



**FACULDADE DE
CIÊNCIAS E TECNOLOGIA
UNIVERSIDADE NOVA DE LISBOA**

Departamento de Física

Análise da concentração de chumbo em sangue de ratos Wistar sujeitos a uma exposição continuada

Ana Inês Brandão Paninho

“Dissertação apresentada na faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade Nova de Lisboa para obtenção do grau de Mestre em Engenharia Biomédica”

Orientador: Professor Doutor José Paulo Santos

Lisboa

2010

Agradecimentos

Em primeiro lugar quero agradecer ao meu orientador, o Professor Doutor José Paulo Santos, sem o qual este projecto não seria possível. Obrigada pelos conhecimentos transmitidos, pela dedicação, pelo apoio prestado e pelo rigor e disciplina mostrados.

Ao Professor Doutor José Luís Capelo, pela disponibilidade e conhecimentos transmitidos.

Ao Instituto de Medicina Molecular – Instituto de Fisiologia da Faculdade de Medicina de Lisboa e respectivos investigadores, pela disponibilização das amostras biológicas.

O meu agradecimento à Faculdade de Ciências e Tecnologia – Universidade Nova de Lisboa pelas condições de trabalho que me ofereceram durante o decorrer do curso. Quero agradecer também ao Departamento de Física e ao Departamento de Química pela disponibilização dos laboratórios e material necessário, e ao Centro de Física Atómica pelo material disponibilizado.

Aos meus amigos, colegas de Biomédica e Professores. Um obrigado muito grande, em especial para os colegas do Departamento de Física, do gabinete 120, pelo bom ambiente de trabalho e alegria constante. Quero também agradecer aos colegas do departamento de química (laboratório 211 e 308), pelo acompanhamento, e esclarecimento na parte prática do meu trabalho.

Não posso deixar de agradecer à Diana pela motivação e apoio ao longo do desenvolvimento deste trabalho.

Sofia, Cláudia, Neuza e Mafalda a união faz a força e vocês foram realmente importantes para eu conseguir chegar até aqui, obrigada por tudo, meninas.

Não podia faltar um agradecimento á família como é óbvio, mamã, papá e avós obrigada do fundo do coração, sem vocês é que não podia mesmo conseguir chegar onde cheguei, obrigado por estes anos de sacrifício onde me acompanharam sempre e me motivaram, fazendo-me seguir em frente. Obrigada também ao meu tio Felisberto que sempre me acompanhou, principalmente, nas alturas mais difíceis.

E por fim, mas não menos importante, obrigada a ti, David por estares sempre aí quando eu mais preciso, pelo teu apoio, paciência, ajuda, carinho, amor e tudo mais.

OBRIGADA POR TUDO!

Resumo

O chumbo é um dos elementos traço com maior impacto e maior risco para a saúde pública, sendo, provavelmente, o analito mais estudado em amostras biológicas.

As técnicas mais utilizadas na análise da concentração de chumbo no sangue são: espectrometria de massa com plasma indutivamente acoplado (ICP-MS), espectrometria de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado (ICP-OES), espectrometria de absorção atómica com chama (FAAS), com geração de hidretos (HGAAS) e electrotérmica (ETAAS).

Neste trabalho, foi escolhida a técnica de análise ETAAS pelas vantagens que apresenta em relação às outras técnicas. Relativamente ao tratamento das amostras, foi efectuada a digestão ácida assistida por microondas e a extracção assistida por ultra-sons.

Este trabalho integra um estudo geral da toxicocinética do chumbo num conjunto de ratos Wistar, sendo um dos principais objectivos deste trabalho desenvolver uma ferramenta de detecção de chumbo “in vivo” de fácil uso médico e não invasiva.

Foram estudados dois conjuntos de ratos Wistar: um conjunto alimentado com uma dieta rica em chumbo desde o período fetal e um outro conjunto de controlo alimentado com uma dieta normal. O regime de exposição ao chumbo foi baseado num procedimento validado por Bielaczyk et al. [1].

As amostras de sangue dos ratos de controlo, não apresentaram quantidades significativas de chumbo. Em relação as amostras de sangue de ratos contaminados com chumbo, mediu-se quantidades significativas de chumbo, as quais diminuem com a idade dos ratos.

Abstract

Lead is among the trace elements with biggest impact and risk to public health, being probably the most studied analyte in biological samples.

Most of the techniques used to analyse the concentration of lead blood include inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS), inductively coupled plasma optical emission spectrometry (ICP-OES), flame atomic absorption spectrometry (FAAS), hydride generation atomic absorption spectrometry (HGAAS) and electrothermal atomic absorption spectrometry (ETAAS)

It was chosen the ETAAS due to its advantages over the other techniques. In what concerns the samples treatment, it was used the microwave-assisted digestion and the ultrasound-assisted extraction.

This work is part of an overall study of the toxicokinetics of lead in a set of rats, which aims to develop a tool for detecting lead “in vivo” non-invasively.

We studied two groups of Wistar rats: one group fed with a diet rich in lead from the fetal period, and another group, in this case control, fed with a normal diet. The system of lead exposure was based on a previous study by Bielaczyk et al. [1].

Control rats blood samples showed no significant amounts of lead. Related to the lead infected rats blood samples, significant quantities of lead were measured, where is possible observe a lead decreasing with the age of the rats.

“Quem fica no vale jamais atingirá o topo da colina.”

Thomas Fuller

Aos meus pais,

Lina e Luís

Símbolos & Notações

AAS – Espectrometria de Absorção Atómica

ALA-D – ácido delta-aminolevulínico desidratase

BLD – Bellow Detection Limit

c.d.o. – comprimento de onda

EDL – *Electrodeless Discharge Lamps*

EMD – *Even Microwave Distribution*

ETAAS – Espectrometria de Absorção Atómica Electrotérmica

FASS – Espectrometria de Absorção Atómica por Chama

FP – *Full Power*

GFAAS – Espectrometria de Absorção Atómica em Forno de Grafite

HCL – *Hollow Cathode Lamps*

HGAAS - Espectrometria de Absorção Atómica com Geração de Hidretos

ICP-MS – Espectrometria de Massa com Plasma Indutivamente Acoplado

ICP-OES – Espectrometria de Emissão Óptica com Plasma Indutivamente Acoplado

IPQ – Instituto Português da Qualidade

IRMM – *Institute for Reference Materials and Measurements*

IUPAC – *International Union of Pure and Applied Chemistry*

wLOD – Limite de detecção

LOQ – Limite de quantificação

m/V – massa por volume

MAD – Digestão Assistida por Microondas

MRC – Materiais de Referência Certificados

p/V – peso por volume

PbS – Concentração de Chumbo no Sangue

ppb – partes por bilião

ppm – partes por milhão

R² – quadrado do coeficiente de correlação

STPF – *Stabilized Temperature Platform Furnace*

THA – Atomizador Aquecido Transversalmente

UAE – Extração assistida por Ultra-Sons

V/V – volume por volume

Índice de matérias

1- Elementos traço: Chumbo	12
❖ Elementos traço essenciais e tóxicos	12
❖ História e propriedades do Chumbo	12
❖ Chumbo no ambiente.....	13
❖ Contaminação por chumbo	14
❖ Distribuição do chumbo no organismo.....	15
❖ Análise da dose absorvida de chumbo: importância das análises ao sangue	16
❖ Limites da concentração do chumbo	17
❖ Efeitos do chumbo na saúde.....	17
❖ Experimentação animal.....	21
❖ Estudo Realizado	20
2- Métodos de Espectrometria Atômica.....	22
❖ Espectrometria com plasma indutivamente acoplado (ICP)	22
ICP-MS.....	22
ICP-OES.....	22
❖ Espectrometria de absorção atômica (ASS).....	23
FAAS.....	23
HGAAS.....	23
ETAAS.....	24
3- ETAAS.....	26
❖ História.....	26
❖ Princípios físicos.....	27
❖ Conceito STPF.....	28
❖ Modificadores	28
❖ Programa térmico	29
Secagem.....	29
Pirólise	29
Atomização	29
Limpeza	29
❖ Melhorias no espectrómetro	30
❖ Pré-tratamentos das amostras	30
Suspensão (“Slurry”).....	31
Lixiviação.....	31
Incineração	31

Digestão ácida.....	31
Ultra-sons	32
▪ Banho convencional de ultra-sons.....	33
▪ Sonoreactor	33
▪ Sonda de ultra-sons.....	33
▪ Comparação entre os vários dispositivos de ultra-sons	34
4- Métodos Experimentais	36
❖ Procedimento A	36
❖ Procedimento B	37
❖ Procedimento C.....	38
5- Validação e Controlo Analítico	41
❖ Limite de detecção	41
❖ Limite de quantificação	41
❖ Precisão	41
❖ Exactidão	41
❖ Ensaio em branco.....	42
❖ Ensaio em triplicado	42
❖ Materiais de referência certificados.....	42
6- Materiais e Métodos	44
❖ Introdução.....	44
❖ Equipamento e acessórios.....	44
Software WinAAS	44
Programa de temperatura do forno de grafite.....	45
Lâmpada de cátodo oco	45
Amostrador automático MPE 60.....	46
❖ Reagentes	46
❖ Soluções de Calibração.....	46
❖ Preparação das amostras.....	46
Recolha das amostras	47
Digestão Ácida assistida por Microondas (MAD).....	48
Extracção assistida por ultra-sons (UAE)	48
7- Resultados e Discussão	51
❖ Estudos realizados.....	51
Recta de Calibração	51
Limite de Detecção e de Quantificação.....	52
Exactidão	52

Repetibilidade.....	52
❖ Tratamento de Resultados	53
Digestão Ácida assistida por Microondas (MAD).....	53
Extracção assistida por ultra-sons (UAE)	53
❖ Resultados Finais	54
❖ Análise de Resultados.....	56
8- Conclusões e Perspectivas Futuras	58
9- Referências Bibliográficas.....	59
10 - Apêndices.....	63
❖ Apêndice 1: Software WinAAS.....	63
❖ Apêndice 2: Resumo do poster Física 2010	67
11 - Anexo	68

Índice de Figuras

Figura 1: Rotas de exposição humana ao chumbo	14
Figura 2: Efeitos do chumbo inorgânico em crianças e adultos	18
Figura 3: Limites de detecção para as principais técnicas de espectrometria atómica	24
Figura 4: Relação entre a concentração e a absorvância	27
Figura 5: Esquema de uma lâmpada de cátodo oco (HCL)	28
Figura 6: Comparação entre os dispositivos de ultra-sons	34
Figura 7: Esquema do aparelho de ETAAS	44
Figura 8: Programa do forno de grafite usado neste trabalho.....	45
Figura 9: Amostrador automático MPE 60	46
Figura 10: Sonda UP 200S da <i>Hielscher</i> , usada neste estudo	48
Figura 11: Resultados das três medições obtidas MAD (esquerda) e UAE (direita) da PbS da amostra G7+G8 Pb (2 meses).	54
Figura 12: Resultados das três medições obtidas MAD (esquerda) e UAE (direita) da PbS da amostra J1 Pb (3 meses).	54
Figura 13: Resultados das três medições obtidas MAD (direita) e UAE (esquerda) da PbS da amostra I1 Pb (6 meses).	55
Figura 14: Evolução da concentração de chumbo no sangue ao longo do tempo.....	57
Figura 15: Selecção do tubo de grafite no software WinAAS.....	63
Figura 16: Selecção da lâmpada de chumbo no software WinAAS.	63
Figura 17: Área de trabalho do software usado.....	64
Figura 18: Representação dos parâmetros HCL e EHT.....	64
Figura 19: Revisão dos erros do software na secção do <i>furnance program</i>	65
Figura 20: Revisão dos erros do software na secção do <i>autosampler</i>	65
Figura 21: Selecção das amostras que se pretende determinar a PbS.....	66

Índice de Tabelas

Tabela 1: Propriedades físico-químicas do chumbo	12
Tabela 2: Requisitos instrumentais e operacionais necessários às condições STPF	28
Tabela 3: Algumas características da técnica ETAAS na determinação de amostras biológicas ..	32
Tabela 4: Parâmetros instrumentais para a determinação de Pb por ETAAS	36
Tabela 5: Programas de temperatura usados para a determinação de chumbo por ETAAS .	36
Tabela 6: Comparação de alguns métodos usados em ETAAS	37
Tabela 7: Programa de temperatura para a determinação de chumbo por ETAAS	38
Tabela 8: Programa do forno para a determinação do chumbo no sangue total por GFAAS .	38
Tabela 9: Programa de temperatura para o chumbo no sangue total e na urina	39
Tabela 10: Resumo dos vários procedimentos para a determinação de chumbo no sangue.....	40
Tabela 11: Características do padrão de sangue com chumbo do <i>IRMM</i> usado neste trabalho. ...	43
Tabela 12: Programa do forno de grafite usado para determinar a PbS, por ETAAS.....	45
Tabela 13: Parâmetros instrumentais usados nas medições com a técnica ETAAS.	45
Tabela 14: Caracterização dos Ratos <i>Wistar</i> recolhidos.....	47
Tabela 15: Resultados obtidos com UAE usando o ácido acético.	49
Tabela 16: Valores da concentração e absorvância da recta de calibração nº 5.	51
Tabela 17: Rectas de calibração usadas neste trabalho.....	51
Tabela 18: Limites de Detecção e Quantificação obtidos neste estudo	52
Tabela 19: Estudo da Exactidão.....	52
Tabela 20: Estudo da Repetibilidade.....	52
Tabela 21: Comparação entre preparação das amostras por MAD e por UAE.....	55
Tabela 22: Valores da PbS nas várias amostras de sangue analisado.....	56

1- Elementos traço: Chumbo

❖ Elementos traço essenciais e tóxicos

Um elemento traço é, segundo a União Internacional de Química Pura e Aplicada (IUPAC), qualquer elemento com uma concentração média inferior a 100 partes por milhão (ppm) ou inferior a 100 mg/g [2]. Apesar da sua baixa concentração, alguns elementos traço são considerados essenciais do ponto de vista biológico. No entanto, estes elementos, quando se encontram no ambiente em concentrações elevadas podem causar impactos negativos nos ecossistemas e, conseqüentemente, na saúde pública. Entre os elementos considerados importantes para o homem destacam-se o ferro, níquel, selénio e o zinco. Elementos como o arsénio, cádmio, mercúrio e o chumbo estão entre os elementos traço tóxicos, os quais não se conhece qualquer função biológica, pelo que são motivo de maior preocupação [3].

❖ História e propriedades do Chumbo

O elevado impacto que os elementos traço têm nos recursos naturais e na qualidade do ambiente justifica o grande interesse no seu acompanhamento. Destaca-se a poluição ambiental por metais pesados, a qual tem aumentado nas últimas décadas. O chumbo está entre os elementos traço com maior impacto e maior risco para a saúde pública, sendo por essa razão, provavelmente o analito mais estudado em amostras biológicas.

O chumbo (do latim *plumbum*), de símbolo Pb, é um metal com um tom cinza-azulado, têm uma temperatura de fusão de 327,5°C e uma temperatura de ebulição de 1740°C.

Este metal é suficientemente mole para se conseguir cortar com uma faca, mas impurezas como o antimónio, arsénio, cobre ou zinco tornam o chumbo muito duro [4]. Na Tabela 1 estão apresentadas algumas características físico-químicas deste elemento.

Número Atómico	82
Massa Atómica	207,2 u
Principal estado de oxidação	+2 (+4)
Densidade [g/cm ³]	11,35 (a 20°C)
Raio Atómico [pm]	181
Propriedades de óxido	Anfotérico
Estado (a 300 Kelvin, 1 atmosfera)	Sólido
Grupo da tabela periódica	14

Tabela 1: Propriedades físico-químicas do chumbo [5].

O chumbo é um metal que ocorre naturalmente na crosta terrestre, mas normalmente encontra-se combinado outros elementos, formando compostos de chumbo [6].

Pelo facto de ser um metal cujas propriedades são maleabilidade, ductilidade, resistência a corrosão, baixo ponto de fusão e opacidade aos raios X e gama, é um metal com um amplo uso industrial. Tem diversas aplicações, entre as quais produções de tintas (pigmentos), plásticos (estabilizantes), vidros (produção de cristais), cerâmicas, e fabrico de armas de fogo e de munições [6]. A nível industrial é usado em soldas, fusíveis, material anti-fricção, revestimentos de cabos eléctricos, fabrico de baterias, indústria química, entre outros.

Desde há muito tempo o chumbo tem sido utilizado como bloqueador da radiação, principalmente como manta protectora para os aparelhos de Raios-X. Contudo, há uma

tendência para diminuir o uso de chumbo nessas e outras aplicações devido aos riscos toxicológicos associados a este elemento [7].

No antigo Egito (5000-7000 a.C.), o chumbo foi usado na fabricação de armas, adornos e utensílios, como vidros de cerâmica. O Império Romano usou extensivamente o chumbo em tubagens de água e canalizações, algumas das quais ainda são usadas nos dias de hoje. Os antigos romanos também usavam o chumbo no fabrico de utensílios de cozinha. Estudos sugerem que a civilização romana desagregou-se em grande parte como resultado de envenenamento por chumbo generalizado. Esta teoria é suportada por dados que relevam elevadas concentrações de chumbo nos ossos dos antigos romanos. Na idade média, a prática de adoçar o vinho com chumbo ou acetato de chumbo, tornou-se um grave problema a nível toxicológico [8].

A história do envenenamento por chumbo é conhecida há mais de 2500 anos. Os primeiros indícios da toxicidade do chumbo foram encontrados em papiros Egípcios, nos quais o chumbo era utilizado para fins homicidas. Apesar do envenenamento por chumbo ser conhecido na Antiguidade, só na Idade Média é que se tornou a mencionar esporadicamente o chumbo. A primeira descrição clínica “moderna” de intoxicação por chumbo foi escrita em 1839 por Tanquerel des Planches, onde abordou cerca de 1200 casos [9].

No séc. XX começaram a surgir alguns esforços relacionados com a prevenção da intoxicação por chumbo. No entanto, só em finais do séc. XX é que o conceito de envenenamento por chumbo deixou de ser apenas clínico; foram reconhecidos alguns efeitos sub-clínicos (sem grandes sintomas, apenas a nível metabólico) e considerados indesejáveis.

A intoxicação por chumbo designa-se Plumbismo ou Saturnismo (como referência ao Deus Saturno). Ainda que a toxicidade do chumbo possua uma longa história e sempre tenha merecido especial atenção dos cientistas, fazendo deste metal, talvez, o agente tóxico mais estudado no ambiente de trabalho, o Saturnismo não é apenas uma mera entidade histórica, uma vez que o chumbo continua a ser largamente usado na indústria, afectando a saúde de milhares de pessoas.

❖ Chumbo no ambiente

O nosso ambiente contém inúmeras fontes de chumbo, que é um componente natural do solo, água, ar e vegetação. No mundo moderno é omnipresente nos alimentos, na água e no ar. No entanto, a maior parte dos elevados níveis de chumbo encontrados no ambiente são provenientes de actividades humanas (mineração, indústria e transporte) [8]. Os níveis ambientais de chumbo aumentaram mais de 1000 vezes ao longo dos últimos três séculos como resultado da actividade humana. O maior aumento ocorreu entre os anos 1950 e 2000, e reflecte o aumento da utilização mundial de gasolina com chumbo.

A excessiva utilização do chumbo na indústria libertou aproximadamente 300 milhões de toneladas deste metal para o ambiente [10]. Calcula-se que cerca de 4000 toneladas de chumbo sejam usadas por ano em todo o mundo [11].

O chumbo pode penetrar no meio ambiente através da mineração de chumbo e de outros metais e de fábricas que produzem ou utilizam chumbo, ligas de chumbo ou compostos de chumbo. Este metal é libertado para a atmosfera durante a queima de carvão, petróleo ou resíduos [7]. As rotas de exposição humana ao chumbo estão apresentadas na Figura 1.

O solo é considerado um dos principais depósitos de chumbo, uma vez que, ao alcançá-lo, este contaminante pode permanecer ali indefinidamente. O chumbo no solo é encontrado

especialmente perto de estradas, casas antigas, áreas de mineração, zonas industriais, incineradoras, aterros e depósitos de resíduos perigosos. Os teores de chumbo são muito mais elevados nas zonas mencionadas anteriormente, do que nas zonas encontradas em áreas isoladas, o que faz com que o teor de chumbo nos solos varie de região para região [12].

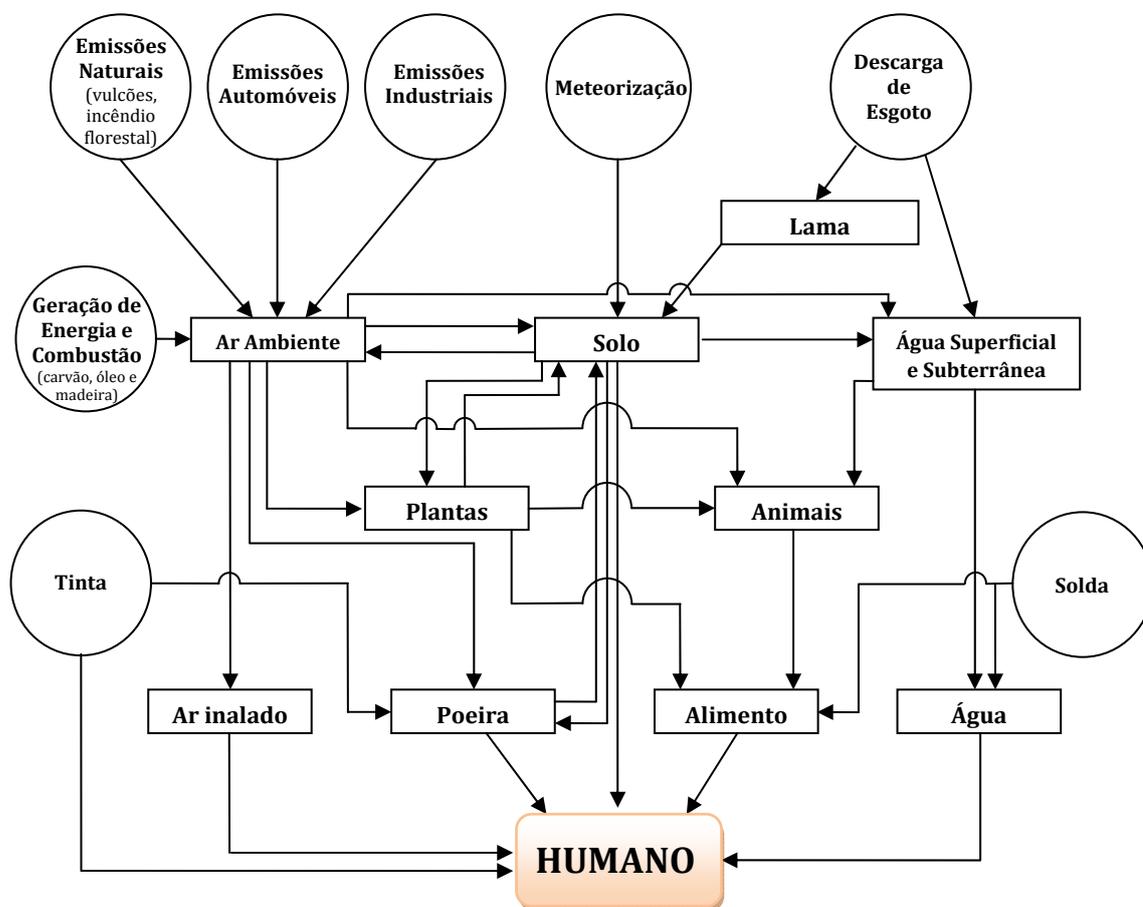


Figura 1: Rotas de exposição humana ao chumbo (adaptado da Referência [13]).

