

Determinação simultânea de chumbo e cádmio em sangue por espectrometria de absorção atômica com forno de grafite

Simultaneous determination of lead and cadmium in blood by graphite furnace atomic absorption spectrometry

RIALA6/1015

Maria de Fátima H. CARVALHO*; Franca D. de MAIO; Maria Cristina DURAN; Carmen S. KIRA; Isaura A. OKADA

* Endereço para correspondência: Instituto Adolfo Lutz, Seção de Equipamentos Especializados
Av Dr. Arnaldo, 355, Cerqueira César, São Paulo/SP, Brasil CEP 01246-902. Tel: (55 11) 3068 2923 e-mail:
mcarvalh@ial.sp.gov.br.
Instituto Adolfo Lutz, Seção de Equipamentos Especializados.
Recebido: 19/08/2004 – Aceito para publicação: 24/06/2005.

RESUMO

O sangue é o indicador biológico mais utilizado para avaliar a exposição humana recente ao chumbo e ao cádmio. A espectrometria de absorção atômica com forno de grafite (GFAAS) é uma escolha apropriada para a determinação desses metais em sangue de crianças, em função da capacidade de detectar baixas concentrações e pequeno consumo de amostra. O objetivo deste estudo foi desenvolver e validar uma metodologia para a determinação simultânea de chumbo e cádmio em sangue por GFAAS. O sangue total foi diluído em uma solução de Triton X-100 em HNO_3 e uma solução de $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ e $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$ foi utilizada como modificador químico. As condições analíticas foram otimizadas e as melhores temperaturas de pirólise e atomização foram respectivamente, 500 °C e 1500 °C. Para validação da metodologia foram utilizados os materiais de referência certificados NIST SRM 955b (Lead in bovine blood) e SRM 966 (Toxic metals in bovine blood). Foram avaliados os seguintes parâmetros para o chumbo e o cádmio, respectivamente: linearidade (5,0 a 100,0 $\mu\text{g.L}^{-1}$ e 0,3 a 3,0 $\mu\text{g.L}^{-1}$), exatidão (99,9% e 97,7%), precisão (CV = 3% e 13%), limite de detecção (5,4 $\mu\text{g.L}^{-1}$ e 0,06 $\mu\text{g.L}^{-1}$) e limite de quantificação (18,4 $\mu\text{g.L}^{-1}$ e 2,1 $\mu\text{g.L}^{-1}$). O método proposto é rápido, sensível e adequado para a determinação simultânea de chumbo e cádmio em sangue de trabalhadores e de populações expostas, incluindo crianças.

Palavras-Chave. chumbo, cádmio, sangue, forno de grafite, AAS, validação.

ABSTRACT

Blood lead and cadmium levels have been used to evaluate recent human exposure to these metals. Graphite Furnace Atomic Absorption Spectrometry (GFAAS) is the most suitable technique for lead and cadmium determinations in biological fluids due to its ability in detecting low concentrations of metals, and for using small amount of sample. The objective of this study was to establish and to validate a methodology for simultaneous determination of lead and cadmium in blood by GFAAS technique. Blood samples were diluted with Triton X-100 in HNO_3 , and a mixture of $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ and $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$ solutions was used as chemical modifier. The analytical conditions were optimized and the best pyrolysis and atomization temperatures were 500°C and 1500°C, respectively. For validation, certified reference materials NIST SRM 955b (Lead in bovine blood) and NIST SRM 966 (Toxic metals in bovine blood) were used. The evaluated parameters for lead and cadmium were: linearity (5.0 to 100.0 $\mu\text{g.L}^{-1}$ and 0.3 to 3.0 $\mu\text{g.L}^{-1}$), accuracy (99.9% and 97.7%), precision (RSD = 3% and 13%), detection limit (0.54 $\mu\text{g.L}^{-1}$ and 0.06 $\mu\text{g.L}^{-1}$), and quantification limit (1.8 $\mu\text{g.L}^{-1}$ and 0.21 $\mu\text{g.L}^{-1}$), respectively. The proposed method is fast, sensitive and suitable for simultaneous determination of lead and cadmium in blood samples from populations with occupational or environmental exposure, including children.

