



**INSTITUTO DE PESQUISAS ENERGÉTICAS E
NUCLEARES**

AUTARQUIA ASSOCIADA À UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

**PODEM SER OS METAIS UTILIZADOS NO
DIAGNÓSTICO DO DIABETES MELLITUS TIPO 2?**

Renata Medeiros Lobo Müller

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do grau de Mestre em Ciências na área de Tecnologia Nuclear – Materiais.

Orientador:

Prof. Dr. Jorge Eduardo de Souza Sarkis

SÃO PAULO

2008



**INSTITUTO DE PESQUISAS ENERGÉTICAS E
NUCLEARES**

AUTARQUIA ASSOCIADA À UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

**PODEM SER OS METAIS UTILIZADOS NO
DIAGNÓSTICO DO DIABETES MELLITUS TIPO 2?**

Renata Medeiros Lobo Müller

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do grau de Mestre em Ciências na área de Tecnologia Nuclear – Materiais.

Orientador:

Prof. Dr. Jorge Eduardo de Souza Sarkis

SÃO PAULO

2008

Dedico esse trabalho com
todo amor e carinho aos meus
queridos pais Ana Lúcia e
Agostinho, ao meu esposo
André e minha filha Júlia.

AGRADECIMENTOS

Ao Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares pela oportunidade de utilizar as suas dependências e favorecer mais uma meta em minha vida;

Ao meu orientador Prof. Dr. Jorge Sarkis pela orientação e confiança no meu trabalho;

A Profa. Dra. Nádia Barbosa pela cooperação e contribuição no trabalho;

Ao Prof. Dr. Nahum Alves pela ajuda incondicional na parte estatística;

Ao Hospital Universitário da Universidade Federal de Juiz de Fora, pela doação das amostras de soro para realização deste trabalho;

A todos os amigos do Laboratório de Caracterização Química (LCQ-CQMA) do IPEN, pela ajuda, apoio e descontração: João, Maurício, Marcos, Helena, Alder, Juan, e em especial a Natalie pela grande força na fase final;

Ao João Ulrich pela contribuição nas idéias e discussão sobre incertezas as medições;

Ao Maurício Kakazu pela ajuda e paciência no aprendizado com o ICP-MS;

Ao Marcos pelas dicas na formatação do meu trabalho;

A Martinha pela amizade e grande ajuda na fase final de meu trabalho;

Ao CNPq pelo apoio financeiro.

PODEM SER OS METAIS UTILIZADOS NO DIAGNÓSTICO DO DIABETES MELLITUS TIPO 2?

Renata Medeiros Lobo Müller

RESUMO

A prevalência do *diabetes mellitus* está aumentando de forma exponencial, adquirindo características epidêmicas em vários países. Nos países em desenvolvimento, particularmente, constitui-se de um grave problema de saúde pública. Dessa forma, o desenvolvimento de novas metodologias que auxiliem no diagnóstico e controle de doenças traz uma importante contribuição não somente ao tratamento de pacientes portadores desta doença como também no estabelecimento de políticas públicas de prevenção da mesma.

A presença dos metais em amostras de soro humano tem sido utilizada por diversos autores para o diagnóstico da doença. Entretanto sua interpretação constitui-se ainda um desafio. A principal razão para esta dificuldade consiste no fato de que, na maioria dos estudos encontrados na literatura, o nível de metais tanto nos pacientes como no grupo de controle estão, muitas vezes, na mesma faixa de distribuição.

Neste estudo, é discutida uma nova abordagem para a interpretação dos níveis de metais em amostras de soro de indivíduos portadores de *diabetes mellitus tipo 2* e a possibilidade de sua utilização no diagnóstico da doença.

Foram recrutados pelo Hospital da Universidade Federal de Juiz de Fora, 86 sujeitos com *diabetes mellitus* tipo 2 e 67 sujeitos controle. As amostras de sangue foram colhidas para separar o soro. Os elementos Cu, Mg, Mn, Se, V e Zn foram determinados pela da técnica de espectrometria de massa de alta resolução com fonte de plasma indutivamente acoplado. A interpretação dos dados foi realizada utilizando-se as técnicas de análise discriminante, componentes principais e de cluster.

O conteúdo de metais nas amostras analisadas foi concordante com os dados da literatura. No entanto, a principal conclusão deste estudo é que as concentrações de cada elemento, por si mesmas, não podem ser utilizadas no diagnóstico de *diabetes mellitus*. Porém, a determinação de todos os metais associados à doença e a utilização de técnicas estatísticas multivariadas podem proporcionar uma excelente alternativa para esta avaliação.

CAN METALS BE USED IN TO DIAGNOSE OF TYPE 2 DIABETES ?

Renata Medeiros Lobo Müller

ABSTRACT

The occurrence of diabetes is increasing exponentially, with taking epidemic characteristics particularly in developing countries. In developing countries, particularly, there is an indication of public health problem. Thus, developing new methodologies that help in diagnosis and disease control brings an important contribution not only to treatment of patients with this disease but also in setting public policies to prevent it.

The presence of metals in samples of human serum has been used by several authors for the diagnosis of the disease. However its interpretation is still a challenge. The main reason for this difficulty is the fact that in most studies in the literature, the level of metals in both the patients and the control group are often in the same range of distribution.

The use of the metals contents in serum samples for the diagnosis of this disease is still a challenge. The main reason for this difficulty is the fact that their levels in the patients as much as in the group of control are often in the same range of distribution.

In this study, we discussed a new approach for the interpretation of the level of metals in serum samples from subjects with of *type 2 diabetes mellitus* and possibility of its use in the diagnosis of the disease.

Serum samples of 86 subjects with *type 2 diabetes mellitus* and 67 non-diabetic control subjects recruited by the Federal University Juiz de Fora Hospital. Fasting blood samples were collected to separate the serum. The elements Cu, Mg, Se, V and Zn were measured using the high resolution inductively coupled plasma mass spectrometry technique. The interpretation of the data was performed using the techniques of discriminant analysis, principal components and cluster.

The metals contents in the analyzed samples were consistent with the literature data. However, the main conclusion of this study is that the concentrations of each element, itself, can not be used in the diagnosis of the *diabetes mellitus*. The analysis of all the metals associated to the disease and the use of multivariate statistical techniques may provide an excellent alternative to this assessment.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1. Justificativa do trabalho	1
1.2. OBJETIVOS.....	4
2. REVISÃO DA LITERATURA	4
2.1. Cobre	5
2.2. Magnésio	5
2.3. Manganês	6
2.4. Selênio	6
2.5. Vanádio	7
2.6. Zinco.....	7
3. METODOLOGIA ANALÍTICA	9
3.1. Espectrometria de massas de alta resolução com fonte de plasma indutivamente acoplado	9
3.2. Parâmetros de Validação	11
3.2.1. Linearidade	11
3.2.2. Limite de detecção	12
3.2.3. Limite de Quantificação	12
3.2.4. Exatidão	12
3.2.4.1. Materiais de referência certificados (MRC)	13
3.2.4.2. Recuperação.....	13
3.2.5. Precisão.....	14
3.2.5.1. Repetitividade.....	14
3.2.6. Incerteza	14
3.2.6.1. Diagrama de causa e efeito (espinha de peixe).....	15
3.2.6.2. Incerteza associada à concentração elementar na alíquota analisada $u(Co)$	16
3.2.6.3. Incerteza associada à massa da amostra $u(M_{amostra})$ e massa final $u(M_{final})$	18
3.2.6.4. Incerteza associada à taxa de recuperação $u(R)$:	18
3.2.6.5. Cálculo da incerteza padrão combinada	19
3.3. Análise Estatística	19
3.3.1. Análise Discriminante Stepwise.....	19
3.3.2. Análise de Componente Principal.....	20

3.3.3. Análise de Cluster.....	21
4. PARTE EXPERIMENTAL.....	21
4.1. Casuística	21
4.1.1. Ética Médica	22
4.1.2. Coleta das amostras de sangue.....	22
4.2. Materiais e Método.....	23
4.2.1. Amostras analisadas.....	23
4.2.2. Instrumentação	23
4.2.3. Balança	23
4.2.4. Micropipetas.....	23
4.2.5. Reagentes utilizados	23
4.2.6. Padrões utilizados.....	24
4.2.7. Preparação das soluções de padrões.....	24
4.2.7.1. Preparo da Solução Padrão Mãe.....	24
4.2.8. Laboratório Limpo	25
4.3. Procedimento Experimental	25
4.3.1. Preparo de amostras	25
4.3.2. Parâmetros Experimentais e Elementos Determinados pelo HR-ICPMS	25
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	26
5.1. Validação do método proposto.....	26
5.1.1. Linearidade.....	26
5.1.2. Limite de Detecção	28
5.1.3. Limite de Quantificação	28
5.1.4. Precisão.....	29
5.1.4.1. Repetitividade.....	29
5.1.5. Recuperação	30
5.1.6. Análise do material de referência por HR-ICPMS	31
5.1.7. Fontes de Incertezas e suas respectivas incertezas padrão	31
5.2. Análise Estatística dos Dados	40
5.3. Análise Estatística Multivariada.....	47
5.3.1. Análise Discriminate <i>Stepwise</i> (AD)	47
5.3.2. Análise de Componentes Principais (ACP)	48
5.3.3. Análise de Cluster (AC).....	49
5.3.4. Correlações entre metais e dados clínicos	51

6. CONCLUSÕES	55
ANEXOS	57
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	60

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - Concentração dos metais (Média \pm SD) em soro de acordo com a literatura	3
TABELA 2 - Massas necessárias para obter 100 g da solução mãe.....	24
TABELA 3 - Parâmetros operacionais.....	25
TABELA 4 - Linearidade para o cobre (Cu).....	26
TABELA 5 - Linearidade para o magnésio (Mg).....	26
TABELA 6 - Linearidade para o manganês (Mn).....	27
TABELA 7 - Linearidade para o selênio (Se)	27
TABELA 8 - Linearidade para o vanádio (V).....	27
TABELA 9 - Linearidade para o zinco (Zn)	28
TABELA 10 - Limite de detecção calculado para o método proposto	28
TABELA 11 - Limite de quantificação para o método proposto	29
TABELA 12 - Resultados obtidos da precisão na solução padrão P1.....	29
TABELA 13 - Resultados obtidos da precisão na solução padrão P2.....	30
TABELA 14 – Média do recuperado (ng g^{-1}) \pm SD	30
TABELA 15 - Valores obtidos para o material de referência, por HR-ICPMS.....	31
TABELA 16 - Valores intermediários e incertezas na determinação do cobre.....	32
TABELA 17- Valores intermediários e incertezas na determinação do magnésio	32
TABELA 18- Valores intermediários e incertezas na determinação do manganês	33
TABELA 19- Valores intermediários e incertezas na determinação do selênio	33
TABELA 20- Valores intermediários e incertezas na determinação do vanádio.....	34
TABELA 21- Valores intermediários e incertezas na determinação do zinco.....	34
TABELA 22– Concentrações médias dos elementos traço em soro de sujeitos diabéticos (n = 86) e de controle (n= 67) e desvio padrão	40
TABELA 23 – Classificação da matriz obtida por DA para 153 amostras de soro humano ...	48
TABELA 24 – Média e desvio padrão das características descritivas e elementos traços nos sujeitos em estudo.....	52

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 - Diagrama básico de um espectrômetro de massas com fonte de plasma indutivamente acoplado.....	9
FIGURA 2 - Esquema básico do HR-ICPMS com geometria Nier-Johnson reversa.	10
FIGURA 3 - Diagrama de causa e efeito para o procedimento analítico na determinação dos elementos de interesse em amostras de soro humano.....	16
FIGURA 4 - Contribuição individual na concentração de cobre	35
FIGURA 5 - Contribuição individual na concentração de zinco	35
FIGURA 6 - Contribuição individual na concentração de magnésio.....	36
FIGURA 7 - Contribuição individual na concentração de manganês	36
FIGURA 8 - Curva analítica para o manganês.....	37
FIGURA 9 - Incerteza para a concentração do manganês.....	37
FIGURA 10 - Contribuição individual na concentração de selênio.....	38
FIGURA 11-Contribuição individual na concentração de vanádio	38
FIGURA 12-Curva analítica para o vanádio	39
FIGURA 13 - Incerteza para a concentração do vanádio.....	39
FIGURA 14 – Boxplot das concentrações do elemento cobre (1: diabéticos e 2: controle)...	40
FIGURA 15 – Boxplot das concentrações do elemento magnésio (1: diabéticos e 2: controle).	41
FIGURA 16 – Boxplot das concentrações do elemento manganês (1: diabéticos e 2: controle).	42
FIGURA 17 – Boxplot das concentrações do elemento selênio (1: diabéticos e 2: controle).	43
FIGURA 18 – Boxplot das concentrações do elemento vanádio (1: diabéticos e 2: controle).	43
FIGURA 19 – Boxplot das concentrações do elemento zinco (1: diabéticos e 2: controle)...	44
FIGURA 20 - Concentração de zinco em sujeitos diabéticos e controle.	45
FIGURA 21 - Concentração de magnésio em sujeitos diabéticos e controle.....	45
FIGURA 22 - Concentração de vanádio em sujeitos diabéticos e controle.	45
FIGURA 23 – Razão Cu/Zn em sujeitos diabéticos e controle.....	46
FIGURA 24 - Concentração de selênio (ng g^{-1}) em função da concentração de vanádio.....	47
FIGURA 25 – Escore plotado em duas dimensões para amostras de sujeitos diabéticos.....	49
FIGURA 26 – Escore plotado em duas dimensões para amostras de sujeitos diabéticos e sujeitos controle e dados da literatura.....	49
FIGURA 27 – Dendrograma da AC para discriminação entre sujeitos diabéticos (1) e sujeitos controle (2)	50

FIGURA 28 – (a) Glicose: Grupo 1 - sujeitos diabéticos e, Grupo 2 - sujeitos controle; (b)
Leptina: Grupo 1 - sujeitos diabéticos e, Grupo 2 - sujeitos controle. 54

1. INTRODUÇÃO

1.1. Justificativa do trabalho

A American Diabetes Association (ADA) define *diabetes mellitus* como um grupo de doenças metabólicas, caracterizadas por hiperglicemia decorrente de defeitos na ação e secreção da insulina, ou ambos os mecanismos. A classificação etiológica do diabetes abrange os seguintes tipos: diabetes tipo 1; diabetes tipo 2; diabetes gestacional; e outros tipos específicos relacionados com defeitos genéticos da função das células β (beta) ou defeitos genéticos da ação da insulina, como: doença do pâncreas exócrino, endocrinopatias, infecções, indução química ou via drogas e associação com outras síndromes genéticas (1).

A síndrome metabólica representa uma situação clínica caracterizada por um agrupamento de fatores de risco para doença cardiovascular, entre eles, a hipertensão arterial, a dislipidemia, a obesidade visceral e as manifestações de disfunção endotelial. Está associada a aumento de risco de evento cardiovascular a longo prazo, assim como o desenvolvimento de *diabetes mellitus tipo 2*. A presença de resistência à ação da insulina tem sido considerada um fator fisiopatogênico importante. Não está ainda definido qual é a melhor definição operacional da síndrome metabólica para ser utilizada na prática clínica. A definição ideal deveria levar em conta a aplicabilidade clínica e o desenvolvimento de desfechos. A partir de 1999 foi sugerido, pela Organização Mundial da Saúde (OMS), uma definição baseada em dados clínicos e laboratoriais que podem ser medidos com relativa facilidade (glicemia de jejum, resistência à ação da insulina, pressão arterial, circunferência da cintura e do quadril, índice de massa corporal, triglicérides, HDL, microalbuminúria). Em 2001, o *National Cholesterol Education Program-Adult Treatment Panel III* (NCEP) propôs uma série de critérios semelhantes, porém mais simples de serem avaliados, os quais incluem: glicemia de jejum, pressão arterial, cintura, triglicérides e HDL. Outras definições surgiram com a *American Association of Clinical Endocrinologists* (AACE) e o *European Group for the Study of Insulin Resistance* (EGIR), mas a da OMS e a do NCEP são as mais frequentemente utilizadas (2).

A prevalência do *diabetes mellitus* está aumentando de forma exponencial, adquirindo características epidêmicas em vários países, particularmente nos países em desenvolvimento. No Brasil, a prevalência do diabetes e a tolerância à glicose em população urbana, entre 30 a 69 anos de idade, é de 7,6 e 7,8% respectivamente, constituindo-se de um grave problema de saúde pública (3).

O *diabetes mellitus tipo 2* ocorre quando o pâncreas perde a capacidade de produzir a quantidade adequada de insulina. A insulina auxilia a entrada do açúcar nas células e controla sua taxa no sangue. Quando o organismo não produz insulina suficiente ou tem problema para usá-la adequadamente, as células não absorvem suficientemente açúcar do sangue. O resultado é uma alta na taxa de açúcar no sangue. Representa aproximadamente 90% dos casos de diabetes e aparece geralmente após os 40 anos de idade. Embora a idade, o histórico familiar, dentre outros fatores não modificáveis, possam estar presentes, na realidade os fatores modificáveis para este tipo de diabetes é que devem ser alvo de intervenção destacando-se a obesidade e o sedentarismo (4).

Os sintomas clássicos de diabetes são: poliúria, polidipsia, polifagia e perda involuntária de peso (os “4Ps”). Outros sintomas que levam à suspeita clínica são: fadiga, fraqueza, letargia, prurido cutâneo e vulvar, balanopostite e infecções de repetição. O diagnóstico é estabelecido a partir de complicações crônicas como neuropatia, retinopatia ou doença cardiovascular aterosclerótica (5). Entretanto, como já mencionado, o diabetes é assintomático em proporção significativa dos casos, a suspeita clínica ocorrendo então a partir de fatores de risco para o diabetes como glicemia de jejum e/ou teste de tolerância à glicose. Alguns casos serão confirmados como portadores de diabetes, outros apresentarão alteração na regulação glicêmica (tolerância à glicose diminuída ou glicemia de jejum alterada), o que confere maior risco de desenvolver diabetes. A caracterização do grau de risco ainda não está padronizada. Para merecer avaliação laboratorial e colocar um paciente assintomático sob suspeita, alguns autores sugerem a presença de vários dos fatores de risco. A tendência crescente é a de se usar um escore de fatores de risco, semelhante aos empregados na avaliação do risco cardiovascular (6).

Nós últimos anos, os metais foram identificados como elementos essenciais que desempenham um papel importante na origem e progressão de várias doenças (7,8).

Vários estudos foram publicados sobre alterações no metabolismo dos elementos traços em sujeitos diabéticos. Alterações no metabolismo de elementos essenciais, como cobre (Cu), magnésio (Mg), manganês (Mn), selênio (Se), vanádio (V) e zinco (Zn) têm sido associados com a resistência à insulina, e intolerância a glicose em animais e seres humanos (9-17). Por essa razão, a determinação de metais em soro humano tem sido estudada como um parâmetro no monitoramento do controle metabólico da população em doenças como *diabetes tipo 2* (18-21).

O uso do conteúdo de metais em amostras de soro para o diagnóstico de doenças ainda é um desafio. A principal razão para esta dificuldade é o fato de que o nível de metais tanto

nos sujeitos diabéticos quanto nos sujeitos controle ser muitas vezes na mesma ordem de grandeza (TAB.1) podendo assim levar a interpretações errôneas, dessa forma uma avaliação mais rigorosa desses valores deve ser feita.

TABELA 1 - Concentração dos metais (Média \pm SD) em soro de acordo com a literatura

Elemento	Sujeitos diabéticos ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Sujeitos controle ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Referência
Cu	1054,93 \pm 0,8	840 \pm 0,6	(9)
	1287,52 \pm 8,06	930,37 \pm 4,68	(10)
Zn	930,68 \pm 5,6	1076 \pm 6,32	(10)
	943,95 \pm 0,53	1241,37 \pm 1,18	(11)
Mg	12000,0-16800,0	15600,0-22080,0	(12)
	16800,0 \pm 1,64	22080,0 \pm 0,62	(12)
	18960,0 \pm 0,29	24000,0 \pm 0,43	(10);(11)
Mn	1,38	1,37	(22)
Se	15,4-118,5	30,2-175	(14)
	64,9 \pm 22,8	74,9 \pm 27,3	(14)
V	78	95	(15)
	-	0,80	(17)

As principais técnicas utilizadas nas determinações de elementos metálicos em amostras de soro são: espectrometria de absorção atômica (AAS), análise por ativação neutrônica (NAA), espectrometria de emissão ótica com fonte de plasma indutivo (ICPOES) e a espectrometria de massa com fonte de plasma indutivamente acoplado (ICPMS) (23). Estas técnicas baseiam-se em princípios diferentes apresentando vantagens, desvantagens e limitações dependendo da matriz, do elemento a ser medido e também do seu nível de concentração.

A espectrometria de absorção atômica é normalmente mono elementar, apresentando limites de detecção da ordem de $\mu\text{g g}^{-1}$ a ng g^{-1} , dependendo do elemento. Quando acoplado a fornos de grafite (GF-AAS) esta é uma técnica rápida, robusta, com metodologias bem estabelecidas podendo atingir limites de detecção na ordem ng kg^{-1} para a maioria dos elementos. Sua principal vantagem consiste na seletividade produzindo espectros com baixos níveis de interferência. Mais recentemente sistemas multielementares foram desenvolvidos (FS-AAS ou absorção atômica *fast sequential*), nos quais é possível analisar alguns elementos de forma seqüencial em uma corrida (24). Apesar disso, a determinação de um conjunto grande de elementos requer a troca de lâmpadas e a realização de várias medições, aumentando o tempo e a quantidade de material consumido em uma análise.

A NAA é capaz de analisar amostras sólidas, fornecendo altos níveis de precisão e exatidão comparada a outras técnicas analíticas para a determinação de elementos traço. A

grande desvantagem desta técnica é a necessidade de se utilizar um reator nuclear nas suas determinações (25).

A ICPOES é uma técnica multielementar que fornece resultados rápidos com boa precisão (26). No entanto, as interferências espectrais podem ser altas para alguns elementos e os limites de detecção ainda são maiores dos que os alcançados pelos espectrômetros de massas (ICPMS).

