

**Emprego de Otimização Multivariada no
Desenvolvimento de Métodos para Determinação
de Metais de Interesse em Soro e Sangue
Humanos por Espectrometria de Absorção
Atômica em Forno de Grafite**

Henrique José Ferraz Fabrino

UFMG 699

D. 420

Henrique José Ferraz Fabrino*

**Emprego de Otimização Multivariada no Desenvolvimento de Métodos para
Determinação de Metais de Interesse em Soro e Sangue Humanos por
Espectrometria de Absorção Atômica em Forno de Grafite**

Dissertação apresentada ao Departamento de Química
do Instituto de Ciências Exatas da Universidade Federal
de Minas Gerais, como requisito parcial para obtenção do
grau de Mestre em Química – Química Analítica.

Orientador: Prof. Dr. José Bento Borba da Silva

Co-orientador: Dr. Waldomiro Borges Neto

*** bolsista CAPES**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
Belo Horizonte
2008**

Fabrino, Henrique José Ferraz

Emprego de otimização multivariada no desenvolvimento de métodos para determinação de metais de interesse em soro e sangue integral humanos por espectrometria de absorção atômica em forno de grafite / Henrique José Ferraz Fabrino. 2008.

xv, 106 f. : il.

Orientador: José Bento Borba da Silva.

Co-Orientador:Waldomiro Borges Neto.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais. Departamento de Química.

Inclui bibliografia.

1.Química analítica - Teses 2. Espectroscopia de absorção atômica – Teses 3.Quimiometria – Teses 4.Sangue - Teses I. Silva, José Bento Borba da, Orientador II. Neto, Waldomiro Borges, Co-Orientador III. Título.

Dedicatórias

A minha mãe, Vânia, e ao meu pai, Ricardo, pelo amor, apoio, dedicação, confiança e ensinamentos de vida.

A Carolina, minha namorada, pelo carinho, presença e incansável apoio ao longo do período de elaboração deste trabalho.

Agradecimentos

A Deus, por me conceder uma vida maravilhosa e sempre colocar pessoas especiais no meu caminho.

Ao Prof. Dr. José Bento pela orientação, amizade, incentivo, paciência e oportunidade de crescer como profissional e como pessoa.

Ao Dr. Waldomiro pela co-orientação, amizade, paciência e pelas valiosas sugestões.

A Prof. Dra. Josiane Nicácio pelos ensinamentos, amizade, paciência e por permitir que parte deste trabalho fosse desenvolvido no LATO.

Ao Prof. Dr. Alfredo Goes por sua dedicação em conseguir as amostras de soro e pela gentileza com que sempre me recebeu.

A todos os amigos do Grupo de Espectrometria Atômica e Preparo de Amostras pelo convívio amistoso e pelas sugestões.

A meu avô Fabrino e a minha avó Clélia que criaram uma família onde as pessoas se respeitam e não há lugar para falsidade nem intrigas, e que são exemplo de como devo proceder em qualquer relação humana da minha vida.

A meu avô Vanor pelo amor e dedicação que sempre teve por mim e pela minha família.

A minha irmã, Juliana, e meu irmão, Ricardo, pela relação de amizade e confiança.

Aos amigos Léo, Du, Márcio, Bruno, Bernardo, Flávio e Adriano pela amizade fiel desde meus primeiros dias em Belo Horizonte.

Aos amigos da república Unidos por Acaso pela amizade e pelos momentos inesquecíveis.

A Bartucada pelos momentos de descontração que ajudaram a aliviar a tensão e pela oportunidade de fazer amizades valiosas.

Aos funcionários do Departamento de Química da UFMG, em especial às secretárias do Programa de Pós-Graduação em Química, pela paciência e colaboração.

Ao Programa de Pós-Graduação em Química da UFMG pela oportunidade.

A CAPES pela bolsa de estudo concedida.

A FAPEMIG pelos recursos fornecidos para realização do projeto de pesquisa sobre determinação de metais em soro humano por GF AAS.

Resumo

Nesta dissertação de mestrado estão descritos desenvolvimentos de métodos para determinação direta de V, Sb, Cr e Mn em soro humano e de Pb em sangue humano sem necessidade de digestão prévia, com a utilização da técnica de espectrometria de absorção atômica em forno de grafite. As amostras de soro foram diluídas 1+4 com uma solução de HNO_3 1% v/v e Triton® X-100 0,1% v/v enquanto que as amostras de sangue foram diluídas 1+9 com uma solução de HNO_3 0,2% v/v e Triton® X-100 0,2% v/v. A otimização dos parâmetros de análise foi realizada através de otimização multivariada, que consistiu em um experimento para triagem de variáveis (planejamento fatorial completo ou fracionário) seguido de uma metodologia de superfície de resposta (planejamento composto central (CCD) ou Doehlert). Para todos os métodos foram avaliadas as melhores temperaturas de pirólise e de atomização e o uso de modificadores químicos, principalmente modificadores permanentes. O efeito da matriz foi avaliado em cada método por meio dos testes estatísticos F e t de Student, sendo que, em alguns casos, a calibração aquosa tornou-se viável. A sensibilidade foi analisada por meio das massas características e dos LODs. Estudos de exatidão foram realizados efetuando recuperações dos metais em amostras artificialmente contaminadas e, no caso do chumbo em sangue, foram também utilizados materiais certificados. A precisão foi determinada em ensaios efetuados em um mesmo dia (precisão intra-ensaio) e em dias diferentes (precisão inter-ensaios). Foram também realizadas leituras de soro e de sangue humanos de indivíduos voluntários.

Abstract

In this master's degree dissertation the developments of methods are described for direct determination of V, Sb, Cr and Mn in human serum and Pb in human whole blood without need of previous digestion, using graphite furnace atomic absorption spectrometry technique. The serum samples were diluted 1+4 with a solution of HNO₃ 1% v/v and Triton® X-100 0,1% v/v while the samples of blood were diluted 1+9 with a solution of HNO₃ 0,2% v/v and Triton® X-100 0,2% v/v. The optimization of the analysis parameters was accomplished through multivariate approach optimization, consisted of an experiment for variables selection (complete or fractional factorial design) followed by a methodology of surface answer (Central Composite Design (CCD) or Doehlert design). For all methods the best pyrolysis and atomization temperatures and the use of chemical modifiers, mainly permanent modifiers, were appraised. The matrix effect was evaluated in each method through the statistical tests *F* and *t* of Student, and, in some cases, the aqueous calibration became viable. The sensibility was analyzed through the characteristic masses and LODs. Studies of accuracy were made through recoveries of the metals in artificially polluted samples and, in the case of the lead in blood, certified materials were also used. The precision was determined in essays made in a same day (precision intra-essay) and in different days (precision inter-essais). Human serum and blood readings of voluntary individuals were also accomplished.

Lista de ilustrações

Figura 1 – Gráfico de Pareto. -----	30
Figura 2 – Planejamentos compostos centrais. -----	32
Figura 3 – Vista de um tubo com plataforma inserida no momento da deposição de uma solução sobre a plataforma. -----	48
Figura 4 – Gráfico de Pareto gerado no planejamento fatorial fracionário (2^{4-1}) para vanádio em soro humano. -----	53
Figura 5 – Superfície de resposta obtida no planejamento Doehlert para vanádio em soro humano. -----	54
Figura 6 – Estudo do efeito da matriz (seletividade) para determinação de vanádio por GF AAS (n=3).-----	56
Figura 7 – Gráfico de Pareto gerado no planejamento fatorial (2^3) para antimônio em soro humano. -----	61
Figura 8 – Superfície de resposta obtida no planejamento CCD para antimônio em soro humano. -----	64
Figura 9 – Estudo do efeito da matriz (seletividade) para determinação de antimônio por GF AAS (n=3).-----	65
Figura 10 – Gráfico de Pareto gerado no planejamento fatorial (2^3) para cromo em soro humano. -----	71
Figura 11 – Superfície de resposta obtida no planejamento CCD para cromo em soro humano. -----	73
Figura 12 – Estudo do efeito da matriz (seletividade) para determinação de cromo por GF AAS (n=3).-----	74
Figura 13 – Gráfico de Pareto gerado no planejamento fatorial fracionário (2^{4-1}) para chumbo em sangue humano. -----	80
Figura 14 – Superfície de resposta obtida no planejamento Doehlert para chumbo em sangue humano levando-se em conta a absorção de fundo.-----	82
Figura 15 – Estudo do efeito da matriz (seletividade) para determinação de chumbo em sangue humano por GF AAS (n=3). -----	84
Figura 16 – Gráfico de Pareto gerado no planejamento fatorial (2^3) para manganês em soro humano. -----	90

Figura 17 – Superfície de resposta obtida no planejamento CCD para manganês em soro humano. ----- 92

Figura 18 – Estudo do efeito da matriz (seletividade) para determinação de manganês em soro humano por GF AAS (n=3).----- 93

Lista de tabelas

Tabela 1 – Matriz de coeficientes de contraste para um planejamento fatorial 2^3 . --	27
Tabela 2 – Matriz de coeficientes de contraste para um planejamento fatorial fracionário 2^{4-1} . -----	29
Tabela 3 – Matrizes dos planejamentos compostos centrais com duas e três variáveis.-----	33
Tabela 4 – Matriz Doehlert para duas, três e quatro variáveis. -----	35
Tabela 5 – Parâmetros instrumentais e condições operacionais para o GF AAS. ---	45
Tabela 6 – Programa de temperatura de forno para tratamento da plataforma ou da parede do tubo com modificadores permanentes (500 ou 520 μg). -----	48
Tabela 7 – Matriz de experimentos do planejamento fatorial fracionário (2^{4-1}) para vanádio em soro humano. -----	52
Tabela 8 – Matriz de experimentos do planejamento Doehlert para vanádio em soro humano mantendo-se a temperatura de pirólise em 1100 °C e utilizando-se tubo com a plataforma tratada com ródio. -----	54
Tabela 9 – Programa de forno otimizado para determinação de vanádio em soro por GF AAS.-----	55
Tabela 10 – Parâmetros de mérito para o método de determinação de vanádio em soro.-----	57
Tabela 11 – Coeficientes de variação intra-ensaio e inter-ensaios obtidos na determinação de vanádio em soro por GF AAS. -----	58
Tabela 12 – Recuperações de vanádio em soro por GF AAS. -----	58
Tabela 13 – Nível de vanádio em soro de pessoas sadias obtido com o método proposto.-----	59
Tabela 14 – Matriz de experimentos do planejamento fatorial (2^3) para antimônio em soro humano. -----	61
Tabela 15 – Matriz de experimentos do planejamento CCD para antimônio em soro humano utilizando-se tubo com a plataforma tratada com zircônio. -----	63
Tabela 16 – Programa de forno otimizado para determinação de antimônio em soro por GF AAS. -----	64
Tabela 17 – Parâmetros de mérito para o método de determinação de antimônio em soro.-----	66

Tabela 18 – Coeficientes de variação intra-ensaio e inter-ensaios obtidos na determinação de antimônio em soro por GF AAS. -----	67
Tabela 19 – Recuperações de antimônio em soro por GF AAS. -----	67
Tabela 20 – Nível de antimônio no soro de voluntários obtido com o método proposto. -----	68
Tabela 21 – Matriz de experimentos do planejamento fatorial (2^3) para cromo em soro humano. -----	70
Tabela 22 – Matriz de experimentos do planejamento CCD para cromo em soro humano utilizando-se tubo com a plataforma tratada com tungstênio. -----	72
Tabela 23 – Programa de forno otimizado para determinação de cromo em soro por GF AAS. -----	73
Tabela 24 – Parâmetros de mérito para o método de determinação de cromo em soro. -----	75
Tabela 25 – Coeficientes de variação intra-ensaio e inter-ensaios obtidos na determinação de cromo em soro por GF AAS. -----	76
Tabela 26 – Recuperações de cromo em soro por GF AAS. -----	76
Tabela 27 – Nível de cromo no soro de voluntários obtido com o método proposto. -----	77
Tabela 28 – Matriz de experimentos do planejamento fatorial fracionário (2^{4-1}) para chumbo em sangue humano. -----	80
Tabela 29 – Matriz de experimentos do planejamento Doehlert para chumbo em sangue humano mantendo o tempo de pirólise em 50 segundos e utilizando-se tubo com a plataforma tratada com tungstênio. -----	82
Tabela 30 – Programa de forno otimizado para determinação de chumbo em sangue por GF AAS. -----	83
Tabela 31 – Parâmetros de mérito para o método de determinação de chumbo em sangue. -----	85
Tabela 32 – Coeficientes de variação intra-ensaio e inter-ensaios obtidos na determinação de chumbo em sangue por GF AAS. -----	86
Tabela 33 – Recuperações de chumbo em sangue por GF AAS. -----	86
Tabela 34 – Leitura das amostras de referência para estudo da exatidão do método desenvolvido. -----	86
Tabela 35 – Concentração de chumbo em dez amostras de sangue humano analisadas pelo método proposto ($n=2$). -----	87

Tabela 36 – Matriz de experimentos do planejamento fatorial (2^3) para manganês em soro humano. -----	89
Tabela 37 – Matriz de experimentos do planejamento CCD para manganês em soro utilizando-se tubo com a parede tratada com tungstênio. -----	91
Tabela 38 – Programa de forno otimizado para determinação de manganês em soro por GF AAS. -----	92
Tabela 39 – Parâmetros de mérito para o método de determinação de manganês em sangue. -----	94
Tabela 40 – Coeficientes de variação intra-ensaio e inter-ensaios obtidos na determinação de manganês em soro por GF AAS. -----	95
Tabela 41 – Recuperações de manganês em soro por GF AAS. -----	95
Tabela 42 – Nível de manganês no soro de voluntários obtido com o método proposto. -----	96

Lista de abreviaturas e siglas

ASV – Voltametria de redissolução anódica

CCD – Planejamento composto central

GC – Cromatografia gasosa

HPLC – Cromatografia líquida de alta eficiência

EDL – Lâmpada de descarga sem eletrodos

FAAS – Espectrometria de absorção atômica com chama

FI-HG AAS – Espectrometria de absorção atômica com geração de hidretos e injeção em fluxo

GF AAS – Espectrometria de absorção atômica com atomização eletrotérmica em forno de grafite

ICP-MS – Espectrometria de massas com plasma induzido

ICP OES – Espectrometria de emissão óptica com plasma induzido

LOD – Limite de detecção

LOQ – Limite de quantificação

MRC – Material de referência certificado

UV/Vis – Ultravioleta/visível

Sumário

1.	<i>Introdução</i>	1
2.	<i>Os metais</i>	2
2.1.	Vanádio	2
2.2.	Antimônio	6
2.3.	Cromo	9
2.4.	Chumbo	11
2.5.	Manganês	14
3.	<i>As matrizes</i>	17
3.1.	Sangue humano	17
3.2.	Soro humano	18
4.	<i>Espectrometria de absorção atômica em forno de grafite</i>	19
4.1.	Modificadores químicos	20
4.2.	Modificadores permanentes	22
5.	<i>Quimiometria</i>	25
5.1.	Experimentos para triagem	26
5.1.1.	Planejamentos fatoriais completos	26
5.1.2.	Planejamentos fatoriais fracionários	28
5.1.3.	Gráfico de Pareto	29
5.2.	Metodologia de superfície de resposta	30
5.2.1.	Planejamento composto central (CCD)	31
5.2.2.	Matriz Doehlert	34
6.	<i>Validação analítica</i>	36
6.1.	Curva de calibração e linearidade	36
6.2.	Seletividade – Interferência de matriz	37
6.3.	Limite de detecção	40
6.4.	Limite de quantificação	40
6.5.	Precisão	41
6.6.	Exatidão	42
6.6.1.	Materiais de referência certificados (MRC)	42
6.6.2.	Recuperação	43
6.7.	Sensibilidade (massa característica)	43
7.	<i>Materiais e métodos</i>	44
7.1.	Material	44
7.1.1.	Equipamentos e acessórios	44
7.1.2.	Reagentes e vidraria	46
7.1.3.	Materiais de referência	47
7.2.	Obtenção dos modificadores permanentes no tubo de grafite ou plataforma	47
7.3.	Amostras e procedimentos de preparo de amostras	48

7.4.	Otimização das condições analíticas	49
8.	<i>Resultados e discussão</i>	51
8.1.	Determinação de vanádio em soro humano por GF AAS	51
8.1.1.	Otimização das condições analíticas	51
8.1.2.	Validação do método	55
8.1.3.	Determinação dos níveis de vanádio em amostras de soro por GF AAS	58
8.1.4.	Conclusões para vanádio em soro	59
8.2.	Determinação de antimônio em soro humano por GF AAS	60
8.2.1.	Otimização das condições analíticas	60
8.2.2.	Validação do método	65
8.2.3.	Determinação dos níveis de antimônio em amostras de soro por GF AAS	67
8.2.4.	Conclusões para antimônio em soro	68
8.3.	Determinação de cromo em soro humano por GF AAS	69
8.3.1.	Otimização das condições analíticas	69
8.3.2.	Validação do método	74
8.3.3.	Determinação dos níveis de cromo em amostras de soro por GF AAS	76
8.3.4.	Conclusões para cromo em soro	78
8.4.	Determinação de chumbo em sangue humano por GF AAS	78
8.4.1.	Otimização das condições analíticas	78
8.4.2.	Validação do método	83
8.4.3.	Determinação dos níveis de chumbo em amostras de sangue humano por GF AAS	87
8.4.4.	Conclusões para chumbo em sangue	87
8.5.	Determinação de manganês em soro humano por GF AAS	88
8.5.1.	Otimização das condições analíticas	88
8.5.2.	Validação do método	93
8.5.3.	Determinação dos níveis de manganês em amostras de soro por GF AAS	95
8.5.4.	Conclusões para manganês em soro	96
9.	<i>Conclusões finais</i>	97
10.	<i>Referências Bibliográficas</i>	99

1. Introdução

A determinação dos níveis de elementos potencialmente tóxicos, como por exemplo, Pb, As, Sb, V, Mn, Cd e Cr em matrizes biológicas como sangue, soro, cabelo e urina tem como finalidade prevenir, avaliar e acompanhar a intoxicação por estes elementos no ser humano. Os elementos determinados em materiais biológicos podem ser classificados como essenciais, não essenciais e tóxicos. Alterações nas concentrações desses elementos em fluidos e tecidos biológicos podem resultar em uma variedade de condições patológicas, e a determinação desses metais pode fornecer informações para diagnósticos e tratamentos de uma grande variedade de desordens metabólicas hereditárias ou adquiridas. Por isso, é de extrema importância o monitoramento da exposição de grupos populacionais a poluentes ambientais e industriais de um modo mais efetivo e constante.

Dados da literatura apontam para uma série de técnicas capazes de determinar metais em concentrações normalmente consideradas baixas, onde valores da ordem do $\mu\text{g L}^{-1}$ podem ser associados a patologias e enfermidades tanto em exposições ocupacionais como na acumulação desses metais nos tecidos ao longo dos anos. Assim, técnicas como a espectrometria de absorção atômica, com atomização em forno de grafite e na chama (GF AAS e FAAS, respectivamente), técnicas de espectrometria de massas ou de emissão óptica com fontes de plasma indutivamente acoplado (ICP-MS e ICP OES, respectivamente), além de, em menor escala, técnicas voltamétricas (ASV), têm sido empregadas para tal fim. Não obstante, uma das características que apontam a técnica de GF AAS como uma ferramenta eficaz para tal tipo de determinações é a possibilidade de, no interior de um forno de grafite, durante a etapa de calcinação da amostra, eliminar-se a matriz

diretamente no próprio equipamento de medida, sem a necessidade de prévia digestão da amostra, o que em muitos casos é a etapa determinante da análise, além de possibilitar, ou a perda do analito (principalmente para elementos voláteis e quando se utiliza temperatura elevada), ou o que é mais comum, a contaminação das amostras através dos reagentes (geralmente misturas de ácidos) e da vidraria empregados e do próprio manuseio desta pelo analista.

Neste trabalho, métodos quimiométricos (planejamentos fatoriais aliados à metodologias de superfície de resposta) foram empregados na otimização multivariada para determinação direta (sem necessidade de digestão prévia das amostras) de vanádio, antimônio, cobre e manganês em soro humano e de chumbo em sangue humano integral, segundo a técnica de GF AAS.

2. Os metais

2.1. Vanádio

Vanádio elementar não ocorre na natureza, porém, compostos de vanádio existem em mais de 50 tipos diferentes de minerais e em associação com combustíveis fósseis. Vanádio é naturalmente liberado no ar através da formação de poeira continental, aerossol marinho e emissão vulcânica. A fonte antropogênica mais importante é a queima de combustível fóssil. A liberação natural de vanádio para a água e solo ocorre primariamente como resultado de lixiviação de rochas e erosão do solo. Este processo geralmente envolve a conversão da forma trivalente menos solúvel para a forma pentavalente mais solúvel. No ambiente, vanádio é combinado normalmente com oxigênio, sódio, enxofre ou cloreto. Tem seis estados de oxidação (-1, 0, +2, +3, +4 e +5) sendo +3, +4 e +5 os mais comuns. Os

compostos de importância toxicológica são pentóxido de vanádio (V_2O_5), metavanadato de sódio ($NaVO_3$), ortovanadato de sódio (Na_3VO_4), sulfato de vanádio ($VOSO_4$) e vanadato de amônio (NH_4VO_3) (ATSDR, 1992a).

Os fabricantes de automóveis e maquinarias reconheceram a resistência e dureza à fadiga de ligas de vanádio, desde os princípios do século XX. O uso metalúrgico, principalmente como liga para ferro e aço, respondeu por aproximadamente 90% do vanádio doméstico consumido em 2006. O uso não metalúrgico principal foi em catalisadores para produção de anidrido maleico e ácido sulfúrico (USGS, 2007a).

Se uma pessoa respirar uma grande quantidade de pó de vanádio, terá irritação pulmonar que irá causar tosse, dor de garganta, além de irritação dos olhos. Pessoas que respiraram $0,1 \text{ mg m}^{-3}$ de vanádio por 8 horas seguidas tossiram durante aproximadamente 1 semana e tiveram irritação nos olhos (ATSDR, 1992a).

Sabe-se que o vanádio é necessário ao desenvolvimento e crescimento normais de algumas espécies (BODEN et al., 1996), tendo em vista que sua deficiência produz retardos no crescimento, deformidades ósseas e infertilidade em alguns animais, contudo suas funções ainda não estão bem definidas. Numerosos estudos foram feitos para tentar relacionar níveis de vanádio com atividade cerebral humana, crescimento e reprodução, mas uma das dificuldades principais de tal estudo é que o organismo parece ajustar seu metabolismo à presença ou ausência de vanádio com respeito à sua entrada na alimentação (HALL; RUMAC, 1997).

A popularidade recente embasa-se em seu suposto efeito similar a insulina, atuando na hipertrofia de diversos tecidos, mais notoriamente no acúmulo de carboidratos dentro dos músculos. Acredita-se que a forma intracelular metabolicamente ativa do mineral seja o $VOSO_4$. A maior parte dos estudos com o

VOSO₄ tem sido feita em casos de diabetes tipo 2, devido à suposição que ele restaure a sensibilidade normal à insulina (CUNNINGHAM, 1998; VERMA et al., 1998). Cusi et al, (2001) avaliaram os efeitos da suplementação de sulfato de vanádio em diabéticos tipo 2 durante 6 semanas, aonde os sujeitos chegaram a receber doses diárias de 150 mg. A suplementação promoveu melhoras no metabolismo de glicose sem, no entanto, alterar os níveis de insulina, comprovando seu efeito na sensibilidade ao hormônio. Entretanto o estudo traz um dado interessante ao sugerir que o fígado, e não o músculo, seja o principal local de ação do suplemento. Pesquisadores do Centro de Pesquisa de Diabetes da Faculdade de Medicina Albert Einstein, em Nova Iorque, conduziram um estudo usando 100 mg de sulfato de vanádio em modelos animais de diabetes insulino-dependentes, porém os resultados não mostraram melhoras no metabolismo de glicose (AHARON; MEVORACH; SHAMOON, 1998). Jentjens e Jeukendrup (2002) realizam três testes de tolerância à glicose em indivíduos ativos saudáveis. O primeiro teste foi feito em estado basal (antes do experimento), o segundo ocorreu após a ingestão de 100 mg de VOSO₄. Nos seis dias seguintes os participantes mantiveram uma ingestão de 50 mg duas vezes ao dia, realizando o terceiro teste no sétimo dia. De acordo com os resultados, não houve diferença entre nenhum dos testes, mostrando que o sulfato de vanádio não traz efeitos na sensibilidade à insulina em indivíduos saudáveis.

Alguns fornecedores de sulfato de vanádio para suplementação nutricional sugerem que atletas ingiram até 30 mg/dia do composto (ULTIMATE NUTRITION, 2007), enquanto outros sugerem que uma ingestão de 10 mg/dia de vanádio produz toxicidade patente em humanos (SERRANA, 2007). Até mesmo quantias como 1 µg g⁻¹ de vanádio (valor 10 a 100 vezes a quantia normalmente presente na dieta) têm sido apontado como tendo efeitos farmacológicos em humanos (SERRANA, 2007).

Um estudo foi conduzido por Fawcett et al. (1996), no qual foi analisado os efeitos do sulfato de vanádio na antropometria, composição corporal e performance de pessoas envolvidas com o treinamento de força, quantificando a performance através dos testes de 1 a 10 repetições máximas no supino e mesa extensora. Os resultados não mostraram nenhuma vantagem do uso de VOSO_4 , no entanto, ocorreram algumas desistências devido aos efeitos colaterais.

O vanádio existe em quantidades baixíssimas em nosso corpo (aproximadamente 0,1 mg) e a ingestão deste mineral em uma dieta normal fica em torno de 50 µg, desta forma a suplementação normalmente usada excede em milhares de vezes a ingestão habitual. Isto, aliado ao fato da essencialidade e segurança do vanádio ainda não terem sido comprovados, faz Verma et al. (1998) afirmarem que os efeitos biológicos do vanádio são farmacológicos e o vanádio deveria ser considerado uma droga ao invés de suplemento.

Dentre os efeitos colaterais relatados estão: hipoglicemia e distúrbios gastrintestinais (náuseas, diarreias, cólicas abdominais) (CUSI et al., 2001; VERMA et al., 1998). Quedas na hemoglobina e hematócrito também foram verificadas, isto provavelmente deve-se ao vanádio competir com o ferro pela entrada nas células vermelhas, atrapalhando a construção de hemoglobina (HALBERSTAM et al., 1996). Há estudos relacionando as concentrações de vanádio a distúrbios maníaco-depressivos e tumores cancerígenos, porém estas relações precisam ser melhores estudadas (NAYLOR, 1984; CHAKRABORTY et al., 1995). Não podemos esquecer que a insulina também atua no tecido adiposo, aumentando o acúmulo de gordura e este efeito também é inerente ao Sulfato de Vanádio (LI et al., 1997).

Foi determinado altas concentrações de vanádio no sangue de pacientes que receberam soluções de albumina via intravenosa. O estudo foi feito com cinco

voluntários saudáveis que receberam 90 mL de uma solução com 20% de albumina comercial contendo $47,6 \mu\text{g g}^{-1}$ de vanádio como impureza (HEINEMANN; FICHTL; VOGT, 2003).

2.2. Antimônio

Antimônio em sua forma elementar é um sólido cristalino frágil branco prateado, que apresenta propriedades pobres na condução de eletricidade e calor. Estima-se que a abundância de antimônio na crosta terrestre é da ordem de 0,2 a $0,5 \mu\text{g kg}^{-1}$. Fixa-se ao solo e sedimento e, geralmente, está associado ao enxofre ou a metais pesados como chumbo, cobre e prata. São conhecidos mais de cem minerais de antimônio na natureza. Estibinita (Sb_2S_3) é o mineral de antimônio mais predominante.

