AUTARQUIA ASSOCIADA À UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

Determinação dos níveis de chumbo em amostras de sangue por meio da técnica de fingerstick associada à espectrometria de massas de alta resolução com fonte de plasma acoplada indutivamente (HR/ICP/MS)

Newton Soldá

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do Grau de Mestre em Ciências na Área de Tecnologia Nuclear - Aplicações

**Orientador:
Prof. Dr. Jorge Eduardo de Souza Sarkis**

**São Paulo
2011**

AGRADECIMENTOS

Ao Professor Doutor Jorge Eduardo de Souza Sarkis, coordenador do Grupo de Caracterização Isotópica do Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares (IPEN), pela orientação deste trabalho.

À banca examinadora composta pelas professoras doutoras Maria Lúcia Cocato e Cibele Bugno Zamboni.

Ao Centro de Química e Meio Ambiente (CQMA) e ao IPEN pela infraestrutura disponibilizada.

Aos colegas do Grupo de Caracterização Isotópica pelo companheirismo em todos os momentos.

À mestrandia Talita Aparecida de Oliveira pela ajuda nas ilustrações.

À pós-doutoranda Juliana Azevedo (IPEN) pelas críticas apresentadas durante a elaboração da dissertação de mestrado.

À Juliana Pacheco da Faculdade de Filosofia e Ciências e Letras Humanas da USP (FFCLH/USP) pelas críticas e revisão gramatical durante a elaboração da dissertação.

Ao pesquisador Doutor Ernesto Diaz, pelo suporte técnico no laboratório.

Ao Professor Doutor Roberto Bockzo, do Instituto Astronômico e Geofísico (IAG/USP), primeiro professor de física do ensino médio, por ter me despertado ao fascinante mundo da mais básica das ciências.

Ao Professor Doutor Wayne, do Instituto de Física da Universidade de São Paulo (IF/USP), que me ensinou a importância de termos uma linguagem precisa no mundo científico.

Às colegas do CQMA, Vanessa Lameira, Juliana Isidoro e Débora Salvin, pela ajuda nas horas certas.

À professora de inglês, Elide Mastena, pela ajuda nas traduções.

Às funcionárias da secretaria de pós-graduação do IPEN Maria do Rosário e Ana Maiorino, pelo apoio na documentação.

Às amigas do IF/USP, Flávia Volcov e Andréa Taschetto, pelo companheirismo e amizade durante e depois da graduação.

Ao Lama Michel Rimpoche, meu guru, por ter me ajudado a ter paz espiritual, tolerância e compaixão durante a execução deste trabalho.

À memória de José Alberto Ochi, pelas oportunidades como monitor no IF/USP.

À Célia Martins pelo carinho e energia positiva em todos os momentos.

À Deus e aos meus pais por terem me dado vida.

A todas as pessoas que sempre me acompanharam e me acompanham.

Oh Mane Padme Hum. Namastê. Amém.

“Enquanto a pessoa não estiver comprometida, pode haver hesitação e chance de voltar atrás (...). Existe uma verdade elementar, cuja ignorância mata inúmeras idéias e planos maravilhosos: que no instante em que a pessoa se compromete, a providência também passa a agir. Começam a acontecer coisas que nunca teriam ocorrido para ajudar essa pessoa (...) incidentes, encontros e ajuda material que a pessoa jamais poderia ter imaginado virem a ela (...). Comece agora.”

Goethe

**DETERMINAÇÃO DOS NÍVEIS DE CHUMBO EM AMOSTRAS DE SANGUE
POR MEIO DA TÉCNICA DE *FINGERSTICK* ASSOCIADA À ESPECTROMETRIA
DE MASSAS DE ALTA RESOLUÇÃO COM FONTE DE PLASMA ACOPLADA
INDUTIVAMENTE (HR/ICP/MS)**

Newton Soldá

RESUMO

Chumbo (Pb) é um elemento tóxico ao qual estão associadas diversas doenças que afligem o ser humano. Dessa forma, o desenvolvimento de novas metodologias para a determinação de Pb no sangue traz uma importante contribuição na monitoração humana exposta a este metal. No presente estudo, é apresentado uma metodologia nova para determinação de Pb utilizando-se a técnica *fingerstick* com filtro de papel em conjunto com a espectrometria de massas de alta resolução em fonte de plasma indutivo (HR/ICP/MS). Os resultados encontrados mostraram-se robustos para uma “digestão total” de cerca de 0,1 g de sangue, em valores de referência, e níveis de chumbo inferiores a 5 $\mu\text{g dL}^{-1}$.

O presente método é pouco intrusivo permitindo a coleta e transporte das amostras à longa distância sem perda de integridade e/ou estabilidade. Dessa forma traz uma importante contribuição para o monitoramento da exposição do metal principalmente no atendimento às comunidades distantes.

DETERMINATION OF BLOOD LEAD LEVELS THROUGH FINGERSTICK TECHNIQUE ASSOCIATED TO INDUCTIVELY COUPLED PLASMA MASS SPECTROMETRY.

Newton Soldá

ABSTRACT

Lead (Pb) is a toxic element to which several diseases affecting human beings are associated. Therefore, the development of new methodologies for the Pb determination in blood represents an important contribution to monitor human exposition to this metal. In the present study, a new methodology for Pb determination is presented using fingerstick techniques for sample collection and lead detection by using a high resolution inductively coupled plasma mass spectrometry technique. The results are robust for total digestion of 0.1 g of deposited blood and lead levels below to 5 $\mu\text{g dL}^{-1}$. This method is less intrusive in comparison with the traditional ones. It allows the collection and transport of samples over long distances without loss of integrity and / or stability. Therefore, it brings an important contribution for monitoring the exposure of this metal mainly in the attendance to remote communities.

LISTA DE TABELAS

TABELA 5.1-Valor médio obtido (com desvio padrão) do analito Pb do branco da amostra.

TABELA 5.2-Valores médios obtidos (com desvio padrão) do analito Pb nas amostras com alíquota de 50 µL.

TABELA 5.3-Valores médios obtidos (com desvio padrão) do analito Pb nas amostras com alíquota de 20 µL.

TABELA 5.4-Valores médios obtidos (com desvio padrão) do analito Pb nas amostras com alíquota de 40 µL com adição de In após a extração.

TABELA 5.5-Valores médios obtidos (com desvio padrão) do analito Pb nas amostras com alíquota de 40 µL com adição de In antes da extração.

TABELA 5.6-Valores médios obtidos (com desvio padrão) do analito Pb no “branco” da amostra.

TABELA 5.7-Valores médios obtidos (com desvio padrão) do analito Pb nas amostras de alíquota de 40 µL com um valor alvo de 4,0 µgdL⁻¹.

TABELA 5.8-Valores médios obtidos (com desvio padrão) do analito Pb nas amostras com a adição da mistura TMAH / TRITON.

TABELA 5.9-Valores da concentração de Pb na amostra QMEQAS08B02.

TABELA 5.10-Resultados obtidos com a série de padrões NIST SEM 955a.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 3.3.1-Rotas do Pb na exposição humana.

FIGURA 3.3.2-Toxicocinética do chumbo no organismo humano.

FIGURA 3.4.1-Esquema com as principais partes do MS.

FIGURA 3.4.2-Tocha de quartzo em operação.

FIGURA 3.4.3-Esquema dos tubos concêntricos da tocha do ICP/MS.

FIGURA 3.4.4-Localização dos cones *skimmer* e *sampler* dentro da interface.

FIGURA 3.4.5-Arquitetura Nier-Johnson reversa.

FIGURA 3.5.1-Procedimento de coleta usando uma lanceta.

FIGURA 3.5.2-Procedimentos necessários para coleta.

FIGURA 4.1.1.1-ICP-MS empregado no trabalho.

FIGURA 4.1.1.2-Detalhes da introdução das amostras.

FIGURA 4.1.1.2-Nebulizador utilizado no trabalho.

FIGURA 4.4.2.1-Coleta do sangue, em seguida, como fica distribuído o mesmo no filtro de papel.

LISTA DE ABREVIATURAS

AAS: Espectrometria de absorção atômica por chama.

ACGIH: Conferência Americana Governamental de Higienistas Industriais.

APDC: Sal ácido amônico.

Ar: Elemento químico Argônio.

ATSDR: Agência para registro de doenças e substâncias tóxicas dos Estados Unidos.

CDC: Centro de Controle de Doenças dos EUA.

CQMA: Centro de Química e Meio Ambiente (IPEN/CNEN/SP).

DIN: Nebulizador de Injeção Direta.

dL: Decilitro

EDTA: Ácido etileno diamino tetra acético.

EP: *Erythrocyte Protoporphyrin*.

ETV: Vaporização Eletrotérmica.

FP: Filtro de Papel.

GFAAS: Espectrometria de absorção atômica em forno de grafite.

ICP: Fonte de Plasma Induzido.

ICP/MS: Espectrometria de massas com fonte de plasma indutivo.

ICP/OES: Espectrometria de emissão atômica com fonte de plasma indutivo.

In: Elemento químico Índio

IPEN: Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares (São Paulo/SP/Brasil).

KDHE: Departamento de Saúde e Meio Ambiente (Kansas/Estados Unidos).

LD: Limite de detecção.

LQ: Limite de quantificação.

mL: mililitro

μL: microlitro

MS: Espectrômetro de massas.

NIST: *National Institute of Standard and Technology*

NRC: Conselho Nacional de Pesquisas dos EUA.

Pb: Elemento químico Chumbo.

Pb/S: Concentração de chumbo no sangue.

PI: Padrão Interno.

QMEQAS: *Quebec Multielement External Quality Assessment Scheme*

RF: Fonte de Radiofrequência.

TMAH: Tetrametil hidróxido de amônia.

WHO: Organização Mundial de Saúde.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	13
2 OBJETIVOS	16
3 REVISÃO DA LITERATURA	17
3.1 Pb no sangue	17
3.2 Grau de exposição de populações sob o efeito do Pb	19
3.2.1 Contaminação no estado da Bahia	19
3.2.2 Contaminação no Alto Vale do Ribeira (SP/PR)	20
3.2.3 Rio Cubatão	21
3.2.4 Helsinki (Finlândia)	21
3.2.5 Silésia (Polônia)	22
3.2.6 Uppsala e Trollhattan (Suécia)	22
3.3 Possibilidades de detecção de metais em seres humanos	23
3.3.1 Técnica analítica para a determinação de níveis de Pb/S	25
3.4 Espectrometria de Massas com Fonte de Plasma (ICP/MS)	26
3.5 Finalidade das técnicas <i>fingerstick</i> e filtro de papel	35
4 METODOLOGIA EXPERIMENTAL	41
4.1 Equipamentos	41
4.1.1 Espectrômetro de massas	41
4.1.2 Bomba peristáltica/Nebulizador	43
4.1.3 Balanças	43
4.1.4 <i>Autosampler</i>	44
4.1.5 Cones do ICP/MS	44
4.1.6 Centrífuga	44
4.1.7 Micropipetas	44
4.2 Materiais/Reagentes	45
4.3 Amostras de Sangue	45

4.4 Procedimentos	45
4.4.1 Preparação da amostra pela extração com solvente	46
4.4.2 Preparação da amostra com processo de “digestão total”	48
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	50
6 CONCLUSÕES	58
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	60

1 INTRODUÇÃO

No organismo humano além dos metais essenciais também são encontrados diversos elementos os quais, a partir de determinadas concentrações, são considerados tóxicos. Os primeiros são importantes para a manutenção da vida e da saúde, apresentam funções ligadas ao desenvolvimento e crescimento de um organismo e concentração no nível de μgg^{-1} ¹. Os metais tóxicos, entretanto, não têm nenhuma função conhecida, além do que, são nocivos, e alguns, acumulativos. Atualmente, os níveis desses metais nocivos estão acima, várias centenas de vezes, dos níveis encontrados num homem da era primitiva. Devido a isso se tornaram causa de muitos tipos de doenças, envelhecimento e até problemas genéticos. São metais que formam compostos solúveis venenosos e que não trazem nenhum benefício aos seres humanos, plantas ou animais, até mesmo em pequenas quantidades. Em outras palavras, não são essenciais à vida, ou mais, ocorrem nas formas que são prejudiciais à saúde quando consumidos ou contatados, alojam-se profundamente dentro de tecidos e organismos do corpo humano. Incluem-se nesse grupo: berílio (Be), mercúrio (Hg), chumbo (Pb), cádmio (Cd), alumínio (Al), bismuto (Bi), bário (Ba), urânio (U), entre outros. Esses metais são onipresentes no ambiente do mundo industrializado^{2, 3}.