Key Words. lead, cadmium, blood, graphite furnace, AAS, validation.

INTRODUÇÃO

O desenvolvimento de metodologias analíticas para a determinação de chumbo e cádmio em alimentos, águas ou fluidos biológicos apresenta grande importância uma vez que estes metais são bastante empregados na indústria, sendo então disseminados no meio ambiente. Além disso, o chumbo é considerado o principal contaminante metálico ambiental em todo o mundo¹. O cádmio pode estar presente nas áreas de mineração de chumbo e zinco como contaminante geológico².

O chumbo é inicialmente absorvido nas células vermelhas do sangue seguindo para os tecidos moles, podendo se acumular nos ossos^{3,4}. O cádmio é acumulativo, nefrotóxico e carcinogênico².

As concentrações de chumbo e cádmio no sangue total são utilizadas como indicadores biológicos de exposição recente a esses metais⁵⁻⁷. Mesmo nos casos de exposição ocupacional e principalmente na exposição ambiental, as concentrações desses contaminantes no sangue são baixas, limitando o número de técnicas analíticas que podem ser utilizadas para essas determinações.

A espectrometria de absorção atômica com forno de grafite (GFAAS) é uma técnica apropriada para a determinação de elementos presentes no sangue em baixos níveis de concentração uma vez que apresenta alta sensibilidade, permitindo a determinação direta, com mínimo consumo de amostra e simplicidade na preparação⁷⁻⁹. Além disso, atualmente a técnica de GFAAS pode ser aplicada à determinação simultânea de elementos, reduzindo o tempo e o custo de análise¹⁰⁻¹³.

Na literatura podemos verificar que a técnica de GFAAS é a mais utilizada rotineiramente pelos Laboratórios de Saúde Pública de outros países, para avaliar a exposição de crianças ao chumbo e, também para atender aos programas de monitoramento de trabalhadores expostos^{4,14}.

Já no Brasil, 50% dos laboratórios que participam do Programa de Ensaio de Proficiência (PEP), organizado pelo Instituto Adolfo Lutz (IAL), utilizam a técnica de GFAAS, enquanto que no Programa Interlaboratórios de Control de Calidad do Gabinete de Seguridad e Higiene en el Trabajo de Zaragoza – Espanha, 74,3% dos laboratórios participantes utilizam esta técnica. A diferença na proporção do uso da GFAAS em relação à técnica com chama, pode ser devido ao maior custo para aquisição do equipamento.

A legislação brasileira¹⁵ estabelece o valor de referência de 40 $\mu\text{g.dL}^{-1}$ e o índice biológico máximo de 60 $\mu\text{g.dL}^{-1}$ para chumbo em sangue de trabalhadores expostos. Para o cádmio, a legislação brasileira não estabelece limites para o sangue, já a American Conference of Governmental Industrial Hygienists - ACGIH adota o valor de 5 $\mu\text{g.L}^{-1}$ para cádmio em sangue como índice biológico de exposição¹⁶.

Uma vez que as crianças são mais sensíveis aos efeitos tóxicos do chumbo, a Organização Mundial da Saúde (OMS) tem considerado que mesmo níveis menores que 10 $\mu\text{g.dL}^{-1}$ de

chumbo no sangue podem causar efeitos adversos, tais como: alteração no desenvolvimento mental, desordens do sistema nervoso, redução da audição e do crescimento^{1,17-20}.

O objetivo deste trabalho foi desenvolver e validar uma metodologia empregando a técnica de GFAAS, que possa ser utilizada para a determinação simultânea de chumbo e cádmio em sangue, tanto de populações expostas quanto não-expostas, incluindo crianças.

