



AUTARQUIA ASSOCIADA À UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

**DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE UMA METODOLOGIA
DE ANÁLISE MULTIELEMENTAR EM AMOSTRAS DE SORO
SANGUÍNEO POR ESPECTROMETRIA DE MASSAS DE ALTA
RESOLUÇÃO COM FONTE DE PLASMA INDUTIVO**

LUCILENA REBÊLO MONTEIRO

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

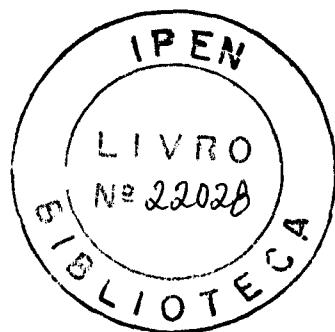
**Orientador:
Dr. Jorge Eduardo de Souza Sarkis**

**São Paulo
2000**

INSTITUTO DE PESQUISAS ENERGÉTICAS E NUCLEARES
Autarquia associada à Universidade de São Paulo

**DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE UMA METODOLOGIA DE ANÁLISE
MULTIELEMENTAR EM AMOSTRAS DE SORO SANGUÍNEO POR
ESPECTROMETRIA DE MASSAS DE ALTA RESOLUÇÃO COM FONTE DE
PLASMA INDUTIVO.**

LUCILENA REBÉLO MONTEIRO



Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do grau de Mestre em Ciências na Área de Tecnologia Nuclear – Materiais.

Orientador:
Dr. Jorge Eduardo de Souza Sarkis

SÃO PAULO
2000

*“Definições para tornar a vida mais simples:
Inteligência não significa instrução;
Instrução não significa cultura;
Cultura não significa educação
Educação não significa caráter”*

Aos meus pais Cláudio e D'Arc,
Às minhas irmãs Dari, Cláudia e Milena,
Ao João,
Ao Danilo e ao Gilson.

Obrigada pela compreensão.

AGRADECIMENTOS

Ao meu Orientador, Dr. Jorge Eduardo de Souza Sarkis;

À Dra. Célia Colli e ao M. Sc. José Peralta Wilder, pela cessão das amostras de soro para a realização deste trabalho;

A todos os atletas que cederam seu sangue, e paciência, para a realização deste trabalho.

Ao João, pela presença sempre no momento certo, pela paciência, pelo carinho e pelo incentivo;

Aos meus colegas do laboratório, Walter, Elisa, Marcelo, Daniela e Patrícia, pela companhia, apoio e unidade;

Aos funcionários Maurício, João Cristiano, Hélio e Isabel, pelo auxílio sempre presente;

À Noemia, Helena, Ivone e a Maria Inês, alguns dos melhores exemplos que já tive, vieram de vocês;

Ao Sr. Manuel Alberto Martins da Silva e ao Sr. Affonso Celso de Aquino, pelas pessoas extraordinárias que são e que eu tive a sorte de ter como chefes durante essa etapa tão difícil;

À todas as pessoas que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho;

Ao IPEN, pelo apoio material;

À CAPES pelo suporte financeiro.

ÍNDICE

RESUMO	1
ABSTRACT	2
I. INTRODUÇÃO	4
1.1. Objetivos	9
1.1.1. Gerais	9
1.1.2. Específicos	9
II. REVISÃO DA LITERATURA	10
2.1. Metais no sangue e soro	10
2.1.1. Elementos Maiores	11
2.1.2. Elementos Traços:	12
2.1.3. Elementos Traços Essenciais	12
2.1.4. O Ferro	14
2.1.5. O Cobre	17
2.1.6. O Zinco	19
2.1.7. O Cromo	21
2.1.8. O Manganês	22
2.1.9. O Níquel	23
2.1.10. O Cobalto	24
2.1.11. Outros elementos	24
2.2. Escolha da Técnica	25
III. REVISÃO DA LITERATURA	27
3.1. Espectrometria de Massa com Fonte de Plasma Indutivo	27
3.1.1. Histórico	27
3.1.2. O Plasma	30
3.1.3. Teoria do Plasma	31

a. Equilíbrio Termodinâmico Completo	31
b. desvios do Equilíbrio Termodinâmico Completo	33
3.1.4. Constituintes do Plasma	34
a. Espécies Neutras	34
b. Espécies Iônicas	34
3.1.5. Formação e Manutenção do Plasma	36
3.1.6. Processo de Introdução de amostras e Extração de íons	39
3.2. Analisadores de Massa	41
3.2.1. Analisadores do tipo Quadrupolo	44
3.2.2. Analisadores do tipo Setor Magnético e Eletroestáticos	46
IV. CASUÍSTICA E MÉTODOS	48
4.1. Protocolo Experimental do Estudo de Caso	48
4.2. Materiais e Métodos	51
4.2.1. Instrumental	51
4.2.2. Reagentes	57
4.2.3. Soluções Simuladas	57
4.2.4. Curvas de Calibração e Adição	58
4.2.5. Amostras Reais	58
4.3. Análise Estatística	59
4.4. Determinação da Estabilidade de Medida	61
4.4.1. Considerações Gerais	61
4.4.2. Procedimento Experimental	63
4.5. Limite de Detecção	65
4.5.1. Considerações Gerais	65
4.5.2. Procedimento Experimental	66
4.6. Avaliação quanto a ocorrência de interferentes	67
4.6.1. Interferências não espectrais	67
a. Simulação da Matriz	68
b. Estudo do comportamento das amostras reais	68
c. Reciprocidade da relação de calibração	69

4.6.2. Avaliação de interferências isobáricas	70
a. Estudo das razões isotópicas	70
b. Avaliação do espectro de massa no modo de média resolução	71
4.7. Verificação da Exatidão da análise	72
a. Sangue total(IAE-A-13)	72
b. Soro sangüíneo (SERODOS)	73
V. RESULTADOS E DISCUSSÃO	74
5.1. Algumas Figuras de Mérito	74
5.1.1. Estabilidade	74
5.1.2. Limite de Detecção	79
5.1.3. Avaliação quanto a ocorrência de interferentes	83
5.1.3.1. Interferências não espectrais	83
a. Simulação de matriz	83
b. Estudo do comportamento de amostras reais	91
c. Reciprocidade da relação de calibração	95
5.1.3.2. Interferências espectrais	99
a. Avaliação do espectro de massa no modo de média resolução	99
b. Estudo das razões isotópicas	104
5.2. Verificação da Exatidão da medida	107
5.2.1. Sangue total (IAE-A-13)	107
5.2.2. Soro Sangüíneo (SERODOS)	113
5.3. Estudo de Caso	120
5.3.1. Indivíduos	121
a. Análise do LINK 1	124
b. Análise do LINK 2 e LINK 3	127
c. Análise dos componentes principais	131

VI. CONCLUSÕES**132****VII. REFERÊNCIAS****134****VIII. ANEXOS**

DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE UMA METODOLOGIA DE ANÁLISE MULTIELEMENTAR EM AMOSTRAS DE SORO SANGÜÍNEO POR ESPECTROMETRIA DE MASSA DE ALTA RESOLUÇÃO COM FONTE DE PLASMA INDUTIVO

Lucilena Rebêlo Monteiro

RESUMO

Este trabalho relata o desenvolvimento e a validação de uma metodologia para a análise elementar em amostras de sangue e soro sangüíneo, empregando-se a técnica de espectrometria de massa de alta resolução com fonte de plasma indutivo. Foram estudadas algumas das figuras de mérito associadas a técnica, tais como limites de detecção instrumental e do método aplicado, estabilidade das medidas a curto e longo prazo, resolução, sensibilidade, precisão e exatidão da técnica. Estas figuras são empregadas como parâmetros de comparação do desempenho da espectrometria de massa com fonte de plasma indutivo com outras técnicas, conforme dados de literatura.

Os principais interferentes espectrais e não espectrais associados à matrizes biológicas, em especial, soro e sangue total, foram identificados. São discutidas também as condições de formação dos interferentes e algumas das opções para que seus efeitos sejam minimizados.

Conhecidas as principais variáveis do método de análise, realizou-se um estudo de caso, tendo como população um grupo de 23 atletas maratonistas. Este estudo verificou a validade da metodologia nas avaliações nutricionais. Empregou-se a análise dos componentes principais na identificação de correlações entre indivíduos em função dos resultados analíticos e do histórico levantado.

A METODOLOGY DEVELOPMENT AND VALIDATION OF SERUM AND BLOOD MULTIELEMENTAR ANALYSIS BY INDUCTIVELY COUPLED HIGH RESOLUTION MASS SPECTROMETRY

Lucilena Rebêlo Monteiro

ABSTRACT

This work reports a methodology development and validation of elemental analysis in whole blood and serum samples, by using the inductively coupled high resolution mass spectrometry technique. Some figures of merit were studied, such as instrumental and procedure detection limits, long and short term stabilities, resolution, sensibility, and the technique precision and accuracy. These results were compared with available values from the same and other techniques found in current literature.

The main spectral and non-spectral interference associated with biological samples were also studied, along with, the interference formation rates and some options to minimize its effects.

Once the analytical methodology variables were found, it was made a small population assay, with 23 running athletes. This assay evaluate the methodology reliability in nutritional studies. The principal component analysis was applied in the individual correlation, in function of metal content in serum and in function of the clinical profile.

I INTRODUÇÃO:

O sangue é o principal agente transportador de nutrientes para os tecidos. Esta propriedade o caracteriza como um importante monitor biológico¹, de tal modo, que a medicina vem empregando os parâmetros hematológicos como indicadores clínicos de critérios de normalidade e toxicidade².

Nos últimos anos, tem crescido a necessidade de avaliar-se a concentração de diversos metais no sangue e em suas frações^{3, 4, 5, 6}. Foram identificados os níveis (Figura 1.1). pelos quais as estruturas biológicas expressam-se^{7,8} e a importância que os elementos metálicos exercem na regulação destes sistemas. Hoje, sabe-se que o funcionamento e a regulação do metabolismo de tecidos e órgãos ocorre em última escala pela ação ativadora ou inibidora de certos metais, em uma série bastante grande de proteínas.

Deste modo as dosagens de elementos presentes no sangue total, no soro ou no plasma tem servido ao estudo do metabolismo normal^{9, 10} e do efeito de doenças (diabetes¹¹); tratamentos médicos (radioterapia¹², quimioterapia¹³, diálise^{6,14}, nutrição parenteral) e de agentes externos (estresse físico¹⁵ e emocional), sobre o metabolismo mineral.

Para o desenvolvimento destes estudos é necessária a implementação de metodologias analíticas que apresentem algumas características, tais como:

- Empregar pequenas quantidades de amostra;
- Permitir o mínimo de manipulação e preparo da amostra;
- Apresentar elevada sensibilidade;
- Permitir medidas com elevada precisão.

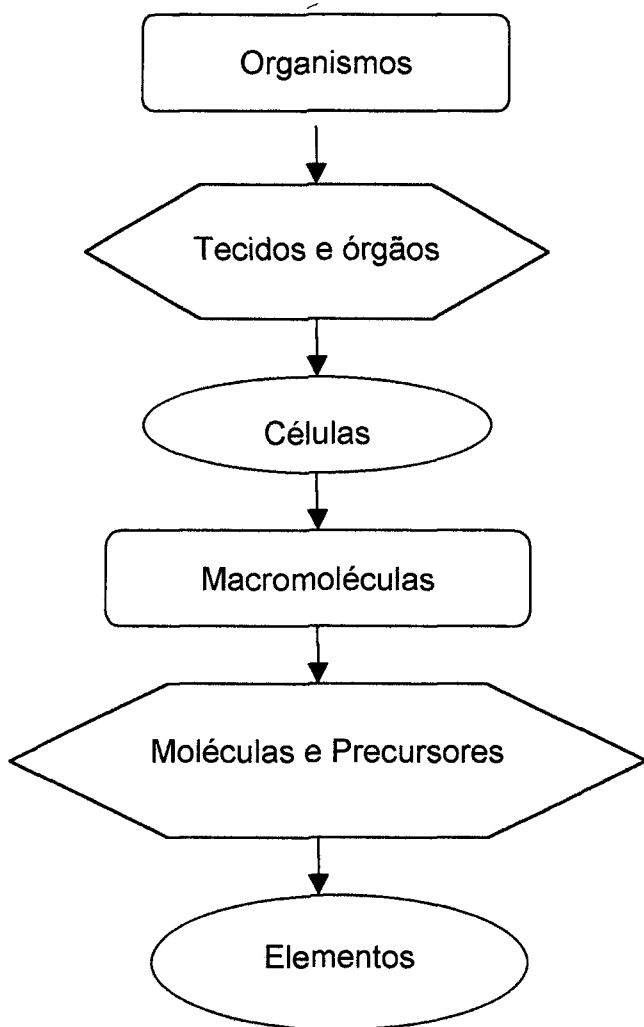


Figura 1.1: Hierarquia das estruturas biológicas⁸.

A partir destas diretrizes, diversas técnicas e metodologias vem sendo empregadas nos estudos do conteúdo de metais no sangue e suas frações^{16,17,18}.

Metodologias envolvendo a espectrometria de absorção atômica, embora amplamente empregadas, permitem determinações a níveis de alguns mg/L. As suas vantagens são principalmente a robustez da técnica, e a grande variedade de métodos de referência disponíveis. Suas limitações são várias, tais como a necessidade de múltiplas diluições e calibrações¹⁶, procedimentos extensos de preparo de amostras e padrões, elevado consumo de amostra e a ocorrência de interferências de matriz, exigindo correções com modificações de matriz, agentes complexantes ou correções de background e de efeito Zeeman^{6,19}.

Com o emprego do forno de grafite, a espectrometria de absorção atômica apresenta melhores níveis de sensibilidade e diminuí o consumo de amostra. Permanecem inalteradas as demais características^{16,21}.

A espectrometria de emissão atômica com fonte de plasma indutivo permite determinações, mais rápidas, em intervalos de concentração mais amplos, que a espectrometria de absorção atômica¹⁶. Entretanto, também fica sujeita a interferentes espectrais, muitas vezes causados pela própria complexidade do espectro de luz e das transições eletrônicas envolvidas no princípio da técnica¹⁶.

Neste cenário, as técnicas nucleares (análise por ativação com neutrons^{17,20}, diluição isotópica⁸, ou envolvendo traçadores radioativos) apresentaram alguma vantagem, frente as demais, quando em estudos clínicos, principalmente pela precisão e sensibilidade que apresentam. As desvantagens destas técnicas, entretanto, decorrem principalmente dos custos e tempo de análise elevados, que prejudicam sua difusão e aplicação corrente em estudos populacionais.

Há ainda que se ponderar quanto ao emprego de isótopos estáveis e radioativos junto a grupos vulneráveis, como crianças, doentes crônicos ou agudos. Mesmo estando entre as técnicas que fornecem os resultados mais precisos^{20,21} e os melhores limites de determinação, são colocadas restrições em seu emprego.

A espectrometria de massas com fonte de plasma indutivo vem se desenvolvendo nos últimos anos uma técnica com as vantagens analíticas de sensibilidade, precisão, rapidez e da possibilidade do emprego de traçadores não-radioativos^{1,17}.

Contudo, até meados da década de 90, a espectrometria de massas com fonte de plasma ainda exibia problemas relativos aos interferentes de massa inerentes aos analisadores do tipo quadrupolo. Com o emprego dos analisadores do tipo setor magnético nos espectrômetros de massas, os interferentes puderam ser separados, uma vez que estes analisadores permitem uma melhor resolução^{1,18}.

As aplicações dos analisadores de massa do tipo setor magnético já são bastante conhecidas, quando empregados com outros tipos de fontes de íons^{1,18}. Entretanto, quando estes analisadores foram empregados juntamente com uma fonte de plasma indutivos¹⁸, uma série de vantagens que sempre foram associadas à técnica analítica ideal foram alcançadas.

Este trabalho irá portando descrever os estudos e resultados obtidos na análise de metais em amostras de plasma e sangue total, empregando o primeiro espectrômetro de massas de alta resolução instalado no Brasil, no Laboratório de Caracterização Isotópica da Divisão de Materiais, do Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares - IPEN.

Esta técnica permite avaliações nutricionais, por meio da determinação de vários elementos, quase-simultaneamente, em amostras consideradas difíceis para outras técnicas, tais como: amostras de sangue e soro. Entretanto uma das principais vantagens seria a de permitir análises de forma rápida, em níveis de concentração menores que as técnicas empregadas até o momento.

Devido os baixos níveis de concentração alcançado para alguns elementos que ocorrem no plasma sangüíneo em concentrações inferiores aos limites de detecção das técnicas hoje disponíveis^{6,17,19}, a técnica de espectrometria de massas de alta resolução com fonte de plasma indutivo foi empregada neste estudo.

1.1. OBJETIVOS:

1.1.1. GERAIS:

O objetivo deste trabalho foi o desenvolvimento de uma metodologia para a determinação de elementos essenciais em plasma sanguíneo por espectrometria de massas com fonte de plasma indutivo.

Aplicação da metodologia em um estudo de caso, na avaliação da condição nutricional de atletas maratonistas.

1.1.2. ESPECÍFICOS:

Definir as condições operacionais mais adequadas para matrizes biológicas;

Identificar as figuras analíticas de mérito do procedimento de análise;

Estudar e eventualmente, eliminar ou corrigir a ocorrência de possíveis interferências espectrais e não espectrais;

Aplicar um procedimento de avaliação envolvendo estatística multivariada no cruzamento de informações analíticas com o perfil dos indivíduos deste estudo.

II REVISÃO DA LITERATURA:

2.1. METAIS PRESENTES NO SANGUE E SORO:

O sangue é uma matriz bifásica, extremamente complexa, com um elevado conteúdo salino e rica em proteínas, para a qual os metais de transição ocorrem em concentrações muito baixas. As duas fases genéricas^a do sangue são os elementos figurados (eritrócitos, plaquetas leucócitos, etc.) e o soro (fluido intersticial).

As matrizes biológicas não apresentam uma composição química definida. Complexos mecanismos regulatórios garantem que no sangue estabeleça-se um equilíbrio entre centenas de compostos diferentes, muito embora a composição iônica total sofra pequenas alterações. O equilíbrio observado é mantido em diversos organismos vivos de modo altamente específico, mantendo uma concentração média de determinados elementos, mesmo quando ocorrem modificações na dieta²².

^a Sem o emprego de anticoagulante.

2.1.1. ELEMENTOS MAIORES:

Os elementos maiores, em tecidos biológicos, são aqueles que se apresentam em quantidades relativas a mg/g, alguns deles são o Na, K, Ca, Mg.

Quando se consideram os fluidos biológicos intra e extra celulares, os cátions de sódio e potássio respectivamente são os mais abundantes^{23,24}. O sódio representa 90% dos 154mmol/L dos cátions inorgânicos presentes no plasma. A necessidade diária de sódio é de 130 a 260mmol (8 a 15 g) de NaCl²². Sua absorção é quase total, e o excesso é eliminado pelos rins^{23,22}.

O potássio é o principal cátion presente dentro das células²². Sua concentração nos eritrócitos é de 105mmol/L, aproximadamente 23 vezes a concentração no plasma²².

A concentração destes eletrólitos, responsáveis pela manutenção da pressão osmótica das células, em condições de saúde normal, não sofrem modificações significativas em relação a hora do dia ou estações do ano²⁴.

2.1.2. ELEMENTOS TRAÇOS:

Os elementos ditos traços são os que se apresentam em concentrações nos níveis de $\mu\text{g/g}^{22}$. Técnicas analíticas com maior sensibilidade tem permitido o estudo de elementos ultra-traços, presentes em concentrações relativas a ng/g ou menos.

2.1.3. ELEMENTOS TRAÇOS ESSENCIAIS:

A determinação de elementos traços em amostras biológicas têm permitido as descobertas das distribuições destes elementos nos metabolismos humano e animal²². A partir destas descobertas designou-se como elementos essenciais, aqueles que são importantes unicamente para a manutenção da vida e da saúde; e que apresentem funções ligadas ao desenvolvimento e crescimento de um organismo²². Necessariamente, a deficiência destes elementos ditos essenciais causa danos funcionais, que só são aliviados com a suplementação alimentar²².

A lista completa dos elementos essenciais é controversa, pois há ainda estudos sobre a toxicidade e essencialidade de alguns elementos que estão em desenvolvimento²². A classificação clínica que é em termos gerais bem aceita é mostrada na TABELA 1.1.

TABELA 1.1: Distribuição dos elementos segundo suas características clínicas²²

Essenciais:	Co, Cr, Cu, Fe, F, I, Mn, Mo, Se, Si, Sn, V e Zn
Não essenciais	Al, Au, B, Bi, Ge, Li e Pt
Não essenciais e Tóxicos	Ag, As, Ba, Be, Cd, Hg, Ni, Pb, Sb, Te e Tl

Na TABELA 1.2. são citados os intervalos de referência de alguns micronutrientes presentes no soro sangüíneo e a seguir cada um destes tem sua função e importância biológica revisadas.

TABELA 1.2: Intervalos de referência de alguns elementos presentes no soro sangüíneo.

Elemento	Intervalo de referência (ug/L)	Observações	Fonte
Fe	500-1.600	Homens	27
	400-1.500	Mulheres	27
Cu	700-1.400	Homens	33
	700-1.600	Mulheres	33
Zn	800-1200	-	38
Cr	0,08-45	-	22
Mn	0,004-0,140	-	22
Ni	0,3-0,9	Indivíduos normais	6
Ni	0,7-4,0	Pacientes de Hemodiálise	6
Co	0,22-140	-	44
Co	0,35	-	36

2.1.4. O FERRO:

O ferro é o mais importante elemento essencial presente no nível de concentração de traço²⁵. As funções biológicas atribuídas ao ferro estão associadas a respiração, transporte do oxigênio e na atividade muscular²⁶.

O metabolismo do ferro é cuidadosamente regulado pelo equilíbrio estabelecido entre as espécies de Fe^{+2} (insolúvel) e Fe^{+3} (solúvel). Quando em excesso, o ferro é armazenado em sua forma insolúvel ligado a ferritina. Quando há demanda de ferro, este é solubilizado e transportado para as células pela transferrina e captado por receptores de transferrina.

Pela importância biológica das funções que exerce, as deficiências de ferro²⁵ se associam a sintomas como anemia, a redução da capacidade respiratória e a diminuição da tolerância a atividades físicas.

A principal causa da deficiência de ferro é o baixo consumo de ferro na dieta. A perda de sangue é a segunda causa, mais comum, de deficiência de ferro em adultos. Daí a elevada ocorrência deste tipo de deficiência em mulheres, devido ao sangramento do período menstrual. Sangramentos no trato gastrointestinal são também causas de deficiência de ferro entre os homens. São também consideradas populações vulneráveis a perda ou a deficiências de ferro: as crianças²⁵, adolescentes²⁵, mulheres grávidas e atletas¹⁵, devido a elevada demanda de ferro causadas por taxas de crescimento ou atividade física superiores a da população em geral.

DE MAEYER et al.²⁷, entretanto, relatam que mais de um bilhão de pessoas no mundo sofram de anemia e que em pelo menos metade destas a causa seja por deficiência de ferro.

Embora, a importância da condição nutricional do ferro no organismo seja reconhecida, ainda hoje não se têm uma perfeita definição dos estágios da deficiência de ferro.

VERCELLOTTI²⁵ relata os estágios preliminares, em que há baixas reservas de ferro. Uma segunda fase seria a deficiência de ferro até atingir estágios avançados de anemia, com o severo comprometimento da eritropoiese.

HASTKA et al.²⁸ utilizam como indicadores da depleção de ferro a concentração de hemoglobina, a contagem de hemácias, os níveis de transferrina e ferritina no soro, bem como os níveis de zinco-protoporfirina nos eritrócitos. Estes parâmetros identificam principalmente três estágios, também definidos por HASTKA et al.²⁸: o de deficiência ou depleção de ferro, o de ferro-deficiência na eritropoiese e o de anemia.

Estas diferenças tênues são particularmente importantes de se identificar em populações vulneráveis, devido as elevadas solicitações metabólicas envolvidas, assim como em pacientes de doenças que atingem os órgãos responsáveis pela produção sanguínea e regulação do metabolismo.

Entre atletas que fazem uso de suplementação mineral, há o risco oposto, pois o excesso de ferro também está associado à hemocromatose, a doenças coronárias²⁹ e a alguns tipos de câncer³⁰.

No sangue total, as concentrações de ferro são elevadas, deste modo a espectrometria de absorção atômica com chama ou com forno ou a espectrometria de emissão com fonte de plasma indutivo são mais adequadas a sua determinação^{22,23}.

Com o emprego de espectrômetros de massas do tipo quadrupolo com fonte de plasma indutivo, VANHOE et al.³¹ relatam a ocorrência de interferentes ($^{40}\text{Ar}^{16}\text{O}$) na massa 56, a do isótopo mais abundante do ferro, e em menor escala na massa 57 ($^{40}\text{Ar}^{16}\text{O}^1\text{H}$). Portanto, seria necessário o estudo com a espectrometria de massas de alta resolução.

MOENS et al.³² foram os pioneiros na separação dos interferentes com o emprego da espectrometria de massas com dupla focalização no estudo das figuras de mérito da técnica no que se refere a amostras de soro. Entretanto, há ainda uma lacuna entre a disponibilidade do recurso analítico e sua aplicação em estudos clínicos e de população.

2.1.5. O COBRE

O cobre é um elemento essencial para as funções celulares de todos os organismos vivos³³. Complexantes biológicos mostram uma grande afinidade com o cobre, tanto que a concentração deste metal livre em fluídos biológicos é muito baixa³³.

A sua forma disponível biologicamente está ligada a albumina, a peptídeos e a aminoácidos. Estes compostos são considerados seus principais transportadores.

As funções bioquímicas do cobre estão associadas a cuproenzimas específicas, tais como, a Cu-Zn-superóxido dismutase, o citocromo c oxidase. A sua atividade biológica principal e de suas enzimas é oxidar o ferro (II) a ferro (III), para que este se ligue a transferrina. A sua importância é tal que a concentração de ferro necessária para manter os níveis normais de hemoglobina são dependentes da concentração de cobre na dieta.

No soro, a concentração de cobre é de aproximadamente 100ug/L e cerca de 90% está associado a ceruloplasmina³⁴. Modificações desta concentração são relatadas³⁴ em pacientes com câncer, e com as Síndromes de MENKES e WILSON^b, linfomas, infecções, reumatismo, artrite e nefrose. Em mulheres grávidas a concentração de cobre pode dobrar em relação ao valor normal.

^b Disfunções metabólicas, de causa genética, cujos sintomas principais são as alterações da absorção e da excreção do cobre.

Como a regulação da sua concentração é feita através do fígado, disfunções deste órgão também alteram sua concentração no soro³⁵.

As deficiências de cobre estão associadas a desnutrição e em geral levam à anemia pela interferência que causa do processo de oxidação do ferro e na formação da hemoglobina. Por isso, em casos de anemia quando se administra ferro, há sempre uma pequena dose associada de cobre.

Várias técnicas³³ já foram empregadas no estudo do metabolismo do cobre, tais como a espectrometria de absorção atômica, espectrometria de emissão com fonte de plasma e detecção de emissões gama dos isótopos ^{64}Cu e ^{66}Cu . Na espectrometria de massas é comum o emprego do ^{65}Cu enriquecido, pois são relatadas interferências sobre a massa do isótopo de massa 63, causadas pela espécie $^{40}\text{Ar}^{23}\text{Na}$.

2.1.6. O ZINCO:

O zinco é um elemento essencial cuja função biológica está associada a síntese do DNA e do RNA³⁶. Este metal é o sítio ativo de mais de 120 enzimas³⁷, tais como, anidrase carbônica, DNA polimerase, RNA polimerase, t-RNA sintase, transcriptase, fosfatase alcalina, oxidoreductase e transferase. No caso específico da anidrase carbônica, o zinco corresponde a 0,33% de seu peso molecular, e a função principal desta enzima é a eliminação do CO₂ do corpo humano.

A maior parte do zinco está presente nos eritrócitos na forma de anidrase carbônica, uma pequena porção fica em equilíbrio no plasma. Deste modo a concentração do zinco no sangue total e nas hemácias é pelo menos 10 vezes maior que no soro³⁹. VERSIECK e CORNELIS³⁸ fizeram uma revisão dos níveis de zinco, entre outros elementos, relatados por diversos pesquisadores, e citam a hemólise como a principal causa de resultados inconsistentes.

A determinação da concentração do zinco no soro é o parâmetro mais amplamente empregado na avaliação da condição nutricional³⁹. A determinação do zinco contido nos eritrócitos, no sangue total, ou nos cabelos não são bons indicadores da condição nutricional recente, pois estes níveis dependem de um prolongado ciclo metabólico³⁹.

Um outro recurso bastante empregado em avaliações metabólicas é a determinação da razão Cu/Zn do plasma. Segundo PRASAD³⁹, um aumento desta razão em pacientes que apresentam tumores, indica uma alta atividade tumoral e um baixo prognóstico.

Segundo, PRASAD³⁹, as deficiências de zinco estão associadas a dietas inadequadas de proteínas; e um fator de predisposição é o consumo predominante de vegetais.

Os níveis de zinco são constantes em indivíduos saudáveis(ver tabela 1.2.), entretanto, modificações destes níveis são relatados em condições de estresse, alcoolismo, infecções crônicas e infarto do miocárdio.

Em casos de deficiência acentuada de zinco foram observados³⁹ retardo de crescimento, hipogonadismo, desordens imunológicas e neuro-sensoriais, uma anormal adaptação ao escuro e nos homens, impotência.

Contudo os quadros mais difíceis de se identificar são as deficiências intermediárias de zinco, pois as zonas de transição ainda não estão bem definidas³⁹.

2.1.7. O CROMO:

Este elemento é essencial no metabolismo de lipídeos e carboidratos⁴⁰. Dietas insuficientes de cromo levam a sintomas semelhantes ao da diabetes e a doenças cardiovasculares²². Estudos recentes comprovaram benefícios da inclusão deste elemento na dieta em pacientes hipoglicêmicos, tratados com insulina ou hipoglicêmicos orais⁴⁰. São relatados também o aumento de receptores de insulina com a suplementação de cromo⁴⁰.

Perdas anormais de cromo ocorrem em condições de estresse, traumas ou exercícios físicos, assim como em dietas com elevado consumo de açúcar refinado⁴⁰.

A absorção do cromo é dita inversa⁴⁰, pois quanto maior a dose menor a absorção.

ANDERSON²² relata que, embora, benefícios tenham sido observados em alguns grupos, para indivíduos saudáveis nenhuma modificação foi observada na tolerância à glicose.

VALLERAND et al.⁴¹ relatam um aumento na perda urinária de cromo após exercício físico. Observou-se também que indivíduos condicionados a corrida apresentaram perdas menores que em indivíduos não treinados, provavelmente por uma depleção prévia desenvolvida.

2.1.8. O MANGANÊS

Diferentemente do ferro, zinco e do cobre, que são classificados como elementos essenciais pelas evidências clínicas de suas deficiências, o manganês foi aceito como elemento essencial com base na dependência de certas enzimas quanto a presença do manganês como cofator²². Uma destas enzimas é a β -Globulina, de atuação específica a ponto de diferenciar os cátions +3 do ^{55}Mn do ^{56}Fe ⁴².

A concentração de manganês é regulada pela ação de hormônios e a administração de estradiol eleva os níveis de Mn no sangue. As maiores concentrações de Mn são encontradas em tecidos ricos em mitocôndrias associado a superóxido dismutase, o que leva a baixos níveis no soro.

Relatos da deficiência de manganês, em voluntários, descrevem sintomas como a perda de peso, dermatite, retardo no crescimento de pelos e unhas e níveis de colesterol e triglicerídeos diminuídos⁴².

Intoxicações também foram relatadas em mineradores ocupacionalmente expostos²². Os sintomas relatados envolvem distúrbios psiquiátricos, como esquizofrenia e desordens neurológicas semelhantes a Mal de Parkinson²².

2.1.9. O NÍQUEL:

O níquel é considerado um elemento tóxico, sendo reconhecido como um agente carcinogênico. Níveis elevados de níquel são relatados⁶ em quadros de infarto do miocárdio, artrite reumatóide e em paciente submetidos a hemodiálise regular. Nos pacientes de hemodiálise e em roedores tratados com NiCl_2 são observadas desordens⁶ como peroxidação de lipídeos, danos celulares e à imunidade humoral e hiperprolactinemia.

Em indivíduos saudáveis o níquel é eliminado pela urina, bile e cabelo⁴³. Muito pouco se conhece do metabolismo de remoção deste elemento do sangue, e estudos em pacientes de hemodiálise indicam que o níquel não é totalmente removido do corpo por este tipo de tratamento⁶. Este fato sugere que o níquel esteja ligado a grupos protéicos, em especial a *l*-histidina⁶.

2.1.10. O COBALTO:

O cobalto é essencial em humanos somente como parte integrante da vitamina B₁₂(cobalamina)²², e esta deve ser suplementada na dieta pois a flora intestinal não sintetiza a vitamina B₁₂ a partir do cobalto livre. Nenhuma outra função biológica é atribuída ao cobalto²².

O intervalo de referência do cobalto em amostras de soro é bastante amplo⁴⁴, provavelmente por efeitos de contaminação e problemas de detecção de algumas técnicas. Usualmente o valor relatado é de 0,10 a 0,35ug/L³⁶.

2.1.11. OUTROS ELEMENTOS:

Outros elementos estudados neste trabalho tem sua funções biológicas ou características detalhadas no decorrer do texto, na seção de resultados e discussões.

2.2. ESCOLHA DA TÉCNICA

A metodologia utilizada nesse trabalho permite a quantificação direta de alguns elementos em níveis de concentração que outras técnicas atuais não permitem. Mais que isso, permite a medida com tal precisão que permite a identificação de pequenas variações do conteúdo de elementos. Essa informação é de particular interesse em estudos de avaliação nutricional nas amostras de soro sanguíneo. Desse modo, a precisão e a exatidão da medida são fundamentais na diferenciação entre dois valores de concentração na ordem de grandeza de alguns $\mu\text{g.L}^{-1}$.

CREWS e COLABORADORES avaliam a absorção e o metabolismo de micronutrientes e elementos traços, empregando a espectrometria de massas com fonte termo-iônica, por bombardeamento de elétrons e com fonte de plasma indutivo. Algumas revisões bastante amplas são encontradas na literatura^{18, 36}. BARNES⁵⁰ se refere a ocorrência de interferentes espectrais na espectrometria de massas com fonte de plasma indutivo de baixa resolução como uma limitação a seu emprego. Várias das sugestões em superar esses efeitos são possíveis, algumas tratam de separações químicas, a utilização de gases especiais no plasma, muito recentemente o emprego de plasmas "frios" e apenas uma das abordagens possíveis seria a da utilização de analisadores de massa mais eficientes, como os de setor magnético.

Entretanto, há que se considerar que nas técnicas descritas acima, a grande maioria dos trabalhos buscam concentrações totais de alguns elementos para a verificação das faixas de normalidade. Nesses trabalhos as faixas de normalidade corresponde a uma faixa ampla de concentração. Para a identificação de um individuo normal a elevada precisão não é um dos requisitos da técnica podendo ser em alguns casos da ordem de 1mg.L^{-1} (TABELA 1.2: Ver página 13). Entretanto com técnicas que apresentam essa precisão, a diferenciação de dois indivíduos normais, que apresentem características diferentes de condicionamento físico ou de dieta é improvável.

Na diferenciação de dois valores de concentração muito próximos (diferenças de alguns $\mu\text{g.L}^{-1}$) a precisão da medida é fundamental. Além desse fator outros fatores desejados estão relacionados a rapidez analítica, a acessibilidade à composição isotópica e o emprego deste recurso na certificação de resultados^{16,32,45}, aos limites de detecção baixos, a permitir a análise de pequenos volumes de amostra^{34,36}.

Quanto a espectrometria de massas de alta resolução com fonte de plasma indutivo disponível no IPEN, poucos são os trabalhos atualmente disponíveis relativo a amostras clínicas⁴⁶, em particular para soro sanguíneo e sangue⁴⁷, e praticamente nenhum havia sido editado na época de execução da parte experimental.

Entretanto as características gerais da técnica que se encaixaram no perfil desejado e levou a crer que essa seria a mais adequada a determinação de diferenças nutricionais sutis em um grupo de atletas maratonistas com um perfil físico e clínico muito similar.

III REVISÃO DA LITERATURA

3.1. ESPECTROMETRIA DE MASSA COM FONTE DE PLASMA INDUTIVO:

3.1.1. HISTÓRICO:

A física de plasma começou a se desenvolver com o estudo de descargas aplicadas a gases a baixa pressão. O primeiro a reconhecer as propriedades dos gases ionizados foi LORD RAYLEIGH⁴⁸, em 1906, ao discutir o modelo de THOMSON do átomo observando comportamentos “coletivos” de elétrons. LANGMUIR, em 1928, foi o primeiro a empregar a palavra plasma^{49,50}. Embora mais recentemente, o termo plasma tem sido aplicado a qualquer volume de gás ionizado, em que a carga total seja zero^{49,50,51}.

Segundo GREEN⁴⁹ até o final da década de 30 a física de plasma não teria sido competitiva o bastante com outras descobertas da época, de modo a despertar um interesse maior. Entretanto, plasmas gerados por descargas elétricas de forma direta, capacitiva e indutiva também foram bastante estudadas⁵². MAVRODINEANU e HUGHES⁵³ realizaram experimentos de excitação de gases a baixa pressão para análises espectroscópicas entre os anos de 1891 e 1963.

Contudo, a transição de plasmas em sistemas fechados a baixa pressão, para sistemas abertos a pressão atmosférica demoraria ainda vinte anos⁵². BABAT é citado por diversos autores^{52,54,55}, como pioneiro, por em 1941, conseguir manter um plasma induzido a pressão atmosférica. Diferentemente dos outros tipos de plasma, este não exigia a conversão de um gás, em um condutor, via contato direto com uma fonte de carga. Por este motivo este tipo de descarga foi inicialmente descrita como “high frequency electrodeless discharge”⁵².

Novamente, a estabilização da fonte de plasma induzido levaria outros vinte anos, principalmente pelo atraso no desenvolvimento de métodos e materiais que garantissem o isolamento térmico e elétrico do sistema⁵². Sendo assim REED⁵⁶, em 1961, relataria a obtenção de uma fonte de plasma indutivo, em fluxo, a pressão atmosférica, cuja produção, indução, estabilização e confinamento seriam controladas.

A aplicação de plasmas induzidos como fontes de excitação, junto a emissão atômica foi concebida ainda na década de 60, principalmente por GREENFIELD⁵⁷ e FASSEL⁵⁸. Sendo o mecanismo de geração do plasma induzido descrito posteriormente por GREENFIELD⁵⁹ juntamente com uma ampla revisão do surgimento à aplicação de diversos tipos de plasma como fonte espectroscópica^{60,61}. Entre os anos de 1964 e 1974, as condições de operação dos plasmas indutivos não só foram melhor entendidas, como também, em termos práticos padronizadas⁵².

