

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

Avaliação do uso da cela de reação dinâmica em espectrometria de massas com plasma acoplado indutivamente (DRC-ICP-MS) para determinação de elementos químicos em sangue

Bruno Lemos Batista

Ribeirão Preto
2009

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

Avaliação do uso da cela de reação dinâmica em espectrometria de massas com plasma acoplado indutivamente (DRC-ICP-MS) para determinação de elementos químicos em sangue

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Toxicologia para a obtenção do Título de Mestre em Toxicologia.

Área de Concentração: Toxicologia

Orientado: Bruno Lemos Batista

Orientador: Dr. Fernando Barbosa Junior

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.

Batista, Bruno Lemos

Avaliação do uso da cela de reação dinâmica em espectrometria de massas com plasma acoplado indutivamente (DRC-ICP-MS) para determinação de elementos químicos em sangue

79 p. : il.; 30cm.

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

Orientador: Dr. Fernando Barbosa Junior.

1. ICP-MS 2. Sangue 3. Metais 4. DRC 5. Injeção direta

FOLHA DE APROVAÇÃO

Bruno Lemos Batista

Avaliação do uso da cela de reação dinâmica em espectrometria de massas com plasma acoplado indutivamente (DRC-ICP-MS) para determinação de elementos químicos em sangue

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Toxicologia para a obtenção do Título de Mestre em Toxicologia.

Área de Concentração: Toxicologia

Orientador: Dr. Fernando Barbosa Junior

Aprovado em:

Banca Examinadora:

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

“Um homem precisa viajar. Por sua conta, não por meio de histórias, imagens, livros ou televisão. Precisa viajar por si, com seus olhos e pés, para entender o que é seu. Para um dia plantar as suas árvores e dar-lhes valor. Conhecer o frio para desfrutar o calor. E o oposto. Sentir a distância e o desabrigo para estar bem sob o próprio teto. Um homem precisa viajar para lugares que não conhece para quebrar essa arrogância que nos faz ver o mundo como o imaginamos, e não simplesmente como é ou pode ser; que nos faz professores e doutores do que não vimos, quando deveríamos ser alunos, e simplesmente ir ver”.

Amir Klink

DEDICATÓRIA

“Existem pessoas na nossa vida que nos marcam para sempre. Quer através da ajuda que nos dão no dia a dia, quer na ajuda que nos deram. Esta ajuda significa tudo o que podemos desejar dos que nos rodeiam, apoio nos momentos mais difíceis. Quando podemos agradecer por tudo aquilo que fizeram por nós, a altura deles nos dá por conta que algo ficou por fazer e que deveríamos fazer sempre mais a eles. Dedico este trabalho a todos aqueles que ainda trabalham comigo no dia a dia e aqueles que estão sempre comigo, nos meus pensamentos.”

A Deus, nosso guia e senhor de sabedoria,

Ao meu pai, Pedro Batista Filho, e minha mãe, Noemia Maria Lemos Batista, verdadeiros amigos, doutores de um conhecimento espiritual, educadores inigualáveis,

Aos meus irmãos, Talles e Camila, que sempre estarão comigo em cada jornada da vida,

À minha doce Daniele Jacomini, fonte de luz e amor na minha vida, pelo apoio incondicional sempre e por tornar meus dias mais brandos,

A todos meus amigos, em especial Bruno Rocha e Jairo Rodrigues, fontes de força e luta, por compartilharem e ajudarem sempre a superar os momentos difíceis.

AGRADECIMENTOS

Aos amigos de pós-graduação Jairo, Samuel, Juliana Nunes, Denise, Gustavo, Bruno e Kátia,

Ao Professor Fernando Barbosa pela credibilidade no trabalho de cada um,

À nossa técnica de laboratório, Vanessa, pela dedicação ao trabalho e ajuda nos experimentos,

À Professora Márcia Mesquita Veiga pelo apoio durante os estudos,

Aos Professores e Funcionários da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, pela dedicação ao trabalho e cuidado com cada aluno,

À FAPESP e ao CNPq pelo financiamento deste estudo.

RESUMO

BATISTA, B. L. **Avaliação do uso da cela de reação dinâmica em espectrometria de massas com plasma acoplado indutivamente (DRC-ICP-MS) para determinação de elementos químicos em sangue.** 2009. 79f. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2009.

A espectrometria de massas com plasma acoplado indutivamente com simples quadrupolo (q-ICP-MS) e cela de reação dinâmica (DRC-ICP-MS) foi avaliada para determinação seqüencial de Al, As, Cd, Co, Cu, Cr, Mn, Mo, Pb, Pt, Sb, Se, Sn, Te, Tl, V e Zn em sangue. Para as análises, amostras de sangue (200 µL) foram diluídas 1:50 em uma solução contendo 0,01% v/v Triton® X-100 e 0,5% v/v de ácido nítrico. As calibrações foram realizadas com ajuste de matriz, utilizando sangue ovino. Como gás de reação utilizou-se a NH₃. O uso do DRC foi fundamental para a determinação de Cr e V. A escolha da melhor vazão do gás e a otimização do parâmetro de rejeição (RP_q) foram estudadas utilizando sangue base ovino ou uma solução de matriz sintética (SMS), de acordo com a concentração do analito no sangue base. Os limites de detecção (*3s/coeficiente angular*) para determinação de ²⁷Al, ⁷⁵As, ¹¹¹Cd, ⁵⁹Co, ⁶³Cu, ⁵⁵Mn, ⁹⁸Mo, ²⁰⁸Pb, ¹⁹⁵Pt, ¹²³Sb, ⁸²Se, ¹²⁰Sn, ¹³⁰Te, ²⁰⁵Tl e ⁶⁶Zn em sangue por q-ICP-MS foram 0,223; 0,014; 0,003; 0,011; 0,304; 0,009; 0,009; 0,003; 0,001; 0,005; 0,264; 0,006; 0,010; 0,001; 0,834 µg L⁻¹, respectivamente, e para determinação de ⁵²Cr e ⁵¹V em sangue por DRC-ICP-MS utilizando o gás de reação amônia os limites de detecção foram de 0,007 e 0,006 µg L⁻¹. Para a determinação de ²⁷Al, ⁶³Cu, ⁶⁵Cu, ⁶⁴Zn e ⁶⁶Zn em sangue por q-ICP-MS através da calibração com ajuste de matriz com SMS os limites de detecção foram 0,083; 0,090; 0,055; 0,281; 0,306 µg L⁻¹, respectivamente. A validação do método foi realizada por meio da análise de materiais de referência do INSP-Canadá, NYSDOH-EUA e Seronorm-Noruega.

Palavras chave: ICP-MS, metais, sangue, injeção direta, cela de reação dinâmica (DRC-ICP-MS)

ABSTRACT

BATISTA, B. L. **Evaluation of the use of dynamic reaction cell inductively coupled plasma mass spectrometry (DRC-ICP-MS) for determination of elements in whole blood.** 2009. 79f. Dissertation (Master). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2009.

The use of inductively coupled plasma mass spectrometry with quadrupole (q-ICP-MS) and dynamic reaction cell (DRC-ICP-MS) was evaluated for sequential determination of Al, As, Cd, Co, Cu, Cr, Mn, Mo, Pb, Pt, Sb, Se, Sn, Te, Tl, V and Zn in whole blood by q-ICP-MS or DRC-ICP-MS methods. Prior to analysis, sample (200 μL) were diluted 1:50 v/v in a solution containing 0.01% v/v Triton[®] X-100 and 0.5% v/v nitric acid. For all elements, except Cr and V, the instrument was operated in q-ICP-MS mode. The use of DRC was only mandatory for Cr and V. NH_3 was evaluated as the reaction gas. Selection of best flow rate of reaction gas and optimization of the quadrupole dynamic bandpass rejection parameter (RP q) were carried out, using base whole blood or synthetic matrix solution (SMS), in accordance with element base blood concentration. Method detection limits ($3s/slope$) for ^{27}Al , ^{75}As , ^{111}Cd , ^{59}Co , ^{63}Cu , ^{55}Mn , ^{98}Mo , ^{208}Pb , ^{195}Pt , ^{123}Sb , ^{82}Se , ^{120}Sn , ^{130}Te , ^{205}Tl and ^{66}Zn determination in whole blood by q-ICP-MS against matrix matching calibration (base blood) were 0.223; 0.014; 0.003; 0.011; 0.304; 0.009; 0.009; 0.003; 0.001; 0.005; 0.264; 0.006; 0.010; 0.001; $0.834 \mu\text{g L}^{-1}$, respectively, and for ^{52}Cr and ^{51}V determination in whole blood by DRC-ICP-MS the detection limits were 0.007 e $0.006 \mu\text{g L}^{-1}$. For ^{27}Al , ^{63}Cu , ^{65}Cu , ^{64}Zn and ^{66}Zn determination by q-ICP-MS through matrix matching calibration with SMS the detection limits were 0.083; 0.090; 0.055; 0.281; $0.306 \mu\text{g L}^{-1}$, respectively. Method validation was accomplished by the analysis of reference materials from INSP-Canada, NYSDOH-USA, Seronorm-Norway.

Keywords: inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS), metals, whole blood, direct injection, dynamic reaction cell (DRC).

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Esquema de uma tocha e bobina de RF	20
Figura 2 - Esquema de um espectrômetro de massas com plasma acoplado indutivamente e cela de reação dinâmica (DRC-ICP-MS)	21
Figura 3 - Esquema do dispositivo e os componentes associados à formação do plasma	22
Figura 4 – Diagrama de estabilidade para um quadrupolo linear sob condições de baixo número de colisões	29
Figura 5 – Avaliação da estabilidade das intensidades de Rh, Y, Ir, Sr e Mn em função do número de injeções no ICP-MS de sangue base diluído 1:50 v/v	47
Figura 6 – Avaliação da estabilidade das intensidades de Se, As, Pb e Cd em função do número de injeções no ICP-MS de sangue base diluído 1:50 v/v	47
Figura 7 – <i>Skimmer</i> (A) e cone de amostragem (B) antes e após 100 injeções de sangue diluído 1:50 v/v (C e D, respectivamente)	48
Figura 8 – Determinação de Al, As, Cd, Co, Cu, Mn, Mo e Pb no material de referência de sangue humano QMEQAS07B06 por q-ICP-MS durante 10 diferentes dias pelo método proposto	53
Figura 9 – Determinação de Pt, Sb, Se, Sn, Te, Tl e Zn no material de referência de sangue humano QMEQAS07B06 por q-ICP-MS durante 10 diferentes dias pelo método proposto	54
Figura 10 – Concentração equivalente do sinal de fundo (BEC) em função das diferentes vazões para NH ₃ (à esquerda) e a razão intensidade / sinal de fundo em função da variação do RP _q (à direita) para a determinação dos isótopos ⁵² Cr e ⁵¹ V em sangue	57
Figura 11 – Sensibilidade (linha tracejada) e concentração equivalente do sinal de fundo (BEC, linha contínua) em função das diferentes vazões para NH ₃ para a determinação do isótopo ⁶⁴ Zn	58
Figura 12 – Curvas analíticas de calibração dos elementos cromo e vanádio sem (⁵² Cr e ⁵¹ V) e com (⁵² Cr* e ⁵¹ V*) o uso do DRC-ICP-MS	60
Figura 13 – Determinação de Al, Cu e Zn no material de referência de sangue QMEQAS07B03 durante 5 dias por q-ICP-MS com uso de SMS como matriz de ajuste e de Cr e V no material de referência de sangue QMEQAS07B06 durante 10 dias por DRC-ICP-MS com uso de sangue base como matriz de ajuste	62

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Comparação entre os limites de detecção aproximados ($\mu\text{g L}^{-1}$) para as técnicas de ICP-MS, ICPOES, FAAS e GFAAS e as concentrações consideradas referência no plasma sanguíneo	20
Tabela 2 – Interferências isobáricas e poliatômicas em ICP-MS dos isótopos dos elementos em estudo com sua respectiva abundância	25
Tabela 3 – Força de ligação entre os óxidos	27
Tabela 4 – Potencial de ionização de alguns elementos em ordem decrescente de potencial	32
Tabela 5 – Condições operacionais do q-ICP-MS.	41
Tabela 6 – Condições operacionais do DRC-ICP-MS	43
Tabela 7 – Composição das soluções padrão (matriz e <i>spike</i>) de otimização do DRC-ICP-MS para os analitos ^{52}Cr , ^{51}V , ^{64}Zn , ^{66}Zn , ^{63}Cu , ^{65}Cu e ^{27}Al utilizando NH_3	43
Tabela 8 – Análise semi-quantitativa do material depositado no <i>skimmer</i> e cone de amostragem após 100 injeções de sangue base diluído 1:50 v/v com Triton® X-100 0,01% v/v e HNO_3 0,5% v/v	49
Tabela 9 – Avaliação da precisão e exatidão da determinação de alumínio, arsênio, cádmio, cobalto, cromo, manganês, mercúrio, molibdênio, chumbo, platina, cobre, antimônio, selênio, estanho, telúrio, tálio, urânio, zinco e vanádio através da análise dos materiais de referência Seronorm 404109, QMEQAS07B03, NYSDOH (BE 07-08; 07-09; 07-10). Os valores encontrados estão como média \pm desvio padrão relativo (n=3)	51
Tabela 10 – Limites de detecção e quantificação (3s, n=10) e coeficiente de linearidade dos analitos determinados por q-ICP-MS	52
Tabela 11 – Otimização do DRC para avaliação da composição do meio e a influência na vazão da NH_3 para Cr e V	56
Tabela 12 – Otimização do DRC para avaliação da composição do meio e a influencia na vazão da NH_3 para Al, Cu e Zn	59
Tabela 13 – Comparação entre o coeficiente angular, coeficiente de correlação linear, limites de detecção e quantificação (3s, n=10) no modo q-ICP-MS (com sangue ou SMS como matriz) e DRC-ICP-MS (com sangue como matriz)	60

LISTA DE ABREVIATURAS

ACGIH	<i>American Conference of Industrial Hygienists</i>
BEC	Concentração equivalente de sinal de fundo
Cps	Contagens por Segundo
DA	Doença de Alzheimer
DPR	Desvio padrão relativo
DRC-ICP-MS	Espectrometria de massas com plasma acoplado indutivamente modo cela de reação dinâmica
EDTA	Ácido etilendiamino tetra-acético
GF AAS	Espectroscopia de absorção atômica com forno de grafite
GPx	Glutathione peroxidase
IARC	<i>International Agency for Research on Cancer</i>
LD	Limite de detecção
LQ	Limite de quantificação
Potência RF	Potência de rádio-frequência
q-ICP-MS	Espectrometria de massas com plasma acoplado indutivamente modo padrão
R	Coefficiente de correlação linear
RP _a	Parâmetro de rejeição <i>a</i>
RP _q	Parâmetro de rejeição <i>q</i>
SF-ICP-MS	ICP-MS de duplo setor
SMS	Solução de matriz sintética
SOD	Superóxido dismutase
U.S. EPA	<i>United States Environmental Protection Agency</i>

SUMÁRIO

Resumo	i
Abstract	ii
Lista de figuras	iii
Lista de tabelas	iv
Lista de abreviaturas	v
1. Introdução	1
1.1. Aspectos gerais dos elementos	1
1.2. Biomonitoramento	17
1.3. Espectrometria de massas com plasma acoplado indutivamente	19
2. Objetivo	37
3. Justificativa	37
4. Material e métodos	38
4.1. Instrumentação e acessórios	38
4.2. Reagentes, soluções, materiais de referência e limpeza do material	38
4.3. Coleta de sangue ovino (sangue base)	39
4.4. Preparo dos diluentes e das curvas analíticas de calibração por ajuste de matriz ou em meio aquoso	40
4.5. Avaliação da influência do meio de diluição na deposição de sais no cone de amostragem e <i>skimmer</i>	44
4.6. Parâmetros analíticos para validação dos métodos propostos para determinação dos analitos nas amostras biológicas por injeção direta em DRC-ICP-MS	44
5. Resultados e discussão	46
5.1. Escolha do método a ser utilizado (diluyente e fator de diluição para as amostras de sangue)	46
5.2. Determinações de Al, As, Cd, Co, Cu, Mn, Mo, Pb, Pt, Sb, Se, Sn, Te, Tl e Zn em sangue por ICP-MS utilizando introdução direta de amostra diluída	50
5.3. Otimização da cela de reação dinâmica para determinação de Al, Cr, Cu, Zn e V por DRC-ICP-MS	55
5.4. Avaliação do uso dos padrões internos	63
6. Conclusões	64
7. Referências Bibliográficas	65

1 – Introdução

1.1 – Aspectos Gerais dos Elementos

“Trace metals play important roles in biological processes, both as essential components and toxins. Monitoring body status of trace metals thus has become an important function of many clinical, industrial and government laboratories.”

J. SAVORY

Os elementos metálicos, semi-metálicos e não metálicos, nas formas iônica, livres ou associados a outras espécies químicas, estão presentes nos sistemas biológicos e desempenham importantes papéis na manutenção do bom funcionamento dos organismos vivos (TSALEV, 1984; GOYER, KLAASSEN e WAALKES, 1995). Alguns desses elementos são considerados essenciais, pois algumas patologias são conseqüência da baixa ingestão desses nutrientes, e os sintomas são minimizados ou até eliminados através de suplementação alimentar (SAVORY e WILLS, 1992).

Atualmente, cerca de 25 elementos são reconhecidos como essenciais para a vida humana, sendo que 11 deles (Co, Cu, Cr, I, Mn, Mo, Ni, Se, Si, V e Zn) estão presentes em baixas concentrações (menos de 7g em um indivíduo de 70Kg) e, por isso, são denominados elementos traço (SAVORY e WILLS, 1992; WALRAVENS, 1980; PATRIARCA et al., 1998). A maioria desses elementos (como zinco, cobalto, cobre, selênio e magnésio) são cofatores de enzimas que participam de importantes eventos biológicos, como transporte de oxigênio, inibição da formação de radicais livres, organização estrutural de macromoléculas e atividade hormonal (PATRIARCA et al., 1998; DIPLOCK, 1991). Em contraste, existem os elementos com efeitos tóxicos como, por exemplo, o cádmio, chumbo e mercúrio (GOYER, KLAASSEN e WAALKES, 1995; GOYER, 1995). No entanto, a toxicidade de qualquer elemento dependerá de sua concentração, período e nível de exposição como também da forma química isto é, das espécies químicas do elemento presentes no indivíduo (PARSONS e BARBOSA, 2007).

Normalmente, os intervalos de concentração que determinam a deficiência, a essencialidade e a toxicidade desses elementos são extremamente curtos (VANDECASTEELE e BLOCK, 1994). Assim, é necessário conhecer a concentração dos elementos essenciais em amostras de interesse clínico com adequada precisão e exatidão, o que exige o aprimoramento dos procedimentos analíticos dedicados a esse tipo de análise.

Os elementos químicos em estudo neste trabalho são relevantes do ponto de vista toxicológico e nutricional. Portanto, os aspectos toxicológicos-nutricionais mais relevantes destes elementos serão apresentados a seguir.

Elementos Essenciais com Potencial Toxicidade

Cálcio

O cálcio é essencial tanto para a estrutura física do osso quanto para a função fisiológica normal (como condução nervosa, contração muscular, coagulação sanguínea, permeabilidade das membranas, ativação enzimática, síntese de acetilcolina, entre outros). O corpo de um adulto saudável contém, em média, 1200 g de cálcio sendo que, 99% estão presentes nos ossos e dentes e o 1% restante presente nos fluidos extracelulares, estruturas intracelulares e membranas celulares. O sangue humano, contém em média, cerca de 90 a 105 mg L⁻¹, com preciso controle fisiológico dessa concentração. A diminuição de cálcio no corpo leva a perda de minerais nos ossos com redução da densidade óssea, suscetibilidade a fraturas, convulsões, tetania e aumento da pressão sanguínea, especialmente em gestantes (HAYES, 2001).

O cálcio não é um metal tóxico, mas efeitos adversos podem ocorrer com ingestão diária acima de 2g. A absorção intestinal de cálcio reduz com o aumento da ingestão deste elemento; entretanto, uma ingestão em grandes quantidades pode aumentar a concentração corpórea como também interferir na absorção de magnésio, zinco e ferro, além de estar associada à hipercalcemia e/ou hipercalcúria que pode causar falência renal (formação de cálculos) e calcificação do tecido mole. Um potencial efeito colateral está associado a uma habitual ingestão de suplementos contendo cálcio, como medicações utilizadas para prevenção de câncer de cólon, osteoporose e hipertensão e a concomitante ingestão de metais

tóxicos como arsênio, cádmio e chumbo, que são encontrados como contaminantes desses suplementos (HAYES, 2001).

Cobalto

O cobalto na forma de cobalamina é um componente essencial da vitamina B₁₂, necessária para produção de células vermelhas e prevenção da anemia perniciosa. A cobalamina é sintetizada pela flora intestinal, assim o organismo necessita da cobalamina e não do íon cobalto. Isso levou alguns nutricionistas a não considerarem o cobalto como um elemento essencial para o homem. Porém, bovinos e ovinos que receberam uma dieta com baixa concentração de cobalto desenvolveram anemia, tiveram perda de peso e retardo no crescimento (WHO, 1996; HERBERT, 1996). O cobalto é absorvido via oral, não se bioacumulando significativamente. Cerca de 80% do cobalto ingerido é excretado na urina e 15% nas fezes, pelo ciclo enterohepático, leite e suor (ELINDER e FRIBERG, 1986; SCHRAUZER, 1995). As concentrações de referência no sangue variam de 0,01 a 0,91 $\mu\text{g L}^{-1}$ e na urina em torno de 1 $\mu\text{g L}^{-1}$ (KLAASEN, 2001). O excesso de cobalto pode provocar diarreia, vômito, aumento da pressão sanguínea, cardiomiopatias (> 10 mg/dia – o cobalto é colocado na cerveja para melhorar a qualidade da espuma). A exposição ocupacional por inalação ao cobalto pode provocar pneumoconiose (> 0,1 mg Co/m³) (KLAASEN, 2001).

Cobre

No homem o cobre é necessário para o desenvolvimento do tecido conjuntivo, formação dos nervos e dos ossos. Também participa do metabolismo do ferro e carboidratos. Ele age como um redutor em enzimas como a superóxido dismutase, citocromo oxidase, lisil oxidase, dopamina hidroxilase e várias outras oxidases que reduzem o oxigênio molecular. O cobre é transportado no organismo pela proteína ceruloplasmina. Um adulto contém cerca de 80mg de cobre (maiores concentrações no fígado e no cérebro) e a ingestão média de cobre varia de 0,9 a 2,2 mg/dia em adultos, sendo as concentrações no soro de indivíduos referência de 120 a 145 $\mu\text{g L}^{-1}$ (KLAASEN, 2001). Fontes ricas em cobre são o fígado e outros órgãos animais (carnes), nozes, sementes, chocolate preto e grãos em geral. A

deficiência de cobre no homem é rara, mas quando ocorre leva a anemia normocítica e hipocrômica, leucopenia, neutropenia e osteoporose em crianças (KANUMAKALA et al., 2002). Uma dieta em excesso de zinco pode causar deficiência de cobre. A toxicidade crônica do cobre é rara no homem e na maioria das vezes associada ao dano no fígado. A intoxicação aguda por cobre leva a efeitos gastrintestinais caracterizados por dor, diarreia, vômitos e náusea. A presença de elevados teores de cobre no organismo também implica na redução da concentração de vitamina A no sangue e em problemas renais que, em casos agudos, podem levar a doença de *Wilson* (TSALEV, 1984).

Cromo (III)

Embora o cromo seja encontrado nas valências de -2 a +6, as valências mais importantes são +3 e +6. O cromo trivalente é a forma mais abundante deste elemento no ambiente. Não há evidências que o cromo (III) vá a cromo (VI) no organismo. No meio intracelular o cromo (VI) vai rapidamente a cromo (III). O cromo (III) é um elemento traço essencial que participa do fator de tolerância à glicose (STOECKER, 1996), como cofator da insulina, liga-se ao DNA *in vitro* provocando a síntese de RNA entre outras funções, sendo assim considerado relativamente não tóxico. Apesar da baixa absorção de Cr^{3+} pela via oral, ela é aumentada pelo fator de tolerância à glicose, que forma um complexo com o Cr^{3+} facilitando sua absorção intestinal (HAYES, 2001).

