



**PROGRAMA DE APRIMORAMENTO  
PROFISSIONAL**  
SECRETARIA DE ESTADO DA SAÚDE  
COORDENADORIA DE RECURSOS HUMANOS  
FUNDAÇÃO DO DESENVOLVIMENTO  
ADMINISTRATIVO – FUNDAP



ALINE FACCIOLI BODONI  
CAMILA RUY

Procedimento Operacional Padronizado para a Dosagem de Alumínio Sérico em  
Hospital do Interior Paulista.

**RIBEIRÃO PRETO  
FEVEREIRO 2014**

**SECRETARIA DE ESTADO DA SAÚDE- SES -SP  
COORDENADORIA DE RECURSOS HUMANOS-CRH  
GRUPO DE DESENVOLVIMENTO DE RECURSOS HUMANOS-GDRH  
CENTRO DE FORMAÇÃO DE RECURSOS HUMANOS PARA O SUS  
“Dr. Antonio Guilherme de Souza”  
SECRETARIA DE ESTADO DA GESTÃO PÚBLICA  
FUNDAÇÃO DO DESENVOLVIMENTO ADMINISTRATIVO – FUNDAP**

**PROGRAMA DE APRIMORAMENTO PROFISSIONAL MICROTÉCNICAS E METAIS**

**Aline Faccioli Bodoni**

**Camila Ruy**

Procedimento Operacional Padronizado para a Dosagem de Alumínio Sérico em Hospital do Interior Paulista.

Monografia apresentada ao Programa de Aprimoramento Profissional - SES-SP, elaborada no Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – USP, Departamento de Apoio Médico.

Área Microtécnicas e Metais

Orientador: Tânia Maria Beltramini Tревilato

**Ribeirão Preto**

**2014**

## **AGRADECIMENTOS**

Primeiramente a Deus por ter nos acompanhado e iluminado os caminhos permitindo a realização dos nossos objetivos.

A nossos pais por todo apoio e incentivo.

A nossa querida orientadora Tânia Maria Beltramini Trevilato, agradecemos por toda orientação, sabedoria, amizade, pela ajuda incondicional e pela grande contribuição em nossa formação profissional.

Ao Marcos Paulo Souza Muniz pela grande amizade que construímos durante essa jornada e por toda atenção e suporte que nos concedeu sempre que precisamos.

A todos os funcionários e pós-graduandos que colaboraram direta e indiretamente para o desenvolvimento deste trabalho.

Ao Hospital das Clínicas de Ribeirão Preto pela oportunidade oferecida de realizar o Programa de Aprimoramento Profissional.

“O sucesso é ir de fracasso em fracasso sem perder o entusiasmo.”

Winston Churchill

## RESUMO

Por ser um metal muito abundante na crosta terrestre, estamos em contato com o alumínio a todo momento, pela alimentação, medicamentos, materiais industrializados e até mesmo o ar que respiramos. Nosso organismo elimina rapidamente o alumínio, porém pacientes em hemodiálise tem a eliminação dificultada e ocorre acúmulo do metal em vários órgãos. Nesses deve-se ter uma monitorização biológica constante do alumínio de acordo com a Portaria 2042 do MS. O objetivo do trabalho é desenvolver um Procedimento Operacional Padronizado para dosagem de Alumínio sérico em um Espectrofotômetro de Absorção Atômica, equipado com Forno de Grafite Zeeman 640Z - Varian do Laboratório de Pediatria, Setor de Metais do HCFMRP- USP. Relavamos todo o material utilizado no processo, com HNO<sub>3</sub> a 30% overnight e enxaguamos abundantemente com água ultrapura no dia das dosagens. As leituras foram realizadas em um Ambiente Clean, com filtro de alta eficiência (HEPA), em sala com classe certificada de 10000 partículas. Testamos os parâmetros comprimento de onda, rampa de aquecimento, tubo pirolítico e curvas de calibração. Foram analisadas soluções para preparo prévio de amostras e modificadores de matriz. Utilizou-se amostras de soro de um grupo controle de pessoas saudáveis, doadores voluntários do próprio laboratório e outro grupo com uma fração de amostras de soros de pacientes da Unidade de Terapia Renal, dosagens rotineiramente terceirizadas pelo hospital, anualmente, para validação da metodologia. O método desenvolvido proposto como adequado para a dosagem de Alumínio sérico tem comprimento de onda 396,2 rampa de aquecimento com 55,0 segundos de secagem 27,0 de pirólise e 1,7 de atomização com tubo de grafite plateau. A solução para preparo prévio das amostras foi HNO<sub>3</sub> a 6%, Triton X-100 a 0,1% e Antifoam a 0,1% diluindo-se os soros um para dois e centrifugando dez minutos a 13.000 rpm. O modificador de Matriz foi o Fostato dihidrogeno de Amônia a 1%. A metodologia apresenta curvas de calibração construídas com "r" médio igual 0,9989 (linearidade), com erros intra ensaios de DP= 1,28 e CV= 16,88%. Para exatidão utilizou-se uma amostra de soro humano da Community Bureau of Reference adquirida da Comissão Europeia, com concentração certificada de Alumínio igual 12,5 µg/L e incerteza de 3,0µg/L aceito CV= 12%, obtendo-se resultado médio de 12,36 µg/L.

Palavras Chaves: Alumínio, Espectrofotometria de Absorção Atômica -FG

## **LISTA DE ABREVIATURAS**

**Al** – Alumínio

**CV**- Coeficiente de Variação

**DP**- Desvio Padrão

**DA** - Doença de Alzheimer

**DFO** - Desferroxamina

**DRC** - Doença Renal Crônica

**DOA** - Doença Óssea Adinâmica

**EAA** – Espectrofotômetro de Absorção Atômica

**EDTA** – Ácido Etilenodiamino Tetra-acético

**ET AAS** - Electrothermal Atomic Absorption Spectrometry

**HCFMRP-USP** – Hospital das Clinicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo

**HD** - Hemodiálise

**IRC** – Insuficiência Renal Crônica

**MS** – Ministério da Saúde

**RPM** – Rotações por minuto

**UTR** – Unidade de Terapia Renal

**PTH** - Paratormônio

**HPS**- Hiperparatireoidismo secundário

**PTX**- Paratireoidectomia

## LISTA DE SÍMBOLOS

°C - Graus Celsius

HNO<sub>3</sub> – Ácido Nítrico

µg/L – Microgramas por Litro

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Rampa de Aquecimento <b>1</b> do Forno de Grafite com dez passos.....	26
Tabela 2 – Rampa de Aquecimento <b>2</b> do Forno de Grafite com nove passos.....	26
Tabela 3 – Resultados das análises de amostras de soro de pessoas saudáveis....	39
Tabela 4 – Resultados das análises de amostras de soro de pacientes com IRC no Laboratório do HC-FMRP e no Laboratório de referência.....	39
Tabela 5 – Resultados das análises de amostras de pessoas saudáveis.....	44
Tabela 6 – Resultados das análises de amostras de pacientes com IRC.....	44
Tabela 7 – Concentrações das replicatas das amostras de pool de soro normal.....	45



## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Curva de calibração obtida no EAA 640Z.....	29
Figura 2 – Representação gráfica da Curva de Calibração número 1, elaborada com a Rampa de Aquecimento 1, comprimento de onda 396,2 e sem a presença de Modificador de Matriz.....	32
Figura 3 – Representação Gráfica da Curva de Calibração número 2, elaborada com a Rampa de Aquecimento 2, comprimento de onda 396,2 e sem a presença de Modificador de Matriz.....	32
Figura 4 – Representações Gráficas da leitura do blank, Padrão de 5,0µg/L, Padrão de 10,0 µg/L, Padrão de 15,0 µg/L e Padrão de 20,0 µg/L na Rampa de Aquecimento número 1.....	33
Figura 5 – Representações Gráficas da leitura do blank, Padrão de 5,0µg/L, Padrão de 10,0 µg/L, Padrão de 15,0 µg/L e Padrão de 20,0 µg/L na Rampa de Aquecimento número 2.....	34
Figura 6 – Representação Gráfica da Curva de Calibração número 3, elaborada com comprimento de onda 309,3 e sem a presença de Modificador de Matriz.....	35
Figura 7 - Representação Gráfica da dosagem de uma amostra de soro analisada na Curva de Calibração número 3 e diluída com SDAS 1, onde se pode observar muitos interferentes.....	35
Figura 8 - Representação Gráfica da dosagem de uma amostra de soro analisada na Curva de Calibração número 3 e diluída com SDAS 2, onde se pode observar muitos interferentes.....	36
Figura 9 – Representação Gráfica da Curva de Calibração número 4, elaborada com comprimento de onda 309,3 e sem a presença de Modificador de Matriz.....	36
Figura 10 - Representação Gráfica das dosagens de uma amostra de soro analisada na Curva de Calibração número 4 e diluída com SDAS 3.....	37
Figura 11 – Representação Gráfica da Curva de Calibração número 5, elaborada com comprimento de onda 309,3 e com Modificador de Matriz número 1 (Fosfato de Amônia a 1%).....	37
Figura 12 - Representação Gráfica da dosagem de uma amostra de soro analisada na Curva de Calibração número 5 e diluída com SDAS 4.....	38
Figura 13 – Representação Gráfica da Curva de Calibração número 6, elaborada com comprimento de onda 309,3 e com Modificador de Matriz número 2 (Dicromato de Potássio a 0,1%).....	38

Figura 14 - Representação Gráfica da dosagem de uma amostra de soro analisada na Curva de Calibração número 6 e diluída com SDAS 4.....	39
Figura 15 – Representação Gráfica da Curva de Calibração número 7, elaborada com comprimento de onda 396,2 e sem Modificador de Matriz.....	40
Figura 16 – Representação Gráfica da Curva de Calibração número 8, elaborada com comprimento de onda 396,2 e sem Modificador de Matriz.....	40
Figura 17 – Representação Gráfica da Curva de Calibração número 9, elaborada com comprimento de onda 396,2 e sem Modificador de Matriz.....	41
Figura 18 - Representação Gráfica das dosagens de uma amostra de soro analisada na Curva de Calibração número 9 e diluída com SDAS 5.....	41
Figura 19 – Representação Gráfica da Curva de Calibração número 10, elaborada com comprimento de onda 396,2 e com Modificador de Matriz.....	42
Figura 20 – Representação Gráfica da Curva de Calibração número 11, elaborada com comprimento de onda 396,2 e com Modificador de Matriz.....	42
Figura 21 – Representação Gráfica da Curva de Calibração número 12, elaborada com comprimento de onda 396,2 e com Modificador de Matriz.....	43

## SUMÁRIO

<b>1 Introdução</b> .....	12
1.1 O alumínio e suas propriedades físico-químicas.....	12
1.1.2 Principais usos e aplicações.....	13
1.2. Alumínio e o organismo .....	14
1.2.1 A intoxicação ocupacional por Alumínio.....	16
1.2.2 A intoxicação por Al em pacientes com Insuficiência Renal Crônica.....	17
1.2.3 A Doença de Alzheimer.....	20
1.3 Diagnóstico na intoxicação por Alumínio.....	21
1.3.1 A contaminação na determinação de traços de Alumínio.....	22
<b>2 Objetivo</b> .....	24
<b>3 Materiais e Métodos</b> .....	25
3.1 Instrumental.....	25
3.2 Materiais, equipamentos e reagentes.....	27
3.3 Amostras.....	28
3.4 Controle da Contaminação.....	28
3.5 Curva de Calibração .....	29
3.6 Modificador de Matriz.....	30
3.7 Preparo prévio das amostras.....	30
<b>4 Resultados e Discussões</b> .....	31
<b>5 Conclusão</b> .....	46
<b>6 Referências</b> .....	47

## 1 Introdução

### 1.1 O alumínio e suas propriedades físico-químicas

O alumínio (Al) é o metal mais comum na crosta terrestre (8,13%). Ele não é encontrado isolado no estado natural, mas na forma de vários silicatos. Desses silicatos, os mais importantes são a bauxita e a criolita. Ressalta-se, ainda, que alguns compostos de interesse são o óxido, o sulfato, o hidróxido, o fluoreto, o cloreto e o complexo glicol-alumínio.