O sulfeto de antimônio já era conhecido e usado na medicina e como cosmético à dois mil anos. Atualmente, o uso mais importante do antimônio é na fabricação de baterias de chumbo. O metal também possui aplicações em soldas e outras ligas. O trióxido de antimônio é a espécie de maior importância comercial, principalmente em formulações para o retardo da chama. As aplicações para o retardo da chama incluem roupas infantis, brinquedos, aeronaves e cobertura de assento de veículos. As principais utilizações de antimônio pela indústria no ano de 2006 foram: anti-chama 40%, transporte (incluindo baterias) 22%, substâncias químicas 14%, cerâmica e copos 11% e outros 13% (USGS, 2007b).

Antimônio entra no ambiente durante a mineração e processamento de seus minérios e na produção do metal, de ligas, do óxido de antimônio e da combinação de antimônio com outras substâncias. Quantidades pequenas de antimônio são

também liberadas no ambiente por incineradores. Normalmente leva muitos dias para o antimônio ser removido da atmosfera (ATSDR, 1992b).

O antimônio ingerido pela via oral é absorvido em poucas horas, contudo menos de 10% da quantidade de antimônio entra no sangue. A espécie química, tamanho da partícula e solubilidade do antimônio, assim como idade e dieta do indivíduo influenciam na quantidade de Sb que será absorvida. Assim que atinge a corrente sanguínea o antimônio acumula primeiro no fígado para então ser distribuído por todo o corpo, atingindo principalmente os pulmões, intestinos e baço (ATSDR, 1992b). Ele é lentamente excretado pelos rins e o aumento da produção urinária, sintoma de envenenamento por antimônio, não ajuda.(Emsley, 2005).

O nível normal de Sb em fluidos corpóreos humanos é estimado em partes por trilhão. Alguns órgãos podem apresentar quantidades maiores, como o cérebro com 0,1 ppm, o cabelo com 0,7 ppm, fígado e rins com 0,2 ppm. Análise da urina de pacientes submetidos a tratamentos com drogas contendo antimônio injetadas por vários dias para tratar infecções parasitárias, com quantidades que chegavam a 500 mg de Sb, encontrou valores altos de Sb na urina mesmo decorrido certo tempo após o fim do tratamento: 1 ppm depois de seis meses e 0,25 ppm após um ano (Emsley, 2005).

A ingestão diária média é cerca de 0,5 mg e a quantidade média de antimônio em uma pessoa é 2 mg, este por sua vez está associado a átomos de enxofre presente em proteínas. Se esses átomos de enxofre não estiverem localizados em sítios ativos das enzimas, o antimônio não irá interferir no metabolismo (Emsley, 2005).

O uso de antimônio como agente terapêutico sempre foi muito controverso desde seu emprego inicial no século XV, tendo sido praticamente abolido no século

XIX em função de sua toxicidade. Já era considerado droga suprimida do arsenal terapêutico quando, em 1912, começou a ser utilizado em pacientes portadores de leishmaniose. Os efeitos adversos mais comuns desses tratamentos a base de drogas contendo Sb são: mialgia, artralgia, astenia, náusea, síndrome febril, anemia, leucopenia, insuficiência renal, hepatotoxicidade, cardiotoxicidade, trombocitopenia e pancreatite. Todos parecem ser dose e tempo dependentes (MATTOS et al., 2000). A cardiotoxicidade, relacionada a altas doses e a duração do tratamento, tem sido apontada por alguns autores como efeito colateral mais freqüente (RIBEIRO et al., 1999). Existem ainda relatos de casos de morte relacionados à toxicidade dos antimoniais pentavalentes sobre a fibra cardíaca (KOPKE et al., 1991; LIMA et al., 2007).

Muitos assassinos já fizeram o uso de sais de antimônio para envenenar suas vítimas. Sais de antimônio podem rapidamente causar vômitos violentos, eliminando do corpo a maioria das toxinas antes que sejam absorvidas. Doses pequenas o suficiente para serem retidas pelo organismo podem ser fatais. Alternativamente, é possível matar uma pessoa dando a ela sucessivas pequenas doses. Assassinos desse tipo de envenenamento são pessoas muito próximas às suas vítimas e fingem estar cuidando delas enquanto administram pequenas doses de veneno em sua comida, bebida ou medicamentos, assistindo suas vítimas agonizarem em uma morte prolongada e dolorosa. O composto de Sb mais usado em envenenamentos é o tártaro emético (tartarato duplo de antimônio e potássio). Em pequenas doses (cerca de 5 mg) tártaro emético atua como diaforético e em doses maiores (cerca de 50 mg) atua como emético. Uma dose de 500-1000 mg certamente colocará a vida de pessoa em risco se o vômito atrasar por um certo espaço de tempo. No organismo, Sb pode bloquear enzimas que são necessárias

para o funcionamento do fígado, rins e músculo do coração. A vítima de várias pequenas doses começa a perder peso causado por perda de apetite e pela dificuldade para reter comida. A morte eventualmente resulta de um colapso geral (Emsley, 2005).

2.3. Cromo

O cromo ou crômio é um dos metais mais utilizados em atividades humanas. É utilizado na fabricação de ligas (que apresentam alta resistência à corrosão e alta dureza), tintas, fitas magnéticas e eletrodos. É também utilizado em curtumes. Outras fontes antropogênicas são a fabricação de cimento, a construção civil, a soldagem, as lâmpadas e o lixo urbano. Como fontes naturais destacam-se as emissões vulcânicas e os incêndios florestais. O metal está presente na natureza principalmente como $\text{Fe}(\text{CrO}_2)_2$, no mineral cromita. O cromo está presente em plantas, mas não há indícios de que seja essencial para os vegetais. Os alimentos que apresentam maiores concentrações de cromo são os pães e frutos do mar. O metal apresenta-se como Cr (III) (geralmente associado a fontes naturais) e Cr (VI) (geralmente associado a fontes antropogênicas) (MOREIRA; BOAVENTURA, 2003). A forma hexavalente apresenta maior toxicidade do que a forma trivalente (FERREIRA, 2002). Alguns autores explicam este fenômeno pela maior facilidade do Cr (VI) em atravessar a membrana celular por formar complexos tetraédricos de estrutura semelhante aos sulfatos (MOREIRA; BOAVENTURA, 2003).

Em humanos e animais Cr (III) é um nutriente essencial que participa do metabolismo de glicose, gordura e proteína, potencializando a ação da insulina (ANDERSON, 1981). Há suspeitas de que sua deficiência possa causar problemas

para o coração (FERREIRA, 2002). Uma ingestão diária de 50-200 µg de Cr (III) é recomendada para adultos (ATSDR, 2000). Exposições excessivas ao cromo podem causar danos que vão desde problemas nos rins a dermatites, passando por úlceras e câncer. Suspeita-se da sua ligação com disfunções cardíacas e outros problemas (MOREIRA; BOAVENTURA, 2003; FERREIRA, 2002). Não é um elemento cumulativo no organismo humano, e tem uma meia vida biológica de 15 a 41 horas.

O cromo encontra-se no ar como material particulado ($< 20 \mu\text{m}$) com tempo de residência de 10 dias. Sua concentração na atmosfera é da ordem de $\sim 0,1 \mu\text{g m}^{-3}$. Em águas a concentração pode chegar a $1 \mu\text{g L}^{-1}$ e em solos os valores variam entre $2 - 60 \text{ mg Kg}^{-1}$ (MOREIRA; BOAVENTURA, 2003).

A maior quantidade de cromo liberada na água deposita-se nos sedimentos. Uma pequena porcentagem pode estar presente na água nas formas solúvel e insolúvel. Nas formas solúveis encontram-se Cr (VI) e complexos de Cr (III). Em fase aquosa, o cromo (III) ocorre como partícula sólida adsorvida a materiais argilosos, orgânicos ou a óxido de ferro. A espécie cromo (VI) predomina em condições oxidantes elevadas; o inverso ocorre para cromo (III). Condições oxidantes são encontradas em águas mais superficiais, enquanto as condições redutoras são observadas em águas mais profundas. Na água do mar a espécie predominante é o Cr (VI), geralmente estável. A oxidação do Cr (III) a Cr (VI) não ocorre devido ao oxigênio, mas pode ser promovida durante a cloração da água com pH em torno de 6,0. Mesmo essa ação é inibida, pois o Cr (III) fica protegido na forma de complexos orgânicos (SILVA; PEDROZO, 2001).

2.4. Chumbo

O chumbo é um metal cinza azulado, e o mais maleável dos metais pesados. O chumbo é encontrado na natureza em diferentes minerais, entre eles destaca-se a galena, PbS. Os compostos do chumbo bivalente são os mais freqüentemente encontrados na natureza (WHO; IPCS, 1995).

Dentre os metais pesados, o chumbo é um dos mais empregados na indústria, muito utilizado na fabricação de baterias, pigmentos, extrusão a rolo, cabos e munições (ILZSG, 2007).

Os relatos sobre a intoxicação por chumbo vêm da Grécia antiga, onde era utilizado na confecção de taças, dos aquedutos e de utensílios domésticos. Também era costume a adição de óxidos de chumbo para a correção da acidez do vinho. Hipócrates em 370 A.C. foi quem primeiro descreveu sobre as cólicas saturninas sofridas pelos mineradores (OGA, 1996). Segundo Timbrell (1995), o chumbo teria contribuído para o declínio do Império Romano, uma vez que altos teores deste metal foram encontrados nos esqueletos humanos referentes a este período.

O nível de contaminação dos alimentos produzidos próximos às regiões industrializadas é afetado pelas características das indústrias existentes. Os organismos que vivem em ambiente aquático captam e acumulam o chumbo existente na água e nos sedimentos. A carga do contaminante existente nos vegetais é gerada pela captação do metal pelas raízes e pela deposição no vegetal de matéria finamente particulada. O chumbo pode também ser incorporado aos alimentos durante os processos de industrialização, ou no preparo doméstico, especialmente quando são utilizados utensílios de cerâmica, chumbo-cristal ou metálicos (OGA, 1996).

Na introdução pela via oral, a absorção é pequena e ocorre no nível da mucosa intestinal (intestino delgado), variando com a idade, dieta e tipo de composto ingerido. No adulto, a absorção por esta via varia de 5 a 10% da quantidade de chumbo ingerida, enquanto que na criança esta porcentagem pode alcançar até 50% da mesma. O mecanismo de absorção do chumbo nesta região, não está totalmente esclarecido, mas acredita-se que ocorra por transporte ativo, regulado pelos mesmos mecanismos que regulam a absorção de íons, tais como cálcio, ferro, magnésio e fósforo. Apesar dos carregadores apresentarem maior afinidade de ligação com o chumbo, uma dieta rica em cálcio irá sempre diminuir a absorção plúmbica, ou seja, a interação entre o chumbo e o cálcio é antagônica no nível da absorção intestinal (WHO, 1995; TIMBRELL, 1995).

Pode-se observar, portanto, que a dieta individual representa um fator importante na absorção do chumbo pelo TGI (trato gastrointestinal). Além do cálcio e ferro, outros componentes da alimentação podem alterar a porcentagem de absorção do chumbo (MANNAN et al., 1992; CEZARD; MAGUENOER, 1992).

O chumbo absorvido é distribuído entre o plasma e os eritrócitos, sendo que menos de 5% do metal permanece no plasma e a maior parte está ligado à hemoglobina (PAOLIELLO; CHASIN, 2001). A meia-vida do chumbo no sangue e tecidos moles está na faixa de 36-40 dias para adultos. Os ossos contêm cerca de 90% do conteúdo total de chumbo no organismo, onde a meia-vida é aproximadamente de 2 a 10 anos. O chumbo transpõe rapidamente a barreira placentária e sua concentração no sangue do recém-nascido é semelhante à da mãe (TIMBRELL, 1995; CEZARD; MAGUENOER, 1992).

A principal ação tóxica dos compostos inorgânicos de chumbo ocorre na medula óssea onde interferem com a síntese do heme, fração não protéica da

hemoglobina e de outras hemoproteínas como o citocromo P450, e a mioglobina. Nessa síntese, o chumbo inibe duas enzimas: o ácido delta amino-levulínico desidratase (δ ALA-D) e a heme sintetase. Existem evidências da inibição da coproporfirina descarboxilase (COPRO-D) e do ácido delta-aminolevulínico sintetase (δ ALA-S) (WHO, 1995).

No sistema nervoso central o chumbo, em elevadas concentrações, pode provocar as chamadas síndromes cerebrais orgânicas (SCO), que se iniciam lentamente com irritabilidade difusa, dificuldade em novos aprendizados, dificuldade de encarar situações novas. No sistema nervoso periférico, o chumbo produz desmielinização e degeneração dos axônios. A velocidade de condução nervosa é afetada por níveis de chumbo no sangue acima de $50 \mu\text{g L}^{-1}$, em exposições crônicas longas. Os músculos mais ativos são atingidos primeiro, mas geralmente, não há comprometimento da sensibilidade tátil. O mecanismo proposto para esta ação neurotóxica periférica é a destruição da bainha de mielina dos neurônios (TIMBRELL, 1995).

A ação nefrotóxica pode ocorrer em exposições agudas e crônicas. A exposição crônica, no entanto, pode levar a dois tipos de lesão que se associam à insuficiência renal crônica e até à falência renal ao longo do tempo. A lesão tubular proximal, mantida devido à exposição crônica a altas doses, leva à nefrite túbulo intersticial irreversível que se associa com a esclerose glomerular, esta, em geral, associada à hipertensão arterial (MANNAN et al., 1992). Esses tipos de lesão ocorrem após longos períodos de exposição ocupacional a altas doses (25 a 30 anos). Efeito secundário à lesão tubular crônica é a hiperuricemia por diminuição na excreção de ácido úrico, o que leva a quadro clínico de gota, chamada, então, de

satúrnica, acometendo cerca de 50% dos casos de nefropatia por chumbo (GOYER, 1996).

Os níveis de chumbo no sangue integral são amplamente utilizados como medidas de dose interna, ou dose absorvida. Uma concentração de chumbo no sangue menor que $100 \mu\text{g L}^{-1}$ é recomendada pela OMS (Organização Mundial de Saúde), CDC (Center for Disease Control) e ACGIH (American Conference of Governmental Industrial Hygienists). A ACGIH recomenda este limite também para mulheres grávidas (FAO/OMS, 1994).

2.5. Manganês

O manganês é um sólido frágil, quebradiço, ou pode apresentar-se como pó-branco-acinzentado. É um elemento amplamente distribuído na crosta terrestre, água e atmosfera, na forma particulada. Não há indícios de manganês na forma elementar livre, na natureza. Seus minerais mais abundantes são a pirolusita (MnO_2), manganita ($\text{Mn}_2\text{O}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$) e hausmanita (Mn_3O_4). Existem outros minerais de manganês onde o metal se encontra associado a sulfetos, carbonatos e silicatos. Também se encontra presente em minérios de outros elementos, como o de ferro, onde sua concentração varia de 50 a 350 g Kg^{-1} . O manganês é o principal componente metálico nos nódulos, que são pontos ou cavidades nos quais há uma concentração de minerais, depositados nos oceanos. Também é um elemento abundante nas rochas ígneas, sedimentares e metamórficas (MENA; WALDRON, 1980).

O manganês possui muitas aplicações, onde se destaca a fabricação de ligas de ferro-manganês, a produção de aço, de baterias, de palitos de fósforo, de

porcelanas e de materiais vítreos. O cloreto de manganês é usado como precursor para outros compostos de manganês, como um catalisador na cloração de compostos orgânicos, como suprimento para animais e na fabricação de baterias. O sulfato de manganês é utilizado como fertilizante (60% do consumo total) e como suplemento (30% do consumo total), sendo também usado na fabricação de cerâmicas e fungicidas, entre outros. O permanganato de potássio é um pó oxidante utilizado com desinfetante, agente antialgas, agente de limpeza de metais e conservante de folhas e frutas frescas (ATSDR, 2000b).

No ar, o manganês emitido, geralmente, está associado a formas particuladas com diâmetro menor que 5 μm . O metal ocorre em quase todos os tipos de solo em sua forma divalente ou tetravalente. A concentração estimada varia de 40 a 900 $\mu\text{g kg}^{-1}$. A erosão dos solos é uma das mais importantes fontes de manganês, sendo o material lixiviado e associado a partículas suspensas em água. Estas partículas são fortemente adsorvidas por sedimentos. Também nas águas o manganês pode ser oxidado e precipitado pela ação bacteriana em pH entre 4 e 7. Na água predomina a forma divalente. Em oceanos sua concentração é de 0,4 a 10 $\mu\text{g L}^{-1}$. Estudos da CETESB – Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental, ligada à Secretaria do Meio Ambiente do governo de São Paulo, normalmente, encontram valores de manganês em águas potáveis da ordem de 0,2 mg L^{-1} . Raramente encontram-se teores maiores que 1 mg L^{-1} . Quando encontrado em concentrações maiores que esta, pode causar alterações no sabor, tingimento de instalações sanitárias, manchas em roupas lavadas, dentre outros problemas (MARTINS; LIMA, 2001).

Em humanos e animais, manganês é um nutriente essencial e desempenha função na mineralização dos ossos, metabolismo de proteínas, regulação metabólica, proteção celular de espécies de radicais livres, e síntese de

glicominoglicanos (WEDLER; KLIMIS-TAVANTIZIS, 1994). Manganês pode tanto ser um componente de metaloenzimas como também um ativador enzimático. Dentre as enzimas que contém manganês podemos citar: arginase, piruvato carboxilase, e manganês-superoxido dismutase (MnSOD) (KEEN; ZIDENBERG-CHE, 1990; NRC, 1989; WEDLER; KLIMIS-TAVANTIZIS, 1994). Manganês tem mostrado ser capaz de ativar numerosas enzimas com função catalítica ou reguladora, como por exemplo, transferase, decarboxilase, hidrolase (WEDLER; KLIMIS-TAVANTIZIS, 1994). Estudos sobre a distribuição do manganês no organismo mostram que os locais que apresentam as maiores concentrações do metal são os de maior atividade metabólica, como o fígado e o pâncreas, e os relacionados à eliminação, como os rins e o intestino delgado e grosso. Em contraste, os tecidos de baixa atividade metabólica como músculos esqueléticos, pele, bexiga, testículos, útero, ossos e tireóide, apresentam menores concentrações. Essa distribuição, provavelmente, se correlaciona com a quantidade de mitocôndrias do órgão ou tecido, organela onde o manganês se acumula. Os tecidos pigmentados, como o cabelo e a pele, se são escuros, tendem a acumular o manganês (WHO, 1981).

A concentração sanguínea média de manganês, em adultos normais, é de $9 \mu\text{g L}^{-1}$, com um intervalo de 4 a $15 \mu\text{g L}^{-1}$. Na urina os níveis de Mn são inferiores a $10 \mu\text{g L}^{-1}$, e similar ao sangue esta amostra reflete exposição recente ao metal (BARCELOUX, 1999). O desaparecimento de manganês do sangue é rápido. No homem a meia-vida plasmática varia de 0,5 a 5 minutos. Considerando o organismo total, a remoção do manganês apresenta meia vida biológica de 37 dias, sendo os ossos e o cérebro os locais de eliminação mais lenta (SIQUEIRA, 1984).

Já é conhecido que exposições crônicas a níveis elevados de manganês causam danos neurológicos permanentes, como já visto em trabalhadores em minas

de manganês. Também foi constatado, em exposições crônicas a níveis bem menores, déficits na habilidade de executar movimentos rápidos com as mãos, problemas com a coordenação e com o equilíbrio, acompanhado de outros sintomas como esquecimento, ansiedade ou insônia (ATSDR, 2000b).

3. As matrizes

3.1. Sangue humano

O sangue executa tantas funções que, sem ele, de nada valeria a complexa organização do corpo humano.

O sistema endócrino precisa do sangue para liberar, transportar e distribuir seus hormônios por todo o organismo. É através da circulação sanguínea que inúmeras células do organismo, em todos os tecidos, recebem sua alimentação, representada por componentes de proteínas, açúcar, gordura, água e sais minerais. Também é o sangue que, ao retornar dos tecidos, conduz o gás carbônico e os resíduos das células do corpo, eliminando-as através da respiração, do suor, da urina e das fezes.

O sangue mantém constantes as condições internas do corpo (homeostasia) como temperatura, hidratação, pH, etc. Os médicos se servem da circulação para controlar artificialmente várias alterações orgânicas, seja retirando ou administrando drogas numa tentativa de corrigir e equilibrar o meio orgânico (HEMONLINE, 2008).

Os elementos celulares que constituem o sangue têm forma, tamanho e funções distintas. Os glóbulos vermelhos, também chamados de hemácias ou eritrócitos, são as células que existem em maior quantidade no sangue e são responsáveis pela coloração avermelhada deste. Em cada milímetro cúbico de

sangue existem cerca de 5 a 5,5 milhões de glóbulos vermelhos, no homem, e aproximadamente 4,5 milhões na mulher.

Os glóbulos brancos, ou leucócitos, distinguem-se em cinco variedades chamadas neutrófilos, eosinófilos, basófilos, linfócitos e monócitos. Os leucócitos são, ao contrário dos eritrócitos, nucleados e constituem a parede celular do sistema imunológico contra substâncias estranhas e microorganismos patológicos. Também participam das reações alérgicas, na produção de histamina.

Um terceiro grupo presente no sangue são as plaquetas. Sua importância é fundamental no mecanismo de hemóstase e coagulação do sangue. As plaquetas são fragmentos de megacariócitos (células especiais nativas da medula óssea) liberados na circulação. O seu número normal no sangue é de 150 mil a 450 mil por milímetro cúbico.

3.2. Soro humano

Toda a parte líquida do sangue forma o soro sanguíneo. Cerca de 90% do soro constitui-se de água pura, na qual estão dissolvidas as inúmeras substâncias existentes no sangue. Destas, cerca de $\frac{3}{4}$ são sais que contêm sódio, cloro, fósforo, magnésio, cálcio e outros. Importância fundamental cabe às proteínas, que também estão dissolvidas no soro. Em cada litro de sangue existem de 60 a 80 gramas de proteínas (HEMONLINE, 2008).

A maior parte é constituída pela albumina. Em menor proporção estão as globulinas, relacionadas com a formação de anticorpos. As proteínas controlam a viscosidade do sangue, a pressão oncótica e regulam a osmose, entre outras funções.

Dissolvidos no soro existem também alguns gases, como o oxigênio, o gás carbônico e, principalmente o nitrogênio. Uréia, ácido úrico, creatinina, glicose, gorduras e ácidos graxos também se encontram presentes no soro.

Várias dosagens bioquímicas e imunológicas podem ser realizadas no soro (obtido a partir de sangue sem anticoagulantes) ou no plasma (obtido de sangue com anticoagulantes). A única diferença analítica entre soro e plasma é que o primeiro não contém fibrinogênio (um tipo de proteína fundamental no processo de coagulação), o qual foi utilizado para a formação do coágulo (fibrina). Estas amostras podem ser refrigeradas por até 3 dias ou congeladas por vários meses até a sua análise, sem que haja prejuízo no resultado dos testes.

Para alguns metais pode haver uma relação com o nível destes, encontrado no sangue ou no soro, com o tipo de exposição. A avaliação dos níveis de chumbo no sangue, por exemplo, é recomendada para diagnosticar exposição recente, pois o tempo de meia vida do chumbo no sangue é de 30 a 40 dias. Contudo, em face da meia vida longa nos ossos (aproximadamente 27 anos), o soro sanguíneo tem uma relação direta com o conteúdo acumulado nos ossos (GULSON et al., 1997; SILBERGELD; SCHWARTZ; MAHAFFEY, 1988), indicando exposição passada (GULSON et al., 1995; SMITH; OSTERLOH; FLEGAL, 1996).

4. Espectrometria de absorção atômica em forno de grafite

Entre as técnicas disponíveis para a determinação de metais em um número variado de amostras, as mais comuns são a espectrofotometria na região do ultravioleta/visível (UV/Vis), a espectrometria de absorção atômica e de emissão óptica (AAS e OES, respectivamente), a espectrometria de massas com fonte de

plasma indutivamente acoplado (ICP-MS), entre outras. A AAS tem como principais características sua especificidade, além da possibilidade de empregar como atomizadores uma chama (FAAS) que normalmente trabalha em concentração na faixa do mg L^{-1} e o forno de grafite (GF AAS), que usualmente determina concentrações na faixa de μg ao ng L^{-1} .

No caso da GF AAS, os principais atrativos são, além de sua especificidade pela utilização de uma fonte de radiação específica para o analito, alta sensibilidade, pequeno volume necessário de amostra (usualmente da ordem de 1 a 100 μL) e possibilidade de eliminar a matriz diretamente na etapa da calcinação (pirólise). A técnica de GF AAS tem, como outra vantagem sobre as demais, o fato de permitir trabalhar com amostras líquidas, sólidas, suspensões e gases (hidretos e vapor frio de mercúrio) (WELZ, 1999).

4.1. Modificadores químicos

Para influenciar os processos que ocorrem no atomizador de modo desejável, na técnica de GF AAS, podem ser empregados reagentes denominados modificadores químicos. Esses são substâncias adicionadas com a amostra no tubo de grafite ou já presentes na superfície da parede do tubo ou da plataforma, que auxiliam na retenção do analito em elevadas temperaturas durante a etapa da pirólise, removendo concomitantes da matriz e/ou auxiliando a formação adequada da nuvem atômica do analito.

O termo modificador de matriz foi introduzido em 1974 por Ediger, Peterson e Kerber (1974 apud PINTO, 2004) (hoje denominado modificador químico) após a realização de um estudo que tinha como objetivo determinar Pb em água do mar.

Essa determinação é prejudicada pois o Pb volatiliza-se em temperaturas acima de 500 °C, e o NaCl só é eliminado em temperaturas acima de 1000 °C. A adição de NH_4NO_3 em excesso (mg L^{-1}) dá início a uma reação espontânea com o NaCl formando NaNO_3 e NH_4Cl , os quais se volatilizam abaixo de 300 °C. Mantendo a temperatura de pirólise em 400 °C, o autor conseguiu eliminar o interferente, sem perdas do analito. A partir deste estudo, centenas de outros têm sido propostos, com substâncias diversas que têm essa função de aumentar a volatilidade da matriz. Por outro lado, o modificador pode atuar também sobre o analito formando um composto com este, que diminua sua volatilidade e, deste modo, permita o uso de temperaturas altas na etapa da pirólise para eliminar interferências da matriz sem perder o analito.

Desde então, um grande número de substâncias químicas têm sido citadas na literatura nos últimos anos para atuar como modificador químico. Elementos metálicos como Cu, Ni, La, Pd e Mg, entre outros, têm sido empregados com este propósito. Uma mistura de nitrato de Pd e Mg tem sido recomendada como modificador químico universal para cerca de 21 analitos (WELZ; SCHLEMMER; MUDAKAVI, 1992).

Um bom modificador deve ter uma série de características, tais como: estabilizar o analito até pelo menos 1000 °C, ser raramente determinado (para evitar contaminação cruzada), ser o mais universal possível, não diminuir o tempo de vida do forno, não causar alta absorção de fundo, não afetar negativamente a sensibilidade, etc. Uma outra alternativa interessante é o uso de modificadores permanentes. Nesse caso, uma determinada massa de modificador é depositada sobre a superfície de grafite e aí fixada por um programa de temperatura específico (CAMPOS, 2000).