Nos países considerados desenvolvidos, a existência de normas e programas de vigilância médica contribuiu para uma diminuição da exposição humana ao chumbo e da degradação ambiental provocada por este metal. A substituição da gasolina com chumbo, a diminuição do uso de soldas em alimentos enlatados e o controlo da água potável e das emissões industriais, foram algumas das acções que justificaram esta diminuição. No entanto, nos países em desenvolvimento, a falta de vigilância e controle nas emissões, o facto de existir várias actividades artesanais que usam chumbo secundário, como a recuperação de baterias, torna a exposição ao chumbo um sério problema de saúde pública [10, 14, 15].

❖ Contaminação por chumbo

O chumbo pode contaminar os organismos através da inalação (ar atmosférico), da ingestão (água, alimentos e solos contaminados), e por via dérmica.

O chumbo inalado entra nos pulmões e passa através do sangue para outras partes do corpo. Quando o chumbo penetra no organismo através da ingestão de água ou alimentos contaminados, também entra no sangue e passa para outras partes do corpo. Este metal também pode penetrar no organismo através do solo ou poeiras, mas apenas uma pequena porção passa através da pele e entra no sangue. Se a pele for lavada não corremos este risco, excepto nos casos

em que a pele esteja danificada (arranhões, escoriações ou feridas). Os únicos compostos de chumbo que facilmente penetram na pele são os aditivos de gasolina com chumbo [7].

Experiências com voluntários mostraram que em adultos que acabaram de comer, a quantidade de chumbo que entrou no sangue do estômago foi apenas 6% do total ingerido. No entanto, em adultos que não tenham comido durante um dia, cerca de 60-80% do chumbo ingerido no estômago vai para o sangue. Em geral, se os adultos e as crianças ingerirem a mesma quantidade de chumbo entra uma maior proporção da quantidade ingerida no sangue das crianças, o que mostra que as crianças não são adultos pequenos. As crianças absorvem cerca de 50% do chumbo ingerido [7].

❖ **Distribuição do chumbo no organismo**

Tal como foi referido, o chumbo é um elemento tóxico não essencial, e que se acumula no organismo.

Existem dois tipos de compostos de chumbo: os inorgânicos (sais e óxidos de chumbo) e os orgânicos (chumbo tetraetila e tetrametila). Os compostos inorgânicos depois de absorvidos actuam no organismo da mesma forma. Os compostos orgânicos são lipossolúveis e podem ser absorvidos pela pele e por via respiratória [4].

A absorção de chumbo pelo organismo é lenta e além da dose, a idade da pessoa, as condições fisiológicas e nutricionais e possivelmente factores genéticos, são factores que influenciam a absorção [4].

Após a absorção, o chumbo não se distribui homogeneamente no organismo [4]. No sangue, o chumbo circulante encontra-se normalmente associado aos eritrócitos. Dentro dos eritrócitos o chumbo liga-se preponderantemente à enzima polimórfica (apresenta dois alelos) ácido delta-aminolevulínico desidratase (ALA-D), que catalisa a formação do porfobilinogénio, um precursor do heme e de outras hemoproteínas. Do sangue, o chumbo é distribuído a todos os tecidos (especialmente tecidos moles como os rins e fígado), inclusive ao feto durante a gravidez. Posteriormente, o chumbo é depositado nos ossos e dentes.

O osso é onde se acumula a maior percentagem de chumbo, cerca de 90% [6]. O chumbo segue o movimento do cálcio no organismo, depositando-se nos ossos como fosfato de chumbo. Consequentemente quando há necessidade de cálcio, o chumbo armazenado nos tecidos duros (dentes e ossos) pode ser novamente libertado na corrente sanguínea, porque o cálcio vai competir pelo fosfato, logo o chumbo vai-se depositar menos e vai ficar mais no sangue. Em situações como a gravidez, onde há necessidade de cálcio, deve-se ter um cuidado reforçado face a uma possível contaminação, pelo facto de o feto ser muito sensível aos efeitos da exposição do chumbo [16].

O corpo não consegue transformar o chumbo em outras formas. Após ser absorvido pelo organismo, o chumbo que não se armazena deixa o corpo pela urina ou fezes. Mais de 90% da quantidade de chumbo tomada no corpo de um adulto é eliminada dentro de poucas semanas, mas só 32% do chumbo no corpo de uma criança é eliminado. Em pequenas quantidades o chumbo também pode ser eliminado pelo suor, saliva, unhas e cabelo. Em condições de exposição contínua, nem todo o chumbo que entra no corpo é eliminado, o que pode resultar numa acumulação de chumbo nos tecidos e especialmente nos ossos [7].

Devido aos efeitos tóxicos do chumbo serem os mesmos independentemente da via de entrada no organismo, não se separa a dose humana por via de exposição, ou seja os dados da

dose para os seres humanos são em termos de dose absorvida em miligramas por quilograma por dia (mg/kg/dia) [7].

❖ **Análise da dose absorvida de chumbo: importância das análises ao sangue**

O chumbo absorvido e armazenado tem uma meia-vida de pelo menos 25 anos no osso cortical denso [17], aproximadamente 40 dias nos tecidos moles [18] e 36 dias no sangue [4].

No passado, o envenenamento por chumbo foi diagnosticado com base nos seus sintomas, no entanto hoje em dia é diagnosticado através da análise da concentração de chumbo no organismo.

Apesar do método mais comum para saber a dose absorvida de chumbo no organismo ser através da concentração de chumbo no sangue (PbS), existem outras alternativas como por exemplo através do chumbo nos dentes, ossos e cabelos [7].

A análise de chumbo nos dentes revela algumas desvantagens, visto que o chumbo não se distribui de forma homogénea pela estrutura dentária, sendo difícil fazer a selecção do dente a analisar, e no próprio dente, que parte deste se deve analisar [19].

O chumbo nos ossos é considerado um biomarcador de exposição cumulativa ou a longo prazo, uma vez que o chumbo se acumula no osso ao longo da vida.

Vários estudos sugerem o uso do cabelo como ferramenta de diagnóstico da concentração de elementos traço, como o chumbo. Existe muita informação disponível na literatura, no entanto há muita controvérsia em relação a aceitação desses dados devido à discrepância de resultados, e à dificuldade em se diferenciar a contaminação endógena (interna) da exógena (externa). Ou seja o problema da análise do cabelo não é a análise em si, já que esta pode ser executada sem muita dificuldade, o problema relaciona-se com as características do cabelo, falta de procedimentos de análise padronizados e controle de qualidade da análise [20-24]. Outra desvantagem em usar o cabelo é que se um indivíduo possuir cabelos de diferentes pigmentações (naturais), estes devem ser separados porque a absorção dos elementos pode variar com a pigmentação do cabelo. Se o cabelo tiver uma coloração artificial, não podem ser analisados porque podem estar contaminados com algum elemento de difícil remoção no processo de lavagem [25].

No caso do cabelo não se fala em valores normais para a concentração de elementos traço mas sim em faixas de concentração consideradas normais, uma vez que são muitos os factores que interferem com a concentração (idade, hábitos alimentares, sexo, localização geográfica, ocupação, etc.). Para o chumbo no cabelo humano a faixa de concentração é 0,004 – 95 µg/g [26].

No entanto, também existem vantagens na análise de cabelo. O crescimento do cabelo reflecte as mudanças metabólicas dos elementos ao longo do tempo, fornecendo assim um registo de exposição ao longo do tempo. Além disso o cabelo possui uma matriz mais simples que o sangue e a urina, o que torna a análise mais simples, a sua recolha é fácil, indolor e sem traumas, é um material fácil de transportar, manusear e não precisa de ser mantido sobre refrigeração [20, 24].

As análises ao sangue são importantes nos diagnósticos de intoxicações agudas, uma vez que a concentração de chumbo no sangue reflecte principalmente a história de exposição dos meses anteriores, mas esta característica faz também com que o PbS não seja um biomarcador ideal para a exposição a longo prazo, principalmente a baixos níveis, devido a semi-vida do

chumbo no sangue ser aproximadamente 35/36 dias [19]. No entanto, a determinação do chumbo no sangue é importante na avaliação da exposição interna presente num indivíduo, especialmente no caso das crianças, uma vez que são mais sensíveis aos efeitos do chumbo na saúde, do que os adultos [27].

As análises ao sangue são fundamentais no controlo, não só de indivíduos expostos ocupacionalmente, mas também para controlo da população em geral. Isto porque a população também pode ser significativamente exposta, seja pela ocupação de áreas contaminadas, pelo uso de utensílios cerâmicos com vitrificação inadequada, pelo consumo de alimentos ou de água com elevados teores de chumbo, ou ainda pelo uso de compostos de chumbo em tintas e cosméticos [6]. Assim, o chumbo pode estar presente no quotidiano das pessoas, em ocupações que não são consideradas de risco, onde pode haver contaminação, daí ser muito importante a realização de análises ao sangue.

❖ **Limites da concentração do chumbo**

O Saturnismo faz parte das doenças profissionais de declaração obrigatória e para a qual existe uma legislação específica (Dec. Regulamentar nº 12/80); por exemplo, o Decreto de Lei nº 274/89, estabelece diversas medidas de protecção da saúde dos trabalhadores contra os riscos de exposição ao chumbo [28, 29].

Existem também valores padrão limite para as concentrações de chumbo, os quais não devem ser ultrapassados; uma concentração de chumbo no sangue superior a 10 µg/dL (100 ppb) é indicação de uma exposição excessiva em bebés, crianças e mulheres em idade fértil. Já no caso de trabalhadores expostos, o índice de tolerância biológica é 30 µg/dL (300 ppb). A concentração de chumbo no ar, numa zona laboral, não deve ser superior a 50 µg/m³ (0,05 ppb)[7, 9].

Os valores limite para os solos residenciais e para a água potável são 400 µg/g (400 ppm) e 10 µg/dL (100 ppb) de chumbo, respectivamente. No entanto, para se considerar um solo não contaminado, a concentração de chumbo deve ser inferior a 50 µg/g (50 ppm)[9].

Em relação aos limites a partir dos quais a concentração de chumbo ingerida se torna prejudicial, não existe um consenso. Devido ao constante aumento da sensibilidade das medições, os valores limites estão continuamente a mudar, uma vez que são identificados efeitos na saúde para concentrações inferiores a 10 µg/dL (100 ppb). Por esta razão, estes valores deverão ser apenas encarados como referências [9].

❖ **Efeitos do chumbo na saúde**

Está disponível uma vasta quantidade de informação sobre os efeitos do chumbo na saúde humana. De facto, os efeitos tóxicos do chumbo são conhecidos há séculos, mas as descobertas nas últimas décadas de que exposição a níveis de chumbo relativamente baixos são associados efeitos adversos no organismo, é um assunto de grande preocupação.

Segue abaixo os efeitos do chumbo no organismo, alguns dos quais estão esquematicamente representados na Figura 2.

Sistema nervoso

O conjunto de órgãos mais sensível a contaminação por chumbo é o sistema nervoso, sendo que a encefalopatia é um dos efeitos mais sérios do envenenamento por chumbo em crianças e adultos. Durante o desenvolvimento da criança, o sistema nervoso pode ser afectado por PbS inferiores a 10 µg/dL (100 ppb), níveis antes considerados seguros. Nos adultos o sistema nervoso também é afectado por PbS relativamente baixas, inferiores a 40 µg/dL (400 ppb) [18, 30-32]. No entanto, quer para crianças, quer para adultos, só são verificados danos mais sérios no cérebro, como por exemplo encefalopatia, em PbS superiores a 90 µg/dL (900 ppb) [33].

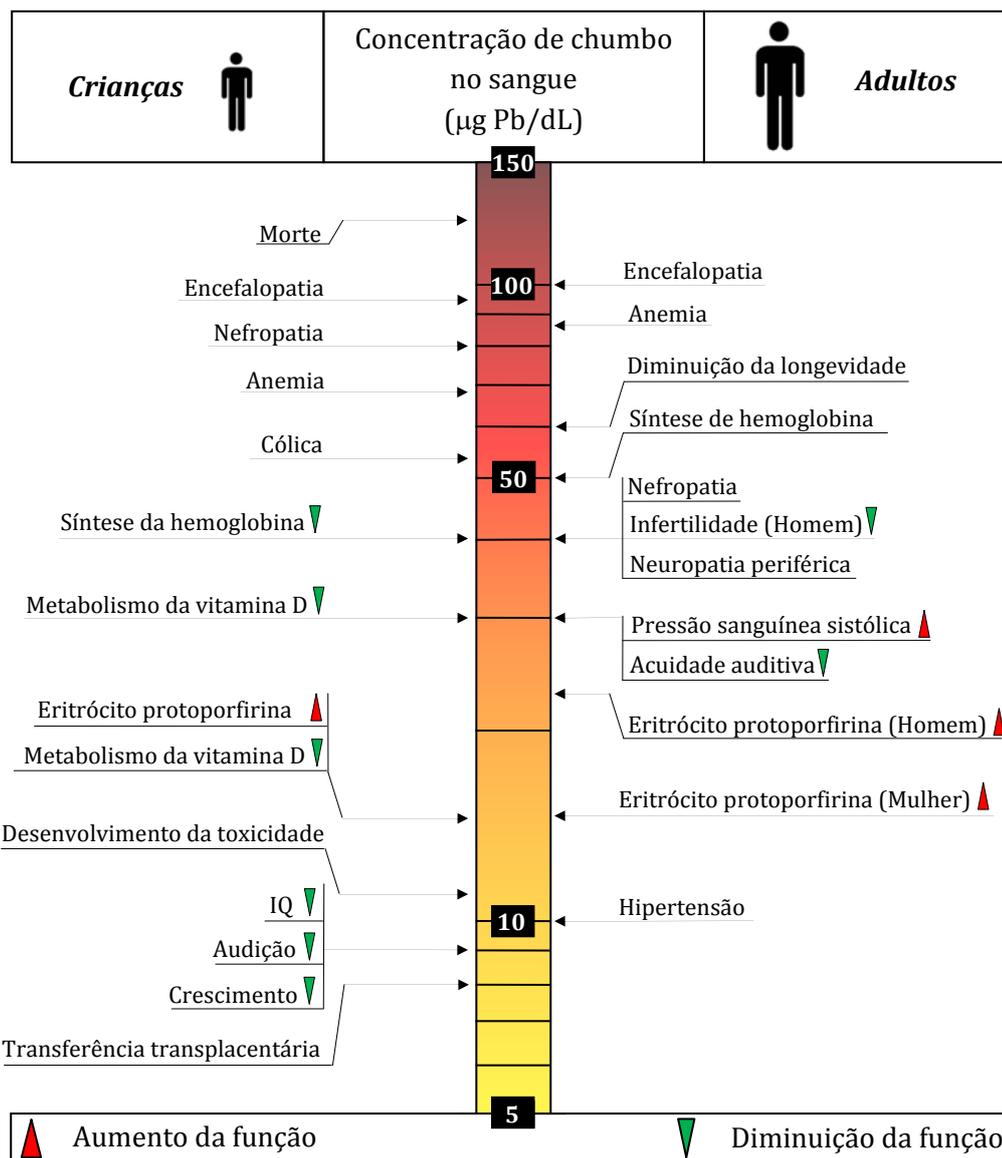


Figura 2: Efeitos do chumbo inorgânico em crianças e adultos (adaptado da Referência [33]).

Sistema Renal

A exposição excessiva e prolongada ao chumbo pode provocar doença renal progressiva e irreversível. A nefropatia por chumbo é caracterizada por uma redução gradual da função renal e é frequentemente acompanhada por hipertensão [18, 30]. Os efeitos tóxicos deste metal sobre os rins ocorrem em níveis particularmente altos da PbS, superiores a 40 µg/dL (400 ppb)

e dividem-se essencialmente em disfunção tubular renal reversível e nefropatia intersticial irreversível. A disfunção tubular renal reversível ocorre na maior parte das vezes em crianças sob exposição aguda e a nefropatia intersticial irreversível é encontrada principalmente em trabalhadores expostos [34].

O diagnóstico de doenças renais por chumbo é difícil, uma vez que não há indicadores específicos; os níveis de ureia no sangue e de creatinina no soro só se tornam elevados após a perda de dois terços da função renal [18, 31].

A nefropatia crónica está associada a níveis de PbS que variam de 40 a mais de 90 µg/dL (900 ppb). Nas crianças a nefropatia só ocorre em níveis de PbS superiores a 80 µg/dL (800 ppb) [35].

Anemia

A anemia é geralmente leve a moderada nos adultos, e por vezes severa nas crianças [30]. A anemia por chumbo inclui efeitos como a inibição da síntese da hemoglobina e diminuição do tempo de vida dos eritrócitos circundantes. No entanto, a anemia não é um efeito precoce do envenenamento por chumbo, sendo rara sem se detectarem outros efeitos, e só é evidente quando a PbS é significativamente elevada, superior a 60 µg/dL (600 ppb) [18, 32, 35].

Vitamina D

O chumbo parece também interferir no metabolismo da vitamina D. No entanto, alguns estudos concluíram que os efeitos do chumbo sobre o metabolismo da vitamina D só eram evidentes em crianças com deficiência nutricional crónica e com exposição elevada e prolongada ao chumbo [36].

Reprodução e desenvolvimento

Estudos como o de Gandley *et al.* apoiam a conclusão de que níveis elevados de PbS causam efeitos adversos significativos na reprodução humana, no entanto os dados não permitem estimar os níveis de PbS que causam danos na reprodução, sendo esta definição apenas especulativa [35, 37].

Em mulheres grávidas pode causar o aborto e nos homens pode danificar os órgãos responsáveis pela produção de esperma [7].

Como o chumbo consegue atravessar a barreira placentária [30, 38] através do sangue, o chumbo pode ser rapidamente transferido da mãe para o feto. Consequentemente, o nível de chumbo no sangue fetal vai-se aproximar ao do sangue materno [39]. Logo, a exposição ao chumbo pode começar ainda no útero, caso a mãe tenha chumbo no seu organismo [35]. Estudos feitos por Nashashibi *et al.* [40] sugerem uma correlação estatisticamente significativa entre a PbS materna e a concentração de chumbo no cordão umbilical ou no leite, provando que existe transferência para o feto ou para o recém-nascido, respectivamente.

Crescimento

Diversas pesquisas sugerem a influência do chumbo no crescimento físico e estatura das crianças. Um estudo realizado em 1980, nos Estados Unidos da América, com crianças com idades inferior a 7 anos, forneceu evidências de uma associação entre os níveis crescentes de PbS e uma diminuição no peso, altura e circunferência do tórax [18, 35]. Em 2000, a exposição ao chumbo também foi associada com a baixa estatura em crianças nos estudos de Berglund *et al.* [41]. Estudos de Vivoli *et al.* [42] sugerem que este metal pode afectar o crescimento em estatura mesmo em situações de baixas exposições [42, 43].

Outros efeitos

Têm sido investigada a relação entre o chumbo e os efeitos sobre o sistema cardiovascular, e não foi detectada nenhuma relação causal em humanos [36].

Os efeitos gastrointestinais ocorrem essencialmente em indivíduos expostos ocupacionalmente ou em indivíduos com exposição aguda a elevados níveis de chumbo, porém são poucas as pesquisas sobre este assunto [36].

A exposição de chumbo pode causar fraqueza nos dedos das mãos, pulsos ou tornozelos. Pode causar também anemia e um ligeiro aumento na pressão sanguínea, especialmente em pessoas de meia-idade e idosas [7].

Este metal é também conhecido por alterar o sistema hematológico, inibindo as actividades de várias enzimas envolvidas na biossíntese do heme [7], bloqueando a capacidade do organismo produzir hemoglobina e afectando a morfologia dos eritrócitos. Estes efeitos podem ser observados em humanos e animais [44, 45].

Como se pode verificar, devido aos multi-modos de acção do chumbo nos sistemas biológicos, este pode afectar potencialmente qualquer sistema ou órgão do corpo [7]. O principal alvo para a toxicidade do chumbo é o sistema nervoso e em ultimo caso pode provocar a morte [7]. Apesar dos estudos científicos sobre os efeitos tóxicos do chumbo serem desenvolvidos há mais de um século [36], existe ainda muitas questões sem solução, pelo que continuam a ser necessárias novas pesquisas, para o completo entendimento e prevenção destes efeitos na saúde.

❖ **Estudo Realizado**

Tendo em vista o desenvolvimento de uma ferramenta de detecção de chumbo “in vivo” nos humanos, de fácil uso médico e não invasiva, neste trabalho determinou-se a concentração de chumbo em sangue de ratos da espécie *Rattus norvegicus*, vulgo *Wistar*. Foram estudados 16 ratos, 11 do grupo de controlo (alimentado com uma dieta rica em acetato de chumbo) e 5 do grupo de controlo (alimentado com uma dieta normal).

