

Comparação de métodos de preparo de amostras de sangue para determinação de chumbo e cádmio por ICP-MS

Comparison of blood samples preparation methods for lead and cadmium determination using ICP-MS

Luciana Juncioni de Arauz^{1*}, Lidiane Raquel Verola Mataveli¹, Maria de Fátima Henriques Carvalho¹, Márcia Liane Buzzo¹ & Paulo Tiglea¹

¹Núcleo de Contaminantes Inorgânicos, Instituto Adolfo Lutz, São Paulo/SP, Brasil.

^{1*}Endereço para correspondência: Núcleo de Contaminantes Inorgânicos, Centro de Contaminantes, Instituto Adolfo Lutz, Av. Dr. Arnaldo, 355, Cerqueira César, São Paulo, SP, Brasil, CEP 01246-902. Tel.: (11)3068-2924. E-mail: ljarauz@ial.sp.gov.br

RESUMO

O sangue tem sido amplamente utilizado como matriz para monitorar a exposição da população a metais tóxicos. O objetivo deste estudo foi comparar dois procedimentos de preparação de amostras para determinação de chumbo e cádmio em sangue fortificado: (i) diluição em solução de Triton X-100/HNO₃ (oxidação utilizando HNO₃ e H₂O₂) e (ii) digestão por radiação micro-ondas. As amostras preparadas foram analisadas por Espectrometria de Massas com Plasma Indutivamente Acoplado (ICP-MS). Com relação aos valores alvo, as recuperações totais de amostras fortificadas de Cd foram encontradas nas faixas de 93,6-111,7% e 96,3-113,5%, e Pb de 96,3-113,5% e 93,5-113,2%, para os procedimentos de preparo de amostras (i) e (ii), respectivamente. A exatidão foi verificada por meio da análise de amostras do Programa *Lead and Multi-Element Proficiency* (LAMP-CDC/EUA), que indicou uma boa concordância entre a concentração média relatada pelo Programa e as concentrações determinadas para Cd e Pb, em ambos os procedimentos de preparação de amostras. Assim, este trabalho apresenta dados para auxiliar profissionais de saúde sobre a escolha de procedimentos de preparação da amostra com o objetivo de investigar metais no sangue.

Palavras-chaves: Chumbo, Cádmio, ICP-MS, Sangue, Preparação de amostras.

ABSTRACT

Blood has been widely used as matrix to monitor population exposure to toxic metals. The aim of this study was to compare two sample preparation procedures for the determination of lead and cadmium in fortified blood: (i) dilution in a solution containing Triton X-100/HNO₃; (ii) microwave oven digestion (oxidation using HNO₃ and H₂O₂). Prepared samples were analyzed using Inductively Coupled Plasma-Mass Spectrometry (ICP-MS). Regarding the target values, overall recoveries of fortified samples of Cd were found to be in the range of 93.6 – 111.7% and 96.3 – 113.5%, and Pb of 96.3 – 113.5% and 93.5 – 113.2%, for sample preparation procedures (i) and (ii), respectively. Accuracy was checked by analyzing samples from the *Lead and Multi-Element Proficiency Program* (LAMP-CDC/USA), which indicated good agreement between the mean concentration reported by the Program and the determined concentrations of Cd and Pb in this work, considering both sample preparation procedures. This study presents data to guide health professionals regarding the choice of sample preparation procedures, aiming to investigate metal concentrations in blood.

Keywords: Lead, Cadmium, ICP-MS, Blood, Sample preparation.

INTRODUÇÃO

Entre os diferentes contaminantes encontrados no meio ambiente, os metais tóxicos como chumbo e cádmio geram grandes preocupações devido a seus efeitos na saúde da população. Os efeitos toxicológicos relacionados à exposição a estes metais incluem doenças pulmonares, renais, cardíacas e do sistema ósseo, entre outros (Nunes, 2009). O aumento à exposição ocupacional e ambiental a estes elementos tóxicos mostra a necessidade de monitoramento e diagnóstico clínico da exposição humana.