A aplicação de plasmas indutivos junto à espectrometria de emissão foi empregada pela primeira vez durante os anos 70⁵². Em 1974, o primeiro modelo comercial de um espectrômetro de emissão óptica com fonte de plasma indutivo foi lançado pelo Applied Research Laboratoy (Sunland, Califórnia), imediatamente seguido por um instrumento Jarrell Ash da Division of Fisher Corporation Walthon, Mass^{52,62}.

Ainda nos anos 70, a espectrometria de massa ensaiava os mesmos passos que a espectrometria de emissão óptica⁶³, com outras fontes de plasma, que não as indutivas^{52, 62} tais como a termo-iônica ou a de centelha, montadas no interior câmaras de vácuo^{64,65}.

Entretanto mantinha-se a concepção de que uma fonte de íons a pressão atmosférica seria incompatível com os sistemas de alto vácuo dos analisadores de massa⁶². Principalmente, pela necessidade de um sistema de interface muito mais complexo que o utilizado pela espectrometria de emissão óptica.

O desenvolvimento de interfaces em um ou dois estágios de vácuo, através de cones de cobre⁶² permitiu que uma população significativa de íons fosse levada ao analisador de massa e detectada⁶⁶, assim nasceu a espectrometria de massa com fonte de plasma indutivo.

3.1.2. O PLASMA:

O plasma é comumente definido como um gás que apresenta uma população de íons positivos e elétrons livres em concentração considerável^{50, 67}. Contudo esta definição, no sentido físico, tem sido descrita como insuficiente⁶⁸, pois qualquer gás, em maior ou menor grau, sempre apresenta certa ionização^{69, 70, 71, 72}.

A definição mais completa⁶⁸ coloca o plasma como sendo um gás quase neutro de partículas carregadas e neutras que exibem um comportamento coletivo*.

A expressão do comportamento coletivo se refere ao fato de que há uma interdependência entre as condições locais e remotas do plasma, havendo inclusive uma dependência no que se refere a extensão desta ionização⁶⁸. Particularmente, algumas propriedades observadas em plasmas de diversas naturezas, deram sustentação ao modelos que explicassem as interdependências^{49, 51}. As principais propriedades sob o aspecto da espectrometria de emissão ou de massa, são as seguintes: a emissão de radiação, a quase-neutralidade elétrica, e a frequência de Interações^{49, 59, 68} diferentes das exibidas por gases ionizados.

*Há que se observar, entretanto, que neste texto a abordagem feita, trata o plasma como uma fonte de íons. Deste modo, não são feitas considerações magneto-hidrodinâmicas sobre a física do plasma. Pois, embora disponha-se de uma vasta literatura, inclusive no que se refere a plasmas indutivos de argônio, acredita-se que esta discussão não seja compatível com a aplicação aqui presente.

3.1.3. TEORIA DE PLASMA:

Neste texto, pela aplicação espectroscópica, o plasma é visualizado como um sistema particulado. Sendo assim é freqüente que funções de distribuição de estados atômicos sejam empregadas na previsão de como átomos e íons estejam presentes, nos diferentes estados excitados possíveis^{49, 51, 61}. A partir destas funções de distribuição torna-se possível modelar o fluxo de partículas, momento e energia no plasma, através dos coeficientes apropriados.

Estes modelos são descritos em função das condições termodinâmicas dos sistemas físicos. Muitos modelos não descrevem adequadamente os diversos processos em um plasma indutivo, mas asseguram a compreensão de outros mais adequados.

Dois modelos bastante conhecidos são descritos abaixo:

a. Equilíbrio Termodinâmico Completo:

Diversos autores dão um tratamento matemático amplo e detalhado, para a quanto as condições de ocorrência do equilíbrio termodinâmico completo. Dentre estes, VAN DER MULLEN⁷³, faz uma revisão dos mecanismos e balanços adotados no estabelecimento do equilíbrio termodinâmico completo, e seus desvios^{59, 67, 73, 74}.

O equilíbrio termodinâmico completo assume que o transporte de energia no plasma indutivo se dá como um sistema primário (bobina de indução) de um transformador, que permite a total absorção da energia incidente pelo sistema secundário, no caso o próprio plasma^{49, 51, 73}. Assume portanto, que não ocorrem processos de irradiação de energia. Assume portanto que o plasma se comporta como um corpo negro perfeito, e que em seu interior não ocorrem processos secundários de transporte de

energia⁵¹. Não são considerados gradientes de temperatura no corpo absorvedor, e o plasma teria uma temperatura homogênea.

Assim a energia cinética de todas as partículas obedeceriam a DISTRIBUIÇÃO DE MAXWELL , em um sistema de colisões elásticas. Os graus de liberdade do sistema, para rotação, vibração, dissociação, excitação e ionização seriam previstos pela EQUAÇÃO DE SAHA-BOLTZMAN. As interações onda partícula obedeceriam a EQUAÇÃO DE PLANK^{73, 76}.

Com a condição de equilíbrio termodinâmico completo atendida, uma vez conhecida a composição e a pressão sob a qual se forma o plasma, a temperatura pode ser usada como o parâmetro que define a distribuição de energia do sistema^{51,49, 73}.

Mesmo sendo um modelo bastante simples o Equilíbrio Termodinâmico Completo é um conceito teórico que serve apenas como uma aproximação, pois em qualquer plasma real são encontrados desvios das condições de Equilíbrio Termodinâmico^{49,74}. Visto o exemplo de plasmas luminosos, tais como os plasmas indutivos, que são irradiadores, o que derruba a cadeia de equilíbrios assumida. Portanto, na prática, o modelo do equilíbrio termodinâmico completo não é aplicável.

b. Desvios do Equilíbrio Termodinâmico Completo:

Os desvios ou as violações das condições do Equilíbrio termodinâmico em geral são observados por três fatores⁷⁴: A influência de forças externas na manutenção e limitação do plasma; o escape de radiação do próprio plasma como limitador espacial; e a presença de gradientes de temperatura e gradientes de densidade das espécies no plasma.

As limitações são decorrentes do próprio sistema real, onde é fácil observar que⁷³):

- Partículas diferentes respondem diferentemente, a processos de colisão elásticas, ou não;
- A emissão de fótons é intensa, e irreversível, sendo uma componente considerável na perda de energia do plasma;
- O transporte de partículas é decorrente da diferença de concentração entre as espécies.

Entretanto, uma aproximação bastante comum, é a que o único equilíbrio realmente irreversivelmente quebrado seja o de PLANK. Esta consideração transforma o Equilíbrio Termodinâmico Completo em Equilíbrio Termodinâmico Local^{49, 51, 74}.

Assim, a zona de transferência de energia do indutor é mantida em Equilíbrio Termodinâmico, e as demais zonas seriam regiões transientes de retorno ao gás neutro. Nestas condições dois tipos de fenômenos podem ser observados: ionizações e recombinações^{75,76}.

3.1.4 CONSTITUINTES DO PLASMA INDUTIVO:

As funções de distribuição de estado nas condições de equilíbrio visam muitas vezes a previsão das espécies constituintes do plasma. Algumas das principais espécies previstas por estas funções são as seguintes:

a. Espécies Neutras:

Pela proporção que é introduzido no plasma, a maior espécie neutra presente, é o argônio, segundo NIU e HOUK⁷⁵, em uma densidade de $1,5 \times 10^{18}$ átomos. cm^{-3} , seguido por átomos de oxigênio provenientes da solução aquosa introduzida no plasma. Os átomos de oxigênio estão a uma proporção variável entre $4,9 \times 10^{16}$ a $8,6 \times 10^{16}$ átomos. cm^{-3} , dependendo da condição de nebulização, e assumindo-se uma dissociação da água, formando H e O, sem grande eficiência de ionização.

b. Espécies iônicas:

Nas condições habituais de plasma, as espécies iônicas mais abundantes são o Ar^+ , H^+ , e O^+ , muito embora a eficiência de ionização do argônio, do hidrogênio e do oxigênio sejam baixas. Outros elementos com potenciais de ionização menores que o do argônio, hidrogênio e oxigênio são mais eficientemente ionizados. Para os elementos de potencial de ionização inferior a 8eV a extensão de ionização varia entre 90 e 100%⁷⁷. O mesmo é válido para espécies duplamente ionizadas (M^{2+})⁷⁷.

Os íons dupla carga formados a partir de átomos neutros de elementos de baixo potencial de ionização ($\text{Pot}_{\text{ionização}} < 15\text{eV}$), tais como Ba, Sr, Pb, Cs e terras raras, chegam a uma proporção de 3 a 10%, dos íons de simples carga^{75,77}.

Interferências causadas por halogênios e por elementos de elevado potencial de ionização são freqüentemente relatadas^{75,77}.

No que se convencionou ser um solvente típico (1% de HNO₃ em água), os principais íons positivos obtidos são principalmente^{66, 78}: ArH⁺, Ar⁺, H₃O⁺, H₂O⁺, NO⁺, O₂⁺, N₂⁺, HO⁺, Ar₂⁺, Ar₂H⁺, ArO⁺, ArOH⁺, ArN⁺^{75,77}, originários do gás de formação do plasma e da matriz carregadora.

Segundo NIU e HOUK⁷⁵, a descrição genérica do espectro de massa dos elementos estudados consiste principalmente em íons de carga simples, monoatômicos, ou íons óxidos de carga simples, mantendo sempre em termos de ocorrência a abundância relativa isotópica dos elementos que o constitui.

3.1.5. FORMAÇÃO E MANUTENÇÃO DO PLASMA:

O plasma de argônio induzido usado como fonte espectroscópica, descrito neste texto, tem sua aplicação junto a analisadores de massa, e portanto apresenta uma disposição horizontal⁷⁹. O plasma é gerado no interior de um conjunto de três tubos concêntricos de quartzo, denominado de tocha⁵⁰ (FIGURA 3.1)

A tocha comumente usada se baseia no desenho de SCOTT e FASSEL⁸⁰, e consiste em um tubo externo de 18mm de diâmetro e 100mm de comprimento. em seu interior estão dois tubos concêntricos de 13 e 1,5 mm de diâmetro internos⁷⁹. Estas dimensões definem o fluxo de argônio, que sustenta o plasma e resfria a tocha. As entradas mais externas de gás são tangenciais, criando assim um fluxo vorticular⁷⁹.

O tubo central introduz a amostra no plasma e seu fluxo é longitudinal. Na tubulação externa é introduzido o gás refrigerante que protege as paredes da tocha e age como o gás suporte principal do plasma⁶⁷. O fluxo auxiliar previne a ponta de introdução de amostra contra fusão⁶⁷.

Na extremidade da tocha, é posicionada uma bobina (espiral) de indução eletromagnética, sobre a qual se aplica um campo magnético oscilante na faixa de radiofrequência, em geral de 2 a 80 MHz⁶⁷.

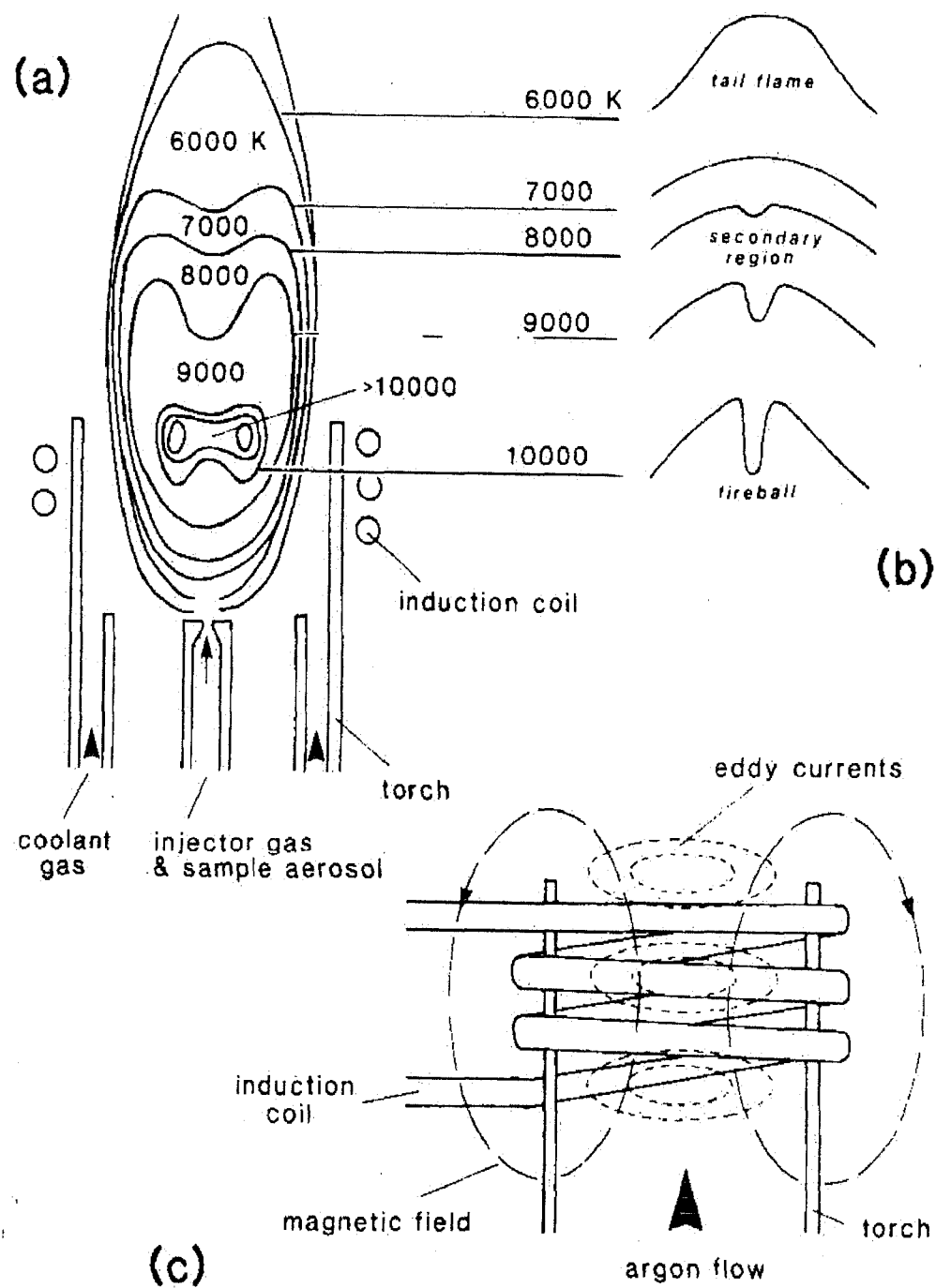


FIGURA 3.1: Configuração da (a) e (c) tocha e das (b) zonas de temperatura

Uma centelha fornece os primeiros elétrons livres, pois na condição inicial o gás neutro de suporte não é condutor. Esta centelha é gerada por uma fonte externa em uma agulha introduzida na tocha, na qual é aplicado um potencial elevado.

Estes elétrons gerados na centelha são acelerados pelo campo magnético na mesma direção das correntes de indução, e passam a formar correntes circulares, e a energia é transferida das partículas para os átomos neutros por colisão. Neste instante o livre caminho médio é pequeno, e como a taxa de colisão é alta, há o favorecimento dos mecanismos de excitação e ionização⁷⁵.

A trajetória dos íons formados é resultante de duas componentes: a componente circular gerada por correntes indutivas na bobina e a componente linear gerada pelo fluxo de gás. A trajetória resultante é descrita como um deslocamento helicoidal⁵⁰. Uma vez formado, na saída da tubulação, devido a estrutura do conjunto da tocha e de seu arranjo dentro do campo magnético, o plasma assume uma aparência toroidal^{50,79}.

3.1.6. PROCESSO DE INTRODUÇÃO DA AMOSTRA E EXTRAÇÃO DOS ÍONS

A amostra é levada ao nebulizador por meio de uma bomba peristáltica. Um fluxo de gás argônio em alta velocidade produz um fino aerossol da solução a ser analisada. As gotas maiores são removidas da câmara de vaporização garantindo que somente as de menor dimensão sigam o percurso pelo canal central (axial). Ao atravessá-lo as gotículas são secas e vaporizadas. Neste instante ainda sob a forma molecular, ocorrem os processos de atomização e ionização progressivamente.

Um dos aspectos mais críticos é a extração dos íons formados no plasma. Para que seja obtida uma maior eficiência de extração e transmissão de íons, são também requeridos movimentos dos íons através de um campo eletromagnético em condições essencialmente livres de colisões. Para tanto, o livre caminho médio (distância média percorrida entre duas colisões) aumentar de 10^{-4} cm, no plasma para cerca de 1m ou mais na região de vácuo.

Os íons são extraídos formam um feixe que é acelerado em uma sucessão de estágios. A extração dos íons se dá inicialmente, na chamada interface de amostragem, composta pelo cone amostrador e por um cone se denominado "skimmer". A função da interface de amostragem é garantir que, mesmo com um grande número de íons gerados no plasma, somente uma fração destes seja extraída para as câmaras diferenciais de vácuo.

É através do cone amostrador, que a porção mais central do plasma flui formando uma cauda bem definida. A porção exterior do vórtex do plasma é defletido para fora do amostrador, e não é coletada.

As características do espectro de massa dependem da posição relativa de coleta dos íons. O sinal do íon analito é máximo quando o orifício de amostragem é colocado de 1 a 2 mm depois da zona inicial de radiação. A localização mais sensível, ou seja, a que fornece a maior quantidade de íons M^+ é bem definida, mostrando o máximo de intensidade, para todos os elementos, na mesma posição relativa.

3.2. OS ANALISADORES DE MASSA:

A espectrometria de massa teve seu começo com o estudo de partículas elementares. THOMPSON obteve feixes de raios positivos e deformou suas trajetórias formando parábolas⁶³. Desta maneira, THOMPSON estabeleceu que as partículas positivas eram fragmentos de massa remanescentes de átomos ou moléculas neutras, dos quais um ou mais elétrons haviam sido arrancados⁶³. A partir destes experimentos surgiu a evidência de que o Neônio apresentava duas formas isotópicas, de massas 20 e 22. Esta foi a primeira indicação da ocorrência de isótopos entre elementos estáveis, visto que o conceito já existia para elementos radioativos. Em 1920, foram determinadas as abundâncias dos isótopos de Mg, Li, K, Ca e Zn.

Segundo FARMER⁸¹, o termo espectrômetro de massa pode ser aplicado a qualquer dispositivo capaz de separar ions gasosos segundo sua razão massa/carga. De acordo com a teoria proposta por THOMPSON, a separação pela razão massa carga é obtida pela aplicação de um campo elétrico ou magnético. Deste modo os analisadores de massas empregam estes tipos de campos ou ambos⁸¹. Uma divisão genérica feita por FARMER, denomina os espectrômetros de massas em estáticos e dinâmicos, justamente por estes empregarem campos magnéticos e elétricos respectivamente.

No espectrômetro de massas ideal de FARMER⁸¹, os íons são gerados, separados e detectados sem colisões com outros íons ou moléculas. Na prática é necessária uma atmosfera de 10^{-5} Torr, para que esta condição seja atingida. Nesta condição de pressão o livre caminho médio é longo quando comparado com a trajetória do íon.

Os analisadores do tipo estáticos seguem o princípio de que os íons são defletidos, quando estão sob a ação de campos magnéticos⁸².

A passagem de partículas carregadas através de um campo magnético (FIGURA 3.2) resulta em uma trajetória circular cujo raio é dado pela equação 3.1.

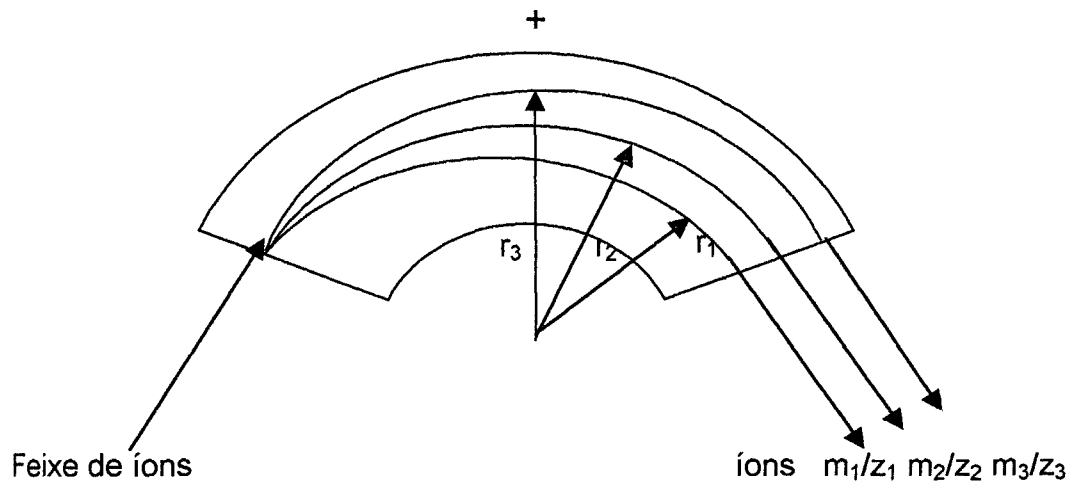


Figura 3.2: Esquema da separação de íons com razões massa/carga diferentes.

$$r = \frac{1}{B} \sqrt{2V \frac{m}{z}} \quad \text{Eq. 3.1.}$$

Onde V é a voltagem de aceleração dos íons, B é a intensidade do campo magnético e m/z a razão massa carga do íon considerado.

Deste modo, quando um feixe de íons de energia cinética uniforme é acelerado em um campo magnético, os íons emergem em trajetórias diferentes em função das diferenças na razão massa carga. Este é o princípio de funcionamento dos analisadores de massa.

Em termos práticos, para obter a separação dos íons pela razão massa carga, neste tipo de analisador são modificados a intensidade do campo magnético (B) ou

o potencial (V), o restante das variáveis são constantes de construção de cada instrumento.

Em 1934, HERZOG e MATTAUCH estudaram as propriedades de focalização dos íons em meio a campos magnéticos e elétricos e chegaram a EQUAÇÃO GERAL DA FOCALIZAÇÃO⁶³. Este estudo possibilitou o projeto e a construção de diversos tipos de analisadores de massa em diversas geometrias, inclusive os analisadores de alta resolução, também chamados de dupla focalização, aplicado neste estudo.

3.2.1. ANALISADORES DO TIPO QUADRUPOLO:

Este tipo de analisador consiste em quatro superfícies cilíndricas ou semi-cilíndricas (FIGURA 3.2.) nas quais são aplicados potenciais alternados, que formam um sistema comumente conhecido como quadrupolo. As intensidades dos potenciais aplicados em cada polo são ajustadas, de modo a permitir que um dado íon, que apresente uma relação massa-carga m/z , seja acelerado na direção z em uma trajetória estável e ultrapasse a região do quadrupolo. Qualquer outro íon de relação massa-carga diferente da ajustada tem uma trajetória, na direção z , instável e colide contra um dos pólos, ou é expulso para fora da região de ação dos campos.

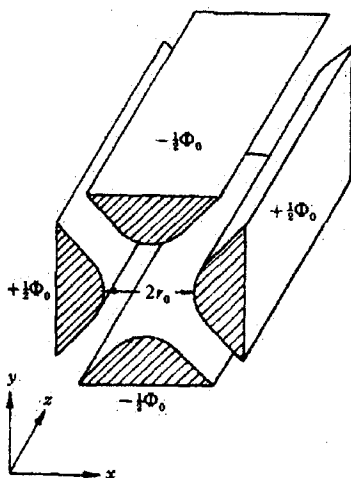


FIGURA 3.3. Esquema geral dos analisadores de massa do tipo quadrupolo⁶³

A resolução alcançada por este tipo de analisador de massa é da ordem de até 0,7 uma, ou seja, são separados íons com diferença de massa superiores a este valor⁷⁹. Esta resolução limita o emprego destes analisadores a espectrometria de massa elementar.

Segundo a classificação de FARMER⁸¹, o analisador do tipo quadrupolo é um analisador de massa dinâmico, pois suas condições de potenciais elétricos variam drasticamente em ciclos.

Segundo WHITE⁸², o analisador do tipo quadrupolo seria mais um filtro de massas, pois não há focalização de trajetórias ou dispersão de massas, e sim uma pequena faixa de valores de m/z que tem suas trajetórias estáveis.

3.2.2. ANALISADOR DE MASSA DO TIPO SETOR MAGNÉTICO E ELETROESTÁTICOS:

Os analisadores de massa do tipo setor magnético consistem em um magneto sobre o qual é aplicada uma corrente. Neste processo é gerado um campo magnético que será o responsável pela separação dos íons. Neste caso, as varreduras de massa são mais lentas pois a variação da corrente que gera o campo deve ser feita lentamente devido a indutância do campo magnético.

Os analisadores eletroestáticos consistem em uma tubulação curva sobre a qual são aplicados potenciais, geradores de um campo elétrico responsável pela separação dos íons.

Entretanto estes analisadores são chamados de simples focalização e não permitem separar íons de diferentes cargas que também apresentem-se com diferentes energias cinéticas⁸². Deste modo, foram empregados sistemas de dupla focalização que utilizam analisadores eletroestáticos e magnéticos^{81,82}, para se obter um feixe de íons focalizado direcionalmente, para uma dada razão massa/carga mesmo quando as energias são diferentes.

O analisador magnético⁸² elimina divergências angulares do feixe de íons e permite a focalização direcional deste; e o analisador eletroestático permite a focalização e o ajuste de velocidades. No analisador eletroestático são focalizados íons com a mesma massa que apresentam diferentes velocidades.

Os primeiros espectrômetros de dupla focalização foram construídos por MATTAUCH⁸³ e HERZOG⁸⁴, DEMPSTER⁸⁵, BAINBRIDGE e JORDAN⁸⁶. O instrumento

de MATTAUCH e HERZOG⁸³ consistia em um analisador de massas de configuração eletroestática –magnética com capacidade de focalizar qualquer massa entre as do Boro e as do Urânio, com o simples ajuste do campo magnético.

NIER⁸⁷ desenvolveu mais tarde um modelo de espectrômetro de massas de dupla focalização que mereceria menção por ser de pequeno porte e mais competitivo em termos de sensibilidade e resolução, empregando um setor magnético. Estas características foram alcançadas pela alta estabilidade do potencial de aceleração e do campo magnético. O instrumento desenvolvido por NIER foi ainda notável por permitir a calibração em função de massas conhecidas já inseridas no seu ciclo de varredura de campo e por ter sido o primeiro a apresentar uma detecção inteiramente elétrica ao invés de por chapa fotográfica.

Os analisadores de massa do tipo setor magnético alcançam uma resolução de até 5.000, enquanto sistemas de dupla focalização chegam até a 50.000 unidades de resolução⁶². Com este poder de resolução as primeiras aplicações deste tipo de analisador de massa foi na separação de fragmentos de íons de moléculas orgânicas. Apenas recentemente⁶² foram colocados no mercado os primeiros equipamentos de alta resolução com aplicação elementar, como o empregado neste trabalho.

IV. CASUÍSTICA E MÉTODOS:

4.1. PROTOCOLO EXPERIMENTAL DO ESTUDO DE CASO:

O estudo de caso foi realizado com 23 amostras de soro sangüíneo de atletas maratonistas, em continuação a um projeto conjunto com o Departamento de Nutrição Experimental da Faculdade de Ciências Farmacêuticas - USP. As etapas de Decisão de Critérios de Seleção, Seleção, Coleta, Levantamento de Dados Antropométricos, Questionamento sobre a Dieta e Acompanhamento dos Atletas ficou a cargo do M.Sc. José Wilder Peralta Vasquez e da Profa. Dra. Célia Colli.

O procedimento de coleta é o empregado em rotina no Laboratório de Nutrição Experimental. Dados adicionais sobre os indivíduos e amostras estão disponíveis no trabalho de Vasquez¹⁵. As informações empregadas neste trabalho para a avaliação do grupo de estudo são mostradas na TABELA 4.1 A seleção dos indivíduos foi feita no período no primeiro semestre de 1996. Os critérios de seleção dos atletas estipularam as seguintes características:

- Que fossem indivíduos de ambos os sexos;
- Que praticassem atividade física regular na cidade de São Paulo, Ribeirão Pires, Campos do Jordão e Santos;
- Que participassem de maratonas regularmente nos últimos 12 meses;
- Que estivessem em fase pré-competitiva.

Após a seleção dos indivíduos, e até duas semanas antes de uma competição, as amostras de sangue foram coletadas e fracionadas. Parte das amostras foram destinadas a análise dos parâmetros hematológicos (Hemoglobina, % de saturação da transferrina e ferritina sérica), realizados pela Faculdade de Ciências Farmacêuticas – USP. O restante foi cedido ao Laboratório de Caracterização Isotópica/IPEN para a realização deste estudo. As amostras foram então preparadas de acordo com o procedimento descrito na seção 4.2.5. Foram determinadas as concentrações elementares de 33 nuclídeos de elementos essenciais e tóxicos, por espectrometria de massa de alta resolução com fonte de plasma indutivo (HR-ICP-MS), em condições operacionais e de resolução otimizadas.

Os valores de concentração obtidos foram avaliados por procedimentos de análise multivariada descritos a seguir. Estes resultados foram cruzados com os dados disponíveis sobre o histórico pessoal e clínico de cada atleta.

TABELA 4.1: Nomenclatura adotada e os dados relevantes referentes a este trabalho(VASQUEZ¹⁵).

Indivíduo	Sexo	Idade	Hb g/dL	Sat. Transf. %	Ferritina ng/mL	Nº de provas/ ano	Anos de prática esportiva
01	M	29	14,7	32,5	41,4	3	7
02	M	26	14,4	43,5	16,4	3	7
03	F	31	13,5	37,9	21,0	2	14
04	F	34	13,5	55,8	37,6	1	6
05	F	38	12,3	27,8	11,9	5	15
07	M	33	15,2	28,5	22,2	3	12
08	F	33	14,7	27,9	49,9	1	9
09	M	30	15,6	28,9	52,3	2	-
10	M	30	14,9	33,1	82,7	2	9
11	M	31	15,4	64,8	116,6	1	8
12	F	21	14,0	70,4	38,0	1	1
13	M	34	14,0	20,3	46,0	5	11
14	M	38	15,0	20,8	35,5	4	10
15	M	31	14,3	29,0	136,5	4	9
16	M	36	14,0	44,8	30,2	4	12
17	M	-	15,5	24,7	58,2	-	-
18	M	30	16,6	47,5	73,5	5	5
19	M	32	15,7	24,3	23,1	2	10
21	M	35	15,9	43,0	70,5	5	10
23	M	32	15,4	23,7	67,3	3	17
25	F	35	12,5	33,5	8,9	4	13
26	F	34	13,6	34,4	46,8	3	8
29	M	32	15,5	36,2	19,3	5	10
Média		31,9	15,13	34,10	53,86	3,4	9,1
Masculina		±3,0	±0,72	±11,99	±33,95	±1,3	±3,7
Média		32,3	13,44	41,10	30,59	2,4	9,4
Feminina		±5,4	±0,83	±16,01	±16,59	±1,6	±5,0
Média		32,5	14,62	36,30	46,77	3,1	9,2
Total		±3,7	±1,08	±13,37	±31,32	±1,4	±4,1

4.2. MATERIAIS E MÉTODOS:

4.2.1. INSTRUMENTAL:

Neste estudo todas as análises foram realizadas empregando-se um espectrômetro de massa de alta resolução com fonte de plasma induzido, modelo ELEMENT, Marca FinninganMAT. A configuração deste equipamento é descrita com maiores detalhes a seguir⁸⁸:

- a. Sistema de Introdução de Amostras: Este sistema consiste de uma bomba peristáltica (Gilson, França); nebulizador pneumático do tipo Meinhard, câmara de expansão do tipo SCOTT (FIGURA 4.1);
- b. Fonte de íons: Consiste de tocha do tipo FASSEL, bobina de indução, sistema de refrigeração e gerador de radiofrequência (FIGURA 4.1);
- c. Sistema de interface: Este é o primeiro estágio de transição entre a região do plasma, a pressão atmosférica e o detetor, a alto vácuo. Consiste do cone de amostragem, do Skimmer cone e de uma bomba de vácuo (FIGURA 4.2);
- d. Sistema de focalização de íons: Neste sistema situam-se mais três estágios de vácuo. São encontrados também dois quadrupolos responsáveis pelo ajuste do feixe de íons e as lentes de focalização e extração responsáveis pela aceleração dos íons. Este sistema se encerra na chamada fenda de entrada (FIGURA 4.2)

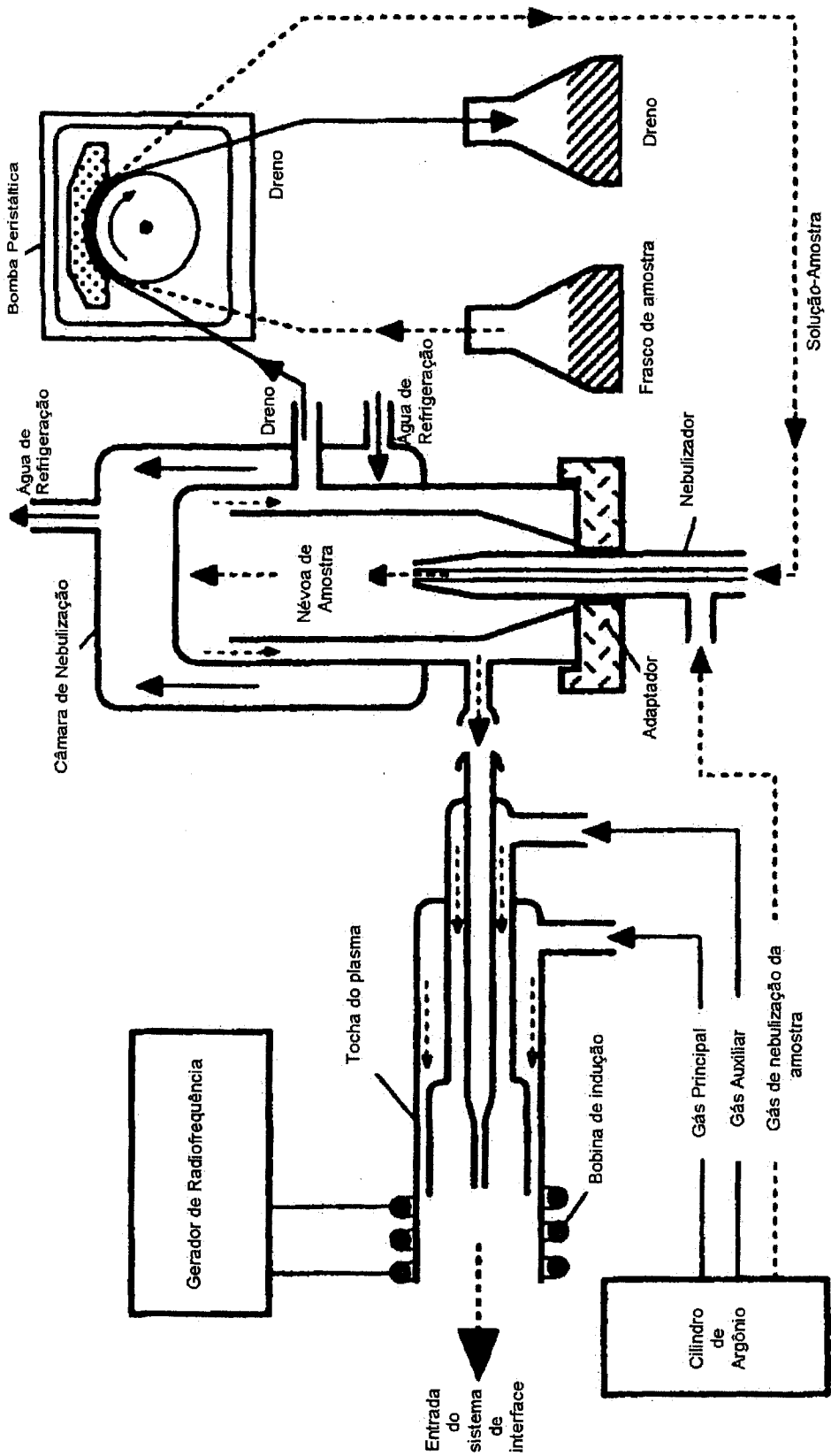


Figura 4.1: Sistema de introdução, nebulização e ionização da amostra.

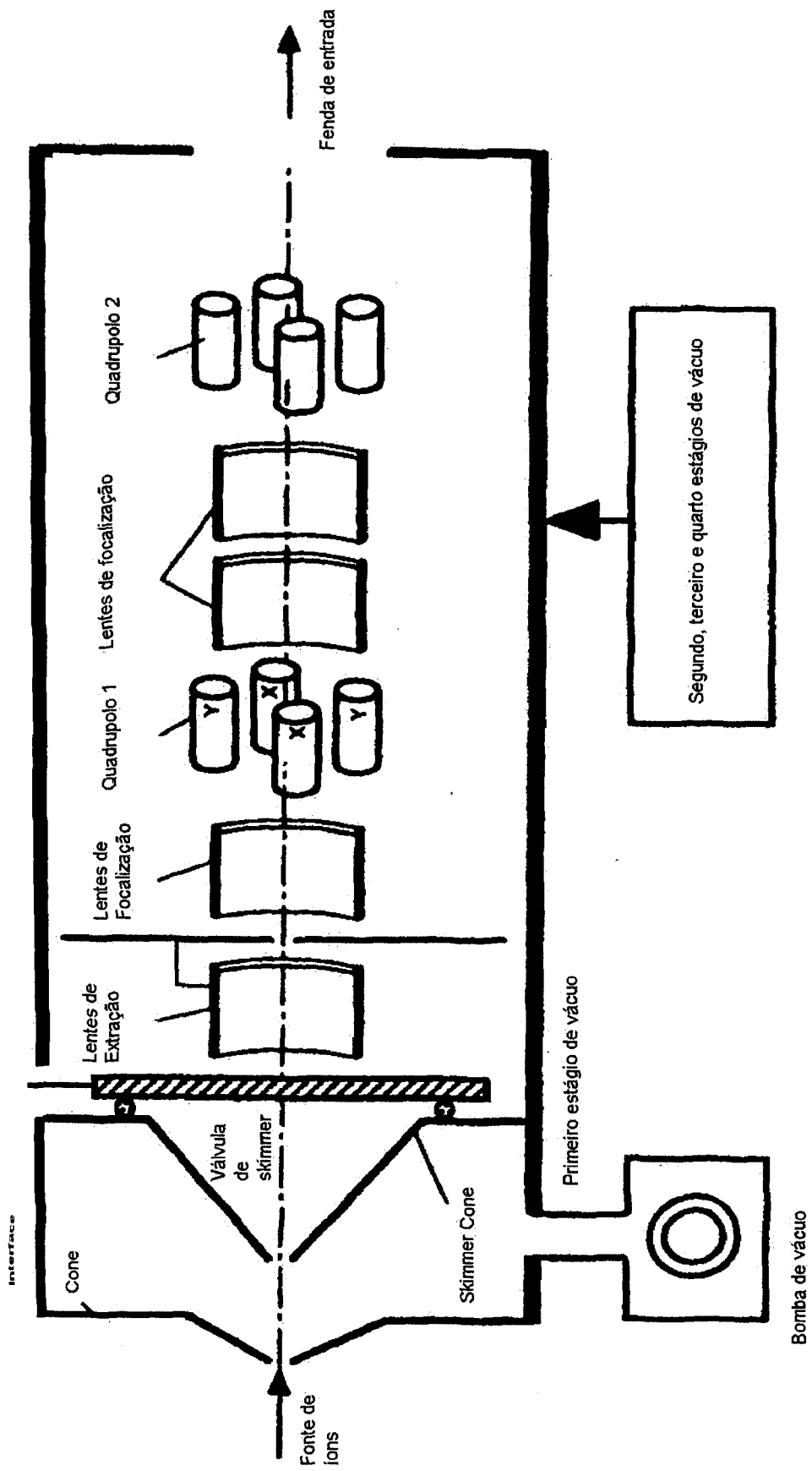


Figura 4.2. Componentes do sistema de interface e de focalização de íons do HR-ICP-MS (Finningan Mat)⁷⁹.