O Alumínio na forma elementar é um metal de cor branca prateada característica, dúctil, maleável, inodoro, bom condutor de calor e eletricidade. Apresenta peso atômico 26,98 e número atômico 13; pertence, na tabela periódica, ao grupo II A. (AZEVEDO; CHASIN, 2003)

São conhecidos nove isótopos do Alumínio, com números de massa entre 23 e 30, ocorrendo naturalmente, apenas, os isótopos  $^{27}\text{Al}$  e  $^{26}\text{Al}$ , sendo o primeiro o mais abundante e o segundo o mais estável. Quimicamente, o alumínio caracteriza-se por ser altamente reativo, ter elevada afinidade para o hidrogênio na fase líquida e por ter uma forte tendência para formar compostos de óxido de alumínio ( $\text{Al}_2\text{O}_3$ ). O seu caráter anfótero permite-lhe reagir com ácidos inorgânicos e bases fortes.

A exposição à água, ao oxigênio, e a outras substâncias oxidantes leva à formação de uma camada superficial do Óxido de Alumínio, o que confere ao metal alta resistência à corrosão. (ROSALINO, 2011)

São propriedades físico – químicas relevantes do alumínio:

-Número atômico :13

-Massa atômica relativa : 26,98

-Ponto de fusão: 660 °C

-Ponto de ebulição : 2.327 °C

-Densidade relativa : 2,70

-Pressão de vapor :1mmHg a 1.284 °C

-Solubilidade : solúvel em álcalis , ácido clorídrico e ácido sulfúrico, e insolúvel em ácido nítrico concentrado, ácido acético aquecido e em água fria ou quente.

O Alumínio não evapora mesmo em altas temperaturas, possui a capacidade de reduzir cátions de muitos metais pesados ao estado metálico. (AZEVEDO; CHASIN, 2003)

### 1.1.2 Principais usos e aplicações

As propriedades físico - químicas do Alumínio fazem com que esse metal seja muito útil em processos industriais na produção de ligas, juntamente com o cobre, zinco, magnésio e manganês. É utilizado na produção de abrasivos, cimento, plástico e cerâmica. Na indústria petrolífera é usado para a remoção de umidade, de vapores e de gás natural, assim como em certos processos de refino. Muitos países utilizam o Alumínio, como o sulfato, nos sistemas de tratamento de água. Outras aplicações incluem adição aos pigmentos de tintas, aos cosméticos e aos alimentos. (JERONYMO; FUJIMURA,1998)

A utilização de Alumínio é permitida como aditivo alimentar, sendo utilizada no refino do açúcar nas concentrações de aproximadamente 1,5%. Seu uso na alimentação também pode ser evidenciado no tratamento de água potável como agente floculante, na forma de Alumínio e sulfato de alumínio. (AZEVEDO; CHASIN, 2003)

Além das aplicações industriais, alguns compostos de Alumínio têm utilidade terapêutica em decorrência de suas propriedades antissépticas, sendo indicados para uso tópico e para a administração sistêmica, como antiácido, no tratamento de úlceras gastroduodenais e no controle da hiperfosfatemia do paciente com Insuficiência Renal Crônica. (JERONYMO; FUJIMURA,1998)

O Alumínio está presente em algumas vacinas como adjuvante na forma de hidróxido, fosfato ou hidroxifosfato de alumínio. O adjuvante é acrescentado às vacinas para aumentar a resposta de imunização e certas vacinas precisam dele para garantir a sua eficiência. (ABAL, 2013)

## 1.2. Alumínio e o organismo

O Al é um dos mais frequentes causadores de intoxicações por metais, pode alterar as estruturas celulares, as enzimas e ainda substituir metais co-fatores de atividades enzimáticas, forma radicais livres e por efeito cumulativo leva a processos degenerativos. (Pascalichio, 2002).

A exposição humana ao Alumínio é inevitável. Passa pela presença natural do Alumínio na natureza, isto é, nos alimentos, na água e no ar, e também pela consciente utilização e introdução diária deste elemento pelo homem, nos medicamentos, no tratamento de água, produtos de consumo, entre outros. (ROSALINO, 2011)

Os componentes químicos do Alumínio ocorrem, em geral, no estado trivalente ( $Al^{3+}$ ). Como um íon trivalente duro, o Alumínio liga-se fortemente aos ligantes doadores de oxigênio, tais como o citrato e o fosfato. (KLAASSEN, 2012)

O Alumínio não é distribuído uniformemente pelo corpo. Metade vai para o plasma sanguíneo, da qual 80% se liga a transferrina (proteína transportadora de ferro), como se o alumínio competisse com o ferro para se ligar a transferrina; os outros 10% se ligam a albumina, 9% se ligam a outras proteínas e 1% constitui o alumínio livre. A outra metade se difunde em fluidos de tecidos extracelulares, similarmente ao que acontece com outros metais. Não há uma distribuição uniforme dos compostos de alumínio, ou seja, cada órgão incorpora o metal em diferentes graus. O cérebro, por exemplo, incorpora menos Alumínio do que o esperado, levando-se em conta a sua massa proporcional e vascularização. Já os ossos incorporam mais Alumínio do que pode ser explicado, considerando-se sua massa proporcional e vascularização.

A ocorrência comum do Alumínio nos tecidos do organismo humano tem sido bastante estudada, portanto, já é comprovada. O total de Alumínio ligado ao organismo em humanos considerados saudáveis é algo em torno de 30 a 50mg.

Em pessoas com boas condições de saúde, com funcionamento renal normal, observa-se que o Alumínio é assimilado e eliminado dos ossos, competindo com o cálcio para se ligar com as proteínas ósseas, porém este processo é reversível não havendo nenhum dano a função óssea. Da mesma maneira o Alumínio também

compete com o ferro na formação das hemácias, e similarmente ao que ocorre nos ossos, trata-se de um processo reversível, não ocorrendo anemia ou outro efeito as células sanguíneas. (MENDONÇA <sup>1</sup>, 2003 apud SANTOS, 2009 p.39-40)

Do Alumínio existente no corpo, cerca de metade se liga ao esqueleto e um quarto nos pulmões. A maior parte do Alumínio detectado nos pulmões está provavelmente relacionada aos compostos à base de alumínio insolúveis que entram no organismo através das vias aéreas superiores. Enquanto a maior parte observada em outras partes do corpo tem sua origem principalmente relacionada a alimentação como fonte de exposição. (AZEVEDO; CHASIN, 2003)

O Alumínio é neurotóxico em animais de experimentação, com grande variação entre as espécies e idades. Em animais suscetíveis, tais como coelhos e gatos, a mudança patológica precoce mais proeminente é o acúmulo de emaranhados neurofibrilares em neurônios grandes de muitas regiões cerebrais. Isso está associado com a perda das sinapses e a atrofia da árvore dendrítica. Em outras espécies das funções cognitivas e motora e anormalidades comportamentais são frequentemente observadas. (KLAASSEN, 2012)

Há uma preocupação crescente acerca dos efeitos adversos do Alumínio no desenvolvimento de alterações de comportamento . Animais expostos a Alumínio apresentam dificuldades de aprendizagem e déficit de memória. Estas alterações foram observadas em gatos, ratos e coelhos. Porém, a utilização de protocolos de exposição bem distintos e um número reduzido de testes comportamentais não possibilita a caracterização das alterações comportamentais induzidas por Alumínio.(SILVA,V.,2005)

A principal via de eliminação para o Alumínio é a renal. Em condições seguras de exposição, as pessoas saudáveis são capazes de eliminar a maior parte do Alumínio absorvido através da filtração glomerular. Este mecanismo fisiológico é bastante eficiente e protege o indivíduo contra o acúmulo desse metal. Somente nos casos em que a ingestão exceder os limites de 100mg/dia, ou quando o rim não estiver funcionando adequadamente pode ocorrer retenção. (AZEVEDO; CHASIN, 2003)

---

<sup>1</sup> MENDONÇA ,J.K.A., Interação do alumínio com ânions de baixo peso molecular e alguns dos aminoácidos presentes no sangue. Tese de Doutorado, UFSM, 2003.

Em indivíduos com função renal enfraquecida ou com insuficiência renal, todo o Alumínio absorvido deposita-se no organismo, preferencialmente no tecido ósseo, onde faz trocas com o cálcio. (SANTOS,2009)

A maioria dos casos de toxicidade por Alumínio em humanos é observada em pacientes com doença renal crônica ou em pessoas expostas ao alumínio nos locais de trabalho, sendo o pulmão, os ossos e o sistema nervoso central os órgãos mais afetados. O Alumínio também pode produzir efeitos no desenvolvimento. (KLAASSEN, 2012)

Nos seres humanos com função renal normal, a concentração desse metal no soro situa-se normalmente abaixo de 6 µg/L. Os paciente com insuficiência renal apresentam invariavelmente níveis de Al no soro acima desse valor (BURTIS,1998)

#### 1.2.1 A intoxicação ocupacional por Alumínio

Os trabalhadores que apresentam maior risco de exposição ocupacional são aqueles cuja atividade profissional está ligada a serviços médicos e a outras áreas da saúde, impressão e pinturas, montagens de peças automobilísticas em várias de suas etapas (fundição, soldagem), fabricação de produtos metálicos, papéis e produtos afins, produtos químicos e indústrias de metal primário. (AZEVEDO; CHASIN, 2003)

As exposições ocupacionais ao metal ocorrem também durante a mineração e o processamento, bem como na solda com Alumínio, a exposição à poeira de Alumínio pode produzir fibrose pulmonar em humanos. (KLAASSEN, 2012)

A exposição ocupacional considera principalmente a exposição a partículas (em geral <1 µm) que normalmente encontram-se, no processo industrial, associada a óleos e solventes cuja ação está relacionada com a de agentes oxidantes.

(AZEVEDO; CHASIN, 2003)



### 1.2.2 A intoxicação por Al em pacientes com Insuficiência Renal Crônica.

Os pacientes com graus variados de Insuficiência Renal têm a via de excreção do alumínio comprometida, tornando-se potenciais candidatos à intoxicação crônica. (JERONYMO; FUJIMURA,1998)

Embora seja mais frequente em pacientes com Doença Renal Crônica (DRC) em diálise, a intoxicação por Al já foi descrita na DRC pré-dialítica e em pacientes transplantados renais. O Al acumula-se em vários tecidos, incluindo osso, cérebro, glândulas paratireóides e outros órgãos. Portanto, as manifestações clínicas do seu acúmulo são variadas, dependendo do órgão afetado, assim como da magnitude da intoxicação.

Os principais sinais e sintomas da intoxicação alumínica são a anemia hipocrômica e microcítica, a neurotoxicidade aguda (agitação, confusão mental, mioclonia e convulsão), a encefalopatia dialítica (distúrbios da marcha e fala, apraxia motora, alucinações auditivas e visuais) e a doença óssea relacionada ao Al (Osteomalacia e Doença Óssea Adinâmica [DOA]). (BARRETO; ARAUJO, 2008)

Uma síndrome neurológica progressiva tem sido relatada em pacientes em hemodiálise intermitente a longo prazo para o tratamento de falência renal crônica. O primeiro sintoma nesse paciente é a disfunção da fala seguida por demência, convulsões e mioclonia. O transtorno, que costuma aparecer após 3 a 7 anos de tratamento de diálise, pode ser devido a intoxicação por Alumínio. A concentração de Alumínio no cérebro, nos músculos e nos ossos aumenta nesses pacientes. (KLAASSEN, 2012)

Na IRC e hemodiálise, o Alumínio dietético é inadequadamente eliminado, sendo depositado no osteóide do osso recém-formado, inibindo a mineralização e levando à osteomalácia. O quadro clínico é representado por dor óssea difusa, mais grave e incapacitante que a da osteíte fibrosa, com maior risco de fraturas, principalmente de costelas.(VIEIRA et al,2005)

A osteomalácia, que representa um dos estados de “baixo turnover ósseo”, caracteriza-se por um excesso de osteóide lamelar não mineralizado, estando ausentes atividade celular e fibrose endóstea, e havendo marcada diminuição da mineralização. Tem sido demonstrado que a grande maioria de pacientes em diálise

e portadores de osteomalácia tem extensos depósitos ósseos de Alumínio. O outro tipo de lesão de “baixo turnover” ósseo é a doença óssea aplástica ou adinâmica, onde há baixa formação óssea sem marcado aumento de osteóide não mineralizado, podendo estar relacionada ou não a acúmulo de Alumínio; os casos com Alumínio aumentado tem pior prognóstico tanto em relação à doença óssea como à mortalidade. (SILVA, L., 1998)

As vias de contaminação por esse metal são a oral, sobretudo pelo uso de quelantes de fósforo à base de alumínio, e a parenteral, através da água utilizada no preparo do dialisato. Outras formas de contaminação descritas incluem o uso de utensílios domésticos de Alumínio e soluções parenterais. Além disso, o uso de medicamentos contendo citrato pode facilitar a absorção intestinal de Alumínio. (BARRETO; ARAUJO, 2008)

As altas concentrações de Alumínio no soro podem estar relacionadas com o aumento dos níveis do hormônio da paratireoide, que se devem ao baixo teor de cálcio no sangue e osteodistrofia, comuns a pacientes com Doenças Renais Crônicas. (KLAASSEN, 2012)

Os passos importantes na prevenção e no manejo terapêutico incluem adequado tratamento da água por deionização e osmose reversa, a fim de se obter valores menores que 10 microgramas/litro, substituição dos quelantes com Alumínio por carbonato ou acetato de cálcio e desintoxicação com desferroxamina, seja com doses maiores inicialmente utilizadas ou com doses menores mais recentemente recomendadas. (SILVA, L., 1998)

A monitorização dos níveis séricos de Alumínio é a forma considerada mais apropriada para que sejam evitados efeitos tóxicos do alumínio em pacientes submetidos à hemodiálise.