Sangue, plasma, soro e urina são matrizes utilizadas para o monitoramento biológico da exposição a estes metais, pois são importantes em termos bioquímicos e possuem fácil acessibilidade (Soldá, 2011), sendo que o sangue constitui-se como matriz indicada para medir as exposições recentes a cádmio e chumbo. Os níveis de chumbo sanguíneo apresentam representatividade na legislação brasileira junto ao Ministério do Trabalho e Emprego pela Portaria GM nº 3214, de 08 de junho de 1978 (Norma Regulamentadora 7), revista pela Portaria SSST nº 24, de 29 de dezembro de 1994 (Brasil, 1978). Esta Legislação estabelece como parâmetro para controle biológico da exposição ocupacional ao chumbo o valor de referência de 40 µg/100mL e índice biológico máximo permitido de 60 µg/100mL para chumbo em trabalhadores expostos, porém não prevê limites para o elemento cádmio no mesmo tipo de matriz. O organismo internacional American Conference of Governmental Industrial Hygienists (ACGIH), que estabelece guias orientativos para o controle de riscos à saúde nos locais de trabalho, adota o valor de 5 µg/L para cádmio em sangue como índice biológico de exposição (ACGIH, 2014). Para avaliação da exposição ambiental ao chumbo, o Centro de Controle de Doenças (CDC) dos EUA, recomenda o valor de referência de chumbo em sangue para crianças menores que 5 µg/100mL, como limite de exposição ao contaminante e prevenção de doenças neurológicas (CDC, 2012).

A evolução das técnicas espectrométricas permitiu a determinação de elementos químicos em concentrações cada vez menores (em níveis de µg/L, e ng/L), em fluidos biológicos como, por exemplo, chumbo e cádmio em sangue por emprego da técnica de Espectrometria de Massas com Plasma Acoplado Indutivamente (ICP-MS).

Devido à alta complexidade de matrizes como o sangue, torna-se imprescindível a escolha de um método de preparo de amostra compatível com a técnica de determinação escolhida. Dentre os diversos métodos propostos na literatura para determinação destes elementos em sangue (Nunes, 2009; Kim *et al.*, 2013; Forte *et al.*, 2011; Nascimento *et al.*, 2014; Heitland & Koster, 2006; Gajek *et al.*, 2013), os tratamentos de diluição com Triton X-100 em ácido nítrico, e digestão por micro-ondas, são bastante empregados devido à simplicidade e rapidez na execução do preparo de amostras.

Os processos de digestão por micro-ondas usando recipientes fechados em meio ácido contendo peróxidos têm sido empregados para decompor as matrizes orgânicas de amostras biológicas em temperaturas e/ou pressões elevadas. Já foi demonstrado que a digestão de amostras por radiação micro-ondas apresenta rápido aquecimento e menor propensão a contaminação e perdas de analitos voláteis, como o mercúrio (Barbosa *et al.*, 2015). Frequentemente esta técnica é utilizada para amostras clínicas sólidas como cérebro e fígado (Batista, 2009).

Já a diluição das amostras de sangue é necessária para reduzir os efeitos de interferência de matriz bem como evita o entupimento do sistema de introdução de amostras de espectrômetros, tais como o ICP-MS. Para isto, um diluente amplamente utilizado é o surfactante não iônico Triton X-100, cuja função é a de solubilizar melhor o sangue no meio e evitar o depósito do mesmo no sistema de introdução de amostras do ICP-MS. Esta solução é preparada em meio ácido, como o ácido nítrico, que têm como função a estabilização dos metais no meio. A concentração do ácido nítrico na solução é de extrema importância, pois concentrações superiores a 0,5% (v/v) podem ocasionar precipitação das proteínas presentes no sangue, prejudicando a homogeneidade da amostra (Batista, 2009).