4.2. Modificadores permanentes

O termo modificador permanente foi introduzido por Shuttler, Feuerstein e Schlemmer (1992), que depositaram no interior do tubo de grafite 50 μg de Pd + 50 μg de Ir para captar hidretos de As, Bi e Se. Com este tratamento foi possível a obtenção de 300 determinações com o mesmo tubo de grafite.

Modificadores permanentes podem ser obtidos por deposição térmica do metal sobre a superfície da parede do forno ou da plataforma, através de introduções consecutivas de uma solução do reagente modificador no interior do tubo, seguidas de um programa de aquecimento específico. Outra alternativa é a eletrodeposição do elemento. A modificação da plataforma desta última forma (eletrodeposição ou *sputtering*) não é tão eficiente como ocorre com a deposição térmica. Nos processos de *sputtering* a superfície do grafite fica completamente coberta com o metal nobre não ficando sítios de carbono ativo disponíveis para promover a redução dos óxidos do analito em átomos livres. Isso inibe a formação de composto intermetálico e/ou solução sólida entre o analito e o metal nobre – modificador aumentando as perdas por volatilização do analito.

Os elementos preferidos para a aplicação como modificador permanente são aqueles do grupo da platina (Pt, Ir, Ru, Rh), além daqueles elementos formadores de carbetos (principalmente Zr e W). A escolha por esses elementos leva em conta os seus altos pontos de fusão (entre 2400 e 3300 °C) o que possibilita o uso de elevadas temperaturas de atomização e limpeza sem a perda do modificador característica do termo permanente. Entre os principais atrativos do uso de modificador permanente pode-se citar:

- não necessita ser um sal de alta pureza, porque ele será descontaminado durante a deposição, ao contrário do que ocorre com o modificador convencional que é introduzido junto com a amostra;
- curto tempo de programa de temperatura pois não há necessidade da introdução e secagem do modificador;
- menor custo de análise, uma vez que o modificador não é de elevada pureza;
- melhora o limite de detecção, uma vez que ele é limpo “in situ” durante a deposição;
- geralmente atua com maior eficiência na destruição da matriz na etapa de pirólise;
- elimina ou minimiza interferências atenuando a absorção de fundo em relação ao modificador convencional;
- pode permitir a análise de algumas matrizes complexas diretamente sem digestão;
- protege o tubo de grafite, aumentando consideravelmente sua vida útil (SILVA, 2000).

Foi observado que o uso de irídio, de ródio e de suas misturas, na forma de modificador químico permanente, mostrou ser eficiente na determinação de prata, arsênio, bismuto, cádmio e antimônio em amostras certificadas de água e de tecido de ostra, apresentando valores em concordância com os valores certificados (SILVA et al., 1998). Posteriormente o rutênio foi investigado e se mostrou uma excelente opção para atuar como modificador permanente, mesmo em meios extremamente agressivos ao tubo de grafite como é o caso da água régia, onde o tubo teve uma vida superior a 1800 determinações (SILVA et al., 1999), como também, por outro lado, em meio extremamente básico, que é o caso de amostras biológicas

submetidas a solubilização alcalina com hidróxido de tetrametilamônio (TMAH) (SILVA et al., 2000). Tungstênio como modificador permanente foi utilizado na análise de chumbo em amostras de vinagre por Oliveira S., Oliveira A. e Gomes Neto (2007) com co-injeção de $\text{Pd}(\text{NO}_3)_2 + \text{Mg}(\text{NO}_3)_2$ obtendo-se uma massa característica e um LOD de 40 pg e $0,4 \mu\text{g L}^{-1}$, respectivamente. Fariñas et al. (2007) utilizaram tubos de grafite com plataformas cobertas com alguns modificadoras permanentes (como W, Ir, Ru, W+Ir e W+Ru) que foram comparativamente estudados em relação a misturas comuns de modificadores químicos [$\text{Pd-Mg}(\text{NO}_3)_2$ e $(\text{NH}_4)_2\text{H}_2\text{PO}_4\text{-Mg}(\text{NO}_3)_2$] na determinação de Cd em destilado à base de bagaço de oliva (*orujo spirit samples*), conseguindo-se melhores resultados para W com LOD de $0,01 \mu\text{g L}^{-1}$. Não uso de modificador, irídio, rutênio, ródio e zircônio (independentemente, 500 μg) foram testados na determinação de Al, Cd, Cr e Pb em amostras de água potável apresentando melhores resultados para o uso de Rh na determinação de cádmio e cromo e, para o uso de Zr, na determinação de chumbo e alumínio (PEREIRA; AMORIM; SILVA, 2004). Flores, Pérez e Arruda (2004) demonstraram a potencialidade do uso de Zr na modificação permanente da plataforma de L'Vov, empregada em condições drásticas ($4 \text{ mol L}^{-1} \text{ HNO}_3$) na determinação de lítio, com bons resultados de precisão ($\text{RSD} < 9\%$) e exatidão após 480 ciclos de aquecimento.

Barbosa Jr. et al. (2004) determinaram cromo em urina utilizando tubo de grafite modificado por eletrodeposição de tungstênio, obtendo bons resultados e com 800 queimas de vida útil do tubo. Resultados satisfatórios foram obtidos empregando-se rutênio como modificador permanente na determinação direta de cobre e cromo em urina (MAGALHÃES et al., 2002). Para determinação exata de

selênio em urina, uma mistura de zircônio e ródio, com co-injeção de ródio, foi aplicada com sucesso (PINTO et al., 2005).

5. Quimiometria

A quimiometria pode ser definida como a aplicação de métodos matemáticos, estatísticos e de lógica formal para o tratamento de dados químicos, de forma a extrair uma maior quantidade de informações e melhores resultados analíticos (MASSART et al., 1998). Conforme o objetivo do estudo, a quimiometria pode ser dividida em algumas áreas muito aplicadas atualmente como: processamento de sinais analíticos, planejamento e otimização de experimentos, reconhecimento de padrões e classificação de dados, calibração multivariada, métodos de inteligência artificial, dentre outras.

É comum em otimizações de técnicas analíticas como GF AAS a necessidade de se estudar uma propriedade que é afetada por um grande número de fatores. Como investigar os efeitos de todos esses fatores minimizando-se o trabalho necessário e o custo dos experimentos? Usando planejamentos experimentais baseados em princípios estatísticos, os pesquisadores podem extrair do sistema em estudo o máximo de informação útil, fazendo um número mínimo de experimentos (NETO; SCARMINIO; BRUNS, 2003).

Planejamentos experimentais são usados para obter um método com características desejáveis de maneira eficiente. Isso significa entender o efeito dos fatores (experimentos para triagem) e modelar a relação entre Y e X (metodologia de superfície de resposta) (MASSART et al., 1998).

5.1. Experimentos para triagem

Um experimento para triagem é executado com o interesse em se determinar as variáveis experimentais e as interações entre variáveis que têm influência significativa sobre as diferentes respostas de interesse.

Após selecionar as variáveis que são possíveis de serem estudadas e que provavelmente interferem no sistema, é preciso avaliar a metodologia experimental (tempo, custo, etc.). As variáveis que não foram selecionadas devem ser fixadas durante todo o experimento.

Em uma etapa seguinte, deve-se escolher qual planejamento usar para estimar a influência (o efeito) das diferentes variáveis no resultado realizando um número reduzido de experimentos. No estudo de triagem, as interações entre as variáveis (interações principais) e de segunda ordem, obtidas normalmente pelos planejamentos fatoriais completos ou fracionários, são de extrema importância para a compreensão do comportamento do sistema.

5.1.1. Planejamentos fatoriais completos

Em um planejamento fatorial são investigadas as influências de todas as variáveis experimentais de interesse e os efeitos de interação na resposta ou respostas. Se a combinação de k fatores é investigada em dois níveis, um planejamento fatorial consistirá de 2^k experimentos. Normalmente, os níveis dos fatores quantitativos são nomeados pelos sinais – (menos) para o nível mais baixo e + (mais) para o nível mais alto (TEÓFILO; FERREIRA, 2006).

Para fatores qualitativos fica a critério do experimentalista nomear os seus níveis. Os sinais, para os efeitos de interação de 2ª ordem e de ordem superior entre todas as variáveis do planejamento, realizando-se todas as combinações possíveis, são obtidos pelo produto dos sinais originais das variáveis envolvidas. Desta maneira, é possível construir as colunas de sinais para todas as interações e, assim, elaborar a matriz de coeficientes de contraste (Tabela 1).

Tabela 1 – Matriz de coeficientes de contraste para um planejamento fatorial 2³.

<i>Média</i>	<i>Variáveis</i>			<i>Interações</i>			
	<i>x₁</i>	<i>x₂</i>	<i>x₃</i>	<i>X₁₂</i>	<i>X₁₃</i>	<i>X₂₃</i>	<i>X₁₂₃</i>
+	-	-	-	+	+	+	-
+	+	-	-	-	-	+	+
+	-	+	-	-	+	-	+
+	+	+	-	+	-	-	-
+	-	-	+	+	-	-	+
+	+	-	+	-	+	-	-
+	-	+	+	-	-	+	-
+	+	+	+	+	+	+	+

Fonte: (TEÓFILO; FERREIRA, 2006)

Uma coluna de sinais + (mais) é adicionada à esquerda da matriz de coeficientes de contraste para o cálculo da média de todas as respostas observadas. Suponha um planejamento fatorial com n ensaios e y_i observações individuais (quando houver replicatas, considere a resposta média $\bar{y}_i$). Os efeitos para cada coluna da matriz de coeficientes de contraste (conforme Tabela 1) são dados pelas seguintes Equações:

$$ef_{\text{médio}} = \frac{\sum_{i=1}^n y_i}{n} \quad (1)$$

$$ef = \frac{\sum_{i=1}^{n/2} y_{i(+)} - \sum_{i=1}^{n/2} y_{i(-)}}{n/2} \quad (2)$$

A Equação 1 descreve o efeito para a média de todas as observações, enquanto a Equação 2 descreve o cálculo do efeito para as variáveis e interações usando a diferença entre as médias das observações no nível mais ($y_{i(+)}$) e as médias das observações no nível menos ($y_{i(-)}$).

5.1.2. Planejamentos fatoriais fracionários

O planejamento fatorial completo necessita de 2^k experimentos para sua execução, portanto, sua principal desvantagem é o aumento no número de experimentos que devem ser realizados a cada fator adicionado ao estudo (TEÓFILO; FERREIRA, 2006). Se considerarmos (e observarmos) que os efeitos de altas ordens, principalmente para planejamentos com $k > 4$, são quase sempre não significativos, a realização de ensaios para estimar tais efeitos de interação pode ser irrelevante. Desta maneira, com um número menor de experimentos, é possível obter informações daqueles efeitos mais importantes e retirar, na maioria das vezes, as mesmas conclusões caso fosse realizado um fatorial completo. Os planejamentos que apresentam estas características são conhecidos como planejamentos fatoriais fracionários. Enquanto um planejamento fatorial completo com quatro variáveis (2^4) utiliza 16 experimentos, um planejamento fatorial fracionário com o mesmo número de variáveis (2^{4-1}) faz o uso de oito experimentos (fatorial de fração meia).

Tabela 2 – Matriz de coeficientes de contraste para um planejamento fatorial fracionário 2^{4-1} .

<i>Média</i>	<i>Variáveis</i>				<i>Interações</i>		
	X ₁	X ₂	X ₃	X ₄	X ₁₂	X ₁₃	X ₁₄
+	-	-	-	-	+	+	+
+	+	-	-	+	-	-	+
+	-	+	-	+	-	+	-
+	+	+	-	-	+	-	-
+	-	-	+	+	+	-	-
+	+	-	+	-	-	+	-
+	-	+	+	-	-	-	+
+	+	+	+	+	+	+	+

5.1.3. Gráfico de Pareto

O nome Gráfico de Pareto foi uma homenagem ao economista italiano Vilfredo Pareto que, através de uma constatação, identificou as seguintes características em problemas socio-econômicos:

- a) poucas causas principais influíam fortemente no problema;
- b) havia um grande número de causas triviais, pouco importantes, que influíam marginalmente no problema.

Nos processos industriais e na administração em geral comprovou-se que o comportamento dos problemas é semelhante. Assim, é importante identificar quais as causas principais e atacá-las efetivamente, de modo a obter o máximo ganho em termos de solução para o problema em estudo (LINS, 1993).

O gráfico de Pareto tem o aspecto de um gráfico de barras. Cada causa é quantificada em termos da sua contribuição para o problema e colocada em ordem

decrecente de influência (Figura 1). O analista também tem a opção de definir um nível mínimo de efeito que cada causa deve produzir para ser considerada importante na solução do problema. Na Figura 1 a linha tracejada, corresponde ao efeito mínimo que uma variável, ou interação entre elas, deve produzir para causar variação significativa no sinal analítico com uma confiança de 95%. Repare que apenas a variável 4 (tempo de pirólise) não atinge este limite.

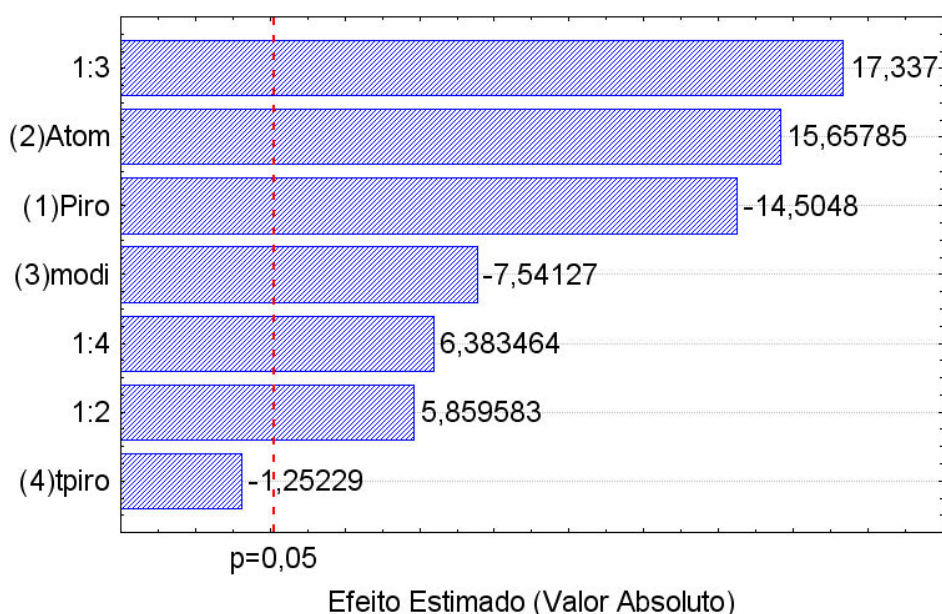


Figura 1 – Gráfico de Pareto.

5.2. Metodologia de superfície de resposta

Após a realização dos experimentos de triagem, os fatores significativos são selecionados e uma metodologia de análise de superfície de resposta pode ser executada para otimização do experimento. Neste sentido, otimizar significa encontrar os valores das variáveis que irão produzir a melhor resposta desejada, isto é, encontrar a região ótima na superfície definida pelos fatores (TEÓFILO; FERREIRA, 2006).

A metodologia de superfície de resposta baseia-se na construção de modelos matemáticos empíricos que geralmente empregam funções polinomiais lineares ou quadráticas para descrever o sistema estudado e, conseqüentemente, dão condições de explorar (modelar e deslocar) o sistema até sua otimização.

Um planejamento experimental construído para estimar coeficientes, segundo algum modelo aproximado, deve reunir certos critérios desejáveis, sendo os principais (MYERS; MONTGOMERY, 2002;): proporcionar boas estimativas para todos os coeficientes, exigindo poucos experimentos, e fornecer condições de avaliação dos coeficientes e do modelo, ou seja, da regressão e da falta de ajuste.

Os planejamentos composto central (CCD), do inglês “Central Composite Design”, possivelmente são as classes de planejamentos mais utilizadas para ajustar modelos quadráticos (Equação 3), visto que apresentam todos os critérios descritos acima, dentre outros (TEÓFILO; FERREIRA, 2006).

$$y = b_0 + \sum_{i=1}^k b_i x_i + \sum_{i=1}^k b_{ii} x_i^2 + \sum_{i < j} \sum_j b_{ij} x_i x_j + e \quad (3)$$

5.2.1. Planejamento composto central (CCD)

Os planejamentos compostos centrais (CCD) foram apresentados como uma evolução dos planejamentos 3^3 . Outras vantagens, como rotabilidade e blocagem ortogonal, além do pouco número de ensaios, foram obtidas devido à presença das seguintes partes no planejamento (MYERS; MONTGOMERY, 2002;):

- 1) um planejamento fatorial completo de dois níveis, podendo ser usado ainda, um planejamento fatorial fracionário de dois níveis;
- 2) experimentos no ponto central, isto é, $x_i = 0$ para todo i ;

3) experimentos nos pontos axiais em que $x_i = \pm \alpha$, com $x_j \neq x_i$, e $\alpha = \sqrt[k]{2^k}$. Estes pontos são situados nos eixos do sistema de coordenadas com distância $\pm \alpha$ da origem e formam a parte estrela do planejamento.

A Figura 2 ilustra os pontos experimentais no sistema de coordenadas definidas pelos eixos x_i .

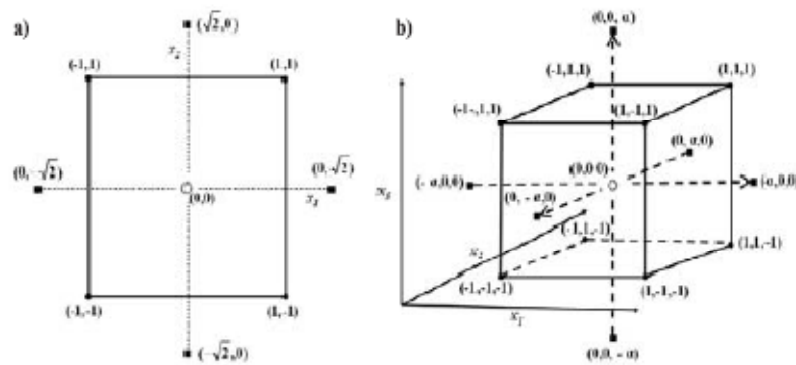


Figura 2 – Planejamentos compostos centrais: (a) $k = 2$ e $\alpha=1,414$, (b) $k = 3$ e $\alpha=1,682$. (●) planejamento fatorial, (■) pontos axiais e (□) ponto central.

Para construção de um planejamento CCD é necessário definir o número de variáveis a serem estudadas (k), qual planejamento fatorial será empregado (completo 2^k ou fracionário 2^{k-b}) e quantos experimentos serão realizados no ponto central ($2k$). O número de experimentos a ser realizado é dado por 2^k+2k+1 . A Tabela 3 apresenta as matrizes de planejamento para 2 e 3 variáveis.

Observe que neste tipo de planejamento, os níveis α (o mesmo vale para qualquer valor codificado x_i) necessitam ser decodificados para os valores experimentais dos níveis das variáveis a serem estudadas e para isso utiliza-se a Equação 4:

$$x_i = \frac{z_i - \bar{z}}{\Delta z / 2} \quad (4)$$

em que x_i é o valor codificado do planejamento CCD, z_i o valor experimental do nível, $\bar{z}$ o valor médio entre os níveis mais (+) e menos (-), que é exatamente o valor do nível zero (0) e Δz é a diferença entre os níveis mais (+) e menos (-) (TEÓFILO; FERREIRA, 2006).

Tabela 3 – Matrizes dos planejamentos compostos centrais com duas e três variáveis.

Planejamento CCD – 2 ²			Planejamento CCD – 2 ³			
x ₁	x ₂		X ₁	x ₂	x ₃	
-1	-1	Planejamento fatorial	-1	-1	-1	Planejamento fatorial
1	-1		1	-1	-1	
-1	1		-1	1	-1	
1	1		1	1	-1	
0	0	Ponto central	-1	-1	1	
			1	-1	1	
			-1	1	1	
-α	0	Pontos axiais	1	1	1	
A	0					
0	-α		0	0	0	Ponto central
0	A					
			-α	0	0	
			α	0	0	
			0	-α	0	
			0	α	0	
			0	0	-α	
			0	0	α	

Fonte: (TEÓFILO; FERREIRA, 2006)

5.2.2. Matriz Doehlert

Os pontos da matriz Doehlert correspondem aos vértices de um hexágono e, em geral, o número total de pontos experimentais no planejamento é igual a k^2+k+pc , em que k é o número de fatores e pc é o número de experimentos no ponto central. Uma importante propriedade do planejamento Doehlert diz respeito ao número de níveis que cada variável possui (TEÓFILO; FERREIRA, 2006).

O planejamento Doehlert descreve um domínio circular para duas variáveis, esférico para três e hiperesférico para mais de três variáveis, o que acentua a uniformidade no espaço envolvido. Embora suas matrizes não sejam ortogonais nem rotacionais, elas não apresentam divergências significativas que comprometam a qualidade necessária para seu uso efetivo (MASSART et al., 1998). Para duas variáveis, a matriz Doehlert consiste de um ponto central e mais seis pontos adicionais formando um hexágono regular e, por esse motivo, situada sob um círculo. As matrizes do planejamento Doehlert para duas, três e quatro variáveis podem ser visualizadas na Tabela 4.

Cada planejamento é definido considerando o número de variáveis e os valores codificados (x_i) da matriz experimental. A relação entre os valores experimentais e os valores codificados é dada pela Equação 5:

$$x_i = \left(\frac{z_i - z_i^0}{\Delta z_i} \right) \beta_d \quad (5)$$

O termo x_i é o valor codificado para o nível do fator i ; z_i é o seu experimental; Δz_i é a distância entre o valor experimental no ponto central e o experimental no nível superior ou inferior, β_d é o maior valor limite codificado na matriz para cada fator e z_i^0 é o valor experimental no ponto central.

Tabela 4 – Matriz Doehlert para duas, três e quatro variáveis.

Variáveis experimentais – Matriz Doehlert									
	2 Variáveis		3 Variáveis			4 Variáveis			
	X_{1a}	X_{2a}	X_{1b}	X_{2b}	X_{3b}	X_{1c}	X_{2c}	X_{3c}	X_{4c}
1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2	1	0	1	0	0	1	0	0	0
3	0,5	0,866	0,5	0,866	0	0,5	0,866	0	0
4	-1	0	0,5	0,289	0,817	0,5	0,289	0,817	0
5	-0,5	-0,866	-1	0	0	0,5	0,289	0,204	0,791
6	0,5	-0,866	-0,5	-0,866	0	-1	0	0	0
7	-0,5	0,866	-0,5	-0,289	-0,817	-0,5	-0,866	0	0
8			0,5	-0,866	0	-0,5	-0,289	-0,817	0
9			0,5	-0,289	-0,817	-0,5	-0,289	-0,204	-0,791
10			-0,5	0,866	0	0,5	-0,866	0	0
11			0	0,577	-0,817	0,5	-0,289	-0,817	0
12			-0,5	0,289	0,817	0,5	-0,289	-0,204	-0,791
13			0	-0,577	0,817	-0,5	0,866	0	0
14						0	0,577	-0,817	0
15						0	0,577	-0,204	-0,791
16						-0,5	0,289	0,817	0
17						0	-0,577	0,817	0
18						0	0	0,613	-0,791
19						-0,5	0,289	0,204	0,791
20						0	-0,577	0,204	0,791
21						0	0	-0,613	0,791

Fonte: (TEÓFILO; FERREIRA, 2006)

6. Validação analítica

6.1. Curva de calibração e linearidade

A curva de calibração é o método de quantificação mais utilizado e consiste na determinação da resposta de determinado instrumento às várias concentrações de um dado analito. A linearidade é definida pela análise de calibradores (soluções de diferentes concentrações), abrangendo a faixa de concentração de interesse no trabalho. O número de calibradores é definido em função da faixa de concentração de interesse e deve ser de, no mínimo, cinco (ANVISA, 2003).

A linearidade é a capacidade de um método analítico gerar resultados proporcionais à concentração da espécie em análise, dentro de uma faixa analítica especificada, na qual é possível se relacionar o valor de uma variável dependente (medida) através do conhecimento da variável independente (concentração do analito). As técnicas de se adequar a reta aos dados e verificar o quanto a reta descreve os dados chamam-se regressão e correlação, respectivamente (CHASIN et al, 1998).

Freqüentemente usa-se o coeficiente de correlação linear R para indicar o quanto pode ser considerada adequada a reta como modelo matemático. O critério mínimo aceitável para o coeficiente de correlação R deve ser $= 0,99$, ou $0,98$ para o coeficiente de determinação (R^2) (ANVISA, 2003). O método pode ser considerado como livre de tendências se o corredor de confiança da reta de regressão linear contiver a origem (INMETRO DOQ-CGCRE-008, 2003).

6.2. Seletividade – Interferência de matriz

Uma amostra, de maneira geral, consiste dos analitos a serem medidos, da matriz e de outros componentes que podem ter algum efeito na medição, mas que não se quer quantificar. A especificidade e a seletividade estão relacionadas ao evento da detecção. Um método que produz respostas para apenas um analito é chamado específico. Um método que produz respostas para vários analitos, mas que pode distinguir a resposta de um analito da de outros, é chamado seletivo. Entretanto, os termos especificidade e seletividade são freqüentemente utilizados indistintamente ou com diferentes interpretações.

A medição pode ser alterada porque os reagentes, matriz da amostra ou outros componentes, alteram a sensibilidade do detector que mede o analito de interesse ou porque esses compostos afetam diretamente a resposta. Os efeitos de erros constantes (interferências) e erros proporcionais (efeito matriz) podem ocorrer ao mesmo tempo. Uma vez conhecidos, esses problemas podem ser superados através da calibração por adição-padrão, análise de múltiplos componentes ou por uma mudança no pré-tratamento, separação, ou detecção (INMETRO DOQ-CGCRE-008, 2003).

A curva de calibração aquosa do instrumento, ou seja, com os padrões preparados em água, relaciona a resposta do aparelho com a massa do analito, sem levar em conta a interferência da matriz, já a curva de calibração por adição de analito à matriz visa eliminar interferência da matriz e de outras etapas do método.

O efeito da matriz pode ser testado comparando-se as inclinações das curvas de calibração do instrumento, sem a matriz, com a curva de calibração por ajuste de matriz. Se as inclinações destas duas curvas de regressão linear forem as mesmas,

o único efeito matriz presente é a interferência natural causada pelo nível básico do analito. Para tal, são preparadas 3 curvas de calibração do instrumento e 3 curvas de calibração com adição de analito com leituras em triplicata. Primeiro, faz-se o teste F para verificar se as variâncias das inclinações podem ser consideradas iguais, calculando-se:

$$F = \frac{s_1^2}{s_2^2} \quad (6)$$

onde s_1^2 e s_2^2 são as variâncias de cada inclinação, com a maior variância no numerador. Ao mesmo tempo, obtém-se o valor de F_{tabelado} , com (n_1-1) graus de liberdade no numerador e (n_2-1) graus de liberdade no denominador; usualmente, adota-se um nível de confiança de 95%. Tem-se dois casos:

(I) se o teste F não é significativo, isto é, se o $F_{\text{calculado}}$ for menor que o F tabelado, a matriz não tem um efeito importante sobre a precisão do método na faixa de concentração em estudo. Nesse caso, os desvios-padrões dos grupos de testes podem ser agrupados e a significância das diferenças das médias dos dois conjuntos de amostras pode ser testada com a distribuição t de Student. Neste caso, calculam-se:

$\bar{x}_1$ e $\bar{x}_2$ = médias das respostas dos analitos em amostras “com matriz” e “sem matriz” na mesma faixa de concentrações,

s_1^2 e s_2^2 = variâncias das respostas dos analitos dos dois grupos de amostras, bem como o valor

$$t_{\text{calculado}} = \frac{|\bar{x}_1 - \bar{x}_2|}{\sqrt{s^2 \left(\frac{1}{n_1} + \frac{1}{n_2} \right)}} \quad (7)$$

onde $s^2 = \frac{(n_1 - 1)s_1^2 + (n_2 - 1)s_2^2}{(n_1 + n_2 - 2)}$; n_1 e n_2 são os tamanhos das amostras 1 e 2.