A ICPMS é uma das técnicas mais sensíveis de análise multielementar da atualidade, fornecendo limites de detecção da ordem de pg kg^{-1} . Esta técnica é capaz de medir quase todos os elementos da tabela periódica simultaneamente de forma rápida e precisa (23).

1.2. Objetivos

Este trabalho apresenta três objetivos: determinação de metais a níveis de ultratraços (ng g^{-1}) em soro de sujeitos portadores de *diabetes mellitus tipo 2* e sujeitos controle através de uma metodologia baseada na técnica de espectrometria de massas de alta resolução com fonte de plasma acoplado indutivamente (HRICP-MS). O segundo consiste em correlacionar os dados obtidos com informações levantadas no estudo epidemiológico dos pacientes, procurando identificar possíveis correlações entre a presença desses metais e os principais sintomas da doença identificados no grupo de estudo. E por fim, a partir dos estudos anteriores, verificar a possibilidade de utilizar os metais em um procedimento de prognóstico, diagnóstico e acompanhamento da doença.

2. REVISÃO DA LITERATURA

Os metais são elementos importantes na manutenção da vida, participam de processos fisiológicos essenciais para o metabolismo protéico e lipídico, reações enzimáticas e são componentes essenciais de muitas enzimas, as chamadas metaloenzimas, que estão envolvidas na síntese, na regeneração e na degradação de moléculas biológicas, assim como na liberação e no reconhecimento de certas moléculas sinalizadoras biológicas e, por fim, na transferência de pequenas moléculas e elétrons e processos cruciais como a respiração. Desta forma, os metais, quando presentes no corpo humano, em falta ou em excesso, podem refletir, ou induzir os mais variados tipos de doenças, bem como alterações em metabolismos essenciais (8). No caso do *diabetes mellitus tipo 2*, os teores de alguns metais como Cu, Mg, Mn, Se, V e Zn podem influenciar de forma decisiva nos níveis de homeostase de glicose (9-17).

2.1. Cobre

O cobre (Cu) é um metal encontrado na ordem de 0,01- 100 $\mu\text{g g}^{-1}$ com importância biológica, funcional e estrutural. Em animais e humanos, a sua importância está relacionada com as funções metabólicas de enzimas dependentes de Cu (cuproenzimas), como por exemplo: citocromo oxidase, superóxido dismutase citosólica, lisil oxidase, tirosinase, ceruloplasmina, e dopamina β - hidroxilase. Estas enzimas catalisam reações fisiológicas importantes relacionadas com a fosforilação oxidativa, inativação de radicais livres, biossíntese de colágeno e elastina, formação de melanina e coagulação sanguínea, metabolismo do ferro e síntese de catecolaminas (27).

Fatores endógenos e alguns componentes dietéticos influenciam de formas distintas a captação de cobre pelo lúmen intestinal. As proteínas, D e L- aminoácidos, citrato e fosfatos aumentam esta captação, e outros como fibras, fufato, ácido ascórbico, tiomolibdato e zinco influenciam negativamente, tanto por processos de complexação que limitam a absorção, como por mecanismos antagônicos como no caso da interação zinco-cobre (28,29).

Neste contexto, o tipo de carboidrato da dieta consitui também um fator importante na utilização do cobre, sendo a frutose o mais investigado, principalmente em estudos de deficiência deste mineral (30).

As implicações patogênicas das alterações do estado nutricional do Cu no diabetes, ainda não estão bem claras, principalmente se elas ocorrem por deficiência ou excesso deste metal. Baseado neste estudo, o nível de Cu circulante mostrou-se aumentado, mas isto não implica em um estado nutricional adequado de Cu. Este distúrbio pode ser proveniente de alterações na absorção e circulação de cobre, podendo levar a um aumento da peroxidação lipídica, contribuindo assim para o surgimento ou aumento das complicações vasculares do diabetes (21).

2.2. Magnésio

O magnésio (Mg) é um importante cátion intracelular que está distribuído em três principais compartimentos: ossos (65%), espaço intracelular (34%) e fluido extracelular (1%) (31) e é o cofator de aproximadamente 300 reações enzimáticas, principalmente das que utilizam ligação fosfato de alta energia. Dessa forma, o Mg participa de inúmeros processos metabólicos, inclusive daqueles ligados ao metabolismo de carboidratos envolvidos na regulação da secreção e ação da insulina (32).

O Mg está relacionado ao metabolismo de carboidratos e de gordura. A baixa

concentração do magnésio no soro tem sido encontrada nos pacientes sob tratamento em longo prazo com insulina e naqueles que se recuperam da cetoacidose (18).

Há possibilidade de que a hipomagnesemia possa ser usada como indicador ou marcador da doença (13,32). A causa desta hipomagnesemia não é plenamente conhecida, tendo como possíveis mecanismos: (1) perda acelerada do Mg na urina devido à ação osmótica da glicosúria; e (2) depressão da reabsorção da rede tubular do magnésio devido a própria hiperglicemia.

O Mg pode também exercer papel na liberação de insulina. O esgotamento do Mg tem um potencial aterogênico. Os pacientes com infarto do miocárdio tiveram a reversão de testes padrões anormais de lipoproteína ao normal, após administração do Mg (18).

Guerrero- Romero *et al.*, (13), demonstrou a correlação da deficiência de magnésio e resistência à insulina, em que numa população de 192 pacientes com síndrome metabólica, 65,6% de hipomagnesemia, comparada com 4,9% no grupo controle.

2.3. Manganês

O manganês (Mn) está concentrado na hipófise, fígado, pâncreas, e glândulas mamárias, e é um elemento essencial, para a estrutura óssea normal, reprodução e função do sistema nervoso central.

O Mn é necessário para o desenvolvimento da síntese normal de insulina e secreção. Alterações no metabolismo do Mn também têm sido aplicadas na intolerância à glicose (33).

As concentrações em soro não mostraram diferença estatística significativa em sujeitos diabéticos ($1,38 \mu\text{g L}^{-1}$) e controle ($1,17 \mu\text{g L}^{-1}$) (22). Segundo Ekmekcioglu *et al.*, (16), a concentração de Mn nos linfócitos de sujeitos diabéticos tipo 2 é menor em relação ao do controle.

2.4. Selênio

O selênio (Se) é um elemento químico encontrado em quantidades de traço no corpo humano e tem um largo número de funções biológicas no organismo humano. A mais importante e conhecida ação é a antioxidante, especialmente quando combinado com a vitamina E por via da enzima glutatona peroxidase, sendo esta responsável pela defesa do organismo contra os radicais livres (33).

Alterações na homeostase do Se têm sido associadas ao diabetes mellitus. Um aumento da peroxidação lipídica e redução do status antioxidante podem contribuir para o desenvolvimento de complicações em diabetes (7).

O controle de Se na produção de radicais livres tem benefício na prevenção da intolerância à glicose e complicações do *diabetes mellitus*. Estudos *in vitro* utilizando adipócitos têm demonstrado efeitos de Se na insulina (translocação de transportadores de glicose para a membrana plasmática). O efeito aparece de imediato via fosforilação nos resíduos de tirosina (34).

A suplementação com selenato ou selenometionina + acetato de tocoferol diminuiu níveis de glicose no plasma de ratos diabéticos. Isto também tem sido observado em seres humanos diabéticos. O selênio induz uma melhoria sustentável da homeostase glicose em indivíduos diabéticos com a ação da insulina (7).

2.5. Vanádio

O vanádio (V) existe em dois principais estados de oxidação em fluidos biológicos: vanadato (+5) e vanadil (+4) (34) que coexistem em equilíbrio e são regulados pela tensão do oxigênio, acidez e presença de agentes redutores como, por exemplo, ascorbato, glutatona e catecolaminas. O vanádio presente no corpo é armazenado nos ossos, rim e fígado (35).

O vanádio atua provavelmente em nível de pós receptor e pode mimetizar a ação da insulina. O vanádio estimula a síntese do glicogênio no fígado, músculos esqueléticos e adipócitos contribuindo para o controle da glicemia (34).

Compostos de vanádio, a exemplo vanadato, provaram ser eficiente em modelos com *diabetes tipo 2*, sendo capaz de normalizar a concentração de glicose e de reduzir a hiperinsulinemia e os níveis de triacilgliceróis no plasma (35).

Estudos realizados em humanos, por curto período de tempo, com metavanadato de sódio verificaram melhora na sensibilidade da insulina em pacientes diabéticos tipo 2 e alguns do tipo 1 (34). Esta melhora foi relacionada principalmente com o aumento da captação de glicose nos tecidos periféricos, visto que não houve alteração na produção de glicose hepática.

Embora o mecanismo de ação dos compostos de vanádio não esteja totalmente esclarecido, sabe-se que seus efeitos semelhantes aos da insulina não seguem exatamente a mesma via de sinalização da insulina. Sendo assim, os sais de vanádio podem ser importantes agentes farmacológicos em doenças onde a ação da insulina não seja satisfatória (35).

2.6. Zinco

O zinco é componente de várias enzimas e participa de vias metabólicas que envolvem a síntese de proteínas, metabolismo de carboidratos, de lipídeos e de ácidos nucléicos (1).

Muitos dados da literatura sugerem que um metabolismo anormal do Zn participa da

patogênese do diabetes e de algumas de suas complicações. A insulina é estocada nas células β (beta) do pâncreas na forma de cristal hexamérico, contendo um número variável de moléculas de Zn. Além da função estrutural, o Zn também se relaciona com a modulação da ação da insulina (1).

Nos últimos anos, a deficiência de zinco tornou-se um problema nutricional em diversos países. Esta deficiência tem como causas a ingestão dietética inadequada, diminuição na absorção ou aumento na excreção urinária, presença de agentes na dieta que comprometem sua absorção, cirurgias do intestino, síndromes de má-absorção, doenças renais, doença crônica do fígado, abuso do álcool, nutrição parenteral total sem adição de zinco, e ainda, problemas genéticos (36).

A relação do Zn com o *diabetes mellitus* (DM), especificamente, baseia-se no fato de que este mineral desempenha inúmeras funções orgânicas, que se encontram normalmente alteradas neste grupo de pessoas, tais como crescimento, maturação sexual, cicatrização, capacidade visual e função imune (37).

Especulações sobre o agravamento do estado nutricional de Zn em sujeitos portadores do *diabetes mellitus* são fundamentadas por estudos que mostram a correlação negativa entre Zn no soro e tempo da doença (1). A deficiência de Zn em diabéticos está associada com a baixa concentração de Zn em linfócitos, granulócitos, plaquetas e no plasma (38).

A timulina, um hormônio importante para a maturação e a diferenciação de linfócitos T, é considerada um biomarcador da atividade biológica do Zn e em situação de concentrações limítrofes deste em tecidos humanos, tem-se apresentado com atividade reduzida. Este aspecto é de importância, uma vez que os pacientes diabéticos geralmente apresentam alterações imunológicas (1).

Um fator que está associado à deficiência de Zn em diabéticos, é a alta excreção de zinco pela urina. Estudos com humanos sugerem que a zincúria poderia estar sob o controle poligênico. A excreção urinária do zinco parece ser controlada por fenótipos (manifestação detectável do genótipo), em regiões específicas dos cromossomos, e os diabéticos poderiam possuir uma variedade diferente destes fenótipos em comparação ao grupo controle (18).

Os estudos relacionados com a suplementação deste elemento neste grupo de pacientes são escassos, principalmente em se tratando de crianças com DM. A maioria retrata o efeito da suplementação de Zn em pacientes com DM adultos, idosos, com ou sem complicações e, na maioria das vezes, os resultados são contraditórios (9).

Portanto, a determinação de metais em amostras de soro de sujeitos portadores de *diabetes mellitus tipo 2* e sujeitos controle é de grande importância a ser estudada como um

parâmetro no monitoramento do controle metabólico da população em doenças como *diabetes tipo 2*.

3. METODOLOGIA ANALÍTICA

3.1. Espectrometria de massas de alta resolução com fonte de plasma indutivamente acoplado

O acoplamento ICPMS nasceu da necessidade de se aliar a rapidez e simplicidade das análises do ICPOES a uma técnica mais sensível e com espectros mais simples. Como sistemas convencionais de espectrometria de massas, esta técnica tem como princípio a separação de íons em função da razão massa/carga, sendo necessária a ionização dos elementos antes de serem introduzidos no sistema analisador.

Na espectrometria de massas com fonte de plasma, os íons são gerados em um plasma de argônio, à pressão atmosférica, sustentado por um gerador de rádio frequência (RF). Esse sistema de ionização é denominado ICP (inductively coupled plasma), ou fonte de plasma indutivo, e pode ser acoplada tanto a um espectrômetro de massa, quanto a um espectrômetro de emissão ótica (ICPOES). O ICP passou então a ser utilizado como fonte de ionização dos elementos, fornecendo uma eficiência em torno de 90% para a maioria dos elementos.

No diagrama da FIG.1 podem ser visualizadas as 5 principais partes de um ICPMS: sistema de introdução de amostra (via sólido, suspensão ou líquidos), fonte de ionização, sistema de focalização, sistema analisador de massas e um sistema de detecção de íons.

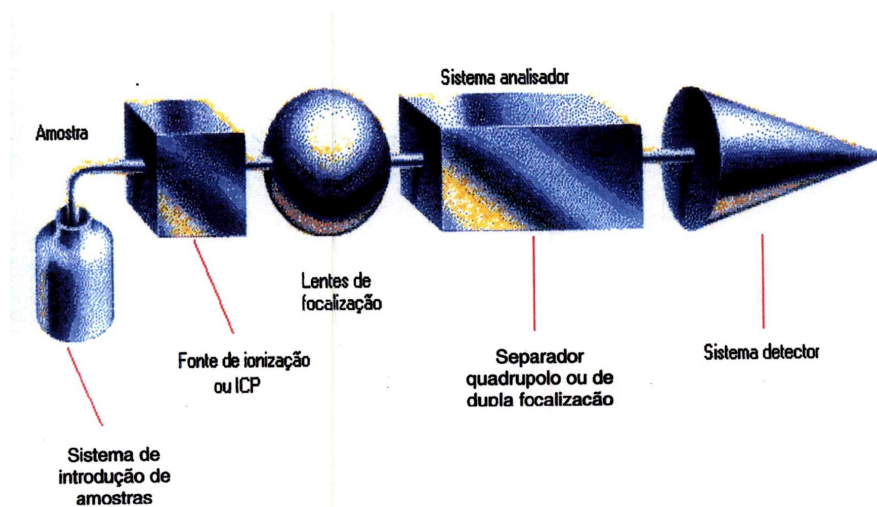


FIGURA 1 - Diagrama básico de um espectrômetro de massas com fonte de plasma indutivamente acoplado.

O sistema de introdução de amostras mais utilizado na análise de soluções é composto basicamente por uma bomba peristáltica, uma câmara de nebulização e um nebulizador tipo Meinhard ou MicroMist. A amostra é transformada em um fino aerossol e transportado pelo gás de arraste até o plasma, onde ocorre a dissociação, atomização e ionização dos elementos. No entanto, aplicações específicas que requerem, por exemplo, uma maior eficiência de nebulização pode fazer uso de outros sistemas como o nebulizador ultra-sônico, o que permite alcançar limites de detecção ainda mais baixos. A técnica de ICPMS permite também a análise direta de materiais na forma sólida, sendo a ablação por laser o método mais largamente utilizado.

Neste estudo, a metodologia é baseada na técnica de espectrometria de massas de alta resolução com fonte de plasma acoplado indutivamente (HRICP-MS).

Diferente dos sistemas quadrupolos, o sistema analisador do HR-ICPMS (espectrômetro de massa de alta resolução com fonte de plasma indutivamente acoplado) apresenta dois separadores de massa, um magnético e outro eletrostático. Na FIG. 2 é apresentado um diagrama básico de um HR-ICPMS com a geometria Nier-Johnson reversa (constituído por um setor eletrostático precedido pelo magnético), configuração do equipamento utilizado neste trabalho. Nestes sistemas os íons sofrem dupla separação, primeiro no setor magnético, onde o íon é separado em função da sua razão massa/carga, e a seguir, no setor eletrostático, quando são novamente separados em função de sua energia. Este sistema analisador abrange uma faixa de massas de 6 a 254 unidades de massa atômica (39).

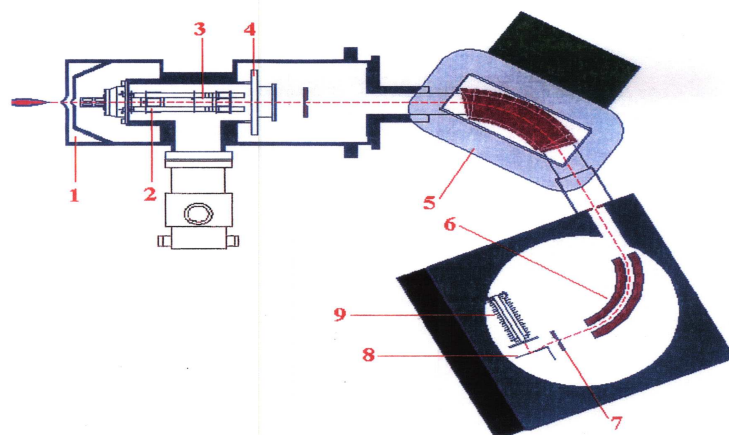


FIGURA 2 - Esquema básico do HR-ICPMS com geometria Nier-Johnson reversa.

Sendo 1: interface; 2.sistema de focalização e transferidor óptico; 3.acelerador e sistema de focalização do feixe ;4.fenda de entrada ; 5.setor magnético;6.setor eletrostático;7.fenda de saída ;8.multiplicador de elétrons;9.sistema detector.

Devido aos baixíssimos limites de detecção instrumental, a técnica de HRICP-MS vem sendo a mais largamente utilizada na análise de uma grande variedade de matrizes (40 - 44).

3.2. Parâmetros de Validação

A determinação de metais em amostras biológicas constitui em um importante aspecto da química clínica para o diagnóstico, prognóstico e controle de doenças. O soro tem sido usado como um parâmetro no monitoramento do controle metabólico da população portadora de *diabetes mellitus*. Portanto, exige a utilização de metodologias confiáveis a fim de se obter resultados precisos e reprodutíveis garantindo a qualidade e a rastreabilidade dos dados analíticos.

Os critérios empregados no sistema de garantia da qualidade dos resultados para a validação de uma metodologia são discutidos pelo Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial (INMETRO), no documento DOQ-CGCRE-008 (2007) (45) que envolve a determinação de muitos parâmetros, como linearidade, limites de detecção e quantificação, repetitividade, reprodutibilidade, recuperação e incerteza.

3.2.1. Linearidade

Linearidade é a maneira de um método analítico produzir resultados em proporção direta à concentração do analito nas substâncias em estudo, em uma dada faixa de concentração. A linearidade de um método consiste na proporcionalidade dos valores de tendência ao longo da faixa analítica estudada. É formulada como expressão matemática para o cálculo da concentração do analito a ser determinado na amostra real.

A equação da reta que relaciona as duas variáveis é apresentada na Eq.1.

$$y = ax + b \quad (1)$$

Onde:

y = Resposta medida (absorbância, altura ou área do pico, etc.);

x = Concentração;

a = Inclinação da curva de calibração = sensibilidade;

b = Interseção com o eixo y, quando x = 0.

A linearidade de um método pode ser observada pelo gráfico dos resultados dos ensaios em função da concentração do analito ou então calculados a partir da equação da

regressão linear, determinada pelo método dos mínimos quadrados. A correlação é, normalmente, calculada por intermédio do coeficiente r de Pearson ou pelo coeficiente de determinação, r^2 .

O cálculo do coeficiente de correlação (r) que expressa a relação de “x” e “y” na curva torna a equação da reta mais consistente e significativa. O coeficiente de correlação linear é frequentemente usado para indicar o quanto pode ser considerada adequada a reta como modelo matemático. Um valor maior que 0,90 é usualmente requerido, podendo ser considerado satisfatório, entretanto, uma análise criteriosa da faixa de trabalho, dos erros de cada ponto na curva assim como os resíduos, devem ser também levados em conta na interpretação final dos dados.

3.2.2. Limite de detecção

A avaliação do limite de detecção é importante para saber qual o menor valor de concentração do analito detectado em confiabilidade de precisão aceitável, em função do limite do sistema (eletrônica, instrumental, etc), ou seja, do ruído.

O limite de detecção do equipamento (LDE) é definido como a concentração ou quantidade de uma dada substância que produz um sinal ou resposta maior do que $3s$ (onde s representa o desvio padrão de uma série de medidas de branco). Em geral, o LDE é utilizado como guia para o estabelecimento do limite de detecção do método.

3.2.3. Limite de Quantificação

O limite de quantificação (LQ) é a menor concentração do analito em uma amostra, que pode ser determinada com um nível de qualidade compatível com o objetivo da análise em execução.

Através da determinação da concentração do analito de interesse nas soluções branco, podemos determinar o LQ, que por definição é a média do branco mais 10 vezes o valor do desvio padrão da média das concentrações do analito nas soluções branco, representado por $X + 10S_0$, onde S_0 é o valor médio do desvio padrão.

3.2.4. Exatidão

A exatidão de um método é definida como sendo a concordância entre o resultado de um ensaio e o valor de referência. Os procedimentos geralmente utilizados para avaliar a

exatidão de um método são feitos pela análise de materiais de referência e realização de ensaios de recuperação.

3.2.4.1. Materiais de referência certificados (MRC)

Sempre que possível, os materiais de referência certificados devem ser utilizados no processo de validação de um método de ensaio. Um MRC possui um valor de concentração, ou outra grandeza, para cada parâmetro e uma incerteza associada. É muito importante, portanto, que o fornecimento desses MRC seja realizado por organismos reconhecidos e confiáveis.

3.2.4.2. Recuperação

A taxa de recuperação (R) é uma medida de eficiência do processo de isolamento do analito de interesse a matriz na qual se encontra presente.