Este trabalho integra um estudo geral da toxicocinética do chumbo num conjunto de ratos *Wistar*, em que têm sido analisados vários tecidos e fluidos orgânicos, nomeadamente fígado, rins, cérebro, cabelo, ossos, sangue, fezes e urina, de um total de 57 ratos, 37 do grupo contaminado e 20 do grupo de controlo.

❖ **Experimentação animal**

Os cientistas usam muitas vezes testes para proteger a população contra efeitos nocivos de produtos químicos tóxicos e para encontrar formas de tratar as pessoas que tenham sido lesadas.

Um modo de saber se um produto químico tóxico vai prejudicar as pessoas é determinar como o corpo o absorve, usa e liberta. Para alguns produtos, pode ser necessário realizar testes em animais. Estes testes também podem ajudar a identificar os efeitos na saúde, como cancro ou defeitos congénitos. Sem os testes em animais de laboratório, os cientistas perderiam um método básico para obter as informações necessárias para tomar decisões sensatas que protegem a saúde pública [7].

No entanto, os cientistas têm a responsabilidade de tratar os animais de pesquisa com cuidado e compaixão e devem cumprir e respeitar de forma rigorosa as orientações dos cuidados animais devidamente regulamentadas.

2- Métodos de Espectrometria Atómica

O acompanhamento e controle dos elementos traço requer o processamento de um elevado número de amostras, de modo a caracterizar a sua abundância com precisão e chegar a conclusões viáveis [46].

A escolha de uma técnica analítica adequada para a determinação da concentração de elementos traço depende de vários factores: preparação da amostra, limite de detecção das técnicas disponíveis, precisão, exactidão, faixa de concentração, interferências, duração temporal e custo da análise [47].

As técnicas mais utilizadas na análise da concentração de chumbo no sangue são: espectrometria de massa com plasma indutivamente acoplado (ICP-MS), espectrometria de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado (ICP-OES), espectrometria de absorção atómica (AAS) com chama (FAAS), com geração de hidretos (HGAAS) e electrotérmica (ETAAS)[27].

❖ Espectrometria com plasma indutivamente acoplado (ICP)

As técnicas ICP-MS e ICP-AES são actualmente usadas em análises de rotina, devido à sua capacidade multielementar de análise, ampla faixa de concentração dinâmica e boa velocidade analítica. Em ICP é maior o número de elementos que podem ser detectados relativamente às técnicas FAAS e ETAAS [48].

ICP-MS

De entre todas as técnicas analíticas utilizadas para detecção, tem sido dada grande atenção ao ICP-MS, que é considerado o detector mais sensível para a especiação e que terá uma importância crescente no futuro, principalmente onde é necessária a melhor sensibilidade e/ou a análise simultânea de diversos elementos [49].

Com esta técnica as amostras de sangue são analisadas directamente após uma diluição simples ou após uma decomposição orgânica da matriz.

Em relação a AAS, a ICP-MS permite um maior rendimento analítico, como resultado da capacidade instrumental para analisar vários elementos ou isótopos na análise da amostra [50]. Entretanto, o seu alto custo, bem como os seus consumos [51], conseqüente indisponibilidade e o facto de ser uma técnica nova e sofisticada onde ainda não estão amplamente disponíveis recursos humanos adequadamente treinados, fazem com que a AAS seja considerada a técnica de maior potencial de uso em análises de rotina, onde o custo se torna um factor determinante para a escolha do método [49].

ICP-OES

Esta técnica de emissão atómica, embora tendo um elevado carácter multielementar, que permite determinar até 75 elementos, tem como limitação limites de detecção insatisfatórios quando comparados com as técnicas ICP-MS e ETAAS [52].

❖ Espectrometria de absorção atômica (ASS)

A espectrometria de absorção atômica é relativamente simples, rápida e um poderoso método de análise química, pelo que é um método muito difundido e desenvolvido de forma intensa [53].

Ao longo do tempo, a espectrometria de absorção atômica sofreu vários avanços instrumentais, tornando os equipamentos mais robustos [54]. Comparativamente, a ETAAS é a técnica que têm sofrido mais melhoramentos desde a sua proposta inicial feita por Boris V. L'vov [55].

As principais vantagens de usar métodos atômicos na determinação de metais no sangue são a sensibilidade da instrumentação e a capacidade de usar injeção em fluxo para uma melhor automação e rendimento.

A AAS, além de ser uma técnica relativamente barata, tanto na sua implantação como nos gastos de operação, é de fácil operação e está disponível na maioria dos laboratórios [49].

FAAS

A espectrometria de absorção atômica com atomização em chama é uma técnica analítica bem estabelecida e suficientemente robusta para ser implantada nos laboratórios envolvidos em análises químicas em larga escala. No entanto, as alterações que possam ocorrer na temperatura da chama, na taxa de aspiração da solução, na composição da amostra, entre outras, podem prejudicar os resultados analíticos [56].

A determinação de chumbo por FAAS é praticamente livre de interferências e requer uma chama de ar-acetileno (C_2H_2 -ar) ou óxido nitroso-acetileno ($C_2H_2-N_2O$) [53]. As riscas mais importantes do chumbo são 217,00 e 283,31 nm. A 217,00 nm é mais sensível, apesar dos elevados efeitos da radiação de fundo.

A técnica FAAS é usada há décadas na maior parte dos laboratórios e as possibilidades e limitações dos métodos já são muito bem conhecidas. No entanto, a optimização deste método é praticamente limitada à escolha do tipo de chama e à adição de um modificador (usualmente sais de Lantânio), se necessário [53]. Não é de surpreender que um técnico sem experiência possa usar eficazmente esta técnica [53].

Quando comparada com a FAAS, a ETAAS, especialmente em forno de grafite (GFAAS), é substancialmente mais sensível e versátil face à configuração do tubo de grafite e ao seu carácter dual: reactor químico e atomizador [56].

HGAAS

O princípio básico da HGAAS é a formação de hidretos covalentes voláteis do elemento a analisar, por redução, sendo estes posteriormente atomizados e analisados [5]. É uma técnica que permite a separação do elemento da matriz, possui limites de detecção baixos e as interferências da matriz são praticamente nulas [5]. No entanto, também existem várias desvantagens associadas a esta técnica. Depende de vários factores, tais como o estado de oxidação do analito, o tempo de reacção, a pressão do gás, a concentração e volume da solução [5]. Outra desvantagem é que poucos elementos geram hidretos estáveis. Além disso, a HGAAS

em relação a ETAAS requer um volume significativamente maior de amostra, sendo que em ETAAS é comum analisar amostras com um volume inferior a 100 μL [51].

ETAAS

De entre os atomizadores electrotérmicos destacam-se os fornos de grafite (GFAAS), uma vez que foram os que tiveram uma maior evolução sistemática em função do número de utilizadores e de trabalhos publicados [57]. Razão pela qual a espectrometria de absorção atómica electrotérmica ser também designada espectrometria de absorção atómica com câmara de grafite ou com forno de grafite. A ETAAS é muito usada na determinação da concentração total de elementos traços em amostras biológicas e é uma técnica bem estabelecida para determinações monoelementares [52]. No entanto várias restrições têm limitado a sua utilização. É susceptível a alterações instrumentais e operacionais que podem afectar o desempenho analítico da ETAAS: variações na temperatura e na taxa de aquecimento do tubo de grafite, no volume injectado de amostra, na radiação emitida da fonte, nas diluições, na estrutura do atomizador [56].

Ao longo dos últimos anos as melhorias nos espectrómetros de ETAAS contribuíram parcialmente, ou totalmente, para a resolução destes problemas, tendo sido reduzidas as principais limitações deste método. O uso de modificadores mais eficientes, métodos de captura para a estabilização e pré-concentração dos analitos, progressos no controlo da temperatura de atomização, novos modelos de atomizadores e avanços nos métodos de correcção das interferências do espectro de fundo, têm permitido uma melhoria no aumento da sensibilidade, aumento do poder de detecção, diminuição da manipulação da amostra e o aumento da reprodutividade dos resultados [46]. Estes avanços foram responsáveis por um melhoramento da utilidade da ETAAS na determinação de elementos traço na ordem de grandeza de $\mu\text{g/L}$, tendo como consequência maior reprodutividade, menor custo e maior facilidade no pré-tratamento das amostras, em comparação com outros métodos [46].

Esta técnica ainda tem alguns problemas no que diz respeito às interferências de matriz e às interferências de *background* [5]. No entanto, a fonte contínua de alta resolução em ETAAS é uma aproximação cada vez melhor para a determinação directa de elementos traço nos diferentes tipos de amostras, incluindo materiais biológicos, desde que esteja disponível uma correcção de fundo eficiente [58].

O facto de ser uma abordagem relativamente barata com um baixo consumo de amostra são algumas das vantagens adicionais desta técnica, que tem resultados equivalentes a ICP-MS.

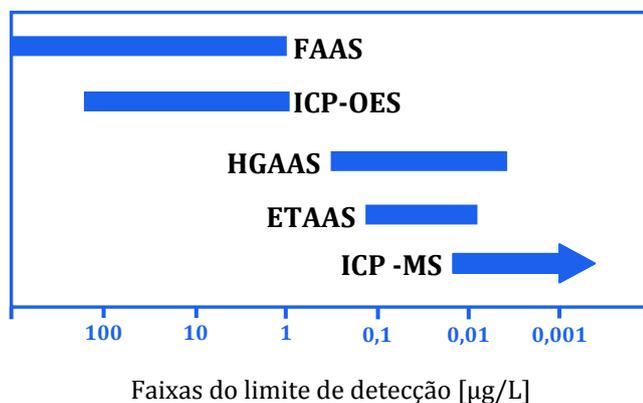


Figura 3: Limites de detecção para as principais técnicas de espectrometria atómica (Adaptado da Referência [59, 60]).

Na Figura 3 estão apresentadas as faixas dos limites de detecção típicos das técnicas acima apresentadas.

Pelo facto de nos últimos anos terem surgido melhorias de forma progressiva que reforçaram o uso da ETAAS na determinação de chumbo em amostras biológicas e pelas diversas vantagens que esta técnica apresenta em relação às outras, a ETAAS com forno de grafite foi a técnica escolhida para determinar a concentração de chumbo no sangue neste trabalho. No capítulo seguinte vai-se explorar um pouco mais esta técnica.

3- ETAAS

❖ História

Em 1859, Robert W. Bunsen juntamente com Gustav R. Kirchhoff criaram um espectroscópio que tornou possível a observação de riscas de emissão de elementos químicos excitados numa chama não luminosa, o queimador de Bunsen, actualmente designado por bico de Bunsen. O uso deste equipamento tornou possível a descoberta de dois novos elementos químicos: o Césio e o Rubídio [61]. Estes investigadores desempenharam um papel fundamental na espectrometria de emissão de chama, ao descobrir que as linhas espectrais emitidas pelos metais ocorrem em comprimentos de onda definidos, independentemente dos aniões presentes em solução [62]. A descrição deste processo de emissão e absorção de energia radiante por átomos em chama chamou a atenção de vários investigadores, sendo a emissão atómica escolhida como técnica analítica na determinação de metais, nomeadamente na indústria metalúrgica [63].

Com o passar dos anos, esta técnica foi perdendo popularidade até que em 1954 o cientista Alan Wash propôs uma técnica analítica para a determinação de metais: a espectrometria de absorção atómica em chama [64]. Esta técnica não originou grande interesse por parte dos investigadores, à excepção do cientista Boris L'vov que propôs a mesma técnica mas com um forno de grafite como atomizador electrotérmico (GFAAS), o que permitiu uma redução significativa nos limites de detecção [65, 66].

Ao longo dos anos vários avanços têm contribuído para o desenvolvimento da AAS, como por exemplo a câmara de pré-mistura acoplada aos queimadores dos espectrómetros de chama, a lâmpada de cátodo oco de alta intensidade [66] e a introdução do conceito STPF - *stabilized temperature platform furnace*, por Slavin *et al.* [67]. Também foram desenvolvidas pesquisas e aplicações de novas fontes de radiação como as lâmpadas de descarga sem eléctrodo (EDL - *Electrodeless Discharge Lamps*), lâmpadas de cátodo oco (HCL - *Hollow Cathode Lamps*) e o uso de laser de díodos [68].

O crescente interesse pela AAS esta patente no elevado número de publicações que referem esta técnica a partir de 1960, uma vez que era um método relativamente simples e de baixo custo. Este interesse foi também evidenciado no elevado número de laboratórios que adquiriram este equipamento, especialmente laboratórios industriais [69].

Devido ao rápido desenvolvimento da ICP-OES e ICP-MS, começaram a ser feitas comparações com a AAS, discutindo-se as vantagens e desvantagens de cada técnica.

Em 1989, Hiefje [70] abordou a possibilidade desta técnica estar a cair em desuso, por isso, publicou uma revisão que visava uma diminuição no número de publicações relacionadas com a espectrometria de absorção atómica e, caso esta tendência continuasse e não houvesse avanços tecnológicos, a ETAAS seria retirada do mercado no 2000.

Actualmente, a AAS continua a ser muito usada e inovações como o uso de técnicas de injeção em fluxo e possibilidade de separação e pré-concentração on-line têm contribuído para o seu sucesso [66]. Segundo Sneddon e colaboradores [71], o uso e interesse pela ASS não são representados pelo número de artigos, que são indicativos do interesse académico, mas sim pelo número de laboratórios que usam esta técnica.

❖ Princípios físicos

Os métodos de espectrometria atômica baseiam-se na medição da intensidade da radiação que é absorvida pelos analitos quando um feixe de radiação electromagnética atravessa a amostra [72]. Recorrendo à Lei de Lambert-Beer, pode-se verificar que a concentração do analito é proporcional à intensidade de radiação absorvida:

$$A = \log (I_0/I) = \epsilon bc$$

onde A é a absorvância, I_0 é a intensidade da radiação incidente na amostra, I é a intensidade da radiação transmitida, ϵ é o coeficiente de extinção molar (é característico de cada substância e c.d.o.), b é o caminho óptico (distância que a radiação percorreu através da amostra) e c é a concentração do analito na amostra [72].

Como b é se mantém constante e ϵ é uma constante, a absorvância é proporcional á concentração, como mostra a Figura 4 [73, 74]. Esta relação permite determinar a concentração de um analito pela medição da sua absorvância [74].

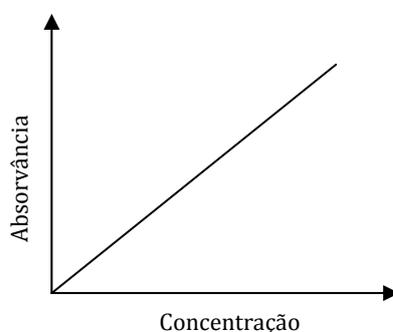


Figura 4: Relação entre a concentração e a absorvância (Adaptado da Referência [73]).

Assim, consegue-se obter informações das amostras, quer a nível qualitativo, quer a nível quantitativo. A informação qualitativa é obtida pelo comprimento de onda (c.d.o.) no qual a radiação é absorvida, enquanto que a informação quantitativa é obtida pela energia de radiação electromagnética que é absorvida [75].

Em ETAAS, a absorção da radiação electromagnética é feita na zona do visível e ultravioleta por átomos neutros, no estado gasoso e no estado fundamental. Cada elemento têm um c.d.o. característico, e a radiação deste c.d.o é emitida através do vapor atômico. Os átomos do elemento absorvem parte desta radiação. A quantidade de radiação absorvida é medida e usada na determinação da concentração do elemento da amostra em estudo [75].

As fontes de radiação usadas em absorção atômica são fontes em linha, e emitem riscas espectrais estreitas, sendo as lâmpadas de cátodo oco (HCL) e as lâmpadas de descarga sem eléctrodos (EDL) as mais comuns. A lâmpada HCL é mais estável enquanto que a EDL é mais intensa. Por esta razão, a lâmpada HCL é usada para a maioria dos elementos e a EDL para elementos mais voláteis, em que é necessária uma intensidade mais elevada.

Neste trabalho, foi utilizado a lâmpada de HCL, o gás de preenchimento usado foi o Árgon, a baixas pressões (1-5 Torr) e o ânodo era de Tungsténio. Na Figura 5 está representado um esquema da lâmpada que se usou neste trabalho.

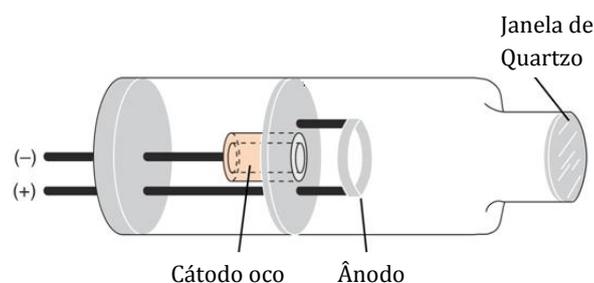


Figura 5: Esquema de uma lâmpada de cátodo oco (HCL) (Adaptado da Referência [76]).

❖ Conceito STPF

Em ETAAS, o número de variáveis que determinam a sua eficiência tornou-se significativamente menor após a introdução do conceito STPF em análises práticas. As condições STPF são um conjunto de requisitos instrumentais e operacionais (ver Tabela 2) que asseguram uma condição analítica adequada, que permite obter métodos mais sensíveis e com interferências mínimas usando a ETAAS [77].

Condições STPF	Resultado Obtido
Tubo de grafite com plataforma de L'vov	Estabelecimento de um ambiente quase isotérmico durante a atomização
Sinais de absorvância registados em área	Minimização dos efeitos das variações cinéticas do processo de atomização
Atomizador com grafite pirolítica	Diminuição das perdas por difusão através da parede do atomizador
Tubo de grafite com aquecimento transversal	Estabelecimento de um ambiente espacialmente isotérmico
Correcção de fundo por efeito de Zeeman	Correcção das interferências espectrais
Uso de modificador químico	Aumento da eficiência do tratamento térmico durante a pirólise
Interrupção do fluxo de gás durante a atomização	Aumento do tempo de permanência da nuvem atômica na zona de observação
Elevada taxa de aquecimento do tubo de grafite	Diminuição das interferências na fase de vapor e formação de uma nuvem atômica densa

Tabela 2: Requisitos instrumentais e operacionais necessários às condições STPF [67].

❖ Modificadores

Uma das primeiras abordagens para melhorar a determinação de chumbo em amostras biológicas decorre da investigação do uso de modificadores químicos. Os modificadores são introduzidos dentro do forno com a amostra, de modo a permitir uma maior eficiência na separação térmica do analito na etapa da pirólise. Normalmente, o analito é estabilizado e a matriz removida por volatilização. Estes procedimentos têm sido particularmente relevantes na determinação de Cd e Pb, para os quais são populares seis modificadores diferentes, utilizados sozinhos ou misturados: Pd(NO₃)₂/Pd, PdCl₂/Pd, PdCl₂/Pd + ácido ascórbico, Pd(NO₃)₂/Pd + Mg(NO₃)₂, (NH₄)₃PO₄, NH₄H₂PO₄, Mg(NO₃)₂ + (NH₄)₂HPO₄, Mg(NO₃)₂ + (NH₄)₂PO₄, Triton X-100 + NH₄H₂PO₄. O uso correcto destes modificadores reduz interferências e melhora o processo de atomização [46].

Apesar do uso generalizado de modificadores, existem dois inconvenientes na sua utilização: a contaminação degrada os limites de detecção e a diminuição do tempo de vida do atomizador. Estes problemas têm sido resolvidos recorrendo ao uso de modificadores químicos

permanentes. Durante o tratamento térmico, as impurezas voláteis das soluções de reagente são eliminadas, pelo que não são necessários modificadores químicos com uma alta pureza. Além disso, os modificadores permanentes prolongam o tempo de vida do atomizador proporcionado uma melhor estabilidade térmica e repetibilidade. Actualmente, não existe um só elemento químico identificado como tendo uma vasta aplicação para a determinação de outros elementos. No entanto, podem ser constatadas algumas tendências, como o uso de Pd como modificador químico tradicional e o uso de W, Ir e Rh como modificadores químicos permanentes [46].

❖ Programa térmico

Outra área de investigação é o estudo dos programas de temperaturas óptimos para cada tipo de amostra. Com a técnica de ETAAS é imprescindível estabelecer um programa de aquecimento apropriado, onde se pode controlar o tempo e temperaturas das etapas de secagem, pirólise, atomização e limpeza. A optimização deste programa permite evaporar bem o solvente e eliminar os constituintes da matriz, de modo a se diminuir eventuais interferências [51].

As temperaturas mais usadas para a atomização do chumbo vão desde 1500 a 2300°C. Apesar das diferenças entre a temperatura óptima de atomização, o uso do mesmo programa de temperatura para o Cd e Pb, produz bons resultados analíticos [46].

Secagem

O objectivo desta etapa é o de evaporar o solvente (água), secando assim a amostra. Daí que as temperaturas desta etapa sejam superiores ou próximas da temperatura de ebulição do solvente. Este aquecimento não pode ser brusco, porque poderia ocorrer uma dispersão da amostra, o que ia ter como consequência a diminuição da sensibilidade e reprodutibilidade dos resultados [5]. Por esta razão, muitas vezes são usadas rampas de aquecimento, onde o solvente evapora lentamente.

Pirólise

Nesta etapa o objectivo é eliminar a matéria orgânica da amostra. Para isso, tem-se que atingir a temperatura máxima possível sem eliminar o analito. Como já foi referido anteriormente, em alguns casos para se obter melhor sensibilidade, recorre-se ao uso de modificadores químicos que alteram a química da amostra [5].

Atomização

Nesta etapa é feita a medição do elemento em estudo, logo em termos analíticos é a fase mais importante. A temperatura de atomização é característica de cada elemento e é influenciada pela matriz [5].

Limpeza

Esta etapa é a mais curta de todas, dura apenas alguns segundos, com uma temperatura muito elevada. Tem como objectivo eliminar alguns resíduos do analito que não foram atomizados ou óxidos difíceis de vaporizar [5].