Assim, diante do exposto, o objetivo deste trabalho foi comparar dois procedimentos de preparo de amostra de sangue: (i) diluição em solução de Triton X-100/HNO₃ e (ii) digestão por micro-ondas, para posterior quantificação de chumbo e cádmio por ICP-MS. Este estudo tem como meta colaborar na melhoria da rotina de laboratórios que atuam na área de toxicologia, apresentando o desempenho de dois métodos distintos de preparo de amostras de sangue para a determinação de chumbo e cádmio, visando o atendimento da Saúde Pública no monitoramento ambiental e ocupacional a que a população está exposta.

MATERIAL E MÉTODOS

As vidrarias e frascos de Teflon® utilizados nas análises foram submetidos ao processo de descontaminação química em dois banhos consecutivos de solução de ácido nítrico a 20 % (P.A.) (Merck), e enxaguados em água desionizada com resistividade de 18,2 MΩ.cm (Merck-Millipore). Os reagentes utilizados foram peróxido de hidrogênio a 30% (H₂O₂), ácido nítrico (HNO₃) Suprapur® (Merck), e Triton X-100 (Sigma Aldrich).

As soluções padrões intermediárias de chumbo (Pb) e cádmio (Cd) foram preparadas em meio aquoso em HNO₃ a 1% (v/v), a partir de diluições de soluções padrão contendo 1000 mg/L (Inorganic Venture) de cada elemento. As curvas analíticas foram preparadas com concentrações de 5 a 40 µg/L para Pb e 0,3125 a 2,5 µg/L para Cd, por meio de ajuste de matriz com sangue bovino. O sangue bovino é considerado similar ao sangue humano, devido à complexidade deste material

biológico e as várias mudanças físicas e químicas que podem ocorrer devido a fatores como idade, sexo, presença de doenças e alimentação (Cox, 1989). Além disso, o sangue bovino pode ser utilizado por produtores de materiais de referência de reconhecimento internacional (Cox *et al.*, 1989). Todas as soluções foram preparadas com água desionizada com resistividade de 18,2 M Ω /cm (Merck-Millipore).

As análises das amostras foram realizadas utilizando ICP-MS (modelo ELAN DRC-II, marca Perkin-Elmer) equipado com nebulizador Meinhard® e câmara nebulizadora ciclônica, ambos de vidro. Para a determinação de cádmio utilizou-se o isótopo ^{111}Cd e para chumbo utilizou-se a média dos isótopos ^{206}Pb , ^{207}Pb , ^{208}Pb . Os padrões internos utilizados foram ^{187}Re e ^{115}In para chumbo e cádmio, respectivamente, na concentração de 5 $\mu\text{g/L}$.

Um sistema de digestão por micro-ondas (modelo ETHOS ONE, Milestone), equipado com rotor SK-10 foi usado para o preparo de amostras, nas seguintes condições: pressão máxima de 45 bar, temperatura máxima de operação de 180 °C. Para o procedimento proposto foram pipetados 1 mL da amostra de sangue, 2 mL de HNO₃ Suprapur®, 2 mL de H₂O₂ a 30% (v/v) e 4,5 mL de água desionizada. Após a digestão, as soluções foram transferidas para frascos de polipropileno graduado e o volume foi completado com água desionizada para 25 mL.

Para o procedimento de preparo de sangue por diluição, as amostras foram diluídas na razão 1:20 em solução de Triton X-100 a 0,05% em HNO₃ a 0,2%.

Em ambos os métodos de preparo de amostras, as análises foram realizadas em três replicatas. Para cada tomada de ensaio, foram preparados dois brancos das amostras dos reagentes.

