UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS

MEI YING WANG CARRARA

DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE METODOLOGIA PARA DETERMINAÇÃO DO NÍVEL DE MANGANÊS EM SANGUE TOTAL

CAMPINAS
2020

MEI YING WANG CARRARA

DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE METODOLOGIA PARA DETERMINAÇÃO DO NÍVEL DE MANGANÊS EM SANGUE TOTAL

Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas como parte dos requisitos exigidos para a obtenção do título de obtenção do título de Mestra em Farmacologia.

ORIENTADOR: PROF. DR. PAULO CÉSAR PIRES ROSA

ESTE TRABALHO CORRESPONDE À VERSÃO
FINAL DA DISSERTAÇÃO DEFENDIDA PELA
ALUNA MEI YING WANG CARRARA, E ORIENTADO
PELO PROF. DR. PAULO CÉSAR PIRES ROSA.

CAMPINAS
2020

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca da Faculdade de Ciências Médicas
Maristella Soares dos Santos - CRB 8/8402

C231d

Carrara, Mei Ying Wang, 1976-
Desenvolvimento e validação de metodologia para determinação de nível de manganês em sangue total / Mei Ying Wang Carrara. – Campinas, SP : [s.n.], 2020.

Orientador: Paulo César Pires Rosa.
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Ciências Médicas.

1. Manganês. 2. Espectrometria por absorção atômica acoplado ao forno de grafite. 3. Validação de método analítico. 4. Sangue. I. Rosa, Paulo César Pires, 1976-. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Development and validation for determining the level of manganese in whole blood
Palavras-chave em inglês:
Manganese
Graphite furnace atomic absorption spectrometry
Analytical method validation
Blood
Área de concentração: Farmacologia
Titulação: Mestra em Farmacologia
Banca examinadora:
Paulo César Pires Rosa [Orientador]
José Luiz da Costa
Fernando Luiz Affonso Fonseca
Data de defesa: 21-12-2020
Programa de Pós-Graduação: Farmacologia

Identificação e informações acadêmicas do(a) aluno(a)
- ORCID do autor: https://orcid.org/0000-0002-7752-1854
- Currículo Lattes do autor: http://lattes.cnpq.br/2215085098542834

COMISSÃO EXAMINADORA DA DEFESA DE MESTRADO

MEI YING WANG CARRARA

ORIENTADOR: PROF. DR. PAULO CÉSAR PIRES ROSA

MEMBROS:

1. PROF. DR. PAULO CÉSAR PIRES ROSA

2. PROF. DR. JOSÉ LUIZ DA COSTA

3. PROF. DR. FERNANDO LUIZ AFFONSO FONSECA

Programa de Pós-Graduação em Farmacologia da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas.

A ata de defesa com as respectivas assinaturas dos membros encontra-se no SIGA/Sistema de Fluxo de Dissertação/Tese e na Secretaria do Programa da Faculdade de Ciências Médicas.

Data de Defesa: 21/12/2020

DEDICATÓRIA

Dedico esse trabalho ao meu marido e aos meus filhos que estiveram comigo durante todo esse período, aos meus amigos que souberam entender esse momento, me apoiando e ajudando sempre que necessário, aos professores pela possibilidade de crescimento que propuseram.

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar a Deus, por colocar pessoas iluminadas no meu caminho, me dando forças para manter-me firme permitindo com que eu atingisse os meus objetivos.

A todas as pessoas que se disponibilizaram a participar dessa pesquisa doando seu tempo, e literalmente seu sangue.

Ao meu orientador Prof. Dr. Paulo César Pires Rosa pela possibilidade de realização desse projeto.

Ao Prof. Dr. Ângelo Zanaga Trapé que tanto incentivou e encorajou esse trabalho.

Aos companheiros e amigos do laboratório pelos momentos em que choramos e rimos juntos, pelo apoio incondicional, e pela imensa presteza nas atividades necessárias do dia a dia.

Às colegas de Mestrado por participar junto comigo do desafio, por dividirem comigo o campo de trabalho e pelos auxílios prontamente atendidos.

À Profª. Drª. Marcia, pela disponibilidade e atenção. Não só com o planejamento experimental, mas também disponibilizando seu tempo para orientação.

A todos os professores do curso de mestrado em farmacológica da Faculdade de Ciências Médicas da Unicamp pelo conhecimento.

Aos funcionários da Unicamp, laboratórios parceiros pelo auxílio técnico e apoio, em especial à Siomara, por ter sido uma verdadeira amiga e apoiadora.

A todas as pessoas que nos momentos desafiadores me auxiliaram.

"*O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001".*

EPÍGRAFE

"O que possibilita uma pessoa inteligente conquistar seus objetivos e vencer suas dificuldades, realizando façanhas fora do comum é o planejamento, conhecimento que só pode ser adquirido por aqueles que realmente conhecem seus desafios"

Adaptado de Sun Tzu
A Arte da Guerra

RESUMO

Manganês é o décimo segundo elemento mais abundante na crosta terrestre. Trata-se de um micronutriente essencial ao organismo, que quando em excesso, torna-se prejudicial à saúde. Altas concentrações deste podem ocasionar neurotoxicidade resultando em sintomas como distonia, tremores, irritabilidade entre outros. No Brasil ainda não foi definido o nível sérico de manganês de referência nacional, fazendo com que sejam utilizadas referências internacionais. As referências internacionais podem ser incompatíveis com o nível sérico de manganês de populações específicas no Brasil possibilitando uma interpretação errônea dos dados coletados. Essa possibilidade torna-se foco de atenção, uma vez que, cada vez mais, se faz necessário a determinação dos níveis considerados normais para a população brasileira devido a um aumento considerável de uso de manganês por trabalhadores de diversas áreas, além da abundância natural desse metal. Por isso, viu-se a necessidade de se desenvolver um método de determinação de manganês em sangue total. Através do planejamento experimental foram determinadas faixas de temperaturas ótimas de pirólise e atomização e avaliadas tempo de pirólise e concentração de modificador a ser utilizado no método de forma que o método se tornasse mais robusto e preciso. A otimização multivariada foi desenhada com o objetivo de se obter maior precisão estatística possível na resposta analítica e o melhor rendimento do equipamento assegurando os melhores resultados com desempenho superior. A validação do método foi realizada avaliando-se os parâmetros de seletividade, efeito residual, efeito matriz, curva de calibração, precisão e exatidão. O método foi considerado seletivo, pois os resultados de *p*-valor obtidos pela comparação entre cada curva construída com a matriz substituta e a curva construída pela solução padrão foram maiores ou iguais a 0,05 indicando que as retas possuíam a mesma origem e a mesma inclinação sendo, portanto, paralelas. Na avaliação dos efeitos matriz e residual, em ambos os parâmetros, os resultados foram satisfatórios, demonstrando que não há interferências de reagentes ou da matriz na determinação do metal no sangue e que a autolimpeza do método realizada pelo equipamento utilizado foi suficiente em evitar resíduos em uma próxima análise de amostra. Na linearidade, além da análise do valor do desvio padrão relativo obtido, foram realizados testes para verificação da

homoscedasticidade dos dados gerados pela curva (teste de Cochran), teste para avaliar a distribuição de normalidade dos resíduos (Shapiro Wilk) e um teste para avaliação da existência de qualquer relação de dependência entre os resíduos (Durbin-Watson). Todos os resultados obtidos nos testes usados para avalição da linearidade foram considerados satisfatórios sugerindo que o método é linear para concentrações superiores a 0,5 μgL^{-1}, sendo adequado para a análise de manganês em sangue total em humanos. O método também demonstrou ser preciso (precisão intra-dia e inter-dia) e exato de acordo com os resultados estatísticos encontrados. Por fim, foram analisadas algumas amostras de sangue total de voluntários do próprio laboratório de análises toxicológicas da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas com o objetivo de testar a acuracidade e empregabilidade do método desenvolvido e validado.

Palavras-chave:

Manganês, espectrometria por absorção atômica acoplado ao forno de grafite, validação de método, sangue total.

ABSTRACT

Manganese is the twelfth most abundant element in the earth's crust. It is an essential micronutrient for the body, which when in excess, becomes harmful to health. High concentrations of this can cause neurotoxicity resulting in symptoms such as dystonia, tremors, irritability, among others. In Brazil, the national reference serum level of manganese has not yet been defined, making international references used. International references may be incompatible with the serum manganese level of specific populations in Brazil, allowing for an erroneous interpretation of the data collected. This possibility becomes a focus of attention, since it is increasingly necessary to determine the levels considered normal for the Brazilian population due to a considerable increase in the use of manganese by workers from different areas, in addition to the natural abundance of this metal. Therefore, there was a need to develop a method for determining manganese in whole blood. Through experimental planning, optimal pyrolysis and atomization temperature ranges were determined and pyrolysis time and modifier concentration to be used in the method were evaluated so that the method became more robust and accurate. The multivariate optimization was designed with the objective of obtaining the highest possible statistical precision in the analytical response and the best performance of the equipment, ensuring the best results with superior performance. The validation of the method was performed by evaluating the parameters of selectivity, residual effect, matrix effect, calibration curve, precision and accuracy. The method was considered selective, since the p-value results obtained by comparing each curve constructed with the substitute matrix and the curve constructed by the standard solution were greater than or equal to 0.05 indicating that the lines had the same origin and the same slope and are therefore parallel. In the evaluation of the matrix and residual effects, in both parameters, the results were satisfactory, demonstrating that there is no interference from reagents or matrix in the determination of the metal in the blood and that the self-cleaning of the method performed by the equipment used was sufficient to avoid residues in next sample analysis. In linearity, in addition to the analysis of the value of the relative standard deviation obtained, tests were performed to check the homoscedasticity of the data generated by the curve (Cochran test), test to assess the normality distribution of the residues (Shapiro Wilk) and a test for evaluation the existence of any

dependency relationship between waste (Durbin-Watson). All results obtained in the tests used to assess linearity were considered satisfactory, suggesting that the method is linear for concentrations greater than 0.5 μgL^{-1}, being suitable for the analysis of manganese in whole blood in humans. The method also proved to be precise (intra-day and inter-day precision) and exact according to the statistical results found. Finally, some samples of whole blood from volunteers from the laboratory of toxicological analysis of the Faculty of Medical Sciences of the State University of Campinas were analyzed in order to test the accuracy and employability of the method developed and validated.

Key words:
Manganese, Graphite Furnace Atomic Absorption Spectrometry, method validation, whole blood.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1: Consumo de agrotóxicos e afins no Brasil, no período dos anos 2000 - 2017 20
Figura 2: Diagrama de níveis de energia para o Sódio atômico(a) e para o íon magnésio (Mg) 23
Figura 3: a) Atomizador eletrotérmico b) um tubo de cilindro de grafite 25
Figura 4: Gráfico de Pareto: representação de fatores que interferem na absorbância..... 43
Figura 5: Superfície de resposta: influência da temperatura de atomização (B) e da concentração do modificador (D) na resposta (absorbância), fixando o valor de temperatura de pirólise em 800°C e o tempo de pirólise em 10 segundos. 44
Figura 6: Gráficos de diagnósticos através do resíduo..... 45
Figura 7: Design Space – a região em amarelo representa a faixa de trabalho 45
Figura 8: Programa de aquecimento para o método de análise de manganês em sangue total utilizando GFAAS 46
Figura 9: Resultados gráficos para avaliação da dispersão na seletividade..... 48
Figura 10: Avaliação da dispersão dos resultados obtidos para linearidade 52
Figura 11: Diagrama de resíduos vs ordem de coleta..... 54

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Doses diárias recomendadas de manganês em homens e mulheres em diferentes faixas etárias de acordo com os órgãos de locais diferentes. 18
Tabela 2: Tipos de atomizadores usados em Espectrometria Atômica 24
Tabela 3: Condições iniciais do método usado para análise de manganês em sangue total 35
Tabela 4: Fatores e níveis do planejamento fatorial utilizando o GFAAS na análise de manganês no sangue total 37
Tabela 5: Valores de Temp. e tempo de pirólise, Temp. de atomização e concentração de modificador utilizados no planejamento experimental 37
Tabela 6: Resultados da análise de variância para o modelo quadrático 42
Tabela 7: Programa de temperatura que resultou nos melhores parâmetros de quantificação de manganês no sangue por absorção atômica em forno de grafite 46
Tabela 8: Leitura da fortificação das concentrações na matriz substituta 47
Tabela 9: Resultados obtidos para avaliação da seletividade curvas 1, 2 e 3 47
Tabela 10: Resultados obtidos para avaliação da seletividade curvas 4, 5 e 6 47
Tabela 11: Resultados estatísticos para avaliação da seletividade 49
Tabela 12: Dados obtidos para avaliação do efeito residual (carry over) 49
Tabela 13: Resultados obtidos para validação do efeito residual 49
Tabela 14: Resultados obtidos para o efeito matriz, amostra 1 e 2 50
Tabela 15 Resultados obtidos para o efeito matriz, amostra 3 e 4 50
Tabela 16: Resultados obtidos para o efeito matriz, amostra 5 e 6 50
Tabela 17: Resultado do fator de matriz normalizado 51
Tabela 18: Dados obtidos para avaliação da linearidade 51
Tabela 19: Desvio padrão relativo em cada uma das concentrações usadas na regressão. 52
Tabela 20: Avaliação da homocedasticidade dos dados 53
Tabela 21: Avaliação da distribuição dos dados 53
Tabela 22:Tese estatístico para independência dos resíduos 54
Tabela 23: Avaliação do coeficiente angular 55
Tabela 24: Avaliação do coeficiente linear 56
Tabela 25: Dados obtidos para a precisão no dia 1 56
Tabela 26: Dados obtidos para a precisão no dia 2 57
Tabela 27: Dados obtidos para a precisão no dia 3 57
Tabela 28: Resultados para precisão 58
Tabela 29: Resultados obtidos para avaliação da exatidão no Dia 1 58
Tabela 30: Resultados obtidos para avaliação da exatidão no Dia 2 58

Tabela 31: Resultados obtidos para avaliação da exatidão no Dia 3 59
Tabela 32: Dados obtidos no dia 1 para cálculo da exatidão 59
Tabela 33: Dados obtidos no dia 2 para cálculo da exatidão 60
Tabela 34: Resultados da exatidão..... 60
Tabela 35: Valores de Temp. e tempo de pirólise, Temp. de atomização e concentração de modificador utilizados no planejamento experimental 65

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Anova – Análise de variância

Anvisa – Agência Nacional de Vigilância Sanitária

ATSDR- Agency for Toxic Substances and Disease Registry

ºC - Graus Celsius

CQ - Amostra de controle de qualidade amostra de matriz adicionada do analito em concentração específica, usada para validar e monitorar o desempenho de um método bioanalítico;

CQA - Amostra de controle de qualidade de alta concentração

CQB - Amostra de controle de qualidade de baixa concentração

CQD - Amostra de controle de qualidade de diluição

CQM - Amostra de controle de qualidade de média concentração

DPR – Desvio padrão relativo

Embrapa – Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária

EPA - United States Enviroment Protection Agency

EPR – Erro padrão relativo

FNB - Food and Nutrition Board

H0 - Hipótese nula

H1 - Hipótese alternativa

HNO_3 - Ácido nítrico

Ibama - Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis

IMC – Índice de massa corpórea

IOM - Institute of Medicine

L min^{-1} - Litros por minuto

LIQ - Limite inferior de quantificação do método

LSQ - Concentração acima da maior concentração da curva de calibração

MAPA – Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento

Mg - Magnésio

mL - Mililitros

Mn – Manganês

µg- Micrograma

µg g^{-1}- Micrograma por grama

$\mu g\ L^{-1}$ - Microgramа por litro

$\mu g\ m^{-3}$ - Microgramа por metro cúbico

µm – Micrometro

OMS – Organização Mundial de Saúde

ppb – partes por bilhão

ppm – partes por milhão

NHMRC - Australian National Health and Medical Research Council

USP – Universidade de São Paulo

WHO - World Health Organization

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO 18
1.1 O Manganês 18
1.1.1 Toxicidade 19
1.1.2 Agrotóxicos e o seu consumo no Brasil 20
1.2 Níveis de manganês sérico na população brasileira 21
1.3 Determinação de manganês sérico em seres humanos 22
1.4 Espectrometria de Absorção Atômica 22
1.5 Planejamento experimental. 28
2. OBJETIVOS 31
2.1 Objetivos gerais 31
2.2 Objetivos específicos 31
3. MATERIAIS E MÉTODOS 32
3.1 Instrumentação 32
3.2 Materiais e reagentes 32
3.3 Descontaminação do Material 33
3.4 Amostra sanguínea 33
3.5 Desenvolvimento do método 34
3.6 Planejamento experimental 36
3.7 Validação analítica 38
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO 42
4.1 Resultados obtidos pela análise experimental. 42
4.2 Resultados obtidos pela validação analítica 47
5. CONCLUSÃO 61
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 62
7. ANEXOS 65

1 INTRODUÇÃO

1.1 O Manganês

Manganês é o décimo segundo elemento mais abundante na crosta terrestre, amplamente disponível nos solos, rochas e água sob as formas de óxido, sulfato e cloreto, sendo a pirolusita (dióxido de manganês), a forma mais comumente encontrada na natureza (1).

O manganês é considerado como um micronutriente essencial por ser vital não só ao cérebro, como para todo o restante do organismo e a inúmeras funções metabólicas e celulares, uma vez que, participa como co-fator de várias enzimas como arginase, superóxido dismutase, piruvato carboxilase, glutamina sintetase. É imprescindível ao metabolismo de proteínas, aminoácidos, lipídeos e carboidratos, produção de uréia no fígado, prevenção ao estresse oxidativo das células do organismo, ao processo de mineralização óssea, formação da cartilagem, reprodução, resposta imune, regulação das atividades neuronais e à cicatrização de feridas (1,2,3).

É na alimentação que encontramos a principal fonte de manganês. Está presente nas leguminosas, frutas, mexilhões, vegetais folhosos de cor verde escura, grãos e chás, sendo esses três últimos e os cereais responsáveis por um terço da ingestão de micronutrientes pelo organismo. Em países orientais, devido ao hábito de consumo diário de cereais, a concentração de manganês presente no organismo costuma ser maior que em outros países. Pelos dados mostrados na Tabela 1 é possível constatar a variação das doses diárias recomendadas em diferentes locais.