O valor de t_{tabelado} é obtido a partir da tabela da distribuição de Student para $(n_1 + n_2 - 2)$ graus de liberdade e a confiança desejada.

(II) Se o teste F é significativo, a matriz tem um efeito importante sobre a precisão do método na faixa de concentração em estudo, as variâncias podem ser consideradas desiguais e o $t_{\text{calculado}}$ é calculado por:

$$t_{\text{calculado}} = \frac{|\bar{x}_1 - \bar{x}_2|}{\sqrt{\frac{s_1^2}{n_1} + \frac{s_2^2}{n_2}}} \quad (8)$$

Neste caso, para a obtenção do t_{tabelado} , o número de graus de liberdade (n) é igual a:

$$\nu = \frac{(s_1^2/n_1 + s_2^2/n_2)}{\frac{(s_1^2/n_1)^2}{n_1 + 1} + \frac{(s_2^2/n_2)^2}{n_2 + 1}} - 2 \quad (9)$$

No caso de somente uma faixa relativamente estreita de concentrações interessar, ou se o erro analítico devido a uma possível dependência com a concentração for desprezível, o teste t com dados pareados pode ser utilizado para verificar efeitos de matriz. O cálculo neste caso é:

$$t_{\text{calculado}} = \frac{\bar{x}_d \sqrt{n}}{s_d} \quad (10)$$

onde:

$$\bar{x}_d = \sum_{i=1}^n \frac{(d_{i1} - d_{i2})}{n} \quad (11) \quad \text{e} \quad s_d = \frac{\sum_{i=1}^n [(d_{i1} - d_{i2}) - \bar{x}_d]^2}{n - 1} \quad (12)$$

Nas equações, $\bar{x}_d$ = média das diferenças entre as respostas dos pares de analitos; d_{i1} , d_{i2} = respostas do analito para o par de amostras “com matriz” e “sem

matriz”; s_d = desvio padrão das diferenças e n = número de pares. O valor de t_{tabelado} é obtido da distribuição t de Student com $(n-1)$ graus de liberdade e a confiança desejada.

Se o valor de $t_{\text{calculado}}$ for menor que o t_{tabelado} , pode-se concluir que a matriz não afeta o ensaio. Se o valor de t for maior que o esperado, pode-se concluir que a matriz tem um efeito estatisticamente significativo sobre o resultado do ensaio.

6.3. Limite de detecção

Limite de detecção (LOD) é a menor quantidade do analito presente em uma amostra que pode ser detectado, porém não necessariamente quantificado, sob as condições experimentais estabelecidas.

No caso de técnicas instrumentais (HPLC, GC, AAS), a estimativa do limite de detecção pode ser feita com base na relação de 3 vezes o ruído da linha de base (ANVISA, 2003). Pode ser determinado pela equação:

$$LOD = \frac{s_a \times 3}{IC} \quad (13)$$

em que: s_a é o desvio padrão obtido a partir de 10 leituras consecutivas do primeiro ponto da curva de calibração por adição de analito à matriz; IC é a inclinação da curva de calibração.

6.4. Limite de quantificação

Limite de quantificação (LOQ) é a menor quantidade do analito em uma amostra que pode ser determinada com precisão e exatidão aceitáveis sob as condições experimentais estabelecidas. Pode ser expresso pela equação:

$$LOQ = \frac{s_a \times 10}{IC} \quad (14)$$

em que: s_a é o desvio padrão obtido a partir de 10 leituras consecutivas do primeiro ponto da curva de calibração por adição de analito à matriz; IC é a inclinação da curva de calibração.

6.5. Precisão

A precisão é a avaliação da proximidade dos resultados obtidos em uma série de medidas de uma amostragem múltipla de uma mesma amostra. A repetibilidade do método é verificada por no mínimo 3 concentrações, baixa, média e alta, contemplando o intervalo linear do método, realizando-se, no mínimo, 5 determinações por concentração (ANVISA, 2003). A precisão deve ser determinada em ensaios efetuados em um mesmo dia (precisão intra-ensaio) e em dias diferentes (precisão inter-ensaio).

A precisão pode ser expressa como desvio padrão relativo (RSD) ou coeficiente de variação (CV%), segundo a fórmula,

$$CV\% = \frac{s}{\bar{C}} \times 100 \quad (15)$$

em que, s é o desvio padrão e $\bar{C}$, a concentração média determinada.

Os limites aceitáveis variam de acordo com a concentração: 100 ppb – 15%; 20 ppb – 21% e 1 ppb – 30%. (AOAC, 1993).

6.6. Exatidão

Exatidão do método é definida como sendo a concordância entre o resultado de um ensaio e o valor de referência aceito como convencionalmente verdadeiro. A exatidão, quando aplicada a uma série de resultados de ensaio, implica numa combinação de erros aleatórios e sistemáticos (tendência).

A determinação da tendência total com relação aos valores de referência apropriados é importante no estabelecimento da rastreabilidade aos padrões reconhecidos. A tendência pode ser expressa como recuperação analítica (valor observado/valor esperado). A tendência deve ser corrigida ou demonstrada ser desprezível, mas em ambos os casos, a incerteza associada com a determinação da tendência permanece como um componente essencial da incerteza global.

Os processos normalmente utilizados para avaliar a exatidão de um método são, entre outros: uso de materiais de referência, participação em comparações interlaboratoriais e realizações de ensaios de recuperação.

6.6.1. Materiais de referência certificados (MRC)

Sempre que possível, os materiais de referência certificados devem ser utilizados no processo de validação de um método de ensaio. Um MRC possui um valor de concentração e uma incerteza associada. É muito importante, portanto, que o fornecimento desses MRC seja realizado por organismos reconhecidos e confiáveis.

O uso correto dos MRC consiste na sua análise para avaliar o desempenho do laboratório. Quando o valor obtido não estiver dentro do intervalo da incerteza

indicado para o valor certificado, o laboratório deve procurar as causas desse desvio e tentar eliminá-las ou aceitá-las, dependendo do rigor definido para os resultados.

6.6.2. Recuperação

A recuperação do analito pode ser estimada pela análise de amostras adicionadas com quantidades conhecidas do mesmo (*spike*). As amostras podem ser adicionadas com o analito em pelo menos três diferentes concentrações, por exemplo próximo ao limite de quantificação, próximo à concentração máxima permissível e em uma concentração próxima à média da faixa de uso do método.

A recuperação é calculada segundo a equação:

$$\text{Recuperação (\%)} = \left(\frac{C_1 - C_2}{C_3} \right) \times 100 \quad (16)$$

onde: C_1 = concentração determinada na amostra adicionada; C_2 = concentração determinada na amostra não adicionada; C_3 = concentração adicionada.

Os valores determinados nos ensaios de recuperação devem contemplar a faixa de 80 a 120% (EPA, 1992).

6.7. Sensibilidade (massa característica)

A sensibilidade de métodos em AAS é dada pela concentração característica (β_0 ou c_0) e pela massa característica (m_0). Essa concentração ou massa corresponde a uma absorvância de 0,0044 ou uma absorvância integrada de 0,0044s (1% de absorção). Com o método no forno de grafite, o volume de amostra pode variar com a viscosidade, amostra efetivamente útil e capacidade do tubo. Por isso, a massa característica é mais usada do que a concentração característica. A

unidade usada para quantificar a massa característica é o picograma (10^{-12} g) (WELZ; SPERLING, 1999).

$$\text{Massa característica} = \frac{\text{volume } (\mu\text{L}) \times \text{concentração } (\mu\text{g L}^{-1}) \times 0,0044}{\text{absorvância da amostra}} \quad (17)$$

7. Materiais e métodos

7.1. Material

7.1.1. Equipamentos e acessórios

No estudo dos metais vanádio, cobre e antimônio em soro foi usado um espectrômetro de absorção atômica PerkinElmer Aanalyst™ 400, equipado com forno de grafite (HGA® 800), um amostrador automático (AS-800) e um corretor de fundo com uma fonte de arco contínuo de deutério operando sob as condições recomendadas pelo fabricante (PerkinElmer Life e Analytical Sciences, Shelton, CT, USA). Leitura em absorvância integrada (área do pico) foi usada para avaliação do sinal. As lâmpadas mono-elementares utilizadas foram de catodo oco da PerkinElmer e da IST® para V e Cr, respectivamente, e EDL da PerkinElmer para Sb operando em condições recomendadas. O volume pipetado para dentro do tubo de grafite foi de 20 μL tanto para a amostra diluída como para as soluções usadas na calibração. Argônio foi usado como gás inerte de limpeza (99,996% da White Martins, Belo Horizonte, MG, Brasil). Tubos de grafite pirolítico com plataforma integrada (PerkinElmer) foram usados em todos os estudos. Micropipetas reguláveis de 20 a 200 μL e 100 a 1000 μL (Thermo) foram empregadas no preparo de soluções.

Para o estudo do manganês em soro e do chumbo em sangue as medidas foram obtidas em um espectrômetro de absorção atômica SpectrAA 220 da Varian

(Vitória, Austrália) equipado com forno de grafite, um amostrador automático EL 98013384-2C e correção de fundo por efeito Zeeman polarizado, todos da Varian. O motivo da escolha de outro equipamento para desenvolver métodos de análise para esses dois metais foi a inoperância do primeiro equipamento citado durante alguns meses da elaboração dessa dissertação devido a problemas técnicos. As lâmpadas de catodo oco de Mn da Varian e de Pb da IST foram operadas seguindo as recomendações do fabricante. As absorvâncias foram medidas em altura de pico. Argônio 99,999% da Air Liquid® (Contagem, MG, Brasil) foi usado como gás de limpeza. O volume pipetado para dentro do tubo de grafite foi de 20 µL tanto para a amostra diluída como para as soluções usadas na calibração. Tubos de grafite pirolíticos sem plataforma para Mn e com plataforma de L'Vov da Varian para Pb foram usados para o desenvolvimento do método. Micropipetas reguláveis de 20 a 200 µL e 100 a 1000 µL (Thermo) também foram usadas. Agitador mecânico tipo vortex modelo MS1 (IKA®) e centrífuga Excelsa Baby I da Fanem foram utilizados no preparo das amostras de sangue . Os parâmetros operacionais dos dois equipamentos de GF AAS foram utilizados seguindo as recomendações do fabricante e são mostrados na Tabela 5.

Tabela 5 – Parâmetros instrumentais e condições operacionais para o GF AAS.

Parâmetro	V	Cr	Sb	Mn	Pb
Comprimento de onda (nm)	318,4	357,87	217,58	279,5	283,3
Fenda (nm)	0,8	0,8	1,35	0,2	0,5
Corrente (mA)	20	15	240	15	8

7.1.2. Reagentes e vidraria

Todos os reagentes empregados foram de alto grau de pureza analítica, salvo aqueles especificados. Água desionizada (resistividade de $18,2 \text{ M}\Omega \text{ cm}^{-1}$) de um sistema Milli-Q (Millipore, Bedford, MA, USA) foi usada para a preparação de todas as soluções aquosas. O ácido nítrico utilizado para diluir as amostras de soro e sangue foi da Merck (No. 7587956).

Foram usadas as seguintes soluções de 1000 mg L^{-1} : RhCl_3 (Fluka, No. 84033), RuCl_3 (Fluka, No. 83722), IrCl_3 (Fluka, No. 58195), $(\text{NH}_4)_2\text{TaF}_7$ (Merck, No. 170356), todos em HCl aproximadamente 1 mol L^{-1} , $\text{Pd}(\text{NO}_3)_2$ em HNO_3 1 mol L^{-1} (Fluka, No. 76035), Zr em HCL 5% v/v (Aldrich, No. 274976). Além das seguintes soluções 1000 mg L^{-1} preparadas em 100 mL de água Milli-Q (HNO_3 1 mol L^{-1}): tungstênio preparada com 0,1794 g de $\text{Na}_2\text{WO}_4(\text{H}_2\text{O})_2$ (Merck) e nióbio preparada com 0,1430 g de Nb_2O_5 (Merck No. 5214816).

As soluções analíticas de vanádio, cromo, antimônio, manganês e chumbo foram preparadas a partir de soluções estoques de 1000 mg L^{-1} feitas com ampolas de titrisol da Merck em 5% v/v de ácido nítrico.

Antes do uso, tubos de centrífuga com tampas rosqueáveis (capacidade de 15 mL), balões volumétricos, béqueres, copos do amostrador automático e ponteiras de micropipeta foram lavados abundantemente com solução de detergentes, enxaguadas com bastante água, e mantidas em banho com ácido nítrico 20% v/v por um período não inferior a vinte e quatro horas e, posteriormente, enxaguadas várias vezes com água Milli-Q.

7.1.3. Materiais de referência

Duas amostras de sangue do programa de controle interlaboratorial do governo de Aragon na Espanha e uma amostra de sangue certificada da Bio Rad (US Bio Rad Laboratories, Irvine, CA), nível 2 (Código 562) foram analisadas.

7.2. Obtenção dos modificadores permanentes no tubo de grafite ou plataforma

Para a obtenção dos modificadores permanentes, os tubos de grafite foram tratados de acordo com um programa de forno específico (Tabela 6) (SILVA et al., 1998; SILVA et al., 1999).

Os tubos de grafite da Varian, com ou sem plataforma, receberam volumes de 40 μL da solução do modificador, que foram introduzidos no interior do forno de grafite pelo pipetador automático (Figura 3), e submetidos ao programa de temperatura de forno, sendo este procedimento executado 13 vezes obtendo-se uma plataforma ou parede de tubo tratada com 520 μg do modificador permanente. Já os tubos de grafite da PerkinElmer têm capacidade para se introduzir um volume um pouco maior assim, volumes de 50 μL foram introduzidos em seu interior seguidos do programa de forno, aplicou-se esse procedimento 10 vezes de forma a obter uma plataforma integrada com 500 μg do modificador permanente. Este programa foi aplicado na obtenção de irídio, ródio, rutênio, zircônio, tungstênio, tântalo e nióbio.

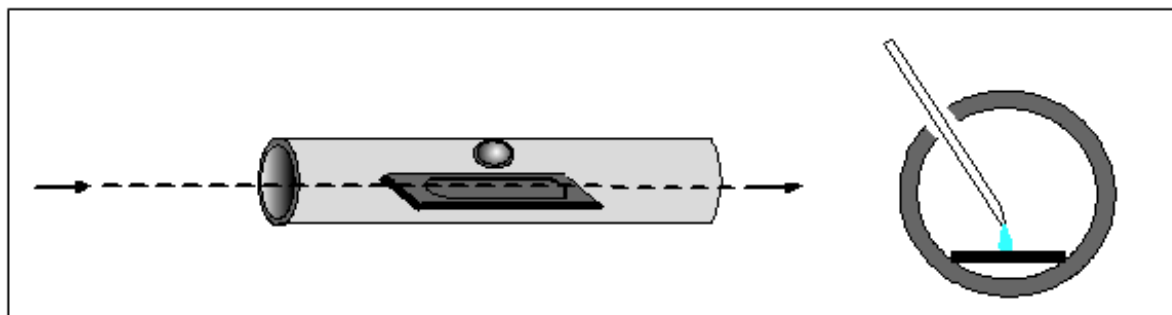


Figura 3 – Vista de um tubo com plataforma inserida no momento da deposição de uma solução sobre a plataforma.

Tabela 6 – Programa de temperatura de forno para tratamento da plataforma ou da parede do tubo com modificadores permanentes (500 ou 520 μg).

<i>Etapa</i>	<i>Temperatura ($^{\circ}\text{C}$)</i>	<i>Rampa (s)</i>	<i>Tempo de permanência (s)</i>	<i>Fluxo de Ar</i>
1	90	5	15	SIM
2	140	5	15	SIM
3	1000	10	10	SIM
4	2000	0	5	NÃO
5	20	1	10	SIM

7.3. Amostras e procedimentos de preparo de amostras

Neste trabalho foram utilizadas amostras de soro fornecidas pelo Prof. Dr. Alfredo Góes do Departamento de Bioquímica e Imunologia do ICB/UFMG e amostras de sangue humano que foram fornecidas pelo laboratório Hermes Pardini de Belo Horizonte.

As amostras de sangue foram obtidas por punção venosa utilizando-se tubos heparinizados, a vácuo. Em seguida, as amostras foram imediatamente estocadas em uma geladeira. O único preparo da amostra foi uma diluição 1+9 com uma solução de ácido nítrico 0,2% v/v e Triton® X-100 0,2% v/v, exceto para as amostras

com concentrações maiores que o último ponto da curva de calibração, que foram diluídas 1+12. A diluição foi realizada após a amostra ser homogeneizada por 1 minuto em agitador de tubo; essa mistura foi centrifugada por 10 minutos a 3000 rpm, e por fim, o sobrenadante foi transferido para o copo do amostrador automático do GF AAS.

Após a coleta do sangue por punção venosa em tubos não heparinizados, a vácuo, as amostras de soro foram obtidas pela centrifugação das amostras de sangue por 15 minutos em 3000 rpm. O soro das amostras foi separado com a ajuda de uma pipeta, colocados em tubos de centrífuga de 15 mL e conservado em um congelador. A preparação das amostras de soro foi feita diretamente nos copos do amostrador automático do GF AAS, diluídas 1+1 ou 1+4 com solução de ácido nítrico 1% v/v e Triton® X-100 0,1% v/v.

7.4. Otimização das condições analíticas

Um programa de temperatura de forno consiste basicamente de etapas de secagem, para eliminar o solvente (às vezes com uma pré-secagem para não haver crepitação de amostras para fora do tubo), uma etapa de calcinação da amostra para eliminar os concomitantes da matriz (chamada de pirólise), a atomização, onde o analito deve ser liberado da parede do tubo ou da plataforma, formando assim a nuvem atômica o mais livre de interferências possíveis e cuja densidade está associada diretamente à concentração do metal em questão na amostra e finalmente, uma etapa de limpeza, recomendada para evitar efeitos de memória de uma análise para a subsequente. É importante na otimização da etapa de secagem que o analista acompanhe (usando um espelho) o que ocorre no interior do forno, ou

seja, que o tempo e as temperaturas de secagem sejam suficientes para garantir a mesma e que não ocorram crepitações da amostra o que resultaria em perdas e imprecisão. Quando se trabalha com amostras complexas as temperaturas e tempo de secagem devem merecer maior atenção. No caso do uso de surfactante (como Triton X-100, cloreto de tricetilmetil amônio, etc) pode ser necessário uma etapa de pré-secagem e, também utilizar uma rampa (taxa de aquecimento) mais lenta, de modo a evitar a formação de bolhas que também conduzem a crepitação da amostra.

Utilizando-se a etapa de secagem otimizada e as condições recomendadas pelo fabricante para as etapas de pirólise, atomização e limpeza, são testados tubos de grafite com a parede ou a plataforma tratada com diferentes tipos de modificadores permanentes, além de tubos não tratados, com ou sem modificador químico em solução. Selecionam-se dois que apresentarem melhores desempenhos para o sinal de absorvância com fundo corrigido e, aleatoriamente, um é escolhido para o nível mínimo e o outro para o nível máximo do planejamento fatorial.

Além do uso de modificador químico, temperaturas de pirólise e de atomização também são fatores que devem ser analisados no planejamento fatorial. Outros parâmetros como fator de diluição e tempo de pirólise, por exemplo, também podem ser investigados.

Após determinar quais são os parâmetros significativos, as variáveis não-significativas são fixadas, e o uso de modificador químico é definido, já que se trata de um parâmetro qualitativo e não pode ser alterado. Na etapa seguinte, um método que permite gerar superfície de resposta (planejamento Doehlert ou CCD, por exemplo) é utilizado no refinamento dos parâmetros significativos para, enfim, obter-se as condições ótimas de análise.

8. Resultados e discussão

8.1. Determinação de vanádio em soro humano por GF AAS

8.1.1. Otimização das condições analíticas

Aleatoriamente uma amostra de soro foi selecionada de um grupo de pessoas saudáveis para estudos posteriores (amostra de referência). A amostra de referência diluída 1+4 ou 1+1 com ácido nítrico 1% v/v e Triton® X-100 0,1% v/v foi contaminada com 30 $\mu\text{g L}^{-1}$ de vanádio e utilizada na otimização.

A temperatura e o tempo de secagem foram otimizados, a partir das condições recomendadas pelo fabricante do equipamento, até não se observar borbulhamento da amostra dentro do forno de grafite. Após a otimização das temperaturas e tempo de secagem, foram testados diferentes tubos de grafite com plataformas integradas para seleção dos dois que apresentassem melhores sinais (com maior sensibilidade, fundo corrigido e perfil simétrico compatível com sinais analíticos do forno de grafite) para empregá-los em um planejamento fatorial. Os tubos testados foram: tubos com plataforma tratada com modificador químico permanente (tungstênio, ródio, rutênio, irídio ou zircônio) e tubo com plataforma sem modificador químico. Nesses experimentos foram utilizados as temperaturas e tempos de secagem otimizados na etapa anterior e as temperaturas e tempos de pirólise e atomização recomendados pelo fabricante. Os melhores resultados foram obtidos para o tubo com plataforma tratada com ródio e para o tubo com a plataforma não tratada. Um planejamento fatorial fracionário (2^{4-1}) (Tabela 7) foi feito para avaliação preliminar das variáveis fator de diluição, temperaturas de pirólise e atomização e uso de modificador químico. O gráfico de Pareto (Figura 4) mostrou que as variáveis que apresentaram efeito significativo na resposta (sinal do analito

em absorvância integrada, s) a 95% de nível de confiança foram o fator de diluição da amostra, com melhor resultado para diluição 1+4, uso de modificador químico, com o tubo que teve a plataforma tratada com ródio como modificador permanente (500 µg) apresentando a melhor performance e temperatura de atomização indicando melhor desempenho em 2700 °C.

Tabela 7 – Matriz de experimentos do planejamento fatorial fracionário (2^{4-1}) para vanádio em soro humano.

Leitura	Temperatura de pirólise (°C)	Temperatura de atomização (°C)	Fator de diluição	Modificador	Absorvância integrada (s)*
1	1100 (-)	2300 (-)	1+1 (-)	Sem modif. (-)	0,094
2	1700 (+)	2300 (-)	1+1 (-)	Rh (+)	0,130
3	1100 (-)	2700 (+)	1+1 (-)	Rh (+)	0,336
4	1700 (+)	2700 (+)	1+1 (-)	Sem modif. (-)	0,338
5	1100 (-)	2300 (-)	1+4 (+)	Rh (+)	0,145
6	1700 (+)	2300 (-)	1+4 (+)	Sem modif. (-)	0,104
7	1100 (-)	2700 (+)	1+4 (+)	Sem modif. (-)	0,405
8	1700 (+)	2700 (+)	1+4 (+)	Rh (+)	0,422

* média de triplicatas

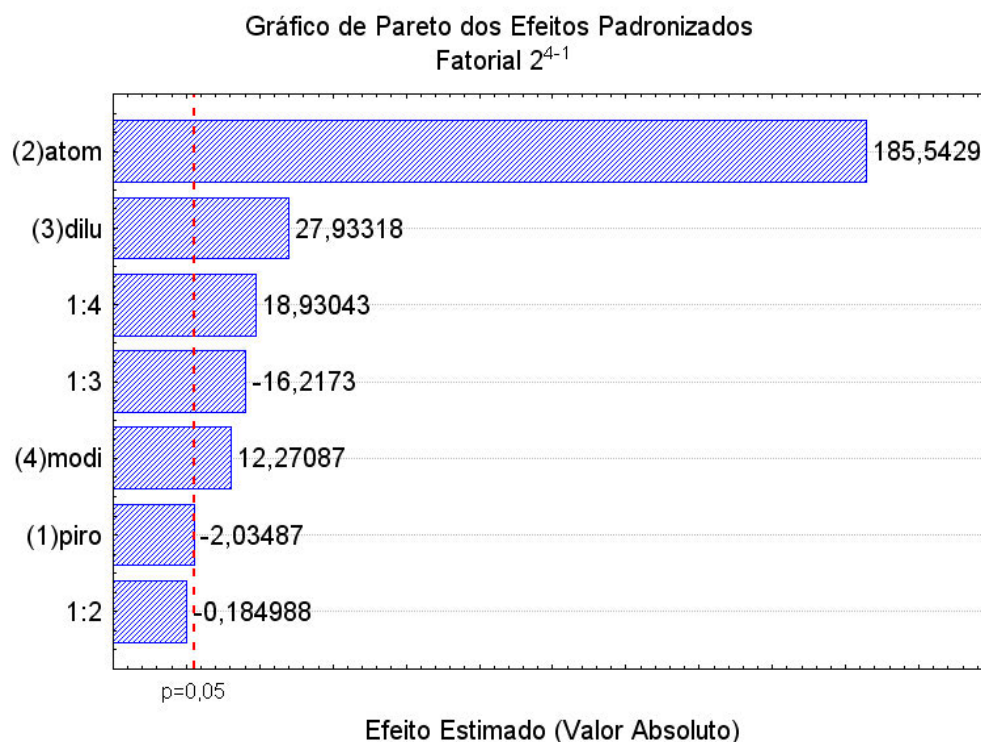


Figura 4 – Gráfico de Pareto gerado no planejamento fatorial fracionário (2^{4-1}) para vanádio em soro humano.

Um segundo estudo foi feito usando-se planejamento Doehlert para refinar as variáveis fator de diluição e temperatura de atomização como mostra a Tabela 8. As leituras 7, 8 e 9 foram realizadas no ponto central. Nesse estudo, utilizou-se o tubo com plataforma tratada com Rh, selecionado no planejamento fatorial, e fixou-se a temperatura de pirólise em 1100 °C, já que o planejamento fatorial mostrou que se trata de um parâmetro não significativo. A Figura 5 mostra a superfície de resposta gerada através desse planejamento onde apenas temperatura de atomização foi significativa. A diluição 1+4 foi escolhida já que uma menor diluição levava a uma absorvância de fundo elevada. A temperatura de atomização teve efeito linear na resposta, indicando que temperaturas elevadas na etapa da atomização levariam a uma maior sensibilidade para a leitura em absorvância integrada. Dessa forma, a melhor temperatura de atomização deve ser igual a 2700 °C, que é o valor máximo alcançado por esse equipamento.

Tabela 8 – Matriz de experimentos do planejamento Doehlert para vanádio em soro humano mantendo-se a temperatura de pirólise em 1100 °C e utilizando-se tubo com a plataforma tratada com ródio.

<i>Leitura</i>	<i>Temperatura de atomização (°C)</i>	<i>Fator de diluição</i>	<i>Absorvância integrada (s)*</i>
1	2700 (1)	1+4 (0)	0,062
2	2600 (0,5)	1+6 (0,866)	0,050
3	2300 (-1)	1+4 (0)	0,009
4	2400 (-0,5)	1+2 (-0,866)	0,016
5	2600 (0,5)	1+2 (-0,866)	0,048
6	2400 (-0,5)	1+6 (0,866)	0,015
7 (PC)	2500 (0)	1+4 (0)	0,028
8 (PC)	2500 (0)	1+4 (0)	0,031
9 (PC)	2500 (0)	1+4 (0)	0,029

* média em duplicata, exceto para as leitura 7,8 e 9.

