

Universidade Federal de Santa Catarina  
Centro de Ciências Físicas e Matemáticas  
Departamento de Química  
Programa de Pós-Graduação em Química

**Determinação de Cd e Pb em urina e sangue por espectrometria de absorção atômica em forno de grafite após extração no ponto nuvem com otimização multivariada: Aplicação em trabalhadores de uma fundição**

Dissertação de mestrado

Tatiane de Andrade Maranhão

Florianópolis  
2007

**Determinação de Cd e Pb em urina e sangue por espectrometria de absorção atômica em forno de grafite após extração no ponto nuvem com otimização multivariada: Aplicação em trabalhadores de uma fundição**

Tatiane de Andrade Maranhão

Orientador: Prof.<sup>o</sup> Dr. Adilson José Curtius

Co-orientadores: Prof.<sup>a</sup> Dra. Cláudia Regina dos Santos  
Prof.<sup>a</sup> Dra. Vera L. A. Frescura Bascuñan

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal de Santa Catarina como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Química Analítica

Florianópolis  
2007

*Como expressar com singelas palavras  
a importância de uma pessoa em nossa vida?  
Não saberia responder...  
Mas posso dizer Mãe que te amo muito  
Obrigada por tudo!*

## **Agradecimentos**

Ao Prof.<sup>o</sup> Dr. Adilson pela amizade e orientação ministradas desde a graduação, por me permitir desenvolver esse projeto, por ser um exemplo profissional a ser seguido.

A Prof.<sup>a</sup> Dra. Vera pela amizade e co-orientação, por ser uma entusiasta deste projeto, sempre me animando quando por vezes o desânimo me assombrou.

A Prof.<sup>a</sup> Dra. Cláudia pela co-orientação e oportunidade de interação com uma área outrora tão “distante”, por todas as vezes que me acalmou quando a inexperiência de minha parte falava mais alto mostrando que tudo daria certo.

A Deus por ser a fonte de água viva na qual renovo minhas forças e esperança, nunca me deixando desistir, mesmo nos momentos de maior fraqueza.

A minha adorável família, especialmente minha Mãe e irmão, por serem o porto seguro que me acolhem em todos os momentos de minha vida, sempre compreensivos e amorosos.

Ao meu falecido Pai que foi a primeira pessoa que me mostrou o mundo da ciência, com certeza ele observou toda minha trajetória!

Aos colegas da FUNDACENTRO e da CEREST pelo apoio técnico e oportunidade.

A minha família próxima, Beatriz, Amanda, Daniel e Adriana, por todos bons momentos vividos e incentivos.

A minha família distante, em Pernambuco, que nunca fez da distância um obstáculo para me incentivar e apoiar.

Aos amigos do laboratório 211: Ingrid, Mirela, Daiane Torres, Daiane Quadros, Luciano, Fábio, Eduardo, Tatiana, Jairo, Frederico e aos distantes Alessandra, Mariana, Anderson e Jessee. Obrigada por tornar o ambiente de trabalho um lugar sério porém divertido, harmonioso porém sempre agitado, um lugar onde a ciência se faz presente sem precisar descartar o melhor que cada um pode doar como pessoa.

Ao amigo, colega de trabalho, parente e por que não co-orientador também, Daniel, por todos os conhecimentos passados, dicas e conversas vividas, pela paciência e oportunidade.

Aos amigos do laboratório 209, Dilma, Janaína, Heloísa, Kalya, pela paciência em emprestar a centrífuga, em especial Edmar que não só me ajudou com a análise multivariada como muitas vezes escutou meus desabaços.

Aos amigos distantes, que sempre apoiaram e foram compreensivos ao longo desta caminhada, Janaíse, Rodrigo, Liane, Marcus, Lílian, e tantos outros que enriquecem minha vida mesmo morando distante.

Aos amigos extra-laboratório, especialmente, Alexandre, Karin, Bethânia, Renata, Val, Aloíso, Ivanise, Adriana, Maryene, Nicolás, Vânia, Geórgia, Angélica, Sara, Karina, Gilson, Aline, Tânia, Isadora e Evandro. A meu grupo de amigos, intitulado Linha T, pelos maravilhosos momentos de diversão e descontração, tão importantes em diversos momentos da vida. Aos amigos do Grupo de Oração Universitário e da Fazenda da Esperança pela sincera amizade.

A CAPEs pelo financiamento da bolsa durante o período do mestrado.

**SUMÁRIO**

<b>Resumo .....</b>	<b>vii</b>
<b>1. Introdução.....</b>	<b>1</b>
1.1. Processo industrial.....	1
1.2. Cádmio e chumbo.....	3
1.3. Extração no ponto nuvem .....	8
1.4. Espectrometria de absorção atômica.....	11
1.5. Planejamento Box Behnken.....	12
<b>2. Objetivo geral .....</b>	<b>14</b>
<b>3. Procedimento experimental .....</b>	<b>15</b>
3.1. Instrumentação .....	15
3.2 Reagentes, padrões e material certificado.....	15
3.3. Tratamento da plataforma com Ru .....	16
3.4. Preparo da amostra .....	17
3.5. Estratégia de otimização.....	18
3. 6. População estudada .....	19
3.6.1. O ambiente de trabalho da fundição .....	20
3.6.2. Coleta das amostras .....	21
<b>4. Resultados e discussão.....</b>	<b>23</b>
4.1. Metodologia para determinação de Cd e Pb em amostras de urina .....	23
4.1.1. Curvas de pirólise e atomização .....	23
4.1.2. Condições de complexação por planejamentos fatorial e Box- Behnken .....	26
4.1.3. Parâmetros de mérito e resultados .....	36
4.2. Metodologia para determinação de Pb em amostras de sangue .....	38
4.2.1. Curvas de pirólise e atomização .....	38
4.2.2. Condições de complexação pelo planejamento Box-Behnken.....	40
4.2.3. Parâmetros de mérito e resultados .....	43
4.3. Aplicação da metodologia otimizada para determinação de Cd e Pb em urina e Pb em sangue.....	45
<b>5. Conclusões .....</b>	<b>53</b>
<b>6. Referências .....</b>	<b>54</b>

## ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1. Programa de temperatura do forno de grafite para determinação de Cd e Pb. ....	15
Tabela 2. Programa de temperatura do forno de grafite para a deposição de Ru na plataforma de grafite .....	16
Tabela 3. Fatores e níveis usados na otimização multivariada dos parâmetros envolvidos na CPE .....	19
Tabela 4. Planejamento fatorial envolvendo concentrações dos componentes do CPE e da amostra em dois níveis e com ponto central. ....	28
Tabela 5. Planejamento Box-Behnken envolvendo os componentes da CPE para Pb e Cd em urina (U) e em solução padrão aquosa (S.A.) .....	29
Tabela 6. Condições de absorvância integrada máxima para Cd e Pb em urina e em solução padrão aquosa e valores otimizados obtidos por planejamento Box-Behnken.....	31
Tabela 7. Parâmetros de mérito para determinação de Cd e Pb em amostras de urina por ET AAS com calibração aquosa submetida à CPE (EF = fator de melhoramento; LD = limite de detecção; R = coeficiente de correlação linear; RSD= desvio padrão relativo). ....	36
Tabela 8. Concentrações ( $\mu\text{g L}^{-1}$ ) obtidas para Cd e Pb em amostras de urina certificadas submetidas a extração no ponto nuvem ( $n = 5$ ) .....	37
Tabela 9. Resultados ( $\mu\text{g L}^{-1}$ ) obtidos para análise de amostras de urina de voluntários e dados de recuperações após enriquecimento com Cd e Pb ( $n = 5$ ) .....	37
Tabela 10. Planejamento Box-Behnken envolvendo os componentes da CPE para Pb em sangue. ....	40
Tabela 11. Condições de absorvância integrada máxima de Pb em sangue... ..	41
Tabela 12. Parâmetros de mérito para determinação de Pb em amostras de sangue por GF AAS com calibração aquosa submetida a CPE (EF = fator de “melhoramento”- enhancement factor; LD = limite de detecção; R = coeficiente de correlação linear).....	43
Tabela 13. Concentrações ( $\mu\text{g L}^{-1}$ ) obtidas para Cd e Pb em amostras de sangue certificadas submetidas a extração no ponto nuvem ( $n = 5$ ) .....	44

Tabela 14. Resultados ( $\mu\text{g L}^{-1}$ ) obtidos para análise de amostras de sangue de voluntários e dados de recuperação após enriquecimento para Pb após CPE (n = 5)..... 44

Tabela 15. Concentrações médias e teste-t aplicado para o grupo exposto e controle, níveis em urina relacionados com a concentração de creatinina de cada indivíduo. .... 45

Tabela 16. Teste t aplicado para 95% de confiança para as médias em diferentes setores da fundição. .... 47



**ÍNDICE DE FIGURAS**

Fig. 1. Esquema das etapas envolvidas no processo de fundição.....	2
Fig. 2. Diagrama de fases do octilfenoxipolietoxietanol (Triton X-114).....	10
Fig. 3. Box Behnken design. a) O planejamento derivado da forma de um cubo; b) Representação dos experimentos fatoriais intercalando-os na ordem de $2^2$ . .....	13
Fig. 4. Fundição participante deste estudo; a) Forno; b) Trabalhador responsável pelo transporte e envase do fundido; c) O envase do ferro fundido nos moldes. ....	21
Fig. 5. Curvas de pirólise e atomização para Pb submetido a extração no ponto nuvem: (a) Urina enriquecida com $1,0 \mu\text{g L}^{-1}$ de Pb e Urina sem enriquecimento;(b) Solução aquosa $1,0 \mu\text{g L}^{-1}$ de Pb;.....	24
Fig. 6. Curvas de pirólise e atomização para Cd em urina enriquecida e solução aquosa submetidas a extração no ponto nuvem ( $0,05 \mu\text{g L}^{-1}$ Cd). ....	26
Fig. 7. Gráficos de Pareto obtido com interação 2 a 2 entre as variáveis envolvidas na extração no ponto nuvem e checagem de curvatura. a) Pb; b) Cd.....	27
Fig. 8. Superfícies de resposta obtidas através do planejamento Box-Behnken para Pb em urina (a-c) e em solução padrão aquosa (a'-c'), após extração no ponto nuvem.....	33
Fig. 9. Superfícies de resposta obtidas com planejamento Box-Behnken para Cd em amostras de urina (a-c) e solução padrão aquosa (a'-c'), após CPE....	34
Fig. 11. Superfícies de resposta obtidas com planejamento Box-Behnken para Pb em amostras de sangue.....	42
Fig.12. Concentração média de Pb em urina (Pb-U) e em sangue (Pb-S) e de Cd em urina (Cd-U) no setor de acabamento para os grupos expostos e controle. ....	46
Fig. 13. Concentração média de Pb em urina (Pb-U) e em sangue (Pb-S) e de Cd em urina (Cd-U) no setor de moldagem para os grupos expostos e controle. ....	47
Fig. 14. Concentração média de Pb em urina (Pb-U) e em sangue (Pb-S) e de Cd em urina (Cd-U) no setor de fusão e vazamento para os grupos expostos e controle. ....	48

Fig.15. Concentração média de Pb em urina (Pb-U) e em sangue (Pb-S) e de Cd em urina (Cd-U) para o grupo exposto correlacionando os diferentes setores da fundição.....	49
Fig. 16. Tempo de exposição por setor da fundição.....	50
Fig.17. Distribuição do hábito de fumar; a) grupo exposto; b) grupo controle ..	51
Fig.18. Distribuição quanto ao consumo de álcool; 1) Grupo exposto; 2) Grupo Controle.....	51

## LISTA DE SIGLAS, SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

ACGIH	<i>American Conference of Governmental Industrial Hygienists</i>
Cd-U	Cádmio em urina
CEREST	Centro de Referência em Saúde do Trabalhador
C.M.C.	Concentração micelar crítica
CPE	Extração no ponto nuvem
DDTP	O,O dietilditiofosfato de amônio
EF	Fator de melhoramento
EPA	Agência de Proteção Ambiental
EPI	Equipamento de proteção individual
EO	Oxietileno
ET AAS	Espectrometria de absorção atômica com atomização eletrotérmica
F AAS	Espectrometria de absorção atômica com chama
IARC	<i>International Agency of Research on Cancer</i>
IBMP	Índice biológico máximo permitido
ICP OES	Espectrometria de emissão ótica com plasma indutivamente acoplado
LD	Limite de detecção
LLE	Extração líquido-líquido
NR	Norma regulamentadora
Pb-S	Chumbo no sangue
Pb-U	Chumbo na urina
PEO	Poli(óxido de etileno)
r	Coefficiente de correlação linear
RSD	Desvio padrão relativo
SPE	Extração em fase sólida
SPME	Microextração em fase sólida
TOXEM	Laboratório de toxicologia de emergência
TX-114	Triton X-114 (surfactante octilfenoxipolietoxietanol)
VR	Valor de referência

## Resumo

A extração no ponto de nuvem (CPE) é proposta como um procedimento de pré-concentração para a determinação de Pb e Cd em urina e Pb em sangue por espectrometria de absorção atômica em forno de grafite (ET AAS). Foram acidificadas alíquotas de 0,5 mL de urina e 0,5 mL de sangue sem digestão com HCl e o sal de amônio do ácido O,O-dietilditiofosfórico (DDTP) foi adicionado junto com o surfactante não-iônico Triton X-114 nas concentrações otimizadas. A separação de fases foi alcançada aquecendo a mistura a 50 °C por 20 min. A fase rica em surfactante foi analisada por ET AAS, empregando as temperaturas de pirólise otimizadas de 900 °C para Pb e 800 °C para Cd e um tubo de grafite com uma plataforma tratada com 500 µg Ru como modificador permanente. A otimização das concentrações de reagentes envolvidos na CPE (HCl, DDTP e Triton X-114) foi realizada utilizando planejamento Box-Behnken. As respostas obtidas através de superfícies mostram os valores ótimos que são semelhantes para as amostras e para a solução padrão aquosa, indicando a possibilidade de uso da calibração contra padrões aquosos submetidos à CPE. Limites de detecção de 40 e 2 ng L<sup>-1</sup> para Pb e Cd em urina e 20 ng L<sup>-1</sup> para Pb em sangue, foram obtidos juntamente com um fator de melhoramento de 18 para ambos os analitos. Foram analisadas três amostras de urina certificadas de referência e duas de sangue, obtendo-se boa concordância entre os valores certificados e determinados a um nível de confiança de 95%. Amostras “reais” também foram analisadas antes e depois de serem enriquecidas com Pb e Cd, resultando em recuperações que variaram de 83 a 109%. Este trabalho ainda envolve a aplicação do método a uma população de trabalhadores expostos ocupacionalmente a estes metais, avaliando-se os indicadores biológicos de exposição, Pb e Cd em urina e Pb em sangue.

## Abstract

Cloud point extraction (CPE) is proposed as a pre-concentration procedure for the determination of Pb and Cd in urine and Pb in blood by graphite furnace atomic absorption spectrometry (GF AAS) without digestion. Aliquots of 0.5 mL urine and 0.5 mL blood without digestion, were acidified with HCl and the complexing agent ammonium O,O-diethyldithiophosphate (DDTP) was added together with the non-ionic surfactant Triton X-114 in the optimized concentrations. Phase separation was obtained by heating the mixture to 50 °C for 15 min. The surfactant-rich phase was analyzed by GF AAS, using the optimized pyrolysis temperatures of 900 °C for Pb and 800 °C for Cd, and a graphite tube with a platform treated with 500 µg of Ru as permanent modifier. The optimization of the reagents concentrations involved in CPE (HCl, DDTP and Triton X-114) was accomplished using a Box-Behnken design. The obtained response surfaces show the optimum values, which were very similar for an aqueous standard solution and for the samples, demonstrating that aqueous standards submitted to CPE could be used for calibration. Limits of detection of 40 and 2 ng L<sup>-1</sup> for Pb and Cd in urine and 20 ng L<sup>-1</sup> for Pb in blood, were obtained along with an enhancement factor of 16 for both analytes. Three certified reference samples of urine and two of blood were analyzed, and good agreement between the certified and found value was obtained at a 95% confidence level. "Real" samples were also analyzed before and after enrichment with Pb and Cd, resulting in recoveries that varied from 83 to 109%. This work still involves the application of the method to a population of workers occupationally exposed to these metals, in order to evaluate Cd and Pb in urine and Pb in blood as biological indicator of exposure.

## **1. Introdução**

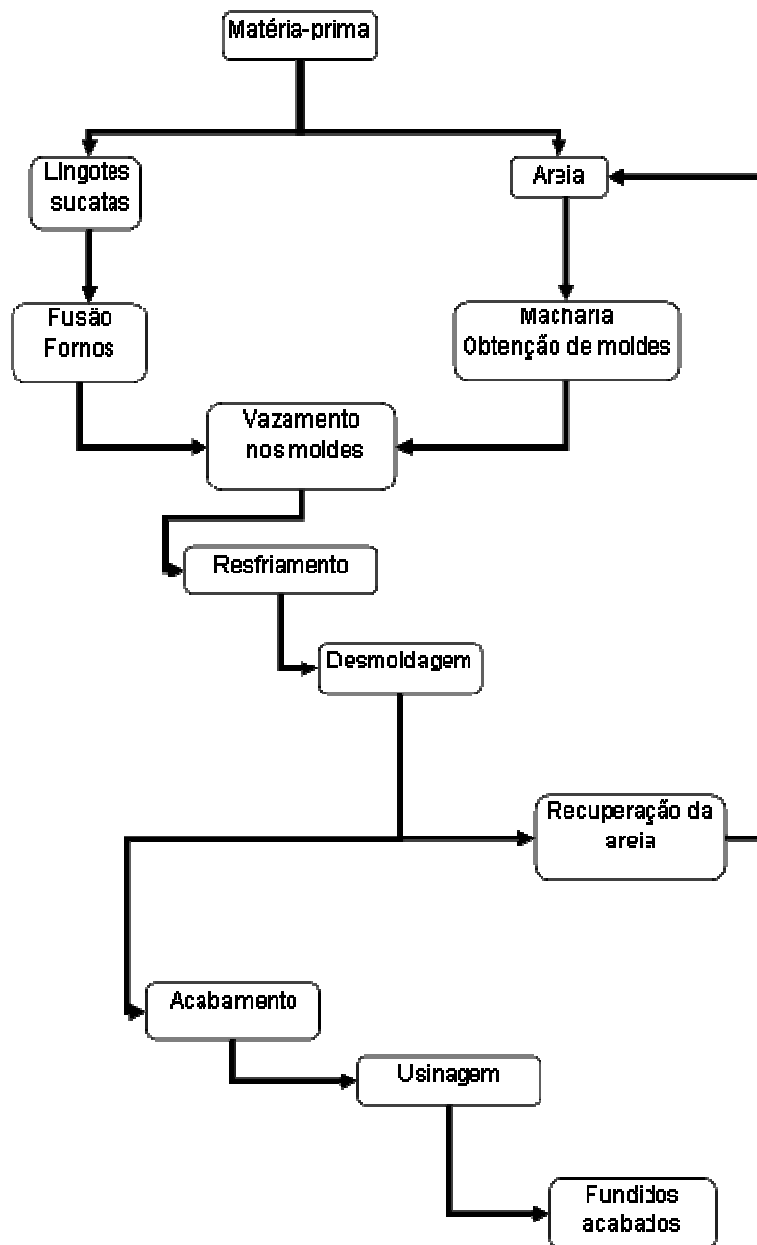
Um dos aspectos relevantes da presença de metais em níveis traço em materiais biológicos trata dos seus efeitos potencialmente tóxicos aos organismos vivos. A contaminação dos ambientes é resultado da grande atividade industrial e do uso de substâncias químicas, sendo um problema importante deste século.<sup>1</sup> Estudos vêm mostrando a existência de correlação entre o nível de metais traços e muitas doenças comuns. Para alguns destes metais, os relatos negativos estão associados principalmente a problemas de saúde individual ou coletiva em função, muitas vezes, do uso inadequado destes compostos. Estando envolvidos em diversos processos industriais, como nos processos de fundição, siderurgia, de tratamento de superfície, metalurgia, tintas e pigmento.<sup>2</sup> É preocupante a crescente contaminação do meio ambiente e do homem diante dos avanços tecnológicos.<sup>2</sup>

O Brasil tem uma vocação para ter uma forte indústria de fundição. Essa vocação provém dos recursos naturais que dispomos como matérias-primas, energia e a tecnologia vigente<sup>3</sup>. A indústria de fundição de peças de ferro, aço e ligas não ferrosas é um segmento da economia nacional que emprega cerca de 50.000 trabalhadores. Cerca de 48% da produção nacional destina-se à indústria automotiva, abastecendo fabricantes de componentes automotores, autopeças e as montadoras de automóveis, caminhões, ônibus e tratores. Além deste segmento, destacam-se entre os clientes de fundição a indústria de bens de capital e a siderurgia.<sup>4</sup> A região sul vem gradativamente destacando-se no campo das fundições, sendo, segundo a Associação Brasileira de Fundições, a região com considerável produção de ferro, aço, ligas de cobre, zinco, alumínio e magnésio, com produção de 61.497 t anual registrada em janeiro de 2006<sup>5</sup>.

### **1.1. Processo industrial**

O processo existente nas indústrias de fundição pode ser descrito simplificadaamente como sendo o preenchimento de moldes com ferro fundido, sendo que estes moldes correspondem ao formato da peça de interesse. Após o resfriamento e solidificação da peça, que ocorre normalmente em

temperatura ambiente, o molde é então desfeito e a peça é submetida a outras etapas de acabamento. Na Fig 1. encontra-se um fluxograma que, de forma geral, mapeia o processo de fundição.



**Fig. 1.** Esquema das etapas envolvidas no processo de fundição.<sup>6</sup>

Nas fases de fusão e vazamento, nas quais o metal passa por um pré-aquecimento, seguido da fusão propriamente dita, de tratamento, de transferência, de vazamento e de resfriamento do metal, são gerados alguns

fatores de risco para a saúde humana, conseqüentes das elevadas temperaturas e dos resfriamentos agressivos. Assim além dos riscos físicos associados às mudanças de temperatura, os trabalhadores estão sujeitos à exposição potencial de fumos metálicos gerados nestes processos.<sup>2</sup>

A contaminação por metais e alguns não metais como arsênio, cádmio, chumbo, cobre, cromo, por exemplo, ocorre principalmente por via respiratória e oral, sendo a primeira a mais relevante sob o ponto de vista ocupacional. Estes elementos são absorvidos e distribuídos no organismo, acumulando-se em especial em tecidos moles, como fígado e rins, e em tecidos rígidos, como ossos e dentes, e no sangue.<sup>7</sup>

O estabelecimento de limites de exposição para estes metais permite a monitoração biológica, através da avaliação de indicadores biológicos de exposição. Entre os indicadores biológicos estão o Pb no sangue e na urina e o Cd na urina. Esta é uma prática rotineira no âmbito da vigilância à saúde e nos estudos epidemiológicos.<sup>8</sup> Num estudo,<sup>7</sup> que avaliou indicadores biológicos de exposição a metais em fundições de metais não ferrosos, no estado do Paraná, mais especificamente, em fundições de metais sanitários, nas quais as etapas do processo são realizadas de forma artesanal. Neste trabalho<sup>7</sup> foram avaliados 273 indivíduos do sexo masculino (178 do grupo exposto e 95 do grupo controle) e os resultados obtidos revelaram que os níveis de Pb no sangue apresentaram-se elevados, considerando o limite internacional. Nas condições avaliadas, Pb foi considerado o metal com maior potencial para causar danos à saúde dos trabalhadores.

## **1.2. Cádmio e chumbo**

Elementos químicos e, em particular, certos metais representam um extenso e importante campo de interesse na medicina ocupacional e ambiental.<sup>9</sup> Este interesse permite avaliar níveis de exposição e relacioná-los com distúrbios específicos. Estudos mostram estratégias de monitoramento na prevenção de quadros clínicos.<sup>10</sup>

Processos de mineração e fundições que comumente envolvem o manuseio de metais são grandes responsáveis pela dispersão destes no meio ambiente, podendo conseqüentemente prejudicar a saúde da população em



geral. Porém a ingestão de comida e bebidas contaminadas por metais, por exemplo, peixes contaminados com Hg, água potável contaminada com As e arroz por Cd já foram reportados na literatura.<sup>11</sup> Na Itália, apenas para comparação, cerca de 20-30% da concentração de Pb no sangue de homens adultos vem da presença de metais nos vinhos, no qual a faixa de concentração de Pb, em geral, encontra-se entre 50 e 100  $\mu\text{g L}^{-1}$ , ocorrendo casos com níveis entre 500 e 700  $\mu\text{g L}^{-1}$ .<sup>9</sup>

A determinação deste tipo de poluente em fluidos biológicos é de considerável importância para a investigação e a correlação com algumas doenças. Na medicina ocupacional, o metal Pb ocupa importante papel, sendo um dos mais importantes agentes tóxicos quando se fala em doenças clínicas e ocupacionais, e um importante foco da toxicologia ocupacional.<sup>9</sup>

Cádmio e chumbo, entre outros, são descritos como elementos prejudiciais à saúde humana, sem nenhuma função biológica essencial ao organismo humano.