Constatou-se que, na década de 80, 1,3 milhões de toneladas de Pb, 6500 toneladas de Cd e 2500 toneladas de Hg foram consumidos nos Estados Unidos a cada ano. Também, estimou-se a liberação de 100000 toneladas de Pb, 5500 toneladas de Cd, 2000 toneladas de Hg no ar e na água. Dentre esses, o Pb é o metal tóxico de uso industrial mais amplo^{2, 4}.

O Pb é um metal cinza-azulado de peso atômico 207,19, ponto de fusão 327,50 °C e o ponto de ebulição 1740 °C. No estado natural é

suficientemente mole para ser cortado com uma faca. Porém, impurezas como o antimônio (Sb), arsênio (As), cobre (Cu) ou zinco (Zn) tornam-no muito duro. Na natureza, o Pb pode ser encontrado em seu estado livre sob quatro formas isotópicas (PM=208, 206, 207 e 204 em ordem de abundância) e ocasionalmente na forma metálica⁵.

É um dos primeiros metais que o homem aprendeu a usar e há evidências que já era utilizado na Ásia menor em 4000 aC. Por ser utilizado de forma tão intensiva e por tão longo tempo, relatos de envenenamento por esse metal são extensas. Hipócrates foi o primeiro cientista a ligar os sintomas de intoxicação a seu fator causal. Durante a Idade Média, entretanto, a intoxicação por Pb foi totalmente esquecida, e somente no século XVI apareceu novamente na literatura médica, quando Paracelso descreveu a intoxicação como a “doença dos mineiros”. A concentração de Pb encontrado, na década de 80, em residências urbanas nos Estados Unidos foi 10 vezes maior do que aquelas encontradas nas moradias de indivíduos nas regiões remotas do Himalaia e ordens de magnitude acima daqueles encontrados em resquícios esqueléticos de homens pré-históricos^{4, 6}.

Os riscos de exposição ao Pb variam consideravelmente de um lugar para outro. Em Bangkok, Cidade do México e Jacarta a exposição ao Pb está relacionada à fumaça produzida por automóveis; entretanto, em cidades desenvolvidas como Chicago ou Washington, DC, a exposição está ligada somente à pintura doméstica. Geralmente, a exposição humana ao Pb vem principalmente das seguintes fontes: gasolina, tinta, tubos para suprimento de água, minas e fundição^{6, 7}.

Segundo Apostoli⁸, os efeitos danosos do Pb são mais acentuados nos seguintes compartimentos do corpo humano: sistema nervoso, aparelho cardiovascular, aparelho gastroentérico, sistema endócrino, sistema imunológico, rim, fígado, pulmão, sangue e pele.

Olympio e colaboradores⁹ demonstraram uma importante associação entre a exposição a Pb e o comportamento anti-social em adolescentes. Estes resultados estavam de acordo com pesquisas anteriores realizadas nos Estados Unidos^{10, 11}. Incluindo os diversos fatores de riscos sociais e familiares para o

estabelecimento dos problemas encontrados na análise estatística, a exposição ao Pb se mostrou um dos fatores de risco mais importantes.

Muitos pesquisadores utilizam sangue total, plasma, soro e urina para a determinação de elementos-traço pelo fato de que são importantes em termos bioquímicos e por possuírem fácil acessibilidade. Os testes sanguíneos são principalmente úteis no caso de exposições agudas. O problema reside no fato de que esse tipo de metal é eliminado rapidamente do fluxo sanguíneo e armazenado nos tecidos. Então, testes que visem identificar e medir a concentração de metais tóxicos devem ser feitos logo depois que a exposição ocorreu, não se podendo esperar mais do que um intervalo de dias ou semanas²,

¹².

2 OBJETIVOS

O principal objetivo deste trabalho consiste em desenvolver uma metodologia para a quantificação de chumbo no fluxo sanguíneo baseada na técnica *fingerstick*, pouco intrusiva, com filtro de papel associado para coleta de amostras e a detecção por meio da técnica de espectrometria de massas, de alta resolução, com fonte de plasma induzido (HR/ICP/MS).

3 REVISÃO DA LITERATURA

3.1 Pb no sangue

Os elementos tóxicos precisam ser monitorados nos locais onde os efeitos adversos, em consequência da exposição ambiental, possam causar males ao ambiente, aos animais e aos seres humanos. A monitoração da exposição é um procedimento que consiste em uma rotina de avaliação e interpretação de parâmetros biológicos ou ambientais, com a finalidade de detectar possíveis riscos à saúde. A exposição pode ser avaliada pela medida da concentração do agente químico em amostras ambientais, como o ar (monitoração ambiental), ou por meio da medida de parâmetros biológicos (monitoração biológica), denominados indicadores biológicos ou biomarcadores^{13, 14}.

Biomarcadores reagem à presença de poluentes atmosféricos, porém não com efeitos visíveis. Tais efeitos podem ser mudanças em nível celular, molecular, bioquímico e fisiológico. A detecção de efeitos precisa ser efetuada utilizando técnicas microscópicas e fisiológicas, assim como análises bioquímicas. São principalmente referidos a medidas diretas usadas no diagnóstico ou estimativa de risco dentro do campo de saúde ambiental. Em 1987, o Conselho Nacional de Pesquisa dos Estados Unidos (NRC) desenvolveu o conceito de biomarcadores descrevendo-os com uma série de eventos da exposição propriamente dita até o desenvolvimento da doença motivada pelo envenenamento. São geralmente classificados em três grupos: biomarcadores de exposição, efeito e suscetibilidade. Os do primeiro grupo possuem a habilidade para identificar se uma exposição ocorreu ou não, a rota da exposição e os efeitos resultantes dela. Podemos ter, por exemplo, o sangue de um indivíduo, que pode ser testado para verificar o nível de Pb no sangue (Pb/S) e conseqüentemente

determinar detalhes sobre a exposição que esse indivíduo sofreu. O Pb/S é considerado como o índice mais confiável de exposição ao Pb, porque cerca de 95 % desse metal contido no fluxo sanguíneo está ligado aos eritrócitos. O biomonitoramento do Pb no sangue possibilita a avaliação quantitativa, tanto ocupacional quanto ambiental, dos efeitos nocivos desse metal ao homem. Apesar dos consideráveis esforços feitos para identificar e eliminar as fontes de Pb, ainda existe um interesse significativo na área da saúde, principalmente em relação à preocupação com as crianças. Até aproximadamente 30 anos atrás, o envenenamento crônico de Pb foi definido com um nível de Pb/S acima de 80 μgDL^{-1} , enquanto que atualmente um nível de 30 μgDL^{-1} é considerado excessivo, e níveis na ordem de 10 μgDL^{-1} são considerados particularmente danosos em crianças^{15, 16}

Para a Agência de Registro de Doenças de Substâncias Tóxicas dos Estados Unidos (ASTR), as análises de Pb em sangue total são as mais comuns e precisas para estimar a exposição ao metal. Os testes de *Erythrocyte Protoporphyrin* (EP) podem ser usados, mas não são tão sensíveis em baixas concentrações de traços de Pb sanguíneo ($< 20 \mu\text{gDL}^{-1}$). O Pb no sangue reflete exposições recentes, enquanto medidas no osso são indicadoras de uma exposição acumulativa. Concentrações na urina e no cabelo também são utilizadas para estimar exposição de Pb, entretanto, ambos não são considerados matrizes confiáveis¹⁷.

Com relação às crianças, a ATSDR classificou, em 1988, três níveis de exposição plúmbea:

- (i) baixa exposição: nível de Pb/S no sangue entre 10 μgDL^{-1} e 20 μgDL^{-1} ;
- (ii) exposição moderada: nível de Pb/S entre 21 e 60 μgDL^{-1} ;
- (iii) exposição elevada: nível de Pb/S acima de 61 μgDL^{-1} .

O Centro de Controle e Prevenção de Doenças dos Estados Unidos (CDC) considera elevado um Pb/S em torno de 10 μgDL^{-1} em crianças. A Agência Internacional de Saúde (WHO), definiu a concentração de Pb em “sangue total”

maior que $30 \mu\text{gdl}^{-1}$ em adultos como um indicativo de uma exposição significativa. Definiu, também, recomendações para uma terapia de quelação quando a Pb/S excede $60 \mu\text{gdl}^{-1}$. A legislação brasileira, por meio da Norma Regulamentadora NR-7, Portaria N. 24, da Secretaria de Segurança e Saúde no Trabalho, de 29 de Dezembro de 1994, estabeleceu que o nível de plumbemia é aquele no qual a Pb/S é igual ou superior a $40 \mu\text{gdl}^{-1}$ (Valor de Referência de Normalidade) até o limite de tolerância biológica (Índice Biológico Máximo Permitido), cujo valor é de $60 \mu\text{gdl}^{-1}$ ¹⁸.

Durante a Conferência Americana Governamental de Higienistas Industriais (ACGIH), em 1993, foi estabelecido que o valor limite da exposição ocupacional ao Pb deveria ser controlado em torno de $20 \mu\text{gdl}^{-1}$ ou abaixo, já que mulheres, crianças e fetos são mais sensíveis à exposição do Pb do que homens adultos ¹⁶.

3.2 Grau de exposição de populações sob o efeito do Pb

Abaixo, são descritos, alguns estudos feitos entre a exposição do Pb e seu efeito na população

3.2.1 Contaminação no estado da Bahia

Entre 1960 e 1993, uma fundição primária de Pb, subsidiária do grupo multinacional Peñarroya (produção anual de 11000 a 32000 toneladas de Pb), poluiu intensamente a cidade de Santo Amaro da Purificação (Bahia). Os trabalhadores da fundição, seus filhos e os moradores das regiões próximas à usina foram particularmente afetados. O estudo abrangeu estudo abrangeu crianças de 1 a 4 anos de idade que residiam a menos de 1 km da fundição. Mães ou responsáveis por 47 crianças responderam questionários sobre transtornos do hábito alimentar e outros aspectos epidemiológicos relevantes. O nível médio de Pb no sangue foi de $17,1 \mu\text{gdl}^{-1}$, que é considerado alto quando comparado ao Pb/S do CDC que é de $10 \mu\text{gdl}^{-1}$. Os níveis de Pb no sangue foram cerca de 5

μgdl^{-1} mais elevados em crianças que tinham transtorno alimentar, independente da idade, antecedentes familiares com intoxicação do Pb e poder aquisitivo da família de origem. Em 1989, a empresa foi adquirida por um grupo industrial brasileiro e em dezembro de 1993 encerrou suas atividades¹⁹.

3.2.2 Contaminação no Alto Vale do Ribeira (SP/PR)

O Alto Vale do Ribeira foi palco de intensa atividade de mineração e refino de metais até 1996, quando a empresa Plumbum e as últimas minas de Pb foram fechadas, deixando para trás importante passivo ambiental. No período de 1999 a 2003 realizaram-se estudos do meio físico da saúde humana nos quatro municípios mineiros e em Cerro Azul, localizado fora da região de mineração, escolhido como área de controle.

