendo menor quantidade de oxigênio no plasma além de diminuir formação de $ArCl^+$ e $CaCl^+$ que gera interferências na determinação de ^{75}As.

Também em 2002, Bonnefoy et al. propuseram um método para analise de Pb em amostras de sangue por ICP-MS. Para isso, amostras de pacientes e amostras de material de referência de sangue foram diluídas 1:45 (v/v) com solução contendo 0,1mg L^{-1} NH_4OH; 0,1g L^{-1} butanol e 0,1% (v/v) Triton® X-100. A calibração das amostras foi realizada por ajuste de matriz com uma matriz sintética de sangue contendo 7,5g L^{-1}de NaCl e 0,5g L^{-1} $CaCl_2$.

Nixon et al. (2004) propuseram um método para determinação direta de As, Cd, Pb, Hg, e Tl em sangue e urina por ICP-MS avaliando o uso de cela de reação dinâmica. As amostras foram diluídas com solução contendo 2,5% (v/v) de butanol e 0,5% (v/v) HCl e analisadas diretamente no ICP-MS. Os autores observaram que apenas para a análise de As era necessário o uso de célula de reação dinâmica (DRC) para diminuir as interferências promovidas por $^{40}Ar^{35}Cl^+$ e $^{40}Ca^{35}Cl^+$, principalmente em urina.Também foi observado um melhor limite de detecção e melhor precisão das medidas para o arsênio com o uso de DRC.

Goullé et al. em 2005 propuseram um método de introdução direta de amostras de sangue, plasma e urina em ICP-MS com simples quadrupolo para a determinação de 27 elementos em sangue. Para isso as amostras de sangue foram diluídas 1:10 em 1% (v/v) HNO_3; 0,1% (v/v) Triton®X100 e 0,5% (v/v) butanol. O método foi aplicado para o estabelecimento de valores de referência de elementos químicos na população francesa.

D'Ilio et al. (2006) fizeram uso de um DRC-ICP-MS acoplado com um sistema de desolvatação de amostra, para a determinação de 17 elementos em amostras de sangue (Al, As, Ba, Cd, Co, Cr, Li, Mn, Mo, Ni, Pb, Sb, Se, Sn, Sr, V e Zr). Amônia foi utilizada como gás de reação para determinar os elementos Al, Cr, Mn, e V, e O_2 para determinar As e Se. Os autores observaram diminuição das interferências e melhores limites de detecção com o uso do DRC. No entanto, o método proposto pelos autores sugere uma prévia digestão das amostras, o que inviabiliza operações de rotina em larga escala. Além disso, a digestão das amostras é injustificada, já que o método propõe o uso do DRC.

Heitland e Koster (2006) usaram um nebulizador do tipo Babington e cela de colisão para introdução direta no ICP-MS de amostras de sangue diluídas 1:10 (v/v) com 0,1%(v/v) de Triton®X-100 e 0,5%(v/v) NH_4OH, para a determinação de 37

elementos químicos. Os autores também avaliaram o uso de tubos injetores com 2.5mm de diâmetro interno, combinado com uma baixa taxa de aspiração das amostras (0,4 mL min^{-1}.) para minimizar obstrução do bico injetor. No entanto, devido à baixa diluição das amostras, após 6hs de trabalho ocorria alta formação de depósitos no sistema de nebulização. O uso da cela de colisão associado aos procedimentos anteriormente citados possibilitou a aquisição de resultados mais precisos e exatos para a análise de materiais de referência. No entanto, vários laboratórios clínicos ainda não dispõem de ICP-MS com cela de colisão/reação Este acessório chega a encarecer em cerca de 70.000 dólares um equipamento de simples quadrupolo.

Palmer et al. (2006) propuseram um método para determinação de Hg, Pb e Cd em amostras de sangue por ICP-MS utilizando introdução direta de amostra. Um volume de apenas 200µL de sangue foram diluídos 1:50 em solução contendo 0,5% (v/v) HNO_3; 0,005% (v/v) Triton® X-100, sendo que ajuste de matriz foi utilizado para calibração da amostras. Com isso até 500 amostras de sangue puderam ser analisadas sem necessidade de limpeza do nebulizador, cones ou lentes. Apesar de o equipamento utilizado ser um DRC-ICP-MS, os autores observaram que não era necessária a utilização da cela de reação.

A utilização de bases fortes como o hidróxido de tetrametilamônio (TMAH) para preparo de amostras clínicas vem sendo proposta por vários grupos para determinação de elementos químicos tanto por espectrometria de absorção atômica com forno de grafite (da SILVA et al., 2003, MARTINS et al. 2002, RIBEIRO; CURTIUS; POZEBON 2000) quanto por espectrometria de massas com plasma acoplado (RODRIGUES et al., 2008b, BATISTA et al., 2008). O TMAH promove a clivagem de proteínas facilitando a solubilização da amostra. Duas recentes publicações de nosso grupo descrevem a vantagem do uso do TMAH para solubilizar amostras clínicas de unha e cabelo antes da introdução direta no ICP-MS. (RODRIGUES et al., 2008b, BATISTA et al., 2008).

Não só o TMAH como outros solventes orgânicos (metanol, etanol, propanol e outros) vêm sendo utilizados na solução do diluente (GOULLÉ et al. 2005, DA VEIGA, MAMS; FRESCURA, VLA; CURTIUS AJ; 2000, FEATHERSTONE et al. 2004). Os solventes orgânicos em geral diminuem a viscosidade de uma amostra, aumentam a homegeneidade da solução, melhoram a nebulização da amostra visto que reduzem a tensão superficial da solução, diminuindo o tamanho das gotículas e

com isso aumentando a eficiência de nebulização. Além desses fatores favoráveis ao pré-tratamento de amostras clínicas, sabe-se pela literatura (ALLAIN et al. 1991, LARSEN E. H., STURUP S, 1994) que o carbono no plasma aumenta a intensidade do sinal de analitos que tenham mais alto potencial de ionização (Tabela 3). Quando solventes orgânicos são introduzidos ocorre à formação de espécies de carbono no canal central do plasma e essa população de carbono (C^+) e/ou espécies contendo íons carbono no plasma, juntamente com os analitos a serem determinados, tendem a sofrer rearranjo permitindo a formação de um cátion radical mais estável. Exemplos de espécies como As, Se e Au que precisão de alta energia para a ionização (9-10 eV) (Tabela 3) começam a transferir elétrons para as espécies mais estáveis que, neste caso, são espécies contendo carbono.

$$CO^+ + M \longrightarrow M^+ + CO$$

Da Veiga, Frescura e Curtius (2000) demonstraram que a principal espécie de carbono formada no plasma de um ICP-MS é o monóxido de carbono (CO 92,53%; ArC 7,07%; ArO 0,35%; C_2 0,04%) quando metanol foi usado como solvente.

No entanto, a utilização de solventes orgânicos no diluente deve ser feita com cautela. A introdução destes solventes no plasma de um equipamento de ICP-MS é crítica, visto que a alta concentração de carbono pode desestabilizar o plasma ou até mesmo extinguí-lo (KREUNING G., MAESSEN F.J.M.J., 1987, KREUNING G., MAESSEN F.J.M.J., 1989). Além disso, átomos de carbono não oxidados podem recombinar para formar grafite e a temperatura menor dos cones e lentes pode facilitar a obstrução dos orifícios dos cones ou mudar a voltagem das lentes iônicas. Adicionalmente íons poliatômicos podem ser formados com mais facilidade e podem interferir, por exemplo, na determinação de ^{52}Cr (formação de $Ar^{40}C^{12}$).

Deve-se considerar que a utilização de um surfactante faz-se necessário quando se utiliza um solvente orgânico, pois o mesmo muda as propriedades físicas do solvente e diminui a obstrução de nebulizador, bico injetor, cones e lentes (BATISTA et al. 2009, DA VEIGA, MAMS; FRESCURA, VLA; CURTIUS AJ; 2000).

Tabela 3. Valores de energia de ionização para os diferentes elementos químicos. (JARVIS; GRAY; HOUK, 1992)

Energia de Ionização (eV)	Elementos
< 7	Li, Na, Al, K, Ca, Sc, Ti, V, Cr, Ga, Rb, Sr, Y, Zr, Nb, In, Cs, Ba, La, Ce, Pr, Nd, Pm, Sm, Eu, Gd, Tb, Dy, Ho, Er, Tm, Yb, Lu, Hf, Tl, Ra, Ac, Th, U.
7-8	Mg, Mn, Fe, Co, Ni, Cu, Ge, Mo, Tc, Ru, Rh, Ag, Sn, Sb, Ta, W, Re, Pb, Bi.
8-9	B, Si, Pd, Cd, Os, Ir, Pt, Po.
9-10	Be, Zn, As, Se, Te, Au.
10-11	P, S, I, Hg, Rn.
11-12	C, Br.
12-13	Xe.
13-14	H, O, Cl, Kr.
14-15	N.
15-16	Ar.
> 16	He, F, Ne.

Objetivos

3-OBJETIVOS

Desenvolver um método de análise direta de sangue por espectrometria de massas com plasma acoplado (ICP-MS) para determinação de Ag, As, Cd, Co, Mn, Ni, Pb e Se com diluição de amostra em meio de hidróxido de tetrametilamônio (TMAH).

Comparar o método desenvolvido com outros dois métodos analíticos rotineiramente utilizados para análise direta de elementos químicos em sangue, por espectrometria de massas com plasma acoplado (ICP-MS), com relação às características analíticas e aplicabilidade em rotina para laboratórios clínicos.

Material e Métodos

4-MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Material

4.1.1. Instrumentação

Todas as análises foram feitas utilizando-se um ICP-MS modelo Elan DRC II (Perkin-Elmer, Norwalk, CT) operando com argônio de alta pureza (99,999%, White Martins, Brasil). Foi utilizado um nebulizador concêntrico do tipo Meinhard (Spectron/Glass Expansion, Ventura, CA, USA) e câmara de nebulização do tipo ciclônica. A radiofreqüência (RF) selecionada foi de 1100 watts no modo pulso e as lentes operando entre 6 e 9V Os dados das amostras foram obtidos usando 20 varreduras de leitura (sweeps/reading) e 3 replicatas. A vazão de gás no nebulizador foi otimizada diariamente (0.5 a 0.8 L min^{-1}). A bomba peristáltica operou em uma rotação de 20rpm. Os resultados foram obtidos em contagens por segundo (cps). Na Tabela 4 são mostradas algumas características da instrumentação utililizada, bem como alguns parâmetros otimizados diariamente.

Embora o equipamento utilizado disponha de cela de reação dinâmica (DRC-ICP-MS) para remover interferências poliatômicas, foi utilizado o equipamento no modo padrão com a válvula de DRC vetada.

Os seguintes isótopos foram selecionados ^{75}As, ^{107}Ag, ^{111}Cd, ^{59}Co, ^{55}Mn, ^{60}Ni ^{208}Pb e ^{82}Se.

Tabela 4: Instrumentação e parâmetros otimizados para o método proposto.

Instrumentação	**Elan DRC II (Perkin Elmer SCIEX)**
Nebulizador	Meinhard
Camara de nebulização	Ciclônica
Tocha, bico injetor	Quartzo
Lentes Iônicas	6-9 V
Potência de Radio Frequencia (RF)	1100 W
Vazão do gás de Nebulização	0,5 a 1,0 L min^{-1}
Vazão do gás do Plasma	15 L min^{-1}
Vazão do gás auxiliar	1,2 L min^{-1}
Isótopos	^{75}As, ^{107}Ag ^{111}Cd, ^{59}Co, ^{55}Mn, ^{60}Ni ^{208}Pb, ^{82}Se.
Interface	**Cones de Platina**
Cone de amostragem	1,1 mm de diâmetro do orifício.
Skimmer	0,9 mm de diâmetro do orifício.
ICP-MS	
Tempo de integração	2000 ms
Replicatas	3
Leituras	1
Vazão	1,0 mL min^{-1}

Para fins de comparação, 20 amostras de sangue de indivíduos saudáveis foram analisadas por duas diferentes técnicas. Essas amostras foram analisadas utilizando o ICP-MS e também utilizando a técnica de espectrometria de absorção atômica com atomização eletrotérmica (ET AAS), usando um espectrômetro de absorção atômica SIMMA 6000 (PerkinElmer, Norwalk, CT, USA) equipado com um tubo atomizador de grafite THGA (GF AAS), um AS-72 amostrador automático (PerkinElmer). Este último equipamento está localizado no Departamento de Química Analítica da Universidade Estadual Paulista (UNESP). Lâmpada de catodo oco (HCL), (PerkinElmer Lumina) foi usada para determinar Pb (283,3 nm) e Mn ((279,5 nm) operando a 20mA. Lâmpada de descarga de elétrons (EDL) (PerkinElmer Lumina®) foi usada para determinação de Cd (228,8 nm) e Se (196,0

nm) operadas em uma descarga de 240 e 280 mA, respectivamente. Com resolução de 0,2 nm para Mn e 0,7 nm para Cu, Cd, Pb e Se, equipamento foi operado com argônio de alta pureza 99,996% (White Martins, São Paulo, SP). Para análise de chumbo e selênio, utilizou-se tubo de grafite THGA previamente revestido com W-Rh de acordo com o método proposto por Zanão et al. (2002) e Zhou et al. (2002)

4.1.2. Reagentes

Todos os reagentes utilizados foram obtidos da Sigma (Sigma, St Louis, MO USA), de grau analítico, exceto HNO_3 e os álcoois metanol, etanol, propanol e butanol que foram previamente purificados com destilação *sub-boiling*, utilizando um destilador de quartzo (Kürner). Foi utilizada uma solução estoque multielementar contendo 1000 mg L^{-1} de cada elemento além de uma solução estoque de Rh 1000 mg L^{-1}, ambas obtidas da PerkinElmer (PerkinElmer, Norwalk, CT, USA).

O preparo das soluções e manipulação das amostras foi realizado em sala limpa classe 1000. Água deionizada de alta pureza (resistividade 18.2 MΩ cm) foi obtida usando um sistema de purificação por osmose reversa seguida de um Milli-Q (Millipore, Bedford, MA, USA). Todas as soluções foram estocadas em tubos de polietileno. Todos os materiais utilizados, balões volumétricos, béqueres, ponteiras, tubos, foram descontaminados pela imersão em uma solução de 10% (v/v) de HNO_3 por 24 h e depois foram enxaguados de 3 a 5 vezes com água Milli-Q e secos em capela de fluxo laminar antes do uso.

Sangue base de origem ovina foi coletado no biotério central da Universidade de São Paulo campus Ribeirão Preto, utilizando tubos de coleta *Becton Dickinson Vacutainer®* "livre de metais" contendo ácido etilendiamino tetra-acético dipotássico (EDTA) como anticoagulante e armazenado por até 30 dias após coleta em refrigeração à – 80ºC.

Os materiais de referência utilizados neste trabalho (ICP-07B03 ICP-07B06) foram produzidos no *Institut National de Santé Publique du Quebec,* INSP-Québec, Canadá.

Também foram utilizadas amostras de sangue humano coletadas como parte de um estudo envolvendo elementos traço na população ribeirinha da Amazônia. Estas amostras foram utilizadas com propósito de validação do método proposto pela comparação de resultados entre duas técnicas diferentes. Estas amostras

foram obtidas com consentimento dos indivíduos doadores de acordo com os procedimentos aprovados pelo Comite de Ética em Pesquisa da FCFRP.

