

# Magnésio urinário, plasmático e eritrocitário: validação do método de análise por espectrofotometria de absorção atômica com chama

## Magnesium contents in urine, plasma and erythrocyte samples: validation of analytical methodology using flame atomic absorption spectrophotometry

RIALA6/1522

Cristiane Hermes SALES, Vivianne de Sousa ROCHA, Luciana SETARO, Célia COLLI\*

\*Endereço para correspondência: Laboratório de Nutrição, Departamento de Alimentos e Nutrição Experimental, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, Av. Prof. Lineu Prestes, 580, Bloco 14, Butantã, São Paulo, SP, Brasil, CEP: 05508-000. Tel.: (11) 3091-3651, Fax: (11) 3091-4410. E-mail: cecolli@usp.br

Recebido: 14.10.2011 – Aceito para publicação: 04.10.2012

### RESUMO

Neste estudo foi validada a metodologia de análise de magnésio urinário, plasmático e eritrocitário por espectrofotometria de absorção atômica com chama. As análises foram realizadas em *pools* de amostras de urina, de plasma e de eritrócitos de humanos. Para a validação, foram considerados os parâmetros de linearidade da curva-padrão, faixa de trabalho, limite de detecção (LD), limite de quantificação (LQ), precisão e exatidão da medição. Os LD e LQ da curva foram, respectivamente, de 0,006 e 0,021 µg/mL de Mg para urina e plasma, e de 0,003 e 0,010 µg/mL de Mg para eritrócitos. A faixa linear de trabalho para determinação de Mg foi entre 0,05 e 0,5 µg/mL de Mg, e as curvas-padrão apresentaram coeficientes de correlação maiores do que 0,99, que demonstram a linearidade da metodologia. As precisões intra e interensaio superiores a 90% foram consideradas adequadas. As recuperações obtidas, usando-se materiais de referência certificados, foram de 101% e de 97%, respectivamente, em urina e plasma. As médias de recuperação por adição de padrão foram de 87% para urina e eritrócitos e de 91% para plasma. A metodologia avaliada foi linear, sensível, seletiva, precisa e exata; portanto, são confiáveis os resultados obtidos.

**Palavras-chave.** espectrofotometria de absorção atômica, magnésio, eritrócitos, plasma, urina, validação.

### ABSTRACT

This study aimed at validating the methodology for analyzing magnesium contents in urine, plasma, and erythrocytes samples by atomic absorption spectrophotometry. Pools of human urine, plasma, and erythrocytes samples were analyzed. The standard curve linearity, linear response range, detection limit (DL), quantitation limit (QL), precision, and accuracy of measurement were determined. DL and QL values were, respectively, 0.006 and 0.021 µg/mL of Mg for urine and plasma, and 0.003 and 0.010 µg/mL of Mg for erythrocytes. The linear response ranged from 0.05 to 0.5 µg/mL of Mg, and the standards curves showed the correlation coefficients higher than 0.99, which demonstrated the linearity of the methodology. Intra- and inter-assay precisions above 90% were considered adequate. The accuracy obtained with certified reference materials for urine and plasma was 101% and 97%, respectively. The average recoveries found by adding the standard were 87% for urine and erythrocytes, and 91% for plasma. Therefore, the evaluated methodology showed to be linear, sensitive, specific, precise and accurate, and the obtained results were reliable.

**Keywords.** atomic absorption spectrophotometry, magnesium, erythrocytes, plasma, urine, validation.

## INTRODUÇÃO

O magnésio (Mg) teve, nos últimos anos, importância reconhecida para diversos processos metabólicos. A alteração de sua homeostase é associada à maior incidência de doenças crônicas não transmissíveis (como diabetes tipo 2, hipertensão, doenças cardiovasculares e câncer), e o monitoramento de sua distribuição compartimental tem implicações fisiológicas importantes no âmbito da saúde<sup>1-3</sup>.

O *status* de Mg no organismo pode ser avaliado em vários compartimentos biológicos, sendo que sua concentração é determinada mais frequentemente em soro/plasma, também em urina, células sanguíneas (eritrócitos, monócitos e linfócitos) e, mais raramente, em músculo e osso, pela maior dificuldade de amostragem<sup>4-5</sup>.