Ferro

O ferro é encontrado em 4 classes de proteínas: ferro-hemoproteínas (como a hemoglobina que reserva 2/3 do ferro no organismo, mioglobina, catalase e citocromos); ferro-sulfoenzimas (como a aconitase e fumarato redutase); proteínas de transporte e armazenamento de ferro (transferrina, lactoferrina, ferritina, hemosiderina), e outras enzimas que possuem ferro (NADH desidrogenase, succinato desidrogenase, álcool desidrogenase, ciclooxigenases). O intervalo de ingestão diária total média vai de 14,4 a 20,2 mg/dia (CHANARIN, 1999). O ferro no soro humano é encontrado em uma concentração de cerca de $1,3 \text{ mg L}^{-1}$, estando a maior parte ligada a transferrina. Em homens adultos, o total de ferro no corpo é de

4g, já em mulheres em menstruação decresce para 3g. A deficiência de ferro causa anemia. As fontes de ferro-heme (15% do consumo) são adquiridas da hemoglobina e mioglobina do consumo de carne. Fontes de ferro não heme são os cereais, sementes de leguminosas, frutas, vegetais, etc. Entre os elementos essenciais, a intoxicação aguda por ferro é uma das mais danosas ao organismo humano. Já a intoxicação crônica por ferro ocorre freqüentemente associada a doenças genéticas e metabólicas, por repetidas transfusões de sangue ou ingestão excessiva (FRAGA e OTEIZA, 2002).

Magnésio

O magnésio é essencial para a formação do ácido nucléico, portanto sendo necessário a todas as células. Várias enzimas necessitam deste íon para sua ação catalítica, especialmente aquelas que utilizam adenosina trifosfato (ATP) e outros nucleotídeos para síntese de DNA e RNA. O magnésio é de fundamental importância para a saúde humana e sua deficiência implica em um grande número de doenças. O seu excesso no sangue é facilmente filtrado pelos rins, porém, em indivíduos com função renal prejudicada, ou até aqueles saudáveis, pode ocorrer hipermagnesemia (KONTANI et al., 2005). O magnésio tem um efeito antagônico com o cálcio, pois crianças com hipermagnesemia têm diurese aumentada de cálcio além de constipação e dilatação do cólon e reto. Ações no sistema nervoso podem ocorrer como o bloqueio pré e pós-sináptico de junções neuromusculares (ASHTON, SUTTON e NIELSEN, 1990). A baixa ingestão de magnésio pode causar espasmos musculares, e está associado com doenças cardiovasculares, diabetes, aumento da pressão arterial, ansiedade, osteoporose e acidente vascular cerebral (LARSSON et al., 2008).

Manganês

O manganês é o metal que compõe a enzima superóxido dismutase (SOD) no compartimento mitocondrial, que integra o sistema de defesa do organismo contra os radicais livres. Além de prejudicar o combate contra essas espécies, a deficiência desse metal no organismo está relacionada com distúrbios no crescimento devido a problemas na formação dos ossos e no sistema nervoso (TSALEV, 1984). Em

condições de deficiência aguda, verifica-se o aparecimento de osteoporose, acromegalia (deficiência na produção do hormônio do crescimento) e esclerose múltipla (TSALEV, 1984; PATRIARCA et al., 1998). O excesso de manganês no organismo reduz a absorção de ferro provocando anemia, além de afetar o sistema nervoso central, reprodutivo e respiratório. Em situações de intoxicação crônica verifica-se o desenvolvimento de psicoses maníaco depressivas, redução da resistência a infecções pulmonares e a maior incidência de abortos espontâneos (TSALEV, 1984).

Molibdênio

O molibdênio é um elemento essencial que possui vários estados de oxidação +3, +4, +5 e +6, o que facilita a transferência de elétron. O molibdênio é colocado em fertilizantes para aumentar o crescimento das plantas. O excesso de exposição pode resultar em toxicidade aos animais e ao homem (NRC, 1989). Os compostos hexavalentes deste elemento são bem absorvidos no trato gastrointestinal e depois levados ao fígado (NIELSON, 1996). O molibdênio é um componente da xantina oxidase, aldeído oxidase e sulfato oxidase. Os principais locais de armazenamento no homem são o fígado, rins, tecido adiposo e sangue. A concentração de molibdênio no organismo de recém nascidos é baixa e aumenta até os 20 anos, diminuindo novamente em seguida. A deficiência de molibdênio está relacionada com o metabolismo do ácido úrico e sulfetos (xantina oxidase e sulfeto oxidase) (NIELSON, 1996).

Selênio

A ação antioxidante do selênio indica que este elemento pode desempenhar um importante papel na prevenção do câncer. Essa ação preventiva ocorre principalmente devido ao papel desempenhado pelo selênio no fígado, local onde substâncias carcinogênicas são metabolizadas através de um conjunto de oxidases. Além disso, o selênio é um metal importante para a produção da enzima antioxidante glutathiona peroxidase (GPx), responsável por metabolizar o peróxido de hidrogênio, evitando a proliferação de radicais livres nos organismos vivos (TSALEV, 1984; SAVORY e WILLS, 1992; GOYER, 1995). A deficiência de selênio, além de

aumentar a probabilidade do desenvolvimento de certos tipos de câncer, está associada a uma patologia observada na China, devido às baixas concentrações de selênio no solo daquela região: a doença de *Keshan*. Esta doença é uma cardiomiopatia verificada em crianças e mulheres jovens que atinge aproximadamente 10 milhões de pessoas. A administração de suplementos alimentares ricos em selênio é o mais eficiente modo de prevenção dessa patologia (SAVORY e WILLS, 1992). O selênio também influi na toxicidade do mercúrio, protegendo o organismo contra os efeitos nocivos deste metal. A redução da toxicidade do mercúrio pode ser atribuída à ação antioxidante do selênio, que minimiza os danos causados pelos radicais livres gerados pelo mercúrio nas membranas celulares (GOYER, 1995). Já em elevadas concentrações no organismo o selênio torna-se um elemento tóxico. Devido a sua similaridade química com o enxofre, o selênio pode interferir no metabolismo dos compostos que contêm enxofre, sendo incorporado em aminoácidos como cisteína, cistina e metionina, alterando a estrutura de proteínas como a queratina, resultando em mudanças estruturais nos cabelos e unhas. Em casos agudos de intoxicação verificam-se distúrbios relacionados com o sistema nervoso central, além de afetar o fígado, retardar o crescimento e levar a infertilidade (TSALEV, 1984).

Zinco

O zinco é um cofator indispensável que compõe mais de 100 enzimas presentes nos mamíferos, como a enzima SOD presente no citosol. Ele está envolvido nos processos de divisão celular, crescimento, cicatrização, regulação do metabolismo e do sistema imunológico. Sintomas de deficiência de zinco estão relacionados principalmente ao aumento da susceptibilidade a infecções, devido à menor ação das células T do sistema imunológico, que são responsáveis pela resposta biológica do organismo contra células infectadas, fungos, parasitas e tecidos estranhos (TSALEV, 1984; SAVORY e WILLS, 1992; WALRAVENS, 1980; VANDECASTEELE e BLOCK, 1994; SANDSTEAD 1995). O zinco atua também no metabolismo de glicose. Após a insulina ser clivada forma-se um monômero que, no interior da célula, entra em contato com o zinco formando um cristal dimérico de zinco para ser armazenada e secretada (CHAUSMER, 1998). Assim, elevadas

doses de zinco podem causar hiperglicemia, além de afetar o intestino e o fígado (TSALEV, 1984).

Principais Elementos Tóxicos

Arsênio

O arsênio pode ser absorvido por todas as vias, mas a via oral é a principal (90%) sendo que, por inalação, de 25 a 40% do que é inalado deposita-se nos pulmões (WHO, 1981). A exposição por via oral é mais comum devido a sua presença em organismos marinhos utilizados como alimentos (arsenobetaína, arsenocolina e arseno-açúcares) (SHIBATA et al., 1992; BUCHET et al., 1994; MA e LE, 1998; HSUEH et al., 2002). O arsênio é distribuído pelo organismo ligado às proteínas plasmáticas, acumulando-se no fígado e rins em exposições agudas e nos pêlos, unhas e cabelos em exposições crônicas. As formas inorgânicas sofrem metilação formando o ácido monometilarsênico (MMA) e o ácido dimetilarsênico (DMA). Já o As(V) é reduzido a As(III) (APOSHIAN e APOSHIAN, 2006). Arsenobetaína e arsenocolina, encontradas em alimentos de origem marinha, não são biotransformadas, sendo excretadas inalteradas na urina. Arseno-açúcares sofrem biotransformação principalmente a DMA. A ordem crescente de toxicidade dos compostos de arsênio é: arsênio elementar < compostos de arsênio < ácidos alquil-arsênicos < arsenato (As^V) < arsenito (As^{III}) < arsina (SHIBATA et al., 1992; BUCHET et al., 1994; MA e LE, 1998; HSUEH et al., 2002). A principal via de excreção do arsênio é a urinária. Para indivíduos expostos ao arsênio inorgânico, as formas principais encontradas na urina são: 60-80% na forma de DMA, 10-20% como MMA e 10-20% como As inorgânico (FELDMANN, J. et al., 1999; APOSHIAN e APOSHIAN, 2006).

A sintomatologia da exposição aguda ao arsênio é a mesma para derivados orgânicos e inorgânicos: quadro gastroenterítico grave com início após 30 minutos de exposição. A exposição crônica é observada ocupacionalmente e em pacientes tratados com compostos arsenicais (WHO, 1981). O arsênio e seus compostos são reconhecidos pela *International Agency for Research on Cancer* (IARC) e pela *American Conference of Industrial Hygienists* (ACGIH) como carcinogênico humano (IARC, 2008; ACGIH, 2003).

Cádmio

A principal via de absorção do cádmio é a respiratória, sendo que cerca de 55% do cádmio depositado nos pulmões é absorvido. Já a absorção gastrointestinal é influenciada pela carência nutricional (FRIBERG e NORDBERG, 1979). Na avaliação da exposição a este elemento é imprescindível considerar o tabagismo, pois se calcula que de 20 a 50% do cádmio proveniente do cigarro seja absorvido (ATSDR, 1999). O cádmio é distribuído pelo organismo geralmente ligado à albumina, acumulando-se principalmente no fígado e rins, onde se liga a metalotioneína. Este elemento ainda acumula-se no pâncreas, pulmões, testículos e tireóide (ATSDR, 1999). A principal via de excreção do cádmio é a urinária (filtração glomerular) quando a absorção se faz por via respiratória e, quando a via de absorção é oral, a excreção é realizada pelas fezes.

A meia vida biológica do cádmio no organismo é calculada entre 17 e 38 anos (UCL, 2008). Devido a essa longa meia vida biológica, a exposição crônica pode levar a lesões ósseas (devido à competição do cádmio com o cálcio), enfisema pulmonar, nefrite, proteinúria e grande potencial de cardiotoxicidade (FRIBERG e NORDBERG, 1979; ATSDR, 1999). O cádmio e seus compostos são reconhecidos pela IARC como carcinogênico humano (IARC, 2004) e pela ACGIH como suspeito carcinogênico humano (ACGIH, 2003).

Chumbo

O chumbo e seus compostos são utilizados na indústria de baterias, munições, tintas, vernizes, gasolina, pigmentos equipamentos contra radiação, soldas, vidros e cerâmica (HAYES, 2001). A principal via de absorção do chumbo é a respiratória. No pulmão, ele é absorvido sob a forma de fumos ou partículas finas que são fagocitadas. A absorção por via oral depende da solubilidade e do tamanho das partículas (FRIBERG e NORDBERG, 1979). O chumbo é distribuído pelo sangue, no interior das hemácias e atravessa a barreira hematoencefálica. Acumula-se nos ossos (90%, com substituição do cálcio ósseo), dentes, fígado, pulmões, rins, cérebro e baço (WHO, 1977). A excreção ocorre principalmente pela urina e fezes. A vida média do chumbo no sangue varia de 25 a 36 dias, nos tecidos moles cerca de 40 dias e nos ossos cerca de 27 anos (WHO, 1977). Os sintomas da intoxicação por

exposição aguda são análogos aos descritos para o saturnismo clássico, com rápido desenvolvimento. Produz encefalopatia aguda com insuficiência renal, sintomas gastrointestinais graves e hemólise. Em crianças expostas cronicamente os sintomas não são específicos incluindo dores de cabeça, anorexia, vômito, constipação, anemia progressiva com redução de basófilos, linha de *Burton*, nefrite crônica, neuropatia periférica e radiografia dos ossos grandes com depósitos (HAYES, 2001).

O chumbo inorgânico e seus compostos são reconhecidos pela IARC como carcinogênicos para o homem, já os compostos de chumbo orgânico são reconhecidos como não carcinogênicos para o ser humano (IARC, 2008). A ACGIH reconhece o chumbo e seus compostos inorgânicos como carcinogênico para animais confirmado com relevância desconhecida para seres humanos (ACGIH, 2003). Já a Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (U.S. EPA) considera o chumbo como provável carcinogênico humano. (HAYES, 2001).

Cromo (VI)

O cromo hexavalente é o mais importante do ponto de vista de toxicidade. Diferentemente do cromo (III), o cromo (VI) é rapidamente absorvido por todos os tecidos. Devido ao cromato (CrO_4^{2-}) ser estruturalmente semelhante ao fosfato e ao sulfato, ele rapidamente entra em todas as células via canal aniônico de proteínas. A dose letal via oral (toxicidade aguda) de sais solúveis de cromatos para humanos está em torno de 50 a 70 mg kg^{-1} de peso corporal. Sintomas de toxicidade aguda incluem vômito, danos no trato gastrointestinal como sangramento e choque cardiovascular. A exposição crônica ao cromo está associada com perda de proteínas de cadeia leve e proteinúria. O cromo hexavalente é reconhecidamente um elemento carcinogênico, sendo que o mecanismo de ação é a direta modificação do DNA. Após o cromo (VI) entrar na célula ele é rapidamente reduzido a cromo (III), mas durante essa redução, radicais intermediários instáveis e reativos (Cr^{+6} , Cr^{+5} , hidroxil, sulfidril e orgânicos) e espécies reativas de oxigênio são formados, levando ao dano do DNA e, por conseguinte, à carcinogenicidade. A U.S. EPA classifica o cromo (III) como não carcinogênico e o cromo (VI) como carcinogênico humano (HAYES, 2001).

Mercúrio

A principal via de absorção do mercúrio metálico e inorgânico é a inalação do vapor, com penetração de 75% da dose inalada através da membrana alvéolo-capilar (SÄLLSTEN, 1994; FRIBERG e NORDBERG, 1979). O mercúrio iônico é transportado pelo plasma enquanto o mercúrio elementar é transportado pelas hemácias onde é oxidado a íon mercúrio. O mesmo acontece nos outros tecidos, por via catalítica reversível, fixando-se depois às proteínas. O mercúrio não oxidado é capaz de penetrar através das barreiras hematoencefálica e placentária (SÄLLSTEN, 1994). O acúmulo ocorre no cérebro, quando originado de exposição a vapores de mercúrio metálico e organomercuriais (FRIBERG e NORDBERG, 1979), e nos rins para exposição a sais inorgânicos (WHO, 1976). A velocidade de excreção está associada à espécie e é dose-dependente. A excreção de mercúrio é ainda influenciada pela exposição simultânea a outros metais, uso de antibióticos do tipo penicilina e ingestão de bebidas alcoólicas (SÄLLSTEN, 1994). Na exposição a mercúrio metálico, a excreção é principalmente urinária, podendo ocorrer eliminação pulmonar de vapores de mercúrio. A meia-vida biológica do mercúrio metálico no organismo é de 60 dias (FRIBERG e NORDBERG, 1979). A excreção do mercúrio inorgânico se dá totalmente pela via urinária, com uma meia-vida de 30 a 60 dias (WHO, 1976). Os compostos orgânicos de mercúrio são eliminados, sobretudo pelas fezes, com meia-vida de 70 dias (FRIBERG e NORDBERG, 1979).

A intoxicação aguda por mercúrio metálico tem como sintomas iniciais tosse seca, febre e calafrios, que podem evoluir para pneumonia intersticial (WHO, 1976). A intoxicação crônica por mercúrio é mais freqüente e afeta o sistema nervoso central (polineuropatia, perda da audição e olfato, distúrbio do sono, cegueira, surdez, podendo levar ao coma e à morte (WHO, 1976). Os compostos orgânicos de mercúrio são reconhecidos pela IARC como possivelmente carcinogênicos para o homem, já o mercúrio metálico e compostos inorgânicos são reconhecidos como não carcinogênicos para o homem (IARC, 2008). A ACGIH não o classifica como carcinogênico para seres humanos (ACGIH, 2003).

Elementos Relacionados ao Uso em Terapia Medicamentosa

Alumínio

O alumínio é pouco absorvido pelas vias oral e inalatória. Aproximadamente 0,1% do alumínio consumido na dieta é absorvido pelo intestino. Na presença de citrato, o alumínio é mais absorvido (JOUHANNEAU et al., 1997) mas, a presença de silício diminui a absorção provavelmente por formar hidróxi-alumino-silicatos (FLATEN et al., 1993). No plasma, de 80 a 90% do alumínio está ligado a transferrina, acumulando-se nos ossos (osteomalácia) e pulmões (fibrose pulmonar pelo acúmulo de poeira), possuindo baixas concentrações no sangue total por ser facilmente eliminado pelos rins na urina (GANROTE, 1986). O alumínio ainda diminui a absorção de fluoretos, cálcio, ferro, ácido salicílico e fosfatos (osteomalácia), além de alterar a motilidade gastrointestinal por inibição da acetilcolina (antiácidos a base de alumínio) (NAGYVARY e BRADBURY, 1977). Em modelos experimentais com ratos, o alumínio causou sérios danos ao sistema nervoso central: perda de sinapses, atrofia dendrítica, impedimento do transporte intracelular, ligação com cromatina ou DNA reduzindo a síntese de DNA e a atividade da RNA polimerase, alteração do metabolismo do cálcio no cérebro (liga-se a calmodulina) (SIEGEL e HAGU, 1983; BIZZI e GAMBETTI, 1986; BIRCHALL e CHAPPEL, 1988). Em seres humanos, são relatados casos de síndrome de demência humana (demência da diálise) em pacientes com 3 a 7 anos de tratamento com fluidos de hemodiálise (que contêm altas concentrações de alumínio e também de estrôncio), elevando a concentração de alumínio nos ossos, cérebro e músculos (WILLS e SAVORY, 1983). Garruto et al. (1984) descreveram a síndrome da demência parkinsoniana e a esclerose amiotrófica lateral em Guam (ilhas Marina, oeste do oceano pacífico). Eles detectaram altas concentrações de manganês e alumínio no solo vulcânico e baixas concentrações de cálcio e magnésio, atribuindo a estes analitos (em excesso e deficiência, respectivamente) as causas de lesões neuronais e morte. Há também algumas especulações sobre a ação do alumínio na doença de *Alzheimer* (DA). Altas concentrações de alumínio são encontrados em cérebros de pacientes que morreram com DA, porém este aumento pode ser consequência da DA e não a causa e, ainda neste pacientes, observa-se uma menor seletividade da barreira hemato-encefálica (KLAASEN, 2001).

Lítio

O lítio (carbonato) é utilizado no tratamento de desordens maníaco-depressivas e deve ser cuidadosamente biomonitorado, para evitar efeitos tóxicos (KLAASEN, 2001). O índice terapêutico vai exatamente de 0,6 a 1,5 mEq/L de soro (4,2 a 10,5 mg/L). A ingestão diária por meio da alimentação é de cerca de 2mg. Ele é prontamente absorvido no trato gastrointestinal. A meia-vida biológica deste elemento químico em indivíduos saudáveis é de 12 a 27 hs no plasma (TIMER e SANDS, 1999). Do ponto de vista ocupacional, apenas o hidreto de lítio é perigoso, podendo causar queimaduras na pele e corrosão (COX e SINGER, 1981). O lítio pode causar uma série de sintomas não usuais quando utilizado terapeuticamente (mudanças neuromusculares, no sistema nervoso central, no coração, no trato gastrointestinal e lesão renal). Pode ocorrer perda do sentido cognitivo e lesão na região de memória, *déficit* na visão, entre outros (BRUMM et al., 1998). O uso crônico de lítio pode causar nefrite intersticial, síndrome nefrótica, mudanças no sistema cardiovascular e no sistema nervoso central (SINGER, 1981; LENOX et al., 1998). A superdosagem de lítio pode ser tratada com diuréticos com acompanhamento de reposição de água e eletrólitos (STEELE, 1977).

Platina

A platina é principalmente utilizada na indústria como catalisador ou na área médica como agente antitumoral (diclorodiamina platina II ou cisplatina, entre outros). Altas concentrações de platina são encontradas nas proximidades de rodovias devido ao seu uso em conversores catalíticos de veículos. As concentrações de platina no sangue total e urina, em indivíduos não expostos ocupacionalmente são $0,13 \mu\text{g L}^{-1}$ e $0,11 \mu\text{g g}^{-1}$ de creatinina, respectivamente (FARAGO et al., 1998). No geral, a platina e seus sais, podem produzir vários tipos de alergias no homem, sendo que alguns sais podem persistir por anos no corpo e os agentes antitumorais como a cisplatina exibem sérios efeitos de nefrotoxicidade (KLAASEN, 2001).

Outros Elementos Tóxicos

Antimônio

Antimônio é um metal prateado e quebradiço extraído de minérios. Os compostos menos tóxicos são encontrados em pigmentos de cosméticos (sulfeto de antimônio) e medicamentos (tartarato potássico de antimônio, antimoniato de meglumina). Estibina, um hidreto de antimônio, é um gás incolor altamente tóxico utilizado na fabricação de semi-condutores. A ingestão de compostos de antimônio pode causar efeitos tóxicos no intestino, estômago, coração, pele, fígado e sistema nervoso de homens e animais, pois a ligação com os grupos sulfidril inibe o metabolismo de proteínas e carboidratos. A exposição por inalação aguda do tricloreto ou pentacloro de antimônio pode causar pneumonite (o composto, não o antimônio apenas), assim como o hidreto de antimônio pode causar hemólise (novamente o composto apenas). A carcinogênese do antimônio ainda é incerta, pois alguns estudos demonstram aumento do risco de câncer pulmonar, porém esse crescimento pode ser devido à exposição concomitante dos trabalhadores ao arsênio (HAYES, 2001). Outro importante meio de exposição e de intoxicação por antimônio ocorre pelo consumo de medicamentos utilizados no tratamento da leishmaniose. Inicialmente, eram utilizados sais de Sb (III) que ligam-se a grupos sulfidril (-SH) de certas proteínas, resultando na perda da função destas e provocando sérios efeitos tóxicos. Atualmente, o medicamento de escolha para o tratamento de todos os tipos de leishmaniose é a base de sais de Sb (V), porém, ainda assim, aparecem principalmente efeitos tóxicos ao final do tratamento e alguns pacientes desenvolvem problemas no coração, nos rins e no fígado (DEMICHELI e FRÉZARD, 2005).

Estanho

O estanho é um metal branco e leve presente ligado a outros elementos químicos como cloro e oxigênio. Utilizado com outros metais para fabricação de solda, bronze, tubulações e outras ligas metálicas. O fluoreto de estanho é utilizado amplamente como pasta dental. Substâncias organoestanosas agem como antimicrobianos na agricultura, como estabilizantes de cloreto de polivinila (PVC) na

indústria e como agentes anti-incrustantes na indústria naval. Em animais de experimentação, verificou-se que compostos inorgânicos de estanho são mal absorvidos no trato gastrointestinal e, portanto, relativamente não tóxicos. Sais solúveis de estanho inorgânico são irritantes gástricos e produzem sinais não específicos de náusea, vômito e diarreia. Ratos mantidos com uma dieta contendo 0,3% ou mais de estanho inorgânico solúvel apresentaram retardo mental e anemia. Cloreto de estanho intravenoso é um potente indutor da heme oxigenase microsomal em ratos, levando a quebra da produção de heme. Ainda em ratos, uma dieta rica em ferro e cobre protegeu contra anemia, mas não diminuiu o retardo. O estanho causa efeitos adversos na absorção e no metabolismo dos elementos essenciais ferro, cobre e zinco. Ao contrário, organoestanosos, especialmente os trialkil derivados, são altamente tóxicos. Os compostos de trietilestanho são irritantes da pele e potente neurotoxina, reduzindo a quantidade de mielina no sistema nervoso central e causando edema na massa branca, provavelmente pelo desacoplamento da fosforilação oxidativa. Exposição por inalação aguda pode causar febre e a exposição crônica pode causar uma pneumoconiose benigna, estanose (HAYES, 2001).

Tálio

O tálio é um dos metais mais tóxicos ao ser humano. O íon tálio tem carga e raio iônico semelhante ao íon do potássio, interferindo nas funções do potássio e causando os seus efeitos tóxicos: irritação gastrointestinal, paralisia aguda, distúrbios físicos, alopecia, efeitos agudos cardiovasculares, inibição da fosforilação oxidativa mitocondrial. Este metal é utilizado na obtenção de ferro, zinco e cádmio, como depilatório, em pigmentos, semicondutores, termômetros, veneno de ratos e inseticidas, sendo estas duas últimas as fontes mais comuns de intoxicação para o homem. O tálio é absorvido pela pele e trato gastrointestinal. A meia-vida biológica do tálio no corpo é de 1 a 30 dias e pode ser dose-dependente (perfaz ciclo enterohepático) (KLAASEN, 2001).

