



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO
DE MESQUITA FILHO”

Instituto de Biociências de Botucatu

Campus Botucatu – SP

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
INSTITUTO DE BIOCIÊNCIAS DE BOTUCATU, CAMPUS BOTUCATU

FELIPE ANDRÉ DE FIGUEIREDO TEIXEIRA

**EXAME DE MENSURAÇÃO CORPORAL PELA INGESTÃO DE
DIÓXIDO DE DEUTÉRIO E AVALIAÇÃO DO ERRO**

BOTUCATU

2023



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE
MESQUITA FILHO”

Instituto de Biociências de Botucatu

Campus Botucatu – SP

FELIPE ANDRÉ DE FIGUEIREDO TEIXEIRA

**EXAME DE MENSURAÇÃO CORPORAL PELA INGESTÃO DE
DIÓXIDO DE DEUTÉRIO E AVALIAÇÃO DO ERRO**

Monografia apresentada à Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Instituto de Biociências, Campus Botucatu, como requisito para obtenção do título de Bacharel em Física Médica.

Orientador: Vladimir Eliodoro Costa

BOTUCATU

2023

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: MARIA CAROLINA A. CRUZ E SANTOS-CRB 8/10188

Teixeira, Felipe André de Figueiredo.

Exame de mensuração corporal pela ingestão de dióxido de deutério e avaliação do erro / Felipe André de Figueiredo Teixeira. - Botucatu, 2023

Trabalho de conclusão de curso (bacharelado - Física Médica) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Instituto de Biociências de Botucatu
Orientador: Vladimir Eliodoro Costa
Capes: 10203001

1. Composição corporal. 2. Óxido de Deutério. 3. Erro.

Palavras-chave: Composição corporal; Dióxido de deutério; Erro.

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho à minha irmã, minha maior inspiração. Quero seguir seu exemplo de pessoa, quem mais me ensinou a enxergar a vida.

Dedico aos pais, por todo apoio e confiança ao longo da minha caminhada.

A um amigo que conheci em uma aldeia, que ensinou que devo seguir um objetivo, mirar, e atirar no mesmo.

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao meu orientador Professor Dr. Vladimir Eliodoro Costa pelo auxílio e ensinamentos ao longo de todo curso.

Agradeço á Professora Dr. Thábata Koester Weber pelo amparo ao longo do projeto. A base de ambos foi fundamental para o desenvolvimento do trabalho.

Meus agradecimentos aos familiares e principalmente amigos, que tiveram grande importância ao longo de toda graduação.

Ao Instituto de Biociências de Botucatu pelo Conhecimento e ajuda, possibilitando uma formação leve e fluída, e ao apoio financeiro da bolsa UNESP Presente.

Resumo

O trabalho visa à apresentação de uma padronização de um exame voltado ao método de determinação de composição corporal, através do dióxido de deutério (D_2O), com detalhamento em um estudo acerca do erro, visando encontrar onde pode haver a maximização do erro, sendo este encontrado nas fórmulas de maneira teórica, ou na prática, sendo observada a preparação da Dose Ofertada (DO), Dose Diluída (DD), Doses individuais (DI), aplicação do teste, preparo das amostras para análise, e análise isotópica. A determinação da composição corporal é uma ferramenta importante para avaliar a saúde e o desempenho físico de indivíduos, com diversas fórmulas envolvidas para estimar a porcentagem de gordura corporal, massa muscular e outros componentes relevantes. No entanto, uma padronização para tal determinação é de extrema importância, uma vez que origina um modelo a ser seguido, este testado e aceito, com a finalidade de usá-lo e até melhorá-lo em futuros estudos acerca da composição corpórea. Além do mais, diversas fórmulas são usadas ao longo da determinação, e por isso, um estudo acerca do erro e limitações é de grande interesse, já que a partir da padronização do teste, há pontos a serem considerados com mais importância para minimizar a margem de erro do procedimento estabelecido, dando uma melhor precisão para os resultados obtidos. Além disso, é esperado que tal publicação forneça proveito com relação a compreensão dos erros a serem atentados, para desenvolvimento do método de maneira precisa e confiável, tendo implicações importantes para a área da saúde.

Palavras-chave: Composição corporal, ingestão isotópica, erro, métodos para determinação corporal.

Abstract

The work aims to present a standardization of an examination focused on the method of determining body composition using deuterium oxide (D₂O), with a detailed study on error, aiming to identify areas where error can be maximized. This error can be found in the formulas either theoretically or in practice, by observing the preparation of the Offered Dose (OD), Diluted Dose (DD), individual doses (ID), test application, sample preparation for analysis, and isotopic analysis. Determining body composition is an important tool for assessing the health and physical performance of individuals, with various formulas used to estimate the percentage of body fat, muscle mass, and other relevant components. However, standardization for such determination is of utmost importance as it establishes a model to be followed, tested, and accepted, with the purpose of using and even improving it in future studies on body composition. Furthermore, since multiple formulas are used throughout the determination process, studying the errors and limitations is of great interest, as the standardized test highlights important points to minimize the margin of error in the established procedure, providing better precision for the obtained results. Moreover, it is expected that this publication will contribute to understanding the errors to be considered, allowing for the development of a precise and reliable method, with significant implications for the field of health.

Keywords: Body composition, isotopic ingestion, error, methods for body determination

Lista de abreviaturas

D₂O: dióxido de deutério.

²H: deutério.

DO: dose ofertada.

DD: dose diluída.

DI: dose individual.

DO1: dose ofertada 1.

DO2: dose ofertada 2.

ΔBW: enriquecimento isotópico em excesso da água corporal, dado em partes por milhão (ppm).

ΔDD: enriquecimento isotópico em excesso da dose diluída, dado em partes por milhão (ppm).

x²H: valor da abundância para um isótopo do hidrogênio.

TBW: *Total Body Water*.

Nx: espaço de diluição de um dado isótopo “x”.