Tabela 1: Doses diárias recomendadas de manganês em homens e mulheres em diferentes faixas etárias de acordo com os órgãos de locais diferentes.

Fases	Idade	IOM (mg/dia)	Anvisa (mg/dia)	NHMRC (mg/dia)
Lactentes	0–6 meses	0,003	0,03	0,003
Lactentes	7–12 meses	0,6	0,6	0,6
Crianças	1–3 anos	1,2	1,2	2,0
Crianças	4–8 anos	1,5	1,5	2,5
Crianças	9–13 anos (homens)	1,9	1,9	3,0
	9–13 anos (mulheres)	1,6	1,9	2,5
	14–18 anos (homens)	2,2	2,2	3,5
Adolescentes	14–18 anos (mulheres)	1,6		3,0
	Acima de 19 anos (homens)	2,3	2,3	5,5
	Acima 19 anos (mulheres)	1,8	1,8	5,0
Adultos				
Gestantes	Todas as idades	2,0	2,0	5,0
Lactantes	Todas as idades	2,6	2,6	5,0

Fonte: Adaptação Food and Nutrition Board (FNB)/Institute of Medicine (IOM) (4), 2001; Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa) (5), 2005; Australian National Health and Medical Research Council (NHMRC) (6), 2005.

De acordo com Agency for Toxic Substances and Disease Registry (ATSDR), o nível sérico de manganês compreende a faixa de 4-16 μgL^{-1} e em caso de deficiência no organismo, apesar de raro, poderá ocasionar lesões na pele, deficiência no crescimento, alterações no sistema reprodutor, dificuldades no processo de cicatrização e distúrbios metabólicos (1).

1.1.1 Toxicidade

Manganês, apesar de ser um micronutriente essencial ao organismo, quando em excesso torna-se prejudicial à saúde. Devido ao acúmulo do metal em alguns órgãos, os possíveis danos causados são: cirrose hepática, bronquite, pneumonite, bronquiolite, episódios depressivos, transtornos de personalidade, demência, parkinsonismo secundário (7,8,9).

Por ser um dos metais mais usados na indústria (bateria, naval, aço), agricultura (uso de fungicidas), no transporte (aditivo de combustível), por estar presente no meio ambiente e em virtude dos possíveis danos, principalmente ao sistema nervoso, a exposição ao manganês tem sido uma grande preocupação nos últimos anos (4). Além disso, um artigo de revisão Weiss (10), discute o aumento da prevalência nas faixas etárias mais jovens do mal de Parkinson relacionado com a toxicidade do Mn e suas implicações econômicas. Em relação a pessoas mais jovens como crianças, apenas o estudo realizado por Wasserman *et al*. (11) foi identificado. Nesse estudo, foi avaliada a função cognitiva de 142 crianças de 10 anos de idade em Bangladesh, que consumiam água de poço com concentração média de 795 $\mu g\ MnL^{-1}$ de manganês, valor maior que a recomendada pela United States Enviroment Protection Agency (EPA), de 300 $\mu g\ MnL^{-1}$. Ao final, os pesquisadores chegaram à conclusão que a ingestão de alta dose de Mn na água estava relacionada com a redução do desempenho escolar das crianças (11,12).

Viu-se que o cérebro humano é o órgão com maior susceptibilidade à

intoxicação por manganês, possivelmente em razão dos neurônios apresentarem vida útil longa e pela alta demanda de energia, evidenciados através de sintomas severos (movimentos mais lentos, falta de coordenação motora, fraqueza muscular, lentidão na fala, tremores semelhantes aos do Mal de Parkinson) e desordens mentais (13).

1.1.2 Agrotóxicos e o seu consumo no Brasil

Além das fontes de intoxicação por manganês citadas anteriormente, o metal em questão, é comumente utilizado em lavouras de soja e está presente em formulações de fungicidas (maneb, mancozebe).

É interessante observar que existem vários estudos a respeito de níveis séricos de manganês em regiões vizinhas às áreas com possíveis contaminações industriais, no entanto não foram identificados estudos que analisassem o nível sérico de manganês em trabalhadores que fizessem o manuseio de agrotóxicos, o que torna esse tema, no mínimo, interessante quando se trata de contaminação com esse metal, pois o Brasil é um dos maiores consumidores mundiais de agrotóxicos sendo sua utilização bastante difundida nas produções agrícolas. Desde o ano de 2004, o uso dessas substâncias aumentou aproximadamente 700%, enquanto no mesmo período, a área agrícola aumentou 78% (14).

Diante do quadro crescente do uso de agrotóxicos no Brasil (Figura 1) e, sendo o nosso país um grande consumidor destes, a verificação no nível sérico de manganês em trabalhadores que manuseiam agrotóxicos em lavouras é de fundamental importância.

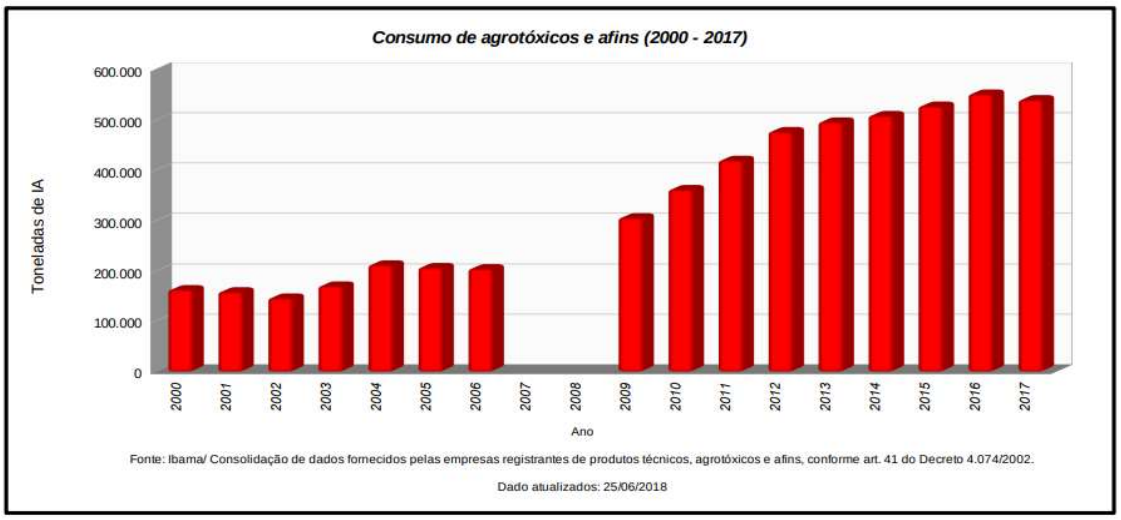

Figura 1: Consumo de agrotóxicos e afins no Brasil, no período dos anos 2000 - 2017

Fonte: Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Renováveis (Ibama), 2000 (15)

Além disso, baseado nos dados do boletim anual 2019 do Ibama (15), o qual se refere à comercialização de agrotóxicos, o mancozeb (fungicida) é o terceiro mais vendido no país devido à sua eficiência.

E de acordo com a Embrapa, baseado nos dados da safra de 2019-2020, Brasil segue como maior produtor mundial de soja (16). Nas lavouras de soja além do uso de agrotóxicos, é comum a aplicação de manganês, por ser vital ao crescimento da planta.

1.2 Níveis de manganês sérico na população brasileira

Além do aumento considerável do consumo de agrotóxicos no país e do Brasil ser o maior produtor de soja no mundo, outro fator que despertou o interesse pelo presente estudo, foi a ausência de referência do nível sérico de manganês nas diversas regiões e atividades desenvolvidas pela população.

Em conformidade com a ATSDR, o nível sérico de manganês varia de 4-16 μgL^{-1}, porém como foi citado nesse estudo os valores de manganês no organismo podem variar de acordo com a cultura e alimentação da população e adotar níveis internacionais poderia gerar resultados equivocados. Dessa forma resolveu-se utilizar as referências de trabalhos publicados com a população brasileira. Embora os costumes e a alimentação sejam diferentes em todo o Brasil, acredita-se que essa variação pode ser menor dentro do território nacional.

Em um trabalho publicado pela Fiocruz em 2013, a concentração de manganês sérico da população controle usada no estudo foi de 7,61 ± 3,22 μgL^{-1} em sangue (3). Esse valor vem ao encontro do valor declarado por Oliveira e Correia (17) no estudo realizado para determinação de cobre, maganês, selênio e zinco no sangue utilizando absorção atômica com forno de grafite. No referido estudo os pesquisadores afirmam que a concentração média de manganês no sangue é menor do que 10 μgL^{-1}. Em um estudo realizado por Moreira e colaboradores (18) cujo objetivo era a determinação dos niveis de exposição de metais em trabalhadores navais verificou que os trabalhadores expostos a diferentes fontes de contaminação de manganês não apresentaram quantidades maiores do que os niveis de segurança estabelecidos pela American Conference of Governmental Industrial Higyenists (ACGIH) sugerindo que as concentrações encontradas nos trabalhadores estávam próximas às concentrações séricas basais. Os valores encontrados pelos pesquisadores variaram de 2,62 a 13,22 μgL^{-1} sugerindo que o valor médio seria de 7,92 μgL^{-1} . Esse valor se mostrou semelhante com os outros valores citados anteriormente. E ainda em um estudo realizado por Nunes e colaboradores em 2010 (19), foram avaliados níveis

séricos de manganês em cinco estados brasileiros em que a média nacional apresentada foi de 9,6 μgL^{-1}, tendo diferença de valores entre os moradores da região norte e sul do país.

1.3 Determinação de manganês sérico em seres humanos

Para análise de metais em material biológico são usadas técnicas como espectrômetro de massa com plasma indutivamente acoplado (ICP/MS), absorção atômica acoplado à chama ou ao forno de grafite.

A técnica do ICP/MS vem sendo utilizada devido à sua capacidade de analisar vários metais simultaneamente em uma mesma amostra, porém o uso dela requer maior habilidade do operador, que demanda tempo e custo para treinamento, além de terem maior custo, a instalação e a manutenção do equipamento.

Neste estudo especificamente foi utilizada a espectrometria de absorção acoplado ao forno de grafite. Os fatores considerados na escolha do equipamento foram a sensibilidade da técnica, por trabalharmos com concentrações mínimas, na ordem de micrograma por litro, do material em questão ser amostra biológica, que no caso foi sangue total, que geralmente está disponível em pequenas quantidades, determinação de apenas um metal e o custo da técnica de absorção atômica ser bem inferior quando comparado ao ICP/MS.

1.4 Espectrometria de Absorção Atômica

A espectrometria, é um termo usado no estudo das interações de diferentes tipos de radiação e a matéria. Esse estudo é baseado na intensidade da radiação oriundo da matéria que está sendo analisada através de sinais provenientes de transdutores fotoelétricos ou outros dispositivos eletrônicos.

Nesse estudo o interesse será sobre a espectrometria de absorção atômica, mais precisamente aos espectros atômicos ópticos, cuja base teórica é fundamentada no diagrama de níveis de energia.

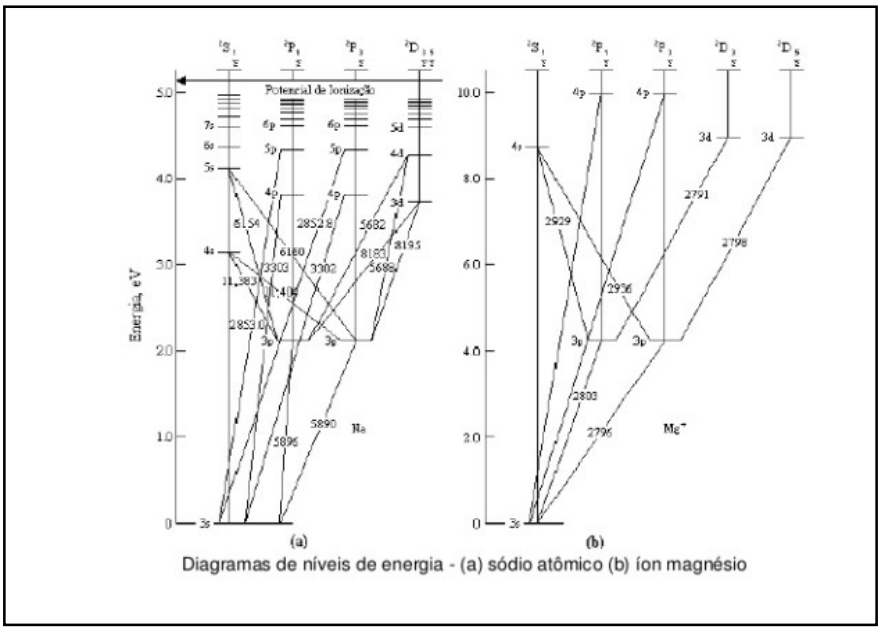

Figura 2: Diagrama de níveis de energia para o Sódio atômico(a) e para o íon magnésio (Mg)

Fonte: Skoog DA, 2002 (20)

O Diagrama (Figura 2) demonstra a energia dos vários orbitais atômicos representadas por linhas horizontais. No diagrama de energia do metal sódio (Na) atômico (a) é possível observar orbitais *p* em dois níveis que se diferenciam muito pouco em padrões de energias. No entanto do “spin” dos elétrons presentes criam um campo elétrico que variam de intensidade de acordo com o sentido de movimentação desse, essa movimentação é específica para cada unidade molecular criando uma assinatura eletrônica específica para cada elemento, como se cada elemento tivesse um diagrama de energia específico baseado nas interações e movimentação de seus elétrons. Esse diagrama de energia compõe os espectros de emissão atômica. Em temperatura ambiente todos os átomos estão em estado fundamental, no entanto quando submetidos a uma fonte de energia externa, vibram alcançando orbitais mais altos, consequentemente quando a energia cessa os átomos retornam ao seu estado fundamental acompanhados pela emissão de um fóton de radiação. Na figura 6 essa foto de radiação é representada pelas linhas verticais.

Como dito anteriormente, átomos diferentes possuem diferentes níveis de energia gerando diferentes espectros de emissão atômicas quando excitados por uma fonte externa. Nesse sentido, é fácil compreender que diferentes fontes de excitação também podem gerar diferentes espectros de emissão atômica. É importante notar

que para que sejam produzidos espectros atômicos ópticos, os constituintes de uma amostra devem ser convertidos em átomos gasosos ou átomos ionizados em um processo conhecido como atomização (Tabela 2), esse processo é de extrema importância em uma análise, pois juntamente com a introdução de amostras, definem a precisão e a exatidão analítica.

Tabela 2: Tipos de atomizadores usados em Espectrometria Atômica

Tipo de Atomizador	Temperatura típica de atomização
Chama	1700-3150 ºC
Vaporização eletrotérmica	1200-3000 ºC
Plasma de argônio (Plasma ICP)	4000-6000 ºC
Plasma de argônio (Plasma DCP)	4000-6000 ºC
Plasma de argônio (Plasma MIP)	2000-3000 ºC
Plasma de descarga de emissão	NÃO TÉRMICO
Arco elétrico	4000-5000 ºC
Centelha Elétrica	40.000 ºC

Fonte: Skoog DA, 2002 (20)

A introdução de amostras tem sido considerada um grande problema na espectroscopia atômica, assim vários sistemas de introdução de amostras foram criados para transferir uma porção reprodutível e representativa de uma amostra em um atomizador. A forma mais comum de introduzir as amostras em um atomizador é através de uma solução que nesse caso envolvem nebulização da amostra em solução. Nesse contexto existem três tipos de nebulizadores, os nebulizadores pneumáticos onde a solução da amostra é sugada através de um tubo capilar por um fluxo de alta pressão de gás que devido a velocidade divide o líquido em pequenas gotas de vários tamanhos que, então são levadas ao atomizador. O segundo tipo de nebulizador é chamado de ultra-sônico, onde a amostra é bombeada para uma superfície de cristal que vibra a uma frequência de 20KHz, produzindo uma nebulização mais densa e mais homogênea. O terceiro tipo de nebulizador é chamado de vaporizadores eletrotérmico, que consiste em uma câmara fechada através da qual um gás inerte, normalmente argônio, leva a amostra vaporizada ao atomizador.

Assim como existem diferentes formas de nebulizar uma amostra, também existem diferentes processos de atomização. No presente estudo será investigada a atomização eletrotérmica. Tal atomização possui um custo maior quando comparado às outras técnicas de atomização, no entanto a atomização eletrotérmica é mais sensível, sendo possível a avaliação de concentrações menores de metais nas amostras analisadas. Essa sensibilidade ocorre devido a forma de injeção de amostra,

uma vez que a amostra é injetada diretamente no interior do tubo de grafite eliminando a necessidade de um sistema de nebulização. Além disso a injeção direta da amostra permite a formação de uma nuvem de átomos muito densa ocasionando a maior sensibilidade característica da técnica. A espectrometria de absorção atômica com atomização eletrotérmica pode ser definida como uma técnica analítica onde um pequeno volume da solução de referência ou da amostra (geralmente 10 a 20 µL) é introduzido no interior de um tubo de grafite, que é, então, aquecido, de tal forma que o solvente da amostra seja evaporado, nesse instante, precursores atômicos são formados no estado sólido e, em seguida, ocorre a atomização do analito. Durante a atomização a nuvem atômica produzida no interior do tubo é detectada e um sinal é produzido (21).

A Figura 3 traz o esquema de um atomizador eletrotérmico cujo núcleo é um forno de grafite.