Os níveis médios de Pb em sangue para as várias comunidades estudadas foram:

- 5,40 μgdl^{-1} na cidade de Ribeira;
- 6,06 μgdl^{-1} na zona urbana de Adrianópolis;
- 11,89 μgdl^{-1} nas proximidades de Vila Mota e Capelinha (situadas próximas à refinaria Plumbum);
- 4,17 μgdl^{-1} na comunidade de Porto Novo (mais afastada da refinaria);
- 5,36 μgdl^{-1} no bairro da Serra (Iporanga);
- 2,37 μgdl^{-1} na cidade de Cerro Azul.

Esses dados revelam que o nível de exposição ao Pb foi registrado entre as crianças residentes nas comunidades mais próximas à refinaria. Como foi mencionado anteriormente, O CDC considera elevado um Pb/S em torno de 10 μgdl^{-1} em crianças.

Os estudos de qualidade ambiental confirmaram a atividade industrial de refino e mineração como a principal fonte de poluição. As emissões de metais para a atmosfera durante décadas de funcionamento da refinaria e subsequente deposição dos particulados foram responsáveis pela contaminação do solo nas áreas habitadas por essas populações. Tais estudos revelaram que, embora as

atividades de mineração e metalurgia tenham cessado em 1996, as populações do Alto Vale do Ribeira ainda conviviam com várias áreas contaminadas, em especial por Pb e As, tipicamente originadas de atividades de extração, beneficiamento e refino mineral²⁰.

3.2.3 Rio Cubatão

O Rio Cubatão é um importante manancial utilizado pela Companhia de Saneamento Básico do Estado de São Paulo (SABESP) para o abastecimento público de cinco municípios da região, fornecendo água tratada a, aproximadamente, um milhão de habitantes. A Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental (CETESB) precede, através de cinco estações de coleta, ao monitoramento de alguns parâmetros físico-químicos das águas do Rio Cubatão. Foi realizado um estudo em seis bairros do município de Cubatão, situados às margens dos principais rios do município, com uma amostragem de 251 crianças de um a dez anos de idade. Determinou-se a concentração de Pb sanguíneo e obteve-se um valor médio igual a $17,81 \mu\text{gDL}^{-1}$ para as crianças consumidoras de organismos aquáticos de origem exclusiva dos rios de Cubatão. Esse valor foi considerado elevado em relação a uma população infantil que não são consumidoras de organismos aquáticos de qualquer origem ($10 \mu\text{gDL}^{-1}$). Não foram encontradas diferenças significativas entre os valores da concentração sanguínea de Pb por sexo e faixa etária²¹.

3.2.4 Helsinki (Finlândia)

Em Helsinki, o Pb no ar atmosférico é controlado desde 1978. Na década de 80 até o ano de 1996 foi feito um programa de monitoração sobre a presença deste metal no sangue de crianças de um a oito anos. O sangue foi coletado pelo meio intravenoso contendo EDTA (ácido etileno diamino tetra acético) como agente anticoagulante. Verificou-se uma queda de $46 \mu\text{gDL}^{-1}$ em 1983 para $30 \mu\text{gDL}^{-1}$ em 1988 e $26 \mu\text{gDL}^{-1}$ em 1996. Apesar disso, esses valores ainda se encontram relativamente preocupantes¹⁶, considerando que para a Agência para

Registro de Doenças e Substâncias Tóxicas (ATSDR) crianças com níveis exposição moderada possuem nível de Pb no sangue na faixa de 21 a 60 μgdl^{-1} , como será visto posteriormente²².

3.2.5 Silésia (Polônia)

Na região de Silésia, Polônia, crianças eram expostas principalmente ao Pb originário da combustão da gasolina aditivada e de processos industriais. O chumbo originário de combustíveis foi a maior fonte de exposição nos anos 90, mas por volta de 2005 a gasolina aditivada de Pb foi totalmente banida. Minas e fundições de Pb operam quase que exclusivamente em Silésia, a mais industrializada e densamente povoada província da Polônia. Um programa de prevenção do envenenamento de Pb foi conduzido em crianças de 3 a 5 anos vivendo no centro urbano dessa província, testadas entre 1993 e 1998, para estimar a exposição ao Pb, e associar o nível de Pb/S com relação as estações do ano, dados de questionários preenchidos pelas famílias das crianças e níveis de Pb local. Foi constatado que aproximadamente 13 % das crianças tinham um nível de Pb/S maior que 10 μgdl^{-1} . Acrescentando, o nível médio de Pb/S diminui de 6,8 μgdl^{-1} em 1993/1994 para aproximadamente 5,5 μgdl^{-1} em 1998²³.

3.2.6 Uppsala e Trollhattan (Suécia)

Foi realizado um estudo da influência de sexo, idade, área residencial e *status* sócio econômico no nível de 13 elementos-traço, no sangue e soro, em adolescentes residentes em duas cidades suecas (Uppsala e Trollhattan), com características diferentes em termos ambientais e socioeconômicos, entre 1993 e 1996.

Em Uppsalla, as emissões de metais eram oriundas da queima de combustíveis fósseis e carvão, enquanto que em Trollhattan eram vindas de fundições. No estudo feito em ambas as cidades tivemos dois grupos amostrais um com adolescentes de 15 anos e outro com 17 anos. Um Uppsala tivemos os seguintes valores médios de Pb/S: 1,7 μgdl^{-1} no grupo amostral de 15 anos e 1,4

μgDL^{-1} no de 17 anos. Enquanto que em Trollhattan tivemos os seguintes valores médios: $2,1 \mu\text{gDL}^{-1}$ no grupo de 15 anos e $1,8 \mu\text{gDL}^{-1}$ no grupo de 17 anos¹⁸. O valores nessa segunda cidade são maiores do que o da primeira talvez devido ao fato das fundições presentes nela. Em ambas as cidades temos valores que segundo a ATSDR estão num nível abaixo do moderado²⁴.

3.3 Possibilidades de detecção de metais em seres humanos

A absorção do Pb pelo homem ocorre principalmente pela inalação (ar atmosférico), sendo correspondente a 30 % até 50 % de toda a absorção. A absorção por ingestão (água, alimentos e solos contaminados) e por via cutânea soma 10 %. Após ser absorvido, é distribuído pelo organismo a outros órgãos de forma lenta e cumulativa. No sangue, é primeiramente ligado aos eritrócitos, sendo em seguida distribuído aos tecidos moles, ossos e dentes. Esta absorção é diferente entre crianças, mulheres gestantes e adultos: os adultos absorvem de 10 a 15 % da quantidade ingerida, enquanto as crianças e mulheres gestantes absorvem mais de 50 %. Os níveis de absorção aumentam quando há deficiência orgânica de ferro, cálcio e zinco. Os estudos mostram que a meia vida biológica desse metal é de 25 dias. Sabe-se que 95 % do Pb no organismo humano é transportado pela hemoglobina. Estudos de algumas populações indicam que até 90 % da carga total absorvida pelos adultos deposita-se nos ossos e o restante (5 %), nos tecidos moles e sangue. Na literatura, há inúmeros relatos encontrados sobre os prejuízos reprodutivos verificados, tanto nos animais como no homem, pela exposição a este metal. Na reprodução, o mecanismo primário pelo qual o Pb produz sua ação tóxica parece ser por alteração no controle hipotalâmico da secreção de hormônios pituitários e por seu turno na espermatogênese. A figura 3.3.1 ilustra as rotas de exposição humana do Pb. Cerca de 60 % do Pb absorvido é retido pelo organismo e 40 %, é eliminado por meio da urina e das fezes (excreção biliar). Todo o metal proveniente da dieta, não absorvido pelo trato gastrointestinal, é excretado nas fezes, assim como o metal proveniente do ar, que também tenha sido ingerido. A quantidade eliminada por qualquer via é

afetada pela idade e pelas características da exposição, além de ser dependente da espécie. Sob condições constantes de exposição a baixas concentrações, sua excreção urinária é de, aproximadamente, 70 % da dose absorvida. A figura 3.3.2 apresenta um esquema geral da toxicocinética do Pb^{25, 26}.

FIGURA 3.3.1-Rotas do Pb na exposição humana⁵.

FIGURA 3.3.2-Toxicocinética do chumbo no organismo humano²⁶.

3.3.1 Técnica analítica para a determinação de níveis de Pb/S

A concentração de Pb no sangue total pode ser determinada pela técnica analítica ICP/MS, que é baseada tanto na tecnologia de quadrupolo (um filtro de natureza eletrostática que só permite a passagem, a cada instante, de íons com determinada relação carga/massa), como na arquitetura Nier-Johnson (um setor eletrostático contido no equipamento pré-seleciona os íons pela sua energia e o setor magnético seleciona os íons pela relação massa/carga). Nessa última, temos uma melhora considerável na produtividade como no limite de detecção (LD). Em uma única varredura, o modo qualitativo de operação é capaz de avaliar todos os elementos da tabela periódica. A composição da matriz do soro é demasiadamente complexa para que seja analisada diretamente por ICP/MS e geralmente a quantidade de amostra é insuficiente para executar-se uma medida direta. Além disso, é muito importante evitar-se os problemas de contaminação, porque resultados significativos podem somente ser obtidos quando todas as fontes de contaminações são eliminadas durante a coleta das amostras de sangue, como, por exemplo, tubos de coleta, anticoagulantes e agulhas^{12, 27, 28}.

Mesmo diante de um quadro onde se tem um avanço tecnológico nos equipamentos de medição, as etapas de coleta e pré-tratamento das amostras continuam sendo aquelas mais difíceis de todo o processo. No caso das coletas, os procedimentos comuns, intravenosos, são muito intrusivos. Expõe pacientes e agentes de saúde a riscos de contaminação, demandam a coleta de uma grande quantidade de material (entre três e cinco mL de sangue) e requerem cuidados especiais para o transporte (tanto no sentido de preservação das amostras, quanto sob o ponto de vista de controles sanitários)²⁹.

No que diz respeito à etapa de pré-tratamento, deve-se ter cuidado com relação à manipulação do material em instalações adequadas, em segurança biológica, com controle de meio ambiente, evitando, com isso, riscos aos operadores e erros nos procedimentos analíticos. A preparação de amostras sólidas, muitas vezes, implica em processos de digestão/dissolução e/ou extração dos analitos antes da medida de suas concentrações. Esses processos são

denominados “via úmida” e serão utilizados para a determinação da concentração de Pb, como será mostrado adiante.

3.4 Espectrometria de Massas com Fonte de Plasma Indutivamente Acoplado (ICP/MS)

A espectrometria de massas (MS) é uma das mais importantes técnicas de análise quantitativa e qualitativa da atualidade. Ela pode ser aplicada nas mais diversas áreas da ciência, como química, biologia, medicina forense, entre outras³⁰.

ICP/MS pode ser entendida como uma técnica analítica que permite a identificação da composição química de um determinado composto isolado, ou de diferentes compostos em misturas complexas, através da determinação de suas massas moleculares na forma iônica, ou seja, com carga elétrica líquida, positiva ou negativa. Ela tem como princípio básico uma fonte de alta energia para excitar um elétron e ejetá-lo do átomo. Esse elétron, quando liberado, torna-se carregado positivamente (íon) o elemento químico. Esses íons são separados por campos elétricos e/ou magnéticos de acordo com a razão massa-carga (m/z) dessas espécies. Um registro é obtido, isto é, o espectro de massas, apresentando os tipos de íons e suas quantidades relativas. De um modo simplificado, a grande maioria dos espectrômetros de massas é constituída de três partes principais: um sistema de fonte de íons, o analisador de massas e o detector. Em acréscimo a esses, ainda há um sistema de vácuo, um dispositivo para introdução da amostra, um sistema de lentes iônicas e um sistema de registro e processamento de dados³¹. A figura 3.4.1 mostra um esquema com as principais partes do MS.