W: quantidade de água para realizar a destilação.

a: quantidade da dose usada para a dose diluída.

A: dose da água dada para o paciente.

MACT_u: massa de água corporal total para espaço de diluição do deutério pela análise da urina.

MACT_s: massa de água corporal total para espaço de diluição do deutério pela análise da saliva.

CUL: *cumulative urine loss*.

H: água ingerida na realização do exame.

MLG: massa livre de gordura.

MG: massa gorda.

MT: massa total.

%MG: porcentagem de massa gorda.

SUMÁRIO

<u>RESUMO</u>	3
<u>ABSTRACT</u>	4
<u>LISTA DE ABREVIATURAS</u>	5
<u>1. INTRODUÇÃO</u>	7
<u>2. OBJETIVO</u>	8
<u>3. REVISÃO DA LITERATURA</u>	8
<u>3.1. INGESTÃO DE DIÓXIDO DE DEUTÉRIO</u>	8
<u>3.2. BALANÇO ISOTÓPICO</u>	9
<u>3.3. ABUNDÂNCIA ISOTÓPICA</u>	10
<u>3.4. ERRO ABSOLUTO</u>	11
<u>3.5. ERRO RELATIVO</u>	11
<u>3.6. INCERTEZA</u>	12
<u>4. APLICAÇÃO DO TESTE PAQRA INGESTÃO DE DIÓXIDO DE DEUTÉRIO</u> ..	12
<u>5. CÁLCULOS</u>	15
<u>5.1. CÁLCULO PARA EESPAÇO DE DILUIÇÃO DOS ISÓTOPOS</u>	15
<u>5.2. CÁLCULO DA COMPOSIÇÃO CORPORAL</u>	17
<u>6. SIMULAÇÃO DO CÁLCULO</u>	21
<u>7. AVALIAÇÃO DO ERRO E DISCUSSÃO</u>	22
<u>7.1. AVALIAÇÃO DOO ERRO PARA VALOR TEÓRICO</u>	22
<u>7.2. AVALIAÇÃO DO ERRO PARA VALOR REAL</u>	25
<u>8. CONCLUSÃO</u>	27
<u>9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</u>	28

1. Introdução

Para o estudo da composição corporal, diversos métodos são utilizados, como a bioimpedância e medição de espessura de dobras cutâneas, que são comumente utilizados. Assim, o uso de dióxido de deutério (D_2O) como marcador na mensuração de composição corporal mostra vantagem com relação a medição das dobras cutâneas, visto que é um método não invasivo, e possui ganho com relação a bioimpedância, já que independe de calibrações do maquinário, e depende apenas de fatores simples que serão usados em modelos matemáticos. Ademais, mesmo sendo considerado método referência, diversos fatores devem ser atentados, a fim de definir o menor erro possível para o teste, dando assim, o melhor resultado viável. No entanto, um estudo do erro é fundamental, uma vez que o uso de isótopos para tais determinações requer extrema atenção, devido a sua grande precisão.

O D_2O foi descoberto por Harold Clayton Urey em 1931 [5], sendo obtido através da destilação fracionada da água. Com isso, há três tipos de isótopos de hidrogênio conhecidos, sendo o Prótio (H), Deutério (2H) e o Trítio (3H), que possuem diferentes características, como peso molecular, ponto de fusão e ebulição. Assim, a água pesada ou deuterada, contém dois átomos de deutério e um de oxigênio (D_2O), sendo o deutério um isótopo de hidrogênio, com um nêutron e um próton em seu núcleo. Tendo isso em vista, o D_2O possui grande importância tecnológica, sendo usado como moderador em reatores nucleares, como solvente em ressonância magnética nuclear do hidrogênio, e principalmente na marcação de compostos orgânicos para estudo de mecanismos de reações. Sabendo disto, marcadores são ótimos meios para determinação da água total presente no corpo, e assim, e consequentemente, distribuição de massa magra e gordura ao longo do corpo humano. Logo, os isótopos estáveis são destacados como marcadores. Portanto, ao medir a concentração de deutério na água corporal total, é possível inferir a composição corporal.

Vale ressaltar que o deutério é um isótopo estável do hidrogênio, o que faz com que não seja metabolizado pelo corpo humano de forma significativa, ocasionando em uma constância de sua concentração após sua administração. Com a dose administrada, após um dado tempo, é possível o cálculo da água corporal total, que é diretamente relacionada à massa corporal, sendo possível estimar as diferentes massas da composição. Essa técnica é baseada no princípio de que a água é distribuída de forma proporcional aos diferentes compartimentos corporais.

2. Objetivo:

O objetivo deste estudo foi estimar o erro analítico do percentual de gordura de pacientes submetidos ao teste de mensuração de massa corporal a partir da ingestão de dióxido e de deutério.

3. Revisão da literatura:

3.1. Ingestão de dióxido de deutério

O dióxido de deutério (D_2O) é um isótopo estável da água, e é usado como traçador na diluição isotópica, já que a ingestão de uma dose conhecida do D_2O e com a coleta das amostras biológicas, como urina e saliva ao longo do tempo, é possível a determinação da quantidade de deutério presente no corpo, o que possibilita a estimativa da água corporal total. Este é avaliado a partir da estimativa de água corporal total, onde o paciente deverá ingerir uma dose de D_2O estipulada a partir de seu peso, sendo uma forma estável e não tóxica da água, que será igualmente distribuída ao longo dos diferentes tecidos do corpo. Tendo isso em vista, haverá a coleta de uma amostra basal do indivíduo, e uma coleta de amostra enriquecida, esta, sendo apurado após 4 horas da ingestão do D_2O , o tempo ideal para que a água pesada se distribua proporcionalmente ao corpo, ocorrendo um equilíbrio isotópico. Com isso, equações são fundamentais, com diferentes parâmetros, estes, adotados desde a preparação da Dose Ofertada (DO), a qual será distribuída aos pacientes, considerando o peso de cada a preparação da Dose Diluída (DD), que será usada para análise isotópica, peso do paciente, dentre outras, que serão abordadas mais a frente. Logo, é reconhecido que um traçador é totalmente distribuído em um espaço de distribuição, mostrando que a diluição isotópica permite medir a massa de uma quantidade desconhecida de água, sendo uma técnica reconhecida de alta exatidão. Portanto, o uso do D_2O é benéfico, já que é um método não invasivo, com resultados precisos. No entanto, mesmo sendo uma análise referencial, o teste precisa ser minuciosamente realizado, já que pequenas mudanças ao longo da preparação ou realização do teste podem gerar grandes erros, com resultados imprecisos.