Estes estudos são efetuados adicionando-se soluções do padrão analítico de interesse de concentração conhecida à matriz. Efetuam-se as operações necessárias à recuperação do analito adicionado, o valor é então determinado. Empregando-se esses valores na Eq. 2 apresentada a seguir, encontra-se a recuperação.

$$R = \frac{C_1 - C_2}{C_3} \quad (2)$$

Onde:

C_1 = concentração determinada na amostra adicionada;

C_2 = concentração determinada na amostra não adicionada;

C_3 = concentração adicionada.

No caso do taxa de recuperação do analito pela análise de material de referência o cálculo deverá ser feito calculado pela Eq.3 segundo Burns *et al.*,2002 (46).

$$R = \frac{C_{obs}}{C_{ref}} \quad (3)$$

Onde:

C_{obs} = concentração na amostra analisada;

C_{ref} = concentração certificada do material de referência

3.2.5. Precisão

É um termo geral para avaliar a dispersão de resultados entre ensaios independentes, repetidos de uma mesma amostra, amostras semelhantes ou padrões, em condições definidas. É normalmente determinada para circunstâncias específicas de medição e uma das formas mais comuns de expressá-la é por meio da repetitividade, sendo usualmente expressas pelo desvio-padrão.

O desvio padrão relativo (DPR) ou coeficiente de variação (CV%) pode ser mais útil neste caso, pois foi normalizado com base na concentração e deste modo ele é praticamente constante ao longo da faixa de interesse, contanto que esta não seja muito grande:

$$DPR = \frac{DP}{CMD} \cdot 100 \quad (4)$$

Onde:

DP = desvio padrão;

CMD = concentração média determinada

3.2.5.1. Repetitividade

A repetitividade é o grau de concordância entre os resultados de medições sucessivas de um mesmo mensurado, efetuadas sob as mesmas condições de medição:

- Mesmo procedimento de medição;
- Mesmo observador;
- Mesmo instrumento usado nas mesmas condições;
- Mesmo local, e
- Repetições em curto espaço de tempo.

3.2.6. Incerteza

Normalmente, o resultado de uma medição ou do cálculo de uma grandeza representa somente uma aproximação, ou uma estimativa do valor do mensurado e, portanto, somente é completo quando acompanhado de uma declaração da incerteza associada.

A palavra “incerteza” significa dúvida e assim, no sentido mais amplo, “incerteza de medição” significa dúvida sobre a qualidade do resultado de uma medição. A definição formal do termo incerteza de medição segundo o VIM (Vocabulário Internacional de

Metrologia) é “parâmetro associado ao resultado de uma medição, que caracteriza a dispersão dos valores que podem ser razoavelmente atribuídos ao mensurando”.

A incerteza de medição da concentração de um analito em uma determinada matriz, por exemplo, é expressa na forma de desvio padrão, chamada de incerteza padrão. Entretanto, a incerteza total do método proposto é a soma de todas as incertezas geradas em cada passo do método pelos diversos componentes do processo de medição. Um experimento bem planejado pode, em muito, facilitar as avaliações confiáveis da incerteza e é um requisito importante na organização das atividades de medição.

O cálculo de incertezas associadas à técnicas espectrométricas depende da identificação de diversos parâmetros que interferem na incerteza global do método proposto. Alguns parâmetros associados à determinação experimental podem influenciar nos estudos das incertezas, como a calibração do espectrômetro, a estabilidade do detector, o fluxo de gás etc. Os efeitos associados às pequenas mudanças nestes parâmetros podem influenciar no pico dos espectros das amostras e do padrão, podendo interferir em até 10% no cálculo final das incertezas associadas ao método.

3.2.6.1. Diagrama de causa e efeito (espinha de peixe)

Uma das abordagens para obter a lista das possíveis fontes de incerteza é o emprego do “Diagrama de Causa e Efeito”, também conhecido como Diagrama de Espinha de Peixe ou Diagrama de Ishikawa. O exame do diagrama pode levar à simplificação, seja agrupando as fontes de incerteza que podem ser consideradas em uma série de repetições, seja removendo termos duplicados. O diagrama simplificado pode, então, ser usado para assegurar que todas as fontes de incerteza foram levadas em conta. Os princípios da construção do Diagrama de Causa e Efeito estão descritos na norma NBR ISO 9004(2000) (47).

As principais fontes de incertezas relacionadas ao procedimento analítico deste trabalho (análise de Cu, Mg, Mn, Se, V e Zn) estão representadas no diagrama de causa e efeito (FIG. 3).

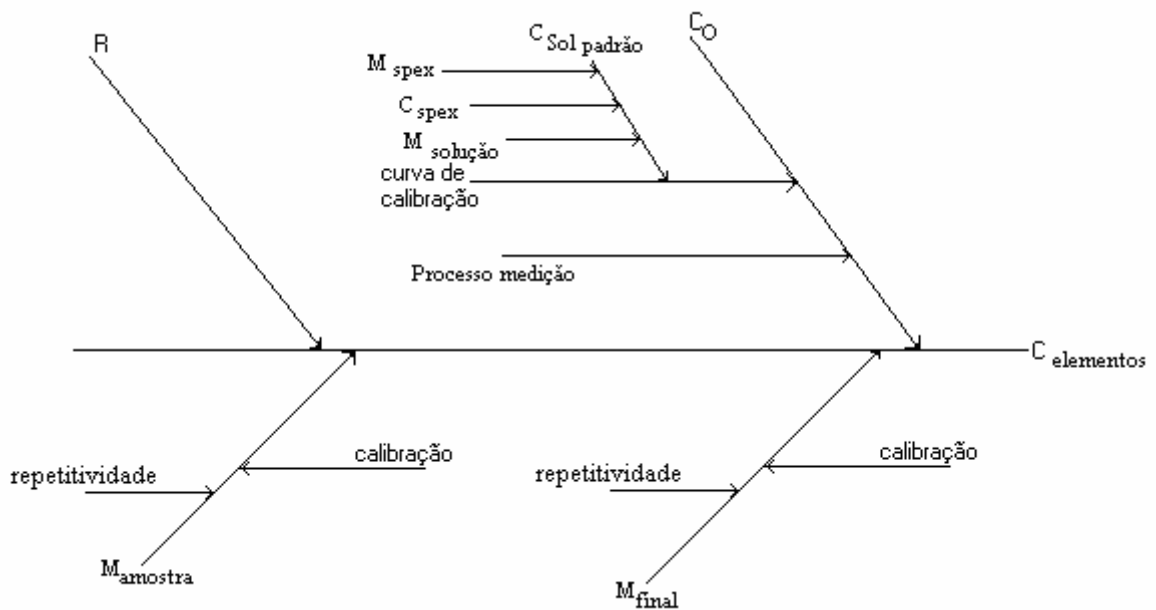


FIGURA 3 - Diagrama de causa e efeito para o procedimento analítico na determinação dos elementos de interesse em amostras de soro humano.

Como indicado na FIG. 3, as fontes de incerteza que contribuem na metodologia para a determinação dos elementos de interesse são os parâmetros associados à curva de calibração e os parâmetros associados ao processo de medição.

3.2.6.2. Incerteza associada à concentração elementar na alíquota analisada $u(C_o)$

A incerteza para a $u(C_o)$ é a combinação das incertezas da solução padrão e processo de medição através da curva de calibração.

A incerteza da $C_{sol\ padrão}$ é obtida pela Eq.5 (48).

$$u_{C_{sol\ padrão}} = C_{sol\ padrão} \times \sqrt{\left(\frac{u_{M_{sol}}}{M_{sol}}\right)^2 + \left(\frac{u_{C_{estoque}}}{C_{estoque}}\right)^2 + \left(\frac{u_{M_{estoque}}}{M_{estoque}}\right)^2} \quad (5)$$

Onde:

$C_{sol\ padrão}$ = concentração da solução padrão preparada para obter os pontos da curva (solução diluída) ;

$M_{solução}$ = massa final da solução padrão diluída;

$u(M_{solução})$ = incerteza da massa da solução diluída, calculada pela Eq. 6 (47).

$$u(M) = \sqrt{(u_1)^2 + (u_2)^2 + (u_3)^2} \quad (6)$$

Onde:

(u_1) = incerteza informada no certificado de calibração da balança utilizada;

(u_2) = incerteza dos dados obtidos a partir de gráficos de controle do laboratório;

(u_3) = repetitividade da balança.

C_{estoque} = concentração da solução padrão estoque, esta concentração é informada pelo fornecedor da solução (Spex);

$u(C_{\text{estoque}})$ = incerteza da concentração na solução estoque calculada pela Eq.7(49).

$$u(C_{\text{estoque}}) = C_{\text{estoque}} \times \sqrt{\left(\frac{\left(\frac{S_{\text{nominal}}}{\sqrt{3}}\right)}{C_{\text{estoque}}}\right)^2 + \left(\frac{u(d)}{d_{\text{estoque}}}\right)^2} \quad (7)$$

Onde:

S_{nominal} = desvio padrão dado para a concentração da solução estoque;

d_{estoque} = densidade informada no certificado da solução estoque;

$u(d)$ = incerteza da densidade da solução de acordo com a Eq. 8 (48).

$$u(d) = \sqrt{\left(\frac{u(d)_{\text{form}}}{\sqrt{3}}\right)^2 + \left(\frac{(T_t \times 3)}{1.96}\right)^2} \quad (8)$$

$u(d)_{\text{form}}$ = incerteza da densidade dada pelo fornecedor da solução padrão estoque;

T_t = taxa de mudança da densidade com a temperatura;

1.96 = calor atribuído para 91% de confiança;

$u(M_{\text{estoque}})$ = incerteza da massa da solução estoque, é calculada pela Eq.6;

M_{estoque} = massa da solução padrão estoque transferida para preparar a solução padrão diluída.

No processo de medição através da curva de calibração estão envolvidos os parâmetros dos pontos da curva e sinais de resposta.

A incerteza no processo de medição é calculada pela Eq. 9, segundo o guia Eurachem (49).

$$u(\text{proc}_{\text{medição}}) = \frac{S}{B_1} \sqrt{\frac{1}{n} + \frac{1}{m} + \frac{(c_o - \bar{c})^2}{Q_{xx}}} \quad (9)$$

Onde:

S = desvio padrão residual, é calculado na Eq.10

$$S = \frac{\sum_{j=1}^n [A_j - (B_0 + B_1 \cdot c_i)]^2}{m - 2} \quad (10)$$

Sendo

A_j = cps para o padrão de calibração;

B_0 = intercepto da curva;

B_1 = slope da curva;

c_i = concentração real de cada solução na curva;

m = número de medidas para a calibração;

m = número de medidas para calibração;

n = número de medições realizadas para determinar C_o ;

C_o = concentração do analito obtida na amostra e

Q_{xx} = somatório, calculado pela Eq.11.

$$Q_{xx} = \sum_{j=1}^m (c_j - \bar{c})^2 \quad (11)$$

Onde:

c_j = concentração calculada a partir da equação da curva analítica;

\bar{c} = concentração média das soluções da curva.

Portanto,

$$u_{C_o} = \sqrt{(u_{solpadr\tilde{a}o})^2 + (u_{proc_medi\tilde{c}ao})^2} \quad (12)$$

3.2.6.3. Incerteza associada à massa da amostra $u(M_{amostra})$ e massa final $u(M_{final})$

As incertezas na massa da amostra e massa final são calculadas da mesma maneira, de acordo com a Eq. 6. As fontes de incerteza a serem consideradas aplicadas ao processo de pesagem são a contribuição da incerteza informada no certificado de calibração da balança utilizada (u_1), os dados obtidos a partir de gráficos de controle do laboratório (u_2) e a repetitividade da balança (u_3) (48).

3.2.6.4. Incerteza associada à taxa de recuperação $u(R)$:

E a incerteza da recuperação é obtida pela Eq.13 (49).

$$u(R) = R \times \sqrt{\left(\frac{u(C_{sol_padrao})}{C_{sol_padrao}}\right)^2 + \frac{s_{obs}^2}{n \times C_{obs}^2}} \quad (13)$$

Onde :

R = taxa de recuperação;

s = desvio quadrado das medições da solução padrão diluída;

C = concentração média obtida das medições da solução padrão diluída;

n = número de medições da solução padrão diluída;

$u(C_{sol_padrao})$ = incerteza da solução padrão diluída, calculada pela Eq.5

3.2.6.5. Cálculo da incerteza padrão combinada

Para calcular a incerteza padrão combinada, as incertezas padrão de cada componente foram consideradas, de acordo com a Eq.14.

$$u(C_{elemento}) = C_{elemento} \times \sqrt{\left(\frac{u(Co)}{Co}\right)^2 + \left(\frac{u(R)}{R}\right)^2 + \left(\frac{u(M_{amostra})}{M_{amostra}}\right)^2 + \left(\frac{u(M_f)}{M_f}\right)^2} \quad (14)$$

E substituindo nesta equação os valores das incertezas padrão de cada componente, apresentados nas TAB. 16 a 21, temos a incerteza padrão combinada para cada elemento de interesse.

3.3. Análise Estatística

A quimiometria é uma área da química que faz uso de ferramentas estatísticas multivariadas para extrair o máximo de informações químicas relevantes na análise de um conjunto de dados com um grande número de variáveis. Estas ferramentas possibilitam a identificação de correlações impossíveis de se observar de forma direta, realçando as informações mais relevantes (39).

3.3.1. Análise Discriminante Stepwise

Na análise de discriminantes (AD) parte-se de dois ou mais grupos de amostras com histórico conhecido na tentativa de se encontrar uma combinação linear entre as variáveis que caracterize as diferenças existentes entre os grupos. Esta avaliação estabelece uma função discriminante capaz de classificar novos casos, fornecendo também a probabilidade destas amostras de pertencerem a cada um dos grupos considerados (39).

A função discriminante pode ser escrita pela Eq.15.

$$Z = W_1 X_1 + W_2 X_2 + W_3 X_3 \dots + W_N X_N \quad (15)$$

Em que: Z corresponde ao *score* discriminante, W_i corresponde ao peso discriminante para a variável i e X_i corresponde à variável independente i.

Essa equação determina um *score* discriminante para cada observação e o *score* médio do grupo. A média do grupo é referida como centróide.

Através dos centróides determina-se o grupo de melhor localização para qualquer caso. O teste de significância estatística da função discriminante é medida pela distância entre os centróides dos grupos, ou seja, quanto mais distantes os centróides de cada grupo estiverem, mais as variáveis selecionadas estarão diferenciando os grupos.

Quando o método *stepwise* – que testa cada variável separadamente – é utilizado para interpretação do poder discriminante das variáveis independentes são avaliados os valores F, sendo que quanto maiores forem, maior será o poder discriminatório das variáveis. A análise de discriminante *stepwise* (AD) linear é baseada no teste de Fisher pela significância das variáveis (50).

3.3.2. Análise de Componente Principal

A análise de componente principal (ACP) estuda a correlação existente entre um grande número de variáveis, agrupando-se em alguns poucos fatores, sendo a principal finalidade a redução da matriz de dados (39). É um método de análise multivariada utilizado para projetar dados em n-dimensões em um espaço de baixa dimensão, normalmente duas ou três. Isso é feito através de cálculo de componentes principais obtidas fazendo-se combinações lineares das variáveis originais. ACP é um método exploratório porque auxilia na elaboração de hipóteses gerais a partir dos dados coletados, contrastando com estudos direcionados nos quais hipóteses prévias são testadas. Uma ACP extrai fatores independentes a partir de números altamente correlacionados por decomposição da matriz dos dados: matriz *loadings*, o qual contém fatores independentes e a matriz de *scores*.

Em uma análise de componentes principais, o agrupamento das amostras define a estrutura dos dados através de gráficos de *scores* e *loadings*, cujos eixos são componentes principais (CPs) nos quais os dados são projetados. Os *scores* fornecem a composição das CPs em relação às amostras, enquanto os *loadings* fornecem essa mesma composição em relação às variáveis.

Esta ferramenta é fortemente indicada quando se trabalha com um grande número de variáveis, sendo largamente utilizada na análise exploratória de dados (pré-avaliação dos dados), visando uma compreensão completa do problema abordado.

Como as CPs são ortogonais, é possível examinar as relações entre amostras e variáveis através dos gráficos dos *scores* e dos *loadings*. O estudo conjunto de *scores* e *loadings* ainda permite estimar a influência de cada variável em cada amostra (50).

3.3.3. Análise de Cluster

Na análise de cluster (AC), cada ponto forma somente um agrupamento inicial e então a similaridade da matriz é analisada. Os pontos mais similares são agrupados formando um grupo e o processo é repetido até todos os pontos pertencerem a somente um grupo.

A AC é um processo hierárquico, cada passo a matriz de dados é diminuída em uma dimensão, pela reunião de pares semelhantes, até a reunião de todos os pontos em um único grupo. O objetivo da AC é mostrar os dados em um espaço bidimensional de maneira a enfatizar os seus agrupamentos e padrões naturais. A distância entre os pontos (amostras ou variáveis) reflete a similaridade de suas propriedades, portanto, quanto mais próximos estiverem os pontos no espaço amostral, mais similares eles são. Os resultados são apresentados na forma de dendogramas, os quais agrupam amostras ou variáveis e função da similaridade. A distância euclidiana e a técnica de conexão baseada na distância do vizinho mais próximo são as metodologias mais utilizadas para o cálculo da similaridade (50).

4. PARTE EXPERIMENTAL

4.1. Casuística

Foram avaliados 153 pacientes acompanhados pelos Serviços de Endocrinologia e de Nefrologia do Hospital Universitário da Universidade Federal de Juiz de Fora, acompanhados durante os anos de 2004 / 2005 assim divididos:

Grupo 1: composto por 86 sujeitos com diagnóstico de síndrome metabólica, segundo os critérios da OMS; Grupo 2: composto por 67 sujeitos não portadores de síndrome metabólica (grupo controle).

O número de sujeitos do grupo 1 foi superior ao do grupo 2 (controle) em função da possibilidade de existência de subgrupos de pacientes portadores de síndrome metabólica. Contrariamente, o grupo controle será homogêneo.

Os sujeitos foram classificados como tendo síndrome metabólica pela definição da OMS e pelo CNEP (51,52), tendo como critério de inclusão:

1. Homens e mulheres não grávidas, com idade entre 40 e 70 anos;
2. Assinatura do consentimento livre e esclarecido;
3. *Diabetes mellitus tipo 2* associado a dois ou mais dos critérios abaixo:
 - a. hipertensão arterial leve a moderada, definida como PAD > 90 mmHg e <110 mmHg e PAS >140 mmHg e <160 mmHg;
 - b. índice de massa corporal (IMC) > 26 kg/m² e < 35 kg/m²;
 - c. circunferência da cintura > 88 cm, em mulheres e > 102 cm, em homens;
 - d. triglicérides ≥ 150 mg/dl;
 - e. colesterol HDL < 40 mg/dl, em mulheres e <35 mg/dl, em homens.

4.1.1. Ética Médica

O projeto foi aprovado pelo comitê de ética para pesquisas em humanos da Universidade Federal de Juiz de Fora (número de protocolo: 211-015/2003). Esse estudo também foi aprovado pelo Comitê de Ética do Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares – IPEN (ANEXO I).

4.1.2. Coleta das amostras de sangue

O volume de sangue coletado foi de 10-15 mL obtido por punção periférica da veia do antebraço utilizando scalp 21G (Becton Dickinson, USA). Os participantes estavam em jejum de 8 horas para que fossem realizadas as análises bioquímicas e hematológicas previstas. As amostras de sangue coletadas em tubos contendo anticoagulante (EDTA dissódico 0,16 M) foram utilizadas para a realização do hemograma e a quantificação das plaquetas. A contagem diferencial foi realizada em esfregaço confeccionado com a mesma amostra de sangue total, empregando microscopia óptica (microscópio Eclipse E200, Nikon, Japão) e objetiva de imersão. As amostras de sangue coletadas em tubos sem anticoagulante foram centrifugadas, após coagulação, a 3.000 rpm (centrífuga Eppendorf 5810R), por 15 minutos à temperatura ambiente, para a obtenção do soro, o qual foi aliqotado, codificado e armazenado em criotubo à temperatura de - 80°C, garantindo a integridade e identidade das espécies até o momento da análise. As análises bioquímicas foram realizadas com o emprego de equipamento automatizado de alto desempenho, com metodologias analíticas de uso consolidado nas análises clínicas, através de kits reagentes de marcas tradicionais no mercado. Todo o material foi codificado de modo que a identidade dos participantes não fosse revelada.

4.2. Materiais e Método

4.2.1. Amostras analisadas

Todas as amostras analisadas são procedentes de pacientes acompanhados pelos Serviços de Endocrinologia e de Nefrologia do Hospital Universitário da Universidade Federal de Juiz de Fora.

4.2.2. Instrumentação

O equipamento utilizado foi um espectrômetro de massas de dupla focalização com fonte de plasma indutivo (HR-ICPMS), Element 1 com a geometria reversa da Finnigan MAT, Bremen, Alemanha, pertencente ao Laboratório de Caracterização Química e Isotópica do Centro de Química e Meio Ambiente do Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares (IPEN).

4.2.3. Balança

Para todas as pesagens realizadas, na preparação de amostras e padrões, foi utilizada uma balança analítica modelo BK 600 da Gehaka (Ind. E Com. Gehaka Ltda. SP, Brasil). O certificado de calibração da balança utilizada, emitido pela Micronal apresenta a relação entre cargas aplicadas e a correspondente incerteza de medição obtida.

O procedimento de pesagem utilizado envolveu sempre a execução de duas atividades imediatamente prévias às pesagens. A primeira foi a verificação da calibração da balança através da utilização de pesos padrão de verificação. A segunda foi a execução de uma seqüência de pesagens do peso padrão de verificação para a avaliação da incerteza oriunda da repetibilidade da balança utilizada, conforme descrito nos próximos itens.

4.2.4. Micropipetas

Para a manipulação quantitativa de pequenas quantidades de soluções de amostras e padrões, foram utilizadas micropipetas calibradas, modelo Finnpiquette (Labsystems, Helsinki, Finlândia) e LABMATE (Warsaw, Poland).

4.2.5. Reagentes utilizados

- ácido nítrico Suprapur (HNO₃)
- água obtida por sistema de purificação Milli-Q, com resistividade de 18,2MΩ.cm a 25°C.