FIGURA 3.4.1-Esquema com as principais partes do MS³².

O desenvolvimento da técnica ICP/MS teve início em 1975 com a procura de uma metodologia de análise substituta para a espectrometria de emissão atômica com fonte de plasma induzido (ICP/OES), principalmente quando da análise multielementar de elementos constituintes em amostras geológicas. Além de apresentar sérios problemas de interferências espectrais, começava-se a sentir, para vários tipos de atividades, a necessidade de atingirem-se limites de detecção ainda menores do que aqueles alcançados pelo ICP/OES. Nos 10 anos seguintes, seu projeto e desempenho sofreram mudanças consideráveis³³.

O plasma indutivamente acoplado (ICP) é um dispositivo no qual ocorre a vaporização, atomização e ionização do aerossol da amostra e o qual permite a análise de soluções aquosas, empregando-se nebulizadores convencionais. Sabe-se que o plasma consiste em um gás ionizado, correndo elétrons livres, íons, átomos e moléculas. O comportamento das partículas no plasma é governado, principalmente, por interações de Coulomb (forças elétricas). O plasma induzido em argônio (Ar), utilizado em química analítica desde a década de 1960, consiste em uma descarga sem eletrodos sobre o gás à pressão

atmosférica e mantida pela energia fornecida por uma fonte de radiofrequência (RF), de 27 ou 40 MHz, que induz um campo magnético oscilante em uma bobina de cobre³⁴.

Há uma grande variedade de tipos de espectrômetros de massas, oferecendo diferentes tipos de filtro de massa, tanto quadrupolo, setor magnético, ou tempo de voo. O ICP/MS não somente oferece um limite de detecção muito baixo (na faixa de pgg^{-1}), como também possibilita um nível de quantificação na faixa de μgg^{-1} . Essa capacidade faz dele uma técnica muito atrativa comparada a outras técnicas de metal-traço. O MS é um dispositivo de detecção para íons gerados pelo ICP. É indubitavelmente a técnica de detecção de elementos-traço de crescimento mais rápido no mercado atualmente. Foi comercialmente introduzida em 1983 e desde então ganhou aceitação geral em muitos tipos de laboratórios espalhados pelo mundo, sendo executada em diversos tipos de aplicações³⁵.

ICP/MS combina a alta temperatura do plasma formado por acoplamento indutivo com um espectrômetro de massas. A fonte de ICP converte os átomos dos elementos químicos contidos na amostra em íons. Então, o feixe iônico é lançado ao espectrômetro de massas, no qual cada íon é separado de acordo com a razão m/z e em seguida detectado por um detector de elétrons. O plasma forma-se numa tocha de quartzo, cujo extremo é centralizado no interior de uma bobina de indução eletromagnética alimentada por uma RF^{34, 35}. A figura 3.4.2 mostra a tocha de quartzo em operação.

FIGURA 3.4.2-Tocha de quartzo em operação³².

Campos magnéticos e elétricos oscilantes são estabelecidos no final da tocha. Quando uma faísca é aplicada ao fluxo de gás Ar através da tocha, os elétrons são removidos para fora dos átomos desse gás. Esses íons são capturados pelos campos oscilantes e colidem com outros átomos de Ar. Dessa forma, tem-se a transferência de energia cinética para os átomos, produzindo mais ionizações, aumentando, assim, o número de elétrons em um processo em cascata, formando a descarga de Ar ou o plasma propriamente dito^{34, 35}.

A tocha constitui-se de três tubos concêntricos com entradas de gás Ar independentes em cada seção anular (vide figura 3.4.3). Na seção anular externa, é induzido tangencialmente o gás com o qual o plasma é gerado. Na seção intermediária, um fluxo de gás auxiliar é utilizado para estabilizar o plasma durante a introdução da amostra e, na seção central, é introduzido o gás que permite o transporte da amostra na forma de aerossol em um plasma de Ar a uma temperatura de aproximadamente 8000 K³⁶.

FIGURA 3.4.3-Esquema dos tubos concêntricos da tocha do ICP/MS³⁶.

Os métodos mais utilizados para a introdução de amostras são: nebulização das amostras líquidas; sistemas nebulizadores-dessolvatadores; introdução direta da amostra do plasma com um DIN (Nebulizador de Injeção Direta); vaporização eletrotérmica (ETV) e vaporização a laser. Os acessórios de introdução de amostras, como dessolvatadores, sistemas *laser ablation* e dispositivos ETV, estão sendo usados mais rotineiramente para melhorar a flexibilidade do ICP/MS. A maior diferença entre esses equipamentos e o sistema convencional de introdução de amostras (“líquido”) é que aqueles geram uma amostra de aerossol “seca”, que exige condições totais diferentes de operação³⁵.

Depois que os elementos químicos da amostra são convertidos em íons, eles vão para o espectrômetro de massas através da região da interface, que é provavelmente a área mais crítica de todo o sistema ICP/MS, pois a amostragem das espécies do plasma e o transporte até o espectrômetro de massa dependem da construção de uma interface adequada. Essa região transmite o fluxo de íons da amostra com Ar numa região em pressão atmosférica (760 Torr) para uma região de baixíssima pressão no espectrômetro de massas, aproximadamente 10^{-6} Torr. A interface compõe-se de dois cones metálicos, de aproximadamente um mm, com perfuração circular no centro, mantidos num vácuo na faixa de um a dois Torr através de uma bomba mecânica rotatória³⁴.

Em seguida à geração dos íons no plasma, esses passam pelo primeiro cone (*sampler*). Numa curta distância alcançam outro cone (*skimmer*), como mostra a figura 3.4.4. Ambos os cones são produzidos em Pt ou Ni, materiais resistentes a altas temperaturas (3000 K). Em virtude dos pequenos diâmetros dos orifícios de ambos, o ICP/MS tem limitações com relação à quantidade de sólidos dissolvidos nas amostras. A recomendação é que elas não tenham mais do que 0,2 % de total de sólidos dissolvidos para um melhor desempenho e estabilidade do ICP/MS. Os íons penetram, então, na região de focalização (lentes eletrostáticas) acelerados e vão de encontro ao espectrômetro de massa, que pode ser constituído de um espectrômetro de massa tipo quadrupolo ou do tipo setor magnético^{34, 35, 36}.

FIGURA 3.4.4-Localização dos cones *skimmer* e *sampler* dentro da interface³⁶.

Basicamente, o que difere um espectrômetro de massa com fonte de plasma quadrupolo de um espectrômetro de massa de dupla focalização é que o sistema analisador de massa do segundo é constituído por um setor magnético acoplado a um setor eletrostático. O setor eletrostático pré-seleciona os íons pela sua energia e o setor magnético seleciona os íons pela relação carga/massa. O projeto do setor magnético foi usado pela primeira vez na espectroscopia molecular para as análises estruturais de compostos orgânicos complexos. Infelizmente, foi considerado inadequado como aparelho de separação para o sistema ICP, pois exigia algumas centenas de volts em tensão na área da interface do plasma para acelerar os íons dentro do analisador de massa. Por esse motivo, mudanças básicas tinham de ser feitas para aperfeiçoar o mecanismo de aceleração como um dispositivo de separação do ICP/MS. A necessidade de se desenvolver um dispositivo de separação mais eficiente foi um desafio significativo quando o sistema setor magnético foi desenvolvido no final dos anos 1980. Entretanto, no início dos anos 1990, projetistas de instrumentos resolveram esse problema colocando componentes de alta voltagem adiante do

plasma e da interface e dentro do espectrômetro de massa. Atualmente, a instrumentação é baseada em duas diferentes abordagens, comumente referidas: Nier-Johnson-standard e Nier-Johnson-reverse. Ambos os projetos usam os mesmos princípios básicos: consistem de dois analisadores, sendo um eletromagnético e outro eletrostático. Na configuração Nier-Johnson-*reverse*, o analisador eletrostático é colocado em primeiro lugar e depois o magnético. A figura 3.4.5 mostra detalhes dessa configuração. Comparados aos analisadores de massa quadrupolo, eles têm poder de resolução e limites de detecção superiores, ainda que o analisador de massa quadrupolo represente 90 % do mercado de ICP/MS³⁷.

FIGURA 3.4.5-Arquitetura Nier-Johnson reversa³⁶.

Embora o ICP/MS tenha diversas vantagens, possui alguns problemas, como por exemplo³²:

- Perda de informação química (concentração total);
- Instrumentação com custo relativamente elevado;
- Limitada ionização de elementos com elevada energia de ionização (halogênios);
- Interferências matriciais: o feixe de íons após o *skimmer* tem alta densidade de cargas positivas e como consequência repele cargas do analito e
- Interferências isobáricas: mesma razão m/z do isótopo mais abundante ou de elementos mono isotópicos.

Por outro lado, é sensível, rápida e exige pequenas quantidades de amostras – uma alíquota de 0,4 mL de sangue ou urina é suficiente. O quadro 3.4.1 abaixo simplificado³⁸ mostra de forma resumida as principais vantagens do ICP/MS em relação aos outros equipamentos analíticos do mercado.

Quadro 3.4.1-Comparação das técnicas elementares.

Critério	GFAAS	ICP-OES	ICP-MS
Limite de detecção	pgg^{-1}	ngg^{-1}	$\text{fgg}^{-1} - \text{pgg}^{-1}$
Faixa Linear	2-3	4-6	9
Interferências	Moderadas	Muitas	Poucas
Velocidade	Lenta	Rápida	Rápida
Faixa de massa coberta	Pobre	Boa	Excelente
Multielementariedade	Não	Sim	Sim
Simultaneidade	Não	Sim	Sim
Quantidade de amostra	μL	mL	μL ou mL
Custo de capital	\$	\$\$	\$\$
Custo operacional	\$\$\$	\$\$	\$

O segundo maior segmento de utilização do ICP/MS está na área biomédica. Comparada com outras áreas, como, por exemplo, a ambiental e a geoquímica, essa área percebeu, de maneira tardia, os benefícios da utilização do

ICP/MS como instrumento de rotina nos laboratórios para estudos sobre elementos-traço em pesquisas criticamente importantes, como a toxicologia. Dentro dela estão sendo executadas análises da determinação de elementos tóxicos (As, Cd ou Pb) no “sangue total”, urina e cabelo³⁷.

Vários métodos com essa técnica para a determinação de diferentes elementos em soro ou sangue total já foram publicados. Como exemplo, pode-se citar o trabalho de Lutz e colaboradores³⁹. Ambos consideram, também, ser essa uma técnica rápida e com uma capacidade de determinação multielementar. Desse modo, pode-se fazê-la como uma técnica ideal para *screening* de grandes populações, visando à obtenção do conhecimento de quais concentrações de elementos-traço são adequadas. Amostras de sangue total, por exemplo, são analisadas por essa técnica diretamente depois de um procedimento de diluição simples ou decomposição de matrizes orgânicas. Entretanto, a determinação de Pb na faixa de $\mu\text{g L}^{-1}$ no sangue é freqüentemente limitado devido a contaminações e impurezas durante o pré-tratamento das amostras, tanto durante a extração, quanto durante a diluição ou digestão^{40, 41, 42}

3.5 Finalidade das técnicas *fingerstick* e filtro de papel (FP) associado

O sangue é a matriz indicada para o monitoramento da maioria dos elementos químicos, devido ao seu contato com o organismo inteiro e seu equilíbrio com órgãos e tecidos, onde estes elementos são depositados. Sua análise, entretanto, tem uma grande desvantagem: ser invasiva, podendo dificultar os estudos epidemiológicos. Então, é de fundamental importância encontrar um procedimento para que se minimize esta dificuldade⁴³.