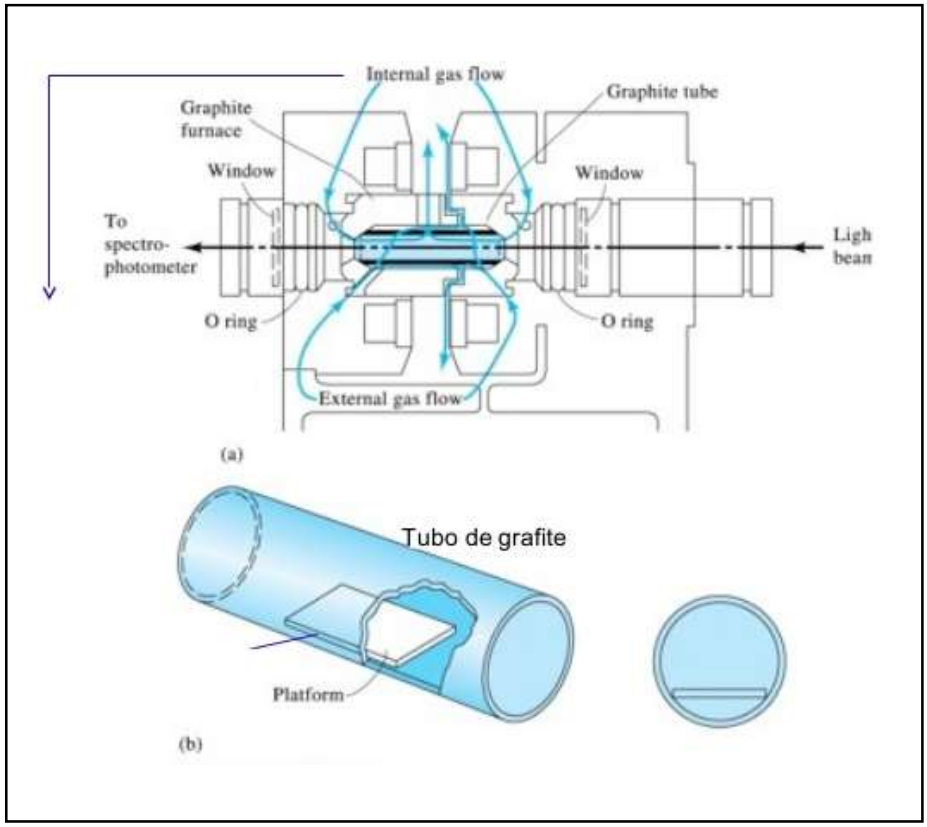

Figura 3: a) Atomizador eletrotérmico b) um tubo de cilindro de grafite

Fonte: Skoog DA, 2002 (20)

É importante notar que no interior no tubo de grafite (Figura 3 b) existe uma plataforma denominada plataforma de L'Vov que é posicionada na entrada de acesso da amostra, impedindo que amostra fique em contato com as paredes do tubo. Essa plataforma serve para proteger a amostra do aumento rápido da temperatura do forno. Assim, quando o tubo de grafite é aquecido, a amostra sofre evaporação e incineração de forma usual, fazendo com que a atomização ocorra em um ambiente no qual a temperatura não varia tão rapidamente, consequentemente os resultados obtidos no processo são mais reprodutíveis. Nesse dispositivo a atomização ocorre em um cilindro de grafite aberto nas duas extremidades, com uma abertura no meio do cilindro onde são inseridas as amostras. O tubo de grafite se ajusta a um par de contatos elétricos cilíndricos, também de grafite, localizado nas duas extremidades do tudo, esses contatos são mantidos em um suporte metálico resfriado a água. O sistema possui dois fluxos de gases inertes o fluxo externo evita a entrada de ar externo durante o processo de incineração dentro do tubo, o fluxo de ar interno flui para as duas extremidades do tudo e para fora do suporte central da amostra, tendo por finalidade, não só a exclusão do ar, mas também a eliminação dos vapores gerados pela matriz da amostra, durante os dois primeiros estágios de aquecimento (20). Dessa forma, a espectrometria de absorção atômica com forno de grafite possui sobre as outras técnicas analíticas a vantagem de pré-tratamentos químicos e térmicos da amostra, que podem ser realizados durante uma ou mais etapas do programa de aquecimento do forno.

Por isso outra grande vantagem dessa técnica é a possibilidade de se fazer o uso da amostra sem a necessidade de fazer um tratamento prévio. Isso se deve ao fato de fazerem parte do processo as fases de secagem, pirólise, antes da atomização em si (momento em que há a quantificação do metal a ser analisado). Apesar de essas serem as três etapas fundamentais do processo, outras duas etapas podem ser incorporadas no programa de aquecimento do forno e ocorrem após a atomização. Normalmente após finalizada a atomização é inserido um programa para a limpeza do forno com a temperatura acima da temperatura usada durante o processo de atomização.

Em seguida é adicionado uma etapa de resfriamento que, em muitos equipamentos, é feita automaticamente, essa etapa é de extrema importância, pois é após o resfriamento do forno que ocorre a próxima injeção da amostra.

Outro fator de extrema importância a ser considerado são as características físicas do tubo de grafite, pois essas impactam diretamente na sensibilidade analítica. De acordo com o Professor Krug (21) do Centro de Energia Nuclear de Agricultura da Universidade de São Paulo (USP), o tempo de residência dos átomos dentro do tubo é diretamente proporcional ao quadrado do comprimento do tubo e inversamente proporcional ao coeficiente de difusão, supondo que os átomos sejam perdidos apenas por difusão. O que nos leva a crer que quanto maior o tubo maior seria a sensibilidade analítica. Porém, nessa equação, um fator de extrema relevância deve ser levado em consideração, o aquecimento resistivo, pois a corrente elétrica requerida aumenta com o comprimento do tubo o que poderia prejudicar as rampas de temperatura durante a análise. Ao avaliar o diâmetro do tubo observa-se que tal parâmetro não impacta na difusão dos átomos em seu interior, porém tubos com diâmetros maiores podem levar a diluição da nuvem atômica, com consequente diminuição da sensibilidade. Por análise associativa a diminuição do diâmetro faz com que haja um aumento da densidade da nuvem atômica com consequente elevação da sensibilidade.

Porém deve-se levar em conta que o feixe de radiação deve passar pelo interior do tubo, sem ser obstruído, para não haver uma diminuição considerável da intensidade da radiação que chega ao detector.

Durante os anos de desenvolvimento da técnica de espectrometria de absorção atômica com forno de grafite foi observado que outros fatores externos poderiam contribuir de forma positiva na precisão e repetitividade dos resultados. Um exemplo típico dessa observação é a utilização de modificadores químicos.

Segundo o Professor Krug (21), o uso de modificadores químicos tornou-se uma parte essencial da espectrometria de absorção atômica com atomização eletrotérmica em forno de grafite a tal ponto de o desempenho em relação à seletividade, sensibilidade, precisão, exatidão e tempo de vida útil do atomizador, depender principalmente da amostra, do programa de aquecimento e do modificador químico empregado. O modificador pode tornar o interferente mais volátil ou o elemento a ser determinado mais refratário. O modificador químico também pode aumentar a volatilidade do analito promovendo sua atomização antes da vaporização da matriz, proporcionando uma separação temporal dos sinais de absorção atômica e não atômica e/ou diminuindo as interferências que ocorrem na fase vapor. Os modificadores também atuam aumentando a volatilidade da matriz, facilitando a

separação das espécies interferentes durante a etapa de pirólise. Desta maneira, as interferências que ocorrem na fase condensada e/ou na fase vapor, e os problemas de absorção de fundo podem ser eliminados ou pelo menos diminuídos utilizando-se uma modificação química e programa de aquecimento apropriados.

1.5 Planejamento experimental.

No desenvolvimento do método para a quantificação do metal foi utilizada uma ferramenta estatística, conhecida como planejamento e otimização experimental, conhecida também como Design of Experiments (DOE), a princípio citadas por agências regulatórias da área de indústrias farmacêuticas (22,23). Esse permite avaliar as melhores condições de trabalho, avaliando as variáveis de entrada e as suas interações e, enquanto estes afetam a resposta. O uso desta ferramenta apresentou uma grande vantagem por redução do número de análises, com otimização de tempo e custos.

Neste trabalho, o planejamento fatorial experimental foi utilizado para determinação de temperaturas ótimas de pirólise e atomização para determinação de nível sérico de manganês em agricultores utilizando a técnica de GFAAS.

Durante a obtenção dos primeiros resultados foram identificados alguns problemas relacionados aos sinais de absorção medidos durante a atomização eletrotérmica. Devido à velocidade de emissão dos fótons ser muito rápida o instrumento não proporcionava resposta real das medidas de absorbância fato comum aos instrumentos desenhados e planejados para trabalhos em chama e que possuem o forno de grafite como um acessório. Esse fato pode ser comprovado devido ao modelo do equipamento que estava sendo utilizado e pode ser justificado levando em consideração que as medidas de absorbância dependem do mecanismo de atomização e das condições do grafite, por isso os sinais não eram reprodutíveis.

Diante do cenário, surgiu a necessidade de melhorar os resultados através da otimização do método analítico.

O Planejamento experimental consiste em uma metodologia utilizada para se planejar experimentos, ou seja, para definir quais dados, em que quantidade e em que condições devem ser obtidos durante a análise em questão, buscando, satisfazer dois grandes objetivos: a maior precisão estatística possível na resposta analítica e o melhor rendimento do equipamento. A sua aplicação na otimização do método de

determinação de Mn por espectrometria de absorção atômica usando forno de grafite é de extrema importância para otimização do método assegurando os melhores resultados com desempenho superior seja em termos de suas características funcionais, como também sua robustez e, consequentemente nas melhores conclusões acerca dos experimentos realizados

A aplicação da técnica requer uma quantidade exaustiva de cálculos, tornando fundamental o emprego dos recursos de informática. Dessa forma para obtenção das melhores condições analíticas para o método foi utilizado o software Design Expert®.

É sabido que durante um processo analítico existe uma infinidade de fatores ocorrendo simultaneamente e se relacionando entre si. Dessa forma isolar um desses fatores com a intenção de verificar o impacto deste no experimento possui como única finalidade definir o motivo daquele fator existir, porém ignorar que os outros fatores que ocorrem simultaneamente podem influenciar potencializando ou diminuindo a ação daquele fator isolado e condenar a tentativa de otimização do método em fracasso absoluto. Mediante a essa constatação fica evidente que um modelo estatístico adequado deverá ser usado durante o planejamento experimental possibilitando o máximo de informação útil com um número reduzido de experimento, levando em consideração que para isso o modelo empírico deverá ser adotado com intuito de prever o comportamento do processo estudado com base nas evidências experimentais.

Nesse contexto o primeiro grande erro seria considerar que a estatística deveria ser empregada somente durante a avaliação dos resultados, pois com tudo que se foi falado até o momento fica evidente que o planejamento de experimentos em que os dados finais serão obtidos é o fato principal a ser considerado. Assim a essência de um bom planejamento consiste em projetar um experimento de forma que ele seja capaz de fornecer exatamente o tipo de informação que está sendo procurada. Fica evidente que a primeira coisa que precisa ser levantada é o que está sendo procurado e conforme escrito anteriormente o que se procura com o planejamento experimental é a otimização do método analítico de determinação de Mn com o intuito de se obter resultados precisos e reprodutíveis.

Nesse momento cabe uma avaliação interessante que pode trazer informações relevantes ao planejamento proposto, ou seja, é importante avaliar se todos os fatores relacionados impactam significativamente no resultado. Assim, a

melhor forma de fazer essa avaliação seria a realização de uma triagem usando o planejamento fatorial de segunda ordem. Porém, para que seja realizado um planejamento fatorial completo devem ser realizados experimentos em todas as possíveis combinações dos níveis dos fatores. A interpretação dos resultados poderá evidenciar ou não a interação de um determinado fator com outro fator. Caso a evidenciação seja positiva o fator avaliado deverá constar no quadro de fatores que influenciam o resultado, caso não esse poderá ser descartado.

Fica claro que à medida que são acrescentados fatores para que sejam avaliadas as interações, fica evidente o aumento do exponencial empregado no planejamento fatorial.

Quando os fatores são muitos, o número de ensaios necessários para se fazer um planejamento fatorial 2^k completo aumenta rapidamente com k, o número de fatores investigados, ou seja, com o número de 5 fatores o número de experimento seria, no mínimo, 2^5 o que relaciona a necessidade de pelo menos 32 ensaios.

Percebe-se que a complexidade do planejamento experimental está associada a dois fatores importantes o primeiro refere-se ao número de elementos que impactam o método e consequentemente estão relacionados ao resultado, pois esses definem o número de experimentos atribuídos ao planejamento, o segundo está associado à complexidade das interações entre os vários fatores presentes, pois essa está relacionada ao modelamento da estatística associada.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivos gerais

Desenvolvimento e validação de método por espectrometria de absorção atômica acoplado ao forno de grafite para determinação de manganês em sangue total.

2.2 Objetivos específicos

Otimização do método avaliando tempo de pirólise, temperatura de otimização e concentração de modificador, analisando a influência dos fatores sobre as respostas e definir uma região robusta de trabalho. (Definir condições experimentais através de planejamento experimental).

Validação do método optimizado para determinação do nível sérico de manganês.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Instrumentação

Foi utilizado o espectrômetro de absorção atômica acoplado ao forno de grafite (GF AAS), modelo ICE Série 3000 da Thermo Scientific, o qual possui amostrador automático e corretor de fundo Zeeman e software ICE Solaar. Também foram utilizadas micropipetas reguláveis de 20 a 200 µL e 100 a 1000 µL da Thermo scientific/Finnpipette® (Vantaa, Finlândia) empregadas no preparo de soluções, sistema de purificação de água MilliQ (Millipore – São Paulo, Brasil), balança analítica (Sartorius CP0225D), equipamento homogeneizador de sangue do fabricante Hemoquímica.

Os dados obtidos foram tratados utilizando o software Design-Expert® v10.0.6 (Stat-Ease, Mineapollis, EUA), MS Excel 2016 (Microsoft Co., Washington, EUA) e a validação foi realizada no Action Stat v 3.4.124.1308 (Portal Action, São Carlos, Brasil).

Para análise estatística dos dados foram utilizados os seguintes programas computacionais: The SAS System for Windows (Statistical Analysis System), versão 9.4. SAS Institute Inc, 2002-2008, Cary, NC, USA.

3.2 Materiais e reagentes

Todos os reagentes utilizados foram de grau analítico (PA). A água de diluição e descontaminação de material foi previamente purificada pelo sistema Milli-Q, modelo Academic, acoplado ao Milli-RO, modelo RIOS (Millipore Corporation, GA, USA). Uma solução estoque de 1000 g L^{-1} foi preparada a partir do concentrado de 1000 g mL^{-1} de manganês para a construção das curvas analíticas. No entanto, as soluções de calibração foram preparadas diariamente em ácido nítrico (HNO_3) 0,2% (v v^{-1}) por diluições adequadas da solução estoque.

Os reagentes utilizados para o estudo estão listados abaixo:

- Ácido Nítrico (J.T. Baker)
- Nitrato de Paládio (PerkinElmer),
- Triton-X (Synth)
- Nitrato de magnésio (Sigma Aldrich)

- Solução padrão de Manganês a 99% de pureza (Specsol)
- Água MilliQ (Millipore)
- Gás de purga utilizado foi o nitrogênio da White Martins com grau de pureza de 99,999%.
- Solução de lavagem do amostrador automático utilizada foi uma mistura de Triton-X 100 0,1% (v v^{-1}) em ácido nítrico 0,2% (v v^{-1}).

3.3 Descontaminação do Material

Todo o material utilizado na análise das amostras, vidraria e utensílios plásticos, no caso de já terem sido utilizados anteriormente, passaram por um criterioso processo de descontaminação. Esta etapa pode ser considerada o início do trabalho experimental e adquire grande importância na análise de traços de manganês, pois a eficiente descontaminação do material elimina erros nos resultados devido à contaminação e, consequentemente, na interpretação destes.

O processo inicia-se na lavagem abundante com água corrente e, em seguida, imersão em solução de Extran (Merck), 5% (v v^{-1}) por 24h. No caso de materiais usados com sangue, existe uma etapa anterior à imersão em solução do detergente neutro, que seria imergir em solução de hipoclorito de sódio (RIOQUÍMICA) 1% (v v^{-1}) pelo período de 24h, e, após, lavado com água corrente. Após a imersão em solução com detergente é utilizada água corrente para enxague e, em sequência, imerso em uma solução de HNO_3 (J.T. Baker) 10% (v v^{-1}) para descontaminação, por um período mínimo de 48h. Em seguida, ocorre o enxague com água deionizada para que depois o material seja armazenado para secagem para ser utilizado em novos experimentos.

3.4 Amostra sanguínea

As amostras de sangue foram obtidas de colaboradores do Laboratório de Análises Toxicológicas (Labtox) da Faculdade de Ciências Médicas (FCM) da Universidade Estadual de Campinas (Unicamp), que tiveram uma amostra de 5 ml de seu sangue coletado em tubos à vácuo próprio para análise de traços de metais contendo heparina sódica como anticoagulante.

As amostras foram armazenadas em refrigeradores em temperatura entre 2-8 ºC. O preparo destas para uso na técnica de absorção atômica foi diluição em solução de ácido nítrico e triton-x 100 conforme descrito a seguir.

3.5 Desenvolvimento do método

O objetivo do desenvolvimento analítico é estabelecer as melhores condições analíticas, para isso será preciso definir quais seriam as características do método que poderiam ser alteradas visando uma maior sensibilidade e precisão. Segundo Douglas A. Skoog (20) existem 5 passos fundamentais para otimizar as condições analíticas no método de absorção atômica com forno de grafite. Os três primeiros primeiros passos estão relacionados ao processo de atomização, enquanto os dois ultimos estão associados ao processo de limpeza do forno. Além disso, segundo o professor Krug (21) outros fatores externos poderiam contribuir de forma positiva na precisão e repetitividade dos resultados, tais como a utilização de modificadores que auxiliam na melhoria do desempenho em relação à seletividade, sensibilidade, precisão, exatidão e tempo de vida útil do atomizador.