4.2.6. Padrões utilizados

Todas as análises no HR-ICPMS foram precedidas de preparação de soluções padrão dos mesmos analitos a serem quantificados. Essas soluções foram preparadas a partir da transferência, com micropipetas calibradas, de alíquotas de solução padrão elemental Spex[®], originalmente com uma concentração de 1000 $\mu\text{g g}^{-1}$ e incerteza declarada de 0,5% não tendo sido fornecido o nível de confiança. As soluções estão em meio de ácido nítrico (HNO_3) com concentração de 5%.

4.2.7. Preparação das soluções de padrões

Para estabelecer a função de calibração através da qual foram determinadas as concentrações elementares de interesse foi preparado um conjunto de soluções padrão, contendo os analitos pesquisados nas concentrações de 0,04 a 2000 ng g^{-1} dependendo do analito.

Para a obtenção desse conjunto de soluções padrão, é necessária a diluição da solução original, até uma concentração intermediária, evitando, dessa forma, a manipulação de quantidade de material muito pequena, que resultaria em soluções finais com incertezas associadas muito elevadas.

As soluções padrão Spex[®] de Mn, Se e V foram, então diluídas até uma concentração 1000; 10000 e 1000 ng g^{-1} , respectivamente. Para o Se transferiu-se 0,1 mL da solução original para um tubo de polipropileno aferindo seu volume a 10 mL com HNO_3 a 2%, e no caso do Mn e V, transferiu-se 0,1mL da solução original para seus respectivos tubos de polipropileno aferindo seus volumes a 100 mL com HNO_3 a 2%.

4.2.7.1. Preparo da Solução Padrão Mãe

A TAB.2 apresenta as massas necessárias a partir da solução padrão Spex[®] (Cu, Mg, e Zn) e das soluções preparadas anteriormente de Mn, Se e V para obter a solução mãe dos analitos.

TABELA 2 - Massas necessárias para obter 100 g da solução mãe

Solução de Partida ng g^{-1}	1002	1003	1000	10000	1000	1000
	Cu	Mg	Mn	Se	V	Zn
massa pesada (g)	0,18	0,9	1,45	0,23	0,26	0,45
massa final (g)	100	100	100	100	100	100

4.2.8. Laboratório Limpo

O Laboratório de Caracterização Química (LCQ) no IPEN, onde foram realizados os experimentos, ofereceu todas as condições necessárias de infra-estrutura e instrumentação necessárias para a execução do trabalho.

O laboratório limpo, para manuseio de amostras biológicas (sangue, urina, soro humano e cabelo) e/ou amostras que necessitem de tratamento especial (elementos traços e ultra-traços), contendo capela de fluxo laminar e sistema central de filtragem de ar. As amostras são inseridas através de caixas de passagem, não necessitando, portanto de tráfego de amostras através de corredores. O laboratório possui 1 pia para lavagem de materiais e equipamentos necessários (geladeira, estufa, mufla, mesa agitadora, etc).

4.3. Procedimento Experimental

4.3.1. Preparo de amostras

A metodologia de diluição adotada neste trabalho baseou-se no trabalho de Barany *et al.*, (53), constituindo-se dos seguintes passos:

- 1) pesagem de 0,5g de amostra diretamente nos tubos de centrífuga;
- 2) adição de 0,5mL de padrão interno de Índio (In) 100 ng g⁻¹;
- 3) soluções avolumadas com HNO₃ 0,14M a 10 mL (diluição de 20 vezes).

4.3.2. Parâmetros Experimentais e Elementos Determinados pelo HR-ICPMS

Foram medidos 6 elementos (Cu, Mg, Mn, Se, V e Zn). O elemento In foi utilizado como padrão interno nas análises, para corrigir eventuais flutuações de sinal e minimizar os efeitos da matriz. Na TAB. 3, as condições experimentais de análise.

TABELA 3 - Parâmetros operacionais

Gás	Argônio
Potência da RF	1250 W
Refrigeração	16,0 l min ⁻¹
Gás auxiliar	0,8 l min ⁻¹
Gás nebulizador	1,0-1,2 l.min ⁻¹
Nebulizador	Meinhard
Cones e skimmer	Níquel/Platina
Tipo de varredura	E-scan(eletrostático)
Runs e passes	10x1
Tempo de análise por isótopo	0,010 s
Medições <i>per peak</i>	30
Isótopo/ Resolução	⁸² Se/baixa
Isótopo/ Resolução	⁶³ Cu, ²⁴ Mg, ⁵⁵ Mn, ⁵¹ V, ⁶⁶ Zn, / média

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Para obtenção desses resultados, este trabalho seguiu os procedimentos da garantia da qualidade utilizando métodos validados segundo a Norma ISO 17025.

5.1. Validação do método proposto

5.1.1. Linearidade

A linearidade foi estudada por meio da análise de um conjunto de soluções padrão em diferentes concentrações com adição de padrão interno, o qual produz um espectro de massa versus intensidade da solução padrão e dessa maneira uma expressão matemática, na forma de equação da reta, conforme o item 3.2.1 é fornecida.

As TAB. 4, 5, 6, 7, 8 e 9 apresentam a equação da reta obtida, acompanhada com o coeficiente de correlação linear (r), para a curva analítica dos elementos de interesse.

TABELA 4 - Linearidade para o cobre (Cu)

Analito	Equação da reta	Coeficiente de correlação linear (r)	Concentração teórica (ng g ⁻¹)	Concentração calculada (ng g ⁻¹)	Desvio Padrão Relativo (%)
Cu	$y = 0,1883x + 0,1825$	0,9995	0,8	0,75	12,85
			32	32,6	3,13
			65	66,36	5,33
			95	100,88	6,94
			130	132,72	6,39
			160	165,0	4,48

TABELA 5 - Linearidade para o magnésio (Mg)

Analito	Equação da reta	Coeficiente de correlação linear (r)	Concentração teórica (ng g ⁻¹)	Concentração calculada (ng g ⁻¹)	Desvio Padrão Relativo (%)
Mg	$Y = 0,111x - 4,5351$	0,9988	400	420,58	4,87
			600	619,68	2,62
			800	775,09	5,24
			1000	968,78	4,42
			1500	1432,74	5,78
			2000	2022,84	6,47

TABELA 6 - Linearidade para o manganês (Mn)

Analito	Equação da reta	Coefficiente de correlação linear (r)	Concentração teórica (ng g ⁻¹)	Concentração calculada (ng g ⁻¹)	Desvio Padrão Relativo (%)
Mn	Y = 0,5179x-0,0026	0,9989	0,02	0,007	21,36
			0,05	0,025	17,85
			0,07	0,04	19,11
			0,3	0,2	16,87
			0,6	0,35	11,4
			0,8	0,5	8,57

TABELA 7 - Linearidade para o selênio (Se)

Analito	Equação da reta	Coefficiente de correlação linear (r)	Concentração teórica (ng g ⁻¹)	Concentração calculada (ng g ⁻¹)	Desvio Padrão Relativo (%)
Se	Y = 0,8989x-0,127	0,9979	1,6	1,37	11,27
			2,0	2,09	5,32
			2,5	2,58	6,24
			3,2	3,26	4,45
			4,8	4,82	4,96
			7,5	7,45	3,75

TABELA 8 - Linearidade para o vanádio (V)

Analito	Equação da reta	Coefficiente de correlação linear (r)	Concentração teórica (ng g ⁻¹)	Concentração calculada (ng g ⁻¹)	Desvio Padrão Relativo (%)
V	Y = 0,4559x + 0,0026	0,9987	0,007	0,006	21,51
			0,02	0,017	20,03
			0,04	0,04	18,16
			0,086	0,09	14,39
			0,2	0,19	5,56
			0,4	0,39	8,44

TABELA 9 - Linearidade para o zinco (Zn)

Analito	Equação da reta	Coefficiente de correlação linear (r)	Concentração teórica (ng g ⁻¹)	Concentração calculada (ng g ⁻¹)	Desvio Padrão Relativo (%)
Zn	Y= 0,0589x + 0,3917	0,9979	0,5	0,48	13,35
			20	19,0	6,63
			40	39,35	4,72
			60	63,47	5,48
			80	79,43	8,46
			100	98,95	4,1

Verifica-se através do estudo da linearidade que o sistema é linear dentro da faixa metodológica. Os elementos Mn e V apresentaram um desvio padrão relativo alto em relação aos elementos Cu, Mg, Se e Zn em virtude dos níveis dos analitos nas amostras em estudo serem baixas.

5.1.2. Limite de Detecção

O limite de detecção (LD) foi calculado seguindo a norma ISO 17025, conforme descrito no item 3.2.2.

Através da análise de sete soluções branco com 5 ng g⁻¹ de padrão interno (In), foi obtida a concentração média do analito nas soluções branco e o desvio padrão médio destas concentrações obtidas. O valor de LD é apresentado na TAB. 10.

TABELA 10 - Limite de detecção calculado para o método proposto

Elemento de interesse	Média das concentrações do branco	Média das concentrações do desvio padrão	LD (ng g ⁻¹)
Cu	0,373	0,152	0,83
Mg	1,503	0,128	1,88
Mn	0,010	0,002	0,015
Se	0,063	0,009	0,09
V	0,002	0,002	0,007
Zn	0,379	0,086	0,64

5.1.3. Limite de Quantificação

O limite de quantificação (LQ) corresponde à menor concentração do analito que pode ser determinada com um nível aceitável de precisão e veracidade (*trueness*).

O LQ foi calculado de acordo com o descrito no item 3.2.3, e o valor é apresentado na TAB. 11.

TABELA 11 - Limite de quantificação para o método proposto

Elemento de interesse	Média das concentrações do branco	Média das concentrações do desvio padrão	LQ (ng g ⁻¹)
Cu	0,373	0,152	1,89
Mg	0,873	0,128	2,15
Mn	0,010	0,002	0,024
Se	0,063	0,009	0,153
V	0,002	0,002	0,022
Zn	0,379	0,086	1,24

5.1.4. Precisão

Como descrito no item 3.2.4, a precisão pode ser expressa por meio da repetitividade. O cálculo da repetitividade será representado no item a seguir.

5.1.4.1. Repetitividade

Para o cálculo da repetitividade do método, foram preparadas duas soluções padrão dos elementos em estudo com diferentes concentrações, e estas analisadas, de forma sucessiva conforme apresentado na TAB. 12.

TABELA 12 - Resultados obtidos da precisão na solução padrão P1

Elemento de interesse	Concentração		Desvio padrão da concentração (ng g ⁻¹)	Desvio Padrão da Repetitividade (%)
	Média da solução padrão analisada (ng g ⁻¹)	Número de determinações (n)		
Cu	24,48	10	1,15	4,70
Mg	104,78	10	6,89	6,57
Mn	0,24	10	0,034	14,16
Se	0,38	10	0,022	5,79
V	0,04	10	0,007	17,5
Zn	6,47	10	0,37	5,72

TABELA 13 - Resultados obtidos da precisão na solução padrão P2

Elemento de interesse	Concentração		Desvio padrão da concentração (ng g ⁻¹)	Desvio Padrão da Repetitividade (%)
	Média da solução padrão analisada (ng g ⁻¹)	Número de determinações (n)		
Cu	58,93	10	2,093	3,55
Mg	300,2	10	13,66	4,55
Mn	0,48	10	0,055	11,45
Se	0,75	10	0,066	8,80
V	0,086	10	0,01	11,63
Zn	15,87	10	1,11	7,0

5.1.5. Recuperação

O estudo de recuperação foi realizado em triplicata (n= 3), adicionando-se soluções do padrão analítico contendo os metais de interesse à amostra de soro. Foram efetuadas adições do padrão nas faixas correspondentes aos elementos de interesse, e os valores obtidos estão apresentados na TAB.14.

TABELA 14 – Média do recuperado (ng g⁻¹) ± SD

Adicionado (ng g ⁻¹)	Cu	Mg	Mn	Se	V	Zn
0,02	-	-	0,014 ± 0,12	-	0,016 ± 0,024	-
0,05	-	-	-	-	0,06 ± 0,064	-
0,1	-	-	0,13 ± 0,17	-	0,084 ± 0,08	-
0,2	-	-	0,18 ± 0,20	-	0,18 ± 0,07	-
0,4	-	-	0,3 ± 0,27	-	-	-
1,0	-	-	-	0,96 ± 0,8	-	-
5,0	-	-	-	6,9 ± 1,2	-	-
25	30 ± 1,57	24,5 ± 1,5	-	28,5 ± 1,61	-	30 ± 3,91
50	58,5 ± 2,0	51 ± 2,0	-	61 ± 2,0	-	61,5 ± 5,5
100	115 ± 3,0	97 ± 1,2	-	-	-	118 ± 5,0
150	153 ± 7,6	151,5 ± 3,1	-	-	-	151,5 ± 8,2
200	228 ± 8,7	196 ± 5,5	-	-	-	196 ± 8,9

-: não adicionado; SD: desvio padrão

De acordo com os resultados obtidos na TAB.14, os analitos estudados apresentaram uma boa reprodutibilidade na faixa estudada. Isso foi considerado satisfatório para o objetivo do trabalho em virtude dos níveis dos analitos estarem de acordo com as faixas correspondentes aos elementos de interesse nos grupos de estudo. Para os elementos Cu, Mg, Se e Zn (100-120%) e no caso dos analitos Mn e V, os níveis de recuperação ficaram em torno de 90%

,sendo considerados satisfatórios em virtude dos baixos teores presentes na amostra e de estarem próximos aos valores obtidos neste trabalho, para limite de quantificação.

5.1.6. Análise do material de referência por HR-ICPMS

A precisão do método, obtida durante o período de medição, pode ser avaliada através da medição dos resultados da análise do material de referência certificado de elementos traços Seronorm™ (lote 704121). O padrão foi submetido ao processo de reconstituição e as amostras foram preparadas em triplicata. A medição dos resultados, para cada elemento, é apresentada na TAB. 15.

TABELA 15 - Valores obtidos para o material de referência, por HR-ICPMS

Material de Referência	Metal (ng g ⁻¹) (média ± SD)	Valor Certificado (ng g ⁻¹)	Recuperação (%)
Cu	1103,94 ± 4,29	1300	84,91
Mg	17103,88 ± 2,92	20000	85,52
Mn	5,78 ± 1,5	6,2	93,22
Se	79,65 ± 1,21	80	99,56
Zn	1188,90 ± 4,88	1480	80,33

Os resultados obtidos apresentaram uma recuperação na ordem de 90% dos elementos certificados devido o padrão ser liofilizado e homogêneo, composição esta diferente da amostra de soro in natura com gordura.

5.1.7. Fontes de Incertezas e suas respectivas incertezas padrão

O cálculo da estimativa de incerteza associada ao processo de medição permitiu a compreensão de cada etapa do procedimento analítico e a identificação das fontes de incerteza.

A incerteza do resultado final foi estimada pela combinação das componentes descritas nas TAB. 16, 17, 18, 19, 20 e 21.

TABELA 16 - Valores intermediários e incertezas na determinação do cobre

Fontes de Incerteza Cu	Valor X_i	Incerteza Padrão $u(X_i)$	Incerteza Relativa $u(X_i)/X_i$
Concentração na alíquota (ng g^{-1})	50,05 - 71,15	2,0774 – 1,0934	0,0415 - 0,01536
Massa da amostra(g)	0,5	0,00077	0,00154
Massa final(g)	10	0,00077	0,000076
Recuperado	0,8491	0,0107	0,0126
Concentração (C) \pm incerteza expandida (ng g^{-1}) $C_{\text{Cu (mínima)}} = 1001 \pm 86,9$ e $C_{\text{Cu (máxima)}} = 1423 \pm 56,74$			

Para a concentração mínima final de 1001 ng g^{-1} , a incerteza associada foi de 9%, e para a concentração máxima final de 1423 ng g^{-1} , a incerteza associada foi de 4%.

TABELA 17- Valores intermediários e incertezas na determinação do magnésio

Fontes de Incerteza Mg	Valor X_i	Incerteza Padrão $u(X_i)$	Incerteza Relativa $u(X_i)/X_i$
Concentração na alíquota (ng g^{-1})	799,94- 896,45	22,80–18,83	0,0285 –0,021
Massa da amostra(g)	0,5	0,00077	0,00154
Massa Final(g)	10	0,00077	0,000077
Recuperado	0,8552	0,0176	0,020
Concentração (C) \pm incerteza expandida (ng g^{-1}) $C_{\text{Mg (mínima)}} = 15998 \pm 660,36$ e $C_{\text{Mg (máxima)}} = 17929 \pm 740$			

Tanto para a concentração mínima final de 15998 ng g^{-1} quanto para a concentração máxima final de 17929 ng g^{-1} , a incerteza associada foi de 4%.

TABELA 18- Valores intermediários e incertezas na determinação do manganês

Fontes de Incerteza Mn	Valor X_i	Incerteza Padrão $u(X_i)$	Incerteza Relativa $u(X_i)/ X_i$
Concentração na alíquota (ng g^{-1})	0,02 – 0,083	0,0025 – 0,0015	0,125 – 0,018
Massa da amostra(g)	0,5	0,00077	0,00154
Massa Final(g)	10	0,00077	0,000077
Recuperado	0,9322	0,0188	0,020
Concentração (C) \pm incerteza expandida (ng g^{-1}) $C_{\text{Mn}}(\text{mínima}) = 0,4 \pm 0,1$ e $C_{\text{Mn}}(\text{máxima}) = 1,66 \pm 0,09$			

Para a concentração mínima final de $0,4 \text{ ng g}^{-1}$, a incerteza associada foi de 25%, e para a concentração máxima final de $1,66 \text{ ng g}^{-1}$, a incerteza associada foi de 6%.

TABELA 19- Valores intermediários e incertezas na determinação do selênio

Fontes de Incerteza Se	Valor X_i	Incerteza Padrão $u(X_i)$	Incerteza Relativa $u(X_i)/ X_i$
Concentração na alíquota (ng g^{-1})	2,0 – 3,44	0,0764 – 0,0672	0,0382 – 0,020
Massa da amostra(g)	0,5	0,00077	0,00154
Massa final (g)	10	0,00077	0,000077
Recuperado	0,9956	0,0205	0,0205
Concentração (C) \pm incerteza expandida (ng g^{-1}) $C_{\text{Se}}(\text{mínima}) = 40 \pm 3,52$ e $C_{\text{Se}}(\text{máxima}) = 68,8 \pm 4,3$			

Para a concentração mínima final de 40 ng g^{-1} , a incerteza associada foi de 9%, e para a concentração máxima final de $68,8 \text{ ng g}^{-1}$, a incerteza associada foi de 6%.

TABELA 20- Valores intermediários e incertezas na determinação do vanádio

Fontes de Incerteza V	Valor Fontes de Incerteza X_i	Incerteza Padrão $u(X_i)$	Incerteza Relativa $u(X_i)/ X_i$
Concentração na alíquota ($\mu\text{g L}^{-1}$)	0,01 - 0,04	0,0015 – 0,001	0,15– 0,025
Massa da amostra(g)	0,5	0,00077	0,00154
Massa final (g)	10	0,00077	0,000077
Recuperado	0,9	0,0202	0,0224
Concentração (C) \pm incerteza expandida (ng g^{-1}) $C_{V \text{ (mínima)}} = 0,2 \pm 0,06$ e $C_{V \text{ (máxima)}} = 0,8 \pm 0,054$			

Para a concentração mínima final de $0,2 \text{ ng g}^{-1}$, a incerteza associada foi de 30%, e para a concentração máxima final de $0,8 \text{ ng g}^{-1}$, a incerteza associada foi de 7%.

TABELA 21- Valores intermediários e incertezas na determinação do zinco

Fontes de Incerteza Zn	Valor X_i	Incerteza Padrão $u(X_i)$	Incerteza Relativa $u(X_i)/ X_i$
Concentração na alíquota (ng g^{-1})	43,6 – 54,15	3,3312 – 2,3585	0,0764– 0,0435
Massa da amostra(g)	0,5	0,00077	0,00154
Massa final(g)	10	0,00077	0,000077
Recuperado	0,8033	0,0204	0,02540
Concentração (C) \pm incerteza expandida (ng g^{-1}) $C_{Zn \text{ (mínima)}} = 872 \pm 140,44$ e $C_{Zn \text{ (máxima)}} = 1083 \pm 109,26$			

Para a concentração mínima final de 872 ng g^{-1} , a incerteza associada foi de 16%, e para a concentração máxima final de 1083 ng g^{-1} , a incerteza associada foi de 10%.

Comparando-se os resultados para Cu e Zn na TAB.16 e TAB.21, respectivamente, verifica-se que suas contribuições de incerteza em valores numéricos, são similares. Isto significa que, segundo o método empregado, apresentaram características analíticas idênticas. Ou seja, nível de concentração compatível com a técnica e condições experimentais, como

branco e curva (FIG. 4 e 5), demonstrando assim a robustez da metodologia para esses elementos nesse nível. A incerteza final para o Cu variou de 4 a 9%, e para o Zn, de 10-16%.