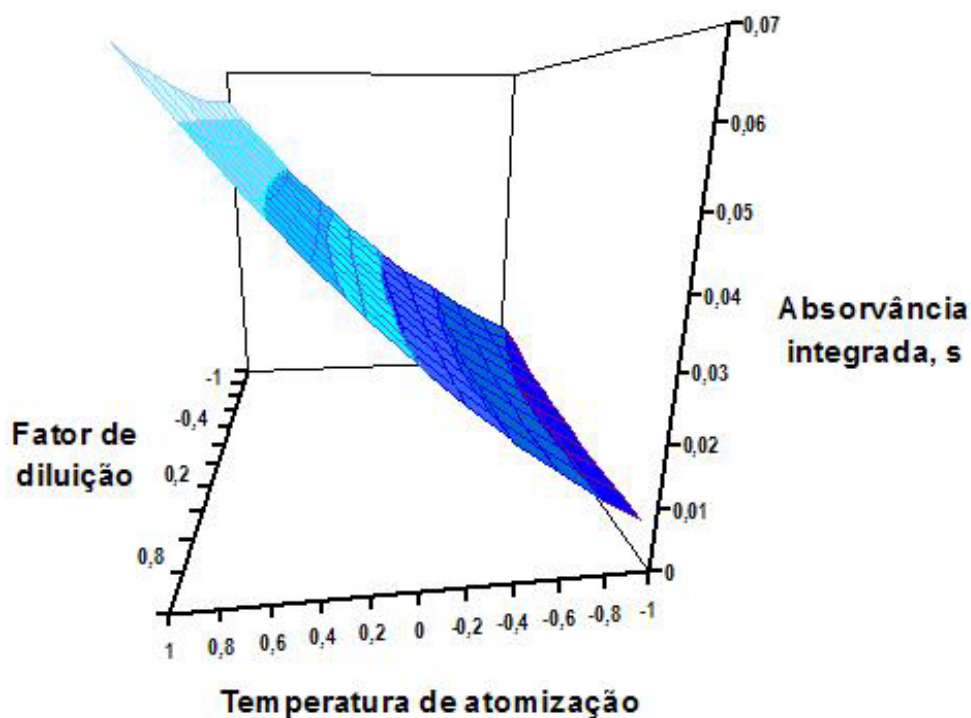


Figura 5 – Superfície de resposta obtida no planejamento Doehlert para vanádio em soro humano.

Tabela 9 – Programa de forno otimizado para determinação de vanádio em soro por GF AAS.

<i>Etapa</i>	<i>Temperatura (°C)</i>	<i>Rampa (s)</i>	<i>Tempo de permanência (s)</i>	<i>Fluxo de argônio (mL min⁻¹)</i>
Secagem	100	10	20	250
Secagem	140	20	20	250
Secagem	200	10	30	250
Pirólise	1100	10	20	250
Atomização*	2700	0	5	0
Limpeza	2700	1	4	250

* leitura nesta etapa

Mesmo com a otimização das temperaturas de pirólise e atomização foi observado que se formavam resíduos sobre a plataforma após várias determinações. Para evitar o acúmulo desses resíduos, foi necessário utilizar uma pré-injeção de 10 µL de solução Triton® X-100 0,1%, seguido apenas da etapa de secagem (Tabela 9).

8.1.2. Validação do método

A Figura 6 apresenta uma média de três curvas de calibração em água e de três curvas de calibração por ajuste de matriz, bem como as equações médias das retas e dos coeficientes de determinação (R^2). O método apresentou resposta linear às concentrações de vanádio compreendidas na faixa de 0 a 30 µg L⁻¹ com coeficientes de determinação maiores que 0,99 para ambas. Foi feita a análise estatística (teste F e teste t de Student) das inclinações das curvas, como descrito no item 6.2, mostrando que há diferença significativa entre as mesmas para o

intervalo de confiança de 95%. Assim, todos os estudos posteriores foram feitos utilizando-se calibração por ajuste de matriz, i. e., para construir cada ponto da curva em que 20 µL são introduzidos, 5 µL são de soro com baixo teor de vanádio e os outros 15 µL de diluente adicionado de concentrações crescentes do analito.

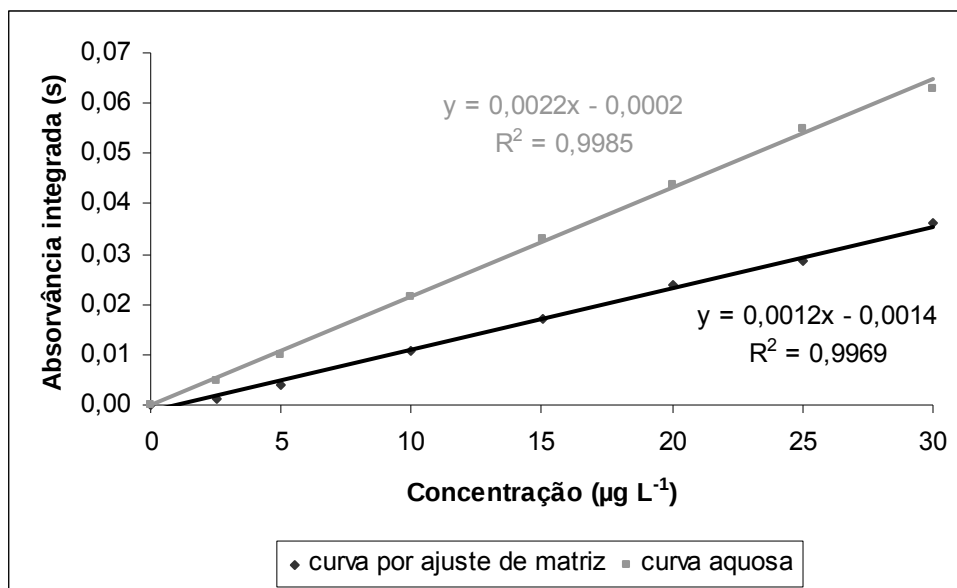


Figura 6 – Estudo do efeito da matriz (seletividade) para determinação de vanádio por GF AAS (n=3).

A Tabela 10 mostra algumas figuras de mérito do presente estudo. Foi observado que a curva de calibração apresentou um coeficiente de correlação linear satisfatório. A massa característica foi determinada através do valor médio calculado para cada um dos pontos da curva de calibração por ajuste de matriz descontados do branco. O valor determinado está de acordo com o valor recomendado pelo fabricante do equipamento. Os valores encontrados para o limite de detecção e de quantificação foram apropriados para determinações de vanádio por GF AAS. Cassela, Oliveira e Magalhães (2007) relatam a determinação direta de vanádio em águas altamente salinas (obtidas em área de exploração de petróleo perto da praia) empregando GF AAS e obtendo um LOD e LOQ de 1,9 µg L⁻¹ e 6,3 µg L⁻¹,

respectivamente. Em outro trabalho, amostras de urina foram adicionadas ao modificador químico fluoreto de bário (100 mg L^{-1}) e ao Triton X-100 na determinação de vanádio por GF AAS obtendo um LOD de $0,54 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$ (FERNANDES et al., 2004).

Na Tabela 11 podem-se observar os valores obtidos para a precisão usando-se a metodologia proposta na seção 6.5. Os valores obtidos estão de acordo com os valores aceitáveis.

A Tabela 12 apresenta as recuperações obtidas para soros diluídos com quantidades de vanádio adicionadas na faixa de 2 a $28 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$, mostrando que todos os resultados estão dentro da faixa de 80 a 120%.

Tabela 10 – Parâmetros de mérito para o método de determinação de vanádio em soro.

<i>Parâmetro</i>	<i>Resultados</i>
Equação de regressão ($n=3$)	$Abs = (0,0012 \pm 0,0002)C_V + (-0,0014 \pm 0,0007)$
R^2 ($n=3$)	$0,993 \pm 0,005$
Faixa linear ($\mu\text{g L}^{-1}$)	0 – 30
LOD ($\mu\text{g L}^{-1}$)	1,4
LOQ ($\mu\text{g L}^{-1}$)	4,5
Massa característica ($n=7$, pg)*	31 ± 4

* massa característica recomendada pelo fabricante para determinação de V em água = 30 pg.

Tabela 11 – Coeficientes de variação intra-ensaio e inter-ensaios obtidos na determinação de vanádio em soro por GF AAS.

<i>Concentração de vanádio ($\mu\text{g L}^{-1}$)</i>	<i>CV intra-ensaio (%, n=7)</i>	<i>CV inter-ensaios (%, n=3)</i>
6	4,2	7,5
12	6,2	5,2
18	2,7	4,0
Média	$4,4 \pm 1,4$	$5,5 \pm 1,8$

Tabela 12 – Recuperações de vanádio em soro por GF AAS.

<i>Concentração de vanádio ($\mu\text{g L}^{-1}$)</i>	<i>Valor determinado ($\mu\text{g L}^{-1}$, n=3)</i>	<i>Recuperação (%, n=3)</i>
2	$2,3 \pm 0,5$	117,0
6	$5,6 \pm 0,4$	93,8
14	$13,8 \pm 0,5$	98,7
18	$18,4 \pm 0,3$	102,3
24	$24,6 \pm 0,7$	102,6
28	$28,3 \pm 0,1$	100,9

8.1.3. Determinação dos níveis de vanádio em amostras de soro por GF AAS

Na Tabela 13 estão apresentados os níveis de vanádio determinados em soros de vinte voluntários. Pode ser visto que os níveis de vanádio encontrado nos soros destas pessoas abrangem uma faixa de 8,1 a 16,0 $\mu\text{g L}^{-1}$.

Tabela 13 – Nível de vanádio em soro de pessoas sadias obtido com o método proposto.

<i>Indivíduo</i>	<i>Nível de vanádio ($\mu\text{g L}^{-1}$)</i>	<i>Indivíduo</i>	<i>Nível de vanádio ($\mu\text{g L}^{-1}$)</i>
1	12,8 $\pm$ 0,7	11	11,3 $\pm$ 0,4
2	12,5 $\pm$ 0,2	12	11,9 $\pm$ 0,2
3	12,4 $\pm$ 0,5	13	13,2 $\pm$ 0,8
4	12,5 $\pm$ 0,4	14	12,6 $\pm$ 0,6
5	11,4 $\pm$ 0,4	15	11,8 $\pm$ 0,4
6	16,0 $\pm$ 1,0	16	12,9 $\pm$ 0,6
7	13,5 $\pm$ 0,9	17	12,0 $\pm$ 0,7
8	11,2 $\pm$ 0,2	18	8,8 $\pm$ 0,4
9	12,1 $\pm$ 0,8	19	12,9 $\pm$ 0,6
10	10,7 $\pm$ 0,2	20	8,1 $\pm$ 0,7

8.1.4. Conclusões para vanádio em soro

Vanádio pode ser determinado diretamente, sem necessidade de digestão prévia das amostras empregando-se a técnica de GF AAS, com tubo de grafite com plataforma integrada tratada com ródio (500 μg) como modificador permanente;

As amostras devem ser diluídas 1+4 com ácido nítrico 1% v/v Triton® X-100 0,1% v/v;

As temperaturas ótimas para a pirólise e atomização são, respectivamente, de 1100 e 2700 °C;

A presença da matriz provoca uma diminuição de sensibilidade e a calibração deve ser feita por ajuste de matriz.

O método se mostrou exato e preciso para determinar níveis traço de vanádio em soro humano.

8.2. Determinação de antimônio em soro humano por GF AAS

8.2.1. Otimização das condições analíticas

Aleatoriamente uma amostra de soro foi selecionada do grupo de pessoas saudáveis para estudos posteriores (amostra de referência). A amostra de referência diluída 1+4 com ácido nítrico 1% v/v e Triton® X-100 0,1% v/v foi contaminada com 30 µg L⁻¹ de antimônio e utilizada na otimização.

Foram utilizadas as mesmas condições para a etapa de secagem otimizada para a determinação de vanádio em soro. Após, foram selecionados os dois melhores modificadores para o planejamento fatorial. Foram testados diferentes tubos de grafite com plataformas integradas sendo: tubos com plataforma tratada com modificador químico permanente (tungstênio, ródio, rutênio, irídio, tântalo, nióbio ou zircônio) e tubo com plataforma não tratada com modificador químico permanente. Nesses experimentos foram utilizados as temperaturas e tempos de pirólise e atomização recomendados pelo fabricante. Os melhores resultados foram obtidos para os tubos com plataformas tratadas com zircônio e com tântalo. Um planejamento fatorial (2³) (Tabela 14) foi feito para avaliação preliminar das variáveis temperaturas de pirólise e atomização e uso de modificador químico. Através do gráfico de Pareto (Figura 7), nota-se que todas as variáveis apresentaram efeito significativo na resposta (sinal do analito em absorvância integrada, s) a 95% de nível de confiança. O gráfico de Pareto mostra que os melhores resultados para as temperaturas de pirólise e de atomização foram 800 e 2000 °C, respectivamente, e que o tubo de grafite com a melhor performance foi o que teve a plataforma tratada com zircônio como modificador permanente (500 µg).

Tabela 14 – Matriz de experimentos do planejamento fatorial (2^3) para antimônio em soro humano.

<i>Leitura</i>	<i>Temperatura de atomização (°C)</i>	<i>Temperatura de pirólise (°C)</i>	<i>Modificador</i>	<i>Absorvância integrada (s)*</i>
1	2000 (-)	800 (-)	Zr (-)	0,229
2	2400 (+)	800 (-)	Zr (-)	0,182
3	2000 (-)	1500 (+)	Zr (-)	0,145
4	2400 (+)	1500 (+)	Zr (-)	0,123
5	2000 (-)	800 (-)	Ta (+)	0,221
6	2400 (+)	800 (-)	Ta (+)	0,193
7	2000 (-)	1500 (+)	Ta (+)	0,057
8	2400 (+)	1500 (+)	Ta (+)	0,052

* média de triplicatas

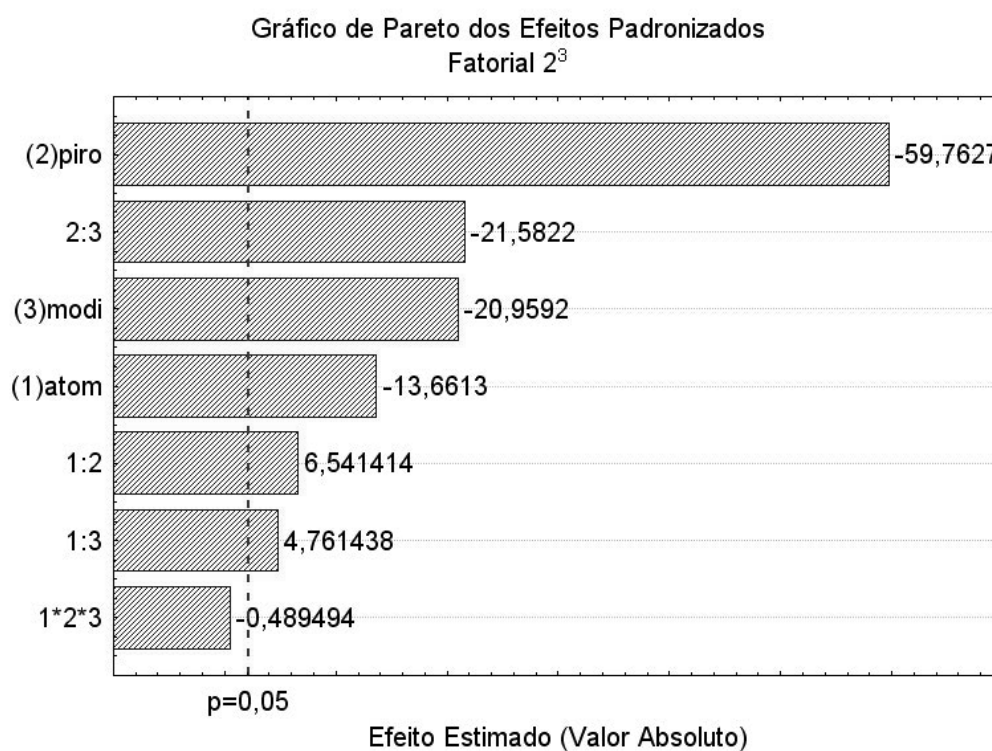


Figura 7 – Gráfico de Pareto gerado no planejamento fatorial (2^3) para antimônio em soro humano.

Um planejamento CCD foi usado para determinar os valores ótimos para as temperaturas de pirólise e de atomização como está descrito na Tabela 15. Nesse estudo utilizou-se o tubo com plataforma tratada com Zr. A Figura 8 mostra a superfície de resposta obtida através desse planejamento. Os valores críticos para as temperaturas de pirólise e de atomização foram obtidos através da equação matemática (19). A Tabela 16 mostra as condições otimizadas para o programa de aquecimento do forno.

$$Abs = - 0,0000008T_a^2 - 0,0000008T_p^2 - 0,0000002T_a^2T_p^2 + 0,0034T_a + 0,0018T_p - 4,1786 \quad (19)$$

onde,

Abs = absorvância integrada, s

T_a = temperatura de atomização

T_p = temperatura de pirólise

Tabela 15 – Matriz de experimentos do planejamento CCD para antimônio em soro humano utilizando-se tubo com a plataforma tratada com zircônio.

<i>Leitura</i>	<i>Temperatura de pirólise (°C)</i>	<i>Temperatura de atomização (°C)</i>	<i>Absorvância integrada (s)*</i>
1	800 (-1)	1800 (-1)	0,270
2	800 (-1)	2200 (1)	0,224
3	1000 (1)	1800 (-1)	0,245
4	1000 (1)	2200 (1)	0,184
5	760 (-1,414)	2000 (0)	0,262
6	1040 (1,414)	2000 (0)	0,203
7	900 (0)	1720 (-1,414)	0,245
8	900 (0)	2280 (1,414)	0,203
9 (PC)	900 (0)	2000 (0)	0,221
10 (PC)	900 (0)	2000 (0)	0,231
11 (PC)	900 (0)	2000 (0)	0,230
12 (PC)	900 (0)	2000 (0)	0,226
13 (PC)	900 (0)	2000 (0)	0,224

* média em duplicata, exceto para as leituras no ponto central.

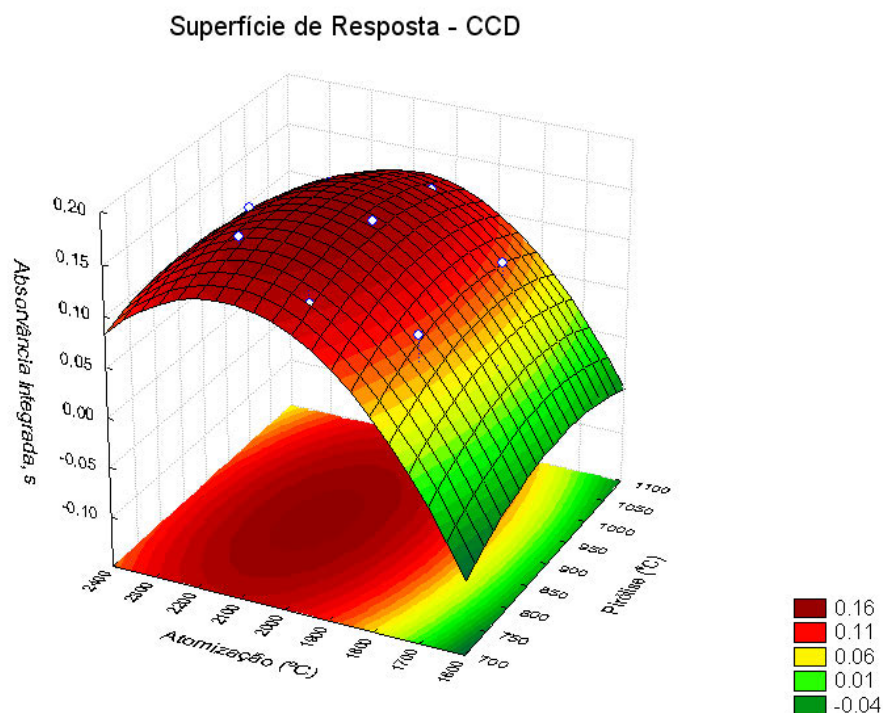


Figura 8 – Superfície de resposta obtida no planejamento CCD para antimônio em soro humano.

Tabela 16 – Programa de forno otimizado para determinação de antimônio em soro por GF AAS.

<i>Etapa</i>	<i>Temperatura (°C)</i>	<i>Rampa (s)</i>	<i>Tempo de permanência (s)</i>	<i>Fluxo de argônio (mL min⁻¹)</i>
Secagem	100	10	20	250
Secagem	140	20	20	250
Secagem	200	10	30	250
Pirólise	800	10	30	250
Atomização*	2100	0	6	0
Limpeza	2600	1	5	250

* leitura nesta etapa

Para evitar o acúmulo de resíduos na plataforma, foi necessário utilizar uma pré-injeção de 10 µL de solução Triton® X-100 0,1%, seguido apenas da etapa de secagem (Tabela 16).

8.2.2. Validação do método

As curvas de calibração em água e de calibração por ajuste de matriz podem ser vistas na Figura 9, assim como as equações das retas e os coeficientes de determinação (R^2). O método apresentou resposta linear às concentrações de vanádio compreendidas na faixa de 0 a 30,0 $\mu\text{g L}^{-1}$ com coeficientes de determinação maiores que 0,99 para ambas. A análise estatística (teste F e teste t de Student) das inclinações das curvas foi realizada conforme descrito no item 6.2, mostrando-se que não há diferença significativa entre as mesmas para o intervalo de confiança de 95%. Assim, todos os estudos posteriores foram feitos utilizando-se calibração em água.

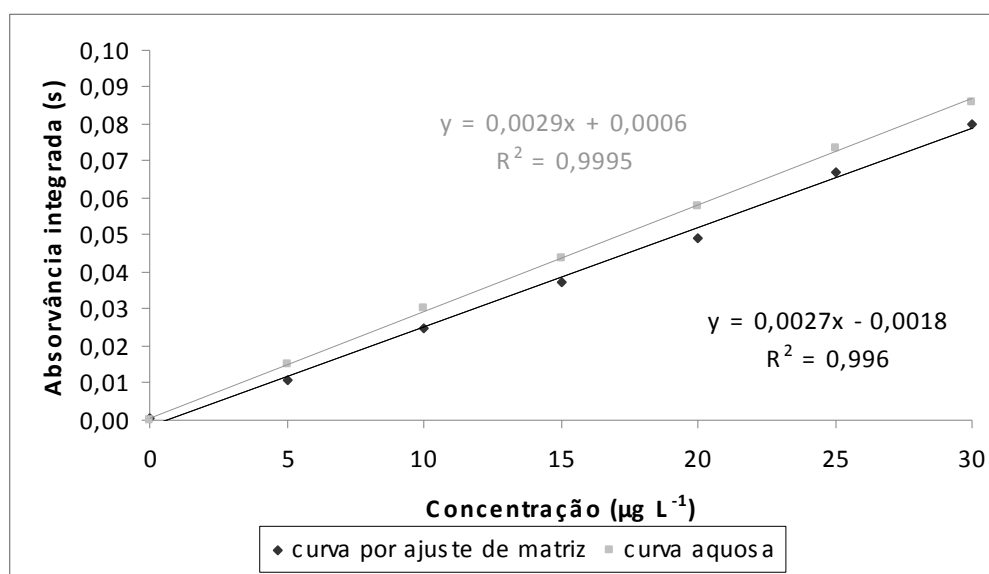


Figura 9 – Estudo do efeito da matriz (seletividade) para determinação de antimônio por GF AAS (n=3).

A Tabela 17 apresenta algumas figuras de mérito do presente estudo. A curva de calibração apresentou um coeficiente de correlação linear satisfatório. Os valores obtidos para o limite de detecção e de quantificação foram adequados para

determinações de antimônio por GF AAS. Pode-se observar ainda que a sensibilidade analisada pela massa característica é quase a metade da recomendada pelo fabricante para padrão de antimônio em água. Silva et al. (2006) descrevem um método para determinação direta de antimônio no soro de ratos por GF AAS, utilizando-se uma mistura de Zr e Rh como modificador permanente e obtendo-se uma massa característica de 30 pg e um LOD de $0,6 \mu\text{g L}^{-1}$. Na determinação de Sb (III) e Sb(V) em fígado e em sangue por FI-HG AAS foi relatado LOD de $1,0 \mu\text{g L}^{-1}$ para Sb (III) e LOD de $0,5 \mu\text{g L}^{-1}$ para Sb (V) (PEÑA et al., 2001).

Na Tabela 18 podem-se observar os valores obtidos para a precisão, usando-se a metodologia proposta na secção 6.5. Os valores obtidos estão de acordo com os valores aceitáveis.

A Tabela 19 apresenta as recuperações obtidas para soros diluídos com quantidades de antimônio adicionadas na faixa de 5 a $30 \mu\text{g L}^{-1}$, mostrando que todos os resultados estão incluídos na faixa de 80 a 120%.

Tabela 17 – Parâmetros de mérito para o método de determinação de antimônio em soro.

<i>Parâmetro</i>	<i>Resultados</i>
Equação de regressão ($n=3$)	$Abs = (0,0029 \pm 0,0003)C_{Sb} + (0,0006 \pm 0,0006)$
R^2 ($n=3$)	$0,9977 \pm 0,0005$
Faixa linear ($\mu\text{g L}^{-1}$)	0 – 30
LOD ($\mu\text{g L}^{-1}$)	0,3
LOQ ($\mu\text{g L}^{-1}$)	1,0
Massa característica ($n=6$, pg)*	13 ± 1

* massa característica recomendada pelo fabricante para determinação de Sb em água = 22 pg.

Tabela 18 – Coeficientes de variação intra-ensaio e inter-ensaios obtidos na determinação de antimônio em soro por GF AAS.

<i>Concentração de antimônio ($\mu\text{g L}^{-1}$)</i>	<i>CV intra-ensaio (%, n=7)</i>	<i>CV inter-ensaios (%, n=3)</i>
12,5	2,8	5,1
17,5	2,6	4,3
22,5	2,6	5,6
Média	$2,7 \pm 0,1$	$5,0 \pm 0,6$

Tabela 19 – Recuperações de antimônio em soro por GF AAS.

<i>Concentração de antimônio ($\mu\text{g L}^{-1}$)</i>	<i>Valor determinado ($\mu\text{g L}^{-1}$, n=7)</i>	<i>Recuperação (%, n=7)</i>
12,5	$12,7 \pm 0,4$	101,6
17,5	$17,6 \pm 0,4$	100,6
22,5	$22,4 \pm 0,6$	99,5

8.2.3. Determinação dos níveis de antimônio em amostras de soro por GF AAS

Na Tabela 20 estão apresentados os níveis de antimônio determinados em soros de sessenta voluntários de Belo Horizonte, Brasil. Os níveis de antimônio encontrado nos soros destas pessoas variam desde $< 0,3 \mu\text{g L}^{-1}$ até $10,9 \mu\text{g L}^{-1}$.

Tabela 20 – Nível de antimônio no soro de voluntários obtido com o método proposto.