A espectrofotometria de absorção atômica com chama é o método mais empregado para a determinação de minerais em amostras biológicas, por ser considerado acurado e relativamente simples<sup>6</sup>. Todavia, sempre chama a atenção o número pequeno de estudos de validação de métodos publicados, especialmente no Brasil, nas áreas de bioquímica, fisiologia e nutrição, o que mostra que essa é uma prática pouco frequente em muitos laboratórios de pesquisa. No entanto, a etapa de validação é fundamental para a obtenção de resultados confiáveis, uma vez que quando confiáveis são reprodutíveis, permitem conclusões acertadas e o delineamento de novas hipóteses. Portanto, é fundamental que os laboratórios se empenhem nessa importante etapa analítica, para economizar tempo e recursos, lembrando-se sempre que o método deve ser revalidado toda vez que houver alterações das condições analíticas (por exemplo, mudança de equipamento ou na composição dos reagentes usados)<sup>7,8</sup>.

O objetivo deste estudo foi validar o método de análise do Mg em amostras de urina, plasma e eritrócitos por espectrofotometria de absorção atômica (EAA) com chama, para viabilizar sua difusão e comparação em pesquisas em nutrição e na prática clínica.

## MATERIAL E MÉTODOS

O estudo foi aprovado pelo comitê de ética em pesquisa da Faculdade de Ciências Farmacêuticas – USP (Protocolo CEP nº 339/2006) e seguiu os padrões exigidos pela Declaração de Helsinque. As amostras utilizadas no processo de validação foram provenientes de atletas de

voleibol profissional (n = 12), do sexo masculino, com idade entre 15 e 20 anos (18,1 ± 1,4 anos).

Toda vidraria foi previamente desmineralizada em banho de ácido nítrico 30%, por pelo menos 12 horas, e depois enxaguadas com água desmineralizada. Esse processo é realizado com o objetivo de remover os minerais da vidraria e evitar contaminação das amostras.

### Amostras biológicas

As amostras de urina de 24 horas, colhidas sem conservantes, foram acidificadas até pH 2 com ácido clorídrico 3 M (Synth®, São Paulo, Brasil), sendo posteriormente armazenadas em microtubos de polipropileno.

O sangue, colhido com seringas plásticas e agulhas de inox estéreis e descartáveis, foi transferido para tubos contendo citrato de sódio (Synth®, São Paulo, Brasil) a 30% (10 µg/mL de sangue), como anticoagulante, e centrifugado a 3.500 rpm, durante 15 minutos, a 4 °C. Após centrifugação, o plasma foi distribuído em alíquotas de 1 mL. O concentrado de eritrócitos foi lavado três vezes, por ressuspensão, com NaCl (Synth®, São Paulo, Brasil) a 0,9% (1:2 massa de eritrócitos para solução salina, v/v), e centrifugado a 10.000 rpm, por 10 minutos, a 4 °C, sendo o sobrenadante desprezado a cada etapa.

### Preparo dos pools

As amostras de urina foram homogeneizadas com auxílio de agitador magnético (IKA C-MAG HS 10, Wilmington, Carolina do Norte, EUA), durante 10 minutos, em rotação média. Preparado o *pool*, alíquotas de 1 mL deste foram armazenadas a -20 °C até o momento da análise. O mesmo procedimento foi utilizado no preparo dos *pools* de plasma e de eritrócitos.

### Determinação de Mg

O Mg foi determinado em espectrofotômetro de absorção atômica com chama (*Perkin Elmer AAnalyst 100* – Norwalk, CT, EUA), com lâmpada de cátodo oco, comprimento de onda ( $\lambda$ ) de 285,2 nm, fenda ( $\phi$ ) de 0,7 nm, tempo de integração de 2 segundos e chama oxidante de ar/acetileno. O método de análise usado baseou-se em estudos prévios desenvolvidos em nosso laboratório<sup>9,10</sup>, em Nicoll et al.<sup>11</sup> e nas recomendações do manual do equipamento<sup>12</sup>.