Para análise por ETAAS, utilizou-se solução estoque contendo 1000 mg L^{-1} de cada elemento (PerkinElmer, Norwalk, CT, USA). As curvas analíticas de calibração analíticos foram preparadas diariamente em intervalos de 0,04 -1; 0,2 – 3; 5 – 60; 15 – 60; µg L^{-1} para Cd, Mn, Pb e Se respectivamente e diluídos em solução 0.5% (v/v) HNO3 e 0.05% (v/v) Triton X-100.

4.2. Métodos

4.2.1. Preparo das amostras

4.2.1.1. Método Proposto

Inicialmente, 200 µL de sangue foram incubados com 500 µL de TMAH 10% (v/v) e homogeneizadas em vortex e mantidos em repouso a temperatura ambiente por 10 minutos. Em seguida, a amostra resultante foi diluída para 10 mL (1:50) (v/v) com diluente contendo 0,05% (m/v) EDTA; 0,005% (v/v); Triton® X-100. A concentração final de padrão interno (Rh) foi de 10 µg L^{-1}. O mesmo diluente foi utilizado para o preparo das soluções intermediárias multielementar, de concentração 10mg L^{-1}, e de padrão interno (Rh) de concentração 1.0 mg L^{-1}.

Curvas de calibração foram prepararadas com concentrações dos analitos de 1; 5; 10; 20 e 50 µg L^{-1} tanto por ajuste de matriz, acresecentando sangue base de origem ovina diluído 50 vezes, como também em meio aquoso. Ambas foram preparadas com solução diluente: 0,05% (m/v) EDTA; 0,005% (v/v); Triton® X-100 , e continham padrão interno (Rh) a uma concentração final de 10 µg L^{-1} Um branco reagente foi utilizado, o qual era composto apenas pelo diluente e padrão interno.

4.2.1.2 Método de Barany e colaboradores (1997)

As amostras foram diluidas 1:10 (v/v) em diluente EDTA 0,5g L^{-1}; Triton X-100 0,5g L^{-1}; NH_3 5g L^{-1}, e concentração final de padrão interno (Rh) foi de 10 µg L^{-1}. O mesmo diluente foi utilizado para o preparo das soluções intermediárias multielementar, de concentração 10mg L^{-1}, e de padrão interno (Rh) de concentração 1.0 mg L^{-1}.

Curvas de calibração foram preparadas com concentrações dos analitos de 1; 5; 10; 20 e 50 µg L^{-1} tanto por ajuste de matriz, acrescentando sangue base de origem ovina diluído 10 vezes, como também em meio aquoso. Ambas foram preparadas com solução diluente: EDTA 0,5g L^{-1}; Triton 0,5g L^{-1}; NH_3 5g L^{-1}, e continham padrão interno (Rh) a uma concentração final de 10 µg L^{-1} Um branco reagente foi utilizado, o qual era composto apenas pelo diluente e padrão interno.

4.2.1.3 Método de Palmer e colaboradores (2006)

As amostras foram diluidas 1:50 (v/v) em diluente 00,5 % (v/v) HNO_3; 0,005% (v/v) Triton®X-100, e concentração final de padrão interno (Rh) foi de 10 µg L^{-1} O mesmo diluente foi utilizado para o preparo das soluções intermediárias multielementar, de concentração 10mg L^{-1}, e de padrão interno (Rh) de concentração 1.0 mg L^{-1}.

Curvas de calibração foram preparadas com concentrações dos analitos de 1; 5; 10; 20 e 50 µg L^{-1} tanto por ajuste de matriz, acresecentando sangue base de origem ovina diluído 50 vezes, como também em meio aquoso. Ambas foram preparadas com solução diluente: 00,5 % (v/v) HNO_3; 0,005% (v/v) Triton®X-100, e continham padrão interno (Rh) a uma concentração final de 10 µg L^{-1} Um branco reagente foi utilizado, o qual era composto apenas pelo diluente e padrão interno.

4.2.1.4 Método proposto utilizando solventes orgânicos

Inicialmente, 200 µL de sangue foram incubados com 500 µL de TMAH 10% (v/v) e homogeneizadas em vortex e mantidos em repouso por 10 minutos. Em seguida, a amostra resultante foi diluída a 10 mL (1:50) (v/v) com diluente contendo 0,05% (m/v) EDTA; 0,005% (v/v); Triton® X-100; álcool (metanol, etanol, isopropanol ou butanol) em diferentes concentrações (1,0% v/v; 2.5% v/v ou 5,0 % v/v) e concentração final de padrão interno (Rh) foi de 10 µg L^{-1} O mesmo diluente foi utilizado para o preparo das soluções intermediárias multielementar, de concentração 10mg L^{-1}, e de padrão interno (Rh) de concentração 1.0 mg L^{-1}.

Curvas de calibração foram preparadas com concentração dos analitos de 1; 5; 10; 20 e 50 µg L^{-1} tanto por ajuste de matriz, acresecentando sangue base de origem ovina diluído 50 vezes, como também em meio aquoso. Ambas foram preparadas com solução diluente: 0,05% (m/v) EDTA; 0,005% (v/v); Triton® X-100; álcool (metanol, etanol, isopropanol ou butanol) em diferentes concentrações (1,0%

v/v; 2.5% v/v ou 5,0 % v/v), e continham padrão interno (Rh) a uma concentração final de 10 µg L^{-1}. Um branco reagente foi utilizado, o qual era composto apenas pelo diluente e padrão interno.

4.2.1.5 Método para análise por ETAAS

Para a técnica de GF AAS, alíquotas de 100 µL de sangue foram diluídas 1:10 em uma solução contendo 0,5% (v/v) HNO_3 + 0,005% (v/v) Triton X-100. Curvas de calibração em meio aquoso foram preparadas para cada analito contendo o mesmo diluente.

4.3 Validação do método proposto

A validação de um método deve garantir, por meio de estudos experimentais, que o método atenda às exigências das aplicações analíticas, assegurando a confiabilidade dos resultados. Para tanto deve apresentar especificidade, linearidade, intervalo de confiança, precisão, sensibilidade, limite de detecção (LD) e quantificação (LQ), exatidão, adequados à análise (ANVISA 899/2003). A seguir serão descritos os procedimentos e métodos usados neste trabalho para garantir a qualidade dos resultados.

4.3.1.Curvas de Calibração

A análise quantitativa utilizando a técnica de ICP-MS requer a construção de curvas de calibração diárias, que serão referência para converter as intensidades registradas nas análises das soluções-problema em concentrações dos respectivos elementos. A calibração do ICP-MS exige soluções de referência e curvas para todos os elementos determinados no trabalho. As curvas analíticas de calibração foram construídas com 5 pontos (1 µg L^{-1} ; 5 µg L^{-1} ; 10µg L^{-1} ; 20 µg L^{-1} e 50 µg L^{-1}), e preparadas por diferentes diluições da solução estoque (seção 4.2).

A Equação da reta:

$$Y = ax + b$$

Onde: ***Y*** é o número de contagens (cps), ***a*** o coeficiente angular da reta, ***x*** é a concentração a ser calculada e ***b*** é o intercepto.

A partir da construção das curvas de calibração foi verificada a linearidade do método.

4.3.2 Linearidade

É a capacidade de uma metodologia analítica de demonstrar que os resultados obtidos são diretamente proporcionais à concentração do analito na amostra, dentro de um intervalo especificado. Recomenda-se que a linearidade seja determinada pela análise de, no mínimo, 5 concentrações diferentes (ANVISA 899/2003).

4.3.3. Precisão

A precisão é a avaliação da proximidade dos resultados obtidos em uma série de medidas de uma amostragem múltipla de uma mesma amostra. Repetibilidade (precisão intra-corrida) indica a concordância entre os resultados dentro de um curto período de tempo com o mesmo analista e mesma instrumentação (ANVISA 2003). A precisão indica o grau de concordância entre os diversos resultados experimentais obtidos em condições de repetibilidade. Assim, “boa precisão” significa erro estatístico pequeno, de forma que os resultados apresentam boa repetibilidade (VUOLO, 1996).

Na análise por ICP-MS a precisão pode variar com a sensibilidade do elemento a ser determinado na amostra, uma vez que o erro da leitura é seu desvio padrão (SD) determinado por 3 leituras consecutivas. No caso de sensibilidade muito baixa (próximas do limite de detecção) pode levar a desvios elevados (GONZALÉZ; HERRADOR, 2007).

4.3.4 Exatidão

A exatidão é o grau de concordância entre o valor obtido e o valor verdadeiro ou mais provável. Neste trabalho a exatidão foi avaliada analisando um material de referência de sangue e comparando o método proposto com outros dois já

estabelecidos (Barany et al. (1997) e Palmer et al. (2006)) em relação às características analíticas. A diferença entre a média dos resultados e a quantidade real do constituinte no material de referência representa a medida da exatidão do método (GONZALÉZ; HERRADOR, 2007). O material de referência utilizado neste trabalho (ICP-07B-03) foi obtido no *Institut National de Santé Publique du Quebec* INSP-Québec, Canadá.

4.3.5 Reprodutibilidade

Concordância entre os resultados obtidos em laboratórios diferentes como em estudos colaborativos, geralmente aplicados à padronização de metodologia analítica (ANVISA 899/2003) expressam a reprodutibilidade. Neste trabalho além do estudo inter-laboratorial foram feitas análises de amostras de referência em diferentes dias.

4.3.6 Limites de detecção (LD) e Limites de quantificação (LQ)

Além da precisão e exatidão dos métodos é interessante determinar também os limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) definidos, respectivamente, pela *International Union of Pure Applied Chemistry (IUPAC,)* como a menor concentração elementar mensurável com confiabilidade em um determinado método (IUPAC, 2008), O limite de detecção é calculado como 3 vezes o desvio padrão de 10 replicatas do branco dividido pelo coeficiente angular da curva de calibração do referido analito. O Limite de quantidicação é calculado com 10 vezes o desvio padrão de 10 replicatas do branco dividido pelo coeficiente angular da curva de calibração. (GONZALÉZ; HERRADOR, 2007)

Resultados e Discussão

5- RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Primeira fase de estudo

Na primeira fase do trabalho foi avaliado um novo método para a determinação de metais em sangue por ICP-MS utilizando hidróxido de tetrametilamônio (TMAH) no diluente. A escolha do TMAH foi baseada em três recentes publicações de nosso grupo, que demonstraram que este reagente é eficiente na solubilização de amostras clínicas, sem necessidade de uma prévia decomposição assistida por microondas antes da introdução no ICP-MS (RODRIGUES et al., 2008a, RODRIGUES et al., 2008b, BATISTA et al., 2008)

5.1.1. Escolha do diluente

Primeiramente, amostras de sangue com diferentes concentrações dos analitos foram incubadas com 1mL de solução contendo 25% (v/v) TMAH e mantidas a temperatura ambiente por 10 minutos. Após este procedimento, o volume foi completado para 10mL com água MilliQ.

Nestas condições, os números de contagens dos analitos no ICP-MS apresentaram-se muito instáveis. Isto provavelmente ocorreu pela formação de hidróxidos causados pelo pH básico com TMAH. Para evitar isso, um agente quelante, ácido etileno diamino tetra-acético (EDTA), foi adicionado nas amostras de sangue nos estudos subseqüentes, como sugerido por Barany et al. (1997).

Subsequentes experimentos foram feitos no intuito de otimizar as concentrações de TMAH. Para isso, alíquotas (200 µL) do material de referência (ICP-07B03) foram incubadas com 500 µL de TMAH em diferentes concentrações 2,5% (v/v), 5,0% (v/v); 10% (v/v); e 25% (v/v). Depois disso, as amostras foram diluídas para 10 mL com solução contendo 0,1% (m/v) EDTA + 0,005% (v/v) Triton® X-100 e então analisadas diretamente no ICP-MS com calibração por ajuste de matriz. Os melhores resultados (em relação tanto a exatidão quanto a precisão) para todos os analitos em estudo foram obtidas quando as amostras eram incubadas com 10% (v/v) TMAH.

5.1.2. Avaliação da concentração de EDTA

Em seqüência, a melhor concentração de ácido etileno diamino tetra-acético (EDTA) no diluente foi avaliada. Para isso, alíquotas do material de referência (200 µL) foram incubadas com solução contendo 10% (v/v) TMAH durante 10 minutos. Em seguida, a amostra resultante foi diluída para 10 mL com diferentes soluções: (i)- 0,01% (m/v) EDTA; 0,005% Triton®X-100 (ii)- 0,02% (v/v) EDTA; 0,005% (v/v) Triton® X-100; (iii)-0,05% (m/v) EDTA; 0,005% (v/v) Triton®X-100;iv)-0,1% (m/v) EDTA; 0,005% (v/v) Triton®X-100. Foram encontrados melhores resultados (exatidão e precisão) com o diluente contendo 0,05% (v/v) EDTA; 0,005% (v/v) Triton® X-100. Concentrações mais altas que 0,1% (m/v) EDTA não foram avaliadas, visto que era visível a formação de precipitados nessas condições. Assim, em todos os estudos subseqüentes de validação do método as amostras de referência de sangue foram incubadas com 500 µL de solução contendo 10% (v/v) TMAH em temperatura ambiente por 10 minutos e então diluídas para 10mL com solução 0,05 % (m/v) EDTA; 0,005 % (v/v) Triton®X-100.

5.1.3. Exatidão, variação das medidas durante vários dias, limites de detecção e aplicabilidade do método.

Nenhuma diferença estatística significativa (95% de confiança) foi observada entre os valores alvo do material de referência de sangue (ICP-07B03) e os valores encontrados pelo presente método aplicando teste-t pareado, o que demonstra a exatidão do método proposto. Além disso, a precisão analisada com base na variação das medidas durante vários dias (n=10) apresentou valores menores que 10%. A Figura 7 mostra os resultados deste estudo para o método proposto (3 replicatas por dia de análise). Os limites de detecção do método foram de: 0,008; 0,02; 0,004; 0,009; 0,003; 0,09; 0,04; 0,1 µg L^{-1} para Ag, As, Cd, Co, Mn, Ni, Pb e Se, respectivamente.