Dessa forma o processo de desenvolvimento do método foi baseado nas seguintes etapas:

Condições gerais do equipamento: as condições pré-definidas usadas foram: comprimento de onda de 279,5 nm, fluxo de gás nitrogênio de 0,2 $Lmin^{-1}$, largura da fenda de 0,2nm. **Pré-tratamento**: foi realizado um pré-tratamento em toda a vidraria e material plástico utilizando detergente neutro a 5 % (v v^{-1}), ácido nítrico a 10% (v v^{-1}), hipoclorito de sódio a 1% (v v^{1}) e água MilliQ para enxague com o objetivo de remover os metais presentes nesses utensílios. **Preparo das amostras**: inicialmente foram feitas tentativas, alterando volumes da amostra a ser injetada, com diferentes diluições desta, 50, 20, 10 e 4 vezes, uso ou não de modificadores como nitrato de prata e nitrato de paládio, concentrações de triton-x 100 a 0,5% (v v^{-1}), 0,1% (v v^{-1}), 0,05% (v v^{-1}), todas as diluições realizadas em ácido nítrico a 0,2% (v v^{-1}). **Etapas da análise por GFAAS**: o processo de análise é definido por três etapas. Secagem: essa etapa é caracterizada para separação do solvente, por isso é aconselhável que se utilize como referência a temperatura de ebulição do solvente. A duração dessa etapa deverá ser baseada no volume de amostra injetado e do tipo de tubo utilizado. Pirólise: essa etapa é utilizada para eliminar componentes orgânicos e

inorgânicos da matriz, sem perder o elemento a ser determinado o analito, considerado, pois, uma etapa de separação térmica entre o analito e os outros componentes presentes na amostra. A pirólise é considera uma etapa de pré-tratamento e por isso de grande importância analítica. Via de regra, quanto maior a temperatura de pirólise, melhor a separação de componentes indesejados e menor o ruído no sinal. Atomização: nessa etapa é que são gerados os átomos no estado fundamental. A temperatura de atomização deve ser suficientemente alta para gerar a nuvem atômica no menor tempo possível, mas não deve ser exageradamente elevada para não deteriorar prematuramente os tubos e os contatos de grafite. Em resumo o processo de atomização é composto de três etapas. Na primeira etapa ocorre a eliminação do solvente utilizado na diluição da amostra e em seguida, ocorre a remoção da matriz biológica sem a perda do analito. Após a eliminação do solvente e dos interferentes da matriz, ocorre a formação de uma nuvem atômica do metal em questão, quando é realizada a medição da quantidade do metal presente na amostra usada. Isso explica, em partes, o fato de o forno de grafite possuir a capacidade de quantificar concentrações reduzidas de metais na ordem de parte por bilhão (microgramas por litro). Além do mais, por se tratar de amostra biológica, a quantidade do material utilizado, é fator determinante nas análises. O volume necessário, no caso, do sangue total, para a quantificação é mínimo, microlitros. **Processo de limpeza**: o processo de limpeza é extremamente importante para garantir que não haja efeito residual. Para o processo de limpeza foi determinado um programa do forno com a temperatura acima da temperatura usada durante o processo de atomização. **Etapa de resfriamento.** Assim quando o programa de limpeza é finalizado ocorre o programa de resfriamento, preparando o sistema para uma nova injeção da amostra.

A tabela a seguir traz a programação inicial usada no método para análise de manganês no sangue:

Tabela 3: Condições iniciais do método usado para análise de manganês em sangue total

Secagem (rampa: 10 ºCs^{-1})		**Pirólise (rampa: 10 ºCs^{-1})**		**Atomização (rampa: 150 ºCs^{-1})**		**Limpeza**	
Tempo	**Temp.**	**Tempo**	**Temp.**	**Tempo**	**Temp.**	**Tempo**	**Temp.**
15 s	90 ºC	20 s	900 ºC	3 s	1800 ºC	3 s	2500 °C

Durante os testes iniciais observou-se que os resultados melhoravam ou pioravam com a variação dessas especificações. Foram feitos alguns testes para que

fosse definido a melhor condição analítica. No entanto, pelo número de variáveis optou-se pela otimização do método através do planejamento experimental.

3.6 Planejamento experimental

Neste trabalho, o planejamento experimental foi utilizado para determinação de melhores condições de análise de manganês (temperatura de pirólise, temperatura de atomização, tempo de cada etapa) em sangue total utilizando a técnica de GFAAS.

O planejamento foi desenhado com o objetivo de se obter maior precisão possível na resposta analítica e o melhor rendimento do equipamento assegurando os melhores resultados com desempenho superior.

Assim, o primeiro passo para o planejamento experimental foi definir todos os fatores que agiam sobre o sistema, considerando que fatores serão as variáveis e sistema o método analítico capaz de gerar os resultados. Dessa forma foram levados em consideração os fatores de secagem, pirólise, atomização, além dos fatores externos à programação do equipamento. Após a definição desses fatores foi definido o objetivo do planejamento experimental, que consiste na determinação das melhores condições analíticas baseado na programação dos fatores relacionados de modo que os resultados obtidos possuam a menor variação possível. Devido ao fato de os fatores serem muitos, o número de ensaios necessários para se fazer um planejamento fatorial e determinado pela relação 2^k onde k é o número de fatores investigados.

Os fatores analisados foram temperatura de pirólise (ºC), temperatura de atomização (ºC), tempo de aquecimento na etapa de pirólise (segundos) e concentração de modificador (v v^{-1}) conforme exposto na Tabela 4. Para cada um destes fatores foram avaliados os níveis mínimo, central e máximo para se verificar a influência destes isoladamente e a interação entre as variáveis na absorbância.

Tabela 4: Fatores e níveis do planejamento fatorial utilizando o GFAAS na análise de manganês no sangue total

Fatores	Nível Mínimo	Ponto Central	Nível Máximo
Temperatura de pirólise (°C)	800	1000	1200
Temperatura de atomização (°C)	1400	1800	2200
Tempo de aquecimento na pirólise (s)	10	20	30
Concentração do medidor (%v v^{-1}) ($Pd(NO_3)_2$/$Mg(NO_3)_2$)	0	0,2($Pd(NO_3)_2$/ 0,1$Mg(NO_3)_2$)	0,4($Pd(NO_3)_2$/ 0,2$Mg(NO_3)_2$)

Para o planejamento experimental as condições de análise da técnica foram:

- Comprimento de onda de 279,5 nm
- Fluxo de gás nitrogênio de 0,2 L min^{-1}
- Largura de fenda de 0,2 nm
- Diluição da amostra de sangue: 5x em solução de Triton-X a 0,01% (v v^{-1}) e ácido nítrico a 0,2% (v v^{-1})

A Tabela 5 demonstra os testes realizados com as variações dos fatores a serem avaliados.

Tabela 5: Valores de Temp. e tempo de pirólise, Temp. de atomização e concentração de modificador utilizados no planejamento experimental

Experimento	Temperatura de pirólise (°C)	Temperatura de atomização (°C)	Tempo de pirólise (s)	Concentração de modificador (%v v^{-1})	Absorbância (média)
1	800	1400	10	0	0,0470
2	1200	1400	10	0	0,0465
3	800	2200	10	0	0,1145
4	1200	2200	10	0	0,1200
5	800	1400	10	0,4/0,2	0,0130
6	1200	1400	10	0,4/0,2	0,0135
7	800	2200	10	0,4/0,2	0,1130
8	1200	2200	10	0,4/0,2	0,1240
9	800	1400	30	0	0,0480
10	1200	1400	30	0	0,0345
11	800	2200	30	0	0,1185
12	1200	2200	30	0	0,0875

(Tabela 5: continuação)

Experimento	Temperatura de pirólise (°C)	Temperatura de atomização (°C)	Tempo de pirólise (s)	Concentração de modificador (%v v^{-1})	Absorbância (média)
13	800	1400	30	0,4/0,2	0,0150
14	1200	1400	30	0,4/0,2	0,0115
15	800	2200	30	0,4/0,2	0,1205
16	1200	2200	30	0,4/0,2	0,1220
17	800	1800	20	0,2/0,1	0,113
18	1200	1800	20	0,2/0,1	0,1130
19	1000	1400	20	0,2/0,1	0,0200
20	1000	2200	20	0,2/0,1	0,1360
21	1000	1800	20	0	0,1240
22	1000	1800	20	0,4/0,2	0,1020
23	1000	1800	10	0,2/0,1	0,1195
24	1000	1800	30	0,2/0,1	0,1210
25	1000	1800	20	0,2/0,1	0,1190
26	1000	1800	20	0,2/0,1	0,1280
27	1000	1800	20	0,2/0,1	0,1205
28	1000	1800	20	0,2/0,1	0,1215
29	1000	1800	20	0,2/0,1	0,1265

3.7 Validação analítica

Um método analítico deve ser validado para ser capaz de fornecer resultados confiáveis uma vez que esses serão usados para fomentar informações importantes para um estudo. Segundo o “Guideline on bioanalytical method validation” da European Medicines Agency (24), todos os métodos usados para gerar resultados relacionados à saúde humana devem ser bem caracterizados e validados de documentados de forma satisfatória afim de produzir resultados confiáveis e reprodutíveis. No Brasil, cabe a Agência Nacional de Vigilância Sanitária através da RDC Nº 27, de 17 de maio de 2012 determinar o que deve ser feito para que um método bioanalítico seja considerado apto para produzir resultados confiáveis em

relação a saúde humana. Dessa forma, a validação analítica do método em questão seguiu orientações da RDC27/2012 (25).

De acordo com essa resolução um método bioanalítico será considerado validado quando for comprovado que é seletivo, que possui baixo efeito residual e efeito matriz, além de possuir uma curva de calibração adequada, e quando os resultados forem considerados precisos e exatos.

No estudo de validação o sangue usado como base para fortificação das amostras foi um pool do sangue de alguns colaboradores do Laboratório de Análises Toxicológicas (Labtox) do Faculdade de Ciências Médicas/Unicamp, análises preliminares demonstraram que a concentração sérica de manganês nesse sangue variava de 1,3 a 2,5 μgL^{-1} nas amostras individualizadas que compunham o pool. Dessa forma o valor de concentração estabelecido nesse estudo levou em consideração o estudo das amostras usadas como branco (pool de sangue dos colaboradores) e a referência média encontrada nos artigos (7,5 μgL^{-1}), assim os valores usados para a construção da curva de calibração foram 0,5 μgL^{-1} 1,5 μgL^{-1} 2,5 μgL^{-1} 3,5 μgL^{-1} 4,5 μgL^{-1} 5,5 μgL^{-1} 6,5 μgL^{-1} 7,5 μgL^{-1}.

Entende-se por seletividade a capacidade do método de diferenciar e quantificar o analito na presença de outros componentes da amostra. No presente estudo a seletividade será verificada através de uma análise quantitativa, determinada pela comparação das inclinações de, no mínimo, 6 (seis) curvas de adição padrão em 6 (seis) amostras de fontes distintas de matriz biológica (contendo um nível basal do analito) e da curva padrão em solução ou matriz substituta. Para cada curva de calibração serão usadas 8 concentrações sendo 0,5 $\mu g\ L^{-1}$; 1,5 μgL^{-1}; 2,5 μgL^{-1}; 3,5 μgL^{-1}; 4,5 μgL^{-1}; 5,5 μgL^{-1}; 6,5 μgL^{-1} e 7,5 μgL^{-1}. Cada curva de calibração foi preparada três vezes totalizando, sendo três leituras independentes para cada nível das curvas, totalizando 180 pontos para avaliação desse parâmetro. O método será considerado seletivo quando os resultados de P-valor obtidos pela comparação de cada curva construída com a matriz substituta com a curva construída pela solução padrão forem maiores ou iguais a 0,05 indicando que as retas possuem a mesma origem e a mesma inclinação e, portanto, são paralelas.

O efeito residual é o efeito gerado pelo aparecimento ou aumento do sinal do analito causado por contaminação proveniente de amostras analisadas anteriormente. Esse efeito é muito comum e pode comprometer as análises posteriores caso não seja eliminado, ou pelo menos trabalhado em níveis aceitáveis.

Normalmente esse efeito está relacionado com a capacidade do equipamento usado para fazer análise de se autolimpar após a leitura de uma determinada amostra. Para avaliação desse efeito foram realizadas 3 (três) leituras da mesma amostra branco, sendo uma antes e duas logo após a leitura de uma amostra processada do LSQ. Os resultados obtidos devem ser 20% inferiores ao resultado obtido para o LIQ.

Todas as vezes que em que uma determinada substância é analisada deve-se levar em consideração as possíveis interferências oriundas das substâncias que compõe o meio onde essa substância está solubilizada, de forma que os efeitos na quantificação possam ser conhecidos e avaliados. Esses efeitos recebem o nome de efeito matriz e são de fundamental importância na avaliação da eficácia do método analítico. Pelo fato da matriz biológica ser sangue total, o efeito matriz foi avaliado utilizando 6 (seis) amostras de fontes distintas sendo 4(quatro) amostras normais e 2(duas) lipêmicas. Foram utilizadas amostras já processadas nas quais foram adicionadas amostras nas mesmas concentrações de CQB e CQA. Para cada amostra foi obtido o fator de matriz normalizado (FMN) de acordo com a fórmula abaixo.

$$\boldsymbol{FMN = \frac{Resposta\ do\ analito\ em\ matriz}{Resposta\ do\ analito\ em\ solução}}$$

Equação 1: usada para determinação do Fator de matriz normalizado

Para avaliação da curva de calibração do método foram construídas e avaliadas três curvas de calibração que incluíram a análise na amostra em branco (matriz proposta para o estudo) e de 6 determinações construídas através da fortificação usando o padrão de manganês. A faixa escolhida para a avaliação da curva de calibração será a mesma utilizada durante todo a validação analítica incluindo amostras com concentração de 0,5 μgL^{-1} (LIQ); 1,5 μgL^{-1} (CQB); 2,5 μgL^{-1} (CQM1); 3,5 μgL^{-1} (CQM2); 4,5 μgL^{-1} (CQM3); 5,5 μgL^{-1} (CQM4) e 6,5 μgL^{-1} (LSQ) compreendida entre o LIQ e LSQ. Para que os resultados não sejam alterados pela passagem forçada da curva de calibração pelo de origem não foram utilizados os pontos referentes ao branco e/ou o de concentração zero. Para que a avaliação da curva de calibração seja considerada satisfatória o desvio padrão da concentração relacionada o LIQ deverá ser menor do que 20%, em relação as outras concentrações da curva o DPR deverá ser menor de 15%, além disso os resíduos oriundos da diferença entre as concentrações experimentais e as concentrações preditoras deverá

apresentar distribuição normal e ser homocedásticos. A avaliação dos coeficientes, linear e angular devem justificar o modelo matemático usado. Por fim, a inexistência de tendência na distribuição dos resíduos será considerada um forte indicador de que a curva de calibração poderá ser considerada validada.

A precisão, por sua vez, será determinada através da avaliação intracorrida e intercorrida. Em cada corrida serão realizadas 5 replicatas utilizando 8 concentrações. As concentrações utilizadas foram as mesmas usadas para avaliação da linearidade (0,5 μgL^{-1}- LIQ), (1,5 μgL^{-1}-CQB), (2,5 μgL^{-1} - CQM1), (3,5 μgL^{-1} - CQM2), (4,5 μgL^{-1}- CQM3) (5,5 μgL^{-1}- CQA), (6,5 μgL^{-1}- LSD), acrescido do (7,5 μgL^{-1} - CQD). Para caracterizar a precisão intercorridas foram realizadas avaliações em dias diferentes. Para ser considerado preciso o desvio padrão relativo (DPR) não poderá ser superior a 20% para a concentração do LIQ e 15% para as demais concentrações.

A exatidão é a capacidade que o método possui de quantificar todo o material de interesse presente na matriz, dessa forma o método analítico deverá ser capaz de disponibilizar todo o manganês presentes na matriz para que seja analisado pelo equipamento de absorção atômica. A exatidão será avaliada nos mesmo formatos que a precisão, ou seja, com 5 réplicas em pelo 8 concentrações. No entanto, a exatidão será expressa através do Erro Padrão Relativo (EPR) que não poderá ser maior de 20% no LIQ e 15% nas outras concentrações. O EPR deverá ser calculado da seguinte forma:

$$\boldsymbol{EPR = \frac{(CME - CN)}{CN} * 100}$$

Equação 2: Determinação do erro padrão relativo (EPR)

Onde CME é concentração média experimental (Preditor Médio) e CN é a concentração nominal. Para a determinação da CME deverá ser construída a curva de calibração de cada um dos pontos de cada réplica.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Resultados obtidos pela análise experimental.

Foi realizada análise de variância para significância de regressão, levando em consideração os seguintes fatores: A – Temperatura de pirólise, B – Temperatura de atomização, C – Tempo de pirólise, D – concentração de modificador, onde as hipóteses testadas foram:

H0 – inclinação igual a zero

H1 – inclinação diferente de zero

Os resultados indicam que a probabilidade F for maior ou igual a 0,05, aceita-se ***H0*** e para valores de probabilidade F menor que 0,05, rejeita-se a hipótese nula, aceitando-se a hipótese alternativa com 95% de confiança.

Na Tabela 6 a seguir podemos observar como os fatores escolhidos interferem nos resultados, seja este de forma independente ou interagindo entre eles.

Tabela 6: Resultados da análise de variância para o modelo quadrático

Fatores	Soma dos quadrados	Graus de liberdade	Média dos quadrados	Valor de F	Prob > F
Modelo	0,054	14	0,003895	64,5	< 0,0001
A	0,00005	1	0,00005	0,84	0,3761
B	0,036	1	0,036	604,78	< 0,0001
C	0,0000568	1	0,0000568	0,98	0,3388
D	0,0006242	1	0,0006242	10,43	0,006
AB	0,000001	1	0,000001	0,017	0,899
AC	0,0002481	1	0,0002481	4,15	0,061
AD	0,00015	1	0,00015	2,51	0,1356
BC	0,000009	1	0,000009	0,15	0,7039
BD	0,00164	1	0,00164	27,42	0,0001
CD	0,0001266	1	0,0001266	2,12	0,1679
A^2	0,00007257	1	0,00007257	1,21	0,2893
B^2	0,004199	1	0,004199	70,19	<0,0001
C^2	0,000009855	1	0,000009855	0,16	0,691
D^2	0,00007257	1	0,00007257	1,21	0,2893

Os resultados apresentados para os fatores B, D, BD e B^2 possuem a probabilidade F menor que 0,05, sugerindo que estes influenciam sobremaneira a absorbância. Os resultados em que a probabilidade é maior ou igual a 0,05 sugestionam que os valores de absorbância não são significativamente influenciados por eles.

Através do Diagrama de Pareto, representado pela Figura 4, é possível observar os resultados encontrados na Tabela 9. O gráfico retrata os fatores mais significativos que influenciam na absorção, começando com o de maior influência para o menor.