O teste de gotejamento de sangue para uma análise preliminar (testes de *screening*) já vem sendo desenvolvido há décadas. Esse método utiliza, basicamente, três formas de coleta de material^{44, 45}.

- intravenosa;
- capilar intravenosa;

-punção capilar ou punção de pele, com uma lanceta descartável e esterilizada (*fingerstick*), no dedo ou no calcanhar (conhecido no Brasil como “teste do pezinho”).

Com relação à terceira forma, por ser derramado sobre a pele, o sangue pode ser facilmente gotejado dentro de um minitubo ou esparramado sobre um filtro de papel (FP) apropriado, como ocorrem nos “testes do pezinho”. A figura 3.5.1 mostra a coleta efetuando-se uma picada no dedo com uma lanceta estéril e descartável.

FIGURA 3.5.1-Procedimento de coleta usando uma lanceta⁴⁶.

A punção capilar é utilizada na hematologia, em pesquisa de hemoparasitos, na coleta de amostras para execução de micro técnicas e em provas de coagulação. É uma mistura de sangue venoso e arterial, mas o sangramento é principalmente arterial. O sangue capilar é obtido através da pele especialmente em pacientes pediátricos. A punção da pele ocorre ^{44, 45, 46}.

- Na superfície pósterio-lateral do calcanhar, em crianças até um ano de idade;
- Na polpa do terceiro ou quarto dedo da mão;

-No lóbulo da orelha.

Exemplares capilares são considerados testes de pré-avaliação propensos a resultados altamente falseados em razão da superfície de contaminação, principalmente nos casos em que as mãos do paciente não são lavadas corretamente com água e sabão. Amostras obtidas por agulhas intravenosas são consideradas para testes de diagnóstico porque o gotejamento vai diretamente de uma veia para dentro de um dispositivo de coleta, desse modo evitando-se a contaminação oriunda da superfície da pele. Entretanto, como já mencionamos anteriormente, em virtude de a injeção intravenosa ser intrusiva para crianças e de seu sangue total ser algumas vezes instável, modos alternativos de coleta, estabilização e transporte de exemplares têm sido considerados⁴⁷.

Em 1970, Delves⁴⁸ introduziu uma técnica de micro amostragem para medir traços de Pb em amostras biológicas com o uso de um cadinho de platina denominado “copo de Delves”, sendo uma das primeiras técnicas a proporcionar uma correta estimativa da baixa concentração de Pb em matrizes biológicas complexas. O mesmo autor apresentou, naquela época, uma nova técnica para pré-avaliação: amostras com várias gotas de sangue sobre discos de FP para determinação de Pb. A partir de então, o método de coleta de nódos de sangue em FP para análise de Pb tornou-se atrativo como *screening* para estimar-se o nível de exposição a esse metal.

As análises de Pb no sangue em FP são interessantes pelas seguintes vantagens^{46, 48}:

- (a) Uma pequena quantidade é exigida;
- (b) A coleta de sangue via lanceta descartável é geralmente mais fácil e menos traumática para crianças;
- (c) A coleta pode ser executada por um agente da saúde;
- (d) Amostras em FP apropriadamente preparadas são estáveis e podem ser facilmente transportadas para um determinado laboratório dentro de um malote do correio;

- (e) são de fácil obtenção;
- (f) Há possibilidade de alternarem-se os locais e de ser feita em casa.

As desvantagens são:

- (a) As quantidades limitadas de sangue que podem ser obtidas;
- (b) Falta de precisão que pode oferecer para alguns exames.

O cuidado deve ser levado em conta para prevenir a contaminação no momento de obtenção da coleta das amostras. O seguinte fluxograma (figura 3.5.2) mostra os procedimentos necessários para que as amostras estejam livres de contaminação e adequadas para uma ótima análise.

FIGURA 3.5.2-Procedimentos necessários para coleta⁴⁹.

Adiante, são descritos alguns estudos do método de análise *fingerstick* associado com FP para coleta de sangue para a determinação de traços de Pb. Os autores demonstram que tal método pode ser útil em casos reais (campo) de coleta.

O Departamento de Saúde e Meio Ambiente do Kansas (KDHE) realizou um estudo na cidade de Treece, onde havia uma intensa atividade mineradora para extração de Pb e Zn. Essa atividade foi encerrada nos anos 70, mas temos, ainda, resquícios da mesma nessa região e, por esse fato, tornou-se motivo de interesse, por parte das autoridades desse departamento, observar as consequências causadas por essa atividade mineradora no meio ambiente e na saúde dos habitantes locais. O KDHE coleta e monitora os resultados dos *screens* para Pb/S tanto em adultos como crianças. Esse departamento considera que a metodologia *fingerstick* é a menos invasiva, com um melhor custo efetivo. No *screening* para Pb/S foi realizado um protocolo *fingerstick* em que o gotejamento de sangue é colocado num FP. As amostras obtidas foram analisadas usando um ICP/MS. Os resultados dos *screenings* foram registrados, havendo indivíduos em que o *screen* apresentava um elevado nível de Pb/S. Os membros da área de saúde local eram contatados imediatamente devido a casos de intoxicação⁵⁰.

Holtrop e colegas⁵¹ testaram se o método *fingerstick* com FP podia ser usado como um método alternativo em locais onde o risco de contaminação ambiental por Pb fosse alto. Concluíram que tal método tem alta sensibilidade e especificidade e correlaciona-se muito bem com amostras venosas numa situação de *screening*. A facilidade com que pode ser executado e retirado dos laboratórios faz dele uma micro técnica alternativa atrativa para determinar traços de Pb em amostras sanguíneas.

Srivuthana e colaboradores^{52, 53} desenvolveram um método de determinação de traços de Pb utilizando o GFAAS. Uma quantidade de 50 µL de sangue capilar foi gotejada sobre um FP Schleicher & Schuel 903 paper num círculo de meia polegada de diâmetro. O Pb foi extraído do sangue seco por um tratamento com 0,8 M (5 % v/v) de uma solução de ácido nítrico para gerar uma extração aquosa. O método proposto mostrou-se confiável como teste *screening* de Pb/S.

Shen e equipe⁵⁴ estabeleceram a aplicabilidade de um método de FP para medir a Pb/S em uma larga população geograficamente dispersa de crianças chinesas. Para tanto, utilizou-se o equipamento GFAAS. Os valores obtidos aparentaram ser relativamente estáveis acima de quatro semanas pós-coleta. Os

autores descreveram a facilidade com a qual esta técnica pôde ser executada e a amostra examinada – além de poderem ser enviadas para um laboratório via correio, indicando ser um promissor e atrativo método de referência, particularmente para grandes populações amplamente dispersas. Esse estudo mostrou que tal método pode ser útil no campo de coleta. Foi testada a estabilidade do Pb no FP com EDTA (ácido etileno diamino tetra acético) depois de quatro semanas, tendo sido concluído, como pontuado anteriormente, que é possível enviar as amostras sem problemas a laboratórios especializados em análises de Pb em regiões remotas da China. Portanto, a adição desse agente complexante ao sangue é importante para manter sua estabilidade, ajudando no que se refere ao transporte de regiões distantes de coleta para laboratórios que possuem equipamentos analíticos.

4 MÉTODOLOGIA EXPERIMENTAL

4.1 Equipamentos

4.1.1 Espectrômetro de Massas

Nesse trabalho foi utilizado um espectrômetro de massas de alta resolução com fonte de plasma indutivamente ativado de duplo setor focal modelo *Element* da Finnigan MAT (Bremen, Alemanha), que foi projetado para análises em baixa (300), média (3000) e alta resolução (7500), abrangendo um intervalo de massa atômica de 2 a 260 uma. Esses valores de resolução são suficientes para eliminar a grande maioria dos problemas de interferência por sobreposição (*overlapping*). Além disso, possui uma geometria Nier-Johnson reversa, ou seja, o campo magnético localiza-se na frente do campo elétrico para obter-se o mais alto valor de sensibilidade possível⁵⁵. A figura 4.1.1.1 mostra o modelo empregado neste trabalho.

As análises para determinação de Pb/S no FP foram feitas em baixa resolução porque o elemento químico Pb não possui interferentes que concorrem diretamente aos seus principais isótopos (206, 207 e 208). O mercúrio (Hg) de massa atômica 204 concorre diretamente ao isótopo 204, mas sua abundância é baixa (1,40 %) em relação às outras 3 formas isotópicas do Pb⁵⁶.

FIGURA 4.1.1.1-ICP/MS empregado no trabalho⁵⁵.

No início do experimento, a bomba peristáltica transferiu uma alíquota da amostra preparada, vinda de um tubo Falcon de fundo cônico, contido no *autosampler*, para o nebulizador. Nele tivemos também a entrada do gás de Ar, que misturou com a amostra, que sofreu uma transformação em gotículas de aerossol. A mistura foi “arrastada” em direção a tocha. A figura 4.1.1.2 mostra detalhes da introdução das amostras ao ICP/MS.

FIGURA 4.1.1.2-Detalhes da introdução das amostras³⁸.

No nebulizador, havia um sistema auxiliar de refrigeração com água que ajudava na transformação para aerossol. A figura 4.1.1.3 mostra o nebulizador, o sistema de refrigeração (mangueiras com presilhas), a mangueira de entrada da mistura e um presilha (para evitarem-se vazamentos) entre a saída do nebulizador e a entrada da tocha.

FIGURA 4.1.1.2-Nebulizador utilizado no trabalho.

4.1.2 Bomba peristáltica/Nebulizador

- IPC High Precision Multichannel Dispenser – ISMATEC
- Câmara de nebulização Tipo Scott (PE-Sciex)

4.1.3 Balanças

Para todas as pesagens realizadas, na preparação de amostras e padrões, assim como para calibrações dos materiais utilizados (balões e micropipetas), foram utilizadas dois tipos de balanças: uma balança analítica modelo H54AR da Mettler (Mettler Instrument AG, Zurich, Suíça) e uma balança semi-analítica modelo BG 2000 da Gehaka (Indústria e Comércio Gehaka Ltda, SP, Brasil). Utilizou-se um procedimento de pesagem que envolveu sempre a verificação da calibração da balança através da utilização de pesos-padrão de verificação.

4.1.4 *Auto sampler*

ASX-500 CETAC Model 510: Introduz na ordem de 400 amostras quando está totalmente carregado. Contém um microprocessador que permite coleta de amostras de modo seqüencial ou randômico.

4.1.5 Cones do ICP/MS

Cone do amostrador: Nickel 1,0 mm

Cone do *skimmer* Nickel 0,8 mm

4.1.6 Centrifuga

Centrífuga Excelsa II Mod 206BL 600 w

4.1.7 Micropipetas

Para manipulação quantitativa de pequenas quantidades de soluções de amostras e padrões, foi utilizada uma micropipeta da marca GILSON, modelo M50 (20 a 50 μL), calibrada, automática e especial para coleta de sangue. A calibração da micropipeta visa assegurar a qualidade das atividades realizadas.

4.2 Materiais/Reagentes

- HNO_3 Supra puro
- Índio (In): PI da amostra. Concentração de $10 \mu\text{g.dL}^{-1}$
- Triton X-100: PA – Reagent Plus thiourea – Merck
- TMAH (Tetra metil hidróxido de amônio)
- APDC: Alfa Aesar (USA)
- Álcool isopropílico: PM:60,10 Reagente analítico QUIMEX
- Água obtida por sistema de purificação Milli-Q, com resistividade de $18,2 \text{ M}\Omega\cdot\text{cm}$ a 25°C .
- Tubo modelo FALCON: Fundo cônico com volume de 15 mL cada.
- Bloco de filtro de papel: Marca INTERCIÊNCIA. Modelo Schleicher & Schuel 903 (catálogo # 58370). Com quatro círculos de $\frac{1}{2}$ polegada em cada folha.