Ainda assim, para a aplicação do exame de mensuração corporal a partir da ingestão do dióxido de deutério, as etapas devem ser atentadas, visto que o erro pode ser grande, já que alterações pequenas possuem grande influência na finalização do teste.

3.2. Balanço isotópico

O balanço isotópico é uma técnica para calcular diferentes proporções de diferentes isótopos em uma dada mistura, o que leva em consideração as abundâncias isotópicas dos isótopos individuais em cada componente da mistura. Também, podemos obter os valores do delta isotópico para as misturas das águas com diferentes composições, onde delta é uma medida que expressa a composição isotópica de uma substância em relação a uma padrão de referência.

Visto isso, o balanço isotópico possui extrema importância para estudos de interações naturais de diferentes corpos d'água, como rios, córregos, água do mar, dentre outras, além de ser usado em laboratório, como usado com a técnica de diluição isotópica e a produção de misturas enriquecidas, para saber com precisão o enriquecimento.

Com isso, uma planilha foi desenvolvida para formato de Excel [2], onde há uma solução flexível e abrangente para o cálculo das abundâncias de isótopos, além dos valores de delta isotópico para as misturas da água. É válido ressaltar que é de extrema relevância para encontrar um valor isotópico desconhecido a partir de um valor de referência, em que é oferecido uma maneira que minimiza os erros computacionais, porém, estes ainda existentes.

Com isso, temos que:

$$n_1 x(E^i_1) + n_2 x(E^i_2) = x(E^i_T) \quad (1)$$

Onde:

n_n = fração molar do componente n da mistura.

$x(E^i_n)$ = abundância isotópica do isótopo i do elemento E no componente n .

$x(E^i_T)$ = abundância isotópica do isótopo i do elemento E na mistura total T .

Logo,

$$n_1 x(E^i_1) + n_2 x(E^i_2) = (n_1 + n_2) x(E^i_T) \quad (2)$$

Com isso, aplicaremos a fórmula aplicada anteriormente para a abundância de deutério, sendo $x(E^i_1)$ substituído por x^2H :

$$n_1(x^2H_F) - n_1(x^2H_1) = n_2(x^2H_2) - n_2(x^2H_F) \quad (3)$$

Portanto,

$$n_1(x^2H_F - x^2H_1) = n_2(x^2H_2 - x^2H_F) \quad (4)$$

Onde:

$$(x^2H_F - x^2H_1) = \Delta BW; \quad (5)$$

$$(x^2H_2 - x^2H_F) = \Delta DD. \quad (6)$$

3.3. Abundância isotópica

Os elementos, em sua maioria, possuem diferentes isótopos, que ocorrem naturalmente em diferentes proporções. Logo, a abundância isotópica é a proporção de um isótopo em comparação com o número total de átomos de um dado elemento, por meio de uma fração, ou quando comparado ao isótopo majoritário de um elemento, sendo uma razão. Desta forma, essa abundância é essencial para o cálculo de uma massa atômica, por exemplo, já que é dada como a média ponderada das massas isotópicas correspondentes.

Com isso, é necessária a determinação da abundância isotópica, definida a partir da razão dos isótopos de um determinado elemento, sendo o hidrogênio o que será aplicado, onde uma razão será apresentada com o prótio (^1H) e o deutério (^2H). A seguinte equação será demonstrada para o hidrogênio de dois isótopos, com $i = 1,2$. Tal fórmula é necessária para a obtenção da distribuição dos isótopos na amostra. [2]

Assim temos:

$$x^2H = \frac{2R}{1 + 2R} \quad (7)$$

$x^2\text{H}$ = valor da abundância para a razão de dois isótopos do hidrogênio.

R = razão isotópica do deutério com relação ao prótio.

3.4. Erro absoluto

Para determinação dos erros de uma determinada equação, o erro absoluto é a diferença entre o valor medido e valor verdadeiro, fornecendo a magnitude direta do desvio entre os dois valores de modo absoluto, o que independe se é negativo, dado sempre em módulo. Assim, temos o erro, dado por:

$$Erro_{abs}(\hat{x}) = |x - \hat{x}| \quad (8)$$

Onde:

x = valor absoluto de uma medida de x .

$\hat{x}$ = valor medido.

3.5. Erro relativo

A medida do erro relativo, por sua vez, é dada a partir de uma medição expressa com relação ao erro absoluto e o valor verdadeiro da medida. Assim, matematicamente, o valor do erro relativo é realizado a partir da divisão do erro absoluto pelo valor verdadeiro da grandeza, expresso por:

$$Erro_{rel}(\hat{x}) = \frac{|x - \hat{x}|}{|\hat{x}|} \quad (9)$$

Onde:

$|x - \hat{x}|$ = módulo do erro absoluto.

$|\hat{x}|$ = módulo do valor medido.