Chumbo é um agente acumulativo altamente tóxico aos seres vivos. Efeitos crônicos do chumbo no sistema heme têm sido reportados, como inibição e redução de várias enzimas do sangue e urina. Altas concentrações de chumbo na urina estão associadas a quantidades de Pb recentemente absorvidas.<sup>12,13</sup> A intoxicação aguda por Pb é rara e geralmente confundida com episódios da intoxicação crônica. Os efeitos da intoxicação crônica pelo chumbo podem ser percebidos em diferentes partes do organismo. Os sintomas mais comuns são dores abdominais intensas, pouca formação de hemácias, hipertensão, arterioesclerose precoce, nefropatia intersticial irreversível e a deterioração mental progressiva, mais comum em crianças, que é o sintoma considerado mais grave.<sup>13</sup>

Uma vez no organismo, o chumbo é distribuído entre três compartimentos. O primeiro é o sangue que está em comunicação direta com os outros dois, o segundo é composto pelos tecidos moles como fígado e rins, e o terceiro é constituído por tecidos rígidos como ossos e dentes. O tempo de meia-vida descrito para o Pb no sangue é cerca de 36 dias; 40 dias nos tecidos moles e de 20 a 27 anos nos ossos. Além disso, o Pb pode atravessar a membrana placentária provocando efeitos teratogênicos em fetos.<sup>13</sup>

Pb é um contaminante ambiental e industrial onipresente nos sistemas ambientais e biológicos. A quantidade de Pb usada ao longo do século XX excede o total consumido em eras anteriores.<sup>14</sup> Em muitos países, o Pb é o único metal que apresenta um controle, por legislação, da sua presença no ar. O método utilizado por órgãos oficiais para o controle da poluição do ar, em zonas urbanas e industriais, é a filtração por bombeamento de um volume determinado de ar, para posterior análise dos resíduos retidos nos filtros.<sup>13</sup>

A contaminação ambiental pelo Pb ocorre principalmente em função do seu emprego industrial.<sup>15</sup> Em virtude das diferentes formas de utilização do metal e do grande número de fatores influenciadores, em alguns locais a concentração no ambiente pode chegar a  $35 \mu\text{g m}^{-3}$  de ar,<sup>16</sup> enquanto que, o limite estabelecido pela Agência de Proteção Ambiental (*Environmental Protect Agency -EPA*) nos Estados Unidos é de  $1,5 \mu\text{g m}^{-3}$  de ar.<sup>17</sup>

No Brasil, o Ministério do Trabalho apresenta a Norma Regulamentadora nº 15 (NR-15) que estabelece limites de tolerância para o Pb, fixando em  $100 \mu\text{g m}^{-3}$  de ar, o valor máximo permitido em ambientes de trabalho.<sup>18</sup> Esses valores são baseados na *American Conference of Governmental Industrial Hygienists* (ACGIH) de 1977, esta agência apresenta valores considerados confiáveis para limites de exposição, uma vez que estes são tecnicamente e cientificamente revisados anualmente.<sup>19</sup> No entanto, há estudos no Brasil, por Cordeiro & Lima Filho<sup>20</sup> (1995) que avaliaram os valores limites de tolerância biológica para a prevenção da intoxicação profissional pelo Pb, sendo que consideraram segura, para exposição ocupacional, a quantidade de  $50 \mu\text{g m}^{-3}$ .

Para avaliação da exposição ocupacional ao Pb utiliza-se como indicador biológico com reconhecimento mundial o Pb sanguíneo, sendo que ACGIH adota  $30 \mu\text{g dL}^{-1}$  como valor limite. No Brasil, a NR-7, do Ministério do Trabalho, estabelece o limite para Pb sanguíneo maior que o adotado internacionalmente pela ACGIH, que estabelece como valor de referência (VR),  $40 \mu\text{g dL}^{-1}$  como nível máximo de chumbo em pessoas não ocupacionalmente expostas e  $60 \mu\text{g dL}^{-1}$  como índice biológico máximo permitido (IBMP) em trabalhadores expostos.

Pb na urina também é considerado um indicador biológico, porém é comum para alguns metais ter sua concentração relacionada com a

concentração de creatinina presente na urina do indivíduo. Isto deve-se ao fato de que em estudos ocupacionais tem-se a coleta pontual e não uma coleta de 24 horas. A creatinina está envolvida na filtração glomerular que ocorre nos rins. A presença de metais nos rins influencia na filtração glomerular dos rins, e portanto a relação entre esses dois parâmetros leva a correção da concentração do metal presente na urina, minimizando assim efeitos de diluição.

A mesma norma considera Pb urinário como indicador biológico com um VR máximo de  $50 \mu\text{g g}^{-1}$  de creatinina e um IBMP de  $100 \mu\text{g g}^{-1}$  de creatinina.<sup>14</sup> A busca pelo uso de outros indicadores além do Pb sanguíneo é descrita na literatura, como por exemplo determinação dos níveis de chumbo urinário. Este parece se correlacionar bem com os níveis de chumbo plasmático, sendo utilizado para monitorar exposições a longo prazo, em pacientes sob tratamento utilizando agentes quelantes, ou mesmo pacientes candidatos a iniciar o tratamento.<sup>21</sup> Sadão em seu estudo<sup>22</sup> afirma que a concentração de Pb urinário pode ser utilizada como teste de exposição ocupacional.

A NR-7 (Portaria nº 24, de 29/12/94) também determina que exames médicos anuais sejam feitos com o intuito de monitorar os efeitos tóxicos do Pb inorgânico no organismo de trabalhadores expostos. No entanto, é comprovado que níveis de Pb no sangue, inferiores aos fixados pela legislação brasileira, podem provocar alterações de humor, disfunções da memória, da associação verbal, da inteligência visual e da atenção em trabalhadores expostos ao metal.<sup>23</sup>

Cádmio por sua vez também é um conhecido agente cumulativo nos tecidos humanos,<sup>24</sup> sendo responsável por danos renais e interferindo no funcionamento renal no que diz respeito ao balanço cálcio-fosfato.<sup>12</sup> Concentrações altas de Cd na urina representam uma exposição ao referido metal por um longo período e acúmulo deste no corpo, particularmente nos rins e fígado.<sup>24</sup> Poucos são os estudos acerca dos efeitos do Cd à saúde de pessoas. Os efeitos da exposição a baixos níveis de Cd a longo prazo são difíceis de se determinar.<sup>25</sup> Alguns estudos em trabalhadores expostos a Cd no ar, não resultaram em evidência convincente de que cádmio possa causar câncer pulmonar em humanos. Estudos com camundongos expostos por via inalatória não revelaram nenhuma evidência de câncer pulmonar, mas ratos

que inspiraram Cd apresentaram o desenvolvimento de câncer pulmonar. Ratas fêmeas que respiraram níveis altos de Cd tiveram menos ninhadas, e os bebês apresentaram mais deformidades que o habitual.<sup>26</sup> Conclui-se que é importante perseverar e ampliar os estudos acerca da influência deste elemento. Como conduta conservadora e com base nos dados de estudos com humanos e com ratos a *International Agency of Research on Câncer* (IARC) determinou que o cádmio é um agente carcinogênico para humanos. O Departamento de Saúde e Serviços Humanos dos Estados Unidos determinou que é razoável a antecipação como agente carcinógeno.<sup>26</sup> A Agência de Proteção Ambiental (EPA) determinou que o cádmio é provavelmente um agente carcinógeno por inalação.<sup>26</sup>

Alimentos e consumo de cigarros são as maiores fontes de exposição a Cd para a população em geral. Nas áreas urbanas, com altos níveis de poluição atmosférica advinda da queima de combustíveis fósseis, os níveis de Cd podem ser maiores que  $40 \text{ ng m}^{-3}$ .<sup>26</sup>

Trabalhadores podem ser expostos ao Cd quando em contato com vapores de metais fundidos e quando trabalham na manufatura de artigos como baterias e plásticos. Regulamentos que fixem os níveis permissíveis de exposição fazem-se necessários para evitar efeitos prejudiciais à saúde do trabalhador.

A excreção do Cd absorvido é muito lenta. Uma vez absorvido, leva de 17 a 38 anos no corpo, sendo, de 6 a 38 anos nos rins e de 4 a 19 anos no fígado. A maior parte do Cd inalado ou ingerido é excretado pelas fezes, estando relacionado à porção não absorvida pelo trato gastrointestinal.<sup>26</sup>

No Brasil, Cd não é um elemento listado na NR-15, não tendo conseqüentemente um limite de tolerância estabelecido. Na NR-9 é citado que se deve utilizar o valor da ACGIH. A NR-7, norma que relata sobre os indicadores biológicos, recomenda a determinação de Cd urinário para monitoração biológica e estabelece VR de  $2 \mu\text{g g}^{-1}$  de creatinina e IBMP de  $5 \mu\text{g g}^{-1}$  de creatinina.

### 1.3. Extração no ponto nuvem

O monitoramento de elementos traço em materiais biológicos é particularmente difícil, devido à usual alta complexidade da matriz e à baixa concentração destes elementos nestas amostras, o que requer uma técnica instrumental sensível e muitas vezes uma etapa de pré-concentração e/ou separação. A extração líquido-líquido clássica e os métodos de separação convencionais consomem normalmente muito tempo e labor intensivo, além de requererem volumes relativamente grandes de solventes de alta pureza. Um problema adicional refere-se ao tratamento dos solventes utilizados, uma vez que solventes orgânicos podem gerar severos problemas ambientais. Neste sentido, a extração no ponto nuvem é uma alternativa interessante e eficiente, uma vez que reduz o consumo e a exposição a solventes, custos com tratamento de resíduos e tempo de extração.<sup>27</sup>

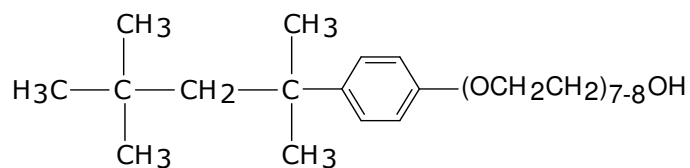
Surfactantes são substâncias tensoativas, formadas por moléculas anfífilas. Uma molécula anfífila possui em sua estrutura duas partes bem definidas, uma de caráter hidrofóbico (porção apolar) e outra de caráter hidrofílico (porção polar). De acordo com o grupo polar dividem-se em aniônicos, catiônicos, não iônicos ou zwitteriônicos.<sup>28</sup>

Surfactantes organizam-se em micelas e vesículas, sendo este um dos fenômenos mais interessantes investigados na química. Micelas são microscopicamente organizadas em grupos químicos formados por auto-agregação das moléculas individuais do surfactante. Em baixas concentrações as moléculas de surfactantes encontram-se na forma de monômeros em soluções. Quando a concentração excede um mínimo, também chamado de concentração micelar crítica (C.M.C.), os monômeros associam-se espontaneamente e formam agregados micelares de dimensões coloidais. Uma importante característica das micelas é que elas não são estruturas estáticas, existindo um equilíbrio dinâmico entre os monômeros e as micelas em solução. As micelas são termicamente estáveis e facilmente reprodutíveis, porém podem ser destruídas pela diluição quando a concentração do surfactante fica abaixo da C.M.C.<sup>29</sup>

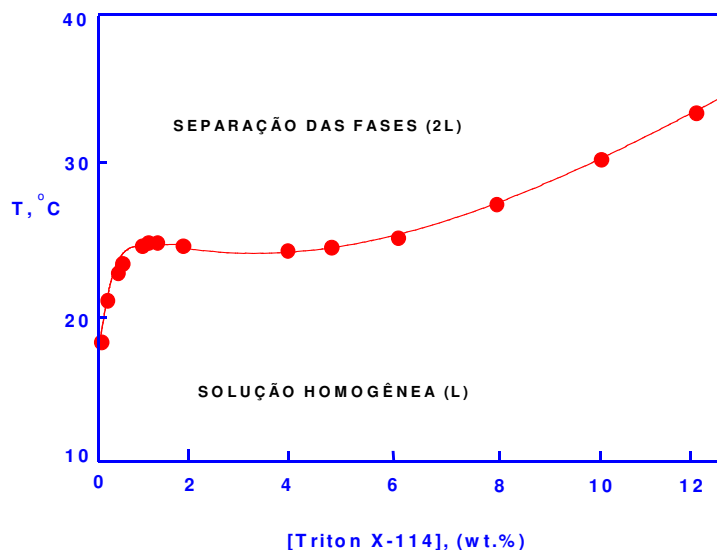
Sistemas micelares formados em soluções aquosas de surfactantes têm sido empregados com sucesso em quase todas as faces da química analítica, variando desde aplicações em espectroscopia e química eletroanalítica à ciência da separação.<sup>28-32</sup> Uma das mais importantes aplicações das micelas envolve o seu uso nos processos de separação.<sup>12</sup>

Surfactantes não iônicos em solução aquosa provocam a separação de fases com o aumento da temperatura ou adição de um agente, normalmente um sal. Este fenômeno é denominado “ponto nuvem” e tem sido usado em diferentes âmbitos, como por exemplo, na determinação simultânea de metais por ICP OES,<sup>35</sup> na pré-concentração de Cd e Ni,<sup>36</sup> especiação de Sb em amostras ambientais e biológicas<sup>37</sup> e na determinação de Bi em urina.<sup>38</sup> De forma versátil é também utilizada na determinação de pesticidas<sup>39</sup> e como uma técnica de extração prévia à determinação de vitaminas,<sup>40</sup> drogas medicinais,<sup>41</sup> e proteínas.<sup>42</sup>

O diagrama de fase do surfactante octilfenoxipolietoxietanol, Triton X-114, utilizado neste trabalho é mostrado na Fig. 2. A estrutura química do mesmo encontra-se abaixo:



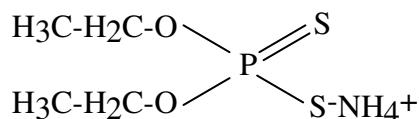
Em temperaturas acima do ponto nuvem, como mostra a Fig. 2, o sistema separa-se em duas fases isotrópicas. Uma das fases consiste de uma solução diluída do surfactante não iônico, quase livre de micelas, a uma concentração igual ou próxima a sua concentração micelar crítica (C.M.C), ou seja uma fase rica em água e uma fase rica em surfactante que aparece apenas quando a solução está acima do seu ponto nuvem, ou seja quando as micelas estão formadas e não há água no meio.<sup>28</sup>



**Fig. 2.** Diagrama de fases do octilfenoxipolietoxietanol (Triton X-114).

Várias são as hipóteses do mecanismo de separação de fases dos surfactantes. Uma delas se baseia na entropia da mistura contendo o surfactante, e afirma que quando as moléculas agregam-se formando as micelas tem-se a entalpia agindo de forma mais importante favorecendo a separação de fase, ou seja, mudanças pequenas na entalpia da mistura devidas a mudança na temperatura superam a contribuição da entropia.<sup>43</sup> Há também a hipótese de que a separação de fase ocorra de forma semelhante ao observado experimentalmente para o sistema água/ poli(óxido de etileno) (PEO). Neste sistema, o ponto crítico mínimo da solução é alcançado como consequência de mudanças na ligação de hidrogênio entre as moléculas de água e o polímero PEO devido à variação de temperatura. A química quântica, por sua vez, sugere que a separação de fases é promovida pela mudança conformacional nas ligações oxietileno (EO), e o aumento da temperatura faz o segmento EO tornar-se menos polar.<sup>43</sup> Em temperaturas baixas e solventes polares, a conformação preferencial das ligações C-C é a estrelada e para as ligações C-O é a trans, em altas temperaturas e/ou com solventes de baixa polaridade tem-se o favorecimento de outras conformações, assim ocorrendo a separação de fases do sistema.<sup>43</sup>

Elementos metálicos como Cd, Pb e mesmo alguns não metais como As podem ser extraídos para a fase rica em surfactante sob a forma de complexos hidrofóbicos formados entre os íons do elemento e um agente quelante apropriado sob condições adequadas de pH. O procedimento proposto,<sup>33, 44</sup> envolve, por exemplo, a reação de complexação entre o sal de amônio de *O,O*-dietilditiofosfato (DDTP), mostrado abaixo, e o analito de interesse em meio ácido. A extração no ponto nuvem (CPE) é realizada após a adição de um pequeno volume de Triton X-114, neste exemplo.



A extração e a pré-concentração, que se baseiam na separação de fases utilizando o fenômeno do ponto nuvem, oferecem uma conveniente alternativa aos sistemas de extração convencionais, como extração líquido-líquido (LLE), e criteriosos, como extração em fase-sólida (SPE) e microextração em fase sólida (SPME).<sup>45</sup> Entre as vantagens do CPE incluem-se a alta eficiência de extração, além de requerer pequenas quantidades do surfactante não-iônico, trazendo benefícios em termos de custo e segurança.<sup>46</sup> Diferentes surfactantes (PONPE 7.5, Triton X-100)<sup>47</sup> e agentes quelantes (TAN, 5-Br-PADAP)<sup>47</sup> têm sido usados.

#### 1.4. Espectrometria de absorção atômica

Uma aplicação prática do fenômeno ponto nuvem é a extração de quelatos metálicos, para posterior quantificação usando uma técnica de espectrometria atômica. A espectrometria de absorção atômica em chama (FAAS) é a técnica mais amplamente empregada na detecção de analitos combinada com extração no ponto nuvem.<sup>46-49</sup> Entretanto, mesmo sendo FAAS uma técnica que apresenta vantagens, especialmente no que diz respeito ao tempo de análise, o uso de técnicas mais sensíveis que podem reduzir consideravelmente os limites de detecção para diversos elementos permitiria



quantificar de forma precisa e exata suas concentrações em amostras nas quais a concentração encontra-se em nível de ppb ou sub-ppb.<sup>50</sup>

A espectrometria de absorção atômica com atomização eletrotérmica (ET AAS) pode, neste sentido, combinar todos os benefícios associados à extração no ponto nuvem e ao uso de uma técnica instrumental sensível. A ET AAS permite eliminar de forma eficiente a matriz e o surfactante, durante o aumento gradual da temperatura antes da atomização do analito, através da utilização de um programa de temperatura otimizado, que com maior tempo de residência e maior eficiência de atomização, proporciona uma melhora na sensibilidade de cerca de 2-3 ordens de magnitude em relação à F AAS.<sup>52</sup>

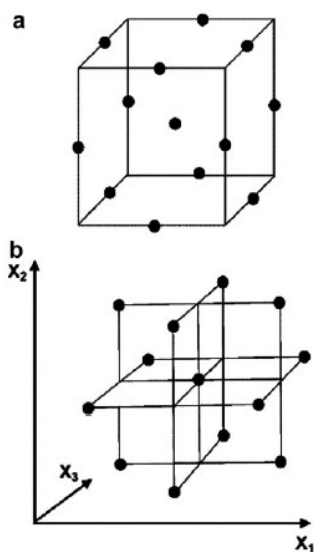
O desempenho da ET AAS pode ser melhorado com o uso de modificadores químicos que normalmente são termicamente depositados na superfície da plataforma de grafite. As vantagens incluem valores de branco mais baixos, devido à purificação *in situ* durante a deposição, menor tempo de análise e freqüentemente um tempo de vida mais longo para o tubo. Alguns trabalhos relatam o uso de Ir ou Ru termicamente depositado para determinar Cd e/ou Pb em diferentes amostras obtendo maior estabilidade térmica e, em muitos casos, sensibilidade melhor do que é obtido sem um modificador.<sup>33,51</sup>

### 1.5. Planejamento Box Behnken

Com a utilização da extração no ponto nuvem (CPE) para qualquer estudo, faz-se necessário uma série de otimizações para definir o valor ótimo de cada parâmetro envolvido, como a concentração do agente quelante, a concentração do ácido, pH e concentração de surfactante, entre outros. A otimização multivariada aparece então como uma interessante alternativa para facilitar de forma confiável a otimização dos parâmetros envolvidos na CPE, além de permitir investigar a interação entre esses parâmetros e as influências destes no processo. A análise multivariada é uma forma alternativa de obtenção de uma quantidade máxima de informações sobre a metodologia experimental, proporcionando significativa economia no tempo do procedimento experimental e redução no número de experimentos.<sup>53</sup>

Uma das alternativas é o planejamento Box-Behnken, que requer um número de experimentos de acordo com a equação  $N = k^2 + k + c_p$ , sendo (k) o

número de fatores (parâmetros) envolvidos no estudo em questão e ( $c_p$ ) é o número de replicatas do ponto central. Trata-se de um planejamento esférico, que pode ser visualizado por meio de um cubo (Fig. 3a), consistindo de um ponto central e de pontos médios localizados nos lados do cubo. Isto pode ser interpretado como um planejamento fatorial intercalando as variáveis  $2^2$  e um ponto central (Fig. 3b).<sup>54</sup> O uso do planejamento Box-Behnken é crescente em química analítica, sendo aplicado na otimização de sistemas de pré-concentração em linha,<sup>54</sup> na modelagem de carvões,<sup>53</sup> na otimização e teste de robustez por eletroforese capilar em amostras farmacêuticas,<sup>55</sup> sendo também um importante recurso na otimização das condições experimentais de métodos de preparação de amostras para cromatografia gasosa.<sup>56</sup>



**Fig. 3.** Box Behnken design. a) O planejamento derivado da forma de um cubo; b) Representação dos experimentos fatoriais intercalando-os na ordem de  $2^2$ .

## **2. Objetivo geral**

O objetivo geral do presente trabalho é utilizar o fenômeno ponto nuvem como método de extração e pré-concentração para desenvolvimento de método analítico para determinação de Cd e Pb em amostras de sangue e urina utilizando espectrometria de absorção atômica com atomização eletrotérmica (ET AAS).

### **2.1 Objetivos específicos**

Desenvolvimento de metodologias para determinação de Cd e Pb em amostras de sangue e urina por ET AAS após extração no ponto nuvem.

- Investigar a utilização de modificadores químicos com intuito de aumentar a estabilidade térmica dos analitos
- Com auxílio da análise multivariada, determinar as concentrações ótimas de trabalho dos componentes do CPE e avaliar efeitos de interação
- Aplicar o método otimizado a trabalhadores de fundição expostos a fumos metálicos
- Efetuar uma associação preliminar entre os níveis dos IBEs, o ambiente de trabalho, hábitos de tabagismo e consumo de álcool

### 3. Procedimento experimental

#### 3.1. Instrumentação

Um espectrômetro de absorção atômica AAnalyst 100 (Perkin Elmer, Norwalk, CT, USA), equipado com atomizador em forno de grafite HGA 800 e amostrador automático AS-72 foi utilizado em todos os experimentos. A correção de absorvância não-específica (fundo) foi efetuada com lâmpada de arco de deutério. Todas as medidas foram efetuadas utilizando absorvância integrada (área de pico). Lâmpadas de cátodo de Cd e Pb (Perkin Elmer) foram operadas, respectivamente, a 4 mA e 10 mA. Os comprimentos de onda de 228,2 nm e 283,3 nm foram selecionados para Cd e Pb, respectivamente. Alíquotas de 20  $\mu$ L de todas as amostras e soluções de calibração foram injetadas diretamente no tubo de grafite. Argônio (99,996 %, White Martins, São Paulo) foi utilizado como gás de proteção e de purga. Tubos de eletrografite policristalino recobertos com grafite pirolítico e plataformas de grafite pirolítico (Perkin Elmer) foram utilizados. O programa de temperaturas do forno de grafite é mostrado na Tabela 1.

**Tabela 1.** Programa de temperatura do forno de grafite para determinação de Cd e Pb.

Etapa	Temperatura/ °C	Rampa/ s	Permanência/ s	Vazão de Ar/ mL min <sup>-1</sup>
secagem I	80	5	10	250
secagem II	110	5	10	250
pirólise	800 <sup>a</sup> , 900 <sup>b</sup>	5	25	250
resfriamento	20	1	5	250
atomização	1600 <sup>a</sup> , 1800 <sup>b</sup>	0	5	0
limpeza	2200	1	5	250

a- Temperatura para Cd

b- Temperatura para Pb

#### 3.2 Reagentes, padrões e material certificado

Todos os reagentes utilizados possuíam grau analítico de pureza. Água foi deionizada em sistema Milli-Q (Millipore, Bedford, MA, USA) a uma resistividade de 18,2 M $\Omega$  cm. Ácido clorídrico (Merck, Darmstadt, Alemanha),

metanol (Carlo Erba, Milão, Itália) e ácido nítrico (Carlo Erba) foram bi-distilados abaixo da temperatura de ebulição em destiladores de quartzo (Kürner Analysentechnik, Rosenheim, Alemanha). O quelante *O,O*-dietilditiofosfato de amônio (Aldrich, Milwaukee, WI, USA) e Triton X-114 (Sigma, St. Louis, MO, USA) foram utilizados sem purificação prévia. Modificadores químicos Rutênio (Fluka, Buchs, Suíça) e Paládio (Merck, Darmstadt, Alemanha).

Os materiais certificados usados para validação do método foram: *Metalle Urine* níveis 1 e 2, urina humana (MEDICHEM, Steinenbronn, Alemanha). *Seronorm Trace Elements in Urine* (Sero AS, Billingstad, Noruega). Amostras de sangue total certificadas também foram utilizados, sendo estes: *Seronorm Blood* nível 1 e 2 (Sero AS).

Um kit para dosagem de creatinina Labtest foi utilizado para as análises de creatinina nas amostras dos trabalhadores de fundição.

### 3.3. Tratamento da plataforma com Ru

Rutênio foi termicamente depositado na superfície da plataforma de grafite pirolítico. O programa de temperatura usado no pré-tratamento da plataforma com Ru encontra-se mostrado na Tabela 2. A massa total de 500 µg de modificador foi depositada na plataforma, injetando-se 20 µL de uma solução estoque de 1000 mg L<sup>-1</sup> diretamente na plataforma de grafite e submetida ao programa de temperatura da Tabela 2.

**Tabela 2.** Programa de temperatura do forno de grafite para a deposição de Ru na plataforma de grafite

Temperatura/ °C	Rampa/ s	Permanencia/ s	Vazão de Ar/ mL min <sup>-1</sup>
90	5	15	250
140	25	15	250
1000	10	10	250
2000	0	5	0
20	1	5	250

### 3.4. Preparo da amostra

As amostras de urina certificadas e liofilizadas foram reconstituídas com 5,0 mL de água deionizada. Alíquotas das amostras reconstituídas foram diretamente submetidas ao procedimento de extração no ponto nuvem.

O procedimento de pré-concentração iniciou-se com a adição de HCl 37% v/v destilado com concentração otimizada, 0,30 mol L<sup>-1</sup> para Pb e 0,50 mol L<sup>-1</sup> para Cd. Alíquotas de 20 a 100 µL de amostra reconstituída, de acordo com a concentração de analito esperada nas amostras, foram adicionadas em frascos de polipropileno de 14 mL (TPP, Techno Plastic Products AG, Trasadingen, Suíça). Uma solução estoque de DDTP foi preparada na concentração de 5% m/v e esta solução foi adicionada às amostras até que fosse atingida a concentração otimizada, 0,7 % m/v para Pb e 1,0 % m/v para Cd. Finalmente, Triton X-114 na concentração otimizada foi adicionado, 0,3 % m/v e 0,5 % m/v para Pb e Cd respectivamente, e água deionizada foi introduzida até o volume final de 14 mL. A solução final foi então aquecida em banho-maria a 50 °C por 15 minutos. A separação de fases foi acelerada pela centrifugação dos tubos a 3500 rpm por 15 min. A fase rica em surfactante tornou-se viscosa após imersão dos tubos em banho de gelo por 10 minutos, permitindo a eliminação da fase aquosa pela simples inversão dos tubos. Resíduos de água foram removidos com auxílio de uma pipeta de Pasteur. Para reduzir a viscosidade do extrato e permitir a análise por ET AAS, 500 µL de metanol acidificado com HNO<sub>3</sub> 0,1 mol L<sup>-1</sup> foram adicionados e alíquotas de 20 µL da solução resultante foram pipetadas diretamente no forno de grafite com auxílio do amostrador automático e submetidas ao programa de temperaturas mostrado na Tabela 1. A calibração foi realizada com padrões aquosos submetidos ao mesmo procedimento de extração ao qual foram submetidas as amostras. Um “branco”, constituído de água deionizada e componentes do CPE, submetido ao mesmo procedimento foi medido paralelamente.