- e. Analisador de massa ou setor magnético: O analisador de massa tem geometria NIER-JOHNSON Reversa, que consiste em um setor magnético e um analisador eletroestático. A voltagem normal de aceleração é de 8kV. Nesta região do espectrômetro são separados os íons pela razão massa carga (FIGURA 4.3);
- f. Sistema de Detecção: Este consiste de um diodo de conversão de sinal e uma multiplicadora de elétrons secundária (SEM). Os íons colidem com o diodo, sendo convertidos em elétrons, os quais são acelerados até a SEM. Deste modo a corrente que chega até a SEM é convertida em sinal que é convertido e relacionado, mais tarde, a uma dada concentração. A SEM opera em dois modos: O analógico, pelos quais os elétrons secundários atravessam 7 diodos e que deve ser empregado para sinais mais intensos; e o modo de contagens onde os elétrons secundários passam por 19 diodos, que deve ser empregado para sinais menos intensos (FIGURA 4.3);
- g. configuração de Hardware e Software: O instrumento é todo controlado através de uma estação de trabalho, com sistema operacional WINDOWS NT, e gerenciada pelo software de trabalho ELEMENT NT v.1.6.

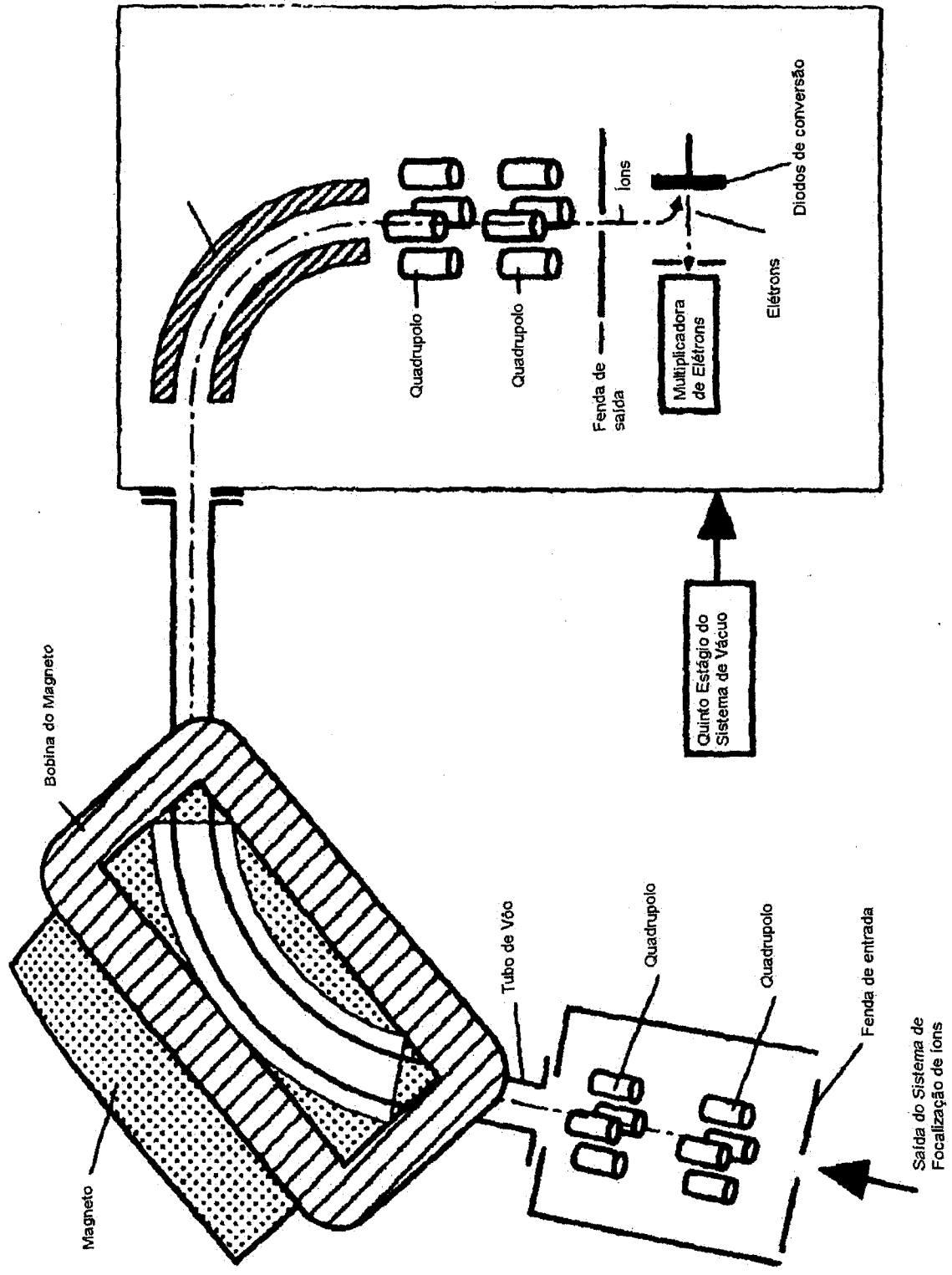


Figura 4.3: Analisador de massa do tipo setor magnético e detector do HR-ICP-MS (Finningan Mat)⁷⁹

4.2.2. REAGENTES

No preparo de soluções elementares e multielementares foram empregados padrões SPEX, contendo o elemento de interesse a uma concentração de 1000mg/L, ou soluções multielementares SPEX (CLMS-1 e CLMS-2) a uma concentração de 10mg/L.

O meio de preparo das soluções e o branco de análise consistiu de uma solução de HNO₃ (MERCK, Suprapuro) diluído 1+99 em volume com água.

Toda a água empregada no preparo de soluções e na lavagem foi deionizada e purificada por osmose reversa (Milli-Q).

4.2.3. SOLUÇÕES SIMULADAS:

As amostras reais de soro sangüíneo tem um elevado conteúdo de sais dissolvidos e de proteínas. Desta maneira foram empregadas na simulação da matriz soluções de NaCl a 0,0001; 0,001; 0,01; 0,1; 1 e 10g/L e de albumina a 0,0063; 0,063 e 0,63 g/L de modo a reproduzir a concentração daqueles compostos.

4.2.4. CURVAS DE CALIBRAÇÃO E ADIÇÃO:

As curvas de adição foram preparadas de acordo com a TABELA 4.2. Nos estudos de precisão foram preparadas quatro curvas diferentes. As curvas de calibração foram preparadas de modo similar, sem a adição da amostra.

TABELA 4.2: Demonstrativo da preparação das curvas de adição.

Adição	A ₁	A ₁ +S ₁	A ₁ +S ₂	A ₁ +S ₃	A ₁ +S ₄
Volume de Amostra diluída 1+9(mL)	1	1	1	1	1
Solução Padrão 100ppb(mL)	0	0,2	0,5	1,0	2,0
HNO ₃ 1%(mL)	9	8,8	8,5	8	7
Volume Final(mL)	10	10	10	10	10
Concentração final(ug/L)	0	2	5	10	20

4.2.5. AMOSTRAS REAIS:

Por ICP-MS, a análise de qualquer fração do sangue sem diluição é quase impossível, devido aos efeitos extremos de supressão de sinal, causado pelo elevado conteúdo de sais dissolvidos e de proteínas⁸⁹. Portanto é recomendada uma etapa de diluição. Procedeu-se com a amostra real uma série de diluições, de modo que as faixas de concentração atingidas coincidisse com as faixas das soluções simuladas. Para isso os fatores de diluição aplicados foram de 1:10, 1:100, 1:250 e 1:500.

4.3. ANÁLISE ESTATÍSTICA:

A avaliação dos dados decorrentes da análise multielementar em amostras de soro sangüíneo de um grupo de atletas pode ser considerada complexa devido a matriz de dados associados ao sistema. Um número X de indivíduos cada um correspondendo a uma amostra com Z elementos de interesse medidos em N replicatas corresponde a uma estrutura de experimento de $X \times Z \times N$ resultados. Nesse estudo essa matriz A teve 621 resultados ($23 \times 9 \times 3$). Portanto a fim de superar este problema foi empregada a análise de dados via componentes principais^{90,91,92}. Este método determina o número de componentes independentes responsáveis por variações no sistema e reduz o número de dados a estes componentes⁹⁰. A primeira componente responde pelo comportamento geral do grupo, sem considerar desvios individuais. As outras componentes determinadas respondem por variações diversas, inclusive as individuais.

O objetivos da aplicação deste método foi o de Identificar as fontes de variação individuais que incidem sobre o grupo de estudo e separá-las das características de grupo, a fim de melhor classificar os indivíduos.

A análise de dendrogramas (clusters) e a análise multidimensional empregada na redução aos componentes principais, fez parte do programa SPSS (Statistical Package for the Social Sciences, Chicago, IL, USA). Este método é particularmente conhecido por auxiliar no reconhecimento de padrões de comportamento não previsíveis (unsupervised pattern recognition technique)⁹³.

A análise aplicada constituiu-se de duas etapas:

Na primeira foi feita a determinação dos componentes principais e sua representação. Nesta fase são identificadas (a) amostras ou medidas anômalas (b) as relações entre as variáveis medidas e (c) relações e agrupamentos entre amostras. Na segunda etapa são propostos os modelos que expliquem tais comportamentos. Uma descrição mais detalhada do modelo matemático empregado foi realizada por SCARMÍNIO⁹⁴.

As amostras do estudo de caso tiveram seus valores de concentração avaliados, para a identificação dos componentes principais. Foi determinado, em cada amostra um total de 33 nuclídeos. Deste modo cada amostra é representada por um ponto em um espaço de 33 dimensões. Os parâmetros empregados são alguns dos empregados por SCARMÍNIO⁹⁴:

- Todos os dados foram autoescalados, de modo a se obter média zero e variância igual a um.
- A medida de similaridade é dada pelo quadrado da distância euclidiana.

De modo a se obter uma configuração mais simples de variáveis (resultados em concentração ou intensidade) ou de objetos (amostras ou indivíduos) foi aplicada a técnica da rotação VARIMAX, que consiste na parametrização dos dados e na mudança dos eixos de referência para a expressão em uma matriz de dados mais simplificada.

4.4. DETERMINAÇÃO DA ESTABILIDADE DE MEDIDA:

4.4.1. CONSIDERAÇÕES GERAIS:

Este experimento serviu na avaliação da flutuação do sinal, inerente ao instrumento de medida, em condições constantes a curto e longo prazo. Para a avaliação da estabilidade de sinal é necessária a descrição do procedimento de aquisição do sinal e da estatística de contagens de uma medida.

O espectro de massa é composto diversos picos, e a quantificação destes é feita pela integral da área correspondente. A área de um pico qualquer será o produto da região de massa $[d(m/z)]$ desejada pela altura do sinal de cada canal de aquisição⁸⁸. Os valores normais são de 15 canais por unidade de massa e de uma integração de 80% da região de massa do pico⁸⁸. Este valor corresponderá a uma aquisição de dados.

A medida será, portanto, a média interna de um dado número (n) de aquisições correspondentes a (p) passagens do magneto por todo o intervalo de massa, vezes (r) corridas efetuadas sobre uma massa específica. Uma medida é considerada como determinação independente efetuada em um intervalo de tempo de alguns milisegundos.

Este valor da média interna é fornecido, de acordo com a Equação 4.1, juntamente com seu desvio absoluto pelo software, Element NT versão 1.6 (Finningan MAT) de gerenciamento do instrumento. O desvio da média interna

muitas vezes é tratado como a estabilidade interna da medida, ou como percentual de repetibilidade da medida⁹⁵.

$$\bar{y}_j = \frac{\sum_{i=1}^n y_i}{n} \quad \text{Eq. 4.1}$$

onde $n = p \times r$ (Número de medidas internas)

y_i = Integral da área sob o pico de uma aquisição.

\bar{y}_j = Média interna das aquisições ou medida.

A estabilidade externa é avaliada através do desvio da intensidade de sinal de um conjunto (m) de medidas de uma mesma solução, em intervalos de tempo da ordem de minutos ou horas.

A partir deste conjunto de medidas é obtida uma média externa calculada conforme a Equação 4.2 e seu desvio padrão relativo. Pois de um modo geral o desvio padrão relativo expressa a incerteza da medida. No caso de m medidas, o desvio padrão expressa a estabilidade externa ou o percentual de repetibilidade entre medidas⁹⁵.

$$\bar{y}_e = \left(\frac{\sum_{j=1}^m \bar{y}_j}{m} \right) \quad \text{Eq. 4.2}$$

onde: m = número de medidas independentes no tempo.

\bar{y}_e = Média externa das intensidades de sinal, no intervalo de tempo t , nas condições c .

Como somente o desvio padrão não expressa as tendências assumidas pelo sinal, foi efetuada uma análise dos resíduos (diferenças) das medidas em relação à média externa, segundo a Equação 4.3.

O emprego da análise dos resíduos é relativamente simples, por em condições normais de operação, os resíduos apresentarem uma distribuição aleatória. Sendo facilitada a identificação de "outliers" ou da ocorrência de um efeito significativo sobre as medidas, pois há uma alteração em sua distribuição.

$$R_i = y_e - y_i \quad \text{Eq. 4.3}$$

Onde: R_i = Resíduo no instante i

4.4.2. PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL:

Acompanhou-se a intensidade dos sinais obtidos de 38 nuclídeos a uma concentração elementar de 10ug/L, nos modos de baixa e média resolução. Esta solução multielementar foi nebulizada continuamente durante nove horas.

Nas primeiras duas hora foram feitas medidas a cada 5 minutos. Nas horas seguintes os intervalos foram de 15 minutos. Todas as medidas foram realizadas nas condições instrumentais otimizadas.

Desta forma, a estabilidade a curto prazo consistiu da aquisição de medidas externas ($m=19$), no intervalo de tempo de 0 a 120 minutos. A estabilidade a longo prazo consistiu da aquisição de medidas externas no intervalo de tempo de 120 a 540 minutos ($m=29$).

Todas as medidas foram realizadas nas condições instrumentais otimizadas. No modo de média resolução, não se estabelece valor limite para a estabilidade a longo prazo, devido a necessidade de recalibrações de massa mais frequentes⁸⁸.

4.5. LIMITE DE DETECÇÃO:

4.5.1. CONSIDERAÇÕES GERAIS:

O limite de detecção (L_D) é definido como a menor concentração do analito, que se diferencie com razoável confiança do nível do branco^{96,97,98}. Esta figura de mérito é dependente da técnica e também das condições laboratoriais, portanto é um dos requisitos para a validação de métodos.

Para o cálculo do Limite de detecção, seguiu-se a recomendação do Analytical Methods Committee⁹⁹, empregando-se a Equação 4.4.

$$L_c = k \times t_{(1-\alpha, \nu)} \times S_0 \quad \text{Equação 4.4}$$

onde t é o valor da distribuição t para um dado limite de confiança (α) e para um dado grau de liberdade do experimento (ν) e S_0 é o desvio padrão médio de 10 determinações independentes do branco. O valor do intervalo de confiança estipulado para estes experimentos foi de 95%, em 10 determinações, para os quais $k \times t_{(1-0,05; 9)}$ é igual a 3.

Esta recomendação é feita pelo Analytical Methods Committee⁹⁹ a fim de que a probabilidade de se obter um resultado falso-positivo empregando este procedimento é quase igual a zero. Desta maneira pretende-se impedir que um ruído de qualquer origem seja quantificado como sinal do analito.

Apesar do limite de detecção ser um valor teórico, têm-se com ele uma avaliação conjunta da relação sinal/ruído, da sensibilidade e da estabilidade de medida, para a técnica. Além de permitir comparações entre laboratórios, para a mesma técnica.

Neste trabalho, aplicou-se a Eq. 4.4., do limite de detecção em contagens por segundo, para que este fosse expresso em unidade de concentração. Para obter-se esta unidade é necessária a divisão pelo valor da sensibilidade (S)⁹⁸ de cada elemento (Equação 4.5.). A sensibilidade corresponde também a inclinação da reta de calibração.

$$S = \frac{y_p - y_b}{x_p} \quad \text{Equação 4.5}$$

Onde y_p é a intensidade do padrão, y_b a intensidade do branco e x_p a concentração do padrão.

4.5.2. PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL:

Foram preparadas e medidas 10 soluções de HNO₃ 1%(branco) e 10 soluções multielementares de concentração 10ug/L. Para cada medida foram realizadas 10 aquisições. A leitura dos brancos foi intercalada com as soluções padrões. As medidas foram feitas em dois modos de resolução (R=300 e R=3000). Este procedimento foi repetido a, pelo menos, cada seis meses de operação.

4.6. AVALIAÇÃO QUANTO A OCORRÊNCIA DE INTERFERENTES:

4.6.1. INTERFERÊNCIAS NÃO ESPECTRAIS:

Os interferentes não espectrais são alguns dos principais causadores de erros de medida, associados a técnicas que empregam plasma de argônio indutivo como fonte de íons.

Em geral, as interferências não espectrais decorrem de efeitos físicos causados pela proporção de sólidos dissolvidos na solução de medida¹⁰⁰, por esta razão são também chamados de Efeitos de Matriz.

As principais consequências destes efeitos são:

- a. Mudanças na eficiência de nebulização^{100,101};
- b. Mudanças na taxa de formação dos íons no plasma¹⁰¹ e;
- c. Mudanças no transporte de íons até o analisador de massa.

Diversos trabalhos descrevem os processos e a teoria destes efeitos^{102,103, 104}.

Nesta etapa do trabalho, pretende-se avaliar o fator de diluição aplicado na amostra, a ser introduzida no instrumento, de modo a evitar estes efeitos descritos acima. Portanto, algumas abordagens são necessárias, tais como: a simulação de matriz, o estudo de comportamento com amostras reais e da reciprocidade da relação de calibração:

a. Simulação da Matriz:

As soluções simuladas foram preparadas conforme o descrito na seção 4.2.3. com a adição de In a uma concentração final de $10\mu\text{g/L}$, como padrão interno.

As soluções simuladas foram medidas e os valores de intensidade obtidos foram comparados com os valores de intensidade de soluções padrão sem o meio de simulação. Foi admitida uma variação de sinal compatível com o esperado pelos experimentos de estudo da estabilidade de sinal.

b. Estudo do comportamento de amostras reais:

As amostras reais foram preparadas de acordo com o descrito na seção 4.2.5. A cada diluição, foram efetuadas medidas e calculadas as concentrações aparentes, pela comparação com as intensidades obtidas para uma curva de calibração externa.

Procurou-se então identificar uma faixa de concentração para a qual não fossem observados efeitos de supressão, interferentes espectrais e que proporcionasse condições satisfatórias de quantificação.

c. Reciprocidade da curva de calibração:

Algumas matrizes favorecem a ocorrência de diferenças significativas no sinal do analito, expressas nas relações de calibração^{105,106}, prejudicando resultados quantitativos.

As diferenças na relação de calibração ocorrem por que em geral os métodos instrumentais são relativos. Assim sendo, o processo de quantificação depende que resultado da análise da amostra seja igual ao resultado de um padrão de mesma concentração. Caso isso ocorra, a amostra pode ser quantificada a partir daquela curva de calibração. Caso contrário, não havendo reciprocidade na relação de calibração, outros procedimentos analíticos devem ser adotados, tais como a adição de padrão.

Este efeito pode ser facilmente identificado, pois comparando-se a curva de calibração (padrões) com uma curva de adição (padrões + amostra) dois comportamentos podem ser observados:

- Uma diferença significativa na inclinação das retas de calibração e adição, para a qual há efeitos de matriz alterando o resultado da medida,
- ou a igualdade nas inclinação das retas, para a qual não há efeitos de matriz alterando o resultado da medida.

De modo estudar este efeito, foram preparadas quatro curvas de adição de padrões e de calibração, de acordo com o descrito acima.

4.6.2. AVALIAÇÃO DE INTERFERÊNCIAS ISOBÁRICAS:

Este experimento visou estimar a influência dos interferentes espectrais sobre o sinal obtido sobre o analito.

a. Estudo das razões isotópicas:

A composição isotópica natural entre os isótopos de um dado elemento mantém uma proporcionalidade, que é denominada abundância isotópica natural. Excetuando procedimentos específicos para a modificação desta razão, tais como o enriquecimento isotópico, o valor da composição natural se mantém constante¹⁰⁷. Sendo assim, a composição isotópica natural pode ser empregada como indicador da ocorrência de interferência espectral, e como indicador da exatidão da medida¹⁰⁸.

Em se tratando da análise por espectrometria de massa, quando é observado um desvio em relação a razão natural acentuado, esta modificação pode ser atribuída a formação de espécies interferentes, sobre a massa de um dos isótopos avaliados.

Deste modo, foram medidas as razões isotópicas dos elementos de interesse em presença de uma amostra real 100 vezes diluída, e esta foi comparada com a razão isotópica natural esperada. Nesta avaliação foram levados em conta a precisão com que a medida foi efetuada e o desvio entre o valor obtido e o valor esperado, para os modos de baixa e média resolução.

b. Avaliação do espectro de massa no modo de média***resolução:***

Com o espectrômetro de massa de dupla focalização empregado neste estudo, alguns dos interferentes podem ser separados com o emprego do modo de média resolução. Deste modo pode-se verificar exatamente qual é o interferente que está sendo formado se sobrepondo ao sinal do analito.

Neste trabalho, empregou-se a medida da razão isotópica como mecanismo de confirmação dos resultados na avaliação da ocorrência de interferentes espectrais¹⁰⁹.

A aplicação do modo de média resolução permite que sejam separados núclídeos com diferença de 0,1 u.m.a. Deste modo foi estudada a separação de analitos e interferentes, com estas diferenças de massa, presentes no plasma sanguíneo.

Foi estudada a presença de interferentes sobre os sinais de alguns núclídeos, tais como: Cr, Fe, Zn, Cu, V e Mn. Deste modo foram preparadas soluções multielementares nas seguintes concentrações 1, 10, 25, 50 e 100 ug/L e amostras diluídas 10, 100 e 250 vezes.

4.7. VERIFICAÇÃO DA EXATIDÃO DA MEDIDA:

a. Sangue Total (IAEA-A-13)

Utilizou-se a amostra de referência IAEA-A-13 fornecida pela Agência Internacional de Energia Atômica. Esta amostra de referência foi obtida a partir do sangue total e tem origem animal (Anexo I), podendo, entretanto, ser empregada na validação da metodologia de análise de sangue humano. O procedimento de preparo da amostra para a medida está descrito a seguir.

Sete frações de aproximadamente 0,5g do padrão IAEA-A13 (sangue total) foram tomadas e digeridas em 10mL de HNO₃ concentrado, a temperatura ambiente. Após a digestão, procedeu-se uma diluição 1:100 em balão volumétrico. Uma fração foi empregada no ensaio de umidade. Após as medidas, as concentrações foram calculadas em base seca (Umidade=2,23%).

As frações foram medidas empregando-se o mesmo método utilizado para a análise das amostras reais. Os valores de concentração obtidos foram comparados com os valores certificados. No caso dos elementos, que não dispunham de valor de referência, foram medidos mais de um isótopo, quando disponível, a fim de confirmar os resultados. As concentrações elementares obtidas a partir das medida isotópicas independentes foram então comparadas.

b. Soro Sangüíneo(SERODOS):

Este é um padrão de soro sangüíneo humano (Anexo II). Conforme o descrito pelos fabricantes, durante o procedimento de preparo e certificação, alguns dos elementos foram adicionados ao soro a fim de atingir o limite de determinação das técnicas empregadas. A concentração destes elementos não corresponde portanto ao intervalo de referência em humanos.

Dez frações de 0,1mL da amostra de referência SERODOS foram tomadas e diluídas com HNO₃ 1% a um volume final de 10mL. O procedimento de medida adotado foi idêntico ao descrito acima para o padrão IAEA-A-13.

V. RESULTADOS E DISCUSSÃO:

5.1. ALGUMAS FIGURAS DE MÉRITO:

5.1.1. ESTABILIDADE

Na TABELA 5.1, são apresentadas as flutuações de sinal individual de alguns dos isótopos estudados, a curto prazo, nos modos de baixa e média resolução. Os valores de estabilidade a curto prazo obtidos neste trabalho (FIGURA 5.1) foram concordantes com os recomendados pelo fabricante⁸⁵, que admite uma flutuação de sinal menor que 2,5% a curto prazo (1hora). Estes valores também concordaram com os obtidos por outros autores, que encontraram uma flutuação de 3 a 4%, com o mesmo sistema de nebulização^{113,114,117}.

No modo de média resolução, o fabricante⁸⁵ não estabelece valor limite para a estabilidade a longo prazo, devido a necessidade de recalibrações de massa mais freqüentes.

A estabilidade a curto prazo, no modo de média resolução (FIGURA 5.2), apresenta valores que variam entre 5 e 10%, pois esta é dependente da calibração de massa, da resolução efetiva no momento da medida e da menor transmissão de íons nesta condição. O efeito da transmissão de íons ocorre no formato do pico, pois em baixa resolução o pico se apresenta alargado com um platô, para o qual o sinal é menos influenciado por flutuações na altura. Enquanto que em média resolução o pico é estreito e agudo, portanto qualquer alteração na sua altura leva a variações no sinal.

TABELA 5.1: Intensidade de sinal e desvios obtidos para alguns elementos na avaliação da estabilidade a curto prazo para uma solução contendo 10ug/L de cada elemento.

	Modo de baixa resolução			Modo de média resolução		
	Intensidade (cps)	STD (cps)	RSD (%)	Intensidade (cps)	STD (cps)	RSD (%)
⁵² Cr	1993160	44620	2,24	61715	3636	5,89
⁵⁵ Mn	2381124	41179	1,73	68581	5907	8,61
⁵⁷ Fe	237723	3333	1,40			
⁵⁶ Fe				54422	6370	11,71
⁵⁹ Co	2232684	36452	1,63			
⁶³ Cu	1116586	18429	1,65	486	42	8,72
⁶⁴ Zn	650777	11052	1,70	445	35	6,90
⁶⁶ Zn	353578	5932	1,68	427	22	5,09
⁶⁷ Zn	53930	1278	2,37	428	21	4,88
¹¹⁴ Cd	1226200	16137	1,32	47030	1338	2,84
¹¹⁵ In	5525044	75690	1,37	225805	7917	3,51
¹³⁸ Ba	6475893	135292	2,09	244143	4323	1,77
²⁰⁸ Pb	6041291	107444	1,78	431	27	6,37
²³⁸ U	10281688	240915	2,34	438	23	5,42

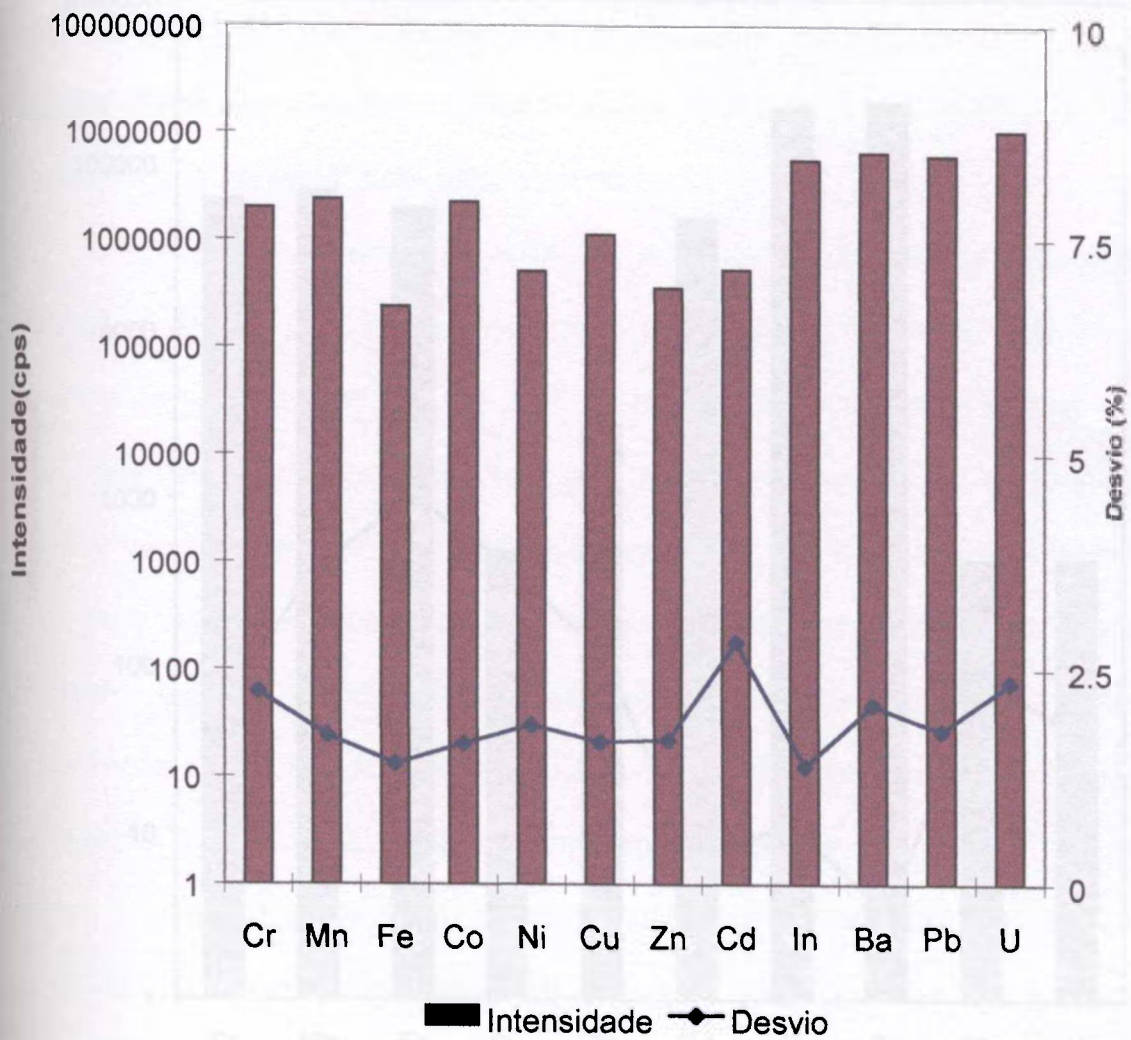


Figura 5.1. Flutuação absoluta e relativa dos sinais de alguns elementos estudados, a curto prazo na condição de baixa resolução.

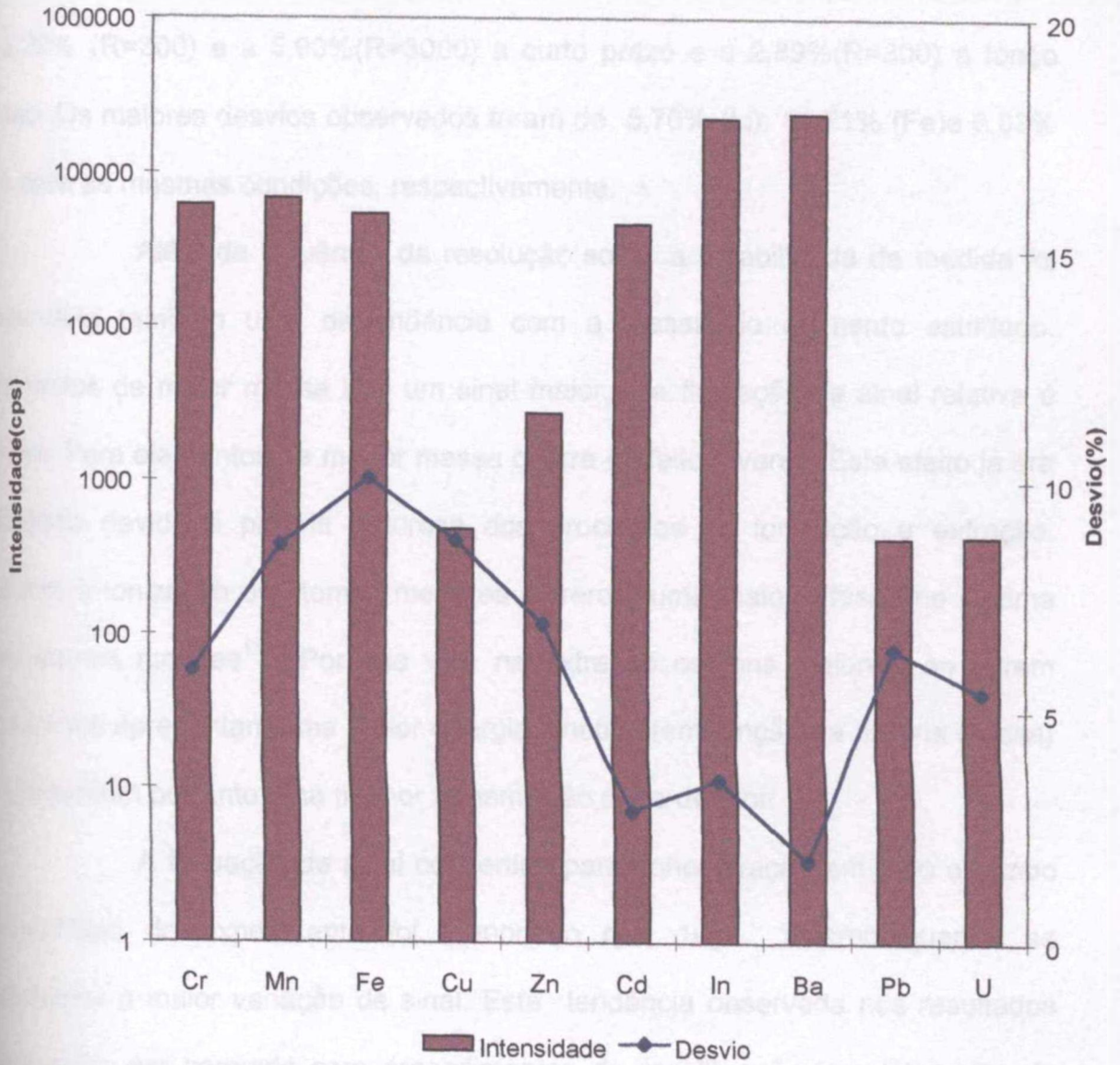


Figura 5.2: Flutuação de sinal, absoluta e relativa, para alguns elementos estudados, a curto prazo, na condição de média resolução.

A distribuição de frequência da estabilidade de sinal dos elementos estudados ($n=38$) teve um valor médio de desvio (TABELA 5.1) que correspondeu a 2,20% ($R=300$) e a 5,93% ($R=3000$) a curto prazo e a 2,89% ($R=300$) a longo prazo. Os maiores desvios observados foram de 5,76% (Li); 11,71% (Fe) e 6,03% (Li) para as mesmas condições, respectivamente.

Além da influência da resolução sobre a estabilidade da medida foi observada também uma dependência com a massa do elemento estudado. Elementos de maior massa têm um sinal maior, e a flutuação de sinal relativa é menor. Para elementos de menor massa ocorre o efeito inverso. Este efeito já era esperado devido a própria natureza dos processos de ionização e extração. Durante a ionização os átomos menores sofrerem uma maior difusão no plasma que átomos maiores¹¹⁵. Por sua vez, na extração os íons maiores, ao serem acelerados apresentam uma maior energia cinética (em função da própria massa) e apresentam portanto uma melhor transmissão até o detetor.

A flutuação de sinal convertida para concentração em todo o tempo considerado do experimento foi menor do que 1 μ g/L, mesmo quando se considerou a maior variação de sinal. Esta tendência observada nos resultados pode ainda ser corrigida com procedimentos de recalibração, em intervalos de tempo regulares. Portanto os valores de estabilidade observados são compatíveis com a repetibilidade requerida a procedimentos quantitativos, e com os valores relatados por FELDMAN¹¹⁶ e MOENS¹¹⁷, para a técnica.

5.1.2. LIMITE DE DETECÇÃO

Alguns dos valores obtidos para os limites de detecção e os valores disponíveis na literatura para ICP-QMS e ICP-AES, expressos em concentração são mostrados na TABELA 5.2.

O limite de detecção está associado à condição de medida¹¹⁸. Deste modo, assim como têm-se um limite para um elemento para uma determinada linha de emissão, na espectrometria de emissão; têm-se um limite de detecção para cada isótopo medido, na espectrometria de massas.

O menor limite de detecção é obtido para o isótopo mais abundante (i.e. Cr, Cd, In); exceto quando há interferentes associados a ele (i.e. ⁵⁶Fe). Este efeito ocorre simplesmente por diferenciação na estatística de contagens, o isótopo mais abundante terá um sinal associado maior.

Efeito semelhante ocorre entre os mesmos isótopos, em condições diferentes de resolução. Sabe-se que na média resolução ocorre uma menor transmissão dos íons formados⁸⁵, portanto observa-se um comprometimento do limite de detecção com o aumento da resolução, onde a concentração mínima detectável aumenta, como já era esperado. Este efeito pode ser melhor observado na FIGURA 5.3.