MATERIAL E MÉTODO

Reagentes

Água desionizada ultrapura (com resistividade de 18,2 $\text{M}\Omega\cdot\text{cm}^{-1}$), HNO_3 ultrapuro e Triton X-100 P.A. foram utilizados na diluição da amostra e na preparação da curva analítica. Como modificador químico, foi utilizada uma mistura de $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ e $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$ nas concentrações de 0,5% (m/v) e 0,03% (m/v), respectivamente. Para a avaliação da exatidão do método proposto foram utilizados os materiais de referência certificados de sangue do National Institute of Standards and Technology (NIST), SRM 955b níveis 2, 3 e 4; e SRM 966 nível 2. As soluções-padrão de trabalho contendo 10,0 mg.L^{-1} de Pb e 1,0 mg.L^{-1} de Cd foram preparadas a partir de soluções padrão monoelementares Titrisol (Merck) com concentração de 1000,0 mg.L^{-1} . As soluções-padrão da curva analítica para o Pb e o Cd foram preparadas no dia do ensaio, em uma solução de Triton X-100 0,2% (m/v) em HNO_3 0,1% (v/v), e consistiram das seguintes concentrações para Pb: 5,0; 20,0; 60,0; 80,0 e 100,0 $\mu\text{g.L}^{-1}$ e para Cd: 0,3; 0,6; 1,2; 2,4 e 3,0 $\mu\text{g.L}^{-1}$. A vidraria utilizada foi descontaminada quimicamente passando por 2 banhos de HNO_3 20% (v/v) (24 horas cada um) e subsequente enxágüe com água desionizada ultrapura.

Preparação da amostra

Uma alíquota de 100 μL de sangue total previamente homogeneizada foi diluída em 900 μL de uma solução de Triton X-100 0,2% (m/v) em HNO_3 0,1% (v/v), diretamente no copo do autoamostrador. A ponteira foi enxaguada várias vezes com a solução preparada, para assegurar a homogeneidade do sangue com o diluente.

Instrumentação

As análises foram realizadas utilizando-se um espectrômetro de absorção atômica simultâneo com aquecimento transversal e equipado com corretor de fundo Zeeman longitudinal, modelo SIMAA 6000, marca Perkin Elmer. As injeções foram feitas com autoamostrador, modelo AS 72, marca Perkin Elmer. Lâmpadas de cátodo oco foram utilizadas nas determinações de chumbo e cádmio e foram selecionados os comprimentos de onda 283,3 nm e 228,8 nm, respectivamente. Tubos pirolíticos com plataforma integrada foram utilizados em todas as determinações. Os parâmetros analíticos utilizados são apresentados na Tabela 1.

Tabela 1. Parâmetros analíticos para a determinação simultânea de chumbo e cádmio.

Tempo de integração	5 s
Volume de amostra	20 µL
Volume do modificador químico	10 µL
Calibração	Linear com interseção calculada
Sinal	Área de pico
Gás	Argônio

RESULTADOS

Otimização das temperaturas de pirólise e atomização

Baseando-se em estudos preliminares realizados com amostras de sangue, foi estabelecido o programa térmico apresentado na Tabela 2. A partir deste programa foram realizados experimentos para a otimização das temperaturas de pirólise e atomização para Pb e Cd, onde foi utilizada uma amostra de sangue adicionada de 100,0 µg.L⁻¹ de Pb e 10,0 µg.L⁻¹ de Cd, que foi diluída na proporção 1:9 em Triton X-100 0,2% (m/v) em HNO₃ 0,1% (v/v), resultando em 10,0 µg.L⁻¹ para Pb e 1,0 µg.L⁻¹ para Cd, como concentrações finais adicionadas na amostra diluída. As determinações foram realizadas utilizando-se uma mistura de NH₄H₂PO₄ 0,5% (m/v) e Mg(NO₃)₂ 0,03% (m/v), como modificador químico.

A curva de pirólise (absorbância integrada “versus” temperatura) foi obtida variando-se a temperatura de pirólise, com incrementos de 100 °C, enquanto a temperatura de atomização era mantida constante em 1500 °C. Da mesma forma, foi obtida a curva de atomização com a temperatura de pirólise fixada em 500 °C. Para cada ponto foi considerada a absorbância integrada média de 3 injeções.