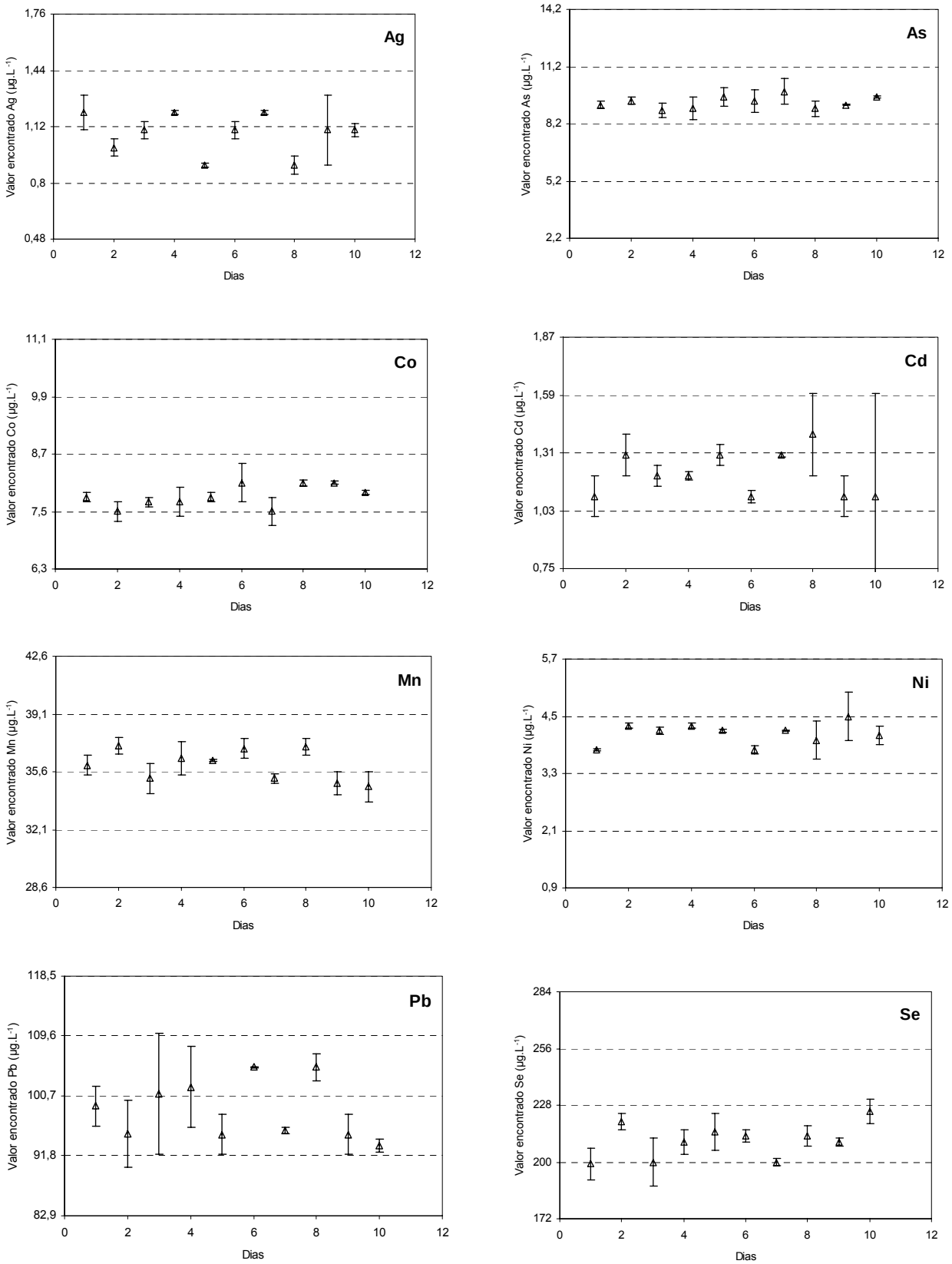


Figura 7: Estudo do coeficiente de variação das medidas em diferentes dias de análise (n=10) utilizando o método proposto de preparo de amostras com TMAH. O eixo (x) representa os dias analisados e o eixo (y) representa o valor alvo estabelecido pelo Material de Referência de Sangue ICP-07B03 (média ± SD).Em cada dia de análise foram feitas 3 replicatas.

Cabe ressaltar que com o uso do método proposto pelo menos 500 amostras de sangue podem ser analisadas em 3 dias sem que haja necessidade de limpeza do equipamento.

5.1.4 Linearidade do método

A Figura 8 mostra as curvas de calibração dos analitos em estudo com a aplicação do método proposto com TMAH. Na Tabela 5 pode ser observado que os coeficientes de correlação foram sempre superiores a 0,99 (valor mínimo aceitável pela ANVISA, Resolução 899/2003).

Tabela 5: Coeficientes angulares e lineares das curvas de calibração para o método proposto.

Analito	Coeficiente angular	Coeficiente Linear (R)
^{107}Ag	3316,19	0,9993
^{75}As	3689,47	0,9999
^{111}Cd	3032,05	0,9999
^{59}Co	17612,6	0,9999
^{55}Mn	19393,6	0,9999
^{60}Ni	3925,9	0,9999
^{208}Pb	28669,2	0,9999
^{82}Se	441,8	0,9999

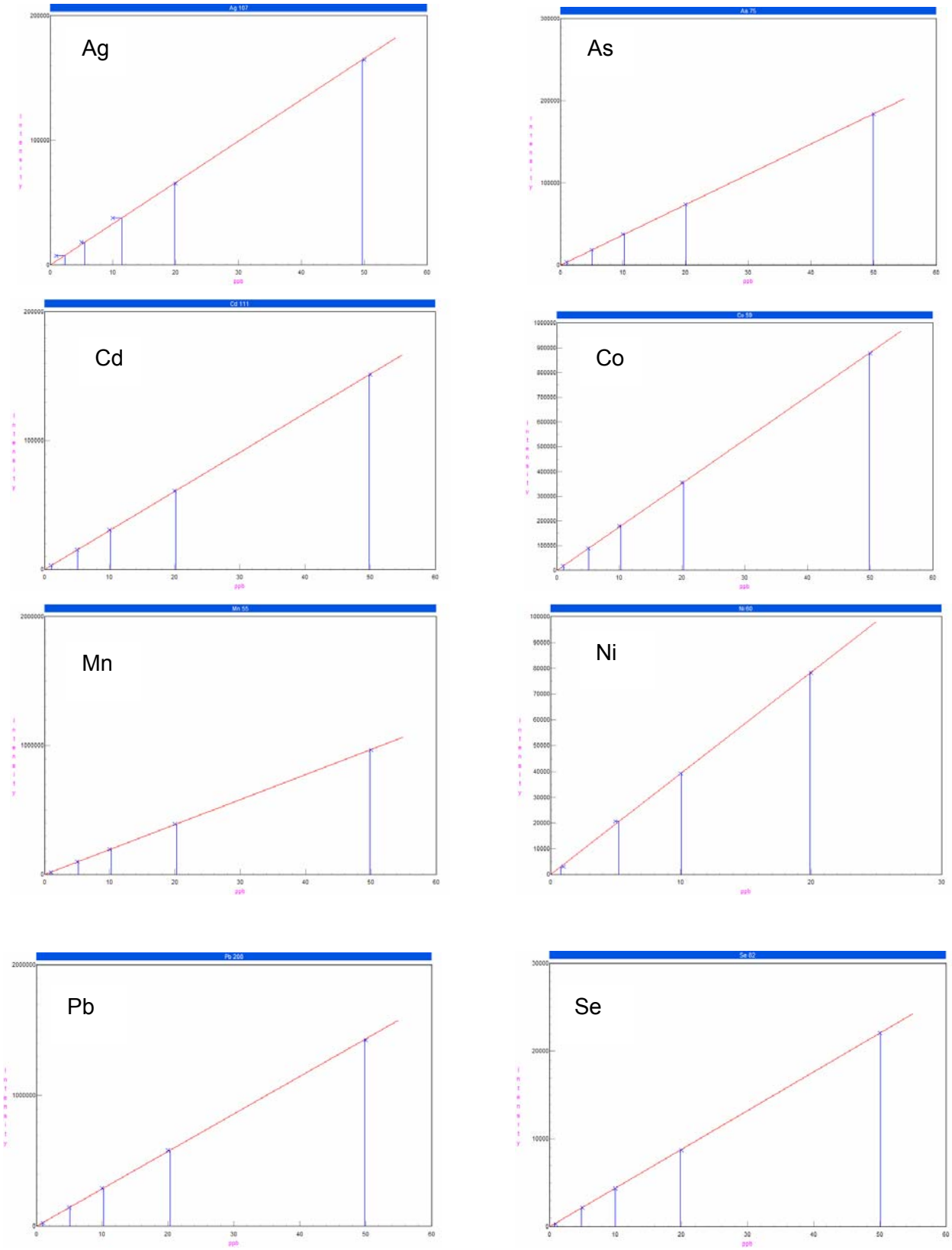


Figura 8: Curvas de calibração por ajuste de matriz utilizando método proposto. 200µL de sangue foram incubados com 500µL TMAH e diluídos para 10mL em solução contendo: 0,05% (m/v) EDTA; 0,005% (v/v) Triton® X-100.

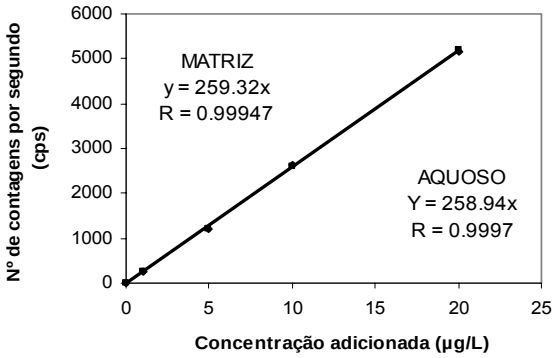
5.2 Segunda fase do estudo

Após o desenvolvimento e validação do método utilizando TMAH como diluente, os resultados obtidos foram comparados à aqueles obtidos com dois métodos já estabelecidos na literatura e utilizados em rotina em laboratórios americanos ou suecos (Barany et al. 1997 e Palmer et al. 2006). Inicialmente, foram avaliados os efeitos de matriz para a determinação dos analitos ^{75}As, ^{111}Cd, ^{208}Pb, ^{59}Co, ^{55}Mn, ^{60}Ni,^{107}Ag, ^{82}Se em sangue utilizando os métodos referência de Barany et al. (1997) e de Palmer et al. (2006).

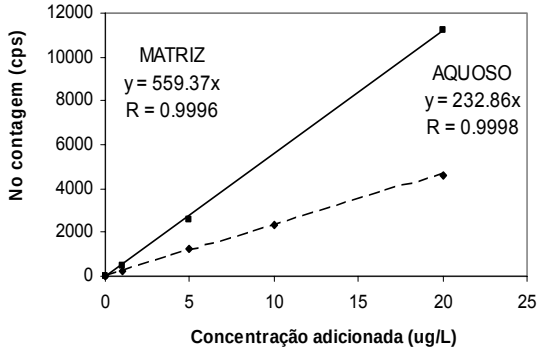
Para este estudo foram preparadas duas curvas de calibração: (i)-uma em meio aquoso e outra (ii)-com ajuste de matriz (utilizando sangue ovino). As Figuras 9, 10 e 11 apresentam as curvas de calibração nos dois meios para os dois métodos avaliados.

Arsênio (^{75}As)

a

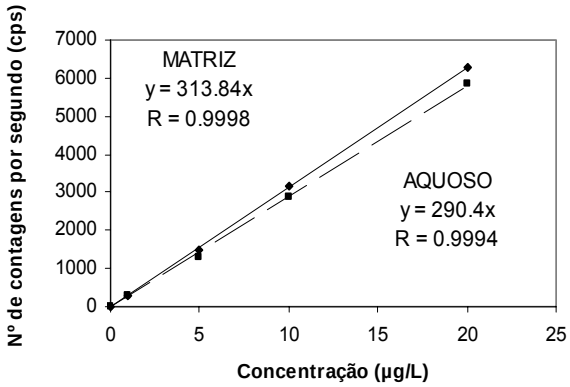


b

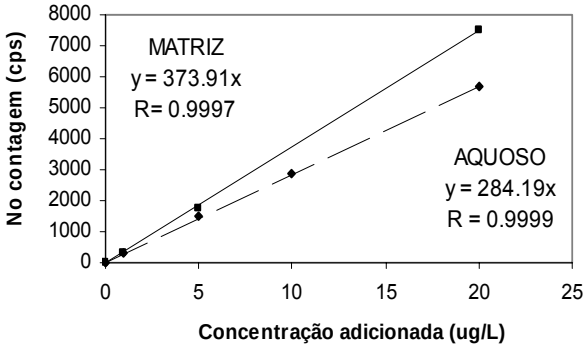


Cádmio (^{111}Cd)

a

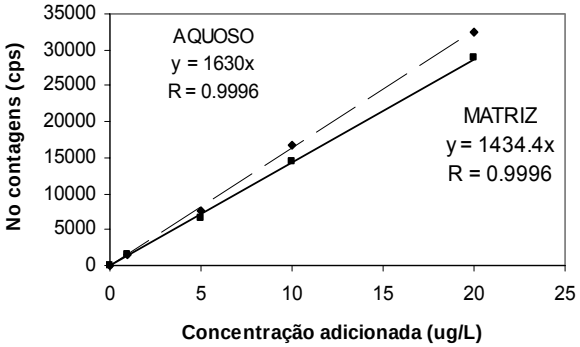


b



Cobalto (^{59} Co)

a



b

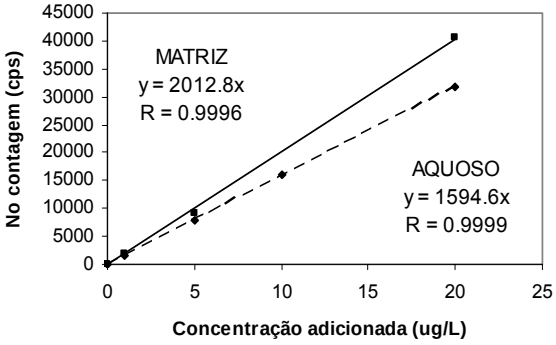
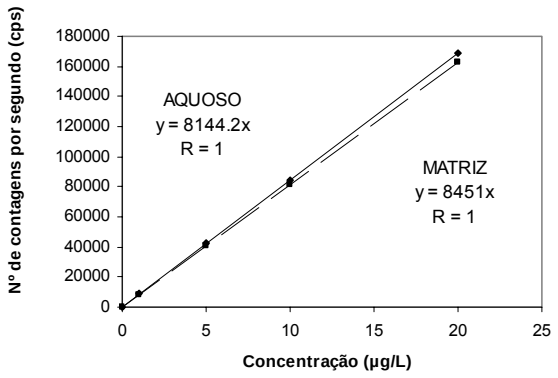


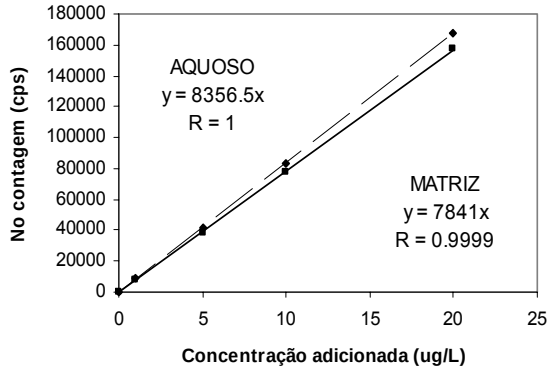
Figura 9: Curvas analíticas de calibração em meio aquoso (-) e com ajuste de matriz (- -) para As, Cd e Co obtidas para o método de Palmer et al. gráfico (**a**) e com o método de Barany et al. gráfico (**b**). R é o coeficiente de correlação da curva, y o número de contagens (cps), e x representa a concentração.