3.6. Incerteza

A incerteza refere-se à falta de precisão ou exatidão na determinação de uma dada quantidade, onde é expressa a margem de erro. Além do mais, a incerteza de diferentes fontes, incluindo erros de medição, variações nas condições experimentais, limitações dos instrumentos de medição, dentre outros fatores. Em resumo, é um valor associado ao resultado de uma medida, surgindo devido ao desconhecimento de um valor exato da grandeza em questão. Visto isso, há diferentes tipos de incerteza, estes, provenientes dos diferentes tipos de medições. Para instrumentos que não possuem estimativas, como o exemplo de balanças analíticas, a incerteza é definida como a menor divisão ou a menor medida realizada. Ademais para o caso listado, é possível utilizar o desvio padrão fornecido pelo fornecedor do equipamento.

4. Aplicação do teste para ingestão de dióxido de deutério

Primeira etapa - preparação da DO: A partir das instruções da IAEA Human Health Series [3], foi realizada a preparação da Dose Ofertada (DO), seguindo a proporção de 1:10 em mL, em que o deutério com concentração de 99,8% será combinado com água potável, para distribuir aos pacientes submetidos ao exame. Para isso, 400 mL de água serão dispostos na balança, e serão adicionados 100 mL aproximadamente 110,5g. Por fim, a água será disponibilizada até atingir 1L, aproximadamente 1010,5 g. É válido dizer que os valores obtidos devem ser anotados com precisão nas balanças, a fim de minimizar o erro possível nesta etapa. É válido ressaltar que para o presente estudo, foram preparadas duas Doses Ofertadas diferentes, usando valores diferente para cada leva de paciente, estes considerados futuramente para determinação dos cálculos de composição corporal, onde um número de 11 voluntários fora usados com a DO1 e os 20 demais foram usados com a DO2, tendo diferentes abundâncias isotópicas para cada dose.

Segunda etapa - preparação da DD: Com base na etapa anterior, é preparada a Dose Diluída, em que uma porção da DO será disposta a fim de obter seu valor isotópico, com a precisão de uma balança de quatro casas decimais [3]. Inicialmente, 50 mL de água potável será colocado em um frasco, logo, será pipetado 100 μ L da água pesada, aproximadamente 0,1105g, e por fim, o frasco deverá ser completo de água até atingir 100 mL, para assim, ser coletada uma pequena porção do produto final para a análise isotópica. As anotações das

massa alcançadas são de extrema importância em todas as partes desta etapa, visto que o valor isotópico da DD precisa ser dado com mínimas variações.

Terceira etapa - preparação da DI: A fim de distribuir as doses para os pacientes, a DO é dividida para cada indivíduo com diferentes massas, estas, separadas de acordo com os respectivos pesos dos pacientes, uma vez calculadas e dispostas na seguinte tabela:

Tabela 1: Tabela com os valores da Dose Ofertada para cada paciente de acordo com os valores aproximados de suas respectivas massas, com espaço para preenchimento da massa da dose medida em gramas (g).

Massa do paciente (kg)	D ₂ O (g)	Dose ofertada (mL)	Massa Dose (g)
30	1,98	18	
40	2,64	24	
50	3,3	30	
60	3,96	36	
70	4,62	42	
80	5,28	48	
90	5,94	54	
100	6,6	60	

Assim, é fundamental dizer que as doses são dadas a partir de cálculos teóricos, sendo apresentado na tabela de modo que não tenha casa decimal. Para isso, os valores que devem ser usados são os mais próximos de uma determinada massa. Para o caso do estudo analisado, o número de 31 voluntários de diferentes massas, foram submetidos a tabela disposta, onde foi possível obter o valor da dose ofertada para cada paciente (DI).

Quarta etapa - aplicação do teste e coleta das amostras: Para a coleta das amostras, sendo basais e enriquecidas, os 31 pacientes foram levados ao CEPRAN (Centro de Práticas Nutricionais da Unesp Botucatu) em jejum, onde inicialmente foi coletada a urina e a saliva, ambas em estado basal. Em seguida a dose individual foi oferecida seguida da adição de 100 mL de água, de acordo com a separação prévia devido a uma triagem online. Por fim, foi feita a coleta de amostras de saliva e urina 3 a 4 horas após a administração da DI, para que tenha um equilíbrio isotópico ao longo do corpo do indivíduo, como mostrado pelo gráfico disponibilizado pelo protocolo da IAEA [3]. Para cada paciente, o recipiente com as respectivas doses individuais com massa de até quatro casas decimais, foi lacrado, de modo que fosse pesado em uma balança para verificação do quanto do conteúdo foi bebido.

Após a coleta, as amostras foram armazenadas e mantidas congeladas, fechadas com Parafilm e seladas, a fim de conservar as mesmas.

Quinta etapa - armazenamento das amostras: Para um melhor armazenamento, tanto as amostras de urina basal, quanto as de saliva, são fechadas com Parafilm, no intuito de não haver trocas com o ambiente externo e não ter perda do material. Depois de lacradas, as amostras são arrumadas em um refrigerador, visto que são amostras orgânicas, e a refrigeração inibe o crescimento de microrganismos que podem afetar as composições químicas das amostras. Além disso, guardar as amostras de urina e saliva em refrigeração ajuda a evitar que certas substâncias sensíveis se deteriore, o que é importante para garantir que as análises futuras sejam precisas. Por isso, é comum e recomendado refrigerar essas amostras para manter a qualidade, preservação e integridade e a confiabilidade dos resultados [3].

Sexta etapa - preparação da amostras para análise: Após retiradas da refrigeração, as amostras enriquecidas são separadas das basais e enumeradas para evitar trocas manuais. Com isso, o lacre é retirado e deve ser pipetado cerca de 1,5 mL de cada porção em vidraria específica para destilação a vácuo em baixas temperaturas, localizado no Centro de Isótopos Estáveis da Unesp Botucatu (CIE). A preparação deve ser minuciosa para evitar erros, já que o processo para destilação é lento e deve ser cuidadoso a cada processo, desde a inserção das vidrarias no equipamento até a retirada e deposição nos viles com o uso de uma pipeta, que serão destinados para análise.