A curva de calibração foi feita com MgCl<sub>2</sub> × 6H<sub>2</sub>O – 1.000 mg/L de Mg (Titrisol, Merck®, Darmstadt, Alemanha), no intervalo de 0,05 a 0,5 µg/mL de Mg.

Aos pontos da curva-padrão para análise de Mg em eritrócitos, foi adicionado glicerol (Merck®, Darmstadt, Alemanha), até concentração final de 5%. As curvas foram preparadas a cada dia de análise.

As amostras de urina (125 µL) e de plasma (250 µL) foram diluídas com água desmineralizada, em balões volumétricos, na proporção de 1:400 e 1:100, respectivamente. O concentrado de eritrócitos (300 µL) foi lisado com água desmineralizada (1:4, v/v). Desse lisado foram feitas diluições seriadas até que a diluição final do concentrado de eritrócitos fosse de 1:120.

A fim de minimizar interferências espectrais, foi adicionado lantânio, tanto nas amostras como na curva-padrão, em concentração final de 0,1%. Inicialmente, 14,66 g de La<sub>2</sub>O<sub>3</sub> (Merck®, Darmstadt, Alemanha) foram diluídos em 10 mL de água; posteriormente, foram acrescentados 62,5 mL de HCl concentrado (37%) e o volume completado para 250 mL.

#### **Análise de hemoglobina**

A concentração de hemoglobina nos eritrócitos lavados foi quantificada pelo método da cianometahemoglobina<sup>13</sup>, utilizando reagentes da Labtest® (Lagoa Santa, MG, Brasil).

#### **Validação**

No processo de validação do método, foram avaliados a linearidade, a faixa de trabalho e a faixa linear de trabalho, o limite de detecção (LD), o limite de quantificação (LQ), a precisão e a exatidão do método.

#### *Limites de detecção e de quantificação*

O LD inferior foi obtido pela multiplicação do desvio padrão de 10 leituras do branco por três, considerando a relação sinal/ruído de 3:1, e o produto dividido pelo coeficiente angular da curva de calibração. O LQ inferior foi obtido da mesma forma, mas considerando a relação sinal/ruído de 10:1<sup>8,14</sup>. Para os limites superiores da curva de calibração, considerou-se a informação do fabricante do equipamento, segundo a qual, nas condições usadas ( $\lambda$  285,2 nm,  $\Phi$  0,7 nm), são geradas curvas lineares até 0,5 µg/mL de Mg<sup>12</sup>.

#### *Linearidade*

A linearidade das curvas-padrão, obtida por 10 repetições de cada concentração dos pontos da curva

(cinco pontos para avaliação da urina e do plasma, e sete para eritrócitos), foi avaliada pelo coeficiente de correlação (*r*). Foi considerado adequado valor de *r* superior a 0,998.

#### *Sensibilidade*

A sensibilidade foi obtida pelo cálculo do coeficiente angular (inclinação) das curvas-padrão usadas para definir a linearidade<sup>15</sup>.

#### *Precisão*

A princípio, foram testadas diversas diluições das amostras, de modo a situar a resposta (absorvância) no centro da faixa linear de trabalho. Definidas as diluições (400 vezes para urina, 100 vezes para plasma e 120 vezes para eritrócitos), foi avaliada a precisão de medição, pela repetitividade, e a precisão intermediária, as quais foram obtidas pela relação do desvio padrão com a média aritmética dos resultados obtidos, que fornece a imprecisão do método. A precisão intraensaio foi avaliada pelo resultado de 10 determinações de cada *pool*, e a interensaio pela primeira determinação (primeiro dia) e mais 10 determinações do *pool* realizadas em um segundo e terceiro dias. Todas as análises foram realizadas pelo mesmo operador, no mesmo equipamento e nas mesmas condições experimentais. Considerou-se adequado valores de desvios padrões relativos (coeficiente de variação, que corresponde à imprecisão do método) inferiores a 15 %<sup>8,16,17</sup>.