<i>Indivíduo</i>	<i>Nível de antimônio ($\mu\text{g L}^{-1}$)</i>	<i>Indivíduo</i>	<i>Nível de antimônio ($\mu\text{g L}^{-1}$)</i>	<i>Indivíduo</i>	<i>Nível de antimônio ($\mu\text{g L}^{-1}$)</i>
1	5,8 $\pm$ 0,4	21	< LOD	41	< LOD
2	< LOD	22	2,1 $\pm$ 0,9	42	4,9 $\pm$ 0,9
3	< LOD	23	7,1 $\pm$ 1,2	43	< LOD
4	7,6 $\pm$ 0,8	24	< LOD	44	< LOD
5	5,8 $\pm$ 0,4	25	< LOD	45	9,1 $\pm$ 0,0
6	< LOD	26	< LOD	46	< LOD
7	< LOD	27	7,2 $\pm$ 0,4	47	< LOD
8	< LOD	28	3,1 $\pm$ 0,8	48	7,4 $\pm$ 1,2
9	6,7 $\pm$ 0,8	29	< LOD	49	< LOD
10	6,1 $\pm$ 0,8	30	9,6 $\pm$ 0,4	50	2,0 $\pm$ 0,4
11	< LOD	31	9,1 $\pm$ 1,5	51	6,4 $\pm$ 0,4
12	< LOD	32	< LOD	52	< LOD
13	< LOD	33	< LOD	53	1,4 $\pm$ 0,5
14	5,4 $\pm$ 0,0	34	7,6 $\pm$ 0,8	54	< LOD
15	7,9 $\pm$ 0,4	35	< LOD	55	< LOD
16	< LOD	36	1,9 $\pm$ 1,2	56	2,1 $\pm$ 0,5
17	< LOD	37	6,4 $\pm$ 1,2	57	1,6 $\pm$ 0,0
18	10,9 $\pm$ 1,2	38	< LOD	58	< LOD
19	8,9 $\pm$ 0,4	39	< LOD	59	< LOD
20	< LOD	40	7,9 $\pm$ 1,2	60	< LOD

8.2.4. Conclusões para antimônio em soro

Antimônio pode ser determinado diretamente, sem necessidade de digestão prévia das amostras, empregando-se a técnica de GF AAS, com tubo de grafite com plataforma integrada tratada com zircônio (500 µg) como modificador permanente;

As amostras devem ser diluídas 1+4 com ácido nítrico 1% v/v Triton® X-100 0,1% v/v;

As temperaturas ótimas para a pirólise e atomização são respectivamente de 800 e 2100 °C;

A otimização multivariada aliada ao uso de modificador químico permanente forneceu um aumento de sensibilidade na determinação de Sb por GF AAS em relação à obtida pelo fabricante para matriz aquosa utilizando modificador químico universal. A eficiente eliminação da matriz foi outro resultado alcançado, que eliminou o efeito de matriz e possibilitou o uso de calibração aquosa;

A exatidão, investigada em estudos de recuperação para diferentes concentrações do metal em soro, e a precisão estão dentro dos limites aceitáveis.

8.3. Determinação de cromo em soro humano por GF AAS

8.3.1. Otimização das condições analíticas

Aleatoriamente uma amostra de soro foi selecionada do grupo de pessoas saudáveis para estudos posteriores (amostra de referência). A amostra de referência diluída 1+4 com ácido nítrico 1% e Triton® X-100 0,1% foi contaminada com 5 µg L⁻¹ de cromo e utilizada na otimização.

Utilizando-se a etapa de secagem otimizada no estudo de determinação de vanádio em soro e as temperaturas e tempos de pirólise e atomização recomendados pelo fabricante, foram testados diferentes tubos de grafite com

plataformas integradas sendo: tubos com plataforma tratada com modificador químico permanente (tungstênio, ródio, rutênio, irídio, tântalo, nióbio ou zircônio) e tubo com plataforma não tratada com modificador químico. Os melhores resultados foram obtidos para os tubos com plataformas tratadas com rutênio e com tungstênio. Um planejamento fatorial (2^3) (Tabela 21) foi feito para avaliação preliminar das variáveis temperaturas de pirólise e atomização e uso de modificador químico. Através do gráfico de Pareto (Figura 10), nota-se que todas as variáveis apresentaram efeito significativo na resposta (sinal do analito em absorvância integrada, s) a 95% de nível de confiança. O gráfico de Pareto mostra que os melhores resultados para as temperaturas de pirólise e de atomização foram 1600 e 2500 °C, respectivamente, e que o tubo de grafite com a melhor performance foi o que teve a plataforma tratada com tungstênio como modificador permanente (500 µg).

Tabela 21 – Matriz de experimentos do planejamento fatorial (2^3) para cromo em soro humano.

<i>Leitura</i>	<i>Temperatura de atomização (°C)</i>	<i>Temperatura de pirólise (°C)</i>	<i>Modificador</i>	<i>Absorvância integrada (s)*</i>
1	2100 (-)	1600 (-)	Ru (-)	0,049
2	2500 (+)	1600 (-)	Ru (-)	0,166
3	2100 (-)	2000 (+)	Ru (-)	0,003
4	2500 (+)	2000 (+)	Ru (-)	0,067
5	2100 (-)	1600 (-)	W (+)	0,026
6	2500 (+)	1600 (-)	W (+)	0,284
7	2100 (-)	2000 (+)	W (+)	0,013
8	2500 (+)	2000 (+)	W (+)	0,259

* média de triplicatas

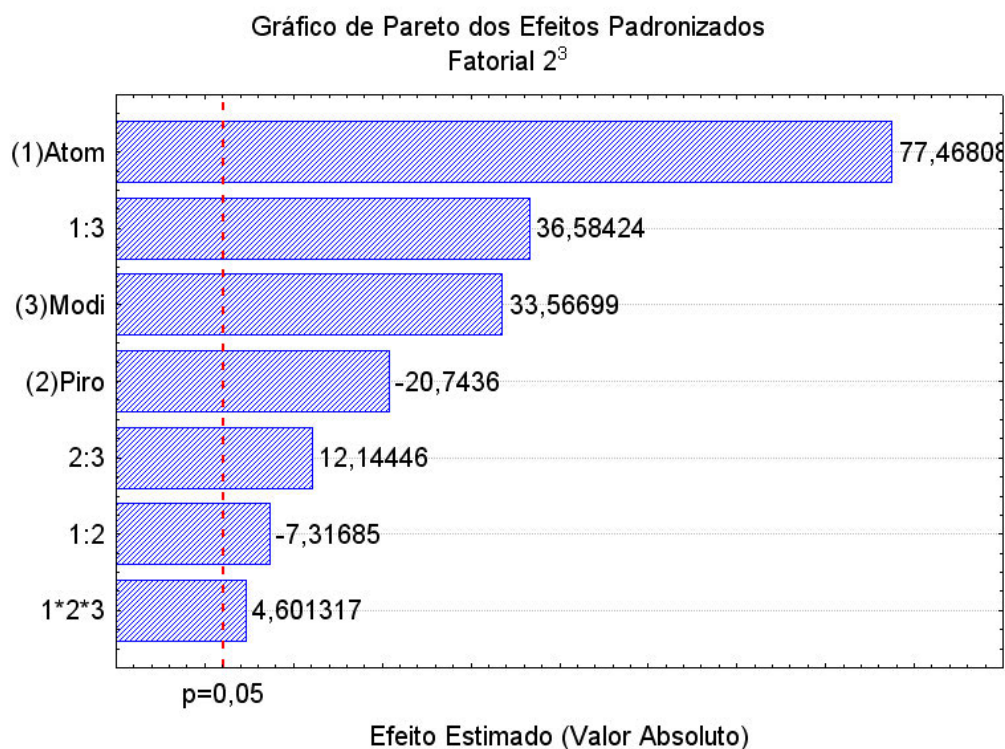


Figura 10 – Gráfico de Pareto gerado no planejamento fatorial (2³) para cromo em soro humano.

Um planejamento CCD foi usado para determinar os valores ótimos para as temperaturas de pirólise e de atomização como está descrito na Tabela 22. Nesse estudo utilizou-se o tubo com plataforma tratada com W. A Figura 11 mostra a superfície de resposta obtida através desse planejamento. Os valores críticos para as temperaturas de pirólise e de atomização foram obtidos através da equação matemática (20). A Tabela 23 mostra as condições otimizadas para o programa de aquecimento do forno.

$$Abs = - 0,00000289T_a^2 - 0,000000076T_p^2 - 0,000000491T_a^2T_p^2 + 0,0159T_a + 0,00152T_p - 21,730 \quad (20)$$

onde,

Abs = absorvância integrada, s

T_a = temperatura de atomização

T_p = temperatura de pirólise

Tabela 22 – Matriz de experimentos do planejamento CCD para cromo em soro humano utilizando-se tubo com a plataforma tratada com tungstênio.

<i>Leitura</i>	<i>Temperatura de atomização (°C)</i>	<i>Temperatura de pirólise (°C)</i>	<i>Absorvância integrada (s)*</i>
1	2530 (-1)	1300 (-1)	0,183
2	2530 (-1)	1700 (1)	0,202
3	2670 (1)	1300 (-1)	0,218
4	2670 (1)	1700 (1)	0,209
5	2500 (-1,414)	1500 (0)	0,192
6	2700 (1,414)	1500 (0)	0,206
7	2600 (0)	1220 (-1,414)	0,218
8	2600 (0)	1780 (1,414)	0,225
9 (PC)	2600 (0)	1500 (0)	0,207
10 (PC)	2600 (0)	1500 (0)	0,218
11 (PC)	2600 (0)	1500 (0)	0,224
12 (PC)	2600 (0)	1500 (0)	0,221
13 (PC)	2600 (0)	1500 (0)	0,223

* média em duplicata, exceto para as leituras no ponto central.

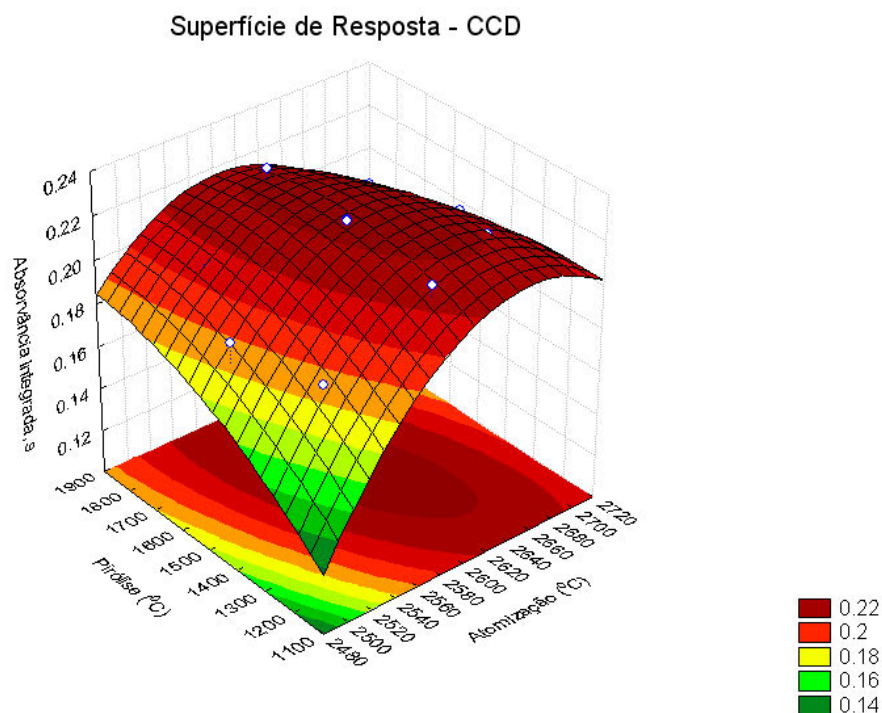


Figura 11 – Superfície de resposta obtida no planejamento CCD para cromo em soro humano.

Tabela 23 – Programa de forno otimizado para determinação de cromo em soro por GF AAS.

<i>Etapa</i>	<i>Temperatura (°C)</i>	<i>Rampa (s)</i>	<i>Tempo de permanência (s)</i>	<i>Fluxo de argônio (l min⁻¹)</i>
Secagem	100	10	20	250
Secagem	140	20	20	250
Secagem	200	10	30	250
Pirólise	1520	10	20	250
Atomização*	2620	0	10	0
Limpeza	2700	1	5	250

* leitura nesta etapa

Para evitar o acúmulo de resíduos na plataforma, foi necessário utilizar uma pré-injeção de 10 µL de solução Triton® X-100 0,1%, seguido apenas da etapa de secagem (Tabela 23).

8.3.2. Validação do método

As curvas de calibração em água e de calibração por ajuste de matriz podem ser vistas na Figura 12, assim como as equações das retas e os coeficientes de determinação (R^2). O método apresentou resposta linear às concentrações de cromo compreendidas na faixa de 0 a 12 $\mu\text{g L}^{-1}$ com coeficientes de determinação maiores que 0,99 para ambas. A análise estatística (teste F e teste t de Student) das inclinações das curvas foi realizada conforme descrito no item 6.2, mostrando que não há diferença significativa entre as mesmas para o intervalo de confiança de 95%. Assim, todos os estudos posteriores foram feitos utilizando-se calibração em água.

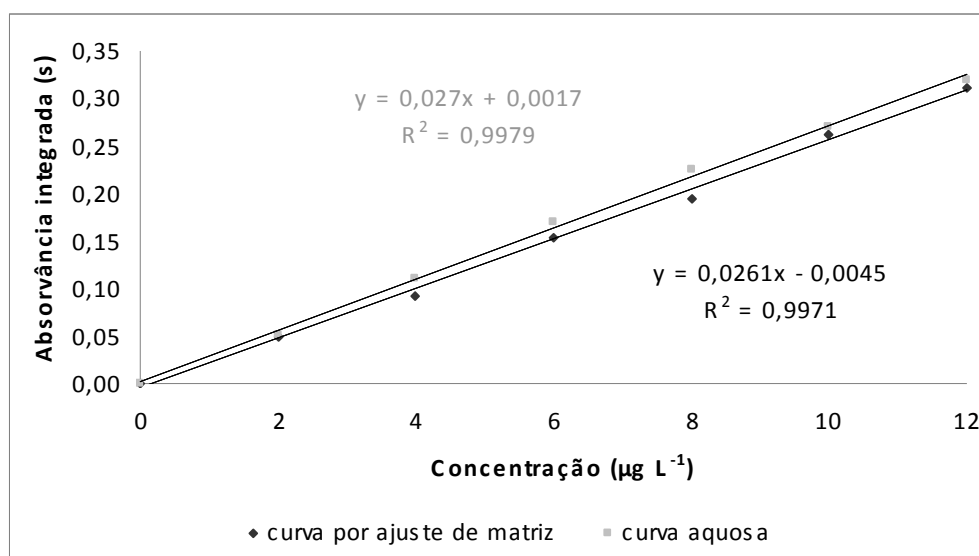


Figura 12 – Estudo do efeito da matriz (seletividade) para determinação de cromo por GF AAS (n=3).

A Tabela 24 apresenta algumas figuras de mérito do presente estudo. A curva de calibração aquosa apresentou um coeficiente de correlação linear satisfatório. Os valores obtidos para o limite de detecção e de quantificação foram adequados para

determinações de cromo por GF AAS. O valor obtido para massa característica foi bem próximo ao valor recomendado para determinação de Cr em água. Determinação direta de cromo em soro e urina por GF AAS foi realizada obtendo-se um LOD de $0,8 \mu\text{g L}^{-1}$ para ambas as matrizes com o uso de H_2O_2 como modificador em solução (TODOROVSKA et al., 2007). Em outro trabalho, Barbosa et al. (2004) determinaram cromo em amostras de urina, utilizando W como modificador permanente e conseguindo valores de $3,1 \text{ pg}$ para massa característica e $0,10 \mu\text{g L}^{-1}$ para o limite de detecção.

Na Tabela 25 podem-se observar os valores obtidos para a precisão usando-se a metodologia proposta na secção 6.5. Os valores obtidos estão de acordo com os valores aceitáveis.

A Tabela 26 apresenta as recuperações obtidas para soros diluídos com quantidades de cromo adicionadas na faixa de 2 a $12 \mu\text{g L}^{-1}$, mostrando que todos os resultados estão incluídos na faixa de 80 a 120%.

Tabela 24 – Parâmetros de mérito para o método de determinação de cromo em soro.

<i>Parâmetro</i>	<i>Resultados</i>
Equação de regressão ($n=3$)	$Abs = (0,027 \pm 0,001)C_{Cr} + (0,0017 \pm 0,0041)$
R^2 ($n=3$)	$0,9947 \pm 0,0008$
Faixa linear ($\mu\text{g L}^{-1}$)	0 – 12
LOD ($\mu\text{g L}^{-1}$)	0,3
LOQ ($\mu\text{g L}^{-1}$)	0,9
Massa característica (pg)*	$3,2 \pm 0,1$

* massa característica recomendada pelo fabricante para determinação de Cr em água = $3,0 \text{ pg}$.

Tabela 25 – Coeficientes de variação intra-ensaio e inter-ensaios obtidos na determinação de cromo em soro por GF AAS.

<i>Concentração de cromo ($\mu\text{g L}^{-1}$)</i>	<i>CV intra-ensaio (%, n=7)</i>	<i>CV inter-ensaios (%, n=3)</i>
3	5,5	9,9
7	4,6	6,2
11	3,0	7,7
Média	$4,4 \pm 1,3$	$7,9 \pm 1,9$

Tabela 26 – Recuperações de cromo em soro por GF AAS.

<i>Concentração de cromo ($\mu\text{g L}^{-1}$)</i>	<i>Valor determinado ($\mu\text{g L}^{-1}$, n=7)</i>	<i>Recuperação (%, n=7)</i>
3	$3,0 \pm 0,2$	99,4
7	$6,3 \pm 0,3$	89,6
11	$9,8 \pm 0,3$	89,1

8.3.3. Determinação dos níveis de cromo em amostras de soro por GF AAS

Na Tabela 27 são apresentados os níveis de cromo determinados no soro de sessenta voluntários de Belo Horizonte, Brasil. Os níveis de cromo encontrado nos soros destas pessoas abrangem a faixa de 1,4 a 41,8 $\mu\text{g L}^{-1}$.

Tabela 27 – Nível de cromo no soro de voluntários obtido com o método proposto.

<i>Indivíduo</i>	<i>Nível de cromo ($\mu\text{g L}^{-1}$)</i>	<i>Indivíduo</i>	<i>Nível de cromo ($\mu\text{g L}^{-1}$)</i>	<i>Indivíduo</i>	<i>Nível de cromo ($\mu\text{g L}^{-1}$)</i>
1	3,03	21	5,04	41	8,67
2	3,91	22	< LOD	42	2,41
3	23,58	23	28,97	43	6,79
4	3,66	24	< LOD	44	4,54
5	< LOD	25	17,82	45	9,42
6	< LOD	26	2,03	46	3,78
7	14,56	27	25,96	47	3,78
8	2,16	28	7,17	48	2,78
9	3,72	29	< LOD	49	2,78
10	< LOD	30	< LOD	50	2,28
11	2,16	31	< LOD	51	3,28
12	1,40	32	26,72	52	7,29
13	< LOD	33	4,41	53	3,03
14	< LOD	34	5,41	54	4,91
15	< LOD	35	41,75	55	4,54
16	4,52	36	< LOD	56	6,92
17	< LOD	37	< LOD	57	9,67
18	12,06	38	27,72	58	3,16
19	13,87	39	< LOD	59	1,78
20	10,30	40	< LOD	60	2,91

8.3.4. Conclusões para cromo em soro

Cromo pode ser determinado diretamente, sem necessidade de digestão prévia das amostras, empregando-se a técnica de GF AAS, com tubo de grafite com plataforma integrada tratada com tungstênio (500 µg) como modificador permanente;

As amostras devem ser diluídas 1+4 com ácido nítrico 1% v/v e Triton® X-100 0,1% v/v;

As temperaturas ótimas para a pirólise e atomização são respectivamente de 1520 e 2620 °C;

Uma sensibilidade tão boa quanto à obtida pelo fabricante em matriz aquosa utilizando $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$ como modificador químico em solução foi alcançada na determinação de Cr em soro humano utilizando W como modificador permanente. Uma eficiente eliminação da matriz na etapa de pirólise eliminou o efeito de matriz e possibilitou o uso de calibração aquosa;

O ensaios de validação realizados sob as condições otimizadas mostraram bons resultados de precisão e de exatidão para o método proposto.

8.4. Determinação de chumbo em sangue humano por GF AAS

8.4.1. Otimização das condições analíticas

Uma amostra de sangue de controle inter-laboratorial de qualidade do governo de Aragon na Espanha enriquecida com $443 \pm 50 \mu\text{g L}^{-1}$ de Pb foi utilizada na otimização (amostra de referência).

A temperatura e o tempo de secagem foram otimizados, a partir das condições recomendadas pelo fabricante, até não se observar borbulhamento da

amostra dentro do forno de grafite, utilizando-se a amostra de referência diluída 1+4 ou 1+9 com ácido nítrico 0,2% e Triton® X-100 0,2%. As leituras com a diluição 1+4 apresentaram valores de absorvância de fundo elevados, dessa forma os estudos posteriores foram realizados com a diluição 1+9. Foram avaliadas as leituras em altura ou em área do pico e a leitura em altura se mostrou mais sensível (já que o pico é bem simétrico e afilado). Em seguida foi feita a escolha dos modificadores para o programa fatorial, utilizando-se temperaturas e tempos de pirólise e atomização recomendados pelo fabricante. Foram testados diferentes tubos de grafite com plataformas de L'Vov sendo: tubos com a plataforma tratada com modificadores permanentes (tungstênio, ródio, rutênio, e irídio), tubo sem tratamento da plataforma com modificador permanente porém adicionado de paládio (modificador químico em solução) e tubo com plataforma não tratada e sem utilizar qualquer tipo de modificador químico. Os dois tipos de tubos de grafite que apresentaram os melhores desempenhos foram os que tiveram a plataforma tratada com tungstênio e irídio. Um planejamento fatorial fracionário (2^{4-1}) (Tabela 28) foi feito para avaliação preliminar das variáveis tempo de pirólise, temperaturas de pirólise e atomização e uso de modificador químico. Apenas a variável tempo de pirólise não teve efeito significativo na resposta (sinal do analito em absorvância) a 95% de nível de confiança. O gráfico de Pareto (Figura 13) mostra que os melhores resultados para as temperaturas de pirólise e de atomização foram 500 e 2500 °C, respectivamente, e que o tubo de grafite com a melhor performance foi o que teve a plataforma tratada com tungstênio como modificador permanente (520 µg).

Tabela 28 – Matriz de experimentos do planejamento fatorial fracionário (2^{4-1}) para chumbo em sangue humano.

<i>Leitura</i>	<i>Temperatura de pirólise (°C)</i>	<i>Temperatura de atomização (°C)</i>	<i>Modificador</i>	<i>Tempo de pirólise (s)</i>	<i>Absorvância*</i>
1	500 (-)	1700 (-)	W (-)	30 (-)	0,3363
2	800 (+)	1700 (-)	W (-)	60 (+)	0,0649
3	500 (-)	2500 (+)	W (-)	60 (+)	0,3514
4	800 (+)	2500 (+)	W (-)	30 (-)	0,1791
5	500 (-)	1700 (-)	Ir (+)	60 (+)	0,1098
6	800 (+)	1700 (-)	Ir (+)	30 (-)	0,0974
7	500 (-)	2500 (+)	Ir (+)	30 (-)	0,2313
8	800 (+)	2500 (+)	Ir (+)	60 (+)	0,2831

* média de triplicatas

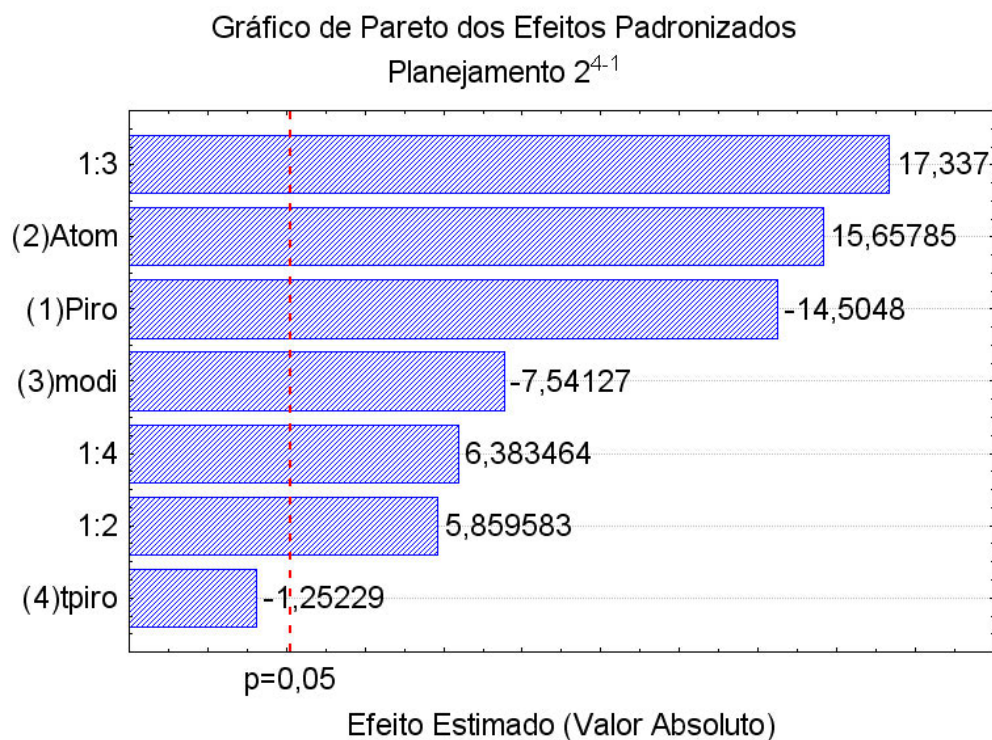


Figura 13 – Gráfico de Pareto gerado no planejamento fatorial fracionário (2^{4-1}) para chumbo em sangue humano.

Um planejamento Doehlert foi realizado para determinação dos valores ótimos para as temperaturas de pirólise e atomização como está descrito na Tabela 29. Como os resultados obtidos pelo planejamento fatorial mostraram que a variável tempo de pirólise não causa efeito significativo na absorvância, foi escolhido o tempo de pirólise de 50 s, necessário para obter uma queda significativa no valor de background. Considerando os resultados do planejamento fatorial, foi realizado um planejamento Doehlert, com o uso de W, para determinação das condições críticas para as temperaturas de pirólise e atomização. Os resultados obtidos em absorvância não apresentaram variação significativa para gerar superfície de resposta e, para alguns ensaios os valores de background foram bastante elevados. Tendo em vista esses fatos optamos por usar o background como resposta para o planejamento Doehlert, procurando condições otimizadas para os menores valores de background. A Figura 14 mostra a superfície de resposta obtida através desse planejamento. Os valores críticos para as temperaturas de pirólise e de atomização foram obtidas através da equação matemática (21). A Tabela 30 mostra as condições otimizadas para o programa de aquecimento do forno.

$$Abs = 0,157T_a^2 + 0,293T_p^2 + 0,075T_aT_p - 0,11T_a - 0,404T_p + 0,461 \quad (21)$$

onde,

Abs = absorvância de fundo

T_a = temperatura de atomização

T_p = temperatura de pirólise

A decodificação foi feita através da equação (5) descrita na seção 5.2.2.

Tabela 29 – Matriz de experimentos do planejamento Doehlert para chumbo em sangue humano mantendo o tempo de pirólise em 50 segundos e utilizando-se tubo com a plataforma tratada com tungstênio.