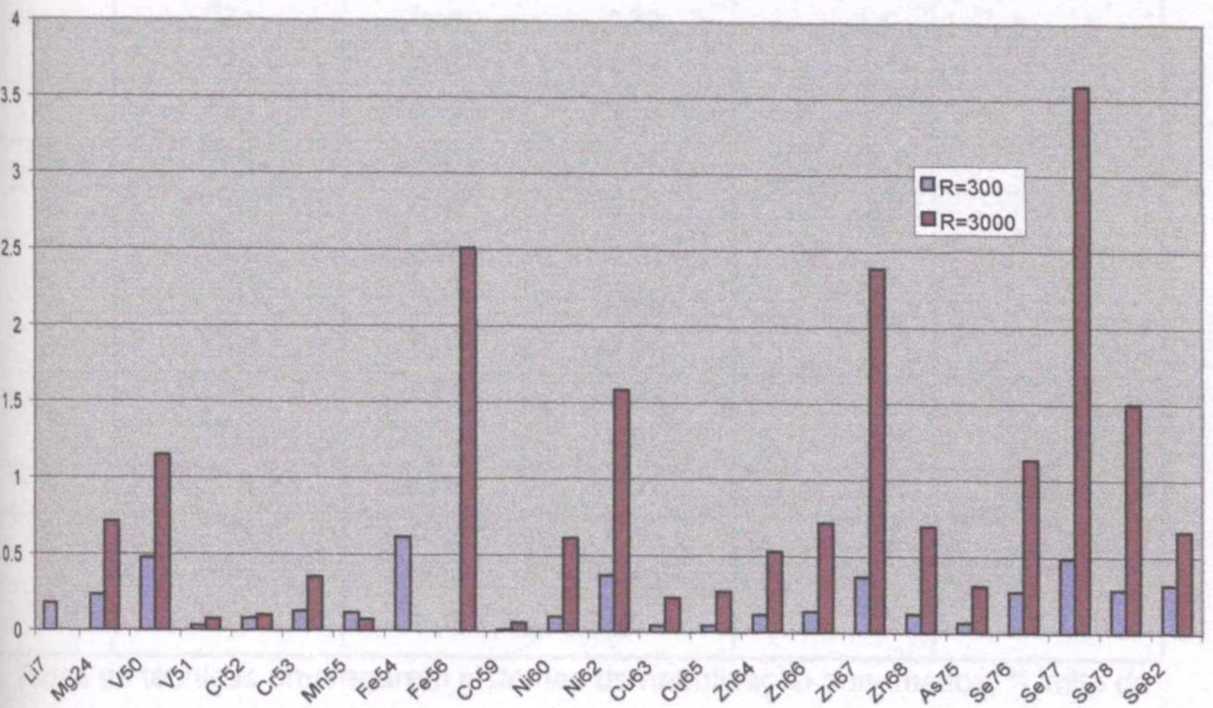
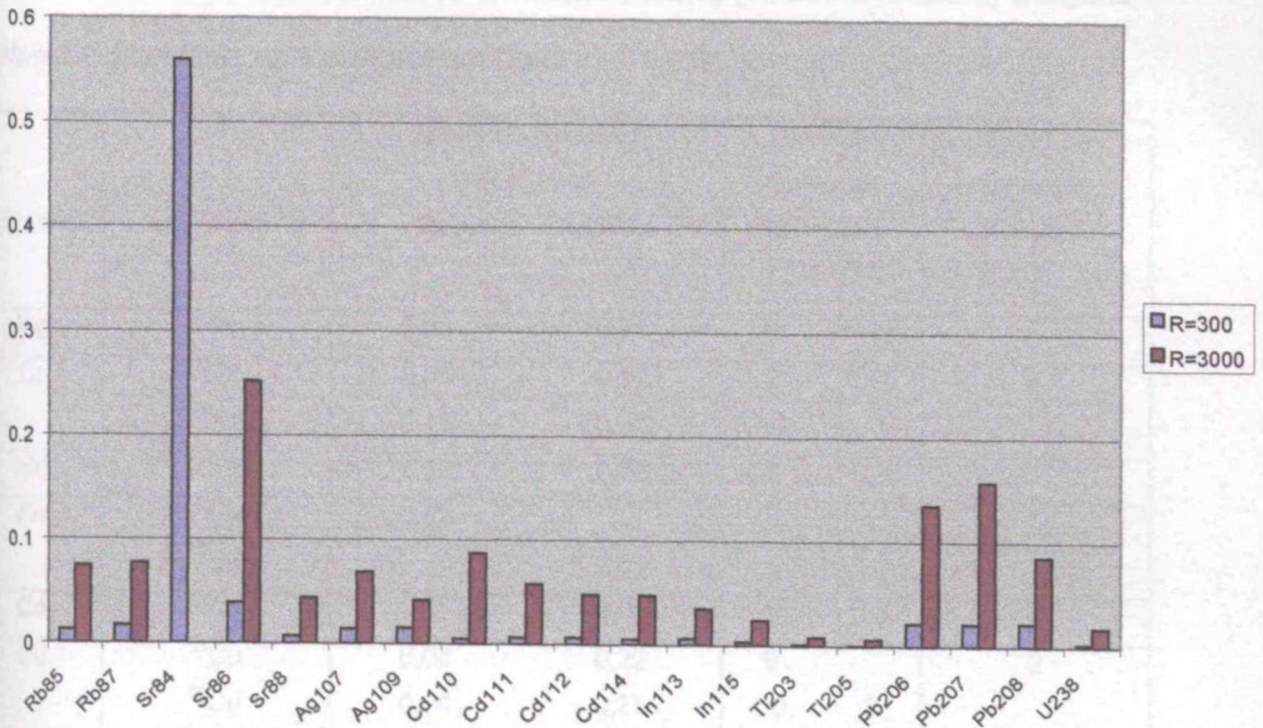


Figura 5.3: Limites de detecção em ug/L obtidos em duas condições de resolução.

TABELA 5.2: Valores dos limites de detecção obtidos (R=300 e R=3000) e alguns valores disponíveis na literatura, em ug/L.

Elemento	Nuclídeo	Limite de detecção HR-ICPMS		Limite de Detecção ICP-QMS 119,120		Limite de Detecção ICP-AES *
		R=300	R=3000			
Mg	²⁴ Mg	0,23	0,71	6	0,71	
Cr	⁵² Cr	0,08	0,10	2	0,50	4
	⁵³ Cr	0,13	0,35	10		
Mn	⁵⁵ Mn	0,12	0,08	3	0,3	
Fe	⁵⁴ Fe	0,62			1	
	⁵⁶ Fe		2,51		2,5	
Co	⁵⁹ Co	0,01	0,06	6	0,3	5
Cu	⁶³ Cu	0,04	0,22	9		2
	⁶⁵ Cu	0,04	0,27	20	3	
Zn	⁶⁴ Zn	0,12	0,53			2
	⁶⁶ Zn	0,14	0,72		4	
	⁶⁷ Zn	0,37	2,39			
	⁶⁸ Zn	0,13	0,70			
Rb	⁸⁵ Rb	0,01	0,07	8	0,5	
Cd	¹¹⁰ Cd	0,06	0,09		0,2	2
	¹¹¹ Cd	0,01	0,06			
	¹¹² Cd	0,01	0,05			
	¹¹⁴ Cd	0,01	0,05			
In	¹¹³ In	0,01	0,04			
	¹¹⁵ In	0,004	0,02		0,06	
Tl	²⁰³ Tl	0,001	0,01		0,05	22
Pb	²⁰⁶ Pb	0,02	0,14		0,2	27
	²⁰⁷ Pb	0,02	0,16			
	²⁰⁸ Pb	0,02	0,09			

Todas as técnicas empregaram sistemas de nebulização pneumática, *Limite de detecção expresso por elementos para a linha de emissão mais sensível.

Para a mesma técnica observa-se uma certa variação nos valores dos limites de detecção. Isto ocorre devido a condições ambientais dos diferentes laboratórios, às aplicações associadas e a rotina do laboratório. Este comportamento também ficou evidenciado com as repetições deste experimento.

Comparando-se os valores obtidos com os disponíveis na literatura, pode-se perceber que os espectrômetros de massa de dupla focalização, permitem a obtenção de limites de detecção menores (uma a quatro ordens de grandeza) que os encontrados empregando-se espectrômetros de massa do tipo quadrupolo; ou espectrômetros de emissão atômica, para as mesmas condições de nebulização.

Quando são necessários limites de detecção menores um recurso que pode ser empregado por todas estas técnicas é a modificação do sistema de nebulização¹²⁰. Os nebulizadores recomendados a fim de melhorar os limites de detecção são o micro-concêntrico e o ultra-sônico.

5.1.3. AVALIAÇÃO QUANTO A OCORRÊNCIA DE

INTERFERENTES:

5.1.3.1. Interferências não espectrais:

a. Simulação da Matriz:

Para o estudo do efeito matriz foram empregados soluções simulados contendo NaCl e albumina, conforme o descrito anteriormente. Os sinais relativos obtidos para alguns elementos, nestes meios simulados são mostrados nas FIGURA 5.4 e 5.5. É observada uma supressão de sinal significativa a 10g/L de NaCl (28,29%) e a 0,63g/L de albumina(78,16%). Este comportamento era esperado¹²¹ e indica diferenças de sinal das soluções amostra e de solução padrão.

A diminuição na taxa de aspiração, o aumento da viscosidade¹⁰⁰, mudanças no tamanho de gota da névoa levada ao plasma¹⁰⁰ são relatadas por DAMS¹³⁰ como as causas destes efeitos de supressão de sinal. Esse comportamento poderia ser corrigido simplesmente com o emprego de padrões internos¹³⁰. De acordo, com o que foi observado, a influência sobre as intensidades de sinal é igual para todos dos elementos estudados (FIGURAS 5.4 e 5.5). Outro efeito observado é causado pelo aumento da concentração das soluções nebulizadas é a mudança nas condições de ionização¹⁰⁰. Tal como BEAUCHEMIN¹¹⁵ observou, há uma diminuição da temperatura do plasma que desfavorece a ionização de elementos de altos potenciais de ionização frente a elementos de baixos potenciais.

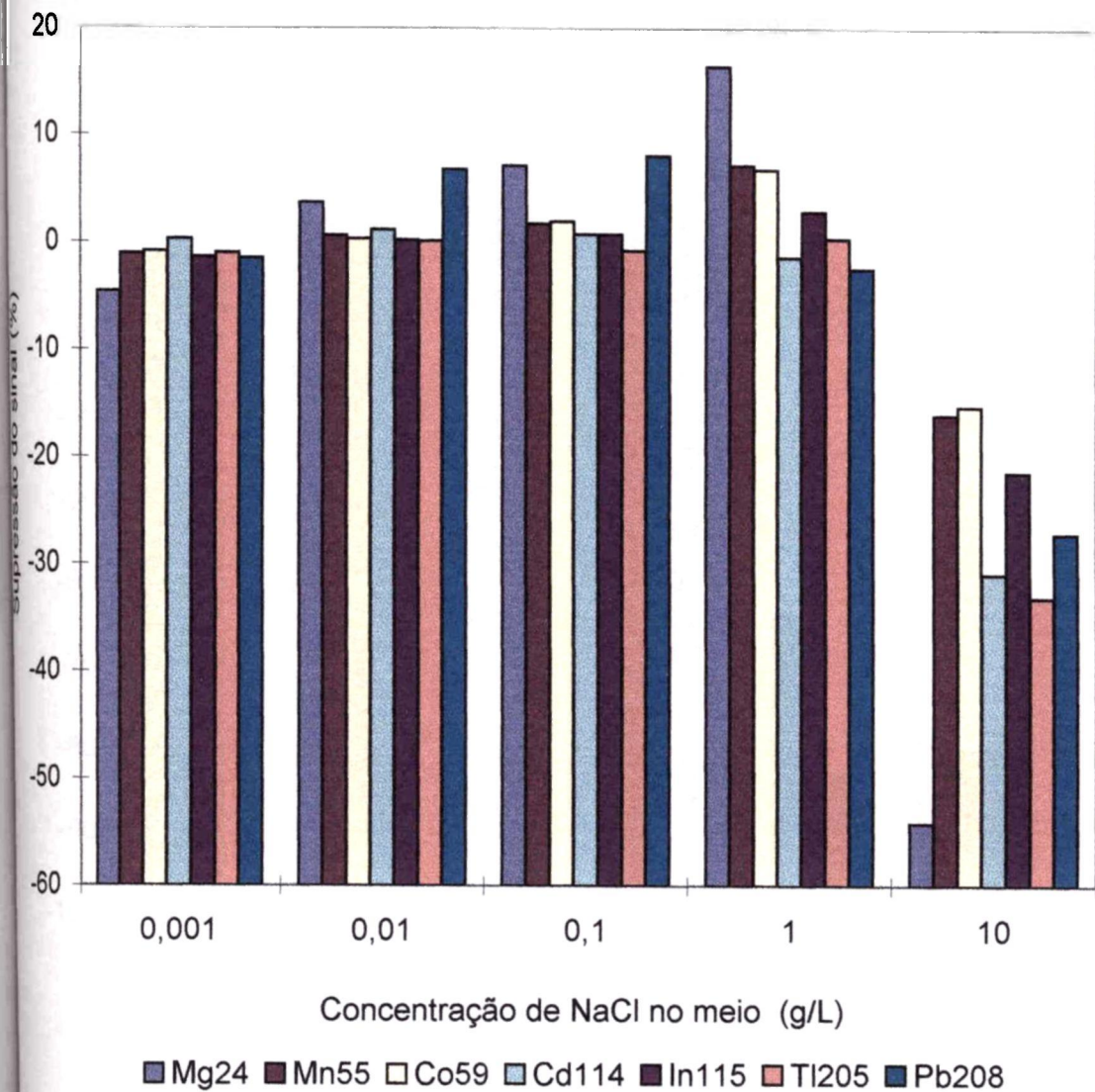


Figura 5.4: Comportamento do sinal em termos relativos (%) para alguns elementos em meio de NaCl a diferentes concentrações.

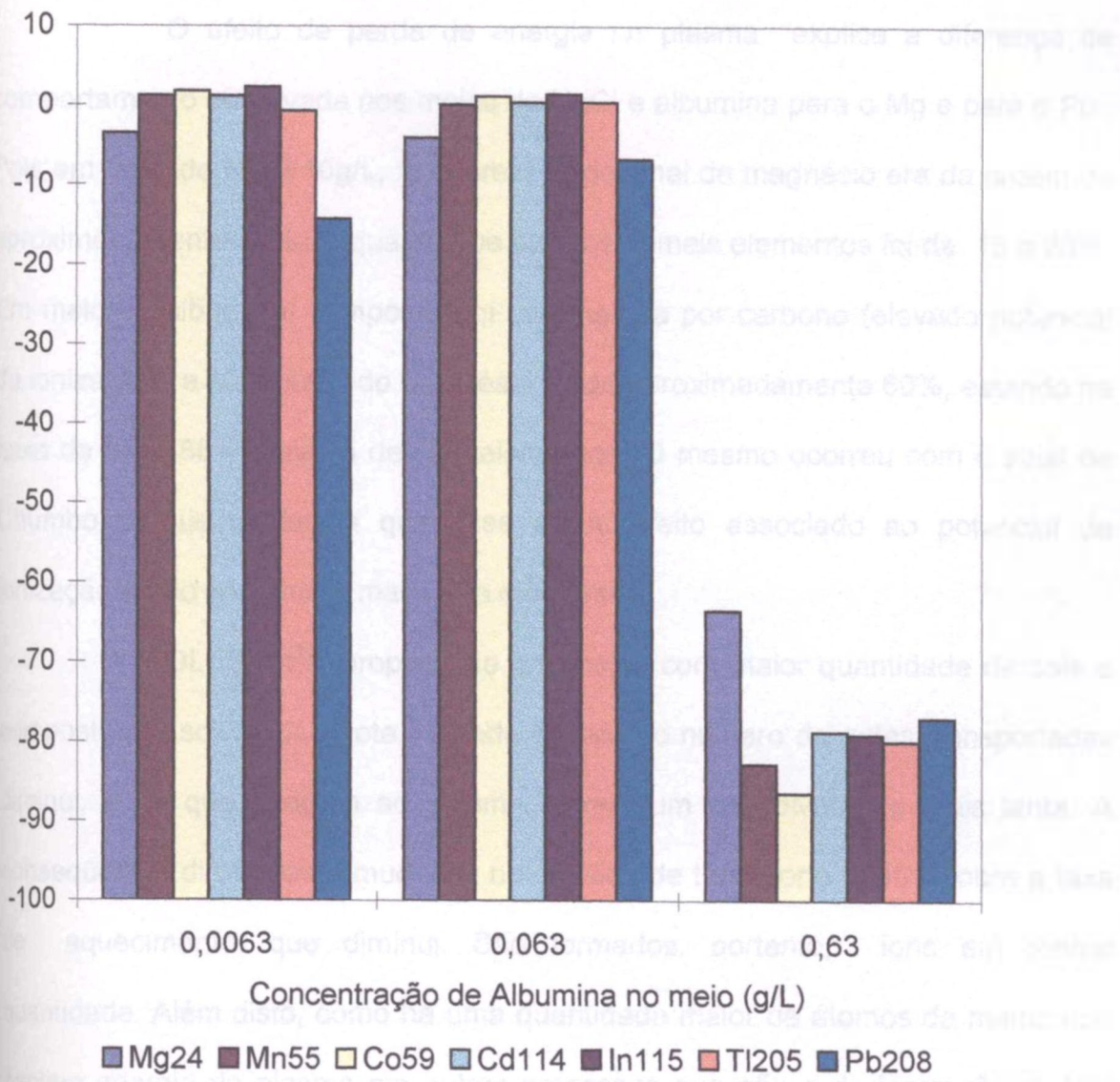


Figura 5.5: Comportamento do sinal em termos relativos(%) observado para alguns elementos em meio de Albumina a diferentes concentrações.

O efeito de perda de energia no plasma explica a diferença de comportamento observada nos meios de NaCl e albumina para o Mg e para o Pb. Pois em meio de NaCl 10g/L, a supressão do sinal de magnésio era da ordem de aproximadamente 55%, enquanto que para os demais elementos foi de 15 a 30%. Em meio de albumina, composta em sua maioria por carbono (elevado potencial de ionização), a supressão do magnésio foi de aproximadamente 60%, estando na faixa de 80 a 85% para os demais elementos. O mesmo ocorreu com o sinal de Chumbo, o que evidencia que esse é um efeito associado ao potencial de ionização e não somente a massa do elemento.

OLESIEK¹⁰⁰ propõe que em meios com maior quantidade de sais e compostos dissolvidos a gota formada é maior, o número de gotas transportadas diminui, e as que chegam ao plasma sofrem um dessolvatação mais lenta. A consequência direta desta mudança na cinética de transporte ocorre sobre a taxa de aquecimento, que diminui. São formados, portanto, íons em menor quantidade. Além disto, como há uma quantidade maior de átomos da matriz que captam energia do plasma em outros processos que não o de ionização¹²². Isto causa diminuição da intensidade de sinal para todos os elementos. Estas proposições^{100,115} explicam os resultados obtidos neste experimento. Estes efeitos foram corrigidos e/ou minimizados com o emprego de padrões internos¹²³, tal como o mostrado nas FIGURAS 5.6 e 5.7.

A correção com padrão interno permite que o sinal normalizado mostre uma pequena (ou nenhuma) diminuição, quando em meio de NaCl 10g/L (3,27%) e de albumina a 0,63g/L (7,55%), com exceção ao sinal do magnésio.

A correção empregando índio como padrão interno permite a comparação do sinal dos vários elementos, tanto em soluções diluídas quanto em meios muito concentrados. Para o sinal do magnésio normalizado, como se observa na FIGURA 5.7, a diminuição da intensidade do sinal de magnésio em meio de NaCl é muito superior a sofrida por outros elementos, e muito menor em meio de Albumina. Esta diferenciação ocorre inclusive quando o sinal é corrigido com o padrão interno.

Segundo OLESIEK¹⁰⁰ uma das explicações para o comportamento dos sinais de magnésio e chumbo, se situa nos potenciais de ionização mais baixo, que leva a supressão de sinal em presença de sódio (FIGURA 5.7), e que favorece sua ionização quando em presença de uma maior quantidade de carbono(FIGURA 5.6).

Outra causa da diminuição de sinal pode ser atribuída a efeitos espaço carga, onde o Mg, como um íon leve é repelido mais facilmente do plasma, pela grande nuvem de íons de sódio formados, difundindo-se, e tendo seu sinal suprimido. Diversos autores^{124,125,126,127}, descrevem a fuga e o espalhamento de elétrons no plasma o que gera repulsão entre íons positivos, como a possível causa de efeitos espaço-carga. Este efeito¹²⁸ nada mais é que a difusão de íons mais leves para fora da região de coleta de íons (skimmer) quando em presença de íons pesados mais abundantes.

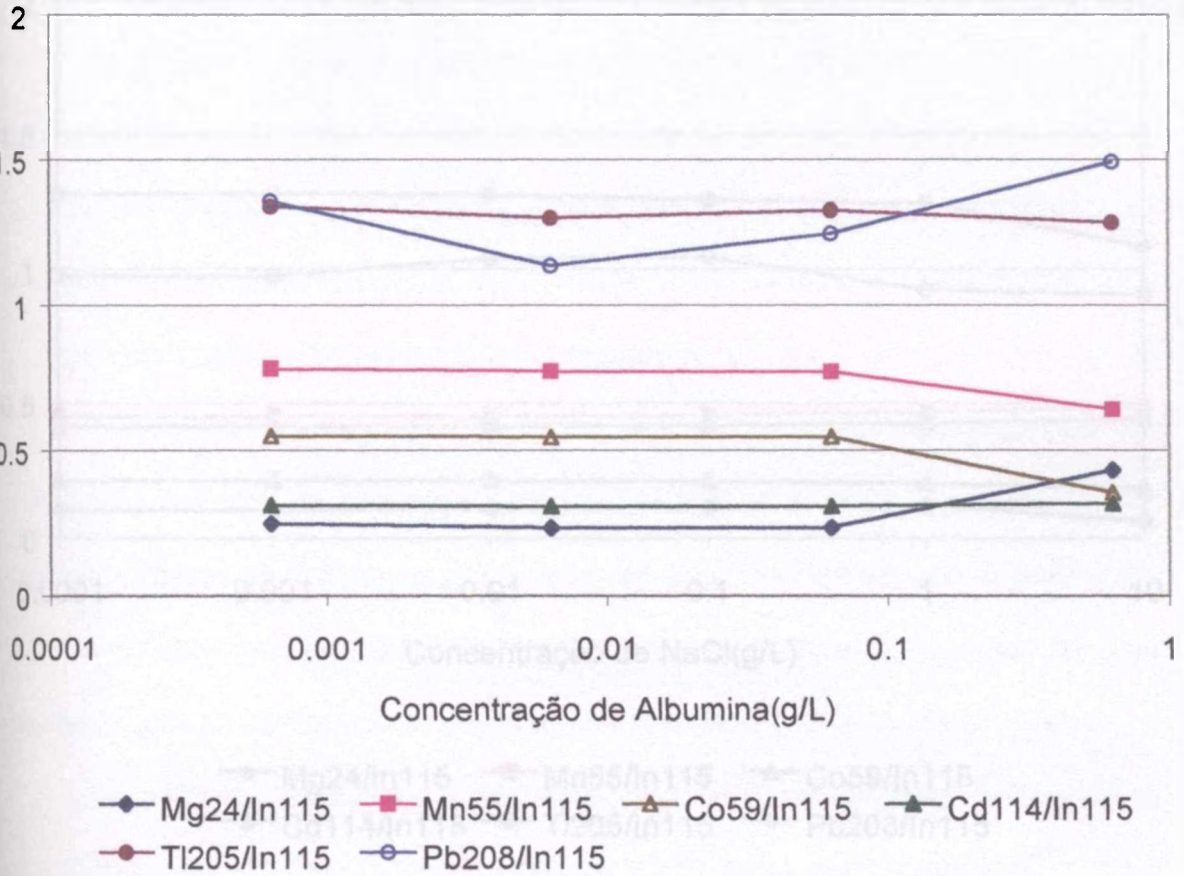


Figura 5.6: Sinal normalizado de alguns elementos pelo sinal de In-115.

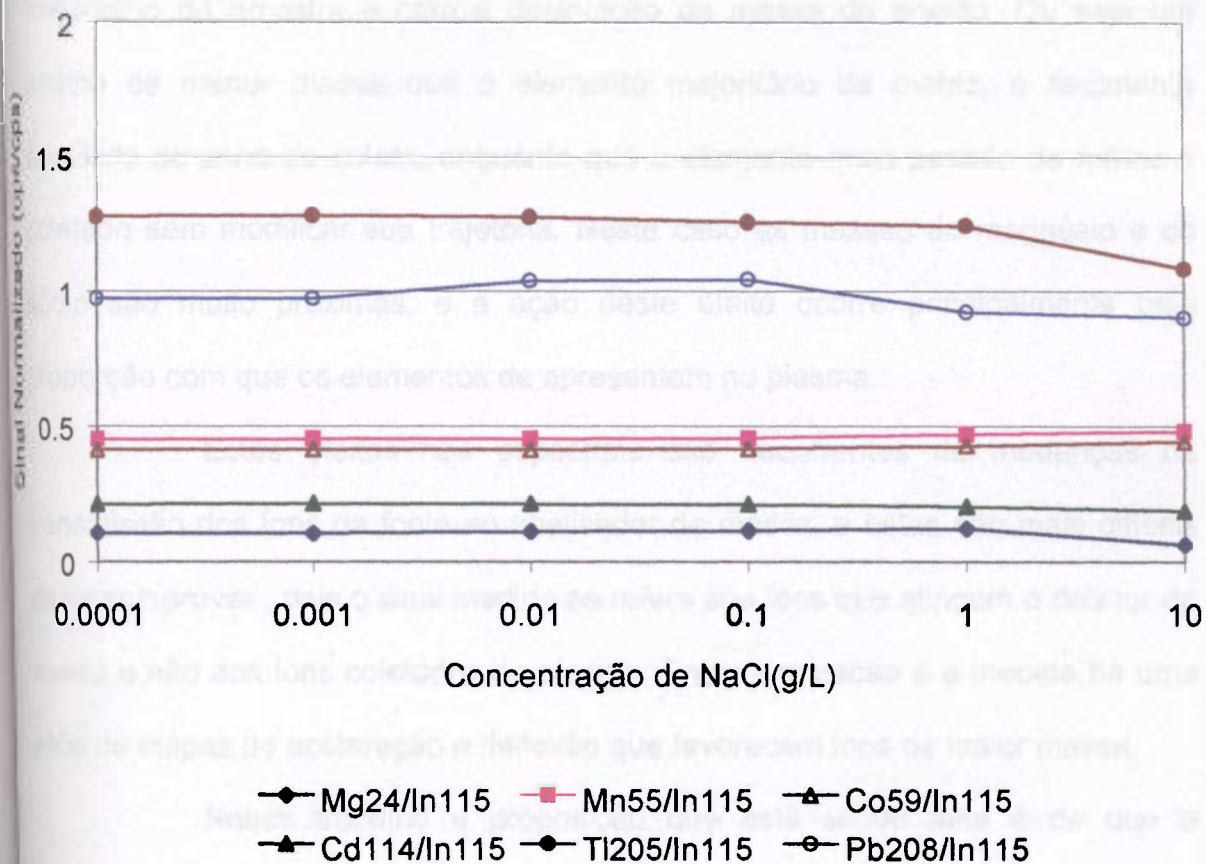


Figura 5.7: Sinal normalizado de alguns elementos pelo sinal de In115, em meio de NaCl a diferentes concentrações

Estes efeitos são observados com o aumento de massa do elemento majoritário da amostra e com a diminuição de massa do analito. Ou seja um analito de menor massa que o elemento majoritário da matriz, é facilmente desviado da zona de coleta, enquanto que o elemento mais pesado da matriz é coletado sem modificar sua trajetória. Neste caso as massas do magnésio e do sódio são muito próximas, e a ação deste efeito ocorre principalmente pela proporção com que os elementos se apresentam no plasma.

Estes efeitos não espectrais são decorrentes de mudanças na transmissão dos íons da fonte ao analisador de massa, e estas são mais difíceis de se comprovar, pois o sinal medido se refere aos íons que atingem o detetor de massa e não aos íons coletados do plasma. Entre a extração e a medida há uma série de etapas de aceleração e deflexão que favorecem íons de maior massa.

Nesse trabalho a proposição que está sendo feita é de que a normalização do sinal de magnésio pelo sinal de índio em concentrações mais elevadas, não se mostrou adequada. Possivelmente esse efeito é explicado pela repulsão entre as cargas formadas no plasma, tal como o que já foi descrito em literatura¹²⁹.

Em presença de albumina a supressão de sinal do magnésio é menor que a dos demais elementos, provavelmente por que o efeito de repulsão de cargas é menor (há um número menor de íons positivos gerados pela matriz devido o alto potencial de ionização do carbono) e a ionização do magnésio é favorecida devido ao seu baixo potencial. Essa é a proposição escolhida como a melhor para explicar o comportamento observado na FIGURA 5.7.

b. Estudo do comportamento em amostras reais

Segundo FALK e COLABORADORES¹²¹, a análise de qualquer fração do sangue sem diluição, por ICP-MS é impossível, devido aos efeitos extremos de supressão de sinal. Este tipo de amostra contém concentrações de cloreto de sódio constantes a 0,9g/L e de proteínas a aproximadamente 63g/L⁸⁸,

130

Foram feitos ensaios para a verificação sobre quais os fatores de diluição que deveriam ser empregados às amostras reais, e esses ensaios foram baseados nos dados encontrados na literatura¹³⁰. Desta forma, foram aplicados diferentes fatores de diluição às amostras reais ($F_{\text{diluição}}=10, 100, 250$ e 500 vezes) e analisadas. Foram então calculadas as concentrações aparentes de cada solução.

Na FIGURA 5.8., são mostradas as concentrações aparentes de zinco em uma única amostra, empregando-se os fatores de diluição mencionados. Para um fator de diluição igual a 10, observou-se uma severa alteração do valor de concentração aparente em relação a concentração esperada e real. Quando empregou-se um fator de diluição de 500 vezes, a incerteza da medida para os diferentes isótopos foi superior a obtida em outras diluições.

Estudou-se também a formação dos íons óxidos para cada diluição a partir do acompanhamento das massas do ^{208}Pb e de seu óxido ($^{208}\text{Pb}^{16}\text{O}$). Observou-se que em diluições menores a formação dos íons óxidos é superior.

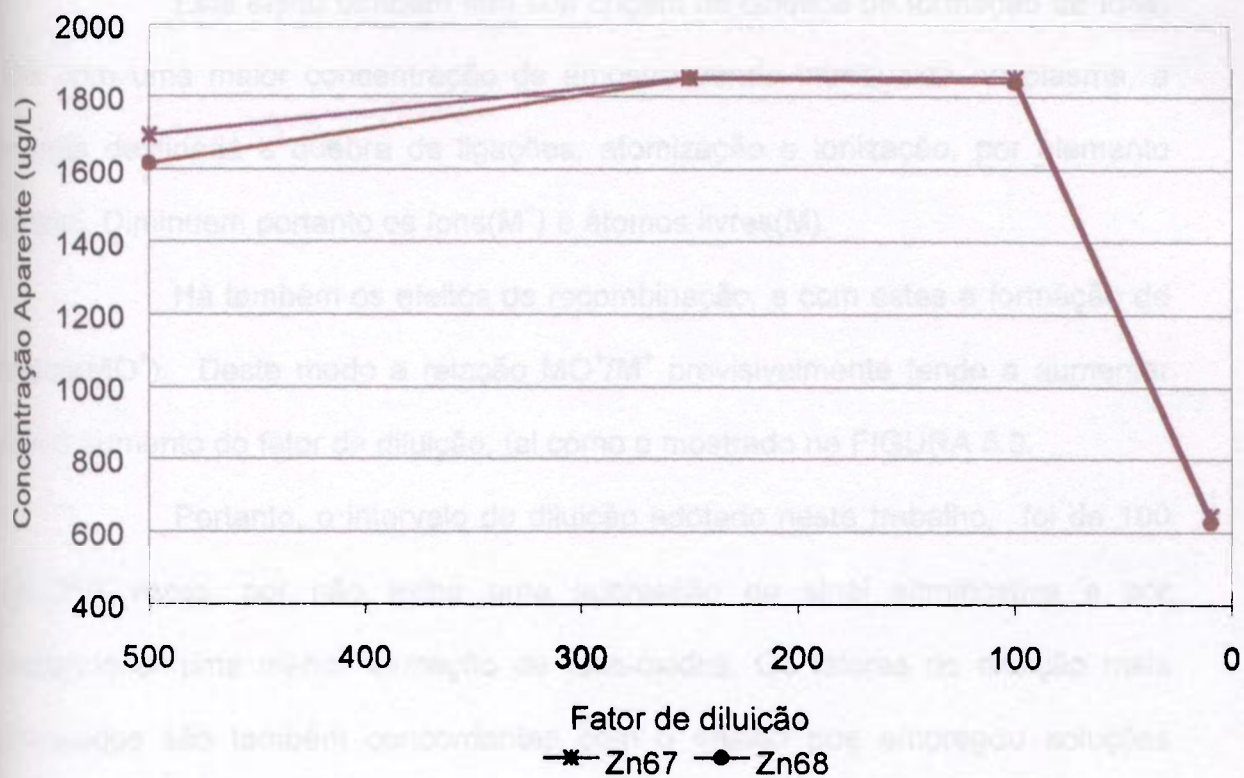


Figura 5.8: Concentrações aparentes obtidas para o "pool" de soro, empregando-se diferentes fatores de diluição.

Este efeito também tem sua origem na cinética de formação de íons, pois com uma maior concentração de amostra sendo introduzida no plasma, a energia destinada a quebra de ligações, atomização e ionização, por elemento diminui. Diminuem portanto os íons(M^+) e átomos livres(M).

Há também os efeitos de recombinação, e com estes a formação de óxidos(MO^+). Deste modo a relação MO^+/M^+ previsivelmente tende a aumentar com o aumento do fator de diluição, tal como o mostrado na FIGURA 5.9.

Portanto, o intervalo de diluição adotado neste trabalho, foi de 100 até 250 vezes, por não exibir uma supressão de sinal significativa e por proporcionar uma menor formação de íons-óxidos. Os fatores de diluição mais adequados são também concordantes com o ensaio que empregou soluções simuladas e com o comportamento observado por DAMS¹³⁰.

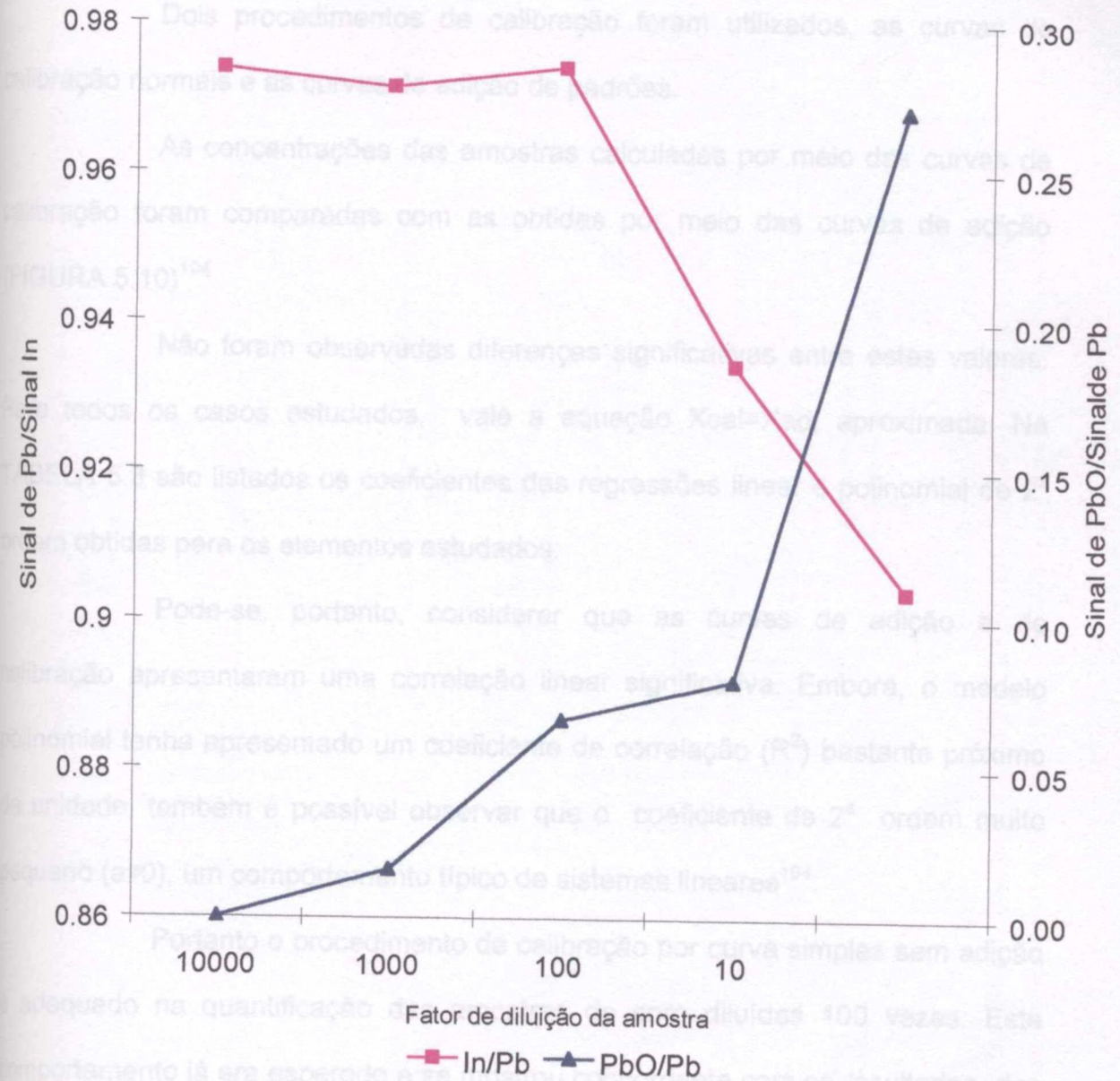
Reciprocidade na relação de calibração:

Figura 5.9: Diminuição do sinal do Pb e aumento da formação de íons óxidos com o fator de diluição aplicado.

c. *Reciprocidade na relação de calibração:*

Dois procedimentos de calibração foram utilizados, as curvas de calibração normais e as curvas de adição de padrões.

As concentrações das amostras calculadas por meio das curvas de calibração foram comparadas com as obtidas por meio das curvas de adição (FIGURA 5.10)¹⁰⁴

Não foram observadas diferenças significativas entre estes valores. Para todos os casos estudados, vale a equação $X_{cal}=X_{ad}$, aproximada. Na TABELA 5.3 são listados os coeficientes das regressões linear e polinomial de 2ª ordem obtidas para os elementos estudados.

Pode-se, portanto, considerar que as curvas de adição e de calibração apresentaram uma correlação linear significativa. Embora, o modelo polinomial tenha apresentado um coeficiente de correlação (R^2) bastante próximo da unidade, também é possível observar que o coeficiente de 2ª ordem muito pequeno ($a \neq 0$), um comportamento típico de sistemas lineares¹⁰⁴.

Portanto o procedimento de calibração por curva simples sem adição é adequado na quantificação das amostras de soro diluídas 100 vezes. Este comportamento já era esperado e se mostrou concordante com os resultados dos experimentos de simulação da matriz, com NaCl e albumina.