#### *Exatidão*

A exatidão foi avaliada pela análise de materiais de referência certificados (MRC) e por ensaios de recuperação. A exatidão foi obtida pelo erro relativo – ER, comparando-se o valor médio obtido com o valor certificado, e expressa em porcentagem do viés<sup>8,15</sup>.

Os MRC usados foram: *Trace Elements Serum L-1* [lote JL4409] e *Urine Blank* [lote OK4636] (Seronorm®, Billingstad, Noruega). Por não se dispor de padrão certificado para análise de Mg em eritrócitos, o monitoramento das análises nesse compartimento deu-se apenas pela adição de padrão.

Para os ensaios de recuperação foram utilizadas as amostras diluídas conforme procedimentos descritos anteriormente. Alíquotas de cada amostra diluída foram transferidas para tubos de ensaio, e feita então a adição de padrões com concentrações diferentes de Mg: 0; 0,05; 0,1 e 0,2 µg/mL, para urina e plasma, e 0; 0,125; 0,25; 0,5

µg/mL, para eritrócitos. Para cada adição de padrão foram feitas 10 replicatas por amostra biológica. Considerou-se como adequados valores de recuperação entre 70 e 120%<sup>8,16</sup>.

### Análise estatística

Regressão linear, análise de variância (ANOVA) e teste *t-Student* para amostras não pareadas foram realizadas com *software* SPSS 15.0 for Windows (Chicago, Illinois, EUA), considerando nível de confiança de 95% e alfa de 5%.

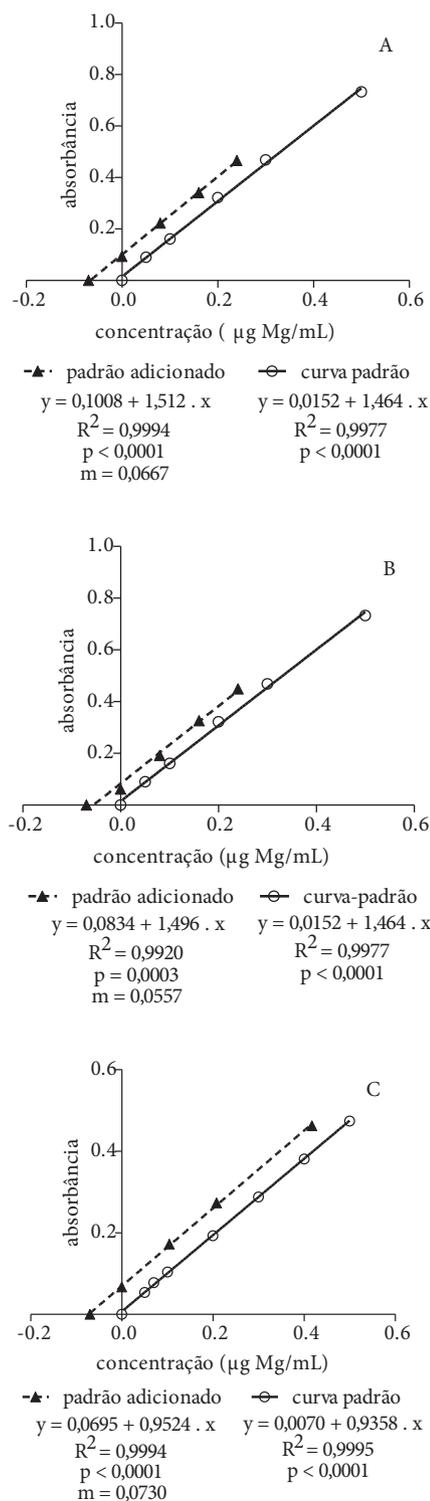
## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Inicialmente determinaram-se os LD e LQ, que foram, respectivamente, de 0,006 µg/mL de Mg e de 0,021 µg/mL de Mg em urina e plasma, e de 0,003 µg/mL de Mg e de 0,010 µg/mL de Mg em eritrócitos. Esses valores são similares a outros descritos na literatura por EAA<sup>18,19</sup>, e sua determinação permite que se estabeleça até que nível de concentração do mensurando o método é confiável<sup>14</sup>.