O encontro internacional “The Role of Biological Monitoring in the Prevention of Al Toxicity in man”, organizado pela Comunidade Comum Européia e IUPAC, em Luxemburgo, 1982, conseguiu estabelecer critérios recomendados para a manutenção de pacientes submetidos à diálise. Os critérios são:

- As concentrações séricas de Alumínio nunca devem exceder 200ug/l;
- As concentrações superiores a 100ug/l devem ser reavaliadas e os níveis cuidadosamente monitorados;

- As concentrações entre 60 e 100ug/l aparentemente não causam problemas aos pacientes em curto prazo. (AZEVEDO; CHASIN, 2003)

As medições do Alumínio sérico apresentam algumas limitações e significativas dificuldades de interpretação. O Alumínio sérico representa apenas o Alumínio presente no espaço extracelular, isto é, em cerca de 5% da massa corporal.

A determinação dos níveis séricos de alumínio informa-nos mais sobre a exposição aguda a este metal do que sobre a respetiva exposição crónica. Estas determinações seriadas permitem ainda definir um perfil de aluminemia para cada doente e acompanhar eventuais variações bruscas (indicadoras de exposição maciça e/ou recente a este metal).

Embora a relevância deste teste tenha sido, ocasionalmente, posta em causa, pelas variações dos resultados (variações inter-testes), e pelas dificuldades na interpretação dos mesmos, ele tem sido utilizado na prática clínica nefrológica. (FERREIRA, 2012)

O teste com desferroxamina (DFO), interpretado de acordo com os níveis de PTH e estoque de ferro, apresenta uma boa sensibilidade e especificidade para o diagnóstico da intoxicação pelo Alumínio. Teste com DFO positivo combinado com PTH intacto menor que 150pg/mL, com estoque de ferro adequado (ferritina entre 100 e 500ng/mL) tem valor preditivo positivo para Doença Óssea Relacionada ao Alumínio. O teste com DFO deverá ser realizado anualmente e poderá ser repetido caso o paciente apresente pelo menos uma das seguintes situações clínicas: presença de sinais e sintomas recentes de intoxicação alumínica, início de tratamento farmacológico para HPS e antes de PTX e naqueles pacientes com história de exposição recente ao Alumínio.

O teste é feito através de duas coletas de sangue, após 4h de jejum, para determinação dos níveis séricos de Alumínio, sendo a primeira coleta realizada antes da 1ª sessão e a segunda coleta antes da 2ª sessão de HD da semana. Após o término da primeira sessão de HD, infundir DFO na dose de 5mg/kg de peso, diluída em 100mL de solução glicosada a 5% ou fisiológica a 0,9%, durante 30 minutos. O teste com DFO é considerado positivo se a diferença (delta) entre a 1ª e 2ª concentração sérica de alumínio for maior que 50µg/L. Para pacientes em diálise peritoneal, o teste com DFO deve ser realizado também com duas coletas de sangue para dosagem de Alumínio sérico, separadas por um período mínimo de 5h, durante

o qual, a deve ser interrompida (cavidade abdominal vazia). Sabe-se que, nesse período de 5h, a concentração de Alumínio sérico atinge seu pico máximo após a infusão de DFO.

A dose de DFO é a mesma utilizada para a HD e deve ser administrada imediatamente após a 1ª coleta de sangue. É importante ressaltar que se deve ter atenção especial na coleta de sangue e no método utilizado para sua dosagem. Por ser muito abundante na natureza, existe um risco elevado de contaminação da amostra, gerando resultados falsamente positivos. Para se evitar tal interferência, a coleta deve ser feita em tubo seco livre de metal, enquanto que a dosagem deverá ser feita pela técnica de Espectrofotometria de Absorção Atômica, com Forno de Grafite. Embora o teste com DFO tenha reduzido a necessidade de se realizar biópsia óssea, essa continua sendo o único método para o diagnóstico de certeza da intoxicação óssea pelo Alumínio. Assim, em caso de suspeita clínica de intoxicação por Alumínio associada a um teste com DFO negativo, a biópsia óssea deve ser sempre realizada. A presença de pelo menos 20% da superfície óssea trabecular recoberta por Alumínio, detectada através da coloração por solocromo azurine, é considerada diagnóstica da intoxicação óssea por esse metal. (BARRETO; ARAUJO, 2008)

### 1.2.3 A Doença de Alzheimer

A Doença de Alzheimer (DA) é uma demência degenerativa caracterizada por alterações típicas, destrutivas de neurônios (emaranhados neurofibrilares e placas amilóides), e proliferação de células gliais. (RIBIZZI et al, 2010, tradução nossa)

O fator genético é considerado atualmente como preponderante na etiopatogenia da DA entre diversos fatores relacionados. Além do componente genético, foram apontados como agentes etiológicos, a toxicidade a agentes infecciosos, ao Alumínio, a radicais livres de oxigênio, a aminoácidos neurotóxicos e a ocorrência de danos em microtúbulos e proteínas associadas. É interessante ainda salientar que estes agentes podem ainda atuar por dano direto no material genético, levando a uma mutação somática nos tecidos. (SMITH,1999)

Uma possível relação entre o Alumínio e a Doença de Alzheimer tem sido motivo de especulação por décadas. Níveis elevados de Alumínio em cérebros com Alzheimer podem ser consequência, e não a causa da doença. A reduzida eficácia da barreira hematoencefálica na doença de Alzheimer pode permitir a entrada de mais Alumínio no cérebro. Além disso estudos recentes tem levantado a possibilidade de que os métodos de coloração em estudos anteriores podem ter levado a contaminação por Alumínio. Há conclusões conflitantes em estudos examinando o papel do Alumínio na DA ,entretanto, há cada vez mais evidencias sugerindo uma ligação entre o Alumínio no cérebro e outras doenças neurodegenerativas. (KLAASSEN, 2012)

Em 2008 foi publicada uma revisão que demonstrou que 68% dos trabalhos analisados apresentam o Al como um dos fatores de risco para a DA, comprovando e descrevendo os mecanismos toxicológicos através dos quais o Al afeta o tecido nervoso. Neste estudo foi destacado a necessidade de compreender a importância dos fatores ambientais, em especial a exposição ao Al, como determinantes no processo saúde-doença da população, realçando seu potencial para afetar, positiva ou negativamente, os processos naturais de envelhecimento. (FERREIRA et al, 2008)

### 1.3 Diagnóstico na intoxicação por Alumínio

O diagnóstico da intoxicação pelo Al é baseada na determinação dos níveis séricos basais e após o teste de DFO. D' Haese et al propuseram uma estratégia para diagnóstico da sobrecarga corporal de Al que consiste na avaliação da presença de sintomas clínicos , dosagem de ferritina e do paratormônio (PTH) associada a determinação dos níveis séricos basais do metal e após o teste de DFO. Os níveis plasmáticos de Al representaram um guia para se avaliar o risco de sua toxicidade, sendo especialmente útil como um índice de exposição aguda. (D' HAESE et al 1995 apud LIMA et al,2001. P 10).

Várias técnicas têm sido descritas para a determinação de Alumínio em amostras biológicas mas, segundo os dados disponíveis na literatura, a Espectrofotometria de Absorção Atômica por Forno de Grafite é o método mais apropriado.

A atomização por Forno de Grafite é mais eficaz que a técnica por chama, sendo que um dos motivos que justificam essa eficácia é que para a produção de átomos no estado fundamental praticamente toda amostra é aproveitada. Além disso, a nuvem atômica formada permanece mais tempo no caminho ótico, já que fica confinada dentro do Tubo de Grafite, devidamente aquecido. Essa técnica atinge níveis adequados de sensibilidade; os limites de detecção alcançados estão na faixa de ng/L para a maioria dos elementos.

A utilização de pequenos volumes de amostra, sem prejuízo da sensibilidade, e o nível de automação obtido na técnica por Forno de Grafite são, também, exemplos das vantagens que essa metodologia oferece. (JERONYMO; FUJIMURA,1998)

### 1.3.1 A contaminação na determinação de traços de Alumínio

A determinação de Alumínio encontra uma peculiaridade que é a necessidade de controle rigoroso de contaminação externa, já que esse metal é um dos mais abundantes na natureza e os níveis de sensibilidade exigidos são muito altos. (JERONYMO; FUJIMURA,1998)

A onipresença do Alumínio se deve principalmente a emissões antropogênicas em função do seu grande emprego a nível industrial. Além de seu uso geral como metal, o óxido de Alumínio é componente de quase todos os tipos de vidros, e compostos de Alumínio são utilizados como catalisadores na fabricação de plásticos. Isto elimina qualquer possibilidade de encontrar recipientes livres de traços de Alumínio, a não ser que tenham sido especialmente preparados para isto. (BOHRER,1997)

Podem contribuir para a contaminação além dos reagentes e recipientes utilizados na análise, pó, fumaça, partículas provenientes de paredes, chão, teto, roupas e de materiais naturais como, por exemplo o pólen.

O problema da contaminação já existe a partir da coleta da amostra em função do tipo de recipiente para a armazenagem, limpeza do mesmo e da presença de partículas de poeira no ar. Às amostras de sangue acrescentem-se ainda traços de Alumínio provenientes da pele do paciente, da utilização de agulhas e seringas e,

quando necessário, da utilização de agentes anticoagulantes. (GARCIA; GIODA; NASCIMENTO, 1996)

A coleta de sangue, por exemplo, em tubo tipo Vacutainer padrão pode contaminar a amostra em até 60 ng/ml de Alumínio. Isso se deve ao fato que as tampas de borracha utilizadas nesses tubos têm uma quantidade muito grande de silicato de Alumínio. (JERONYMO; FUJIMURA, 1998)

As principais fontes de contaminação são recipientes, reagentes e partículas provenientes do ar. Desta forma a determinação de traços de Alumínio começa pela escolha do material adequado e sua limpeza, utilização de reagentes de qualidade ou pré-purificados e a execução da análise em ambiente livre de partículas de poeira.

Recipientes de vidro são contra-indicados devido à presença do óxido de Alumínio. Recipientes plásticos devem ser submetidos a uma descontaminação por ação de uma solução de lavagem. As mais empregadas são soluções de ácido nítrico, ácido clorídrico e agentes complexantes como o Ácido Etilenodiamino Tetra-acético (EDTA) para retirar os traços de Alumínio das paredes dos recipientes.

Um ambiente livre de partículas de poeira é obtido através da utilização de filtros de ar, instalados de forma a purificar o ar de uma sala ou de um ambiente menor como uma capela.

Isto é conseguido através da utilização de filtros HEPA (High Efficiency Particulate Air filter) desenvolvidos nos Estados Unidos durante a II Guerra Mundial para conter partículas radioativas.

Adequados para laboratórios de análise de traços são ambientes Classe 100, que devem, teoricamente, ter uma atmosfera com no máximo 100 partículas de 0,5  $\mu\text{m}$  por 0,028m<sup>3</sup>. De acordo com Howard e Statham os filtros HEPA tem uma eficiência maior do que 99,97% na remoção de partículas com diâmetro igual ou maior do que 0,3  $\mu\text{m}$ . (GARCIA; GIODA; NASCIMENTO, 1996)

## **2 Objetivo**

Desenvolver um Procedimento Operacional Padronizado para dosagem de Alumínio sérico através de Espectrofotometria de Absorção Atômica com Forno de Grafite no Setor de Metais do Laboratório de Pediatria do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (HCFMRP-USP).