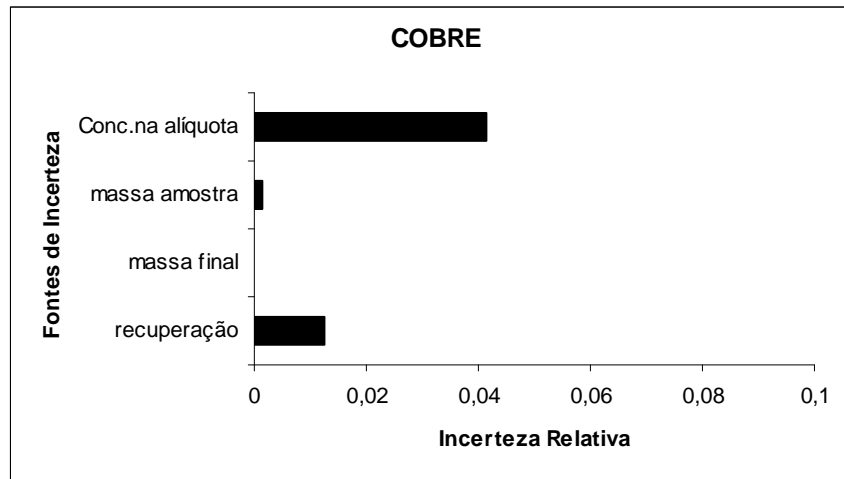


FIGURA 4 - Contribuição individual na concentração de cobre

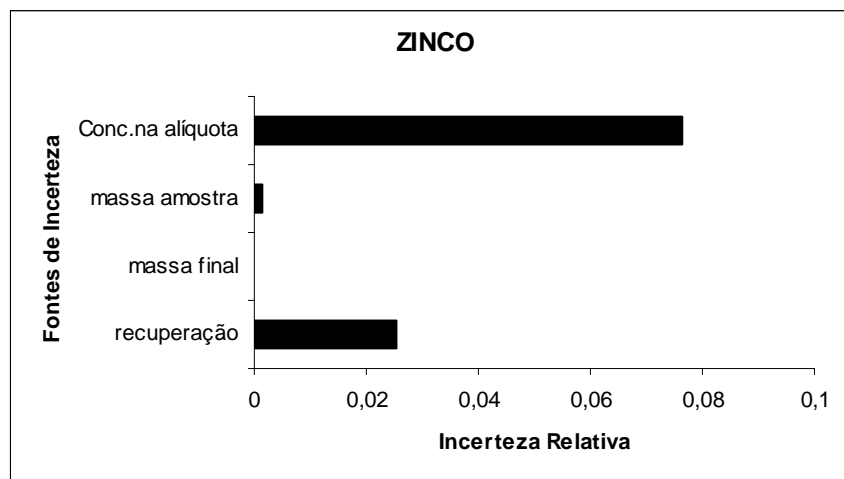


FIGURA 5 - Contribuição individual na concentração de zinco

Para o Mg, a maior contribuição na incerteza padrão combinada foi à incerteza na concentração da alíquota e na recuperação (FIG. 6), mas nada significativo para a incerteza final em torno de 4%.

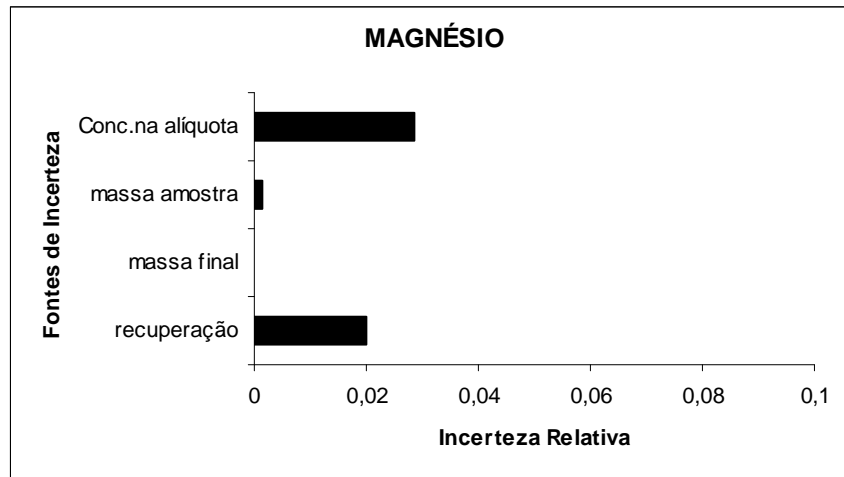


FIGURA 6 - Contribuição individual na concentração de magnésio

Como pode ser observada na FIG.7, para o elemento manganês, as principais contribuições para a incerteza padrão combinada foram devido à concentração na alíquota analisada e a recuperação. Mesmo neste nível de concentração, o método funciona bem, mas com maior grau de incerteza (cerca de 25%).

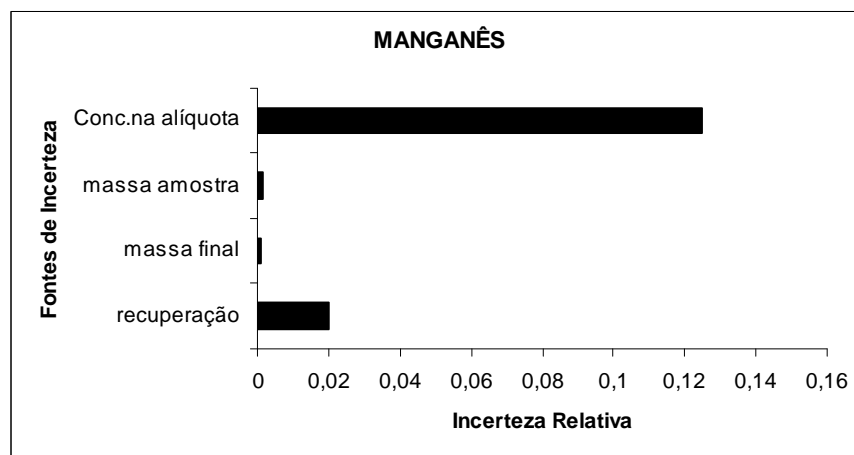


FIGURA 7 - Contribuição individual na concentração de manganês

Os resultados obtidos para o Mn permitem a análise de dois fatores fundamentais relacionados à qualidade de um resultado analítico. A primeira diz respeito à precisão da medida. Este elemento está presente a níveis de ultratraços nas amostras (0,02; 0,04 e 0,08 ng g⁻¹), níveis próximos aos valores obtidos, neste trabalho, para o limite de detecção e quantificação (0,015 e 0,024 ng g⁻¹), respectivamente. Como consequência, os níveis de precisão do sinal analítico foram cerca de 20%.

A segunda refere-se a curva analítica. Observa-se aqui uma característica importante e muito comum em trabalhos analíticos de rotina. A curva analítica (0,02 – 0,8 ng g⁻¹) utilizada

apresentou-se linear na faixa analítica de cobertura do elemento de interesse, mas também próximo ao limite de detecção e quantificação do método (FIG.8). Isto significa que os pontos inferiores da curva, região de maior influência para o analito de interesse, apresentaram também uma precisão inferior, aumentando o valor de incerteza na medição. Visto que à medida que a concentração das amostras afasta-se dos limites de detecção e quantificação, a incerteza vai diminuindo de 25 para 6 (%) (FIG.9).

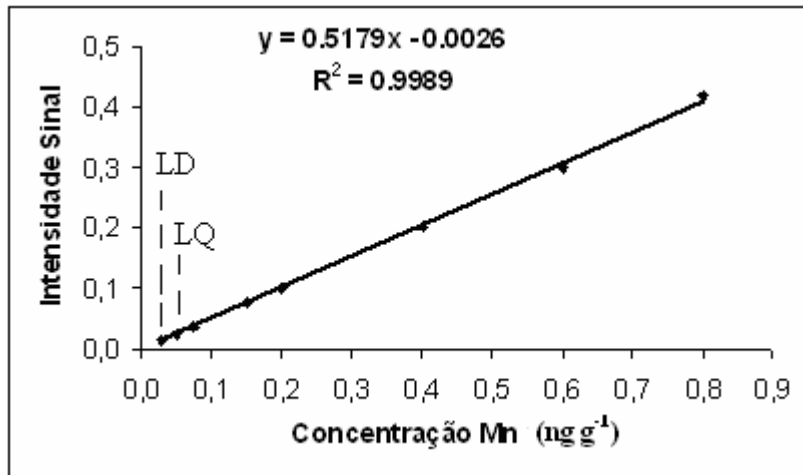


FIGURA 8 - Curva analítica para o manganês

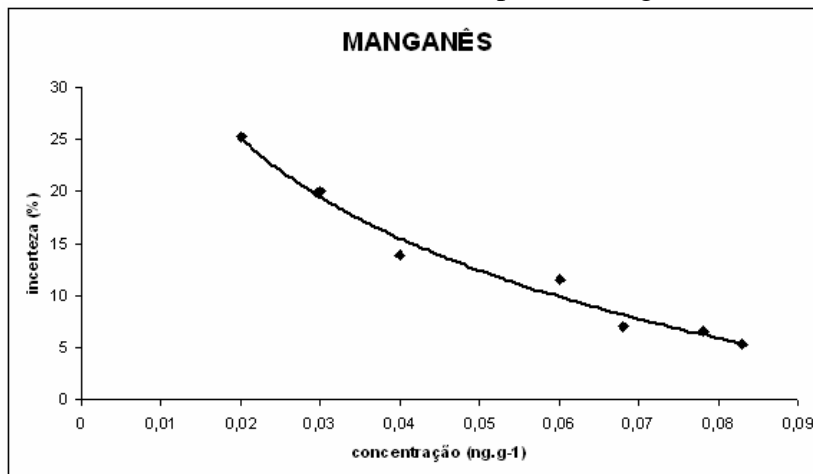


FIGURA 9 - Incerteza para a concentração do manganês

No caso do Se, a maior contribuição na incerteza padrão combinada foi a incerteza na concentração da alíquota seguida da precisão (FIG.10), no entanto, nada significativo para a incerteza total na faixa de 6 a 9%.

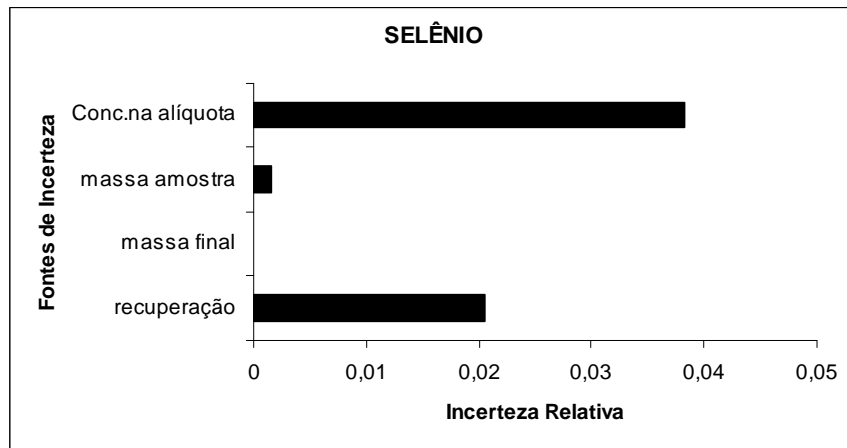


FIGURA 10 - Contribuição individual na concentração de selênio

Assim como para o elemento Mn, as principais contribuições para a incerteza padrão combinada para o elemento V foram a precisão das medições, a concentração na alíquota analisada e a recuperação (FIG.11). O V nas amostras está em níveis baixos (0,01; 0,02; 0,04 ng g^{-1}), níveis estes próximos aos valores obtidos, neste trabalho, ao limite de detecção (0,007 ng g^{-1}) e quantificação do método (0,02 ng g^{-1}). A curva analítica (0,007-0,4 ng g^{-1}) linear na faixa analítica de cobertura do analito de interesse apresentou-se também próxima ao limite de quantificação (FIG.12). Com isto, a incerteza final é alta nas amostras em estudo, no entanto, tende a diminuir a medida que afasta-se dessa região de 30 para 7 % (FIG.13).

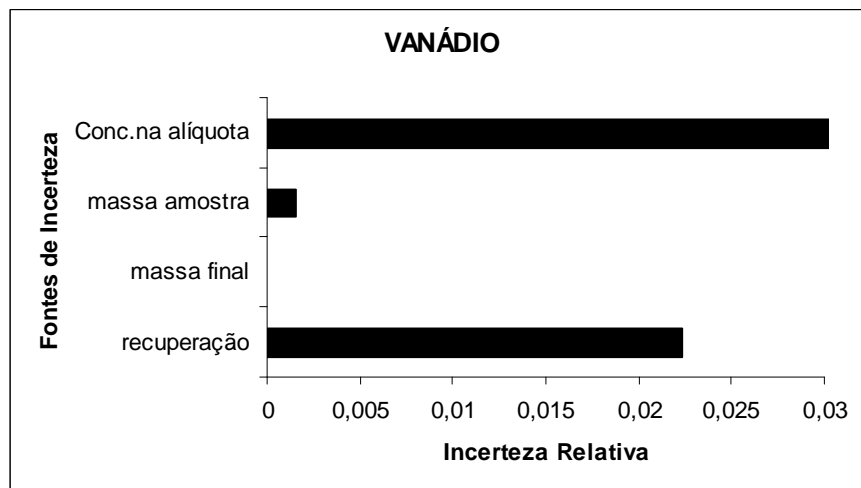


FIGURA 11-Contribuição individual na concentração de vanádio

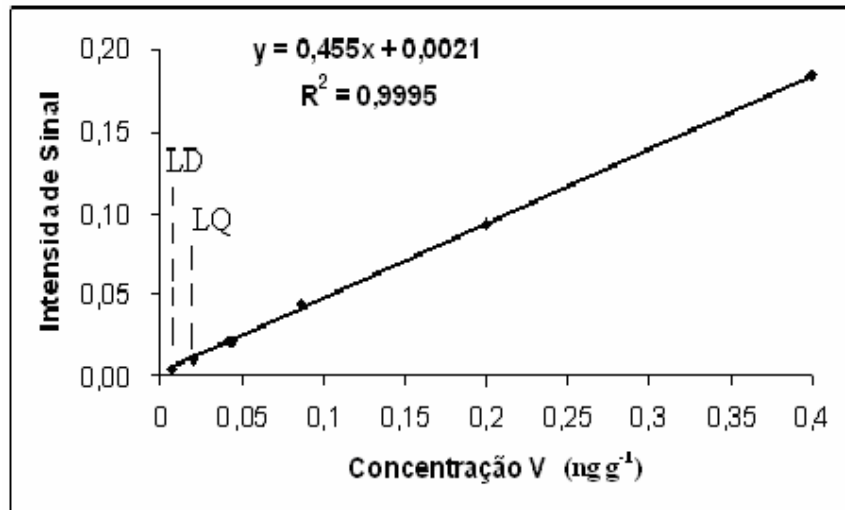


FIGURA 12-Curva analítica para o vanádio

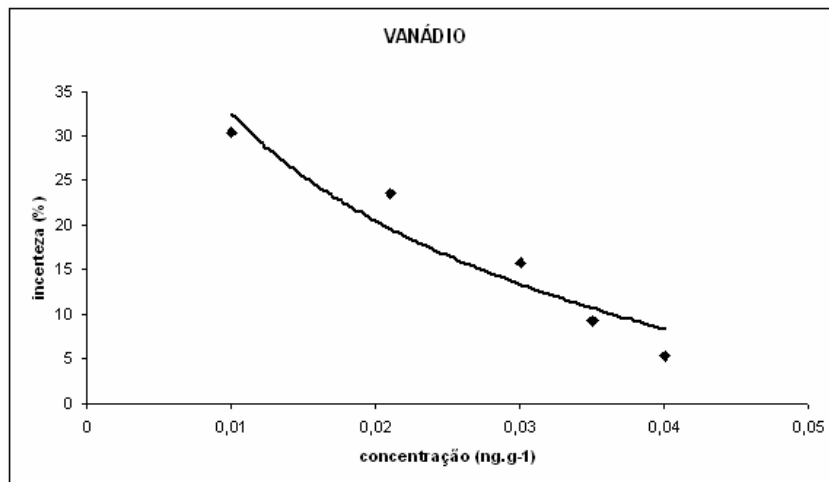


FIGURA 13 - Incerteza para a concentração do vanádio

No caso do Mn e do V, o analista poderia reduzir a incerteza padrão combinada, pré concentrando os analitos de interesse, utilizando a mesma técnica com um sistema de introdução de amostra de alta eficiência ou mesmo reduzir o intervalo da curva analítica. Caso a faixa esteja próxima ao valor obtido neste trabalho para o limite de detecção, o analista pode fazer uma análise relativa preparando um padrão que apresente exatamente o mesmo nível de sinal das amostras em estudo e usar a regra de três, ou por fim utilizar outra técnica. No entanto, todas estas ações irão apresentar mais esforços de laboratório e, certamente, irão trazer outras fontes que possam contribuir para a incerteza expandida.

Verifica-se que algumas fontes de incerteza, como massa final e massa da amostra, podem ser consideradas como insignificantes no processo de obtenção da incerteza expandida. Porém, sempre deve haver a consideração dessas fontes e avaliá-las tecnicamente, principalmente se houver mudança dos equipamentos utilizados ou do grupo envolvido na preparação das amostras.

5.2. Análise Estatística dos Dados

A TAB. 22 apresenta os resultados da média e desvio padrão das concentrações dos elementos traço, e suas respectivas faixas.

TABELA 22– Concentrações médias dos elementos traço em soro de sujeitos diabéticos (n = 86) e de controle (n= 67) e desvio padrão

Elementos	Sujeitos diabéticos (ng g ⁻¹)	Faixa encontrada	Sujeitos controle (ng g ⁻¹)	Faixa encontrada
Cu	1160,25 ± 3,52	1000,94 -1422,25	1080,61 ± 4,0	919,63-1293,54
Mg	17024,96 ± 4,93	15998,85 – 17928,85	20039,60 ± 5,1	17185,9-22836,4
Mn	1,16 ± 8,55	0,43-1,66	1,25 ± 11,15	0,74-1,95
Se	56,45 ± 6,94	40,27-68,82	106,7 ± 5,45	80,46-134,47
V	0,43 ± 12,12	0,17-0,8	0,80 ± 11,21	0,55-0,95
Zn	948,1 ± 4,1	872,0-1083,9	1052,40 ± 3,9	907,81-1194,15

Analisando os resultados na TAB. 22, para o elemento cobre, a média das concentrações encontrada para os sujeitos diabéticos foi de 1160,25 ng g⁻¹, valor este que está de acordo com a média encontrada na literatura de 1054,93 (9) e 1297,52 ng g⁻¹ (10) assim como para os sujeitos controle, a média foi de 1080,61 ng g⁻¹ e na literatura 840 e 930,37 ng g⁻¹ (9,10). No entanto, ao analisar a faixa dos sujeitos diabéticos podemos perceber que alguns resultados individuais podem ser vistos na faixa do controle conforme apresentado no boxplot (FIG.14), em que a variação dos dados no grupo 1 de sujeitos diabéticos é maior quando comparada ao grupo 2 ,controle.

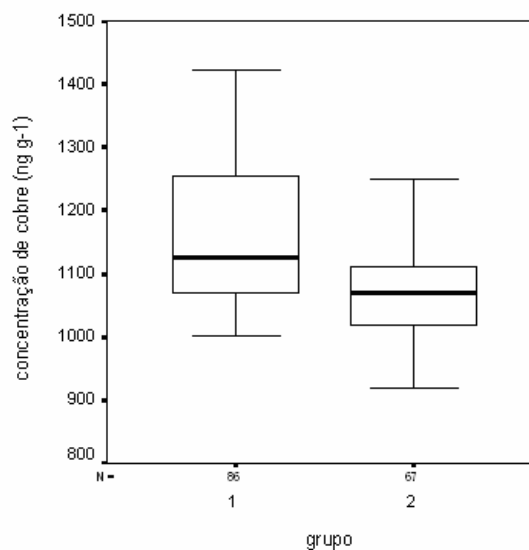


FIGURA 14 – Boxplot das concentrações do elemento cobre (1: diabéticos e 2: controle).

O magnésio aparece em menor concentração em sujeitos diabéticos ($17024,96 \text{ ng g}^{-1}$) em relação aos sujeitos do grupo controle ($20039,60 \text{ ng g}^{-1}$). Valores estes similares ao da literatura, em que $16800,0$ e $18960,0 \text{ ng g}^{-1}$ para sujeitos diabéticos enquanto $22080,0$ e $24000,0 \text{ ng g}^{-1}$ para os sujeitos controle.

Assim como para o Cu e Zn percebe-se que para o Mg a faixa dos sujeitos diabéticos tendem a dos sujeitos controle em virtude de uma maior dispersão dos resultados na faixa controle.

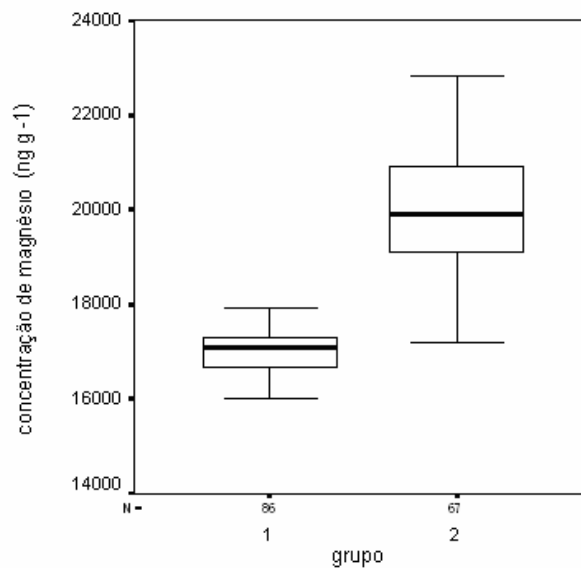


FIGURA 15 – Boxplot das concentrações do elemento magnésio (1: diabéticos e 2: controle).

Os níveis observados para o manganês em sujeitos diabéticos ($1,16 \text{ ng g}^{-1}$) apresentaram baixa significância em relação ao controle ($1,25 \text{ ng g}^{-1}$), fato este de acordo com a literatura (17). Essa observação sugere que, embora o metabolismo do manganês seja alterado, pode ser um fator na etiologia da doença em casos selecionados, mas a deficiência do manganês não parece ser uma ocorrência comum em diabéticos (9).

Analisando o boxplot na FIG.16 em relação à dispersão dos dados, verifica-se que apesar da alta variabilidade para o manganês, as medianas não diferem significamente, uma vez que os valores médios de classificação dos sujeitos estão concentrados em volta da mediana. O grupo 1 (diabéticos) apresentou valores mínimos muito baixos em relação ao grupo 2 (controle) indicando uma maior heterogeneidade.

Duas amostras de sujeitos diabéticos apresentaram valores diferentes do conjunto, que foram 15 e 16. Os valores que originaram tais diferenças foram $0,44 \text{ ng g}^{-1}$ para a amostra 15 e $0,45 \text{ ng g}^{-1}$ para a amostra 16. Naturalmente, deve-se observar que estes resultados não

deverão ser descartados e até que se possa concluir que tais valores foram realmente aberrações, variações nos equipamentos etc.