Determinados esses limites, a faixa linear de trabalho foi estabelecida entre 0,05 e 0,5 µg/mL de Mg. As curvas-padrão, geradas a partir de 10 replicatas de cada concentração, apresentaram coeficiente de correlação (*r*) de 0,9991 (sem glicerol; para plasma e urina) e de 0,9999 (com glicerol; para eritrócitos). A sensibilidade foi de 1,46 mL/µg em plasma e urina, e de 0,94 mL/µg em eritrócitos (Figura 1). Esses valores indicam um bom ajuste entre o sinal gerado pelo aparelho e a concentração obtida do mineral e comprovam a linearidade da curva, no intervalo de concentração estabelecido<sup>8,15</sup>.

As precisões intraensaio foram de 96% em urina, 95% em plasma e 96% em eritrócitos; e as interensaios de 95%, 95% e 96% em urina, plasma e eritrócitos, respectivamente.

Os resultados deste estudo são similares aos obtidos anteriormente em nosso laboratório, em outro EAA (Hitachi Z-5000; 97-98 % em urina, 95-96% em plasma<sup>10</sup> e 95-98% em eritrócitos<sup>9</sup>), e aos de Hulanicki et al.<sup>18</sup> (97% em plasma e soro e 93% em eritrócitos – EAA PU 9100X com atomizador PU 9390X Philips Scientific) e de Stone et al.<sup>19</sup> (precisão intraensaio de 97-99% e interensaio de 95-97% em amostras de soro – Varian AA1275). Gilroy et al.<sup>20</sup>, que avaliaram soro de felinos em analisador de eletrodo íon-seletivo CRT8 Nova, também obtiveram precisões similares: intraensaio de 99-100 % e interensaio de 98-99%.



**Figura 1.** Curvas-padrão de Mg e de adição de padrão em urina (A), plasma (B) e eritrócitos (C), n = 10, em cada ponto. y: resposta medida [absorbância], x: concentração, a: interseção com o eixo y quando x = 0 [erro randômico ou indeterminado] e b: inclinação [sensibilidade]; R<sup>2</sup>: coeficiente de determinação; p: nível de significância; m = tg α = a/b

Os valores obtidos de precisão estão dentro do limite aceitável (> 90%) para micronutrientes<sup>14,21</sup> e dentro do recomendado pela ANVISA<sup>8</sup>, indicando que a variabilidade entre os resultados, que é associada ao erro aleatório, ou seja, ao erro não previsível (que ocorre ao acaso e tende a diminuir após várias repetições), está dentro da variação prevista. Vale destacar que é mais aconselhável que se adote, na avaliação do método, a precisão intermediária (interensaio) ao invés da repetitividade (intraensaio), por ela ser a mais representativa da variabilidade dos resultados em um único laboratório<sup>16</sup>.

É importante que se assegure que os métodos usados para avaliação de minerais apresentem boa precisão, uma vez que as concentrações presentes nas amostras comumente são baixas, e minimizar possíveis erros.

Outro parâmetro fundamental para que se obtenham resultados confiáveis é a exatidão, que representa o grau de concordância entre o valor médio obtido de uma série de resultados, com um valor verdadeiro convencional ou um valor de referência aceito<sup>14</sup>, e, tanto nos ensaios com MRC quanto nos ensaios de recuperação na matriz (Tabela 1), observaram-se resultados dentro de limites aceitáveis: 70-120%.

**Tabela 1.** Exatidão do método de avaliação de Mg em amostras de urina, plasma e eritrócitos, avaliadas pela adição de padrões

Amostras	Quantidade de Mg (µg/mL)		n	% recuperação		
	amostra	padrão adicionado		$\bar{x}(s)$ individual*	$\bar{x}(s)$ total†	CV%
Urina	0,048	0,000	10	-	87,0(6,3)	7,3
	0,048	0,050	10	94,3(6,8)		
	0,048	0,100	10	83,1(2,5)		
	0,048	0,200	10	83,6(2,1)		
Plasma	0,026	0,000	10	-	90,5(4,4)	4,9
	0,026	0,050	10	95,5(1,2)		
	0,026	0,100	10	88,7(0,7)		
	0,026	0,200	10	87,2(0,3)		
Eritrócitos	0,062	0,000	10	-	87,1(0,8)	0,9
	0,062	0,125	10	87,5(3,0)		
	0,062	0,250	10	86,2(1,3)		
	0,062	0,500	10	87,7(1,2)		

$\bar{x}$ : média; s: desvio padrão; CV%: coeficiente de variação em porcentagem.