Sétima etapa - análises isotópicas: Contudo, a análise é o processo final, onde serão observados os valores de abundância isotópica de cada amostra, sendo as basais e enriquecidas, a partir da técnica de Espectrometria de Massa por Razão de Isótopos, sendo "*Isotope Ratio Mass Spectrometry*", ou técnica IRMS. Além disso, a DD também será analisada para a obtenção de seu valor de enriquecimento, sendo de extrema importância para o estudo corporal. Visto isso, os viles com o conteúdo destilado serão analisados pela técnica IRMS no CIE, onde os resultados serão disponibilizados e interpretados para a formulação das equações, para assim, determinar a abundância isotópica das diferentes amostras, sendo a da água utilizada para determinação da DO, DD, urina e saliva, basais e enriquecidas.

5. Cálculos

A partir do protocolo proposta pela Agência Internacional de Energia Atômica (IAEA), equações foram desenvolvidas a fim de determinar a composição corporal de um dado indivíduo, como a quantidade total de água, massa livre de gordura e massa gorda, a partir de diferentes parâmetros obtidos experimentalmente pelas etapas do exame.

5.1. Cálculo de espaço de diluição dos isótopos

A água corporal total, (TBW da sigla *Total Body Water*) representa a quantidade total da água do corpo humano, variando entre 70% a 75% do peso corporal do indivíduo após o seu nascimento, e decai para cerca de 60 % para adultos magros e menos de 40% para adultos obesos. Ainda, a água está contida exclusivamente na massa livre de gordura, com aproximadamente 73,2% de água para indivíduos adultos, visto a não aderência da massa gorda com a água [3].

Ao realizar a técnica de diluição isotópica para medir a quantidade total de água no corpo, é importante considerar que o isótopo utilizado se distribui não apenas na água corporal, mas também em outros tecidos e órgãos do corpo. Portanto, é fundamental levar em conta essa ampla distribuição ao calcular a quantidade de água presente no organismo, garantindo resultados mais precisos e confiáveis.

A quantidade desconhecida de água, seja o seu volume ou massa, pode ser medida com precisão utilizando a técnica de diluição isotópica. Essa técnica é altamente respeitada e amplamente utilizada em diversas áreas da análise química e bioquímica. O princípio por trás da diluição isotópica pode ser explicado de maneira simples através das seguintes equações, que descrevem como uma dose enriquecida de um traçador é distribuída uniformemente em um grande reservatório de água (TBW):

$$N_1 \cdot F_1 = N_2 \cdot F_2 \quad (10)$$

Onde:

N_1 : tamanho do pool da dose em moles.

F_1 : enriquecimento da dose.

N_2 : tamanho do pool do espaço de distribuição em moles.

F_2 : enriquecimento do espaço de distribuição.

Logo:

$$N_1 \cdot (x^2 H_F - x^2 H_1) = N_2 \cdot (x^2 H_2 - x^2 H_F) \quad (11)$$

Com:

$$N = \frac{M}{M_n} \quad (12)$$

$$\frac{M_1}{M_{n1}} \cdot (x^2 H_F - x^2 H_1) = \frac{M_2}{M_{n2}} \cdot (x^2 H_2 - x^2 H_F) \quad (13)$$

Onde:

M_1 : espaço de diluição dos isótopos no corpo, sendo o TBW (kg).

M_2 : espaço de diluição dos isótopos para a dose, sendo a dose da água dada para o paciente (g).

M_{n1} : peso molecular da água em gramas por mol (g/mol).

M_{n2} : peso molecular do deutério em gramas por mol (g/mol).

Logo, N_1 representa a quantidade de um traçador na dose em mols N_2 representa a quantidade do traçador no espaço de distribuição, dado em mols. Portanto, o produto de F_1 e N_1 é a quantidade do excesso de água $^2\text{H}_2\text{O}$ em mols. Assim, o grau de enriquecimento é expresso em partes por milhão (ppm) em excesso, contando que as unidades de F_1 e F_2 sejam as mesmas.

Com isso, obtemos o valor de Nx , referente ao TBW, que é representado como o volume pelo qual um isótopo é distribuído, sendo um espaço de distribuição, em que sua utilização é importante para determinação de cálculos da massa de água corporal total do indivíduo.

$$Nx: \left\{ \left(\frac{W}{a} \right) \cdot \Delta DD \right\} \cdot \left(\frac{A}{\Delta BW \cdot 1000} \right) \quad (14)$$

Onde:

Nx: espaço de diluição de um dado isótopo “x” (kg)

W: quantidade de água para realizar a destilação em gramas (g)

a: quantidade da dose usada para a dose diluída em gramas (g).

ΔDD : enriquecimento isotópico em excesso da dose diluída, dado em partes por milhão (ppm).

A: dose da água dada para o paciente (g).

ΔBW : enriquecimento isotópico em excesso da água corporal, dado em partes por milhão (ppm).

5.2. Cálculo da composição corporal

Á água é o maior compartimento do corpo, o que faz com que as moléculas se distribuam rapidamente e uniformemente ao longo do corpo. Dentro disso, a água entra no corpo, ao mesmo tempo em que o deixa, por meio de vapor, urina, dentre outros fluídos. A partir disso, o estudo em [5] Lifson, N., & McClintock, R. (1966), permitiu uma observação fisiológica crucial para a teoria da água duplamente marcada, onde o oxigênio na água está em equilíbrio isotópico com o oxigênio do dióxido de carbono. Logo, uma molécula marcada com oxigênio-18, não apenas se comporta da mesma forma que uma molécula marcada com deutério, mas também é eliminada do corpo mais rapidamente, pois também se mistura e sai do corpo como dióxido de carbono. Portanto, ao medir a eliminação do hidreto de oxigênio junto ao dióxido de deutério, e considerar o espaço de diluição, a taxa de eliminação não será

apenas da água, mas também do dióxido de carbono, onde nesse caso de estudo, observaremos a relação do aumento do espaço de diluição do deutério, onde terá o aumento de 4,1% em comparação com a água total do corpo.