Telúrio

O telúrio tem um grande número de aplicações na indústria e também é encontrado, em altas concentrações, em uma grande variedade de produtos alimentícios (condimentos, castanhas, peixes e produtos de consumo diário). Pneumonite e anemia hemolítica são doenças características da intoxicação aguda por telúrio. O hidreto de telúrio é altamente tóxico, causando irritação pulmonar e hemólise intravascular. Intoxicação aguda, oral ou parental, resulta em numerosos sintomas, com hematúria, visualizada em animais de experimentação.

Não há relatos de sérias lesões ou morte de trabalhadores expostos ao telúrio e seus compostos. Quanto à absorção, o telúrio é lentamente metabolizado a dimetil telúrio e é excretado na urina, suor e no ar exalado, caracterizando-se o “hálito de alho” (HAYES, 2001).

Urânio

O urânio é um metal leve e maleável da série dos actinídeos. O mineral primário do urânio é o óxido de urânio e a carnotita (um mineral que contém urânio e vanádio). O urânio é utilizado como combustível nuclear, mas há também outras utilidades menores, como corantes em cerâmicas ou vidros ou em cápsulas de projéteis. A exposição ocupacional ocorre na mineração e no enriquecimento do urânio (hexafluoreto de urânio) (HAYES, 2001).

A exposição por inalação aguda de hexafluoreto de urânio pode causar pneumonite, mas a causa principal seria pelo fluoreto. O rim é o principal alvo da toxicidade do urânio (túbulos proximais, coletor e alça de *Henle*). Em animais de experimentação, chegou-se a um valor de $3 \mu\text{g g}^{-1}$ de tecido renal como limite crítico de concentração neste tecido. Porém, em trabalhadores não se obteve evidências de toxicidade nesta concentração, provavelmente devido às diferenças entre o metabolismo humano e animal (ligação do urânio com a metalotioneína ou outra proteína detoxificante). A *U.S. EPA* determina uma dose de referência crônica para sais de urânio de $3 \mu\text{g U/kg/dia}$. Não há evidências de que o urânio não enriquecido seja carcinogênico a homens ou animais, porém devido a sua radiação ionizante a *U.S. EPA* classificou o urânio como carcinogênico humano (HAYES, 2001).

Vanádio

O vanádio é um metal branco acinzentado que não ocorre naturalmente sozinho, mas em combinação com oxigênio, sódio, enxofre e cloreto. A deficiência de vanádio ocorre em animais de laboratório com uma alimentação bem restrita, sendo que há evidência que ele participa de enzimas fosforil transferidoras (HAYES, 2001). O vanádio é encontrado na mineração, utilizado em revelações de fotografias, cremes dentais entre outros. A toxicidade do vanádio depende do seu estado físico-químico; particularmente da sua valência e solubilidade. O vanádio tetravalente é 5 vezes mais tóxico que o vanádio trivalente (ROSCHIN, 1967). Os compostos do vanádio são pouco absorvidos no trato gastrointestinal. A exposição por inalação ao vanádio e seus compostos resulta inicialmente em efeitos adversos no trato respiratório (ATSDR, 1990; RESS et al., 2003; WORLE-KNIRSCH et al., 2007). Outros efeitos foram descritos no sangue depois de exposição oral ou por inalação (SCIBOR et al., 2006; GONZALEZ-VILLALVA et al., 2006), no fígado (KOBAYASHI et al., 2006), no desenvolvimento neurológico em ratos (SOAZO e GARCIA, 2007) entre outros órgãos. O pentóxido de vanádio foi descrito como carcinogênico em ratos machos e em camundongos machos e fêmeas quando expostos por inalação (RESS et al., 2003). O vanádio não é classificado como carcinogênico humano (US EPA, 1991).

1.2 - Biomonitoramento

Nas últimas três décadas houve um grande aumento dos estudos para utilização e aplicabilidade (rotina) do biomonitoramento de elementos traço essenciais e tóxicos em diferentes matrizes biológicas. O monitoramento biológico de elementos tóxicos e organometálicos é de grande importância para o gerenciamento de políticas em saúde pública, pesquisa e também para entender a toxicologia de elementos químicos, sendo justificado através de vários exemplos ao longo dos anos de estudo onde se compreendeu em parte a ação de vários elementos tóxicos ou essenciais. A determinação de espécies organometálicas e inorgânicas redirecionam, na maioria das vezes, a utilização desses elementos na indústria, por exemplo (PASCHAL, 2007).

O biomonitoramento é definido como a avaliação da dose interna de um elemento tóxico ou de seu metabólito em um tecido ou fluido biológico. Para entender esse conceito nós devemos primeiramente considerar a dose externa, que são as concentrações desses elementos no ar, na água, no solo, na poeira ou em alimentos, ao qual a população está exposta. Essa dose externa, em parte, é absorvida através dos pulmões, intestino e pele e, ao entrar no organismo, forma-se a dose interna. Para caracterizar a dose interna, a concentração (mg L^{-1} , $\mu\text{g L}^{-1}$, $\mu\text{g dL}^{-1}$) de uma substância tóxica em um fluido biológico é determinada por uma metodologia analítica bem fundamentada. As informações obtidas de um biomonitoramento são geralmente empregadas para responder questões científicas específicas, para determinação da distribuição no ambiente, cinética, absorção e dose interna de um toxicante inorgânico (PASCHAL, 2007).

Assim, essa avaliação da deficiência de elementos químicos essenciais ou da presença de elementos tóxicos é uma prática comum em laboratórios clínicos de países desenvolvidos, visando melhorar a saúde da população (CDC, 2005). Nos Estados Unidos, por exemplo, o mais recente programa de biomonitoramento, realizado pelo Centro para Controle e Prevenção de Doenças (CDC) e publicada na “*Third National Report on Human Exposure to Environmental Chemicals*”, apresenta dados sobre 148 substâncias, que incluem elementos traço em urina (Sb, Ba, Be, Cd, Cs, Co, Pb, Hg, Mo, Pt, Tl, W e U) e sangue (Pb, Cd, Hg) coletados de 2001 a 2002 (CDC, 2005).

Normalmente, a análise de elementos químicos é realizada em rotina por técnicas de alta sensibilidade como a espectrometria de fluorescência atômica (AFS) e a de ICP-MS, sendo que atualmente esta última tem sido a técnica de escolha para a determinação de elementos em diversos tipos de amostras em concentrações em um intervalo de ng L^{-1} a $\mu\text{g L}^{-1}$ (CDC, 2005; SUTTON e CARUSO, 1999). A versatilidade da ICP-MS em termos de especificidade e sensibilidade a torna apropriada para a análise multielementar em rotina. As principais vantagens desta sobre outros métodos incluem o amplo intervalo dinâmico linear, alta velocidade de análise, capacidade de análise multielementar, espectro simples e habilidade para análises isotópicas (SUTTON e CARUSO, 1999).

1.3 - Espectrometria de Massas com Fonte de Plasma Acoplado Indutivamente

A quantificação de elementos químicos em amostras clínicas pode ser feita com a utilização de técnicas analíticas apropriadas, cabendo destaque para a espectrometria de absorção atômica com chama (FAAS) e com forno de grafite (GF AAS) (ZANÃO et al., 2002; ZHOU et al., 2002), espectrometria de emissão ótica com plasma (ICP OES) (PROHASKA et al., 2000) e a ICP-MS (PRUSZKOWSKI et al., 1998). Dentre as técnicas mencionadas, a de ICP-MS possui os melhores limites de detecção (Tabela 1), que possibilitam a determinação dos elementos de interesse nutricional-toxicológico com uma boa margem de confiança, entre 0,1 a 1000 $\mu\text{g L}^{-1}$, de forma multielementar, seqüencial e rápida. Além disso, deve-se destacar a possibilidade de medidas de razões isotópicas de vários elementos, que se constituem na “impressão digital” do elemento que está sendo determinado (FLAMENT et al., 2002). Um exemplo clássico da importância desta técnica na análise clínica de metais refere-se à determinação de Pb no plasma sanguíneo, considerado por muitos pesquisadores como o compartimento indicador da fração mais tóxica do Pb presente no sangue. Atualmente, a determinação em rotina de Pb no plasma sanguíneo só é possível utilizando-se a técnica de ICP-MS, devido às baixas concentrações encontradas, normalmente inferiores a 1 $\mu\text{g L}^{-1}$ (BARBOSA et al., 2005; BARBOSA et al., 2006A; BARBOSA et al., 2006B; BARBOSA et al., 2006C; BERGDAHL et al., 1999; MANTON et al., 2001).

Inicialmente, o ICP-MS foi utilizado para a análise de amostras geológicas (datação e caracterização de rochas e minérios) (DATE e GRAY, 1989), sendo os primeiros equipamentos comercializados em 1983. O plasma acoplado indutivamente é uma fonte bem caracterizada de alta temperatura, apropriada para a atomização e ionização de espécies elementares.

A forma convencional de introdução da amostra no ICP é líquida, e o sistema típico de introdução de amostra consiste em um nebulizador (pneumático ou ultrassônico), que forma um aerossol fino, seguido por uma câmara de nebulização que separa as gotas maiores das menores vindas do nebulizador. O aerossol é então, transportado para o plasma pelo fluxo do gás nebulizador, onde rapidamente sofre dessolvatação, vaporização, atomização e ionização, podendo ocorrer também a formação de óxidos devido a queda de temperatura pela saída do gás do canal central (Figura 1) (MONTASER, 1998).

Tabela 1. Comparação entre os limites de detecção aproximados ($\mu\text{g L}^{-1}$) para as técnicas de ICP-MS, ICPOES, FAAS e GFAAS e as concentrações consideradas referência no plasma sanguíneo.

Elemento	ICP-MS	ICPOES	FAAS	GF AAS	Concentração plasma
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

(Reproduzido de TYLER, 1994)

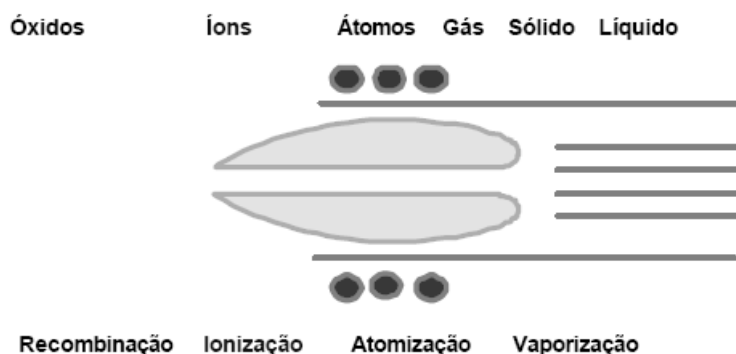


Figura 1 – Esquema de uma tocha e bobina de RF. Notar a seqüência de eventos que ocorrem com o elemento químico no plasma em função das diferentes temperaturas e da vazão de nebulização (Adaptado de JARVIS, GRAY e HOUK, 1992).

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 (Figura 2). Os íons são extraídos do plasma atmosférico para o MS à baixa pressão por meio de um cone de amostragem de platina que se encontra refrigerado. O orifício deste cone tem aproximadamente 1 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, chamado de *skimmer*, e a maior parte do $\text{Ar}_{(g)}$ é bombeada para fora. Os íons são focalizados diretamente no

caminho do analisador de massas usando uma série de lentes (que são eletrodos submetidos a diferentes voltagens). Os íons são então separados no analisador de massas (quadropolo) de acordo com sua razão massa/carga (m/z) (SUTTON e CARUSO, 1999).

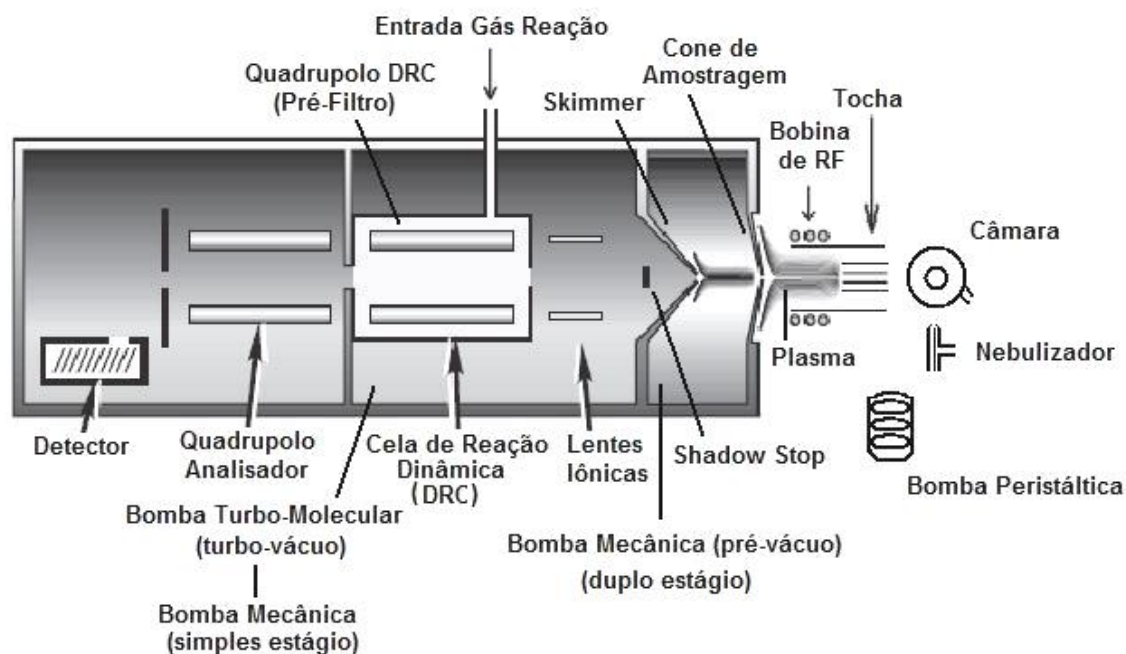


Figura 2 - Esquema de um espectrômetro de massas com plasma acoplado indutivamente e cela de reação dinâmica (DRC-ICP-MS). A Figura mostra os vários componentes do DRC-ICP-MS, destacando-se o DRC: um quadrupolo rf/dc que pode ser fechado e pressurizado com um gás de reação (Adaptado de TANNER e BARANOV, 1999).

O plasma é formado em uma tocha de quartzo, que consiste em três tubos concêntricos através dos quais flui gás argônio ($Ar_{(g)}$). O fluxo externo é chamado de gás de “plasma”, de resfriamento (refrigeração) ou gás suporte e é introduzido tangencialmente na tocha. É este fluxo de gás que sustenta a ICP. O fluxo de gás central é chamado de “auxiliar” e é usado para manter o plasma afastado das laterais da tocha de quartzo. O fluxo interno de gás é conhecido como gás “nebulizador” e transporta a solução do analito para o plasma. Uma fonte de radiofrequência de 27,12 ou 40,68 MHz é acoplada à tocha usando-se um filamento metálico (*coil*, resfriado também por fluxo de $Ar_{(g)}$), assim, campos elétricos e magnéticos oscilantes são formados no topo da tocha (Figura 3). O plasma é formado quando uma faísca, proveniente da bobina de *Tesla*, é usada para produzir

elétrons que são acelerados vetorialmente pelos campos elétricos e magnéticos tendo energia suficiente para ionizar o $\text{Ar}_{(g)}$. Colisões sucessivas causam novas ionizações e o plasma torna-se auto-sustentável. O gás permanece eletricamente neutro, e isto o torna um bom condutor de eletricidade, assim, parte da energia deste plasma é transferida para excitar e ionizar o analito (SUTTON e CARUSO, 1999).

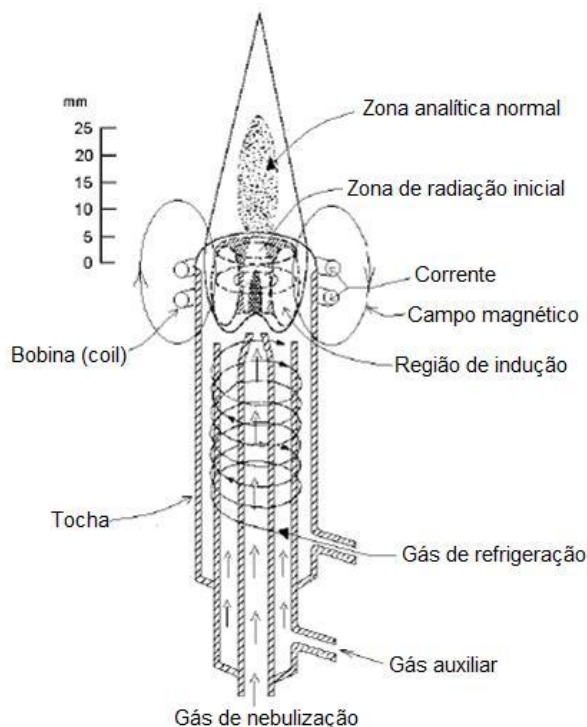


Figura 3 - Esquema do dispositivo e os componentes associados à formação do plasma. A figura mostra os três tubos concêntricos, situados em uma bobina de indução de um gerador de RF (Adaptado de JARVIS, GRAY e HOUK, 1992).

Desde 1997 foram publicados mais de 600 artigos que utilizaram esta técnica para a determinação de elementos químicos em amostras clínicas, visando tanto o desenvolvimento de métodos analíticos para a determinação de metais como a aplicação dos métodos já estabelecidos para estudos de elucidação de interação de metais ou semi-metais com proteínas (TAYLOR et al., 2004). A ICP-MS não é livre de problemas, pois durante a análise os metais, por exemplo, podem sofrer significativas interferências devido à formação de óxidos por elementos presentes no ar atmosférico, no $\text{Ar}_{(g)}$, diluente e/ou matriz (DIEGOR e LONGERICH, 2000).

Interferências em ICP-MS

Embora o ICP-MS seja uma poderosa técnica na determinação de elementos traço, um dos seus maiores problemas é sua suscetibilidade a interferências, que são divididas em dois grupos: físicas e espectrais (EVANS e GIGLIO, 1993). Uma ampla compreensão das possíveis interferências em ICP-MS pode ser decisiva na obtenção e interpretação dos dados analíticos, além de facilitar no desenvolvimento de metodologias relacionadas a esta técnica.

Interferências físicas

As interferências de natureza física estão relacionadas com as propriedades das amostras (como viscosidade e volatilidade), que podem interferir no método de introdução e na ionização da amostra no plasma. Existem vários métodos aplicados para detectar e eliminar este tipo de interferência, tais como a utilização de um padrão interno (devem ser livres de interferências espectrais como o índio e ródio), adição de padrão, diluição isotópica, ajuste de matriz, entre outros (PRICHARD et al., 1996; NIXON e MOYER, 1996).

Podem ocorrer também efeitos de supressão do sinal onde um excesso de elementos facilmente ionizáveis, presentes na matriz, poderá causar a supressão do sinal do analito e, em alguns casos, o aumento do sinal. Alguns elementos, tais como Na, Mg, K, Ca e Cs, aparentemente causam um aumento no sinal, enquanto Li exerce pouco efeito e B, Al e U causam supressão do sinal do analito (JARVIS, GRAY e HOUK, 1992). Como este efeito de matriz é dependente da quantidade absoluta do elemento causador da interferência, ele pode, em parte, ser reduzido pela diluição da amostra, além de sofrer também, influência das condições operacionais do plasma (EVANS e GIGLIO, 1993). O excesso de um elemento na matriz com baixo potencial de ionização levaria a um grande excesso de elétrons e íons positivos, os quais provocariam um deslocamento do equilíbrio no plasma, conduzindo à formação do átomo do analito, resultando na supressão da formação do íon (GRÉGOIRE, 1987). Efeito de espaço-carga também se enquadra neste tipo de interferência. Na presença de um excesso de íons provenientes da matriz, relativamente pesados, os quais possuem uma energia translacional maior, os íons

mais leves são repelidos do feixe de íons, e apenas uma pequena quantidade destes analitos mais leves chegarão ao detector (GILSON et al., 1988).

Uma das interferências físicas observadas para ICP-MS é o efeito de memória, oriundo do lento decaimento do sinal para um nível de até 0,1% do sinal total quando a solução do analito é substituída pelo branco. Este efeito é devido principalmente ao excesso de analito proveniente das paredes da câmara de nebulização e da vidraria associada, tornando-se pior para os componentes mais voláteis da solução, tais como os compostos de Pb, Cd, Li, I e principalmente o Hg; compostos refratários são menos propensos a este efeito. Outra interferência física é a deposição de sal ou carbono nos cones de amostragem e no *skimmer*, causando obstrução dos orifícios, afetando substancialmente o processo de amostragem. Estas interferências são geradas pela introdução de amostras com alto teor de sólidos dissolvidos ou compostos orgânicos, os quais podem afetar também a eficiência de ionização. O nível de tolerância para o teor de sólidos dissolvidos é de 0,2% para uma análise em ICP-MS (ALLAIN et al., 1991).

Interferências espectrais

As interferências espectrais, que ocorrem geralmente para a determinação de elementos com massa atômica inferior a 82 u.m.a. (como o As, Zn e Fe), podem ser divididas em dois grupos: interferências isobáricas e interferências poliatômicas (Tabela 2). As interferências isobáricas ocorrem quando um isótopo de um elemento sobrepõe a leitura de um isótopo de outro elemento com a mesma massa nominal. As interferências poliatômicas são formadas a partir de moléculas ionizadas que são produzidas nas altas temperaturas do plasma ou na região de interface entre o plasma e os filtros de massa (PRICHARD et al., 1996). Esses íons poliatômicos podem interferir com alguns isótopos de mesma massa nominal e são produzidos a partir do $\text{Ar}_{(g)}$ e outros gases (O_2 e N_2), de reagentes utilizados no tratamento das amostras (como o H_2SO_4 , HCl , HF) ou da própria matriz da amostra (sais e íons) (PRICHARD et al., 1996). Interferentes como ArH^+ , H_3O^+ e H_3^+ por exemplo, que doam prótons para hidrocarbonetos, aumentam o sinal espectral de fundo em várias ordens de magnitude (TANNER et al., 2002), sendo outro exemplo clássico a interferência do poliatômico $^{40}\text{Ar}^{16}\text{O}$ sobre o ^{56}Fe .

Existem também os óxidos, espécies que podem ser provenientes ou da dissociação incompleta da amostra ou da recombinação dos íons no plasma (JARVIS, GRAY e HOUK, 1992). O controle da resposta de óxidos em uma análise é determinado pela razão óxido/íon, MO^+/M^+ ($^{140}Ce^{16}O^+/^{140}Ce^+$), freqüentemente expresso em porcentagem. Na realidade, esta razão é uma aproximação da razão correta $MO^+/(MO^++M^+)$, e na maioria dos casos não deve exceder 3%. A formação de óxidos também está relacionada com a quantidade de vapor de água transportada, uma vez que o analito poderá ser atomizado em um excesso de átomos de oxigênio. A quantidade de água introduzida no plasma também poderá afetar o equilíbrio do mesmo. Aumentar a potência do plasma (aumento de temperatura), diminuir a vazão do gás carregador, introdução de uma câmara de nebulização resfriada a pelo menos 4°C, o uso de um nebulizador ultra-sônico que possui um sistema de dessolvatação podem ser soluções na otimização dos parâmetros instrumentais do equipamento em uma análise. A eliminação ou remoção dos óxidos está relacionada com a força da ligação entre o metal e o oxigênio; para elementos mais refratários, como o Si, por exemplo, a razão MO^+/M^+ será maior do que para o Co, que possui uma menor energia de ligação (Tabela 3).

Tabela 2 – Interferências isobáricas e poliatômicas em ICP-MS dos isótopos dos elementos em estudo com sua respectiva abundância.