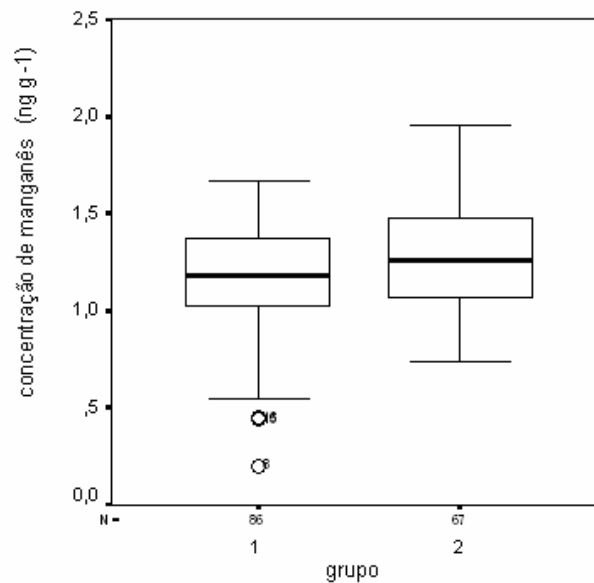


FIGURA 16 – Boxplot das concentrações do elemento manganês (1: diabéticos e 2: controle).

Para o selênio, a média encontrada nos sujeitos diabéticos foi de 56,45 ng g⁻¹ e 106,7 ng g⁻¹ para os sujeitos controle, apresentando assim uma diferença significativa entre os sujeitos em estudo, o que difere ao ser reportado por Navarro-Alárcon *et al.*,(14) e Schlienger *et al.*,(15).

Na FIG.17, a alta variabilidade na concentração do elemento selênio nos sujeitos em estudo realmente refletem medianas que diferem significativamente. Podemos observar que amostras com valores mais baixos de Se são de sujeitos diabéticos, enquanto que as amostras com valores mais altos são de sujeitos controle.

Três amostras de sujeitos diabéticos apresentaram valores diferentes do conjunto, que foram 91, 95 e 120. Os valores que originaram tais diferenças foram 134,47 ng g⁻¹ para a amostra 91; 130,84 ng g⁻¹ para a 95 e 84,0 ng g⁻¹ para a amostra 120. Naturalmente, deve-se observar que estes resultados não deverão ser descartados e até que se possa concluir que tais valores foram realmente aberrações, variações nos equipamentos etc.

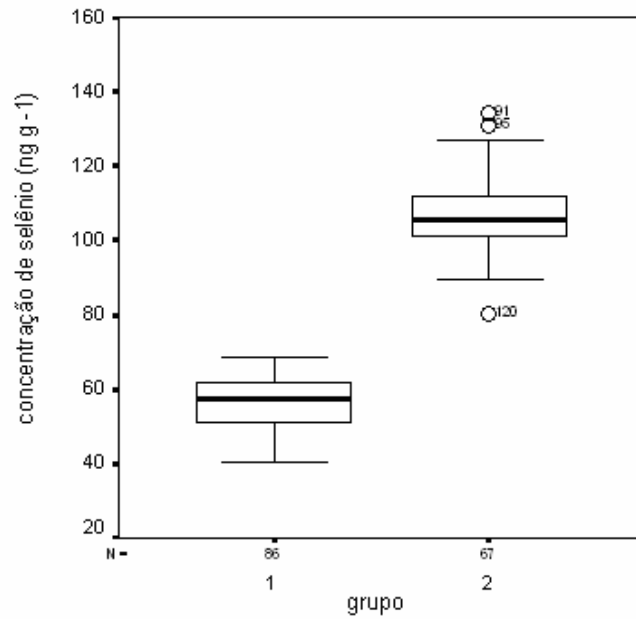


FIGURA 17 – Boxplot das concentrações do elemento selênio (1: diabéticos e 2: controle).

O valor médio de vanádio nas amostras dos sujeitos controle (0,80 ng g⁻¹) foram similares ao reportado por Moens *et al.*, (17), que foi de 0,83 ng g⁻¹, no entanto não foram reportados os níveis para os sujeitos diabéticos. De acordo com o boxplot na FIG.18 verifica-se uma maior variabilidade nas amostras do grupo 1 em relação ao grupo 2, fazendo com que os valores mais dispersos nesse grupo venham a ser confundidos com os do grupo 2 em virtude de estarem na mesma faixa.

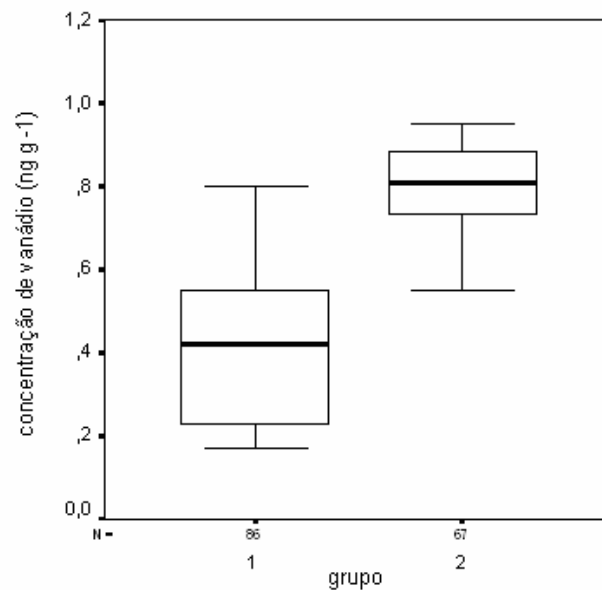


FIGURA 18 – Boxplot das concentrações do elemento vanádio (1: diabéticos e 2: controle).

Na FIG.19, observa-se que, ao contrário do que aconteceu com o cobre, os

valores obtidos para o zinco são mais baixos em sujeitos diabéticos quando comparados com os sujeitos controle. Analisando a dispersão dos dados nos sujeitos diabéticos verifica-se uma maior dispersão para o valor máximo nos sujeitos diabéticos tendendo assim para a faixa de sujeitos controle.

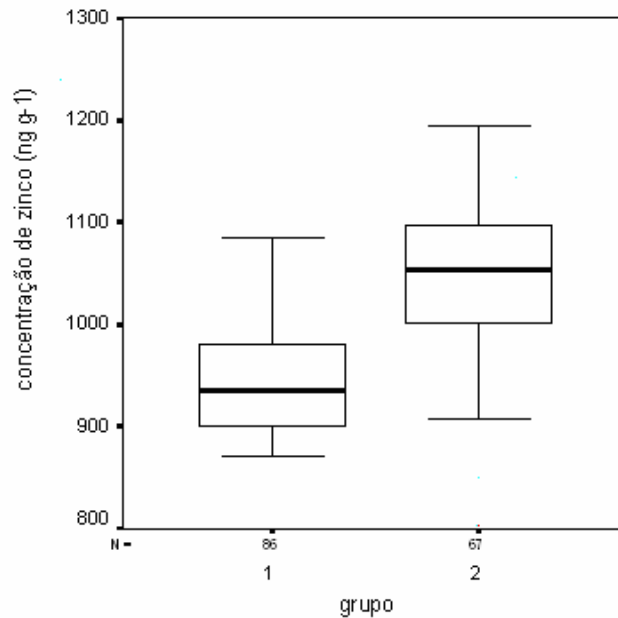


FIGURA 19 – Boxplot das concentrações do elemento zinco (1: diabéticos e 2: controle).

Embora os resultados apresentados na TAB. 22 estejam de acordo com a literatura, o uso destes valores no diagnóstico da doença ainda requer uma avaliação mais criteriosa. Nas FIG. 20 a 22 são apresentadas uma distribuição dos dados obtidos neste trabalho, tanto para os sujeitos diabéticos como para os sujeitos controle, e aqueles encontrados na literatura. Como pode ser observado, baseado apenas no valor de concentração individual de cada elemento, a separação é tênue e, em muitos casos, ocorre à sobreposição entre os dois grupos. Em termos práticos significa que uma análise por estes critérios pode gerar falsos positivos ou falsos negativos.

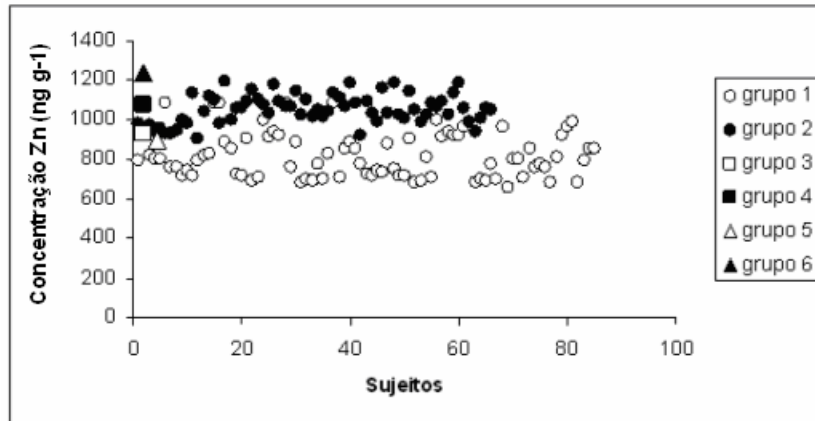


FIGURA 20 - Concentração de zinco em sujeitos diabéticos e controle.

Grupo 1: sujeitos diabéticos experimental; grupo 2: sujeitos controle experimental, grupo 3: média dos sujeitos diabéticos; grupo 4: média dos sujeitos controle (10), grupo 5: média dos sujeitos diabéticos; grupo 6: média dos sujeitos controle (11).

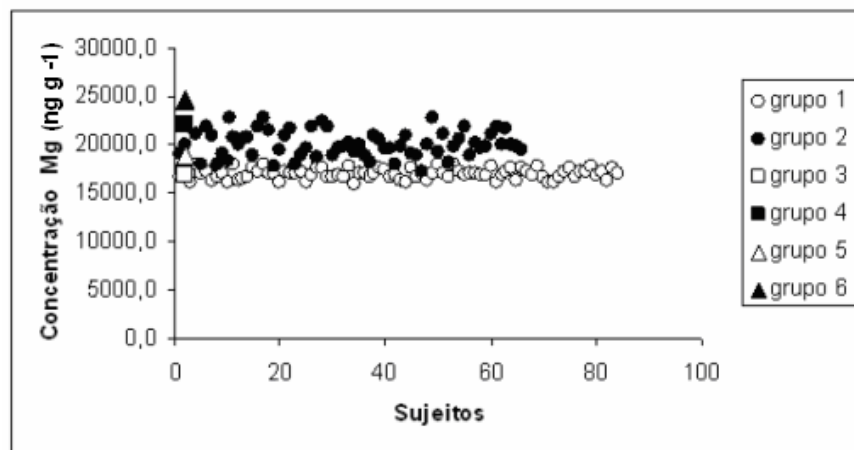


FIGURA 21 - Concentração de magnésio em sujeitos diabéticos e controle.

Grupo 1: sujeitos diabéticos experimental; grupo 2: sujeitos controle experimental, grupo 3: média dos sujeitos diabéticos; grupo 4: média dos sujeitos controle (12), grupo 5: média dos sujeitos diabéticos; grupo 6: média dos sujeitos controle(10,11).

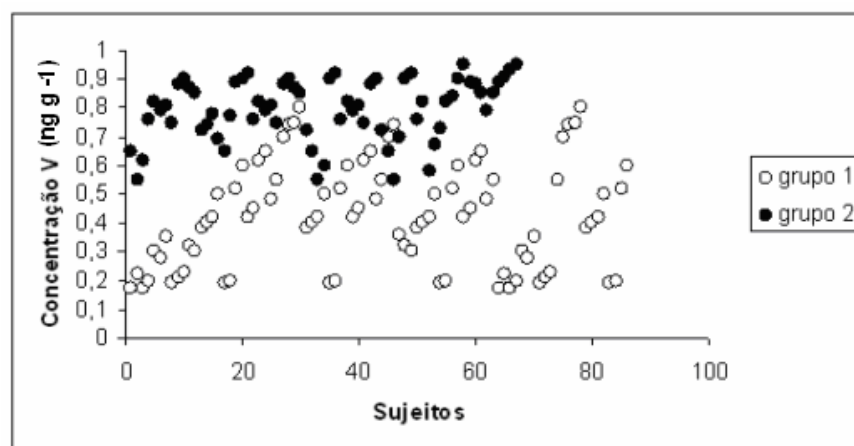


FIGURA 22 - Concentração de vanádio em sujeitos diabéticos e controle.

Grupo 1: sujeitos diabéticos experimental; grupo 2: sujeitos controle.

Alguns autores usam a razão Cu/Zn (10) e Zn/Cu (11) como parâmetro para identificar o início da doença, onde sujeitos diabéticos apresentam alto nível de Cu/Zn enquanto Zn/Cu baixo.

Na FIG.23 é apresentado o resultado obtido da Cu/Zn em sujeitos diabéticos e sujeitos controle experimental correlacionado com os obtidos na literatura, demonstrando que esse tipo de análise ainda não oferece um diagnóstico seguro.

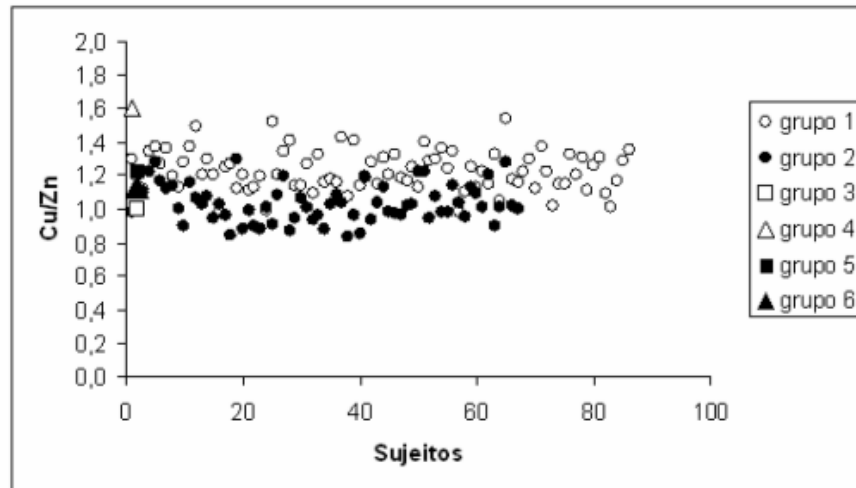


FIGURA 23 – Razão Cu/Zn em sujeitos diabéticos e controle.

Grupo 1: sujeitos diabéticos experimental; grupo 2: sujeitos controle experimental, grupo 3: média dos sujeitos diabéticos; grupo 4: média dos sujeitos controle (10), grupo 5: média dos sujeitos diabéticos; grupo 6: média dos sujeitos controle (9)

Entretanto, ao utilizar o gráfico binário (FIG.24), a diferença observada entre sujeitos diabéticos e controle obtida nesse trabalho é considerável em relação as Figuras 20, 21 e 22, mas ainda não pode ser considerada universal.

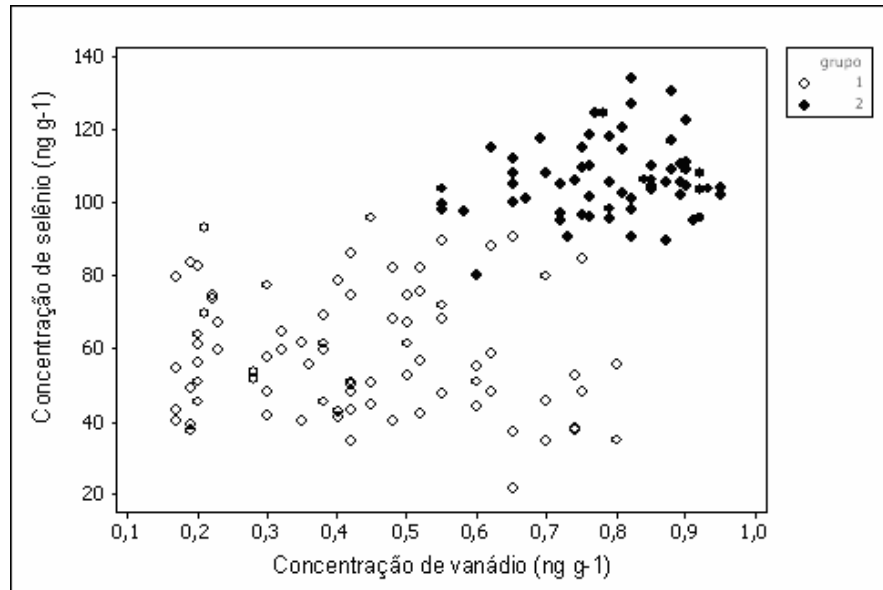


FIGURA 24 - Concentração de selênio (ng g^{-1}) em função da concentração de vanádio (ng g^{-1}) em sujeitos diabéticos (1) e controle (2)

5.3. Análise Estatística Multivariada

Uma questão importante na análise composicional numa matriz está relacionada à representação dos resultados, onde o número de variáveis observadas nas amostras pode dificultar a representação dos dados.

A observação individual dos elementos em estudo na TAB. 22, assim como nos boxplots e nas FIG. 20 a 22 demonstrou que as faixas desses elementos tanto em sujeitos diabéticos quanto controle se sobrepõe podendo induzir a interpretações errôneas.

Tendo em vista esta dificuldade, recorre-se a técnicas estatísticas multivariadas no sentido de explicar a distribuição desses elementos no conjunto de dados.

5.3.1. Análise Discriminate *Stepwise* (AD)

O principal objetivo da AD é determinar as funções discriminantes usando a medida das variações que separam grupos distintos. Foram considerados dois grupos: sujeitos diabéticos, que estão numerados de 1 a 86 e os sujeitos controle, os quais estão numerados de 87 a 153.

A AD linear é um método baseado no teste de Fisher para a significância das variáveis. Em cada etapa, uma variável é selecionada com base em sua significância, e após várias etapas, as variáveis mais importantes são extraídas de todo o conjunto de dados sob investigação. Na investigação entre sujeitos diabéticos e controle foram usadas seis variáveis (concentrações de Cu, Mg, Mn, Se, V e Zn). As propriedades mais significativas selecionadas por essa análise foram: Mg, Se, V e Zn.

A classificação percentual correta para o grupo portador e o grupo controle foi de 100%, resultando na separação satisfatória dos dois grupos (TAB. 23).

TABELA 23 – Classificação da matriz obtida por DA para 153 amostras de soro humano

Grupo classificado	Porcentagem	Grupo verdadeiro	
		1	2
1	98	83	0
2	100	3	67
Total n	-	86	67
n correto	-	83	67

A função discriminante obtida com 153 amostras é dada a seguir pelas Eq.16 e 17.

$$\text{Sujeitos diabéticos} = - 2,80 - 2,39 \text{ Mg} - 2,31 \text{ Se} - 1,55 \text{ V} - 0,83 \text{ Zn} \quad (16)$$

$$\text{Sujeitos controle} = - 4,65 + 3,08\text{Mg} + 3,75 \text{ Se} + 1,99 \text{ V} + 1,07 \text{ Zn} \quad (17)$$

Através das funções discriminantes dadas pelas equações 16 e 17 e pelos valores de cada variável dos grupos estudados, pode-se obter uma matriz de classificação usando todas as amostras na análise. Quando novas amostras de sujeitos forem investigadas pode-se usar os resultados obtidos com a AD, seguindo os seguintes passos: a) Determinar inicialmente, para as novas amostras de portadores, os valores das variáveis mais importantes obtidas a partir da metodologia AD, como por exemplo: Mg, Se, V e Zn; b) Substituir esses valores nas duas funções discriminantes (equações 16 e 17); d) Checar qual função discriminante apresenta maior valor. A nova amostra será considerada como diabética se a função discriminante para o grupo de sujeitos diabéticos apresentar valor elevado e vice versa.

5.3.2. Análise de Componentes Principais (ACP)

Uma ACP extrai fatores independentes a partir de números altamente correlacionados por decomposição da matriz de dados: matriz *loadings*, os quais contem fatores independentes (componentes principais CPS e matriz de scores). Nesta análise foi realizada uma combinação entre as variáveis, a combinação que apresentou maior variância foi selecionada.

Os resultados da ACP mostram que a primeira componente principal (CP1) é responsável por 82,6% da variância dos dados. Considerando a primeira e a segunda componente principal, a variância acumulativa explica 94,8%. O número de scores plotado foi examinado e mais uma informação é apresentada na FIG.25.

Na FIG. 25 podemos observar que as amostras de soro, com exceção da amostra 6, 27 e 83, são separadas em dois grupos: grupo 1 (sujeitos diabéticos) e grupo 2 (sujeitos controle). Também na FIG.25, podemos observar que a CP1 é responsável pela separação entre dois grupos em que os metais Zn, Mg, Se e V tem similaridade em PC1.

Analisando a FIG.25, podemos observar que os sujeitos diabéticos apresentaram valores negativos para a CP1, enquanto que o controle apresentou valores positivos na CP1.