❖ Melhorias no espectrómetro

As progressivas mudanças no design dos atomizadores electrotérmicos têm melhorado a sensibilidade e os limites de detecção oferecidos pela ETAAS. Durante a década de 1990, o uso de plataformas inseridas no forno de grafite tornou o processo de atomização mais reprodutivo e constante. Quando a temperatura das paredes do atomizador aumenta rapidamente, a atomização da amostra a partir da plataforma é retardada porque a amostra é previamente aquecida, proporcionando um ambiente isotérmico, onde a reprodutibilidade é melhorada. Com o atomizador clássico aquecido longitudinalmente (LHA), a temperatura atinge o máximo no centro e o mínimo nas extremidades de refrigeração. Para diminuir este gradiente foram projectados atomizadores aquecidos transversalmente, os quais proporcionam uma distribuição uniforme da temperatura ao longo do comprimento do tubo, aumentando assim a sensibilidade e diminuindo os limites de detecção. Quando comparadas as duas configurações do atomizador na determinação do mesmo analito, na mesma matriz, a configuração do atomizador aquecido transversalmente (THA) tem apresentado melhores resultados [46].

Actualmente, os melhores resultados têm sido obtidos usando a correcção de fundo de efeito de Zeeman, porque o fundo é sempre medido como o mesmo c.d.o. que a absorção atómica do analito [46].

Assim, desde 1996 e até a data, o estabelecimento de modificadores mais adequados, o uso de THA juntamente com o uso de espectrómetros mais sofisticados, ou seja correctores de fundo Zeeman, conduziu a uma melhoria na análise da determinação de Cd, Cu e Pb em amostras biológicas, ao diminuir os limites de detecção e permitir determinações simultâneas de analitos [46].

Como mencionado anteriormente, as inferências espectrais dos componentes da matriz são frequentemente a principal causa pelos elevados limites de detecção. Para atenuar este problema, têm sido usados vários sistemas de correcção de fundo em ETAAS. O método de fonte contínua também apresenta algumas limitações se a amostra tiver outro elemento com uma linha de absorção localizada muito próxima da linha de ressonância do analito. As interferências espectrais podem ser insuficientes, uma vez que só é efectivamente medida a média das absorções não atómicas, que ocorrem durante a passagem da banda espectral. Apesar das limitações, esta metodologia tem sido muito usada para a determinação de Cd, Cu e Pb em amostras biológicas, desde os anos 1990 [46].

❖ Pré-tratamentos das amostras

Os materiais biológicos analisados no rastreamento de elementos traço incluem tecidos duros (ossos e dentes), tecidos semi-rígidos (cabelo e unhas), tecidos moles (órgãos), fluidos biológicos (sangue e respectivos componentes, urina, líquido amniótico e líquido sinovial) e secreções (lágrimas, saliva, suor, bÍlis e leite)[58].

Os procedimentos de pré-tratamento variam de acordo com a natureza das amostras, o método disponível de análise, a capacidade do laboratório, os objectivos do estudo, os elementos a serem analisados e os seus níveis de concentração.

Não existe, por isso, um único pré-tratamento antes da introdução da amostra no forno de grafite [46]. Como a matriz pode prejudicar a atomização completa do analito, interferindo com a precisão da determinação do analito, são seguidas duas metodologias para separar o analito da matriz:

- Limpeza da amostra: por vezes é necessário fazer uma limpeza da amostra.

- Pré-tratamento da matriz: melhora os limites de detecção e envolve métodos com a digestão ácida, "slurry", lixiviação, incineração e ultra-sons.

Suspensão ("Slurry")

O *Slurry* é uma suspensão de partículas insolúveis, geralmente em solução ácida e/ou em meios como o Triton X-100, o que permite a homogeneização da amostra e a libertação, em certa medida, dos elementos traço da solução. Tendo em conta parâmetros como a segurança, o ambiente, a economia, o tempo e o baixo risco de contaminação para se obter baixos limites de detecção, a técnica de amostragem *Slurry* parece ser mais vantajosa que a clássica digestão ácida por microondas. No entanto, para obter uma boa precisão e recuperação com a técnica *Slurry* é necessário otimizar a influência do tamanho das partículas, concentração de sólidos (relação entre o peso da amostra e o volume de sólidos) e a homogeneidade [46].

O uso de baixas concentrações de ácido nítrico (HNO_3) e peróxido de hidrogénio (H_2O_2), ou de outros reagentes que aumentem a decomposição de resíduos de carbono no interior do atomizador, pode diminuir o poder de detecção. Em condições óptimas, os resultados são frequentemente comparados aos obtidos por digestão ácida e é realizada a recuperação total do analito. Apesar da optimização, nem sempre é alcançada a libertação completa do analito da matriz da amostra, o que pode conduzir a resultados insatisfatórios [46].

Lixiviação

Quando o objectivo é determinar a parte da fracção dos elementos traço que está biodisponível ou móvel pela solubilização da água são usadas técnicas como a lixiviação de sólidos ou líquidos. A extracção ultra-sónica seguida da lise (destruição das membranas, que leva a libertação do seu conteúdo) em meio ácido pode ser um método útil para evitar perdas dos analitos. Normalmente, quando o objectivo é determinar a concentração total do analito é mais aconselhável usar a digestão ácida ou a amostragem *slurry*. Quando o interesse for a determinação das diferentes espécies dos analitos é mais conveniente usar um método de extracção selectiva como a extracção líquido-líquido ou a técnica de cromatografia [46].

Incineração

Vários estudos demonstraram que a técnica de calcinação da amostra a temperaturas superiores a 400°C não é muito adequada, porque podem ocorrer perdas significativas dos analitos. Normalmente, os métodos de incineração apresentam uma precisão inferior e uma menor recuperação do analito, quando comparados com a digestão ácida [46].

Digestão ácida

A digestão ácida baseia-se na oxidação de ácidos concentrados que provocam a destruição da matriz. É dos métodos mais usados em amostras biológicas devido à sua eficiência. Pode ser feita em frasco aberto ou fechado, sendo que a digestão em frasco fechado e em forno de microondas é a mais usada recentemente. Quando se utiliza o forno de microondas, basta adicionar HNO_3 e H_2O_2 consoante a quantidade de matéria a digerir. Com este método de digestão, as quantidades de reagentes são inferiores, minimizando os riscos de contaminação. Também não são introduzidos iões Cl^- e SO_4^- que podem interferir na técnica ETAAS [78, 79].

A mistura de HNO_3 com outros ácidos também é favorável. Por outro lado, uso de ácido clorídrico (HCl) não é geralmente recomendado porque pode haver interferências dos cloretos

na determinação de Cd ou Pb, por ETAAS e o uso do ácido fluorídrico (HF) também não é aconselhado porque ataca o vidro [48].

Deve-se ter em atenção as fontes de contaminação devido ao uso de ácidos concentrados, devido aos recipientes usados no processo de digestão, e ao programa de microondas assistido por temperatura e pressão de modo a assegurar a mineralização completa de todas as formas orgânicas dos analitos [46].

Existem várias vantagens ao digerir a amostra em ETAAS: facilidade em manipular as concentrações do analito de modo a ficar no intervalo óptimo de detecção, disponibilidade de padrões de calibração adequados e a possibilidade de uso de equipamento menos sofisticado. No entanto, se for usado equipamento inadequado para realizar a digestão ácida, podem ocorrer perdas inaceitáveis do analito. O uso de digestão ácida assistida por microondas com elevada pressão e controle de temperatura atenua estes problemas e torna possível a utilização de grandes massas de amostras (1-2 g), sem o perigo de ruptura do vaso e minimizando a hipótese de contaminação [46].

Independentemente do uso ou não de microondas, a digestão em frasco fechado diminui o risco de contaminação e a perda de elementos voláteis.

Analito	Amostra da matriz	Pré-tratamento da amostra	Modificadores	Correcção de fundo	Características do espectrómetro
Cd, Co, Cr, Pb	Sangue humano	Centrifugação + digestão ácida com HNO ₃	NH ₄ H ₂ PO ₄ , Mg(NO ₃) ₂ , Pd(NO ₃) ₂ em diferentes combinações	Zeeman	Fonte em linha. Atomização a 1400°C Cd, 1800°C Pb. THA (atomizadores aquecidos transversalmente).
Cd, Pb	Sangue e urina	Slurry	(NH ₄) ₂ HPO ₄	Zeeman	Fonte em linha. Atomização a 1300°C Cd, 1600°C Pb
Cd, Pb	Sangue humano	Slurry	Mg(NO ₃) ₂ , (NH ₄) ₂ HPO ₄	Zeeman	Fonte em linha. THA.
Cd, Pb	Sangue humano	Slurry	Mg(NO ₃) ₂ + (NH ₄) ₂ HPO ₄	Zeeman	Fonte em linha. Atomização a 1500°C. THA.
Pb	Arroz e sangue humano	Digestão ácida com HNO ₃ + co-precipitação FIA	-	-	Fonte em linha
Pb	Sangue	Slurry	W + Rh revestido	Zeeman	Fonte em linha. Atomização a 1400°C. THA.

Tabela 3: Algumas características da técnica ETAAS na determinação de amostras biológicas [46].

A Tabela 3 mostra um resumo de algumas características como o pré-tratamento, modificador, correcção de fundo, etapas do forno de grafite, entre outras, usadas na determinação de elementos traço em amostras biológicas por ETAAS.

Ultra-sons

Nos últimos anos, têm sido feitos avanços significativos na metodologia de preparação de amostras, com o fim de substituir os métodos que envolvem elevadas temperaturas e pressões, e ácidos mineralizados concentrados por métodos de separação sem decomposição da matriz, como as extracções ultra-sónicas em condições brandas, nas quais se usam solventes menos agressivos, e temperaturas e pressões mais baixas [80].

Em laboratório os equipamentos de ultra-sons podem ser usados na preparação da amostra, na diluição, mistura, emulsão e ruptura ou lise de tecidos [81]. Os equipamentos de ultra-sons mais usados em laboratório de química são o banho convencional de ultra-sons, o sonoreactor e a sonda de ultra-sons [82].

➤ Banho convencional de ultra-sons

Os dispositivos do banho convencional de ultra-sons são os mais comuns nos laboratórios de química e bioquímica. São normalmente constituídos por um recipiente de aço inoxidável com um ou mais transdutores na parte inferior. Devido ao seu volume, a potência de densidade fornecida por estes dispositivos varia entre 1 a 5 W/cm², o que corresponde a uma baixa intensidade [82, 83]. A temperatura no interior destes dispositivos é difícil de controlar e a frequência aplicada varia significativamente com a marca do fornecedor, o que torna difícil reproduzir as mesmas condições de laboratório para laboratório [84]. Além disso, a posição e forma do material (balão, tubo, eppendorf) que se usa no interior do tanque, bem como a quantidade de água com que se enche o tanque, têm influência sobre a quantidade de energia ultra-sónica que atinge a amostra [84]. Por esta razão, os banhos de ultra-sons são essencialmente aplicados para fins de limpeza e desgaseificação e não para promover as reacções químicas.

Recentemente têm sido desenvolvidos novos banhos de ultra-sons para superar algumas das questões mencionadas acima, incluindo um aquecedor, que permite controlar a temperatura, um regulador da potência de ultra-sons e diferentes modos de operação [82].

➤ Sonoreactor

O sonoreactor é um sistema indirecto de sonicação ultra-sónica de alta potência. Têm como grande vantagem, para fins analíticos, os frascos de reacção ser tratados de forma fechada, evitando assim a contaminações das amostras [81, 85].

Devido às suas características pode ser visto como um pequeno e poderoso banho de ultra-sons. Este dispositivo funciona com uma frequência pré-determinada. A potência de entrada pode ser controlada, bem como o ciclo de trabalho. Além disso este dispositivo pode funcionar com mais de que uma amostra ao mesmo tempo, o que resulta numa maior produtividade, quando comparada com a sonda de ultra-sons.

No entanto, uma vez que as ondas ultra-sónicas são transmitidas através da água e é necessário atravessar a parede do recipiente usado, o poder da densidade ultra-sónica fornecido por estes dispositivos é inferior quando comparado com a sonda. Além disso, para se alcançar um maior poder de ultra-sons, o volume do recipiente deve ser pequeno, o que impõe uma limitação no tamanho do recipiente que se vai usar.

A intensidade de sonicação pode chegar a ser 50 vezes superior à obtida com banho de ultra-sons. No entanto, é aproximadamente 30 vezes menos intensa que a intensidade obtida com a sonda [81, 85].

➤ Sonda de ultra-sons

A sonda de ultra-sons é um dos dispositivos mais populares entre os ultra-sons utilizados em química. Ao contrário do banho de ultra-sons, e do sonoreactor, a sonda está imersa no meio líquido. É um dispositivo capaz de fornecer uma grande quantidade de energia ultra-sónica ao meio [84].

A maioria destes sistemas funciona com uma frequência fixa, geralmente num intervalo de 20 a 40 kHz, o que permite um controle da amplitude da vibração da ponta, ou seja, da energia ultra-sónica.

Apesar do seu enorme potencial, uma vez que a sonda deve ser imersa no meio líquido, tem uma possibilidade de contaminação maior, quer a partir de aplicações anteriores, quer a partir do material metálico da ponta.

A extracção assistida por ultra-sons (UAE) alcançou uma grande popularidade como um método de preparação de amostras simples, eficiente e rápido na determinação de elementos traço. O uso de sondas ultra-sónicas permitiu focalizar a energia na amostra, proporcionando uma alta eficiência [80].

➤ Comparação entre os vários dispositivos de ultra-sons

Na Figura 6 estão apresentadas as intensidades de sonicação correspondentes aos três dispositivos anteriormente apresentados.

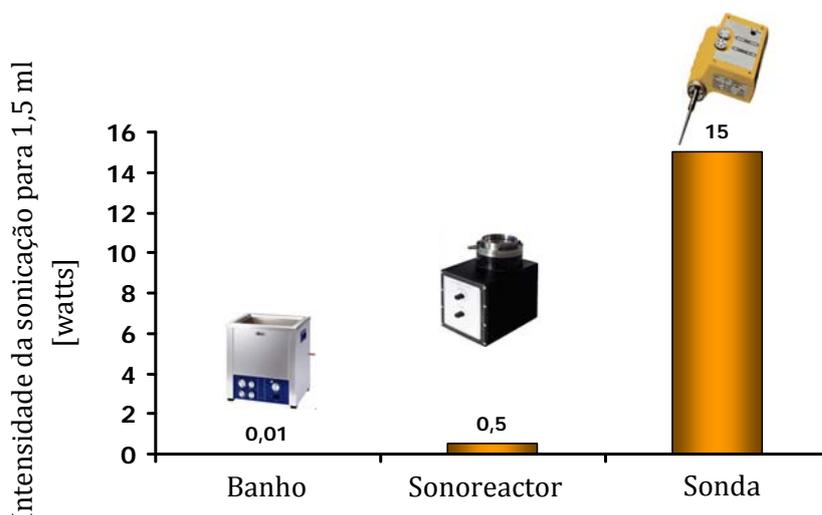


Figura 6: Comparação entre os dispositivos de ultra-sons [86].

O banho de ultra-sons, pelo facto de possuir um baixo poder de irradiação [85] aliado a uma distribuição não homogénea da intensidade dos ultra-sons [82], não é uma ferramenta poderosa pelo que não foi utilizada neste trabalho.

O sonoreactor é uma boa alternativa para se evitar os problemas de contaminação associados à sonda. No entanto, como é uma sonicação indirecta, a intensidade de sonicação não é a desejada para este trabalho, pelo que das várias técnicas de ultra-sons disponíveis a extracção assistida por ultra-sons com sonda, é a mais adequada para este trabalho. Para se evitar as contaminações, entre cada utilização a ponta é descontaminada com uma solução de 20% de ácido nítrico e depois passada por água Milli-Q.

Em relação aos outros pré-tratamentos referidos, a técnica MAD reúne as características necessárias a determinação da concentração de chumbo no sangue, o que aliado às suas vantagens faz com que esta técnica seja adequada para este trabalho. Além disso os ultra-sons em soluções ácidas diluídas e a digestão ácida assistida por radiação de microondas ou por calor

são as técnicas normalmente usadas para libertar os analitos da matriz biológica. Logo além da técnica UAE, foi também utilizada a técnica MAD em frasco fechado neste trabalho.

4- Métodos Experimentais

Com o objectivo de estruturar o procedimento experimental a seguir na utilização da técnica ETAAS, foram estudados alguns procedimentos na literatura, de modo se conhecer os pré-tratamentos, técnicas e procedimentos usados na determinação da concentração de elementos traço no sangue, nomeadamente do chumbo, usando a técnica ETAAS. Passamos a descrever a aplicação de alguns destes procedimentos efectuados por diversos autores.

❖ Procedimento A

Este procedimento foi baseado num estudo desenvolvido por Viitak *et al.* [53].

- **Reagentes:** HNO₃ 66% pureza, HCl 36-38 % pureza (para análise de vestígios de metal), H₂O₂ 35% pureza e Milli-Q (água de elevada pureza desionizada obtida por um sistema de purificação).
- **Procedimento:** mineralização de 2 mL de sangue com 3 mL de HNO₃ concentrado e 1mL de H₂O₂ concentrado, num forno de microondas, com bombas de Teflon, com temperatura até 180°C durante 30min. Após o arrefecimento das bombas, transferir as soluções para balões volumétricos de 25 mL com água.

A concentração da solução do modificador é de 1 mg/L. Os parâmetros instrumentais e programas de temperatura para a medição de absorção atómica estão indicados nas Tabelas 4 e 5, respectivamente.

Elemento	Pb
Comprimento de onda [nm]	283,3
Largura de Banda [nm]	0,5

Tabela 4: Parâmetros instrumentais para a determinação de Pb por ETAAS [53].

Etapa	Temperatura para o Pb [°C]	Tempo [s]	Fluxo de ar [l/min]
Secagem	110	5.0	3.0
Secagem	110	20.0	3.0
Secagem	130	10.0	3.0
Pirólise	700	10.0	3.0
Pirólise	700	25.0	3.0
Pirólise	700	6.2	0
Atomização	2000	0.7	0
Atomização	2000	3.0	0
Limpeza	2300	2.0	3.0

Tabela 5: Programas de temperatura usados para a determinação de chumbo por ETAAS [53].

❖ Procedimento B

Este procedimento foi baseado num estudo desenvolvido por Biasino *et al.* [87].

- **Reagentes:** dissolução da amostra: hidróxido de sódio (NaOH) (98% pureza) e H₂O₂ (30% V/V pureza); agente anti-espumante: Octanol (99% pureza); amostras padrão: 1000 mg/L de solução de chumbo; solução do modificador: 5000 mg/L de NH₄H₂PO₄, 300mg/L de Mg(NO₃)₂.6H₂O (99% pureza) e 0,2% HNO₃ (65%). Utiliza-se água destilada e desionizada com resistividade 18mΩ ao longo de todo o procedimento.
- **Preparação das amostras padrão e branco:** medir aproximadamente 2g de amostras de sangue total com exactidão num balão volumétrico de 150 mL; adicionar 3 mL de solução NaOH 0,2mol/L e 2 gotas de octanol, seguidas da adição de 1 mL de H₂O₂. Agitar manualmente o balão para promover a oxidação da amostra e em seguida perfazer o volume com água destilada e desionizada. Para a calibração padrão aquosa das soluções padrão de Pb preparar diluições de 1000 mg/L de solução de chumbo Tritisol. Usando o método padrão para a calibração, misturar cuidadosamente 1300 µL de cada solução da amostra de sangue, num amostrador automático com frascos de 200 µL contendo 5, 20, 50 e 100 µg/L de Pb. Usar uma solução com H₂O₂, 1-octanol e água destilada e desionizada, nas mesmas proporções que as amostras, como branco.

Procedimento	Quantidade de amostra	Reagentes	Instrumentação	Estabilidade da solução	Tempo [min]
Complexação APDC e extracção MIBK	5,0	APDC, MIBX, Triton X-100	Centrifugação	Instável, deve ser usado dentro de 1h após a preparação	20
Diluição ácida	2,0	HNO ₃ , Triton X-100	Agitação mecânica	Estável até 24h	60
Digestão ácida assistida por microondas	1,0	HNO ₃	Forno microondas	Estável até 24h	45
Digestão ácida assistida por microondas	1,0	HNO ₃ , H ₂ O ₂	Forno microondas	Estável até 24h	45
Peróxido de hidrogénio em dissoluções de meio básico	2,0	NaOH, H ₂ O ₂ , 1-octanol	Nada	Estável até 24h	3

Tabela 6: Comparação de alguns métodos usados em ETAAS [87].

- Este procedimento de preparação de amostras produz soluções límpidas, sem partículas insolúveis ou camadas gordurosas, em cerca de 3 minutos, sem necessidade de aquecimento. Este rápido processo de diluição é então adequado para a preparação de amostras onde se analisem elementos voláteis como o Pb e Hg.

- **Condições de atomização:** o Pb é estabilizado termicamente pela adição de 10 µL da solução do modificador. Não foi feita nenhuma tentativa para otimizar o programa padrão de aquecimento proposto para o Pb, excepto a introdução de uma segunda etapa de secagem, necessária para melhorar a precisão dos resultados, e a extensão do tempo da etapa de limpeza nas primeiras medições, de modo a eliminar resíduos de carbono, observados na plataforma de grafite após poucos ciclos de atomização. Nas medições seguintes a formação de resíduos foi evitada pela adição de 10 µL de solução 1:1 água-metanol. O programa final de temperatura usado é mostrado na Tabela 7.

Etapa	Temperatura [°C]	Tempo Rampa [s]	Tempo Espera [s]	Fluxo de Ar [mL/min]
Secagem	110	5	20	250
Secagem	130	5	30	250
Incineração	850	10	20	250
Atomização	1500	0	5	0
Limpeza	2400	5	5	250

Tabela 7: Programa de temperatura para a determinação de chumbo por ETAAS [87].

❖ Procedimento C

Este procedimento foi baseado num estudo desenvolvido por Pineau *et al.* [88].

- **Reagentes:** solução de trabalho (100 mg/L) de padrão de chumbo: diluir 10mL de 1 mg/mL de padrão de chumbo com 100 mL de água desionizada; padrão aquoso de chumbo de 0,4 µg/mL: diluir volumes de 100 mg/L de HNO₃M padrão. Armazenar os padrões de chumbo em frascos de plástico de alta qualidade e refrigerados quando não estão a ser usados.
- **Medição GFAAS:** antes de se medir o sangue deve-se mistura-lo com um reagente de tratamento com 250 µL de HCl diluído em água (0,1 mol/L), com o objectivo de remover o chumbo dos eritrócitos. A concentração de Pb no sangue é determinada pelo método de adição calibrado, após a deterioração química por HNO₃M, modificado e adaptado para estabilizar a temperatura da plataforma do forno, ver na Tabela 8 as temperaturas usadas. Usar volumes de 20 µL como branco, padrão e amostras. Esta técnica foi validada pela participação num controlo de qualidade externa, conduzido pelo centro de toxilogia Quebec, num programa de comparação interlaboratorial.