Alíquotas de 500 µL de amostras reais de urina acidificadas, de voluntários não expostos, sem nenhum tratamento prévio, foram submetidas ao procedimento de extração no ponto nuvem e também foram utilizadas na

otimização das condições de trabalho. Testes de recuperação foram feitos, utilizando alíquotas das amostras de urina agora enriquecidas. Cada analito foi separadamente analisado, sendo as condições de extração otimizadas por quimiometria.

As amostras de sangue certificadas por sua vez foram também reconstituídas e, anteriormente ao processo de extração, foram hemolisadas utilizando uma solução diluente na proporção de 1:10. A solução diluente continha dihidrogeno fosfato de amônio, na concentração de 0,2% m/v, Triton X-100 na concentração de 0,5% v/v e 0,2 % v/v de ácido nítrico concentrado bi-destilado. Esta solução diluente encontra-se citada em diferentes trabalhos no campo da medicina.<sup>7,8,10,57</sup> As amostras reais de voluntários também foram hemolisadas e posteriormente cerca de 500 µL das amostras hemolisadas foram submetidas ao procedimento de extração no ponto nuvem assim como o descrito para as amostras de urina.

### **3.5. Estratégia de otimização**

A otimização dos componentes do CPE foi previamente avaliada através de planejamento fatorial em dois níveis com um ponto central. Subseqüentemente foi utilizada a metodologia de superfície de resposta com o planejamento Box-Behnken. As variáveis envolvidas foram: concentração de HCl (HCl), concentração de DDTP (DDTP) e concentração de Triton X-114 (TX-114). A resposta analítica utilizada foi a absorvância integrada. Os dados experimentais foram avaliados usando o programa STATISTICA 6.0.

Para análise preliminar da significância das variáveis no sistema em estudo, um planejamento fatorial completo em dois níveis e um ponto central em triplicata foi realizado, envolvendo quatro fatores: concentrações do quelante DDTP, de HCl, de surfactante TX-114 e da matriz urina. A variável concentração da amostra urina envolveu a comparação entre o sinal obtido para uma solução padrão aquosa, contendo os analitos e uma amostra de urina enriquecida com a mesma concentração. Esta variável foi também avaliada para verificar se a calibração poderá ser realizada contra padrões aquosos, ou seja, se há diferença significativa no sinal analítico entre uma amostra e uma solução padrão aquosa, ambas com as mesmas

concentrações. O nível mínimo (-) para esse fator foi uma solução padrão aquosa contendo  $2,0 \mu\text{g L}^{-1}$  Pb e  $0,01 \mu\text{g L}^{-1}$  Cd. O nível máximo foi uma alíquota de  $500 \mu\text{L}$  de urina enriquecida com as mesmas concentrações do mínimo e o ponto central foi uma alíquota de  $250 \mu\text{L}$  de urina também enriquecida na mesma concentração do mínimo. Um ponto central realizado em triplicata foi incluído no planejamento para estimar a variância experimental e para avaliar a perda de linearidade entre os níveis escolhidos para cada uma das variáveis. Esse procedimento é denominado de checagem de curvatura, onde o software estima se há diferença significativa na inclinação das duas possíveis retas formadas entre o nível inferior e o ponto central e entre o ponto central e o nível superior.

Para a amostra de sangue submetida a CPE foi realizado apenas um planejamento Box-Behnken em duplicata e as superfícies obtidas foram comparadas com as obtidas para a solução padrão aquosa submetidas a CPE.

Na Tabela 3 encontram-se os níveis mínimos e máximos para as outras três variáveis estudadas pelo planejamento fatorial e pelo planejamento Box-Behnken realizado posteriormente. O ponto central para cada variável foi a média aritmética entre os níveis máximo e mínimo para cada variável.

**Tabela 3.** Fatores e níveis usados na otimização multivariada dos parâmetros envolvidos na CPE

Variáveis	Min.(-)	Máx.(+)	Ponto central (0)
Concentração DDTP (%m/v)	0,01	1,00	0,50
Concentração HCl ( $\text{mol L}^{-1}$ )	0,01	0,63	0,32
Concentração Triton X-114 (%m/v)	$0,1^a / 0,0^b$	$1,1^a / 0,6^b$	$0,6^a / 0,3^b$

<sup>a</sup> para Cd em urina e solução padrão aquosa e Pb em sangue

<sup>b</sup> para Pb em urina e solução padrão aquosa de Pb

### 3. 6. População estudada

O processo de amostragem foi realizado numa indústria de fundição na cidade de Joinville-SC, em um trabalho de parceria entre o Departamento de Química (Laboratório de Espectrometria de Absorção Atômica), o



Departamento de Patologia (Laboratório de Toxicologia de Emergência - TOXEM) da UFSC, o Centro de Referência em Saúde do Trabalhador (CEREST) da cidade de Joinville, a Fundação Jorge Duprat Figueiredo de Medicina e Segurança do Trabalho - FUNDACENTRO (Regional de Santa Catarina) e ainda o Ministério Público do Trabalho de Santa Catarina.

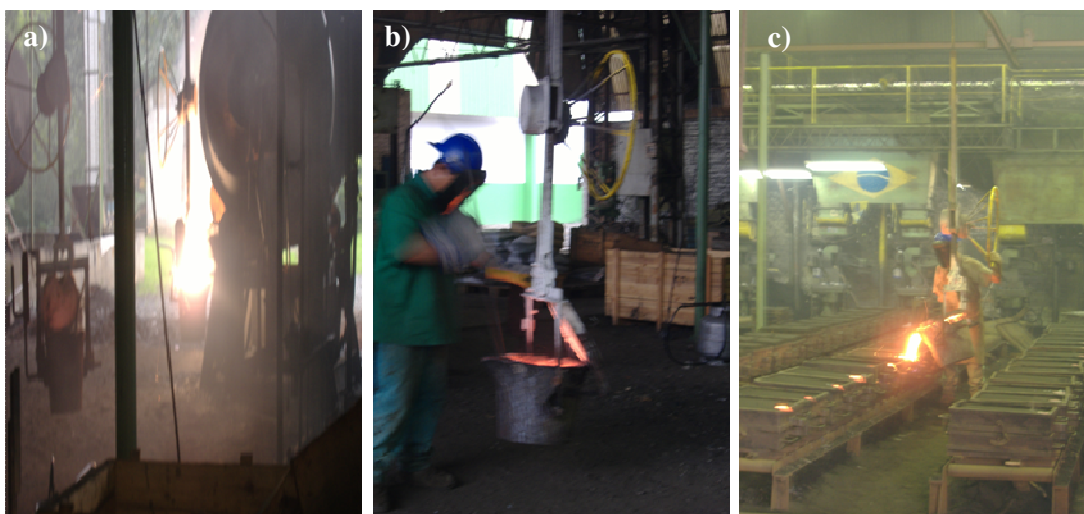
A indústria selecionada é uma empresa que fabrica peças de ferro usadas comumente em borracharias. É composta de uma pequena fundição e da indústria propriamente dita, em dois blocos distintos. A indústria conta com um total de 70 funcionários nos dois blocos. A carga horária dos trabalhadores envolvidos no estudo era de oito horas diárias, cinco dias por semana, totalizando 40 horas semanais. Foram avaliadas amostras de sangue e urina de 34 trabalhadores. Avaliaram-se todos os trabalhadores da fundição. Para o estudo foram selecionados 17 funcionários, os expostos diretamente aos fumos metálicos, e também 17 funcionários considerados não expostos da mesma indústria.

Os trabalhadores envolvidos no estudo responderam um questionário (Anexo 1) para obtenção de dados, como identificação, condições de trabalho, hábitos pessoais, patologias e uso de medicamentos. Também assinaram um termo de consentimento após uma conversa informativa sobre a participação no trabalho (Anexo 2). O protocolo foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos da UFSC sob o número 111/06, relacionados ao projeto “Avaliação dos indicadores biológicos de exposição aos metais em trabalhadores de fundições de Santa Catarina”.

### **3.6.1. O ambiente de trabalho da fundição**

A indústria é composta de 2 blocos, sendo uma a fundição e o outro onde ocorre a montagem de peças. A fundição é constituída de um galpão de aproximadamente 100 m<sup>2</sup>, com um lado fechado e na parte superior apresenta janelas. O outro lado do galpão é aberto, onde se localiza o forno. Alguns trabalhadores utilizavam equipamentos de proteção individual (EPI). A poeira e odor característico proveniente da fusão da liga estão presentes em toda extensão do galpão, indicando que as janelas superiores são insuficientes para

renovação do ar. Tanto a areia advinda dos moldes quanto a disposição do material, tornam o ambiente desorganizado e de difícil circulação. O galpão não conta com um sistema de exaustão e o forno estava localizado em uma área mais ventilada. Quatro funcionários se revezam nas atividades próximas ao forno, sendo responsáveis pela operação de vazamento em panela, realizado na parte central do galpão, e dois funcionários ficam apenas no forno, sendo responsáveis pela fusão do ferro e retirada da escória. A Fig.4 ilustra momentos do expediente da fundição com os trabalhadores que formaram o grupo exposto.



**Fig. 4.** Fundição participante deste estudo; a) Forno; b) Trabalhador responsável pelo transporte e envase do fundido; c) O envase do ferro fundido nos moldes.

### 3.6.2. Coleta das amostras

Após uma visita de fiscalização de reconhecimento de riscos, junto ao CEREST e a FUNDACENTRO, e conversa com os responsáveis, foi realizada no dia seguinte, a coleta. A intenção é que com os resultados a empresa possa, junto aos órgãos competentes, ter um comprometimento em realizar melhorias nos ambientes de trabalho da fundição e assim tentar garantir uma melhor qualidade do ambiente de trabalho para o trabalhador.

Na manhã do dia da coleta foram aplicados os questionários e, à tarde, as coletas de sangue e urina foram realizadas por profissionais qualificados indicados pelo CEREST, situados em Joinville-SC, acompanhados por uma equipe de profissionais da FUNDACENTRO e CEREST e por pesquisadores dos Departamentos de Química e Patologia da UFSC.

De cada trabalhador, após higienização e assepsia local com álcool 70%, foram coletados 10 mL de sangue em tubo plástico (BD) contendo heparina, utilizando sistema de *vacuntainer*. As coletas foram realizadas em ambiente isento de contaminação. As amostras então foram homogeneizadas, para evitar a coagulação. Foram mantidas e transportadas em caixas térmicas com gelo seco, afim de manter a temperatura de armazenamento, 5 °C, até a chegada no laboratório de análise, e mantidas a temperatura abaixo de 4 °C.

A urina foi diretamente coletada em frascos de polipropileno de 50 mL (Sarstedt, Nümbrecht, Alemanha) descontaminados. Após a coleta, as amostras também foram mantidas em caixas térmicas com gelo seco e transportadas até o laboratório, sendo divididas em alíquotas para determinação de creatinina e alíquotas que foram acidificadas com 2,5% v/v de ácido nítrico bi-destilado e conservadas a 4°C até o momento da determinação dos metais. Tanto as amostras do grupo exposto quanto as do grupo controle receberam o mesmo tratamento e foram avaliadas da mesma forma.

## 4. Resultados e discussão

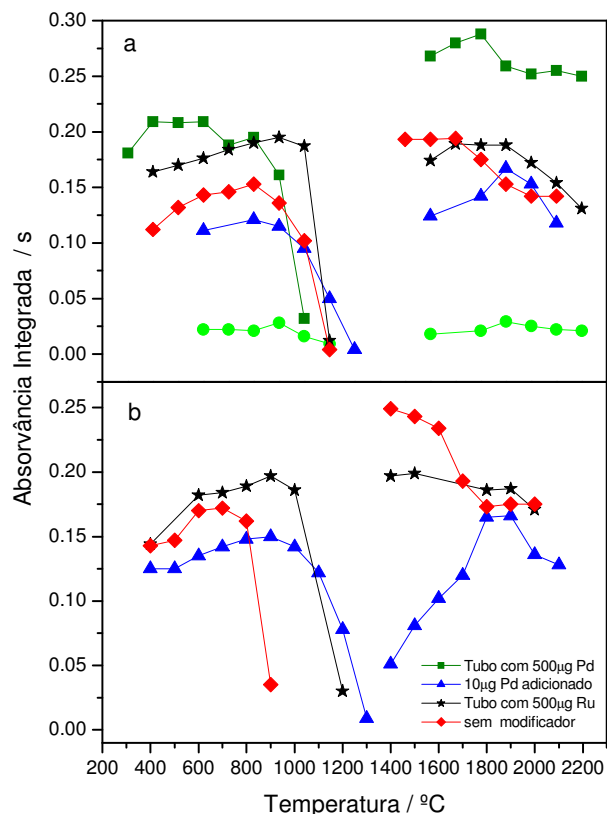
### 4.1. Metodologia para determinação de Cd e Pb em amostras de urina

#### 4.1.1. Curvas de pirólise e atomização

As curvas de pirólise e atomização foram estabelecidas usando amostra de urina de um voluntário enriquecida com os analitos Cd e Pb na concentração de  $0,05 \mu\text{g L}^{-1}$  e  $1,0 \mu\text{g L}^{-1}$ , respectivamente. Soluções padrão aquosas para Cd e Pb também foram utilizadas. Ambas, amostra de urina e soluções aquosas foram submetidas ao procedimento de extração no ponto nuvem. Alíquotas contendo  $20 \mu\text{L}$  do extrato final em metanol foram utilizadas para leitura por ET AAS.

Temperaturas de pirólise abaixo de  $600 \text{ }^{\circ}\text{C}$  não podem ser usadas, pois os concomitantes não são eliminados de forma eficiente nestas condições, gerando fundo considerável, que pode não ser adequadamente corrigida pelo corretor utilizado. Este efeito foi mais pronunciado para o Pb, resultando em um considerável decréscimo na absorvância para baixas temperaturas, como mostra a Fig. 5. O tempo de rampa na etapa de pirólise foi ajustado para permitir a eliminação gradual da matriz, evitando possíveis perdas do analito causadas por um aumento súbito de temperatura. A etapa de limpeza do programa do forno foi ajustada para uma temperatura mais elevada, com intuito de vaporizar todo o resíduo da amostra, evitando efeitos de memória. Estes comentários são aplicáveis a todas as amostras analisadas.

A Fig. 5 (a) e (b) mostra o perfil das curvas de pirólise e atomização para Pb em urina e solução aquosa, respectivamente, com diferentes modificadores químicos (Pd e Ru) e com diferentes formas de emprego destes modificadores, se em solução ou depositado permanentemente no tubo.



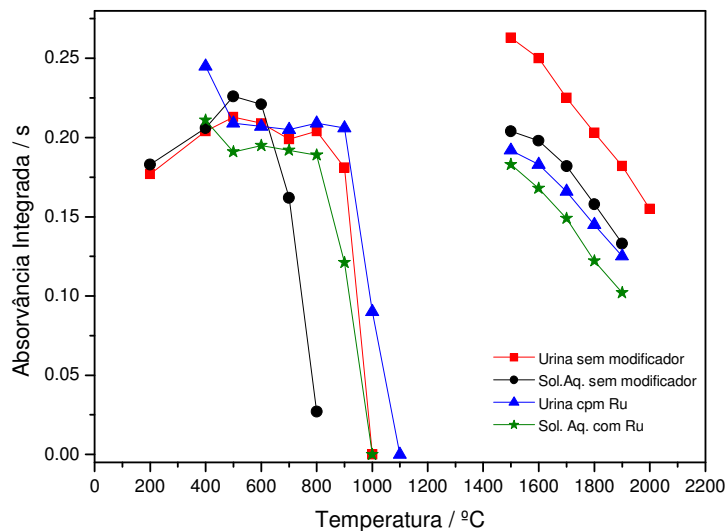
**Fig. 5.** Curvas de pirólise e atomização para Pb submetido a extração no ponto nuvem: (a) Urina enriquecida com  $1,0 \mu\text{g L}^{-1}$  de Pb e Urina sem enriquecimento (—●—);(b) Solução aquosa  $1,0 \mu\text{g L}^{-1}$  de Pb;

As curvas permitem observar que o Pb no extrato apresenta-se termicamente estável devido à contribuição dos reagentes envolvidos na extração no ponto nuvem que, mesmo sem o uso de um modificador químico externo, garante estabilidade térmica até  $700 \text{ }^{\circ}\text{C}$  para solução aquosa e até  $800 \text{ }^{\circ}\text{C}$  para a amostra de urina. Isto é explicado pela presença de altos níveis de fosfato em urina e ao DDTP, que pode agir como modificador químico como já mencionado previamente.<sup>45</sup> Com o uso de modificadores percebe-se que há um aumento dessa estabilidade até  $900 \text{ }^{\circ}\text{C}$  para Pb. Realizou-se um estudo sobre o melhor modificador a ser utilizado e qual a melhor forma de emprego deste, se em solução (adicionado em cada ciclo) ou como modificador permanente. Com Pd adicionado em solução no tubo, observou-se a formação de um precipitado na ponteira do amostrador, devido à presença da matriz da

urina, fato esse que resultou em repetibilidade pobre do sinal analítico. Neste aspecto, o uso de modificador permanente depositado sobre a plataforma de grafite se mostrou mais conveniente. Além disto, o uso de Pd em solução não resultou em estabilização térmica significativa como pode ser visto na Fig 5. Semelhantemente, o uso de um tubo de grafite tratado com Pd como um modificador permanente não mostrou nenhuma vantagem, uma vez que não aumentou a estabilidade térmica para Pb. Observa-se na Fig. 5 um melhor desempenho do Ru como modificador permanente, permitindo uma maior estabilidade térmica do analito, maior sensibilidade e melhor perfil do sinal analítico, com total eliminação do fundo advindo da matriz. Este resultado está em concordância com trabalho anterior,<sup>51</sup> que relata o uso de Ru como modificador permanente na determinação de Pb em sangue, eliminando de forma eficiente o fundo. Observa-se que a matriz urina garante uma maior estabilidade ao Pb, no entanto o perfil das curvas para solução padrão aquosa e urina com modificador Ru mostraram-se semelhantes. A temperatura de atomização foi otimizada levando-se em conta o perfil da curva de atomização e o perfil (largura) do sinal transiente. Para o Pb, a temperatura de atomização otimizada foi de 1800 °C.

As curvas de pirólise e atomização para Cd foram estabelecidas da mesma maneira como descrito acima para Pb. Porém, como foram obtidos melhores resultados para Pb usando Ru como modificador permanente, este foi o único modificador testado para Cd em uma solução aquosa e em uma amostra de urina submetida à CPE, como mostrado na Fig. 6. O efeito da matriz na estabilização térmica do Cd foi especialmente pronunciado já que sem modificador, a estabilidade é garantida até temperatura de pirólise de 800 °C para a amostra de urina. Em uma solução aquosa submetida à CPE, porém, observou-se perda significativa de Cd a uma temperatura de pirólise de 700 °C, o que demonstra que os componentes da matriz de urina são, de fato, os principais responsáveis da estabilização térmica de Cd. O uso de Ru como modificador permanente permitiu temperaturas de pirólise de até 900 °C e 800 °C para Cd na urina e em solução padrão aquosa submetida à CPE, respectivamente. Como compromisso, foi adotada uma temperatura de pirólise de 800 °C para experimentos posteriores. Na Fig. 6 encontram-se as curvas de pirólise e atomização para o Cd. Justifica-se ainda o uso do Ru, uma vez

que a idéia é usar calibração externa com padrões aquosos, pois simular a matriz da urina seria algo inviável, tendo vista a grande variação na composição de cada amostra.



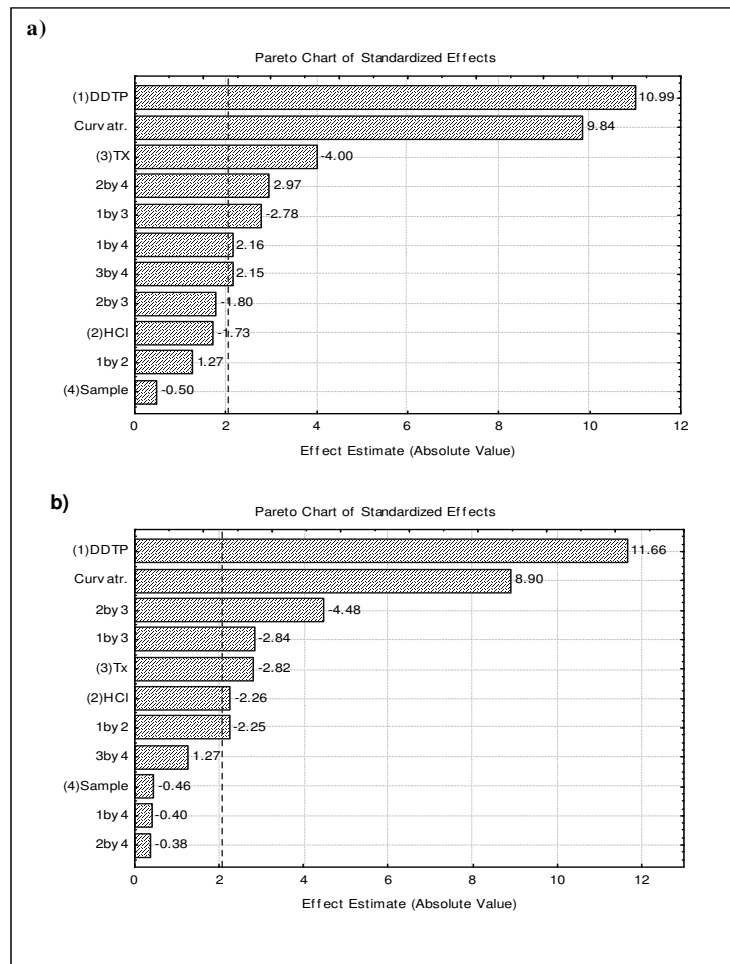
**Fig. 6.** Curvas de pirólise e atomização para Cd em urina enriquecida e solução aquosa submetidas à extração no ponto nuvem ( $0.05 \mu\text{g L}^{-1} \text{Cd}$ ).

A temperatura de atomização para Cd foi otimizada baseando-se na forma do pico, uma vez que as curvas de atomização, mostram-se (Fig 6.) decrescentes com o aumento da temperatura, explicado pelo aumento da difusão do Cd para fora do tubo de grafite, com o aumento da temperatura. A temperatura de atomização selecionada para Cd foi  $1600 \text{ }^\circ\text{C}$ .

#### 4.1.2. Condições de complexação por planejamentos fatorial e Box-Behnken

A combinação das variáveis avaliadas pelos planejamentos fatoriais para Cd e Pb e os resultados em absorvância integrada encontram-se na Tabela 4. Na Tabela 4 os níveis encontram-se codificados, os mínimos no planejamento estão representados por -1,0, os máximos por 1,0 e o ponto central por 0(zero).

A partir dos gráficos de Pareto da Fig 7 (a) e (b), percebe-se que os efeitos das três variáveis envolvidas no ponto nuvem são estatisticamente significativos para Cd (Fig 7b) e apenas as concentrações de DDTP e Triton X-114 são significativas para Pb (Fig 7a). Contudo, efeitos de interação entre as variáveis foram estatisticamente significativos tanto para Cd quanto para Pb, indicando que as variáveis não podem ser avaliadas isoladamente. Tanto para Pb quanto para Cd a variável amostra apresentou efeito não-significativo. Contudo, para Pb, esta variável está envolvida em interações significativas, e, portanto, necessita de um estudo mais detalhado. Para Cd, nenhuma interação envolvendo a variável amostra foi significativa, sendo esta uma boa indicação de que padrões aquosos podem ser utilizados para a calibração deste analito.



**Fig. 7.** Gráficos de Pareto obtido com interação 2 a 2 entre as variáveis envolvidas na extração no ponto nuvem e checagem de curvatura. a) Pb; b) Cd.



**Tabela 4.** Planejamento fatorial envolvendo concentrações dos componentes do CPE e da amostra em dois níveis e com ponto central.

Replicata	DDTP	HCl	TX-114	Amostra	Abs. Int. (s) Pb	Abs.Int. (s) Cd
1	-1,0	-1,0	-1,0	-1,0	0,134	0,003
1	1,0	-1,0	-1,0	-1,0	0,250	0,120
1	-1,0	1,0	-1,0	-1,0	0,044	0,002
1	1,0	1,0	-1,0	-1,0	0,313	0,193
1	-1,0	-1,0	1,0	-1,0	0,087	0,004
1	1,0	-1,0	1,0	-1,0	0,232	0,148
1	-1,0	1,0	1,0	-1,0	0,051	0,003
1	1,0	1,0	1,0	-1,0	0,023	0,003
1	-1,0	-1,0	-1,0	1,0	0,059	0,002
1	1,0	-1,0	-1,0	1,0	0,213	0,116
1	-1,0	1,0	-1,0	1,0	0,031	0,002
1	1,0	1,0	-1,0	1,0	0,278	0,133
1	-1,0	-1,0	1,0	1,0	0,041	0,002
1	1,0	-1,0	1,0	1,0	0,185	0,149
1	-1,0	1,0	1,0	1,0	0,025	0,003
1	1,0	1,0	1,0	1,0	0,233	0,034
1	0	0	0	0	0,329	0,143
1	0	0	0	0	0,305	0,168
1	0	0	0	0	0,327	0,178
2	-1,0	-1,0	-1,0	-1,0	0,138	0,002
2	1,0	-1,0	-1,0	-1,0	0,257	0,121
2	-1,0	1,0	-1,0	-1,0	0,034	0,002
2	1,0	1,0	-1,0	-1,0	0,324	0,191
2	-1,0	-1,0	1,0	-1,0	0,077	0,003
2	1,0	-1,0	1,0	-1,0	0,233	0,150
2	-1,0	1,0	1,0	-1,0	0,043	0,002
2	1,0	1,0	1,0	-1,0	0,021	0,008
2	-1,0	-1,0	-1,0	1,0	0,059	0,003
2	1,0	-1,0	-1,0	1,0	0,223	0,118
2	-1,0	1,0	-1,0	1,0	0,024	0,002
2	1,0	1,0	-1,0	1,0	0,294	0,127
2	-1,0	-1,0	1,0	1,0	0,033	0,004
2	1,0	-1,0	1,0	1,0	0,185	0,153
2	-1,0	1,0	1,0	1,0	0,022	0,002
2	1,0	1,0	1,0	1,0	0,238	0,038
2	0	0	0	0	0,327	0,143
2	0	0	0	0	0,304	0,170
2	0	0	0	0	0,332	0,184

Com base no observado através do planejamento fatorial, decidiu-se por uma otimização através de metodologia de superfície de resposta com o auxílio do planejamento Box-Behnken envolvendo três variáveis, para matriz urina e para solução padrão aquosa, separadamente, em dois planejamentos, num total de 15 experimentos feitos em duplicata, para cada analito e matriz. As três

variáveis estudadas simultaneamente foram as concentrações dos componentes do CPE (HCl, DDTP e Triton X-114). O planejamento Box-Behnken para Pb e Cd e as respostas obtidas para cada ensaio, encontram-se mostrados na Tabela 5.