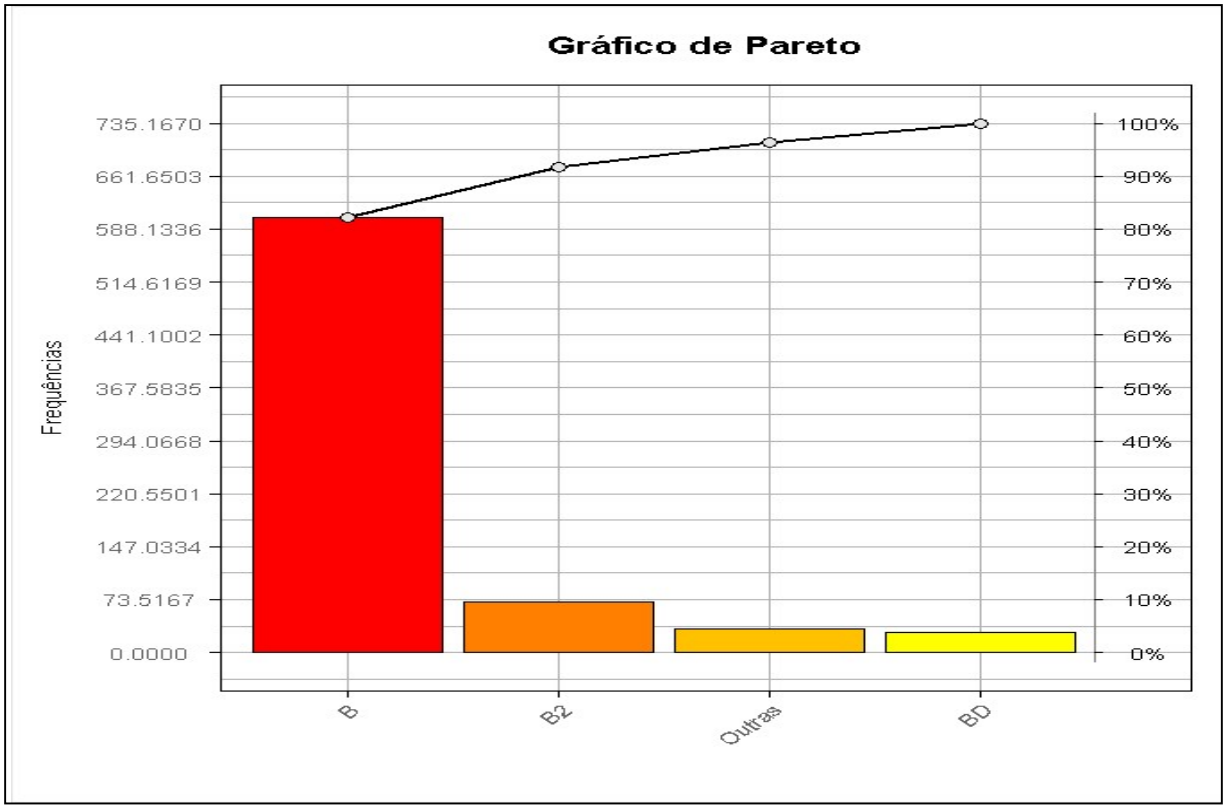

Figura 4: Gráfico de Pareto: representação de fatores que interferem na absorbância

Legenda: **B** – Temperatura de atomização; **BD** – interação entre temperatura de atomização e concentração de modificadores; $\mathbf{B^2}$ – segunda ordem da temperatura de atomização

Foi possível observar que o fator B, temperatura de atomização, é a variável que com maior frequência interfere no resultado de absorbância, demonstrando que os outros fatores não influenciam significativamente.

Após a identificação dos fatores que mais interferem na absorbância, a Figura 5, no qual está representada a superfície de resposta, nos mostra a influência da tempertura de atomização e da concentração do modificador na resposta da

absorbância quando o valor de temperatura e o tempo de pirólise são fixados em 800ºC, e 10 segundos, respectivamente.

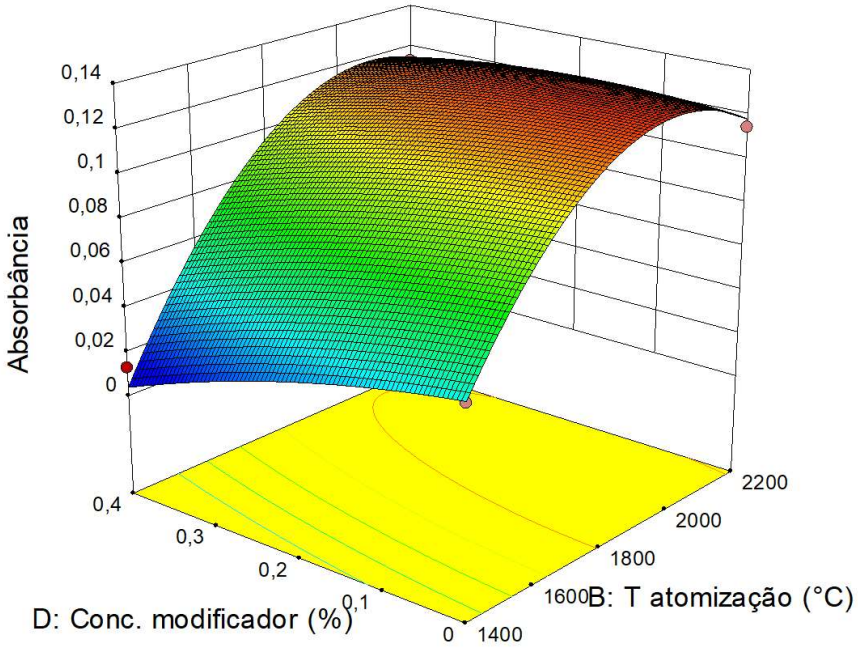

Figura 5: Superfície de resposta: influência da temperatura de atomização (B) e da concentração do modificador (D) na resposta (absorbância), fixando o valor de temperatura de pirólise em 800°C e o tempo de pirólise em 10 segundos.

Observou-se, através da superfície de resposta apresentada acima, que a temperatura de atomização influencia significativamente a absorbância e que a influência da concentração de modificador é significativa, mas não de forma muito expressiva, causando maiores alterações na absorbância apenas em temperaturas mais baixas de atomização.

De uma forma geral, os gráficos da figura 6 demonstram não haver tendências estatísticas observados indicando que os resíduos advêm de erros aleatórios como foi proposto pela otimização do método através do planejamento experimental. No gráfico (a) temos indícios sobre o comportamento da variância dos resíduos com relação aos valores ajustados (Predicto), observar-se que, por esse gráfico, não é possível observar tendências relacionadas ao resíduo.

Quando avaliamos os resíduos associado à ordem de coleta (Gráfico b) obtemos indícios da independência entre os resíduos, pois não foi observado nenhum comportamento sistemático do gráfico. O gráfico (c), por sua vez, indica que os dados possuem uma distribuição normal.

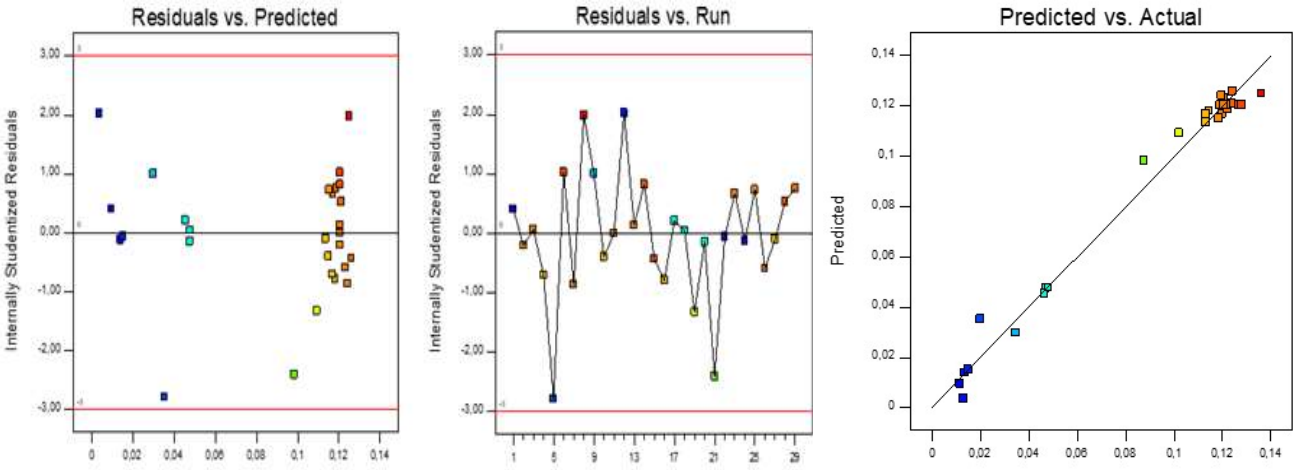

Figura 6: Gráficos de diagnósticos através do resíduo

a) representação gráfica dos valores de resíduos versus valores experimentais; b) gráfico de resíduos versus experimento; c) representação dos valores de resíduos experimentais versus valores teóricos.

Em seguida, através da Figura 7 foi possível estabelecer a área (em amarelo), conhecida como Design Space, em que a alteração da temperatura de atomização e a concentração do modificador não impactam significativamente nos resultados analíticos. Essa informação é muito importante para o método, pois define uma área de flexibilização das condições analíticas conferindo certa robustez ao método.

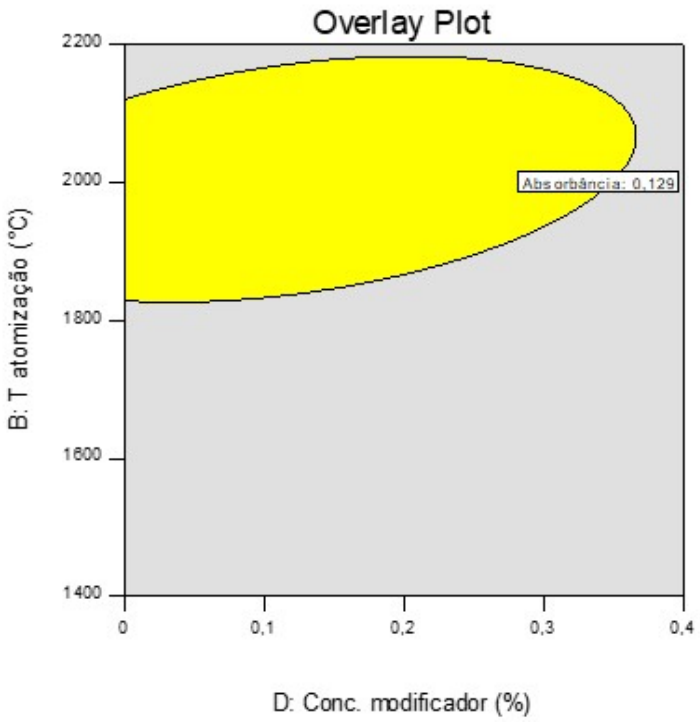

Figura 7: Design Space – a região em amarelo representa a faixa de trabalho dos parâmetros que oferece melhor resultado do método conferindo uma certa robustez.

Baseado nos resultados obtidos com o planejamento experimental, a tabela a seguir (Tabela 7) demonstra as condições utilizadas para programação do espectrômetro de absorção atômica acoplado ao forno de grafite para análise de manganês no sangue total dos agricultores.

Tabela 7: Programa de temperatura que resultou nos melhores parâmetros de quantificação de manganês no sangue por absorção atômica em forno de grafite

Fases	Temperatura (ºC)	Rampa (ºC)	Tempo (s)	Fluxo de gás
Secagem	90	10	10	0,2Lmin^{-1}
Secagem	110	10	10	0,2Lmin^{-1}
Secagem	120	10	10	0,2Lmin^{-1}
Pirólise	935	150	3	0,2Lmin^{-1}
Atomização	1946	0	3	0
Limpeza	2700	0	3	0,2Lmin^{-1}

As etapas do processo de GFAAS descritas na tabela anterior está representada graficamente na Figura 8.

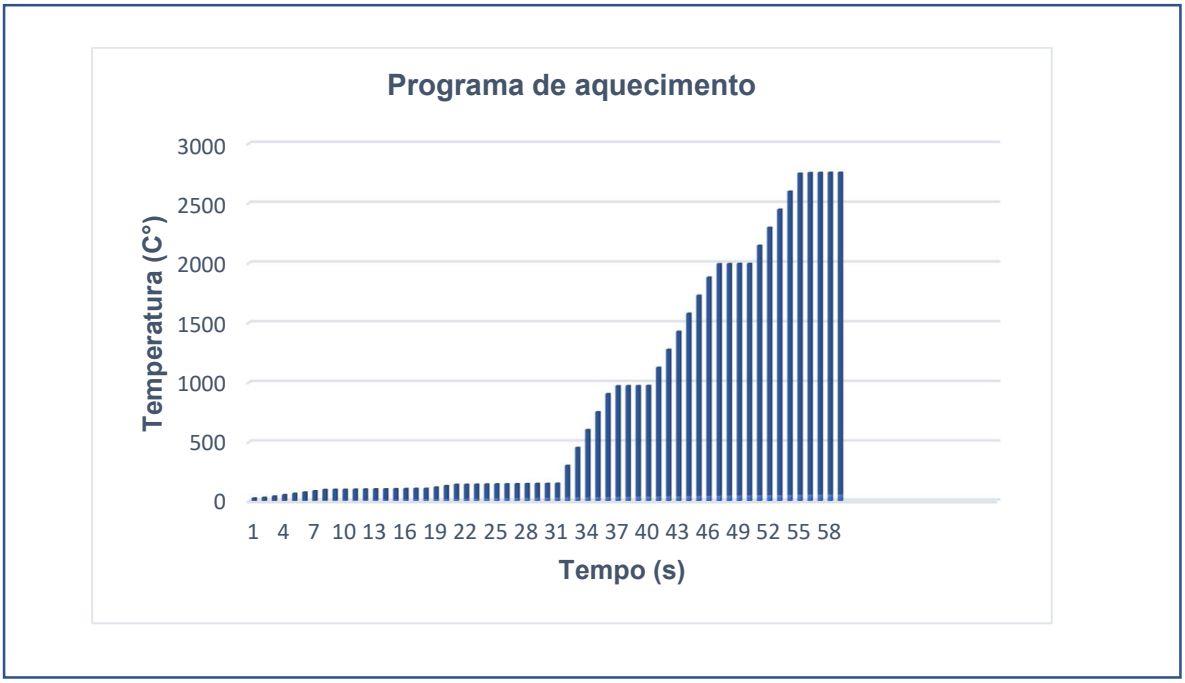

Figura 8: Programa de aquecimento para o método de análise de manganês em sangue total utilizando GFAAS

4.2 Resultados obtidos pela validação analítica

Para execução dos testes de validação é importante ressaltar que as concentrações usadas foram: LIQ (0,5 μgL^{-1}), CQB(1,5 μgL^{-1}), CQM1(2,5 μgL^{-1}), CQM2(3,5 μgL^{-1}), CQM3(4,5 μgL^{-1}), CQA(5,5 μgL^{-1}), LSQ(6,5 μgL^{-1}), CQD(7,5 μgL^{-1})

A seletividade do método foi avaliada pela comparação das inclinações de, 6 (seis) curvas de adição padrão em 6 (seis) amostras de fontes distintas de matriz biológica (contendo um nível basal do analito) e da curva padrão em solução ou matriz substituta. Para a construção da curva de calibração foram usadas 8 concentrações sendo 0,5 μgL^{-1}, 1,5 μgL^{-1}, 2,5 μgL^{-1}, 3,5 μgL^{-1}, 4,5 μgL^{-1}, 5,5 μgL^{-1}, 6,5 μgL^{-1}, 7,5 μgL^{-1}. Os resultados estão dispostos a seguir, conforme as Tabelas 8, 9 e 10:

Tabela 8: Leitura da fortificação das concentrações na matriz substituta

Concentração	Matriz Substituta
0,5	0,099
1,5	0,144
2,5	0,180
3,5	0,237
4,5	0,281
5,5	0,302
6,5	0,339
7,5	0,378

Tabela 9: Resultados obtidos para avaliação da seletividade curvas 1, 2 e 3

Curva 1			Curva 2			Curva 3		
Prep. 1	Prep. 2	Prep. 3	Prep. 1	Prep.2	Prep. 3	Prep. 1	Prep. 2	Prep. 3
0,108	0,107	0,108	0,106	0,110	0,108	0,107	0,108	0,111
0,148	0,139	0,143	0,149	0,144	0,140	0,151	0,159	0,161
0,169	0,172	0,165	0,205	0,199	0,202	0,210	0,206	0,199
0,235	0,234	0,238	0,235	0,242	0,238	0,241	0,239	0,239
0,269	0,256	0,274	0,255	0,261	0,265	0,258	0,259	0,258
0,302	0,301	0,299	0,294	0,301	0,291	0,297	0,299	0,292
0,330	0332	0,335	0,329	0,330	0,331	0,330	0,329	0,327
0365	0,370	0,368	0,358	0,362	0,364	0,359	0,370	0,369

Tabela 10: Resultados obtidos para avaliação da seletividade curvas 4, 5 e 6

Curva 4			Curva 5			Curva 6		
Prep. 1	Prep. 2	Prep. 3	Prep. 1	Prep. 2	Prep. 3	Prep. 1	Prep. 2	Prep. 3
0,112	0,109	0,112	0,107	0,108	0,11	0,109	0,107	0,110
0,158	0,155	0,154	0,161	0,165	0,163	0,162	0,165	0,158
0,206	0,209	0,198	0,202	0,204	0,204	0,215	0,208	0,212
0,232	0,233	0,241	0,231	0,233	0,233	0,235	0,038	0,241
0,265	0,274	0,274	0,267	0,270	0,270	0,268	0,271	0,268
0,290	0,302	0,302	0,301	0,299	0,297	0,305	0,307	0,306
0,330	0,328	0,328	0,327	0,335	0,332	0,335	0,328	0,332
0,372	0,368	0,372	0,365	0,364	0,371	0,372	0,373	0,369

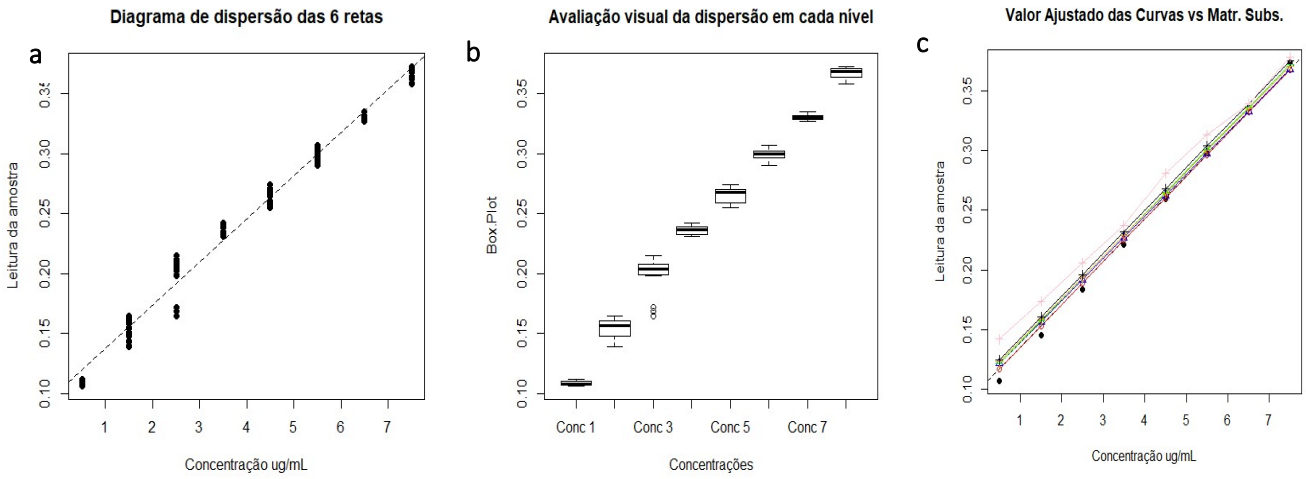

Figura 9: Resultados gráficos para avaliação da dispersão na seletividade

Legenda: a) Diagrama de dispersão das 6 retas; b) Avaliação visual da dispersão em cada nível; c) valor ajustado das curvas versus matriz substituta.