Chumbo (^{208}Pb)

a

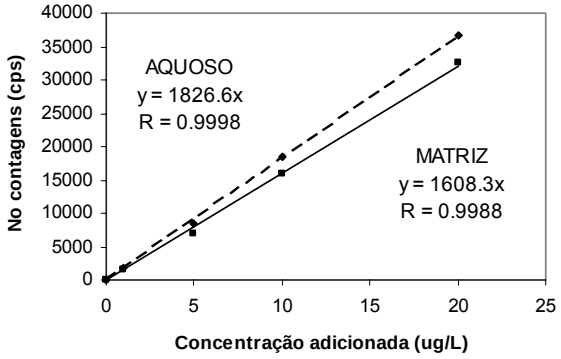


b

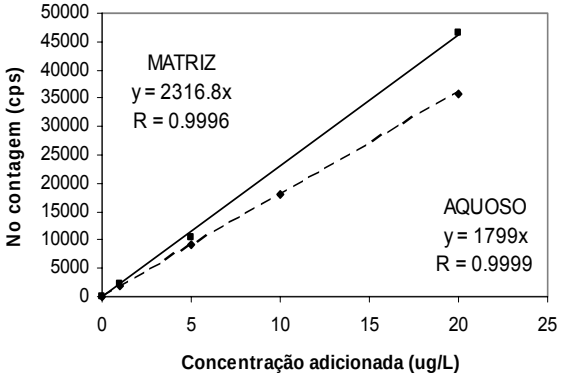


Manganês (^{55}Mn)

a

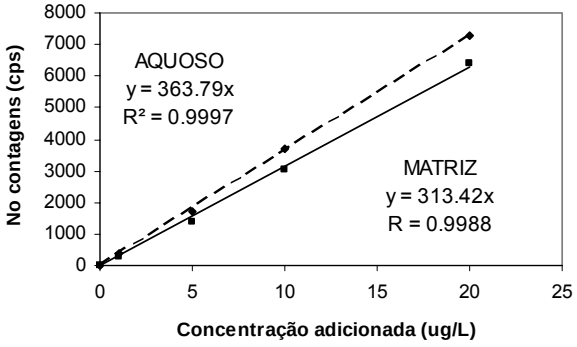


b



Níquel (^{60}Ni)

a



b

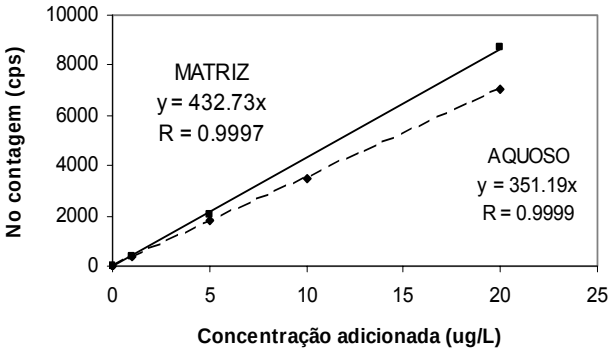


Figura 10: Curvas analíticas de calibração em meio aquoso (-) e com ajuste de matriz (- -) para Pb, Mn e Ni obtidas para o método de Palmer et al. gráfico (**a**) e com o método de Barany et al. gráfico (**b**). R é o coeficiente de correlação da curva, y o número de contagens (cps), e x representa a concentração.

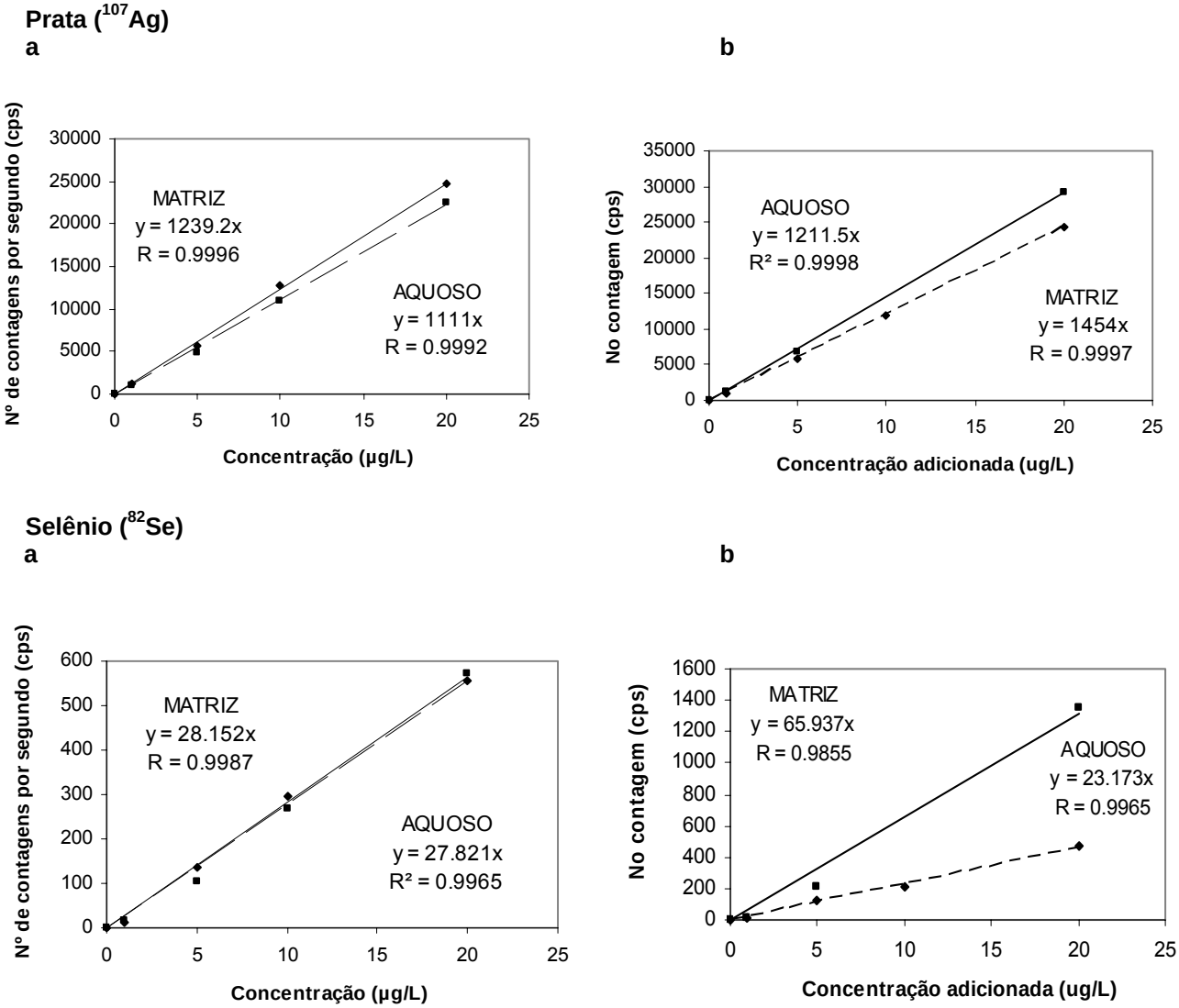


Figura 11: Curvas analíticas de calibração em meio aquoso (-) e com ajuste de matriz (- -) para Ag e Se obtidas para o método de Palmer et al. gráfico (**a**) e com o método de Barany et al. gráfico (**b**). R é o coeficiente de correlação da curva, y o número de contagens (cps), e x representa a concentração.

As Figuras 9, 10 e 11 mostram os resultados obtidos nesta fase do estudo. Com a utilização do método de Palmer et al. (2006) não foi observada diferença significativa entre as inclinações das curvas de calibração em meio aquoso e com ajuste de matriz (variação < 15%) para todos os elementos em estudo. Entretanto, para o método de Barany et al. (1997), consideramos que apenas o Pb (Figura 10) apresentou a mesma inclinação para ambas as curvas (CV = 6%). Isto provavelmente ocorreu devido à menor diluição das amostras (1:10) (v/v) empregada neste método em relação ao de Palmer et al. (2006) (1:50) (v/v) o que

potencializa o efeito de interferentes. A princípio isto representaria a não necessidade de se fazer uma curva de calibração em meio contendo a matriz com a utilização do método de Palmer. No entanto, pela própria sugestão dos autores daquele trabalho que a calibração das amostras deveria ser realizada com ajuste de matriz e por observarmos em nossos experimentos que após certo número de amostras analisadas, as curvas começavam a mostrar diferenças na inclinação, preferimos trabalhar com a utilização do método de calibração por ajuste de matriz para os dois métodos usados para os estudos de comparação.

Em seguida, foram calculados os limites de detecção para os dois métodos utilizando as condições instrumentais de nosso laboratório. A Tabela 6 mostra os resultados dos limites de detecção em comparação com aqueles obtidos pelo método proposto no estudo 1. Pela mesma tabela observa-se que para praticamente todos os elementos em estudo o método de Barany et al (1997) apresentou limites de detecção mais altos (piores). Cabe ressaltar que, o método proposto neste estudo com TMAH foi o que apresentou os melhores limites de detecção para As, Mn, Ni e Se. Mesmo assim, os LD obtidos em todos os métodos, demonstraram sensibilidade suficiente para o biomonitoramento da maioria dos analitos em amostras de sangue (CDC, 2008, NIGG et al., 2008, BARBOSA et al. 2005).

Tabela 6. Limites de detecção (LD) e de quantificação (LQ) para os métodos Palmer et al. (2006), Barany et al. (1997) e para o método proposto, para a determinação dos analitos ^{107}Ag, ^{75}As, ^{59}Co, ^{111}Cd, ^{55}Mn, ^{60}Ni, ^{208}Pb, ^{82}Se por ICP-MS.

	Palmer et al. (2006)		**Barany et al. (1997)**		**Método Proposto**	
Analito	**LD (µg L^{-1})**	**LQ (µg L^{-1})**	**LD (µg L^{-1})**	**LQ (µg L^{-1})**	**LD (µg L^{-1})**	**LQ (µg L^{-1})**
Ag	0,005	0,016	0,008	0,027	0,008	0,027
As	0,03	0,1	0,04	0,13	0,02	0,067
Cd	0,006	0,02	0,01	0,03	0,04	0,13
Co	0,005	0,016	0,02	0,06	0,009	0,03
Mn	0,06	0,2	0,11	0,36	0,003	0,01
Ni	0,18	0,6	0,18	0,6	0,09	0,027
Pb	0,03	0,1	0,04	0,13	0,04	0,13
Se	0,3	1,0	0,9	3,0	0,1	0,33

Posteriormente, foram feitos estudos de repetibilidade (no mesmo dia e em diferentes dias de análise), comparando os resultados encontrados para a análise do material de referência ICP-07B03 entre o método proposto, o método de Barany et al (1997) e o de Palmer et al. (2006). O material de referência (ICP-07B03) foi analisado pelos três métodos durante 10 dias e foram construídos gráficos do tipo *scatterplot* (Figuras 12, 13, 14 e 15), demonstrando a repetibilidade no mesmo dia (n=3) e a repetibilidade entre diferentes dias de análise (n=10), para os elementos ^{107}Ag, ^{75}As, ^{111}Cd, ^{59}Co, ^{55}Mn, ^{60}Ni,^{208}Pb e ^{82}Se. Os pontos não apresentados no gráfico estiveram fora dos valores aceitáveis do Material de Referência.

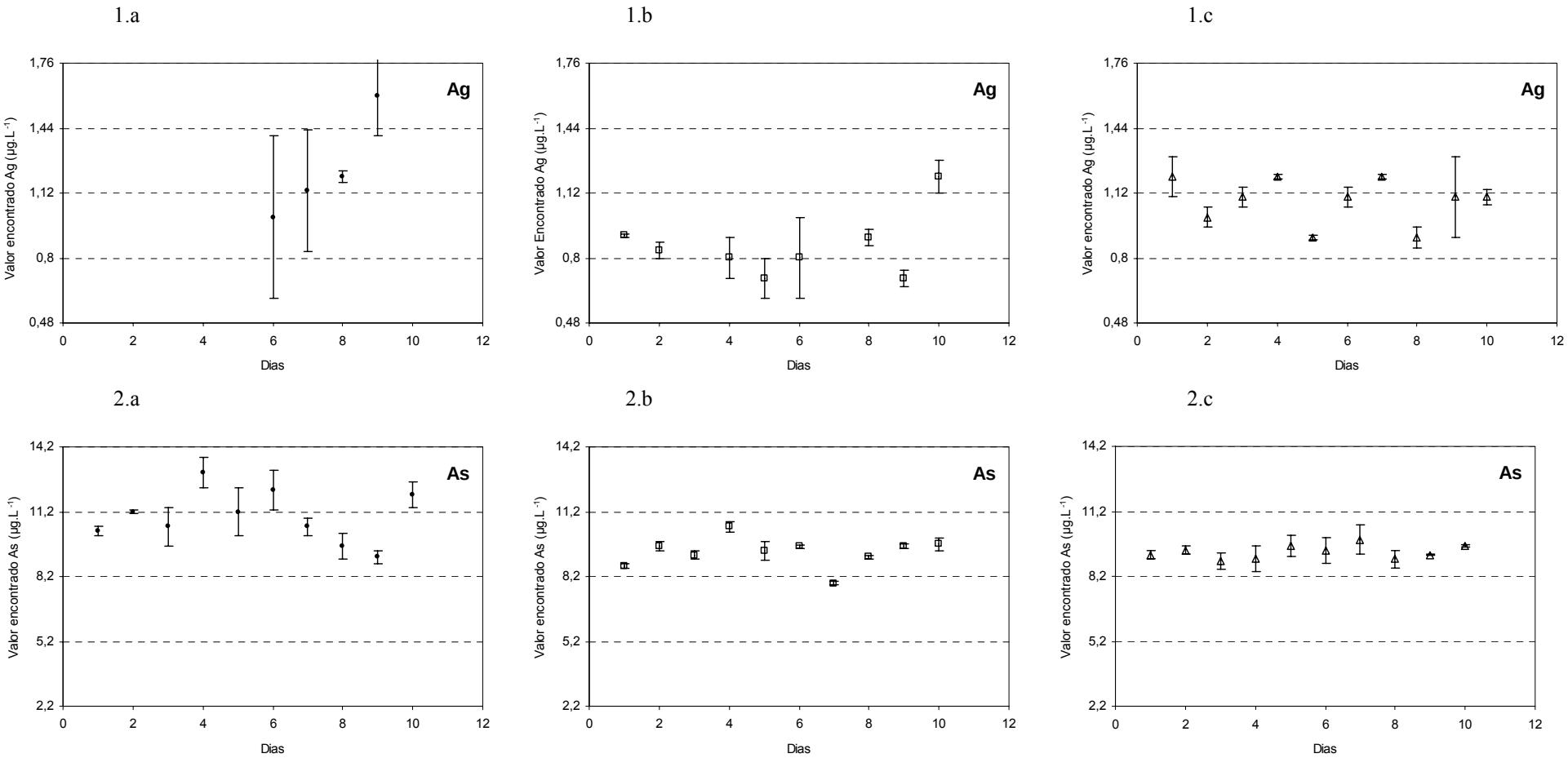


Figura 12. Estudo do coeficiente de variação das medidas no mesmo dia de análise (n=3) e em diferentes dias (n=10) para os métodos de Palmer et al. (a), Barany et al. (b) e o método proposto (c), para Ag e As em sangue por ICP-MS**.** O gráfico mostra a distribuição dos valores encontrados nos diferentes dias de análise. No eixo y encontra-se o valor alvo do Material de Referência de sangue (ICP-07B-03) e seus respectivos desvios (± SD). As médias e desvios-padrão foram calculados com 3 medidas/dia (repetibilidade) durante 10 dias.