Com o espaço de diluição dos isótopos (Nx) é possível a determinação da água corporal, com o uso 1,041 para um fator de troca de isótopos com a água. Vale ressaltar que os isótopos na água corporal entram em diferentes seções do corpo, o que resulta nas trocas não aquosas pelos isótopos de hidrogênio e oxigênio. O Hidrogênio realiza trocas com alguns componentes não aquosos, porém, a maior parte é a troca com as proteínas, além de que também é incorporado em gorduras e proteínas durante a síntese as moléculas. Sabendo disso, é estimado que o espaço ocupado pelo 2H é de aproximadamente 1,041 vezes maior que o espaço da água corporal total (TBW)[3]. Desse modo, uma equação será descrita com seu respectivo fator de correção para a troca não aquosa.

Sendo assim, o a ACT a partir de um dado isótopo é:

$$MACT = \frac{Nx}{1,041} \quad (15)$$

Onde:

MACT: massa de água corporal total para espaço de diluição do deutério (kg).

Nx : espaço de diluição de um dado isótopo “x”(kg).

Logo, com a fórmula com a constante dada, ainda, é necessária a adição de fatores que possuem influência no resultado final, uma vez que são termos necessários para a realização do teste e devem ser considerados por conta do aumento ou perda no resultado na água corporal total.

Assim, temos:

$$MACTu = \left\{ \left(\frac{Nx}{1,041} \right) - \left(\frac{(2 \times C \times UL)}{1000} \right) \right\} \text{ para a urina ;} \quad (16)$$

$$MACTs = \left\{ \left(\frac{Nx}{1,041} \right) - \left(\frac{H}{1000} \right) \right\} \text{ para a saliva .} \quad (17)$$

Onde:

MACT: massa de água corpora total para espaço de diluição do deutério (kg).

Nx: espaço de diluição de um dado isótopo “x” (kg).

CUL: da sigla *cumulative urine loss*, ou perda cumulativa de urina (g).

H: água ingerida na realização do exame (mL).

A massa livre de gordura (MLG) por sua vez é dada a partir da constante de hidratação de mamíferos (73,2%)[3], em que se refere à quantidade do tecido corporal que não possui gordura que inclui os músculos, ossos, e água. Tal medida é fundamental para a determinação da gordura corporal do indivíduo, visto que será subtraída do peso atual do mesmo.

Em que:

$$MLG = \frac{MACT}{0,732} \quad (18)$$

Onde:

MLG: massa livre de gordura (kg).

MACT: massa de água corpora total para espaço de diluição do deutério (kg).

Além disso, é possível a obtenção da massa gorda, conhecida como a gordura corporal do indivíduo, sendo a quantidade de tecido adiposo no indivíduo.

Em que:

$$MG = MT - MLG \quad (19)$$

Onde:

MG: massa gorda (kg).

MT: massa total (kg).

MLG: massa livre de gordura (kg).

Contudo, para melhor análise, é feito um cálculo percentual da gordura corporal, o que possibilitará a comparação com as demais técnicas para determinação corporal, visto que haverá a quantidade da massa gorda dividindo pela massa total do indivíduo, indicando uma porcentagem.

$$\%MG = \frac{MG}{MT} \quad (20)$$

Onde:

%MG: percentual de gordura corporal (%).

MG: massa gorda (kg).

MT: massa total (kg).

Há de ressaltar que os parâmetros apresentados são em função dos valores das coletas de urina e saliva, o que leva a dois resultados distintos, visto que as informações das amostras, urina e saliva, são diferentes.

6. Simulação do cálculo

Dentro disso, será feita uma simulação, esta, com valores disponibilizados pela IAEA [3], para a determinação da massa corporal. Para a massa corporal de 80 Kg, dose individual de 60,52g. Ademais, a quantidade de água para realizar a destilação é de 80,1732g, com a quantidade da dose usada para a dose diluídas sendo 0,1525g; ΔDD é a medida de enriquecimento na dose diluída, calculada como 258,8 - 146,9, resultando em 111,9 ppm de excesso de 2H ; A perda de fluido cumulativa é de 0,240 kg; o ΔBW é equivalente a 99,36 ppm. Dentro disso, o valor do espaço de diluição é dado por (14):

$$Nx: \left\{ \left(\frac{80,1732}{0,1525} \right) \cdot 111,9 \right\} \cdot \left(\frac{60,52}{99,36 \cdot 1000} \right)$$

$$Nx: 35,832072 \text{ Kg}$$

Assim, para urina, temos (16):

$$MACT_u(Kg) = \left(\frac{35,832072}{1,041} \right) - 2,0,24$$

$$MACT_u = 33,94 \text{ Kg}$$

Assim, para saliva, consideramos o padrão de cada voluntário ingerir 100 mL de água, onde tal medida será colocada no mesmo recipiente que foi oferecida a dose individual, para melhor diluição na aplicação do teste, onde teremos (17):

$$MACT_s(Kg) = \left(\frac{35,832072}{1,041} \right) - \left(\frac{100}{1000} \right)$$

$$MACT_u = 34,32 \text{ Kg}$$

Logo, obteremos a massa livre de gordura, sendo (18):

$$MLG_u(Kg) = \frac{MACT_u}{0,732}$$

$$MLG_u = 46,37 \text{ Kg}$$

$$MLG_s(Kg) = \frac{MACT_s}{0,732}$$

$$MLG_s = 46,8 \text{ Kg}$$

Desta forma, a massa gorda, também conhecida como gordura corporal, é dada por (19):

$$MG_u(Kg) = MT - MLG_u$$

$$MG_u = 33,63 \text{ Kg}$$

$$MG_s(Kg) = MT - MLG_s$$

$$MG_s = 33,11 \text{ Kg}$$

Por fim, a porcentagem (%) da gordura corporal é dada por (20):

$$MG_u\% = \frac{MG_u}{MT}$$

$$MG_s\% = \frac{MG_s}{MT}$$

Logo, a porcentagem de gordura a partir da análise da urina é 42,04% e para a análise da saliva é de 41,39% para a dada simulação.