Na FIGURA 5.11 observa-se ainda que os desvio padrão relativos das medidas de cada um dos pontos das calibrações exibem o comportamento geral esperado para concentrações neste nível de concentração.

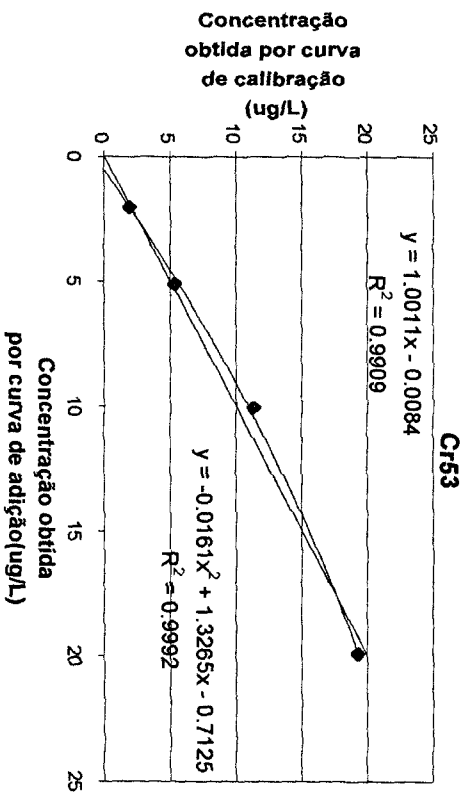
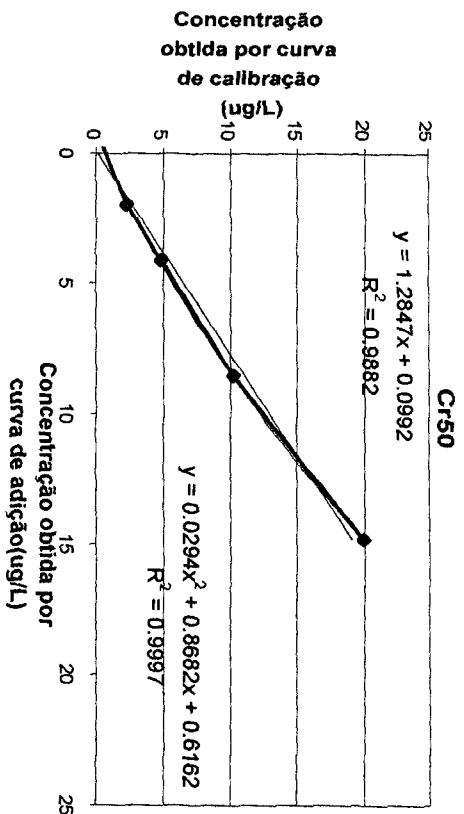
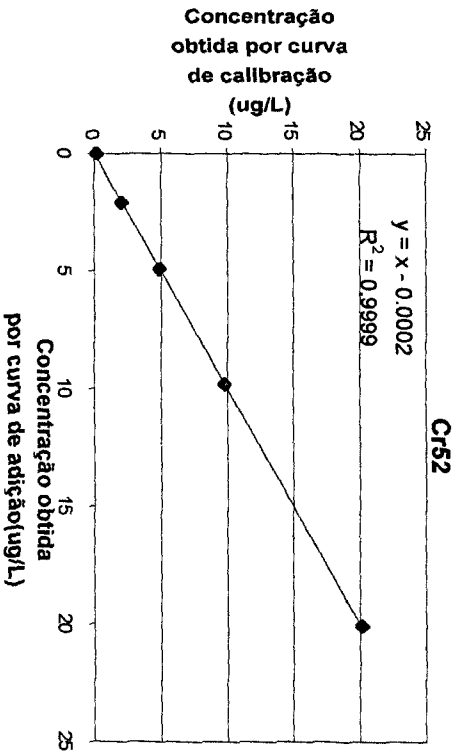
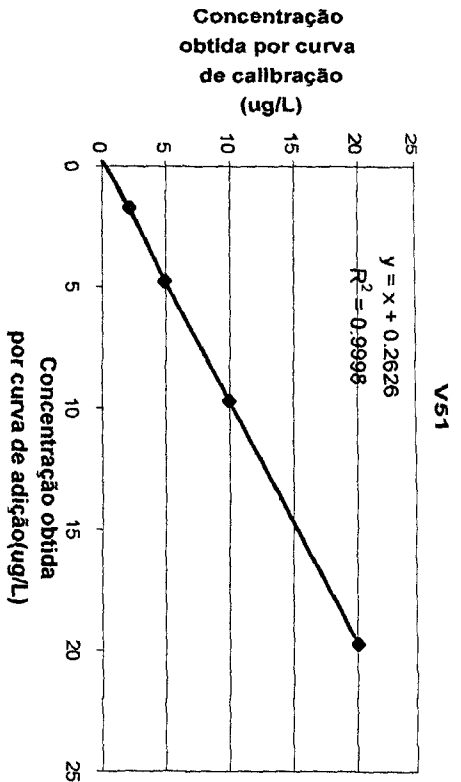


Figura 5.10: Reciprocidade entre as curvas de calibração e de adição de alguns dos núcleos estudados

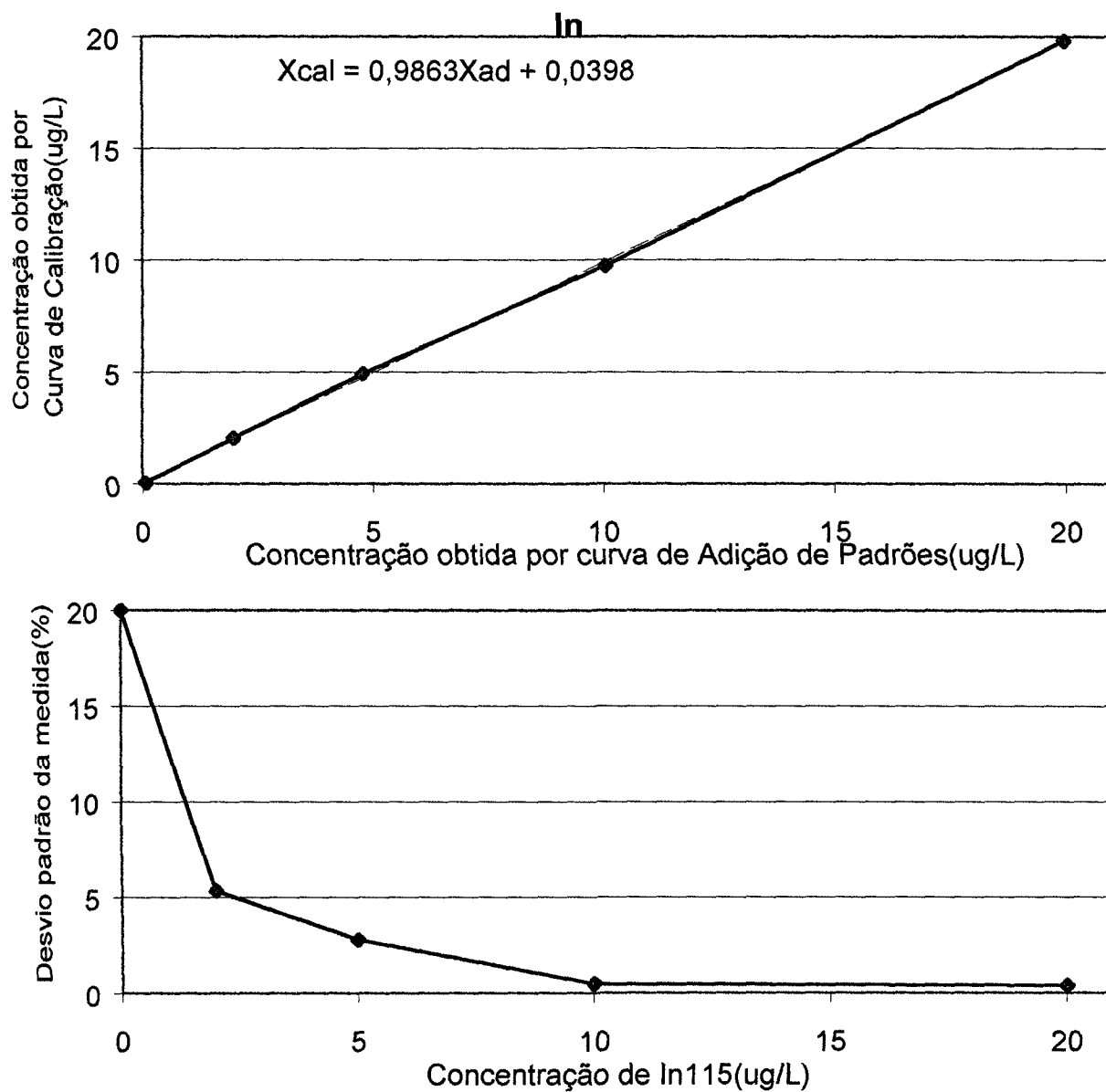


Figura 5.11: Reciprocidade entre as curvas calibração e de adição do índio e seus desvios padrão

TABELA 5.3: Regressões aplicadas as curvas de calibração externa(X_{cal}) versus as de adição de padrão(X_{ad}).

Nuclídeos	Regressão Linear Simples			Regressão Polinomial de ordem 2			
	$y=ax+b$			$y=ax^2+bx+c$			
	a	b	R^2	a	b	c	R^2
^{24}Mg	0,9801	0,7522	0,9641	-0,0378	1,7277	-0,5276	0,9995
^{51}V	1	0,2626	0,9998	0,0007	0,9856	0,2915	0,9998
^{50}Cr	1,2847	0,0992	0,9882	0,0294	0,862	0,6162	0,9997
^{52}Cr	1	-0,0002	0,9999	-	-	-	-
^{53}Cr	1,0011	-0,008	0,9909	-	-	-	-
^{55}Mn	0,9071	1,2662	0,9796	-0,0219	1,3608	0,2236	0,9975
^{59}Co	0,9997	0,0022	0,9972	0,0017	0,9654	0,077	0,9973
^{58}Ni	1	0,0003	0,9988	-	-	-	-
^{60}Ni	1	0,0001	0,9994	-	-	-	-
^{63}Cu	0,9994	0,0041	0,9989	-	-	-	-
^{65}Cu	0,9999	0,0004	0,9986	-	-	-	-
^{64}Zn	1,0062	-0,0576	0,9956	-	-	-	-
^{66}Zn	0,9925	0,0557	0,9864	-0,0172	1,3592	-0,8194	0,9959

5.1.3.2. Interferências espectrais:

Esta etapa da parte experimental visou avaliar a influência dos interferentes sobre o sinal dos analitos de interesse em baixa resolução, e qual seria a validade na utilização da média resolução na separação destes interferentes. Deste modo os experimentos realizados mostraram as seguintes respostas:

a. Avaliação do espectro de massa no modo de média resolução:

Uma curva de calibração (branco, 10, 50 e 100ug/L) foi medida juntamente com amostras diluídas 10, 100 e 250 vezes. Foram obtidos os espectros de massas dos analitos e de seus interferentes esperados. O método de medida empregado teve como janela de integração 500% da região de massa sujeita a ocorrência de interferências espectrais. Por exemplo para o ^{52}Cr e seus interferentes $^{36}\text{Ar}^{14}\text{N}^+ + ^{40}\text{Ar}^{12}\text{C}^+$, a região de massa medida foi de 51,92 a 51,98u.m.a conforme o mostrado na FIGURA 5.12. A TABELA 5.4 mostra a classificação adotada quanto a presença ou ausência dos interferentes estudados. Onde designou-se os interferentes de acordo com a nomenclatura abaixo:

- **RESOLVIDO:** quando o pico de interferente que pôde ser separado do analito por meio do emprego da média resolução;
- **AUSENTE:** quando o interferente poderia ser separado com o emprego da média resolução, mas que não foi observado nas condições de diluição adotadas;
- **CORRIGIDO:** O interferente que independente do tipo de amostra, da concentração da solução padrão ou amostra,

permaneceu constante durante todo o tempo de aquisição, em média resolução. Deste modo uma simples subtração permite a eliminação de seus efeitos, e que portanto permite que a medida do elemento de interesse possa ser efetuada em baixa resolução, apenas com um limite de detecção maior.

- **NÃO RESOLVIDO:** O interferente que mesmo com o emprego da média resolução não é separado do analito.

Este último tipo de interferente não foi estudado nesta fase. Os analitos que ocorriam juntamente com este tipo de interferente tem seu modo de análise descrito em detalhes em seções posteriores.

TABELA 5.4: Nuclídeos e interferentes estudados no modo de média resolução.

Nuclídeo	Interferência	Condição dos interferentes
^{50}Cr	$^{36}\text{Ar}^{14}\text{N}, ^{14}\text{N}^{16}\text{O}^{16}\text{O}$	Resolvidos
^{52}Cr	$^{40}\text{Ar}^{12}\text{C}, ^{35}\text{Cl}^{16}\text{O}^{1}\text{H}$	Resolvidos
^{53}Cr	$^{37}\text{Cl}^{16}\text{O}$	Resolvidos
^{54}Cr	$^{40}\text{Ar}^{14}\text{N}, ^{35}\text{Cl}^{18}\text{O}^{1}\text{H}$	Resolvidos*
^{56}Fe	$^{40}\text{Ar}^{16}\text{O}, ^{40}\text{Ca}^{16}\text{O}$	Resolvidos
^{57}Fe	$^{40}\text{Ar}^{16}\text{O}^{1}\text{H}$	Resolvidos
^{59}Co	$^{40}\text{Ar}^{18}\text{O}^{1}\text{H}, ^{36}\text{Ar}^{23}\text{Na}$	Ausente
^{63}Cu	$^{40}\text{Ar}^{23}\text{Na}$	Ausente
^{64}Zn	$^{32}\text{S}_2, ^{32}\text{S}^{16}\text{O}_2,$	Resolvidos
^{65}Cu	$^{33}\text{S}^{16}\text{O}^{16}\text{O}$	Resolvidos
^{66}Zn	$^{34}\text{S}^{16}\text{O}_2, ^{32}\text{S}^{16}\text{O}^{18}\text{O}$	Resolvidos
^{68}Zn	$^{36}\text{S}^{16}\text{O}_2, ^{34}\text{S}^{16}\text{O}^{18}\text{O}$	Corrigido
^{70}Zn	$^{40}\text{Ar}^{14}\text{N}^{16}\text{O}, \text{Cl}_2^+$	Resolvidos

* A separação de espécies moleculares "isóbaras" é muitas vezes possível em função de suas diferenças de massa, tanto que os interferentes foram separados dos analitos de massa 54. Entretanto a separação de elementos "isóbáros", tais como o ^{54}Cr do ^{54}Fe não é possível com a resolução que este sistema dispõe. Isto ocorre por que a diferença de massa é igual a diferença de um próton para um neutron.

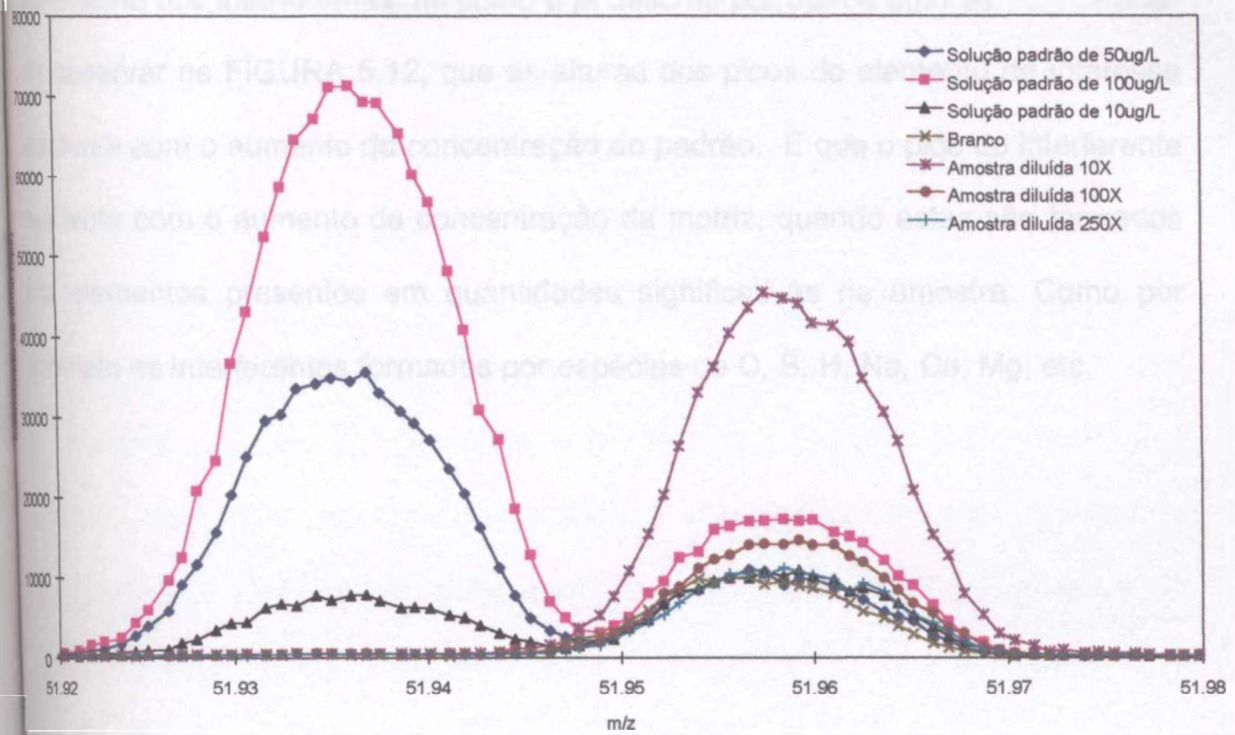


Figura 5.12: Espectros de massa na região de massa do Cromo-52, para diferentes soluções padrão e amostras sob diferentes diluições.

O emprego da média resolução, permitiu a separação e identificação da maioria dos interferentes, tal como o já descrito por outros autores^{131, 132}. Pode-se observar na FIGURA 5.12, que as alturas dos picos do elemento de interesse aumenta com o aumento da concentração do padrão. E que o pico do interferente aumenta com o aumento da concentração da matriz, quando estes são formados por elementos presentes em quantidades significativas na amostra. Como por exemplo os interferentes formados por espécies de C, S, H, Na, Ca, Mg, etc.

b. Estudo das razões isotópicas[†]:

Amostras de soro sanguíneo diluídas 100 vezes foram analisadas de modo a incluir os intervalos de massa dos diversos isótopos de Cr, Ni, Zn e Cd, em baixa e média resolução. Os resultados das medidas de razão isotópica[†], em baixa e média resolução estão mostrados na TABELA 5.5. Com base nestes valores, pode-se perceber que medidas realizadas em baixa resolução, ficam sujeitas a interferências espectrais severas para os elementos de massa atômica intermediária (Cr, Ni, Zn) conforme o mostrado na FIGURA 5.13. Para estes mesmos elementos, as medidas realizadas em média resolução permitem a separação dos interferentes, e fornecem resultados mais exatos e precisos da razão isotópica natural, resultados semelhantes foram obtidos por BEGEROW & DUNEMANN¹³³, STURUP et al.¹³⁴ e por RIONDATO et al.¹³⁵.

Entretanto, para elementos que não estão sujeitos a interferentes isobáricos a melhor estratégia é o emprego da baixa resolução, pois a média e a alta resoluções apresentam uma menor transmissão de íons.

[†] A estatística de contagens (n=100) deste experimento permitiu resultados de razão isotópica aproximados. Experimentos com maior precisão necessitam de um número de aquisições superior (n=2000), e não foram o objeto deste estudo.

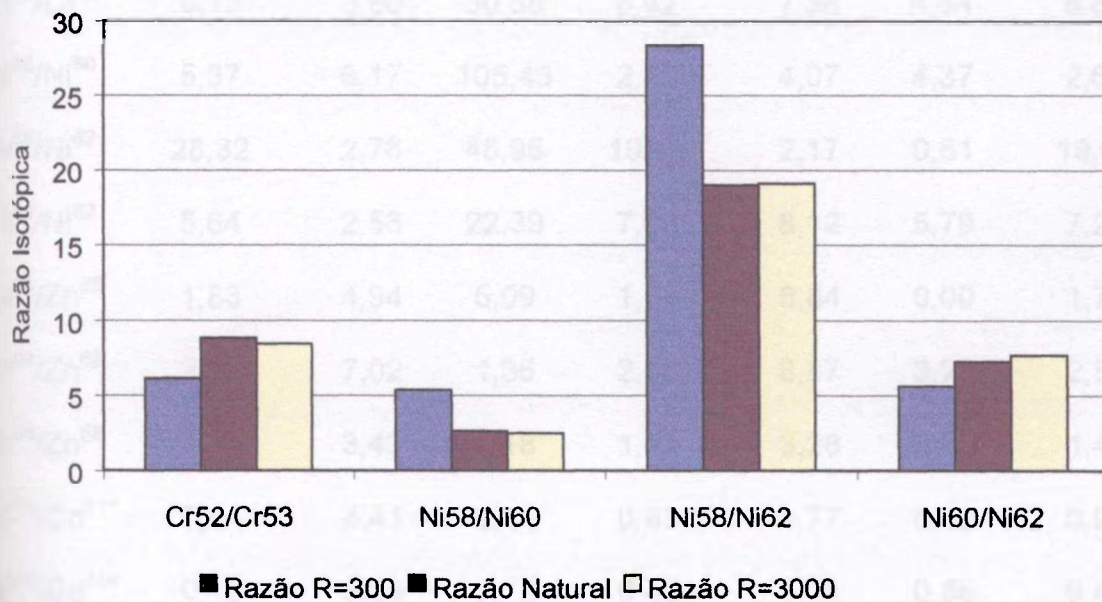


Figura 5.13: Razões isotópicas obtidas em diferentes condições de resolução e o valor de razão natural.

TABELA 5.5: Razões isotópicas obtidas em diferentes modos de resolução, para uma amostra real.

<i>Nuclídeos</i>	<i>Modo de Baixa Resolução</i>			<i>Modo de Média Resolução</i>			<i>Razão</i>
	<i>Razão</i>	<i>s*(%)</i>	<i>d**(%)</i>	<i>Razão</i>	<i>s*(%)</i>	<i>d**(%)</i>	
	<i>Obtida</i>			<i>Obtida</i>			<i>Natural</i>
Cr ⁵² /Cr ⁵³	6,13	3,80	30,55	8,42	7,38	4,54	8,82
Ni ⁵⁸ /Ni ⁶⁰	5,37	6,17	105,43	2,50	4,07	4,37	2,62
Ni ⁵⁸ /Ni ⁶²	28,32	2,76	48,95	19,11	2,17	0,51	19,02
Ni ⁶⁰ /Ni ⁶²	5,64	2,53	22,39	7,69	6,12	5,79	7,27
Zn ⁶⁴ /Zn ⁶⁶	1,83	4,94	5,09	1,74	6,84	0,00	1,74
Zn ⁶⁴ /Zn ⁶⁸	2,55	7,02	1,36	2,50	8,87	3,26	2,59
Zn ⁶⁶ /Zn ⁶⁸	1,39	3,43	6,18	1,43	3,28	3,35	1,48
Cd ¹¹⁰ /Cd ¹¹¹	0,94	4,41	3,41	0,97	1,77	0,12	0,98
Cd ¹¹⁰ /Cd ¹¹⁴	0,42	3,59	3,72	0,43	6,44	0,86	0,43
Cd ¹¹¹ /Cd ¹¹⁴	0,44	4,61	0,22	0,44	5,64	0,32	0,45

*s** é a precisão de 6 determinações, *d*** é o desvio percentual relativo calculado em relação as razões naturais

5.2. VERIFICAÇÃO DA EXATIDÃO DA MEDIDA:

5.2.1. SANGUE TOTAL (IAEA-A-13)

Uma das etapas de validação da metodologia de análise multielementar em amostras de sangue, foi a de análise de material certificado segundo o procedimento testado até então.

Deste modo foram analisadas as amostras certificadas, preparadas conforme o descrito na seção 4.7 e os resultados obtidos foram comparados com os valores certificados.

A fim de se comparar estes valores, seguiu-se a recomendação de De BIÈVRE, et. Al.¹³⁶, pela qual os valores obtidos ($X \pm s$) e os valores certificados ($V_{\min} \leq V_{\text{Recomendado}} \leq V_{\text{Max}}$) devem ser considerados concordantes quando:

- a média do valor obtido se situa entre o valor máximo e o mínimo recomendado ($V_{\min} \leq X \leq V_{\text{Max}}$) e;
- o desvio padrão (sigma) da medida não for maior que o desvio existente entre o valor recomendado e seus valores limite

$$\left(\frac{s}{V_{\text{Recomendado}} - V_{\min}} \approx \frac{s}{V_{\text{max}} - V_{\text{Recomendado}}} \approx 1 \right).$$

Os resultados obtidos para Mg, Cu, Zn, Rb, Se e Pb (R=300) [FIGURA 5.14] e para Mg, Fe, Cu, Zn, Rb e Se (R=3000) [FIGURA 5.15] concordaram com o valor certificado (ver TABELA 5.6).

As precisões internas e externas foram compatíveis com valores anteriores observados para soluções padrão durante o teste de estabilidade.

Foram calculados os desvios padrão (s) e os desvios em relação ao valor certificado ($X - V_{\text{Recomendado}}$), para os isótopos de Zn, nas duas condições de resolução. Embora ambas as condições de resolução tenham apresentado valores compatíveis com o valor certificado, e que as precisões tenham sido similares, é possível observar, conforme a FIGURA 5.16, que os desvios em relação ao valor certificado foram maiores para a condição de baixa resolução.

Este desvio embora pequeno era esperado, devido a formação de interferentes já discutidos anteriormente (seção 5.1.3.2).

As concentrações obtidas de Ni não concordaram com os valores recomendados (TABELA 5.7), e não concordaram entre si para diferentes isótopos (^{60}Ni e ^{62}Ni).

BARANY¹³⁷ também observou uma variabilidade grande e não esperada por se tratar de um padrão certificado, foi encontrada para os valores de concentração de Ni, conforme a TABELA 5.7. Para alguns elementos analisados não foram encontrados valores de referência disponíveis, entretanto os resultados das medidas se mostraram reprodutíveis (^{51}V e ^{75}As) e/ou compatíveis com as composições isotópicas naturais esperadas (Sr, Ag e Tl), conforme o mostrado na TABELA 5.8.

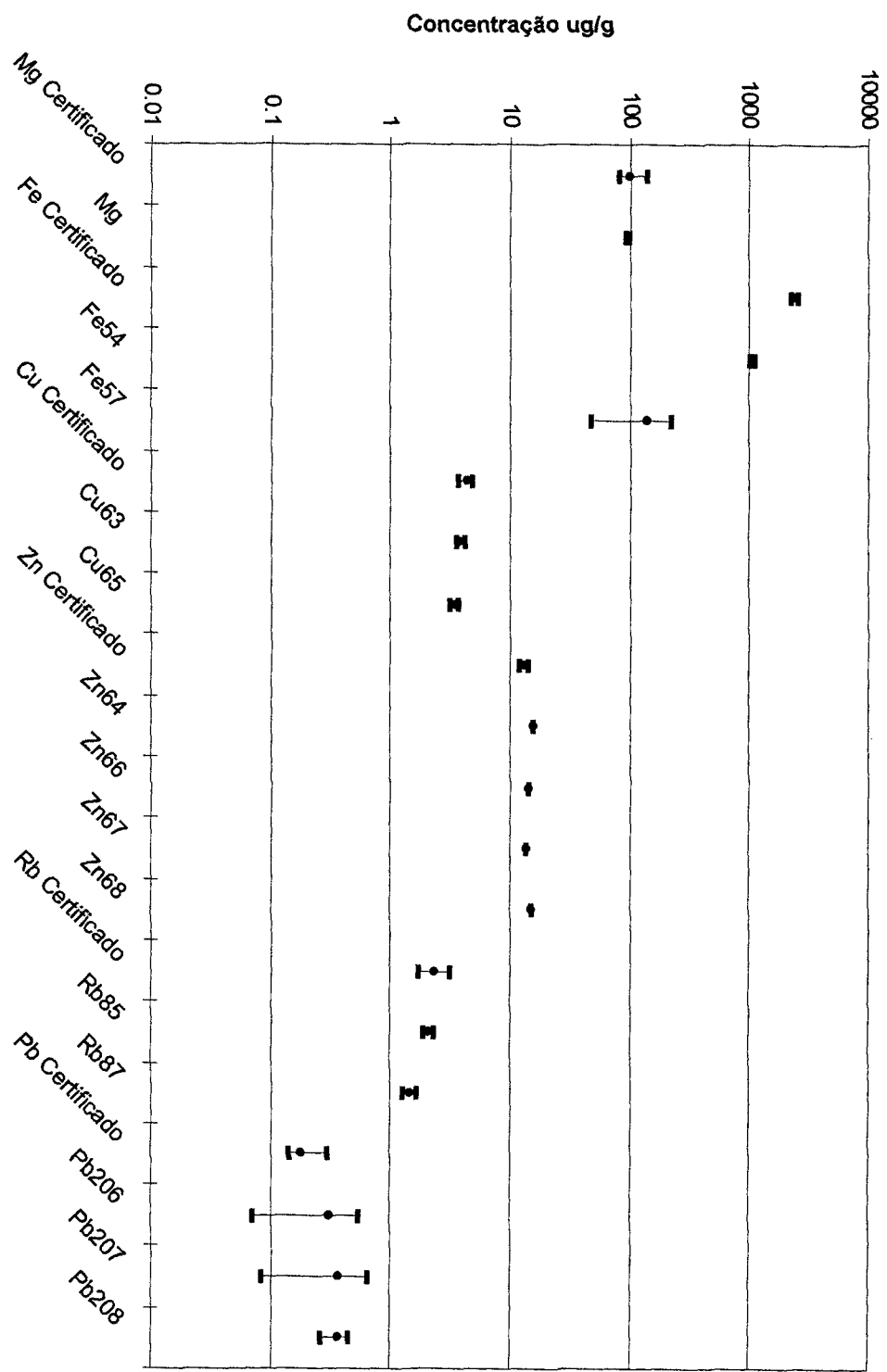


Figura 5.14: Comparação entre os valores certificados e os valores obtidos de concentração, em condição de baixa resolução

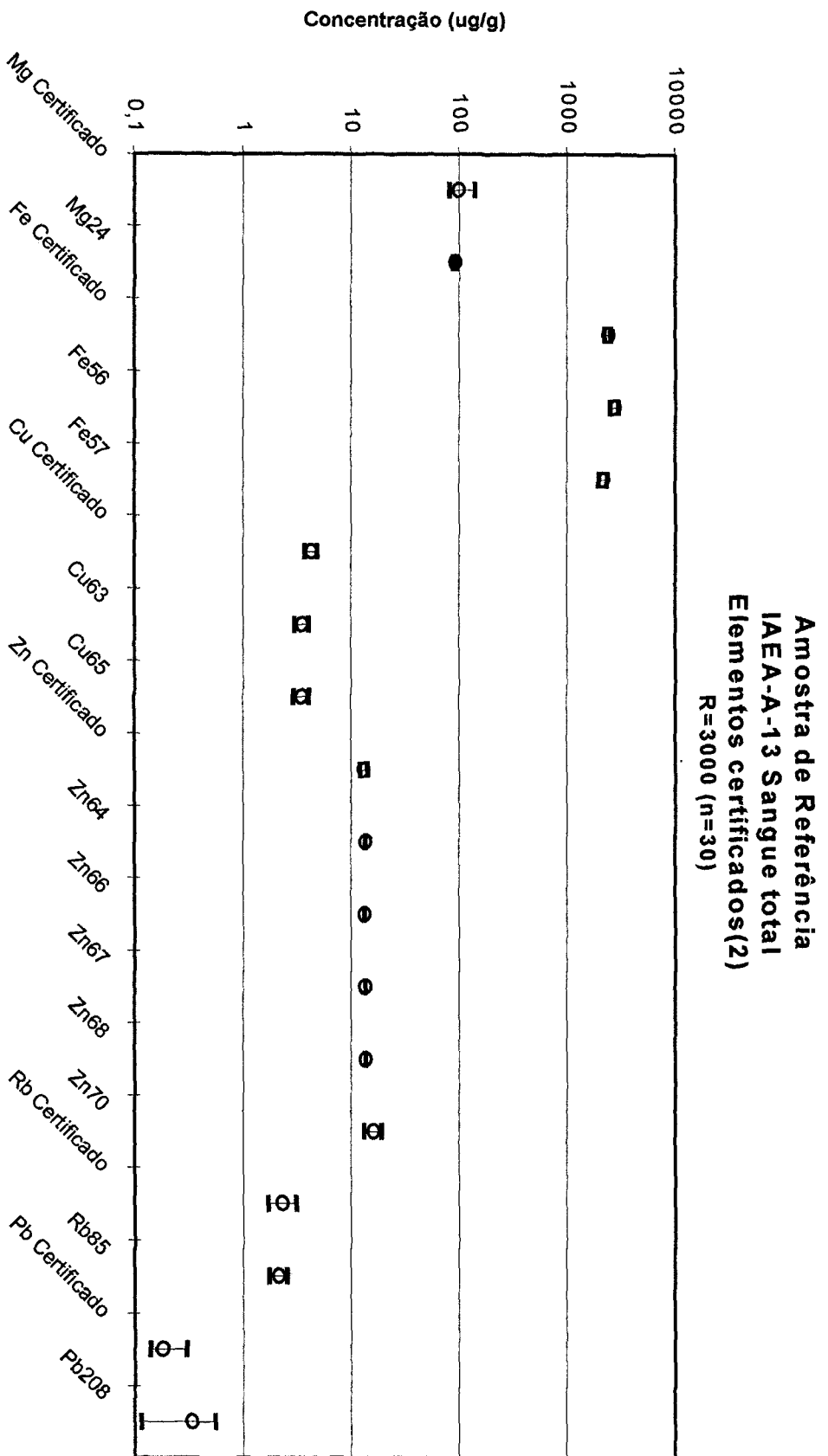


Figura 5.15: Comparação entre os valores certificados e os valores obtidos de concentração, em condição de média resolução

TABELA 5.6: Valores de concentração obtidos que concordaram significativamente com os valores certificados do padrão IAEA-A-13(todos os valores estão expressos em $\mu\text{g/g}$).

Isótopo	R=300		R=3000		Valor Certificado $\mu\text{g/g}$	Limites $\mu\text{g/g}$	Barany ¹²⁸
	X* $\mu\text{g/g}$	s** $\mu\text{g/g}$	X* $\mu\text{g/g}$	s** $\mu\text{g/g}$			
Mg24	94,10	1,03	90,81	2,35	99	81-139	
Fe54	1028	19	-	-	2400	2200-2500	
Fe56	-	-	2481	34			
Fe57	-	-	2184	67			
Cu63	4,36	0,08	3,54	0,27	4,3	3,7-4,8	4,10
Cu 65	3,94	0,11	3,62	0,35			$\pm 0,20$
Zn64	15,20	0,26	13,56	0,82	13	12-14	13,30
Zn66	14,15	0,32	13,18	1,19			$\pm 1,90$
Zn67	13,32	0,42	13,45	0,66			
Zn68	14,99	0,21	13,59	0,97			
Rb85	2,07	0,05	2,04	0,13	2,3	1,7-3,7	2,50
Rb87	1,98	0,07	1,87	0,17			$\pm 0,60$
Pb206	0,22	0,02	-	-	0,18	0,14-0,30	0,18
Pb207	0,26	0,02	-	-			$\pm 0,10$
Pb208	0,23	0,01					

*As concentrações elementares estão expressas para cada isótopo empregado na medida.

** precisão da medida

TABELA 5.7: Valores de concentração obtidos na análise do padrão IAEA-A-13 que não concordaram significativamente com os valores certificados (todos os valores estão expressos em $\mu\text{g/g}$)

Isótopo	Baixa Resolução		Média Resolução		Valor Certificado	Limites
	X*	S**	X*	s		
	$\mu\text{g/g}$	$\mu\text{g/g}$	$\mu\text{g/g}$	$\mu\text{g/g}$	$\mu\text{g/g}$	$\mu\text{g/g}$
Se77	22,88	1,13	25,68	4,73	0,24	0,15-0,31
Se82	-	-	-	-	$32,0 \pm 8^{(128)}$	
Ni62	1,74	0,70	-	-	1	0,6-1,4

*As concentrações elementares estão expressas para cada isótopo empregado na medida.

** precisão da medida.

TABELA 5.8.: Valores de concentração obtidos na análise do padrão IAEA-A-13 para os quais não se dispõe valores certificados (todos os valores estão expressos em $\mu\text{g/g}$).

Isótopo	Baixa Resolução		Média Resolução	
	X*	s**	X*	s**
	$\mu\text{g/g}$	$\mu\text{g/g}$	$\mu\text{g/g}$	$\mu\text{g/g}$
V51	2,23	0,24	-	-
As75	3,02	0,39	3,23	0,79
Sr86	0,24	0,10	0,17	0,06
Sr88	0,23	0,09	0,21	0,03
Ag107	0,06	0,04	0,07	0,03
Ag109	0,06	0,04	0,07	0,05
Ti203	0,007	0,005	0,007	0,006
Ti205	0,007	0,005	0,010	0,007

*As concentrações elementares estão expressas para cada isótopo empregado na medida.

** precisão do método, incluindo desvios de pesagem diluição e medida.

5.2.2. SORO SANGÜÍNEO(SERODOS)

As amostras do padrão certificado SERODOS foram preparadas conforme descrito na seção 4.7.b e os critérios para avaliação da concordância entre os resultados obtidos e os valores certificados¹³⁶ foram descritos na seção 5.2.1.

Os resultados obtidos pelo método adotado neste trabalho para ${}^7\text{Li}$, ${}^{24}\text{Mg}$, ${}^{63}\text{Cu}$, ${}^{65}\text{Cu}$, ${}^{66}\text{Zn}$, ${}^{67}\text{Zn}$ e ${}^{68}\text{Zn}$ (R=300) e para ${}^{44}\text{Ca}$, ${}^{57}\text{Fe}$, ${}^{56}\text{Fe}$, ${}^{63}\text{Cu}$, ${}^{65}\text{Cu}$, ${}^{64}\text{Zn}$, ${}^{66}\text{Zn}$, ${}^{67}\text{Zn}$ e ${}^{68}\text{Zn}$ (R=3000) foram concordantes com o valor de certificado do padrão SERODOS, conforme as FIGURAS 5.17 e 5.18.

Os valores de concentração discordantes do valor certificado foram encontrados para o ${}^{44}\text{Ca}$, ${}^{57}\text{Fe}$ e ${}^{64}\text{Zn}$ em baixa resolução(R=300). Este tipo de resposta já era esperada em função de interferentes isobáricos associados a estas massas. Dentre os interferentes mais abundantes na matriz e no plasma; e que seriam esperados na massa deste nuclídeos estão respectivamente: ${}^{12}\text{C}{}^{16}\text{O}{}^{16}\text{O}$, ${}^{40}\text{Ar}{}^{16}\text{O}{}^1\text{H}$ e ${}^{32}\text{S}{}^{16}\text{O}{}^{16}\text{O}$.