Para comparação dos resultados entre os métodos de preparo de amostras propostos, foram analisadas amostras de sangue bovino fortificadas com chumbo e cádmio, em três níveis de concentrações distintos: A, B e C; amostras de sangue bovino provenientes do Programa de Ensaio de Proficiência de Chumbo em Sangue (PEP-Pbs), do Instituto Adolfo Lutz (denominadas PEP 1 e PEP 2), e amostras de sangue provenientes da participação do laboratório no Programa Interlaboratorial Lead and Multielement Proficiency (LAMP), coordenado pelo Center for Disease Control (CDC/EUA) (designadas como LAMP 1 e LAMP 2). Para os casos dos Programas Interlaboratoriais, os valores considerados para chumbo e cádmio em cada rodada foram obtidos por valores de consenso entre os laboratórios participantes.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

As Tabelas 1 e 2 apresentam os valores alvos referentes às fortificações realizadas em amostras de sangue bovino com cádmio e chumbo (A, B e C), valores designados para o Programa de Ensaio de Proficiência de Chumbo em Sangue (PEP-Pbs) e Lead and Multielement Proficiency/

Centers for Disease Control and Prevention (LAMP/CDC), respectivamente, bem como os resultados de concentração dos metais em sangue, obtidos empregando-se a técnica de ICP-MS e respectivas recuperações, para cada tipo de procedimento de preparo de amostras.

Tabela 1 - Valores alvos, concentrações obtidas e respectivas recuperações para a determinação de cádmio em amostras de sangue por ICP-MS, para os métodos propostos de preparo de amostras: digestão por micro-ondas e diluição com Triton X-100/ HNO₃

Amostra	Valor alvo*		Concentração obtida		Recuperação (%)	
	µg/L		µg/L			
	Digestão	Diluição	Digestão	Diluição	Digestão	Diluição
Fortificação A	0,4	0,5	0,4	0,5	106,0	112,7
Fortificação B	1,0	1,3	0,9	1,2	93,6	96,3
Fortificação C	2,0	2,5	2,1	2,6	103,3	106,2
LAMP 1	4,0	4,0	4,3	4,1	108,9	103,3
LAMP 2	2,1	2,1	2,3	2,4	111,7	113,5

* Valor alvo – os valores alvos referem-se às fortificações das amostras de sangue bovino com cádmio (A, B e C) e valores de consenso designados para o Programa Interlaboratorial *Lead and Multielement Proficiency* (LAMP), do CDC (LAMP 1 e LAMP 2).

A análise dos resultados indica que os métodos de preparo de amostras de sangue por digestão por micro-ondas e por diluição com Triton X-100/ HNO₃, utilizados para determinação de cádmio e chumbo por ICP-MS nos diferentes tipos de amostras analisadas (fortificações com padrão de cádmio e chumbo, PEP-Pbs e LAMP) fornecem resultados compatíveis. Os valores de recuperação obtidos para cádmio encontram-se na faixa entre 93,6 a 111,7% e de 96,3 a 113,5 %, para os métodos de preparo de amostras por digestão por micro-ondas e por diluição com Triton X-100/ HNO₃, respectivamente. Com relação à determinação de chumbo em sangue por ICP-MS nos diferentes tipos de amostras analisadas, a comparação entre os resultados mostra que a recuperação obtida apresenta valores de 96,3 a 113,5% e de 93,5 a 113,2%, para os métodos de digestão por micro-ondas e por diluição com Triton X-100/HNO₃, respectivamente. Os valores de recuperação obtidos estão de acordo com aqueles preconizados pelo guia AOAC (2012), que recomenda faixa de recuperação aceitável de 60 a 115%, indicando que ambos os métodos de preparo de amostras de sangue são adequados para determinação de chumbo e cádmio por ICP-MS, presentes em baixos níveis de concentração em sangue

Tabela 2 - Valores alvos, concentrações obtidas e respectivas recuperações para a determinação de chumbo em amostras de sangue por ICP-MS, para os métodos propostos de preparo de amostras: digestão por micro-ondas e diluição com Triton X-100/ HNO₃