Serão considerados seletivos quando as 6 curvas geradas forem consideradas paralelas à curva construída com a matriz substituta. A comparação ocorrerá individualmente com cada uma das seis curvas construídas. O Item "c" da figura 9 traz a sobreposição das 6 regressões geradas com a matriz substituta.

A comparação entre as retas foi realizada com objetivo de avaliar possíveis interferentes causadas pelas substâncias presentes na matriz onde se encontra o manganês. A presença dessas substâncias pode provocar a diminuição ou aumento da absorção do manganês. Esse aumento ou diminuição pode não ser linear o que provoca uma mudança no coeficiente angular de cada reta. O teste de paralelismo avaliará se houve alteração no coeficiente angular das retas quando comparados com a fortificação na matriz substituta. A não alteração do coeficiente angular demonstra que não houve interferência dessa matriz.

O teste de paralelismo será realizado utilizando o teste F parcial levando em consideração o modelo de regressão linear inscrito na forma matricial. Para os cálculos foram usados a programação do software R-Studio Versão 3.6.2.

A hipótese estatística usada com o nível de significância de 0,05.

H0 *coeficiente angular da Matriz Substituta é igual ao coeficiente angular da Curva*

H1 *coeficiente angular da Matriz Substituta é diferente do coeficiente angular da Curva*

A Tabela 11 demonstra os resultados encontrados na avaliação do parâmetro seletividade.

Tabela 11: Resultados estatísticos para avaliação da seletividade

Teste de Comparação das regressões com a Matriz Substituta				
Regressão	**GL**	**Soma dos Quadrados**	**Estat. F**	**P-valor**
1	1	3,20009E-31	1,45499	0,29419
2	1	0,000111744	0,592721	0,48431
3	1	2,39795E-30	7,060427	0,05655
4	1	2,39795E-30	1,060427	0,05655
5	1	2,60431E-05	0,465301	0,53206
6	1	1,85742E-04	3,542541	0,12558

Os resultados obtidos para o *p*-valor de todas as curvas são maiores do que 0,05 indicando que a H0 foi aceita. Dessa forma conclui-se que todos as curvas são paralelas à curva construída com a matriz substituta. Dessa forma conclui-se que o método analítico é seletivo.

Para avaliação do efeito residual (carry over) foram realizadas 3 (três) leituras da mesma amostra branco, sendo uma antes e duas logo após a leitura de uma amostra processada do LSQ. Os resultados obtidos devem ser 20% inferiores ao resultado obtido para o LIQ. As Tabelas 12 e 13 demonstram os resultados obtidos na avaliação do efeito residual do método utilizado.

Tabela 12: Dados obtidos para avaliação do efeito residual (carry over)

Tipo de Amostra	**Primeira Leitura**	**Primeira Leitura após o LSQ**	**Segunda Leitura após o LSQ**
Branco	0,015	0,021	0,019
LIQ	0,107	NA	NA
LSQ	0,380	NA	NA

Tabela 13: Resultados obtidos para validação do efeito residual

Efeito residual	**Resultado**
Primeira leitura	14,02%
Primeira Leitura após LSQ	19,7%
Segunda Leitura após LSQ	17,8%

Os resultados obtidos demonstram o que equipamento de absorção atômica utilizado possui um sistema de limpeza entre as injeções que possibilita que não haja acúmulo de resíduo entre uma injeção e outra. Dessa forma o método está validado para o efeito residual, no entanto é importante ressaltar que esse parâmetro sofre pouco impacto do método e mais impacto do equipamento, isso quer dizer que

os resultados de efeito residual para esse método podem não ser satisfatórios quando utilizados em outros equipamentos que não possuam um sistema de limpeza eficiente.

O efeito matriz foi avaliado utilizando 6 (seis) amostras de fontes distintas sendo 4(quatro) amostras normais e 2(duas) lipêmicas. Foram utilizadas amostras já processadas nas quais foram adicionadas amostras nas mesmas concentrações de CQB e CQA. Para cada amostra foi obtido o fator de matriz normalizado (FMN) conforme explicado anteriormente.

As Tabelas 14, 15 e 16 demonstram os resultados obtidos nos experimentos de avaliação do efeito matriz para as amostras 1 e 2; 3 e 4; 5 e 6 respectivamente. E a Tabela 17 representa o fator de matriz normalizado de todas as amostras testadas.

Tabela 14: Resultados obtidos para o efeito matriz, amostra 1 e 2

Meio	**Concentração**	**Amostra 1**			**Amostra 2**		
Amostra	CQB	0,158	0,155	0,160	0,165	0,171	0,159
Diluente	CQB	0,085	0,088	0,090	0,093	0,092	0,080
FMN	**CQB**		**1,8**			**1,9**	
Amostra	CQA	0,292	0,297	0,307	0,305	0,301	0,311
Diluente	CQA	0,175	0,170	0,181	0,202	0,195	0,199
FMN	**CQA**		**1,7**			**1,5**	

Tabela 15 Resultados obtidos para o efeito matriz, amostra 3 e 4

Meio	**Concentração**	**Amostra 3**			**Amostra 4**		
Amostra	CQB	0,183	0,175	0,181	0,182	0,195	0,175
Diluente	CQB	0,085	0,091	0,095	0,093	0,095	0,098
FMN	**CQB**		**2,0**			**1,9**	
Amostra	CQA	0,312	0,299	0,305	0,287	0,295	0,289
Diluente	CQA	0,195	0,191	0,201	0,187	0,190	0,185
FMN	**CQA**		**1,5**			**1,5**	

Tabela 16: Resultados obtidos para o efeito matriz, amostra 5 e 6

Meio	**Concentração**	**Amostra 5**			**Amostra 6**		
Amostra	CQB	0,175	0,182	0,187	0,195	0,193	0,182
Diluente	CQB	0,093	0,090	0,085	0,087	0,085	0,092
FMN	**CQB**		**2,0**			**2,1**	
Amostra	CQA	0,295	0,202	0,307	0,290	0,285	0,282
Diluente	CQA	0,204	0,195	0,201	0,175	0,185	0,180
FMN	**CQA**		**1,5**			**1,6**	

Tabela 17: Resultado do fator de matriz normalizado

Amostra	FMN	Média
Amostra 1 CQB	1,8	1,8
Amostra 1 CQA	1,7	
Amostra 2 CQB	1,9	
Amostra 2 CQA	1,5	
Amostra 3 CQB	2,0	Desvio Padrão
Amostra 3 CQA	1,5	0,2
Amostra 4 CQB	1,9	
Amostra 4 CQA	1,5	
Amostra 5 CQB	2,0	
Amostra 5 CQA	1,5	Desvio Padrão Relativo
Amostra 6 CQB	2,1	13,00%
Amostra 6 CQA	1,6	

Para que o efeito matriz seja considerado irrelevante o desvio padrão relativo dos FMN´s deverá ser inferior a 15%. No caso em questão o DPR foi de13% demonstrando que os resultados obtidos estão de acordo com os limites estabelecidos. Sendo assim considera-se o efeito matriz validado para o método em questão.

Os resultados obtidos para a avaliação da linearidade do método baseado na curva de calibração encontram-se registrado a seguir, conforme pode ser observado na Tabela 18.

Tabela 18: Dados obtidos para avaliação da linearidade

Concentração	Regressão 1	Regressão 2	Regressão 3	Regressão 4	Regressão 5	Regressão 6
LIQ (0,5µg.L^{-1})	0,105	0,075	0,115	0,120	0,087	0,112
CQB (1,5µg.L^{-1})	0,135	0,135	0,121	0,151	0,160	0,165
CQM1 (2,5µg.L^{-1})	0,150	0,182	0,145	0,173	0,190	0,146
CQM2 (3,5µg.L^{-1})	0,190	0,240	0,205	0,251	0,265	0,239
CQM3 (4,5µg.L^{-1})	0,260	0,280	0,295	0,300	0,281	0,255
CQM4 (5,5µg.L^{-1})	0,301	0,315	0,298	0,315	0,325	0,296
CQM5 (6,5µg.L^{-1})	0,330	0,350	0,365	0,345	0,325	0,334

A seguir está representada pela Figura 10, o gráfico com a dispersão dos resultados obtidos na avaliação do parâmetro linearidade.

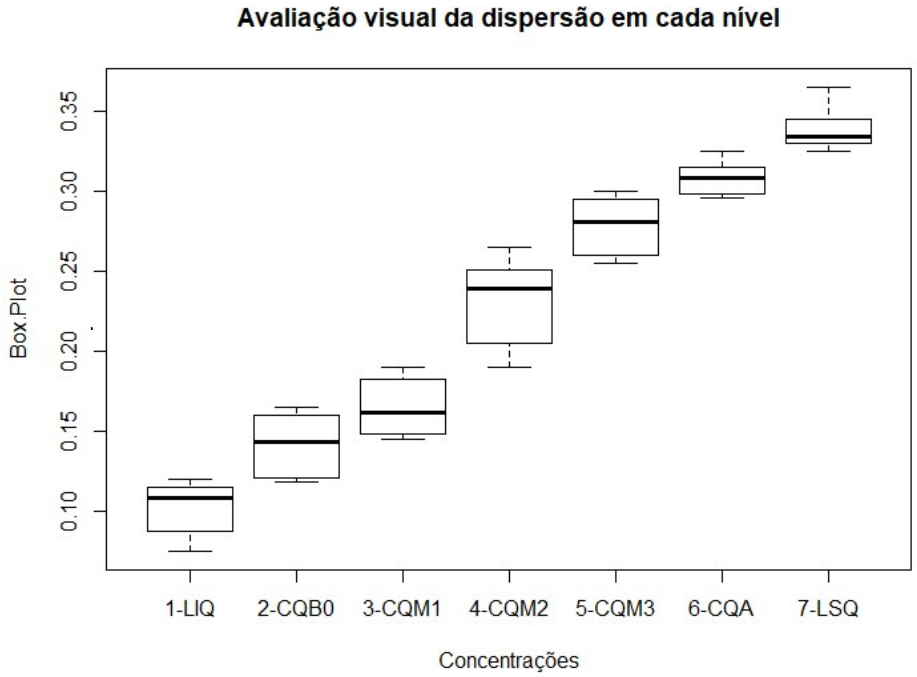

Figura 10: Avaliação da dispersão dos resultados obtidos para linearidade

A Tabela 19 apresentada a seguir demonstra os resultados do desvio padrão relativo de todas as concentrações utilizadas na regressão linear, que estão todos abaixo do limite máximo, que se encontra representada graficamente na Figura 15 acima.

Tabela 19: Desvio padrão relativo em cada uma das concentrações usadas na regressão

	LIQ	**CQB**	**CQM1**	**CQM2**	**CQM3**	**CQM4**	**LSQ**
DPR	17,23%	14,16%	11,81%	12,28%	6,50%	3,78%	4,23%
$Lim_{máx}$	20%	15%	15%	15%	15%	15%	15%

Observa-se que todos os desvios estão abaixo do limite máximo demonstrando que as amostras trabalham com o nível desejado de precisão.

Um dos itens utilizados na avaliação da linearidade foi a verificação da igualdade entre as variâncias, conhecido como avaliação da homocedasticidade.

O teste empregado para verificação da homocedasticidade foi o de Cochran onde as hipóteses testadas foram:

H0 = as variâncias são estatisticamente semelhantes;

H1 = as variâncias são estatisticamente diferentes;

Caso o *p-valor* for maior ou igual a 0,05 aceita-se a hipótese nula (***H0)***, caso o *p-valor* seja inferior a 0,05 rejeita-se a hipótese nula e aceita-se a hipótese alternativa (***H1)***

Os resultados encontrados para o teste de Cochran estão representados na Tabela 20.

Tabela 20: Avaliação da homocedasticidade dos dados

Teste de homocedasticidade - Cochram			
Estatística	***Réplicas***	***Grau de Liberdade***	***p-valor***
0,3164	7	6	0,2515

Conforme visto na Tabela 23, o p-valor é maior que 0,05 adotando o nível de confiança de 95%, dessa forma aceita-se H0, concluindo-se que a distribuição dos resíduos é homocedástica.

Para avaliação da normalidade dos resíduos utilizou-se o teste de Shapiro Wilk onde as hipóteses testadas foram:

H0 = *os dados possuem distribuição normal;*

H1 = *os dados não possuem distribuição normal;*

Caso o *p-valor* for maior ou igual a 0,05 aceita-se a hipótese nula (***H0)***, caso o *p-valor* seja inferior a 0,05 rejeita-se a hipótese nula e aceita-se a hipótese alternativa (***H1)***

Os resultados encontrados para o teste de Shapiro Wilk estão representados na Tabela 21.

Tabela 21: Avaliação da distribuição dos dados

Teste de Normalidade – Shapiro Wilk	
Estatística	**p-valor**
0,97347	0,4287

Conforme visto na Tabela 24, o p-valor é maior que 0,05 adotando o nível de confiança de 95%, dessa forma aceita-se H0, concluindo-se que os dados possuem distribuição normal.

Quando o erro do modelo é devido apenas às variações comuns de análises, espera-se que os resíduos sejam independentes entre si e tenham uma distribuição normal, no entanto quo existe uma tendência devido a erros no modelo os resíduos são considerados dependentes. Essa dependência pode trazer impactos nas amostras analisadas em áreas específicas da curva de calibração. Para evitar que erros assim aconteçam, durante a verificação da linearidade foi realizado o teste de Durbin-Watson para avaliação da independência dos resíduos levando em consideração as seguintes hipóteses:

-H0: *Os resíduos são independentes*

-H1: *Os resíduos não são independentes*

Segue representada na Tabela 22, o resultado da avaliação de teste de independência dos resíduos (teste de Durbin-Watson).

Tabela 22:Tese estatístico para independência dos resíduos

Teste de Independência – Durbin-Watson		
Teste	***Estatística DW***	***p-valor***
Durbin Watson	1,538	0,04505

O *p*-valor encontrado para o teste de Durbin-Watson foi menor do que 0,05 indicando que a hipótese nula foi descartada fazendo com que a hipótese alternativa fosse aceita, demonstrando que os resíduos não são independentes. Porém, ao se avaliar o gráfico de resíduo versus a ordem de coleta, em de coleta, não é possível observar essa dependência. Acredita-se que tal dependência ocorra em concentrações menores do que 0,5 μgL^{-1}. Pelo fato de se tratar do LIQ, esse achado não impacta no resultado da validação. No entanto fica estabelecido que o método não pode ser utilizado para avaliações de concentrações menores que 0,5 μgL^{-1}.

A seguir a Figura 11 que representa o diagrama de dispersão dos resíduos versus ordem de coleta.

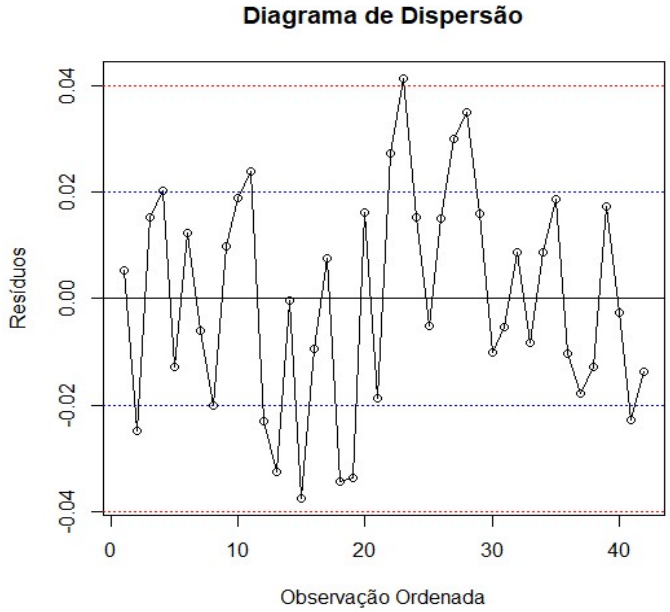

Figura 11: Diagrama de resíduos vs ordem de coleta

A figura 11 demonstra que os resíduos organizados pela ordem de coleta estão dentro do limite esperado, o que pode ser comprovado pela ausência de pontos

fora do range estatístico (linha vermelha). Isso demonstra que não há tendência e que os resíduos são independentes.