<i>Isótopos</i>	<i>Abundância</i>	<i>Interferentes</i>
^{27}Al	100	$^{12}C^{15}N^+$, $^{13}C^{14}N^+$, $^{14}N_2$ spread, $^1H^{12}C^{14}N^+$
^{75}As	100	$^{40}Ar^{35}Cl^+$, $^{59}Co^{16}O^+$, $^{36}Ar^{38}Ar^{16}H^+$, $^{38}Ar^{37}Cl^+$, $^{36}Ar^{39}K$, $^{43}Ca^{16}O_2$, $^{23}Na^{12}C^{40}Ar$, $^{12}C^{31}P^{16}O_2^+$
^{40}Ca	96,97	$^{40}Ar^+$
^{43}Ca	0,145	$^{27}Al^{16}O^+$
^{44}Ca	2,06	$^{12}C_2^{16}O_2^+$, $^{14}N_2^{16}O^+$, $^{28}Si^{16}O^+$
^{110}Cd	12,5	$^{39}K_2^{16}O^+$
^{111}Cd	12,8	$^{95}Mo^{16}O^+$, $^{94}Zr^{16}O^{16}H^+$, $^{39}K_2^{16}O_2^{16}H^+$
^{112}Cd	24,1	$^{40}Ca_2^{16}O_2^+$, $^{40}Ar_2^{16}O_2^+$, $^{96}Ru^{16}O^+$
^{113}Cd	12,22	$^{96}Zr^{16}O^{16}H^+$, $^{40}Ca_2^{16}O_2^{16}H^+$, $^{40}Ar_2^{16}O_2^{16}H^+$, $^{96}Ru^{17}O^+$
^{114}Cd	28,7	$^{98}Mo^{16}O^+$, $^{98}Ru^{16}O^+$
^{116}Cd	7,49	$^{100}Ru^{16}O^+$
^{59}Co	100	$^{43}Ca^{16}O^+$, $^{42}Ca^{16}O^{16}H^+$, $^{24}Mg^{35}Cl^+$, $^{36}Ar^{23}Na^+$, $^{40}Ar^{18}O^{16}H^+$, $^{40}Ar^{19}F^+$
^{50}Cr	4,35	$^{34}S^{16}O^+$, $^{36}Ar^{14}N^+$, $^{35}Cl^{15}N^+$, $^{36}S^{14}N^+$, $^{32}S^{18}O^+$, $^{33}S^{17}O^+$, $^{50}Ti^+$, $^{50}V^+$
^{52}Cr	83,76	$^{35}Cl^{16}O^{16}H^+$, $^{40}Ar^{12}C^+$, $^{36}Ar^{16}O^+$, $^{37}Cl^{15}N^+$, $^{34}S^{18}O^+$, $^{36}S^{16}O^+$, $^{38}Ar^{14}N^+$, $^{36}Ar^{15}N^{16}H^+$, $^{35}Cl^{17}O^+$
^{53}Cr	9,51	$^{37}Cl^{16}O^+$, $^{38}Ar^{15}N^+$, $^{38}Ar^{14}N^{16}H^+$, $^{36}Ar^{17}O^+$, $^{36}Ar^{16}O^{16}H^+$, $^{35}Cl^{17}O^{16}H^+$, $^{35}Cl^{18}O^+$, $^{36}S^{17}O^+$, $^{40}Ar^{13}C^+$
^{54}Cr	2,38	$^{37}Cl^{16}O^{16}H^+$, $^{40}Ar^{14}N^+$, $^{38}Ar^{15}N^{16}H^+$, $^{36}Ar^{18}O^+$, $^{38}Ar^{16}O^+$, $^{36}Ar^{17}O^{16}H^+$, $^{37}Cl^{17}O^+$, $^{19}F_2^{16}O^+$
^{63}Cu	69,1	$^{31}P^{16}O_2^+$, $^{40}Ar^{23}Na^+$, $^{47}Ti^{16}O^+$, $^{23}Na^{40}Ca^+$, $^{46}Ca^{16}O^{16}H^+$, $^{36}Ar^{12}C^{14}N^{16}H^+$, $^{14}N^{12}C^{37}Cl^+$, $^{16}O^{12}C^{35}Cl^+$

Isótopos	Abundância	Interferentes
⁶⁵ Cu	30,9	⁴⁹ Ti ¹⁶ O ⁺ , ³² S ¹⁶ O ₂ ¹ H ⁺ , ⁴⁰ Ar ²⁵ Mg ⁺ , ⁴⁰ Ca ¹⁶ O ¹ H ⁺ , ³⁶ Ar ¹⁴ N ₂ ¹ H ⁺ , ³² S ³³ S ⁺ , ³² S ¹⁶ O ¹⁷ O ⁺ , ³³ S ¹⁶ O ₂ ⁺ , ¹² C ¹⁶ O ³⁷ Cl ⁺ , ¹² C ¹⁸ O ³⁵ Cl ⁺ , ³¹ P ¹⁶ O ¹⁸ O ⁺
⁵⁴ Fe	5,82	³⁷ Cl ¹⁶ O ¹ H ⁺ , ⁴⁰ Ar ¹⁴ N ⁺ , ³⁸ Ar ¹⁵ N ¹ H ⁺ , ³⁶ Ar ¹⁸ O ⁺ , ³⁸ Ar ¹⁶ O ⁺ , ³⁶ Ar ¹⁷ O ¹ H ⁺ , ³⁶ S ¹⁸ O ⁺ , ³⁵ Cl ¹⁸ O ¹ H ⁺ , ³⁷ Cl ¹⁷ O ⁺
⁵⁶ Fe	91,66	⁴⁰ Ar ¹⁶ O ⁺ , ⁴⁰ Ca ¹⁶ O ⁺ , ⁴⁰ Ar ¹⁵ N ¹ H ⁺ , ³⁸ Ar ¹⁸ O ⁺ , ³⁸ Ar ¹⁷ O ¹ H ⁺ , ³⁷ Cl ¹⁸ O ¹ H ⁺
⁵⁷ Fe	2,19	⁴⁰ Ar ¹⁶ O ¹ H ⁺ , ⁴⁰ Ca ¹⁶ O ¹ H ⁺ , ⁴⁰ Ar ¹⁷ O ⁺ , ³⁸ Ar ¹⁸ O ¹ H ⁺ , ³⁸ Ar ¹⁹ F ⁺
⁵⁸ Fe	0,33	⁴⁰ Ar ¹⁸ O ⁺ , ⁴⁰ Ar ¹⁷ O ¹ H ⁺
²⁰⁴ Hg	6,85	²⁰⁴ Pb ⁺
²⁴ Mg	78,7	¹² C ₂ ⁺
²⁵ Mg	10,13	¹² C ¹ H ⁺
²⁶ Mg	11,17	¹² C ¹⁴ N ⁺ , ¹² C ₂ ¹² H ₂ ⁺ , ¹² C ¹³ C ¹ H ⁺
⁵⁵ Mn	100	⁴⁰ Ar ¹⁴ N ¹ H ⁺ , ³⁹ K ¹⁶ O ⁺ , ³⁷ Cl ¹⁸ O ⁺ , ⁴⁰ Ar ¹⁵ N ⁺ , ³⁸ Ar ¹⁷ O ⁺ , ³⁶ Ar ¹⁸ O ¹ H ⁺ , ³⁸ Ar ¹⁶ O ¹ H ⁺ , ³⁷ Cl ¹⁷ O ¹ H ⁺ , ²³ Na ³² S ⁺ , ³⁶ Ar ¹⁹ F ⁺
⁹⁴ Mo	9,3	³⁹ K ₂ ¹⁶ O ⁺
⁹⁵ Mo	15,9	⁴⁰ Ar ³⁹ K ¹⁶ O ⁺ , ⁷⁹ Br ¹⁶ O ⁺
⁹⁶ Mo	16,7	³⁹ K ⁴¹ K ¹⁶ O ⁺ , ⁷⁹ Br ¹⁷ O ⁺
⁹⁷ Mo	9,6	⁴⁰ Ar ₂ ¹⁶ O ¹ H ⁺ , ⁴⁰ Ca ₂ ¹⁶ O ¹ H ⁺ , ⁴⁰ Ar ⁴¹ K ¹⁶ O ⁺ , ⁸¹ Br ¹⁶ O ⁺
⁹⁸ Mo	24,1	⁸¹ Br ¹⁷ O ⁺ , ⁴¹ K ₂ ¹⁶ O ⁺
²⁰⁶ Pb	24,1	¹⁹⁰ Pt ¹⁶ O ⁺
²⁰⁷ Pb	22,1	¹⁹¹ Ir ¹⁶ O ⁺
²⁰⁸ Pb	52,4	¹⁹² Pt ¹⁶ O ⁺
¹⁰³ Rh	100	⁴⁰ Ar ⁶³ Cu ⁺
¹²¹ Sb	57,36	¹⁰⁵ Pd ¹⁶ O ⁺
¹²³ Sb	47,6	⁹⁴ Zr ¹⁶ O ⁺
⁷⁴ Se	0,87	³⁷ Cl ³⁷ Cl ⁺ , ³⁶ Ar ³⁸ Ar ⁺ , ³⁸ Ar ³⁶ S ⁺ , ⁴⁰ Ar ³⁴ S ⁺
⁷⁶ Se	9,02	⁴⁰ Ar ³⁶ Ar ⁺ , ³⁸ Ar ³⁸ Ar ⁺
⁷⁷ Se	7,58	⁴⁰ Ar ³⁷ Cl ⁺ , ³⁶ Ar ⁴⁰ Ar ¹ H ⁺ , ³⁸ Ar ₂ ¹ H ⁺ , ¹² C ¹⁹ F ¹⁴ N ¹⁶ O ₂ ⁺
⁷⁸ Se	23,52	⁴⁰ Ar ³⁸ Ar ⁺ , ³⁸ Ar ⁴⁰ Ca ⁺
⁸⁰ Se	49,82	⁴⁰ Ar ₂ ⁺ , ³² S ¹⁶ O ₃ ⁺
⁸² Se	9,19	¹² C ³⁵ Cl ₂ ⁺ , ³⁴ S ¹⁶ O ₃ ⁺ , ⁴⁰ Ar ₂ ¹ H ₂ ⁺
¹¹⁶ Sn	14,53	¹⁰⁰ Ru ¹⁶ O ⁺
¹¹⁸ Sn	24,23	¹⁰² Ru ¹⁶ O ⁺ , ¹⁰² Pd ¹⁶ O ⁺
¹²⁰ Sn	32,59	¹⁰⁴ Ru ¹⁶ O ⁺ , ¹⁰⁴ Pd ¹⁶ O ⁺
¹²² Te	2,603	¹⁰⁶ Pd ¹⁶ O ⁺
¹²⁴ Te	4,816	¹⁰⁸ Pd ¹⁶ O ⁺
¹³⁰ Te	33,80	⁹⁸ Ru ¹⁶ O ₂ ⁺
²⁰³ Tl	29,5	¹⁸⁷ Re ¹⁶ O ⁺ , ¹⁸⁶ W ¹⁶ O ¹ H ⁺
⁵⁰ V	0,24	³⁴ S ¹⁶ O ⁺ , ³⁶ Ar ¹⁴ N ⁺ , ³⁵ Cl ¹⁵ N ⁺ , ³⁶ S ¹⁴ N ⁺ , ³² S ¹⁸ O ⁺ , ³³ S ¹⁷ O ⁺
⁵¹ V	99,76	³⁴ S ¹⁶ O ¹ H ⁺ , ³⁵ Cl ¹⁶ O ⁺ , ³⁸ Ar ¹³ C ⁺ , ³⁶ Ar ¹⁵ N ⁺ , ³⁶ Ar ¹⁴ N ¹ H ⁺ , ³⁷ Cl ¹⁴ N ⁺ , ³⁶ S ¹⁵ N ⁺ , ³³ S ¹⁸ O ⁺ , ³⁴ S ¹⁷ O ⁺
⁶⁴ Zn	48,89	³² S ¹⁶ O ₂ ⁺ , ⁴⁸ Ti ¹⁶ O ⁺ , ³¹ P ¹⁶ O ₂ ¹ H ⁺ , ⁴⁸ Ca ¹⁶ O ⁺ , ³² S ₂ ⁺ , ³¹ P ¹⁶ O ¹⁷ O ⁺ , ³⁴ S ¹⁶ O ₂ ⁺ , ³⁶ Ar ¹⁴ N ₂ ⁺
⁶⁶ Zn	27,81	⁵⁰ Ti ¹⁶ O ⁺ , ³⁴ S ¹⁶ O ₂ ⁺ , ³³ S ¹⁶ O ₂ ¹ H ⁺ , ³² S ¹⁶ O ¹⁸ O ⁺ , ³² S ¹⁷ O ₂ ⁺ , ³³ S ¹⁶ O ¹⁷ O ⁺ , ³² S ³⁴ S ⁺ , ³³ S ₂ ⁺
⁶⁷ Zn	4,11	³⁵ Cl ¹⁶ O ₂ ⁺ , ³³ S ³⁴ S ⁺ , ³⁴ S ¹⁶ O ₂ ¹ H ⁺ , ³² S ¹⁶ O ¹⁸ O ¹ H ⁺ , ³³ S ³⁴ S ⁺ , ³⁴ S ¹⁶ O ¹⁷ O ⁺ , ³³ S ¹⁶ O ¹⁸ O ⁺ , ³² S ¹⁷ O ¹⁸ O ⁺ , ³³ S ¹⁷ O ₂ ⁺ , ³⁵ Cl ¹⁶ O ₂ ⁺
⁶⁸ Zn	18,57	³⁶ S ¹⁶ O ₂ ⁺ , ³⁴ S ¹⁶ O ¹⁸ O ⁺ , ⁴⁰ Ar ¹⁴ N ₂ ⁺ , ³⁵ Cl ¹⁶ O ¹⁷ O ⁺ , ³⁴ S ₂ ⁺ , ³⁶ Ar ³² S ⁺ , ³⁴ S ¹⁷ O ₂ ⁺ , ³³ S ¹⁷ O ¹⁸ O ⁺ , ³² S ¹⁸ O ⁺ , ³² S ³⁶ S ⁺
⁷⁰ Zn	0,62	³⁵ Cl ³⁵ Cl ⁺ , ⁴⁰ Ar ¹⁴ N ¹ O ⁺ , ³⁵ Cl ¹⁷ O ¹⁸ O ⁺ , ³⁷ Cl ¹⁶ O ¹⁷ O ⁺ , ³⁴ S ¹⁸ O ₂ ⁺ , ³⁶ S ¹⁶ O ¹⁸ O ⁺ , ³⁶ S ¹⁷ O ₂ ⁺ , ³⁴ S ³⁶ S ⁺ , ³⁶ Ar ³⁴ S ⁺ , ³⁸ Ar ³² S ⁺

(Reproduzido de MAY e WIEDMEYER, 1998)

Outros interferentes espectrais são os íons de dupla carga. Como os íons são filtrados no analisador de massa com base na razão massa/carga, os íons de dupla carga aparecerão no espectro com metade da massa do íon desejado univalente, incorrendo em dois pontos: (1) pequena perda do sinal e, portanto, em sensibilidade para as espécies univalentes; (2) geração de um número de isótopos com metade da massa do íon de origem, ocasionando interferências em massas semelhantes. Os elementos mais suscetíveis a esta interferência são os alcalino-terrosos, alguns metais de transição e os terras-raras, por possuírem baixo potencial de ionização. O controle é realizado por meio do monitoramento da razão M^{2+}/M^+ ($^{138}\text{Ba}^{++}/^{138}\text{Ba}^+$), que também não deve exceder 3%. Mais uma vez, a vazão do gás carregador do aerossol e a potência de radiofrequência serão parâmetros determinantes no controle, ou aumentando a vazão do gás (resfriando o plasma), ou diminuindo a potência RF (a temperatura do plasma diminui).

Tabela 3 – Força de ligação entre os óxidos.

<i>Elemento</i>	<i>Energia de ligação (kJ mol⁻¹)</i>	<i>MO⁺/M[*]</i>
Rb	255	$5,5 \cdot 10^{-7}$
Cs	297	$2,8 \cdot 10^{-8}$
Co	368	$1,7 \cdot 10^{-5}$
Pb	409	$1,2 \cdot 10^{-5}$
Fe	427	$1,1 \cdot 10^{-5}$
Cr	512	$3,6 \cdot 10^{-5}$
Al	563	$1,1 \cdot 10^{-5}$
Ba	597	$8,3 \cdot 10^{-5}$
P	607	$3,7 \cdot 10^{-3}$
Mo	619	$9,5 \cdot 10^{-4}$
Sm	662	$2,3 \cdot 10^{-3}$
Ti	760	$1,8 \cdot 10^{-3}$
Zr	795	$4,7 \cdot 10^{-3}$
Ce	795	$1,3 \cdot 10^{-2}$
Si	799	$1,5 \cdot 10^{-3}$

(Reproduzido de GRAY e WILLIAMS, 1987).

Cela de reação dinâmica (DRC)

Para minimizar ou mesmo eliminar as interferências na espectrometria de massas com plasma acoplado tem sido proposto o uso de diferentes tecnologias, tais como o SF-ICP-MS (*Sector Field high resolution* ou focalizador de setor duplo) e o DRC. Para esta finalidade também são utilizadas as técnicas de plasma frio e de separação de matriz, correções matemáticas, ajuste experimental das condições do plasma, separação cromatográfica, dessolvatação, entre outros (BARANOV e TANNER, 1999; CHRISTOPHER et al., 2005; FELDMANN et al., 1999a; FELDMANN et al., 1999b). A aplicação do SF-ICP-MS na área clínica, operando em média ou alta resolução, vem sendo avaliada por alguns grupos de pesquisa há alguns anos (FIELD et al., 2003; MUNIZ et al., 1999a,b; TOWNSEND et al., 1998). Para alguns isótopos, o uso da mais alta resolução do SF-ICP-MS aumenta a seletividade, porém compromete a sensibilidade, inviabilizando a análise de alguns elementos em concentrações fisiológicas baixas. Além disso, poucos laboratórios o utilizam para exames de rotina devido a sua complexidade e ao alto custo tanto do equipamento quanto da manutenção (PARSONS e BARBOSA, 2007).

O DRC é um dispositivo muito atrativo, pois a amostra é introduzida convencionalmente com a técnica ICP-MS em condições analíticas normais, podendo-se eliminar a etapa de pré-tratamento das amostras para determinados analitos, diminuindo o tempo de análise e o gasto com reagentes. O DRC-ICP-MS é um equipamento versátil para a eliminação de interferentes, dado a oportunidade de escolha de vários gases de reação como Xe, CH₄, (CH₃)₂, NH₃, He, e mistura H₂:Ar (1:9 v/v), injetados no interior do DRC. Ele está localizado na câmara de vácuo entre o cilindro de lentes iônicas e o quadrupolo analisador (Figura 2).

O DRC é constituído por um quadrupolo com lentes em cada extremidade sendo alimentado por radiofrequência (rf) e voltagem DC (contínua) (BARANOV e TANNER, 1999). O campo de rádio-freqüência se comporta como um componente de energia para a distribuição térmica de energia provendo um ambiente termicamente controlado para maior promoção das reações. Assim, após entrarem normalmente pela interface do ICP-MS, os analitos e interferentes são levados sob vácuo até o DRC que possui basicamente dois aparatos para eliminar esses interferentes: 1) discriminação por energia cinética e 2) discriminação por massa. A

discriminação por energia cinética é alcançada colocando-se o DRC com polarização positiva ligeiramente menor que a polarização do filtro de massas. Isso significa que os produtos iônicos das colisões, que têm a mesma energia da célula, são discriminados e rejeitados, enquanto os íons de interesse analítico, que possuem uma energia cinética maior que a energia da célula, são transmitidos (TANNER et al., 2002). Para realizar a discriminação por massa é utilizado um pequeno quadrupolo no interior do DRC, que funciona como um filtro de massas semelhante ao quadrupolo do ICP-MS (THOMAS, 2002).

A transmissão dos íons dentro do quadrupolo é gerenciada por um diagrama de estabilidade (Figura 4). O posicionamento, de acordo com este diagrama, é definido por dois parâmetros de rejeição, RP_a e RP_q , relatados pelas equações de *Mathieu*. RP_a é proporcional a voltagem DC e RP_q é proporcional a voltagem rf, sendo ambas inversamente proporcionais a freqüência angular rf. Em $a=0,24$ e $q=0,706$ é onde há maior restrição (rejeição) dos íons, comparável ao filtro de massas do quadrupolo (TANNER et al., 2002).

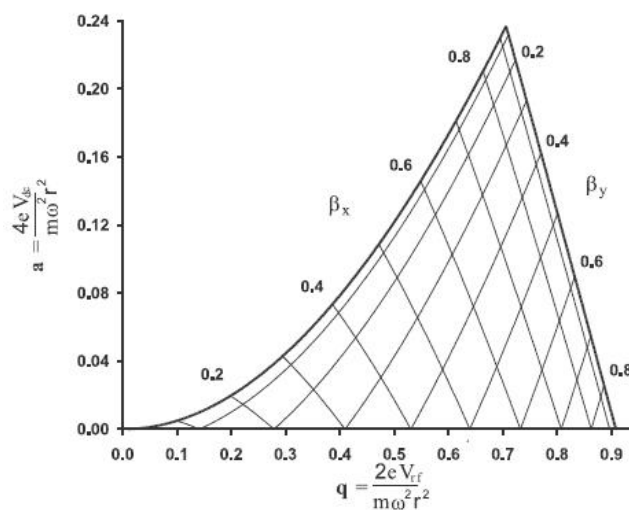


Figura 4 – Diagrama de estabilidade para um quadrupolo linear sob condições de baixo número de colisões. A região com linhas ligadas pelas curvas $\beta_y = 0$ e $\beta_x = 1$ fornece o caminho de estabilidade do íon em ambos, x e y (a : voltagem aplicada entre os pares de pólos independente da massa e é aplicada no topo da rf amplificada (q); q : rf determinada pelo analito; n : ordem do multipolo (quadrupolo $n = 4$); e : carga eletrônica; m : massa do íon; V_{dc} : voltagem dc; V_{rf} : voltagem de rf; m : massa do íon; ω : freqüência angular rf; r_o : raio do campo magnético (Adaptado de TANNER e BARANOV, 1999).

Os tipos de reações que ocorrem no interior da câmara geralmente são: 1- Reação de transferência de carga (equação 1); 2- Reação de transferência de próton (equação 2); 3- Reação de oxidação onde o gás, ao invés de reagir com o interferente, reage com o íon analito (equação 3). A otimização do DRC leva em consideração a vazão do gás onde se obtém o menor sinal de fundo e a intensidade máxima para o íon analito. É muito importante considerar também que a vazão do gás no DRC que gera o menor sinal de fundo nem sempre é o melhor, pois este tem que ir de acordo com o menor limite de detecção e com a natureza reativa dos analitos de interesse em questão com o gás injetado na câmara (TANNER et al., 2002).



Devido o íon possuir carga, ele pode interagir com o momento dipolo de uma molécula polar ou induzir um dipolo em uma molécula não-polar. As interações íon-dipolo são efetivas ao longo das distâncias inter-atômicas, e então a frequência entre moléculas neutras e íons é alta. As interações íon-dipolo são, na maioria das vezes, suficientemente fortes para excederem a barreira de ativação da energia potencial e promoverem reações exotérmicas, permitindo então, termodinamicamente, reações íon-molécula geralmente rápidas. Devido à barreira de ativação da energia que promove as reações ser geralmente insignificante, a probabilidade de uma simples pequena partícula (elétron, átomo de hidrogênio e/ou próton) transferir reações é binária (ocorre ou não) e depende da exotermicidade da reação (isto é, a diferença no potencial de ionização do produto e reagentes neutros que promovam a transferência de elétrons). Portanto, permitindo termodinamicamente reações íon-molécula geralmente rápidas e altamente específicas. Por exemplo, a reação 1 é rápida possuindo uma taxa constante de $1,7 \cdot 10^{-9} \text{ cm}^3 \text{ molécula}^{-1} \text{ s}^{-1}$ (TANNER et al., 2002).



A reação 1 é um exemplo da transferência de elétrons (ou troca de carga), e ocorre devido ao potencial de ionização da amônia (10,2 eV) ser menor que o potencial do argônio (15,775 eV). A reação é exotérmica. Por outro lado, o potencial de ionização do cálcio (6,111 eV) é menor que o potencial da amônia, correspondendo a uma reação endotérmica que não observa-se ocorrer (Reação 2) pois a taxa constante é menor que $10^{-13} \text{ cm}^3 \text{ molécula}^{-1} \text{ s}^{-1}$. A diferença na taxa constante de reações entre elementos isobáricos como Ar^+ e Ca^+ com NH_3 permite que o sinal para o íon Ar^+ , que possui uma razão massa/carga (m/z) de 40, seja suprimido em 9 ordens de magnitude enquanto simultaneamente o sinal do íon Ca^+ não é virtualmente afetado. Essa especificidade na reação gera uma grande melhora no limite de detecção quando o ICP-MS está configurado no modo DRC (TANNER et al., 2002). A Tabela 4 nos mostra o potencial de ionização dos elementos estudados e dos elementos muitas vezes envolvidos como interferentes.

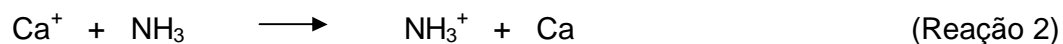


Tabela 4 – Potencial de ionização de alguns elementos em ordem decrescente de potencial.