Com base nos perfis obtidos das curvas de pirólise e atomização, e considerando as temperaturas que forneceram o maior sinal de absorbância integrada, as temperaturas selecionadas para pirólise e atomização foram 500 °C e 1500 °C, respectivamente.

Concentração do diluente

O reagente Triton X-100 utilizado para diluição do sangue e preparação da curva de calibração, tem a função de hemolisar as células vermelhas do sangue, facilitando a homogeneização da amostra e evitando a formação de emulsões estáveis^{8,9}.

A concentração de Triton X-100 deve ser otimizada de tal forma que seja suficiente para quebrar as hemáceas do sangue, porém não deve ser tão alta que a formação de espuma inviabilize a utilização do reagente como diluente. Além disso, a utilização de soluções mais concentradas deste diluente pode levar à formação de resíduos de carbono dentro do tubo de grafite¹⁴.

Foi realizado um estudo para verificar o efeito de diferentes concentrações de Triton X-100 em HNO₃ 0,1% (v/v) na curva de calibração para chumbo e cádmio. As concentrações estudadas foram: 0,05%; 0,1%; 0,2%; 0,5%; 1% e 1,5% (m/v). Foi adotado um Modelo de Regressão Linear Múltipla²¹ usando os valores de “absorbância” como variável resposta e “concentração das soluções-padrão” e “concentração de Triton”, como variáveis explicativas. Por meio de um teste de ANOVA foram testados os coeficientes dessas variáveis explicativas e foi concluído que a variável “concentração de Triton” (p = 0,849 e p = 0,983, para Pb e Cd, respectivamente) não é significativa, indicando que a concentração de Triton não interfere na variável resposta “absorbância”. Isto é o mesmo que concluir que todas as retas de regressão linear simples de absorbância “versus” concentração são iguais, não dependendo da concentração de Triton.

Um outro estudo da diluição da amostra de sangue utilizando diferentes concentrações de Triton também foi realizado. Neste estudo fixou-se em 0,2% (m/v) a concentração de Triton X-100 em HNO₃ 0,1% (v/v) para o preparo da curva de calibração. Como amostra de sangue foi utilizado um material de referência certificado, NIST 966 nível 2 e as concentrações testadas de Triton foram: 0,05%; 0,1%; 0,2%; 0,5%; 1% e 1,5% (m/v). Foi observada a formação de resíduo de carbono na plataforma do tubo de grafite quando se utilizou Triton na concentração de 1,5% (m/v), o que diminuiu a precisão da análise. Os valores obtidos para Pb e Cd no material de referência certificado, preparado em diferentes concentrações de Triton,

Tabela 2. Programa térmico para a determinação simultânea de Pb e Cd.

Etapa	Temp (°C)	Rampa (s)	Patamar (s)	Fluxo de gás (mL.min ⁻¹)	Leitura
1	110	20	45	250	
2	130	30	45	250	
3	Tp	10	20	250	
4	Ta	0	5	0	SIM
5	2550	1	5	250	

onde: Tp = temperatura de pirólise

Ta = temperatura de atomização

foram comparados aos valores certificados e verificou-se, por análise de variância (único fator) e posterior aplicação de teste de comparação múltipla de Tukey-Kramer (programa GraphPad InStat – versão 2.01, 1990-1993), que não havia diferença estatisticamente significativa para chumbo e cádmio, ao se utilizar as concentrações de Triton de 0,2% e 0,1% (m/v). Adotou-se a concentração de 0,2% (m/v) de Triton X-100, pois todos os testes de otimização das temperaturas de pirólise e atomização foram feitos utilizando-se esta concentração, mas isso não impede que se utilize a concentração de 0,1% (m/v) de Triton para o preparo da amostra de sangue.