\* médias e desvios padrões obtidos dos resultados das 10 replicatas de cada ponto avaliado.

† médias e desvios padrões de todos os pontos avaliados.

Neste estudo, com o uso dos MRC foram obtidas exatidões (erros relativos) de 101% e de 97% em ensaios feitos na urina e no plasma, respectivamente, e com os ensaios de recuperação, de 87%, 91% e 87% (Tabela 1) foram obtidas para o método, quando as matrizes foram, respectivamente, urina, plasma e eritrócitos.

Dentre os estudos de validação de magnésio encontrados na literatura, o único que usou MRC foi Hulanicki et al.<sup>18</sup>, que obtiveram exatidões de aproximadamente 92% usando o *Quality Serum KONE*. O uso correto do MRC, além de permitir avaliar o desempenho das análises de um laboratório, é mais recomendado, por minimizar erros sistemáticos<sup>15,21</sup>.

Em ensaios de recuperação, outros estudos utilizando EAA obtiveram resultados de exatidão similares aos do presente estudo<sup>19,22,23</sup>. As pequenas variações de recuperação observadas entre os estudos podem ser explicadas: 1) pelo próprio método em si, ou seja, ser um erro inerente ao método; 2) por diferenças nas marcas dos equipamentos; 3) manejo técnico do operador; 4) pelo diluente utilizado para o preparo das amostras poder gerar alguma interferência; ou ainda, 5) pela matriz utilizada em cada estudo, que, dependendo da quantidade de outras substâncias presentes nesta matriz, pode influenciar no processo de atomização.

Outro parâmetro avaliado foi a seletividade: as curvas de padrão adicionado apresentaram forte correlação ( $r = 0,9999$  em urina,  $0,9999$  em plasma e  $0,9997$  em eritrócitos) e paralelismo com as curvas analíticas padrão (Figura 1), o que comprova a não interferência das matrizes testadas.

Pode-se, portanto, afirmar que o método é adequado para análise de Mg não somente em plasma, como em urina e em eritrócitos (havendo poucos estudos de validação feitos nessas células). O conjunto dessas determinações permite a avaliação mais completa do *status* de Mg em diferentes condições de saúde do ser humano.

## CONCLUSÃO

Com base nos dados obtidos, pode-se concluir que o método testado é preciso e exato, além de sensível e seletivo para a determinação de Mg na urina, plasma e eritrócitos, gerando resultados confiáveis.

## AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP (Processo 2006/05601-9), à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES (Processo 404577) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq (Processo 142618/2005-5), pelas bolsas de mestrado e doutorado concedidas às alunas envolvidas neste trabalho.