Massa média	Elemento	Potencial de ionização (eV)	Massa	Elemento	Potencial de ionização (eV)
39,948	Argônio	15,7596	54,938	Manganês	7,434
15,999	Oxigênio	13,6181	207,2	Chumbo	7,4167
35,453	Cloro	12,9676	118,71	Estanho	7,3439
12,0107	Carbono	11,2603	95,94	Molibdênio	7,0924
200,590	Mercúrio	10,4375	51,9961	Cromo	6,7665
32,065	Enxofre	10,36	50,9415	Vanádio	6,7462
74,9216	Arsênio	9,7886	88,9059	Ítrio	6,2173
78,96	Selênio	9,7524	238,0289	Urânio	6,1941
65,39	Zinco	9,3942	40,078	Cálcio	6,1132
127,6	Telúrio	9,0096	204,3833	Tálio	6,1082
112,411	Cádmio	8,9938	69,723	Gálio	5,9993
192,217	Íridio	8,9670	26,9815	Alumínio	5,9858
195,078	Platina	8,9587	114,818	Índio	5,7864
121,76	Antimônio	8,6084	87,62	Estrôncio	5,6949
106,42	Paládio	8,3369	140,116	Cério	5,5387
55,845	Ferro	7,9024	6,941	Lítio	5,3917
58,9332	Cobalto	7,881	137,327	Bário	5,2117
63,546	Cobre	7,7264	22,9897	Sódio	5,1391
24,305	Magnésio	7,6462	85,4678	Rubídio	4,1771
102,9055	Ródio	7,4589	132,9055	Césio	3,8939

(Reproduzido de *Israel Science and Technology*, 2008)

Além da NH_3 , outro gás utilizado é o H_2 , que possui particularidades com relação a sua seletividade química. Primeiro, a ligação H-H é relativamente forte (4,5 eV de energia de dissociação), no mínimo 2 eV mais forte que a maioria das ligações MH^+ . As reações de transferência do átomo de H com cátions de metais são geralmente endotérmicas. Apesar de 2 a 3 eV parecer não ser uma grande

quantidade de energia pra sobrepor essa endotermicidade, comparada com a energia de 5 a 10 eV dos íons extraídos de um ICP, ela está no centro de massa onde ocorre as reações enquanto a segunda refere-se a energia cinética moldada em laboratório. Reações de troca de carga também são energeticamente impossíveis entre o H₂ (15,6 eV) e os cátions dos analitos devido a menor energia de ionização dos analitos (6 a 9 eV), resultando, como no caso da amônia, na especificidade reacionária com os interferentes. Enquanto a pequena massa do hidrogênio é uma vantagem pelas razões citadas, está descrito que apenas o H₂ (puro) é incapaz de produzir um ambiente termicamente eficiente para a entrada da corrente de íons na cela. Porém, misturas de H₂ se mostraram eficientes, suprimindo interferentes de Ar de 5 a 9 ordens de magnitude, sendo os gases de mistura Ne, Xe ou Ar que são gases de maior peso (KOPPENAAL et al., 2004).

Assim, na prática, a técnica DRC tem se mostrado altamente favorável para a determinação de alguns elementos em amostras clínicas, simplificando-se a etapa de pré-tratamento das amostras (KOPPENAAL et al., 2004; MANTON et al., 2001). As amostras podem ser analisadas com uma simples diluição, o que facilita a determinação de ⁸⁰Se, ⁷⁵As e ⁵⁶Fe, livres de interferências isobáricas devida à formação de ⁴⁰Ar₂, ⁴⁰Ar³⁵Cl e ⁴⁰Ar¹⁶O, além de eliminar possíveis contaminações que ocorreriam durante o processo de pré-tratamento das amostras (KOPPENAAL et al., 2004; TANNER et al., 2002). D'Llio et al. (2006b) propuseram um método para a análise de 17 elementos químicos traço em amostras de sangue digeridas utilizando DRC-ICP-MS (com NH_{3(g)} e O_{2(g)} como gases de reação) e concluíram ser este um método apropriado para análise de elementos químicos em matrizes complexas como sangue. O uso do DRC resolveu os indesejáveis problemas de interferências sem a perda da sensibilidade, gerando resultados em boa concordância quando comparados aos obtidos nas mesmas amostras por SF-ICP-MS. Portanto, o DRC combinado com o filtro de massas do quadrupolo analisador parece ser um meio eficaz para a resolução química das interferências isobáricas, bem como um benefício complementar que aumenta a sensibilidade, a precisão e a resolução das massas (TANNER et al., 2002).

Introdução direta de amostras clínicas em ICP-MS

Na análise de metais em sangue, normalmente são empregadas dois métodos básicos para o preparo da amostra: simples diluição ou digestão (geralmente assistida por microondas) (D'LLIO et al., 2006b). A simples diluição das amostras de sangue, soro ou urina é necessária para reduzir os efeitos de supressão do sinal das respectivas matrizes e para evitar o entupimento do bico do injetor e do nebulizador (ST'ASTNÁ et al., 1999). Alimonti et al. (1997) mostrou a capacidade do ICP-MS de determinar 14 elementos químicos em soro diluídos entre 20 e 50 vezes em ácido nítrico 0,14 M. Mestek et al. (1997) determinaram selênio em sangue humano depois de diluição em diluente contendo Triton X-100 (1% v/v) e ácido nítrico (1% v/v). O tratamento das amostras utilizando a digestão é baseado na destruição da matéria orgânica presente na amostra e, para isso, são utilizados um ou mais ácidos como o ácido nítrico, além de peróxidos. Frequentemente, esta técnica é utilizada para amostras clínicas sólidas como cérebro e fígado (KRACHLER et al., 1996). Entre as desvantagens da digestão encontram-se os riscos de contaminação das amostras, aumento dos brancos analíticos, possibilidade de perda de elementos voláteis como o mercúrio (no caso de digestão em sistemas abertos) e principalmente o tempo total destinado para esta etapa da análise, que inviabiliza análises em rotina com grande número de amostras (VANHOE et al., 1994). Na área clínica, o método escolhido para a análise deve ser simples, robusto e rápido, oferecendo a possibilidade de um rápido diagnóstico, o que poderia ser obtido com uma simples diluição da amostra.

A injeção direta de amostra em ICP-MS foi aplicada pela primeira vez em 1986 por Salin et al. que propôs um método direto para determinação de Mn, As, Pb, Cd, Li, Ag e Cu em amostras de água. As amostras de sangue analisadas diretamente por ICP-MS geralmente são diluídas por uma solução contendo amônia, que causa lise celular, EDTA para evitar a perda de metais por precipitação ou adsorção e Triton X-100 que impede o entupimento do bico injetor (HARRINGTON et al., 1999). Quando são analisadas grandes quantidades de amostras de sangue pode ocorrer o entupimento do injetor por proteínas desnaturadas, após a leitura de cerca de 10 a 20 amostras diluídas 1:10 v/v, prejudicando a performance analítica (VANDECASTEELE et al., 1993). Entretanto, a introdução de amostras por fluxo

segmentado e o aumento da diluição podem eliminar estas limitações, facilitando a leitura em rotina (BARANY et al., 1997).

Em 1986, Nixon et al. compararam a análise de soro e urina por ICP-MS e por GF AAS para determinação de Ca, Mg, Cu, Zn e Fe, com introdução direta das amostras, revelando uma ótima correlação entre os resultados obtidos pelas duas técnicas. Case et al. (2001) desenvolveram um método de injeção direta de sangue total em ICP-MS para determinação de Mo, Co, Cr e Ni em pacientes com artroplastia total do quadril e dos joelhos. O método proposto, com introdução direta da amostra, diminuiu os riscos de contaminação e possibilitou a análise de até 60 amostras em 8 horas de trabalho sem necessidade de limpeza do equipamento. Nakagawa et al. (2004) compararam uma simples diluição de amostras de urina com uma digestão ácida assistida por microondas para a determinação de Fe, Cu, Zn, Se, As, Cd e Pb por ICP-MS, obtendo resultados que não apresentaram diferença estatística entre si. Heitland e Koster (2004) propuseram um método para determinação de 23 elementos em urina por DRC-ICP-MS com simples diluição das amostras em meio ácido. Como gases de reação foi sugerido $\text{He}_{(g)}$ para As, Ba, Co, Cd, Cu, V, Cr, Mn, Mo, Rh e Zn e o $\text{H}_{2(g)}$ para ^{78}Se e ^{80}Se . A utilização do gás de reação diminuiu significativamente o sinal de fundo. Outro estudo recente proposto por D'Llio et al. (2006a) para determinação de Al, Co, Cr, Mn, Ni e Se em soro liofilizados de eqüinos, utilizou introdução direta de amostra em DRC-ICP-MS e os gases de reação $\text{NH}_{3(g)}$, $\text{CH}_{4(g)}$ e $\text{H}_{2(g)}$. Os melhores resultados em relação às características analíticas foram obtidos com a utilização de $\text{NH}_{3(g)}$ como gás de reação para a determinação de Al, Cr, Mn, enquanto para a determinação de Co, Ni e Se foi utilizado o gás de reação $\text{H}_{2(g)}$.

Palmer et al. (2006) propuseram um método rápido para determinação de Hg, Pb e Cd em sangue por ICP-MS, na qual uma simples diluição das amostras (1:50 v/v) com solução contendo 0,5% v/v HNO_3 + 0,005% v/v Triton X-100 era realizada, antes da análise direta no ICP-MS. Os autores utilizaram a calibração por ajuste de matriz com sangue base de origem caprina. Os resultados obtidos com o método proposto para a análise de Materiais de Referência e de Referência Certificada de sangue foram confrontados com os resultados obtidos utilizando metodologias muito bem estabelecidas empregando GF AAS e CV AAS.

Cabe destacar que, atualmente, alguns analitos como Pb, Cd, Hg, As, Li, Be, Ni, Sb, Pt, Tl, Cu, Zn, Se, Mo, W já são determinados rotineiramente em amostras clínicas (urina, sangue, plasma) utilizando equipamentos com simples quadrupolo e apenas com a diluição da amostra e calibração com ajuste de matriz (PALMER et al., 2006; BARANY et al., 1997; HEITLAND e KOSTER, 2004; NIXON e MOYER, 1996). No entanto, para a determinação de outros elementos como V, Cr, U, Fe, Ge, Pt, Pd, Te, a utilização de equipamentos com alta resolução ou com cela de reação ou de colisão são fundamentais (HEITLAND e KOSTER, 2004; BEGEROW, TURFELD e DUNEMANN, 1997).

Neste trabalho, avaliou-se a possibilidade da determinação seqüencial de elementos químicos de interesse nutricional e toxicológico em sangue e plasma com introdução direta das amostras no ICP-MS utilizando calibração em meio aquoso ou ajuste de matriz com e sem o uso do DRC.

O método de calibração em meio aquoso é utilizado quando as espécies interferentes não produzem efeito algum quando abaixo de certas concentrações, sendo o efeito de interferência minimizado simplesmente pela diluição da amostra (SKOOG et al., 2004). O método por ajuste de matriz consiste em duplicar a matriz da amostra na solução de referência e no branco. Isto pode ser realizado com a adição dos principais compostos presentes na matriz ou pelo uso da própria matriz contendo baixos níveis dos elementos em estudo. Por exemplo, na determinação de elementos químicos em amostras de água de mar, as soluções de referência podem ser preparadas em uma solução sintética contendo Na^+ , K^+ , Cl^- , Ca^{2+} , Mg^{2+} , além de outros componentes. De outra forma, os analitos em estudo poderiam ser removidos da matriz da amostra original e os componentes da matriz utilizados para o preparo do branco e das soluções de referência (SKOOG et al., 2004). O método de ajuste de matriz já é utilizado com muita freqüência nas análises de metais em amostras clínicas por ICP-MS (ST'ASTNÁ et al., 1999; PALMER et al., 2006; NIXON et al., 2004).

2 – Objetivo

Desenvolvimento de um método simples e rápido para determinação de 17 elementos químicos em sangue por injeção direta de amostras clínicas em espectrômetro de massas com plasma acoplado indutivamente com cela de reação dinâmica (DRC-ICP-MS).

3 - Justificativa

Cada vez mais está se tornando imprescindível o uso de métodos rápidos e simples para diagnóstico de deficiência nutricional e intoxicação por elementos químicos. Alguns métodos descritos para introdução direta de sangue em ICP-MS estão validados para determinação de poucos elementos ou têm baixa aplicação em rotina. Quanto à aplicabilidade na rotina, levando-se em conta apenas o Laboratório de Análises Clínicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto e o Hospital das Clínicas de Ribeirão Preto, são coletadas e analisadas, para diversos estudos clínicos, mais de 50 mil amostras de sangue por ano. Assim, este estudo se enquadra nesta perspectiva para posterior aplicação do método em rotina dentro do Laboratório de Toxicologia de Essencialidade de Metais da FCFRP para suporte em diversos estudos clínicos (toxicológicos e nutricionais) dentro e fora de nossa unidade para a determinação em rotina de um amplo número de analitos em sangue.

4 - Material e Métodos

4.1 – Instrumentação e Acessórios.

As análises foram feitas em um espectrômetro de massas com plasma acoplado equipado com cela de reação dinâmica modelo ELAN DRC II (Perkin Elmer, USA) e autoamostrador (AS93 *plus* PerkinElmer), ligado em um computador Dell Pentium 4 com o *software* ELAN versão 3.4 e impressora Hewlett-Packard Laserjet 4250. Esse equipamento encontra-se instalado, no Laboratório de Toxicologia e Essencialidade de Metais da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – USP, em uma sala limpa classe “1000”.

4.2 – Reagentes, soluções, materiais de referência e limpeza do material.

Água deionizada de alta pureza (resistividade 18,2 MΩ cm) obtida pelo sistema Milli-Q (Millipore®), previamente purificada em sistema de Osmose Reversa (RiOs-DI™ da Millipore®); ácido nítrico (Synth 65% v/v) purificado por destilação, empregando-se destilador *subboiling* de quartzo da *Kürner Analysetechnik* para eliminação de impurezas; L-cisteína (Fluka, 99,5%, C₃H₇NO₂S); cloreto de sódio ultrapuro (Puratronic Alfa, 99,999%, NaCl); Triton® X-100 suprapuro (Sigma-Aldrich); ácido etilenodiamino tetra-acético sal dissódico (EDTA, Merck 99%, C₁₀H₁₄N₂Na₂O₈.2H₂O); amônia 99,999% (PRAXAIR INC., U.S.A.).

Materiais de referência de sangue provenientes do *Institut National de Santé Publique Du Quebec (Canadá, Human blood QMEQAS07B03 e QMEQAS07B06)*, do *Wadsworth Center – New York State Department of Health (USA, Whole blood NYSDOH BE 07-08, NYSDOH BE 07-09, NYSDOH BE 07-10)*, *Seronorm™ Trace Elements Whole Blood Lyophilized (Norway, No 404109)*.

A análise de baixas concentrações de metais em qualquer matriz requer uma limpeza especial do material que é utilizado no preparo das amostras e armazenamento de soluções. Assim, todos os frascos plásticos utilizados foram colocados em banho de ácido nítrico 15 % v/v por 24 h, enxaguados com água Milli-Q por 5 vezes e secos em câmara de fluxo laminar (classe “100”), onde também são preparados os reagentes, amostras, soluções padrão e brancos.

Para o preparo das soluções de calibração utilizou-se soluções estoque multielementares produzidas pela PerkinElmer e padronizadas pelo *National Institute of Standards and Technology* (NIST) contendo:

A-) 10 mg L⁻¹ de cada elemento em estudo: *Multi-element ICP-MS Calibration Std. 3* (Al, As, Cd, Co, Cr, Cs, Cu, Li, Mn, Pb, Se, Tl, U, V e Zn) em 5% v/v HNO₃, *Multi-element ICP-MS Calibration Std. 4* (Sb, Pt, Te e Sn) em 10% v/v HCl e 1% v/v HNO₃;

B-) 1000 mg L⁻¹: Rhodium (Rh) em 10% v/v HCl, Iridium (Ir) em 10% v/v HCl, Indium (In) em 2% v/v HNO₃, Yttrium (Y) em 2% v/v HNO₃, Gallium (Ga) em 2% v/v HNO₃;

C-) 1000 µg L⁻¹ Molibdênio (Mo) em 5% v/v HNO₃ e 1% v/v HCl.

Para as curvas de calibração preparadas pelo método de ajuste de matriz foi utilizado sangue ovino (sangue base), de animais pertencentes ao Biotério Central da Universidade de São Paulo em Ribeirão Preto.

4.3 – Coleta de sangue ovino (sangue base).

Foram utilizados tubos de coleta de sangue da *Becton Dickinson Vacutainer*[®] “*livre de metais*” de 6 mL (anticoagulante: etilendiamino tetra-acético dipotássico, EDTA), luvas de látex sem pó (EMBRAMAC), agulha Becton Dickinson 1,60x40 (16 G 1,5), algodão e álcool 70°GL para assepsia.

A coleta foi realizada por médicos veterinários do Biotério Central da Universidade de São Paulo do campus de Ribeirão Preto por meio de punção da veia jugular de carneiros machos, após assepsia com álcool 70° G.L.. Cerca de 80 mL de sangue foram coletados duas semanas ou menos antes do experimento. O sangue base foi coletado com o anticoagulante EDTA. Após a coleta o sangue foi lentamente homogeneizado por, no mínimo, 10 minutos para evitar coagulação e armazenados a -80°C.

4.4 – Preparo dos diluentes e das curvas analíticas de calibração por ajuste de matriz ou em meio aquoso.

A) Determinações de Al, As, Cd, Co, Cr, Cu, Mn, Mo, Pb, Se, Tl, V, Zn, Sb, Pt, Te e Sn por ajuste de matriz com sangue “base”:

Foi utilizado o método de Palmer et al. (2006) com modificações. O diluente originalmente constituído com 0,5 % v/v HNO₃ + 0,005% v/v de Triton X-100 foi modificado para conter 0,01% v/v de Triton X-100. Diariamente, as curvas analíticas de calibração foram preparadas em sangue base (1:50 v/v diluição final) contendo os analitos nas concentrações de 10 -100 µg L⁻¹ (para Al, Cu e Zn) e 1 -20 µg L⁻¹ (para os outros analitos). Os padrões internos avaliados, todos na concentração de 50 ou 10 µg L⁻¹, foram Y, In e Ga para Mo, Pt, Te, Sn e Sb e Y, Ir e Rh para os outros analitos. Foram feitas duas soluções do branco: (i)-o branco da matriz contendo apenas o diluente, o sangue diluído 1:50 v/v e os padrões internos; e (ii)- o branco reagente contendo apenas o diluente e os padrões internos. As condições instrumentais de operação do ICP-MS estão descritas na Tabela 5.

Tabela 5 – Condições operacionais do q-ICP-MS.

Parâmetro	Condição / Característica
Equipamento	Elan DRCII (PerkinElmer SCIEX)
Nebulizador	Meinhard®
Câmara de nebulização	Ciclônica
Bico injetor	Quartzo para amostras clínicas (2,0 mm)
Auto lentes	Ligada
Potência de RF (W)	1100
Vazões do Argônio (L min ⁻¹)	Nebulizador 0,56-0,98; Plasma 15; Auxiliar 1,2
Interface	Cones de Platina
Cone de amostragem	1,1 mm
Skimmer	0,9 mm
Modo padrão (q-ICP-MS)	²⁷ Al, ⁷⁵ As, ¹¹¹ Cd, ⁵⁹ Co, ⁶³ Cu, ⁵⁵ Mn, ⁹⁸ Mo, ²⁰⁸ Pb, ¹⁹⁵ Pt, ¹²³ Sb, ⁸² Se, ¹²⁰ Sn, ¹³⁰ Te, ²⁰⁵ Tl e ⁶⁶ Zn
Modo de varredura	Intensidade máxima do sinal
Tempo de integração do sinal (ms)	2000
Replicatas	3
Sweeps (Varredura quadrupolo analisador)	40
Leituras	1
Dwell time (Tempo residência por analito - ms)	50
Voltagem das lentes (v)	6,0 a 8,0
Voltagem das lentes estágio analógico (v)	-1587
Voltagem das lentes estágio pulso (v)	800
Tempo morto do detector (ns)	55
Fluxo de aspiração da amostra (mL min ⁻¹)	1,0
Equações de correção	
$Mo = {}^{98}Mo - (0,10963 \times {}^{101}Ru)$	
$Sb = {}^{123}Sb - (0,125884 \times {}^{125}Te)$	
$Se = {}^{82}Se - (1,007833 \times {}^{83}Kr)$	
$Sn = {}^{120}Sn - (0,012730 \times {}^{125}Te)$	
$Te = {}^{130}Te - (0,009437 \times {}^{137}Ba) - (0,154312 \times {}^{129}Xe)$	

B) Otimização da cela de reação dinâmica por ajuste de matriz com sangue base ou com utilização de uma solução de matriz sintética (SMS):

Após a ignição do plasma e antes de qualquer otimização do ICP-MS o gás de reação foi purgado por três vezes (durante 30 segundos cada purga), a uma vazão de $0,001 \text{ mL min}^{-1}$ para garantir que o sistema não contenha outros gases que não sejam o gás de reação amônia.

Para a otimização do DRC-ICP-MS levou-se em conta os parâmetros vazão do gás de reação e RPq . Em cada etapa do aumento da vazão do gás de reação há uma varredura no quadrupolo instalado no interior da cela de reação para se determinar o melhor RPq naquela vazão. O ponto (vazão + RPq) que proporcionou a menor concentração equivalente de sinal de fundo (BEC) foi considerado o melhor, ou seja, o de menor presença de interferentes. Para a otimização destes parâmetros utilizam-se duas soluções: a matriz (branco) que contém apenas os interferentes que vão definir o sinal de fundo e o *spike*, geralmente com 1 ug L^{-1} do analito, que vai definir a melhor sensibilidade dos melhores parâmetros (vazão + RPq) para a dada concentração do analito em relação a sua matriz.

Para a otimização dos parâmetros do DRC-ICP-MS utilizou-se um branco da matriz, que contém os principais interferentes do analito e uma solução padrão contendo a matriz adicionada de $1 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$ do analito (solução *spike*) em estudo. Essas duas soluções foram preparadas de acordo com o item 4.4A, sendo 10 mL de matriz e 10 mL de *spike* para cada analito. As condições instrumentais de operação do DRC-ICP-MS estão descritas na Tabela 6. Para alguns analitos que estão presentes em alta concentração no sangue utilizou-se uma solução de matriz sintética (SMS), preparada diariamente, assim como as soluções de otimização. Esta solução contém os interferentes de cobre, zinco e alumínio e, ao contrário da matriz de sangue base, contém os analitos em baixas concentrações. A Tabela 7 descreve as soluções utilizadas para a otimização dos analitos.

Tabela 6 – Condições operacionais do DRC-ICP-MS.

Parâmetro	Condição / Característica
Equipamento	Elan DRCII (PerkinElmer SCIEX)
Nebulizador	Meinhard®
Câmara de nebulização	Ciclônica
Bico injetor	Quartzo para amostras clínicas (2,0 mm)
Auto lentes	Ligada
Potência de RF (W)	1100
Vazões do Argônio (L min ⁻¹)	Nebulizador 0,56-0,98; Plasma 15; Auxiliar 1,2
Interface	Cones de Platina
Cone de amostragem	1,1 mm
Skimmer	0,9 mm
Modo DRC (DRC-ICP-MS)	Gás de Reação NH ₃ : ²⁷ Al, ⁶³ Cu, ⁶⁵ Cu, ⁶⁴ Zn, ⁶⁶ Zn, ⁵² Cr, e ⁵¹ V
Vazão NH ₃ (mL min ⁻¹)	0,4 a 1,5 (otimização diária)
Variação do RPq	NH ₃ : 0,40 a 0,90
RPa	0,25
Modo de varredura	Intensidade máxima do sinal
Tempo de integração do sinal (ms)	2000
Replicatas	3
Sweeps (Varredura quadrupolo analisador)	40
Leituras	1
Dwell time (Tempo residência por analito - ms)	50
Voltagem das lentes iônicas (v)	6,0 a 8,0
Voltagem das lentes estágio analógico (v)	-1587
Voltagem das lentes estágio pulso (v)	800
Tempo morto do detector (ns)	55
Fluxo de aspiração da amostra (mL min ⁻¹)	1,0
Tipo de curva	Linear passando pelo zero

Tabela 7 – Composição das soluções padrão (matriz e spike) de otimização do DRC-ICP-MS para os analitos ⁵²Cr, ⁵¹V, ⁶⁴Zn, ⁶⁶Zn, ⁶³Cu, ⁶⁵Cu e ²⁷Al utilizando NH₃.

Analito	SMS	Composição da Matriz	Composição da solução spike
²⁷ Al, ⁶³ Cu, ⁶⁵ Cu, ⁶⁴ Zn, ⁶⁶ Zn	70 mg dL ⁻¹ de L-cisteína + 770 mg dL ⁻¹ NaCl + água Milli-Q	SMS 1:50 + padrão interno 10 ug L ⁻¹	SMS 1:50 + padrão interno 10 ug L ⁻¹ + analito 1 ug L ⁻¹
⁵² Cr e ⁵¹ V	-	Sangue 1:50 + padrão interno 10 ug L ⁻¹	Sangue 1:50 + padrão interno 10 ug L ⁻¹ + analito 1 ug L ⁻¹

4.5 – Avaliação da influência do meio de diluição na deposição de sais no cone de amostragem e skimmer.