### 3 Materiais e Métodos

#### 3.1 Instrumental

Para a dosagem do Alumínio foi utilizado um Espectrofotômetro de Absorção Atômica (EAA) Zeeman Varian modelo 640Z, com Forno de Grafite, equipado com amostrador automático.

Foram realizados alguns experimentos para determinar as condições instrumentais do equipamento para análise de Al. Parâmetros como comprimento de onda, programação de temperatura do forno foram analisados. As condições instrumentais que apresentaram melhores resultados foram utilizados para todas as análises aqui descritas e estão detalhadas abaixo.

Condições instrumentais do equipamento:

- Comprimento de onda: 309,3 e 396,2 nm
- Corrente da lâmpada de cátodo oco de Al: 10 mA
- Aparelho: automix
- Resultados: concentração em  $\mu\text{g/L}$  e replicatas
- Sinal: Peak Height (altura do pico)
- EHT inicial: 291 Volts
- Volume da amostra: 20 $\mu\text{L}$
- Volume total: 25 $\mu\text{L}$
- Tipo gás normal: Argônio

Tabela 1 – Rampa de Aquecimento 1 do Forno de Grafite com dez passos

Etapa	Temperatura (°C)	Tempo (s)	Fluxo de gás (L/min)	Gás	Leitura
1	85	5,0	3,0	Argônio	Não
2	95	40,0	3,0	Argônio	Não
3	120	10,0	3,0	Argônio	Não
4	1100	10,0	3,0	Argônio	Não
5	1100	10,0	3,0	Argônio	Não
6	1100	5,0	3,0	Argônio	Não
7	1300	2,0	0,0	-	Não
8	2700	0,7	0,0	-	Sim
9	2700	1,0	0,0	-	Sim
10	2800	1,0	3,0	Argônio	Não

Tabela 2 – Rampa de Aquecimento 2 do Forno de Grafite com nove passos

Etapa	Temperatura (°C)	Tempo (s)	Fluxo de gás (L/min)	Gás	Leitura
1	85	5,0	3,0	Argônio	Não
2	95	35,0	3,0	Argônio	Não
3	120	10,0	3,0	Argônio	Não
4	1100	20,0	3,0	Argônio	Não
5	1100	10,0	3,0	Argônio	Não
6	1100	2,0	0,0	-	Não
7	2500	0,7	0,0	-	Sim
8	2500	1,0	0,0	-	Sim
9	2500	1,0	3,0	Argônio	Não

### 3.2 Materiais, equipamentos e reagentes

Os reagentes, gases e materiais de referência certificados foram utilizados dentro dos respectivos prazos de validade e estão especificados abaixo:

- Ácido Nítrico 65% PA ISSO Emsure® Merck KGaA
- Ácido Nítrico 65% Suprapur Merck KGaA
- Água Ultra pura, Millipore, 18,2  $\Omega$ /cm
- Antifoam B Emulsion, Sigma® Aldrich Chemie GmbH P.O 1120 A- 5757
- Balança analítica , Mettler Toledo, AB204
- Balão volumétrico de 100 mL e 50 mL, Pyrex
- Becker de 80mL, Pyrex
- Centrífuga, CT -500, Cientec
- Dicromato de potássio (  $K_2Cr_2O_7$  ) , Merck
- Erlenmeyer de 125 mL, Pyrex
- Fosfato dihidrogeno de amônia ( $NH_4H_2PO_4$ ), Sigma® Aldrich
- Gás Argônio UP White Martins
- Material de referência certificado – BCR- 637 EUROPEAN COMMISSION – JOINT RESEARCH CENTRE – INSTITUTE FOR REFERENCE MATERIALS AND MEASUREMENTS. Concentração certificada em 12,5  $\mu$ g/L desvio 3,0.
- Microcentrifuga MSE, Sanyo
- Microtubos de 2,0mL PP Sarsctect e 1,5 mL clear Axygen
- Pipetas de 1  $\pm$  10mL, Discovery Comfort Autoclavable HT, 20-200  $\mu$ L, Thermo Scientific e 100- 1000  $\mu$ L, Thermo Scientific
- Ponteiras de 10mL Gilson, 1000 $\mu$ L Axygen Scientific e de 200 $\mu$ L Axygen Scientific
- Triton X-100 Acros Organics
- Tubo BD Vacutainer® Trace Element Serum 6,0 mL

### 3.3 Amostras

Utilizou-se como testes dois grupos distintos:

Grupo N – composto por 21 amostras de soros de pessoas saudáveis doadores voluntários do próprio laboratório considerados grupo controle.

Grupo P – composto por 16 amostras de soros de pacientes da Unidade de Terapia Renal (UTR) do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, com graus variados de insuficiência renal, desse foi utilizado uma fração das amostras que são anualmente enviados a um laboratório de referência.

As amostras foram coletadas em tubo livre de elementos traços (tampa azul marinho), depois de retraído o coágulo os tubos foram centrifugados por 10 minutos a 2.500 rotações por minuto (rpm) e o soro transferido para tubos de polietileno em uma “sala limpa” equipada com filtro HEPA. O tempo entre a coleta e a separação do soro não excedeu duas horas, para evitar hemólise.

Posteriormente as amostras foram armazenadas a uma temperatura de -20°C até o momento da análise.

### 3.4 Controle da Contaminação

Para minimizar a contaminação durante a análise, as seguintes medidas foram tomadas:

- A água utilizada em todos os procedimentos foi obtida a partir de um sistema de purificação Mili-Q da Milipore, o parâmetro utilizado para avaliar a qualidade da água foi a resistividade fixada em 18 MΩ/cm.
- Todo o material utilizado já lavado no Setor de Lavagem do HCFMRP-USP foi descontaminado novamente em uma solução de ácido nítrico (HNO<sub>3</sub>) – PA Merck a 30% por um período mínimo de 12 horas (overnight) e enxaguado abundantemente com água ultra pura sem contato com papel. Todo material lavado, foi utilizado no mesmo dia da leitura.

- Todas as etapas da análise foram executadas em ambiente clean, equipada com filtro HEPA (High Efficiency Particulate Air Filter) e classificada pela ISO 7 como classe 10.000 partículas.
- Durante as análises no EAA, o amostrador automático era lavado dez vezes com água acidificada com  $\text{HNO}_3$  a 0,3% no intervalo de cada leitura.
- Entre as leituras das amostras, foi lido um “blank”, que era a água ultra pura, mais o modificador de matriz naquelas curvas que precisava do mesmo, para garantir que as amostras e os padrões não estavam contaminados.

### 3.5 Curva de Calibração

A partir de uma solução concentrada de Alumínio de 1000mg/L TraceCERT Fluka foi preparada uma solução intermediária contendo 0,1% de solução estoque de Alumínio e 1,0 % de Ácido Nítrico ( $\text{HNO}_3$ ) suprapur . Um padrão de uso 20 $\mu\text{g/l}$  foi preparado a partir da solução intermediária, esse foi nomeado de Padrão 1. O equipamento faz a diluição dos outros padrões preconizados. Para o blank foi utilizado água ultra pura.

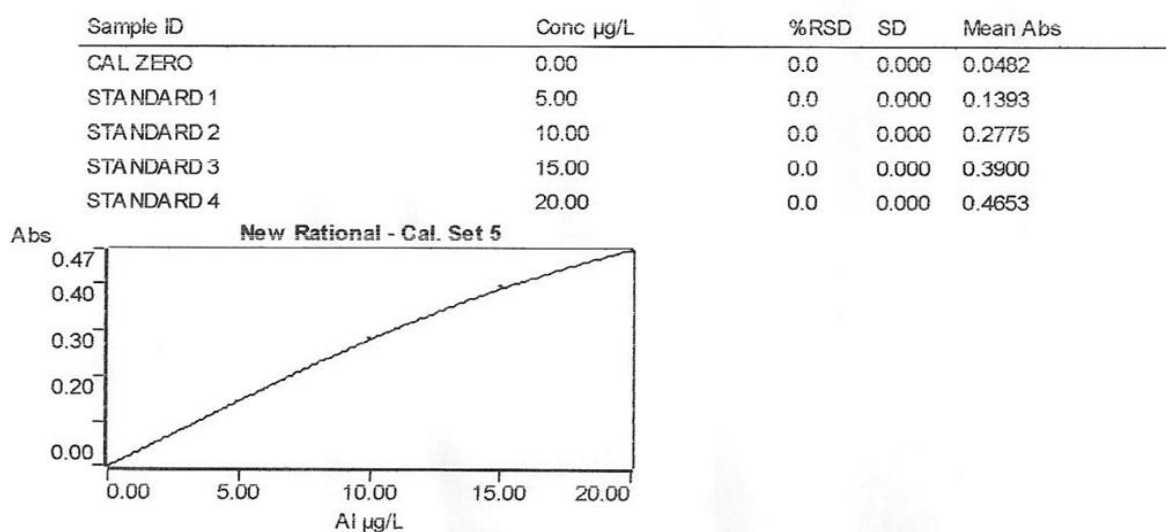


Figura 1 - Curva de calibração obtida no EAA 640Z.

### 3.6 Modificador de Matriz

Duas soluções foram utilizadas como Modificador de Matriz nos experimentos. A primeira, denominada Modificador de Matriz número 1, é uma solução de Fosfato Dihidrogeno de Amônia a 1% e a segunda denominada Modificador de Matriz número 2, é uma solução de Dicromato de Potássio a 0,1%.

### 3.7 Preparo prévio das amostras

Foram testadas 5 técnicas de preparo prévio de amostras visando a desproteinização do soro e a diminuição das interferências na análise.

As soluções utilizadas para a diluição do soro foram denominadas “Solução Diluidora de Alumínio no Soro” (SDAS). Abaixo estão descritas as formulações das soluções e as técnicas de preparo de amostra utilizadas.

SDAS 1 – Triton X-100 a 0,1% e HNO<sub>3</sub> a 0,07%. As amostras foram diluídas com essa solução nas proporções 1:2, 200ul de soro mais 200 ul do SDAS.

SDAS 2 – Triton X-100 a 0,05%, antifoam a 0,05% e HNO<sub>3</sub> a 5%. As amostras foram diluídas com essa solução nas proporções 1:2, homogeneizadas em vortex por 10 segundos e centrifugadas a 13000 rpm por 10 minutos.

SDAS 3 – Triton X-100 a 0,1%, antifoam 0,1% e HNO<sub>3</sub> a 0,5%. As amostras foram diluídas com essa solução nas proporções 1:2.

SDAS 4 – HNO<sub>3</sub> a 0,5%. As amostras foram diluídas com essa solução nas proporções 1:2, homogeneizadas em vortex por 10 segundos e centrifugadas a 13000 rpm por 10 minutos.

SDAS 5 – HNO<sub>3</sub> a 6%, Triton X-100 a 0,1% e antifoam a 0,1%. As amostras foram diluídas com essa solução nas proporções 1:2, homogeneizadas em agitador por 10 segundos e centrifugadas a 13000 rpm por 10 minutos.

## 4 Resultados e Discussões

O EAA com Forno de Grafite é eficaz para a dosagem de Al no soro pois consegue atingir níveis adequados de sensibilidade. Essa técnica vem sendo empregada mundialmente com êxito, mas no Brasil ainda não foi utilizada em todo o seu potencial. Essa pouca utilização talvez possa ser explicada pelas dificuldades operacionais, falta de treinamento técnico e, por fim, pelo custo analítico, relativamente elevado. (JERONYMO; FUJIMURA, 1998)

A descontaminação de todo o material utilizado com  $\text{HNO}_3$  30%, e o enxague abundantemente com água ultra pura foi de extrema importância para a minimização da contaminação externa. Observamos altos níveis de contaminação quando o material não era previamente descontaminado.

A lavagem do autoamostrador evita a contaminação entre as amostras.