**Tabela 5.** Planejamento Box-Behnken envolvendo os componentes da CPE para Pb e Cd em urina (U) e em solução padrão aquosa (S.A.)

Replicata	DDTP	HCl	TX-114	Abs. Int. (s) Pb-U	Abs.Int. (s) Pb-S.A.	Abs.Int. (s) Cd-U	Abs.Int. (s) Cd-S.A.
1	-1,0	-1,0	0	0,117	0,145	0,008	0,011
1	1,0	-1,0	0	0,342	0,339	0,140	0,081
1	-1,0	1,0	0	0,023	0,019	0,006	0,010
1	1,0	1,0	0	0,344	0,342	0,138	0,148
1	-1,0	0	-1,0	0,019	0,023	0,003	0,008
1	1,0	0	-1,0	0,006	0,012	0,135	0,092
1	-1,0	0	1,0	0,038	0,026	0,008	0,006
1	1,0	0	1,0	0,276	0,320	0,143	0,086
1	0	-1,0	-1,0	0,009	0,014	0,035	0,071
1	0	1,0	-1,0	0,009	0,011	0,075	0,076
1	0	-1,0	1,0	0,294	0,277	0,030	0,033
1	0	1,0	1,0	0,315	0,311	0,027	0,060
1	0	0	0	0,389	0,309	0,101	0,124
1	0	0	0	0,334	0,358	0,143	0,103
1	0	0	0	0,367	0,384	0,113	0,090
2	-1,0	-1,0	0	0,112	0,145	0,007	0,011
2	1,0	-1,0	0	0,340	0,346	0,139	0,082
2	-1,0	1,0	0	0,022	0,015	0,005	0,009
2	1,0	1,0	0	0,318	0,352	0,139	0,150
2	-1,0	0	-1,0	0,017	0,021	0,004	0,008
2	1,0	0	-1,0	0,007	0,012	0,132	0,093
2	-1,0	0	1,0	0,039	0,030	0,005	0,007
2	1,0	0	1,0	0,274	0,326	0,140	0,086
2	0	-1,0	-1,0	0,008	0,014	0,032	0,070
2	0	1,0	-1,0	0,009	0,011	0,074	0,076
2	0	-1,0	1,0	0,301	0,286	0,030	0,032
2	0	1,0	1,0	0,321	0,314	0,025	0,054
2	0	0	0	0,390	0,253	0,099	0,124
2	0	0	0	0,337	0,366	0,141	0,106
2	0	0	0	0,374	0,398	0,114	0,090

O planejamento Box-Behnken permite modelar matematicamente a resposta analítica em função das variáveis estudadas. Uma equação quadrática é obtida, da qual obtém-se um ponto crítico, que pode ser de máximo, mínimo ou de sela. Esta verificação também pode ser feita visualmente através da superfície de resposta obtida.

As relações entre as variáveis concentração de agente quelante (DDTP), concentração de ácido clorídrico (HCl), concentração de surfactante (TX-114) e sinal analítico (Abs) estão descritas pelas equações:

- *Para Pb:*

Urina:

$$(Abs) = -0,165 + 0,684(DDTP) - 0,487(DDTP)^2 + 0,264(HCl) - 0,464(HCl)^2 + 1,452(TX) - 1,804(TX)^2 \quad (Eq. 1)$$

Sol. aquosa:

$$(Abs) = -0,149 + 0,601(DDTP) - 0,392(DDTP)^2 + 0,206(HCl) - 0,383(HCl)^2 + 1,391(TX) - 1,704(TX)^2 \quad (Eq. 2)$$

- *Para Cd:*

Urina:

$$(Abs) = -0,053 + 0,168(DDTP) - 0,034(DDTP)^2 + 0,266(HCl) - 0,394(HCl)^2 + 0,181(TX) - 0,159(TX)^2 \quad (Eq. 3)$$

Sol. aquosa:

$$(Abs) = -0,035 + 0,207(DDTP) - 0,111(DDTP)^2 + 0,151(HCl) - 0,177(HCl)^2 + 0,135(TX) - 0,123(TX)^2 \quad (Eq. 4)$$

Os pontos críticos das equações acima são obtidas pela condição, na qual as derivadas parciais assumem valor nulo. As derivadas parciais para cada analito em cada matriz encontram-se abaixo.

- *Para Pb:*

Urina:

$$\delta(Abs)/\delta(DDTP) = 0,684 - 0,974(DDTP)$$

$$\delta(Abs)/\delta(HCl) = 0,264 - 0,928(HCl)$$

$$\delta(Abs)/\delta(TX) = 1,452 - 3,607(TX)$$

Sol. aquosa:

$$\delta(Abs)/\delta(DDTP) = 0,601 - 0,784(DDTP)$$

$$\delta(Abs)/\delta(HCl) = 0,206 - 0,765(HCl)$$

$$\delta(Abs)/\delta(TX) = 1,391 - 3,409(TX)$$

- Para Cd:

Urina:

$$\delta(\text{Abs})/\delta(\text{DDTP}) = 0,168 - 0,068(\text{DDTP})$$

$$\delta(\text{Abs})/\delta(\text{HCl}) = 0,266 - 0,787(\text{HCl})$$

$$\delta(\text{Abs})/\delta(\text{TX}) = 0,181 - 0,319(\text{TX})$$

Sol.aquosa:

$$\delta(\text{Abs})/\delta(\text{DDTP}) = 0,207 - 0,223(\text{DDTP})$$

$$\delta(\text{Abs})/\delta(\text{HCl}) = 0,151 - 0,356(\text{HCl})$$

$$\delta(\text{Abs})/\delta(\text{TX}) = 0,135 - 0,246(\text{TX})$$

Os sistemas de equações obtidos para Pb e Cd, em matriz urina e solução padrão aquosa, mostram a condição experimental de máxima absorvância integrada, uma vez que as superfícies obtidas pelas equações gerais indicam pontos de máximo. A Tabela 6 mostra as condições de máximo nas diferentes matrizes obtidas pela resolução das derivadas parciais.

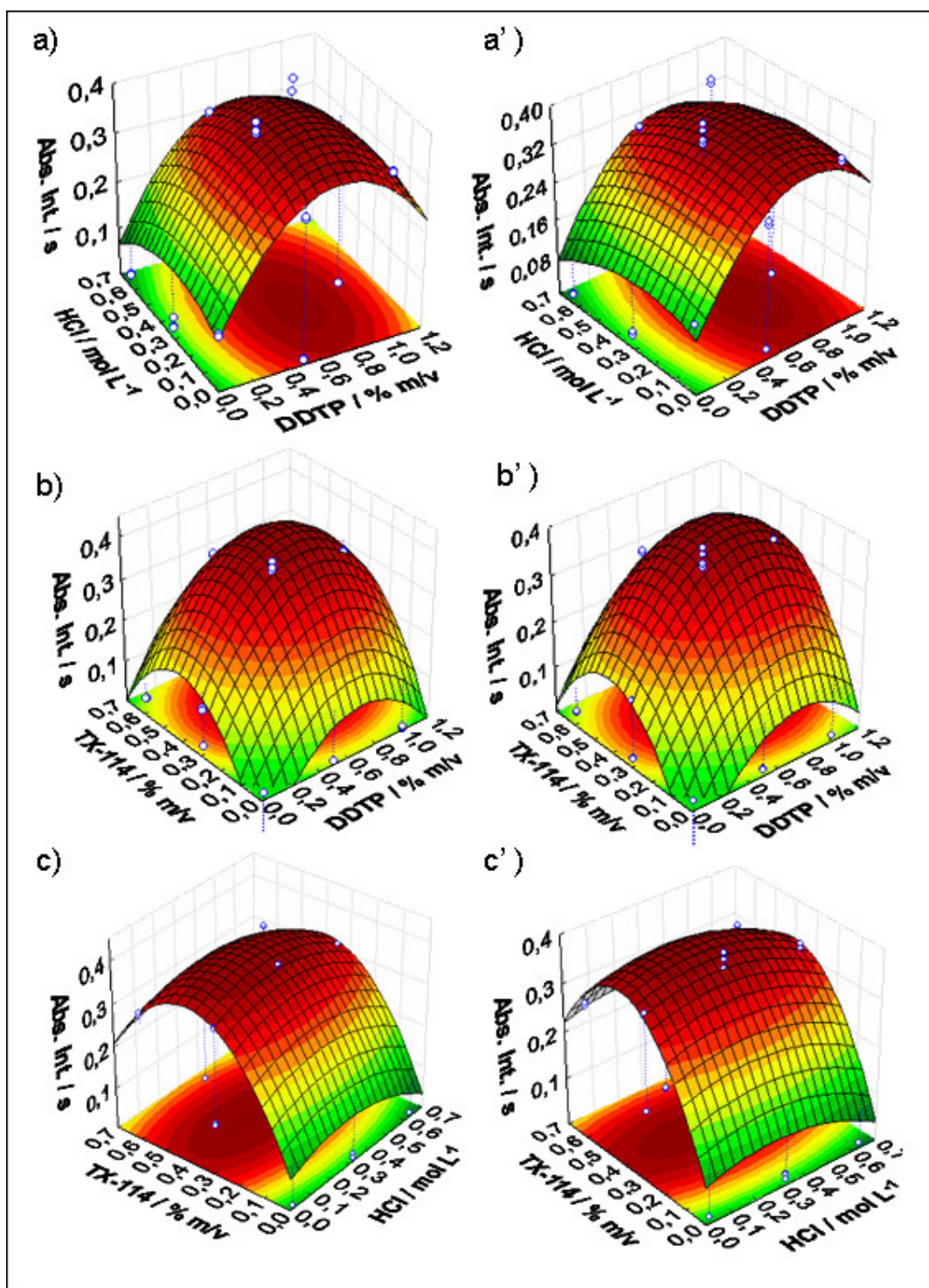
**Tabela 6.** Condições de absorvância integrada máxima para Cd e Pb em urina e em solução padrão aquosa e valores otimizados obtidos por planejamento Box-Behnken.

Reagente	Pb			Cd		
	Urina	Sol. Aq.	Otimiz.	Urina	Sol. Aq.	Otimiz.
DDTP (%m/v)	0,70	0,77	0,70	2,46	0,93	1,00
HCl (mol L <sup>-1</sup> )	0,28	0,27	0,30	0,34	0,43	0,40
TX-114 (%m/v)	0,40	0,41	0,30	0,57	0,53	0,50

Como se pode observar nas Fig. 8 e 9, as superfícies de resposta para os analitos mostram claramente serem superfícies de máximo com regiões bem definidas de condições ótimas. Optou-se por trabalhar com as condições observadas nas superfícies de resposta e os resultados obtidos como pontos de máximo, assumindo-se um compromisso de máximo tanto para solução padrão aquosa como para a urina. Cada planejamento Box-Behnken realizado

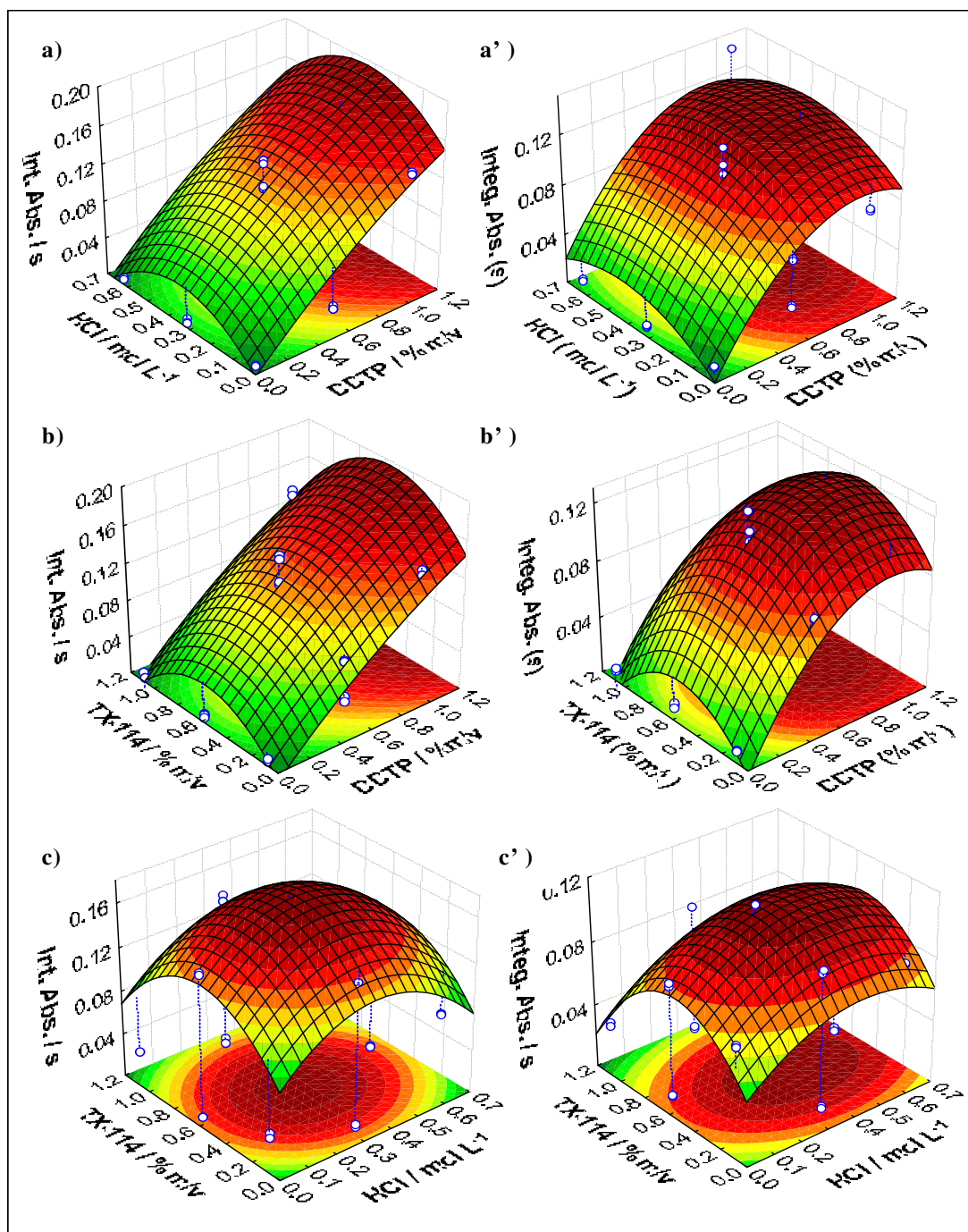
resultou em 3 superfícies de resposta para cada matriz, relacionando-se os parâmetros dois a dois.

As superfícies obtidas para o Pb (Fig. 8) mostram o comportamento dos componentes do CPE quando relacionados dois a dois. O comportamento tanto para a urina (Fig. 8 a-c) quanto para solução padrão aquosa (Fig. 8 a'-c') resultaram em máximos coincidentes, sendo as superfícies muito semelhantes, o que permitiu reforçar a viabilidade do uso de padrões aquosos na calibração e atestar a ausência de interferências. Em todos os estudos, a concentração de DDTP foi visivelmente significativa, como visto nas Fig. 8a e 8a' e Fig. 8b e 8b', estando de acordo com o previsto pelo resultado do planejamento fatorial mostrado na Fig. 7 (gráfico de Paretos). Pode ser visto, claramente, que há um máximo ao redor da concentração de DDTP de 0,7% m/v, com uma diminuição na sensibilidade para concentrações de DDTP mais altas. A concentração de Triton X-114 também é um parâmetro significativo, como visto nas Fig. 8b e 8b' e nas Fig. 8c e 8c'. Para uma baixa concentração de Triton X-114, a sensibilidade é baixa devido a uma extração ineficiente, enquanto que para concentrações mais elevadas o analito é mais diluído na fase rica de surfactante, e o efeito de diluição compensa a possível maior eficiência de extração, resultando na diminuição do sinal. Também pode ser visto nas Fig. 8b e 8b' que há uma considerável interação entre a concentração de DDTP e de Triton X-114. Como ambos estão relacionados intimamente com a eficiência de extração conclui-se que a interação entre estes dois componentes tem significativa influência na sensibilidade do sinal. Isto pode ser observado na superfície de resposta, uma vez que esta apresenta uma região de máximo bem pronunciada. Este resultado confirma as conclusões obtidas através do planejamento fatorial indicando a interação entre estas variáveis como sendo estatisticamente significativa (Fig. 7a). O único parâmetro que não mostrou uma influência significativa foi a concentração de HCl. Embora a formação de complexos com DDTP normalmente ocorra em meio ácido, o sinal mostrou-se independente da concentração de HCl no intervalo estudado. No entanto, para assegurar uma extração eficiente do analito e para evitar a formação de precipitados ou possível adsorção do analito nas paredes do tubo, a concentração  $0,30 \text{ mol L}^{-1}$  de HCl foi escolhida, pois o sinal nesta região da superfície de resposta corresponde a um máximo.



**Fig. 8.** Superfícies de resposta obtidas através do planejamento Box-Behnken para Pb em urina (a-c) e em solução padrão aquosa (a'-c'), após extração no ponto nuvem.

As superfícies obtidas para o Cd (Fig. 9) também mostram o comportamento dos componentes do CPE quando relacionados dois a dois, para a urina e para a solução padrão aquosa.



**Fig. 9.** Superfícies de resposta obtidas com planejamento Box-Behnken para Cd em amostras de urina (a-c) e solução padrão aquosa (a'-c'), após CPE.

Para a urina, pode-se observar nas Fig. 9a e 9b que não há um máximo visualmente bem definido. O efeito da concentração de DDTP para a urina mostrou-se crescente, ou seja, quanto maior a concentração maior o sinal analítico, sendo que dentro do intervalo de concentração estudado, não se atingiu um valor único de concentração ótima. Para escolher a concentração ótima de DDTP, baseou-se na região de máximo obtida para a urina e comparou-se com o valor de máximo obtido para solução padrão aquosa, uma vez que para esta última obteve-se superfícies com máximos definidos, assumindo um compromisso entre os resultados obtidos para matriz urina e a solução aquosa. Para Cd em padrões aquosos submetido à CPE, a região de máximo é bem definida e a concentração de DDTP ótima pode ser deduzida da Eq. 4. Uma explicação para a forte dependência de Cd da concentração de DDTP em amostras de urina é a complexação simultânea de elementos concomitantes na urina, requerendo-se assim quantidades mais altas de DDTP para a máxima eficiência de extração. As Figs. 9a, 9c, 9a' e 9c' mostram que, ao contrário do comportamento observado para o Pb, a concentração de ácido para o Cd mostrou-se uma variável significativa e com nível ótimo de trabalho. A diminuição notável para altas concentrações de HCl pode ser explicada, pelo menos em parte, pela formação de cloro-complexos carregados que poderiam reduzir a eficiência de extração. As Figs. 9c e 9c' também demonstram a interação significativa entre as concentrações de Triton X-114 e HCl o que está de acordo com os resultados do planejamento fatorial, mostrado na Fig. 7b. O efeito pronunciado da concentração de Triton X-114 no sinal analítico é semelhante ao descrito para Pb, uma vez que o efeito de diluição é independente do analito.

A Tabela 6 compila as condições ótimas obtidas das derivadas parciais de Eqs. 1-4 para Cd e Pb em urina e em solução padrão aquosa, submetidas à CPE. O uso de tais condições permite uma resposta de máximo (i.e., o máximo de sensibilidade), de acordo com as equações.

Os resultados na Tabela 6 demonstram que as condições para sensibilidade máxima são bastante semelhantes para ambos os analitos em urina e em solução padrão aquosa, indicando que a matriz de urina não mostra uma influência significativa nos parâmetros experimentais e que é viável se utilizar calibração contra padrões aquosos. A única exceção foi a concentração



de DDTP ótima obtida para Cd em urina que está fora do intervalo experimental estudado. Conforme discutido antes, utilizou-se a análise visual da superfície (Fig. 9a) para definir a concentração ótima desse parâmetro.

Este tipo de otimização usando análise multivariada tem sido usada de forma crescente, em diversos âmbitos.<sup>53-55</sup> Na literatura, ainda não foi reportado o uso de planejamento Box para determinação de Pb e Cd em urina. O uso de análise multivariada é algo recentemente utilizado para otimização das condições de trabalho com CPE.<sup>58</sup>

#### 4.1.3. Parâmetros de mérito e resultados

Os parâmetros de mérito obtidos na otimização do método proposto encontram-se mostrados na Tabela 7.

**Tabela 7.** Parâmetros de mérito para determinação de Cd e Pb em amostras de urina por ET AAS com calibração aquosa submetida à CPE (EF = fator de melhoramento; LD = limite de detecção; R = coeficiente de correlação linear; RSD= desvio padrão relativo).

	Pb	Cd
<b>LD / ng L<sup>-1</sup></b>	40	2
<b>EF</b>	18	16
<b>R</b>	0,9996	0,9971
<b>Sensibilidade / s L µg<sup>-1</sup></b>	0,10	2,73
<b>RSD / %</b>	13	4

O fator de melhoramento foi calculado através da razão entre as sensibilidades das curvas realizadas com soluções padrões aquosas submetidas à extração e sem extração. Foram obtidos limites de detecção (LD,  $3s_B$ ) na ordem de ng L<sup>-1</sup> para ambos os analitos. A comparação com métodos que não utilizam pré-concentração evidencia quão interessante é a CPE. Trabalhos<sup>59-60</sup> descrevem a obtenção de limites de detecção na ordem de µg L<sup>-1</sup>, cerca de 0,57 e 1,0 µg L<sup>-1</sup> para Pb e 0,03 µg L<sup>-1</sup> para Cd, em urina.

A calibração foi realizada contra soluções padrão aquosa, justificada pela otimização multivariada, submetidas ao procedimento de extração no

ponto nuvem. Os resultados foram concordantes com os valores certificados para as três amostras certificadas de urina humana, de acordo com o teste-t para um nível de confiança de 95%. Amostras de urina de voluntários também foram analisadas. Testes de recuperação para Pb e Cd adicionados nestas amostras foram feitos para a verificação da exatidão do método, obtendo-se boas recuperações. Bons coeficientes de correlação ( $> 0,99$ ) foram obtidos em ambos os casos. Os resultados das determinações nos materiais certificados para Cd e Pb encontram-se mostrados na Tabela 8. Na Tabela 9 encontram-se os resultados para o teste de recuperação. A precisão do método desenvolvido mostrou-se boa uma vez que baixos desvios foram obtidos mesmo trabalhando com uma amostra complexa como a urina e com valores certificados apresentando grandes desvios.

**Tabela 8.** Concentrações ( $\mu\text{g L}^{-1}$ ) obtidas para Cd e Pb em amostras de urina certificadas submetidas a extração no ponto nuvem ( $n = 5$ )

Amostra	Pb		Cd	
	Certificado	Obtido	Certificado	Obtido
Metalle urine Nível 1	130 (98-162)	$147 \pm 1,2$	13 (10-16)	$14 \pm 0,3$
Metalle urine Nível 2	80 (62-98)	$68 \pm 1,6$	8 (6,14 – 9,86)	$7,5 \pm 0,6$
Seronorm urine	$91,1 \pm 7$	$90 \pm 1,4$	$5,06 \pm 0,22$	$4,5 \pm 0,1$

**Tabela 9.** Resultados ( $\mu\text{g L}^{-1}$ ) obtidos para análise de amostras de urina de voluntários e dados de recuperações após enriquecimento com Cd e Pb ( $n = 5$ )

	Pb			Cd		
	Obtido <sup>a</sup> $\mu\text{g L}^{-1}$	Obtido <sup>b</sup> $\mu\text{g L}^{-1}$	Rec. %	Obtido <sup>a</sup> $\mu\text{g L}^{-1}$	Obtido <sup>b</sup> $\mu\text{g L}^{-1}$	Rec. %
<b>1</b>	$0,86 \pm 0,22$	$2,93 \pm 0,07$	103	$< 0,002$	$0,053 \pm 0,001$	106
<b>2</b>	$0,45 \pm 0,15$	$2,52 \pm 0,05$	104	$0,051 \pm 0,019$	$0,102 \pm 0,002$	98
<b>3</b>	$0,14 \pm 0,09$	$2,30 \pm 0,07$	108	$< 0,002$	$0,053 \pm 0,002$	105
<b>4</b>	$0,45 \pm 0,13$	$2,62 \pm 0,03$	109	$< 0,002$	$0,055 \pm 0,003$	110
<b>5</b>	$0,056 \pm 0,002$	$1,97 \pm 0,05$	96	$< 0,002$	$0,053 \pm 0,004$	106

<sup>a</sup> Sem enriquecimento; <sup>b</sup> Após enriquecimento ( $2,0 \mu\text{g L}^{-1}$  Pb e  $0,05 \mu\text{g L}^{-1}$  Cd)

## 4.2. Metodologia para determinação de Pb em amostras de sangue

Para determinação de chumbo em sangue inicialmente seria considerado o estudo realizado anteriormente por *Borges et.al.*<sup>50</sup>, cujo procedimento envolve o pré-tratamento da amostra de sangue através de digestão ácida para decomposição da matriz orgânica. Na validação com amostras certificadas não se encontrou nenhum obstáculo, porém quando utilizado com as amostras reais, ainda na validação, verificou-se que a digestão ácida não era viável, possivelmente explicado devido à diluição em excesso a que as amostras de sangue foram submetidas e a baixa concentração de Pb nestas amostras. Na validação, testes de adição/recuperação são recursos comumente utilizados, no entanto a aplicação de um método a uma amostra real com objetivo de avaliação de exposição ocupacional requer um método sensível e confiável. Optou-se então por trabalhar com amostras de sangue hemolisado. Algumas soluções diluentes foram testadas para hemólise, no entanto a solução com surfactante Triton X-100 mostrou-se a mais eficiente destas, garantindo uma eficiente quebra na matriz do sangue e sem grande diluição, como o descrito no procedimento experimental. Desta forma têm-se uma simplificação do experimento quando comparada com o pré-tratamento de digestão ácida que requer mais tempo.