Amostra	Valor alvo*		Concentração obtida		Recuperação (%)	
	µg/100mL		µg/100mL			
	Digestão	Diluição	Digestão	Diluição	Digestão	Diluição
Fortificação A	0,6	0,8	0,6	0,9	98,2	113,2
Fortificação B	1,5	1,9	1,3	1,8	87,8	96,5
Fortificação C	3,0	3,8	2,9	3,9	97,8	102,9
PEP-IAL 1	40,0	40,0	37,8	41,9	94,4	104,8
PEP-IAL 2	74,9	74,9	72,0	77,6	96,2	103,6
LAMP 1	17,5	17,5	15,8	16,4	90,4	93,5
LAMP 2	10,3	10,3	9,1	9,8	88,2	94,8

* Valor alvo – os valores alvos são referem-se às fortificações das amostras de sangue bovino com chumbo (A, B e C) e valores de consenso designados para o Programa de Ensaio de Proficiência de Chumbo em Sangue (PEP-Pbs) (PEP-IAL 1 PEP-IAL 2) e para o Programa Interlaboratorial *Lead and Multielement Proficiency* (LAMP), do CDC (LAMP 1 e LAMP 2).

O teste t de Student foi usado para verificar a significância estatística dos valores médios entre os dois procedimentos de preparo de amostras. Para 95% de confiança, a diferença entre as médias dos métodos propostos não apresentou significância estatística, tanto para chumbo ($p = 0,23$), quanto para cádmio ($p = 0,67$), indicando, mais uma vez, que ambos os métodos de preparo de amostras propostos apresentam resultados compatíveis para determinação de chumbo e cádmio por ICP-MS presentes em baixos níveis de concentração em sangue.

Resultados semelhantes foram encontrados por Kira *et al.* (2014), que apresentou faixa de recuperação entre 96,7 a 109,1%, no desenvolvimento de método para determinação de contaminantes inorgânicos em sangue por ICP-MS empregando preparo de amostra por diluição de sangue com solução de Triton X-100 e HNO₃.

Já Haghlock-Adler & Strathmann (2015) desenvolveram um procedimento de diluição de amostras de sangue total para análise de Sb, Bi, Mn e Zn, e compararam o mesmo com um procedimento de digestão utilizado HNO₃ e HCl em bloco digestor. Os autores concluíram que o procedimento desenvolvido por eles se mostrou eficiente e pode substituir o extenso procedimento de digestão (4 horas) empregado por eles. Ainda, quando as recuperações dos dois métodos utilizados são comparadas, o procedimento de diluição obteve recuperações que variaram entre 96 e 104%, enquanto que o procedimento de digestão obteve recuperações entre 48 e 74%. Os valores de recuperação do método de digestão foram atribuídos a efeitos de matriz e supressão iônica, que

influenciam a eficiência do método. É importante ressaltar que o método de digestão em micro-ondas, utilizado neste trabalho, permite que os valores de concentração obtidos sejam mais exatos e mais precisos do que os obtidos usando um bloco digestor (Amorim, 2006), o que justifica as boas recuperações encontradas neste estudo.

Lu *et al.* (2015) analisaram 25 elementos em sangue total, dentre eles Pb e Cd, utilizando para o preparo da amostra diluição alcalina e digestão em bloco digestor. Baseados nos valores de recuperação obtidos para os materiais de referência analisados, os autores concluíram que ambos os procedimentos de preparo de amostra geraram resultados que estavam em concordância com os valores de recuperação recomendados pelos produtores dos materiais, mesma conclusão obtida no presente estudo.

Outros autores (Forte *et al.*, 2013) estudaram os níveis de Cr, Co, Fe, Mn, Hg, Ni, Pb, Se e Zn em sangue de pacientes com diabetes por ICP-MS de duplo foco (SF-ICP-MS), após a digestão das amostras em micro-ondas. Os valores das recuperações de todos os analitos obtidos foram de 92-101% dos valores certificados, que estão em concordância com aqueles valores obtidos no presente estudo.