Diversos elementos para os quais não se dispunha de valores certificados também foram medidos em condições de baixa e média resolução. Os resultados obtidos para os nuclídeos destes elementos podem ser vistos na FIGURA 5.19. Dentre estes apenas o ${}^{55}\text{Mn}$ (LR e MR), o ${}^{59}\text{Co}$ (LR e MR) e o ${}^{62}\text{Ni}$ (LR e MR), ${}^{60}\text{Ni}$ (MR) foram concordantes entre si nas duas condições de resolução. Este comportamento serve como indicador de que o valor obtido nas duas condições de resolução é livre de interferentes e próximo do real.

Os resultados do ${}^{51}\text{V}$, do ${}^{52}\text{Cr}$ e do ${}^{53}\text{Cr}$, obtidos nas condições de baixa e média resolução, mostrados na FIGURA 5.19, discordaram entre si,

devido a ocorrência de interferentes ($^{38}\text{Ar}^{12}\text{C}^1\text{H}$; $^{40}\text{Ar}^{12}\text{C}$; $^{40}\text{Ar}^{12}\text{C}^1\text{H}$, respectivamente). Em média resolução esses interferentes são resolvidos, logo o que se observa é que as concentrações calculadas para o ^{51}V , o ^{52}Cr e o ^{53}Cr em média resolução são mais baixas e concordantes entre si no caso do ^{52}Cr e o ^{53}Cr .

Neste caso, passam a ser considerados os valores obtidos em média resolução, como os valores de referência nesse trabalho para ^{51}V , ^{52}Cr , e ^{53}Cr .

Na FIGURA 5.20 podem ser observados os nuclídeos estudados somente no modo de baixa resolução, por não estarem sujeitos a interferências espectrais. Dentre estes, os resultados obtidos para Sr^{86} e Sr^{88} e para Pb^{206} , Pb^{207} e Pb^{208} concordaram significativamente, entre si.

**Amostra de Referência
SERODOS
Elementos Certificados (1)
R=300 (n=30)**

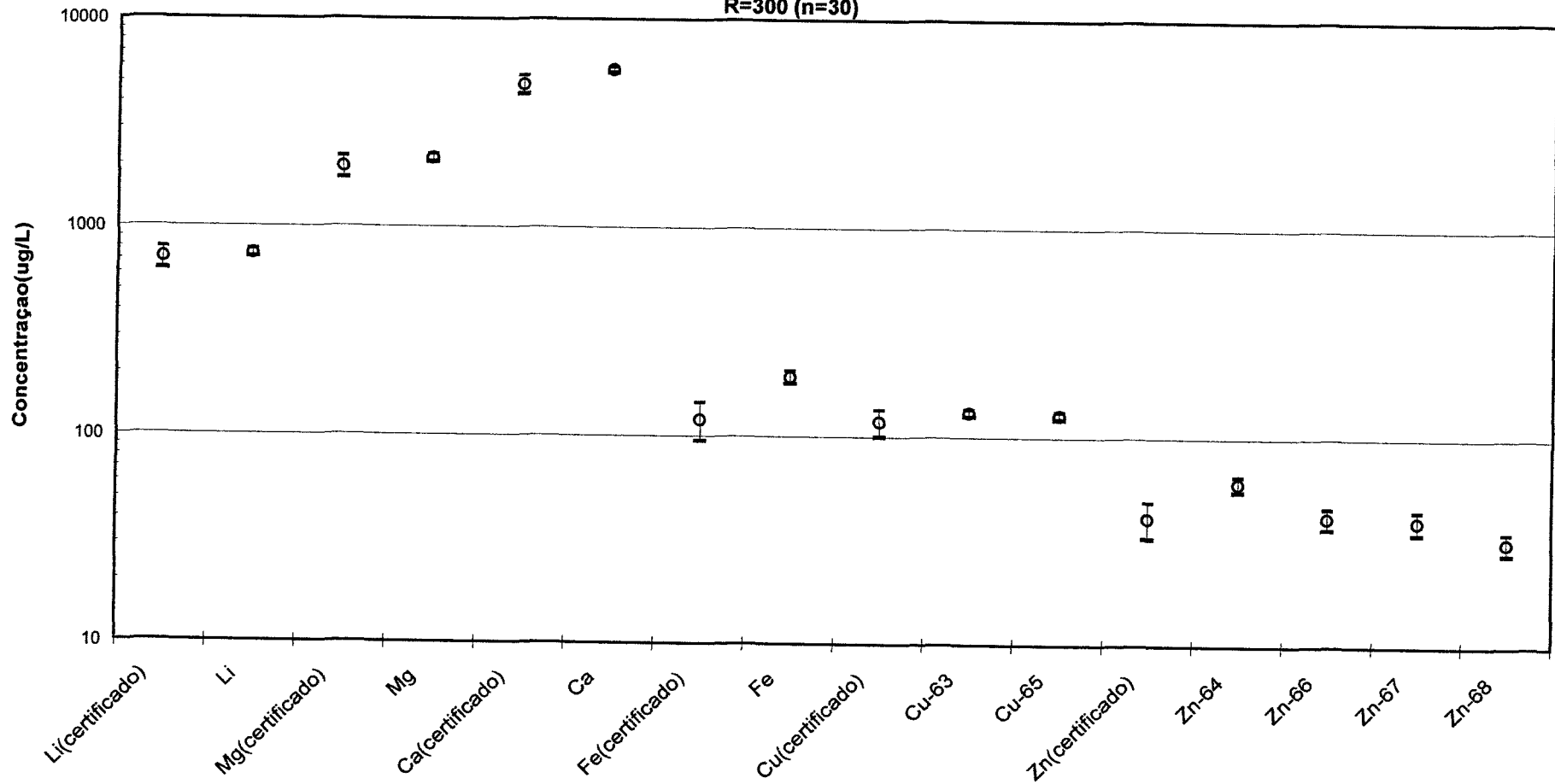


Figura 5.17: Comparação entre os resultados de concentração certificados e obtidos em amostras de soro (SERODOS) em condição de baixa resolução.

SERODOS
Elementos Certificados (2)
R=3000(n=30)

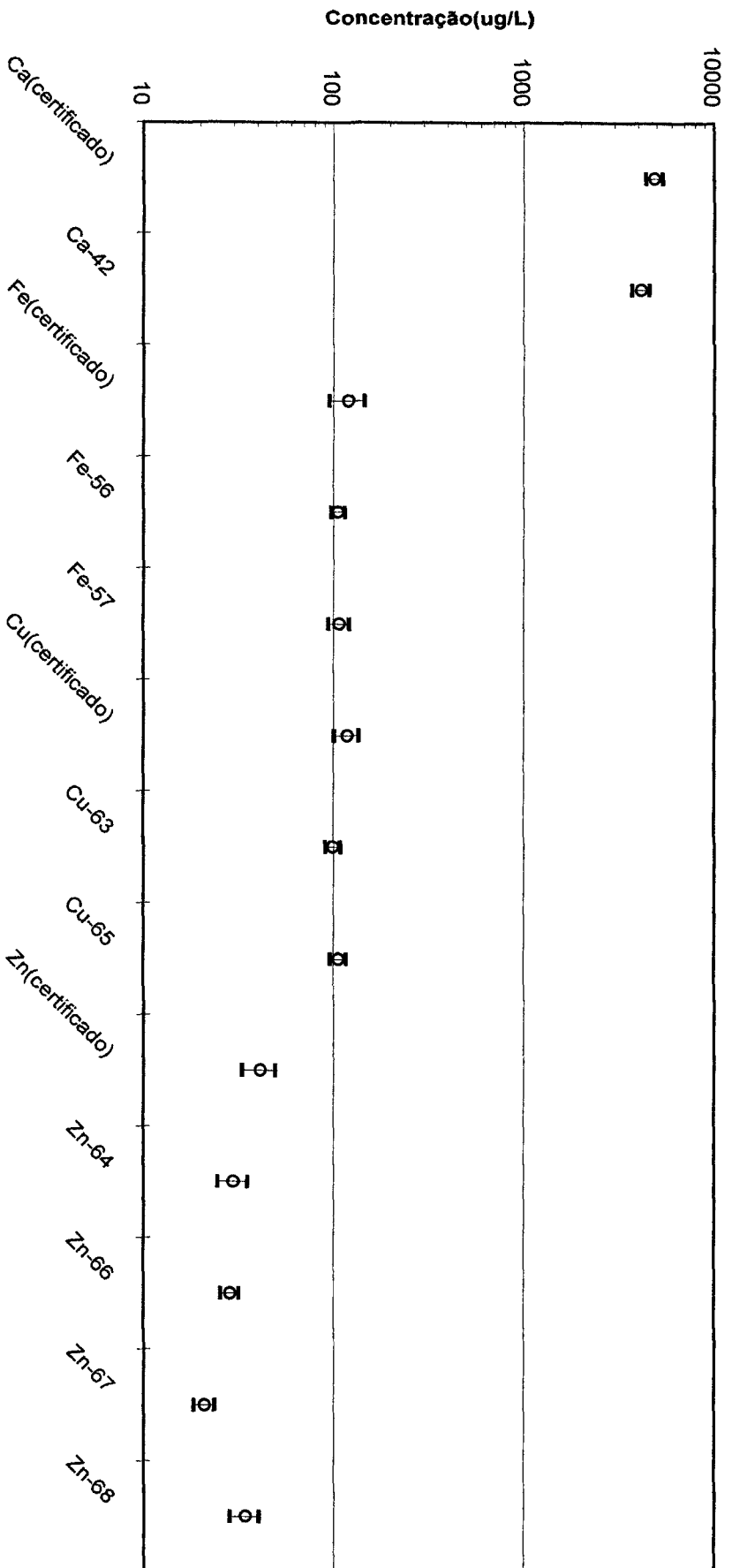


Figura 5. 18: Comparação entre os resultados de concentração certificados e obtidos em amostras de soro (SERODOS) em condição de média resolução.

SERODOS

Elementos Não-certificados (1)

Baixa Resolução X Média Resolução

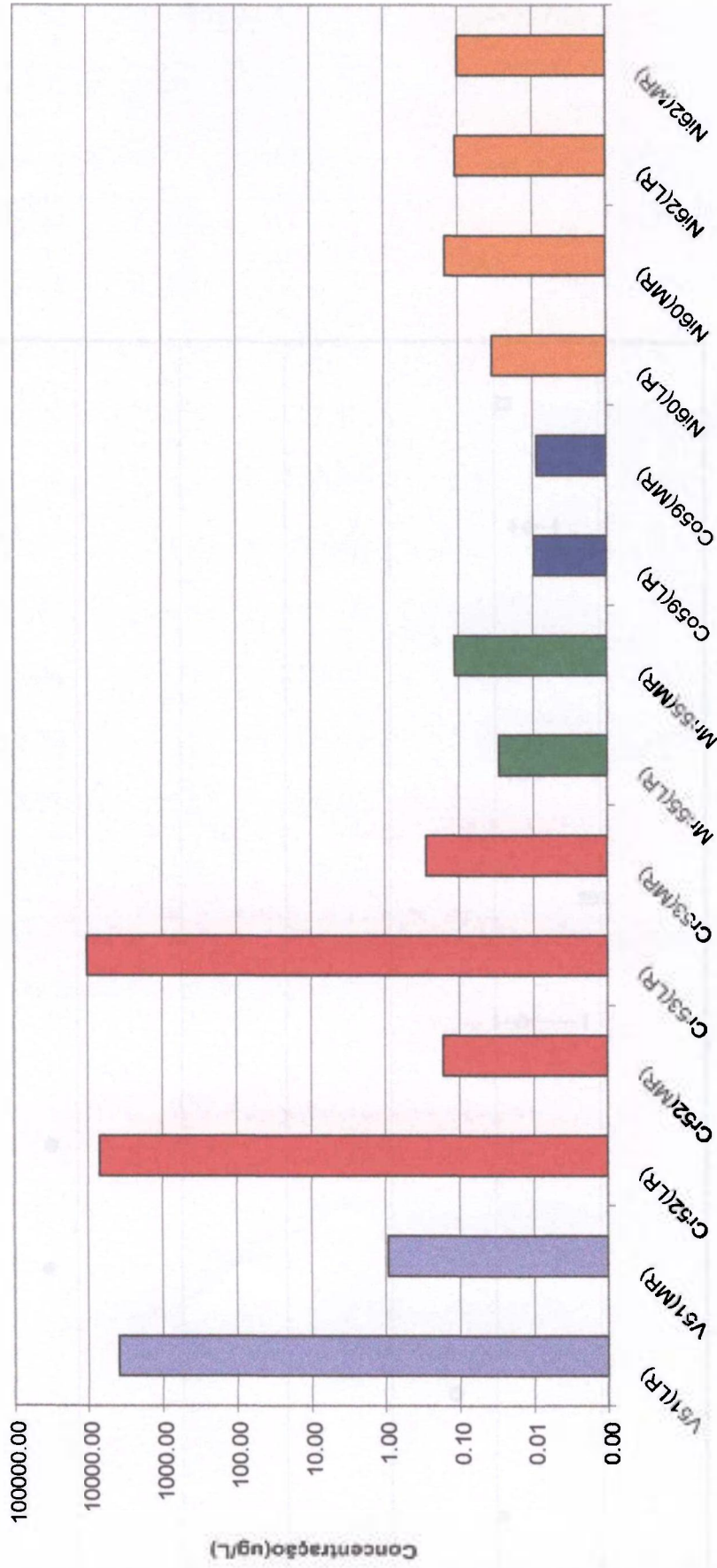


Figura 5. 19: Medidas de concentração em baixa e média resolução de núcleos sem valores de referência.

SERODOS
Elementos Não-certificados (2)
Baixa resolução

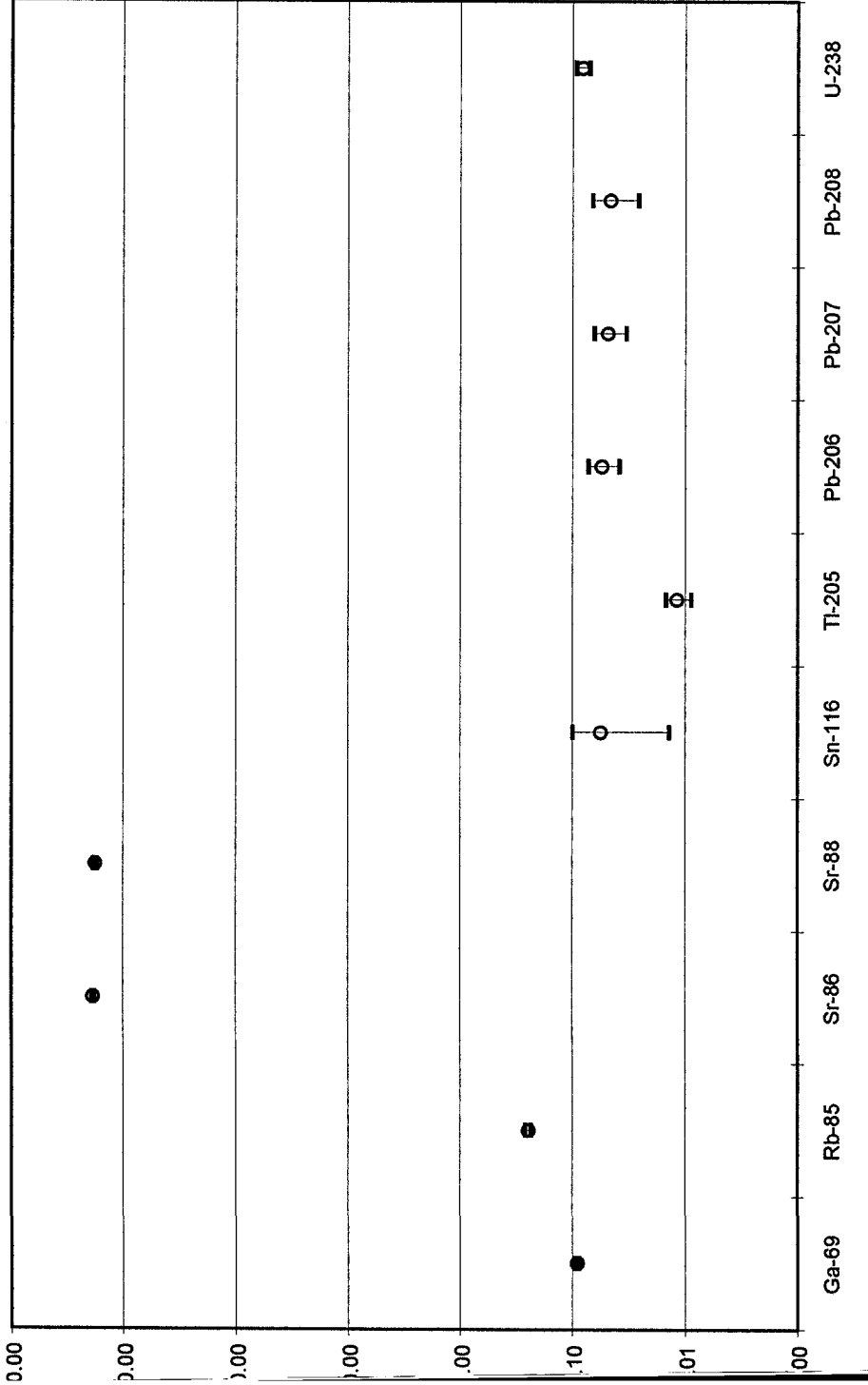


Figura 5.20: Concentrações obtidas para os núcleos estudados somente no modo de baixa resolução.

TABELA 5.9. Valores de concentração obtidos que concordaram significativamente com os valores certificados do padrão de soro SERODOS.

Isótopo	Baixa Resolução		Média Resolução		Valor Certificado $\mu\text{g/g}$	Limites $\mu\text{g/g}$
	X* $\mu\text{g/g}$	S** $\mu\text{g/g}$	X* $\mu\text{g/g}$	S** $\mu\text{g/g}$		
^7Li	744,04	30,62	-	-	703,50	619,50-787,50
^{24}Mg	2139,38	92,62	-	-	1940	1710-2170
^{44}Ca	5720,00	179,31	4106,68	539,25	4850	4360-5340
^{57}Fe	193,20	13,62	107,10	13,53	120,00	94,80-145,00
^{56}Fe	-	-	105,14	8,66	120,00	94,80-145,00
^{63}Cu	131,17	5,07	98,81	8,90	118	100-135
^{65}Cu	127,87	5,40	105,79	10,02	118	100-135
^{64}Zn	60,65	5,09	29,69	5,25	41	32,80-49,20
^{66}Zn	41,39	4,71	28,39	3,14	41	32,80-49,20
^{67}Zn	39,93	5,02	20,90	2,58	41	32,80-49,20
^{68}Zn	31,62	3,62	34,09	5,95	41	32,80-49,20

*As concentrações elementares estão expressas para cada isótopo empregado na medida.

** precisão do método incluindo desvios de medida e diluição

5.3. ESTUDO DE CASO:

O estudo de caso visou a aplicação da metodologia desenvolvida empregando amostras reais (soro de atletas maratonistas), onde a principal informação a ser obtida é a diferenciação de características individuais e de grupo da precisão da técnica analítica.

O estudo de caso consistiu na análise de amostras de soro sanguíneo de 23 atletas maratonistas, em fase pré-competitiva. Estas amostras foram analisadas empregando-se a metodologia desenvolvida de espectrometria de massas de alta resolução com fonte de plasma indutivo.

Para este estudo foram determinados um total de 37 nuclídeos e 23 amostras em um total de 57 medidas. Na interpretação dos resultados analíticos e clínicos desta matriz de dados foi empregada a metodologia de análise multivariada de redução aos componentes principais. Esta metodologia consiste na identificação de relações existentes em uma matriz de dados complexa, e na expressão desta matriz através dos componentes principais de variação do sistema⁹³. Neste estudo de caso foi a redução aos componentes principais foi aplicada aos valores de concentração de alguns elementos presentes no soro sanguíneo de atletas maratonistas. A motivação principal do emprego desta metodologia foi verificar sua validade em estudos de população e identificar correlações entre as concentrações de metais no soro sanguíneo e entre a condição física e clínica dos atletas.

5.3.2. INDIVÍDUOS:

Neste formato da análise foram buscadas as similaridades e variações no grupo de indivíduos selecionados. Portanto pretendeu-se identificar basicamente (i) o padrão genérico do grupo, (ii) similaridades decorrentes de características em comum entre indivíduos (sexo, dieta, número de maratonas/ano, etc.), (iii) correlações e diferenças que posteriormente, servirão a comparações com outros grupos (crianças, lactantes, adultos sedentários, etc.).

Nesta etapa foram consideradas como características dos indivíduos as informações disponíveis do trabalho de Vasquez¹⁵ referentes ao sexo, frequência da prática esportiva, número de participações em maratonas por ano, e alguns parâmetros hematológicos (Ferritina, Transferrina saturada e hemoglobina). Estes valores são reproduzidos na TABELA 4.1.

Os valores de concentração dos metais presentes no soro sanguíneo dos atletas medidos pela análise por espectrometria de massas de alta resolução com fonte de plasma indutivo são mostrados na TABELA 5.10. Os valores de concentração dos núclídeos medidos estão situados no intervalo de referência esperado (Ver TABELA 1.2), e sua precisão foi compatível com resultados obtidos por outros autores para a mesma técnica^{116,123,135,137}. A todos os resultados obtidos constam do ANEXO III. Na classificação em clusters três análises foram feitas conforme a seguinte seqüência:

LINK1: Concentração de metais em todos os indivíduos foram relacionados com o método de "linkage between groups"

LINK2: Os "outliers" encontrados foram eliminados, e relacionados com o método de "linkage between groups" e

LINK3: Os "outliers" encontrados foram eliminados, e relacionados com o método de WARD¹³⁸.

Tabela 5.10: Concentração média (ug/L), desvio padrão (ug/L) e desvio padrão relativo (%) de alguns elementos presentes no soro sanguíneo dos indivíduos considerados no estudo de caso.

Amostras	Elementos	Mg	Ca	V	Cu	Zn	As	Se	Rb	Fe
1	Média	15.319,63	51.575,48	296,02	930,84	1.756,30	245,80	1.796,98	357,39	1.001,25
	S	86,69	1.667,27	11,52	7,83	96,59	4,02	29,74	9,95	28,35
	RSD(%)	0,57	3,23	3,89	0,84	5,50	1,64	1,66	2,78	2,83
2	Média	16.787,83	53.725,32	283,88	1.152,29	1.524,38	239,63	1.737,57	352,81	3.155,85
	S	179,63	800,71	6,80	5,39	94,39	1,01	12,05	3,61	76,25
	RSD(%)	1,07	1,49	2,39	0,47	6,19	0,42	0,69	1,02	2,41
3	Média	16.360,39	55.903,72	287,41	1.411,25	1.502,63	254,33	1.749,02	316,11	2.049,11
	S	133,16	1.233,99	9,16	6,61	95,49	2,52	20,90	6,78	52,31
	RSD(%)	0,81	2,21	3,19	0,47	6,35	0,99	1,19	2,14	2,55
4	Média	19.016,49	54.945,30	254,06	1.371,47	1.672,49	232,92	1.681,63	324,57	2.144,96
	S	238,10	641,71	13,83	12,03	164,93	6,03	57,40	1,30	131,31
	RSD(%)	1,25	1,17	5,45	0,88	9,86	2,59	3,41	0,40	6,12
5	Média	17.536,97	53.745,80	230,35	1.444,68	1.409,66	231,09	1.692,56	412,18	740,55
	S	404,94	1.189,43	15,66	33,26	195,62	8,57	29,70	10,11	36,44
	RSD(%)	2,31	2,21	6,80	2,30	13,88	3,71	1,75	2,45	4,92
7	Média	18.472,97	54.988,07	188,94	987,49	1.104,55	201,15	1.551,06	296,80	886,85
	S	1.261,49	3.892,18	8,78	69,78	176,30	9,74	75,86	18,29	152,66
	RSD(%)	6,83	7,08	4,64	7,07	15,96	4,84	4,89	6,16	17,21
8	Média	18.925,84	55.205,66	185,41	994,11	1.581,40	198,70	1.482,59	334,16	800,15
	S	729,50	1.883,55	3,40	42,61	57,93	3,82	38,76	13,50	14,71
	RSD(%)	3,85	3,41	1,83	4,29	3,66	1,92	2,61	4,04	1,84
9	Média	19.036,87	68.289,58	209,22	1.273,46	1.346,29	193,38	1.511,17	369,00	1.412,26
	S	527,29	2.214,29	12,74	46,40	93,98	8,84	61,20	8,43	25,90
	RSD(%)	2,77	3,24	6,09	3,64	6,98	4,57	4,05	2,28	1,83
10	Média	20.410,01	72.869,03	258,67	1.148,48	1.900,22	227,22	1.779,83	391,85	1.910,50
	S	995,49	2.887,86	6,09	56,19	117,12	6,78	57,31	15,90	83,66
	RSD(%)	4,88	3,96	2,35	4,89	6,16	2,98	3,22	4,06	4,36
11	Média	19.452,40	67.092,61	251,81	991,21	1.357,80	212,27	1.596,15	338,60	2.601,38
	S	568,36	2.404,29	13,26	38,14	47,68	10,67	85,11	10,18	125,75
	RSD(%)	2,92	3,58	5,26	3,85	3,51	5,03	5,33	3,01	4,83
12	Média	17.594,66	63.587,13	266,71	918,59	1.418,25	221,03	1.635,64	292,35	2.486,50
	S	60,29	650,51	2,52	17,11	40,03	1,22	13,07	3,03	9,51
	RSD(%)	0,34	1,02	0,95	1,86	2,82	0,55	0,80	1,04	0,38
13	Média	16.535,10	66.470,49	276,69	1.340,15	1.422,84	222,20	1.697,55	487,35	1.895,99
	S	393,20	1.346,78	3,07	32,19	68,67	3,05	27,70	9,22	73,33
	RSD(%)	2,38	2,03	1,11	2,40	4,83	1,37	1,63	1,89	3,87
14	Média	21.276,81	95.294,66	300,78	1.411,50	25.105,95	230,07	1.750,73	431,80	2.636,42
	S	226,74	998,64	2,80	24,65	54,35	2,13	20,38	6,12	41,42
	RSD(%)	1,07	1,05	0,93	1,75	0,22	0,93	1,16	1,42	1,57
15	Média	19.958,23	81.462,30	282,54	1.030,63	14.116,50	222,73	1.692,70	453,00	2.239,88
	S	790,84	4.047,46	9,66	41,32	577,16	7,73	83,09	17,26	304,78
	RSD(%)	3,96	4,97	3,42	4,01	4,09	3,47	4,91	3,81	13,61
16	Média	20.073,84	78.349,95	267,55	1.183,62	19.732,38	212,84	1.612,99	423,22	1.948,65
	S	508,79	2.523,05	6,23	32,99	315,76	4,93	51,74	11,69	173,10
	RSD(%)	2,53	3,22	2,33	2,79	1,60	2,32	3,21	2,76	8,88
17	Média	19.641,34	69.693,64	269,52	1.067,83	3.642,65	213,37	1.635,81	437,18	2.623,50
	S	344,87	305,56	5,45	5,18	316,11	4,05	50,58	6,38	420,73
	RSD(%)	1,76	0,44	2,02	0,49	8,68	1,90	3,09	1,46	16,04
18	Média	21.204,01	67.949,41	247,74	1.057,35	3.236,08	201,16	1.535,83	343,39	1.743,51
	S	353,71	447,44	5,67	38,17	337,01	3,45	26,04	7,78	80,99
	RSD(%)	1,67	0,66	2,29	3,61	10,41	1,72	1,70	2,27	4,65
19	Média	20.096,97	67.667,39	257,82	732,80	2.370,21	211,85	1.645,90	319,89	2.774,80
	S	849,10	3.052,93	9,06	4,37	32,19	11,76	70,88	10,20	181,22
	RSD(%)	4,23	4,51	3,51	0,60	1,36	5,55	4,31	3,19	6,53
20	Média	20.113,88	71.793,52	259,32	1.812,90	2.455,29	218,01	1.646,58	465,51	1.365,25
	S	461,84	874,18	13,23	26,08	59,89	7,93	68,12	9,18	149,22
	RSD(%)	2,30	1,22	5,10	1,44	2,44	3,64	4,14	1,97	10,93
21	Média	20.806,55	70.587,34	242,74	1.026,98	1.348,38	207,91	1.583,63	375,45	883,15
	S	461,92	1.405,09	8,86	29,98	101,98	7,32	42,57	12,30	82,63
	RSD(%)	2,22	1,99	3,65	2,92	7,56	3,52	2,69	3,28	9,36
22	Média	20.401,67	74.693,77	260,92	1.019,53	1.531,72	228,02	1.756,74	298,65	1.434,68
	S	300,38	1.280,06	1,07	31,50	196,23	0,88	7,80	7,91	60,25
	RSD(%)	1,47	1,71	0,41	3,09	12,81	0,39	0,44	2,65	4,20
23	Média	20.753,07	73.138,72	238,83	1.022,44	1.705,52	213,23	1.632,97	324,17	971,59
	S	287,38	402,61	0,45	6,02	73,65	0,02	0,93	4,99	6,88
	RSD(%)	1,38	0,55	0,19	0,59	4,32	0,01	0,06	1,54	0,71
24	Média	18.149,28	65.918,19	211,97	1.007,67	1.545,94	188,27	1.448,56	283,41	690,17
	S	685,36	2.781,53	5,44	28,84	60,70	7,33	22,05	8,79	55,55
	RSD(%)	3,78	4,22	2,57	2,86	3,93	3,90	1,52	3,10	8,05

a. Análise do LINK1

Nesta etapa foram considerados 23 indivíduos distribuídos em 57 replicatas e 33 nuclídeos, para a análise de similaridade. As concentrações dos metais presentes no soro dos indivíduos considerados foram expressas em ug/L e podem ser observadas na TABELA 5.10. Foram então obtidos o dendrograma e a correlação entre o primeiro e o segundo componente principal, mostrados nas FIGURAS 5.23 e 5.24, respectivamente. Estas duas figuras exibem alguns padrões obtidos para os quais são feitas as seguintes considerações:

(i) Primeiramente, são reconhecidas as amostras que apresentam um comportamento anômalo em relação ao grupo. Na FIGURA 5.23. pode ser observado um grupo de amostras com alto grau de dissimilaridade em relação ao restante do grupo (AM9b, AM15a, AM15b, AM15c, AM14 e AM16b). O mesmo é observado em relação aos valores dos respectivos componentes principais, como pode ser observado na FIGURA 5.24. Particularmente nesta figura percebe-se que estas amostras não se ajustam ao centro de alta densidade. Estas amostras foram portanto consideradas como "outliers", por serem dissimilares das demais. As replicatas da amostra correspondente ao indivíduo 15 foram reprodutíveis e portanto há duas hipóteses a se considerar: a primeira de uma contaminação na amostragem, ou armazenamento, e a segunda de um comportamento individual realmente diverso do grupo.

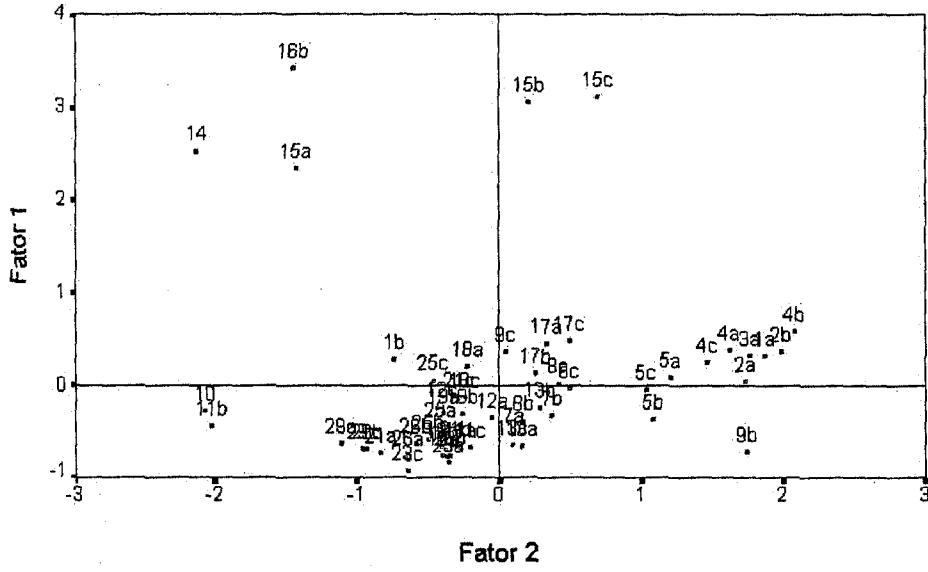


FIGURA 5.24: Cruzamento dos componentes principais.

b. Análise do LINK2 e do LINK3:

Nestas análises foram considerados 19 indivíduos, em 51 replicatas e 33 nuclídeos. Estas etapas são consideradas um refinamento da etapa anterior, pois apenas os indivíduos de maior similaridade são incluídos. As seguintes observações foram feitas:

No LINK2 foram encontrados três grupos (FIGURA 5.25) de acordo com o grau de similaridade mostrado: 2i, 2ii, 2iii (este grupo dividido em subgrupos a e b). No LINK3 foram encontrados dois grupos (FIGURA 5.26) de acordo com o grau de similaridade mostrado: 3i e 3ii (este dividido em quatro subgrupos a, b, c e d). Nestes LINKS não foram considerados outliers os comportamentos divergentes entre replicatas.

Independente do método empregado na análise dos clusters, o agrupamento observado levou a resultados iguais, conforme o mostrado nas TABELAS 5.11 e 5.12. As diferenças observadas entre os resultados dos dois métodos está associada ao grau de similaridade entre as amostras, e não com a inter-relação destas, pois a seqüência das amostras permaneceu igual. Portanto as diferenças são atribuídas às diferenças dos procedimentos de cálculo de similaridade pelos métodos e não às diferenças individuais. Outra consideração importante vem do fato de ter sido possível encontrar características predominantes nos grupos e subgrupos, acima das flutuações do método de análise química, e dos ruídos que normalmente se tem neste tipo de estudo.

Dendrogram using Average Linkage (Between Groups)

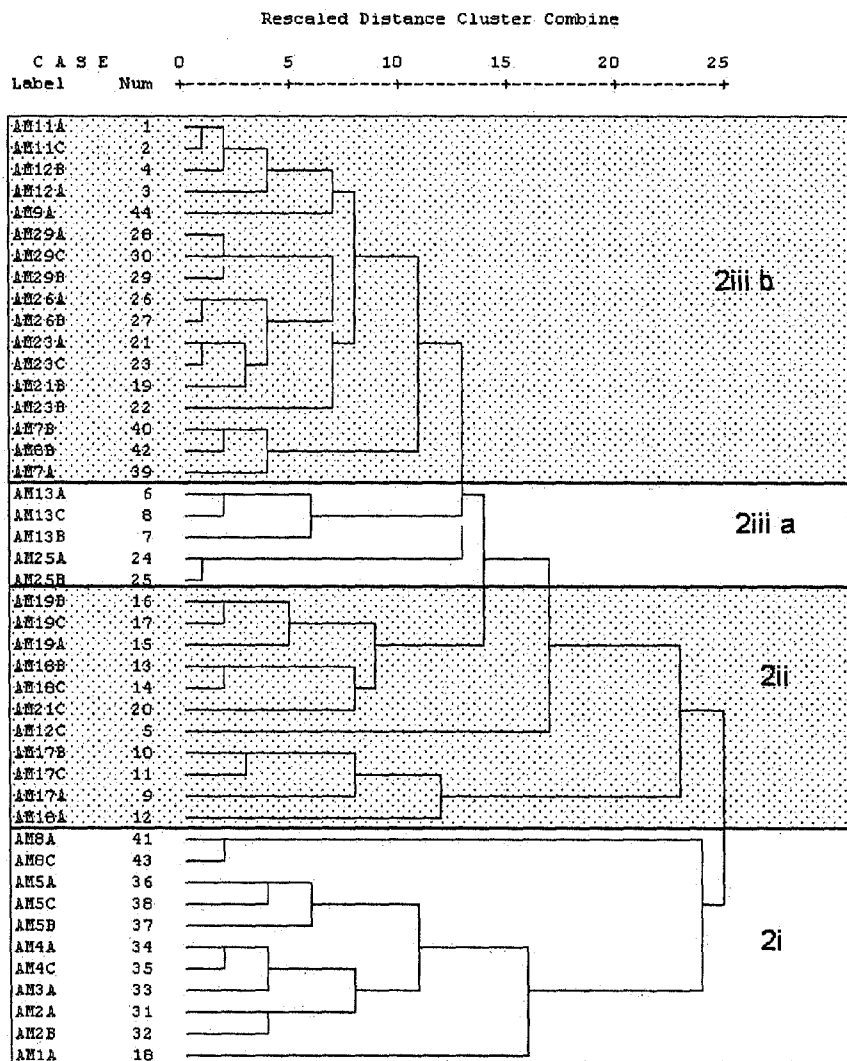


FIGURA 5.25: Análise do LINK2.

Dendrogram using Ward Method

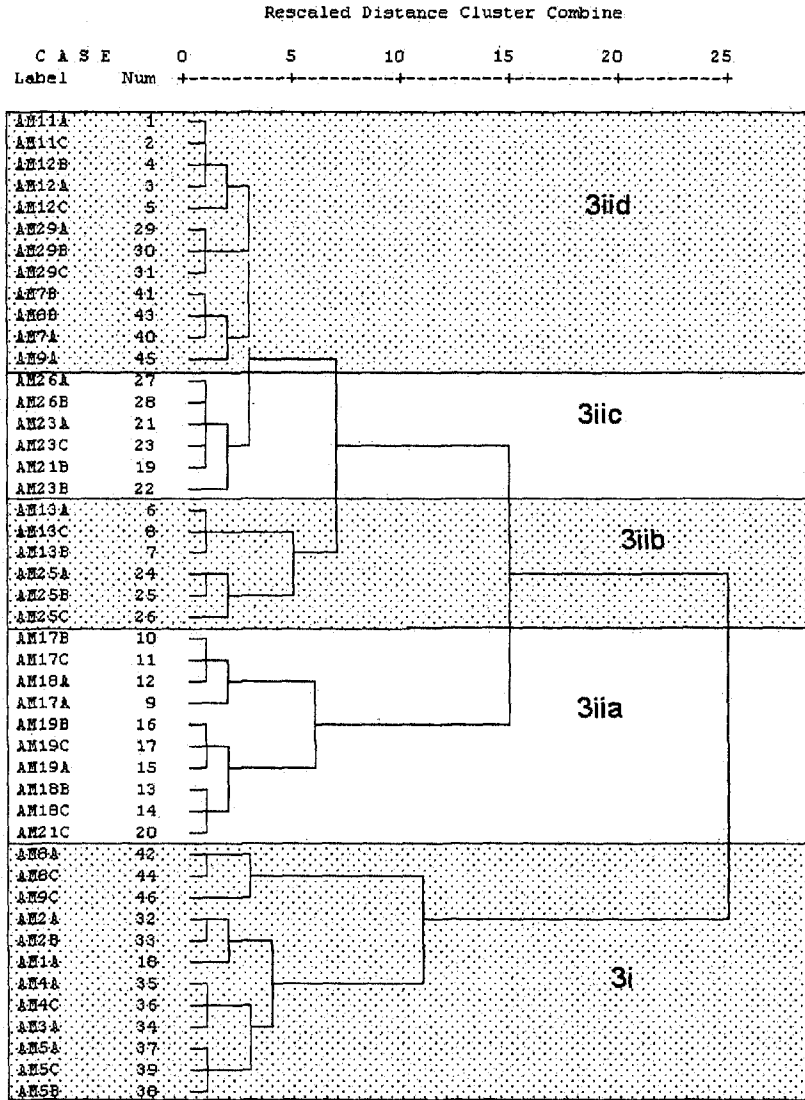


FIGURA 5.26: Análise do LINK3.