O EAA com Forno de Grafite tem como objetivo fundamental gerar uma população significativa de átomos no estado fundamental, de tal forma que a absorção atômica possa ser medida. O processo de obtenção dos átomos ocorre em três estágios, estágio de secagem onde o solvente é removido da amostra, estágio de carbonização, onde são removidas as moléculas orgânicas pesadas e o material inorgânico e estágio de atomização, no qual os átomos no estado fundamental são gerados em uma zona de pequeno volume e coincidem com o caminho óptico do feixe de luz da fonte de radiação. Acima consideramos o processo como dividido em uma sequência de três estágios: secagem, carbonização e atomização, mas praticamente são empregados programas sequenciais divididos em pequenos multi-estágios (usualmente de 8 a 20). Cada estágio é isoladamente programado em duração, velocidade de aquecimento e temperatura final. O sinal analítico produzido no estágio de atomização é na forma de pico, muito bem definido. A área ou a altura deste pico poderá ser relacionado com a quantidade do elemento de interesse presente na amostra. Os resultados e os valores de concentração são obtidos com a comparação das absorbâncias das amostras com os respectivos padrões. (GONÇALVES, 1988)

Para definir a Rampa de Aquecimento ideal, foram construídas curvas de calibração, com dois modelos diferentes de rampa de aquecimento: a rampa de aquecimento número 1, com 55,0 segundos de secagem, 27,0 de pirólise e 1,7

de atomização e a rampa de aquecimento número 2, com 50,0 segundos de secagem, 32,0 de pirólise e 2,7 de atomização. Ambas tinham como parâmetros comprimento de onda 396,2, tubo plateau e não foi utilizado Modificador de Matriz. Estas podem ser visualizadas nas figuras 2 e 3.

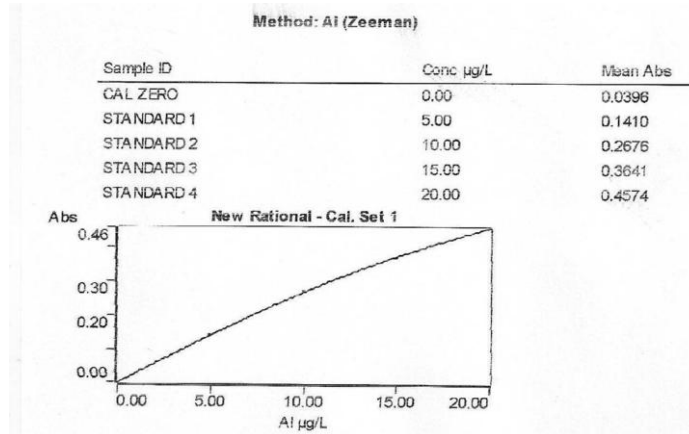


Figura 2 – Representação gráfica da Curva de Calibração número 1, elaborada com a Rampa de Aquecimento 1, comprimento de onda 396,2 e sem a presença de Modificador de Matriz.

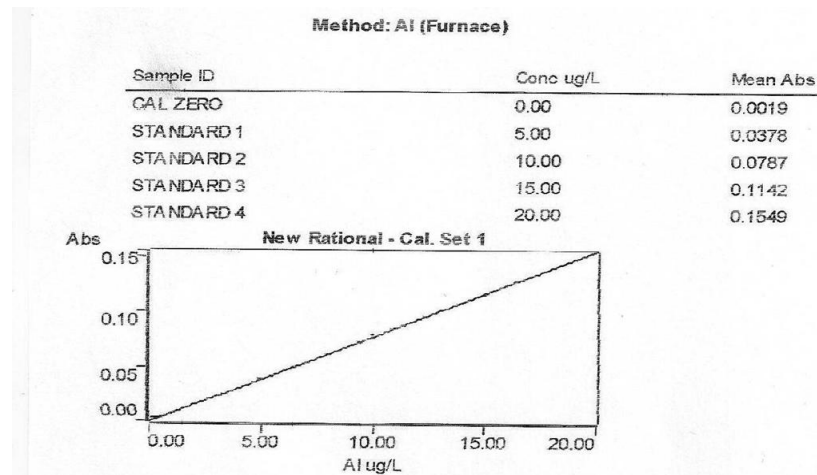


Figura 3 – Representação Gráfica da Curva de Calibração número 2, elaborada com a Rampa de Aquecimento 2, comprimento de onda 396,2 e sem a presença de Modificador de Matriz.

Nas figuras 4 e 5 estão representadas as leituras efetuadas pelo equipamento durante a construção da Curva de Calibração. Na figura 5 pode ser observada a falta de estabilidade do sinal analítico obtido na Rampa de Aquecimento número 2. Por ser mais estável, optou-se pela utilização da Rampa de Aquecimento número 1 em todas as análises seguintes.



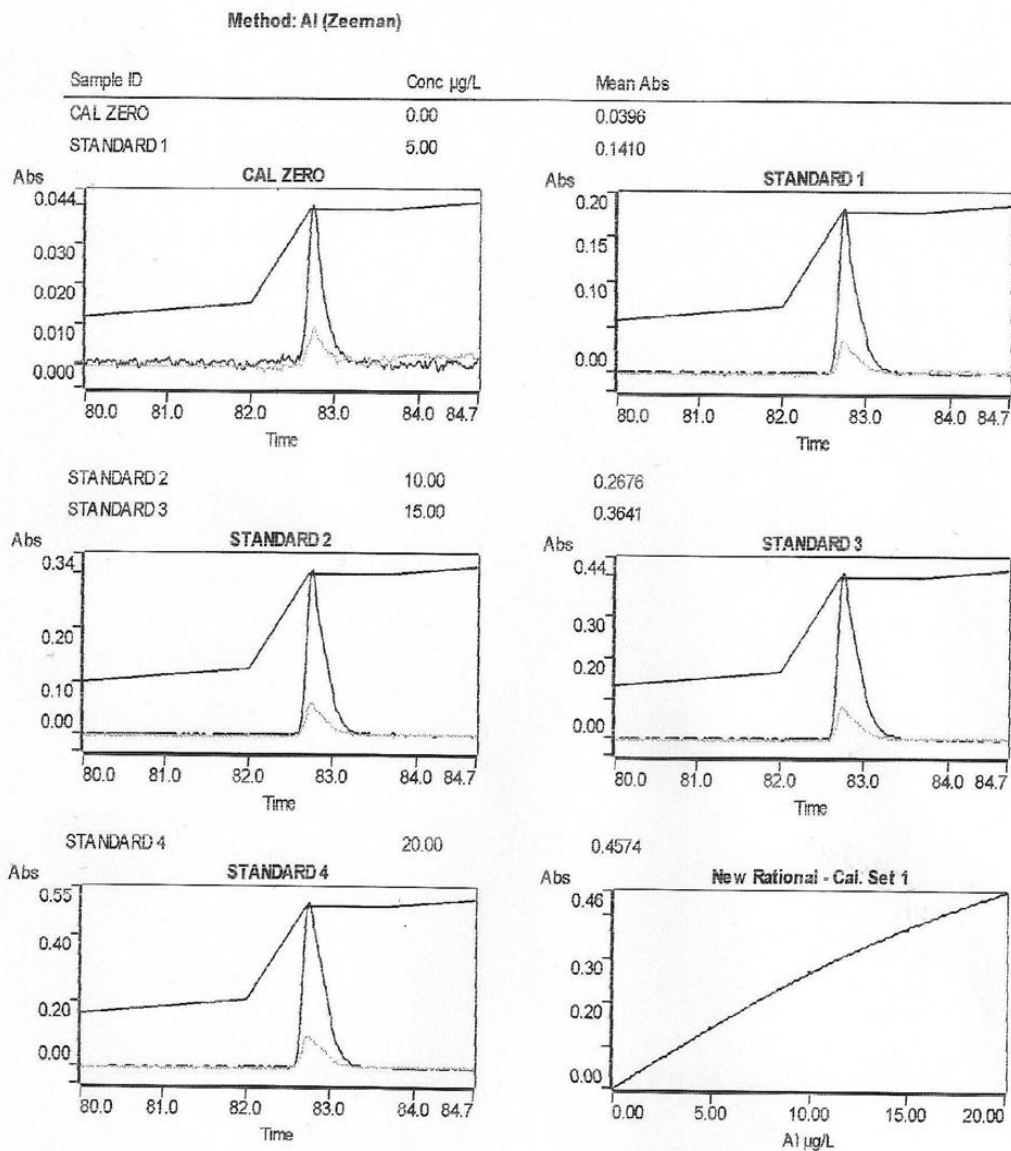


Figura 4 – Representações Gráficas da leitura do blank, Padrão de 5,0 $\mu\text{g/L}$ , Padrão de 10,0  $\mu\text{g/L}$ , Padrão de 15,0  $\mu\text{g/L}$  e Padrão de 20,0  $\mu\text{g/L}$  na Rampa de Aquecimento número 1.

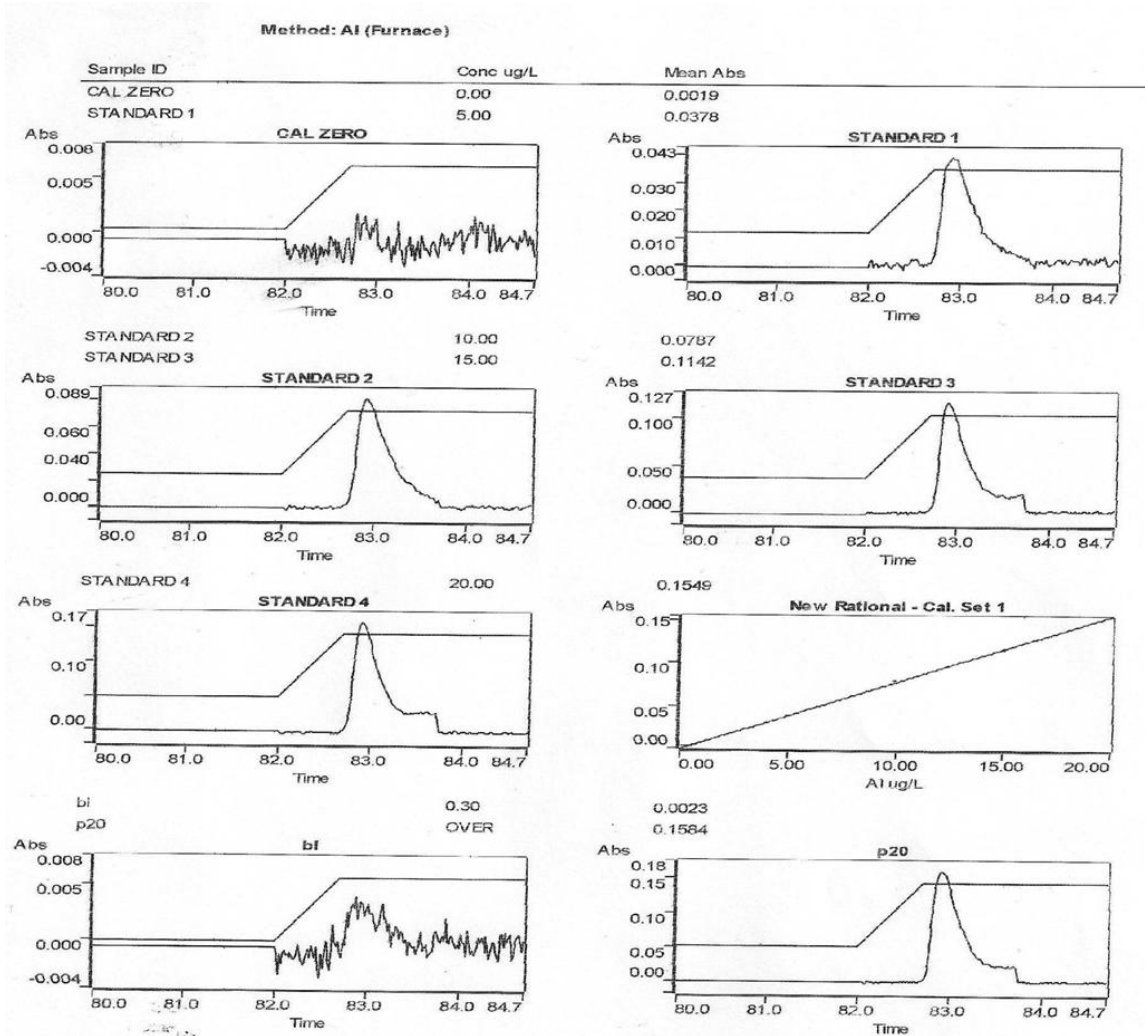


Figura 5 – Representações Gráficas da leitura do blank, Padrão de 5,0 $\mu$ g/L, Padrão de 10,0  $\mu$ g/L, Padrão de 15,0  $\mu$ g/L e Padrão de 20,0  $\mu$ g/L na Rampa de Aquecimento número 2.