Ambas as técnicas de preparo apresentam vantagens e desvantagens. A digestão de amostras em forno micro-ondas é limitada a massas de amostras reduzidas, considerando a elevada pressão gerada no interior dos vasos, devido aos gases gerados durante a decomposição (Amais, 2014). Já a diluição do sangue no Triton X-100 em meio ácido, pode apresentar limitações no que se refere ao efeito de matriz, como por exemplo, viscosidade da amostra e a supressão ou aumento do sinal do analito, entre outros (Batista, 2009). De acordo com os resultados obtidos neste estudo, ambas as técnicas de preparo podem ser aplicadas nas análises de sangue para a quantificação de Pb e Cd. Porém, para a escolha do método a ser empregado nos laboratórios de toxicologia, deve ser levado em consideração à finalidade da amostra para a qual se destina: estudo, pesquisa, diagnóstico clínico, etc. Deste ponto de vista, o método de digestão inviabiliza análises de rotina com grande número de amostras, devido à demanda de tempo exigida para este método. Já para a área clínica, o método escolhido para análise deve ser simples, robusto e rápido, oferecendo a possibilidade de um rápido diagnóstico clínico, que poderia ser obtido pelo preparo de amostra por diluição, devido à rapidez da técnica. Por outro lado, para fins de pesquisa científica e acadêmica, conforme dados da literatura citados acima, ambas as técnicas de preparo são amplamente utilizadas para vários estudos.

Este trabalho apresentou dados para auxiliar profissionais de saúde na escolha de procedimentos de preparação de amostra com o objetivo de investigar e monitorar metais no sangue da população.

CONCLUSÃO

Os métodos de preparo de sangue para determinação de chumbo e cádmio por emprego de técnica de ICP-MS em sangue: digestão por micro-ondas e diluição com solução de Triton X-100/HNO₃, apresentaram médias estatisticamente iguais e mostraram-se adequados, com recuperações compatíveis para os níveis de concentrações avaliados. Estes resultados podem contribuir na melhoria da rotina de laboratórios que atuam na área de toxicologia, para o atendimento da Saúde Pública, no monitoramento ambiental e ocupacional de metais prejudiciais à saúde aos quais, a população está exposta.

AGRADECIMENTOS

À Rede de Serviços Tecnológicos para Sangue e Hemoderivados – REDSANG/SIBRATEC/FINEP, pelo suporte proporcionado para o desenvolvimento deste trabalho.

À Luci Elaine Machado pelos auxílios prestados no laboratório.

REFERÊNCIAS

Amais RS. *Desenvolvimento de procedimentos para a determinação de enxofre em diesel, biodiesel e óleo lubrificante usando ICP OES e ICP-MS*. 2014. São Carlos. 130 p. Tese (Doutorado em Química Analítica), Universidade Federal de São Carlos. São Carlos.

ACGIH. American Conference of Governmental Industrial Hygienists. TLVs® and BEIs® - Based on the Documentation of the Threshold Limit Values for Chemical Substances and Physical Agents & Biological Exposure Indices. Ohio, USA, 2014.

Amorim Filho VR. *Avaliação comparativa de procedimentos para o preparo de amostras agroindustriais na determinação de elementos inorgânicos por técnicas espectrométricas*. 2006. São Carlos. 120 p. Tese (Doutorado em Química Analítica), Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo. São Carlos.

AOAC Appendix F: *Guidelines for standard method performance requirements*. 17 p. Disponível em: <http://www.eoma.aoac.org/app_f.pdf>. Acesso em: fev. de 2015.

Barbosa JTP, Santos CMM, Peralva VN, Flores EMM, Korn M, Nóbrega JA, Korn MGA. Microwave-assisted diluted acid digestion for trace elements analysis of edible soybean products.

Food Chem. 175: 212-217, 2015.