Etapa	Temperatura [°C]	Tempo de Rampa [s]	Tempo de espera [s]	Fluxo de Ar [mL/min]
Secagem	120	20	30	250
Incineração	450	10	20	250
Atomização	1700	0	5	0
Limpeza	2400	1	2	250
Resfriamento	20	3	5	250

Tabela 8: Programa do forno para a determinação do chumbo no sangue total por GFAAS [88].

- Recuperação do Pb adicionado: o sangue foi obtido através de doadores voluntários. Antes de qualquer tratamento, as amostras são rastreadas para o antígeno Austrália, anticorpos HTLV III e patogêneos. A concentração de chumbo no sangue ($3,68 \pm 0,21 \mu\text{g/dL}$; $n=10$) foi determinada por GFAAS.

❖ Procedimento D

Este procedimento foi baseado num estudo desenvolvido por Grinberg *et al.* [89].

- Reagentes: solução de Pb (1000 mg/L), Tritisol, Triton X-100, HNO₃ 65% pureza, 10% (V/V) e Milli-Q.
- Procedimento: usar Árgon com 99,96% de pureza como gás de protecção. Ao longo da experiência usa-se água Milli-Q. O stock de solução de Pb (1000 mg/L) é preparado por diluições da concentração de Tritisol. As soluções analíticas foram preparadas por diluições convenientemente de 1000 mg/L da solução stock. O Triton X-100 e o ácido nítrico são usados como diluente da amostra. Todos os plásticos e vidros são limpos por imersão em 10% (V/V) HNO₃, pelo menos durante 24h e bem enxaguados com água Milli-Q antes de usa-los. As amostras de sangue foram colectadas em tubos heparinizados e congeladas a -20°C. O programa de temperatura usado segue na Tabela 9.

Etapa	Temperatura [°C]	Rampa [s]	Espera [s]	Taxa de Fluxo de Ar [ml/min]
1	90	1	10	300
2	120	10	10	300
3	Pirólise	10	20	300
4	20	1	9	300
5	Atomização	0	5	-
6	2500	1	5	300
7	20	1	5	300

Tabela 9: Programa de temperatura para o chumbo no sangue total e na urina [89].

Resumo

Procedimento	Reagentes	Solução padrão	Etapas	Modificador	Outros	Ref.
A	Acido nítrico 66% pureza, ácido clorídrico 36-38%, H ₂ O ₂ 35% pureza	1000 mg/L de Pb gradualmente diluído com HNO ₃ 4%	3 secagens (110-130 °C), 3 pirólises (700°C), 2 atomizações e 1 limpeza (2300 °C)	Pd coloidal (1mg/mL)	Uso de água destilada de elevada pureza	[53]
B	Dissolução da amostra: NaOH 98% pureza, H ₂ O ₂ 30% (V/V) pureza Agente anti-espumante: Octanol 99% pureza	1000 mg/L de Pb	2 secagens (110-130 °C), 1 incineração (850 °C), 1 atomização (1500 °C) e 1 limpeza (2400 °C)	5000 mg/L NH ₄ H ₂ PO ₄ , 300 mg/L Mg(NO ₃) ₂ 99%pureza, e 0,2% HNO ₃ 65%	Uso de água destilada e desionizada com resistividade 18MΩ; a formação de resíduos foi evitada pela adição de 10μL de solução 1:1 água-metanol	[87]
C	Diluentes: HNO ₃ M	100mg/L de Pb	Secagem (120°C), incineração (450°C), atomização (1700 °C), limpeza (2400 °C) e resfriamento (20 °C)	Não refere	As amostras foram armazenadas em frascos de plástico de alta qualidade e refrigerados quando não estão a ser usadas.	[88]
D	Diluentes da amostra: Triton X-100 e HNO ₃ 10% (V/V)	1000 mg/L de Pb, posteriormente preparado em varias diluições	7 etapas : 90 °C, 120 °C, pirólise, 20 °C, atomização, 2500 °C e 20 °C	Irídio como modificador permanente (para fins de comparação também se usou o modificador: 0,2% (m/V) NH ₄ H ₂ PO ₄ , 0,5% (V/V) Triton X-100, e 0,2% (V/V) HNO ₃	Uso de argon 99,96% pureza como gás de protecção; todos os plásticos e vidros foram lavados por imersão em HNO ₃ , pelo menos durante 24h e antes de se usar enxaguados com água destilada	[89]

Tabela 10: Resumo dos vários procedimentos para a determinação de chumbo no sangue.

5- Validação e Controlo Analítico

A obtenção de resultados fiáveis passa obrigatoriamente pela validação e controlo da qualidade do método analítico usado. No trabalho desenvolvido foi efectuado o controlo da qualidade de modo a garantir a exactidão dos resultados (controlo de qualidade externo) e garantir a precisão dos mesmos (controlo de qualidade interno) [90, 91].

❖ Limite de detecção

O limite de detecção (LOD) é definido como a concentração mínima de um elemento que é possível determinar numa amostra.

O LOD pode ser determinado pela seguinte equação:

$$\text{LOD} = x_0 + 3 \times s_0 ,$$

onde x_0 representa o valor médio de 30 leituras de brancos e s_0 o respectivo desvio padrão [90].

❖ Limite de quantificação

O limite de quantificação (LOQ) é o menor valor de concentração do analito que pode ser determinada com um nível aceitável de exactidão e precisão. Geralmente, o LOQ corresponde ao padrão de calibração de menor concentração (excluindo o branco).

O LOQ pode ser determinado pela seguinte equação:

$$\text{LOQ} = x_0 + 10 \times s_0 ,$$

onde x_0 representa o valor médio de 30 leituras de brancos e s_0 o respectivo desvio padrão [90].

❖ Precisão

A precisão corresponde à concordância entre os dados obtidos a partir de um método numa série de medidas. Esta grandeza é verificada através da repetição da medição de uma mesma amostra e é por norma caracterizada em termos do desvio padrão [9].

A precisão está muitas vezes associada com os termos de repetibilidade e reprodutibilidade. A repetibilidade relaciona-se com a repetição de medições que tenham sido obtidas do mesmo modo, ou seja, no mesmo laboratório, o mesmo operador e equipamento, num intervalo curto de tempo [91, 92]. A reprodutibilidade relaciona-se com a variação dos valores medidos na mesma amostra, com a mesma técnica, mas com diferentes operadores e equipamentos, num intervalo de tempo maior, por exemplo em dias diferentes [9].

❖ Exactidão

A exactidão relaciona-se com a concordância entre o resultado experimental e o verdadeiro valor da grandeza medida ou calculada [5]. Para se analisar a exactidão de um método analítico, recorre-se à medição de amostras padrão, que são amostras com elementos conhecidos e concentrações conhecidas [9].

❖ Ensaio em branco

A análise de ensaios em branco tem como objectivo avaliar contaminações provenientes do material, dos reagentes, do laboratório e de todo o processo de manipulação das amostras. Por esta razão, a análise de ensaios em branco é uma ferramenta importante de controlo de qualidade do método [5]. Os ensaios em branco são também essenciais para o controlo do LOD e/ou LOQ [5].

O ensaio em branco é feito exactamente os mesmos reagentes e nas mesma condições que todo o processo analítico das amostras, mas sem se usar a amostra, que neste caso é o sangue.

É muito importante haver rigor na etapa de limpeza e descontaminação do material de laboratório usado nas análises, caso contrário podem existir fontes de contaminação que vão alterar os resultados obtidos. Por isso, o material utilizado foi descontaminado com uma solução de ácido nítrico diluído (20% HNO₃) e posteriormente passado por água Milli-Q com uma resistividade de 18,30 mΩ. Sempre que possível foi usado material descartável de qualidade.

Tudo o que se adiciona a amostra é uma potencial fonte de contaminação, e por essa razão a água utilizada deve ser ultrapura e de qualidade superior e todos os reagentes usados devem ser de qualidade *Suprapur* ou equivalente [5]. Neste estudo foram seguidos estes critérios.

É importante que no laboratório o ar seja o mais limpo possível, uma vez que o ar é portador de vapores e poeiras que podem contribuir para a alteração dos resultados analisados.

❖ Ensaio em triplicado

Estes ensaios consistem na preparação de três ensaios da mesma amostra e de forma independente. Os ensaios em triplicado fornecem a informação sobre a homogeneidade das amostras estudadas, o modo como decorreu a fase de preparação das amostras e o estado de descontaminação do material usado [5].

❖ Materiais de referência certificados

Os Materiais de referência certificados (MRC) são materiais de referência que possuem o valor da concentração de um ou mais analitos e uma incerteza associada certificada [90]. O material de referência deve ser semelhante a amostra que se vai analisar, deve ser usado de forma idêntica às amostras e com o valor de certificação dentro da faixa de trabalho da análise [5].

A análise de MRC é uma ferramenta importante no processo de validação analítica, uma vez que constitui uma forma de avaliar a exactidão do método.

O padrão de chumbo no sangue usado neste trabalho foi o BCR - 634 *Human Blood* (sangue humano), adquirido ao *Institute for Reference Materials and Measurements - IRMM* (Bélgica). As suas características estão apresentadas na Tabela 11.

Após a análise do MRC, deve ser feita uma comparação entre o valor obtido e o valor certificado, e deve-se situar dentro do intervalo de incerteza do MRC. Se tal não se verificar, deve-se analisar as possíveis causas e eliminá-las.

Elemento	Valor certificado (µg/L)	Incerteza (µg/L)
Cd	1,4	0,4
Pb	46	5

Tabela 11: Características do padrão de sangue com chumbo do *IRMM* usado neste trabalho.

6- Materiais e Métodos

❖ Introdução

Neste trabalho foram estudados dois conjuntos de ratos da espécie *Rattus norvegicus*, vulgo *Wistar*. Um conjunto alimentado com uma dieta rica em chumbo desde o período fetal, através de água contaminada com acetato de chumbo a 0,2% (p/V), e um outro conjunto, neste caso de controlo, que foi alimentado com uma dieta normal. O regime de exposição ao chumbo foi baseado num estudo anterior validado por Bielaczyk *et al.* [1].

Salienta-se que não existe um modelo animal absolutamente equivalente para os efeitos do chumbo em sangue humano, sendo que os estudos animais são discutidos apenas na medida em que apoiam resultados em humanos.

❖ Equipamento e acessórios

Neste estudo foi usado um espectrómetro de absorção atómica [93] AAS ZEEnit 650 (Analytik Jena AG) equipado com aquecimento transversal do forno de grafite, correcção de fundo com Zeeman. O esquema do aparelho está representado na Figura 7.

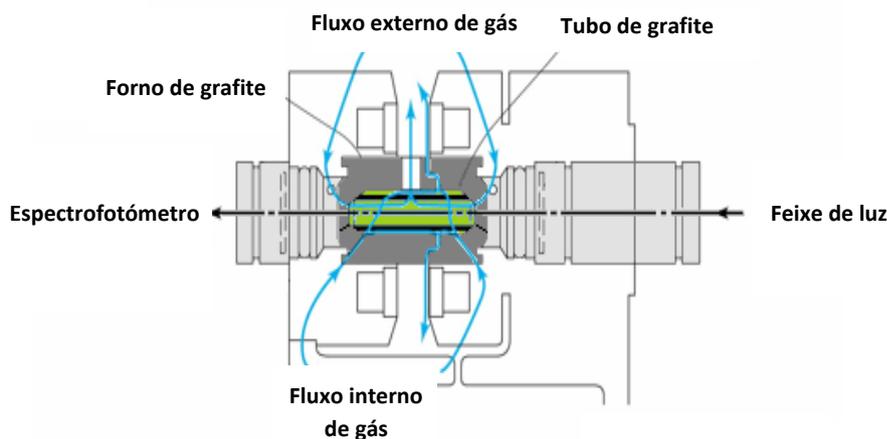


Figura 7: Esquema do aparelho de ETAAS (adaptado da Referência [94]).

Os tubos de grafite usados foram adquiridos na Analytik Jena AG. Um tubo de grafite permite, aproximadamente, 250 medições. Uma forma de saber quando se deve mudar o tubo é quando aparece uma variação superior a 10% na recta de calibração. Para purgar o gás foi usado Árgon comprimido (200 Bar e em termos de especificações $H_2O < 3$ ppm, $O_2 < 2$ ppm e $C_nH_m < 0,5$ ppm) da AlphaGaz Ar, Soc. Portuguesa do AR líquido “Arlíquido”.

Software WinAAS

Utilizou-se o software WinAAS para simplificar as operações do operador e otimizar a rotina de trabalho. As etapas necessárias ao funcionamento deste software estão descritas no Apêndice 1. As leituras foram feitas em absorvância integrada (área do pico). O volume injectado pela pipeta automática no tubo de grafite foi de 20 μ L para as amostras e para as soluções de calibração.

Programa de temperatura do forno de grafite

As etapas do programa do forno de grafite usado neste trabalho foram obtidas a partir do software WinAAS e estão apresentadas na Tabela 12, onde FP (do inglês *Full Power*) significa poder completo e corresponde ao máximo da rampa, e no esquema presente na Figura 8. As temperaturas escolhidas dependem de factores como o estado da câmara, a quantidade de matéria orgânica na amostra e o chumbo presente na amostra.

Etapa	Temp. (°C)	Tempo (s)	Rampa (°C/s)	Fluxo de Gás (mL/min)
1-Secagem	90	34,0	5	Max
2-Secagem	105	25,0	3	Max
3-Secagem	110	12,5	2	Max
4-Pirolise	900	13,2	250	Max
5-Auto-zero (AZRun)	900	4,0	0	-
6 - Atomização	1800	4,0	FP	-
7- Limpeza	2300	5,0	500	Max

Tabela 12: Programa do forno de grafite usado para determinar a PbS, por ETAAS.

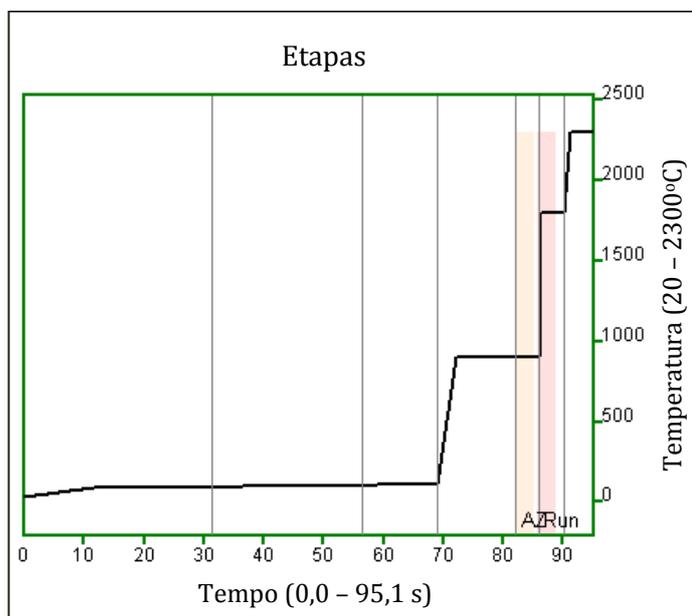


Figura 8: Programa do forno de grafite usado neste trabalho.

Lâmpada de cátodo oco

Nas medições foi usada uma lâmpada de cátodo oco para o elemento Pb. Na Tabela 13 estão apresentados alguns parâmetros usados nas medições com a técnica ETAAS.

Parâmetro	Pb
Comprimento de onda (nm) da lâmpada	217,0
Fenda (nm)	0,5
Corrente (mA) da lâmpada	4
Tipo de lâmpada	HCL

Tabela 13: Parâmetros instrumentais usados nas medições com a técnica ETAAS.

Amostrador automático MPE 60

O espectrómetro de absorção atômica usado está equipado com um amostrador automático MPE 60, tal como representado na Figura 9. Este sistema de amostragem automático permite um aumento na produtividade devido a automatização das calibrações, diluições e injeções sequenciais da amostra.



Figura 9: Amostrador automático MPE 60 [95].

❖ Reagentes

Os reagentes usados neste trabalho tinham elevado grau de pureza. Todas as soluções aquosas foram preparadas com água Milli-Q (resistividade de 18,30 mΩ), obtida através de um sistema Water Max, da Diwer Technologies, presente no laboratório. Neste trabalho foram também usados ácido nítrico *Suprapur* (65%), da Merck KGaA (Alemanha); peróxido de hidrogénio (30% p/V), da Panreac (Espanha), modificador de matriz Pd(NO₃)₂ da Analytikjena (Alemanha) e Triton X-100, da Riedel-de Haën (Alemanha). O padrão de chumbo usado (1000mg/L ± 4 mg/L) é da Fluka Analytical (Suíça).

❖ Soluções de Calibração

Na preparação das soluções de calibração foram usadas micropipetas reguláveis de 10 a 100 µL e de 100 a 1000 µL. As soluções de calibração usadas foram as seguintes:

- Branco 5%: usou-se um balão volumétrico de 10 mL com Milli-Q, 500 µL de HNO₃ e perfez-se com Milli-Q;
- Modificador de matriz: usou-se um copo da câmara de grafite (*vial* de 15 mL, da Analytikjena, Alemanha) com 980 µL de Milli-Q, 10 µL de HNO₃ e 10 µL do modificador de matriz Pd(NO₃)₂;
- Solução padrão: usou-se um balão volumétrico de 50 mL com Milli-Q, 600 µL de solução mãe (2,5 ppm Pb), 500 µL de HNO₃ e perfez-se com Milli-Q;
- Solução mãe (2,5 ppm Pb): usou-se um balão volumétrico de 100 mL com Milli-Q, 250 µL de padrão de chumbo, 1mL de HNO₃ e perfez-se com Milli-Q.

❖ Preparação das amostras

Na preparação das amostras também foram usadas micropipetas reguláveis de 10 a 100 µL e de 100 a 1000 µL. A preparação das amostras divide-se em três partes: recolha das amostras, digestão ácida das amostras assistida por microondas e extracção das amostras

assistida por ultra-sons. No procedimento para se dissolver o sangue utilizou-se H₂O₂ em meio ácido (HNO₃).

Recolha das amostras

A recolha das amostras de sangue foi efectuada no Instituto de Medicina Molecular – Instituto de Fisiologia (Faculdade de Medicina de Lisboa), onde os animais de ambos os grupos foram eutanasiados com uma overdose de pentobarbital de sódio (100 mg/mL/Kg) e submetidos a procedimentos cirúrgicos em conformidade com a legislação em vigor da União Europeia relativamente a experiências com animais.

Amostra/Rato	Data de Nascimento	Idade (meses)	Massa [g]	Sexo	Anticoagulante
E1 Pb	3/04/07	1	96	Masculino	Li-Heparin LH/ 2,7 mL
E3 Pb	3/04/07	1	70	Masculino	Li-Heparin LH/ 2,7 mL
E5 Pb	3/04/07	1	81	Masculino	Li-Heparin LH/ 2,7 mL
E7 N	1/04/07	1	116	Masculino	Li-Heparin LH/ 2,7 mL
G1 N	14/03/07	2	274	Masculino	EDTA KE / 4,9 mL
G2 N	14/03/07	2	260	Masculino	EDTA KE / 4,9 mL
G5 Pb	27/03/07	2	243	Feminino	Li-Heparin LH/ 2,7 mL
G7 +G8Pb	27/03/07	2	240	Feminino	EDTA KE / 4,9 mL
J1 Pb	3/04/07	3	280	Masculino	Li-Heparin LH/ 2,7 mL
J2 Pb	3/04/07	3	351	Masculino	Li-Heparin LH/ 2,7 mL
J5 N	1/04/07	3	291	Masculino	Li-Heparin LH/ 2,7 mL
H1 Pb	3/02/07	4	340	Feminino	Li-Heparin LH/ 2,7 mL
H3 Pb	27/04/07	4	490	Masculino	Li-Heparin LH/ 2,7 mL
H4 N	7/02/07	4	358	Feminino	Li-Heparin LH/ 2,7 mL
F1 Pb	3/04/07	5	455	Masculino	Li-Heparin LH/ 2,7 mL
F4 N	6/12/06	5	225	Feminino	EDTA KE / 4,9 mL
I1 Pb	18/12/06	6	460	Masculino	Li-Heparin LH/ 2,7 mL
I2 Pb	18/12/06	6	383	Masculino	Li-Heparin LH/ 2,7 mL
I4 N	6/12/06	6	275	Feminino	Li-Heparin LH/ 2,7 mL
D1 Pb	8/04/06	11	444	Masculino	Li-Heparin LH/ 2,7 mL
D2 Pb	8/04/06	11	548	Masculino	Li-Heparin LH/ 2,7 mL
D4 N	10/04/06	11	552	Masculino	Li-Heparin LH/ 2,7 mL
D5 N	10/04/06	11	578	Masculino	Li-Heparin LH/ 2,7 mL

Tabela 14: Caracterização dos Ratos *Wistar* recolhidos.

Na Tabela 14 estão listadas as características dos ratos recolhidos como identificação do rato, data de nascimento, idade, massa, sexo e o anticoagulante que foi adicionado ao sangue. As amostras G7 Pb e G8 Pb (2 meses) foram recolhidas para o mesmo tubo devido à pequena quantidade de amostra.

As amostras rotuladas com “N” correspondem aos ratos de controlo, isto é, aos ratos que não foram contaminados com chumbo, as amostras rotuladas com “Pb” correspondem os ratos contaminados com acetato de chumbo na água.

O sangue foi centrifugado e recolhido em tubos com uma dose sólida *standard* de heparina sódica. A centrifugação foi feita com 1700 rpm durante 20 minutos. Na recolha de

sangue foram utilizadas seringas 100 Sterican da Braun, com um diâmetro de 0,45 mm e um comprimento de 12 mm.

Posteriormente, as amostras foram transportadas para o laboratório de Física Atômica e Molecular na Faculdade de Ciências e Tecnologia (Universidade Nova de Lisboa), onde foram armazenadas num frigorífico a 2°C.

A razão pela qual existem poucas amostras de sangue de ratos contaminados deve-se ao facto de os animais terem que permanecer em gaiolas metabólicas individualizadas para se efectuar a recolha simultânea do sangue, da urina e das fezes.