A determinação do coeficiente angula avalia se existe se a relação obtida entre as variáveis independentes e explicativas possuem uma inclinação significativa. Para isso será usado o teste de anova onde as variâncias entre as menores e a maiores concentrações devem ser maiores que a soma das variâncias encontradas dentro de cada concentração

H0 = as variâncias são iguais;

H1 = as variâncias são diferentes;

Caso o *p-valor* seja maior ou igual a 0,05 aceita-se a hipótese nula (***H0)***, caso o *p-valor* seja inferior a 0,05 rejeita-se a hipótese nula e aceita-se a hipótese alternativa (***H1).*** Nesse caso o interessante é que o p-valor seja menor que 0,05 para que o H0 seja rejeitado e a hipótese alternativa seja aceita.

Os resultados encontrados para a Anova estão descritos na Tabela 23.

Tabela 23: Avaliação do coeficiente angular

Anova					
Fatores	**Grau de Liberdade**	**Soma dos Quadrados**	**Quadrado Médio**	**Estatística F**	**p-valor**
Conc.	1	0,286936	0,286936	686,53	2,20E-16
Residual	40	0,0161718	0,000418		

O resultado permitiu que o H0 fosse rejeitado aceitando-se o H1, isso demostra que a relação entre as variáveis resulta em uma reta com inclinação significativa.

A avaliação do coeficiente linear determina se o intercepto da reta obtida cruza o eixo das variáveis independentes no valor estatisticamente igual a zero, indicando que para situação em que a variável independente X é nula a variável dependente Y também é nula. Dessa forma, para avaliar o coeficiente linear foi utilizado o teste *"t" de student* com o nível de significância de 5%, sendo testadas as seguintes hipóteses:

- H0: i*ntercepto igual à zero*

- H1: i*ntercepto diferente de zero*

No caso de amostras biológicas é esperado que o H0 seja rejeitado quando se trabalha com material isento de matriz pura, como é o caso do trabalho em questão.

Segue na Tabela 24 a avaliação estatística do coeficiente linear.

Tabela 24: Avaliação do coeficiente linear

		Teste t		
Predictor	**Estimativa**	**Desvio Padrão**	**Estatística**	**P-valor**
Intercepto	0,079092	0,006358	12,44	2,50E-15
Conc.	0,041327	0,001577	26,2	

Conforme previsto rejeita-se H0 e aceita-se H1, demonstrando que o intercepto da reta não passa pela origem dos pontos.

Os dados obtidos para precisão estão apresentados nas Tabelas 25, 26, 27 e 28.

Tabela 25: Dados obtidos para a precisão no dia 1

	Leitura das amostras					Estatística		
Concentração	**Leitura 1**	**Leitura 2**	**Leitura 3**	**Leitura 4**	**Leitura 5**	**Média**	**DP**	**DPR**
Branco	0,022	0,016	0,016	0,019	0,015	0,116		
Sangue	0,114	0,120	0,114	0,112	0,120	0,116	0,0037	3,2
0,5	0,137	0,135	0,136	0,144	0,138	0,138	0,0035	2,56
1,5	0,10	0,173	0,169	0,182	0,170	0,172	0,0053	3,1
2,5	0,206	0,206	0,209	0,202	0,204	0,205	0,0026	1,27
3,5	0,229	0,239	0,244	0,231	0,233	0,235	0,0060	2,57
4,5	0,259	0,265	0,274	0267	0,270	0,267	0,0056	2,10
5,5	0,299	0,299	0,302	0,301	0,289	0,298	0,0051	1,74
6,5	0,350	0,330	0,328	0,327	0,335	0,334	0,0094	2,83
7,5	0,392	0,389	0,385	0,386	0,390	0,388	0,0028	0,74
Desvio padrão do primeiro dia								**2,24**

Tabela 26: Dados obtidos para a precisão no dia 2

	Leitura das amostras					Estatística		
Concentração	**Leitura 1**	**Leitura 2**	**Leitura 3**	**Leitura 4**	**Leitura 5**	**Média**	**DP**	**DPR**
Branco	0,015	0,017	0,019	0,019	0,024			
Sangue	0,110	0,115	0,099	0,113	0,116	0,1106	0,006877	6,22
0,5	0,145	0,139	0,143	0,145	0,147	0,143	0,003033	2,11
1,5	0,167	0,163	0,166	0,159	0,164	0,163	0,003114	1,9
2,5	0,196	0,192	0,191	0,189	0,199	0,193	0,004037	2,09
3,5	0,207	0,211	0,217	0,214	0,212	0,212	0,003701	1,74
4,5	0,240	0,255	0,243	0,249	0,240	0,245	0,006504	2,65
5,5	0,268	0,260	0,265	0,261	0,267	0,264	0,003564	1,35
6,5	0,285	0,281	0,301	0,290	0,288	0,289	0,007517	2,6
7,5	0,298	0,308	0,311	0,304	0,296	0,303	0,006387	2,11
Desvio padrão do segundo dia								**2,53**

Tabela 27: Dados obtidos para a precisão no dia 3

	Leitura das amostras					Estatística		
Concentração	**Leitura 1**	**Leitura 2**	**Leitura 3**	**Leitura 4**	**Leitura 5**	**Média**	**DP**	**DPR**
Branco	0,025	0,015	0,017	0,023	0,021	0,0202		
Sangue	0,109	0,11	0,112	0,115	0,109	0,111	0,0025	2,30
0,5	0,131	0,145	0,138	0,128	0,142	0,1368	0,0072	5,26
1,5	0,165	0,171	0,169	0,177	0,181	0,1726	0,0064	3,70
2,5	0,207	0,206	0,209	0,202	0,204	0,2056	0,0027	1,31
3,5	0,225	0,241	0,238	0,231	0,233	0,2336	0,0062	2,67
4,5	0,259	0,267	0,278	0,269	0,271	0,2688	0,0069	2,56
5,5	0,198	0,305	0,295	0,308	0,296	0,2804	0,0464	16,55
6,5	0,347	0,345	0,341	0,328	0,334	0,339	0,0079	2,33
7,5	0,401	0,399	0,388	0,391	0,394	0,3946	0,0054	1,37
Desvio padrão do primeiro dia								**4,23**

Tabela 28: Resultados para precisão

Concentração	Leitura Média			Estatística		
	Dia 1	Dia 2	Dia 3	Média	DP	DPR
0,5	0,138	0,162	0,137	0,146	0,014	9,76
1,5	0,173	0,193	0,173	0,180	0,012	6,50
2,5	0,205	0,228	0,206	0,213	0,013	6,16
3,5	0,236	0,262	0,234	0,244	0,016	6,46
4,5	0,269	0,297	0,269	0,278	0,016	5,83
5,5	0,297	0,322	0,280	0,300	0,021	6,98
6,5	0,330	0,354	0,339	0,341	0,012	3,56
7,5	0,388	0,390	0,395	0,391	0,003	0,87
Desvio Padrão Relativo (Precisão intradia)						**5,76**

Os resultados obtidos para exatidão encontram-se a seguir, representadas pelas Tabelas 29, 30 e 31.

Tabela 29: Resultados obtidos para avaliação da exatidão no Dia 1

	Leitura no Absorção Atômica – Dia 1				
	Leitura 1	Leitura 2	Leitura 3	Leitura 4	Leitura 5
Branco	0,022	0,016	0,016	0,019	0,015
Sangue	0,114	0,12	0,114	0,1121	0,12
0,5	0,137	0,135	0,136	0,144	0,138
1,5	0,17	0,173	0,169	0,182	0,17
2,5	0,206	0,206	0,209	0,202	0,204
3,5	0,229	0,238	0,244	0,231	0,233
4,5	0,259	0,265	0,274	0,267	0,27
5,5	0,299	0,299	0,302	0,301	0,289
6,5	0,35	0,33	0,328	0,327	0,335
7,5	0,392	0,389	0,385	0,386	0,39

Tabela 30: Resultados obtidos para avaliação da exatidão no Dia 2

	Leitura no Absorção Atômica – Dia 2				
	Leitura 1	Leitura 2	Leitura 3	Leitura 4	Leitura 5
Branco	0,018	0,017	0,017	0,015	0,013
Sangue	0,133	0,135	0,128	0,137	0,135
0,5	0,162	0,163	0,16	0,162	0,163
1,5	0,189	0,197	0,192	0,188	0,195
2,5	0,231	0,228	0,227	0,229	0,23
3,5	0,26	0,262	0,263	0,26	0,263
4,5	0,299	0,304	0,294	0,296	0,297
5,5	0,32	0,318	0,327	0,32	0,323
6,5	0,36	0,361	0,351	0,351	0,353
7,5	0,391	0,391	0,393	0,389	0,387

Tabela 31: Resultados obtidos para avaliação da exatidão no Dia 3

Leitura no Absorção Atômica – Dia 3					
	Leitura 1	**Leitura 2**	**Leitura 3**	**Leitura 4**	**Leitura 5**
Branco	0,015	0,017	0,019	0,019	0,024
Sangue	0,11	0,115	0,099	0,113	0,116
0,5	145	0,139	0,143	0,145	0,147
1,5	0,167	0,163	0,166	0,159	0,164
2,5	0,196	0,192	0,191	0,189	0,199
3,5	0,207	0,211	0,217	0,214	0,212
4,5	0,24	0,255	0,243	0,249	0,24
5,5	0,268	0,26	0,265	0,261	0,267
6,5	0,285	0,281	0,301	0,29	0,288
7,5	0,298	0,308	0,311	0,304	0,296

A exatidão foi determinada através do EPR (erro padrão relativo) que é calculado baseado nas Concentrações nominais, ou seja, o valor teórico de cada concentração e o valor da concentração média experimental, esse valor, por sua, vez é determinado através da média do preditor oriundo das equações de todas as curvas geradas para a determinação da exatidão. Os valores usados para a determinação do CME e dos preditores que o geraram encontram-se nas tabelas a seguir.

Tabela 32: Dados obtidos no dia 1 para cálculo da exatidão

Cálculo da Exatidão no dia 1					
Concentração	**Regressão 1**	**Regressão 2**	**Regressão 3**	**Regressão 4**	**Regressão 5**
0,5	0,137	0,135	0,136	0,144	0,134
1,5	0,170	0,173	0,169	0,182	0,170
2,5	0,206	0,206	0,209	0,202	0,204
3,5	0,229	0,238	0,244	0,267	0,270
4,5	0,299	0,299	0302	0,301	0,289
5,5	0,350	0,330	0,328	0,327	0,300
6,5	0,350	0,330	0,328	0,327	0,345
7,5	0,392	0,389	0,385	0,386	0,390
Intercepto	0,112678	0,117755	0,120303	0,123952	0,114601
Inclinação	0,035642	0,034154	0,033892	0,032761	0,034630

Tabela 33: Dados obtidos no dia 2 para cálculo da exatidão

Cálculo da Exatidão no dia 2					
Concentração	**Regressão 1**	**Regressão 2**	**Regressão 3**	**Regressão 4**	**Regressão 5**
0,5	0,162	0,163	0,160	0,162	0,163
1,5	0,189	0,197	0,192	0,188	0,195
2,5	0,231	0,228	0,227	0,229	0,230
3,5	0,260	0,262	0,264	0,260	0,263
4,5	0,299	0,304	0,294	0,296	0,297
5,5	0,320	0,318	0,327	0,320	0,323
6,5	0,360	0,361	0,351	0,351	0,353
7,5	0,391	0,391	0,393	0,389	0,387
Intercepto	0,144880	0,148095	0,144589	0,1451184	0,149184
Inclinação	0,032904	0,032476	0,032821	0,0322976	0,031797

Tabela 34: Resultados da exatidão

Resultados para Exatidão - Valores de desvio padrão relativo (DPR)			
DPR - Dia 1	**DPR - Dia 2**	**DPR - Precisão intermediária**	**Limites**
12,898	3,846	2,293	20%
-7,119	5,898	3,294	15%
-2,261	1,801	2,549	15%
2,171	1,417	1,436	15%
3,091	3,799	2,305	15%
4,237	1,853	1,531	15%
2,885	1,032	0,679	15%
5,437	0,149	0,655	15%

Os resultados obtidos para exatidão estão de acordo com os limites estabelecidos nesse documento.

Dessa forma como todos os resultados avaliados foram satisfatórios, entende-se que o método analítico será considerado apto para determinação de manganês em sangue total.

5. CONCLUSÃO

A utilização da técnica de absorção atômica com forno de grafite mostrou-se uma escolha correta, não só pela referência de vários trabalhos similares que demonstraram a utilização dessa técnica com eficiência, A utilização do planejamento experimental, foi essencial para conferir robustez, precisão e acuracidade ao método, e através dela foi possível definir as características do método para obtenção dos melhores resultados.

Essa conclusão pode ser comprovada através dos resultados de validação obtidos nesse experimento. A validação bionalítica mostrou que o método é seletivo e por isso não sofre influência de outros metais ou componentes presentes na matriz, os resultados relacionados ao efeito matriz indicam que componentes presentes do sangue não interferem nos resultados, além disso a programação de limpeza do equipamento se mostrou eficiente impedindo que houvesse efeito residual entre uma injeção e outra. A avaliação da linearidade demonstrou que a variável dependente se realciona de forma satisfatória com variável independente revelando que não existe tendências na distribuição dos resíduos. Esse achado garante que toda o erro presente nos resultados são referentes ao processo analítico e podem ser considerados aleatórios. Os resultados encontrados para precisão e exatidão corroboram com a conclusão de que o planejamento expeirmental foi essencial para a definição das características do método.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1 Toxicological Profile for Manganese. Atlanta: Agency for Toxic Substances and Disease Registry. [updated 2012 Sep; cited 2019 Jul 07]. Available from: https://www.atsdr.cdc.gov/toxprofiles/tp151.pdf

2 O'Neal SL, Zheng W. Manganese Toxicity Upon Overexposure: a Decade in Review. Curr Environ Health Rep. 2015 Sep; 2(3): 315-28.

3 Fundamentos de Toxicologia de Casarett e Doul. 2ª edição. Porto Alegre: AMGH Editora Ltda; 2012. Capítulo 23, Efeitos Tóxicos dos Metais, p. 325-7.

4 Dietary Reference Intakes for Vitamin A, Vitamin K, Arsenic, Boron, Chromium, Copper, Iodine, Iron, Manganese, Molybdenum, Nickel, Silicon, Vanadium, and Zinc. Washington, DC: Institute of Medicine. Atualizada em 2001; acesso em: 2020 Mar 28. Disponível em: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK222310/pdf/Bookshelf_NBK222310.pdf

5 Brasil. Resolução da Diretoria Colegiada nº 269, de 22 de setembro de 2005. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Regulamento técnico sobre a ingestão diária recomenda (IDR) de proteína, vitaminas e minerais. Poder Executivo, Brasília, DF, Diário Oficial da União, nº 184, de 23 de setembro de 2005.

6 Nutrient Reference Values for Australia and New Zealand. Australia. Australian National Health and Medical Research Council. Atualizada em 2005, Sep 09; acesso em: 2020 Mar 28. Disponível em: https://www.nrv.gov.au/sites/default/files/content/n35-manganese_0.pdf

7 Chen P, Chakraborty S, Mukhopadhyay S, Lee E, Paoliello MMB, Bowman AB, et al. Manganese Homeostasis in the Nervous System. J Neurochem. 2015 Aug; 134(4): 601-10.

8 Crossgrove J, Zheng W. Manganese toxicity upon overexposure. NMR Biomed. 2004 Dec; 17(8): 544-53.

9 O'Neal SL, Zheng W. Manganese Toxicity Upon Overexposure: a Decade in Review. Curr Environ Health Rep. 2015 Sep; 2(3): 315-28

10 Weiss B. Economic implications of manganese neurotoxicity. Neurotoxicology. 2006 May; 27(3): 362-8

11 Wasserman GA, Liu X, Parvez F, Ahsan H, Levy D, Litvak PF, et al. Water Manganese Exposure and Children's Intellectual Function in Araihazar, Bangladesh. Environ Health Perspect. 2006 Jan; 114(1): 124-9.

12 2018 Edition of the Drinking Water Standards and Health Advisories Tables. Washington, DC. U.S. Environmental Protection Agency Washington, DC. Atualizada em 2018, March;

acesso em 2020 Mar 31. Disponível em: https://www.epa.gov/sites/production/files/2018-03/documents/dwtable2018.pdf

13 Chen P, Bornhorst J, Aschner M. Manganese metabolism in humans. Front Biosci (Landmark Ed.) 2018 Mar 1;23:1655-79.

14 Santos, L. (2019). Utilização de agrotóxicos aumenta até 700% no Brasil. *Jornal UFG*. [internet]. Atualizada em 2019, Jun 03. Acesso em: 2020, Sep 18. Disponível em: https://jornal.ufg.br/n/117073-utilizacao-de-agrotoxicos-aumenta-ate-700-no-brasil

15 Boletim 2019 [internet]. Instituto Brasileiro do Meio Ambiente (Ibama). Acesso em 2020, Oct 10. Disponível em: https://www.ibama.gov.br/relatorios/quimicos-e-biologicos/relatorios-de-comercializacao-de-agrotoxicos#historicodecomercializacao

16 Soja em números - safra 2019-2020 [internet]. Londrina. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa). Acesso em 2020, Oct 10. Disponível em: https://www.embrapa.br/soja/cultivos/soja1/dados-economicos

17 Ramos TD. Avaliação da exposição ambiental ao manganês na população residente no entorno de um estaleiro no município de Angra dos Reis, RJ [dissertação]. Rio de Janeiro: Escola Nacional de Saúde Pública Sérgio Arouca; 2013.

18 Moreira MFR, Ferreira AP, Araújo UC de. Determinação dos níveis de exposição de metais em trabalhadores da construção naval: impactos e desafios. Revista Brasileira de Medicina do Trabalho. 2016; 14(1).

19 Nunes JA, Batista BL, Rodrigues J. A simple method based on ICP-MS for estimation of background levels of arsenic, cadmium, copper, manganese, nickel, lead, and selenium in blood of the Brazilian population. J Toxicol Environ Health A. 2010; 73(13-14):878-87.