4.3 Amostras de sangue

- *New York State PT Program Trace Elements in Whole Blood 2005. Sample TE05-1.* Contendo sangue de boi preservado com K_2EDTA com a seguinte informação: Pb Alvo ($4,0 \pm 0,3$) $\mu\text{g.dL}^{-1}$.
- QMEQAS (*Quebec Multielement External Quality Assessment Scheme*) com as seguintes informações:

- S08B02: Valor Alvo ($16,0 \pm 0,8$) μgdL^{-1}
- S09B02: Valor Alvo ($24,0 \pm 1,6$) μgdL^{-1}
- *Standard Reference Material NIST (National Institute of Standard and Technology) 955a—Lead in blood.* Com as seguintes informações:
 - (1) ($5,01 \pm 0,09$) μgdL^{-1}
 - (2) ($13,53 \pm 0,13$) μgdL^{-1}
 - (3) ($30,63 \pm 0,38$) μgdL^{-1}

4.4 Procedimentos

Os métodos de preparação da amostra devem ser simples, confiáveis e capazes de executar diversas tarefas rotineiramente. A parte mais complexa da análise de traços de metais está na preparação da amostra, porque é nessa etapa que temos a maior chance de obtermos contaminação, que pode afetar a exatidão das medidas. O método preferido de preparação da amostra é por diluição simples com um diluente confiável, que pode ser, por exemplo, o tetra metil hidróxido de amônio (TMAH) para o sangue. Entretanto, isso não é possível para todos os tipos de materiais biológicos. Em determinados casos, devemos utilizar, por exemplo, a “digestão total” com HNO_3 concentrado seguido por filtração ou centrifugação para extrair todos os elementos desejáveis dentro de uma solução, ou até mesmo a utilização da “extração com solvente”.

4.4.1 Preparação da amostra *fingerstick* pela extração com solvente

Inicialmente, pesou-se o filtro de papel limpo, em seguida, depositaram-se alíquotas de 20 e 40 μL respectivamente de amostra de sangue (padrão QUEBEC S09B02/Valor Alvo ($24,0 \pm 1,6$) μgdL^{-1})) nos discos de $\frac{1}{2}$ polegada da folha de FP. Este estudo foi realizado com auxílio de uma micropipeta especial para coleta de sangue (marca Gilson).

Deixou-se, então, a amostra de sangue secar numa capela dentro da sala limpa. O FP com a amostra seca foi guardado em saco plástico durante cinco dias. Em seguida, pesou-se o FP com o sangue seco e anotou-se a massa. Com esses valores obtidos calculou-se a massa do sangue seco, isto é, a porcentagem de umidade. Depois recortou-se no FP o disco tracejado de meia polegada, não deixando vestígio da marca preta, visto que a tinta dessa marca poderia conter traços de chumbo que afetariam o resultado final.

O FP foi pesado, sem levar em conta o círculo tracejado, e anotou-se a massa. Repetiu-se a mesma seqüência anterior, só que sem a amostra de sangue (branco da amostra).

Cada círculo foi cortado em quatro pedaços iguais, e estes pedaços foram colocados, cada um, num tubo de centrifuga diferente devidamente identificado. Tarou-se o tubo de centrífuga, e adicionou-se 4,6 g da solução extração TMAH 0.25 % / Triton X-100 0.05 % / APDC 0.01 % / Isopropanol 1 %, que age como anticoagulante e solubilizante de proteínas e membranas em células sanguíneas, conforme a recomendação de McShane e colaboradores⁵⁷. Para esses autores, a diluição matricial é exigida para:

- (a) diminuir a introdução de sólidos;
- (b) prevenir o entupimento do nebulizador;
- (c) evitar a repulsão de cargas devido a cátions indesejáveis que podem resultar na queda do sinal.

O Triton é um detergente não iônico cuja função é solubilizar proteínas e membranas da célula, O TMAH (tetrametil hidróxido de amônia) tem a finalidade de clivar as proteínas em fragmentos menores e o APDC (sal ácido amônico) é usado para evitar o “efeito memória”⁵⁷.

Após a adição da solução de extração, anotou-se o valor da massa e, então, o tubo foi submetido a um processo de agitação no *vortex*, num intervalo de tempo de 2 minutos, com velocidade de agitação em torno de 2000 Lmin⁻¹ e um descanso de 10 minutos. Uma agitação foi feita novamente no *vortex*, durante 2 minutos, e descanso de mais 5 minutos.

Voltou-se novamente à balança e foi realizado o procedimento de taragem do tubo com a amostra e a solução eluente, adicionando-se, em seguida, solução de índio (In) como padrão interno (PI).

Calculou-se a solução de diluição final estimada, somando-se a massa da amostra seca com a massa da solução de extração e a massa da solução de In, e subtraiu-se de cinco. Pesou-se a massa estimada de solução de extração anotando-se o valor da sua massa.

Antes de as análises no ICP/MS serem efetuadas, essa solução foi submetida a um processo de agitação com uma centrifugação de 3000 rpm em um intervalo de tempo de 3 minutos.

4.4.2 Preparação da amostra *fingerstick* com processo de “digestão total”

Determinou-se traços de Pb pelo processo denominado “via úmida”, no qual amostras de sangue (padrão New York/Alvo ($4,0 \pm 0,3$) $\mu\text{g dL}^{-1}$) em FP são submetidas à uma “digestão” total com HNO_3 concentrado dentro de tubos Falcon. Com o auxílio de uma bomba peristáltica, alíquotas da solução formada foram introduzidas no HR/ICP/MS para efetuar-se a quantificação.

Nos cartões de coleta de sangue, semelhantes àqueles utilizados no conhecido “teste do pezinho”, foram depositadas gotas de sangue, em cada um dos círculos de $\frac{1}{2}$ polegada, utilizando-se a pipeta especial para sangue (modelo Gilson). O sangue foi depositado devagar, com o auxílio do aquecimento de uma lâmpada halógena para secar e evitar o excessivo espalhamento do sangue no papel.

A figura 4.4.2.1 mostra, respectivamente, o procedimento de coleta e à disposição do sangue sobre os círculos.

FIGURA 4.4.2.1-Coleta do sangue, em seguida, como fica distribuído o mesmo no filtro de papel.

Foram preparadas amostras, em triplicata, com o sangue sobre o papel nos seguintes volumes: 25 μL , 50 μL e 100 μL . Além disso, também foram preparadas três amostras sem sangue como amostras em “branco”.

A adição foi realizada com uma micropipeta especial para coleta de sangue da marca Gilson, modelo M50 (20 a 50 μL). Em seguida as amostras foram secas suavemente em estufa já aquecida à temperatura de 55° C, por cerca de 2 horas. Após secagem as amostras são pesadas novamente, para a obtenção da massa seca.

Em seguida foram colocadas em tubos (modelo Falcon de fundo cônico de 15 mL), adicionou-se 0,3 mL (aproximadamente 0,405 g) de HNO_3 subboiling concentrado. O papel com a amostra deve ficar totalmente umedecido com o ácido e no fundo do tubo, que será levado ao banho Maria por 30 minutos a 80°C.

Após ser resfriado, adiciona-se ao tudo 1 g de $\text{In } 10 \text{ ngg}^{-1}$, completa-se com EDTA até a massa final de 10 g. Para terminar os tubos são centrifugados por 2 min a 3000 rpm.

Após essa etapa, os tubos foram resfriados à temperatura ambiente e, a eles foi adicionado 1 mL da solução de padrão interno e o restante do volume de 10 mL foi completado com água milli Q. Finalmente, foram centrifugados a 3000 rpm durante 3 minutos. As amostras foram mantidas em geladeira até a data da análise, sendo analisadas em temperatura ambiente.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Inicialmente fez-se uma avaliação do limite de detecção (LD) e de quantificação (LQ) para o Pb. O LD é definido como a menor concentração do analito que pode ser detectada pela metodologia (equipamento + método de extração) com 95 % ou 99 % de confiança de que esta concentração é maior do que zero. Para a determinação do LD utilizou-se o valor médio de uma série de medidas envolvendo apenas os reagentes utilizados no procedimento analítico, sem amostras de sangue. O LD baseia-se nesse valor médio somado a um fator t s, onde t é um fator igual a 3,143 (para 99 % de confiança), e s é o desvio padrão das medidas.

O LQ é a menor concentração do analito que pode ser determinada com um nível aceitável de precisão e veracidade⁵⁸. Neste trabalho, considerando estar o analito em níveis de traços, o LQ foi definido como 10 vezes o limite de detecção. Os resultados encontrados são apresentados na tabela 5.1.

TABELA 5.1-Valor médio obtido (com desvio padrão) do analito Pb do branco da amostra

Branco da Amostra	[Pb] (μgdL^{-1})
Br1	0,025
Br2	0,021
Média = $(0,023 \pm 0,003) \mu\text{gdL}^{-1}$	

Baseados nos valores da tabela 4.5.1, os resultados encontrados foram:

$$LD = 0,0315 \mu\text{gdL}^{-1}$$

$$LQ = 0,315 \mu\text{gdL}^{-1}$$

Em seguida, foram feitos ensaios utilizando-se alíquotas de 20 e 50 μL da amostra padrão Quebec 09B02, cujo valor alvo para Pb é $(24 \pm 1,6) \mu\text{gdL}^{-1}$. Os resultados são mostrados na tabelas 5.2 e 5.3.

TABELA 5.2-Valores médios obtidos (com desvio padrão) do analito Pb as amostras com alíquota de 50 μL , com um valor alvo de $(24 \pm 1,6) \mu\text{gdL}^{-1}$.

Amostra	[Pb] (μgdL^{-1})
1	26,51 $\pm$ 0,21
2	17,54 $\pm$ 0,25
3	19,36 $\pm$ 0,23
4	22,40 $\pm$ 0,22
Média = $(21,4 \pm 3,9) \mu\text{gdL}^{-1}$	
Recuperação média = 89 %	

TABELA 5.3-Valores médios obtidos (com desvio padrão) do analito Pb nas amostras com alíquota de 20 μL , com um valor alvo de $24,0 \mu\text{gdL}^{-1}$.

Amostra	[Pb] (μgdL^{-1})
1	15,69 $\pm$ 0,14
2	15,25 $\pm$ 0,15
3	12,91 $\pm$ 0,21
4	13,76 $\pm$ 0,17
Média = $(14,4 \pm 1,3) \mu\text{gdL}^{-1}$	
Recuperação média = 60 %	

Observa-se, pelos resultados uma precisão de cerca de 2 %. Na quadruplicada referente às alíquotas de 50 μL tivemos um valor médio de $(21,4 \pm 3,9) \mu\text{gdL}^{-1}$, com uma recuperação média de 89%, enquanto que nas alíquotas de 20 μL tivemos $(14,4 \pm 1,3) \mu\text{gdL}^{-1}$, com uma recuperação média de 60 %. A baixa recuperação encontrada com a alíquota de 20 μL pode estar relacionada à

dificuldade de extração do Pb em função das pequenas quantidades de amostra. Observa-se, entretanto, que o método apresenta uma reprodutibilidade compatível com aquela certificada pelo material de referência.

Nas tabelas 5.4 e 5.5, são apresentados resultados da análise com alíquotas de 40 μL , avaliando-se o melhor processo de adição de PI.

O PI visa corrigir flutuações do sinal do analito devido a problemas no processo de extração e instrumentais. Nesse trabalho utilizou-se uma solução de 0,1 μgdL^{-1} de In. Na tabela 5.4 a adição foi feita após a extração, enquanto que na tabela 5.5 o padrão interno foi adicionado ao FP sofrendo todo o processo de extração junto com a amostra.