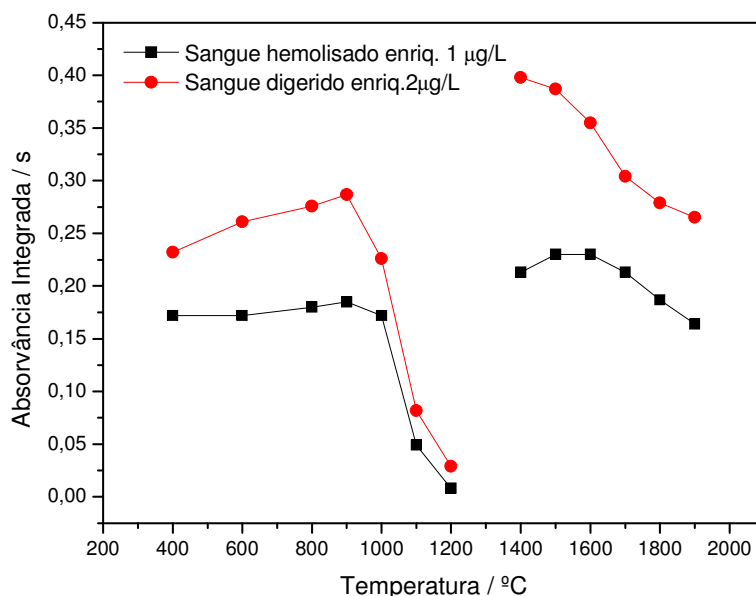
### 4.2.1. Curvas de pirólise e atomização

As curvas de pirólise e atomização foram estabelecidas usando como modificador químico o Ru depositado na plataforma de grafite pirolítico, de acordo com resultados prévios<sup>51</sup> e simplificando o método, uma vez que este mesmo modificador foi utilizado na metodologia para urina. Na Fig. 10 encontram-se as curvas de pirólise e atomização para Pb em sangue.

Pode-se observar que o modificador Ru garante ao analito estabilidade térmica até 900 °C, eliminando de forma eficiente a influência da matriz. Tanto para a amostra digerida quanto para hemolisada, em temperaturas de pirólise baixas tem-se a presença de fundo. Para o sangue hemolisado, a curva mostra-se bem mais estável, apesar de também se ter fundo em baixas

temperaturas. Este por sua vez é de menor intensidade e é adequadamente corrigido pelo corretor com lâmpada de arco de deutério. Em 900 °C tem-se a total ausência de fundo no sinal analítico.

A estabilidade obtida é garantida pela presença de fosfato na matriz e/ou pelos compostos envolvidos na extração no ponto nuvem e na hemolisação. O uso de Ru como modificador, além da simplificação metodológica, é justificado pela ausência de fundo. Sem Ru, observou-se a presença de fundo mesmo em temperaturas altas de pirólise.



**Fig. 10.** Curvas de pirólise e atomização para Pb em amostras de sangue digerido e hemolisado, com modificador permanente Ru após CPE.

A temperatura de atomização foi selecionada com base na curva de atomização e na forma do sinal transiente. Até cerca de 1600 °C o sinal mostrou-se alargado, acima de 1700 °C o sinal é estreito. As temperaturas de pirólise e atomização otimizadas para Pb em sangue após hemólise e CPE foram 900 °C e 1800 °C respectivamente.

#### 4.2.2. Condições de complexação pelo planejamento Box-Behnken

A otimização foi realizada através de metodologia de superfície de resposta, com o auxílio do planejamento Box-Behnken envolvendo três variáveis. Foi realizado para sangue e comparado com um estudo realizado para solução padrão aquosa no mesmo intervalo de trabalho experimental, separadamente em dois planejamentos. As três variáveis estudadas simultaneamente foram as mesmas envolvidas nos planejamentos anteriores, ou seja, as concentrações dos componentes do CPE. O planejamento Box-Behnken para Pb em sangue e as respostas obtidas para cada ensaio encontram-se mostrados na Tabela 10.

**Tabela 10.** Planejamento Box-Behnken envolvendo os componentes da CPE para Pb em sangue.

Replicata	DDTP	HCI	TX-114	Abs. Int. (s)
1	-1,0	-1,0	0	0,036
1	1,0	-1,0	0	0,139
1	-1,0	1,0	0	0,017
1	1,0	1,0	0	0,141
1	-1,0	0	-1,0	0,011
1	1,0	0	-1,0	0,139
1	-1,0	0	1,0	0,020
1	1,0	0	1,0	0,131
1	0	-1,0	-1,0	0,112
1	0	1,0	-1,0	0,136
1	0	-1,0	1,0	0,156
1	0	1,0	1,0	0,154
1	0	0	0	0,143
1	0	0	0	0,162
1	0	0	0	0,159
2	-1,0	-1,0	0	0,024
2	1,0	-1,0	0	0,142
2	-1,0	1,0	0	0,016
2	1,0	1,0	0	0,143
2	-1,0	0	-1,0	0,013
2	1,0	0	-1,0	0,143
2	-1,0	0	1,0	0,019
2	1,0	0	1,0	0,136
2	0	-1,0	-1,0	0,115
2	0	1,0	-1,0	0,135
2	0	-1,0	1,0	0,161
2	0	1,0	1,0	0,145
2	0	0	0	0,145
2	0	0	0	0,163
2	0	0	0	0,156

Assim como no planejamento Box-Behnken anterior, a Tabela 10 encontra-se codificada e os valores de mínimo, máximo e ponto central estão de acordo com os valores exibidos na Tabela 3.

O planejamento Box-Behnken permitiu modelar matematicamente a resposta analítica em função das variáveis estudadas. As variáveis concentração de agente quelante (DDTP), de ácido clorídrico (HCl), de surfactante (TX-114) e o sinal analítico (Abs) estão relacionados pelas equações:

$$(Abs) = -0,017 + 0,402(DDTP) - 0,278(DDTP)^2 + 0,033(HCl) - 0,050(HCl)^2 + 0,196(TX) - 0,264(TX)^2 \quad (Eq. 5)$$

O ponto crítico da equação acima foi obtido pela condição na qual as derivadas parciais assumem valor nulo como segue abaixo:

$$\delta(Abs)/\delta(DDTP) = 0,402 - 0,556(DDTP)$$

$$\delta(Abs)/\delta(HCl) = 0,033 - 0,100(HCl)$$

$$\delta(Abs)/\delta(TX) = 0,196 - 0,528(TX)$$

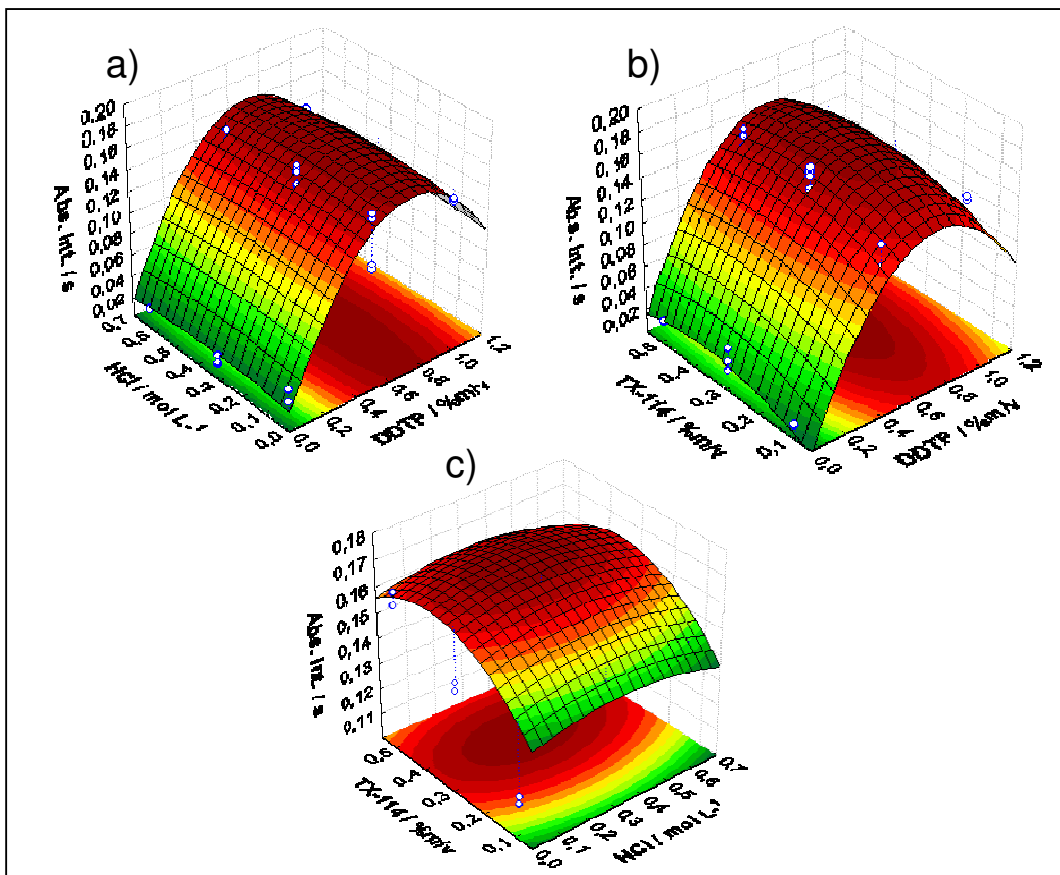
O sistema de equações obtido para Pb em sangue mostram a condição experimental de máxima absorvância integrada, uma vez que as superfícies obtidas pelas equações gerais indicam pontos de máximo. A Tabela 11 mostra as condições de máximo para Pb em sangue, obtidas pela resolução das derivadas parciais.

**Tabela 11.** Condições de absorvância integrada máxima de Pb em sangue.

Reagente	Pb		
	Sangue	Sol. Aq.	Otimiz.
DDTP (% m/v)	0,72	0,77	0,70
HCl (mol L <sup>-1</sup> )	0,32	0,27	0,30
TX-114 (% m/v)	0,37	0,41	0,30

As considerações acerca das condições ótimas para a solução padrão aquosa foram as mesmas adotadas anteriormente, quando foi realizada a otimização para Pb em urina. Apenas realizou-se um planejamento para Pb em

sangue e observou-se que as regiões de máximo e os pontos críticos obtidos apresentaram-se em concordância com o obtido para a solução padrão aquosa. Na Fig. 13 encontram-se as superfícies de resposta obtidas para Pb em sangue.



**Fig. 11.** Superfícies de resposta obtidas com planejamento Box-Behnken para Pb em amostras de sangue.

As superfícies obtidas para o Pb (Fig. 11) mostram o comportamento dos componentes do CPE quando relacionados dois a dois. O comportamento para sangue (Fig. 11 a-c) resultou em superfícies com ponto de máximo semelhante ao obtido para solução aquosa (Fig. 8 a'-c') o que permitiu reforçar a idéia do uso de padrões aquosos na calibração, indicando a ausência de interferências não espectrais. Assim como nos estudos anteriores a concentração de DDTP foi visivelmente significativa, como visto nas Figs. 11a e 11b. Pode ser visto, de forma evidente, que há um máximo em torno da

concentração de 0.7% m/v DDTP, com uma diminuição na sensibilidade para concentrações de DDTP mais altas. A concentração de Triton X-114 e a concentração de HCl não se mostraram significativas se analisadas separadamente, uma vez que as superfícies indicam uma região relativamente grande de máximo e não um ponto específico. Não houve significativa alteração no sinal analítico quando se variam estes fatores.

Conclui-se com a Fig. 11 que a concentração de DDTP é o mais significativo dos parâmetros avaliados, demonstrando a importância da eficiência de extração no sinal analítico. Tanto as superfícies como os resultados das derivadas parciais apontam para as mesmas regiões de máximo. Considerando que a formação de complexos com DDTP normalmente ocorre em meio ácido, para assegurar uma extração eficiente do analito, e como já relatado, evitar a possível formação de precipitados ou adsorção do analito nas paredes do tubo, a concentração  $0,30 \text{ mol L}^{-1}$  de HCl foi selecionada, pois o sinal nesta região da superfície de resposta corresponde a um máximo.

#### 4.2.3. Parâmetros de mérito e resultados

A determinação de Pb em sangue foi realizada em duas amostras certificadas e em três amostras cedidas por voluntários para testes de adição e recuperação. Os parâmetros de mérito obtidos na validação deste método encontram-se mostrada na Tabela 12.

**Tabela 12.** Parâmetros de mérito para determinação de Pb em amostras de sangue por GF AAS com calibração aquosa submetida a CPE (EF = fator de “melhoramento”-enhancement factor; LD = limite de detecção; R = coeficiente de correlação linear).

	<b>Pb</b>
<b>LD / ng L<sup>-1</sup></b>	20
<b>EF</b>	18
<b>R</b>	0,9984
<b>Sensibilidade / s L µg<sup>-1</sup></b>	0,14
<b>RSD / %</b>	13



O fator de melhoramento foi calculado através da razão entre as sensibilidades das curvas realizadas com soluções padrão em meio aquoso submetidas à extração e sem extração. O limite de detecção obtido, também neste caso, foi na ordem de  $\mu\text{g L}^{-1}$ . O método compensa o efeito das diluições obtendo-se bom fator de melhoramento. O método mostrou boa precisão e exatidão. A calibração foi realizada contra soluções padrão aquosas, submetidos ao procedimento de extração no ponto nuvem. Os resultados obtidos para as amostras certificadas foram concordantes com os valores de referência para as duas amostras certificadas de sangue total, de acordo com o teste  $-t$  para um nível de confiança de 95%. Bom coeficiente de correlação ( $> 0,99$ ) foi obtido. Boas recuperações, em torno de 95%, foram obtidas para os testes de adição realizados. Os resultados das determinações nos materiais certificados e os testes de recuperação encontram-se mostrados na Tabela 13 e 14 respectivamente.

**Tabela 13.** Concentrações ( $\mu\text{g L}^{-1}$ ) obtidas para Cd e Pb em amostras de sangue certificadas submetidas a extração no ponto nuvem ( $n = 5$ )

Amostra	Pb	
	Certificado	Obtido
Seronorm Whole Blood Nível 1	34 (31-39)	$27,7 \pm 5.5$
Seronorm Whole Blood Nível2	401 (353-443)	$342,4 \pm 6.2$

**Tabela 14.** Resultados ( $\mu\text{g L}^{-1}$ ) obtidos para análise de amostras de sangue de voluntários e dados de recuperação após enriquecimento para Pb após CPE ( $n = 5$ )

	Pb		Rec. %
	Obtido <sup>a</sup> $\mu\text{g L}^{-1}$	Obtido <sup>b</sup> $\mu\text{g L}^{-1}$	
<b>1</b>	$0,04 \pm 0,009$	$0,12 \pm 0,006$	83
<b>2</b>	<LD	$0,11 \pm 0,007$	99
<b>3</b>	$0,03 \pm 0,004$	$0,13 \pm 0,023$	96

<sup>a</sup> Sem enriquecimento; <sup>b</sup> Após enriquecimento ( $0,108 \mu\text{g L}^{-1}$  Pb)

### 4.3. Aplicação da metodologia otimizada para determinação de Cd e Pb em urina e Pb em sangue

A metodologia proposta neste estudo foi aplicada as amostras de sangue e urina de trabalhadores de uma fundição da cidade de Joinville, SC. O grupo de trabalho, conforme descrito em 2.4. , foi dividido em grupo exposto e grupo controle. O grupo exposto se trata de trabalhadores com potencial risco de exposição ocupacional. O grupo controle, por sua vez, é constituído de trabalhadores que não sofrem exposição direta. Os valores de Pb e Cd em urina foram relacionados com os valores de creatinina urinária para comparação com o estipulado pela legislação nacional.

Os resultados obtidos para as amostras, analisando o total amostral do grupo exposto e controle, encontram-se na Tabela 15 sob a forma de médias, desvios e teste-t aplicado para 95% de nível de confiança. Antes de aplicar o teste-t, devido à distribuição não homogênea da amostra principalmente para Pb em urina (Pb-U), um teste de Grubb's foi aplicado em todos grupos e análises para eliminar os valores que não eram representativos de todo o conjunto da amostra.

**Tabela 15.** Concentrações médias e teste-t aplicado para o grupo exposto e controle, níveis em urina relacionados com a concentração de creatinina de cada indivíduo.

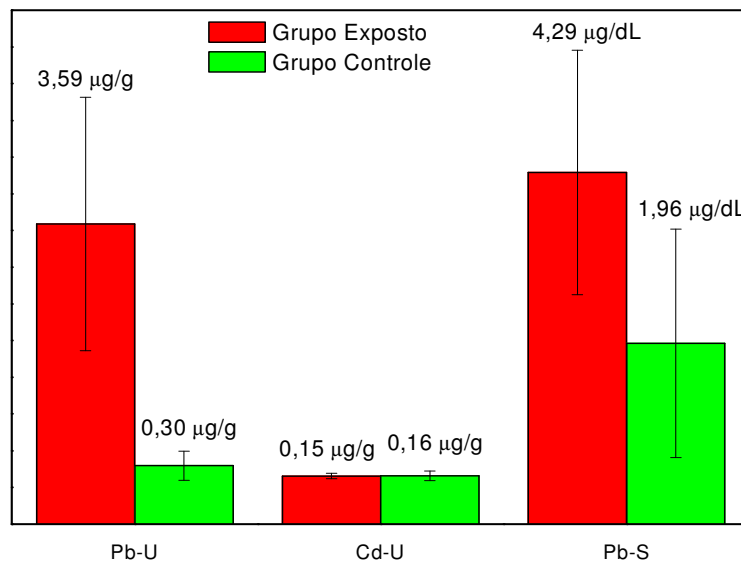
Índice	Média grupo exposto	Média grupo controle	Teste t calculado	Teste t tabelado	Estatística
<i>Pb-Urinário (Pb-U)</i> $\mu\text{g g}^{-1}$	3,01± 2,09	0,40± 0,40	4,89	2,14	significativa
<i>Cd-Urinário (Cd-U)</i> $\mu\text{g g}^{-1}$	0,27± 0,18	0,12± 0,10	2,98	2,12	significativa
<i>Pb-Sanguíneo (Pb-S)</i> $\mu\text{g dL}^{-1}$	2,96± 2,09	2,00± 1,12	1,63	2,13	Não significativa

Pode-se observar, primeiramente, que nenhuma das concentrações encontradas está acima do limites propostos segundo as normas trabalhistas atuais, que são para Pb-Urinário  $100 \mu\text{g g}^{-1}$ , para Cd-Urinário  $5 \mu\text{g g}^{-1}$  e para Pb-Sanguíneo  $60 \mu\text{g dL}^{-1}$ . Porém, se forem avaliados os resultados confrontando valores de grupo exposto vs grupo controle, as concentrações de

Pb e Cd na urina são significativamente diferentes indicando exposição para o grupo de trabalhadores da fundição.

Separando-se os trabalhadores por setor de trabalho, baseando-se no processo industrial da fundição, têm-se três categorias distintas: trabalhadores do setor de acabamento, do setor de moldagem, do setor de fusão e vazamento e o gerente da fundição que circula livremente no ambiente da fundição. O grupo controle por entender-se como um grupo sem exposição foi aleatoriamente atribuído para confrontar os resultados do grupo exposto.

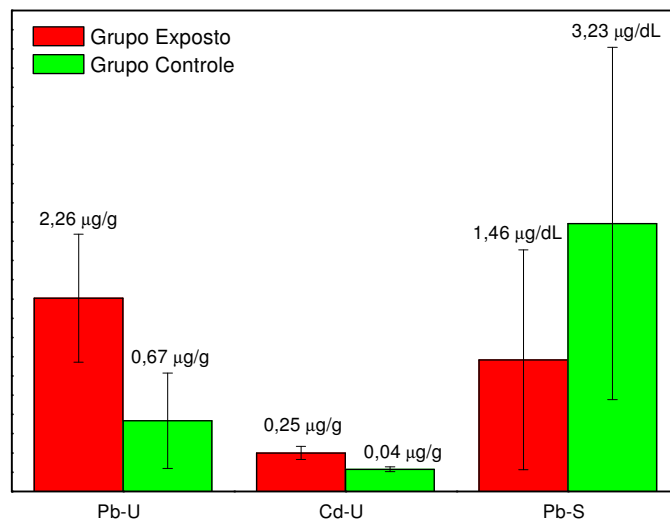
Na Fig. 12 estão representadas as médias no setor de acabamento da fundição. Avaliando apenas os trabalhadores deste setor da fundição, aplicando-se o teste-t para as médias obtidas, a diferença foi estatisticamente significativa para Pb-U e Pb-S, provavelmente em função da exposição a partículas sólidas provenientes destas operações. No acabamento das peças, os trabalhadores encontram-se mais expostos às poeiras que podem conter os metais do que aos fumos metálicos (vapor que sai do ferro fundido). É importante ressaltar também, que segundo a planta da própria fundição em questão, este setor é pouco ventilado e não possui sistema de exaustão.



**Fig.12.** Concentração média de Pb em urina (Pb-U) e em sangue (Pb-S) e de Cd em urina (Cd-U) no setor de acabamento para os grupos expostos e controle.

No setor de moldagem onde se tem o preparo da areia, onde são confeccionados os machos (peças feitas de areia especial compactada com  $\text{CO}_2$ ) que preenchem os moldes e os próprios moldes, pode-se observar que

Pb-U é significativamente diferente do grupo controle, assim como Cd em urina (Cd-U) cujo t calculado apresentou-se maior que o tabelado. Este setor mostrou um comportamento semelhante ao apresentado quando foi avaliado a população de forma geral.

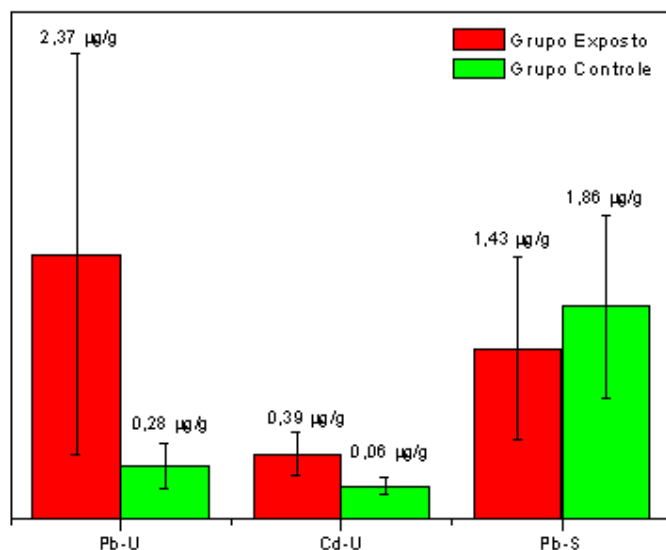


**Fig. 13.** Concentração média de Pb em urina (Pb-U) e em sangue (Pb-S) e de Cd em urina (Cd-U) no setor de moldagem para os grupos expostos e controle.

Todos os setores foram avaliados estatisticamente através do teste t aplicado às médias dos grupos exposto e controle (Tabela 16). O setor de fusão e vazamento, assim como os outros setores também foi avaliado segundo as médias e estas se encontram na Fig. 14. Assim como para o setor de moldagem observa-se Cd-U e Pb-U com diferença significativa entre os grupos, comportamento esse semelhante ao obtido para população geral em estudo.

**Tabela 16.** Teste t aplicado para 95% de confiança para as médias em diferentes setores da fundição.

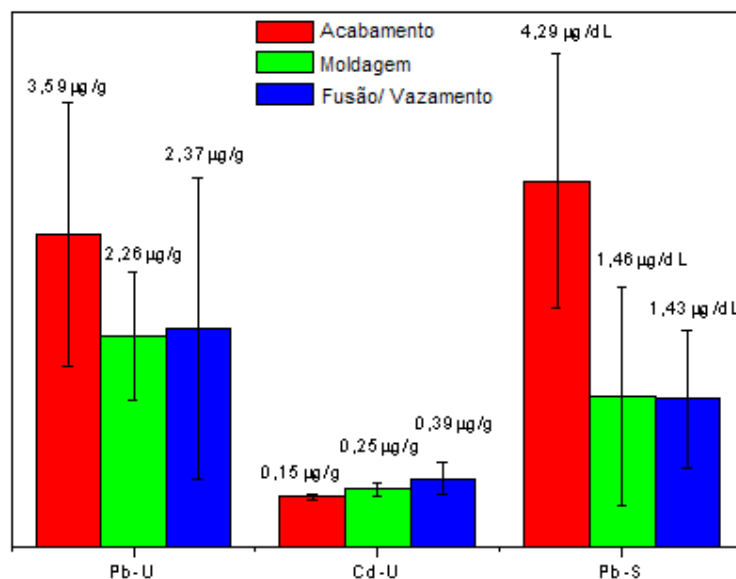
Índice	Acabamento		Moldagem		Fusão	
	$t_{calculado}$	$t_{tabelado}$	$t_{calculado}$	$t_{tabelado}$	$t_{calculado}$	$t_{tabelado}$
<b>Pb-U</b>	4,46	4,30	3,43	2,36	2,35	2,13
<b>Cd-U</b>	0,13	2,30	4,67	2,78	3,27	2,57
<b>Pb-S</b>	2,50	2,23	1,34	2,36	0,70	2,45



**Fig. 14.** Concentração média de Pb em urina (Pb-U) e em sangue (Pb-S) e de Cd em urina (Cd-U) no setor de fusão e vazamento para os grupos expostos e controle.

Também foi avaliada a inter-relação entre os setores para cada índice estudado, com intuito de dentro do grupo de expostos avaliar qual setor estaria sofrendo maior influência destes metais. Na Fig. 15 pode-se perceber que a comparação entre os setores de trabalho para Pb-U mostrou-se estatisticamente significativa entre acabamento e moldagem e acabamento e fusão. Aparentemente o grupo de acabamento é o mais exposto.

Na comparação entre os setores para Cd-U, a diferença foi estatisticamente significativa entre acabamento e moldagem e acabamento e fusão, mas agora é na fusão que o cádmio se apresenta em maiores níveis e pode se supor que a exposição a fumos metálicos contendo Cd aconteça de maneira significativa, sendo um ponto preocupante, uma vez que Cd é um agente carcinogênico conhecido. Na comparação entre os grupos de trabalhadores para Pb-S, assim como para o Pb-U, a diferença foi estatisticamente significativa entre acabamento e moldagem, mostrando que há importante correlação entre estes dois índices e supondo que esta contaminação se dá, aparentemente, em função de exposição recente.