Para verificar a formação de depósitos no cone de amostragem e *skimmer*, devido a alta concentração de material orgânico e sais no meio (sangue diluído 1:50 v/v), realizou-se uma *TotalQuant* (análise semi-quantitativa, método disponível no software ELAN versão 3.4) do material retirado destas duas peças e diluído em 1,5 mL HNO₃ 2% v/v, após 100 injeções diretas de sangue diluído 1:50 durante cerca de uma hora e meia.

4.6 – Parâmetros analíticos para validação dos métodos propostos para determinação dos analitos nas amostras biológicas por injeção direta em DRC-ICP-MS.

A capacidade de proporcionar precisão, exatidão e confiança nas informações obtidas é a principal função da química analítica. A validação de um método é o processo que o torna aceitável ou não para o propósito pretendido (GREEN, 1996).

Linearidade

O estudo da linearidade é utilizado para garantir que as amostras estão em um intervalo de concentração onde a resposta ao analito é linearmente proporcional a sua concentração. Para validação deste parâmetro preparou-se 5 soluções padrão de calibração em diferentes concentrações (de acordo com cada método e a concentração do analito). A linearidade é aceita através do estudo do coeficiente de correlação linear, que, neste trabalho foi considerado $> 0,999$ (GREEN, 1996).

Exatidão e precisão

A exatidão de um método é a determinação do quanto os valores medidos se aproximam do valor médio real da amostra (GREEN, 1996). Neste estudo este parâmetro foi avaliado através dois estudos: análise em triplicata de materiais de referência (INSP-Quebec, NIST, IAEA, Seronorm) com concentrações conhecidas dos analitos; e recuperação de amostras em triplicata.

A precisão é a determinação do quanto os resultados obtidos de múltiplas análises de amostras homogêneas desviam entre si (GREEN, 1996). A precisão intra-dia foi determinada através da leitura em triplicata dos materiais de referência e amostras contaminadas. A precisão intra-ensaios ou inter-dias foi avaliada através de gráficos durante 5 ou 10 dias. A precisão intra-dia ficou determinada em um desvio padrão relativo menor que 10% e a inter dia com valores dentro dos intervalos dos materiais de referência.

Intervalo de determinação

O intervalo de determinação de um método analítico é o intervalo onde a precisão, exatidão e a linearidade obtida são aceitáveis (GREEN, 1996). A técnica de ICP-MS possui uma ampla linearidade, de mg L^{-1} a ng L^{-1} devido principalmente aos detectores de duplo estágio, analógico e pulso (ONDA, 1996).

Limites de detecção e quantificação

De acordo com a *International Union of Pure and Applied Chemistry* (IUPAC), o limite de detecção é definido como a menor concentração que pode ser detectada com confiabilidade em um determinado método (IUPAC, 2007). Payling (2008) define como a concentração na qual podemos afirmar que um elemento está presente ou não. 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 quantificação é 3,3 vezes o limite de detecção (THOMSEN, SCHATZLEIN e MERCURO, 2003). Os limites calculados neste trabalho se referem aos limites de detecção e quantificação dos métodos, ou seja, considerando matrizes reais (sangue base na diluição 1:50) ou, no caso daqueles determinados em meio aquoso, o branco sem adição de matriz. A concentração equivalente de sinal de fundo, BEC, é o mesmo que a altura do pico produzido pelo ruído do sinal de fundo quando se analisa o branco da matriz. É apenas uma forma alternativa de se calcular o limite de detecção, porém o BEC utiliza-se do desvio padrão relativo do branco da matriz (THOMSEN, SCHATZLEIN e MERCURO, 2003).

5. Resultados e Discussão

5.1 – Escolha do método a ser utilizado (diluente e fator de diluição para as amostras de sangue).

Muitos métodos propõem a determinação direta de elementos traço em sangue por ICP-MS (BARANY et al. 2002a, 2002b, 1997; NIXON et al., 2004; PALMER et al., 2006). Esses métodos utilizam meio ácido (ácidos clorídrico ou nítrico) ou básico (hidróxido de amônio ou TMAH) nos seus diluentes para estabilização dos metais na solução.

Inicialmente foram avaliados dois métodos para diluição das amostras. Primeiro o método de Barany et al. (1997), por utilizar o sangue em uma diluição 1:10 (1 mL de sangue em 10 mL de solução), causou impregnação de sangue na câmara e deposições no nebulizador, além de aumentar a formação de *clogging* (deposição) nos cones. Essas possíveis interferências físicas diminuem o número de amostras analisadas, prejudicando análises de sangue em rotina. O segundo método testado (Palmer et al. 2006), por utilizar o sangue em uma diluição 1:50 (0,2 mL de sangue em 10 mL de solução) e, além de ser um método onde o diluente é de fácil e rápido preparo, o número de amostras analisadas é maior, ou seja, com maior aplicação em rotina.

As amostras de sangue foram então diluídas 1:50 de acordo com método proposto por Palmer et al. (2006) com uma pequena modificação na concentração de Triton X-100. A função do Triton X-100 é solubilizar melhor o sangue no meio e evitar o depósito do mesmo no bico injetor do ICP-MS (HARRINGTON et al., 1999). O método de Palmer et al. (2006), empregado com sucesso para a determinação de Hg, Cd e Pb, utiliza 0,005% v/v de Triton X-100 no diluente. Por estendermos este método para outros analitos como As, Co, Cu, Cr, Mn, Se, V, Tl e Zn, a utilização de 0,005% v/v Triton X-100, assim como no método de Barany et al. (1997) porém em menor intensidade, também levou à formação de *clogging* (deposição) no bico injetor e impregnação de material proveniente do sangue na câmara e no nebulizador. Labat et al. (2002) propôs, para a diluição de sangue antes da análise por ICP-MS, o uso de diluente contendo Triton X-100 a uma concentração 0,1% v/v. Assim, como forma de reduzir o *clogging*, impregnação na câmara e no nebulizador e visando a análise de um maior número de amostras, decidiu-se trabalhar com 0,01% (v/v) de

Triton X-100 no diluente. A concentração de ácido nítrico foi mantida em 0,5% (v/v), pois uma concentração maior pode levar a precipitação das proteínas presentes no sangue, prejudicando a homogeneidade.

Para verificar se a matriz de sangue, após a diluição 1:50 v/v, poderia afetar a intensidade (contagens por segundo – cps) dos analitos e padrões internos após um certo tempo de análises, realizou-se 100 injeções seqüenciais de sangue base diluído 1:50 v/v e contendo 10; 10; 10; 170,0; 26,2; 332,2; 7,5; 0,35; 0,12 $\mu\text{g L}^{-1}$ de Rh, Y, Ir, Sr, Mn, Se, As, Pb e Cd, respectivamente. As Figuras 5 e 6 mostram os gráficos dessa variação que não excedeu 10% das intensidades mínimas e máximas em relação à média.

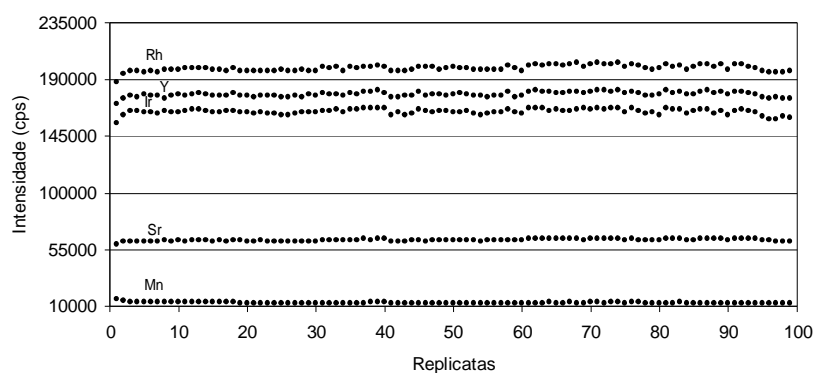


Figura 5 – Avaliação da estabilidade das intensidades de Rh, Y, Ir, Sr e Mn em função do número de injeções no ICP-MS de sangue base diluído 1:50 v/v. A variação das medidas foi menor que 5% (n=100).

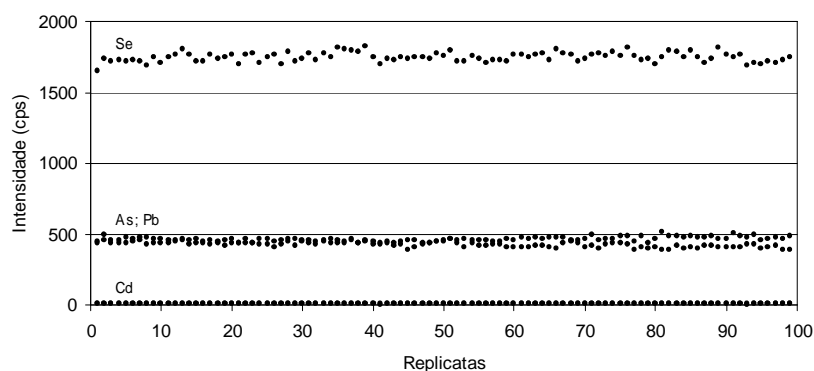


Figura 6 – Avaliação da estabilidade das intensidades de Se, As, Pb e Cd em função do número de injeções no ICP-MS de sangue base diluído 1:50 v/v. A variação foi menor que 5% entre as replicatas exceto para o Se que ficou entre em torno de 10%.

A Figura 7 mostra o cone de amostragem e *skimmer* após 100 injeções seqüenciais de sangue base diluído 1:50 v/v (cerca de uma hora e meia de injeção). A Tabela 8 revela os principais elementos que se depositam nos cones após as 100 injeções. Como pode ser observado, os principais elementos depositados são Ca, Fe, S, P e Mg. O material depositado no orifício dos cones causa uma perda do sinal devido à redução do número de íons que entram no sistema do ICP-MS e uma modificação no processo de extração dos íons devido à diminuição do diâmetro do orifício (JARVIS, GRAY e HOUK, 1992). Assim, é de fundamental importância a limpeza diária dos cones para redução desses efeitos. Foi observado que, para 150 amostras de sangue diluído 1:50 v/v podem ser analisados cerca de 17 analitos em cada amostra sem que haja necessidade de limpeza do cone de amostragem e *skimmer*.

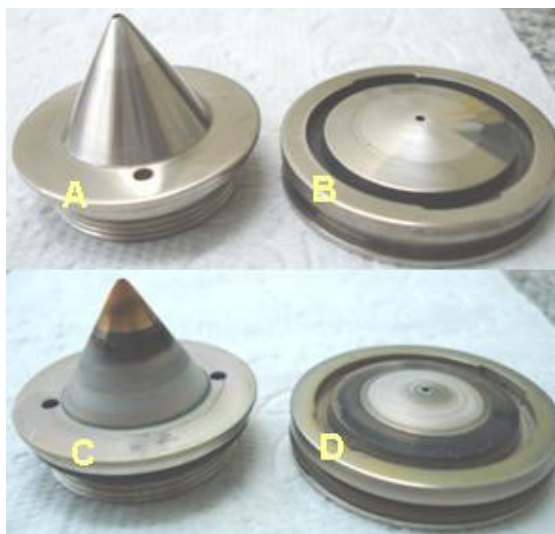


Figura 7 – *Skimmer* (A) e cone de amostragem (B) antes e após 100 injeções de sangue diluído 1:50 v/v (C e D, respectivamente).

Tabela 8 – Análise semi-quantitativa do material depositado no *skimmer* e cone de amostragem após 100 injeções de sangue base diluído 1:50 v/v com Triton® X-100 0,01% v/v e HNO₃ 0,5% v/v.

Analito	Concentração (µg L⁻¹)	Intensidade (cps)
C	0,156	83.769
Na	0,251	2.210.453
Mg	0,421	3.406.039
Al	0,119	1.260.828
Si	0,062	344.856
P	1,960	1.156.661
S	18,581	12.486.019
Cl	0,707	24.276
K	0,329	6.785.865
Ca	3,709	92.111.865
Ti	0,010	177.161
Cr	0,002	28.492
Mn	0,003	65.019
Fe	2,660	64.294.335
Ni	0,004	70.596
Cu	0,006	83.558
Zn	0,030	336.037
Sr	0,004	160.868
Sn	0,078	3.423.516
Ba	0,002	126.773
Pb	0,001	39.199

5.2 – Determinação de Al, As, Cd, Co, Cu, Mn, Mo, Pb, Pt, Sb, Se, Sn, Te, Tl e Zn em sangue por ICP-MS utilizando introdução direta da amostra diluída.

Como explicado anteriormente, vários grupos com experiência na determinação de metais em fluidos biológicos por ICP-MS têm demonstrado que a determinação de vários analitos em sangue por q-ICP-MS é possível com uso de simples diluição da amostra e calibração através do ajuste de matriz.

Neste sentido, foi avaliada inicialmente a possibilidade da determinação dos elementos Al, As, Cd, Co, Cu, Mn, Mo, Pb, Pt, Sb, Se, Sn, Te, Tl e Zn em sangue por ICP-MS utilizando introdução direta da amostra diluída e o equipamento operando em modo padrão (q-ICP-MS). Os materiais de referência de sangue foram analisados após a diluição dos mesmos 1:50 v/v em 0,5 % v/v HNO₃ + 0,01% v/v Triton[®] X-100. A calibração foi realizada com ajuste de matriz. A Tabela 9 apresenta os resultados da análise do material de referência Seronorm 404109, QMEQAS07B03, NYSDOH (BE 07-08; 07-09; 07-10). Como pode ser observado para a maioria dos analitos em estudo, os resultados obtidos são concordantes com os de referência. Já para os elementos ⁵²Cr e ⁵¹V, não foi observada boa recuperação no material de referência de sangue. A Tabela 9 também apresenta os resultados de coeficiente de variação das concentrações dos analitos em três diferentes dias de análise. A variação das medidas nos três diferentes dias esteve abaixo de 10%, um valor aceitável de acordo com Feinberg et al. (in: GONZÁLES e HERRADOR, 2007). As Figuras 8 e 9 mostram as determinações dos analitos entre 10 dias. Os analitos Al, Cu e Zn foram os que sofreram maiores variações, provavelmente devido a alta concentração destes elementos no sangue base (40, 850 e 2850 µg L⁻¹, respectivamente). A análise do sangue base para os outros analitos revelou as seguintes concentrações médias de As, Cd, Co, Mn, Mo, Pb, Pt, Sb, Se, Sn, Te e Tl de 4; <0,003; 9; 25; 22; 3; <0,001; 3; 220; 2; <0,010; <0,001 µg L⁻¹, respectivamente.

Tabela 9 – Avaliação da precisão e exatidão da determinação de alumínio, arsênio, cádmio, cobalto, cromo, manganês, mercúrio, molibdênio, chumbo, platina, cobre, antimônio, selênio, estanho, telúrio, tálio, urânio, zinco e vanádio através da análise dos materiais de referência Seronorm 404109, QMEQAS07B03, NYSDOH (BE 07-08; 07-09; 07-10). Os valores encontrados estão como média \pm desvio padrão relativo (n=3).

Material de Referência Analito	Valor Referência \pm desvio padrão ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Valores entre dias ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Precisão entre dias (%)
Seronorm (404109)			
²⁷ Al	60	56,3	7,3
⁷⁵ As	25	34,3	1,3
¹¹¹ Cd	10,7 (10,6-11,5)	11,2	1,6
⁵⁹ Co	10	10,8	2,8
⁵⁵ Mn	15	14,9	2,9
⁹⁸ Mo	10	10,7	1,7
²⁰⁸ Pb	660 (611-687)	712,2	1,0
¹²³ Sb	75	90,6	1,3
⁸² Se	79 (79-84)	89,9	4,6
²⁰⁵ Tl	10	<LD	<LD
QMEQAS07B03			
²⁷ Al	70,8 \pm 8,6	69,9	2,8
⁷⁵ As	8,2 \pm 3,0	10,0	6,2
¹¹¹ Cd	1,31 \pm 0,28	1,20	7,3
⁵⁹ Co	8,7 \pm 1,2	8,19	3,3
⁵² Cr	2,32 \pm 0,10	763	3,4
⁶³ Cu	888 \pm 78	894	2,9
⁵⁵ Mn	35,6 \pm 3,5	35,3	3,6
⁹⁸ Mo	2,36 \pm 0,81	1,78	4,1
²⁰⁸ Pb	100,7 \pm 8,9	99,6	2,4
¹⁹⁵ Pt	1,23 \pm 0,33	1,42	6,1
¹²³ Sb	1,68 \pm 0,26	1,61	3,1
⁸² Se	228 \pm 28	226	1,2
¹²⁰ Sn	4,79 \pm 0,90	5,19	0,7
¹³⁰ Te	2,3 \pm 1,1	1,88	1,0
²⁰⁵ Tl	1,92 \pm 0,20	1,88	5,7
⁶⁶ Zn	6170 \pm 380	5896	1,6
⁵¹ V	5,30 \pm 0,76	20,28	1,5
NYSDOH (BE 07-08)			
⁷⁵ As	27,4 \pm 2,4	25,9	5,1
¹¹¹ Cd	3,9 \pm 0,4	3,5	9,5
²⁰⁸ Pb	270 \pm 14	282	5,7
NYSDOH (BE 07-09)			
⁷⁵ As	19,1 \pm 1,8	22,2	8,4
¹¹¹ Cd	2,0 \pm 0,3	2,0	8,0
²⁰⁸ Pb	70 \pm 7	62	3,7
NYSDOH (BE 07-10)			
⁷⁵ As	58,8 \pm 4,9	60,3	2,2
¹¹¹ Cd	18,0 \pm 0,8	17,6	2,8
²⁰⁸ Pb	490 \pm 27	497	6,2

Após a determinação dos metais no material de referência, foram calculados os limites de detecção e quantificação do método. Os resultados são mostrados na Tabela 10.

Tabela 10 – Limites de detecção e quantificação (3s, n=10) e coeficiente de linearidade dos analitos determinados por q-ICP-MS. Os coeficientes de correlação linear estão acima de 0,999 para todos os analitos.

Analito	LD ($\mu\text{g L}^{-1}$)	LQ ($\mu\text{g L}^{-1}$)	R
²⁷ Al	0,223	0,743	0,99955
⁷⁵ As	0,014	0,047	0,99999
¹¹¹ Cd	0,003	0,010	0,99999
⁵⁹ Co	0,011	0,037	0,99999
⁶³ Cu	0,304	1,012	0,99968
⁵⁵ Mn	0,009	0,031	0,99999
⁹⁸ Mo	0,009	0,030	0,99999
²⁰⁸ Pb	0,003	0,009	0,99999
¹⁹⁵ Pt	0,001	0,003	0,99999
¹²³ Sb	0,005	0,018	0,99999
⁸² Se	0,264	0,880	0,99998
¹²⁰ Sn	0,006	0,021	0,99999
¹³⁰ Te	0,010	0,035	0,99999
²⁰⁵ Tl	0,001	0,003	0,99999
⁶⁶ Zn	0,834	2,782	0,99984

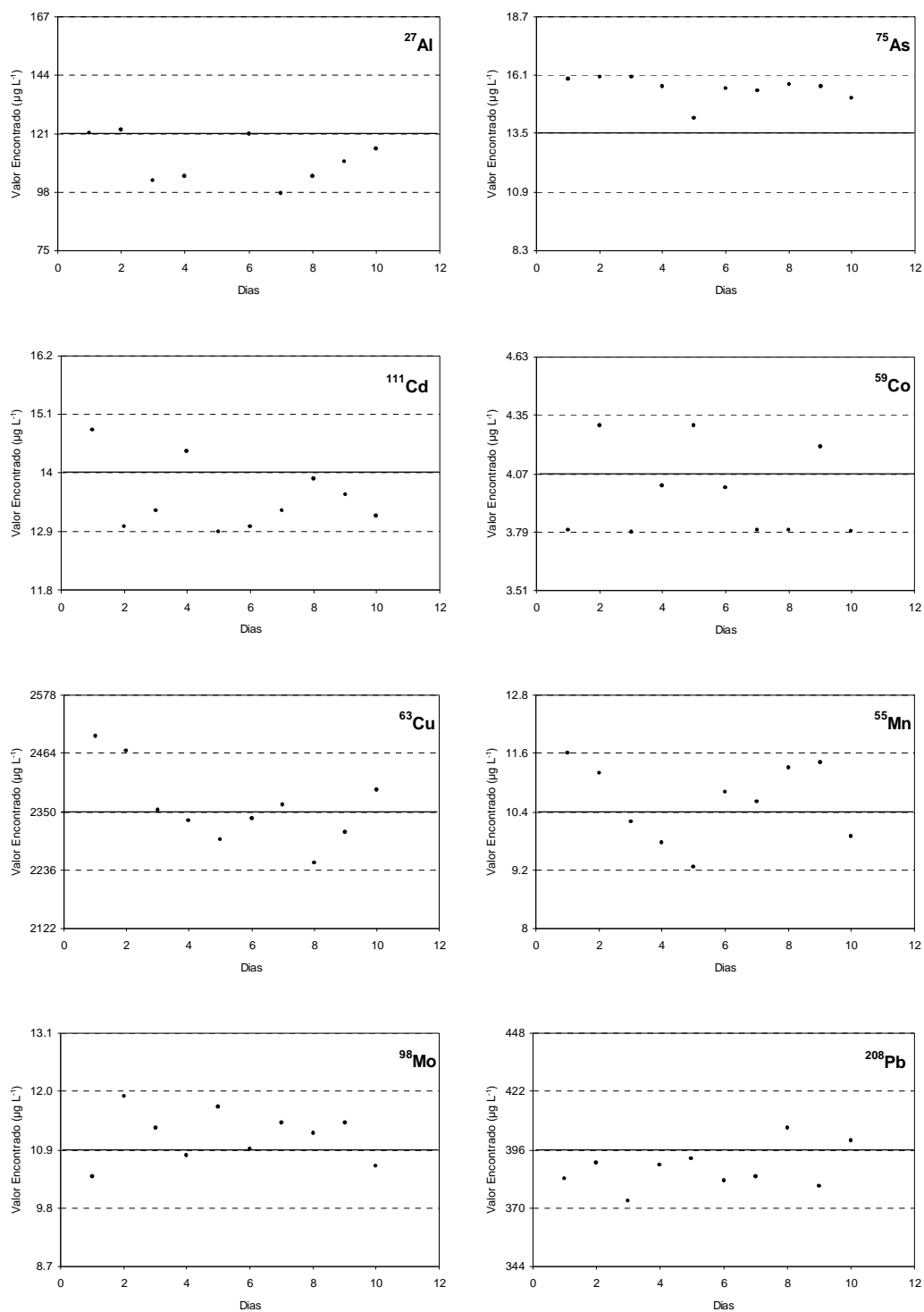


Figura 8 – Determinação de Al, As, Cd, Co, Cu, Mn, Mo e Pb no material de referência de sangue humano QMEQAS07B06 por q-ICP-MS durante 10 diferentes dias pelo método proposto. As linhas tracejadas representam o intervalo de confiança fornecido pelo *Institut National de Santé Publique Du Quebec* (Canadá), o desvio padrão relativo em cada dia não excedeu 10%.