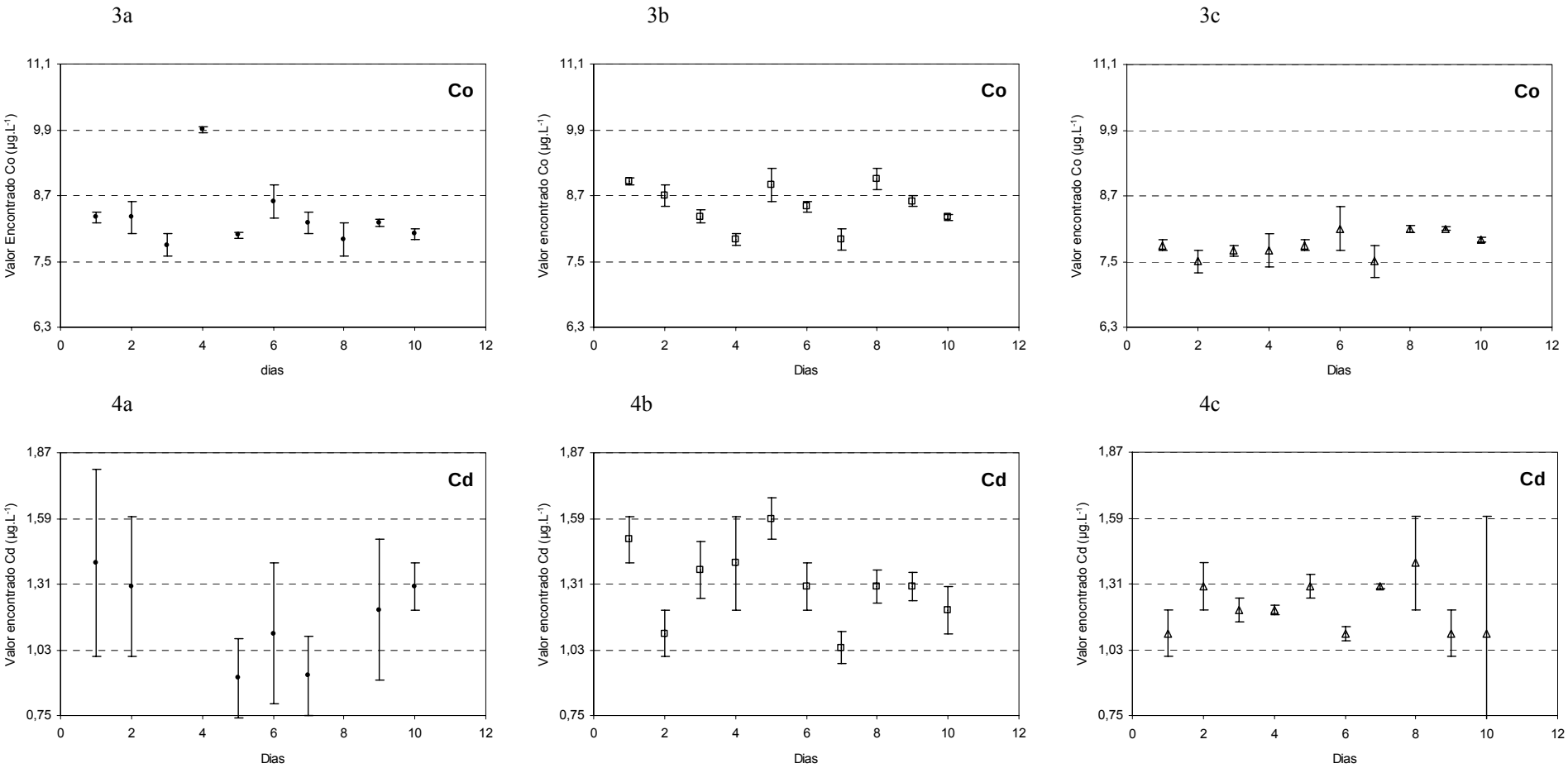


Figura 13. Estudo do coeficiente de variação das medidas no mesmo dia de análise (n=3) e em diferentes dias (n=10) para os métodos de Palmer et al. (a), Barany et al. (b) e o método proposto (c), para Co e Cd em sangue por ICP-MS**.** O gráfico mostra a distribuição dos valores encontrados nos diferentes dias de análise. No eixo y encontra-se o valor alvo do Material de Referência de sangue (ICP-07B-03) e seus respectivos desvios (± SD). As médias e desvios-padrão foram calculados com 3 medidas/dia (repetibilidade) durante 10 dias.

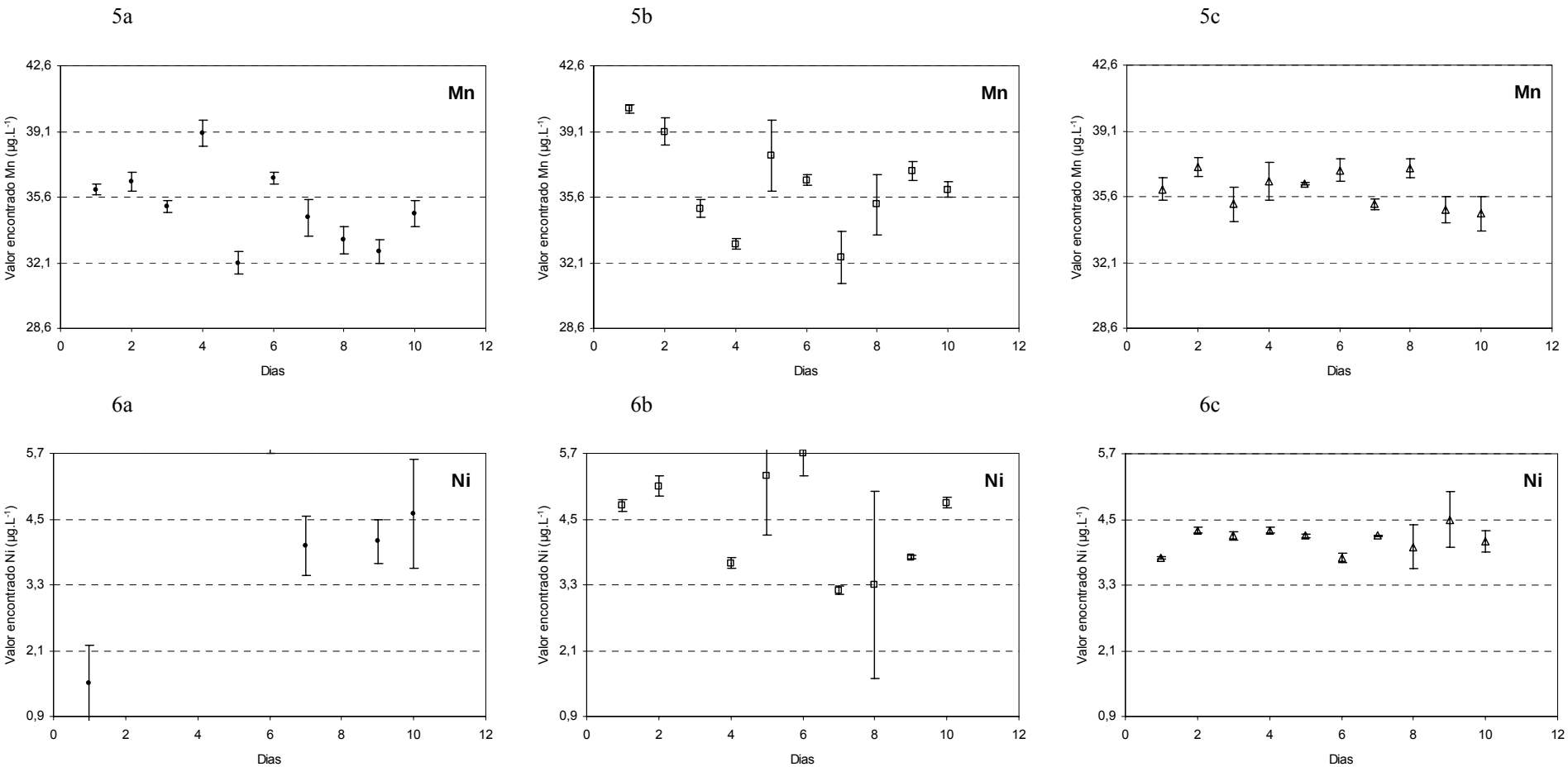


Figura 14. Estudo do coeficiente de variação das medidas no mesmo dia de análise (n=3) e em diferentes dias (n=10) para os métodos de Palmer et al. (a), Barany et al. (b) e o método proposto (c), para Mn e Ni em sangue por ICP-MS**.** O gráfico mostra a distribuição dos valores encontrados nos diferentes dias de análise. No eixo y encontra-se o valor alvo do Material de Referência de sangue (ICP-07B-03) e seus respectivos desvios (± SD). As médias e desvios-padrão foram calculados com 3 medidas/dia (repetibilidade) durante 10 dias.

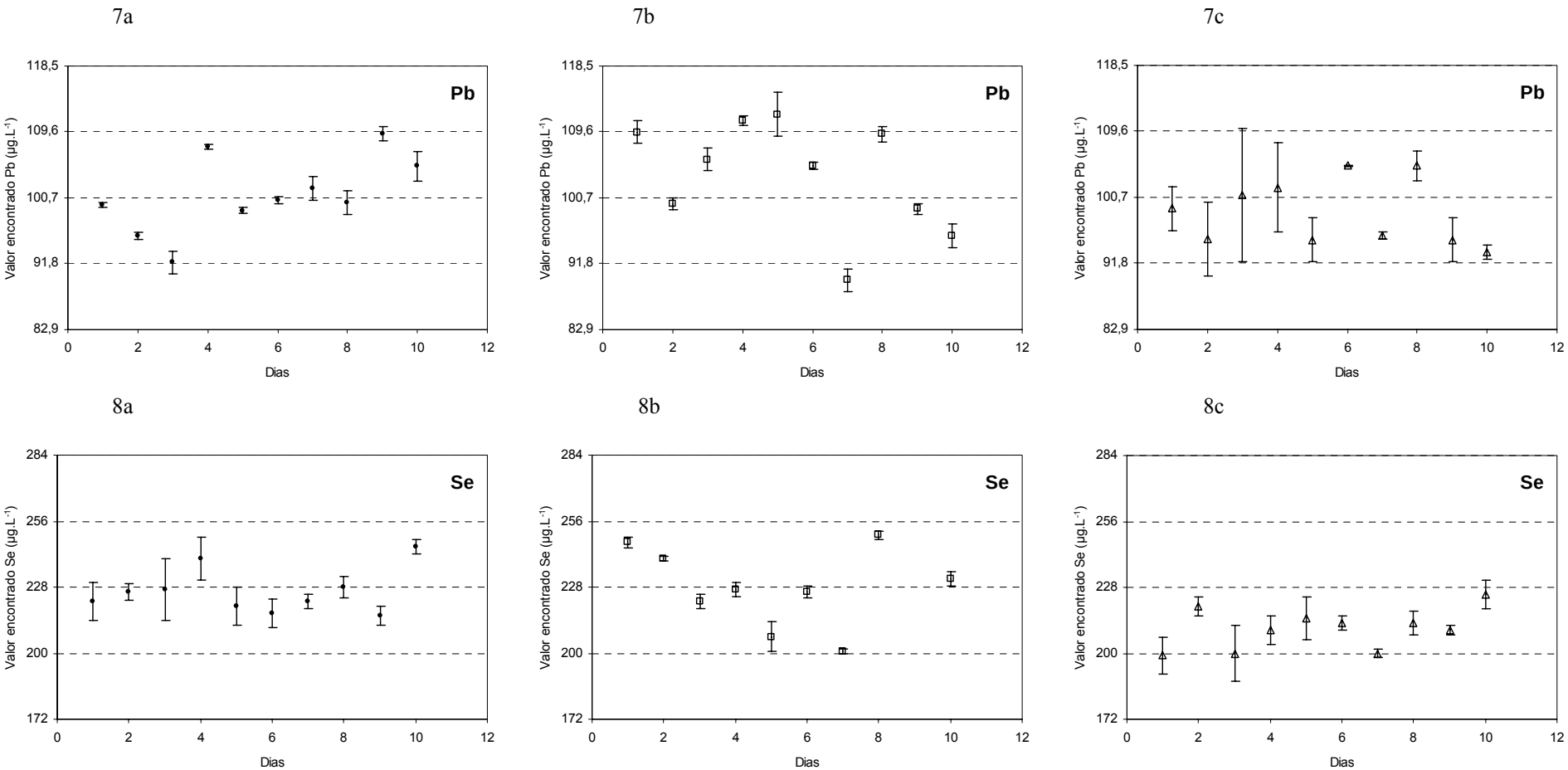


Figura 15. Estudo do coeficiente de variação das medidas no mesmo dia de análise (n=3) e em diferentes dias (n=10) para os métodos de Palmer et al. (a), Barany et al. (b) e o método proposto (c), para Pb e Se em sangue por ICP-MS. O gráfico mostra a distribuição dos valores encontrados nos diferentes dias de análise. No eixo y encontra-se o valor alvo do Material de Referência de sangue (ICP-07B-03) e seus respectivos desvios (± SD). As médias e desvios-padrão foram calculados com 3 medidas/dia (repetibilidade) durante 10 dias.

Os resultados dessa fase do estudo permitem concluir que o método proposto e o método de Barany et al. (1997) em geral apresentaram melhor repetibilidade quando comparados ao de Palmer et al. (2006) para a maior parte dos analitos em estudo. Somente o selênio (^{82}Se) apresentou menor coeficiente de variação entre as medidas durante os 10 dias de análise para o método de Palmer e col. (4,2%) e melhor exatidão (média dos valores encontrados 227 $\mu g.L^{-1}$ ± 9,4 $\mu g.L^{-1}$, média do valor de referência 228 $\mu g.L^{-1}$ ± 14,0 $\mu g.L^{-1}$), (Tabela 7, Figura 15).

Para o cobalto (^{59}Co), o método mais preciso foi o método proposto que apresentou menor variação das medidas entre dias (3,2 %). No entanto, o método que apresentou melhor exatidão para este analito foi o de Barany et al. (1997) (média do valor de referência 8,7 $\mu g.L^{-1}$ ± 1,2 $\mu g.L^{-1}$ e média dos valores encontrados 7,8 $\mu g.L^{-1}$ ± 0,23 $\mu g.L^{-1}$). (Tabela 7, Figura 13)

Para os analitos ^{107}Ag, ^{55}Mn, ^{60}Ni, ^{208}Pb e ^{111}Cd, o método proposto com uso de TMAH apresentou-se mais reprodutível e mais exato com coeficiente de variação das medidas entre dias de 11%, 2,8%, 5,9%, 4,9% e 10%, respectivamente.

Esses resultados podem ser visualizados na Tabela 7 e pelas Figuras 12, 13, 14 e 15.

Tabela 7: Análise do Material de Referência (ICP-07B03) por três diferentes métodos. A média e desvios-padrão (SD) são expressos em função da análise do material em dez diferentes dias em triplicata/dia.

Analito	*Método TMAH*	*Palmer et al. (2006)*	*Barany et al. (1997)*	*ICP-07B03*
	Valor encontrado ($\mu g\ L^{-1}$) ± SD	**Valor encontrado ($\mu g\ L^{-1}$) ± SD**	**Valor encontrado ($\mu g\ L^{-1}$) ± SD**	**Valor alvo ($\mu g\ L^{-1}$) ± SD∗**
Ag	1,0 ± 0,1	0,6 ± 0,6	0,66 ± 0,32	1,12 ± 0,32
As	9,4 ± 0,7	10,0 ± 1,2	8,5 ± 0,7	8,2 ± 3,0
Cd	1,3 ± 0,1	1,2 ± 0,7	1,2 ± 0,2	1,31 ± 0,28
Co	7,0 ±0,1	7,6 ± 0,6	7,7 ± 0,4	8,7 ± 1,2
Mn	35,2 ± 0,4	31,9 ± 2,0	32,9 ± 2,5	35,6 ± 3,5
Ni	3,7 ± 0,2	4,9 ± 2,0	4,2 ± 1,2	3,3 ± 1,2
Pb	95,1 ± 1,9	91,9 ± 5,2	103,7 ± 7,4	100,7 ± 8,9
Se	199 ± 6	226 ± 9	205 ± 16	228 ± 28

∗ Desvio-padrão obtido em relação a 50 laboratórios participantes do *Quebec Multielement External Quality Assesmente Scheme (*QMEAS).