7. Avaliação do erro e discussão

7.1. Avaliação do erro e discussão para valor teórico

A partir da apresentação dos valores apresentados, é possível a análise do erro absoluto e relativo, em que a partir da simulação realizada anteriormente, um erro de $\pm 1\%$ e $\pm 5\%$ será aplicado ao valor obtido, como mostrado nas tabelas do número 2 ao 8, o que possibilitará uma análise dentro dos valores finais, comparado ao da simulação. Para isso, uma tabela será apresentada, com os valores de W , x^2H_{DD} , $x^2H_{H_2O}$, a , A , $x^2H_{enriq.}$ e x^2H_{basal} :

Tabela 2: Valor do erro absoluto e relativo a partir das variações de W , para urina (u) e saliva (s), para %MG.

Variação	Valor de W	Erro Absoluto (s)	Erro relativo (s)	Erro Absoluto (u)	Erro relativo (u)
-1%	79,370577	0,59%	1,40%	0,59%	1,38%
+1%	80,974023	0,59%	1,44%	0,59%	1,42%
-5%	76,163685	2,94%	6,63%	2,94%	6,53%
+5%	84,180915	2,94%	7,64%	2,94%	7,52%

Tabela 3: Valor do erro absoluto e relativo a partir das variações de x^2H_{DD} , para urina (u) e saliva (s), para %MG

Variação	Valor de x^2H_{DD}	Erro Absoluto (s)	Erro relativo (s)	Erro Absoluto (u)	Erro relativo (u)
-1%	256,212	1,36%	3,18%	1,36%	3,13%
+1%	261,388	1,36%	3,40%	1,36%	3,34%
-5%	245,860	6,80%	14,11%	6,80%	13,92%
+5%	271,740	6,80%	19,65%	6,80%	19,29%

Tabela 4: Valor do erro absoluto e relativo a partir das variações de $x^2H_{H_2O}$, para urina (u) e saliva (s), para %MG.

Variação	Valor de $x^2H_{H_2O}$	Erro Absoluto (s)	Erro relativo (s)	Erro Absoluto (u)	Erro relativo (u)
-1%	145,431	0,77%	1,90%	0,77%	1,87%
+1%	148,369	0,77%	1,83%	0,77%	1,80%
-5%	139,555	3,86%	10,28%	3,86%	10,10%
+5%	154,245	3,86%	8,53%	3,86%	8,41%

Tabela 5: Valor do erro absoluto e relativo a partir das variações de a, para urina (u) e saliva (s), para %MG.

Variação	Valor de a	Erro Absoluto (s)	Erro relativo (s)	Erro Absoluto (u)	Erro relativo (u)
-1%	0,150975	0,59%	1,46%	0,59%	1,43%
+1%	0,154025	0,58%	1,39%	0,58%	1,37%
-5%	0,144875	3,09%	8,08%	3,09%	7,94%
+5%	0,160125	2,80%	6,33%	2,80%	6,24%

Tabela 6: Valor do erro absoluto e relativo a partir das variações de A, para urina (u) e saliva (s), para %MG.

Variação	Valor de A	Erro Absoluto (s)	Erro relativo (s)	Erro Absoluto (u)	Erro relativo (u)
-1%	59,9148	0,59%	1,40%	0,59%	1,38%
+1%	61,1252	0,59%	1,44%	0,59%	1,42%
-5%	57,494	2,94%	6,63%	2,94%	6,53%
+5%	63,546	2,94%	7,64%	2,94%	7,52%

Tabela 7: Valor do erro absoluto e relativo a partir das variações de $x^2H_{enriq.}$, para urina (u) e saliva (s), para %MG

Variação	Valor de $x^2H_{enriq.}$	Erro Absoluto (s)	Erro relativo (s)	Erro Absoluto (u)	Erro relativo (u)
-1%	246,866	1,51%	3,79%	1,51%	3,73%
+1%	251,854	1,44%	3,36%	1,44%	3,31%
-5%	236,892	8,43%	25,59%	8,43%	25,10%
+5%	261,828	6,55%	13,67%	6,55%	13,49%

Tabela 8: Valor do erro absoluto e relativo a partir das variações de x^2H_{basal} , para urina (u) e saliva (s), para %MG.

Variação	Valor de x^2H_{basal}	Erro Absoluto (s)	Erro relativo (s)	Erro Absoluto (u)	Erro relativo (u)
-1%	148,50000	0,87%	2,07%	0,87%	2,04%
+1%	151,50000	0,90%	2,23%	0,90%	2,19%
-5%	142,50000	4,13%	9,06%	4,13%	8,94%
+5%	157,50000	4,80%	13,11%	4,80%	12,89%

Com o uso da simulação feita como os valores disponibilizados pela IAEA[3] foi possível comparar um valor teórico com possíveis flutuações, Dentro disso, é observável que para 1% da variação do valor de x^2H_{DD} e $x^2H_{enriq.}$, temos um maior erro relativo que quando comparado aos demais, sobressaindo, devido a maior influência no resultado final da porcentagem de gordura, tanto para urina, quanto para saliva. Do mesmo modo, observamos para a variação de 5%, sendo positiva ou negativa. Tal observação demonstra que para a DD, a preparação deve possuir extrema cautela, já que a dose diluída é feita a partir da DO, o que mostra que seu valor depende das medidas realizadas e anota da dose ofertada, e que se não verificados com cuidado, o erro pode ser maior. Ademais, o ambiente de preparação das amostras deve estar em equilíbrio de temperaturas consideráveis frias, a fim de evitar evaporação do material; baixa circulação de ar, sendo um local fechado; baixa circulação de pessoas, a fim de evitar impurezas.