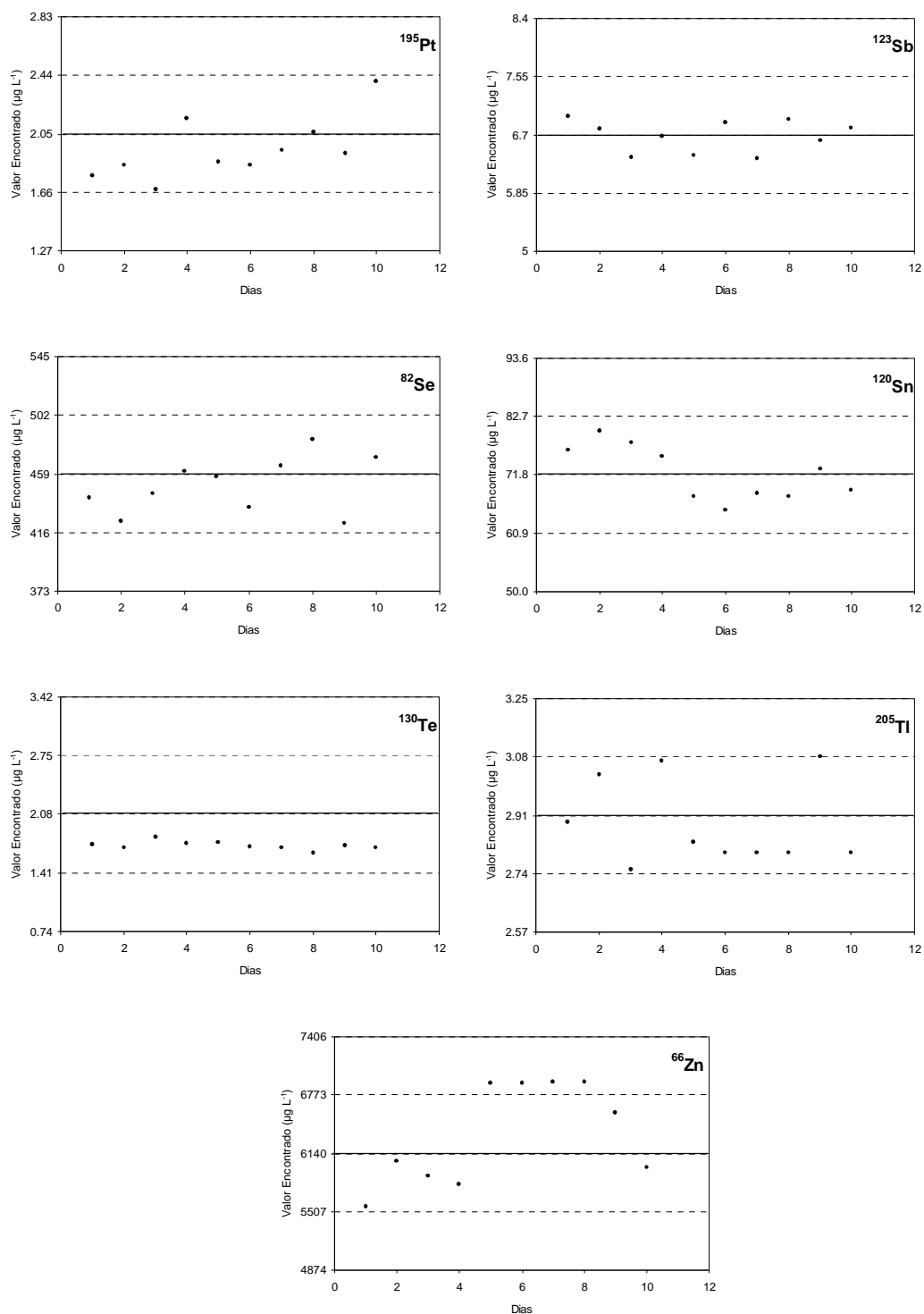


Figura 9 – Determinação de Pt, Sb, Se, Sn, Te, Tl e Zn no material de referência de sangue humano QMEQAS07B06 por q-ICP-MS durante 10 diferentes dias pelo método proposto. As linhas tracejadas representam o intervalo de confiança fornecido pelo *Institut National de Santé Publique Du Quebec* (Canadá), o desvio padrão relativo em cada dia não excedeu 10%.

Tendo em vista as recuperações insatisfatórias dos analitos Cr e V e a variação dos valores obtidos no material de referência de sangue para Al, Cu e Zn durante os 10 dias de análise, decidiu-se avaliar o uso da cela de reação dinâmica para a determinação destes elementos em sangue no intuito de resolver estas limitações do método.

5.3 - Otimização da cela de reação dinâmica para determinação de Al, Cr, Cu, Zn e V por DRC-ICP-MS.

Para alguns elementos, a alta concentração de concomitantes nas matrizes biológicas, principalmente Cl, Na, S, C e K promove interferências poliatômicas que não podem ser eliminadas com a simples utilização de equações de correção, isótopos alternativos, diluição de amostra, baixa vazão de nebulização, calibração com ajuste de matriz ou mesmo a completa digestão das amostras. Dentre os elementos que se enquadram neste último caso estão o vanádio e o cromo. Neste sentido, os estudos preliminares foram realizados na tentativa de otimizar as condições de operação da cela de reação para a determinação direta destes elementos em sangue. As condições de operação do DRC foram otimizadas utilizando como matrizes o próprio sangue base e/ou solução de matriz sintética (SMS). De acordo com cada analito em estudo foi feita uma SMS baseada nos seus interferentes presentes no sangue base, como descritos no item material e métodos.

5.3.1 - Avaliação do gás de reação NH_3 para ^{52}Cr , ^{51}V , ^{64}Zn , ^{66}Zn , ^{63}Cu , ^{65}Cu , ^{27}Al .

Otimizações:

No preparo da SMS para ^{52}Cr e ^{51}V adicionou-se a concentração do aminoácido L-cisteína aproximada, de acordo com Viña et al. (2001). Segundo Viña et al. o valor de L-cisteína no sangue de indivíduos saudáveis é cerca de 44 μM (5,35 g L^{-1} de L-cisteína em sangue). A L-cisteína contém carbono e enxofre que produzem interferência isobárica aos analitos ^{51}V e ^{52}Cr . O cloreto no sangue humano possui uma concentração de cerca de 3,6 g L^{-1} segundo Amer (2006). Adicionou-se então na SMS cerca de 90 vezes a concentração de cloreto

encontrada normalmente em sangue humano a fim de se aumentar a interferência principalmente para o ^{51}V .

Quando comparamos a matriz de sangue base e a SMS para a otimização dos parâmetros RPq e vazão do gás amônia para o ^{51}V (Tabela 11), observa-se a necessidade de uma maior vazão do gás de reação para o SMS a fim de se corrigir as interferências promovidas principalmente pelo Cl. Este estudo foi realizado para verificar a influência dos interferentes no meio e se, mesmo em concentrações mais elevadas de cloreto que normalmente presentes no sangue real, o DRC era capaz de produzir baixa concentração equivalente do sinal de fundo (BEC).

Para o ^{52}Cr , que sofre forte interferência do carbono, observa-se uma menor vazão do gás de reação amônia para a SMS em relação ao sangue base necessária para a eliminação das interferências do carbono. Isto indica que a matriz sintética SMS apresenta uma quantidade menor de carbono em relação ao sangue ou que alguma outra mudança nas matrizes possa estar reduzindo estas interferências (Tabela 11). Portanto, decidiu-se realizar a otimização de ^{52}Cr e ^{51}V com sangue base, devido as baixas concentrações destes elementos neste ($< 0,007$ e $< 0,006 \mu\text{g L}^{-1}$, respectivamente). A Figura 10 mostra os dados de sinal de fundo e intensidade para estes analitos em função da vazão e em função do RPq.

Tabela 11 – Otimização do DRC para avaliação da composição do meio e a influência na vazão da NH_3 para Cr e V. A vazão para V é notadamente maior com a SMS devido a alta concentração de cloreto no meio em relação ao sangue base e para Cr é menor devido a baixa concentração de carbono no meio SMS.

Isótopo	Vazão NH_3 (mL min^{-1})	RPq	Sensibilidade ($\text{cps}/\mu\text{g L}^{-1}$)	BEC ($\mu\text{g L}^{-1}$)
Sangue base				
$^{52}\text{Cr}^*$	1,1	0,80	3199	0,0153
$^{51}\text{V}^*$	1,0	0,80	662	0,0015
SMS				
$^{52}\text{Cr}^{**}$	0,80	0,40	6528	0,0110
$^{51}\text{V}^{**}$	1,3	0,65	316	0,0032

(*) Dados obtidos pela otimização com a matriz de sangue base; (**) Dados obtidos pela otimização com SMS.

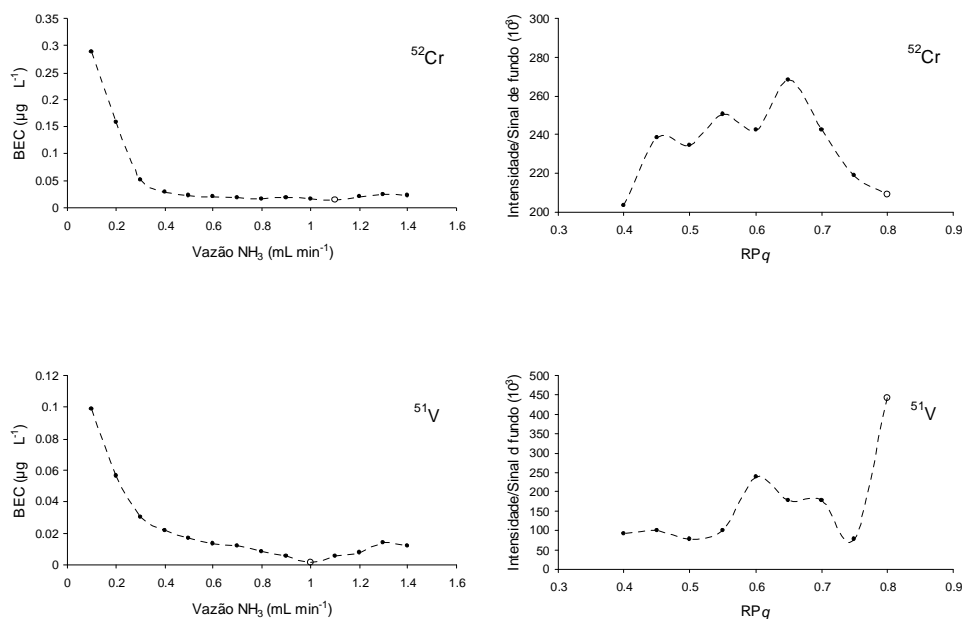


Figura 10 – Concentração equivalente do sinal de fundo (BEC) em função das diferentes vazões para NH_3 (à esquerda) e a razão intensidade / sinal de fundo em função da variação do RP_q (à direita) para a determinação dos isótopos ^{52}Cr e ^{51}V em sangue. Os pontos sem preenchimento representam o valor otimizado.

Al, Cu e Zn podem sofrer interferências poliatômicas durante a determinação em amostras de sangue por ICP-MS e isto pode ter contribuído pelo elevado coeficiente de variação durante os 10 dias de análise do material de referência de sangue QMEQAS07B06. Os principais concomitantes que podem estar na matriz do sangue e interferir na determinação destes elementos são: Na, P, Ca, C e Cl para cobre; S, P e Ca para zinco e C e N para alumínio, além do próprio argônio do plasma que pode interferir na determinação do zinco e do cobre. As condições de operação do DRC foram otimizadas utilizando como matrizes o próprio sangue base e/ou SMS. O intuito deste experimento foi o de confeccionar uma SMS mais próxima do sangue base para a otimização dos parâmetros do DRC para estes elementos, uma vez que estes analitos são encontrados em maiores concentrações no sangue base. Neste sentido, não é possível a otimização dos parâmetros do DRC utilizando sangue base. Um exemplo claro deste efeito é mostrado na Figura 11. Com a otimização do DRC para zinco com sangue base ($^{64}\text{Zn}^*$) observa-se que o DRC aumenta a vazão do gás de reação buscando a condição de menor BEC. No entanto, como há presença de zinco na matriz, mesmo após a eliminação dos

interferentes de massa 64 o detector continua recebendo os íons zinco da própria matriz e o DRC, mesmo a uma vazão máxima de $1,5 \text{ mL min}^{-1}$, não atinge um BEC aceitável. O mesmo ocorre com o cobre. Já para o alumínio isto não ocorre, provavelmente devido a sua menor concentração no sangue base (Tabela 12).

Para eliminar este problema foi avaliada a utilização da SMS contendo alguns dos principais interferentes de Zn e Cu presentes no sangue base. Nesta SMS adicionou-se a concentração do aminoácido L-cisteína, levando em consideração o valor de tiol no plasma de $0,5 \text{ mM}$ (STAMLER et al., 1992). Assim, o valor de enxofre na SMS foi cerca de 100 vezes maior. A L-cisteína contém carbono que produz interferências no ^{27}Al e enxofre que produz interferência para ^{63}Cu e ^{64}Zn . O cloreto no sangue humano possui uma concentração de cerca de $3,6 \text{ g L}^{-1}$ (AMER, 2006) e o sódio cerca de $3,2 \text{ g L}^{-1}$ (FRIED e PALEVSKY, 1997). Neste sentido, foram adicionadas quantidades iguais ou superiores dos interferentes para a confecção da SMS. A Figura 11 também mostra os resultados de BEC em função do gás de reação com o uso da SMS para zinco ($^{64}\text{Zn}^{**}$), tendo o mesmo perfil para ^{63}Cu . O alumínio apresentou o BEC um pouco melhor com o uso da SMS, porém os perfis das otimizações com sangue e SMS foram os mesmos. Na Tabela 12 pode-se comparar os valores de BEC, RPq, vazão e sensibilidade. Com a utilização da SMS os valores de BEC melhoram devido à redução da concentração dos analitos na matriz.

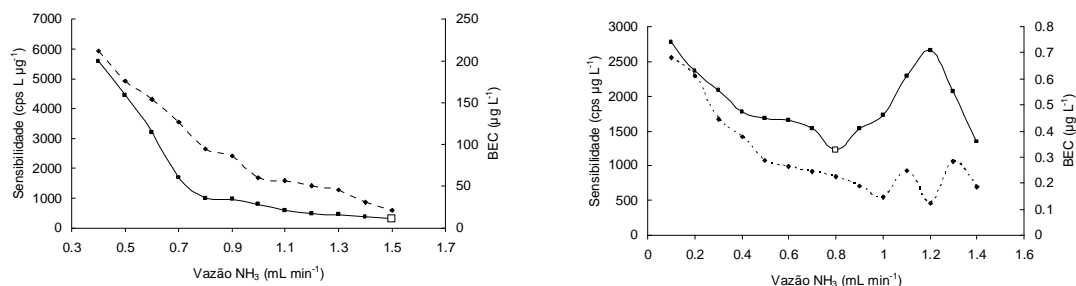


Figura 11 – Sensibilidade (linha tracejada) e concentração equivalente do sinal de fundo (BEC, linha contínua) em função das diferentes vazões para NH_3 para a determinação do isótopo ^{64}Zn . Os pontos sem preenchimento representam o valor otimizado tanto para o $^{64}\text{Zn}^*$ (otimizado em sangue base) quanto para o $^{64}\text{Zn}^{**}$ (otimizado em SMS).

Tabela 12 – Otimização do DRC para avaliação da composição do meio e a influência na vazão da NH_3 para Al, Cu e Zn. A vazão para Cu e Zn em sangue base atinge o máximo e o BEC se mantém ruim. Com a utilização da SMS o BEC melhora cerca de duas ordens de magnitude para CU e Zn.

Isótopo	Vazão NH_3 (mL min^{-1})	RPq	Sensibilidade ($\text{cps}/\mu\text{g L}^{-1}$)	BEC ($\mu\text{g L}^{-1}$)
Sangue base				
$^{27}\text{Al}^*$	0,8	0,70	2904	0,4753
$^{63}\text{Cu}^*$	1,5	0,85	1384	3,9800
$^{64}\text{Zn}^*$	1,5	0,80	3129	10,5018
SMS				
$^{27}\text{Al}^{**}$	1,0	0,70	3571	0,4033
$^{63}\text{Cu}^{**}$	1,3	0,65	900	0,0256
$^{64}\text{Zn}^{**}$	0,8	0,45	2618	0,3278

(*) Dados obtidos pela otimização com a matriz de sangue base; (**) Dados obtidos pela otimização com SMS.

5.3.2 - Determinações de Al, Cu e Zn no Material de Referência QMEQAS07B03 e de Cr e V no Material de Referência QMEQAS07B06 utilizando DRC-ICP-MS:

Após a otimização das variáveis do gás de reação utilizando sangue base e SMS mostradas na etapa de estudo anterior, foram determinadas as concentrações de vanádio e cromo no material de referência de sangue humano QMEQAS07B03 e QMEQAS07B06. Para este estudo, as calibrações foram realizadas com método de ajuste de matriz (sangue base ou SMS).

Foram também avaliadas as curvas analíticas de calibração (utilizando sangue base como matriz) com e sem aplicação do DRC. A Figura 12 mostra os resultados obtidos para ^{52}Cr e ^{51}V (com e sem uso de DRC). O coeficiente angular para a curva analítica feita com DRC sempre se apresenta menor. Isto significa que, com o uso do DRC as interferências que promovem aumento das contagens são eliminadas. Além disso, o uso do DRC proporcionou curvas para Cr e V com muito melhor linearidade, sendo suas determinações possíveis somente com a utilização do DRC-ICP-MS. A Tabela 13 apresenta os resultados de linearidade, limite de detecção e quantificação para Cr e V com e sem utilização de cela de reação dinâmica.

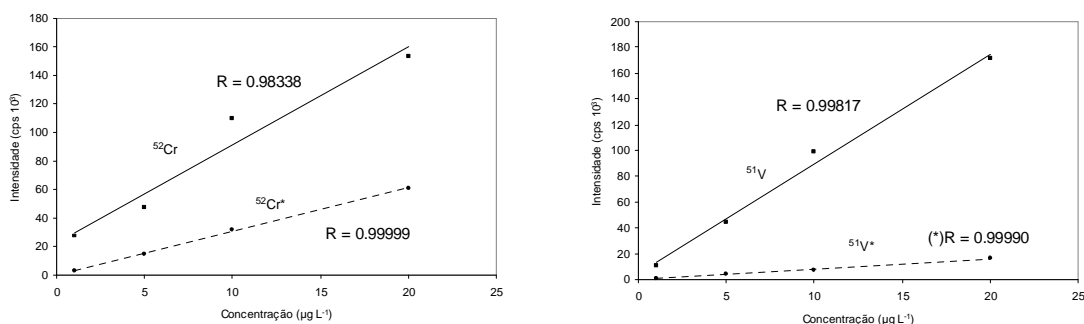


Figura 12 – Curvas analíticas de calibração dos elementos cromo e vanádio sem (^{52}Cr e ^{51}V) e com ($^{52}\text{Cr}^*$ e $^{51}\text{V}^*$) o uso do DRC-ICP-MS. Notar a menor intensidade no número de contagens e a melhor linearidade quando se utiliza o DRC-ICP-MS.

Para os elementos Al, Cu e Zn observou-se que apenas a mudança na utilização da matriz sangue para a matriz SMS na curva de calibração melhorou significativamente os resultados de reprodutibilidade quando da análise do material de referência de sangue QMEQAS07B03, não sendo necessária o uso do DRC. O uso da SMS para a calibração por ajuste de matriz também proporcionou uma considerável melhora no limite de detecção e linearidade da curva para os mesmos elementos (Tabela 13).

Tabela 13 – Comparação entre o coeficiente angular, coeficiente de correlação linear (R), limites de detecção e quantificação ($3s$, $n=10$) no modo q-ICP-MS (com sangue ou SMS como matriz) e DRC-ICP-MS (com sangue como matriz). Com o uso da SMS como matriz em q-ICP-MS ou do modo DRC-ICP-MS todos os parâmetros melhoram.

Analito	Coeficiente angular	R	LD ^(d) ($\mu\text{g L}^{-1}$)	LQ ^(d) ($\mu\text{g L}^{-1}$)
$^{27}\text{Al}^{(a)}$	8601,3	0,99986	0,223	0,743
$^{27}\text{Al}^{(b)}$	7574,9	0,99999	0,083	0,273
$^{52}\text{Cr}^{(a)}$	8438,4	0,98338	0,020	0,077
$^{52}\text{Cr}^{(c)}$	3049,4	0,99999	0,007	0,022
$^{63}\text{Cu}^{(a)}$	8487,6	0,99982	0,304	1,012
$^{63}\text{Cu}^{(b)}$	4688,4	0,99995	0,090	0,300
$^{65}\text{Cu}^{(a)}$	4008,5	0,99985	0,019	0,062
$^{65}\text{Cu}^{(b)}$	2115,9	0,99995	0,055	0,183
$^{51}\text{V}^{(a)}$	8820,5	0,99817	0,013	0,043
$^{51}\text{V}^{(c)}$	804,5	0,99990	0,006	0,020
$^{64}\text{Zn}^{(a)}$	4304,1	0,99818	0,857	2,856
$^{64}\text{Zn}^{(b)}$	2265,4	0,99985	0,281	0,937
$^{66}\text{Zn}^{(a)}$	2528,2	0,99741	0,834	2,782
$^{66}\text{Zn}^{(b)}$	1277,5	0,99986	0,306	1,019

^(a) uso de sangue base como ajuste de matriz modo q-ICP-MS; ^(b) uso de SMS como ajuste de matriz no modo q-ICP-MS; ^(c) uso de sangue base como ajuste de matriz modo DRC-ICP-MS; ^(d) dados baseados em análises com 10 replicatas.

A Figura 13 mostra as determinações dos analitos Al, Cu e Zn durante 5 dias no material de referência QMEQAS07B03 e de Cr e V durante 10 dias no material de referência QMEQAS07B06. As calibrações foram realizadas por ajuste de matriz com sangue base para Cr e V e determinação por DRC-ICP-MS e para Al, Cu e Zn ajuste de matriz com SMS e determinação por q-ICP-MS.

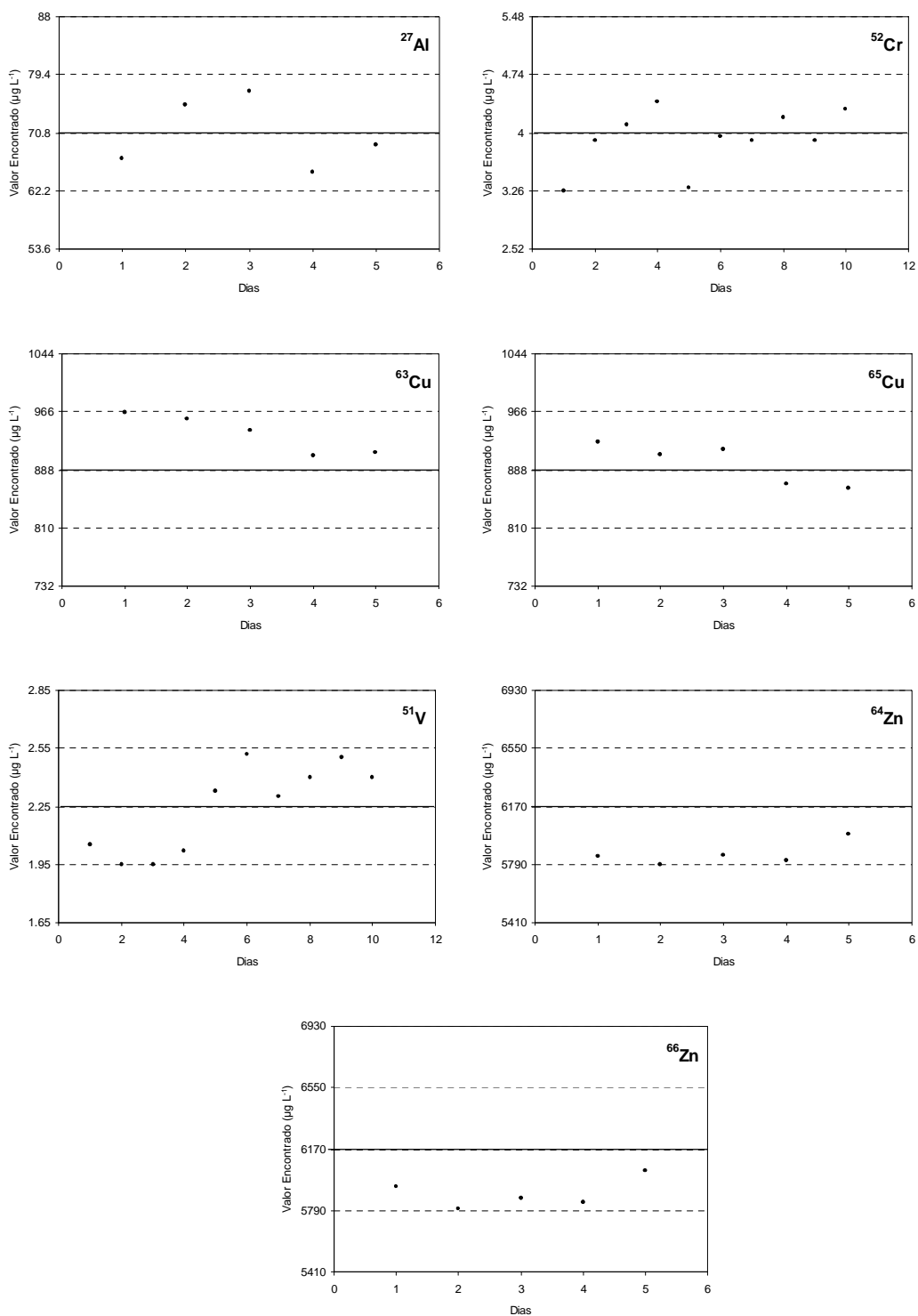


Figura 13 – Determinação de Al, Cu e Zn no material de referência de sangue QMEQAS07B03 durante 5 dias por q-ICP-MS com uso de SMS como matriz de ajuste e de Cr e V no material de referência de sangue QMEQAS07B06 durante 10 dias por DR-ICP-MS com uso de sangue base como matriz de ajuste. As linhas tracejadas representam o intervalo de confiança fornecido pelo *Institut National de Santé Publique Du Quebec* (Canadá), o desvio padrão relativo em cada dia não excedeu 10%.

5.4 - Avaliação do uso dos padrões internos.