Pode também ser observado na Tabela 7 que para o ^{75}As o método proposto apresentou melhor exatidão (variação 3,4%).

Apesar de o método proposto apresentar os melhores resultados de exatidão para os analitos Ag e Cd para a análise do Material de Referência ICP-07B03, observa-se pelas figuras 12 e 13 altos desvios das medidas para alguns dias de análise (RSD > 15%). Isto pode ter ocorrido devido às baixas concentrações desses elementos no Material de Referência em estudo e estarem próximas ao LD (quando diluídas). Para o selênio foi observado um viés negativo do método proposto em relação ao método de Palmer et al (2006). Isto evidencia que o diluente utilizado no método de Palmer et al. (2006). pode ser mais apropriado para determinação deste elemento em sangue. (Figura 15)

Com relação à aplicabilidade em rotina, dentre os três métodos avaliados o método de Barany et al. (1997), por utilizar uma diluição de 1:10 (v/v), foi o que

apresentou a maior obstrução do nebulizador e do bico injetor durante um longo ciclo de análises. Isto leva a necessidade de constantes limpezas e manutenção do equipamento antes que uma nova análise seja realizada. O mesmo não ocorreu com os métodos de Palmer et al. (1997) e o método proposto nesse estudo. Este aspecto demonstra a inviabilidade do uso do método de Barany et al. (1997) para análise em rotina.

5.3 Terceira fase do estudo

Como demonstrado por diversos autores, a utilização de solventes orgânicos em diferentes matrizes (seção 2), melhora a intensidade do sinal analítico para As, Se, Au e Hg quando comparados aos mesmos sinais com diluentes aquosos. (DRESSLER V. L., POZEBON A. J., CURTIUS A. J 1999, NIXON et. al. 2004, DA VEIGA, MAMS; FRESCURA, VLA; CURTIUS AJ; 2000).

Nesse intuito, após a validação do método proposto e sua comparação com métodos da literatura, foi avaliado o uso de solventes orgânicos (metanol, etanol, isopropanol e butanol) no diluente. Para isso, utilizamos a mesma metodologia de preparo de amostras, com a inclusão do solvente orgânico no diluente, calibração por ajuste de matriz, e análise do mesmo material de referência dos estudos anteriores (INSP ICP 07B03).

Os resultados obtidos são mostrados na Tabela 8 e 9. Um aumento da intensidade do sinal analítico foi observado principalmente para os analitos Se e As com a adição do álcool em relação ao diluente sem adição do solvente orgânico (Figura 16). No entanto, os resultados obtidos para os materiais de referências (INSP ICP 03B03 and ICP 03B06) foram piores em relação à precisão e exatidão (Tabelas 8 e 9) quando comparado ao método sem o uso de álcoois no diluente (Tabela 10). Além disso, o constante uso dos solventes orgânicos no diluente promovia aumento de compostos de carbono nos cones, levando a obstrução e necessidade de limpeza frequente, diminuindo, assim, o número de amostras que poderiam ser analisadas antes da manutenção do equipamento.

Tabela 8: Avaliação da adição de solventes orgânicos (butanol e isopropanol) para determinação de Ag, As, Cd, Co, Mn, Ni, Pb e Se no material de referência de sangue (INSP ICP 07B03 e INSP ICP 07B06) (valores são expressos em μg L^{-1} como média ± SD, n=5).

Analito (Material de referência)	Valor Alvo ± SD	Butanol 1,0% v/v	Butanol 2,5% v/v	Butanol 5,0% v/v	Isopropanol 1,0% v/v	Isopropanol 2,5% v/v	Isopropanol 5,0% v/v
Ag (07B 03)	1,12 ± 0,32	0,9 ± 0,6	1,0 ± 0,3	1,0 ± 0,1	0,4 ± 0,2	25,9 ± 0,6	2,4 ± 0,1
Ag (07B 06)	4,0 ± 0,5	1,4 ± 0,1	3,8 ± 1,4	2,0 ± 0,9	4,3 ± 0,2	4,6 ± 0,4	6,2 ± 1,2
As (07B 03)	8,2 ± 3,0	7,4 ± 0,2	6,2 ± 0,7	6,7 ± 0,8	5,1 ± 1,1	5,8 ± 1,7	7,1 ± 0,6
As (07B 06)	13,5 ± 2,6	12,2 ± 0,1	13,8 ± 0,2	12,4 ± 1,5	11,6 ± 1,0	11,6 ± 1,0	12,8 ± 2,1
Cd (07B 03)	1,31 ± 0,28	0,85 ± 0,4	0,9 ± 0,1	0,9±0,1	0,42 ± 0,01	0,7 ± 0,2	0,27 ± 0,10
Cd (07B 06)	14,0 ± 1,1	12,5 ± 0,9	13,8 ± 1,9	19,0 ± 6,4	13,1 ± 1,6	9,3 ± 1,2	13,3 ± 0,7
Co(07B 03)	8,7 ± 1,2	7,8 ± 0,6	7,1 ± 0,9	5,8 ± 1,5	7,0 ± 0,3	13,1 ± 0,2	8,4 ± 0,6
Co (07B 06)	4,07 ± 0,28	3,00 ± 0,07	3,7 ± 0,5	6,4 ± 0,3	3,5 ± 0,1	3,4 ± 0,1	3,7 ± 0,3
Mn (07B 03)	35,6 ± 3,5	37,9 ± 2,6	38,3 ± 1,0	40,2 ± 2,7	36,3 ± 0,1	44,2 ± 1,1	36,7 ± 5,3
Mn (07B 06)	10,4 ± 1,2	10,9 ± 0,5	14,3 ± 1,2	24,7 ± 2,7	10,9 ± 0,2	11,1 ± 0,9	12,3 ± 0,2
Ni (07B 03)	3,3 ± 1,2	18,9 ± 0,8	9,3 ± 3,4	8,5 ± 6,5	2,5 ± 0,4	2,5 ± 1,2	10,2 ± 2,2
Ni (07B 06)	7,07 ± 1,56	5,71 ± 0,07	13,3 ± 1,6	103 ± 10	7,7 ± 1,2	12,1 ± 0,7	15,5 ± 2,2
Pb (07B 03)	100,7 ± 8,9	97,8 ± 1,0	110,9 ± 1,9	98,5 ± 4,9	79,4 ± 1,5	91,9 ± 2,1	99,9 ± 4,9
Pb (07B 06)	396 ± 26	368 ± 7	403 ± 5	361 ± 10	365 ± 5	333 ± 2	390 ± 12
Se (07B 03)	228 ± 28	192 ± 11	223 ± 28	168 ± 30	174 ± 4	169 ± 12	185 ± 4
Se (07B 06)	459 ± 43	366 ± 21	437 ± 20	369 ± 46	428 ± 11	372 ± 10	429 ± 10

Tabela 9: Avaliação da adição de solventes orgânicos (etanol e metanol) para determinação de Ag, As, Cd, Co, Mn, Ni, Pb e Se no material de referência de sangue (INSP ICP 07B03 e INSP ICP 07B06) (valores são expressos em μg L^{-1} como média ± SD, n=5).

Analito (Material de referência)	Valor Alvo ± SD	Etanol 1,0% v/v	Etanol 2,5% v/v	Etanol 5,0% v/v	Metanol 1,0% v/v	Metanol 2,5% v/v	Metanol 5,0% v/v
Ag (07B 03)	1,12 ± 0,32	0,9 ± 0,1	1,1 ± 0,2	0,81 ± 0,04	0,50 ± 0,02	0,9 ± 0,2	0,2 ± 0,1
Ag (07B 06)	4,0 ± 0,55	2,0 ± 0,2	2,4 ± 0,5	1,0 ± 0,2	4,7 ± 0,1	5,3 ± 0,5	4,8 ± 0,2
As (07B 03)	8,2 ± 3,0	6,8 ± 0,3	6,9 ± 0,7	6,4 ± 0,6	6,3 ± 0,3	6,7 ± 0,2	6,9 ± 0,6
As (07B 06)	13,5 ± 2,6	13,6 ± 0,1	13,3 ± 0,3	13,1 ± 0,2	10,5 ± 0,4	11,1 ± 0,1	10,4 ± 0,7
Cd (07B 03)	1,31 ± 0,28	0,75 ± 0,20	1,09 ± 0,38	0,91 ± 0,20	0,90 ± 0,02	0,80 ± 0,24	0,87 ± 0,36
Cd (07B 06)	14,0 ± 1,1	13,5 ± 0,3	14,3 ± 1,0	12,4 ± 0,2	10,7 ± 0,2	12,2 ± 0,1	11,6 ± 1,0
Co(07B 03)	8,7 ± 1,2	7,0 ± 0,3	8,6 ± 0,1	8,3 ± 0,1	7,0 ± 0,2	7,9 ± 0,3	8,3 ± 0,4
Co (07B 06)	4,07 ± 0,28	3,25 ± 0,09	3,5 ± 0,2	3,6 ± 0,1	2,9 ± 0,2	3,8 ± 0,1	2,7 ± 0,1
Mn (07B 03)	35,6 ± 3,5	34,9 ± 0,3	39,2 ± 2,1	40,1 ± 1,1	35,8 ± 2,5	29,8 ± 0,4	33,9 ± 1,1
Mn (07B 06)	10,4 ± 1,2	12,8 ± 0,2	13,4 ± 0,2	11,1 ± 0,2	9,5 ± 0,4	9,3 ± 0,3	10,4 ± 0,1
Ni (07B 03)	3,3 ± 1,2	4,7 ± 0,2	7,8 ± 0,5	6,3 ± 0,5	4,2 ± 1,4	4,7 ± 0,4	7,6 ± 1,7
Ni (07B 06)	7,07 ± 1,56	11,1 ± 0,5	10,1 ± 1,8	9,6 ± 0,9	10,1 ± 1,3	12,8 ± 0,1	10,7 ± 0,8
Pb (07B 03)	100,7 ± 8,9	102,9 ± 1,2	101,4 ± 1,2	107,2 ± 0,8	89,4 ± 0,6	88,1 ± 1,2	102,9 ± 1,1
Pb (07B 06)	396 ± 26	399 ± 6	388 ± 7	379 ± 8	314 ± 10	357 ± 5	344 ± 3
Se (07B 03)	228 ± 28	187 ± 2	196 ± 4	193 ± 2	183 ± 6	187 ± 1	224 ± 20
Se (07B 06)	459 ± 43	399 ± 8	374 ± 7	383 ± 8	342 ± 4	411 ± 9	413 ± 5

Tabela 10. Análise do material de referência de sangue (INSP ICP 07B03 e ICP 07B06) com o método proposto sem a utilização dos solventes orgânicos no diluente. (valores expressos como média ± SD, n=5)

Analitos	***ICP 07B03***		***ICP 07B06***	
	Valor encontrado (µg/L)	**Valor alvo (Intervalo aceitável) µg/L**	**Valor encontrado (µg/L)**	**Valor alvo (Intervalo aceitável) µg/L**
Ag	1,0 ± 0,1	1,12 ± 0,32	3,6 ± 0,2	4,0 ± 0,55
As	9,4 ± 0,7	8,2 ± 3,0	11,5 ± 0,9	13,5 ± 2,6
Cd	1,3 ± 0,1	1,31 ± 0,28	12,6 ± 0,8	14,0 ± 1,1
Co	7,0 ±0,1	8,7 ± 1,2	4,2 ± 0,1	4,07 ± 0,28
Mn	35,2 ± 0,4	35,6 ± 3,5	9,7 ± 0,2	10,4 ± 1,2
Ni	3,7 ± 0,2	3,3 ± 1,2	6,9 ± 0,3	7,07 ± 1,56
Pb	95,1 ± 1,9	100,7 ± 8,9	391 ± 3	396 ± 26
Se	199 ± 6	228 ± 28	419 ± 10	459 ± 43

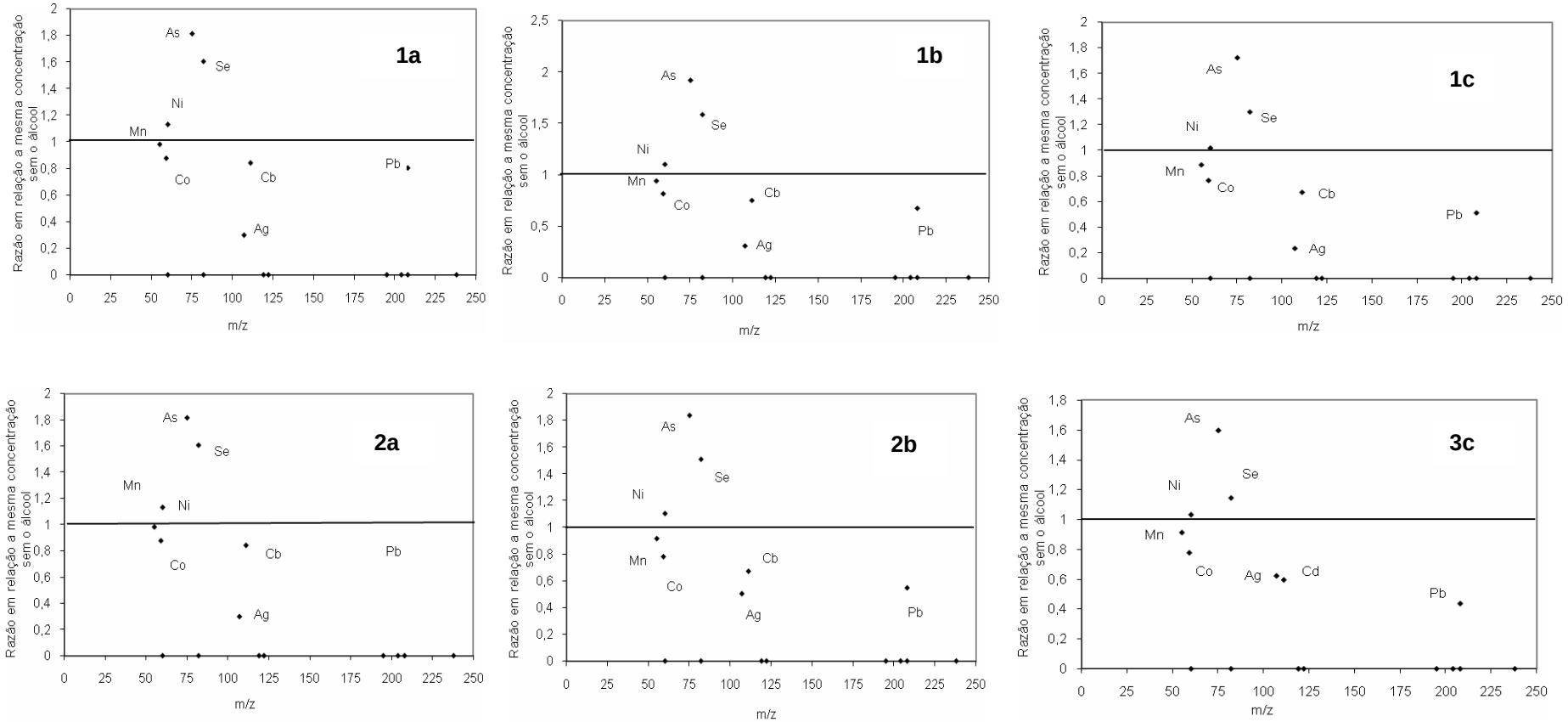


Figura 16: Comparação da intensidade do sinal analítico para o método proposto com a utilização de solventes orgânicos no diluente (etanol e propanol) em relação ao diluente sem adição do solvente. Razão do sinal analítico com o solvente orgânico sobre o sinal analítico sem o solvente orgânico. 1a) 1% etanol; 1b) 2,5% etanol; 1c) 5% etanol 2a) 1%Propanol; 2b) 2,5% propanol; 2c) 5%propanol.