Validação do método

Para a determinação da linearidade da faixa de trabalho foi utilizado o procedimento descrito no documento ISO/CD 13812²², que estabelece como linear uma faixa de concentração quando o fator de linearidade “L” for maior ou igual a 0,7. O fator de linearidade “L” é calculado segundo a equação (1):

$$L = \frac{A_{1,0} - A_{0,8}}{A_{0,2} - A_B}$$

onde:

$A_{1,0}$ = valor da absorbância da solução-padrão com maior concentração

$A_{0,8}$ = valor da absorbância da solução-padrão que corresponde a 80% de $A_{1,0}$

$A_{0,2}$ = valor da absorbância da solução-padrão que corresponde a 20% de $A_{1,0}$

A_B = valor da absorbância da solução do branco

A Tabela 3 mostra os fatores de linearidade obtidos experimentalmente para Pb e Cd. As faixas de concentração estudadas foram consideradas lineares para ambos os elementos.

Considerando que as faixas de trabalho normalmente utilizadas pela técnica de espectrometria de absorção atômica são estreitas, é importante ressaltar que no método proposto as faixas de trabalho estendem-se em uma ordem de magnitude para cádmio e, acima disso para chumbo. Isto é bastante útil, pois, permite monitorar os níveis de concentração desses

Tabela 3. Fator de linearidade (L) experimental para as faixas de concentração testadas para Pb e Cd

Elemento	Faixa de concentração testada ($\mu\text{g.L}^{-1}$)	“L” experimental
Pb	5,0 – 100,0	1,0
Cd	0,3 – 3,0	1,6

metais em indivíduos com exposição ocupacional, onde as concentrações encontradas são geralmente altas, sendo desnecessária a diluição da amostra e ao mesmo tempo, utilizar o método para avaliar o nível destes metais em indivíduos ambientalmente expostos, onde as concentrações encontradas são geralmente inferiores. Verifica-se, portanto, a utilidade deste método com relação à ampla faixa de trabalho empregada.

Os limites de detecção e quantificação do método obtidos na amostra de sangue total foram para Pb 0,54 e 1,84 $\mu\text{g.L}^{-1}$ e para Cd 0,06 e 0,21 $\mu\text{g.L}^{-1}$, respectivamente. Esses valores referem-se aos resultados obtidos na amostra diluída 10 vezes, correspondendo a 0,54 e 1,84 $\mu\text{g.dL}^{-1}$ para Pb e 0,6 e 2,1 $\mu\text{g.L}^{-1}$ para Cd na amostra original. Para a determinação desses limites foram preparadas sete réplicas independentes utilizando uma amostra de sangue. Tendo em vista que a concentração de cádmio no sangue utilizado era muito baixa, foi adicionada uma alíquota de solução-padrão desse elemento à amostra, de tal forma que a concentração final, após a diluição, fosse próxima de 0,5 $\mu\text{g.L}^{-1}$. Os cálculos para a determinação dos limites de detecção e quantificação foram feitos de acordo com as recomendações da IUPAC²³.

A exatidão do método foi avaliada pelo cálculo de Z-score²⁴, utilizando os seguintes materiais de referência certificados: NIST 966 nível 2, 955b níveis 2, 3 e 4. A concentração de chumbo variou nestes diferentes materiais de referência certificados dentro de uma faixa ampla, contemplando concentrações significativas do ponto de vista clínico, variando de 10 $\mu\text{g.dL}^{-1}$ a 40 $\mu\text{g.dL}^{-1}$. Os valores certificados, os valores obtidos experimentalmente e os Z-score calculados são apresentados na Tabela 4. Verificou-se que todos os valores obtidos para o Z-score foram menores que 2, o que evidencia a exatidão do método.

Além do uso de material de referência certificado, foi utilizado o método de adição de padrão em amostra de sangue

Tabela 4. Valores certificados, valores obtidos e Z-score para Pb e Cd nos materiais de referência.