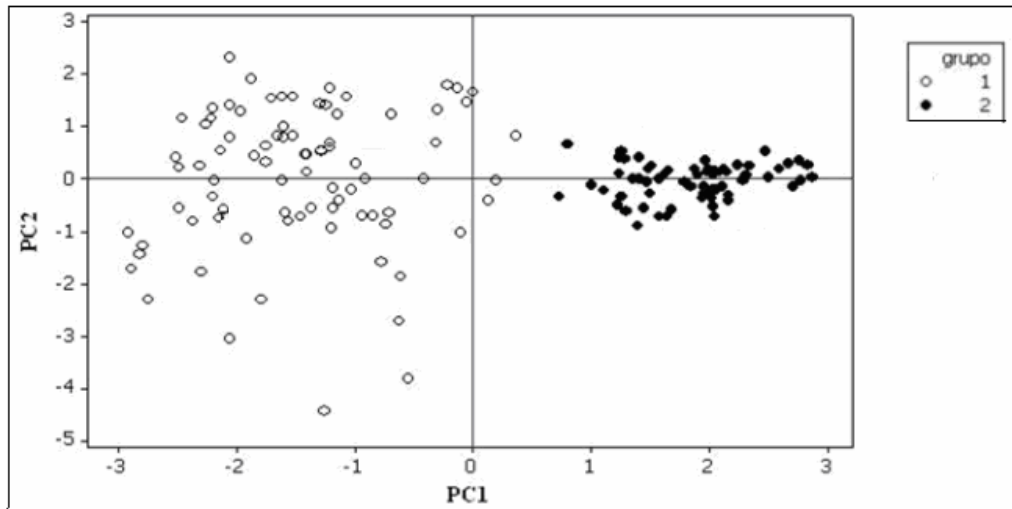


FIGURA 25 – Escore plotado em duas dimensões para amostras de sujeitos diabéticos (grupo 1) e sujeitos controle (grupo 2).

Ao utilizarmos este modelo com os dados da literatura observa-se também a separação entre os sujeitos em estudo, como mostra a FIG.26.

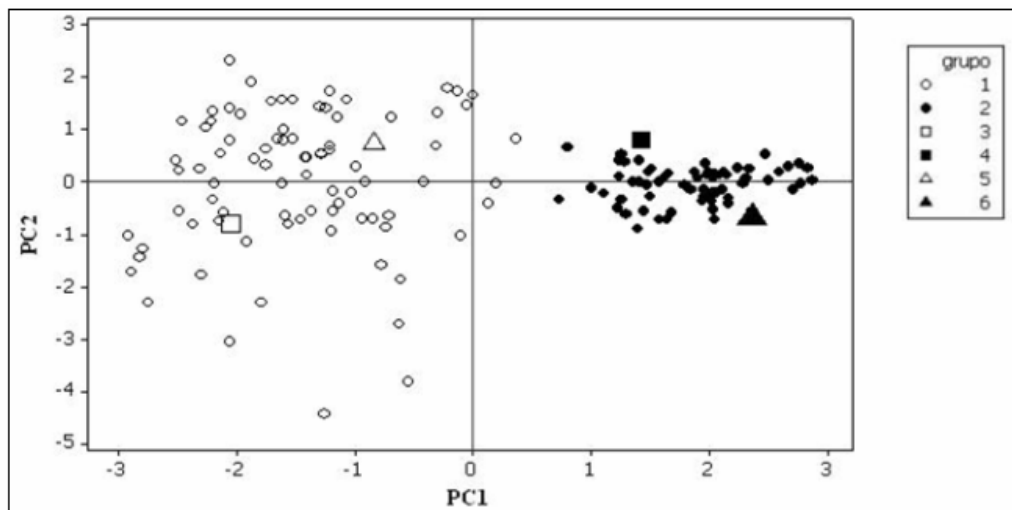


FIGURA 26 – Escore plotado em duas dimensões para amostras de sujeitos diabéticos e sujeitos controle e dados da literatura.

Grupo 1: sujeitos diabéticos experimental; grupo 2: sujeitos controle experimental, grupo 3: média dos sujeitos diabéticos; grupo 4: média dos sujeitos controle (Se (14); Mg (12); Cu (5); Zn (10)); grupo 5: média dos sujeitos diabéticos; grupo 6: média dos sujeitos controle (Se : (15); Mg (10,11); Cu (10); Zn (11)).

5.3.3. Análise de Cluster (AC)

Os resultados obtidos com a AC foram similares aos obtidos com ACP e AD, e são representados no dendrograma apresentado na FIG.27. Nesse caso, o dendrograma pode ser

usado para fornecer informações sobre o comportamento químico e verificar os resultados obtidos na ACP. No dendrograma da FIG. 27 as linhas verticais representam as amostras e as linhas horizontais representam os valores similares entre os pares de amostras, uma amostra e um grupo de amostras e entre grupos de amostras. A partir desse dendrograma pode-se dizer que a similaridade observada entre os dois grupos é zero. Os grupos 1 e 2 na FIG. 27 correspondem aos grupos 1 e 2 na FIG. 25 (ACP).

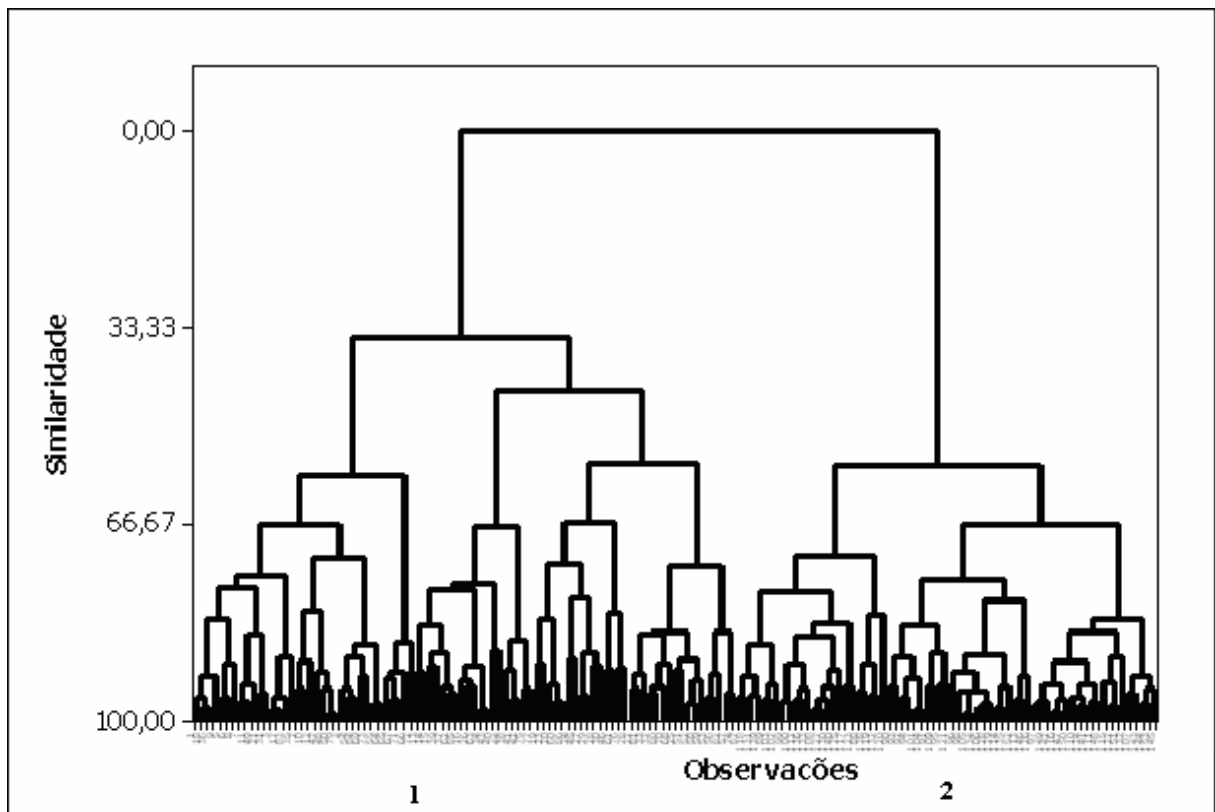


FIGURA 27 – Dendrograma da AC para discriminação entre sujeitos diabéticos (1) e sujeitos controle (2)

Ambos os métodos ACP e AC, com exceção das amostras em 6, 27, 83 em ACP, classificou as 153 amostras de soro em dois grupos, estudados exatamente da mesma maneira. Com base na classificação obtida com os métodos ACP e AC podemos dizer que Zn, Mg, Se e V são responsáveis pela separação entre sujeitos diabéticos e controle.

Pacientes com DM tipo 2, uma doença multifatorial na qual a resistência à insulina é reconhecidamente uma das causas do controle glicêmico deficitário, frequentemente apresentam um estado de hipomagnesemia (32). O Mg tem correlação com a glicose, em que sua deficiência relata uma maior captação de glicose, visto que o Mg envolve-se em diversas ainda não se dispor de dados conclusivos relacionados às alterações no metabolismo de Mg

que ocasionariam mudanças na tolerância à glicose, vários mecanismos são propostos na tentativa ações enzimáticas que influem na oxidação da glicose (12). Estudos atribuem ao Mg uma função crítica no metabolismo da glicose, sugerindo ser sua deficiência um estado associado ao desenvolvimento da resistência à insulina (32), ou ser conseqüência dela (12). Apesar de explicar as modificações ocorridas na homeostase da glicose durante a deficiência de Mg (32).

O elemento selênio além de atividade antioxidante, também contribui para atenuar os efeitos deletérios da hiperglicemia por mimetizar a ação da insulina. As ações de mimetizar a ação da insulina incluem tanto a estimulação da captação da glicose quanto a regulação de processos metabólicos (54). Como a insulina, formas inorgânicas de selênio são efetivas em normalizar os níveis de glicose no sangue e de aumentar a captação de glicose em tecidos insulino-dependentes em ratos diabéticos (55). Dessa forma, o selênio participa da homeostase da glicose modificando a fosforilação das proteínas da cascata da insulina, que modifica as atividades das enzimas e o transporte da glicose (54).

O vanádio é encontrado como elemento ultratraço, em concentrações fisiológicas de 10^{-10} a 10^{-9} M, amplamente distribuído em tecidos de mamíferos e outros animais (35).

Estudos demonstraram que o vanádio altera o metabolismo de glicose de modo semelhante ao da insulina em músculo. O vanádio aumenta a entrada de glicose, síntese de glicogênio e glicólise em amplitude menor que à da insulina, mas sua ação é maior ao produzir lactato e oxidar glicose (35).

A diminuição na concentração sérica do elemento zinco em diabéticos tem sido associada à diminuição sérica dos níveis de albumina e aminoácidos, que são os fatores circulatórios para a transferência de Zn (11). A deficiência de Zn em alguns estudos tem sido associada com a redução da secreção e aumento dos tecidos com resistência à ação da insulina (33).

5.3.4. Correlações entre metais e dados clínicos

A TAB. 24 apresenta as características descritivas dos sujeitos em estudo nas variáveis, idade, peso, altura, cintura, quadril, pressão arterial sistólica, pressão arterial diastólica, índice de massa corpórea, relação cintura-quadril, colesterol total, leptina, glicose, creatinina, ácido úrico, transaminase pirúvica e transaminase oxaloacética, e os elementos traços mais significativos determinados através da análise de componente principal e discriminante nesse estudo.

TABELA 24 – Média e desvio padrão das características descritivas e elementos traços nos sujeitos em estudo

Variável	Sujeitos diabéticos n = 86	Faixa diabéticos	Sujeitos controle n = 67	Faixa controle
Idade (anos)	56 ± 8,08	40-70	51 ± 9,0	29-69
Peso (kg)	73,6 ± 12,34	49,5-99,2	70,8 ± 11,74	49,5-90,5
Altura (m)	157 ± 9,51	140-175	158 ± 7,94	158-172
Cintura (cm)	101 ± 8,63	79-127	97 ± 10,47	78-121
Quadril (cm)	104 ± 7,91	90-122	103 ± 7,31	90-120
PAS (mmHg)	152 ± 27,14	100-230	124 ± 16,04	100-175
PAD(mmHg)	92 ± 15,81	70-140	82 ± 10,74	60-110
IMC (kg/m ²)	30 ± 4,49	23-47	28,25 ± 4,22	21,23-39,56
RCQ	0,96 ± 0,03	0,87-1,07	0,94 ± 0,06	0,79-1,04
CT (mg/dL)	213 ± 71,97	62-357	200 ± 38,51	115-357
Leptina (mg/dL)	5,37 ± 3,23	0,7-17,02	4,09 ± 2,22	0,5-10
Glicose (mg/dL)	133 ± 67,48	70-424	85 ± 10,25	54-109
Creatinina (mg/dL)	1,06 ± 0,59	0,7-6,2	0,91 ± 0,2	0,4-1,4
Ácido úrico (mg/dL)	5,17 ± 1,7	2,0-9,6	4,56 ± 1,62	2,0-8,3
TGP (U/L)	22 ± 11,32	7,0-87	23 ± 7,73	10-49
TGO (U/L)	22 ± 8,79	9,0-79	22 ± 4,91	14-38
Zn (µg L ⁻¹)	948,1 ± 4,1	657,71– 1083,90	1052,4 ± 3,9	907,81 – 1194,15
Mg (µg L ⁻¹)	17024,96 ± 4,93	15998,85 – 17928,85	20039,6 ± 5,1	17185,9 – 22836,4
Se (µg L ⁻¹)	56,45 ± 6,94	40,27 – 68,82	94 ± 5,45	60 – 117
V (µg L ⁻¹)	0,43 ± 12,12	0,17 – 0,8	0,80 ± 11,21	0,55 – 0,95

Onde PAS (pressão arterial sistólica), PAD (pressão arterial diastólica), IMC (índice de massa corpórea), RCQ (razão cintura-quadril), CT (colesterol total), TGP (transaminase pirúvica), TGO (transaminase oxaloacética), Zn (zinco), Mg (magnésio), Se (selênio) e V (vanádio).

Os coeficientes de correlação das características descritivas e dos elementos traço foram avaliados através da correlação de Pearson e são apresentados no Anexo II. As análises dos coeficientes de correlação mostraram correlações significativamente positivas e negativas.

De acordo com o anexo II, observamos uma correlação positiva do zinco com magnésio ($r = 0,596$; $p < 0,01$) e selênio ($r = 0,561$; $p < 0,01$), assim como magnésio e selênio apresentaram uma correlação significativamente positiva ($r = 0,925$; $p < 0,01$) entre si.

Já em relação ao vanádio, o mesmo apresentou uma correlação positiva com magnésio ($r = 0,729$; $p < 0,01$) e selênio ($r = 0,736$; $p < 0,01$). Como era esperado, houve uma correlação entre os metais Zn, Mg, Se e V, confirmando assim os resultados obtidos através da análise de discriminante e de componentes principais.

O peso e a medida da cintura apresentaram uma forte correlação ($r = 0,818$; $p < 0,01$), e ambos apresentaram uma correlação positiva significativa com quadril ($r = 0,729$; $p < 0,01$, $r = 0,788$; $p < 0,01$) e IMC ($r = 0,760$; $p < 0,01$, $r = 0,765$; $p < 0,01$). Isto implica numa inter-relação entre essas variáveis, no qual existindo um aumento de peso, a outra variável também sofrerá uma elevação significativa demonstrando a sinergia entre esses dados ergonômicos.

O grande aumento da prevalência mundial do *diabetes mellitus* deve-se em parte ao aumento também crescente na prevalência do excesso de peso, com a conseqüente síndrome metabólica, na qual a resistência à insulina é aspecto fisiopatológico central (12).

A medida da cintura apresentou uma correlação com os elementos magnésio ($r = -0,183$; $p < 0,05$) e selênio ($r = -0,204$; $p < 0,05$), demonstrando a relação desses elementos associados a medida da cintura, parâmetro este utilizado na identificação de situações clínicas de risco cardiovascular, visto que a utilização da medida da cintura é útil na identificação da obesidade em pacientes com DM2 segundo pesquisadores (56).

A pressão arterial sistólica (PAS) apresentou uma correlação negativa com o magnésio ($r = -0,492$; $p < 0,01$) e selênio ($r = -0,504$; $p < 0,01$). A PAS é definida como a pressão exercida pelo sangue durante a sístole do coração, a PAS ideal é de 120 mmHg., e considerada hipertensão arterial sendo maior ou igual a 140mmHg. Nesse estudo a média da PAS dos pacientes diabéticos foi de 152 mmHg o que os coloca como hipertensos leve (estágio 1) segundo a Organização Mundial de Saúde.

A coexistência de hipertensão e *diabetes mellitus tipo 2* (DM tipo 2) coloca o paciente diabético sob risco duas vezes maior do que de uma pessoa não diabética de apresentar doenças cardiovasculares, principal causa morte no diabético, correspondendo a 70-86% dos óbitos nessa população (57).

A hipertensão arterial sistêmica (HAS) é encontrada em 20-60% dos diabéticos, sendo 1,5 a 3 vezes mais prevalente do que em indivíduos sem diabetes(58).

A baixa concentração de Mg associada à elevação de cálcio intracelular, que são observadas na hipertensão e DM tipo 2, decorreriam, portanto, de uma dissociação do balanço iônico, na qual o acúmulo de Ca estimulado pela insulina predominaria sobre a ação desta para promover a captação de magnésio. Este maior influxo de cálcio e a menor concentração intracelular de magnésio poderiam, então, causar ou exacerbar a resistência à insulina nos pacientes com DM tipo 2. A elevação dos níveis de cálcio livre celular, provocada pela

deficiência de Mg em humanos, tem sido também relatada como uma das causas da resistência à insulina.

Observou-se, ainda, uma tendência à correlação negativa, porém não estatisticamente significativa, entre o zinco e leptina ($r = -0,154$). Existem evidências de que o zinco pode influenciar este hormônio, até porque esse mineral é co-fator para a expressão do gene obesidade. As concentrações de leptina diminuem em resposta a restrição de zinco e aumentam posteriormente a um período de suplementação (57)

Neste estudo, observamos correlação negativa do magnésio e selênio com a medida da cintura e pressão arterial sistólica, e uma tendência para correlação inversa entre o zinco e leptina, que talvez não tenha alcançado significância estatística em função das faixas dos sujeitos em estudo.

Mesmo os dados clínicos consagrados - como teor de glicose e leptina - precisam ser interpretados dentro uma análise mais ampla do quadro clínico do paciente. Observando as figuras abaixo podemos verificar que individualmente estes valores também podem se confundir.

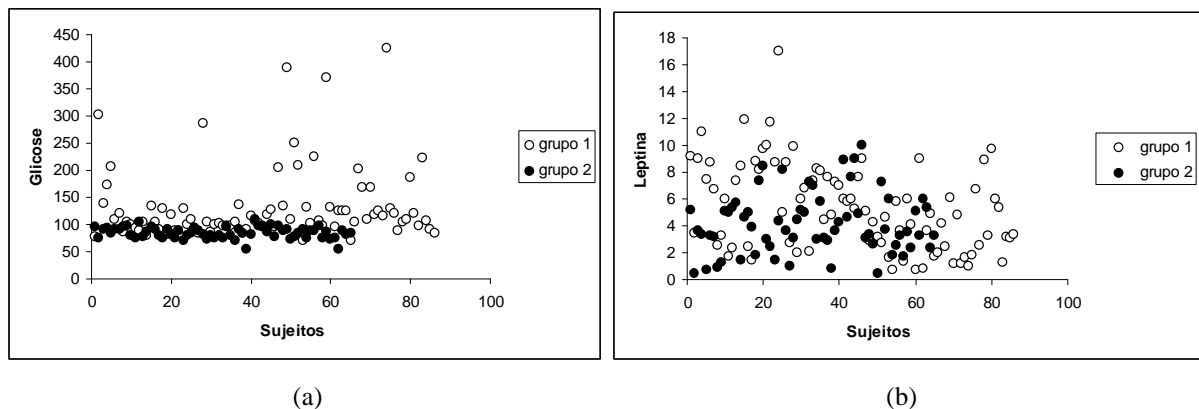


FIGURA 28 – (a) Glicose: Grupo 1 - sujeitos diabéticos e, Grupo 2 - sujeitos controle; (b) Leptina: Grupo 1 - sujeitos diabéticos e, Grupo 2 - sujeitos controle.

6. CONCLUSÕES

A determinação precisa, com resultados confiáveis e reproduzíveis de metais em amostras de soro, constitui de um aspecto importante da química clínica para o diagnóstico de doenças. A utilização de uma técnica multielementar e muito sensível, como um HR-ICPMS, trouxe várias vantagens entre as quais, a simplicidade de procedimentos. Uma simples diluição da amostra de soro permitiu analisar os elementos de interesse, inclusive os elementos em nível de ng g^{-1} como manganês e vanádio. Dessa forma, a determinação rigorosa, com resultados confiáveis e reproduzíveis de metais em amostras de soro, constitui de um aspecto importante da química clínica para o diagnóstico de doenças. No entanto, se por um lado o alto fator de diluição elimina praticamente o efeito da matriz, por outro lado, exige um rigoroso controle das fontes de contaminação em laboratório, a utilização de áreas controladas, reagentes de alta pureza e uma cuidadosa interpretação dos resultados.

Um aspecto importante do processo analítico foi a validação segundo procedimentos recomendados pela Norma ISSO 17025. A adoção destes procedimentos garantiu não somente a qualidade, mas também a rastreabilidade dos mesmos. Entre as principais figuras de mérito da metodologia cabe destacar o cálculo das incertezas. O seu estudo trouxe um conhecimento detalhado dos pontos fortes e fracos de cada etapa do procedimento analítico e, por comparação com valores encontrados na literatura, pontos a serem melhorados. Os maiores fatores que influenciam no cálculo de incerteza consistem na concentração do analito e recuperação. Estes parâmetros podem variar dentro da rotina de um laboratório exigindo do analista uma avaliação contínua dos resultados obtidos em função das principais figuras de mérito da técnica e do procedimento analítico empregado, corrigindo cada etapa conforme a necessidade. No entanto, qualquer decisão que envolva a mudança dos procedimentos estabelecidos deve ser considerada levando em consideração, principalmente, os objetivos da análise. Dessa forma, cabe ao analista decidir se a introdução de etapas adicionais em seu procedimento padrão poderá ser vantajosa ou não.

Em linhas gerais, os teores de metais encontrados nas amostras em estudo estão de acordo com outros trabalhos descritos na literatura. Isto significa que, para a população estudada, a relação destes metais no soro não está fortemente associada a etnia, hábitos alimentares ou mesmo questões ambientais, o que torna nosso estudo comparável com dados encontrados em outros países ou mesmo a aplicação do modelo aqui desenvolvido em outras populações. Dessa forma a utilização destes valores, individualmente, não podem ser usados no diagnóstico da doença.

Entretanto, ao utilizarmos métodos quimiométricos, pequenas diferenças entre esses valores assim como a relação entre os mesmos permitem uma separação clara entre os grupos em observação.