TABELA 5.11: Padrões de comportamento observados considerando-se o LINK 2.

Grupo	Subgrupo	Indivíduos	
2i	-	1, 2, 3*, 4*, 5*, 8	Maioria dos indivíduos do sexo feminino, Ferritina <30ng/mL, *Hb<14,0g/dL.
2ii	-	17, 18, 19, 21,	Sexo masculino, Hb>15,5g/dL
2iii	a	13, 25	Hb<14,0 g/dL
2iii	b	7, 9, 11, 12, 23, 26, 29	Em geral praticantes a mais de 10 anos, e participantes de mais de 3 maratonas por ano.

TABELA 5.12: Padrões de comportamento observados considerando-se o LINK 3.

Grupo	Subgrupo	Indivíduos	Características Predominante
3i	-	1, 2, 3*, 4*, 5*, 8	Maioria dos indivíduos do Sexo feminino, Ferritina <30ng/mL, *Hb<14,0g/dL.
3ii	a	17, 18, 19, 21	Sexo masculino, Hb>15,5g/dL
3ii	b	13, 25	Hb<14,0g/dL
3ii	c	23, 26	Em geral praticantes a mais de 10 anos, e
3ii	d	7, 9, 11, 12, 29	participantes de mais de 3 maratonas por ano.

Obs: Na denominação de grupos adotada faz-se referência ao LINK (2 para o LINK2) e o número de clusters encontrados (i, ii , etc.).

c. Análise dos componentes principais:

Na análise dos componentes principais com rotação foram extraídos 7 componentes que explicaram no total 88,1% da variância do sistema. Na análise dos dois primeiros fatores pode-se visualizar os grupos e subgrupos encontrados pela análise de clusters, o que confirma a interpretação anterior.

Os indivíduos classificados como 2iii ou 3iic ou 3iid são considerados como os que seguem o perfil mais uniforme entre os atletas maratonistas de elite. A distribuição de seus componentes pode ser utilizada como o padrão de reconhecimento (“fingerprint”) do grupo de estudo ou da população, na comparação com outros grupos. Quando estiverem disponíveis dados de um número mais significativo de atletas, poderá então se dispor do “fingerprint” real dessa população em estudo.

Quando comparados aos limites considerados como normais para os elementos medidos apenas para o ferro e para o zinco foram encontrados valores divergentes. Sete dos 23 indivíduos estudados apresentaram valores de concentração de ferro abaixo dos normais. Outros sete indivíduos apresentaram valores acima dos normais das concentrações de zinco, alguns desses foram considerados “outliers” pela análise multivariada.

As concentrações de Magnésio e cálcio, como o esperado, foram mais ou menos constantes, pois esses elementos tem função de eletrólitos.

Os valores de concentração do cobre foram normais para todos os indivíduos estudados. Não houve valor de referência de normalidade para comparação de outros elementos (V, As, Rb, Se).

VI. CONCLUSÕES:

As figuras de mérito estudadas (estabilidade, limite de detecção, precisão e exatidão) foram compatíveis com os valores esperados para a técnica de espectrometria de massa de alta resolução com fonte de plasma indutivo; e com a aplicação pretendida na avaliação nutricional e toxicológica de elementos metálicos no sangue e soro.

O emprego da média resolução permitiu a separação de sinais de alguns núclídeos de seus principais interferentes espectrais, permitindo a superação de um limite imposto a técnicas de baixa resolução.

Devido a sensibilidade da técnica, a diluição das amostras permitiu solucionar problemas decorrentes de interferentes não-espectrais.

O método de análise por espectrometria de massa de alta resolução com fonte de plasma indutivo permitiu a determinações com precisão e exatidão adequadas à determinação de elementos traços (Mg, Fe, Cu, Zn, Rb e Pb) em padrões certificados de sangue total e soro sanguíneo.;

No estudo de caso, foi possível distinguir variações individuais de flutuações analíticas decorrentes da medida, e identificar correlações entre as concentrações obtidas e as informações clínicas disponíveis. Estas correlações não seriam evidentes sem o emprego da análise multivariada. Isto torna esta metodologia particularmente adequada a estudos populacionais.

Embora a técnica analítica, a espectrometria de massas de alta resolução com fonte de plasma indutivo, tenha sido adequada ao objetivo proposto neste trabalho, há que se considerar alguns aspectos que ainda não foram citados:

É necessário o controle ambiente mais rígido onde são realizados os experimentos, e a qualidade dos reagentes e da água empregados na diluição é fundamental para o sucesso das análises. Estes requisitos são importantes tal como nas demais técnicas, mas os níveis de concentração a que nos referimos é menor que o encontrado nas demais técnicas analíticas.

Outro aspecto a se considerar é o custo elevado da análise decorrentes dos fatores já citados, e outros como o valor inerente ao instrumental e os custos associados à estrutura física necessária a qualidade dos resultados (controle de temperatura, consumo de reagentes com alto grau de pureza, consumo de gases e os custos de mão-de-obra qualificada).

VII. REFERÊNCIAS:

1. BARNES, R. Inductively coupled plasma mass spectrometry: capabilities and prospects for analysis of biological materials, **ICP information newsletter**, v. 23, n. 1, p. 3, 1997.
2. LAUWERYS, R. R.; HOET, P. **Industrial Chemical Exposure Guidelines for Biological Monitoring**, 2a ed., Lewis Publisher, CRC, Boca Paton, Florida, p.1-98, 1993,
3. HARRISON, I.; LITTLEJOHN, D.; FELL, G.S. Distribution of selenium in human blood plasma and serum. **Analyst**, v.121, p. 189-194, 1996.
4. WRÓBEL, K.; BLANCO GONZALEZ, E.; SANZ-MEDEL, A. Progress with the speciation of aluminium and silicon in serum of chronic renal patients using atomic spectroscopic techniques. **Journal of analytical atomic spectrometry, march**, v. 9, p. 281, 1994.
5. LEFLON, P.; PLAQUET, R.; ROSE, F.; HENNON, G.; LEDEME, N. Rapid determination of lithium in human serum and urine, at physiological concentrations, by inductively coupled plasma atomic emission spectrometry. **Analytica chimica Acta**, v. 327, p. 301-306, 1996.
6. PATRIARCA, M.; FELL, G.S. Determination of nickel in serum of haemodialysed patients by means of electrothermal atomic absorption spectrometry with deuterium background correction. **Journal of analytical atomic spectrometry**, v.9, p. 457, 1994.
7. CHRISTENSEN, J. M. Human Exposure to toxic metals. Factors influencing interpretation of biomonitoring results. **Science of total environment**, v. 166, p. 80-135, 1995.
8. SANZ MEDEL, A. Beyond total element analysis of biological systems with atomic spectrometric techniques. **Analyst**, v. 120, p.799-807, 1997.
9. ALIMONTI, A.; PETRUCCI, F.; FIORAVANTI, S.; LAURENTI, F.; CAROLI, S. Assessment of the content of selected trace elements in serum of term and pre-term newborns by inductively coupled plasma mass spectrometry. **Analytica chimica Acta**, v. 342, p.75-81, 1997.
10. CAMPANELLA, L. CRESCENTINI, G. ACHILLI, M. AVINO, P. CALI, A, GROSSI, R. TOMASSI, F. Determination of aminoacids and heavy metals in biological fluids and tissues. **ICP Information Newsletter**, v.23, n. 1, p. 23, 1997.

11. PEDROSA, L. F. C. **Avaliação do estado nutricional relativo ao zinco de crianças com diabetes mellitus insulino dependentes.** São Paulo:1997. Tese(doutorado) Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo, Departamento de Alimentos e Nutrição experimental, USP, 1997.
12. DI NOTO; V.; NI, D.; VIA, L. D.; SCOMAZZON, F.; VIDALI, M. Determination of platinum in human blood using inductively coupled plasma atomic emission spectrometry with an ultrasonic nebulizer. **Analyst**, v. 120, p. 1669-1673, 1995.
13. FARREL, N. In: **Transition metal complexes as drug and chemotherapeutic agents**, Kluwer Academic Publisher, Dordrecht, p. 46-121, 1989.
14. WROBEL, K.; GONZÁLEZ, E. B.; SANZ-MEDEL, A. Concentration and distribution of silicon in uremic serum and its relation to aluminium levels. **Journal of analytical atomic spectrometry**, v. 8, p. 915-919, 1993.
15. VASQUEZ, J. W. P. **Avaliação do estado nutricional de atletas maratonistas em fase pré-competitiva. Uma abordagem referente ao Ferro.** São Paulo:1998. Dissertação(Mestrado) Universidade de São Paulo, 1998.
16. FELL, G. S.; LYON, D.T. B. Is there a need for simultaneous multi-element analytical technique in clinical chemistry? In: **Essential and toxic trace elements in human health and disease.** The first international meeting of the international society for trace element research in human held in Palm Springs, Califórnia, p. 521-532, 1988.
17. VANDECASTEELE, C.; VANHOE, H.; DAMS, R. Inductively coupled plasma mass spectrometry of biological samples, **Journal of analytical atomic spectrometry**, v. 8, p. 781, 1993
18. BACON, J. R.; CRAIN, J. S; MCMAHON, A. W.; WILLIAMS, J. G. Atomic spectrometry update –Atomic mass spectrometry. **Journal of analytical atomic spectrometry**, v. 12, p. 407R-448R, 1997.
19. TAYLOR, A.; BRIGGS, R.J. External quality assesment schemes and improvements in the measurement of trace elements in biological fluids. **Journal of analytical atomic spectrometry**, v. 10, p. 1033, 1995.
20. KING, B. Tracebility of chemical analysis. **Analyst**, v. 112, p.197-204, 1997.
21. LEWIS, S. O'HAVER, T. C. HARNLY, J. H. Analysis of blood serum for essential metals by simultaneous multielementar atomic spectrometry with flame atomization. **Analitycal Chemistry**, v. 56, n. 7, p. 1066-1070, 1996.

22. JACOB, R. A. **Trace elements**. In: **Fundamentals of Clinical Chemistry**, Tietz. Norbert, W. 4a edição, 1987.
23. BURTIS, L.; COMAR, R. **Elementar Metabolism**, 1^a. Edição, 1962.
24. WORTH, H.G. Measurement of sodium and potassium in clinical chemistry. **Analyst**, v.113, p. 373-384, 1988.
25. VERCELLOTTI, G. M. A balanced Budget – evaluating the iron economy. **Clinical Chemistry**, v. 42, N. 5, p 657, 1998.
26. CRICHTON, R. R.; CHARLOTEAUX-WAUTERS, M. Iron transport and storage. **European Journal of Biochemique**, v. 164, p. 485-506, 1987.
27. DEMAAYER, E. ADIELS-TEGMAN, M. The prevalence of anemia in the world. **World Health Status Quo.**, v. 38, p. 302-316, 1985.
28. HASTKA, J. ; LASSERRE, J. J. ; SCHAWRZBECK, A.; REITER, A.; HEHLMANN, R. Laboratory tests of iron status: correlation or common sense? **Clinical Chemistry**, v. 42, p. 718-724, 1996.
29. SALONEN, J. T. NYSSONEN, K.; KOPERLA, H.; TUOMILEHTO, J.; SEPPANEN, R.; SALONEN R. High stored iron levels are associated with excess risk of miocardial infarction in Eastern Finnish men. **Circulation** , v. 86, p. 803-811, 1992.
30. STEVENS, R. G.; GRAUBAND, B. I. MICOZZI, M. S.; NERIISHI, K; BLUMBERG, B. S. Moderate elevation od body iron level and increased risk of cancer occurrence and death. **International Journal of Cancer**, v. 56, p. 364-369, 1994.
31. VANHOE, H.; VANDECASTEELE, C.; VERSIECK, J.; DAMS, R. Determination of iron, cobalt, copper, zinc, rubidium, molybdenum and cesium in human serum by inductively coupled plasma mass spectrometry. **Analytical chemistry**, v. 61, No. 17, 1851-1857, 1989.
32. MOENS, L.; VERREPT, P.; DAMS, R.; GREB, U.; JUNG, G.; LASER, B. New high resolution inductively coupled plasma mass spectrometry technology applied for the determination of V, Fe, Cu, Zn and Ag in human serum. . **Journal of analytical atomic spectrometry**, v. 9, p. 10751078, 1994.
33. PROHASKA, J. R. Biochemical functions of copper in animals. In: **Essential and toxic trace elements in human health and disease**. The frist international meeting of the international society for trace element research in human held in Palm Springs, Califórnia, 1988.

34. SARKAR, B. Copper in human serum in normal and pathological states. In: **Essential and toxic trace elements in human health and disease**. The first international meeting of the international society for trace element research in human held in Palm Springs, California, p. 125, 1988.
35. BREWER, G. J.; YUZBASIYAN, V. A.; IYENGAR, V.; HILL, G. M.; DICK, R. D. PRASARD, A. S. Regulation of copper balance and its failure in humans. . In: **Essential and toxic trace elements in human health and disease**. The first international meeting of the international society for trace element research in human held in Palm Springs, California, p. 95-103, 1988.
36. VERSIECK, J.; CORNELIS, R. Normal levels of trace elements in human blood plasma or serum. **Analytica Chimica Acta**, v. 116, p. 217-254, 1980.
37. WOLMAN, S. L. Zinc in total parenteral nutrition. In: **Essential and toxic trace elements in human health and disease**. The first international meeting of the international society for trace element research in human held in Palm Springs, California, p. 459-467, 1988.
38. VERSIECK, J.; CORNELIS, R. Normal levels of trace elements in human blood plasma or serum. **Analytica chimica acta**, v. 116, p. 217-254, 1980
39. PRASARD, A. S. Clinical spectrum and diagnostic aspects of human zinc deficiency. . In: **Essential and toxic trace elements in human health and disease**. The first international meeting of the international society for trace element research in human held in Palm Springs, California, p.3, 1988.
40. ANDERSON, R. A. Recent advances in the role of chromium in human health and diseases. In: **Essential and toxic trace elements in human health and disease**. The first international meeting of the international society for trace element research in human held in Palm Springs, California, p.189, 1988.
41. VALLERAND, A. L. ; CUERRIER, J. P.; SHAPCOTT, D.; VALLERAND, R. F.; GARDINER, P. F. Influence of exercise training on tissue chromium concentration in the rat. **Journal of Clinical Nutrition**, v. 39, p. 402-409, 1984.
42. KORC, M. Manganese homeostasis in human and its role in disease states. In: **Essential and toxic trace elements in human health and disease**. The first international meeting of the international society for trace element research in human held in Palm Springs, California, p.253, 1988.
43. NEIBOR, E.T.; SANDFORD, W. E. In: Nickel and its role in biology. Série: **Metal ions in biological systems**. Nova York, v. 23, cap. 4, p. 91-122, 1988.

44. YYENGAR, G. V.; KOLLMER, W.E. BOWEN, H. J. M. **The elemental composition of human tissue and body fluids**. Verlag Chemie, Weinheim, p. 22-27, 1978.
45. CREWS, H. M.; DUCROS, J.; EAGLES, J.; MELLON, F. A.; KASTENMAYER, P.; LUTEN, J. B.; MACGRAW, E. A. Mass spectrometric method for studying nutrient mineral and trace element absorption and metabolism in humans using stable isotopes. **Analyst**, v. 119, 2491-2514, 1994.
46. TOWNSENDS, AT; MILLER, KA; MCLEAN, S.; ALDOUS, S. **Journal of analytical atomic spectrometry**, v. 11, p.1213, 1998.
47. MUNIZ, CS.; MARCHANTE-GAYON, JM; GARCIA ALONSO, I. SANZ MEDEL. Multielemental analysis of human serum by double focusing ICPMS. **Journal of analytical atomic spectrometry**, v. 2, p.193, 1999.
48. RAYLEIGH, THE LORD. *Phylos. Mag.*, v.11, p. 117, 1906 apud Green, B.J. Overview and survey of plasma physics. In: GILL, R. D. **Plasma physics and nuclear fusion research**. London: Academic, p.3-32, 1981.
49. GREEN, B.J. Overview and survey of plasma physics. **Plasma physics and nuclear fusion research**. London: Academic, p.3-32, 1981.
50. MOORE, G.L. **Introduction to inductively coupled plasma atomic emission spectrometry**. Amsterdam: Elsevier, 1989.
51. MILLER, M. Basic concepts in atomic emission spectrometry. In: MONTASER, A. GOLIGHTLY, D.W. **Inductively coupled plasmas in analytical Atomic spectrometry**. New York, NY:VCH, p. 55-108, 1992.
52. BARNES, R. M. Recent advances in emission spectroscopy: Inductively coupled plasma discharges for spectrochemical analysis. **CRC Critical Reviews in analytical chemistry**, p. 203, 1978.
53. MAVRODINEANU, R.; HUGHES, R. C. *Spectrochimica Acta*, v. 19, p. 1309, 1963 apud Barnes, R. M. Recent advances in emission spectroscopy: Inductively coupled plasma discharges for spectrochemical analysis. **CRC Critical Reviews in analytical chemistry**, p. 203, 1978.
54. BABAT, G.I. *Vestn, Elektronprom.*, nº 2, p.1; nº 3, p.2 apud Greenfield, S.; McDGeachin, H. McD.; Smith, P.B. Plasma emission sources in analytical spectrometry-III. **Talanta**, v. 23, p.1-14, 1976.
55. BABAT, G.I. *Vestn, Elektronprom.*, nº 2, p. 1; nº 3, p. 2 apud ¹ Moore, G.L. **Introduction to inductively coupled plasma atomic emission spectrometry**. Amsterdam: Elsevier, 1989.

56. REED, T. B. *Journal of Applied Physics*, v.32, p.821, 1961, apud Barnes, R. M. Recent advances in emission spectroscopy: Inductively coupled plasma discharges for spectrochemical analysis. **CRC Critical Reviews in analytical chemistry**, p. 203, 1978.
57. GREENFIELD, S. *ICP Information Newsletter*, v.1, p. 3, 1975 apud Barnes, R. M. Recent advances in emission spectroscopy: Inductively coupled plasma discharges for spectrochemical analysis. **CRC Critical Reviews in analytical chemistry**, p. 203, 1978.
58. FASSEL, V. A. *ICP Information Newsletter*, v. 1, p.267, 1976 apud Barnes, R. M. Recent advances in emission spectroscopy: Inductively coupled plasma discharges for spectrochemical analysis. **CRC Critical Reviews in analytical chemistry**, p. 203, 1978.
59. GREENFIELD, S.; MCDGEACHIN, H. MCD.; SMITH, P.B. Plasma emission sources in analytical spectrometry-III. *Talanta*, v. 23, p.1-14, 1976.
60. GREENFIELD, S.; MCDGEACHIN, H. MCD.; SMITH, P.B. Plasma emission sources in analytical spectrometry-II. *Talanta*, v. 22, p.553-562, 1975.
61. GREENFIELD, S.; MCDGEACHIN, H. MCD.; SMITH, P.B. Plasma emission sources in analytical spectrometry-I. *Talanta*, v. 22, p.1-15, 1975.
62. GRAY, A. L. ICP-MS: The improbable ion source. *Spectroscopy Europe*, v. 5, nº 3, p.8, 1993.
63. DUCKWORTH, H. E.; BARBER, R. C.; VENKATASBRAMANIAN, V. S. **Mass Spectrometry**. 2ª. Edição. Nova York, 1990.
64. AHEARN, A. J. **Trace analysis by mass spectrometry**. New York, NY: Academic, 1972.
65. DAWSON, P. H. **Quadrupole mass spectrometry and its applications**, New York, NY: Elsevier, p. 323, 1976.
66. HOUK, R. S.; FASSEL, V. A.; FLESCHE, G. D.; SVEC, H. J.; GRAY, A. L.; TAYLOR, C. E. Inductively coupled argon plasma as an ion source for mass spectrometric determination of trace elements. *Analytical Chemistry*, v. 52, nº 14, p. 2283-2289, 1980.
67. GREENFIELD, S.; MONTASER, A. Common RF generators, torches, and sample introduction systems. p. 187. In: MONTASER, A. GOLIGHTLY, D.W. **Inductively coupled plasmas in analytical Atomic spectrometry**. New York, NY:VCH, p. 949, 1992.
68. CHEN, F.F. **Introduction to plasma physics and controlled fusion**. New York, NY:Plenum Press, 1990.

69. DENDY, R. O. **Plasma dynamics**. Oxford Sciences Publications. Clarendon Press, 1990.
70. BISHWANATH, CHAKRABORTY. **Principles of plasma mechanics**. John Willey & Sons, New Delhi, India, 1990.
71. GILL, R. D. **Plasma physics and nuclear fusion research**. London: Academic, 1981. p.3-32
72. MOSTAGHIMI, J.; BOULOS, M. I. Mathematical modeling of the inductively coupled plasmas. In: MONTASER, A. GOLIGHTLY, D.W. **Inductively coupled plasmas in analytical Atomic spectrometry**. New York, NY:VCH, p. 949, 1992.
73. MULLEN, J. A. M. van der. On the atomic state distribution function in inductively coupled plasmas - I. Thermodynamic equilibrium considered on the elementary level. **Spectrochimica Acta**, v. 44B, n^o 11, p. 1067, 1989.
74. MULLEN, J. A. M. van der. On the atomic state distribution function in inductively coupled plasmas - II. The stage of local thermal equilibrium and its validity region. **Spectrochimica Acta**, v. 45B, n^o 1/2, p. 13, 1990.
75. NIU, H.; HOUK, R. S. Fundamental aspects of ion extraction in inductively coupled plasma mass spectrometry. **Spectrochimica Acta**, v. 51B, 779-815, 1996.
76. MCWHIRTER, R. W. P. Plasma Radiation. p. 235 In: GILL, R. D. **Plasma physics and nuclear fusion research**. London: Academic, p.3-32, 1981.
77. DOUGLAS, D. J. Fundamental aspects of inductively coupled plasma mass spectrometry. p. 613 In: MONTASER, A. GOLIGHTLY, D.W. **Inductively coupled plasmas in analytical Atomic spectrometry**. New York, NY:VCH, p. 949, 1992.
78. WILSON, D. A.; VICKERS, G. H.; HIEFTJE, G. M. Analytical characteristics of an inductively coupled plasma mass spectrometer. **Spectrochimica Acta**, v. 48B, no 1/2, p. 29-38, 1987.
79. JARVIS, K. E.; GRAY, A. L.; HOUK, R. S. **Handbook in inductively coupled plasma mass spectrometry**. London: Blakie & Son, 1992.
80. SCOTT, R. H.; FASSEL, V. A. KINSELEY, R. N.; NIXON, D. E. Inductively coupled plasma optical emission analytical spectrometry: a compact facility for trace analysis of solutions. **Analytical Chemistry**, v. 6, p. 76-80, 1974.
81. FARMER, J. B. **Types of mass spectrometers** Chap2 In: MacDowell, C.A. **Mass Spectrometry**. USA. McGraw Hill Book Company Inc. 956, 1963.

82. WHITE, F. A.; WOOD, G. M. **Mass Spectrometry: Applications in Science and Engineering**. USA, John Wiley & Sons, Inc. 773p, 1986.
83. MATTAUCH, J; HERZOG, R. Z. **Physik**, 89, 786p, 1934 In: MacDowwell, C.A. **Mass Spectrometry**. USA. McGraw Hill Book Company Inc. 956, 1963.
84. MATTAUCH, J. **Phys. Rev**, 50, 617p 1936. In: MacDowwell, C.A. **Mass Spectrometry**. USA. McGraw Hill Book Company Inc. 956, 1963.
85. DEMPSTER, P. **Proc. Am. Phil. Soc.** 75, 755p, 1935. In: : MacDowwell, C.A. **Mass Spectrometry**. USA. McGraw Hill Book Company Inc. 956, 1963.
86. BAINBRIDGE, K. T; JORDAN, E.B. **Phys Rev**, 50, 282, 1936. In : MacDowwell, C.A. **Mass Spectrometry**. USA. McGraw Hill Book Company Inc. 956, 1963.
87. NIER, A.O. **Rev., Sci. Inst.** 31, 1127p, 1960. In : MacDowwell, C.A. **Mass Spectrometry**. USA. McGraw Hill Book Company Inc. 956, 1963.
88. FINNINGAN MAT. **Element Operating Manual**. P/N 1091280, 1997.
89. LIM, H. B.; HAN, M. S.; LEE, K, J. Determination of trace elements in human serum by inductively coupled plasma atomic emission spectrometry with flow injection. **Analytica chimica acta**, v. 320, p. 185-189, 1986
90. LOCHMÜLLER, C.H.; REESE, C. E. **Introduction to fator analysis. CRC Critical reviews in analytical chemistry**, v.28, n.1, p. 21-49,1998.
91. MARDIA, K. V. KENT, J.; BIBBY, J. M. **Multivariate Analysis**. 7a Ed. Academic Press, USA, Califórnia,1989.
92. TROMOD, N.; RIVISK, E. **Multivariate Analysis of data in sensory sciences. Data Handling in sciences and technology**, v. 16, Elsevier, Amsterdã Holanda,1996.
93. ESTEVES, J. C. G.; MACHADO, A. A. S. C. Procedure for the classification of fulvic acids and similar substances based on the variation with pH of their synchronous fluorescence spectra. **Analyst**, v. 122, p. 1299-1305, 1997.
94. SCARMÍNIO, I. S. **Desenvolvimento de um sistema quimiométrico para microcomputadores e algumas aplicações**. Campinas:1989. Tese (doutoramento) Universidade Federal de Campinas.
95. ISO5725-1986(E). **Precision of test methods – Determination of repeatability and reproducibility for a standard test method by interlaboratory tests**.
96. CURRIE, L. Nomenclature in evaluation of analytical methods including detection and quantification capabilities. **Pure and applied chemistry**, v. 67, No. 10, p 1699, 1995.

97. WINEFORDNER, J. D.; PETRUCCI, G. A.; STEVENSON, C.L.; SMITH, B. W. Theoretical and practical limits of atomic spectroscopy. **Journal of analytical atomic spectrometry**, v. 9, p.131, 1994.
98. FLEMING, J.; ALBUS, H.; NEIDHART, B.; WEGSCHEIDER, W. Glossary of analytical terms (VII) **Accreditation and Quality Assurance**, 1997, 2, 51-52
99. ANALYTICAL METHODS COMMITTEE. Recommendations for the definition, estimation and use of the detection limit. **Analyst**, v. 112, p. 199, 1987.
100. DAMS, R.F.J.; GOOSSENS, J.; MOENS, L. Spectral and non spectral interferences in inductively coupled plasma mass spectrometry. **Mickrochimica Acta**, v.119,p. 277, 1995.
101. OLESIK, J. W. Investigating the fate in individual sample droplets in ICP's. **Applied Spectroscopy**, 158A, V. 51, no 5, 1997.
102. BAYON, M.M.; ALONSO, J.I.G; SANZ-MEDEL, A. Enhanced semi-quantitative multi-analysis of trace elements in environmental samples using inductively coupled plasma mass spectrometry. **Journal of analytical atomic spectrometry**, 1988, v. 13, 277-282.
103. RODUSHKIN, I.; RUTH, T.; KLOCKARE, D. Non-spectral interferences caused by a saline water matrix in quadrpole and high resolution inductively coupled plasma mass spectrometry, . **Journal of analytical atomic spectrometry**, v.12, 308, 1990.
104. FERNÁNDEZ, A.; MURILLO, M.; CARRION, N.; MERMET, J. M. Influence of operating conditions on the effects of acids in inductively coupled plasma atomic emission spectrometry. . **Journal of analytical atomic spectrometry**, 1994, v. 9, 217-221.
105. FUNK, W; DAMMANN, V.; DONNEVERT, G. **Quality assurance in Analytical Chemistry**. VHC Publishers, p. 40, 1995
106. BUZOIANU, M.; ABOUL-ENEIN, H. Y. The traceability of analytical measurements. **Accreditation and Quality Assurance**, v.2, 11-17, 1997.
107. BECKER, J. S.; DIETZE, H. J. Double-focusing sector field inductively coupled plasma mass spectrometry for highly sensitive multielement and isotopic analysis. **Journal of analytical atomic spectrometry**, n. 12, 881-889, 1997.
108. RICHTER, W. Primary methods of measurement in chemical analysis, **Accreditation and Quality Assurance**, n. 2, 354-359, 1997.

109. KÜPPERS, S. Validation concept for purity determination assay in the pharmaceutical industry using measurement uncertainty and statistical process control. **Accreditation and Quality Assurance**, n. 2, p. 338-341, 1997.
110. RUI, J. RIUS, F. X. Assessing the accuracy of analytical methods using linear regression with error in both axes. **Analytical Chemistry**, 1996, 68, 1851-1857.
111. ANALYTICAL METHOD COMMITTEE, Is my calibration linear? **Analyst**, v. 119, p.2363, 1994.
112. HUBER, M. K. W. Improved calibration for wide measuring ranges and low contents. **Accreditation and Quality Assurance**, v. 2, 367-374, 1997.
113. PENNINGCKX, W. HARTMAN, C. MASSART, D. L. SMEYERS-VERBEKE, J. Validation of the calibration procedure in atomic absorption spectrometry methods, . **Journal of analytical atomic spectrometry**, 1996, 11, 237-246.
114. WILLIAMS, A. Measurements uncertainty in analytical chemistry. **Accreditation and Quality Assurance**, n. 1, 14-17, 1996.
115. OLESIK, J. W. Understanding the origin of chemical matrix effects in ICP-OES and ICP-MS. **ICP Information Newsletter**, v. 21, n. 11, p. 708, 1996.
116. BEAUCHEMIN, D.; MCLAREN, J. W.; BERMAN, S. S. **Spectrochimica Acta Part B**, 1987, 42, 467.
117. FELDMAN, I.; TITTES, W.; JAKUBOWSKI, N.; STUEWER, D. Performance characteristics of inductively coupled plasma mass spectrometry with high mass resolution. **Journal of analytical atomic spectrometry**, v. 9; p. 1007, 1994.
118. MOENS, L; VANHAECKE, F.; RIONDATO, J.; DAMS, R. Some figures of merit of a new double focusing inductively coupled plasma mass spectrometry. **Journal of analytical atomic spectrometry**, 1995, v. 10, 569-574.
119. BARANY, E.; BERGDAHL, I. A. Characterization of a simple ICP-MS method for multielement determination in whole blood and serum. **ICP Information Newsletter**, v. 22, n. 11, p. 842, 1997.
120. HOUK, R. S.; FASSEL, V. A.; FLESCHE, G. D.; SVEC, H. J.; GRAY, A. L.; TAYLOR, C. E. **Analytical Chemistry**, 1980, 52, 2283-2289.
121. CETAC. Determination of Fe in biological samples using ultrasonic nebulization and membrane desolvation with ICPMS. **Application Bulletin**, 1998, 011v60797u.

122. FALK, H.; GEERLING, R.; HATTENDORF, B.; KRENGEL-ROTHENSEE, K.; SCHIMDT, K.P. Capabilities and limits of inductively coupled plasma mass spectrometry for direct determination of element traces in saline solutions. **Fresenius journal of analytical chemistry**, v. 359, p. 352, 1997.
123. VAN VEEN, E.H.; BOSCH, S. LOOS-VOLLEBREGT, M.T.C. Spectral interpretation and survey analysis in ICP-MS. **ICP Information Newsletter**, v. 22, n. 7, p. 429, 1996.
124. VANDECASTEELE, C.; VANHOE, H.; DAMS, R. Inductively coupled plasma mass spectrometry in biological samples. **Journal of Analytical atomic spectrometry**, v.8, p.781, 1993.
125. JARVIS, K. E.; GRAY, A. L; HOUK, R. S. **Handbook in inductively coupled plasma mass spectrometry**. London: Blakie & Son, 1992.
126. TAN, S.H.; HORLICK, G. **Journal of Analytical Atomic Spectrometry**, 2, 745, 1987
127. OLIVARES, J. A. HOUK, R. S. **Analytica Chemistry**, v.57, p. 2674, 1985
128. TANNER, S.D. **Spectrochimica Acta**, 47B, 209, 1992.
129. HARTENSTEIN, S.D.; HASSAN, M.S.; CHRISTIAN, G.D. Internal standards for simultaneous multielement analysis in inductively coupled plasma mass spectrometry. **Analyst**, v. 108, p.1323, 1993.
130. DAMS, R.F.J.; GOOSSENS, J.; MOENS, L. Spectral and non spectral interferences in inductively coupled plasma mass spectrometry. **Mickrochimica Acta**, v.119, p. 277, 1995.
131. MOENS, L.; VERREPT, P.; DAMS, R.; GREB, U.; JUNG, G.; LASER, B. New high resolution inductively coupled plasma mass spectrometry technology applied for the determination of V, Fe, Cu, Zn, and Ag in human serum. **Journal of analytical atomic spectrometry**, v. 9, p. 1075-1078, 1994.
132. REED, N.M; CAIRNS, R. O.; HUTTON, R. C. ; TAKAKU, Y. Characterization of polyatomic ion interferences in inductively coupled plasma mass spectrometry using a high resolution mass spectrometer. **Journal of analytical atomic spectrometry**, v.9, p. 881, 1994.
133. BEGEROW, J.; DUNEMANN, L. Mass spectral interferences in the determination of trace levels of precious metals in human blood using quadrupole and magnetic sector field inductively coupled plasma mass spectrometry. **Journal of analytical atomic spectrometry**, 1996, 11, 303-306.
134. STUPUP, S.; HANSEN, M.; MOLGAARD, C. **Journal of analytical atomic spectrometry**. 1997, 12, 919-923.

135. RIONDATO, J.; VANHAECKE, F.; MOENS, L.; DAMS, R. Determination of trace and ultratrace elements in human serum with a double focusing magnetic sector inductively coupled plasma mass spectrometry. **Journal of analytical atomic spectrometry**, 1997, 12, 933-937.
136. DE BIÈVRE; P. KAARLS; R. ; PEISER, H.S.; RASBERRY. S.D.; REED, W. P. Protocols for traceability in Chemical Analysis. Part II Design and Use. **Acreditation and Quality Assurance**, 1997, 2, 270-274.
137. BARANY, E.; BERGDAHL, I. A.; SCHUTZ, A. SKERFVING, S. OSKARSSON, A. Inductively coupled plasma mass spectrometry for direct multi-element analysis of diluted human blood and serum. **Journal of Analytical Atomic Spectrometry**, v. 12, p.1005-1007, 1997.
138. MOYER, T. P.; PIPPENGER, C. E. Therapeutic drug Monitoring In: **Tietz Textbook of Clinical Chemistry**. Burtis, C. A.; Ashwood, E.R, 2nd edition WB Saunders Company 1994, Estados Unidos.
139. GRAHAM, R. C. **Data analysis for the chemical Sciences- a guide to statistical techniques**. VHC Publishers, Nova York, 1993.
140. RODUSHKIN, I.; ODMAN, F.; BRANTH, S. Multielement analysis of whole blood by high resolution inductively coupled plasma mass spectrometry. **Fresenius Journal of Analytical Chemistry**. v. 364, n. 4, p. 338-346, 1999.

ANEXO I

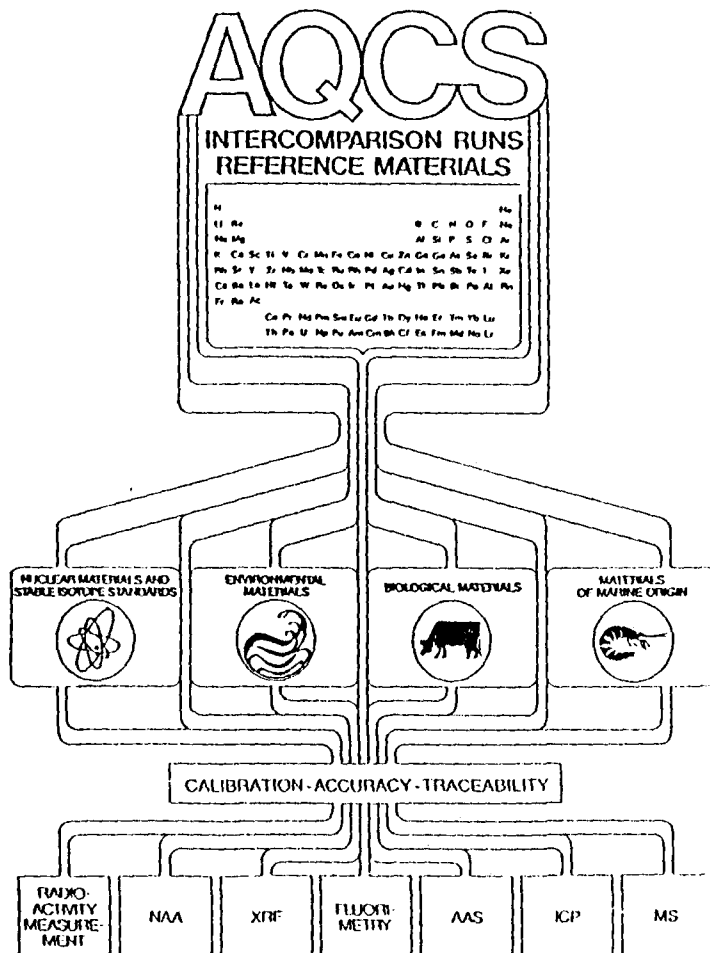
REFERENCE SHEET

IAEA-A-13

TRACE ELEMENTS

IN

FREEZE DRIED ANIMAL BLOOD





INTERNATIONAL ATOMIC ENERGY AGENCY
AGENCE INTERNATIONALE DE L'ENERGIE ATOMIQUE
МЕЖДУНАРОДНОЕ АГЕНТСТВО ПО АТОМНОЙ ЭНЕРГИИ
ORGANISMO INTERNACIONAL DE ENERGIA ATOMICA

WAGRAMERSTRASSE 5, P.O. BOX 100, A-1400 VIENNA, AUSTRIA, TELEX: 1-12645, CABLE: INATOM VIENNA, TELEPHONE: 2360

IN REPLY PLEASE REFER TO:
PRIERE DE RAPPELER LA REFERENCE:

LAB/243

March 1983

Information Sheet

CERTIFIED REFERENCE MATERIAL, A-13
(Concentration of trace and minor elements
in freeze dried animal blood.)