MRC	Valor certificado Pb ($\mu\text{g.dL}^{-1}$)	Valor obtido Pb ($\mu\text{g.dL}^{-1}$)	Z-score Pb	Valor certificado Cd ($\mu\text{g.L}^{-1}$)	Valor obtido Cd ($\mu\text{g.L}^{-1}$)	Z-score Cd
NIST SRM 966 L2	25,27 ± 0,22	25,20 ± 0,30	0,3	5,22 ± 0,16	5,1 ± 0,5	0,8
NIST SRM 955b L2	10,30 ± 0,10	10,23 ± 0,47	0,7
NIST SRM 955b L3	20,59 ± 0,21	20,43 ± 0,55	0,8
NIST SRM 955b L4	39,36 ± 0,36	40,00 ± 0,75	1,8

para a avaliação da exatidão do método para cádmio, uma vez que o material de referência certificado disponível correspondia apenas a um nível de concentração. A recuperação média obtida para a concentração de cádmio de $10 \mu\text{g.L}^{-1}$ foi 94%.

Para a avaliação da dispersão dos resultados tomou-se uma amostra de sangue, com a qual foram preparadas 7 réplicas independentes e as medições foram feitas em condições de repetitividade, isto é, as medições foram realizadas pelo mesmo operador, no mesmo laboratório, com o mesmo equipamento, em um curto intervalo de tempo²⁴. Os valores do coeficiente de variação (CV) obtidos para Pb e Cd foram 3% e 13%, para as concentrações de $4,00 \mu\text{g.L}^{-1}$ e $0,30 \mu\text{g.L}^{-1}$, respectivamente. Para os níveis de concentrações avaliados, faixa de $\mu\text{g.L}^{-1}$, estes valores do coeficiente de variação obtidos para Pb e Cd são bastantes satisfatórios, indicando a boa precisão do método.

A seguir na Figura 1 é apresentada uma carta controle que demonstra o desempenho do nosso laboratório ao longo de 2003, no Programa Interlaboratórios de Control de Calidad do Gabinete de Seguridad e Higiene en el Trabajo de Zaragoza – Espanha, para chumbo em sangue. É possível observar que o método proposto fornece resultados dentro dos intervalos de aceitação estabelecidos pelo programa.

Os valores representados na figura por um losango, correspondem aos valores designados e as linhas abaixo e acima definidas por um quadrado, correspondem aos limites inferior e superior do intervalo de aceitação. Os valores obtidos experimentalmente pelo laboratório estão representados por um x. Não foram detectadas tendências (identificação de erros sistemáticos).

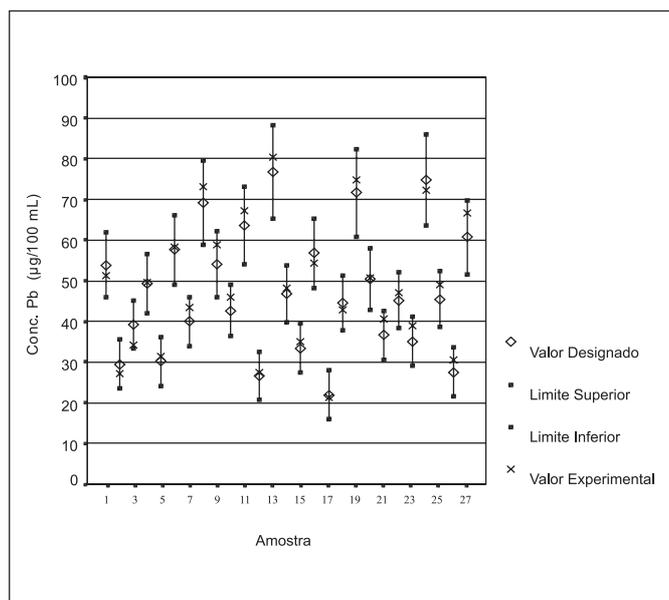


Figura 1. Carta controle da participação em programa interlaboratorial de chumbo em sangue, durante o ano de 2003.

DISCUSSÃO

Na literatura foram encontrados poucos trabalhos aplicados à determinação de chumbo e cádmio em material biológico utilizando a técnica de GFAAS simultâneo com corretor Zeeman.