Outros testes foram realizados para definir as condições ideais do equipamento e o preparo adequado das amostras. As análises realizadas e as conclusões obtidas serão relatadas a seguir.

Uma Curva de Calibração número **3** foi construída a partir da Solução Padrão 20 $\mu$ g/L, elaborada com comprimento de onda 309,3, tubo plateau, sem o uso de Modificador de Matriz e as amostras de soro diluídas com SDAS 1 e SDAS 2, esse procedimento se mostrou ineficaz. Com essa metodologia observou-se grande quantidade de interferências na dosagem das amostras. Em relação ao SDAS 1, observou-se uma dificuldade para pipetagem do amostrador

automático, durante o dispensar da amostra pois ocorria a formação de espuma que impedia que o volume total fosse desprezado no interior do Tubo de Grafite corretamente e não se obteve reprodutibilidade.

Nas figuras abaixo estão representadas a Curva de Calibração número 3 e as dosagens de uma amostra de soro nesta mesma. As interferências podem ser observadas na linha de cor mais clara.

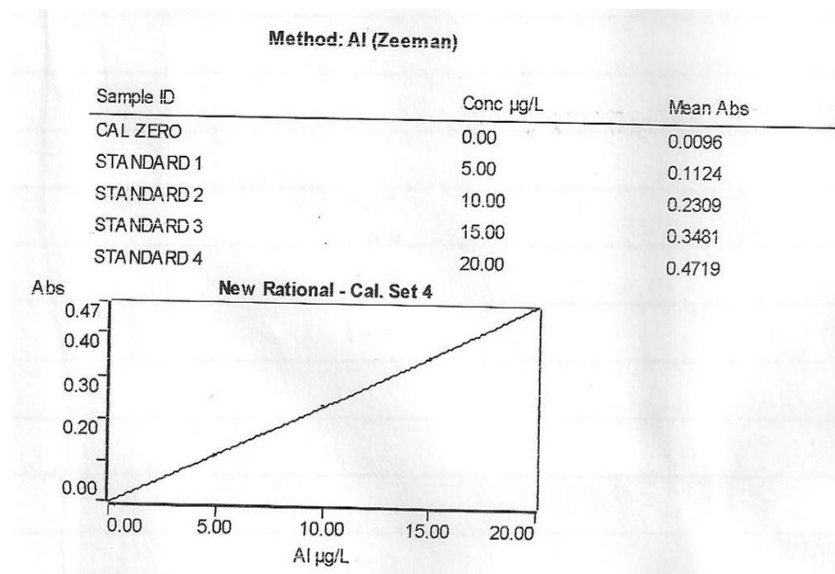


Figura 6 – Representação Gráfica da Curva de Calibração número 3, elaborada com comprimento de onda 309,3 e sem a presença de Modificador de Matriz.

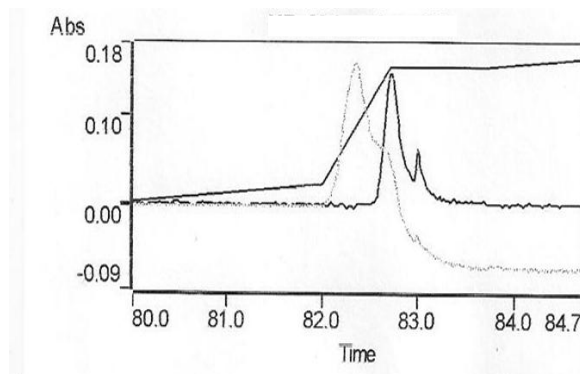


Figura 7 - Representação Gráfica da dosagem de uma amostra de soro analisada na Curva de Calibração número 3 e diluída com SDAS 1, onde se pode observar muitos interferentes.

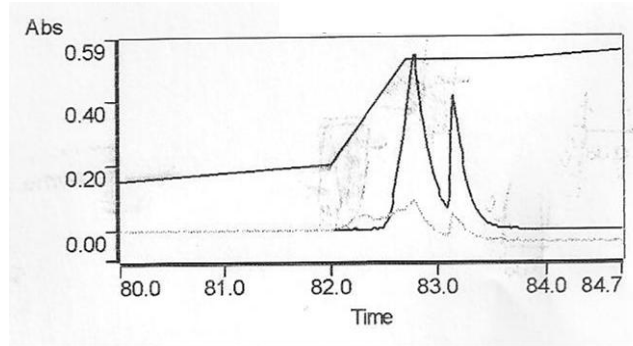


Figura 8 - Representação Gráfica da dosagem de uma amostra de soro analisada na Curva de Calibração número 3 e diluída com SDAS 2, onde se pode observar muitos interferentes.

A Curva de Calibração número 4, foi construída a partir da Solução Padrão 20µg/L, com comprimento de onda 309,3, tubo plateau, sem o uso de Modificador de Matriz e as amostras diluídas com SDAS 3. Apresentou grande quantidade de interferências na dosagem das amostras de soro e muitos erros intra-ensaios. Em relação ao SDAS 3, não houve desproteinização.

Nas figuras abaixo estão representadas a Curva de Calibração número 4 e as representações das dosagens de uma amostra de soro analisada duas vezes onde pode ser observada a falta de reprodutibilidade do método e a grande quantidade de interferentes.

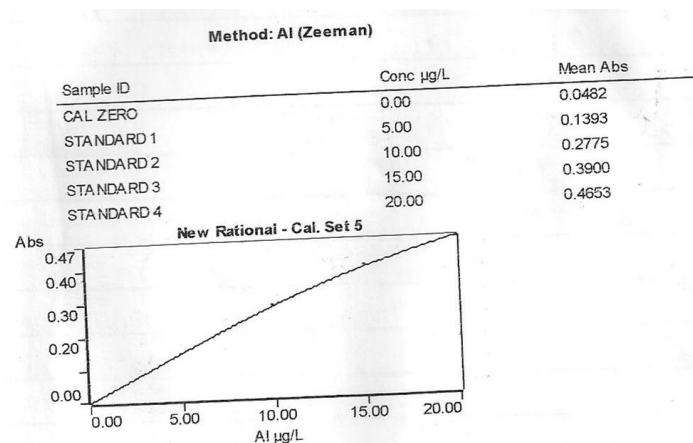


Figura 9 – Representação Gráfica da Curva de Calibração número 4, elaborada com comprimento de onda 309,3 e sem a presença de Modificador de Matriz.

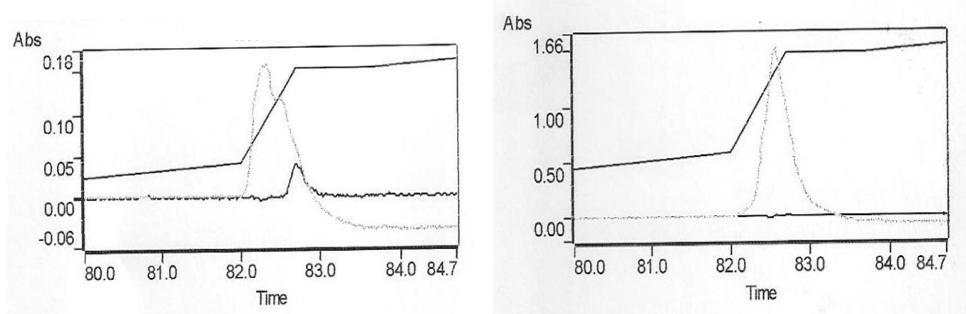


Figura 10 - Representação Gráfica das dosagens de uma amostra de soro analisada na Curva de Calibração número 4 e diluída com SDAS 3.

A modificação química é uma prática comum em determinações por Electrothermal atomic absorption spectrometry (ET AAS) cuja função é aumentar a estabilidade térmica do analito e/ou a eficiência da etapa de pirólise por aumento na volatilização da matriz, eliminando, assim, interferências provocadas pela matriz ou concomitantes presentes na amostra. (FROES,2006)

Os Modificadores de Matriz foram inseridos nas metodologias descritas abaixo na tentativa de estabilizar a análise das amostras de soro e diminuir as interferências, pois os resultados obtidos nas condições acima não foram satisfatórios. Exemplificamos com as Curvas de Calibração obtidas com os Modificadores Fosfato Dihidrogeno de Amônia a 1% e Dicromato de Potássio a 0,1% e a representação da dosagem de uma amostra de soro em ambas.

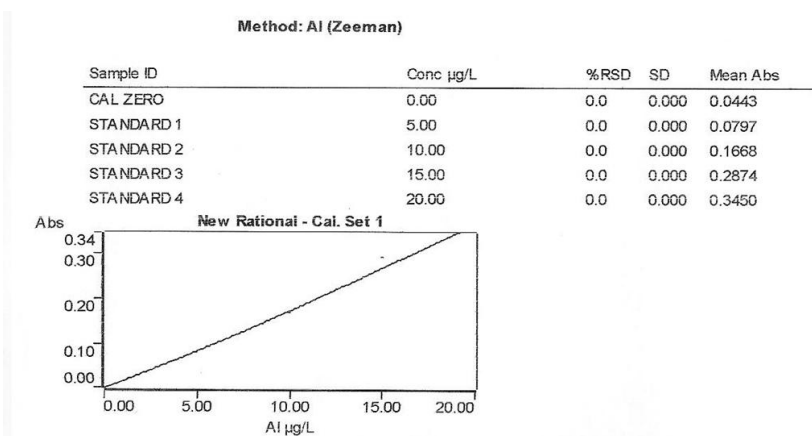


Figura 11 – Representação Gráfica da Curva de Calibração número 5, elaborada com comprimento de onda 309,3 e com Modificador de Matriz número 1 (Fosfato de Amônia a 1%).

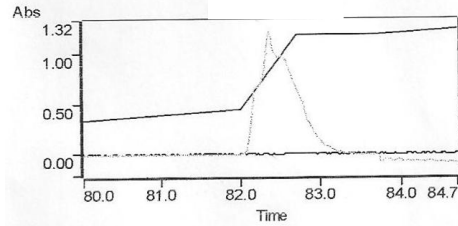


Figura 12 - Representação Gráfica da dosagem de uma amostra de soro analisada na Curva de Calibração número 5 e diluída com SDAS 4.

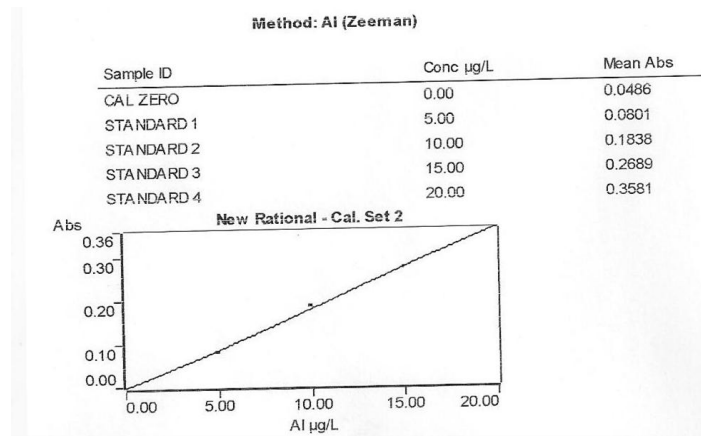


Figura 13 – Representação Gráfica da Curva de Calibração número 6, elaborada com comprimento de onda 309,3 e com Modificador de Matriz número 2 (Dicromato de Potássio a 0,1%).

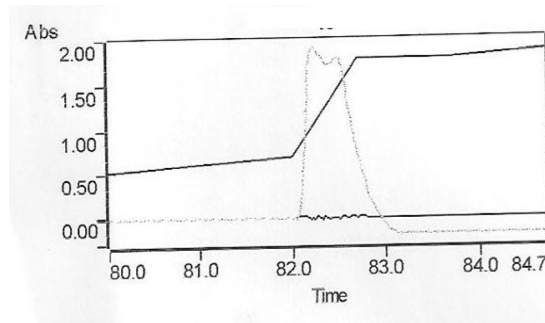


Figura 14 - Representação Gráfica da dosagem de uma amostra de soro analisada na Curva de Calibração número 6 e diluída com SDAS 4.