<i>Leitura</i>	<i>Temperatura de atomização (°C)</i>	<i>Temperatura de pirólise (°C)</i>	<i>Absorvância de fundo</i>	<i>Absorvância *</i>
1	2500 (1)	625 (0)	0,4389	0,3205
2	2400 (0,5)	750 (0,866)	0,4155	0,3021
3	2100 (-1)	625 (0)	0,7959	0,3323
4	2200 (-0,5)	500 (-0,866)	1,0895	0,3305
5	2400 (0,5)	500 (-0,866)	1,0498	0,3250
6	2200 (-0,5)	750 (0,866)	0,3246	0,2975
7 (PC)	2300 (0)	625 (0)	0,5036	0,3081
8 (PC)	2300 (0)	625 (0)	0,4145	0,3371
9 (PC)	2300 (0)	625 (0)	0,4637	0,2958

* média em duplicata, exceto para as leituras no ponto central.

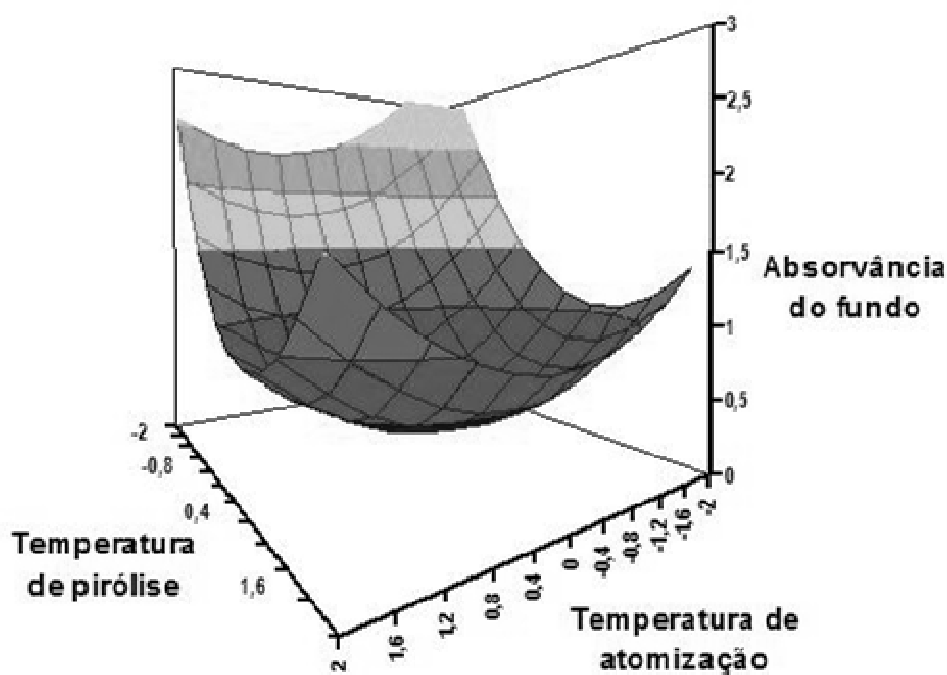


Figura 14 – Superfície de resposta obtida no planejamento Doehlert para chumbo em sangue humano levando-se em conta a absorção de fundo.

Tabela 30 – Programa de forno otimizado para determinação de chumbo em sangue por GF AAS.

<i>Etapa</i>	<i>Temperatura (°C)</i>	<i>Rampa (s)</i>	<i>Tempo de permanência (s)</i>	<i>Fluxo de argônio (L min⁻¹)</i>
Secagem	110	5	40	3
Secagem	140	10	30	3
Pirólise	721	5	35	3
Pirólise	721	0	15	0
Atomização*	2338	0,9	2	0
Limpeza	2500	2	0	3

* leitura nesta etapa

Para evitar o acúmulo de resíduos na plataforma, foi necessário utilizar uma pré-injeção de 10 µL de solução Triton® X-100 0,1%, seguido apenas da etapa de secagem (Tabela 30).

8.4.2. Validação do método

As curvas de calibração em água e de calibração por adição de analito à matriz podem ser vistas na Figura 15, assim como as equações das retas e os coeficientes de determinação (R^2). O método apresentou resposta linear às concentrações de chumbo compreendidas na faixa de 0 a 60 µg L⁻¹ com coeficientes de determinação maiores que 0,99 para ambas. A análise estatística (teste F e teste t de Student) das inclinações das curvas foi realizada conforme descrito no item 6.2, mostrando que não há diferença significativa entre as mesmas para o intervalo de confiança de 95%. Porém, cometemos um erro de cálculo na nossa primeira tentativa que indicou diferença entre as inclinações, portanto, os estudos posteriores

foram feitos utilizando-se calibração por ajuste de matriz, i. e, em todos os pontos da curva para cada 20 µL, 2 µL eram de sangue com baixo teor de chumbo.

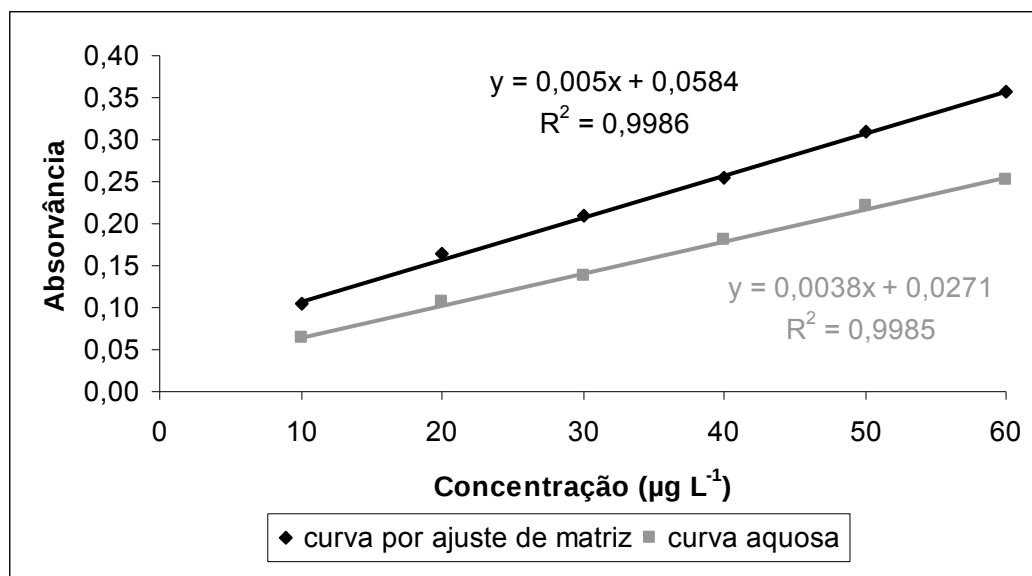


Figura 15 – Estudo do efeito da matriz (seletividade) para determinação de chumbo em sangue humano por GF AAS (n=3).

A Tabela 31 apresenta algumas figuras de mérito do presente estudo. A curva de calibração por ajuste de matriz apresentou um coeficiente de correlação linear satisfatório. Os valores obtidos para o limite de detecção e de quantificação foram adequados para determinações de chumbo por GF AAS. A massa característica calculada foi cerca de duas vezes maior do que a recomendada em água. Biasino, Dominguez e Alvarado (2007) determinaram chumbo em sangue, empregando a técnica de GF AAS, diluindo 2 g de amostra para um volume final de 150 mL em uma solução contendo NaOH, 1-octanol e H₂O₂, utilizando como modificador em solução uma mistura de NH₄H₂PO₄ e Mg(NO₃)₂ e obtendo uma massa característica de 47,2 pg e um LOD de 1,77 µg L⁻¹. Outro método foi desenvolvido para determinação de Pb em urina e soro humanos, obtendo-se uma massa característica de 12 pg e um LOD de 1,0 µg L⁻¹ para urina, usando-se Ir como modificador

permanente, e uma massa característica de 9,8 pg com um LOD de 0,7 µg L⁻¹ para soro, utilizando-se Zr + Rh como modificador permanente (ANDRADA et al., 2005).

Na Tabela 32 podem-se observar os valores obtidos para a precisão, usando-se a metodologia proposta na secção 6.5. Os valores obtidos estão de acordo com os valores aceitáveis.

A Tabela 33 apresenta as recuperações obtidas para sangue diluído com quantidades de chumbo adicionadas na faixa de 10 a 60 µg L⁻¹, mostrando que todos os resultados estão incluídos na faixa de 80 a 120%. Os resultados das leituras das amostras de referência estão apresentados na Tabela 34.

Tabela 31 – Parâmetros de mérito para o método de determinação de chumbo em sangue.

<i>Parâmetro</i>	<i>Resultados</i>
Equação de regressão (n=3)	$Abs = (0,0050 \pm 0,0008)C_{Pb} + (0,058 \pm 0,029)$
R^2 (n=3)	$0,990 \pm 0,005$
Faixa linear (µg L ⁻¹)	0 – 60
LOD (µg L ⁻¹)	2,1
LOQ (µg L ⁻¹)	7,0
Massa característica (n=6, pg)*	$12,8 \pm 0,6$

* massa característica recomendada pelo fabricante para determinação de Pb em água = 5,5 pg.

Tabela 32 – Coeficientes de variação intra-ensaio e inter-ensaios obtidos na determinação de chumbo em sangue por GF AAS.

<i>Concentração de chumbo ($\mu\text{g L}^{-1}$)</i>	<i>CV intra-ensaio (%, n=7)</i>	<i>CV inter-ensaios (%, n=3)</i>
15	5,7	9,3
35	4,1	8,0
55	2,9	9,3
Média	$4,2 \pm 1,4$	$8,9 \pm 0,7$

Tabela 33 – Recuperações de chumbo em sangue por GF AAS.

<i>Concentração de chumbo ($\mu\text{g L}^{-1}$)</i>	<i>Valor determinado ($\mu\text{g L}^{-1}$, n=7)</i>	<i>Recuperação (%, n=7)</i>
15	$14,4 \pm 0,8$	96,2
35	$36,1 \pm 1,5$	103,1
55	$58,2 \pm 1,7$	105,8

Tabela 34 – Leitura das amostras de referência para estudo da exatidão do método desenvolvido.

Amostra 1* ($\mu\text{g L}^{-1}$; n = 5)	Valor de referência	200 ± 31
	Valor determinado	195 ± 42
Amostra 2* ($\mu\text{g L}^{-1}$; n = 5)	Valor de referência	388 ± 49
	Valor determinado	404 ± 42
MRC (Level 2)** ($\mu\text{g L}^{-1}$; n = 5)	Valor de referência	237 ± 36
	Valor determinado	270 ± 28

*Amostras do Programa de Controle Interlaboratorial do governo de Aragon na Espanha; ** MRC = material de referência certificado da Bio-Rad, level 2.

8.4.3. Determinação dos níveis de chumbo em amostras de sangue humano por GF AAS

Na Tabela 35 estão apresentados os níveis de chumbo determinados em sangue de dez pessoas em dois dias diferentes.

Tabela 35 – Concentração de chumbo em dez amostras de sangue humano analisadas pelo método proposto (n=2).

<i>Indivíduo</i>	<i>Nível de chumbo ($\mu\text{g L}^{-1}$)</i>	<i>Indivíduo</i>	<i>Nível de chumbo ($\mu\text{g L}^{-1}$)</i>
1	117 $\pm$ 11	6	368 $\pm$ 25
2	122 $\pm$ 6	7	406 $\pm$ 36
3	141 $\pm$ 12	8	436 $\pm$ 35
4	157 $\pm$ 9	9	666 $\pm$ 11
5	164 $\pm$ 8	10	933 $\pm$ 88

8.4.4. Conclusões para chumbo em sangue

Chumbo pode ser determinado diretamente, sem necessidade de digestão prévia das amostras empregando-se a técnica de GF AAS, com tubo de grafite com plataforma de L'Vov tratada com tungstênio (520 μg) como modificador permanente;

As amostras devem ser diluídas 1+9 com ácido nítrico 0,2% v/v e Triton® X-100 0,2% v/v;

As temperaturas ótimas para a pirólise e atomização são respectivamente de 721 e 2338 °C;

A leitura em altura foi mais intensa do que a leitura em área para as mesmas condições e para a mesma amostra

Uma eliminação eficiente da matriz durante a etapa de pirólise contribuiu para que o efeito da matriz não fosse significativo, porém estudos de exatidão e precisão não foram feitos com calibração aquosa para se comprovar a sua adequação. Tanto a calibração aquosa quanto a calibração por ajuste de matriz apresentaram suficiente correlação linear entre os dados;

Empregando-se as condições otimizadas o método se mostrou preciso e exato.

8.5. Determinação de manganês em soro humano por GF AAS

8.5.1. Otimização das condições analíticas

Aleatoriamente uma amostra de soro foi selecionada do grupo de pessoas saudáveis para estudos posteriores (amostra de referência). A amostra de referência diluída 1+4 com ácido nítrico 1% e Triton® X-100 0,1% foi contaminada com $2 \mu\text{g L}^{-1}$ de manganês e utilizada na otimização.

A temperatura e o tempo de secagem otimizados na determinação de Pb em sangue foram apropriados para este estudo, pois não foi observado borbulhamento da amostra dentro do forno de grafite. Foram avaliadas as leituras em altura ou em área do pico e a leitura em altura se mostrou mais sensível (já que o pico é bem simétrico e afilado). Em seguida, utilizando-se temperaturas e tempos de pirólise e atomização recomendados pelo fabricante, foram testados diferentes tubos de grafite para selecionar dois que seriam usados no planejamento fatorial, sendo: tubos com parede tratada com modificadores permanentes (tungstênio, ródio, rutênio, e irídio) tubo sem tratamento da parede com modificador permanente porém adicionado de paládio (modificador em solução), e tubo com parede não tratada e

sem utilizar qualquer tipo de modificador químico. Os dois tipos de tubos de grafite que apresentaram os melhores desempenhos foram o que teve a parede tratada com tungstênio e o que não utilizou modificador químico. Um planejamento fatorial (2^3) (Tabela 36) foi feito para avaliação preliminar das variáveis temperaturas de pirólise e atomização e uso de modificador químico. Apenas a variável uso de modificador não teve efeito significativo na resposta (sinal do analito em absorvância) a 95% de nível de confiança. O gráfico de Pareto (Figura 16) mostra que os melhores resultados para as temperaturas de pirólise e de atomização foram 700 e 2400 °C, respectivamente. Sendo a variável uso de modificador um parâmetro não significativo, optamos por utilizar W como modificador permanente já que a vida útil do tubo de grafite aumenta consideravelmente (LIMA; BRASIL; SANTOS, 2004; BARBOSA Jr. et al. 2004).

Tabela 36 – Matriz de experimentos do planejamento fatorial (2^3) para manganês em soro humano.

<i>Experimento</i>	<i>Temperatura de atomização (°C)</i>	<i>Temperatura de pirólise (°C)</i>	<i>Modificador</i>	<i>Absorvância*</i>
1	2000 (-)	700 (-)	W (-)	0,0425
2	2400 (+)	700 (-)	W (-)	0,0633
3	2000 (-)	1200 (+)	W (-)	0,0451
4	2400 (+)	1200 (+)	W (-)	0,0625
5	2000 (-)	700 (-)	Sem modif. (+)	0,0457
6	2400 (+)	700 (-)	Sem modif. (+)	0,0622
7	2000 (-)	1200 (+)	Sem modif. (+)	0,0434
8	2400 (+)	1200 (+)	Sem modif. (+)	0,0578

* média de triplicatas

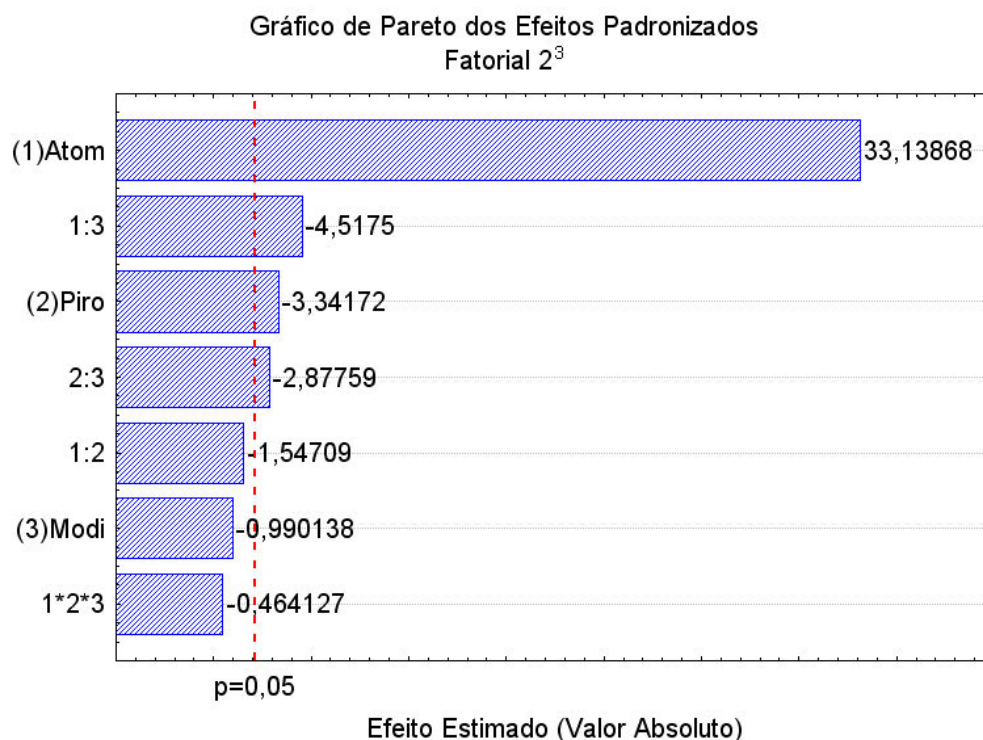


Figura 16 – Gráfico de Pareto gerado no planejamento fatorial (2^3) para manganês em soro humano.

Um planejamento CCD foi realizado para determinação dos valores ótimos para as temperaturas de pirólise e atomização como está descrito na Tabela 37. Em todos os experimentos a temperatura de limpeza foi mantida em 2700°C por 2 segundos. A Figura 17 mostra a superfície de resposta obtida através desse planejamento. Os valores críticos para as temperaturas de pirólise e de atomização foram obtidos através da equação matemática (22). A Tabela 38 mostra as condições otimizadas para o programa de aquecimento do forno.

$$Abs = -0,000002T_a^2 - 0,0000005T_p^2 - 0,0000001T_aT_p + 0,0102T_a + 0,0007T_p - 12,4282 \quad (22)$$

onde,

Abs = absorvância

T_a = temperatura de atomização

T_p = temperatura de pirólise

Tabela 37 – Matriz de experimentos do planejamento CCD para manganês em soro utilizando-se tubo com a parede tratada com tungstênio.

<i>Experimento</i>	<i>Temperatura de atomização (°C)</i>	<i>Tempertura de pirólise (°C)</i>	<i>Absorvância*</i>
1	2200 (-1)	460 (-1)	0,0537
2	2200 (-1)	660 (1)	0,0537
3	2600 (1)	460 (-1)	0,0781
4	2600 (1)	660 (1)	0,0771
5	2117 (-1,414)	560 (0)	0,0401
6	2683(1,414)	560 (0)	0,0792
7	2400 (0)	419 (-1,414)	0,0770
8	2400 (0)	701 (1,414)	0,0721
9 (PC)	2400 (0)	560 (0)	0,0741
10 (PC)	2400 (0)	560 (0)	0,0749
11 (PC)	2400 (0)	560 (0)	0,0747
12 (PC)	2400 (0)	560 (0)	0,0747
13 (PC)	2400 (0)	560 (0)	0,0747

* média em duplicata, exceto para as leituras no ponto central.

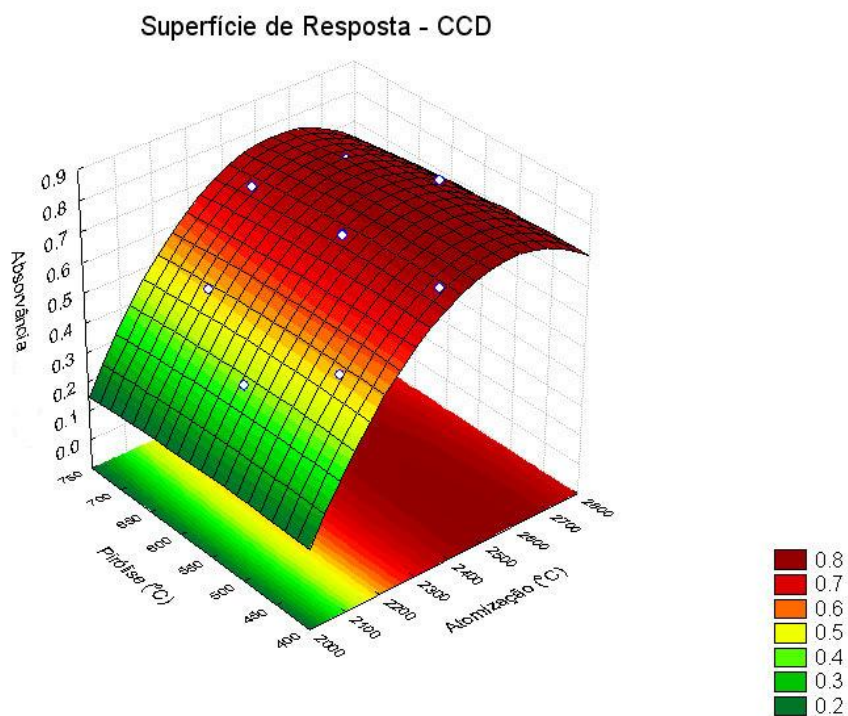


Figura 17 – Superfície de resposta obtida no planejamento CCD para manganês em soro humano.

Tabela 38 – Programa de forno otimizado para determinação de manganês em soro por GF AAS.

<i>Etapa</i>	<i>Temperatura (°C)</i>	<i>Rampa (s)</i>	<i>Tempo de permanência (s)</i>	<i>Fluxo de argônio (L min⁻¹)</i>
Secagem	110	5	40	3
Secagem	140	10	30	3
Pirólise	430	5	35	3
Pirólise	430	0	15	0
Atomização*	2568	0,9	2	0
Limpeza	2500	2	0	3

* leitura nesta etapa

Para evitar o acúmulo de resíduos na plataforma, foi necessário utilizar uma pré-injeção de 10 µL de solução Triton® X-100 0,1%, seguido apenas da etapa de secagem (Tabela 38).

8.5.2. Validação do método

As curvas de calibração em água e de calibração por ajuste de matriz podem ser vistas na Figura 17, assim como as equações das retas e os coeficientes de determinação (R^2). O método apresentou resposta linear às concentrações de manganês compreendidas na faixa de 0 a 3,3 $\mu\text{g L}^{-1}$ com coeficientes de determinação maiores que 0,99 para ambas. A análise estatística (teste F e teste t de Student) das inclinações das curvas foi realizada conforme descrito no item 6.2, mostrando que há diferença significativa entre as mesmas para o intervalo de confiança de 95%, portanto os estudos posteriores foram feitos utilizando calibração por ajuste de matriz.

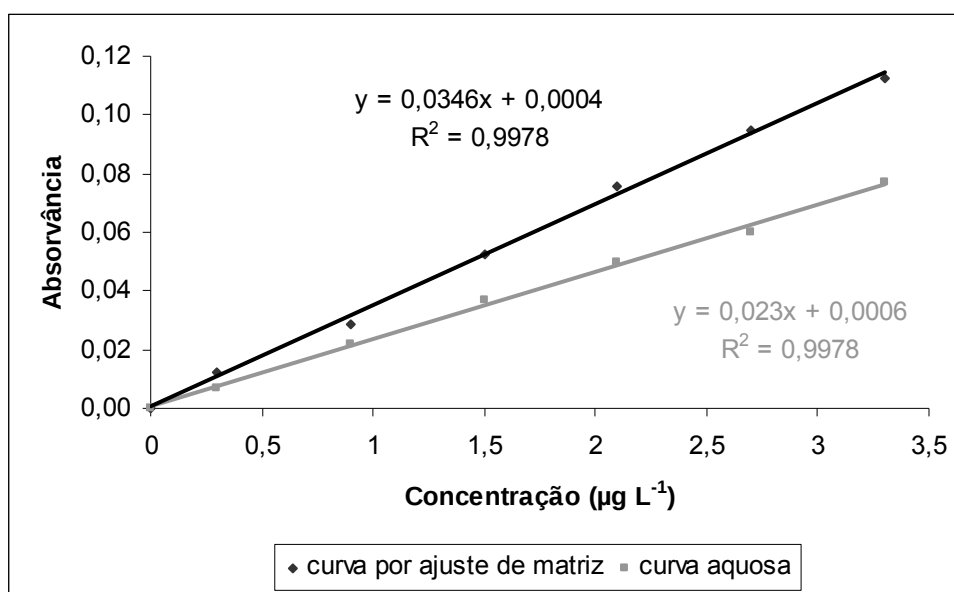


Figura 18 – Estudo do efeito da matriz (seletividade) para determinação de manganês em soro humano por GF AAS (n=3).

A Tabela 39 apresenta algumas figuras de mérito do presente estudo. A curva de calibração por ajuste de matriz apresentou um coeficiente de correlação linear satisfatório. Os valores obtidos para o LOD e LOQ foram adequados para

determinações de manganês por GF AAS. Luna e Campos (1999 apud PINTO et al., 2006) determinaram Mn em amostras de urina por GF AAS fazendo o uso de $\text{Pd}(\text{NO}_3)_2$ como modificador com LOD de $0,6 \mu\text{g L}^{-1}$. Pinto et al. (2006) relatam a determinação direta de manganês em urina e sangue empregando-se GF AAS e as massas características foram de 0,47 e 1,81 pg e os limites de detecção foram de 0,2 e $0,3 \mu\text{g L}^{-1}$ para urina e sangue, respectivamente. Em outro trabalho foi realizada a determinação simultânea de As, Mn, Co, e Ni em urina empregando-se GF AAS, Pd foi usado como modificador químico, obtendo-se LOD para Mn de $0,22 \mu\text{g L}^{-1}$ (HSIANG; SUNG; HUANG, 2004).

Na Tabela 40 podem-se observar os valores obtidos para a precisão usando-se a metodologia proposta na seção 6.5. Os valores obtidos estão de acordo com os valores aceitáveis.

A Tabela 41 apresenta as recuperações obtidas para soro diluído com quantidades de manganês adicionadas na faixa de $0,3$ a $3,3 \mu\text{g L}^{-1}$, mostrando que todos os resultados estão incluídos na faixa de 80 a 120%.

Tabela 39 – Parâmetros de mérito para o método de determinação de manganês em sangue.

Parâmetro			Resultados
Equação de regressão ($n=3$)			$Abs = (0,035 \pm 0,002)C_{Mn} + (0,0004 \pm 0,0002)$
R^2 ($n=3$)			$0,993 \pm 0,002$
Faixa linear ($\mu\text{g L}^{-1}$)			$0 - 3,3$
LOD ($\mu\text{g L}^{-1}$)			$0,2$
LOQ ($\mu\text{g L}^{-1}$)			$0,7$
Massa característica (pg)*			$1,3 \pm 0,2$

* massa característica recomendada pelo fabricante para determinação de Mn em água = 0,6 pg.

Tabela 40 – Coeficientes de variação intra-ensaio e inter-ensaios obtidos na determinação de manganês em soro por GF AAS.

<i>Concentração de manganês ($\mu\text{g L}^{-1}$)</i>	<i>CV intra-ensaio (% , n=7)</i>	<i>CV inter-ensaios (% , n=3)</i>
0,6	4,9	8,0
1,8	4,7	6,0
2,4	7,0	6,1
Média	$5,5 \pm 1,3$	$6,7 \pm 1,1$

Tabela 41 – Recuperações de manganês em soro por GF AAS.