A explicação para este fato ainda não está clara, entretanto sendo o diabetes, uma doença multifatorial, vários fatores contribuem simultaneamente para o seu desenvolvimento.

No desenvolvimento do nosso modelo, a correlação de Pearson, permitiu identificar uma correlação entre os metais Se e Mg, a medida de cintura e pressão arterial sistólica demonstrando assim que essa relação funciona ao ser aplicado para pacientes com *diabetes mellitus tipo 2*.

As técnicas multivariadas como ACP, AD e AC possibilitaram a redução da matriz de dados e determinação das variáveis mais importantes dos grupos, ou seja, a pré-avaliação dos grupos em função da concentração elementar forneceu as principais informações sobre as correlações nas amostras estudadas.

A separação das amostras de soro em dois grupos de sujeitos (diabéticos e controle), através da ACP, AD e AC, demonstraram que as variáveis Zn, Mg, Se e V são as mais importantes para a separação desses grupos.

Como conclusão final podemos afirmar que a análise dos metais em soro humano e a utilização de técnicas quimiométricas para a sua interpretação podem se constituir numa poderosa ferramenta para uma avaliação preliminar do quadro da doença.

Entretanto, a forma mais eficaz de sua utilização no diagnóstico, ou mesmo prognóstico da doença, exigiria um acompanhamento médico a longo prazo dos níveis destes metais no soro humano (por meio de gráficos de controle) permitindo a diferenciação de variações relacionadas a influência da doença, daquelas associadas a fatores externos.

ANEXOS

ANEXO I: Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa do IPEN

**Parecer - Projeto Nº 106/CEP-IPEN/SP**

Com base nos pareceres apresentados pelos relatores, o protocolo de pesquisa "**Influência de Metais no Diabetes Mellitus Tipo II**", de responsabilidade do pesquisador **Dr. Jorge Eduardo de Souza Sarkis** foi considerado **APROVADO**.

Tendo em vista a legislação vigente, devem ser encaminhados, a este Comitê, relatórios anuais (parciais ou finais, dependendo da duração do projeto) referentes ao andamento da pesquisa. Após o término da pesquisa, uma cópia do trabalho, em CD ou disquete, deve ser encaminhada a este CEP.

São Paulo, 20 de julho de 2005

Profa. Dra. Martha Marques Ferreira Vieira
Coordenadora do CEP-IPEN

ANEXO II: Coeficientes de correlação de Pearson entre as características descritivas e os elementos traços

	Peso	Altura	Cintura	Quadril	PAS	PAD	IMC	RCQ	CT	Leptina	Glicose	Creatinina	Acido úrico	TGP	TGO	Zn	Mg	Se	V
Peso	1	0,490**	0,818**	0,733**	0,011	0,068	0,761**	0,442**	-0,178*	0,133	0,008	0,045	0,197	0,091	0,002	-0,013	-0,103	-0,125	-0,110
Altura	0,490**	1	0,221**	0,204*	-0,090	-0,018	-0,184*	0,128	-0,362**	-0,364**	-0,011	0,151	0,186*	0,149	0,104	0,060	0,057	0,048	0,008
Cintura	0,818**	0,221*	1	0,790**	0,154	0,150	0,765**	0,668**	-0,023	0,255**	0,062	-0,034	0,147	0,065	-0,054	-0,073	-0,183*	-0,204*	-0,138
Quadril	0,733**	0,204*	0,790**	1	-0,019	0,052	0,683**	0,078	-0,048	0,202*	0,007	-0,096	-0,004	0,074	-0,012	0,024	-0,048	-0,087	-0,120
PAS	0,011	-0,090	0,154	-0,019	1	0,774**	0,079	0,302**	0,097	0,079	0,417**	0,110	0,008	0,006	-0,054	-0,289**	-0,504**	-0,492**	-0,359**
PAD	0,068	-0,018	0,150	0,052	0,774**	1	0,088	0,213**	0,002	0,039	0,393**	0,146	0,021	-0,019	-0,082	-0,206*	-0,322**	-0,336**	-0,237**
IMC	0,761**	-0,184*	0,765**	0,683**	0,079	0,088	1	0,404**	0,070	0,437**	0,012	-0,068	0,078	-0,013	-0,081	-0,054	-0,156	-0,174*	-0,131
RCQ	0,442**	0,128	0,668**	0,078	0,302**	0,213**	0,404**	1	0,020	0,155	0,118	0,078	0,252**	0,027	-0,067	-0,158	-0,255**	-0,241**	-0,095
CT	-0,178*	-0,362**	-0,023	-0,048	0,097	0,002	0,070	0,020	1	0,345**	-0,029	-0,134	0,063	0,044	0,156	-0,085	-0,059	-0,060	0,013
Leptina	0,133	-0,364**	0,255**	0,202*	0,079	0,039	0,437**	0,155	0,345**	1	-0,006	-0,145	-0,093	-0,057	-0,005	-0,154	-0,202*	-0,169*	-0,099
Glicose	0,008	-0,011	0,062	0,007	0,417**	0,393**	0,012	0,118	-0,029	-0,006	1	0,088	-0,146	0,072	-0,074	-0,292**	-0,443**	-0,417**	-0,360**
Creatinina	0,045	0,151	-0,034	-0,096	0,110	0,146	-0,068	0,078	-0,134	-0,145	0,088	1	0,222*	-0,078	-0,112	-0,064	-0,150	-0,119	-0,196*
Ac. urico	0,197*	0,186*	0,147	-0,004	0,008	0,021	0,078	0,252**	0,063	-0,093	-0,146	0,222**	1	0,223**	0,219**	0,022	-0,161*	-0,147	-0,075
TGP	0,091	0,149	0,065	0,074	0,006	-0,019	-0,013	0,027	0,044	-0,057	0,072	-0,078	0,223**	1	0,843**	0,151	0,059	0,051	0,054
TGO	0,002	0,104	-0,054	-0,012	-0,054	-0,082	-0,081	-0,067	0,156	-0,005	-0,074	-0,112	0,219**	0,843**	1	0,086	0,032	0,012	0,026
Zn	-0,013	0,060	-0,073	0,024	-0,289**	-0,206*	-0,054	-0,158	-0,085	-0,154	-0,292**	-0,064	0,022	0,151	0,086	1	0,561**	0,596**	0,470**
Mg	-0,103	0,057	-0,183*	-0,048	-0,504**	-0,322**	-0,156	-0,255**	-0,059	-0,202*	-0,443*	-0,150	-0,161*	0,059	0,032	0,561**	1	0,925**	0,736**
Se	-0,125	0,048	-0,204*	-0,087	-0,492**	-0,336**	-0,174*	-0,241**	-0,060	-0,169*	-0,417**	-0,119	-0,147	0,051	0,012	0,596**	0,925**	1	0,729**
V	-0,110	0,008	-0,138	-0,120	-0,359**	-0,237**	-0,131	-0,095	0,013	-0,099	-0,360**	-0,196*	-0,075	0,054	0,026	0,470**	0,736**	0,729**	1,000

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1 COZZOLINO, S.M.F. **Biodisponibilidade de nutrientes**. Barueri, SP: Manole, p.705-713, 2005. *Arq Bras Endocrino. Metab*, v.50, n. 2, p. 264-270, 2006.
- 2 PICON, P.X.; ZANNATA, C.M.; GERCHMAN, F.; ZELMANOVITZ, T.; GROSS, J.L.; CANANI, L.H. Análise dos critérios de definição da síndrome metabólica em pacientes com diabetes melito tipo 2.
- 3 SARTORELLI, D.S.; FRANCO, L.J. Tendências do diabetes mellitus no Brasil: o papel da transição nutricional. *Caderno de Saúde Pública*, v.19 (sup.1):S29-S36,2003.
- 4 LYRA, R.; OLIVEIRA, M.; LINS, D.; CAVALCANTI, N. Prevenção do Diabetes Mellitus Tipo 2. *Arq Bras Endocrino. Metab*, v.50, n. 2, p.239-249, 2006.
- 5 MINISTÉRIO DA SAÚDE: **Caderno de atenção básica- Diabetes Mellitus**. Normas e Manuais Técnicos,Série A, n.16, 2006.
- 6 UNWIN, N.; SHAW, J.; ZIMMET, P.; ALBERTI, G.M.M. Impaired glucose tolerance and impaired fasting glycaemia: the current status on definition and intervention. *Diabetic medicine*, v. 19(9), p.708-723, 2002.
- 7 NAVARRO-ALÁRCÓN, M.; LOPEZ-MARTÍNEZ, M.C. Essentiality of selenium in the human body: relationship with different diseases. *The Science of Total Environment*, v.228, p.347-371, 2000.
- 8 THOMPSON, K.H.; BHANOT, S.; MCNEILL, J.H. Essential trace elements of potential importance in management of diabetes mellitus. *Nutrition Research*, v.14, n.4, p.593-604, 1994.
- 9 WALTER, R.M.; URIE-HARE, J.Y.; OLIN, K.L.; OSTER, M.H.; ANAWALT, B.D.; CRITCHFIELD, J.W.; KEEN, C.L. Copper, zinc, manganese, and magnesium status and complications of diabetes mellitus. *Diabetes care*, v.14, p.1050-1056, 1991.
- 10 AGUILAR, M.V.; SAAVEDRA, P.; ARRIETA, F.J.; MATEOS, C.J.; GONZÁLEZ, M.J.; MESEGUER, I.; MARTINEZ-PARA, M.C. Plasma mineral content in type-2 diabetic patients and their association with the metabolic syndrome. *Annals of Nutrition & Metabolism*, v.51, p.402-406, 2007.

- 11 EKIN, S.; MERT, N.; GUNDUZ, H.; MERAL, I. Serum sialic acid levels and selected mineral status in patients with type 2 diabetes mellitus. *Biological Trace Element Research*, v.94, p.193-201, 2003.
- 12 LIMA, M.L.; Pousada J, Barbosa C, Cruz T: Deficiência de Magnésio e Resistência à Insulina em pacientes com diabetes mellitus tipo 2. *Arq Bras Endocrinol Metab*, v.49, p. 959-963, 2005.
- 13 GUERRERO ROMERO, F.; MORAN-RODRIGUEZ, L M. Low serum magnesium levels and metabolic syndrome. *Acta Diabetologica*, v.39, p.209-213, 2002.
- 14 NAVARRO-ALÁRCON, M.; LÓPEZ-G, DE L. S. H.; PÉREZ-VALERO, V.; LÓPEZ-MARTÍNEZ, C. Serum and urine selenium concentrations as indicators of body status in patients with diabetes mellitus. *The Science of Total Environment*, v.228, p.79-85, 1999.
- 15 SCHLIENGER, J.L.; GRUNENBERGER, F.; MAIER, E.A.; SIMON, C.; CHABIER, G.; LEROY, M.J.F. Perturbation des ligoelements plasmatiques dans la diabetes. Relation avec lequilibre glycémique. *Press Med*, v.17, p.1076-1079, 1988.
- 16 EKMEKCIOGLU, C.; PROHASKA, C.; POMAZAL, K.; STEFFAN, I.; SCHERNTHANER, G.; MARKTL, W. Concentrations of seven trace elements in different hematological matrices in patients with type 2 diabetes as compared to healthy controls. *Biological Trace Element Research*, v.79, p. 205-219, 2001.
- 17 MOES, L.; VERREPT, P.; DAMS, R.; GREB, U.; JUNG, G.; LASER, B. New high-resolution inductively coupled plasma mass spectrometry technology applied for the determination of V, Fe, Cu, Zn and Ag in human serum. *Journal Analytica Atomica Spectrometry*, v.9 (9), p.1074-1078, 1994.
- 18 RETMAN, V.J.; BHANDARKAR, S.D. Trace elements in diabetes mellitus. *Journal of Postgraduated Medicine*, v.27, p.129-132, 1981.
- 19 ABOU-SEIF, M.A.; YOUSSEF, A.A. Evaluation of some biochemical changes in diabetic patients. *Clinica Chimica Acta*, v.346, p.161-170, 2004.
- 20 AYDIN, E.; CUMURCUA, T.; OZUGURLU, F.; OZYURT, H.; SAHINOGLU S.; MENDIL D.; HASDEMIR, E. Levels of iron, zinc, and copper in aqueous humor, lens and serum in nondiabetic and diabetic patients. *Biological Trace Element Research*, v.108, p.33-41, 2005.

- 21 PEDROSA, L.F.C.; COZZOLINO, S.M.F. Alterações metabólicas e funcionais do cobre em diabetes mellitus. *Revista de Nutrição*, v.12 (2), p.213-224, 1999.
- 22 NOURMOHAMMADI, I.; KOCHKEKI-SHALMANI, I.; SHAABANI, M.; GOHARI, L.; NAZARI H. Zinc, copper, chromium, manganese and magnesium levels in serum and hair of insulin-dependent diabetics. Disponível em: <<http://www.ams.ac.ir/AIM/0033/nour0033.html>>, acesso em agosto de 2006.
- 23 HILL, S.J.; AROWOLO, T.A.; BUTLER, O.T.; COOK, J.M.; CRESCER, M.S.; HARRINGTON, C.; MILES, D.L. Atomic Spectrometry Update. Environmental Analysis, *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, v.18, p.170-202, 2003.
- 24 HORTELANI, M.A. **Avaliação da contaminação por mercúrio dos sedimentos do estuário Santos-São Vicente, no período de 1996-2000**. 2003. Dissertação (Mestrado)- Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, São Paulo.
- 25 EHMANN, W.D.; VANCE, D.E. Radiochemistry and nuclear methods of analysis, John Wiley & Sons, New York, 1991.
- 26 FASSEL, V.A.; KNISELEY, R.N. Inductively coupled plasmas-optical emissions spectroscopy, *Analytical Chemistry*, v.46 (13), p.1110A-1120A, 1974.
- 27 DANKS, D.M. Copper deficiency in humans. *Annual Reviews in Nutrition*, v.8, p.235-257, 1988.
- 28 OESTREICHER, P.; COUSINS, R.J. Copper and zinc-absorption in the rat - mechanism of mutual antagonism. *Journal of Nutrition*, v.115 (2), p.159-166, 1985.
- 29 TORRE, M.; RODRIGUEZ, A.R.; SAURACALIXTO, F. Effects of dietary fiber and phytic acid on mineral availability. *Critical reviews in food science and nutrition*, v. 30 (1), p.1-22, 1991.
- 30 WERMAN, M.J.; BHATHENA, S.J. The effects of low dietary zinc in copper-deficient rats fed high fructose diet. *Journal of Nutritional Biochemistry*, v. 3 (11), p.605-608, 1992.
- 31 TANG, Y.R.; ZHANG, S.Q.; XIONG, Y.; FU, H.; ZHANG, H.P.; XIONG, K.M. Studies of five microelement contents in human serum, hair and fingernails correlated with aged hypertension and coronary heart disease. *Biological Trace Element Research*, v.92 (2), p. 97-103, 2003.
- 32 REIS, M.A.B.; VELLOSO, L.A.; REYES, F.G.R. Alterações do metabolismo da glicose

- na deficiência de magnésio. *Revista de Nutrição*, v.15, n.3, 2002.
- 33 MOORADIAN, A.D.; FAILLA, M.; HOOGWERF, B.; WYLIE-ROSET, J. Selected vitamins and minerals in diabetes. *Diabetes care*, v.17, 464-479, 1994.
- 34 TIMOTHY, J.M. Chromium and other minerals in diabetes mellitus. Disponível em: <<http://www.uspharmacist.com/oldformat.asp?url=newlook/files/alte/minerals.htm>>, acesso em agosto de 2006.
- 35 YAMAZAKI, R.K. **Redução da glicemia em ratos diabéticos tratados com sais de vanádio peroxidados.** Identificação de proteínas intracelulares envolvidas no mecanismo de ação em músculo sóleo. 2004. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba.
- 36 SENA, K.C.M.; PEDROSA, L.F.C. Efeitos da suplementação com zinco sobre o crescimento, sistema imunológico e diabetes. *Revista de Nutrição*, v.18 (2), p.251-259, 2005.
- 37 SENA, K.C.M.; ARRAIS, R.F.; BRITO, T.N.S.; ALMEIDA, M.G.; PEDROSA, L.F.C. Efeito da suplementação com zinco sobre a zincúria de pacientes com diabetes tipo 1. *Arq Bras Endocrinol Metab*, v.47, p.572-577, n.5, 2003.
- 38 RANDLE, P.J.; PRIESTMAN, D.A.; MISTRY, S.C.; HALSALL A. Glucose fatty acid interactions and the regulation of glucose disposal. *Journal of Cellular Biochemistry*, v. 55, p.1-11, 1994.
- 39 SHIBUYA, E.K. **Rastreamento da Origem Geográfica de Amostras de Maconha Apreendidas nas Ruas de São Paulo, por meio de Assinaturas Químicas.** 2005. Tese (Doutorado) – Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, São Paulo.
- 40 FARIAS, P. M.; SARKIS, J. E. S. ; PEDROSO, R. C. . High Resolution Inductively Coupled Plasma MAass Spectrometry Technique in Metal Determination in Hair Samples. *Brazilian Journal Of Pharmaceutical Sciences*, v. 35, n. 1, p. 20-24, 1999.
- 41 MONTEIRO, L.R. **Desenvolvimento e Validação de uma Metodologia de Análise Multielementar em Amostras de Soro Sanguíneo Por Espectrometria de Massas de Alta Resolução com Fonte de Plasma Indutivo.** 2000. Dissertação (Mestrado) – Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, São Paulo.
- 42 REIS, E.L.T. dos; SARKIS, J. E. S.; RODRIGUES, C.; NEGRINI NETO, O.; VIEBIG, S. Identificação de Resíduos de Armas de Fogo por Meio da Técnica de Espectrometria

- de Massas de Alta Resolução com Fonte de Plasma Indutivo. *Química Nova*, v. 27, n. 3, p. 409-413, 2004.
- 43 SARKIS, J. E. S. ; ROSIAS, GINÉ, M.F.G.; PATREZE, A.F. ; SILVA, L.E.; KAKAZU, M.H.Sequential Cloud Point extraction of trace elements from biological samples and determination by inductively coupled plasma mass spectrometry. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, v. 19, p. 471-477, 2008.
- 44 ULRICH, J. C. **Determinação de impurezas em compostos de urânio por meio da técnica de espectrometria de massas de alta resolução com fonte de plasma indutivo (HR-ICP-MS)**. 2001. Dissertação (Mestrado) – Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, São Paulo.
- 45 INMETRO DOQ-CGRE-008, Revisão 02-JUNHO/2007- Orientações sobre Validação de Métodos de Ensaio Químicos. Disponível em:
<http://www.inmetro.gov.br/Sidoq/Arquivos/CGCRE/DOQ/DOQ-CGCRE-8_02.pdf>, acesso em agosto de 2007.
- 46 BURNS, D.T.; DANZER,K.; TOWNSHEND,A. Use of the terms “recovery” and “apparent recovery” in analytical procedures (IUPAC Recommendations 2002). *Pure Appl. Chem.*, v. 74, n. 11, p. 2201–2205, 2002.
- 47 NBR ISO 9004. Quality management systems- guidelines for performance improvements. ISO 9004:2000.
- 48 BUCHMANN, J.E.; SARKIS, J.E.S. O conceito da incerteza aplicado aos processos de medição associados à preparação de uma solução de referência para calibração. *Química Nova*, vol. 25, n.1, 111-116, 2002.
- 49 EURACHEM/ CITAC Guide. Quantifying Uncertainty in Analytical Measurement. Editors: Ellison, S.R.L., Rosslein, M., Williams, A. 2nd. Ed., 2000.
- 50 SILVA, J.L. **Relação entre a estrutura e atividade de flavonóides com ação anti-HIV-1 IN: uma abordagem dft**. 2006. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Pará, Belém.
- 51 DEFRONZO, R.A.; FERRANNINI, E. Insulin resistance A multifaceted syndrome responsible for NIDDM, obesity, hypertension, dyslipidemia, and atherosclerotic cardiovascular disease. *Diabetes Care*, vol. 14, p.173-194, 1991.

- 52 ALBERTI, K.G.M.M.; ZIMMET, P.Z. Definition, diagnosis and classification of diabetes mellitus and its complications. Part 1: Diagnosis and classification of diabetes mellitus. Provisional report of a WHO consultation. *Diabet Med*, vol. 15, p. 539-553, 1998.
- 53 BARANY, E.; INGVAR, A.; BERGDAHL, L.; SCHATZ, A.; SKERFVING, S.; OSKARSSON, A. Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry Multi-element Analysis of Diluted Human Blood and Serum. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, v. 12, p. 1005-1009, 1997.
- 54 OLIVEIRA, C.Q. **Efeitos do Disseleneto de Difenila na atividade da enzima δaminolevulinato desidratase e em parâmetros bioquímicos de ratos com diabetes mellitus tipo 1.** 2004. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Santa Maria, Rio Grande do Sul.
- 55 BARBOSA, N. B.V. **Efeito de compostos orgânicos de selênio em modelos experimentais de câncer e diabetes mellitus.** 2006. Tese (Doutorado) – Universidade Federal de Santa Maria, Rio Grande do Sul.
- 56 **Paula Xavier Picon; Cristiane Bauerman Leitão; Fernando Gerchman; Mirela Jobim de Azevedo; Sandra Pinho Silveiro; Jorge Luiz Gross; Luís Henrique Canani.** Medida da cintura e razão cintura/quadril e identificação de situações de risco cardiovascular: estudo multicêntrico em pacientes com diabetes melito tipo 2. *Arq Bras Endocrinol Metab*, v.51, p. 443-449, 2007.
- 57 GOMES, M.B. Como está o controle da pressão arterial nos pacientes diabéticos hipertensos no Brasil? Disponível em: <
<http://www.diabetes.org.br/artigos/art009.php>>, acesso em setembro de 2008.
- 58 Avaliação da Pressão Arterial. MAPA em diabete tipo 2. Disponível em : <
http://www.sbh.org.br/hipertensao/2002_N1_V5/26%20a%2029.pdf> ,acesso em setembro de 2008.