Amostras de soros de pessoas saudáveis e de pacientes com insuficiência renal crônica foram analisadas nas condições descritas acima. As concentrações das análises de soros de pessoas saudáveis estão representadas na Tabela 3. Na Tabela 4 há uma comparação das análises das amostras de soro de pacientes com IRC realizadas nessa metodologia com os resultados obtidos no laboratório de referência, para onde o Hospital das Clínicas encaminha suas dosagens.

Tabela 3 – Resultados das análises de amostras de soro de pessoas saudáveis.

Amostra	Concentração de Al em µg/L
N1	5,6
N2	5,9
N3	5,5
N4	5,3
N5	6,8
N6	4,4
N7	8,1
N8	2,1
N9	8,1
N10	1,2
N11	2,5

Tabela 4 – Resultados das análises de amostras de soro de pacientes com IRC no Laboratório do HC-FMRP e no Laboratório de referência.

Amostra	[ ] de Al no HC-FMRP ug/L	[ ] de Al no Lab de Referência ug/L
P1	15,1	19,0
P2	4,1	12,0
P3	4,2	16,0
P4	1,6	11,0
P5	6,3	13,0
P6	11,4	21,0
P7	1,7	6,0
P8	2,7	10,0
P9	10,6	11,0
P10	5,1	12,0
P11	2,5	8,0

Testes foram realizados utilizando o tubo partition nos comprimentos de onda 309,3 e 396,2, mas com este não foi possível obter uma Curva de Calibração.

O comprimento de onda 396,2 e o tubo plateau foram os parâmetros que apresentaram melhores resultados, foram construídas 3 Curvas de Calibrações em dias diferentes para avaliar a correlação linear, a Curva de Calibração número 7 tem coeficiente de correlação linear  $r= 0,9996$  , a Curva de Calibração número 8  $r= 0,9977$  e a Curva de calibração número 9  $r= 0,9999$  .Estas estão representadas nas figuras abaixo.

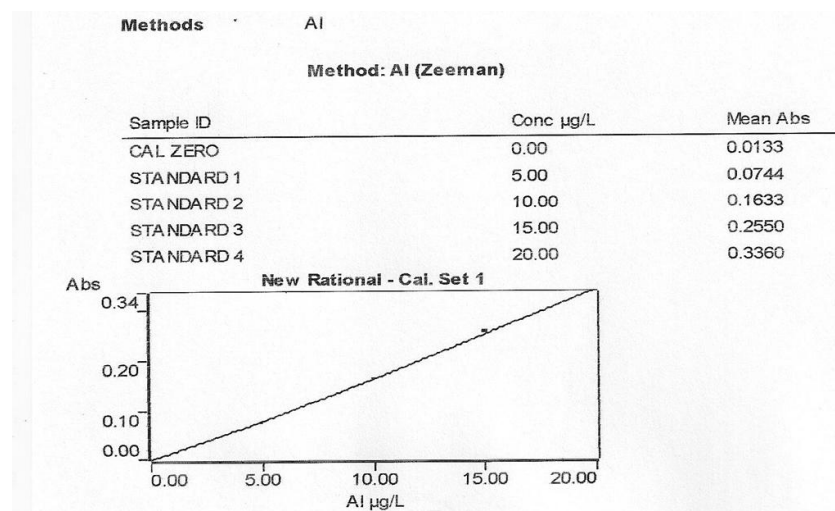


Figura 15 – Representação Gráfica da Curva de Calibração número 7, elaborada com comprimento de onda 396,2 e sem Modificador de Matriz.

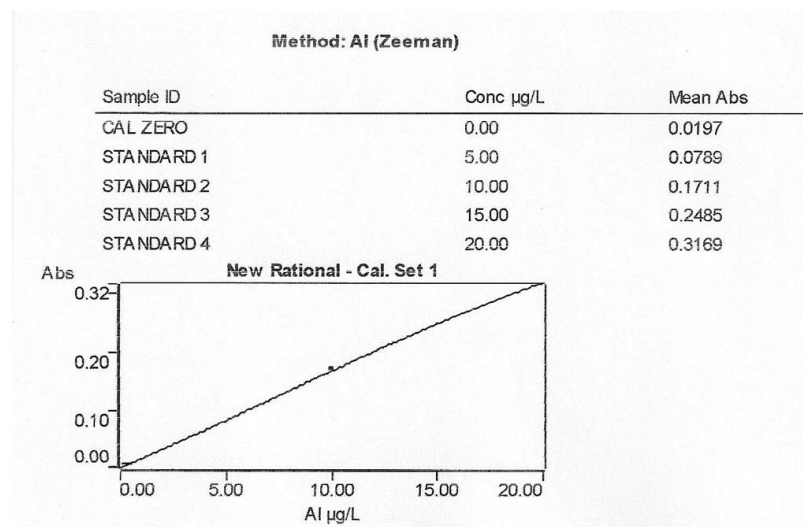


Figura 16 – Representação Gráfica da Curva de Calibração número 8, elaborada com comprimento de onda 396,2 e sem Modificador de Matriz.



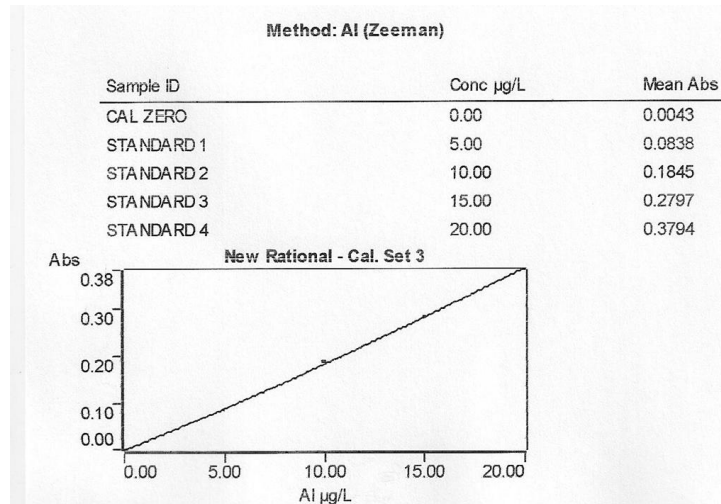


Figura 17 – Representação Gráfica da Curva de Calibração número 9, elaborada com comprimento de onda 396,2 e sem Modificador de Matriz.

Observada a linearidade da metodologia, optou-se pela utilização da Curva de Calibração número 9. Nessa foi analisada uma amostra de soro preparada com SDAS 5. O SDAS 5 foi considerado a solução ideal para o preparo das amostras, ele diminuiu as interferências e estabilizou a amostra. Foi possível identificar menor porcentagem de erros intraensaio nesse método. Abaixo é possível observar a reprodutibilidade nas dosagens de uma amostra de soro analisadas nessas condições.

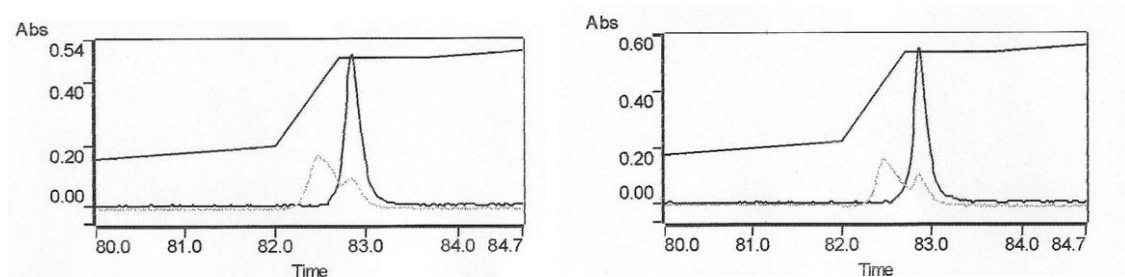


Figura 18 - Representação Gráfica das dosagens de uma amostra de soro analisada na Curva de Calibração número 9 e diluída com SDAS 5, sem modificador de matriz.

O Modificador Fosfato Dihidrogeno de Amônia 1% foi adicionado a esse procedimento para auxiliar na estabilização da amostra. Constatamos que ele é estável pelo período de 60 dias a -20°C e deve ser aliqotado em volumes de 1 ml para ser descongelado de única vez.

Foram construídas 3 Curvas de Calibrações em dias diferentes para avaliar a linearidade do procedimento. O coeficiente de correlação das curvas construídas são respectivamente:  $r = 0,9977$ ;  $r = 0,9996$  e  $r = 0,9994$ .

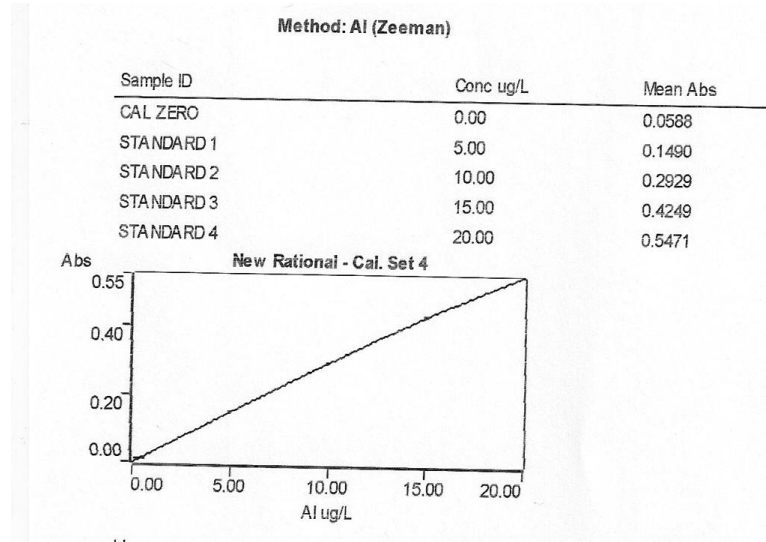


Figura 19 – Representação Gráfica da Curva de Calibração número 10, elaborada com comprimento de onda 396,2 e com Modificador de Matriz (Fosfato Dihidrogeno de Amônia a 1%)

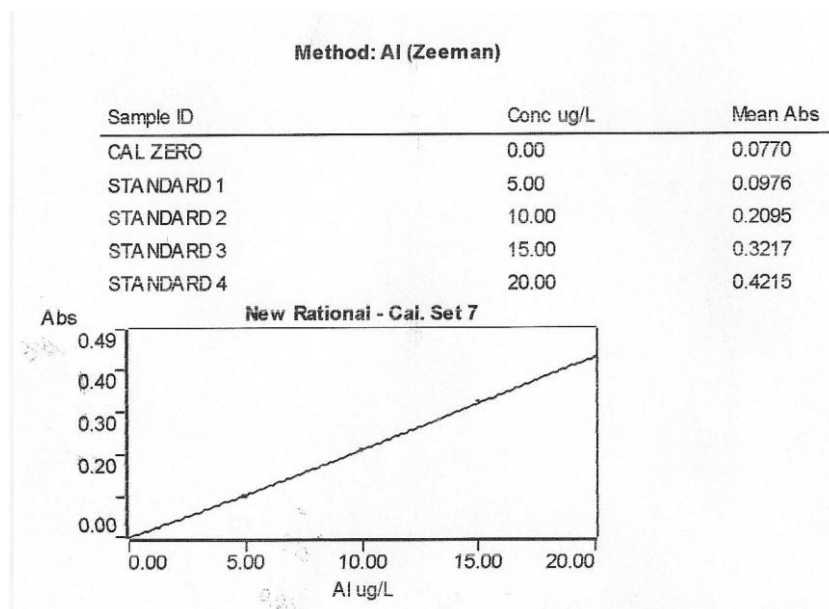


Figura 20 – Representação Gráfica da Curva de Calibração número 11, elaborada com comprimento de onda 396,2 e com Modificador de Matriz.