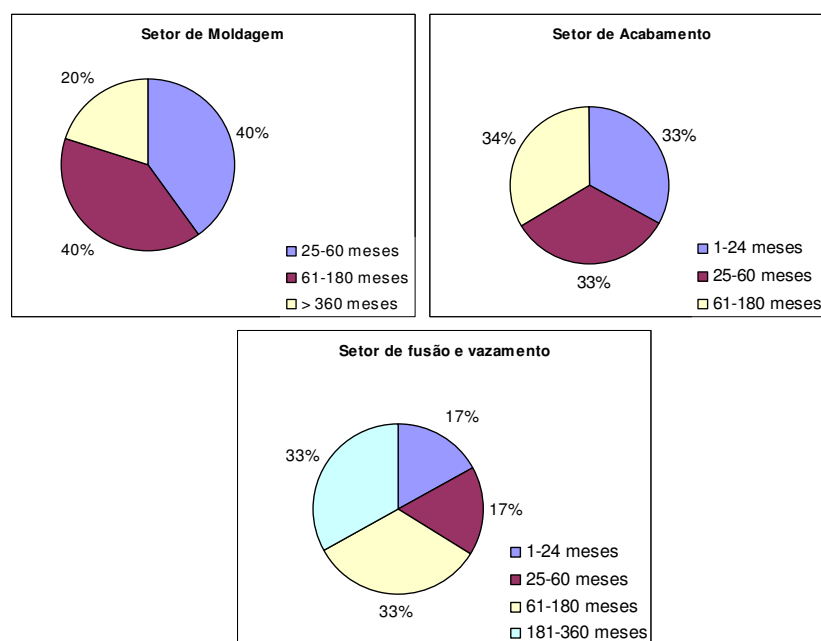
**Fig.15.** Concentração média de Pb em urina (Pb-U) e em sangue (Pb-S) e de Cd em urina (Cd-U) para o grupo exposto correlacionando os diferentes setores da fundição.

É importante ressaltar que para a avaliação do índice Pb-U no setor de acabamento, assim como quando foi feita a avaliação geral, foi necessária a exclusão de três indivíduos que apresentaram concentração de Pb maior que o resto da população, prejudicando a homogeneidade do grupo. As concentrações de Pb encontradas para os três indivíduos, identificados por, A2, A4 e A7, assim como quando coletado, foram  $21,02 \pm 0,45$ ,  $41,15 \pm 0,51$  e  $67,70 \pm 0,02 \mu\text{g g}^{-1}$  de creatinina respectivamente, valores estes abaixo do IBMP estipulado pela legislação, porém altos quando comparados com a maioria do grupo. Resposta para este fato foi buscada nos questionários aplicados aos trabalhadores. Na Fig. 16 têm-se gráficos que relacionam por setores o tempo de exposição, ou seja, tempo de trabalho, nesta fundição.

Para os indivíduos A2 e A7 observou-se serem indivíduos com mais tempo atuando no setor de acabamento, encontrando-se entre os 34% que compõem o gráfico entre 61-180 meses, tendo assim, maior exposição aos metais. Levando em consideração ainda que este setor foi o que apresentou níveis significativos à exposição de Cd e Pb, pode-se então entender que a ventilação deficiente e a total ausência de um sistema de exaustão, tornam maior a exposição para estes funcionários. O indivíduo A4 por sua vez, é o

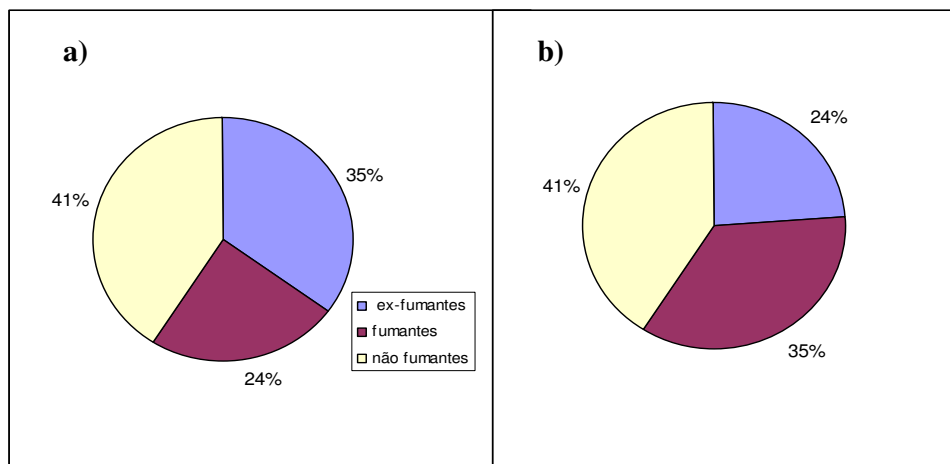
funcionário com menos tempo de vínculo empregatício com a empresa, sendo que outros fatores, como o hábito de fumar e a ingestão de bebidas alcoólicas, também podem explicar tal fato.<sup>61</sup> Porém o Pb é eliminado na urina, quando se tem exposição aguda e recente. O Pb acumula-se com o tempo em tecidos duros, por exemplo, em ossos, podendo-se assim avaliar uma exposição antiga pela análise destes tecidos.<sup>22</sup>

Como o forno fica na área aberta da fundição, têm-se ventilação neste ambiente, não sendo observado índices altos para os funcionários responsáveis pela fusão e vazamento.



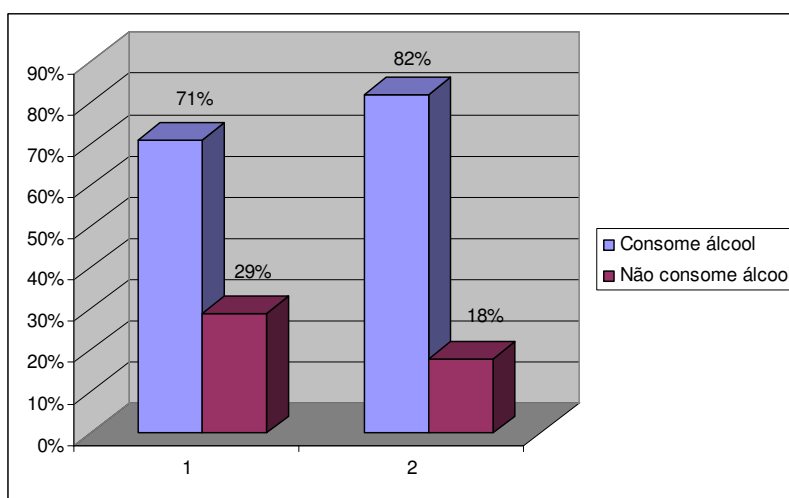
**Fig. 16.** Tempo de exposição por setor da fundição

Na Fig. 17 tem-se o gráfico que distribui as percentagens de fumantes, ex-fumantes e não fumantes, uma vez que o fumo é também considerado uma fonte de exposição.<sup>60</sup> Pode-se observar que a distribuição entre expostos e não expostos a essa fonte é semelhante no número de fumantes, sendo assim, o fumo não seria o fator diferencial, estando os resultados encontrados relacionados à exposição ocupacional.



**Fig.17.** Distribuição do hábito de fumar; a) grupo exposto; b) grupo controle

Na Fig. 18 o consumo de bebida alcoólica é avaliado, sendo que a distribuição entre os que consomem bebidas alcoólicas é relativamente semelhante entre os dois grupos. Para o grupo controle percebe-se uma percentagem maior de pessoas com esse hábito. Os resultados encontrados, no entanto, refletem um caso de exposição no ambiente de trabalho, para o grupo exposto, não sendo os valores encontrados atribuídos ao consumo de álcool.



**Fig.18.** Distribuição quanto ao consumo de álcool; 1) Grupo exposto; 2) Grupo Controle



Tendo em vista a exatidão e acuracidade do método proposto, conclui-se que, mesmo sem nenhum caso de ultrapassagem do limite de tolerância e sem nenhum sintoma relatado, é de extrema importância uma revisão da situação ocupacional da fundição em questão e revisão dos equipamentos de proteção individual (EPIs), principalmente para os indivíduos expostos a poeiras. A exposição ficou evidenciada pela comparação com o grupo controle, sendo que a longo prazo pode ocorrer um quadro grave de intoxicação.

Em estudo semelhante,<sup>7</sup> com uma fundição de metais não-ferrosos, onde avaliou-se a exposição ocupacional antes e depois de modificações realizadas no ambiente de trabalho, foram obtidos níveis muito mais altos de Pb no sangue e Cd em urina, porém o estudo mostra que foram de extrema importância as modificações realizadas, diminuindo os níveis destes metais nos trabalhadores. A empresa em questão no estudo citado apresenta diferenças na forma de funcionamento e na matéria-prima com relação à empresa alvo deste trabalho, não sendo possível estabelecer uma comparação direta entre os resultados obtidos. No entanto, ressalta-se a importância de uma atitude perante os resultados encontrados.

## 5. Conclusões

O procedimento de extração no ponto nuvem para metais usando Triton X-114 como surfactante, e DDTP como complexante mostrou ser uma técnica versátil e simples, para separar e pré-concentrar Cd e Pb em amostras complexas de urina e sangue. A separação de fases ocorre em temperaturas relativamente baixa, resultando em baixos limites de detecção e bons fatores de melhoramento. O uso de modificadores químicos mostrou ser conveniente, permitindo a máxima temperatura de pirólise de 900 °C e 800 °C para Pb e Cd, respectivamente, em ambas as amostras. A otimização multivariada permitiu avaliar as interações entre as concentrações das substâncias componentes do CPE, verificando a majoritária importância do DDTP na eficiência de extração assim como a interação deste com os outros componentes. Calibração externa contra soluções padrão aquosas submetidas à CPE pôde ser aplicada de acordo com os estudos realizados. O método mostrou-se exato uma vez que os resultados obtidos concordam com os valores certificados e boas recuperações foram obtidas para as amostras “reais”.

O método foi usado na investigação de exposição ocupacional com a determinação de indicadores biológicos, Pb e Cd em urina e Pb e sangue, em trabalhadores de uma fundição da cidade de Joinville, SC. O estudo permitiu afirmar que há exposição dos trabalhadores a estes metais, porém não a níveis intoleráveis, pelo menos a curto prazo. Outras fontes de exposição não foram evidenciadas, sendo os níveis de Cd e Pb nos trabalhadores um reflexo da situação ocupacional do ambiente. O estudo sugere que sejam realizadas modificações, como utilização de exaustores nos ambientes menos ventilados da fundição assim como revisão dos equipamentos de proteção individual (EPIs), nas condições de trabalho para garantir a saúde do trabalhador a longo prazo.

## 6. Referências

- [1] B. Isikli, T. A. Demir, T. Akar, A. Berber, S. M. Ürer, C. Kalyoncu, M. Canbek, Cadmium exposure from the cement dust emissions: A field study in a rural residence, **Chemosph.** 63(9), 2006, p.1546.
- [2] FUNDACENTRO, **Relatórios de fundições**, São Paulo, 1999.
- [3] J. T. de Borba,. Análise da eficiência técnica das linhas de produção de blocos e cabeçotes da Tupy Fundições. / José Tavares de Borba, **dissertação de mestrado**, UFSC, 2004.
- [4] C. S. da Silva, L. M. N. Cardoso, **Relatórios de vistoria** da FUNDACENTRO, 2000.
- [5] Site da ABIFA, [www.abifa.org.br](http://www.abifa.org.br), acessado em 19/12/06.
- [6] S. A. Araújo, M. N. Arenales, Dimensionamento de lotes e programação do forno numa fundição automatizada de porte médio. **Pesquisa Operacional**, Rio de Janeiro, v.23, n.3, 2003, p.403.
- [7] C. R. dos Santos; Avaliação dos indicadores biológicos de exposição aos metais em trabalhadores de fundições, **Tese de Doutorado**, USP, 2004.
- [8] M. M. B. Paoliello, P. R. Gutierrez, C. A. Turini, T. Matsuo, L. Mezzaroba, D. S. Barbosa, S. R. Q. Carvalho, A. L. P. Alvarenga, M. I. Rezende, G. A. Figueiroa, V. G. M. Leite, A. C. Gutierrez, B. C. R. Lobo e R. A. Cascales; Valores de referência para plumbemia em população urbana do Sul do Brasil, **Rev. Panam. Salud Publica/ Pan. Am. J. Public Health** 9 (5), 2001, p. 315.
- [9] P. Apostoli, Elements in environmental and occupational medicine, **J. Chromat. B**, 778, 2002, p.63.
- [10] U. C. Araújo, F. R. Pivetta, J. C. Moreira, Avaliação da exposição ocupacional ao chumbo: proposta de uma estratégia de monitoramento para prevenção dos efeitos clínicos e subclínicos; **Cad. de Saúde Pública**, vol. 15, n.1, jan/mar, 1999.
- [11] R. W. dabeka, A.D. McKenzie, G.M.A. Lacroix, **Food Addit Contam.** 4, 1987, p. 89.
- [12] Yu-Hsiang Sung, Shang-Da Huang, On-line preconcentration system coupled to electrothermal atomic absorption spectrometry for the

- simultaneous determination of bismuth, cadmium and lead in urine, **Anal. Chim. Acta** 495, 2003, p. 165.
- [13] T. S. Schifer, S. B. Junior, M.A.E. Montano, Aspectos toxicológicos do chumbo, **Infarma**, v.17, nº 5/6, 2005, p. 67.
- [14] Ping-Chi Hsu, Y. L. Guo, Antioxidant nutrients and lead toxicity, **Toxicology** 180, 2002, p.33.
- [15] M. M. B. Paoliello, A.A.M. Chasin, **Ecotoxicologia do chumbo e seus compostos**, Salvador: CRA, 2001, p. 144.
- [16] S. Schvartsman, **Intoxicações agudas**, 3ª ed. São Paulo: Sarvier, 1985 p.241.
- [17] S. L. Quitério, Uso de poeira e do ar como indicadores de contaminação ambiental em áreas circunvinzinhas a uma fonte de emissão estacionária de chumbo. **Cad. de Saúde Pública**, vol. 17, 2001, p.501.
- [18] L. Larini; P. E. T. Salgado; J. S. Lepera; **Toxicologia**, 3ªEd. São Paulo: Manole, 1997.
- [19] H. V. Della Rosa; M.E.P.B. Siqueira; S. Colacioppo; **Monitorização ambiental e biológica: Fundamentos de toxicologia**, 2ªEd. São Paulo: Atheneu, 2003.
- [20] R. Cordeiro; E.C.Lima Filho, A in adequação dos valores limites de tolerância biológica para a prevenção da intoxicação profissional pelo chumbo no Brasil. **Cad. de Saúde Pública** v.11, 1995, p.177.
- [21] F. Barbosa Jr., J. E. Tanus-Santos, R. F. Gerlach, P.J. Parsons; A critical review of biomarkers used for monitoring human exposure to lead: Advantages, limitations and future needs, **Environm. Health Perspectives**, 113 (12), 2005, p. 1669.
- [22] M. Sadão, Intoxicação por Chumbo, **Rev. de Oxidologia**, Jan/Fev/Mar 2002, p.37.
- [23] R. Cordeiro, Distúrbios neurológicos em trabalhadores com baixos níveis de chumbo no sangue, II-Disfunções neurocomportamentais. **Rev. Saúde Pública**, v.30(4), 1996b, p. 358.
- [24] M. Castelli, B. Rossi, F. Corsetti, A. Mantovani, G. Spera, C. Lubrano, L. Silvestroni, M. Patriarca, F. Chiodo, A. Menditto, Levels of cadmium and lead in blood: an application of validated methods in a group of patients

- with endocrine/metabolic disorders from the Rome area, **Microchem. J.** 79, 2005, p. 349.
- [25] M. Yaman, Determination of cadmium and lead in human urine by STAT-F AAS after enrichment on activated carbon, **J. Anal. At. Spectrom.** 14 (2), 1999, p. 275.
- [26] Site da Agency for Toxic substances and Disease Registry (ATSDR); [www.atsdr.cdc.gov](http://www.atsdr.cdc.gov) , acessado em 20/12/2006.
- [27] G. H. Tao; Z. L. Fang; Fresenius **J. Anal. Chem.**, 360, 1998, p. 156.
- [28] M. A. M. Da Silva, Determinação de elementos traço por AAS e ICP-MS após extração no ponto nuvem, usando dietil-ditiofosfato como agente quelante, **tese de doutorado**, UFSC, 2001.
- [29] A. Sanz-Medel, M.D.R. F. de la Campa, E. B. Gonzalez, L.Fernandez-Sanchez, Organised surfactant assemblies in analytical atomic spectrometry, **Spectrochimica Acta Part B**, 54, 1999, p. 251.
- [30] B. Moreno Cordero, J. L. Pérez Pávon e J. H. Méndez; Detection of slightly soluble systems by means of organized media in flow-injection analysis, **Anal. Chim. Acta.**, 234, 1990, p.239.
- [31] G. L. McIntire, Micelles in analytical chemistry, **Crit. Rev. Anal. Chem.**, 21, 1990, p.257.
- [32] E. Pramauro e E. Pellizzetti; The effect of surface-active compounds on chemical process occurring in aquatic environments, **Colloids Surfaces**, 48, 1990, p. 193.
- [33] M. A. M. da Silva, V. L. A. Frescura, A. J. Curtius, Determination of noble metals in biological samples by electrothermal vaporization inductively coupled plasma mass spectrometry, following cloud point extraction, **Spectrochimica Acta Part B** 56, 2001, p. 194.
- [34] F. H. Quina, W.L. Hinze, Surfactant- mediated cloud point extractions: An environmental benign alternative separation approach, **Ind. Eng. Chem. Res.** 38, 1999, p. 4150.
- [35] M. A. Bezerra, R.E. Bruns and S.L.C. Ferreira, Statistical design-principal component analysis optimization of a multiple response procedure using cloud point extraction and simultaneous determination of metals by ICP OES. **Anal. Chim. Acta** 580, 2006, p. 251.

- [36] J. L. Manzoori, G. Karim- Nezhad, Development of a cloud point extraction and preconcentration method for Cd and Ni prior to flame atomic absorption spectrometric determination. **Anal. Chim. Acta** 521, 2004, p. 173.
- [37] Y.J. Li, B. Hu and Z.C. Jiang, On-line cloud point extraction combined with electrothermal vaporization inductively coupled plasma atomic emission spectrometry for the speciation of inorganic antimony in environmental and biological samples. **Anal. Chim. Acta** 576, 2006, p. 207.
- [38] A. Afkhami, T. Madrakian and H. Siampour, Cloud point extraction spectrophotometric determination of trace quantities of bismuth in urine. **J. Braz. Chem. Soc.** 17, 2006, p. 797.
- [39] C. García Pinto, J.L. Pérez Pavón, B. Moreno Cordero, Cloud point preconcentration and high-performance liquid-chromatographic determination of organophosphorous pesticides with dual electrochemical detection, **Anal. Chem.** 67, 1995, p. 2606.
- [40] S. R. Sirimanne, D.G. Patterson, L. Ma, J. B. Justice, Application of cloud point extraction-reverse-phase high-performance liquid chromatography-a preliminary study of the extraction and quantification of vitamins A and E in human serum and whole blood, **J. Chromatogr. B** 716 , 1998, p. 129.
- [41] M. D. Rukhadze, S. K. Tsagareli, N. S. Sidamonidze, V. R. Meyer, Cloud-point extraction for the determination of free fraction of antiepileptic drugs in blood plasma and saliva, **Anal. Biochem.** 287, 2000, p. 279.
- [42] T. Saitho, W. L. Hinze, Use of surfactant-mediated phase separation (cloud point extraction) with affinity ligands for the extraction of hydrophilic proteins, **Talanta** 42, 1995, p. 119.
- [43] S. E. Friberg, B. Lindman, Organized solutions surfactant in science and technology, vol.44, Marcel Dekker, Nova York, USA, 1992.
- [44] M. A. M. da Silva; V. L. A. Frescura; A. J. Curtius; Determination of trace elements in water samples by ultrasonic nebulization inductively coupled plasma mass spectrometry after cloud point extraction, **Spectrochim. Acta Part B**, 55, 2000, p. 803.
- [45] T. A. Maranhão, D. L. G. Borges, M.A.M.S. da Veiga, A.J. Curtius, Cloud point extraction for the determination of cadmium and lead in biological

- samples by graphite furnace atomic absorption spectrometry, **Spectrochim. Acta Part B**, 60, 2005, p. 667.
- [46] Z. S. Ferrera; C. P. Sanz; C. M. Santana, J. J. S. Rodríguez; The use of micellar systems in the extraction and pré-concentration of organic pollutants in environmental samples, **Tr. in Anal. Chem.**, 23, 7, 2004, p. 479.
- [47] M. G. A. Korn, J. B. de Andrade, D. S. de Jesus, V. A. Lemos, M. L. S. F. Bandeira, W. N. L. dos Santos, M. A. Bezerra, F. A. C. Amorim, A. S. Souza, S. L. C. Ferreira, Separation and preconcentration procedures for the determination of lead using spectrometric techniques: A review. **Talanta**, 69, 2006, p. 16.
- [48] J. Chen, K.C. Teo, Determination of cobalt and nickel in water samples by flame atomic absorption spectrometry after cloud point extraction, **Anal. Chim. Acta**, 434, 2001, p. 325.
- [49] E. K. Paleologos, D.L.Giokas, S. M. Tzouwara-Karayanni, M.I. Karayannis, Micelle mediated methodology for the determination of free and bound iron in wines by flame atomic absorption spectrometry, **Anal. Chim. Acta**, 458, 2002, p. 241.
- [50] M.O. Luconi, M. F. Silva, R. A. Olsina, L. P. Fernández, Cloud point extraction of lead in saliva via use of nonionic PONPE 7.5 without added chelating agents. **Talanta**, 51, 2000, p. 123.
- [51] D. L. G. Borges, M. A. M. S. da Veiga, V. L. A. Frescura, B. Welz and A. Curtius, Cloud point extraction for the determination of Cd, Pb and Pd in blood by electrothermal atomic absorption spectrometry, using Ir or Ru as permanent modifiers, **J. Anal. At. Spectrom.**, 18, 2003, p. 501.
- [52] B. Welz, Electrothermal Atomization, In: B. Welz, M. Sperling, **Atomic Absorption Spectrometry**, Wiley, Weinheim, 1999, p. 170.
- [53] N. Aslan, Y. Cebeci, Application of Box-Behnken design and response surface methodology for modeling of some Turkish coals, **Fuel** 86, 2007, p. 90.
- [54] A. S. Souza, W. N. L. dos Santos, S. L. C. Ferreira, Application of Box-Behnken design in the optimization of an on-line pre-concentration

- system using knotted reactor for cadmium determination by flame atomic absorption spectrometry, **Spectrochim. Acta Part B** 60, 2005, p. 737.
- [55] R. Ragonese, M. Macka, J. Hughes, P. Petocz, The use of the Box-Behnken experimental design in the optimization and robustness testing of capillary electrophoresis method for the analysis of ethambutol hydrochloride in pharmaceutical formulation, **J. of Pharm. And Biomed. Anal.** 27, 2002, p. 995
- [56] M. Preu, D. Guyot, M. Petz, Development of a gás chromatography mass spectrometry method for the analysis of aminoglycoside antibiotics using experimental design for the optimization of the derivatisation reactions, **J. Chromat. A** 818, 1998, p.95.
- [57] P. J. Parsons, W. Slavin, A rapid Zeeman graphite furnace atomic absorption spectrometric method for the determination of lead in blood, **Spectrochim. Acta Part B**, 48, 6-7, 1993, p. 925.
- [58] B. B. Neto, I. S. Scarminio, R. E. Bruns, **Como fazer experimentos**, 2<sup>a</sup> Ed. São Paulo: Unicamp, 2003.
- [59] D. Andrada, F. G. Pinto, C. G. Magalhães, B.R. Nunes, M. B. Franco, J. B. B. da Silva, Direct determination of lead in human urine and serum samples by electrothermal atomic absorption spectrometry and permanent modifiers, **J. Braz. Chem. Soc.**, vol.17, n. 2, 2006, p.328.
- [60] P.R. M. Correia, C.S. Nomura, P. V. Oliveira, Multielement determination of cadmium and lead in urine by simultaneous electrothermal atomic absorption spectrometry with an end-capped graphite tube, **Anal. Sciences**, vol.19, 2003, p. 1519.
- [61] F. R. Moreira, J. C. Moreira, A cinética do chumbo no organismo humano e sua importância para a saúde, **Ciência Saúde Coletiva**, v.9, n.1, Rio de Janeiro, 2004.



# **Anexos**

## Questionário

Amostra n<sup>o</sup>: \_\_\_\_\_

### I. Identificação

1. Nome: \_\_\_\_\_
2. Nascimento: \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_\_\_ Peso: \_\_\_Kg Altura: \_\_\_\_\_
3. Endereço: \_\_\_\_\_
4. Até que série estudou? \_\_\_\_\_
5. Área de trabalho: \_\_\_\_\_

### II. Sobre seu trabalho

1. Quantas horas trabalha por dia? \_\_\_\_\_
2. Quantas vezes por semana você trabalha neste setor?  
( ) 1 ( ) 2 ( ) 3 ( ) 4 ( ) Todos os dias
3. Há quanto tempo tem este emprego? \_\_\_\_\_
4. Tem algum outro emprego ou bico? ( ) sim ( ) não  
Se sim, o que faz? \_\_\_\_\_
5. Qual a profissão anterior? \_\_\_\_\_

### III. Hábitos pessoais

1. Fuma? ( ) sim ( ) não ( ) Parei de fumar Há quantos anos? \_\_\_\_\_ Quantos cigarros por dia? \_\_\_\_\_ Há quantos anos? \_\_\_\_\_
2. Bebidas alcoólicas ( ) sim ( ) não  
Qual bebida? \_\_\_\_\_ Quanto por dia? \_\_\_\_\_ doses
2. Alimentação  
Frango, Quantas vezes por semana? \_\_\_\_\_  
Carne, Quantas vezes por semana? \_\_\_\_\_  
Peixe, Quantas vezes por semana? \_\_\_\_\_
4. Medicamentos ( ) sim ( ) não Qual (is)? \_\_\_\_\_  
Quantas vezes por semana? \_\_\_\_\_  
Complexos vitamínicos ( ) sim ( ) não Qual (is)? \_\_\_\_\_  
Quantas vezes por semana? \_\_\_\_\_
5. Alguma doença crônica? \_\_\_\_\_ Qual? \_\_\_\_\_

## Termo de Consentimento



### Universidade Federal de Santa Catarina

*Departamento de Química*

*Departamento de Patologia*

#### TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

---

#### I – DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DO SUJEITO DA PESQUISA OU LEGAL RESPONSÁVEL

---

1. Nome do Paciente:.....  
Responsável Legal:.....  
Documento de Identidade Nº :.....Sexo: ( )M ( )F  
Data de Nascimento:...../...../.....  
Endereço:.....Nº:.....Apto:.....  
Bairro:.....Cidade:.....  
CEP:.....Telefone:.....