Deval et al., 1995¹¹ utilizando a técnica de GFAAS simultâneo em equipamento com corretor Smith-Hieftje obtiveram sensibilidade maior para o cádmio, com LD cerca de 3 vezes menor, enquanto que para o chumbo o LD foi cerca de 2 vezes maior, em relação ao obtido neste estudo.

A faixa de trabalho para o cádmio neste estudo é de 0,3 a $3,0 \mu\text{g.L}^{-1}$, enquanto que outros autores mencionam curvas a partir de $1,0 \mu\text{g.L}^{-1}$ ^{8,14}.

Acar, 2001⁸ e Campillo et al., 1999¹⁴ determinaram chumbo e cádmio utilizando GFAAS com corretor Zeeman, porém por análise monoelementar, que emprega as melhores condições para cada elemento para o programa térmico. Já para a determinação simultânea, as condições do programa térmico devem ser adequadas aos elementos a serem determinados. Este fato teoricamente poderia causar uma perda na sensibilidade, porém os resultados obtidos pelos autores citados acima para limite de detecção e limite de quantificação foram maiores que os obtidos em nosso estudo. Verificou-se que, mesmo usando um método multielementar, a sensibilidade no presente estudo é melhor.

O coeficiente de variação (CV) obtido para o chumbo é baixo, se comparado ao declarado por Acar 2001⁸, enquanto que para o cádmio o CV obtido de 13% é aceitável devido à baixa concentração determinada, em níveis de ultra-traços.

Os modificadores químicos utilizados neste estudo são comumente empregados em outros métodos descritos na literatura^{8,11,14,25}.

O diluente Triton X-100 em HNO_3 na concentração selecionada possibilita a preparação simples e rápida da amostra.

CONCLUSÃO

O método desenvolvido é sensível, simples, rápido e direto. Permite a determinação simultânea de chumbo e cádmio em sangue com precisão e exatidão requeridas, sendo desnecessária a digestão da amostra. O método utiliza reagentes e modificadores químicos tradicionalmente utilizados na técnica de absorção atômica com forno de grafite, e calibração sem a necessidade de adição de padrão. Pode ser utilizado para a avaliação de exposição humana tanto ambiental quanto ocupacional a esses metais.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem à Dra Alice Sakuma pela orientação e à Roberta Okura pela colaboração na análise estatística.