20 Skoog DA, Holler FJ, Nieman TA. Princípios da Análise Instumental 5ª Edição. Porto Alegre: Artmed Editora S.A.; 2002. Capítulo 9, Espectrometria de Absorção Atômica e de Fluorescência Atômica, p. 194-214.

21 Krug FJ, Nóbrega J de A, Oliveira PV de. Espectrometria de Absorção Atômica - Atomização eletrotérmica em forno de grafite. ASSOCIAO BRASILEIRA DE QUMICA. 2007; 1.

22 FDA Guidance for industry.PAT – A framework for innovative pharmaceutical development, manufacturing and quality assurance. Center of drug evaluation and research, U.S.Food and Drug Administration, Rockville, MD, USA, 2004.

23 ICH. International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use. ICH harmonized tripartide guide. Pharmaceutical development Q8 (R2). ICH, 2009.

24 EMEA. European Medicines Agency. Guideline on bioanalytical method validation. 2011 July 21; Rev.1 Corr. 2. Disponível em: https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/guideline-bioanalytical-method-validation_en.pdf

25 Brasil. Resolução da Diretoria Colegiada - RDC nº 27 de 17de maio de 2012. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Dispõe sobre os requisitos mínimos para a validação de métodos bioanalíticos empregados em estudos com fins de registro e pós-registro de medicamentos. Poder Executivo, Brasília, DF, Diário Oficial da União, nº 98, seção 1, página 93, de 22 de maio de 2012.

7. ANEXOS

Tabela 35: Valores de Temp. e tempo de pirólise, Temp. de atomização e concentração de modificador utilizados no planejamento experimental

Experimento	Temperatura de pirólise (°C)	Temperatura de atomização (°C)	Tempo de pirólise (s)	Concentração de modificador (%v v^{-1})	Absorbância (média)
1	800	1400	10	0	0,0470
2	1200	1400	10	0	0,0465
3	800	2200	10	0	0,1145
4	1200	2200	10	0	0,1200
5	800	1400	10	0,4/0,2	0,0130
6	1200	1400	10	0,4/0,2	0,0135
7	800	2200	10	0,4/0,2	0,1130
8	1200	2200	10	0,4/0,2	0,1240
9	800	1400	30	0	0,0480
10	1200	1400	30	0	0,0345
11	800	2200	30	0	0,1185
12	1200	2200	30	0	0,0875
13	800	1400	30	0,4/0,2	0,0150
14	1200	1400	30	0,4/0,2	0,0115
15	800	2200	30	0,4/0,2	0,1205
16	1200	2200	30	0,4/0,2	0,1220
17	800	1800	20	0,2/0,1	0,113
18	1200	1800	20	0,2/0,1	0,1130
19	1000	1400	20	0,2/0,1	0,0200
20	1000	2200	20	0,2/0,1	0,1360
21	1000	1800	20	0	0,1240
22	1000	1800	20	0,4/0,2	0,1020
23	1000	1800	10	0,2/0,1	0,1195
24	1000	1800	30	0,2/0,1	0,1210
25	1000	1800	20	0,2/0,1	0,1190
26	1000	1800	20	0,2/0,1	0,1280
27	1000	1800	20	0,2/0,1	0,1205
28	1000	1800	20	0,2/0,1	0,1215
29	1000	1800	20	0,2/0,1	0,1265

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Avaliação das Condições de Saúde de agricultores com exposição prolongada e contato direto a agrotóxicos de municípios da região Norte do estado de Mato Grosso

Pesquisador: angelo zanaga trapé
Área Temática:
Versão: 1
CAAE: 56715216.9.0000.5404
Instituição Proponente: Faculdade de Ciências Medicas - UNICAMP
Patrocinador Principal: ASSOCIACAO NACIONAL DE DEFESA VEGETAL

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.611.421

Apresentação do Projeto:

Os agrotóxicos são substâncias químicas amplamente utilizadas na produção agrícola brasileira. São produtos tóxicos que podem causar efeitos na saúde humana dependendo de como os agricultores (as) se expõem aos mesmos (1,2,3,4). A produção de grãos no estado do Mato Grosso na maioria dos municípios utiliza tecnologia de aplicação de agrotóxicos altamente tecnificada com insumos mecânicos de última geração o que pode indicar que a exposição dos agricultores (as) com contato direto aos produtos químicos seja em níveis de baixa preocupação em termos de saúde individual e coletiva Esta realidade que compõe o denominado agronegócio brasileiro do Centro Oeste é predominantemente de grandes propriedades e de grandes corporações empresarias que pode indicar uma maior organização do trabalho rural com normas e orientações técnicas na aplicação dos agrotóxicos determinando uma mínima exposição humana aos produtos químicos Coexistem, dentro desta realidade, produtores menores e também assentamentos rurais nos quais o acesso a tecnologias modernas e cumprimento de orientações técnicas e de proteção individual e coletiva sejam mais reduzidas o que poderia indicar uma maior exposição aos agrotóxicos e um impacto na saúde dos agricultores (as) com contato direto aos produtos. Na produção de grãos e algodão são utilizados inseticidas de vários grupos entre eles os organofosforados e carbamatos, fungicidas, nematicidas e principalmente os herbicidas glifosato

e paraquate considerados fundamentais na produção agrícola do estado. A aplicação dos mesmos é praticamente anual pela sucessão de cultivos produzidos nesse segmento. A utilização correta dos agrotóxicos em geral e principalmente dos herbicidas paraquate e glifosato de acordo com as orientações técnicas de preparo e aplicação dos produtos, não tem demonstrado efeitos na saúde de agricultores com contato direto (5,6,7) O estado do Mato Grosso se compõe de municípios com grande produção dessas lavouras.

Hipótese: Exposição de longo prazo a múltiplos agrotóxicos em agricultores (as) com contato direto sem orientação técnica, organização de trabalho e proteção individual, pode determinar impactos na saúde. Produção agrícola tecnificada, com orientação técnica, organização do trabalho e proteção individual reduz exposição aos agrotóxicos e evita impactos na saúde dos agricultores (as) do estado do Mato Grosso.

Metodologia Proposta: Serão capacitados profissionais de saúde dos municípios envolvidos para a realização das entrevistas utilizando ficha de investigação clinico epidemiológica padronizada pelo Programa de Atenção à Saúde de Populações Expostas a Agrotóxicos da Unicamp. A capacitação será de responsabilidade do coordenador do projeto Prof. Dr. Angelo Zanaga Trapé. Serão capacitados também a aplicar o Teste de Audit para alcoolismo.Serão capacitados 3 bioquímicos de laboratório a ser designado pelos municípios paraa dosagem da acetilcolinesterase eritrocitária pelo método EQM sendo que o equipamento (espectrofotômetro portátil) ficará em comodato naquele laboratório.A capacitação será de responsabilidade do Prof. Dr. Paulo César Pires Rosa e da bióloga sanitarista Siomara Jacobucci dretor adjunto e responsável técnica do Laboratório de Análises Toxicológicas em Matrial Biológico(LABTOX) da Faculdade de Ciências Médicas(FCM) da Unicamp.A avaliação clínica além da entrevista será feita com medidas de peso e altura para definição do Indice de Massa Corporal(IMC) medida de pressão arterial.Será coletado sangue para dosagem de marcadores de efeito: hemograma completo, perfil hepático, perfil renal, TSH e T4 e confundidores(diabetes esíndrome metabólica), glicemia,colesterol e frações.Os casos considerados suspeitos serão avaliados por profissional médico a ser designado pelos municípios envolvidos e as avaliações serão feitas seguindo protocolo padronizado pelo Ambulatório de Toxicologia do Hospital das Clínicas da Unicamp sob coordenação do Prof. Dr. Angelo Zanaga Trapé.Os casos de morbidades identificadas e não inferidas pelos participantes serão encaminhadas para os Programas de Saúde da Família dos municípios envolvidos.A organização das equipes de entrevistadores e coletas de material biológico e o cronograma será de

resonsabilidade das Secretarias de Saúde e Agricultura dos municípios envolvidos.Após a tabulação e analise dos resultados conjunta da coordenação do projeto com os gestores municipais de saúde e Agricultura será feita a devolutiva pública aos participantes e municípios.

Critério de Inclusão: Serão participantes somente agricultores(as) nas faixas de 20 a 40 anos e 40 a 60 anos com exposição prolongada e contato direto.

Critério de Exclusão: Serão excluidos agricultores(as) que possam ter trabalhado com agrotóxicos mas sem contato atual .

Metodologia de Análise de Dados: Os dados consolidados em planilha Excel serão encaminhados para análise e representação gráfica à empresa Diginotas em São Paulo-SP.Os dados serão digitados pelo software estatístico EpiData versão 3.1 sendo o banco de dados exportados para análise mediante software estatístico SPSS(Statistical Package for Social Science) versão. Serás realizada análise de frequência absoluta, cálculo das médias, frequência mínima e máxima e desvio padrão.

Desfecho Primário: Obter dados reais sobre as condições de saúde de agricultores(as) com exposição prolongada e contato direto com agrotóxicos da região.

Desfecho Secundário: Como desdobramento da investigação prpor aos gestores municipais e estaduais a peerspectiva de implantação do Priograma de Atenção à Saúde de Populações Expostas a Agrotóxicos da região Norte do estado e de outras regiões do Mato Grosso.

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Primário: Avaliar o nível de exposição de agricultores (as) ,com exposição prolongada(mais de 1 ano pelo menos)e de contato direto a agrotóxicos , nas faixas etárias de 20 a 40 e de 40 a 60 anos, sendo no mínimo 90% homens e 10 % mulheres do estado do Mato Grosso.

Objetivo Secundário: Obter dados sobre agrotóxicos mais utilizados, tecnologias de aplicação, uso de equipamentos de proteção individual, comorbidades mais prevalentes

Avaliação dos Riscos e Benefícios:
Segundo informações do pesquisador:

Riscos: Os riscos são mínimos de uma punção venosa podendo mesmo com pressão local e stop blood ter leve sangramento ou hematoma local.

Benefícios: Oportunidade de gerar dados reais sobre as condições de saúde de agricultores(as)com exposição prolongada e contato direto em uma amostra significativa da população da região(1.000) avaliando parâmetros clínicos e laboratoriais nos principais órgãos alvo.Todos os participantes receberão os resultados individualmente e terão conhecimento das suas condições de saúde. Todos que apresentarem alguma alteração de exames ou ser suspeito de efeito relacionado aos agrotóxicos serão devidamente encaminhados a exame médico e seguimento clínico nos PSFs dos municípios envolvidos .

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:
Este protocolo se refere ao Projeto de Pesquisa intitulado "Avaliação das Condições de Saúde de agricultores com exposição prolongada e contato direto a agrotóxicos de municípios da região Norte do estado de Mato Grosso", cujo Pesquisador responsável é o Prof. Dr. Angelo Zanaga Trapé com a colaboração dos pesquisadores participante Prof. Dr. Paulo César Pires Rosa, Prof. Dr. Gabriel Fachini, Mei Ying Wang Carrara e Siomara regina Ferreira Jacobuci. A Instituição Proponente é a Faculdade de Ciências Medicas da UNICAMP. Segundo as Informações Básicas do Projeto, a pesquisa tem orçamento estimado em R$ 150.000,00 com o apoio financeiro da Associação Nacional de Defesa Vegetal e o cronograma apresentado contempla início do estudo para 30/07/2016, com término em 10/10/2016. Serão abordadas ao todo 1000 pessoas, sendo: 200 participantes do município de Lucas do Rio Verde, 200 participantes do município de Nova Mutum, 200 participantes do município de Tapurah, 200 participantes do município de Claudia e 200 participantes do município de Ipiranga do Norte as intervenções propostas para todos os municípios serão: avaliação clinico epidemiologica e coleta de sangue.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:
Foram analisados os seguintes documentos de apresentação obrigatória:
1 - Folha de Rosto Para Pesquisa Envolvendo Seres Humanos: Foi apresentado o documento "folha_rosto.pdf 03/06/2016 13:15:39" devidamente preenchido, datado e assinado.

2 - Projeto de Pesquisa: Foram analisados os documentos "mtprojetopesquisa.pdf 03/06/2016 13:17:28" e "PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_604969.pdf 03/06/2016 13:20:56". Adequado

3 - Orçamento financeiro e fontes de financiamento: Informações sobre orçamento financeiro incluídas no documento "PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_604969.pdf 03/06/2016 13:20:56" e e"mtprojetopesquisa.pdf". O projeto conta com o apoio financeiro da ASSOCIAÇÃO NACIONAL DE DEFESA VEGETAL. Adequado.

4 - Cronograma: Informações sobre o cronograma incluídas nos documentos "PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_604969.pdf 03/06/2016 13:20:56" e"mtprojetopesquisa.pdf". Adequado.

5 - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido: Foi apresentado o documento "TCLE02062016.pdf 03/06/2016 13:19:45". Adequado

6- Regulamento do biorrepositório. Adequado

7 - Outros documentos que acompanham o Protocolo de Pesquisa:

• Declaração de vínculo com a instituição (idangeloidentiddade.pdf 03/06/2016 13:19:35)

• carta de intenção de participação assinada pelo prefeito do município de Tapurah (tapurah.pdf 03/06/2016 13:19:25);

• carta de intenção de participação assinada pelo prefeito do município de Nova Mutum (nova_ade.pdf 03/06/2016 13:19:14);

•carta de intenção de participação assinada pelo prefeito do município de Lucas do Rio Verde (ucas_ade.pdf 03/06/2016 13:18:58);

•carta de intenção de participação assinada pelo prefeito do município de Ipiranga do Norte(ipiranga_adesao.pdf 03/06/2016 13:18:45);

•carta de intenção de participação assinada pelo prefeito do município de Claudia (claudia2.pdf 03/06/2016 13:18:31);

•carta informando que os exames de dosagem de manganês sérico serão realizadas e depositas no Laboratório de Análises Toxicológicas em Material Biológico (LABTOX) da FCM/Unicamp. Os respectivos municípios serão responsáveis pelo acondicionamento e envio das amostras ao LABTOX(carta_coleta.pdf 03/06/2016 13:17:55).

Recomendações:

1-Retirar do TCLE no item Responsabilidade do pesquisador a frase: "e pela CONEP, quando pertinente."

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Projeto aprovado.

Considerações Finais a critério do CEP:

- O sujeito de pesquisa deve receber uma via do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, na íntegra, por ele assinado (quando aplicável).

- O sujeito da pesquisa tem a liberdade de recusar-se a participar ou de retirar seu consentimento em qualquer fase da pesquisa, sem penalização alguma e sem prejuízo ao seu cuidado (quando aplicável).

- O pesquisador deve desenvolver a pesquisa conforme delineada no protocolo aprovado. Se o pesquisador considerar a descontinuação do estudo, esta deve ser justificada e somente ser realizada após análise das razões da descontinuidade pelo CEP que o aprovou. O pesquisador deve aguardar o parecer do CEP quanto à descontinuação, exceto quando perceber risco ou dano não previsto ao sujeito participante ou quando constatar a superioridade de uma estratégia diagnóstica ou terapêutica oferecida a um dos grupos da pesquisa, isto é, somente em caso de necessidade de ação imediata com intuito de proteger os participantes.

- O CEP deve ser informado de todos os efeitos adversos ou fatos relevantes que alterem o curso normal do estudo. É papel do pesquisador assegurar medidas imediatas adequadas frente a evento adverso grave ocorrido (mesmo que tenha sido em outro centro) e enviar notificação ao CEP e à Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA – junto com seu posicionamento.

- Eventuais modificações ou emendas ao protocolo devem ser apresentadas ao CEP de forma clara e sucinta, identificando a parte do protocolo a ser modificada e suas justificativas e aguardando a aprovação do CEP para continuidade da pesquisa. Em caso de projetos do Grupo I ou II apresentados anteriormente à ANVISA, o pesquisador ou patrocinador deve enviá-las também à mesma, junto com o parecer aprovatório do CEP, para serem juntadas ao protocolo inicial.

- Relatórios parciais e final devem ser apresentados ao CEP, inicialmente seis meses após a data deste parecer de aprovação e ao término do estudo.

-Lembramos que segundo a Resolução 466/2012 , item XI.2 letra e, “cabe ao pesquisador

apresentar dados solicitados pelo CEP ou pela CONEP a qualquer momento".

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Outros	biorrepositorio.doc	20/06/2016 10:50:56	Renata Maria dos Santos Celeghini	Aceito
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_604969.pdf	03/06/2016 13:20:56		Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE02062016.pdf	03/06/2016 13:19:45	angelo zanaga trapé	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	idangeloidentiddade.pdf	03/06/2016 13:19:35	angelo zanaga trapé	Aceito
Declaração de Pesquisadores	tapurah.pdf	03/06/2016 13:19:25	angelo zanaga trapé	Aceito
Declaração de Pesquisadores	nova_ade.pdf	03/06/2016 13:19:14	angelo zanaga trapé	Aceito
Declaração de Pesquisadores	lucas_ade.pdf	03/06/2016 13:18:58	angelo zanaga trapé	Aceito
Declaração de Pesquisadores	ipiranga_adesao.pdf	03/06/2016 13:18:45	angelo zanaga trapé	Aceito
Declaração de Pesquisadores	claudia2.pdf	03/06/2016 13:18:31	angelo zanaga trapé	Aceito
Declaração de Pesquisadores	claudia.pdf	03/06/2016 13:18:20	angelo zanaga trapé	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	carta_coleta.pdf	03/06/2016 13:17:55	angelo zanaga trapé	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	mtprojetopesquisa.pdf	03/06/2016 13:17:28	angelo zanaga trapé	Aceito
Folha de Rosto	folha_rosto.pdf	03/06/2016 13:15:39	angelo zanaga trapé	Aceito

Situação do Parecer:
Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:
Não

CAMPINAS, 28 de Junho de 2016

Assinado por:
Renata Maria dos Santos Celeghini
(Coordenador)

Endereço: Rua Tessália Vieira de Camargo, 126
Bairro: Barão Geraldo **CEP:** 13.083-887
UF: SP **Município:** CAMPINAS
Telefone: (19)3521-8936 **Fax:** (19)3521-7187 **E-mail:** cep@fcm.unicamp.br