---

#### II – DADOS SOBRE A PESQUISA

- Título do Protocolo de Pesquisa:** Avaliação dos Indicadores Biológicos de Exposição aos metais em trabalhadores de fundições do Estado de Santa Catarina.
- Pesquisador Principal:** Tatiane de Andrade Maranhão  
**Cargo/Função:** Química  
**Departamento da UFSC:** Departamento de Química  
**Pesquisador Responsável:** Cláudia Regina dos Santos  
**Cargo/Função:** Farmacêutica-Bioquímica  
**Departamento da UFSC:** Departamento de Patologia
- Duração da Pesquisa:** 2 anos

---

#### III – REGISTRO DAS EXPLICAÇÕES DO PESQUISADOR AO PACIENTE OU SEU

##### REPRESENTANTE LEGAL SOBRE A PESQUISA, CONSIGNANDO:

- Este estudo tem como objetivo determinar a quantidade de metais (chumbo, cádmio e cromo) presentes em fluidos biológicos (sangue e urina), uma vez que estes metais fazem parte da liga utilizada nesta fundição. Permitindo avaliar o risco ao qual o Sr. está diariamente exposto, e ainda se a condição de trabalho está ou não adequada. Esclarecemos ainda que esta amostra terá a

finalidade de avaliar somente os itens descritos acima, não sendo, portanto utilizada para análise de outras substâncias.

2. Aceitando participar deste estudo, será coletada de sua pessoa uma amostra de urina (100mL) e outra de sangue (5mL), ou por ventura uma segunda amostra se for necessária nova avaliação. Ainda, no dia da coleta de sua amostra você preencherá um questionário que tem por objetivo conhecer um pouco de seus hábitos, seu estado de saúde ou o uso de medicamentos que possam interferir na análise.
3. A coleta será realizada por profissional qualificado, utilizando material descartável, seguindo os procedimentos de assepsia adequados, garantindo assim a sua integridade física, desta forma o único desconforto previsto será aquele relacionado a coleta de amostra de sangue, por necessariamente exigir que exista uma picada para retirada dos 5mL de sangue necessários.
4. Através deste estudo pretende-se avaliar as condições de trabalho e se necessário, sugerir a implementação de mudanças coletivas e individuais, para que se necessário após uma segunda avaliação seja possível assegurar que a sua condição de trabalho não implica em riscos para sua saúde.
5. Todas as análises serão realizadas, de modo a não representar nenhum custo financeiro, para você ou sua empresa.

---

#### **IV – ESCLARECIMENTOS DADOS PELO PESQUISADOR SOBRE GARANTIAS DO SUJEITO DA PESQUISA**

1. Você tem assegurado o direito de a qualquer momento do estudo solicitar informações esclarecedoras sobre o andamento dos procedimentos, bem como dos eventuais riscos e benefícios relacionados a sua participação neste estudo. Desta forma, como Pesquisador principal eu, Tatiane de Andrade Maranhão e Pesquisador Responsável, Claudia Regina dos Santos, colocamo-nos a disposição para quaisquer dúvidas que necessitem esclarecimento, relacionadas a este projeto.
2. Fica assegurado que a sua posição no seu emprego não será prejudicada, independente de você decidir ou não pela participação neste projeto, bem como do resultado da avaliação da condição de trabalho.
3. Fica assegurado ainda a confidencialidade de sua identidade, bem como sigilo dos resultados obtidos, garantindo assim sua privacidade. Os resultados do estudo serão publicados sem revelar sua identidade, entretanto estarão disponíveis para consulta pela equipe envolvida no projeto, e pelo Comitê de Ética.
4. Fica assegurado também que no caso de eventual intercorrência no momento da coleta, o Sr. receberá tratamento adequado e será monitorado até que sua condição de saúde se restabeleça. (Não são esperados problemas deste tipo, no entanto é importante garantir assistência no caso de qualquer intercorrência relacionada ao projeto).

---

**V – INFORMAÇÕES DE NOMES, ENDEREÇOS E TELEFONES DOS RESPONSÁVEIS PELO ACOMPANHAMENTO DA PESQUISA, PARA CONTATO EM CASO DE INTERCORRÊNCIAS CLÍNICAS E REAÇÕES ADVERSAS.**

**Pesquisador Responsável: Claudia Regina dos Santos**

**Pesquisador Principal: Tatiane de Andrade Maranhão**

Telefone de contato: (48) 3331-5069 ou (48) 3331-6841

---

**VII – CONSENTIMENTO PÓS-ESCLARECIDO**

Declaro que, após convenientemente esclarecido pelo pesquisador e ter entendido o que me foi explicado, consinto em participar do presente Protocolo de Pesquisa.

\_\_\_\_\_, \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_.

\_\_\_\_\_  
Assinatura do sujeito de pesquisa

ou responsável legal

\_\_\_\_\_  
Assinatura do pesquisador

(carimbo ou nome legível)

# Cloud point extraction for the determination of lead and cadmium in urine by graphite furnace atomic absorption spectrometry with multivariate optimization using Box–Behnken design <sup>☆</sup>

Tatiane de A. Maranhão <sup>a</sup>, Edmar Martendal <sup>a</sup>, Daniel L.G. Borges <sup>a</sup>, Eduardo Carasek <sup>a</sup>, Bernhard Welz <sup>a,b</sup>, Adilson J. Curtius <sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Departamento de Química, Universidade Federal de Santa Catarina, 88040-900, Florianópolis, SC, Brazil

<sup>b</sup> Grupo de Pesquisa em Química Analítica, Instituto de Química, Universidade Federal da Bahia, 40170-290, Salvador, BA, Brazil

Received 8 January 2007; accepted 31 May 2007

Available online 7 June 2007

## Abstract

Cloud point extraction (CPE) is proposed as a pre-concentration procedure for the determination of Pb and Cd in undigested urine by graphite furnace atomic absorption spectrometry (GF AAS). Aliquots of 0.5 mL urine were acidified with HCl and the chelating agent ammonium *O,O*-diethyl dithiophosphate (DDTP) was added along with the non-ionic surfactant Triton X-114 at the optimized concentrations. Phase separation was achieved by heating the mixture to 50 °C for 15 min. The surfactant-rich phase was analyzed by GF AAS, employing the optimized pyrolysis temperatures of 900 °C for Pb and 800 °C for Cd, using a graphite tube with a platform treated with 500 µg Ru as permanent modifier. The reagent concentrations for CPE (HCl, DDTP and Triton X-114) were optimized using a Box–Behnken design. The response surfaces and the optimum values were very similar for aqueous solutions and for the urine samples, demonstrating that aqueous standards submitted to CPE could be used for calibration. Detection limits of 40 and 2 ng L<sup>-1</sup> for Pb and Cd, respectively, were obtained along with an enhancement factor of 16 for both analytes. Three control urine samples were analyzed using this approach, and good agreement was obtained at a 95% statistical confidence level between the certified and determined values. Five real samples have also been analyzed before and after spiking with Pb and Cd, resulting in recoveries ranging from 97 to 118%.

© 2007 Elsevier B.V. All rights reserved.

**Keywords:** Cloud point extraction; Graphite furnace atomic absorption spectrometry; Urine; Cadmium determination; Lead determination; Permanent modifier

## 1. Introduction

Monitoring the presence of toxic trace elements in biological fluids is an extremely important task to evaluate occupational and environmental exposure. Cadmium and lead are frequently referred to as hazardous elements. Elevated Cd concentrations in urine represent long-term exposure and significant accumulation, particularly in the kidneys and liver [1], while elevated

Pb concentration in urine is associated with recently absorbed amounts [2].

Monitoring trace element concentrations in biological materials, particularly biological fluids, might be considered a difficult analytical task, mostly due to the complexity of the matrix and the low concentration of these elements, which requires sensitive instrumental techniques and often a pre-concentration step. The traditional liquid–liquid extraction and other conventional separation methods are time-consuming and labor-intensive approaches, besides requiring relatively large amounts of high-purity and frequently toxic solvents, which have to be disposed off properly. Cloud point extraction (CPE) is based on the phase behavior of non-ionic surfactants in aqueous solutions, which exhibit phase separation after an increase in temperature or the addition of a salting-out agent

<sup>☆</sup> This paper was presented at the 9th Rio Symposium on Atomic Spectrometry, held in Barquisimeto, Venezuela, 5–10 November 2006, and is published in the special issue of Spectrochimica Acta Part B, dedicated to that conference.

\* Corresponding author. Fax: +55 48 3331 6850.

E-mail address: [curtius@qmc.ufsc.br](mailto:curtius@qmc.ufsc.br) (A.J. Curtius).

[3,4]. CPE might be an interesting and efficient alternative, once it eliminates or reduces consumption of organic solvents significantly. Trace elements can be extracted to the surfactant-rich phase usually after formation of a hydrophobic complex with an appropriate chelating agent [5]. This approach has been successfully employed to extract and pre-concentrate several trace elements from a variety of matrices [6–9], including biological samples [10,11].

Method development for CPE requires the optimization of several experimental parameters, such as pH and the concentrations of chelating agent and surfactant. Traditional univariate optimization might be a time-consuming and labor-intensive procedure, requiring several experiments to be performed and neglecting possible interactions between variables. Multivariate optimization appears to be a more interesting and complete alternative, allowing maximum information to be obtained due to the possibility of evaluating interactions between variables. It also represents a more economical approach, as the number of experiments can be significantly reduced. One of the possibilities is to use a Box–Behnken design, in which the number of experiments ( $N$ ) is defined by the equation  $N = k^2 + k + c_p$ , where  $k$  represents the number of factors (parameters) involved in the study and  $c_p$  is the number of replicates of the central point. Box–Behnken could be seen as a cube, consisting of a central point and the middle points of the edges. However, it can also be viewed as interlocking  $2^2$  factorial design and a central point [12]. The use of Box–Behnken design has become of increasing interest in the field of analytical chemistry, with application to on-line pre-concentration systems [12], coal modeling [13], capillary electrophoresis [14] and gas chromatography [15], among others.

In this work, a CPE procedure using Triton X-114 as non-ionic surfactant and *O,O*-diethyl dithiophosphate (DDTP) as chelating agent was developed for the extraction of Cd and Pb from undigested urine samples and their determination by graphite furnace atomic absorption spectrometry (GF AAS). The optimization of the experimental variables (concentration of HCl, DDTP and Triton X-114) for the CPE will be described using a Box–Behnken design with three variables.

## 2. Experimental

### 2.1. Instrumentation

All measurements were carried out using an AAnalyst 100 atomic absorption spectrometer (Perkin Elmer, Norwalk, CT, USA), equipped with an HGA 800 longitudinally heated graphite tube atomizer and an AS-72 autosampler (Perkin Elmer). Deuterium-arc background correction was employed to correct for non-specific absorption. All measurements were performed using integrated absorbance (peak area). Hollow cathode lamps for Cd and Pb (Perkin Elmer) were operated at 4 mA and 10 mA, respectively, with a spectral bandwidth of 0.7 nm. The selected wavelengths were 228.8 nm and 283.3 nm for Cd and Pb, respectively. Aliquots of 20  $\mu$ L of all samples and calibration solutions were injected directly into the graphite tube. Argon 99.996% (White Martins, São Paulo, SP, Brazil)

was used as protective and purge gas. Pyrolytic graphite coated polycrystalline electrographite tubes with total pyrolytic graphite platforms (Perkin Elmer) were used throughout. The graphite furnace temperature program for the determination of both analytes is shown in Table 1.

### 2.2. Reagents, standards and reference materials

All chemicals were at least of analytical-reagent grade. Water was de-ionized in a Milli-Q system (Millipore, Bedford, MA, USA) to a resistivity of 18.2 M $\Omega$  cm. Hydrochloric acid (Merck, Darmstadt, Germany), methanol (Carlo Erba, Milan, Italy) and nitric acid (Carlo Erba) were further purified by double sub-boiling distillation in a quartz still (Kürner Analysentechnik, Rosenheim, Germany). Ammonium *O,O*-diethyl dithiophosphate (DDTP, Aldrich Chemical Co., Milwaukee, WI, USA) and octylphenoxypolyethoxyethanol (Triton X-114, Sigma, St Louis, MO, USA) were used as supplied. Stock standard solutions containing 1000 mg L<sup>-1</sup> Pb and Cd were prepared by dissolution of high purity Pb(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> and CdO (SPEX, Eddison, NJ, USA), respectively, in 5% v/v HNO<sub>3</sub>.

Three urine control samples were used for accuracy check, including Metalle U level 1 and level 2 Human Urine Control (Medichem, Steinenbronn, Germany) and Seronorm Trace Elements in Urine (Sero AS, Billingstad, Norway).

### 2.3. Treatment of platforms with permanent modifiers

The permanent modifier (Ru or Pd) was applied to the platform by 20 consecutive injections of 25- $\mu$ L aliquots of a 1000 mg L<sup>-1</sup> Ru or Pd solution into the graphite furnace; each injection was followed by a specific temperature program, as described previously [16]. The procedure resulted in the deposition of 500  $\mu$ g of the modifier onto the platform surface.

### 2.4. CPE procedure

Urine control samples were reconstituted with exactly 5.0 mL of de-ionized water and left to stand for about 30 min. Aliquots of the reconstituted samples were directly submitted to the CPE procedure. The pre-concentration procedure started with the addition of HCl at the optimized concentrations, 0.3 mol L<sup>-1</sup> for Pb or 0.5 mol L<sup>-1</sup> for Cd, to aliquots containing between 25 and 100  $\mu$ L of the reconstituted

Table 1  
Temperature program for the determination of Cd and Pb in urine samples by GF AAS following CPE

Stage	Temperature/°C	Ramp/s	Hold/s	Ar flow rate/mL min <sup>-1</sup>
Drying	80	5	10	250
Drying	110	5	10	250
Pyrolysis	800 <sup>a</sup> , 900 <sup>b</sup>	5	25	250
Cooling	20	1	5	250
Atomization	1600 <sup>a</sup> , 1800 <sup>b</sup>	0	5	0
Cleanout	2200	1	5	250

<sup>a</sup> Temperature for Cd.

<sup>b</sup> Temperature for Pb.

sample, depending on the analyte concentration, in 15-mL polypropylene flasks (Techno Plastic Products AG, Trasadingen, Switzerland). A stock solution containing 5% m/v DDTP was prepared in de-ionized water, and the ligand was added to the samples until the optimum concentration, 0.7% m/v for Pb or 1.00% m/v for Cd, was obtained. The optimized Triton X-114 concentration, 0.40% m/v for Pb or 0.50% m/v for Cd, was added to each mixture and the volume was completed to 14 mL with de-ionized water. The resulting solution was heated to 50 °C in a water bath for 20 min. Phase separation was accelerated by centrifuging the tubes at 3500 rpm for 20 min. The flasks were immersed in an ice bath for 10 min, allowing the elimination of the aqueous phase by simply inverting the tubes. Any residual water was removed using a Pasteur pipette. To reduce the viscosity of the surfactant phase prior to GF AAS analysis, 500  $\mu$ L of methanol acidified with 0.1 mol L<sup>-1</sup> HNO<sub>3</sub> was added to the extract. Twenty-microliter aliquots of the resulting solution were directly injected into the graphite tube by means of the autosampler and submitted to the temperature program shown in Table 1. Real urine samples obtained from non-exposed volunteers have also been analyzed without prior digestion. In this case, 500- $\mu$ L aliquots have been submitted to the same CPE procedure as described above. Spike recovery tests were also carried out. In all cases, calibration was performed by submitting aqueous standard solutions of Cd and Pb to the same CPE procedure as described for the urine samples.

### 2.5. Optimization strategy

First, the optimization of CPE components has been evaluated by a two-level factorial design with a central point. Afterwards, the response surface methodology with the Box–Behnken design, involving the variables concentration of HCl, concentration of DDTP and concentration of Triton X-114, has been carried out. The analytical response used has been the integrated absorbance. Experimental data have been evaluated using the software Statistica 6.0. Both experimental designs have been carried out using duplicate measurements.

## 3. Results and discussion

### 3.1. Pyrolysis and atomization curves

Pyrolysis and atomization curves were established using one of the urine samples enriched with Cd (0.05  $\mu$ g L<sup>-1</sup>) and Pb (1  $\mu$ g L<sup>-1</sup>) and submitted to CPE. Aliquots containing 20  $\mu$ L of the final extract in methanol were used for GF AAS analysis.

Pyrolysis temperatures below 600 °C resulted in significantly lower precision, as the matrix could not be eliminated, resulting in a high background signal that could not be efficiently corrected by the deuterium background corrector. Fig. 1a shows the pyrolysis and atomization curves for Pb in urine submitted to CPE. Three modifiers have been tested in this study: 500  $\mu$ g Ru as permanent modifier, 500  $\mu$ g Pd as permanent modifier [17], and the addition of 10  $\mu$ g Pd in solution along with each sample injection. As can be seen in

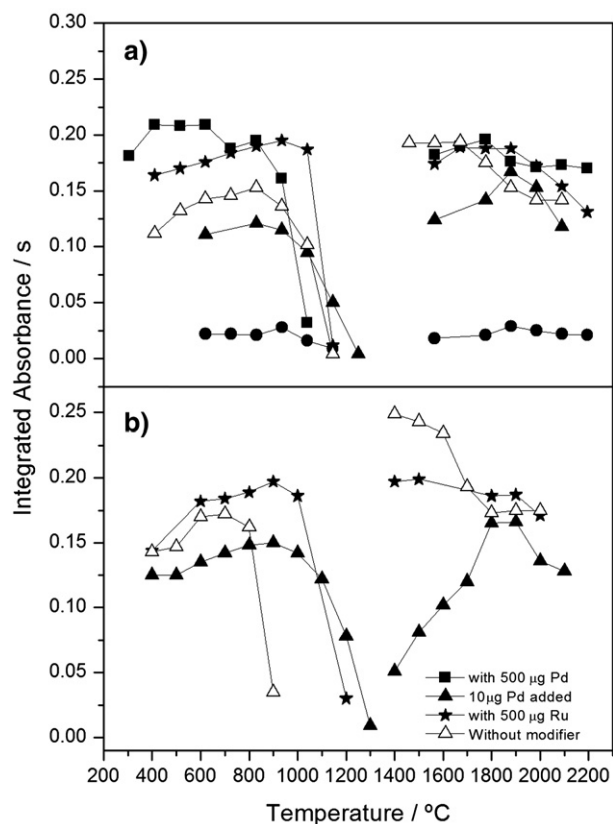


Fig. 1. Pyrolysis and atomization curves for Pb obtained after cloud point extraction from: (a) urine sample enriched with 1.0  $\mu$ g L<sup>-1</sup> Pb, and (b) aqueous solution containing 1.0  $\mu$ g L<sup>-1</sup> Pb. Atomization temperature employed for pyrolysis curves: 1800 °C; pyrolysis temperature employed for atomization curves: 800 °C.

Fig. 1a, significant thermal stabilization was achieved even without the use of a modifier, as a pyrolysis temperature of 800 °C could be used without analyte loss. This is most likely due to the presence of high levels of phosphate in urine and to the added DDTP, which can both act as chemical modifiers as reported previously [11]. The addition of Pd in solution to each sample injection resulted in the formation of a precipitate in the autosampler capillary tip, which was due to urine constituents. In addition, the use of Pd in solution did not result in significant thermal stabilization compared to the use of no modifier, as can be seen in Fig. 1a. Similarly, the use of a graphite tube treated with Pd as a permanent modifier was of no advantage either, as the thermal stability was essentially the same as without modifier. The best results were obtained using Ru as a permanent modifier, which allowed a pyrolysis temperature of up to 1000 °C to be used without analyte loss. Under these conditions, an almost background-free signal could be obtained, improving precision. An atomization temperature of 1800 °C was chosen based on the curve profile shown in Fig. 1a.

A similar evaluation was carried out using an aqueous solution submitted to CPE, and the results are shown in Fig. 1b. Although the use of Pd in solution in this case obviously did not result in the formation of precipitates, and relatively high thermal stabilization could be achieved, the use of a Ru-treated



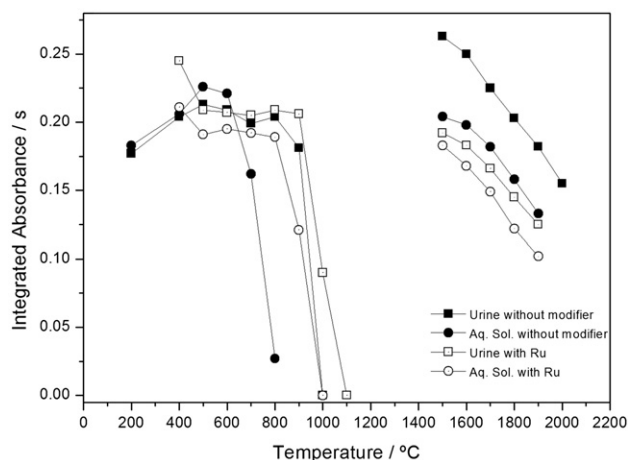


Fig. 2. Pyrolysis and atomization curves for Cd in enriched urine sample and in aqueous solution submitted to cloud point extraction ( $0.05 \mu\text{g L}^{-1}$  Cd). Atomization temperature employed for pyrolysis curves:  $1600^\circ\text{C}$ ; pyrolysis temperature employed for atomization curves:  $600^\circ\text{C}$  (without modifier) or  $800^\circ\text{C}$  (with Ru permanent modifier).

tube resulted in higher sensitivity and also in good thermal stabilization, similar to that observed for Pb in the urine sample submitted to CPE. Ruthenium as permanent modifier was therefore chosen for the determination of Pb in urine samples after CPE with a pyrolysis temperature of  $900^\circ\text{C}$ .

Pyrolysis and atomization curves for Cd have been established in the same manner as described above for Pb, except that Ru as a permanent modifier was the only modifier tested for an aqueous solution and a urine sample submitted to CPE, as shown in Fig. 2. The use of Ru as a permanent modifier for Cd determination has already proved to be efficient in previous works [18–20]. The effect of the matrix on the thermal stabilization of Cd was particularly pronounced, as without a modifier a pyrolysis temperature of up to  $900^\circ\text{C}$  could be used for urine samples, which is quite unusual for Cd. In an aqueous solution submitted to CPE, however, a significant loss of Cd was observed already at a pyrolysis temperature of  $700^\circ\text{C}$ , demonstrating that the components of the urine matrix are in fact responsible for the thermal stabilization of Cd up to an additional  $200^\circ\text{C}$ . DDTP is also responsible for the thermal stabilization of Cd, as in an aqueous solution significant losses can be detected already at pyrolysis temperatures above  $300^\circ\text{C}$ , while for Cd submitted to CPE significant losses occur only above  $600^\circ\text{C}$ , i.e., with  $300^\circ\text{C}$  gain in thermal stability. The use of Ru as a permanent modifier allowed pyrolysis temperatures of up to  $1000^\circ\text{C}$  and  $900^\circ\text{C}$  to be used for Cd in the urine sample and in aqueous solution submitted to CPE, respectively. As a compromise, a pyrolysis temperature of  $800^\circ\text{C}$  was adopted for further experiments; the selected atomization temperature was  $1600^\circ\text{C}$ .

### 3.2. Complexation conditions

In order to perform a preliminary analysis of the significance of the experimental variables, a full factorial design in two levels with duplicate measurements and a central point in

triplicate measurements was carried out. Four factors were evaluated, including the concentration of DDTP, HCl and Triton X-114 and the presence of the urine sample submitted to CPE, which will be from here on denominated as the “sample” parameter, for simplification purposes. The sample parameter involved the comparison between the signal obtained for an aqueous solution containing the analytes and a real urine sample enriched with the same analyte concentration. This variable was also evaluated to assure that calibration against aqueous standards submitted to CPE would be feasible. The minimum level (–) for this factor was taken as an aqueous solution containing  $2.0 \mu\text{g L}^{-1}$  Pb and  $0.01 \mu\text{g L}^{-1}$  Cd submitted to CPE, and the maximum level (+) consisted of a  $500\text{-}\mu\text{L}$  aliquot of urine submitted to CPE, containing the same concentrations of Pb and Cd. A central point was included in the matrix of the experimental design to obtain an estimate of the variance and to check the linearity loss between the chosen levels for each variable. Table 2 contains the minimum and maximum levels for the variables studied using factorial design. The central point was taken as the arithmetic mean between minimum and maximum level values for each variable.

Treatment of the obtained data using analysis of variance (ANOVA) and statistical probability ( $p=0.05$ ) resulted in the Pareto chart shown in Fig. 3. Fig. 3a shows that the only main effects that are statistically significant for Pb are DDTP and Triton X-114 concentrations, while Fig. 3b shows that three main effects are statistically significant for Cd. In addition, the curvature parameter, as shown in Fig. 3, was also found to be statistically significant, indicating that there is no linear relationship between the minimum and maximum levels selected for all or some of the experimental variables evaluated. This is an indication that further optimization should be carried out by means of an experimental design where at least three levels of each variable are evaluated, i.e., a response surface methodology. However, one of the most important results that can be taken from the Pareto charts in Fig. 3 is the effect of interaction between variables. For both analytes, several interactions were found to be of statistical relevance, indicating that an individual evaluation of parameters (univariate optimization) would not be appropriate as it would provide no information on interactions. Another important aspect is that the main effect of the variable “sample” was found to be not of statistical significance, which suggests that there is no significant difference at a 95% confidence level in the sensitivity obtained for the same concentration of Cd and Pb in a urine sample and an aqueous solution when both are submitted to CPE. This indicates the feasibility of carrying out calibration against aqueous standards

Table 2  
Factors and levels used in the multivariate optimization

Variable	Low (–)	High (+)	Central point (0)
DDTP conc./% m/v	0.01	1.00	0.50
HCl conc./mol L <sup>-1</sup>	0.01	0.63	0.32
Triton X-114 conc./% m/v	$0.1^a/0.0^b$	$1.1^a/0.6^b$	$0.6^a/0.3^b$
Sample volume (urine)/mL	0	0.5	0.25

<sup>a</sup> For Cd.