TABELA 5.4-Valores médios obtidos (com desvio padrão) do analito Pb nas amostras com alíquota de 40 μL , com adição de In após a extração, com um valor alvo de $(24 \pm 1,6) \mu\text{gdL}^{-1}$.

Amostra	[Pb] (μgdL^{-1})
5	17,02 $\pm$ 0,12
6	17,83 $\pm$ 0,16
7	17,60 $\pm$ 0,18
8	19,85 $\pm$ 0,12
Média = $(18,1 \pm 1,2) \mu\text{gdL}^{-1}$	
Recuperação média = 75 %	

TABELA 5.5-Valores médios obtidos (com desvio padrão) do analito Pb nas amostras com alíquota de 40 μL , com adição de In antes da extração, com um valor alvo de $(24 \pm 1,6) \mu\text{gdL}^{-1}$.

Amostra	[Pb] (μgdL^{-1})
13	18,46 $\pm$ 0,11
14	16,16 $\pm$ 0,21
15	17,50 $\pm$ 0,18
16	19,13 $\pm$ 0,10
Média = $(17,8 \pm 1,3) \mu\text{gdL}^{-1}$	
Recuperação média = 74 %	

Em ambas as tabelas observamos resultados semelhantes tanto para a concentração do analito de Pb como para a recuperação deste. Para a tabela referente à adição de In após a extração, obteve-se um valor médio de $(18,1 \pm 1,2) \mu\text{gdL}^{-1}$, com uma recuperação de 75 %, enquanto que quando da adição de In à amostra antes de depositar-se o filtro obteve-se um valor médio de $(17,8 \pm 1,3) \mu\text{gdL}^{-1}$, com uma recuperação de 74 %, havendo diferença em torno de 1 % em relação ao valor anterior. Em ambos os casos pode-se constatar que, apesar da robustez do procedimento variações podem ocorrer devido à pequena quantidade de amostra depositada e ao processo de extração. Ainda assim os resultados apresentam uma precisão compatível com o padrão de referência.

Observa-se que, de um modo geral, a quantidade de recuperação está fortemente relacionada à quantidade da amostra depositada. Alíquotas de 50 μL apresentaram uma recuperação na faixa de 90 %. Para alíquotas de 40 μL tivemos uma recuperação de 75 %, ao passo que para aquelas de 20 μL tivemos uma recuperação de 60 %.

A segunda série de ensaios foi realizada utilizando-se o método de “digestão total”. Da mesma forma como anteriormente descrito fez-se, inicialmente, um estudo sobre os limites de detecção e quantificação utilizando-se amostras em “branco”. A tabela 5.6 apresenta os valores encontrados nesta etapa.

TABELA 5.6-Valor médio obtido (com desvio padrão) do analito Pb no “branco” da amostra.

Branco da amostra	[Pb] (μgdL^{-1})
Br1	0,020
Br2	0,015
Br3	0,016
Média = $(0,017 \pm 0,002) \mu\text{gdL}^{-1}$	

Seguindo os mesmos procedimentos da determinação de LD e LQ do método extração pelo solvente, obteve-se:

$$LD = 0,0248 \mu\text{gdL}^{-1}$$

$$LQ = 0,248 \mu\text{gdL}^{-1}$$

Os níveis encontrados foram relativamente inferiores ao método anterior provavelmente devido a menor quantidade de reagentes utilizados.

Em seguida, em três amostras de filtro de papel depositou-se 40 μL de sangue (padrão New York) e efetuou-se a digestão das amostras. Cada amostra tinha como valor alvo 4,0 μgdL^{-1} do analito Pb. Os resultados obtidos em relação à concentração de Pb nessas amostras estão na tabela 5.7.

TABELA 5.7-Valores médios obtidos (com desvio padrão) do analito Pb nas amostras de alíquota de 40 μL com um valor alvo (4,0 $\pm$ 0,3) μgdL^{-1} .

Amostra	[Pb] (μgdL^{-1})
1	5,00 $\pm$ 0,25
2	4,30 $\pm$ 0,24
3	6,00 $\pm$ 0,27
Média = (5,10 $\pm$ 0,85) μgdL^{-1}	
Recuperação média = 127,5 %	

Repetiu-se então o experimento adicionando-se à solução de digestão a mistura TMAH 0.25 % / Triton X-100 0.05 %. Os resultados são apresentados na tabela 5.8.

TABELA 5.8-Valores médios obtidos (com desvio padrão) do analito Pb nas amostras com a adição da mistura TMAH / TRITON, com alvo de $(4,0 \pm 0,3) \mu\text{gdL}^{-1}$.

Amostra	[Pb] (μgdL^{-1})
4	$4,60 \pm 0,24$
5	$4,30 \pm 0,24$
6	$3,30 \pm 0,19$
Média = $(4,07 \pm 0,68) \mu\text{gdL}^{-1}$	
Recuperação média = 100,8 %	

Em ambos os casos os experimentos apresentaram uma boa precisão (em torno de 5 %). Como pode ser observada, a adição da mistura digestora melhorou a recuperação do analito de interesse, ou seja, ficou bem próxima de 100 %.

Repetiu-se o experimento com a amostra padrão Quebec 08B02 valor alvo $(16,0 \pm 1,6) \mu\text{gdL}^{-1}$ procurando-se avaliar a robustez para quantidade de amostra em torno de 25 μL , em relação a quantidade de 100 μL . Os resultados de recuperação obtidos, em cada amostra, estão na tabela 5.9.

TABELA 5.9-Valores da concentração de Pb na amostra com alvo de $(16,0 \pm 0,5) \mu\text{gdL}^{-1}$

Amostra	Concentração média (μgdL^{-1})	Desvio (%)	Recuperação (%)
01 (25 μL)	13,07	3	82
02 (25 μL)	12,83	6	80
03 (25 μL)	11,60	4	72
Recuperação média = 78,1 %			
10 (100 μL)	13,15	2	82
11 (100 μL)	12,72	2	79
12 (100 μL)	12,49	3	78
Recuperação média = 79,9 %			

Podemos observar que para esse nível de Pb presente no sangue temos uma diferença na ordem de 2 % entre os valores médios de recuperação.

Finalmente, testou-se a metodologia de “digestão total” analisando-se uma série de padrões NIST com quantidades de Pb na faixa de 5,0 a 30,0 $\mu\text{g dL}^{-1}$, comparando-se os resultados com aqueles obtidos pelo método tradicional com dissolução direta do sangue (SP). Os dados estão apresentados na tabela 5.10.

TABELA 5.10-Resultados obtidos com a série de padrões NIST SRM 955a

Amostra	Alíquota (μL)	Observação	Alvo ($\mu\text{g dL}^{-1}$)	Concentração Medida ($\mu\text{g dL}^{-1}$)	Desvio (%)	Recuperação (%)
1 A	50	Com papel	5,01 $\pm$ 0,09	3,63	8	73
1 B	50			2,43	17	49
1 A	100			5,82	5	116
1 B	100			5,62	6	114
1 C	100			5,76	4	115
1J (SP)	100	Sem papel		5,68	2	113
1K (SP)	100			5,35	6	103
2 A	50	Com papel	13,53 $\pm$ 0,13	10,97	10	80
2 B	50			11,47	12	85
2 C	50			10,65	10	80
2 E	100			13,62	3	101
2 F	100			15,29	3	113
2 G	100	Sem papel		12,93	5	95
2 I (SP)	100			13,30	2	98
2 J (SP)	100			13,36	4	98
2 K (SP)	100			13,45	2	99
3 A	50	Com papel	30,63 $\pm$ 0,32	31,09	2	101
3 C	50			31,61	2	103
3 E	100			32,24	3	105
3 F	100			32,73	4	106
3 G	100			32,73	4	107
3 I (SP)	100	Sem papel		32,05	4	104
3 J (SP)	100			31,94	3	104
3 K (SP)	100			31,07	2	101

Como pode ser observado os níveis de recuperação para todas as faixas estudadas estão comparáveis àqueles obtidos pelo métodos tradicional (sem papel) estando a recuperação em torno de 100 %. Para concentrações menores de Pb a quantidade de amostra depositada apresenta uma maior influencia mas ainda assim , apresenta-se com uma recuperação adequada.

6 CONCLUSÕES

A análise de elementos em nível de traços em amostras biológicas é um grande desafio analítico principalmente considerando-se a dificuldade de transporte dessas amostras a longas distâncias e, no processo, a manutenção da sua estabilidade. Além disso, o processo de coleta da amostra é geralmente muito intrusivo exigindo cuidados com o paciente e pessoal especializado.

A técnica de *fingerstick*, em si, não é uma novidade. Ela é utilizada normalmente nos hospitais principalmente em crianças recém nascidas no chamado “teste do pezinho” que tem o objetivo de detectar, precocemente, doenças metabólicas, genéticas ou infecciosas que podem causar lesões irreversíveis, como por exemplo, retardo mental.

Considerando-se que o valor de referência para exposição de Pb no sangue é na faixa de $10 \mu\text{g dL}^{-1}$, verifica-se que a metodologia pode vir a atender as necessidades analíticas em futuros estudos de caso.

Os experimentos realizados demonstram o potencial analítico da metodologia de *fingerstick* entretanto há de observar que ela só foi possível porque veio associada a técnica de espectrometria de massas de alta resolução com fonte de plasma indutivamente ativado, a qual possui alta sensibilidade e baixos limites de quantificação. Associa-se a isso o uso de instalações apropriadas para a digestão e recuperação do analito, com salas com ambiente controlado e todo protocolo de garantia da qualidade estabelecido pela norma ISO 17025.

Os procedimentos estudados mostraram que a digestão total do papel de filtro permite uma melhor recuperação do analito de interesse. Entretanto faz-se necessário o uso da mistura TMHA e Triton X100 para a quebra das proteínas e estabilização do sinal do HR/ICP/MS, respectivamente.

Considerando-se que uma gota de sangue normal possui uma massa superior ao limite de 0,1 g utilizados em nossos experimentos pode-se considerar a metodologia desenvolvida robusta e bastante eficaz.

Embora desenvolvida para o Pb essa técnica pode ser utilizada para quaisquer outros elementos tóxicos ou essenciais permitindo atendimentos, ou mesmo estudos de campo, em regiões longínquas trazendo, com isso, uma importante contribuição aos programas de atendimento a populações afastadas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1 Monteiro, R. L.. **Desenvolvimento e validação de uma metodologia de análise multielementar em amostras de soro sanguíneo por espectrometria de massas de alta resolução com fonte de plasma indutivo**. 2000. Dissertação (Mestrado), IPEN, São Paulo.
- 2 Wilson, L.. **Toxic Metals and Human Health**. Disponível em <http://www.drwilson.com/articles/toxic%20metals.htm>. Acesso em 3 de Setembro de 2010.
- 3 CRC CARE FACT SHEET 7 – **Toxic metals**. Disponível em www.crccare.com. Acesso em 2 de Setembro de 2010.
- 4 Landrigan, P. J.. Occupational and Community Exposures to Toxic Metals: Lead, Cadmium, Mercury and Arsenic. **The Western Journal of Medicine**. December, 1982.137.6 Pags. 531 a 539.
- 5 Mavropoulos, E.. **A hidroxiapatita como absorvedor de metais**. Tese de Mestrado. Fundação Osvaldo Cruz, Escola Nacional de Saúde Pública, 1999.
- 6 Sadao, M.. Intoxicação por chumbo. **Revista de Odontologia**. Jan/Fev/Mar/2002. <http://www.maxipas.com.br/principal/pub/anexos/2008/124052830intoxicacao-sadao.pdf>. Acesso em 28 de Novembro de 2010.
- 7 **Lead/World Resources Institute**. Disponível em <http://www.wri.org/publication/content/8377>. Acesso em 28 de Novembro de 2008.
- 8 Apostoli, P.. Elements in environmental and occupational medicine – Review. **Journal of Chromatography B**, 778, p. 63 – 97, 2002.
- 9 Olympio, K. P. K.; Oliveira, P. V.; Naozuka, J., Cardoso, M. R. A.; Marques, A. F.; Günter, W. M. R.; Bechara, E. J. H.. Surface dental enamel lead levels and antisocial behavior in Brazilian adolescents. **Neurotoxicology and Teratology**. 32 (2010) 273-279.
- 10 Needleman, H.L.; McFarland, C.; Ness, R.B.; Fienberg, S. E.; Tobin, M. J. Bonelead levels in adjudicated delinquents A case control study. **Neurotoxicology and Teratology**, 24 (2002) 711-717.