5.4 Quarta fase do estudo

Adicionalmente à validação, na quarta e última fase do estudo, amostras de sangue de 20 indíviduos foram analisadas por ICP-MS utilizando o método proposto e também analisadas por GF AAS para um estudo de comparação envolvendo amostras reais. Quando um estudo envolve comparação entre dois métodos ou técnicas de iguais imprecisões para amostras humanas, além da construção de um gráfico de correlação linear, um gráfico do tipo *Bland-Altman* é recomendado, visto que tal gráfico demonstra de melhor forma se há diferença entre os valores encontrados para ambos os métodos ou técnicas estudadas (BLAND E ALTMAN 1989, BLAND E ALTMAN 1995). No gráfico *Bland-Altman* o eixo x representa a média aritmética dos valores encontrados para os diferentes métodos e o eixo y representa a diferença entre os valores encontrados entre os métodos. A linha tracejada do gráfico delimita ± 2SD da média da diferença dos valores entre as técnicas (métodos).

As Figuras 17 e 18 mostram a comparação dos valores obtidos com o método proposto, utilizando a técnica de ICP-MS e o método utilizando GF AAS. Pode-se observar que não houve evidência de diferenças significativas entre os valores obtidos pelos dois métodos para a análise das 20 amostras, demonstrando mais uma vez a confiabilidade do método proposto neste trabalho.

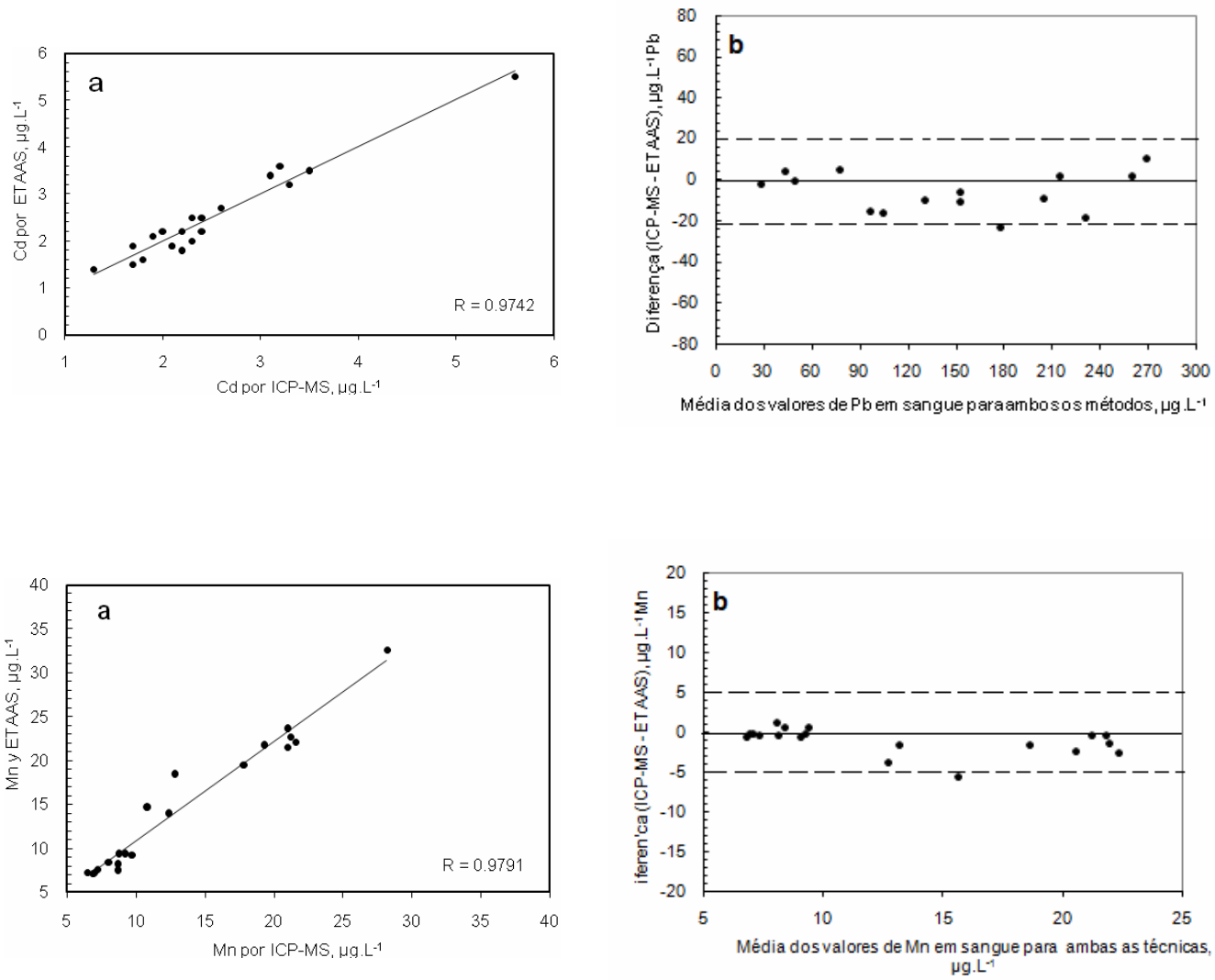


Figura 17: Comparação dos valores obtidos para Cd e Mn com as diferentes técnicas: ICP-MS *versus* ETAAS em 20 amostras de sangue humano. a) gráficos de correlação linear b) gráficos *Bland-Altman.*

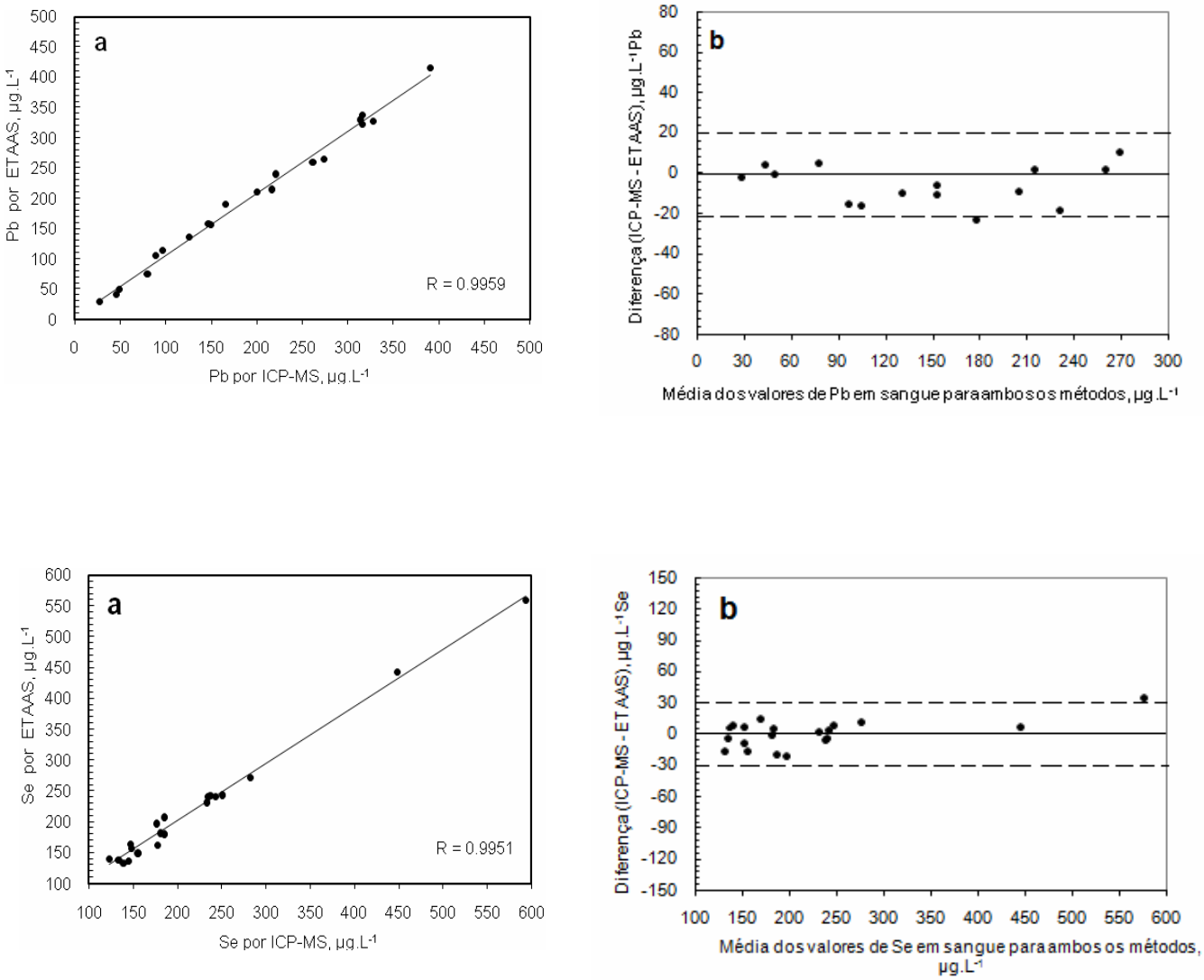


Figura 18: Comparação dos valores obtidos para Pb e Se com as diferentes técnicas: ICP-MS *versus* ETAAS em 20 amostras de sangue humano. a) gráficos de correlação linear b) gráficos *Bland-Altman.*

Conclusão

6-CONCLUSÃO

Neste trabalho pode-se concluir que uma simples diluição das amostras de sangue em meio alcalino com hidróxido de tretrametilamônio (TMAH) é uma boa alternativa aos métodos que sugerem o preparo de amostra assistida por microondas, já que um ganho de tempo de análise substancial é obtido. Com o método proposto até 500 amostras podem ser analisadas em cada semana antes dos procedimentos operacionais de limpeza do ICP-MS. Além disso, a precisão, sensibilidade e exatidão foram aprimoradas com o uso do método proposto quando comparado a dois outros métodos encontrados na literatura.

O TMAH é uma base forte que promove a clivagem de grandes proteínas em fragmentos menores que são melhor dissolvidos, O uso de EDTA nas concentrações de 0,05% também se mostrou favorável para a estabilização dos analitos na solução em meio básico.

Apesar do método de Barany et al. (1997) apresentar bons resultados de variação das medidas entre diferentes dias, tal método não se mostrou eficiente para o uso em análises de rotina, pois freqüentemente era observada obstrução do nebulizador e deposito de resíduos no bico injetor.

O estudo também demonstrou que a utilização de solventes orgânicos no preparo de amostra melhora o sinal analítico de As e Se. No entanto, para os outros analitos houve perda de precisão e exatidão. Além disso, para uma análise em rotina, a utilização de solventes orgânicos no diluente leva a uma maior necessidade de limpeza frequente do equipamento.

Referências Bibliográficas

7-REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA), Resolução 899/2003, Disponivel em: <www,anvisa,gov,br/legis/resol/2003> acessado em maio 2009.

AGENCY FOR TOXIC SUBSTANCES AND DISEASE REGISTRY (ATSDR), **Toxicological profile of lead**, Atlanta Georgia, US Department of Health and human Services, Public Health Services, 2007.

ALIMONT A., PETRUCCI F., SANTUCCI B., CRISTAUDO A., CAROLI S., Determination of chromium and nickel in human blood by means of inductively couple plasma mass spectrometry, **Analytica Chimica Acta**, vol 35-41.

ALLAIN P., JAUNAULT L., MAURAS Y., MERMET J. M., DELAPORTE T., Signal enhancement of elements due to the presence of carbon-containing compounds in inductively couple plasma mass spectrometry, **Analytical Chemistry**, vol. 63, 1497-1498, 1991.

ALLAIN P., JAUNULT L., MAURAS Y., MERMET J. M., DELAPORT T., Signal enhancement of elements due to the presence of carbon-containing compounds in inductively coupled plasma mass spectrometry, **Analytical Chemistry**, vol 63 (14), 1497-1498, 1991.

ALVES A, N,, ROSA H, V, D,, Exposição ocupacional ao cobalto: aspectos toxicológicos, **Brazilian Journal of pharmaceutical Sciences**, vol. 39, n.2, 2003.

AMARASIRIWARDENA C. J., LUPOLI N., PATULA V., KORVICK S., HU H., Determination of the total arsenic concentration in human urine by inductively couple plasma mass spectrometry: a comparison of the accuracy of three analytical methods, **The Analyst**, vol. 123, 441-445, 1998.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS (ABNT)- IMETRO, **Guia para a expressão da incerteza de medição**, 1998.

BARANY E,, BERGDAHL I, A,, SCHUTZ A,, SKERFVING S,, OSKARSSON A, Inductively Couple Plasma Mass Spectrometry for Multi-element Analysis of diluted human blood and serum, **Journal of Analytical Atomic Spectrometry**, vol. 12, 1005-1009, 1997.

BARBOSA F. Jr., TANUS-SANTOS J. E., GERLACH R. F., PARSONS P, A Critical review of biomarkers used for monitoring human exposure to lead advantages, limitations, and future needs, **Environmental Health Perspectives**, vol. 13, 1669-1674, 2005.

BARBOSA F, TANUS-SANTOS J. E., GERLACH R. F., AND PARSONS P. J., Critical Review of Biomarkers usede for monitoring human exposure to lead: Advantages, Limitations and future needs, **Environmental Health Perspectives**, vol 113, 1669-1674, 2005.

BATISTA B. L., RODRIGUES J. L., NUNES J. A., SOUZA V. C. O., BARBOSA F. JR, Exploiting dynamic reaction cell inductively coupled plasma mass spectrometry (DRC-ICP-MS) for sequential determination of trace elements in blood using adilute-and-shoot procedure, **Analytical Chimica Acta,** vol 639, 13-18, 2009.

BATISTA B. L., RODRIGUES J. L., NUNES J. A., TORMEN L., CURTIUS A. J., BARBOSA F., Simultaneous determination of Cd, Cu, mn, Ni, Pb, e Zn in nail samples by ICP-MS after tetrametylammoniun hydroxide solution at room temperature: Comparison with ETASS, **Talanta**, vol. 76, 575-579, 2008.

BLAND J. M., ALTMAN D. G., **Lancet**, vol 1. 307-310, 1986.

BLAND J. M., ALTMAN D, G., **Lancet**, vol 346. 1085-1087, 1995.

BONNEFOY C., MENUDIER A., MOESCH C., LACHÂTRE G., AND MERMET J. M., Validation of the determination of lead in whole blood by ICP-MS, **Journal Analytical Atomic Spectrometry**, vol. 17, 1161-1165, 2002.