<sup>b</sup> For Pb.

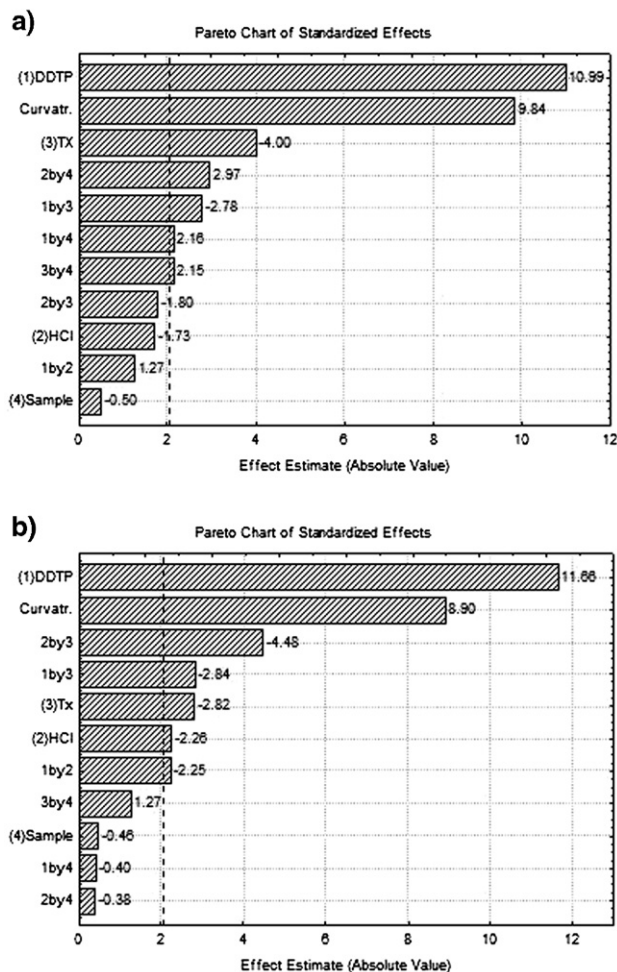


Fig. 3. Pareto charts obtained for interaction in pairs between the variables involved in cloud point extraction: (a) Pb and (b) Cd.

submitted to CPE and demonstrates that urine samples can be directly submitted to CPE without any previous acid digestion, etc., eliminating all problems associated to it, such as time consumption and potential sample contamination or analyte loss.

In spite of the fact that the presence of urine sample alone did not affect the response significantly in the procedure within the range studied, all interactions involving this variable for Pb were statistically significant, as seen in Fig. 3a, requiring a more detailed evaluation to be carried out. For Cd, no interactions with the variable sample were statistically relevant, but an optimization procedure similar to that performed for Pb was also carried out, to assure that similar responses could be obtained.

Based on the results obtained by factorial design experiments, the optimization was carried out using a response surface methodology with Box–Behnken design. Three variables were considered and simultaneously evaluated, concerning the concentrations of Triton X-114, HCl and DDTP. The optimization was carried out in parallel for Cd and Pb in urine samples submitted to CPE and in aqueous solutions, submitted to the same procedure. A total of 15 experiments were carried out in

duplicate for each analyte and each matrix. Box–Behnken design allows developing a mathematical model of the analytical response as a function of the variables under evaluation. A quadratic equation is obtained, from which a critical point (maximum, minimum or saddle) can be calculated. Alternatively, the critical point could also be chosen visually from the response surface.

The critical points can be determined as the points where the partial derivatives from the mathematical equations assume a null value. Therefore, from each of the equations, a total of three partial derivative equations can be taken, and each one will result in the value for maximum signal for one of the parameters involved (DDTP, HCl and Triton X114 concentrations). These values are shown in Table 3.

The equation systems obtained for Pb and Cd show that the critical points in fact correspond to maxima, therefore generating response surfaces with a maximum region visible. Fig. 4 shows the response surfaces obtained for Pb in the urine sample (Fig. 4a–c) and in aqueous solution (Fig. 4a'–c') submitted to CPE. The behavior in both cases is quite similar, resulting in response surfaces with coincident maximum regions, confirming that similar optimum concentrations could be used for the analytes in both media. Hence, calibration against aqueous standards submitted to CPE is a feasible approach.

In all studies, the concentration of DDTP was found to be significant, as seen in Fig. 4a and a' and Fig. 4b and b', which is in agreement with the results of the factorial design, as shown by the Pareto chart in Fig. 3a. It can clearly be seen that there is a maximum for DDTP concentration around 0.7% m/v. The concentration of Triton X-114 is also a significant parameter, as seen in Fig. 4b and b' and in Fig. 4c and c'. For a low concentration of Triton X-114, the signal is significantly lower probably due to poor extraction efficiency, while for elevated concentrations the analyte is more diluted in the surfactant-rich phase, and the dilution effect compensates for potentially higher extraction efficiency. It can also be seen from Fig. 4b and b' that there is a considerable interaction between the concentrations of DDTP and Triton X-114, as both are closely related to the extraction efficiency and, therefore, to the sensitivity for the CPE procedure. The only parameter that did not show a significant influence was the concentration of HCl. Although complex formation with DDTP occurs usually in acidic media, the signal was rather independent of the HCl concentration in the studied interval. Nevertheless, to assure efficient analyte extraction avoiding formation of precipitates or adsorption on

Table 3  
Conditions for maximum integrated absorbance obtained from Box–Behnken design for parameters involved in CPE

Parameter	Pb			Cd		
	Urine	Aqueous solution	Selected	Urine	Aqueous solution	Selected
DDTP/% m/v	0.70	0.77	0.70	2.46	0.93	1.00
HCl/mol L <sup>-1</sup>	0.28	0.27	0.30	0.34	0.43	0.50
TX-114/% m/v	0.40	0.41	0.40	0.57	0.53	0.50

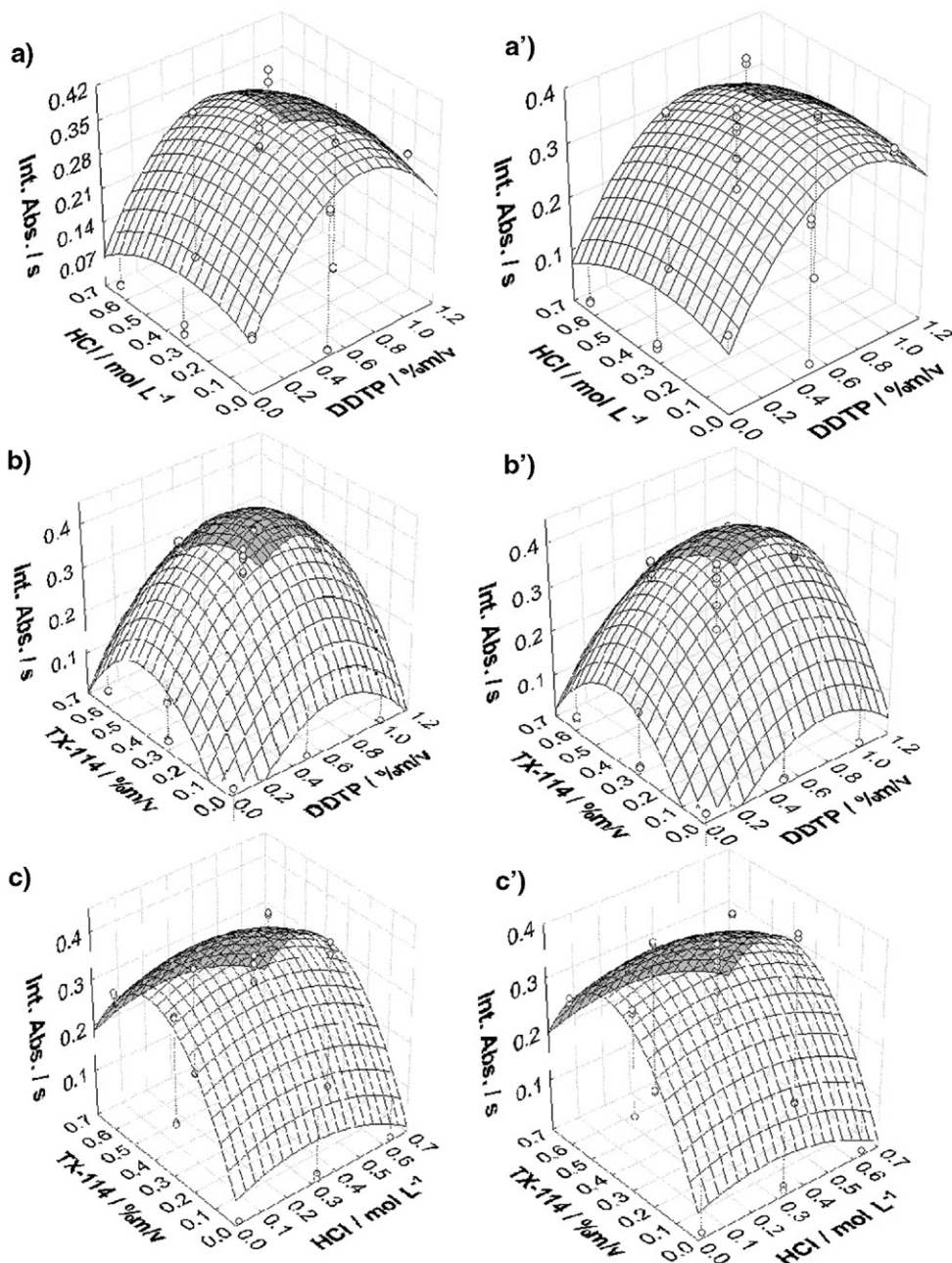


Fig. 4. Response surfaces obtained from Box–Behnken design for Pb in urine samples (a–c) and in aqueous solutions (a'–c'), after cloud point extraction.

tube walls, an HCl concentration of  $0.30 \text{ mol L}^{-1}$  was chosen, also because the signal in this region of the response surface exhibited a maximum.

The response surfaces obtained for Cd (Fig. 5) show the effect of the CPE variables for urine and aqueous solution. Although the regions of maximum signal for Cd in urine samples in Fig. 5a and b are not as clearly visible as for the corresponding surfaces obtained for aqueous standards submitted to CPE (Fig. 5a' and b'), the maximum region is coinciding for both media, indicating that calibration against aqueous standards submitted to CPE can be used for Cd determination. The effect of increasing DDTP concentration on the analytical signal is quite pronounced for Cd in the urine sample, hence the

optimum concentration value was visually chosen by interpretation of the maximum region in Fig. 5a and b. For Cd in aqueous standards submitted to CPE, the maximum region is also well defined. Unlike what has been seen for Pb, Fig. 5a, c, a' and c' show that HCl is in fact a statistically significant parameter for Cd in urine and aqueous solution, with increasing analytical signal as the HCl concentration increases up to about  $0.4 \text{ mol L}^{-1}$ . The signal decrease for higher HCl concentrations can be at least in part explained by the formation of charged chloride complexes, reducing the extraction efficiency. Fig. 5c and c' also demonstrate the significant interaction between Triton X-114 and HCl, which is in agreement with the results from the factorial design, shown in Fig. 3b.

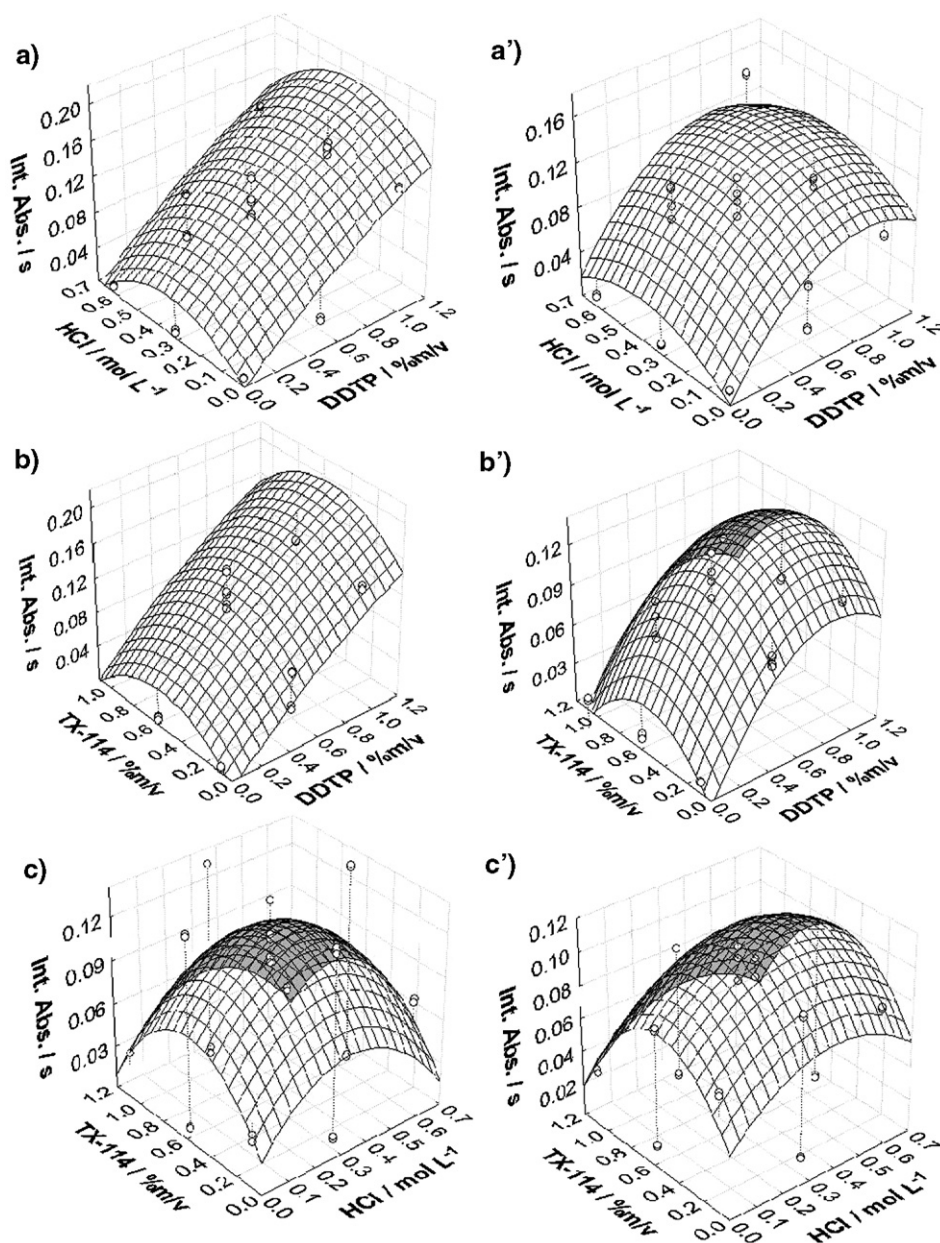


Fig. 5. Response surfaces obtained from Box–Behnken design for Cd in urine samples (a–c) and in aqueous solutions (a'–c'), after cloud point extraction.

Table 3 shows the optimum conditions obtained from the partial derivatives for Cd and Pb in the urine sample and in aqueous solution submitted to CPE. The use of these conditions

results in maximum response (i.e., maximum sensitivity), according to the equations or according to visual selection in the case of the optimum DDTP concentration for Cd in the urine samples.

Table 4

Figures of merit obtained for the determination of Cd and Pb in urine samples by GF AAS following CPE with calibration against aqueous standards submitted to CPE (EF=enhancement factor; LOD=limit of detection;  $R$ =linear correlation coefficient;  $m_0$ =characteristic mass)

	Pb	Cd
LOD/ng L <sup>-1</sup>	40	2
EF	16	16
$R$	0.9996	0.9971
Slope/s L μg <sup>-1</sup>	0.10	2.73
$m_0$ /pg	0.5	0.03

Table 5

Concentrations (μg L<sup>-1</sup>) obtained for Cd and Pb in urine control samples submitted to cloud point extraction ( $n=5$ , Student's  $t$  for 95% confidence level)

Sample	Pb		Cd	
	Reference	Found	Reference	Found
Metalle urine level 1	130 (98–162)	147±1.2	13 (10–16)	14±0.3
Metalle urine level 2	80 (62–98)	68±1.6	8 (6.14–9.86)	7.5±0.6
Seronorm urine	91.1±7	90±1.4	5.06±0.22	4.5±0.1

Table 6  
Results ( $\mu\text{g L}^{-1}$ ) obtained for the analysis of urine samples from volunteers and spike recovery data for Cd and Pb after CPE ( $n=5$ ; Student's  $t$  for 95% confidence level)

Sample	Pb			Cd		
	Determined <sup>a</sup> / $\mu\text{g L}^{-1}$	Determined <sup>b</sup> / $\mu\text{g L}^{-1}$	Recovery/%	Determined <sup>a</sup> / $\mu\text{g L}^{-1}$	Determined <sup>b</sup> / $\mu\text{g L}^{-1}$	Recovery/%
1	0.86±0.22	2.93±0.07	103	<0.002	0.053±0.001	106
2	0.45±0.15	2.52±0.05	104	0.051±0.019	0.102±0.002	98
3	0.14±0.09	2.30±0.07	108	<0.002	0.053±0.002	105
4	0.45±0.13	2.62±0.03	109	<0.002	0.055±0.003	110
5	0.056±0.002	1.97±0.05	96	<0.002	0.053±0.004	106

<sup>a</sup> Without spiking.

<sup>b</sup> After spiking ( $2.0 \mu\text{g L}^{-1}$  Pb and  $0.05 \mu\text{g L}^{-1}$  Cd).

### 3.3. Figures of merit and results

The figures of merit are given in Table 4. The enhancement factor, calculated as the ratio between the slopes of a calibration curve for the analyte submitted to CPE and a curve without pre-concentration, indicates a 16-fold improvement. Detection limits at the  $\text{ng L}^{-1}$  level were determined for both analytes, calculated from the ratio of 3 times the standard deviation of ten blank readings and the slope of the calibration curve, demonstrating the high sensitivity of the procedure. Calibration for both analytes was performed with aqueous standards submitted to the same CPE procedure as the urine samples, as justified by the multivariate optimization.

Good agreement between reference and determined values at a 95% statistical confidence level was obtained for both analytes and in all three urine control samples, as shown by the results in Table 5. Urine samples from volunteers without evident exposure to sources of Pb or Cd have also been analyzed, and the results can be found in Table 6. The natural Pb concentrations could be determined in all urine samples using CPE, while only one of the samples had a detectable Cd concentration. Spike recovery tests have also been performed using the real samples, and recoveries in the range 96–110% were obtained, demonstrating good accuracy of the method and the capability to determine Cd and Pb at trace levels in urine samples. The method has proved to be a reliable and sensitive approach to determine Cd and Pb in urine samples, particularly when compared to other procedures involving 'direct' analysis, which often require relatively complex dilution procedures and result in a reduction in the detection power [21,22]. Typically 1–3 orders of magnitude better detection limits can be obtained using CPE [17,21,22], in addition to the benefits associated to the matrix separation, reducing the risk of interference and, therefore, avoiding complex calibration procedures.

## 4. Conclusions

The developed procedure using CPE and GF AAS has proved to be a versatile, simple and accurate means of determining Cd and Pb at trace levels in certified and 'real' urine samples using calibration against aqueous standards submitted to CPE. The fact that no treatment of the urine samples was necessary prior to CPE certainly is a great advantage of the method, particularly concerning time saving and reduction in

the risk of analyte loss and/or contamination. The use of DDTP as chelating agent and Triton X-114 allowed a satisfactory enrichment factor and low detection limits to be obtained, demonstrating the high sensitivity of the method. The use of Ru as a permanent modifier improved thermal stability for both analytes, avoiding erroneous background correction due to elevated background levels. Finally, multivariate method optimization using factorial and Box–Behnken design has proved to be an extremely valuable tool, allowing accurate optimum values of experimental parameters to be determined as well as the possibility to evaluate the interaction between variables with a reduced number of experiments. This same approach may probably be successfully extended to the determination of other analytes in urine.

## Acknowledgements

The authors are thankful to Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), to Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) and to Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado da Bahia (FAPESB) for financial support. E.M. and D.L.G.B. have scholarships and E.C. and A.J.C. have research scholarships from CNPq. T.A.M. has a scholarship from CAPES and B.W. has a research scholarship from FAPESB.

## References

- [1] M. Yaman, Determination of cadmium and lead in human urine by STAT-F AAS after enrichment on activated carbon, *J. Anal. At. Spectrom.* 14 (1999) 275–278.
- [2] Yu-Hsiang Sung, Shang-Da Huang, On-line preconcentration system coupled to electrothermal atomic absorption spectrometry for the simultaneous determination of bismuth, cadmium and lead in urine, *Anal. Chim. Acta* 495 (2003) 165–176.
- [3] M.A.M. da Silva, V.L.A. Frescura, A.J. Curtius, Determination of noble metals in biological samples by electrothermal vaporization inductively coupled plasma mass spectrometry, following cloud point extraction, *Spectrochim. Acta Part B* 56 (2001) 1941–1949.
- [4] F.H. Quina, W.L. Hinze, Surfactant-mediated cloud point extractions: an environmental benign alternative separation approach, *Ind. Eng. Chem. Res.* 38 (1999) 4150–4168.
- [5] M.G.A. Korn, J.B. de Andrade, D.S. de Jesus, V.A. Lemos, M.L.S.F. Bandeira, W.N.L. dos Santos, M.A. Bezerra, F.A.C. Amorim, A.S. Souza, S.L.C. Ferreira, Separation and preconcentration procedures for the determination of lead using spectrometric techniques: a review, *Talanta* 69 (2006) 16–24.

- [6] M.A. Bezerra, R.E. Bruns, S.L.C. Ferreira, Statistical design-principal component analysis optimization of a multiple response procedure using cloud point extraction and simultaneous determination of metals by ICP OES, *Anal. Chim. Acta* 580 (2006) 251–257.
- [7] J.L. Manzoori, G. Karim-Nezhad, Development of a cloud point extraction and preconcentration method for Cd and Ni prior to flame atomic absorption spectrometric determination, *Anal. Chim. Acta* 521 (2004) 173–177.
- [8] Y.J. Li, B. Hu, Z.C. Jiang, On-line cloud point extraction combined with electrothermal vaporization inductively coupled plasma atomic emission spectrometry for the speciation of inorganic antimony in environmental and biological samples, *Anal. Chim. Acta* 576 (2006) 207–214.
- [9] A. Afkhami, T. Madrakian, H. Siampour, Cloud point extraction spectrophotometric determination of trace quantities of bismuth in urine, *J. Braz. Chem. Soc.* 17 (2006) 797–802.
- [10] D.L.G. Borges, M.A.M.S. da Veiga, V.L.A. Frescura, B. Welz, A.J. Curtius, Cloud point extraction for the determination of Cd, Pb and Pd in blood by electrothermal atomic absorption spectrometry, using Ir or Ru as permanent modifiers, *J. Anal. At. Spectrom.* 18 (2003) 501–507.
- [11] T.A. Maranhão, D.L.G. Borges, M.A.M.S. Veiga, A.J. Curtius, Cloud point extraction for the determination of cadmium and lead in biological samples by graphite furnace atomic absorption spectrometry, *Spectrochim. Acta Part B* 60 (2005) 667–672.
- [12] A.S. Souza, W.N.L. dos Santos, S.L.C. Ferreira, Application of Box–Behnken design in the optimization of an on-line pre-concentration system using knotted reactor for cadmium determination by flame atomic absorption spectrometry, *Spectrochim. Acta Part B* 60 (2005) 737–742.
- [13] N. Aslan, Y. Cebeci, Application of Box–Behnken design and response surface methodology for modeling of some Turkish coals, *Fuel* 86 (2007) 90–97.
- [14] R. Ragonese, M. Macka, J. Hughes, P. Petocz, The use of the Box–Behnken experimental design in the optimization and robustness testing of capillary electrophoresis method for the analysis of ethambutol hydrochloride in pharmaceutical formulation, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 27 (2002) 995–1007.
- [15] M. Preu, D. Guyot, M. Petz, Development of a gas chromatography mass spectrometry method for the analysis of aminoglycoside antibiotics using experimental design for the optimization of the derivatisation reactions, *J. Chromatogr. A* 818 (1998) 95–108.
- [16] D.L.G. Borges, A.F. Silva, B. Welz, A.J. Curtius, U. Heitmann, Determination of lead in biological samples by high-resolution continuum source graphite furnace atomic absorption spectrometry with direct solid sampling, *J. Anal. At. Spectrom.* 21 (2006) 763–769.
- [17] A.C. Davis, C.P. Callaway, B.T. Jones, Direct determination of cadmium in urine by tungsten-coil inductively coupled plasma atomic emission spectrometry using palladium as a permanent modifier, *Talanta* 71 (2007) 1144–1149.
- [18] L. Bianchin, D. Nadvorny, A.F. da Silva, M.G.R. Vale, M.M. da Silva, W.N.L. dos Santos, S.L.C. Ferreira, B. Welz, U. Heitmann, Feasibility of employing permanent chemical modifiers for the determination of cadmium in coal using slurry sampling electrothermal atomic absorption spectrometry, *Microchem. J.* 82 (2006) 176–182.
- [19] J.B.B. da Silva, D.L.G. Borges, M.A.M.S. da Veiga, A.J. Curtius, B. Welz, Determination of cadmium in biological samples solubilized with tetramethylammonium hydroxide by electrothermal atomic absorption spectrometry, using Ru as permanent modifier, *Talanta* 60 (2003) 977–982.
- [20] M.G.R. Vale, M.M. Silva, B. Welz, E.C. Lima, Determination of cadmium, copper and lead in mineral coal using solid sampling graphite furnace atomic absorption spectrometry, *Spectrochim. Acta Part B* 56 (2001) 1859–1873.
- [21] D. Andrada, F.G. Pinto, C.G. Magalhaes, B.R. Nunes, M.B. Franco, J.B.B. da Silva, Direct determination of lead in human urine and serum samples by electrothermal atomic absorption spectrometry and permanent modifiers, *J. Braz. Chem. Soc.* 17 (2006) 328–332.
- [22] P.R.M. Correia, C.S. Nomura, P.V. Oliveira, Multielement determination of cadmium and lead in urine by simultaneous electrothermal atomic absorption spectrometry with an end-capped graphite tube, *Anal. Sci.* 19 (2003) 1519–1523.