Digestão Ácida assistida por Microondas (MAD)

Foram seleccionadas três amostras de sangue com base na maior quantidade de sangue disponível: G7+G8 Pb, J1 Pb e I1 Pb. Foi utilizado o equipamento de microondas MW314, da *Even Microwave Distribution* (EMD). O procedimento efectuado foi o seguinte:

- Pipetou-se um volume de 100 µL de sangue de cada amostra para um vaso de teflon, após estas terem sido agitadas manualmente;
- Adicionou-se 50 µL de H₂O₂ e aguardou-se 15 minutos;
- Adicionou-se 2 mL de HNO₃ e aguardou-se mais 15 minutos;
- Introduziu-se o vaso de teflon num frasco de digestão, o qual permaneceu no microondas durante 3 minutos;
- Esperou-se mais de 2 horas para se abrir o vaso, de modo ao vaso de teflon atingir a temperatura ambiente antes de se abrir;
- Removeu-se cuidadosamente a tampa do vaso de teflon;
- Pipetou-se a solução para um balão de 5 mL e perpez-se com uma solução de 5% de HNO₃;
- Repetiu-se este procedimento três vezes para a mesma amostra;
- Guardaram-se as amostras num refrigerador a 4°C, durante 2 ou 3 dias;
- Para cada amostra foi feito um ensaio em branco.

Após este procedimento seguiu-se a determinação da PbS, utilizando a técnica ETAAS. Um pequeno volume (500µL) de cada amostra foi pipetado para os copos do mostrador automático para análise por absorção atómica.

Extracção assistida por ultra-sons (UAE)

Foram utilizadas as mesmas amostras de sangue que na MAD (G7+G8 Pb, J1 Pb e I1 Pb), de modo a posteriormente se fazer uma comparação entre as técnicas MAD e UAE.

A sonda usada está representada na Figura 10, e corresponde ao modelo UP 200S (200W, 24 kHz) da *Hielscher*.



Figura 10: Sonda UP 200S da *Hielscher*, usada neste estudo [96].

O procedimento efectuado foi o seguinte:

- Pipetou-se um volume de 250 μL de sangue de cada amostra para um eppendorf, após as amostras terem sido agitadas manualmente;
- Adicionou-se 200 μL de HNO_3 e sonicou-se durante 4 minutos e arrefeceu-se em gelo;
- Adicionou-se 20 μL de H_2O_2 , sonicou-se durante 1 minuto e arrefeceu-se em gelo,
- Repetiu-se esta última parte do procedimento mais 4 vezes até completar um total de 100 μL de H_2O_2 .

Não foi possível continuar a utilizar este método uma vez que as proteínas do sangue desnaturavam e era impossível continuar a trabalhar com o sangue com esta técnica. Em primeiro lugar, experimentou-se substituir o ácido nítrico por ácido acético, pelo facto do ácido acético ser um ácido mais fraco, e provocar uma alteração do pH mais suave, impedindo as proteínas de desnaturar. Como resultado a amostra deixou de desnaturar. No entanto, tal como se pode observar na Tabela 15, quando se compara os resultados MAD, conclui-se que o ácido acético não é suficientemente forte para promover a libertação do chumbo, pelo que esta opção foi abandonada.

Amostra (nº da medição)	Ácido	PbS [$\mu\text{g/L}$]	Média da PbS [$\mu\text{g/L}$]	Resultado MAD da PbS [$\mu\text{g/L}$]
G7 + G8 Pb (1)	Acético	11 \pm 3	12 \pm 2	(35 \pm 2) \times 10
G7 + G8 Pb (2)	Acético	13 \pm 2		
G7 + G8 Pb (3)	Acético	13 \pm 4		

Tabela 15: Resultados obtidos com UAE usando o ácido acético.

Posteriormente, utilizou-se um detergente para provocar a lise mecânica e química da amostra, sem alteração do pH, com o objectivo de após o rebentamento das membranas das células o chumbo se libertar do interior da célula.

Após consultar alguns protocolos decidiu-se usar o detergente Triton X-100. Seguiu-se o procedimento descrito a seguir:

- Preparou-se uma solução de Triton X-100 com 50 μL de HNO_3 , 50 mL de Milli-Q e 250 μL de Triton X-100;
- Pipetou-se um volume de 50 μL de sangue de cada amostra para um eppendorf, após as amostras terem sido agitadas manualmente;
- Adicionou-se 500 μL de solução de Triton X-100 e sonicou-se durante 1 minuto;
- Centrifugou-se o conteúdo durante 30 minutos a 125000 rotações por minuto;
- Pipetou-se o sobrenadante para outro eppendorf e centrifugou-se durante 5 minutos;
- Adicionou-se 100 μL de HNO_3 , sonicou-se durante 2 minutos e arrefeceu-se em gelo;
- Adicionou-se 15 μL de H_2O_2 , sonicou-se durante 40 segundos e arrefeceu-se em gelo;
- Repetiu-se esta última parte do procedimento mais 3 vezes até completar um total de 60 μL de H_2O_2 ;
- Repetiu-se este procedimento três vezes para a mesma amostra;
- Guardaram-se as amostras num refrigerador a 4º C, durante 2 ou 3 dias;
- Para cada amostra foi feito um ensaio em branco.

Após este procedimento seguiu-se a determinação da PbS, utilizando a técnica ETAAS. O volume total de cada amostra foi pipetado para os copos do mostrador automático para análise por absorção atômica.

7- Resultados e Discussão

As medições no espectrómetro, produzem um relatório com a informação correspondente às amostras. O modo como este relatório é obtido está descrito no Anexo deste documento. Para se determinar a concentração final de chumbo no sangue é necessário realizar um tratamento de resultados uma vez que os dados obtidos pelo espectrómetro de absorção atômica são expressos em termos de absorvância de chumbo no sangue. Cada amostra é medida três vezes no espectrómetro, sendo feita posteriormente a média das três medidas.

❖ Estudos realizados

Foram medidos experimentalmente o limite mínimo de detecção, a exactidão e a repetibilidade, de modo a se saber as limitações do método escolhido.

Recta de Calibração

Para se obter a recta de calibração mede-se o valor de absorvância para cada uma das seis concentrações pré-definidas ([0, 6, 12, 18, 24 e 30]µg/L). Na Tabela 16 estão listadas, a título de exemplo, os valores obtidos num dos dias. Posteriormente, calcula-se uma regressão linear utilizando os pares de dados acima referidos.

<i>i</i>	Concentração [µg/L] (x_i)	Absorvância (y_i)
1	0	0,002885
2	6	0,03583
3	12	0,06647
4	18	0,09604
5	24	0,1236
6	30	0,1519

Tabela 16: Valores da concentração e absorvância da recta de calibração nº 5.

Na Tabela 17 estão listadas as rectas de calibração obtidas em cada dia de medições, a média do declive (m), a média da ordenada na origem (b) e o coeficiente de correlação das respectivas rectas.

Nº da Recta	Equação da Recta	$m (\times 10^{-3})$	$b (\times 10^{-3})$	Coefficiente de Correlação
1	$y = (5,083x + 3,207) \times 10^{-3}$	4,949	6,140	0,9950
2	$y = (4,687x + 5,534) \times 10^{-3}$	4,687	5,534	0,9968
3	$y = (5,390x + 6,118) \times 10^{-3}$	5,390	6,118	0,9977
4	$y = (5,067x + 7,574) \times 10^{-3}$	5,067	7,574	0,9972
5	$y = (4,943x + 5,315) \times 10^{-3}$	4,943	5,315	0,9990
6	$y = (4,994x + 7,894) \times 10^{-3}$	4,994	7,894	0,9942
7	$y = (4,611x + 8,140) \times 10^{-3}$	4,611	8,140	0,9978
8	$y = (4,784x + 6,274) \times 10^{-3}$	4,784	6,274	0,9959
9	$y = (4,759x + 6,843) \times 10^{-3}$	4,759	6,843	0,9948
10	$y = (4,846x + 4,444) \times 10^{-3}$	4,846	4,444	0,9985
	Média	4,903	6,428	
	Desvio Padrão	0,223	1,190	

Tabela 17: Rectas de calibração usadas neste trabalho.

Para se determinar a recta de calibração característica do método escolhe-se a recta com um m e b mais próximo do m médio e b médio, respectivamente. No presente trabalho, foi escolhida a recta de calibração nº 5, evidenciada a azul na Tabela 17.

Na Tabela 16 estão listados os valores conduziram à recta de calibração característica. Para estes valores temos que o número de medições é $n=6$, a média da concentração é $\bar{x} = 15 \mu\text{g/L}$ e a média da absorvância é $\bar{y} = 0,007945$. A incerteza associada aos coeficientes da referida recta foi calculada utilizando as seguintes expressões [97]:

$$DP(m) = \sqrt{\frac{(\sum_{i=0}^n y_i^2 - n\bar{y}^2) - (m)^2(\sum_{i=0}^n x_i^2 - n\bar{x}^2)}{(n-2)\sum_{i=0}^n x_i^2 - n\bar{x}^2}} \quad \text{e} \quad DP(b) = \sqrt{\frac{(\sum_{i=0}^n y_i^2 - n\bar{y}^2) - (b)^2(\sum_{i=0}^n x_i^2 - n\bar{x}^2)}{(n-2)\sum_{i=0}^n x_i^2 - n\bar{x}^2}},$$

onde DP é o desvio padrão.

A recta de calibração característica do método e a respectiva incerteza é:

$$y = (4,94 \pm 0,08) \times 10^{-3} x + (5,31 \pm 1,45) \times 10^{-3}.$$

Limite de Detecção e de Quantificação

Para se calcular o LOD e o LOQ é necessário usar a recta de calibração característica do método. Os resultados obtidos para o LOD e LOQ estão listados na Tabela 18, respectivamente.

LOD	$0,67 \pm 0,06 \mu\text{g/L}$
LOQ	$3,83 \pm 0,05 \mu\text{g/L}$

Tabela 18: Limites de Detecção e Quantificação obtidos neste estudo.

Exactidão

Para se verificar a exactidão do método experimental efectuou-se um estudo quantitativo da amostra – padrão, cujas especificações estão listadas no Anexo. Na Tabela 19 estão listados, respectivamente, os valores medidos e certificados da concentração de chumbo no sangue. Como se pode verificar o método é bastante exacto para as amostras biológicas em questão, visto existir sobreposição das barras de erro dos dois resultados.

Amostra – Padrão	Elemento	Concentração Medida [$\mu\text{g/L}$]	Concentração Certificado [$\mu\text{g/L}$]
BCR-634 Human Blood	Pb	47 ± 3	46 ± 5

Tabela 19: Estudo da Exactidão.

Repetibilidade

Para se estudar a repetibilidade do método experimental efectuaram-se 4 medições da mesma amostra, neste caso do rato correspondente à amostra H3 Pb. Os resultados obtidos estão apresentados na Tabela 20. A incerteza associada às 4 medições da amostra H3 Pb é inferior a 3%, um valor considerado baixo, pelo que se pode verificar a repetibilidade do método.

Nº da medição	Amostra	Elemento	Concentração Medida [$\mu\text{g/L}$]
1	H3 Pb	Pb	258 ± 25
2	H3 Pb	Pb	265 ± 21
3	H3 Pb	Pb	257 ± 10
4	H3 Pb	Pb	266 ± 10

Tabela 20: Estudo da Repetibilidade.

❖ Tratamento de Resultados

O primeiro passo no tratamento de dados consiste em subtrair a absorvância do respectivo branco (A_{Branco}) à absorvância do chumbo no sangue medida (A_{Sangue}). Obtendo-se assim o valor $A_{\text{Sangue-Branco}}$. De seguida, calcula-se a concentração de chumbo no sangue (C_{Sangue}), através da equação da recta de calibração:

$$A_{\text{Sangue-Branco}} = mC_{\text{Sangue}} + b \Leftrightarrow C_{\text{Sangue}} = \frac{A_{\text{Sangue-Branco}} - b}{m}$$

A concentração de chumbo obtida ainda não é a concentração final visto que as amostras durante o procedimento experimental foram diluídas. Para obter as concentrações pretendidas recorrer-se à expressão:

$$C_i V_i = C_f V_f ,$$

onde C_i é a concentração inicial que vai corresponder a C_{Sangue} , V_i é o volume inicial que corresponde ao volume de sangue pipetados inicialmente, C_f é a concentração final que neste caso é o que se pretende calcular, e corresponde a concentração final de chumbo no sangue $C_{\text{Sangue Final}}$ e V_f é o volume final e corresponde ao volume final da solução. Após se obter $C_{\text{Sangue Final}}$ e uma vez que temos várias medições para a mesma amostra temos que calcular o correspondente valor médio, obtendo-se a concentração de chumbo na amostra $C_{\text{Sangue Final Média}}$.

Digestão Ácida assistida por Microondas (MAD)

Seguindo todos os passos descritos no início da secção do tratamento de resultados, para o cálculo da concentração final de chumbo no sangue, obteve-se a expressão:

$$C_{\text{Sangue}} \times 100\mu\text{L} = C_{\text{Sangue Final}} \times 5000\mu\text{L} \Leftrightarrow C_{\text{Sangue Final}} = \frac{C_{\text{Sangue}}}{50\mu\text{L}}$$

onde os 100 μL e os 5000 μL correspondem ao volume de sangue pipetado e volume do balão volumétrico usado, respectivamente.

Extracção assistida por ultra-sons (UAE)

Seguindo todos os passos descritos no início da secção do tratamento de resultados, para o cálculo da concentração final de chumbo no sangue, obteve-se a expressão:

$$C_{\text{Sangue}} \times 50\mu\text{L} = C_{\text{Sangue Final}} \times 710\mu\text{L} \Leftrightarrow C_{\text{Sangue Final}} = \frac{C_{\text{Sangue}} \times 50\mu\text{L}}{710\mu\text{L}}$$

onde os 50 μL correspondem ao volume de sangue pipetado e os 710 μL a soma do volume de solução de Triton X-100, de HNO_3 e de H_2O_2 ($500+100+60=710 \mu\text{L}$).

Cálculo da média e respectiva incerteza da PbS

O cálculo da média das medições da concentração de chumbo no sangue foi baseado na teoria de combinação de erros de múltiplas medidas [98], segundo a qual, considerando medidas múltiplas x_1, x_2, \dots, x_i de uma quantidade x , com incertezas $\sigma_1, \sigma_2, \dots, \sigma_i$, a melhor estimativa para o valor da quantidade x é a média ponderada dada pela seguinte expressão:

$$\bar{x}_{pond} = \frac{\sum w_i x_i}{\sum w_i} \quad (i = 1, 2, \dots, n) ,$$

onde

$$w_i = \frac{1}{\sigma_i^2} .$$

A incerteza da média ponderada σ_{pond} é dada por:

$$\sigma_{pond} = \frac{1}{\sqrt{\sum w_i}} .$$

❖ Resultados Finais

Os resultados obtidos para a $C_{\text{Sangue Final Média}}$ estão listados nas Tabelas 21 e 22 e representados nas Figuras 11-13.

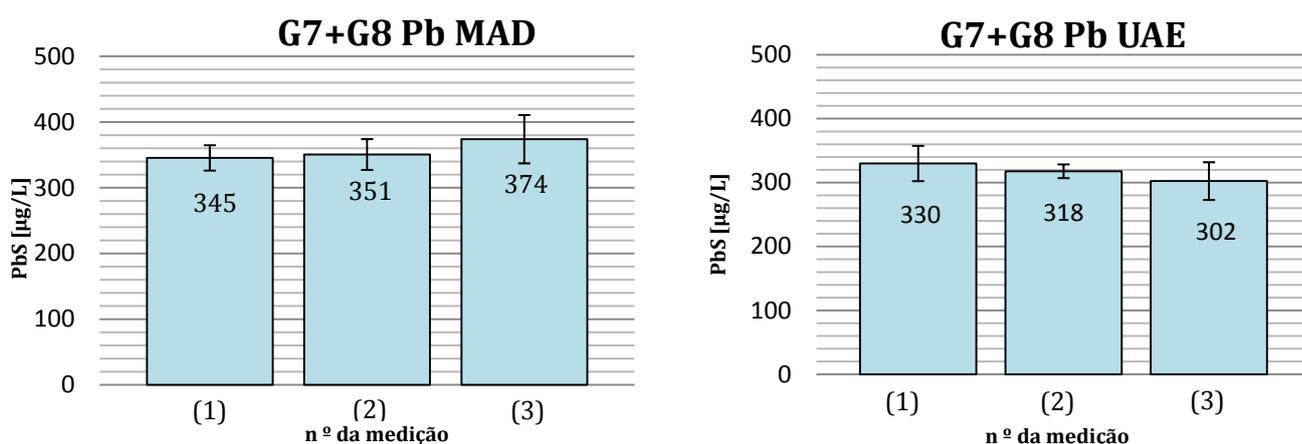


Figura 11: Resultados das três medições obtidas MAD (esquerda) e UAE (direita) da PbS da amostra G7+G8 Pb (2 meses).

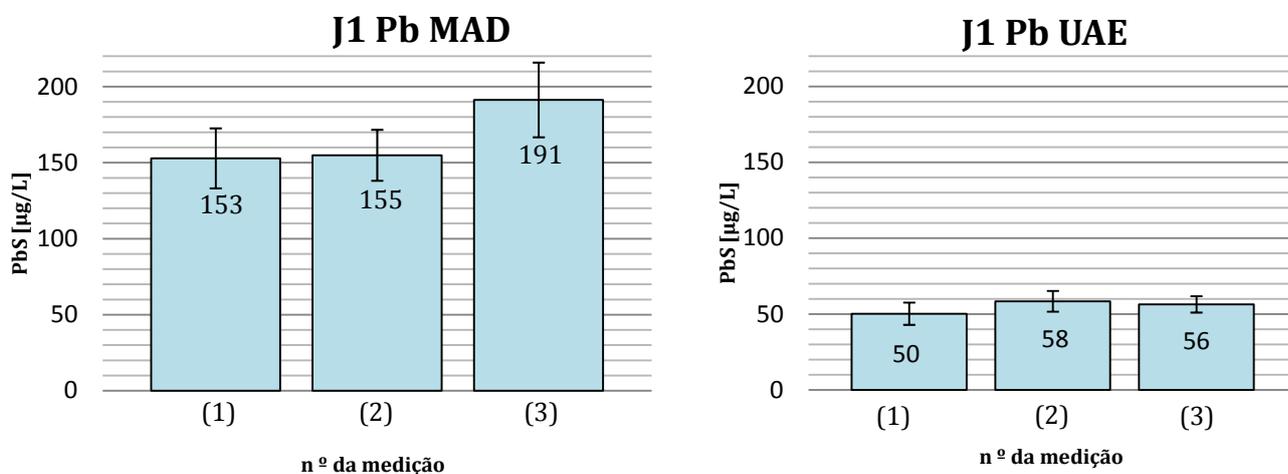


Figura 12: Resultados das três medições obtidas MAD (esquerda) e UAE (direita) da PbS da amostra J1 Pb (3 meses).

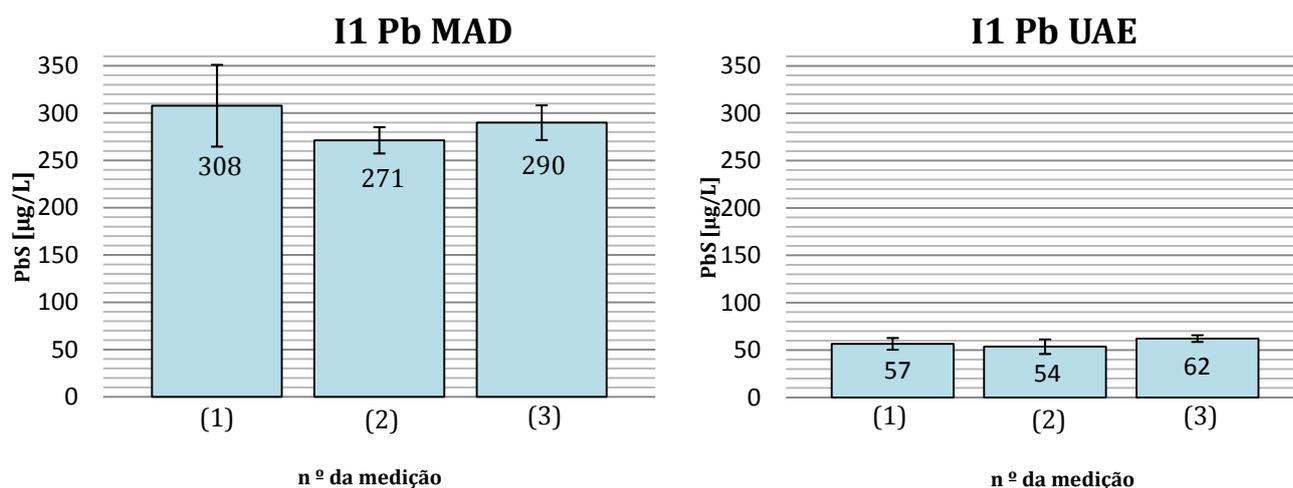


Figura 13: Resultados das três medições obtidas MAD (direita) e UAE (esquerda) da PbS da amostra I1 Pb (6 meses).

Cada medição da concentração de chumbo no sangue é obtida utilizando a recta de calibração desse dia. Verificou-se que a incerteza sistemática associada aos ensaios de cada medição é inferior a 5%.

Na Tabela 21 estão listados os resultados obtidos pelos dois métodos de preparação de amostras, MAD e UAE.

Amostra	Nº da medição	Elemento	MAD PbS [$\mu\text{g/L}$]	UAE PbS [$\mu\text{g/L}$]
G7 + G8 Pb	1	Pb	$(35 \pm 2) \times 10$	$(33 \pm 3) \times 10$
	2	Pb	$(35 \pm 3) \times 10$	$(32 \pm 1) \times 10$
	3	Pb	$(37 \pm 4) \times 10$	$(30 \pm 3) \times 10$
J1 Pb	1	Pb	$(15 \pm 2) \times 10$	$(5 \pm 1) \times 10$
	2	Pb	$(16 \pm 2) \times 10$	$(6 \pm 1) \times 10$
	3	Pb	$(19 \pm 3) \times 10$	$(6 \pm 1) \times 10$
I1 Pb	1	Pb	$(31 \pm 5) \times 10$	$(6 \pm 1) \times 10$
	2	Pb	$(27 \pm 2) \times 10$	$(5 \pm 1) \times 10$
	3	Pb	$(29 \pm 2) \times 10$	$(6 \pm 1) \times 10$

Tabela 21: Comparação entre preparação das amostras por MAD e por UAE.