REFERÊNCIAS

1. Falomir P, Alegría A, Barberá R, Farré R, Lagarda, M. Direct determination of lead in human milk by electrothermal atomic absorption spectrometry. *Food Chem*, 64: 111-13, 1999.
2. ATSDR, Agency for Toxic Substances and Disease Registry. Toxicological Profile for Cadmium, U.S. Department of Health and Human Services. Atlanta, USA, 1998.
3. ATSDR, Agency for Toxic Substances and Disease Registry. Toxicological Profile for Lead, U.S. Department of Health and Human Services. Atlanta, USA, 1999.
4. Parsons PJ, Geraghty C, Verostek MF. An assessment of contemporary atomic spectroscopic techniques for the determination of lead in blood and urine matrices. *Spectrochim Acta Part B*, 56: 1593-604, 2001.
5. Hållen IP, Jorhem L, Lagerkvist BJ, Oskarsson A. Lead and cadmium levels in human milk and blood. *Sci Total Environ*, 166: 149-155, 1995.
6. Sturgeon RE. Graphite furnace atomic spectrometry and environmental challenges at the ultratrace level – a review. *Spectrochim Acta Part B*, 52: 1451-57, 1996.
7. Zhang ZW, Shimbo S, Ochi N, Eguchi M, Watanabe T, Moon CS, et al. Determination of lead and cadmium in food and blood by inductively coupled plasma mass spectrometry: a comparison with graphite furnace atomic absorption spectrometry. *Sci Total Environ*, 205: 179-87, 1997.
8. Acar O. Determination of cadmium and lead in biological samples by Zeeman ETAAS using various chemical modifiers. *Talanta*, 55: 613-622, 2001.
9. Yen CC, Chen WK, Hu CC, Wei BL, Chung C, Kuo SC. Lead determination in whole blood by graphite furnace atomic absorption spectrometry. *Atom Spectroscopy*, 18(2): 64-9, 1997.
10. Correia PRM, Oliveira E, Oliveira PV. Simultaneous determination of Cd and Pb in foodstuffs by electrothermal atomic absorption spectrometry. *Anal Chim Acta*, 405: 205-11, 2000.
11. Deval A, Sneddon J. Determination of cadmium and lead in blood reference samples by simultaneous graphite furnace atomic absorption spectrometry. *Microchem J*, 52: 96-100, 1995.
12. Freschi GPG, Dakuzaku CS, Moraes M, Nóbrega JA, Neto J A G. Simultaneous determination of cadmium and lead in wine by electrothermal atomic absorption spectrometry. *Spectrochim Acta Part B*, 56: 1987-93, 2001.
13. Hoening M, Cilissen A. Performances and practical applications of simultaneous multi-element electrothermal atomic absorption spectrometry the case of SIMAA 6000. *Spectrochim Acta Part B*, 52: 1443-49, 1997.
14. Campillo N, Viñas P, García IL, Córdoba MH. Rapid determination of lead and cadmium in biological fluids by electrothermal atomic absorption spectrometry using Zeeman correction. *Anal Chim Acta*, 390: 207-215, 1999.
15. Brasil, Leis, Decretos, etc. Secretaria de Segurança e Saúde no Trabalho. Portaria nº 24, de 29 de dezembro de 1994. Aprova o texto da Norma Reguladora nº 7 (NR-7) – Exames Médicos. *Diário Oficial da União*, Brasília, 30 de dezembro de 1994. Seção I.
16. ACGIH, American Conference of Governmental Industrial Hygienists. Limites de exposição (TLVs) para substâncias químicas e agentes físicos e índices biológicos de exposição (BEIs), Ohio, USA, 2003. tradução ABHO – Associação Brasileira de Higienistas Ocupacionais. São Paulo, SP, 2003. 219 p.
17. CDC, Centers for Disease Control. Screening young children for lead poisoning: guidance for state and local public health officials. [www.cdc.gov/nceh/lead/guide/1997/pdf]. Acesso em: junho 2003.
18. Chaudhary-Webb M, Paschal DC, Elliott WC, Hopkins HP, Ghazi AM, Ting BC, et al. ICP-MS Determination of lead isotope ratios in whole blood, pottery, and leaded gasoline: lead sources in Mexico City. *Atom Spectroscopy*, 19(5): 156-163, 1998.
19. Furman A, Mehmet L. Analysis of lead body burden in Turkey. *Sci Total Environ*, 234: 37-42, 1999.
20. Parsons JP, Slavin W. A rapid Zeeman graphite absorption spectrometric method for the determination of lead in blood. *Spectrochim Acta*, 48B (67): 925-39, 1993.
21. Draoper NR, Smith H. *Applied Regression Analysis*, 3ª ed., New York: John Wiley; 1998. 706 p.
22. ISO/CD 13812: General Guidelines for Atomic Absorption Spectrometry – Graphite furnace analysis, 1996. 63 p.
23. Currie LA. Nomenclature in evaluation of analytical methods including detection and quantification capabilities - *Pure Appl Chem*, 67: 1669 – 1723, 1995.
24. Brasil, INMETRO. Orientações sobre validação de métodos de ensaios químicos. DOC-CGCRE-008 – revisão 01 – março 2003. [<http://www.inmetro.gov.br>]. Acesso em: junho 2003.
25. Burguera JL, Burguera M, Rondon CE. Determination of lead in whole blood and urine by electrothermal atomic absorption spectrometry using various chemical modifiers. *Atom Spectroscopy*, 18(3): 109-113, 1997.