CANFIELD R. L, HENDERSON C. R. J., CORY-SLECHTA D. A., COX C, JUSKO TA, LANPHEAR B. P., Intellectual impairment in children with blood lead concentration below 10ppb, **The New England Journal of Medicine**, 248, 2003.

CARVALHO F. M., SILVANY NETO A. M., LIMA M. E.C., TAVARES T. M., AZARO M. DA G. A., QUAGLIA G. M. C., Lead and cadmium in the blood and their realtion to the nutritional status of children in Santo Amaro, Bahia, Brazil, **Revista de Saúde Publica**, vol. 21, n,1, 1987.

CASARETT E DOULL'S, **Toxicology, The Basic Science of Poisons**, 7th ed, 2001.

CENTER OF DISEASE CONTROL AND PREVENTION (CDC). Disponivel em: <http://www,cdc,gov,/biomonitoring/,> acessado em jun, 2008.

CLARKSON Y. W., FRIERG L., NORBERG G. F., and SAGER P. R., Biological Monitoring of toxic Metals, New York, 686, 1988.

D'LLIO S., VIOLANTE N., DI GRAGORY M., SENOFONTE O., PETRUCCI F., Simultaneous quantification of 17 trace elemnts in blood by dynamic reaction cell inductively couple plasma mass spectrometry (DRC-ICP-MS) equipped with a high-efficiency sample introduction system, **Analytical Chumica Acta**, 579, 202-208, 2006.

DA VEIGA M. A. M. S., FRESCURA V. L. A., CURTIUS A,. J., Determination of trace elements in water samples by ultrasonic nebulization inductively couple plasma mass spectrometry after cloud point extraction, **Spectrochimica Acta part B**, vol 55, 803-813, 2000.

DIEGOR W. G., LONGERICH H. P., Parameter interaction in signal optimization of an ICP-mass spectrometer, **Atomic Spectrscopy**, vol. 21, 111-117, 2000.

DOS SANTOS S. B., **Elementos traço em soro sanguíneo medidos pelo método de PIXE e ICP-MS**, dissertação de mestrado, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2007.

DRESSLER V. L., POZEBON A. J., CURTIUS A. J., Introduction of alcohols in inductively coupled plasma mass spectrometry by a flow injection system, **Analytica Chimica Acta**, vol. 379, 175-183, 1999.

ENVIRONMENTAL HEALTH PROTECTION (EPA). <http/www,epa,gov/history/ topics/perspect/lead,htm> acessado em jan, 2009.

FEATHERSTONE A. M., TOWNSEND A. T., JACOBSON G. A., PETERSON G. M., Comparison of methods for the determination of total selenium in plasma by magnetic sector inductively couple plasma mass spectrometry, **Analytica Chimica Acta,** vol. 512, 319-327, 2004.

FIELD M. P., SHAPSES S., CIFUENTES R. M., SHERRELL R. M., Precise and accurate determination of calcium isotope ratios in urine using HR-ICP-SFMS, **Journal of Analytical Atomic Spectrometry**, vol. 18, 727-733, 1999.

FLAMENT P., BERTHO M, L., DEBOOUDT K., VERON A., PUSKARIC E., European isotopic signatures for lead in atmospheric aerosols: a source apportionment based upon Pb-206/Pb-207 ratios, **Science of the Total Environmental**, vol. 296, 35-37, 2002.

GINÉ-ROSIAS M. F., Espectrometria de massas com fonte de plasma acoplado, **Ed. CPG/CENA**, novembro 1999.

GONZÁLEZ A. G., HERRADOR M. A., A practical guide to analytical method validation, including measurement uncertainty and accuracy profiles, **Trend in Analytical Chemistry**, vol. 26, No 3, 227-237, 2007.

HEITLAND P., KÖSTER H. D., Biomonitoring of 30 trace elements in urine of children and adults by ICP-MS, **Clinica Chimica Acta**, vol. 365, 310-318, 2006.

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**, vol 20, 253-262, 2006.

INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER (IARC), **Volume 49: Chromium, nickel and welding**, 1997.

INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER (IARC). **Volume 58: Beryllium, cadmium, mercury and exposures in the glass-manufacturing industry**, 1997.

INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER (IARC). **Volume 84: Some drinking-water, desinfectants and contaminants, including arsenic**, 2004.

INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER (IARC). **Volume 86: Cobalto in hard-metals and cobalt sulfate, gallium arsenide, indium phosphide and vanadium pentoxide,** 2003.

INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER (IARC). **Volume 87: Inorganic and Organic lead compounds**, 2004.

IUPAC Gold Book. Disponível em <http://goldbook.iupac.org. Acessado em dezembro de 2008.

JARVIS K. E., GRAY L. A., HOUK, **Handbook of Inductively Couple Plasma Mass Spectrometry**, Ed, Blackie, New York, 1992.

JUSKO T. A., HENDERSON C. R., LANPHEAR B. P., CORY-SLECHTA D. A., PARSONS P. J., CANFIELD R. L., Blood Lead Concentration Less than 10 micrograms per deciliter and child intelligence at 6 yars of age, **Environmental Health Perspectives**, 2007.

KOPPENAAL D. W., EIDEN G. C., BARINAGA C. J., Collision and reaction cells in atomic mass spectrometry: development, status, and applications, **Journal of Analytical Atomic Spectrometry**, vol, 19, 561-570, 2004.

KREUNING G., MAESSEN F. J. M. J., Effects of the solvent plasma load of various solvents on the excitation conditions in medium power inductively couple plasmas, **Spectrochim, Acta part B**, vol. 44, 367-384, 1989.

KREUNING G., MAESSEN F. J. M. J., Organic solvent load of inductively couple argon plasma as a function of the liquid uptake rate and the inner gas flow rate, **Spectrochim, Acta part B**, vol 42, 1527-1539, 1987.

LARSEN E. H., STURUP S., Carbon-enhanced Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometric Detection of Arsenic and Selenium and Its Application to Arsenic Speciation, **Journal of Analytical Atomic Spectrometry**, vol 9, 1099-1105, 1994.

LEMIRE M., MERGLER D., HUELB G., PASSOS C. J. S., FILLION M., PHILIBERT A., GUIMARAES J. R. D., RHEAULT I., BORDUAS J., AND NORMAND G., Biomarkers of selenium status in the Amazonian context: Blood, urine and sequential hair segments, **Journal of Exposure Science and Environmental Epidemiology**, 1-10, 2008.

LYON T. D. B., FELL G. S., Evaluation of Inductively Couple Argon Plasma Mass Spectrometry (ICP-MS) for simultaneous Multi-element Trance Analysis in clinical chemistry, **Journal of analytical atomic spectrometry**, vol. 3,265-271, 1988.

MACSHANE W. J., STEVEN P.R., McELPRANG V. W., PASCHAL DAN, A Rugged and transferable Method for determining blood cadmium, mercury and lead with Inductively Couple Plasma-Mass Spectrometry, 2008 no prelo.

MANTON W. I., ROTHENBERG S. J., MANALO M., The lead content of blood serum, **Environmental Research**, vol, 86, 263-273, 2001.

MASSARO EDWARD J., **Handbook of Human Toxicology**, CRC Press, 1997.

MATUSIEWICZ H., SLACHCINSKI M., HIDALGO M., AND CANALS A., Evaluation of varius nebulizers for use in microwave induced plasma optical emission spectrometry, **Journal Analytical Atomic Spectrometry**, vol. 22(9), 1174-1178, 2007.

MAY T. W., WIEDMEYER R. H., A table of polyatomic interferences in ICP-MS, **Atomic Spectroscopy**, vol. 19, 150-155, 1998.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. PORTARIA 1469/00, Disponivel em: <www,comitepcj, sp,gov,br> acessado em maio de 2009.

MONOIA C., SABBIONI E., POSTALI P., PIETRA R., POZZOLI L., GALLORINI M., et al., Trace elements reference values in tissues from inhabitants of the European Comumunity: A study of 46 elements in urine, blood and serum of Italian subjects, **Science Total Environmental**, vol. 95, 89-105, 1990.

MONTASER A., **Inductively Couple Plasma Mass Spectrometry**, USA, 1998.

MUNIZ C. S.,LARCHANTE-GAYON J. M., ALONSO J. I. G., SANZ-MEDEL A., Multi-elemental trace analysis of human serum by double-focusing ICP-MS, **Journal of Analytical Atomic Spectrometry**, vol. 14, 193-198, 1999.

NATIONAL CENTER FOR ENVIRONMENTAL HEALTH (NCEH) Division of Laboratory Sciences (DLS) Second national report on human exposure to environmental chemicals, 2003-2004.

NATIONAL INSTITUTE FOR OCUPATIONAL SAFETY AND HEALTH (NIOSH), <http://www,cdc,gov/niosh/pel88/7440-48,html> acessado jan, 2009.

NEEDHAM L. L., CALAFAT A. M., BARR D. B., Uses and issues of biomonitoring, **International Journal of Higiene and environmental Health**, vol 210, 229-238, 2007.

NEUBAUER K, E VALLKOPF U., **Atomic Spectroscopy,** 20 (2), 64-68, 1999.

NIGG J. T., KNOTTNERUS G. M., MARTEL M. M., NIKOLAS M., CAVANAGH K., KARMAUS W., AND RAPPELY M. D., Low blood lead levels associated with clinical diagnosed: Attention-Deficit/Hiperactivity Disorder and Mediated by waek Cognitive Control, **Biological Psychiatry**, vol. 63, 325-331, 2008.

NIXON D. E., MOYER T. P., Routine Clinical Determination of lead, arsenic, cadmium, and thalium in urine and whole blood by Inductively Couple Plasma Mass spectrometry, **Spectrochimica Acta part B**,vol, 51, 13-15, 1996.

NIXON D. E., NEUBAUER K. R., ECKDAHL S. J., BUTZ J. A., BURRITT M. F., Comparison of tunable bandpass reaction cell inductively couple plasma mass spectrometry for the determination of heavy metals in whole blood and urine, **Spectrochim, Acta**, vol 57, 951-966, 2002.

NIXON D. E., NEUBAUER K. R., ECKDAHL S. J., BUTS J. A., AND BURRITT M. F., Comparison of tunable bandpass reaction cell inductively couple plasma mass spectrometry with conventional inductively couple plasma mass spectrometry for the determination of heavy metals in whole blood and urine, **Spectrochimica acta part b, Atomic Spectroscopy**, vol, 59, 1377-1387, 2004.

PALMER C. D., LEWIS M. E., GERAGHTY C. M., BARBOSA F., PARSONS P. J., Determination of lead, cadmium and mercury in blood for assessment of environmental exposure: A comparison between inductively couple plasma mass spectrometry and atomic absorption spectrometry, **Spectrochim, Acta, part B**, vol. 61, 980-990, 2006.

PARSONS P. J., BARBOSA F., Atomic Spectrometry and trend in clinical laboratory medicine: mini review, **Spectrochimica Acta part B**, vol. 62, 992-1002, 2007.

PASCHAL D. C., KATHELEEN L., CALDWEEL AND TING B. G., Determination of lead in whole blood using Inductively couple Argon plasma mass spectrometry with isotope dilution, **Journal Analytical Atomic Spectrometry**, vol, 10, 367-370, 1995.

RODRIGUES J. L., BATISTA B. L., NUNES J. A., PASSOS C. J. S., BARBOSA F. Jr, Evaluation of the use of human hair for biomonitoring the deficiency of essential and exposure to toxic elements, **Science of Total Envroment**, vol405 370-376, 2008.

RODRIGUES J. L., NUNES J. A., BATISTA B. L., de SOUZA S. S., BARBOSA F., A fast method for determination of 16 elemts in hair samples by icp-ms with tetramethylamonium hydroxide solubilization at room temperature, **Journal of Analytical Atomic Spectrometry**, vol, 23, 992-996, 2008.

RODUSHKIN I., ÖDMAN F., BRANTH S., Multielement analysis of whole blood by high resolution inductively couple plasma mass spectrometry, **Fresenius Journal Analytical Chemistry**, vol,364, 338-346, 1999.

RODUSHKIN I., ÖDMAN F., OLOFSSON R., AXELSSON M. D., Determination of 60 elements in whole blood by sector field inductively couple plasma mass spectrometry, **Journal Analytical Atomic Spectrometry** vol 15, 937-944, 2000.

RUGBY J., An experimental-study on silver in the nervous-system and aspects of its general cellular toxicity, **Danish medical Bullentin**, vol, 37, 442-449, 1990.

RUKGAUER M., KLEIN J., KRUSE-JARRES JD., Reference values for the trace elements copper, manganese, selenium and zinc in serum/plasma of children adolescents and adults, **Journal of Trace Elements in Medicine and Biology**, vol. 11, 92-98, 1997.

SAVORY J., WILLS M. R., Trace-Metals – Essential nutrients or toxins, **Clinical Chemistry,** vol 38, 1565-1573, 1992.

SEIZE OGA, **Fundamentos de Toxicologia**, seg. Ed,, Atheneu, 2003.

SKOOG D. A., HOLLER F. J., E NIEMAN T. A., Princípios **de Analise Instrumental**, 5ª Ed Bookman, 2002.

SUTTON K. L., CARUSO J. A., Liquid chromatography-inductively couple plasma mass spectrometry, **Journal of chromatography A,** 856,243-258, 1999.

THOMAS V. M., SOCOLOW R. H., FANELLI J. J., AND SPIRO T. G., Effects of reducing lead in gasoline: An analysis of internal experience, **Environmental Science and Techonology**, vol 33 (22), 1999.

TOWNSEND A. T., MILLER K. A., McLEAN S., ALDOUS S., The determination of copper, zinc, cadmium and lead in urine by resolution ICP-MS, **Journal of Analytical Atomic Spectrometry**, vol. 13, 1213-1219, 1998.

TYLER G., *ICP-MS:* Instruments at Work*,* **Varian**, ICP-MS-1, 1-7, 1994.

VUOLO J. H., **Fundamentos da teoria de erros**, 2ª Ed., São Paulo, 152-153, 1996.

WAKEFIELD J., Lead Effects, **Environmental Health Perspectives**, Vol 110, No 10, 2002.

YOSHIOKA N., NAKSHIMA H., HOSODA K., EITAKI Y., SHIMADA N., OMAE K., Urinary excretion of an oxidative stress marker, *8-hydroxiguanine* (8-OH-Gua) among nickel-cadmium battery workers, **Journal Occupational Health,** vol 50, 229-235, 2008.

ZANÃO R. A., BARBOSA F. Jr, SOUZA S. S., KRUG F. J., ABDALLA A. L., Direct determination of selenium in whole blood by electrothermal atomic absorption spectrometry using W–Rh-coated platform and co-injection of Rh as Thermalstabilizer, **Spectrochimica Acta**, vol 57, 291-301, 2002.

ZHOU Y., ZANÃO R. A., BARBOSA F., PARSONS P. J., KRUG F. J., Investigations of a W-Rh permanent modifier for the determination of Pb in blood by electrothermal atomic absorption spectrometry, **Spectrochimica Acta**, vol 57, 1291-1300, 2002.

ZHOU Y., ZANÃO R. A., BARBOSA F., PARSONS P. J., KRUG F. J., Investigations of W-Rh permanent modifier for the determination of Pb in blood by electrothermal atomic, absorption spectrometry, **Spectrochimica acta part B- Atomic Spectroscopy**, vol. 57, 1291-1300, 2002.