Comparando os dois métodos, é possível observar que para a mesma amostra, com a técnica MAD os valores da PbS são mais elevados do que com a técnica UAE. Isto significa que com a técnica MAD se consegue extrair mais chumbo do sangue. Por esta razão, foi escolhida a técnica MAD para analisar a concentração de chumbo nas restantes amostras de sangue.

Os resultados das medições da concentração de chumbo no sangue estão listados na Tabela 22, onde BDL (do inglês *Bellow Detection Limit*) significa que a concentração é inferior ao limite de detecção. Os resultados da PbS das amostras de controlo (G2 N, J5 N, H4 N e D5 N) não estão representados na Tabela 22 porque os valores obtidos são inferiores ao limite de detecção. Num dos ensaios houve desnaturação das proteínas do sangue da amostra H1 Pb, indicada na Tabela 22 com o símbolo *, pelo que esta amostra ficou inutilizada e não foi possível determinar a sua concentração de chumbo.

Idade	Amostra	PbS [ppb]	Médias PbS [$\mu\text{g/L}$] (ratos contaminados)	Média das médias PbS [$\mu\text{g/L}$] (ratos contaminados)
2 meses	G7+G8 Pb	$(35 \pm 2) \times 10$	$(35 \pm 2) \times 10$	$(35 \pm 2) \times 10$
		$(35 \pm 3) \times 10$		
		$(37 \pm 4) \times 10$		
	G5 Pb	$(35 \pm 3) \times 10$	$(34 \pm 2) \times 10$	
		$(33 \pm 3) \times 10$		
		$(34 \pm 2) \times 10$		
3 meses	J1 Pb	$(15 \pm 2) \times 10$	$(16 \pm 2) \times 10$	$(28 \pm 1) \times 10$
		$(16 \pm 2) \times 10$		
		$(19 \pm 3) \times 10$		
	J2 Pb	$(29 \pm 1) \times 10$	$(30 \pm 1) \times 10$	
		$(30 \pm 1) \times 10$		
		$(32 \pm 1) \times 10$		
4 meses	H1 Pb	*	*	$(25 \pm 1) \times 10$
		*		
		*		
	H3 Pb	$(26 \pm 1) \times 10$	$(25 \pm 1) \times 10$	
		$(25 \pm 3) \times 10$		
		$(25 \pm 1) \times 10$		
6 meses	I1 Pb	$(31 \pm 5) \times 10$	$(28 \pm 2) \times 10$	$(26 \pm 1) \times 10$
		$(27 \pm 2) \times 10$		
		$(29 \pm 2) \times 10$		
	I2 Pb	$(22 \pm 2) \times 10$	$(24 \pm 1) \times 10$	
		$(22 \pm 3) \times 10$		
		$(25 \pm 1) \times 10$		
11 meses	D1 Pb	BDL	BDL	$(1,1 \pm 0,1) \times 10$
		BDL		
		BDL		
	D2 Pb	$(1,0 \pm 0,1) \times 10$	$(1,1 \pm 0,1) \times 10$	
		$(1,1 \pm 0,1) \times 10$		
		$(1,2 \pm 0,1) \times 10$		

Tabela 22: Valores da PbS nas várias amostras de sangue analisado.

❖ Análise de Resultados

Na realização deste estudo foi feito um ensaio em branco para cada conjunto de amostras analisadas no mesmo dia. Não foram aceites ensaios em branco com uma absorvância superior a 0,008 [33]; nesses casos repetiu-se a análise. Foram também realizados ensaios em triplicado de todas as amostras analisadas. Sempre que se verificasse um desvio superior a 15% repetia-se a análise. Isto permitiu eliminar possíveis contaminações e garantir o controlo de qualidade do método.

O estudo do LOD permitiu determinar o menor valor de concentração do analito que pode ser detectado pelo método [51], enquanto que o estudo do LOQ permitiu quantificar esse valor.

No estudo da exactidão realizado o método mostrou-se exacto uma vez que existe concordância entre os valores medidos e certificados.

Através do estudo da repetibilidade, foi possível verificar a precisão do método, uma vez que a repetição da mesma amostra produziu os mesmos resultados, pois estes intersectam-se todos em termos de desvio padrão.

Em relação aos resultados obtidos pela técnica MAD e UAE, como se pode observar nas Figuras 11-13, para cada amostra as barras de erro intersectam-se, o que indica que a técnica ETAAS é um método viável para determinar a concentração de chumbo no sangue. As barras de erro das amostras apresentadas na Tabela 22, apesar de não estarem representadas graficamente, também se intersectam.

No que diz respeito à concentração de chumbo nos animais de controlo, os resultados das medições foram abaixo do limite de detecção, o que indica que estes ratos não estavam contaminados com chumbo.

Ao longo dos vários meses esperava-se uma diminuição da concentração de chumbo no sangue dos ratos, uma vez que o chumbo ao longo do tempo deixa de estar disponível no sangue e é absorvido pelo organismo, onde é distribuído pelos órgãos e pelos ossos. O chumbo que não se armazena deixa o corpo pela urina ou fezes. Um estudo feito por Livesey *et. al.* [99] sobre a retenção de chumbo no sangue, após uma baixa exposição, em que a técnica usada também foi a espectrometria de absorção atômica, mostrou que entre 12 a 100 dias, verifica-se um aumento significativo dos níveis de chumbo no sangue seguido de um decréscimo exponencial.

Na Figura 14 estão apresentadas as PbS obtidas ao longo dos vários meses. Como se pode observar, a PbS nos ratos com 2 meses é muito superior à PbS nos ratos de 11 meses de idade, o que reflecte uma tendência de a concentração de chumbo no sangue diminuir ao longo dos vários meses. Em relação às PbS nos ratos com 3, 4 e 6 meses não se verificam grandes alterações, e as barras de erros intersectam-se todas. O facto de não se poder observar um decréscimo regular neste três meses pode ser devido à variabilidade biológica dos ratos e ao facto de o sangue dos ratos ter sido recolhido em 2006, razão pela qual as amostras já se encontravam coaguladas. A coagulação das amostras pode ser responsável por uma distribuição heterogênia do chumbo no sangue. Uma vez que este método só permite analisar a parte líquida do sangue, o facto de o sangue estar coagulado pode ter influência na análise das amostras e, conseqüente, na determinação da concentração de chumbo nestas. O facto de não se ter outra amostra de 4 meses disponível também trouxe algumas limitações no estudo da evolução temporal, pois só uma amostra de sangue é insuficiente para se tirar conclusões fundamentais.

Este trabalho foi apresentado na forma de poster na conferência Física 2010 – 17ª Conferência Nacional de Física. O resumo encontra-se no Apêndice 2 deste trabalho.

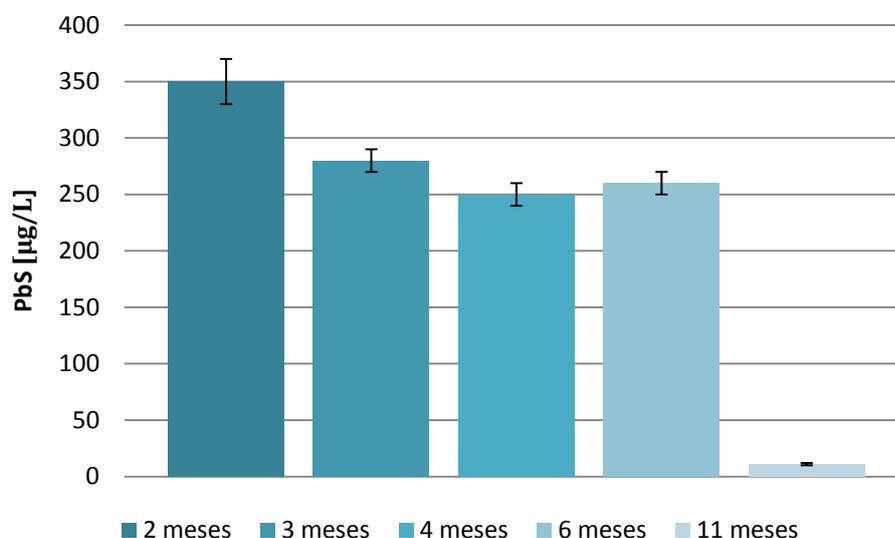


Figura 14: Evolução da concentração de chumbo no sangue ao longo do tempo.

8- Conclusões e Perspectivas Futuras

Neste trabalho foi efectuado um estudo sobre a concentração de chumbo presente no sangue de ratos *Wistar*. Para isso foram desenvolvidas duas metodologias de preparação das amostras sendo as análises posteriormente analisadas por espectrometria de absorção atómica em forno de grafite. As duas metodologias de preparação das amostras usadas foram a digestão ácida assistida por microondas em vaso fechado e a extracção assistida por ultra-sons. O método da digestão ácida assistida por microondas mostrou-se mais eficiente na determinação da concentração de chumbo no sangue pelo que foi o método seleccionado na análise das amostras de sangue disponíveis.

O método com que se trabalhou, tinha as seguintes características: limite de detecção de 0,67 ppb, limite de quantificação de 3,83 ppb, exactidão de 98,5% em relação ao valor certificado e precisão de 98,2% em relação a mesma amostra medida 4 vezes. Estas características permitem afirmar que este método é eficaz e viável na análise da concentração de chumbo no sangue.

As amostras de sangue dos ratos de controlo, alimentados com uma dieta sem chumbo, não apresentaram quantidades significativas de chumbo, resultados que estão de acordo com o esperado. Em relação ás amostras de sangue de ratos contaminados com chumbo, os valores obtidos da PbS neste estudo preliminar permitiram verificar uma tendência na concentração de chumbo diminuir ao longo dos meses.

Apesar de ser um estudo preliminar, este estudo é inovador, uma vez que é determinada a concentração de chumbo no sangue de ratos *Wistar* ao longo de vários meses, sujeitos a uma exposição continuada. Nos estudos já efectuados sobre a exposição ao chumbo, esta é estudada ao longo de apenas vários dias, e a exposição é interrompida antes do fim do estudo em questão.

No entanto, para se continuar a estudar a concentração de chumbo, como trabalho futuro é necessário efectuar-se mais testes para garantir a validade das conclusões, nomeadamente analisar a parte sólida do sangue, por exemplo, através da liofilização deste. É também importante aumentar o número de amostras de ratos *Wistar*, de modo a se analisarem mais ratos por mês e de diferentes meses, com o objectivo de diminuir erros associados a variabilidade biológica dos ratos, e se poder confirmar, ou não, a tendência detectada neste trabalho.

Além do sangue, futuramente, também se pretende analisar outros tecidos, como o pêlo dos ratos, uma vez que é um método não invasivo de detecção da concentração de chumbo no organismo. Após se efectuarem os estudos com o pêlo dos ratos, o objectivo é analisar amostras de cabelo humano, de pessoas residentes em zonas propícias a existências de chumbo, como por exemplo, perto de regiões mineiras. Neste caso o método usado no cabelo seria o mesmo que o estudado no pêlo dos ratos.

9- Referências Bibliográficas

1. Bielarczyk, H., Tian X., Suszkiw J., Brain Res, 1996. 708: p.108.
2. McNaught, A.D. and A. Wikinson, *IUPAC Compendium of Chemical Terminology*. 2nd ed. 1997.
3. Marchi, G., L. Guilherme, and C. Silva, ISSN, 2009: p. 2176.
4. Mavropoulos, E., 1999, Escola Nacional de Saúde Pública da Fundação Oswaldo Cruz: Rio de Janeiro: p. 126.
5. Ribeiro, C., 2005, Universidade do Minho: Minho.
6. Lepera, J.S., *Disponível em*: <http://www2.grupogen.com.br/GBK/erratas/9788527714327d.pdf>
7. ATSDR, *Toxicological Profile for Lead*, in U. S. Department of Health and Human Services Public Health Service. 2005.
8. Korn, M.d.G.A., et al., Talanta, 2006. 69: p. 16.
9. Guimarães, D., 2007, Universidade Nova de Lisboa: Lisboa. p. 100.
10. Tong, S., Y.E. Schirnding, and T. Prapamontol, Bulletin of the World Health Organization, 2000. 78: p. 1068.
11. Hipkins, K.L., et al., 1998. 46: p. 330.
12. Larini, L., *Toxicologia*. 2ª ed, ed. E. Manole. 1993.
13. IPCS, *International Programme on Chemical safety. Environmental Health criteria 165 for Inorganic Lead*. 1995.
14. Matte, T.D., et al., *Jamaica*. Int. J. Epidemiol, 1989. 18: p. 874.
15. Romieu, I., M. Lacasana, and R. McConnell, 1997. 105: p. 398.
16. Leite, E., 2006, Universidade Federal de Minas Gerais - Faculdade de Farmácia Minas Gerais.
17. Journal of the American Medical Association., January 1994. 271.
18. *Environmental Health Criteria 165: Inorganic Lead*. World Health Organization. 1995, Geneva: IPCS (International Programme on Chemical Safety).
19. Fergusson, J.E., New York, 1990.
20. Chatt, A. and S.A. Katz, New York, 1988.
21. Borella, K., et al., Mikrochim Acta, 1996. 123: p. 271.
22. Bozsai, K., Microchem. J., 1992. 46: p. 159.
23. Katz, S.A. and R.B. Katz, J. Appl. Toxicol., 1992. 12: p. 79.
24. Caroli, S., et al., Microchem. J., 1992. 46: p. 174.
25. Bencze, K., Fresenius J. Anal. Chem., 1990. 338: p. 58.
26. Caroli, S., et al., Crit. Rev. Anal. Chem., 1994. 24: p. 363.
27. Hsieh, H.-F., et al., Talanta, 2009. 79: p. 183.
28. Brito, J., 1995, Dissertação de Mestrado, Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa.

29. Cabrera, D.G. and M.D. Cureño, 2006. 23.
30. Saryan, L. and C. Zenz, *Lead and its compounds*. 3 ed. Occupational medicine., ed. B. Dickerson and E. Horvath. 1994, St. Luis, U.S.A: Mosby-Year Book.
31. Skerfving, S., *Inorganic Lead*. Criteria documents from the Nordic Expert Group, ed. B. Beije and P. Lundberg. 1993, Stockholm: Arbete och Halsa: p. 125
32. ATSDR, *Case studies in environmental medicine: lead toxicity*. , in U. S. Department of Health and Human services, *Public Health Service*. 1992: Atlanta, Georgia.
33. Couto, C.M., 1996, Universidade Federal da Bahia: Salvador - BA. p. 63.
34. Mortada, W., et al., *Am J Nephrol.*, 2001. 21: p. 274.
35. ATSDR, *Toxicological Profile for Lead*, in U. S. Department of Health and Human services, *Public Health Service*. 2005: Atlanta, Georgia.
36. Moreira, F. and J. Moreira, *Rev Panam Salud Publica*, 2004. 15: p. 119.
37. Alexander, B., et al., 1996. 56: p. 411.
38. Goyer, R., *Toxic effects of metals - lead*. 4 ed. Casareh and doull's toxicology - the basic science of poisons., ed. M. Amdur, J. Dull, and C. Klaassen. 1991, New York: Pergamon Press.
39. Tsalev, D.L. and Z.K. Zaprianov, *Atomic Absorption Spectrometry in Occupational and Environmentak Health Practice*. 2^a ed. Vol. 1. 1985.
40. Nashashibi, N., et al., 1999. 48: p. 158.
41. Berglund, M., et al., 2000. 219: p. 112.
42. Vivoli, G., et al., *J. Exp Anal Environ Epidemiol*, 1993. 3: p. 201.
43. Shen, X., S. Wu, and c. Yan, *Clin Chim Acta*, 2001. 313: p. 217.
44. Terayama, K., *Ind. Health*, 1993. 31: p. 113.
45. Mushak, P., et al., *Environ. Res.*, 1989. 50: p. 11.
46. Sardans, J., F. Montes, and J. Peñuelas, 2010. 65: p. 97.
47. Cadore, S., É. Matoso, and M. Santos, *Quim. Nova*, 2008. 31: p. 1522.
48. Pozebon, D., V. Dressler, and A. Curtius, *Quim. Nova*, 1999. 22: p. 838.
49. Reinaldo, C. and G. Patricia, *Quim. Nova*, 2001. 24: p. 220.
50. McShane, W.J., et al., *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy*, 2008. 63: p. 638.
51. Oliveira, R., 2009, Universidade Federal de Minas Gerais: Belo Horizonte.
52. Freschi, G., et al., 2000. 25.
53. Viitak, A. and A.B. Volynsky, *Talanta*, 2006. 70: p. 890.
54. Correia, P., C. Nomura, and P. Oliveira, *Revista Analytica*, 2003. 5: p. 52.
55. L'vov, B., 1984. 39: p. 149.
56. Fernandes, K.G., et al., 2003. 26: p. 249.
57. Roldan, P.d.S., F.J. Krug, and J.d.A. Nóbrega, *Revista Analytica*, 2006. 25: p. 58.
58. Burguera, J.L. and M. Burguera, *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy*, 2009. 64: p. 451.

59. PerkinElmer. Available from: <http://www.perkinelmer.com>.
60. *Espectrometria de absorção atômica*. Available from: <http://web.cena.usp.br/apostilas/krug/ETAAS%20FANII.pdf>.
61. Filgueras, C.A.L., *Química Nova na Escola*, 1996. 3: p. 22.
62. Okumura, F., É. Cavalheiro, and J.A. Nóbrega, *Quim. Nova*, 2004. 27: p. 832.
63. Amorim, F., et al., *Quim. Nova*, 2008. 31: p. 1784.
64. Welz, B., et al., *J. Braz. Chem. Soc.*, 2003. 14: p. 220.
65. L'vov, B., *Spectrochim. Acta, Part B*, 1961. 17: p. 108.
66. Welz, B., *Spectrochim. Acta, Part B*, 1999. 54: p. 2081.
67. Slavin, W., D.C. Maning, and G.R. Carnrick, 1981. 2: p. 137.
68. Welz, B. and S. M., eds. *Atomic Absorption Spectrometry*. 3rd ed. 1999: Wiley-VCH: Weinheim.
69. Boar, P.L., *Spectrochim. Acta, Part B*, 1999. 54: p. 1989.
70. Hieftje, G.M., *J. Anal. At. Spectrom.*, 1989. 4: p. 117.
71. Sneddon, J., B.D. Farah, and K.S. Farah, *Microchem. J.*, 1993. 48: p. 318.
72. Gomes, M., et al, *Quim. Nova*, 2006. 29: p. 868.
73. Cooper, T.G., *The Tools of Biochemistry*, ed. J. Wiley and Sons. 1977, New York.
74. Cristóvão, A. *Espectrofotometria de Absorção*. Departamento de Zoologia da Universidade de Coimbra; Available from: <https://woc.uc.pt/botanica/getFile.do?tipo=2&id=5181>
75. Boss, C.B. and K.J. Fredeen, Perkin Elmer, 1989: p. 104.
76. Brum, A. *Fundamentos da Espectrometria Atômica*. Available from: <http://samuellsilva.googlepages.com/absorcao.PPT>
77. Koirtjohann, S. and M.L. Kaiser, 1982. 54: p. 1515.
78. Welz, B., G. Bozsai, and M. Sperling *J. Anal. At. Spectrom.*, 1992. 7: p. 505.
79. Welz, B., G. Schlemmer, and J. Mudakavi, *J. Anal. At. Spectrom.*, 1992. 7: p. 1257.
80. Lavilla, I., et al., *Analytica Chimica Acta*, 2006. 566: p. 29.
81. Martinho, J., 2008, Universidade nova de Lisboa: Monte da Caparica.
82. H. M. Santos and J. L. Capelo, *Talanta*, 2007. 73: p. 795.
83. M. D. L. d. Castro and F.P. Capote, 2007: Elsevier.
84. T. J. Mason and J.P. Lorimer, 2002: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co.
85. Santos, H., 2007, Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade Nova de Lisboa, Monte da Caparica.
86. *Hielscher - Tecnologia em Ultra-Som*. Available from: <http://www.hielscher.com>.
87. Biasino, J., J.R. Domínguez, and J. Alvarado, *Talanta*, 2007. 73: p. 962.
88. Pineau, A., et al., *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*, 2002. 16: p. 113.

89. Grinberg, P. and R.C. de Campos, *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy*, 2001. 56: p. 1831.
90. *Guia para aceitação de calibrações em laboratórios químicos*. . 3 ed. Guia LAB/G01. 2000: Instituto Português da Qualidade (IPQ).
91. Castro, A.F.R., *Controlo da qualidade em análise química*. RELACRE - Associação de Laboratórios Acreditados de Portugal, 2004.
92. Relacre, *Guia Relacre 3: Validação de resultados em laboratórios químicos*. Associação de Laboratórios Acreditados de Portugal. 1996, Lisboa.
93. Maduro, C.V., G.; Alves, S.; Galesio, M.; da Silva, M.D.R.G.; Fernandez, C.; Catarino, S.; Rivas, M.G.; Mota, A.M.; Capelo, J.L., *Talanta* 2006. 68: p. 1156.
94. Skoog, D.A. and J.J. Leary, *Principles of Instrumental Analysis*. 4 ed. 1992, New York: Saunders College Publishing.
95. *Analytik-jena, ZEE nit* . For maximum efficiency and high sample throughput; Available from: http://www.analytik-jena.de/files_db/1246440733_6484__22.pdf.
96. *Hielscher - Ultrasound Technology*. Available from: http://www.hielscher.com/image/up200s_device_p0500.jpg.
97. Natário, I., *Sebenta de Probabilidades e Estatística D*. Universidade Nova de Lisboa, Faculdade de Ciências e Tecnologia. 2007.
98. Taylor, J.R., *An Introduction to Error Analysis*. 2 ed. The Study of Uncertainties in Physical Measurements. 1997, Sausalito, California: University Science Books.
99. Livesey, D.J., et al., *Pharmacology biochemistry & Behavior*, 1986. 25: p. 1089.