O uso de padrões em ICP-MS pode auxiliar, em maior extensão, na correção de flutuações nas intensidades de contagens dos analitos que ocorrem durante o período de análise e, em menor extensão, na eliminação de algumas interferências possibilitando análises em rotina com o equipamento em condições desfavoráveis, como nos casos onde ocorrem depósitos de sais no bico injetor e cones (análise em rotina) com perda de sensibilidade.

Neste estudo, foram avaliados os padrões internos Ir, Y, Rh, Ga e In na concentração final de 10 ou 50 $\mu\text{g L}^{-1}$ cada. A escolha foi baseada na aqueles padrões internos que forneceram menores incertezas com determinação exata e precisa dos analitos presentes nos materiais de referência ou na comparação entre técnicas e/ou na recuperação.

Em resumo, para os isótopos: ^{27}Al , ^{75}As , ^{111}Cd , ^{59}Co , ^{52}Cr , ^{63}Cu , ^{65}Cu , ^{55}Mn , ^{208}Pb , ^{82}Se , ^{205}Tl , ^{51}V , ^{64}Zn e ^{66}Zn determinados em sangue, o padrão interno de melhor eficiência foi o ^{103}Rh na concentração de 10 $\mu\text{g L}^{-1}$. Para os isótopos ^{98}Mo , ^{195}Pt , ^{123}Sb , ^{120}Sn e ^{130}Te determinados em sangue, o padrão interno de melhor eficiência foi o ^{114}In . No modo DRC-ICP-MS os padrões internos utilizados foram os mesmos, nas mesmas concentrações quando no modo q-ICP-MS.

6. Conclusões

Os resultados obtidos no presente estudo mostram a viabilidade do uso da técnica de espectrometria de massas com plasma acoplado (ICP-MS) para a determinação de Al, As, Cd, Co, Cr, Cu, Mn, Mo, Pb, Se, Tl, V, Zn, Sb, Pt, Te e Sn sangue com simples diluição da amostra, o que implica em uma considerável diminuição nos tempos de análise para laboratórios clínicos. Entretanto, a utilização de gás de reação foi fundamental para a determinação de ^{52}Cr e ^{51}V , devido a grande interferência causada pela matriz, que possui altas concentrações de carbono e cloro.

Para os analitos ^{27}Al , ^{63}Cu , ^{66}Zn a determinação em sangue por ICP-MS em modo quadrupolo pode ser realizada por meio do uso de curvas de calibração por ajuste de matriz com sangue base ou SMS (ambas com concentrações de 10-100 $\mu\text{g L}^{-1}$). Porém com a SMS foram obtidos melhores limites de detecção e uma maior facilidade de se produzir uma curva de calibração analítica sem necessitar de coleta de sangue. Já para os analitos ^{75}As , ^{111}Cd , ^{59}Co , ^{55}Mn , ^{98}Mo , ^{208}Pb , ^{195}Pt , ^{123}Sb , ^{82}Se , ^{120}Sn , ^{130}Te , e ^{205}Tl a determinação foi realizada por meio do uso de curvas de calibração (com concentrações de 1-20 $\mu\text{g L}^{-1}$) por ajuste de matriz com sangue base e o ICP-MS operando em modo quadrupolo.

7. Referências Bibliográficas

ACGIH. American Conference of Governmental Industrial Hygienists. *Threshold Limits Values (TLVs) for Chemical Substances and Physical Agents Biological Exposure Indices for 2003*. Cincinnati, OH, **2003**.

Allain, P.; Jaunault, L.; Mauras, Y.; Mermet, J.; Delaporte, T. *Analytical Chemistry*, **1991**, 63, 1497-1498.

Alimonti, A.; Petrucci, S.; Fioravanti, S.; Laurenti, F.; Caroli, S. *Analytica Chimica Acta*, **1997**, 342, 75-81.

Amer, M.M.B. *Journal of Medical Engineering & Technology*, **2006**, 30, 25-30.

Aposhian, H.V.; Aposhian, M.M. *Chemical Research in Toxicology*, **2006**, 19, 1-15.

Ashton, M.R.; Sutton, D.; Nielsen, M. *British Medical Journal*, **1990**, 300, 541.

ATSDR. Agency for Toxic Substances and Disease Registry. *Toxicological Profile for Cadmium*. Atlanta, 1999. Disponível em: <http://www.atsdr.cdc.gov/toxprofiles/tp5-c6.pdf>. Acessado em maio de **2008**.

Baranov, V. I.; Tanner, S. D. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, **1999**; 14, 1133-1142.

Barany, E.; Bergdahl, I. A.; Bratteby, L. E.; Lundh, T.; Samuelson, G.; Schutz, A.; Skerfving, S.; Oskarsson, A. *Environmental Research*, **2002a**; 89, 72-84.

Barany, E.; Bergdahl, I. A.; Bratteby, L. E.; Lundh, T.; Samuelson, G.; Schutz, A.; Skerfving, S.; Oskarsson, A. *Science of the Total Environment*, **2002b**; 286, 129-141.

Barany, E.; Bergdahl, I. A.; Schutz, A.; Skerfving, S.; Oskarsson, A. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, **1997**; 12, 1005-1009.

Barany, E.; Bergdahl, I. A.; Schutz, A.; Skerfving, S.; Oskarsson, A. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, **1997**; *12*, 1005–1009.

Barbosa, F.; Tanus-Santos, J. E.; Gerlach, R. F.; Parsons, P. J. *Environmental Health Perspectives*, **2005**, *113*, 1669-1674.

Barbosa, F.; Gerlach, R. F.; Tanus-Santos, J. E. *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology*, **2006a**, *98*, 559-564.

Barbosa, F.; Rodrigues, M. H. C.; Buzalaf, M. R.; Krug, F. J.; Gerlach, R. F.; Tanus-Santos, J. E. *Archives of Toxicology*, **2006b**, *80*, 633-637.

Barbosa, F.; Ramires, I.; Rodrigues, M. H. C.; Pierre, T. D. S.; Curtius, A. J.; Buzalaf, M. R.; Gerlach, R. F.; Tanus-Santos, J. E. *Environmental Research*, **2006c**, *102*, 90-95.

Begerow, J.; Turfeld, M.; Dunemann, L. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, **1997**, *12*, 1095-1098.

Bergdahl, I. A.; Vahter, M.; Counter, S. A.; Schutz, A.; Buchanan, L. H.; Ortega, F.; Laurell, G.; Skerfving, S. *Environmental Research*, **1999**; *80*, 25-33.

Bizzi, A.; Gambetti, P. *Acta Neuropathologica*, **1986**, *71*, 154-158.

Birchal, J.; Chappel, J. *Clinical Chemistry*, **1988**; *34*, 265-267.

Brumm, V.L.; van Gorp, W.G.; Wirshing, W. *Neuropsychiatry, Neuropsychology, and Behavioral Neurology*, **1998**, *11*, 245-249.

Buchet, J. P.; Pauwels, J.; Lauwerys, R. *Environmental Research*, **1994**, *66*, 44-51.

Carlisle E.M. *Federation Proceedings*, **1974**, *33*, 1758–66.

Carlisle E.M. *Science*, **1972**, 178, 619–621.

Case, C. P.; Ellis, L.; Turner, J. C.; Fairman, B. *Clinical Chemistry*, **2001**; 47, 275-280.

Centers for Disease Control and Prevention. *Third National Report on Human Exposure to Environmental Chemicals*. Department of Health and Human Services, Atlanta, GA, **2005**.

Chanarin, I., **1999**. em: Shils, M.E.; Olson, J.A.; Shike, M.; Ross, A.C. *Modern Nutrition in Health and Disease*. Lippincot: Williams, & Wilkins, Baltimore, **1999**, p. 1419–1436.

Chausmer, A. B. *Journal of the American College of Nutrition*, **1998**, 17, 109-115.

Christopher, S. J.; Day, R. D.; Bryan, C. E.; Turk, G. C. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, **2005**; 20: 1035-1043.

Cox, M.; Singer, I. em: Bronner F.; Coburn, J.W. *Disorders of mineral metabolism*. New York: Academic Press, **1981**, p. 369-438.

Date, A.R.; Gray, A.L. *Applications of Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry*, Blackie & Son Ltd., London, **1989**, p. 254.

Delves, H. T. *Annals of Clinical Biochemistry*, **1982**; 19: 302-306.

Demicheli, C.; Frézard, F. *Cadernos Temáticos de Química Nova na Escola*, **2005**, 6, 24-30.

Diegor, W. G.; Longerich, H. P. *Atomic spectroscopy*, **2000**; 21, 111-117.

D'Illio, S.; Violante, N.; Caimi, S.; Di Gregório, M.; Petrucci, F.; Senofonte, O. *Analytica Chimica Acta*, **2006a**; 573-574: 432-438.

D'Illio, S.; Violante, N.; Di Gregório, M.; Senofonte, O.; Petrucci, F. *Analytica Chimica Acta*, **2006b**; 579: 202-208.

Diplock, A.T. *The American Journal of Clinical Nutrition*, **1991**, 53, 189S-193S.

Duivenvoorden, W.C.M.; Middleton, A.; Kinrade, S.D. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*, **2008**, doi:10.1016/j.jtemb.2008.02.001.

Eisinger J.; Clairet, D. *Magnesium Research*, **1993**, 6: 247-249.

Elinder, C-G.; Friberg, L.; Cobalt, em: Friberg, L.; Nordberg, G.F.; Vouk, V.B. *Handbook on the toxicology of metals*. Amsterdam: Elsevier, **1986**, p. 212-232.

Environmental Chemistry, Produzido por Barbalace, J.K., disponível em: <http://environmentalchemistry.com/yogi/periodic/P.html>. Acesso em junho **2008**.

Evans, E.H.; Giglio, J.J. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, **1993**, 8, 1-18.

Farago, M.E.; Kavanagh, P.; Blanks, R. *Analyst*, **1998**, 123; 451-454.

Feldmann, I.; Jakubowski, N.; Stuewer, D. *Fresenius' Journal of Analytical Chemistry*, **1999a**; 365; 415-421.

Feldmann, I.; Jakubowski, N.; Thomas, C.; Stuewer, D. *Fresenius' Journal of Analytical Chemistry*, **1999b**; 365: 422-428.

Feldmann, J.; Lai, V. W-M.; Cullen, W. R.; Ma, M.; Lu, X.; Le, X. C.; *Clinical Chemistry*, **1999**, 45, 1988-1997.

Field, M. P.; Shapses, S.; Cifuentes, M.; Sherrell, R. M. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, **2003**; 18: 727-733.

Flament, P.; Bertho, M. L.; Deboudt, K.; Véron, A.; Puskaric, E. *Science of the Total Environment*, **2002**; 296: 35-57.

Flaten, T.P.; Wakayama, I.; Sturm, M.J. Natural models of aluminum toxicity in fish from acid-rain lakes, em: Nicolini, M.; Zatta, P.F.; Corain, B. *Alzheimer Disease and related disorders*. Oxford: Pergamon Press, **1993**, p.253-254.

Fraga, C.G.; Oteiza, P.I. *Toxicology*, **2002**, 180, 23–32.

Friberg, L.; Nordberg, G. F.; Vouk, V. B. *Handbook on the Toxicology of Metals*. Amsterdam: Elsevier, **1979**.

Fried, L.F.; Palevsky, P.M. *Medical Clinics of North America*, **1997**, 81, 585–609.

Ganrote, P.O.; *Environmental Health Perspectives*, **1986**, 65, 363-441.

Garruto, R.M.; Fukatsu, R.; Wanagihara, R. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **1984**, 81: 1875.

Gilson, G.R.; Douglas, D.J.; Fulford, J.E.; Halligan K.W.; S.D. Tanner, S.D. *Analytical Chemistry*, **1988**, 60, 1472-1474.

Gonzalez-Villalva, A.; Fortoul, T.I.; Avila-Costa, M.R. *Toxicology and Industrial Health*, **2006**, 22, 113-116.

Gonzalez, A. G.; Herrador, M. A. *Trends in Analytical Chemistry*, **2007**, 26, 227-238.

Goyer, R.A. *American Journal of Clinical Nutrition*, **1995**, 61, 646-650S.

Goyer, R.A; Klaassen, C.D.; Waalkes, M.P. *Metal Toxicology*, Academic Press, San Diego, **1995**.

Gray, A.L.; Williams, J.G. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, **1987**, 2; 599-606.

Green, J. M. *Analytical Chemistry*, **1996**, 68, 305A-309A.

Grégoire, D.C. *Spectrochimica Acta Part B*, **1987**, 42; 895-907.

Guyton, A.C.; Hall, J.E. *Textbook of Medicinal Physiology*, 11^a ed., Pennsylvania, Elsevier Saunders, **2006**, p.45-57.

Harrington, C. F.; Fairman, B.; Ellis, L.; Roberts, D. J.; Case, P. *Plasma source mass spectrometry – New developments and applications*, edit. G. Holland e S. Tanner, Royal Society of Chemistry, Cambridge, **1999**, p. 193.

Hayes, W. A. *Principles and Methods of Toxicology*, 4^a edição, Taylor & Francis, Philadelphia, **2001**, p. 654 a 682.

Heitland, P.; Koster, H. D. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, **2004**; 19: 1552-1558.

Herbert, V.; Vitamin B₁₂, em: Ziegler E.E.; Filer, L.J. *Present Knowledge in Nutrition*. Washington, DC: ILSI, **1996**, p. 191-205.

Hsueh, Y. M.; Hsu, M. K.; Chiou, H. Y.; Yang, M. H.; Huang, C. C.; Chen, C. J. *Toxicology Letters*, **2002**, 133; 83-91.

IARC. International Agency for Research on Cancer, *Agents reviewed by the IARC monographs*, 1-88, **2004**, disponível em: <http://monographs.iarc.fr/monoeval/Listagentsalphorder.pdf>. Acessado em março de **2008**.

Israel Science and Technology Homepage, *List of Periodic Table Elements*, disponível em: www.science.co.il. Acessado em outubro de **2008**.

IUPAC Gold Book. Disponível em: <http://goldbook.iupac.org>. Acessado em março de **2007**.

Jarvis, K.E.; Gray, A.L.; Houk, R.S. *Handbook of Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry*, Blackie & Son Ltd., New York, 1^a ed., **1992**, p. 380.

Jouhannau, P.; Raisbeck, G.M.; Viou, F. *Clinical Chemistry*, **1997**, *43*, p. 1023-1028.

Kanumakala, S.; Boneh, A.; Zacharin, M. *Journal of Inherited Metabolic Disease*, **2002**, *25*, 391–398.

Klaassen, C.D.; Casarett and Doull's Toxicology: The Basic Science of Poisons, 6a ed. USA: McGraw-Hill 2001; p.811-868.

Knochel, J.P. Phosphorus, em: Shils, M. *Nutrition in Health and Disease*, 9^a ed. Baltimore: Williams & Wilkins, **1999**, p. 157-167.

Kobayashi, K.; Himeno, S.; Satoh, M. *Toxicology*, **2006**, *228*, 162-170.

Kontani, M.; Hara, A.; Ohta, S.; Ikeda, T. *Annals of Internal Medicine*, **2005**, *44*, 448–52.

Koppenaar, D. W.; Eiden, G. C.; Barinaga, C. J. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, **2004**; *19*: 561-570.

Krachler, M.; Radner, H.; Irgolic, K. J. *Fresenius' Journal of Analytical Chemistry*, **1996**; *355*, 120-128.

Labat, L.; Dehon, B.; Dhorne, C.; Desaint-Mahieu, A.S.; Lhermitte, M. *Annales de Toxicologie Analytique*, **2002**, *14*, 143–144

Larsson, S.C.; Virtanen, M.J.; Mars, M. *Archives of Internal Medicine*, **2008**, *168*, 459–65.

Lenox, R.H.; McNamara, R.K.; Papke, R.L.; *Journal of Clinical Psychiatry*, **1998**, *58*, 37-47.

Ma, M.; Le, X. C. *Clinical Chemistry*, **1998**, *44*, p. 539-550.

Manton, W. I.; Rothenberg, S. J.; Manalo, M. *Environmental Research*, **2001**; *86*: 263-273.

May, T.W.; Wiedmeyer, R.H. *Atomic Spectroscopy*, **1998**, *19*: 150-155.

Mestek, O.; Suchánek, M.; Vodicková, Z.; Zemanová, B.; T. Zíma, T. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, **1997**; *12*, 85–89.

Montaser, A. *Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry*, Wiley-VCH, **1998**.

Muñiz, C. S.; Larchante-Gayon, J. M.; Alonso, J. I. G.; Sanz-Medel, A. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, **1999a**; *14*: 193-198.

Muñiz, C. S.; Larchante-Gayon, J. M.; Alonso, J. I. G.; Sanz-Medel, A. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, **1999b**; *14*: 1505-1510.

Nagyvary, J.; Bradbury, E.L. *Biochemical Research Communications*, **1977**, *2*, 592-598.

Nakagawa, J.; Tsuchiya, Y.; Yashima, Y.; Tezuka, M.; Fujimoto, Y. *Journal of Health Science*, **2004**; *50*, 164-168.

Nielson, F.; Other Trace elements, em: Ziegler, E.E.; Filer, L.J. *Present Knowledge in Nutrition*. Washington, DC: ILSI, **1996**, p.353-377.

Nixon, D.E.; Moyer, T.P. *Spectrochimica Acta Part B*, **1996**; *51*, 13-25.

Nixon, D. E.; Moyer, T. P.; Johnson, P.; McCall, J. T.; Ness, A. B.; Fjerstad, W. H.; Wehde, M. B. *Clinical Chemistry*, **1986**; *32*, 1660-1665.

Nixon, D. E.; Neubauer, K. R.; Eckdahl, S. J.; Butz, J. A.; Burritt, M. F. *Spectrochimica Acta Part B*, **2004**; 59, 1377-1387.

NRC: Recommended Dietary Allowances, 10^a ed. Washington, DC: National Academy Press, **1989**, p.1-285.

Onda, N. *The Tohoku Journal of Experimental Medicine*, **1996**, 178, 91-99.

Palmer, C. D.; Lewis M. E.; Geraghty, C. M.; Barbosa, F.; Parsons, P. J. *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy*, **2006**; 61: 980-990.

Parsons, P. J.; Barbosa, F. *Spectrochimica Acta Part B*, **2007**, 62, 992-1003.

Paschal, D. *Journal of Chemical Health and Safety*, **2007**, November/December, 8-13.

Patriarca, M.; Menditto, A.; Di Felice, G.; Petrucci, F.; Caroli, S.; Merli, M.; Valente, C. *Microchemical Journal*, **1998**; 59: 194-202.

Payling, R. Disponível em: www.thespectroscopynet.com. Acessado em outubro de **2008**.

Prichard, E.; Mackay, G. M.; Points, J. *Trace Analysis: A structured approach to obtaining reliable results*. Bodmin: Crown **1996**; p.126-129.

Prohaska, C.; Pomazal, K.; Steffan, I. *Fresenius' Journal of Analytical Chemistry*, **2000**; 367: 479-484.

Pruszkowski, E.; Neubauer, K.; Thomas, R. *Atomic Spectroscopy*, **1998**; 19: 111-115.

Ress, N.B.; Chou, B.J.; Renne, R.A. *Toxicological Sciences*, **2003**, 74, 287-296.

Rico, H.; Gallego-Lago, J.L.; Hernandez, E.R.; Villa, L.F.; Sanchez-Atrio, A.; Seco, C. *Calcified Tissue International*, **2000**, *66*, 53–55.

Roshchin, I.V. 1967. *Gigiena i Sanitariia*, **1967**, *32*, 26-32.

Salin, E. D.; Sing, R. L. A.; Powell, M.; Boomer, D. W. *Analytical Chemistry*, **1986**; *58*, 975-976.

Sällsten, G. *Occupational exposure to inorganic mercury – exposure assessment and elimination kinetics*, Göteborg, Switzerland, **1994**.

Sandstead, H.H. *American Journal of Clinical Nutrition*, 1995, *61S*, 621S-624S.

Savory, J.; Wills, M. R. *Clinical Chemistry*, **1992**; *38*: 1565-1573.

Schrauzer, G.N. Functional roles of cobalt, em: Bethon, G. (ed): *Handbook of metal-ligand interactions in biological fluids*. New York: Marcel Dekker, **1995**, p. 244-247.

Scibior, A.; Zaporowska, H.; Ostrowski, J. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, **2006**, *51*, 287-295.

Shibata, Y.; Morita, M.; Fuwa, K. *Advances in Biophysics*, **1992**, *28*, 31-80.

Siegel, N.; Hagu, A. *Biochimica et Biophysica Acta*, **1983**, *744*, 36-45.

Singer, I. *Kidney International*, **1981**, *19*: 374-387.

Skoog, D.A.; West, D.M.; Holler, F.J.; Crouch, S. R. *Fundamentals of Analytical Chemistry*. 8^a ed. California: Thomson Brooks/Cole **2004**; p.210.

Smith, F. E.; Herbert, J.; Gaudin, J.; Hennessy, J.; Reid, G.R. *Clinical Biochemistry*, **1984**, *17*, 306-310.

Soazo, M.; Garcia, G.B. *Neurotoxicology an Teratology*, **2007**, *29*, 503-10.

Stamler, J.S.; Jaraki, O.; Osborne, J.; Simon, D.I.; Keaney, J.; Vita, J.; Singel, D.; Valeri, C.R.; Loscalzo, J. *Proceedings of the National Academy of Science*, **1992**, *89*, 7674-7677.

St'astná, M.; Nemcová, I.; Zýka, J. *Analytical Letters*, **1999**; *32*, 2531-2543.

Steele, T.N. Treatment of lithium intoxication with diuretics, em: Brown, S.S. *Clinical Chemistry and Chemical Toxicology of Metals*. Amsterdam: Elsevier, **1977**, p.289-292.

Stoecker, B.J.; Chromium, em: Ziegler, E.E.; Filer, L.J. *Present Knowledge in Nutrition*. Washington, DC: ILSI, **1996**, p. 344-352.

Sutton, K. L.; Caruso, J. A. *Journal of Chromatography A*, **1999**; *856*: 243-258.

Tanner, S.D.; Baranov, V.I. *Atomic Spectroscopy*, **1999**, *20*: 45-52.

Tanner, S. D.; Baranov, V. I.; Bandura, D. R. *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy*, **2002**; *57*: 1361-1452.

Taylor, A.; Branch, S.; Halls, D.; Patriarca, M.; White, M. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*. **2004**; *4*: 505-556.

Thomas, R. *Spectroscopy*, **2002**; *17*, 42-48.

Thomsen, V.; Schatzlein, D.; Mercurio, D. *Spectroscopy*, **2003**, *18*, 112-114.

Timer, R.T.; Sands, J.M.; *Journal of American Society of Nephrology*, **1999**, *10*, 666-674.

Townsend, A. T.; Miller, K. A.; McLean, S.; Aldous, S. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, **1998**; *13*: 1213-1219.

Tsalev, D.L. *Atomic absorption spectrometry in occupational and environmental health practice*, vol. 3, CRC Press, New York, **1984**.

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

UCL. Université Catholique de Louvain, Belgic, Monitoring biologique de l'exposition aux substances chimiques, disponível em: <<http://www.md.ucl.ac.be/toxi/mbi.htm>>, acessado em maio de **2008**.

U. S. Environmental Protection Agency, *Vanadium, Integrated Risk Information System (IRIS)*. Environmental Criteria and Assessment Office, Office of Health and Environmental Assessment, Cincinnati, **1991**.

Vandecasteele, C.; Block, C.B. *Modern methods for trace element determination*, John Wiley & Sons, West Sussex, **1994**.

Vandecasteele, C.; Vanhoe, H.; Dams, R. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, **1993**; 8, 781 – 786.

Vanhoe, H.; Dams, R.; Versieck, J. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, **1994**; 9, 23 – 31.

Viña, J.R.; Giménez, A.; Corbacho, A.; Puertes, I.R.; Borrás, E.; García, C.; Barber, T. *British Journal of Nutrition*, **2001**, 85, 173-178.

Zanão, R. A.; Barbosa, F.; De Souza, S. S.; Krug, F. J.; Abdalla, A. L. *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy*, **2002**; 57; 291-301.

Zhou, Y.; Zanão, R. A.; Barbosa, F.; Parsons, P. J.; Krug, F. J. *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy*, **2002**; 57: 1291-1300.

Walravens, P.A. *Clinical Chemistry*, **1980**, 26, 185.

WHO. *Arsenic*. Environmental Health Criteria Geneva: WHO, **1981**.

WHO. *Lead*. Environmental Health Criteria 3. Geneva: WHO, **1977**.

WHO. *Mercury*. Environmental Health Criteria 1. Geneva: WHO, **1976**.

WHO: WHO/FAO/IASEA *Report on trace elements in human nutrition and human health*. Geneva: World Health Organization, **1996**.

Wills, M.R.; Savory, J. *Lancet*, **1983**, 2, 29-33.

Worle-Knirsch, J.M.; Kern, K.; Schleh, C. *Environmental Science Technology*, **2007**, 41, 331-336.