- 11 Dietrich, K.N.; Ris, M.D.; Succop, P.A.; Beger, O.B.; Bornschein, R. L.. Early exposure to lead and juvenile delinquency. ***Neurotoxicology and Teratology***, 23 (2001) 511-518.
- 12 Kracher, M. Environmental applications of single collector high resolution ICP/MS. ***Journal of Environmental Monitoring***, v. 9, p. 790-804, 2007.
- 13 Barany, E. Toxic and essential trace elements in adolescents. ***Scandinavian Journal of Nutrition***, 46 (2), p.102-103, 2002.
- 14 Amorim, L. C. A. Os biomarcadores e sua aplicação na avaliação da exposição aos agentes químicos ambientais. ***Revista Brasileira de Epidemiologia. Rev. Brás. Epidemiol.*** Volume 6, Number 2, São Paulo, June 2003.
- 15 Yantasee, W.; Timchalk, C.; LIN, Y. Microanalyzer for biomonitoring lead (Pb) in blood and urine. ***Anal. Bioanal. Chem.*** p. 387:335-341, 2007.
- 16 Sakai, T.. Biomarkers of Lead Exposure. *Industrial Health* 2000, 38, 127-142.
- 17 TOX GUIDE™ FOR LEAD Pb. CAS# 7439-92-1, October 2007. U.S. Department of Health and Human Services – Agency for Toxic Substances and Disease Registry. Disponível em <http://www.asdr.cdc.gov>. Acesso em: 9 de novembro. 2009.
- 18 Jacob, L. C. B.; Alvarenga, K. de F.; Morata, T. C. Os efeitos da exposição ocupacional ao chumbo sobre o sistema auditivo: uma revisão da literatura. ***Revista Brasileira de Otorrinolaringologia***, Volume 68, N. 4, São Paulo Julho/Agosto, 2002.
- 19 Carvalho, F. M.. Chumbo no sangue de crianças e passivo ambiental de uma fundição de chumbo no Brasil. ***Ver Panam. Salud Publica / Pan. Am. J. Public Health***, 13 (1), 2003. Disponível em: <http://journal.paho.org/uploads/1155591539.pdf>. Acesso em 23 de Maio 2007.
- 20 Figueiredo, B. R.; De Capitani, E. M.; Gitahy, L. C. ***Exposição humana à contaminação por chumbo e arsênio no Vale do Ribeira*** (SP/PR). Disponível em: http://www.anppas.org.br/encontro_anual/encontro2/GT/GT12/bernardino_figueiredo.pdf. Acessado em 15 de Setembro 2009.
- 21 Filho, S. E.; Silva, R. S.; Barreto, H. H. C.; Inomata, O. N. K.; Lemes, V. R. R.; Sakuma, A. M.; Scorsafava, M. A.. Concentrações sanguíneas de metais pesados e praguicidas organoclorados em crianças de 1 a 10 anos. ***Revista de Saúde Pública***, v.27 n.1 São Paulo Fev. 1993.
- 22 Ponka, A.. Lead in the ambient air and blood of children in Helsinki. ***The Science of the Total Environment***, 219 (1998) 1-5.

- 23 Jarosinska D.; Peddada, S.; Rogan, W. J.. Assessment of lead exposure and associated risk factors in urban children in Silesia, Poland. ***Environmental Research***, 95 (2004) 133-142.
- 24 Barany, E.; Bergdahl, I.A.; Bratteby, L.; Lundh, T.; Samuelson, G.; Schutz, A.; Skerfvina, S.; Oskarsson, A.. Trace Elements in Blood and Serum of Swedish Adolescents: Relation to Gender, Age, Residential. ***Environmental Research***, Section A, 89, 72-84 (2002).
- 25 Freitas, C. U.. **Tema: Estratégias de abordagem para exposição ambiental ao chumbo no Estado de São Paulo**. Disponível em <http://www.cve.saude.sp.gov.br/htm/doma/chumbo.htm>. Acesso em: 9 de Janeiro de 2007.
- 26 Azevedo, F. A.; Chasin, A. A. da M. **Metais – Gerenciamento da toxicidade**. São Paulo (SP). Atheneu. Intertox, 2003.
- 27 ***Element Finnigan Mat Operating Manual***. PB/N 1091280. FINNIGAN Na ISO 9001 registered Company.1997.
- 28 Laboratory Procedure Manual. Lead Cadmium Mercury. Whole Blood. Blood Lead Cadmium Mercury. CDC-Environmental Health. ICPDRCMS. ITB001A. September 9, 2004.
- 29 www.anvisa.gov.br/legis/portarias/1376-93.pdf. Pag. 7. Acessado em 19 de Novembro de 2010.
- 30 Souza, L. M. ***Aplicações da espectrometria de massas e da cromatografia líquida na caracterização estrutural de biomoléculas de baixa massa molecular***. Tese de Mestrado. Programa de Pós-Graduação em Bioquímica da UFPR, Curitiba, 2008.
- 31 ***Breve introdução sobre os fundamentos da técnica***. Disponível em: http://www2.dbd.puc-rio.br/pergamum/tesesabertas/0124802_03_cap_02.pdf. Acesso em 6 de Setembro de 2010.
- 32 Guiné, M. F.. Slides do curso A Espectrometria de Massas com Fonte de Plasma (CEN5752). CENA/USP. Piracicaba. Março. 2009.
- 33 Branco, R. P. de O. ***Química Forense sob olhares eletrônicos***. Millenium Editora Campinas (SP) 2006.
- 34 Giné, M. F. ***Espectrometria de massas com fonte de plasma (ICP/MS)***.Centro de Energia Nuclear da Agricultura (CENA). Universidade de São Paulo (USP). Piracicaba, São Paulo, Brasil. 1999.
- 35 Thomas, R. ***Practical Guide to ICP-MS***. Marcel Dekker, Inc. New York-Basel. 2004.

- 36 **What is ICP-MS? and more importantly, what can it do?** ICP/MS Facilities in the USGS Geologic Discipline. Disponível em <http://minerals.cr.usgs.gov/icpms/intro.html>. Acesso em 6 de Julho 2009.
- 37 Thomas, R. A. Beginner's Guide to ICP-MS. Part VII: Mass Separation Devices – Double-Focusing Magnetic-Sector Technology. **22 SPECTROSCOPY**, 16 (11), November 2001. Disponível em <http://www.spectroscopyonline.com>
- 38 Agilent 7500 Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry Course Number H8974A ChemStation Revision B.03.XX Windows 2000/xp Operating System Student Manual Revision 1 Manual Part Number H8974 – 90000 UK January, 2005.
- 39 Lutz, T. M.; Nirel, P.M.V.; Schmidt, B.. **Applications of Plasma Source Mass Spectrometry**. Ed. Holland, G. & Eaton, A.N.. The Royal Society of Chemistry, Cambridge, UK, 1991, pp. 96-100.
- 40 Hsieh, hui-fang; Chang, wei-shan; Hsieh, yi-kong; Wang, chu-fang. Lead determination in whole blood by laser ablation coupled with inductively coupled plasma mass spectrometry. **Talanta**, 79 (2009) 183-188.
- 41 Goullé, J. P.; Mahieu, L.; Castermant, J.; Neveu, N.; Boneau, L.; Lainé, G.; Bouige, D.; Lacroix, C.. Metal and metalloid multi-elementar ICP/MS validation in whole blood, plasma, urine and hair. **Forensic Science International**, 153 (2005) 39-44.
- 42 Barany, E.; Bergdahl, I. A.; Schutz, A.; Skerfving, S.; Oskarson, A.. Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry Analysis of Diluted Human Blood and Serum. **Journal of Analytical Atomic Spectrometry**. September 1997, Vol. 12 (1005-1009).
- 43 Esteban, M.; Castano, A.. Non-invasive matrices in human biomonitoring: A review. **Environment Internacional**, 35 (2009) 438-449.
- 44 Moura, R. A. de A.. **Colheita de Material para Exames de Laboratório**. Atheneu (São Paulo), 1987, pag. 29-76.
- 45 Motta, V. T.. **Bioquímica Clínica para o Laboratório**. 4º ed. Editora Médica Missau (Porto Alegre) 2003 pag. 43-45.
- 46 Amostra capilar. Disponível em <http://adam.sertaoggi.com.br/encyclopedia/ency/article/003427.htm>. Acesso em 18 de Agosto de 2009.

- 47 Minnesota's Lead Poisoning Prevention Programs. **Blood Lead Testing Methods Report to the Legislature**. February 2008. Disponível em: <http://www.health.state.mn.us/divs/eh/lead/reports/legislative rept07.pdf>. Acessado em 10 de Agosto de 2009.
- 48 Moyer, T. P; Nixon, D. N. E.; Ash, K. O.. Filter Paper Lead Testing. *Clinical Chemistry*, 45, Number 12, 1999.
- 49 **Collection of Fingertick Whole Blood Filter Paper for Blood Lead Determination**. Disponível em: <http://www.medtox.com/Resources/Images/2763.pdf>. Acessado em 3 de Dezembro de 2010.
- 50 **Review of Blood Lead Screening Data**. Treece, Kansas. September 2009.
- 51 Holtrop, T. G.; Yee, H. Y; Simpson, M. P. E.; Kauffman, R. E.. A Community Outreach Lead Screening Program Using Capillary Blood Collected on Filter Paper. **Arch Pediatr Adolesc Med.**, VOL.152, May 1998.
- 52 Yee, H. Y.; Srivuthana, K.. Capillary Blood Collection by Paper for Lead Analysis by Graphite Furnace Atomic Absorption Spectrometry. **Microchemical Journal**, 52, p. 370-375, 1995.
- 53 Srivuthana, K.; Yee, H. T.; Bhambhani, K.. A new filter paper method to measure capillary blood lead level in children. **Arch Pediatr Adolesc Med.**, 150, p.498-502, 1996
- 54 Shen, X. M. E.; ZHANG, Y. W.. Applicability of a filter paper method to measure blood lead levels in large populations of Chinese children. **Clinica Chimica Acta**, Volume 23, Issues 1-2, Pages 99-104, February 2003.
- 55 ELEMENT Finnigan MAT *Operating Manual* P/N 1091280 1995
- 56 ICP/MS *Interferenz – Tabelle* Finnigan MAT Version 2 1995.
- 57 Mc Shane, W.J.; Pappas, R. S.; Wilson-Mcelprog, V E; Paschal, D.. A rugged and transferable method for determining blood cadmium, mercury and lead with inductively coupled plasma – mass spectrometry. **Spectrochimica Acta**, 63, p.638-644, 2008. Part B.
- 58 **Orientações sobre validação de métodos de ensaios químicos** – DOQ-CGCRE-008, Revisão: 01, MARÇO/2003. Instituto Nacional de Metrologia, Normatização e Qualidade Industrial-INMETRO.