<i>Concentração de manganês ($\mu\text{g L}^{-1}$)</i>	<i>Valor determinado ($\mu\text{g L}^{-1}$, n=7)</i>	<i>Recuperação (% , n=7)</i>
0,6	$0,6 \pm 0,0$	97,9
1,8	$1,8 \pm 0,1$	100,0
2,4	$2,5 \pm 0,2$	102,4

8.5.3. Determinação dos níveis de manganês em amostras de soro por GF AAS

Na Tabela 40 são apresentados os níveis de manganês determinados no soro de cinquenta e três voluntários de Belo Horizonte, Brasil. Os níveis de manganês encontrados nos soros destas pessoas variam de $3,9 \mu\text{g L}^{-1}$ a $13,7 \mu\text{g L}^{-1}$.

Tabela 42 – Nível de manganês no soro de voluntários obtido com o método proposto.

<i>Indivíduo</i>	<i>Nível de manganês ($\mu\text{g L}^{-1}$)</i>	<i>Indivíduo</i>	<i>Nível de manganês ($\mu\text{g L}^{-1}$)</i>	<i>Indivíduo</i>	<i>Nível de manganês ($\mu\text{g L}^{-1}$)</i>
1	13,7 $\pm$ 0,1	19	9,7 $\pm$ 0,1	37	4,5 $\pm$ 0,0
2	5,1 $\pm$ 0,0	20	8,3 $\pm$ 0,1	38	7,3 $\pm$ 0,4
3	11,1 $\pm$ 0,1	21	10,2 $\pm$ 0,4	39	7,5 $\pm$ 0,2
4	8,8 $\pm$ 0,1	22	5,9 $\pm$ 0,5	40	6,5 $\pm$ 0,3
5	7,2 $\pm$ 0,1	23	5,0 $\pm$ 0,1	41	6,4 $\pm$ 0,4
6	6,0 $\pm$ 0,2	24	4,9 $\pm$ 0,1	42	7,1 $\pm$ 0,2
7	7,9 $\pm$ 0,1	25	5,2 $\pm$ 0,3	43	6,4 $\pm$ 0,5
8	11,9 $\pm$ 0,4	26	9,4 $\pm$ 0,2	44	5,4 $\pm$ 0,3
9	6,4 $\pm$ 0,2	27	9,5 $\pm$ 0,1	45	8,8 $\pm$ 0,3
10	9,9 $\pm$ 0,3	28	8,1 $\pm$ 0,1	46	5,6 $\pm$ 0,1
11	4,5 $\pm$ 0,2	29	6,5 $\pm$ 0,4	47	8,9 $\pm$ 0,4
12	3,9 $\pm$ 0,2	30	7,1 $\pm$ 0,4	48	5,0 $\pm$ 0,2
13	6,0 $\pm$ 0,2	31	5,0 $\pm$ 0,2	49	4,1 $\pm$ 0,0
14	6,0 $\pm$ 0,2	32	5,7 $\pm$ 0,0	50	7,9 $\pm$ 0,4
15	9,2 $\pm$ 0,2	33	6,5 $\pm$ 0,3	51	7,7 $\pm$ 0,6
16	10,5 $\pm$ 0,1	34	4,9 $\pm$ 0,1	52	9,0 $\pm$ 0,3
17	4,8 $\pm$ 0,3	35	6,0 $\pm$ 0,3	53	8,1 $\pm$ 0,3
18	12,6 $\pm$ 0,0	36	7,8 $\pm$ 0,3		

8.5.4. Conclusões para manganês em soro

Manganês pode ser determinado diretamente, sem necessidade de digestão prévia das amostras empregando-se a técnica de GF AAS, com tubo de grafite com parede tratada com tungstênio (520 μg) como modificador permanente;

As amostras devem ser diluídas 1+4 com ácido nítrico 1% v/v e Triton® X-100 0,1% v/v;

As temperaturas ótimas para a pirólise e atomização são respectivamente de 430 e 2568 °C;

A leitura em altura foi mais intensa do que a leitura em área para as mesmas condições e para a mesma amostra

O efeito da matriz foi significativo. A curva feita por ajuste de matriz mostrou um aumento de sensibilidade em relação à curva aquosa.

O método se mostrou exato e preciso para determinar níveis traço de manganês em soro humano.

9. Conclusões finais

Com base nos estudos desenvolvidos nesta Dissertação, pode-se concluir que é possível a determinação direta (sem necessidade de digestão prévia das amostras), com níveis adequados de sensibilidade, exatidão e precisão, de vanádio, antimônio, cobre e manganês em amostras de soro humano e de chumbo em sangue humano.

O uso do surfactante Triton® X-100 foi eficiente para evitar a formação de resíduos carbonáceos no interior do tubo de grafite, o que se observa quando não se utiliza um surfactante. A concentração do surfactante foi adequada na diluição de ambas matrizes, sendo eficiente para evitar a formação de resíduos e de bolhas durante a secagem, impedindo que as amostras crepitassem para fora do tubo. O emprego de uma pré-injeção de 10 µL de uma solução de Triton seguido do

programa de secagem foi adequado para evitar a formação de resíduos, mesmo após vários ciclos de aquecimento.

A otimização das condições de análise utilizando a quimiometria foi um procedimento simples e rápido para se obter métodos com a sensibilidade, precisão e exatidão desejadas, fazendo uso de um número reduzido de experimentos em relação à otimização univariada economizando, assim, tempo, reagentes, amostras, tubos de grafite, entre outros recursos.

A sensibilidade, de uma forma geral, foi boa para todos os métodos propostos, para cada conjunto metal/matriz, o que pode ser observado pelas massas características e limites de detecção obtidos. A calibração, em todos os casos, empregando a técnica de ajuste de matriz ou a calibração aquosa, apresentou coeficientes de correlação linear aceitáveis.

Estudos de exatidão e de precisão efetuados através de recuperação dos metais em amostras artificialmente contaminadas, mostraram resultados aceitáveis, com desvios padrões relativos compatíveis com a técnica de GF AAS para todos os metais. Para chumbo em sangue, estudos com materiais certificados mostraram concordância entre valores certificados e determinados, com desvios igualmente compatíveis.

10. Referências Bibliográficas

AHARON, Y.; MEVORACH, M.; SHAMOON, H. Vanadyl sulfate does not enhance insulin action in patients with type 1 diabetes. *Diabetes Care*, v. 21, 2194, 1998.

ANDERSON, R. A.; Nutritional role of chromium. *Sci Total Environ.*, v. 17, p. 13, 1981.

ANDRADA, D.; PINTO, F. G.; MAGALHÃES, C. G.; NUNES, B. R.; FRANCO, M. B.; SILVA, J. B. B.; Direct determination of lead in human urine and serum samples by eletrothermal atomic absorption spectrometry and permanent modifiers. *J. Brazil Chem. Soc.*, v. 17, p. 328, 2006.

ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária), Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos. Resolução – RE nº 899, de 29 de maio de 2003.

AOAC (Association of Official Analytical Chemists), Peer-verified Methods Program, Manual on Policies and Procedures, Arlington, VA, USA, 1993.

ATSDR (Agency for Toxic Substances and Disease Registry), Toxicological profile for vanadium and compounds. 1992a.

ATSDR (Agency for Toxic Substances and Disease Registry), Toxicological profile for antimony and compounds. 1992b.

ATSDR (Agency for Toxic Substances and Disease Registry), Toxicological profile for chromium and compounds. 2000a.

ATSDR (Agency for Toxic Substances and Disease Registry), Toxicological profile for manganese and compounds. 2000b.

BARBOSA Jr., F.; SOUZA, S. S.; SANTOS Jr., D.; KRUG, F. J.; Evaluation of electrodeposited of chromium in urine by ETAAS. *Microchemical Journal*, v. 78, p. 7, 2004.

BARCELOUX, D. G.; Manganese. *Clin. Toxicol.*, v. 37, p. 293, 1999.

BIASINO, J.; DOMÍNGUEZ, J. R.; ALVARADO, J.; Hidrogen peroxide in basic media for whole blood sample dissolution for determination of its lead content by eletrothermal atomization atomic absorption spectrometry. *Talanta*, v. 73, p. 962, 2007.

BODEN, G.; CHEN, X.; RUIZ, J.; VAN ROSSUM, G. D.; TURCO, S. Effects of Vanadyl Sulfate on Carbohydrate and Lipid Metabolism in Patients With Non-Insulin-Dependent Diabetes Mellitus. *Metabolism*, v. 45, p. 1130, 1996

CAMPOS, R. C.; Utilização de modificadores permanentes em GFAAS. Livro de Resumo do VII Encontro Nacional de Contaminantes Inorgânicos. Campinas, p. 31, outubro de 2000.

CASSELLA, R. J.; OLIVEIRA, E. P.; MAGALHÃES, O. I. B. Direct determination of vanadium in high saline produced waters from offshore petroleum exploration by electrothermal atomic absorption spectrometry. *Talanta*, v. 69, p. 48, 2006.

CEZARD, C.; MAGUENOER, J.M. *Toxicologie du plomb chez l'homme*. Paris: Lavoisier Tec. & Doc, p. 331, 1992.

CHAKRABORTY, A.; GHOSH, R.; ROY, K.; GHOSH, S.; CHOWDHURY, P.; CHATTERJEE, M. Vanadium: a modifier of drug metabolizing enzyme patterns and its critical role in cellular proliferation in transplantable murine lymphoma. *Oncology*, v. 52, p. 310, 1995.

CHASIN, A. A. M.; NASCIMENTO, E. S.; RIBEIRO-NETO, L. M., SIQUEIRA, M. E. P. B.; ANDRAUS, M. H.; SALVADORI, M. C.; FERNÍCOLA, N. A. G.; GORNI, R.; SALCEDO, S. Validação de métodos em análises toxicológicas: uma abordagem geral. *Revista Brasileira de Toxicologia*, v.11, p. 1, 1998.

CUNNINGHAM, J. J. Micronutrients as nutraceutical interventions in diabetes mellitus. *J. Am. Coll. Nutr.*, v. 17, p. 7, 1998.

CUSI, K.; CUKIER, S.; DeFRONZO, R. A.; TORRES, M.; PUCHULU, F. M.; PEREIRA REDONDO, J. C. Vanadyl sulfato improves hepatic and muscle insulin sensitivity in type 2 diabetes. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, v. 86, p. 1410, 2001.

EDIGER, R. D.; PETERSON, G. E.; KERBER, J. D.; Application of the graphite furnace to saline water analysis; *At. Absorpt. Newsl.*, v. 13, p. 61, 1974.

EPA (ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY), GUIDANCE for Methods Development and Methods Validation for the RCRA Program SW-846 Methods, 1992.

EMSLEY, J.; *The elements of murder: A history of poison* (Hardcover). Oxford University Press, USA, 436 p., 2005.

FAO/OMS. Documento de Trabajo sobre el Plombo, 26ª Reunion del Comité Del Codex sobre Aditivos Contaminantes de los Alimentos. São Paulo, 1994.

FARIÑAS, M. V.; GARCÍA, B. J.; MARTÍN, S. G.; CRECENTE, R. P.; LATORRE, C. H.; Direct determination of cadmium in Orujo spirit samples by electrothermal atomic absorption spectrometry: Comparative study of different chemical modifiers. v. 591, p. 231, 2007.

FAWCETT, J. P.; FARQUHAR, S. J.; WALKER, R. J.; THOU, T.; LOWE, G.; GOULDING, A. The effect of oral vanadyl sulfate on body composition and performance in weight-training athletes. *Int. J. Sport Nutr.*, v. 6, p. 382, 1996.

FERNANDES, K. G.; NOGUEIRA, A. R. A.; GOMES NETO, J. A.; NÓBREGA, J. A.; Determination of Vanadium in Urine by Electrothermal Atomic Absorption Spectrometry Using Hot Injection and Preconcentration Into the Graphite Tube. *J. Braz. Chem. Soc.*, v. 15, p. 676, 2004.

FERREIRA, A . D. Q. Impacto do crômio nos sistemas biológicos. Quím. Nova, v. 25, p. 572, 2002.

FLORES, A. V.; PÉREZ, C. A.; ARRUDA, M. A. Z.; Evaluation of zirconium as a permanent chemical modifier using synchrotron radiation and imaging techniques for lithium determination in sediment slurry samples by ET AAS. Talanta, v. 62, p. 619, 2004.

GOYER, R.A.; Toxic Effects of Metals. In: *Casarett and Doll's Toxicology: the basic science of poison*. 5 ed. New York:Pergamon Press, p. 691, 1996.

GULSON, B. L.; JAMESON, C. W.; MAHAFFEY, K. R.; MIZON, K. J.; KORSH, M. J.; VIMPANI, G. Pregnancy increases mobilization of lead from maternal skeleton. J. Lab. Clin. Med. V. 130, p. 51-62, 1997. Anal. Chim. Acta, v. 591, p. 231, 1997.

GULSON, B. L.; MAHAFFEY, K. R.; MIZON, K. J.; KORSCH, M. J.; CAMERON, M. A.; VIMPANI, G. Contribution of tissue lead to blood lead in adult female subjects based on stable lead-isotope methods. J. Lab. Clin. Med., v. 125, p. 703, 1995.

HALBERSTAM, M.; COHEN, N.; SHLIMOVICH, P.; ROSSETTI, L.; SHAMOON, H. Oral vanadyl sulfate improves insulin sensitivity in NIDDM but not in obese nondiabetic subjects. Diabetes, v. 45, p. 659, 1996.

HALL, A. H.; RUMAC, B. H. Toxicology and Occupational Medicine System. Englewood, NJ, USA: Tomes Plus® System, 1997.

HEINEMANN, G.; FICHTL, B.; VOGT, W. Pharmacokinetics of vanadium in humans after intravenous administration of a vanadium containing albumin solution. Br. J. Clin. Pharmacol. V. 55, p. 241, 2003.

HEMOnline LTDA. O sangue e seus constituintes. Disponível em: <http://www.hemonline.com.br/info/sangue/sangue.php>; Acessado em: 12 de dezembro de 2007.

HSIANG, M-C.; SUNG, Y-H.; HUANG, S-D.; Direct and simultaneous determination of arsenic, manganese, cobalt and nickel in urine with a multielement graphite furnace atomic absorption spectrometer. Talanta, v. 62, p. 791, 2004.

ICH – Q 2B. *Validation of analytical procedures: methodology*. (International Conference on Harmonization of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use. Nov, 1996. Geneva, Switzerland)

ILZSG (International Lead and Zinc Study Group). End uses of lead. Disponível em: <http://www.ilzsg.org/>. Acessado em setembro de 2007.

INMETRO (Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial). Orientações sobre validações de métodos de ensaios químicos – DOQ-CGCRE-008. p. 1, 2003.

JENTJENS, R. L.; JEUKENDRUP, A. E. Effect of acute and short-term administration of vanadyl sulphate on insulin sensitivity in healthy active humans. *Int. J. Sport Nutr. Exerc. Metab.*, v. 12, p. 470, 2002.

KEEN, C. L.; ZIDENBERG-CHER, S.; BROWN, M.; Manganese. Ed. Present knowledge in nutrition, 6ª edição, Washington, DC: International Life Sciences Institute Nutrition Foundation, p. 279, 1990.

KOPKE, L. F. F.; VALE, E. C. S.; ARAÚJO, M. G.; MAGALHÃES, P. A., FURTADO, T. Tratamento da leishmaniose tegumentar americana pelo antimonio de N-metil-glucamina: estudo duplocego com doses de 14 mg/kg/dia de antimônio. *An. Bras. Dermatol.*, v. 66, p. 66, 1991.

LI, J.; ELBERG, G.; SEKAR, N.; BIN HE, Z.; SHECHTER, Y. Antilipolytic actions of vanadate and insulin in rat adipocytes mediated by distinctly different mechanisms. *Endocr.*, v. 138, p. 2274, 1997.

LIMA, É. C.; BRASIL, J. L.; SANTOS, A. H. D. P.; Determination of Antimony in Environmental Samples by ETAAS Using Different Permanent Modifiers. *Microchim. Acta*, v. 146, p. 21, 2004.

LIMA, M. V. N.; CERINO, D. A.; OLIVEIRA, R. Z.; SILVEIRA, T. G. V.; LIMA, A. P.; Leishmaniose cutânea com desfecho fatal durante tratamento com antimonial pentavalente. *An. Bras. Dermatol.* v. 82, p. 269, 2007.

LINS, B. F. E.; Ferramentas Básicas da Qualidade. *Ciência da Informação*, v. 22, p. 153-161, 1993.

LUNA, A. S.; CAMPOS, R. C.; Determination of Manganese in Whole Blood and Urine by GFAAS Using Different Modifiers. Determination of Manganese in Whole Blood and Urine by GFAAS Using Different Modifiers/Atomic Spectroscopy. *At. Spectrosc.*, v. 20, p. 108, 1999.

MAGALHAES, C. G. ; Lelis, K. L. A. ; SILVA, J. B. B. OU DA SILVA, J.B.B . Direct determination of copper and chromium in urine by electrothermal atomic absorption spectrometry using Ru as permanent modifier. *Anal. And Bioanal. Chem.*, v. 374, p. 1301, 2002.

MAGALHÃES, C. G.; NUNES, B. R.; SILVA, J. B. B. Determinação direta de bismuto em urina humana por ETAAS empregando uma mistura de irídio e ródio como modificador permanente. *25 Reunião Anual da SBQ*, Poços de Caldas, maio de 2002. *J. Anal. At. Spectrom.*, 2003.

MANNAN, A.; WAHEED, S.; AHMAD, S.; QURESHI, I.H. Dietary evaluation of toxic elements through integrated diet. *J. Radioanal. Nuclear Chem.*, v.162, p.111, 1992.

MARTINS, I.; LIMA, I. V.; Ecotoxicologia do manganês e seus compostos. Salvador: CRA, 2001.

MASSART, D. L.; VANDEGINSTE, B. G. M.; BUYDENS, L. M. C.; JONG, S.; LEWI, P. J.; SMEYERS-BERBEKE, J. "Handbook of chemometrics and qualimetrics: Part A". v. 20A, Elsevier Science B. V., Amsterdam, 1998.

MATTOS, M. S.; FRIEDMAN, R. K.; SILVA FILHO, I. L.; OLIVEIRA-NETO, M. P.; Pancreatite: um dos efeitos adversos da terapia antimonial na leishmaniose. An. Bras. Dermatol. v. 75, p. 45, 2000.

MENA, I.; WALDRON, H. A.; Manganese. Ed. Metals in the environment. 1ª edição, Londres, Impresso Acadêmico, p. 199, 1980.

MOREIRA, R. C. A .; BOAVENTURA, G. R. Referência geoquímica regional para a interpretação das concentrações de elementos químicos nos sedimentos da Bacia do Lagoa Paranoá –DF. Quím. Nova, v. 26, p. 812, 2003.

MYERS, R. H.; MONTGOMERY, D. C. "Reponse surface methodology". Wiley: New York, 2002.

NAYLOR, G. J. Vanadium and manic depressive psychosis. Nutr. Health, v.3, p. 79, 1984.

NETO, B. B.; SCARMINIO, E. S.; BRUNS, R. E. Como fazer experimentos: pesquisa e desenvolvimento na ciência e na indústria. 3 Ed, Editora da Unicamp, Campinas, 2003.

NRC (The National Research Council); Recommended dietary allowances. Washington, DC: National Research Council. 3ª edição, p. 231, 1989.

NUNES, B. R.; MAGALHÃES, C. G.; SILVA, J. B. B. Rápida determinação de cromo em soro humano por espectrometria de absorção atômica em forno de grafite. 25ª Reunião Anual da SBQ, Poços de Caldas, maio de 2002. J. Anal. At. Specrom., 2002.

OGA, S. Fundamentos de Toxicologia. Atheneu Editora São Paulo, 1ª edição, São Paulo, p. 135 , 1996.

OLIVEIRA, R. S.; OLIVEIRA, A. P.; GOMES NETO, J. A.; Tungsten permanent chemical modifier with co-injection of $\text{Pd}(\text{NO}_3)_2 + \text{Mg}(\text{NO}_3)_2$ for direct determination of Pb in vinegar by graphite furnace atomic absorption spectrometry. Food Chem., v. 105, p. 236, 2007.

PAOLIELLO, M. M. B., CHASIN, A. A. M.; Ecotoxicologia do chumbo e seus compostos. Salvador: CRA, 2001.

PEÑA, Y. P.; VIELMA. O.; BURGUERA, J. L.; BURGUERA, M.; RONDÓN, C.; CARRERO, C.; On-line determination of antimony(III) and antimony(V) in liver tissue and whole blood by flow injection – hydride generation – atomic absorption spectrometry Talanta, v. 55, p. 743, 2001.

PEREIRA, L. A.; AMORIM, I. G.; SILVA, J. B. B.; Development of methodologies to determine aluminum, cadmium, chromium and lead in drinking water by ET AAS using permanent modifiers. *Talanta*, v. 64, p. 395, 2004.

PINTO, F. G.; Desenvolvimento de Métodos para Determinação de Cobre, Manganês, Chumbo e Cádmio em Urina e Soro por Espectrometria de Absorção Atômica em Forno de Grafite: Estudo de Modificadores Químicos. 101 f. Dissertação (Mestrado) – Departamento de Química, Universidade Federal de Minas Gerais, Minas Gerais, 2004.

PINTO, F. G.; ANDRADA, D.; MAGALHÃES, C. G.; NUNES, B. R.; AMORIM, F. R.; FRANCO, M. B.; SAINT'PIERRE, T. D.; SILVA, J. B. B.; CURTIUS, A. J.; Determination of selenium in urine samples by electrothermal atomic absorption spectrometry using zirconium plus rhodium with co-injection of rhodium as chemical modifiers. *Anal. Bioanal. Chem.*, v. 383, p. 825, 2005 .

PINTO, F. G.; REY, U. V.; FERNANDES, E. F.; SILVEIRA, J. N.; AMORIM, L.; SILVA, J. B. B.; Determination of manganese in urine and blood samples by electrothermal atomic absorption spectrometry: comparison of chemical modifiers. *Anal. Sci.*, v. 22, p. 1605, 2006.

RIBEIRO, A. L. P.; DRUMMOND, J. B.; VOLPINI, A. C.; ANDRADE, A. C.; PASSOS, V. M. A.; Electrocardiographic changes during low-doses, short-term therapy of cutaneous leishmaniasis with the pentavalent antimonial meglumine. *Braz. J. Med. Bio. Res.* V. 32, p. 297, 1999.

SERRANA; Disponível

em: http://www.serrana.com.br/n_boletins.asp?Tipo=NA&id=154; Acessado em: 21 de fevereiro de 2007.

SHUTTLE, I.; FEUERSTEIN, M.; SCHLEMMER, G.; Long –term stability of a mixture Pd-Ir trapping reagent for in situ hydride trapping within a graphite electrothermal atomizer. *J. Anal. At. Spectrom.*, v.7, p. 1299, 1992.

SILBERGELD, E. K.; SCHWARTZ, J.; MAHAFFEY, K. R.; Lead and osteoporosis: mobilization of lead from bone in postmeno-pausal women. *Environ. Res.* V. 47, p. 79, 1988.

SILVA, C. S.; PEDROZO, M. F. M.; Ecotoxicologia do cromo e seus compostos. Salvador: CRA, 2001.

SILVA, J. B. B.; SILVA, M. A. M.; CURTIUS, A. J.; WELZ, B. Determination of Cd in Biological Samples Solubilized with Tetramethylammonium Hydroxide by ET AAS, Using Ru as Permanent Modifier. Resumo apresentado como COMUNICAÇÃO ORAL na Sessão Coordenada de Química Analítica na 23^a Reunião Anual da SBQ – Poços de Caldas – maio de 2000.

SILVA, J. B. B.; Emprego de modificadores permanentes em espectrometria de absorção atômica em forno de grafite – uma revisão de aplicações, limitações e

realidades. Livro de Resumo do VII Encontro Nacional de Contaminantes Inorgânicos. Campinas, p.119, outubro de 2000.

SILVA, J. B. B.; BEJARANO, R. O.; DEMICHELI, C.; FREZARD, F.; MELO, A. L. Determination of antimony in mouse serum by electrothermal AAS using zirconium plus rhodium as permanent modifier. *Atomic Spectrosc.* v. 27, p. 93, 2006.

SILVA, J. B. B.; GIACOMELLI, M. B. O.; SOUZA, I. G.; CURTIUS, A.; J. Iridium and rhodium as permanent chemical modifier for the determination of Ag, As, Bi, Cd and Sb by electrothermal atomic absorption spectrometry, *Microchem. J.* 60, p. 249, 1998.

SILVA, J. B. B.; SILVA, M. A. M.; CURTIUS, A. J.; WELZ, B.; Determination of Ag, Pb and Sn in aqua regia extracts from sediments by electrothermal atomic absorption spectrometry using Ru as permanent modifier. *J. Anal. At. Spectrom.*, v. 14, p. 1737, 1999.

SIQUEIRA, M. E. P. B.; Avaliação do ácido homovanílico urinário e da adenosina desaminase plasmática como índice de exposição ocupacional ao manganês. 243 f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1984.

SMITH, D. R.; OSTERLOH, J. D.; FLEGAL, A. R.; Use of endogenous, stable lead isotopes to determine release of lead from the skeleton. *Environ. Health Perspect.* V. 104, p. 60, 1996.

Ultimate Nutrition. Vitamins and Herbs at Vitaneonline.com, Vitane®, LLC: Vanadyl sulfate 10 mg 150 tabs vitamins and herbs; <http://vitaneonline.com/description/U220026/vitamins/VANADYL-SULFATE-10MG-150TABS>; Acessado em: 21 de fevereiro de 2007.

USGS (U.S. Geological Survey); Vanadium statistics and information; Disponível em: <http://minerals.usgs.gov/minerals/pubs/commodity/vanadium/>; Acessado em: 20 de dezembro de 2007a.

USGS (U.S. Geological Survey); Antimony statistics and information; Disponível em: <http://minerals.usgs.gov/minerals/pubs/commodity/antimony/>; Acessado em: 20 de dezembro de 2007b.

VERMA, S.; CAM, M. C.; MCNEILL, J. H. Nutritional factors that can favorably influence the glucose/insulin system: vanadium. *J. Am. Coll. Nutr.*, v. 17, p. 11, 1998.

TEÓFILO, R. F.; FERREIRA, M. M. C. Quimiometria II: Planilhas Eletrônicas para Cálculos de Planejamentos Experimentais, um Tutorial, *Quim. Nova* v. 29, p. 338, 2006.

TIMBRELL, J.A. *Introduction to toxicology*. 2.ed. London: Taylor & Francis, p.76-77, 111-114, 1995.

TODOROVSKA, N.; KARADJOVA, I.; ARPADJAN, S.; STAFILOV, T.; On chromium direct ETAAS determination in serum and urine. Central European Journal of Chemistry, v. 5, p. 230, 2007.

WEDLER, F. C.; KLIMIS-TAVANTIZIS, D. J.; Biochemical and nutritional role of manganese. Ed. Manganese in Health and Disease. Boca Raton, L.A. Impresso CRC, p. 1, 1994.

WELZ, B.; SPERLING, M. "Atomic Absorption Spectrometry" 3 Ed, Wiley-VHC, Germany, 1999.

WELZ, B.; SCHLEMMER, G.; MUDAKAVI, J. R.; Palladium nitrate magnesium-nitrate modifier for electrothermal atomic absorption spectrometry. Part 5: Performance for determination of 21 elements, J. Anal. At. Spectrom., v. 7, p. 1257, 1992.

WHO (World Health Organization) IPCS (Internacional Programme on Chemical Safety). Environmental Healthy Criteria 165 – Inorganic Lead. Genebra. 1995.

WHO (World Health Organization). Manganese. Environmental Healthy Criteria 17. Genebra. 1981.