Description of the material

Fresh beef blood obtained from a slaughter-house was freeze dried (-40°C) in vacuum. A batch of 40 kg of the dry residue was powdered in a plastic ball-mill, sieved on a nylon sieve to a grain size $< 300 \mu\text{m}$ and homogenized by mixing in a rotating plastic drum for 70 hours. Aliquots of 25 g of the final material were filled into plastic bottles.

In order to assure a long-term conservation of the material, all samples in the sealed bottles were sterilized by gamma-ray irradiation (^{60}Co), using a dose of 2.5 Megarads.

Homogeneity was checked by determining the concentrations of potassium and zinc by instrumental neutron activation analysis in several sub-samples taken from one bottle and comparing the results with those for sub-samples taken from various bottles chosen at random. By applying F and t tests it was found that the results did not differ significantly

and that this material could be considered homogeneous for sample weights less than 200 mg.

more

The water content of the air-dried material as determined by drying at 85°C to a constant weight was found to be 3.5%. As, however, the moisture content may have varied with changes in the ambient humidity and temperature, it was recommended that the water content of this material be always determined in a separate sub-sample (not that taken for analysis) by drying for 40 - 48 hours at 85°C.

All results are expressed on a dry-weight basis.

Establishing of certified values

The basis for establishing the certified concentration values of trace elements was the interlaboratory comparison organized by the IAEA in 1981/82. The median values and their confidence intervals, calculated for the intercomparison results, were accepted as certified values if they fulfilled some testing criteria. In general, the testing criteria were based on the following data: reasonable confidence interval of the median depending on a concentration level, number of results, number of analytical methods used, agreement between the results obtained by various methods, and number of outlying results.

The exact description of the results of the intercomparison and of the criteria used for their qualification may be found in the Report No. IAEA/RL/98, March 1983.

The certified concentration values are established in Table 1. The values which have not fulfilled the testing criteria required for the certification, for which, however, a high probability exists that their true values are contained in the given confidence intervals, are listed in Table 2 as non-certified information values.

Important note

The analysts using the Certified Reference Material V-9 are kindly requested to communicate their meaningful analytical results on this material to:

Analytical Quality Control Service
International Atomic Energy Agency
Laboratory Seibersdorf
P.O.Box 100, A-1400 Vienna, Austria

These results can be used in the future for the updating of the certified values which are the best estimates as of March 1983. As usual, the origin of these additional results will be kept confidential.

Table 50

Certified concentration values of elements
in the IAEA's Freeze Dried Animal Blood (A-13)

Element	Units	Concentration*	Confidence limits**
Br	µg/g	22	19 ÷ 24
Ca	µg/g	286	226 ÷ 332 *
Cu	µg/g	4.3	3.7 ÷ 4.8
Fe	mg/g	2.4	2.2 ÷ 2.5 *
K	mg/g	2.5	2.1 ÷ 2.8
Na	mg/g	12.6	11.6 ÷ 13.5
Rb	µg/g	2.3	1.7 ÷ 3.1
S	mg/g	6.5	5.9 ÷ 7.0 *
Se	µg/g	0.24	0.15 ÷ 0.31 *
Zn	µg/g	13	12 ÷ 14

* Expressed on dry-weight basis.

** Confidence limits at a significance level of 0.05

Table 2

Non-certified information values for concentrations of certain elements
in the IAEA's Freeze Dried Animal Blood (A-13)

Element	Concentration* µg/g	Confidence limits µg/g
Mg	99	81 ÷ 139
Ni	1	0.6 ÷ 1.4
P	940	680 ÷ 1120
Pb	0.18	0.14 ÷ 0.30

* Expressed on dry weight basis.

ANEXO II

Package size

Cat. No.: 13951
13952

6 x 5 ml
20 x 5 ml

Properties and Use

SERODOS® is a lyophilized universal control serum based on human serum with assay values for all important components of human serum. It may be used to control the precision and accuracy of manual and automated methods. To improve measurement, some concentrations and activities of the components have been increased by supplements so that the concentration and activities of the components are in the easily measurable normal range or in the borderline between normal and pathological.

Reference- and Target Values

The bold typed target and reference values in SERODOS® were assigned by special laboratories on behalf of the Institut für Standardization and Documentation in the Medical Laboratory (INSTAND), according to the instructions of the German Medical Council of the German Federal Republic (Bundesärztekammer, BÄK) for quality control of quantitative determinations in the laboratory. The maximum allowed range (for individual results) were calculated by the target value ± the maximum permissible deviation (Appendix 1 of the BÄK guidelines). Additional values were determined in own quality control laboratories and in selected laboratories. The maximum allowed range has been assigned according to the BÄK guidelines.

Instructions for Use

Reconstituting the lyophilisate

Open the SERODOS® vial carefully to avoid any loss of the substance. Accurately pipette 5.0 ml of redistilled water to the contents of one vial. Close the vial carefully and allow to stand, protected from light, for at least 30 minutes.

Then completely dissolve and thoroughly mix any undissolved substance still adhering to the flask and the closure, by careful swirling, rocking or rotating. Do not shake. Avoid foaming.

Storage/Stability

If stored unopened in a refrigerator (2-8°C), the contents are usable until the expiration date printed on the package. The components in reconstituted SERODOS® are stable at 2-8°C for at least 10 days.

In order to prevent contamination and to protect from light (bilirubin) we recommend storing the original bottle in a dark place and removing the necessary amount for a day's usage.

If required, freshly dissolved SERODOS® can be divided into portions and frozen once (-20°C). Carefully mix thawed serum before use.

The activity of acid phosphatase significantly decreases at a neutral pH. Stabilization is achieved by reconstituting the lyophilisate with 5.0 ml of 0.2% acetic acid (0.033 mol/l) 10 days usage is possible after stabilization. The assay values are correspondingly specified. For determining alkaline phosphatase, SERODOS® should not be used earlier than 2 hours after reconstitution. Alkaline phosphatase stabilizes within about 48 hours, the values may increase up to 20%.

Precautions

SERODOS® has been obtained from the blood of carefully selected human donors. Each blood donation contributing to SERODOS® gave negative results for hepatitis B surface antigen and HIV-1/2 antibodies when tested with FDA approved reagents. Nevertheless, it is advisable to use the precautions employed when working with patient serum since even this test does not rule out potential infectiousness.

Routine Organic Constituents

Constituent	Test	Method of Analysis	Target Value	Maximum permitted range	Units
Albumin	instand	Bromocresol green	45.7	38.2-53.1	g/100 ml
	HUMAN	Bromocresol green	45.7	38.2-53.1	g/100 ml
Bilirubin total	instand	Van Jaassens' test	1.41	0.31-3.20	mg/100 ml
	HUMAN	Van Jaassens' test	1.41	0.31-3.20	mg/100 ml
Cholesterol total	instand	2,2-Dichlorovanillin	16.3	13.4-20.4	mmol/l
	HUMAN	DCA	16.3	13.4-20.4	mmol/l
	HUMAN	Jaffe-Kessels' test	11.3	8.92-13.7	mmol/l
	HUMAN	Jaffe-Kessels' test	0.95	0.52-0.80	mmol/l
	HUMAN	Du.ylene	16.9	13.4-20.4	mmol/l
	HUMAN	Jaffe-Kessels' test	0.95	0.52-0.80	mmol/l
	HUMAN	Jaffe-Kessels' test	2.22	1.75-2.89	mmol/l
	HUMAN	Jaffe-Kessels' test	3.13	3.10-3.18	mmol/l
	HUMAN	Jaffe-Kessels' test	0.29	0.18-0.50	mmol/l
	HUMAN	Jaffe-Kessels' test	2.68	2.14-3.22	mmol/l
CEA	instand	Enzymun-Test	4.21	3.45-9.97	nmol/l
	HUMAN	Enzymun-Test	4.21	3.45-9.97	nmol/l
Cholesterol	instand	Reference Method	163	134-192	mmol/l
	HUMAN	Reference Method	163	134-192	mmol/l
	HUMAN	CHOD-PAP	3.98	3.27-4.70	mmol/l
	HUMAN	CHOD-PAP	1.54	1.26-1.82	mmol/l
	HUMAN	CHOD-PAP	4.57	3.74-5.39	mmol/l
	HUMAN	CHOD-PAP	1.77	1.45-2.09	mmol/l
	HUMAN	CHOD-PAP	40.4	35.6-45.2	mmol/l
HDL-Cholesterol	instand	CHOD-PAP	0.94	0.74-1.14	mmol/l
	HUMAN	CHOD-PAP	0.94	0.74-1.14	mmol/l
	HUMAN	CHOD-PAP	36.4	28.7-44.0	mmol/l
LDL-Cholesterol	instand	CHOD-PAP	2.84	2.18-3.14	mmol/l
	HUMAN	CHOD-PAP	103	78.0-131	mmol/l
	HUMAN	CHOD-PAP	91.1	60.5-116	mmol/l
	HUMAN	CHOD-PAP	1.11	0.91-1.31	mmol/l
	HUMAN	CHOD-PAP	168	137-224	mmol/l
	HUMAN	CHOD-PAP	1.90	1.55-2.24	mmol/l
	HUMAN	CHOD-PAP	517	413-620	mmol/l
Fructosamine	instand	Reference Method	6.94	5.90-7.90	mmol/l
	HUMAN	Reference Method	125	106-144	mmol/l
Glucose	instand	Hexokinase / GOD-DH	7.16	6.08-8.23	mmol/l
	HUMAN	Hexokinase / GOD-DH	179	105-148	mmol/l
	HUMAN	GOD-PAP	6.84	5.84-7.84	mmol/l
	HUMAN	GOD-PAP	120	102-138	mmol/l
	HUMAN	GOD-PAP	1.28	0.97-1.61	mmol/l
	HUMAN	GOD-PAP	6.99	5.94-8.03	mmol/l
	HUMAN	GOD-PAP	1.26	1.07-1.45	mmol/l
	HUMAN	GOD-PAP	6.88	5.84-7.90	mmol/l
	HUMAN	GOD-PAP	1.24	1.05-1.43	mmol/l
	HUMAN	GOD-PAP	0.04	0.03-0.05	mmol/l
	HUMAN	GOD-PAP	0.34	0.29-0.42	mmol/l
	HUMAN	GOD-PAP	72.0	65.5-78.5	mmol/l
	HUMAN	GOD-PAP	7.20	6.55-7.85	mmol/l
	HUMAN	GOD-PAP	72.8	66.1-77.0	mmol/l
	HUMAN	GOD-PAP	56.0	50.9-61.0	mmol/l
	HUMAN	GOD-PAP	5.60	5.09-6.10	mmol/l
	HUMAN	GOD-PAP	308	251-361	mmol/l
	HUMAN	GOD-PAP	324	265-382	mmol/l
	HUMAN	GOD-PAP	344	282-406	mmol/l
	HUMAN	GOD-PAP	309	253-363	mmol/l
	HUMAN	GOD-PAP	177	137-239	mmol/l
	HUMAN	GOD-PAP	152	120-184	mmol/l
	HUMAN	GOD-PAP	1.71	1.37-2.05	mmol/l
	HUMAN	GOD-PAP	152	120-184	mmol/l
	HUMAN	GOD-PAP	1.99	1.49-2.29	mmol/l
	HUMAN	GOD-PAP	166	131-201	mmol/l

Routine Organic Constituents

Constituent	Test	Method of Analysis	Target Value	Maximum permitted range	Units
Urea	instand	Diacetylaceton	3.79	2.97-4.89	mmol/l
	HUMAN	Diacetylaceton	22.7	17.4-28.2	mmol/l
	HUMAN	Diacetylaceton	10.5	8.02-13.9	mmol/l
	HUMAN	Diacetylaceton	2.7	1.6-3.6	mmol/l
	HUMAN	Diacetylaceton	7.0	4.8-12.5	mmol/l
	HUMAN	Diacetylaceton	4.93	3.9-7.26	mmol/l
	HUMAN	Diacetylaceton	15.9	12.0-20.0	mmol/l
	HUMAN	Diacetylaceton	5.76	5.59-5.13	mmol/l
	HUMAN	Diacetylaceton	3.99	3.03-4.34	mmol/l
	HUMAN	Diacetylaceton	24.0	18.2-29.8	mmol/l
	HUMAN	Diacetylaceton	11.2	9.31-13.5	mmol/l
	HUMAN	Diacetylaceton	2.99	2.05-3.59	mmol/l
	HUMAN	Diacetylaceton	8.11	6.16-10.1	mmol/l
	HUMAN	Diacetylaceton	0.26	0.21-0.31	mmol/l
	HUMAN	Diacetylaceton	4.30	3.52-5.07	mmol/l
	HUMAN	Diacetylaceton	0.24	0.19-0.28	mmol/l
	HUMAN	Diacetylaceton	4.05	3.30-5.76	mmol/l
	HUMAN	Diacetylaceton	0.25	0.20-0.30	mmol/l
	HUMAN	Diacetylaceton	4.28	3.51-5.05	mmol/l
Protein Fractions	instand	Electrophoresis with Cellulose For Paper			
Albumin	instand	Electrophoresis with Cellulose For Paper	65.7	58.2-72.2	%
α ₁ -Globulin	instand	Electrophoresis with Cellulose For Paper	3.19	2.49-3.89	%
β ₁ -Globulin	instand	Electrophoresis with Cellulose For Paper	10.1	7.45-13.6	%
α ₂ -Globulin	instand	Electrophoresis with Cellulose For Paper	13.0	9.90-16.1	%
β ₂ -Globulin	instand	Electrophoresis with Cellulose For Paper	23.0	15.4-30.6	%
IgG	instand	RIA-Pharmacia IGA Binding RID	1070	878-1263	mg/100 ml
IgM	instand	RIA-Pharmacia IGA Binding RID	125	87.4-162	mg/100 ml
IgA	instand	RIA-Pharmacia IGA Binding RID	37.6	33.5-36.7	mg/100 ml
IgG	instand	RIA-Pharmacia IGA Binding RID	1199	883-1413	mg/100 ml
IgM	instand	RIA-Pharmacia IGA Binding RID	175	122-229	mg/100 ml
IgA	instand	RIA-Pharmacia IGA Binding RID	248	193-383	mg/100 ml
IgG	instand	RIA-Pharmacia IGA Binding RID	1208	950-1425	mg/100 ml
IgM	instand	RIA-Pharmacia IGA Binding RID	177	124-220	mg/100 ml
IgA	instand	RIA-Pharmacia IGA Binding RID	221	148-284	mg/100 ml
IgG	instand	RIA-Pharmacia IGA Binding RID	1010	825-1129	mg/100 ml
IgM	instand	RIA-Pharmacia IGA Binding RID	108	75-149	mg/100 ml
IgA	instand	RIA-Pharmacia IGA Binding RID	150	120-180	mg/100 ml
IgG	instand	RIA-Pharmacia IGA Binding RID	150	120-180	mg/100 ml
IgM	instand	RIA-Pharmacia IGA Binding RID	24.3	17.5-31.0	mg/100 ml
IgA	instand	RIA-Pharmacia IGA Binding RID	76.3	61.0-91.9	mg/100 ml
Haptoglobin	instand	RIA-Pharmacia IGA Binding RID	252	201-302	mg/100 ml
α ₂ -Macroglobulin	instand	RIA-Pharmacia IGA Binding RID	279	223-335	mg/100 ml
CG	instand	RIA-Pharmacia IGA Binding RID	103	82.4-124	mg/100 ml
Ca	instand	Rate Nephelometry	153	131-182	mg/100 ml
	HUMAN	Rate Nephelometry	48.9	37.5-58.3	mg/100 ml

Constituent	Test	Method of Analysis	Target Value	Maximum permitted range	Units
-------------	------	--------------------	--------------	-------------------------	-------

Electrolytes and Inorganic Constituents

Calcium	Instand	Reference Method	2.33	2.01-2.45	mmol/l
	HUMAN		8.34	8.06-8.82	mg/100 ml
	Boehr Mann	α-Cresolphthalen	2.25	2.02-2.48	mmol/l
	NOVA	ISE (indirect)	8.96	8.06-9.86	mg/100 ml
		ISE (indirect)	1.21	1.06-1.33	mmol/l
	NOVA	ISE (indirect)	2.28	2.05-2.51	mmol/l
	Kodak	titrimetric	9.13	8.25-10.0	mg/100 ml
	Etachem	Asensol III	2.32	2.09-2.55	mmol/l
	Instand	Reference Method	4.82	4.37-5.27	mmol/l
	Beckman	PTZ-Method	30.7	28.5-32.4	mg/100 ml
Chloride	HUMAN		91.3	78.5-104	mmol/l
			324	279-369	mg/100 ml
	Beckman	Coulometric titration	30.4	84.9-95.8	mmol/l
	NOVA	ISE (direct)	322	300-340	mg/100 ml
	Kodak	ISE (direct)	332	312-352	mg/100 ml
	Etachem	ISE (direct)	30.9	85.4-96.3	mmol/l
	Instand	Atomic Absorption	18.3-190-135	302-341	mg/100 ml
	iron	Ferrozine-Method	21.5	17.0-26.0	µmol/l
	HUMAN	LAB-Method	120	84.8-145	µg/100 ml
	Kodak	Phenylhydrazol B	112	88.5-142	µg/100 ml
Etachem	Phenylhydrazol	33.1	18.2-28.0	µg/100 ml	
TIBC Iron Binding Capacity	Magnesium carbonate absorption	170	102-156	µg/100 ml	
HUMAN	Aluminium oxide absorption	386	54.9-85.8	µmol/l	
			313-473	µg/100 ml	
Lithium	Reference Method	50.6	40.0-61.2	µmol/l	
NOVA	Reference Method	283	224 - 342	µg/100 ml	
	ISE (direct)	0.96	0.86-1.10	mmol/l	
Magnesium	Reference Method	1.00	0.91-1.15	mmol/l	
HUMAN	Xylyl blue Method	0.86	0.71-2.17	mmol/l	
NOVA	Reference Method	0.83	0.75-0.95	mmol/l	
Kodak	Formazan	2.07	1.82-2.32	mmol/l	
Etachem	Reference Method	1.61	1.52-1.93	mmol/l	
Instand	Phosphomolybdate	1.48	1.23-1.87	mmol/l	
HUMAN	Ammonium molybdate	4.50	3.83-5.18	mmol/l	
NOVA	Reference Method	1.61	1.36-1.85	mmol/l	
Kodak	Ammonium molybdate	4.98	4.25-5.73	mmol/l	
Etachem	Reference Method	1.47	1.25-1.70	mmol/l	
Instand	Flame	4.55	3.86-5.23	mmol/l	
Potassium	Flame	4.66	4.28-5.03	mmol/l	
HUMAN	Turbidimetric Method	4.55	4.19-4.91	mmol/l	
NOVA	Turbidimetric Method	4.33	3.92-4.81	mmol/l	
Beckman	ISE (direct)	4.38	3.99-4.82	mmol/l	
Kodak	ISE (indirect)	4.89	4.50-5.28	mmol/l	
Etachem	ISE (indirect)	4.60	4.23-5.0	mmol/l	
Instand	Reference Method	4.73	4.35-5.11	mmol/l	
HUMAN	Flame	128	120-136	mmol/l	
NOVA	Flame	130	122-138	mmol/l	
Beckman	Magnesium urinary excretion	149	134-164	mmol/l	
Kodak	ISE (direct)	136	127-144	mmol/l	
Etachem	ISE (indirect)	128	118-134	mmol/l	
Instand	ISE (indirect)	135	127-143	mmol/l	
HUMAN	Atomic absorption	6.27	5.01-7.52	µmol/l	
NOVA	5-Bromo-PAPS	41.0	32.8-49.2	µg/100 ml	
Beckman	Reference Method	6.38	5.26-7.50	µmol/l	
Kodak	Reference Method	43.0	34.4-51.6	µg/100 ml	

Constituent	Test	Method of Analysis	Target Value	Maximum permitted range	Units
-------------	------	--------------------	--------------	-------------------------	-------

Enzymes

Acid Phosphatase total	Instand	α-Naphthyl-phosphatase Fast red	7.48	4.89-9.91	U/l
	HUMAN		4.28	2.85-5.66	U/l
	NOVA	α-Naphthyl-phosphatase Fast red	6.28	4.21-8.35	U/l
		α-NAP/Fast Red with larval	4.28	2.87-5.69	U/l
	NOVA	α-NAP/Fast Red with larval	6.15	4.12-8.17	U/l
	Kodak	α-NAP/Fast Red with larval	3.81	2.42-4.80	U/l
	Etachem	α-NAP/Fast Red with larval	4.67	3.13-6.21	U/l
	Instand	DGKC opt. stand. method	2.58	1.79-3.56	U/l
	HUMAN		25.0	18.3-27.9	U/l
	Alkaline Phosphatase (ALP, GPT)	HUMAN	DGKC opt. stand. method	40.4	31.9-49.9
		stand. method	30.6	24.1-37.0	U/l
NOVA		IFCC mod. without pyridoxal phosphate	24.6	19.4-29.8	U/l
Kodak		IFCC mod. without pyridoxal phosphate	38.3	30.2-46.3	U/l
Etachem		IFCC	18.9	15.7-24.1	U/l
Instand		IFCC	54.3	43.0-65.7	U/l
HUMAN		2-Color-EPF	118	86.4-142	U/l
NOVA		2-Color-EPF	37.7	25.4	20.3-30.5
HUMAN		α-naphthyl-methylphosphatase (NMP)	162	129-194	U/l
NOVA		α-naphthyl-methylphosphatase (NMP)	82.4	65.9-98.9	U/l
Beckman	hexokinase	34.0	27.1-41.9	U/l	
Kodak	hexokinase	126	101-151	U/l	
Etachem	Coloured	37.7	49.5	39.9-59.4	
Instand	Aspartate transferase (ASAT, GOT)	DGKC opt. stand. method	17.1	13.3-20.7	U/l
Cholinesterase CHE	HUMAN	DGKC opt. stand. method	34.7	14.7-49.0	U/l
	NOVA	IFCC mod. without pyridoxal phosphate	22.9	17.1-27.3	U/l
	Kodak	IFCC mod. without pyridoxal phosphate	16.9	13.3-20.4	U/l
	Etachem	IFCC	33.5	28.4-40.5	U/l
	Instand	IFCC	18.0	12.9-19.4	U/l
	HUMAN	Cholinesterase	48.8	36.9-56.6	U/l
	NOVA	Cholinesterase	47.23	37.40	37.48
	Beckman	Cholinesterase	5008	3955	3955
	Etachem	Cholinesterase	2799	2210	2210
	Instand	Cholinesterase	5972	4718	4718
Creatine kinase CK	HUMAN	DGKC opt. stand. method	86.3	63.7-107	U/l
	NOVA	NAc-activated	219	169-230	U/l
	Beckman	stand. method	140	107-174	U/l
	Etachem	stand. method	85.2	64.7-106	U/l
	Instand	Greenish	226	178-273	U/l
	HUMAN	Immuno-chem. test	3.95	4.32-7.38	U/l
	NOVA	Immuno-chem. test	13.1	9.95-16.2	U/l
	Beckman	Immuno-chem. test	6.51	8.46-10.5	U/l
	Etachem	Immuno-chem. test	5.42	4.12-6.72	U/l
	Instand	Immuno-chem. test	18.4	14.3-23.8	U/l
γ-Glutamyl transferase γ-GT	HUMAN	γ-Glutamyl-carboxy-4-nitroanilide	32.9	25.9-39.6	U/l
	NOVA	γ-Glutamyl-carboxy-4-nitroanilide	28.1	16.9-31.6	U/l
	Beckman	γ-Glutamyl-carboxy-4-nitroanilide	21.0	14.5-22.3	U/l
	Etachem	γ-Glutamyl-carboxy-4-nitroanilide	18.0	13.6-21.1	U/l
	Instand	γ-Glutamyl-carboxy-4-nitroanilide	45.8	36.2-55	U/l
	HUMAN	γ-Glutamyl-nitroanilide	45.8	36.2-55	U/l
	NOVA	γ-Glutamyl-nitroanilide	45.8	36.2-55	U/l
	Beckman	γ-Glutamyl-nitroanilide	45.8	36.2-55	U/l
	Etachem	γ-Glutamyl-nitroanilide	45.8	36.2-55	U/l
	Instand	γ-Glutamyl-nitroanilide	45.8	36.2-55	U/l

Constituent	Test	Method of Analysis	Target Value	Maximum permitted range	Units
-------------	------	--------------------	--------------	-------------------------	-------

Enzymes

Glutamate dehydrogenase GDH	Instand	DGKC opt. stand. method	3.03	2.18-3.86	U/l
	HUMAN				
	NOVA	α-Hydroxybutyrate dehydrog.	140	110-170	U/l
	Beckman	α-HBDH	22.1	17.6-28.5	U/l
	Etachem	Lactate dehydrogenase	218	172-283	U/l
	Instand	DGKC opt. stand. method	363	302-483	U/l
	HUMAN		165	114-234	U/l
	NOVA	SCF method	44.9	35.0-52.6	U/l
	Beckman	SCF method	322	254-390	U/l
	Etachem	Pyruvate-Lactate	191	151-231	U/l
Lipase	Instand	Turbidimetric	137	106-164	U/l
	HUMAN				
	NOVA	Turbidimetric	120	96.0-144	U/l
	Beckman	Turbidimetric	51.4	41.3-61.7	U/l
	Etachem	Enzymatic	28.9	23.2-35.3	U/l
	Instand	Enzymatic	417	339-500	U/l
	HUMAN	Enzymatic			
	NOVA	Enzymatic			
	Beckman	Enzymatic			
	Etachem	Enzymatic			

DGKC: German Society of Clinical Chemistry
 IFCC: International Federation of Clinical Chemistry
 SCE: Scandinavian Committee on Enzymes

Hormones, Drugs

AFP	Boehringer Mannheim	Enzymun Test	2.50	2.0-3.0	ng/ml
	Boehringer Mannheim	Enzymun Test	250	200 - 300	ng/100 ml
	Boehringer Mannheim	Enzymun Test	0.17	0.11-0.23	µmol/l
	Boehringer Mannheim	Enzymun Test	8.25	4.17-8.29	ng/ml
	Boehringer Mannheim	Enzymun Test	2.04	1.55-2.53	ng/ml
	Boehringer Mannheim	Digoxin	204	155 - 253	ng/100 ml
	Boehringer Mannheim	FSH	1.95	1.46 - 2.42	ng/ml
	Boehringer Mannheim	Enzymun Test	6.82	3.45-9.20	µU/ml
	Boehringer Mannheim	Enzymun Test	20.4	16.3-24.5	µU/ml
	Boehringer Mannheim	Enzymun Test	4.98	3.98-5.97	µU/ml
Progesteron	Boehringer Mannheim	Enzymun Test	5.93	4.73-7.12	ng/ml
	Boehringer Mannheim	Enzymun Test	4.65	3.53-5.77	ng/ml
	Boehringer Mannheim	Enzymun Test	593	475 - 712	ng/100 ml
	Boehringer Mannheim	Enzymun Test	463	353 - 577	ng/100 ml
	Boehringer Mannheim	Enzymun Test	0.63	0.43-0.89	pmol/l
	Boehringer Mannheim	Enzymun Test	7.31	5.65-9.6	ng/100 ml
	Boehringer Mannheim	Enzymun Test	5.63	4.28-6.98	µg/100 ml
	Boehringer Mannheim	Enzymun Test	0.99	0.75-1.23	ng/100 ml
	Boehringer Mannheim	Enzymun Test	12.7	9.85-15.7	pmol/l
	Boehringer Mannheim	Enzymun Test	1.29	0.98-1.90	ng/100 ml
TSH	Boehringer Mannheim	Enzymun Test	12.8	9.4-15.7	µU/ml
	Boehringer Mannheim	Enzymun Test	2.26	1.90-2.71	µU/ml
	Boehringer Mannheim	Enzymun Test			
	Boehringer Mannheim	Enzymun Test			
	Boehringer Mannheim	Enzymun Test			
	Boehringer Mannheim	Enzymun Test			
	Boehringer Mannheim	Enzymun Test			
	Boehringer Mannheim	Enzymun Test			
	Boehringer Mannheim	Enzymun Test			
	Boehringer Mannheim	Enzymun Test			

ANEXO III

Concentração medida de alguns metais presentes no soro sanguíneo dos indivíduos considerados no estudo de caso, em ug/L.

	a1	b1	a2	b2	a3	a4	b4	c4	a5	b5	c5	a7	b7
Mg24(LR)	15380,93	15258,33	16660,81	16914,85	16360,39	18814,47	18955,99	19279	17457,28	17975,84	17177,8	17580,96	19364,98
Ca44(LR)	50396,54	52754,41	53159,13	54291,51	55903,72	54269,62	55019,71	55546,56	53379,1	55075,4	52782,89	52235,88	57740,25
V51(LR)	287,87	304,16	288,68	279,07	287,41	270,03	245,87	246,27	242,3	236,12	212,62	182,73	195,14
Cu63(LR)	925,3	936,38	1148,48	1156,1	1411,25	1358,25	1374,4	1381,76	1432,66	1482,28	1419,11	938,15	1036,83
Zn66(LR)	1275,62	1824,6	1457,63	1591,12	1502,63	1567,67	1587,21	1862,6	1592,14	1203,12	1433,73	979,88	1229,21
Zn67(LR)	1196,59	1688,52	1361,81	1460,44	1376,19	1437	1472,14	1701,57	1445,91	1107,1	1319,65	878,67	1104,8
As75(LR)	242,95	248,64	240,34	238,91	254,33	239,25	227,23	232,29	232,58	238,82	221,87	194,26	208,04
Se77(LR)	1775,95	1818,01	1746,09	1729,05	1749,02	1740,31	1625,6	1678,97	1695,29	1720,81	1661,59	1497,42	1604,7
Rb85(LR)	364,42	350,35	350,26	355,36	316,11	324,03	323,63	326,05	411,65	422,55	402,35	283,86	309,73
Fe56(MR)	1021,3	981,2	2465,51	3846,15	2049,11	2065,59	2296,54	2072,8	754,87	699,12	767,66	778,94	994,84
Cu63(MR)	879,28	887,9	1112,12	1111,32	1381,41	1305,23	1328,31	1351,78	1379,1	1445,16	1361,94	874,49	999,46
Zn66(MR)	1255,33	1731,68	1439,78	1598,46	1457,27	1531,04	1543,75	1833,73	1581,13	1225,81	1409,18	968,63	1224,59
Zn67(MR)	523,67	1719,14	1370,06	1433	1316,76	1337,9	1450,26	1710,01	1512,33	1071,45	1336,04	909,2	1147,46
	a8	b8	c8	a10	a11	b11	c11	a12	b12	c12	a13	b13	c13
Mg24(LR)	18164,63	18994,07	19618,83	20410,01	19269,87	20089,6	18997,72	17664,27	17560,1	17559,6	16274,01	16987,32	16343,96
Ca44(LR)	53302,17	55246,18	57068,62	72869,03	66258,27	69802,93	65216,63	64123,2	62863,43	63774,77	65556,06	68017,05	65838,35
V51(LR)	181,7	186,14	188,38	258,67	240,32	266,31	248,79	269,19	264,15	266,78	275,3	280,21	274,56
Cu63(LR)	953,86	989,73	1038,74	1148,48	970,74	1035,22	967,67	932,77	899,59	923,42	1337,44	1373,61	1309,4
Zn66(LR)	1580,82	1523,76	1639,61	1900,22	1173,71	1758,82	1140,88	1616,8	1151,5	1486,45	1305,33	1836,14	1127,04
Zn67(LR)	1436,84	1404,14	1492,05	1704,77	1055,82	1590,64	1043,5	1478,99	1055,34	1372,02	1186,28	1664,28	1029,22
As75(LR)	194,55	199,5	202,06	227,22	205,76	224,59	206,47	219,63	221,8	221,67	219,14	225,23	222,23
Se77(LR)	1439,13	1495,09	1513,56	1779,83	1547,5	1694,42	1546,53	1623,77	1649,64	1633,51	1695,22	1726,35	1671,09
Rb85(LR)	323,24	329,99	349,26	391,85	334,82	350,13	330,86	295,47	289,42	292,16	483,25	497,91	480,9
Fe56(MR)	810,8	783,35	806,24	1910,5	2481,99	2589,52	2732,64	2823,56	2420,86	2215,08	1900,17	1967,15	1820,66
Cu63(MR)	897,75	946,81	951,89	1094,09	914,42	953,43	918,41	862,85	850,09	828,19	1256,74	1276,07	1246,18
Zn66(MR)	1566,1	1495,92	1645,85	1895,01	1154,92	1663,01	1197,79	1738,38	1210,58	1720,02	1328,31	1825,95	1112,95
Zn67(MR)	1473,96	1437,68	1550,1	1870,03	1132,1	1560,09	1117,72	1485,51	1112,48	1734,55	1262,32	1655,29	980,87

Concentração medida de alguns metais presentes no soro sanguíneo dos indivíduos considerados no estudo de caso, em ug/L.

	a14	a15	b15	c15	b16	a17	b17	c17	a9	b9	c9	a18	b18
Mg24(LR)	21276,81	20401,07	19045,18	20428,44	20073,84	19341,06	20018	19564,97	18450,95	19186,45	19473,21	21120,4	21592,03
Ca44(LR)	95294,66	84911,46	77006,53	82468,9	78349,95	69448,22	70035,88	69596,82	65834,13	68899,95	70134,67	68114,43	68290,9
V51(LR)	300,78	288,08	271,38	288,15	267,55	264,26	275,15	269,16	196,49	209,21	221,97	242,82	253,94
Cu63(LR)	1411,5	997,81	1077,04	1017,05	1183,62	1073,8	1065,17	1064,52	1223,38	1282,01	1315	1014,81	1068,64
Zn66(LR)	25105,95	16135,9	14999,75	11213,85	19732,38	3874,09	3282,48	3771,37	925,4	1087,75	2025,72	3043,61	3039,4
Zn67(LR)	22578,59	14620,93	13534,81	10191,15	18012,35	3517,34	2979,08	3417,91	856,69	987,92	1829,21	2717,33	2710,5
As75(LR)	230,07	223,53	214,63	230,03	212,84	208,71	216,06	215,35	183,74	195,28	201,11	197,75	204,65
Se77(LR)	1750,73	1707,75	1603,12	1767,24	1612,99	1601,11	1693,84	1612,47	1443,42	1527,62	1562,46	1509,43	1561,49
Rb85(LR)	431,8	461,97	433,1	463,92	423,22	430,27	442,85	438,43	360,14	369,95	376,92	336,31	351,72
Fe56(MR)	2636,42	2564,94	2194,17	1960,54	1948,65	2388,84	2372,44	3109,22	1394,46	1400,35	1441,97	1834,65	1679,79
Cu63(MR)	1360,08	951,24	1021,61	940,78	1124,85	993,47	971,21	981,73	1166,6	1230,68	1269,99	894,3	915,51
Zn66(MR)	26838,45	17232,2	14598,55	10308,03	19240,94	3939,28	3408	3803,98	1026,39	1242,47	2091,46	3284,49	3239,47
Zn67(MR)	25670,86	16834,91	13944,85	10291,66	18217,17	3638,74	3015,47	3705,25	920,08	1169,94	2016,12	3109,77	3093,44

	c18	a19	b19	c19	a21	b21	c21	a23	b23	c23	a25	b25	c25
Mg24(LR)	20899,6	19346,75	19925,4	21018,75	20539,94	20178,61	19623,09	21114,7	20275,44	21029,51	20095,79	20412,99	20696,23
Ca44(LR)	67442,89	64741,54	67427,41	70833,23	72759,43	71564,43	71056,7	71957,34	69149,6	70655,07	73536,55	74476,02	76068,74
V51(LR)	246,45	247,88	259,98	265,61	274,42	253,79	249,76	252,66	235,6	239,95	259,9	260,84	262,03
Cu63(LR)	1088,61	734,76	727,8	735,85	3575,22	938,78	924,69	1061,58	1010,84	1008,53	998,94	1003,85	1055,79
Zn66(LR)	3625,22	2825,51	2319,53	1965,6	2273,15	1803,03	3289,7	1440	1366,62	1238,51	1530,49	1336,1	1728,56
Zn67(LR)	3248,45	2602,42	2112,65	1792,31	1983,87	1641,48	3003,26	1294,24	1225,22	1111,43	1401,26	1207,75	1549,98
As75(LR)	201,09	200,64	210,81	224,1	227,05	214,75	212,22	215,2	200,57	207,95	228,63	228,42	227,01
Se77(LR)	1536,56	1566,48	1668,48	1702,73	1722,82	1625,25	1591,68	1614,62	1535,09	1601,18	1747,96	1762,87	1759,38
Rb85(LR)	342,15	309,36	320,58	329,72	470,53	471,08	454,91	387,75	363,15	375,44	292,39	296,01	307,54
Fe56(MR)	1716,08	2983,46	2656,81	2684,14	1265,03	1293,97	1536,74	845,24	1182,82	621,39	1483,42	1367,31	1453,3
Cu63(MR)	946,44	652,1	617,44	617,31	3265,92	836,2	817,89	923,14	895,07	922,26	909,74	932,02	940,67
Zn66(MR)	3909,55	3085,97	2505,79	2130,9	2310,11	1792,95	3448,47	1376,97	1355,85	1228,69	1509,23	1299,29	1720,63
Zn67(MR)	3909,16	3075,62	2452,53	2042,88	2408,13	1683,79	3443,86	1424,78	1247,61	1152,25	1496,45	1301,65	1605,71

Concentração medida de alguns metais presentes no soro sanguíneo dos indivíduos considerados no estudo de caso, em ug/L.

	a26	b26	a29	b29	c29
Mg24(LR)	20549,86	20956,27	17453,79	18170,02	18824,04
Ca44(LR)	72854,03	73423,4	63695,96	65021,02	69037,58
V51(LR)	238,51	239,15	205,69	215,08	215,15
Cu63(LR)	1018,18	1026,7	974,42	1026,02	1022,56
Zn66(LR)	1757,59	1653,44	1479,53	1598,56	1559,74
Zn67(LR)	1560,17	1515,15	1366,72	1427,73	1436,29
As75(LR)	213,21	213,24	182,7	185,53	196,58
Se77(LR)	1632,31	1633,63	1452,84	1424,68	1468,15
Rb85(LR)	320,64	327,7	275,78	281,42	293,02
Fe56(MR)	966,72	976,45	729,57	626,64	714,3
Cu63(MR)	879,14	925,76	921,36	953,4	934,98
Zn66(MR)	1851,16	1682,98	1540,56	1508,96	1601,32
Zn67(MR)	1797,75	1590,89	1470,35	1530,44	1548,3