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

Brasil. Ministério do Trabalho e Emprego. Portaria GM nº 3214, de 08 de junho de 1978 (Norma Regulamentadora 7). Portaria SSST nº 24, de 29 de dezembro de 1994.

CDC *Response to advisory committee on childhood lead poisoning prevention recommendations in “low level lead exposure harms children: a renewed call of primary prevention”.* 16 p. Disponível em: <http://www.cdc.gov/nceh/lead/acclpp/cdc_response_lead_exposure_recs.pdf>. Acesso em: jan. de 2015.

Cox DH, Duncan CE, Wyatt GP, Meadow JS, Robinson JB. Bovine blood lead reference material. *J. Anal. Toxicol.* 13: 204-207, 1989.

Cox DH. Bovine blood quality control material for cadmium, mercury, and lead. *J. Anal. Toxicol.* 13: 367-370, 1989.

Forte G, Madeddu R, Tolu P, Asara Y, Marchal JA, Bocca B. Reference intervals for blood Cd and Pb in the general population of Sardinia (Italy). *Int. J. Hyg. Envir. Health* 214: 102-109, 2011.

Forte G, Bocca B, Peruzzu A, Tolu F, Asara Y, Farace C, Oggiano R, Madeddu R. Blood Metals Concentration in Type 1 and Type 2 Diabetics. *Biol. Trace Elem. Res.* 156(1-3): 79-90, 2013.

Gajek R, Barley F, She J. Determination of essential and toxic metals in blood by ICP-MS with calibration in synthetic matrix. *Anal. Methods* 5: 2193-2202, 2013.

Haglock-Adler CJ & Strathmann FG. Simplified sample preparation in the simultaneous measurement of whole blood antimony, bismuth, manganese, and zinc by inductively coupled plasma mass spectrometry. *Clin. Biochem.* 48: 135-139, 2015.

Heitland P & Koster HD. Biomonitoring of 37 trace elements in blood samples from inhabitants of northern Germany by ICP–MS. *J. Trace Elem. Med. Biol.* 20: 253–262, 2006.

Kim S, Arora M, Fernandez C, Caruso J, Landero J, Chen A. Lead, mercury, and cadmium exposure and attention deficit hyperactivity disorder in children. *Environ. Res.* 126: 1-16, 2013.

Kira CS, Sakuma AM, Gouveia NC. Fast and simple multi-element determination of essential and toxic metals in whole blood with quadrupole ICP-MS. *J. App. Pharm. Sci.* 4(5): 39-45, 2014.

Lu Y, Kippler M, Harari F, Grandér M, Palm B, Nordqvist H, Vahter M. Alkali dilution of blood samples for high throughput ICP-MS analysis—comparison with acid digestion. *Clin. Biochem.* 140-147, 2015.

Nascimento SN, Charão MF, Moro AM, Roehrs M, Paniz C, Baierle M, Brucker N, Gioda A, Barbosa F Jr, Bohrer D, Ávila DS, Garcia SC. Evaluation of toxic metals and essential elements in children with learning disabilities from a rural area of Southern Brazil. *Int. J. Environ. Res. Public Health.* 11(10):10806-10823, 2014.

Nunes JA. *Desenvolvimento de um método para determinação de Ag, As, Cd, Co, Mn, Ni, Pb e Se em sangue por espectrometria de massas com fonte de plasma acoplado indutivamente (ICP-MS) utilizando diluição das amostras em meio alcalino.* 2009. Ribeirão Preto. 77 p. Dissertação (Mestrado em Toxicologia), Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo. Ribeirão Preto.

Soldá N. *Determinação dos níveis de chumbo em amostras de sangue por meio da técnica de fingerstick associada à espectrometria de massas de alta resolução com fonte de plasma acoplada indutivamente (HR/ICP/MS).* 2011. São Paulo. 62 p. Dissertação (Mestrado em Ciências na Área de Tecnologia Nuclear-Aplicações), Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares. São Paulo.