10 - Apêndices

❖ Apêndice 1: Software WinAAS

Para se utilizar o software WinAAS deve-se seguir o seguinte procedimento: ligar o gás Árgon, o equipamento e o computador, por esta ordem, e correr o programa de análise WinAAS. De seguida aparece uma janela como a apresentada na Figura abaixo (Figura 15), onde fazemos *Graphite tube* OK.

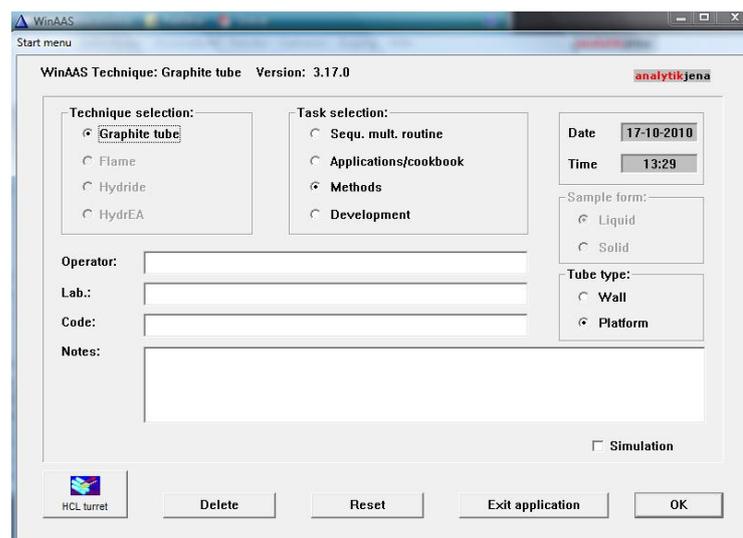


Figura 15: Selecção do tubo de grafite no software WinAAS.

De seguida, selecciona-se a lâmpada de chumbo, que está designada por Pb-2Dezembro2008 com modificador de matriz, e seleccionamos OK, como se pode observar na Figura 16.

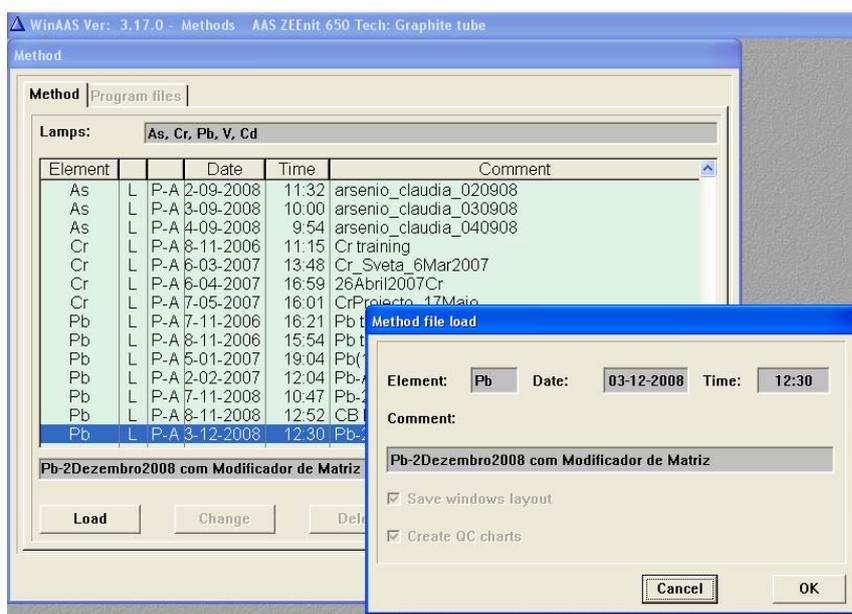


Figura 16: Selecção da lâmpada de chumbo no software WinAAS.

Posto isto, ficamos com a área de trabalho ilustrada na Figura 17, onde no canto superior direito, já se pode verificar que a lâmpada escolhida corresponde mesmo ao chumbo.

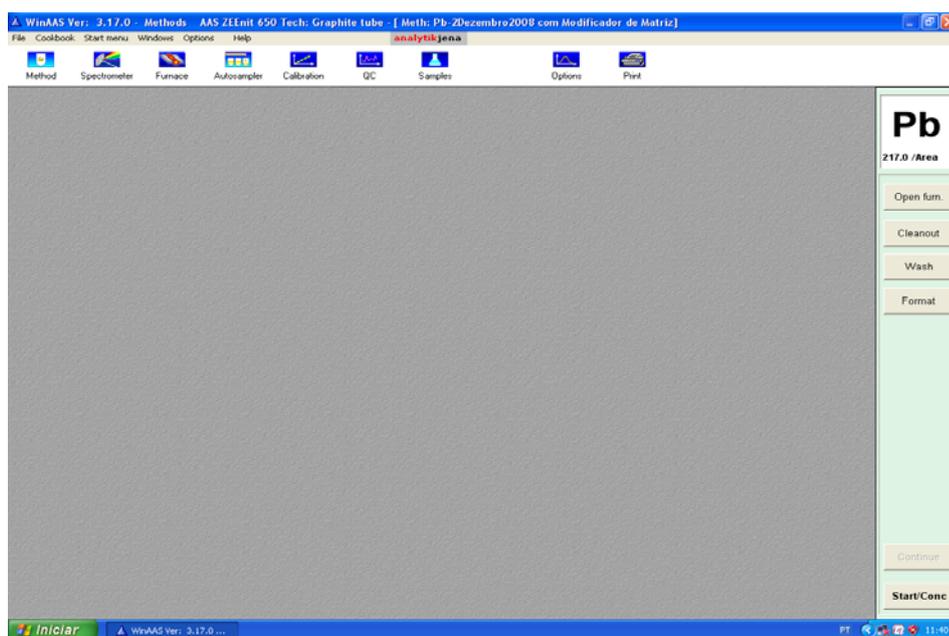


Figura 17: Área de trabalho do software usado.

Como se mostra na Figura 18, na janela *Spectrometer* (espectrómetro) seleccionamos a energia/ganho para se verificar os parâmetros EHT e HCL. O parâmetro EHT corresponde à tensão aplicada no detector, que neste caso é um fotomultiplicador e não pode ser superior a 500 V. O parâmetro HCL corresponde a percentagem de energia usada pela lâmpada que não pode ser inferior a 60. Quando são feitas as medições este parâmetro é sempre ajustado automaticamente para 70%.

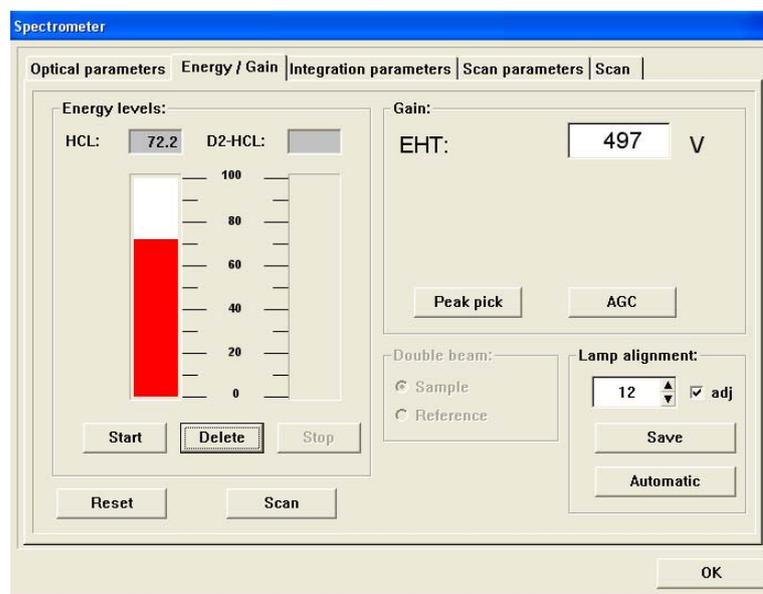


Figura 18: Representação dos parâmetros HCL e EHT.

Antes de se começar a efectuar as medições é necessário confirmar que está tudo bem com o equipamento, mediante a seguinte revisão: *error checks*, no programa do forno e no amostrador automático, se não houver nenhum problema aparece tudo a verde, como mostram as Figuras 19 e 20.

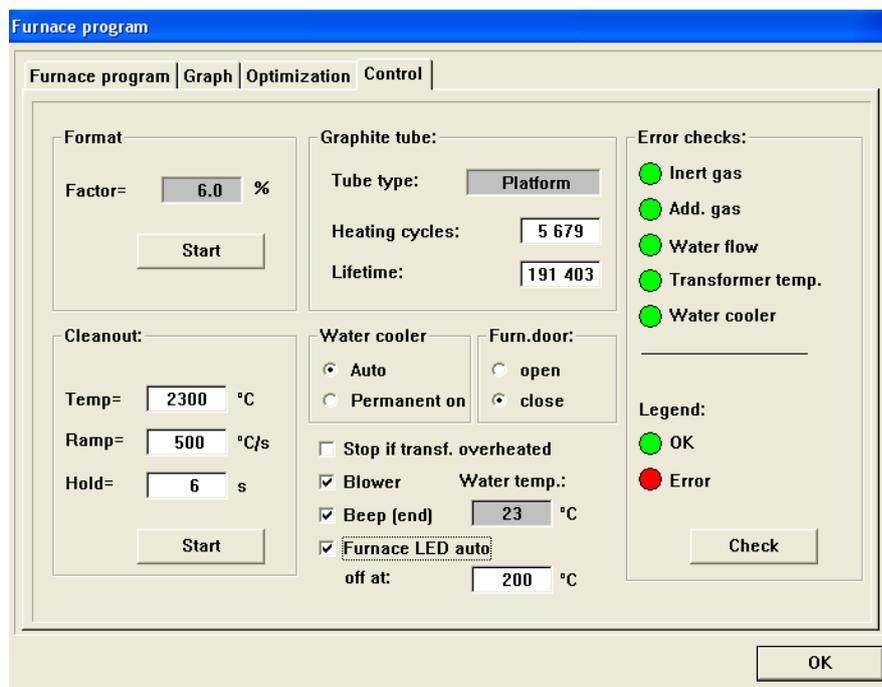


Figura 19: Revisão dos erros do software na secção do *furnace program*.

Antes de se começarem as medições é também necessário fazer um *Format* no *Furnance Program* para saber se o tubo de grafite está em condições de ser utilizado. Tal condição verifica-se se a percentagem do *Factor* for inferior a 10%.

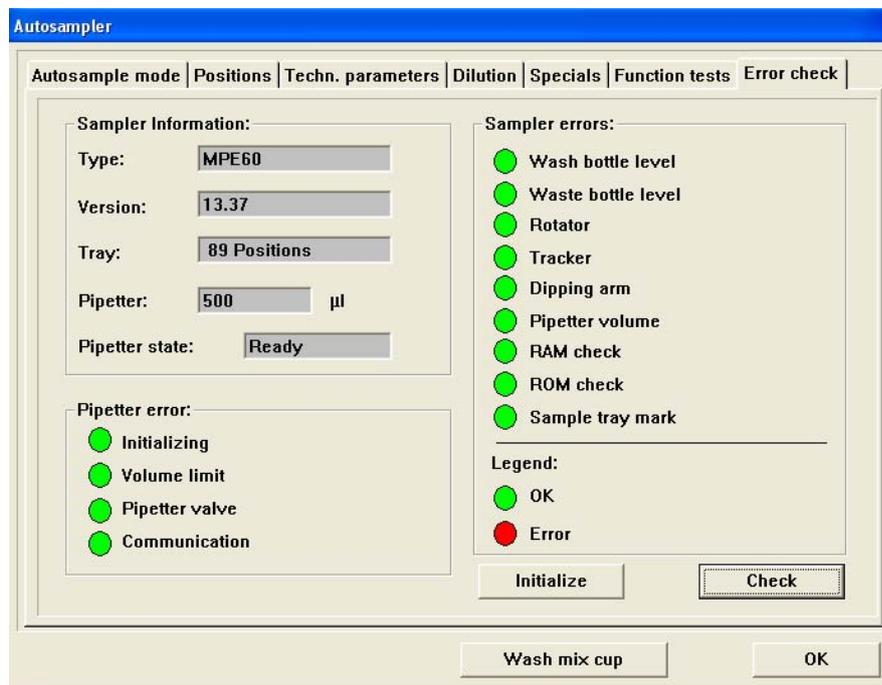


Figura 20: Revisão dos erros do software na secção do *autosampler*.

Depois, na janela *Samples* (amostras) seleccionamos *Working area* (área de trabalho), que corresponde ao número de amostras com que vamos trabalhar (ver Figura 21). No entanto, a posição 1 a 6, está destinada as soluções de calibração. Por exemplo, se quisermos obter uma recta de calibração devemos seleccionar uma área de trabalho 1-6. Mas se o objectivo for determinar a concentração de 5 amostras devemos seleccionar, uma área de trabalho 7-11.

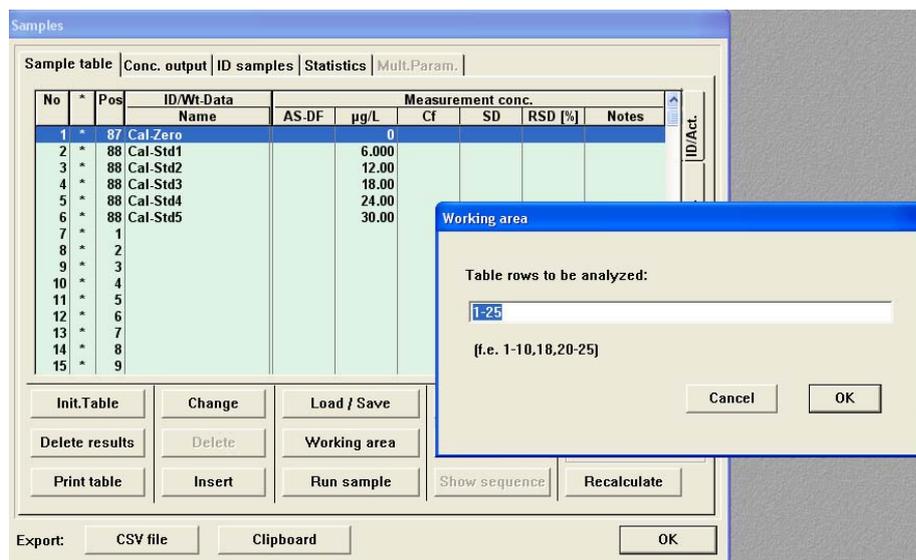


Figura 21: Seleção das amostras que se pretende determinar a PbS.

Posto isto, já estão reunidas todas as condições para se começarem a efectuar a medições. Para se começar as medições é só seleccionar o botão *Start/Conc* que se encontra no canto inferior direito na área de trabalho, representada na Figura 17.

Para se guardar a informação das medidas feitas temos que seleccionar na área de trabalho todas as amostras que fizemos, incluindo a recta de calibração. Isto é, se analisamos 5 amostras, temos que escolher 1-11, depois carregamos no botão *CVS file* na área das amostras e guardamos o documento numa pasta. Para se obter o relatório completo, carrega-se no botão *print* (ver Figura 17) e guardamos o documento numa pasta, caso necessário, é possível imprimir o relatório.

❖ Apêndice 2: Resumo do poster Física 2010

ANÁLISE DA CONCENTRAÇÃO DE CHUMBO EM SANGUE DE RATOS WISTAR SUJEITOS A UMA EXPOSIÇÃO CONTINUADA

A. Paninho¹, D. Guimarães¹, V. Geraldês², I. Rocha², J. L. Capelo³, J. P. Santos¹,

¹Centro de Física Atómica, Departamento de Física, Faculdade de Ciências e Tecnologia, FCT, Universidade Nova de Lisboa, 2829-516 Caparica, PORTUGAL

²Instituto de Fisiologia, Faculdade de Medicina de Lisboa and Instituto de Medicina Molecular, Lisboa, Av. Prof. Egas Moniz, 1649-028 Lisboa, PORTUGAL

³Analytical & Food Chemistry Department, Nutrition & Bromatology Group, University of Vigo, Science Faculty, E-32004 Ourense, SPAIN

anapaninho@gmail.com

As propriedades bioacumulativas do chumbo, assim como a sua capacidade de substituir o cálcio, podem ter efeitos tóxicos em vários sistemas orgânicos tais como o sistema hematopoiético, o sistema nervoso central, o tracto gastrointestinal, o sistema cardiovascular, sistema reprodutivo e o sistema esquelético, suscitando assim preocupações a nível da saúde pública [1-4]. Consequentemente, é necessário ter um conhecimento profundo da forma como o Pb interage e se acumula em todos os tecidos, de forma a estabelecer directivas.

Neste âmbito, tem sido desenvolvido um estudo sobre a toxicocinética do Pb no organismo e da relação entre as concentrações deste elemento em diferentes tecidos por (exemplo, fígado, rins, pêlo, osso, cérebro, coração), no sangue, urina e fezes de ratos Wistar. Foram analisados dois grupos de ratos Wistar; um alimentado com uma dieta rica em Pb (0,2% acetato de Pb na água potável, *ad libitum*) e outro, de controlo, alimentado com uma dieta normal.

As recolhas foram efectuadas no Instituto de Medicina Molecular – Instituto de Fisiologia (Faculdade de Medicina de Lisboa). As várias amostras estão a ser analisadas recorrendo às técnicas de espectroscopia de absorção atómica electrotérmica (ETAAS) e fluorescência de raios X dispersivo em energia (EDXRF).

11 - Anexo



EUROPEAN COMMISSION
JOINT RESEARCH CENTRE
Institute for Reference Materials and Measurements



CERTIFIED REFERENCE MATERIAL BCR[®] – 634 N°. 248

CERTIFICATE OF ANALYSIS

HUMAN BLOOD			
	Mass concentration in the reconstituted material ¹⁾		Number of accepted sets of data p
	Certified value ²⁾ [µg/L]	Uncertainty ³⁾ [µg/L]	
Cd	1.4	0.4	10
Pb	46	5	12

1) When the material is reconstituted according to the procedure specified in the instructions for use.
2) The value is the unweighted mean of p values, each value being the mean of a set of results obtained by a different method and/or laboratory. The certified values are traceable to the SI.
3) Expanded uncertainty with a coverage factor k = 2 according to the Guide to the Expression of Uncertainty in Measurement (GUM), corresponding to a level of confidence of about 95 %.

This certificate is valid for one year after purchase.

Sales date: 01 JUN 2010

The entire contents of the vial must be reconstituted. The recommended minimum amount of the reconstituted material is 10 µL.

DESCRIPTION OF THE SAMPLE

The material consists of lyophilised human whole blood in brown glass vials each containing approximately 0.6 g dry matter with a residual moisture content of less than 2 % and equivalent to 3.0 mL of fresh whole blood. Sodium-EDTA was used as anticoagulant. No other preservatives were added.

NOTE

This material has been certified by BCR (Community Bureau of Reference, the former reference materials programme of the European Commission). The certificate has been revised under the responsibility of IRMM.

Geel, December 2002
Latest revision: March 2009

Signed: _____

Prof. Dr. Hendrik Emons
European Commission
Joint Research Centre
Institute for Reference Materials and Measurements
Retieseweg 111
B-2440 Geel, Belgium



ANALYTICAL METHOD USED FOR CERTIFICATION

- Electrothermal Atomic Absorption Spectrometry
- Flame Atomic Absorption Spectrometry
- Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry
- Differential Pulse Anodic Stripping Voltammetry

PARTICIPANTS

- Analytisch Biochemisch Laboratorium, Assen (NL)
- Centre for Analytical Sciences, University of Southampton (GB)
- Det Nationale Forskningscenter for Arbejdsmiljø, København (DK)
- European Commission, Joint Research Centre, Institute for Reference Materials and Measurements (IRMM), Geel (BE)
- Forschungszentrum für Umwelt und Gesundheit (GSF), Oberschleissheim (DE)
- Health & Safety Laboratory, Sheffield (GB)
- Institut für Arbeits- und Umweltmedizin, Universität München (DE)
- Institut National de Recherche et de Sécurité, Vandoeuvre (FR)
- Institut Scientifique de Santé Publique, Bruxelles (BE)
- Institute of Occupational Health, University of Brescia (IT)
- Instituto Nacional de Seguridad e Higiene en el Trabajo, Baracaldo (ES)
- Istituto Superiore di Sanità, Rome (IT)
- Robens Institute, University of Surrey (GB)
- Sporstoflaboratoriet, Odense Universitetshospital, Odense (DK)
- Statens arbeidsmiljøinstitutt, Oslo (NO)

SAFETY INFORMATION

This material was produced from blood from healthy Danish blood donors. Each portion of blood was tested negative for hepatitis B surface antigen, anti-HCV and anti HTLV-I/II. However, the material should be handled with adequate care as any material of human origin. **For *in vitro* use only.**

INSTRUCTIONS FOR USE

Before use the following instruction for reconstitution has to be followed:

- Allow the vial to reach ambient temperature before opening.
- Tap the bottom of the vial to loosen any blood material adhering to the stopper.
- Carefully remove the rubber stopper.
- Add 3.00 mL water (room temperature). Acceptable $CV = 0.5\%$.
- Replace rubber stopper and homogenize by continuous agitation on a mixing apparatus for at least 1 h.

The reference material should not be used for calibration due to possible differences in matrix between calibrant and sample. If the material is used to assess the performance of a procedure, the user should refer to the recommendations in the certification report.

STORAGE

Upon arrival, the material should be stored at $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ or lower for not more than 12 months until use. However, the European Commission cannot be held responsible for changes that happen during storage of the material at the customer's premises, especially of opened samples.

LEGAL NOTICE

Neither IRMM, its subsidiaries, its contractors nor any person acting on their behalf,

(a) make any warranty or representation, express or implied that the use of any information, material, apparatus, method or process disclosed in this document does not infringe any privately owned intellectual property rights; or

(b) assume any liability with respect to, or for damages resulting from, the use of any information, material, apparatus, method or process disclosed in this document save for loss or damage arising solely and directly from the negligence of IRMM or any of its subsidiaries.

NOTE

A technical report on the production of BCR-634 is available on the internet (<http://www.irmm.jrc.be>). A paper copy can be obtained from IRMM on request.

European Commission – Joint Research Centre
Institute for Reference Materials and Measurements (IRMM)
Retieseweg 111, B - 2440 Geel (Belgium)
Telephone: +32-(0)14-571.722 - Telefax: +32-(0)14-590.406