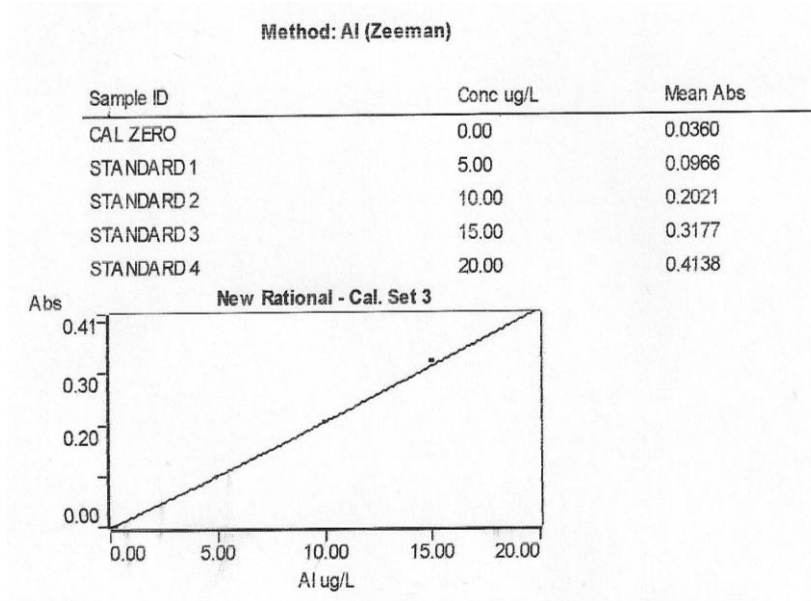


Figura 21 – Representação Gráfica da Curva de Calibração número 12, elaborada com comprimento de onda 396,2 e com Modificador de Matriz.

Para avaliar a exatidão, as curvas de calibração foram construídas com “r” médio igual a 0,9989(linearidade), com erros intra ensaios de DP= 1,28 e CV= 16,88%, e utilizou-se uma amostra de soro humano da Community Bureau of Reference adquirida da Comissão Europeia, com concentração certificada de Alumínio igual a 12,5 µg/L e incerteza de 3,0µg/L, aceito CV= 12%, obtendo-se resultado médio de 12,36 µg/L. Sua primeira análise apresentou replicatas com uma absorbância média de 0,2684 e uma concentração de 13,07 µg/L, na segunda análise a absorbância foi de 0,2380 e a concentração de 11,65 µg/L. Feita uma média das concentrações o valor obtido para a amostra certificada no procedimento operacional desenvolvido foi de 12,36 µg/L.

Após a constatação da exatidão da metodologia foram analisadas amostras de pessoas saudáveis e de pacientes com graus variados de Insuficiência Renal Crônica (IRC). As concentrações e as absorbâncias obtidas estão especificadas nas tabelas número 4 e 5.

Tabela 5 – Resultados das análises de amostras de pessoas saudáveis

Amostras soros normais	Concentração ( $\mu\text{g/L}$ )
N12	3,35
N13	4,04
N14	4,89
N15	8,90
N16	5,20
N17	8,93
N18	10,45
N19	6,32
N20	8,17
N21	8,98

Tabela 6 – Resultados das análises de amostras de pacientes com IRC

Pacientes com IRC	Concentração de Al em $\mu\text{g/L}$ no HC-FMRP	Concentração de Al em $\mu\text{g/L}$ no Laboratório de referência
P12	17,4	16,0
P13	11,0	7,0
P14	20,6	21,0
P15	17,1	18,0
P16	21,1	19,0

Para avaliar o erro intra-ensaio do método foi analisado um “pool” de soros normais, de pessoas saudáveis, efetuada sete leituras em replicatas dessa amostra e calculado o Desvio Padrão (DP) igual 1,28 e o Coeficiente de Variação (CV) igual 16,88%.

As leituras das amostras estão na tabela abaixo.

Tabela 7 – Concentrações das replicatas das amostras de pool de soro normal

Amostra Soro (L)	Concentração em µg/L
L1	8,98
L2	6,66
L3	9,44
L4	8,27
L5	6,58
L6	6,84
L7	6,32

## 5 Conclusão

Assim como visto na literatura o equipamento Espectrofotômetro de Absorção Atômica com Forno de Grafite 640Z - VARIAN mostrou-se adequado para a quantificação de Alumínio no soro. Os experimentos realizados nesse trabalho permitem concluir que o método apropriado para dosagem do Al no soro é com rampa de aquecimento de 55,0 segundos de secagem, 27,0s de pirólise e 1,7s de atomização. O tubo do forno de grafite ideal foi o plateau e o modificador de matriz, o Fosfato Dihidrogeno de Amônia a 1%. . A metodologia apresenta curvas de calibração construídas com “r” médio igual 0,9989 (linearidade), a solução utilizada para diluir as amostras foi HNO<sub>3</sub> a 6%, Triton X-100 a 0,1% e Antifoam a 0,1%, na proporção de 1:2 (200ul de soro mais 200ul SDAS 5), homogeneizadas em agitador e centrifugadas a 13.000 rpm, por 10,0 minutos. A solução diluidora para desproteinização, e a centrifugação adequada das amostras, foram de extrema importância para minimizar os interferentes do método.

O risco de contaminação é um grande obstáculo a ser enfrentado em todas as etapas da análise, por isso todo o material utilizado, deve ser relavado em uma solução de HNO<sub>3</sub> a 30%, overnight, e enxaguado abundantemente com água ultra pura, sem contato com papel.

A validação (CV 16,9%) com soros normais e referenciados por outro laboratório e exatidão (CV 12,0%) com o material de referência adquirido da Comissão Européia, composto por soro humano da Community Bureau of Reference, teve coeficientes de variação aceitáveis para Espectrofotometria de Absorção Atômica com Forno de Grafite ficando entre 10,0 e 20,0 %.

O método proposto foi considerado eficaz para a monitorização biológica do Alumínio.

## 6 REFERÊNCIAS

Associação Brasileira do Alumínio. O alumínio nas Vacinas. Disponível em:<<http://www.abal.org.br/site/pdf/o-aluminio-nas-vacinas.pdf>>. Acesso em: 1 Nov. 2013.

AZEVEDO, F. A.; CHASIN, A. A. M. Metais Gerenciamento da Toxicidade. Editora Atheneu. São Paulo. 2003. p. 01-33

BARRETO, F. C.; ARAÚJO, S. M. H. A. Intoxicação Alumínica na DRC. Jornal Brasileiro de Nefrologia, Brasil, v.30, n. 2, p. 18-22, Mar.2008. Disponível em: <<http://www.jbn.org.br/suplemento-ok.asp?ed=98>>. Acesso em: 16 Mai. 2013.

BOHRER, D. Alumínio em Diálise - Uma visão analítica J. Bras. Nefrol., 1997; v. 19 n.3 p. 264-270. Disponível em: <[http://www.jbn.org.br/detalhe\\_artigo.asp?id=806](http://www.jbn.org.br/detalhe_artigo.asp?id=806)>. Acesso em: 15 Mai. 2013

BURTIS, C. A.; ASHWOOD. Tietz Fundamentos de Química Clínica, 1998; Ed. 4, p.434 – 435.

FERREIRA, M. A. A. Patologia óssea do insuficiente renal crônico: desafio clinicobiológico. 2012 Dissertação de candidatura ao grau de Doutor em Medicina - Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Nova de Lisboa, 2012. Disponível em: <<http://hdl.handle.net/10362/8827>>. Acesso em: 09 Mai. 2013

FERREIRA, P.C. et al. Alumínio como fator de risco para a doença de Alzheimer. Rev Latino-am Enfermagem, Brasil, v.16, n.1, 2008. Disponível em: < [www.eerp.usp.br/rlae](http://www.eerp.usp.br/rlae)>. Acesso em: 22 Mai. 2013

FROES,R.E.S.; WINDMOLLER, C. C.; SILVA,J.B.B. Emprego da Modificação Química Permanente para a determinação de metais em matrizes diversas por Espectrometria de Absorção Atômica em Forno de Grafite. Rev. Analytica 2006 n.23,2006 Disponível em: [http://www.revistaanalytica.com.br/ed\\_anteriores/23/art03.pdf](http://www.revistaanalytica.com.br/ed_anteriores/23/art03.pdf)

GARCIA, S. C.; GIODA, A.; NASCIMENTO, D. B. O problema da contaminação na determinação de traços de alumínio. Química Nova, Brasil, v.20, n. 4, p. 407-411, Ago. 1997. Disponível em: < <http://www.scielo.br/pdf/qn/v20n4/4966.pdf>> Acesso em: 24 Abr. 2013.

GONÇALVEZ, Princípios Básicos de Espectrofotometria de Absorção Atômica. Curso de Absorção Atômica Varian, 1988.

JERONYMO, S.; FUJIMURA A.H.Y. Dosagem de alumínio no soro de indivíduos sadios e em pacientes com insuficiência renal crônica mantidos ou não em tratamento dialítico. Jornal Brasileiro de Nefrologia, Brasil, v.20, n. 2, p.144-150, Jun.1998.

Disponível em: <[http://www.jbn.org.br/detalhe\\_artigo.asp?id=716](http://www.jbn.org.br/detalhe_artigo.asp?id=716)>. Acesso em: 22 Mai. 2013.

KLAASSEN, C. D.; WATKINS III, J. B. Fundamentos em Toxicologia de Casarett e Doull. Editora AMGH Ltda. Porto Alegre .2012. p 334.



LIMA, E.M. et al. Intoxicação por alumínio na insuficiência renal crônica *Jornal Brasileiro de Nefrologia*, Brasil, v.23, n. 1, p.8-17, 2001. Disponível em: < [http://www.jbn.org.br/detalhe\\_artigo.asp?id=515](http://www.jbn.org.br/detalhe_artigo.asp?id=515) >. Acesso em: 24 Mai. 2013

PASCALICCHIO A.E. Contaminação por metais pesados. São Paulo: Associação de Profissionais em Ciência Ambiental; 2002. p.31,40-41.

RIBIZZI, G. et al. Cytokine polymorphisms and Alzheimer disease: possible associations. *Neurol Sci*, v.31, p.321-325, 2010. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20213229> >. Acesso em: 28 Mai. 2013

ROSALINO, M.R.R. Potenciais Efeitos da Presença de Alumínio na Água de Consumo Humano. Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em Engenharia do Ambiente, Perfil Sanitária - Universidade Nova de Lisboa Faculdade de Ciências e Tecnologia, 2011. Disponível em:< <http://run.unl.pt/handle/10362/6323>>

SANTOS, M.V. Estudo da interação entre Alumínio e os constituintes de formulações de eritropoetina empregando HPLC e AAS. 2009 Dissertação (Mestrado em Química) – Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, 2009. Disponível em: < [http://cascavel.cpd.ufsm.br/tede/tde\\_arquivos/6/TDE-2009-07-13T125636Z2137/Publico/SANTOS,%20MARLEI%20VEIGA%20DOS.pdf](http://cascavel.cpd.ufsm.br/tede/tde_arquivos/6/TDE-2009-07-13T125636Z2137/Publico/SANTOS,%20MARLEI%20VEIGA%20DOS.pdf)>. Acesso em: 09 Mai. 2013

SILVA, L. A. M. Dosagem de alumínio e manejo de intoxicação alumínica em pacientes com insuficiência renal avançada em programa de diálise. *Jornal Brasileiro de Nefrologia*, Brasil, v.20, n. 2, p.167-170, Jun.1998. Disponível em: <[http://www.jbn.org.br/detalhe\\_artigo.asp?id=720](http://www.jbn.org.br/detalhe_artigo.asp?id=720)>. Acesso em: 22 Mai. 2013.

SILVA, S.A.A. Estudo do papel da (Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>)ATPase na acção neurotóxica do alumínio. 2005 Dissertação (Doutorado em Biologia) – Universidade de Aveiro, 2005. Disponível em: <http://ria.ua.pt/handle/10773/10763>Acesso em: 20 Mai. 2013

SMITH, M. A. C. Doença de Alzheimer. *Revista Brasileira Psiquiatria*, v.21, out 1999. Disponível em: <[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1516-44461999000600003&lng=en&nrm=iso&tIng=PT](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1516-44461999000600003&lng=en&nrm=iso&tIng=PT)>. Acesso em: 28 Mai. 2013

VIEIRA, W.P. et al. Manifestações Musculoesqueléticas em Pacientes Submetidos à Hemodiálise. *Revista Brasileira de Reumatologia*, Brasil, v.45, n.6, p.357-364, Nov./Dez,2005. Disponível em: < <http://bases.bireme.br/cgi-bin/wxislind.exe/iah/online/?IscScript=iah/iah.xis&src=google&base=LILACS&lang=p&nextAction=lnk&exprSearch=441674&indexSearch=ID>>. Acesso em: 15 Mai. 2013