## REFERÊNCIAS

1. Nielsen FH. Magnesium, inflammation, and obesity in chronic disease. *Nutr Rev*. 2010;68(6):333-40.
2. Rosanoff A, Weaver CM, Rude RK. Suboptimal magnesium status in the United States: are the health consequences underestimated? *Nutr Rev*. 2012;70(3):153-64.
3. Sales CH, Pedrosa LFC, Lima JG, Lemos TMAM, Colli C. Influence of magnesium status and magnesium intake on the blood glucose control in patients with type 2 diabetes. *Clin Nutr*. 2011;30:359-64.
4. Izquierdo AS, Boudet GA, Otero MS, Fernández GMD, González RJ, García de Janlón CA, et al. Estimation of precision and inaccuracy for serum magnesium determination on the basis of interlaboratory comparison data Accreditation ISO 15189. *Magnes Res*. 2008;21(1):51-7.
5. Noronha JL, Matuschak GM. Magnesium in critical illness: metabolism, assessment, and treatment. *Intens Care Med*. 2002;28:667-79.
6. Whitehouse RC, Prasad AS, Rabbanu PI, Cossack ZT. Zinc in plasma, neutrophils, lymphocytes, and erythrocytes as determined by flameless atomic spectrophotometry. *Clin Chem*. 1982;28(3):475-80.
7. Keith LH, Crummett W, Deegan JJ, Libby RA, Taylor JK, Wentler G. Principles of environmental analysis. *Anal Chem*. 1983;55(14):2210-8.
8. Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância Sanitária. Resolução nº 899, de 29 de maio de 2003. Determina a publicação do guia de validação de métodos analíticos e bioanalíticos. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Brasília (DF); 2 jun 2003. [acesso em: 2007 jan 19]. Disponível em: [http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/2003/re/899\_03re.htm].
9. Sardinha FAA. Avaliação do estado nutricional em magnésio, ferro, zinco e cobre de atletas de polo aquático feminino em períodos de treinamento pré-competitivo, de destreinamento e de treinamento de manutenção [tese de doutorado]. São Paulo (SP): Universidade de São Paulo; 2002.
10. Mendes Netto RS. Estado nutricional em magnésio como determinante da eficiência da suplementação de creatina em praticantes de musculação [tese de doutorado]. São Paulo (SP): Universidade de São Paulo; 2004.
11. Nicoll GW, Struthers AD, Fraser CG. Biological variation of urinary magnesium. *Clin Chem*. 1991;37(10):1794-5.
12. Perkin-Elmer. Atomic absorption spectroscopy. Analytical methods. Norwalk: The Perkin-Elmer Corporation; 1996.
13. Austin JH, Drabkin DL. Spectrophotometric studies. III. Methemoglobin. *J Biol Chem*. 1935;112:67-88.
14. International conference on harmonization (ICH) of technical requirements for the registration of pharmaceuticals for human use. Validation of analytical procedures: text and methodology. Q2(R1). 2005. Disponível em: [http://www.ich.org/LOB/media/MEDIA417.pdf].
15. Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial (Brasil). DOQ-CGCRE-008. Orientação sobre validação de métodos analíticos. Revisão 03; fev 2010 [acesso em: 2012 maio 21]. Disponível em: [http://www.inmetro.gov.br/Sidoq/Arquivos/CGCRE/DOQ/DOQ-CGCRE-8\_03.pdf].
16. Ribani M, Bottoli CBG, Collins CH, Jardim ICSE, Melo LFC. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. *Quim Nova*. 2004;27:771-80.
17. Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial (Brasil). Vocabulário Internacional de Metrologia. Conceitos fundamentais e gerais e termos associados (VIM 2008). INMETRO: Rio de Janeiro; 2009. 78p.
18. Hulanicka A, Godlewska B, Brzóska M. Determination of total magnesium in biological samples using electrothermal atomic absorption spectrometry. *Spectrochim Acta Part B*. 1995;50:1717-24.
19. Stone MJ, Chowdrey PE, Miall P, Price CP. Validation of an enzymatic total magnesium determination based on activation of modified isocitrate dehydrogenase. *Clin Chem*. 1996;42(9):1474-7.
20. Gilroy CV, Burton SA, Horney BS, Mackenzie AL. Validation of the Nova CRT8 for the measurement of ionized magnesium in feline serum. *Vet Clin Pathol*. 2005;34:124-31.
21. Dos Santos HG, Sardinha FAA, Colli C. Zinco eritrocitário (validação de um método de análise) e zinco dietético na avaliação do estado nutricional de mulheres adultas. *Braz J Pharm Sci*. 2005;41(2):205-13.
22. Gimblet EG, Marney AF, Bonsnes RW. Determination of calcium and magnesium in serum, urine, diet, and stool by atomic absorption spectrophotometry. *Clin Chem*. 1967;13(3):204-14.
23. Willis JB. Determination of calcium and magnesium in urine by atomic absorptions spectroscopy. *Anal Chem*. 1961;33(4):556-9.