Além do mais, é observado um erro acima de 2% no resultado da porcentagem de massa gorda para x^2H_{basal} , no que se refere à variação de $\pm 1\%$ do valor inicial, o que mostra que tal parâmetro também deve ser atentado na parte da coleta das amostras. Dessa forma, tanto o valor basal como os enriquecidos das coletas dos pacientes, devem ser atentados, desde a ingestão do conteúdo, verificação das horas para o equilíbrio isotópico, revisão se grande parte do conteúdo foi bebido, até as destilações das amostras, onde o cuidado deve ser redobrado, a fim de evitar que o material se misture com impurezas do ambiente ou do próprio preparador, o que leva ao uso de máscaras e luvas.

Logo, os valores para a análise da dose diluída possuem grande influência na solução final, o que mostra que para a preparação da dose diluída, alguns cuidados devem ser atendados, como a verificação da pipetagem para haver maior precisão. Além disso, as balanças devem possuir ao menos quatro casas decimais [3], com o princípio da incerteza bem estabelecido, pela condição do fornecedor do equipamento ou pela menor divisão da medida. Pelas condições do balanço isotópico, a dose diluída é dada a partir das misturas de diferentes

conteúdos, com abundâncias isotópicas diferentes, o que aumenta a margem de erro, já que os valores são dados em partes por milhão, e devem ser encontrados a partir de um padrão de referência para o balanço isotópico ideal, como apresentado pela tabela extraída de [1].

Ainda, as coletas com os voluntários possuem grande domínio na solução geral, já que o erro dado é visível, tanto para urina quanto para saliva. Com as coletas basais e enriquecidas, alguns controles para parte de quem aplica o teste podem ocasionar erros grandes, caso não atentados. Visto que existe a dependência do valor de W para as fórmulas apresentadas, a verificação se o voluntário ingeriu todo o conteúdo é de extrema importância. Além disso, deve haver um tempo determinado para a coleta das amostras finais, sendo de aproximadamente 4 horas, pois é o tempo ideal para o deutério entrar em equilíbrio ao longo do corpo, com bases na informação [3].

Também, os valores representativos da balança em que são pesados os pacientes devem ser atentados, já que erros na calibração da balança, podem ocasionar erros para determinação da composição corporal. Com isso uma análise será apresentada na Tabela 9 para o erro absoluto e relativo, em que a partir da simulação realizada anteriormente, um erro de $\pm 1\%$ e $\pm 5\%$ será aplicado ao valor obtido da massa corporal, como retratado em:

Tabela 9: Valor do erro absoluto e relativo a partir das variações de w , para urina (u) e saliva (s), para %MG.

Varição	Valor de MT	Erro Absoluto (s)	Erro relativo (s)	Erro Absoluto (u)	Erro relativo (u)
-1%	79,2	0,41%	1,01%	0,42%	1,00%
+1%	80,8	0,41%	0,99%	0,42%	1,00%
-5%	76	2,07%	5,26%	2,10%	5,26%
+5%	84	2,07%	4,76%	2,10%	4,76%

A partir disso, é observável que erros significativos no valor final da porcentagem de gordura corporal são dados a partir de uma variação de $\pm 5\%$ do valor real obtido na balança.

7.2. Avaliação do erro e discussão para valor real

Contudo, segundo IAEA [3], há algumas referências para validação das análises realizadas, a partir de um dado valor de referência a ser seguido, pelos parâmetros referentes a abundâncias isotópicas, onde com erros significativos e reconhecidos, os valores devem ser revisados. Dentro disso, será usado um dos parâmetros, sendo o da abundância isotópica da água utilizada na preparação das doses ofertadas, para assim, obter uma validação de que o teste para tal número de voluntários seja aprovado, considerando possíveis erros dentro do mesmo, pela aprovação de um dos parâmetros.

Para o preparo da DO, DD e DI, água local engarrafada foi usada, o que leva a necessidade de obter o valor de seu enriquecimento isotópico. Com isso, uma pipeta é usada, de modo que seja pipetado cerca de 1,5 mL da água engarrafada, para assim, obter o valor do enriquecimento ao passar pela análise isotópica. Logo, os enriquecimentos isotópicos mais comuns na água são os de ^2H e ^{18}O .

Conforme a IAEA [3], os valores aproximados de partes por milhão (ppm) e delta assumem que a água potável local usada tem um teor de deutério de 155,7 ppm ou 0 ‰ $\delta^2\text{H}$, segundo a VSMOW, que significa "Vienna Standard Mean Ocean Water" (Água Oceânica Padrão Média de Viena), é uma água de referência amplamente reconhecida internacionalmente para medições isotópicas de água [1]. No entanto, a água pode variar de 130 ppm ou -150 ‰ $\delta^2\text{H}$ segundo VSMOW para 156 ppm ou 0 ‰ $\delta^2\text{H}$ VSMOW, dependendo da latitude. Dessa forma, é observável um valor de referência para a abundância do ^2H na água potável, o que possibilita uma análise acerca do possível erro, para assim, uma validação.

Dentro disso, para 31 voluntários submetidos ao teste de mensuração corporal partir da ingestão de dióxido de deutério, duas diferentes águas engarrafadas locais foram usadas para a preparação da DO, DD e por fim, a DI. Para 11 voluntários, a água usada para o preparo das doses possui o valor de abundância isotópica do deutério de 148,31 ppm a partir da análise feita por Espectroscopia de massa por Razão de Isótopos, IRMS, a fim de determinar a composição isotópica da água. Assim, é possível observar que para tal leva de pacientes, o processo é validado a partir de uma referência dada, estando dentro da mesma, sendo um referencial de 130 ppm até 156 ppm. Do mesmo modo, um número de 20 voluntários, tiveram o uso de uma segunda água engarrafada local, esta tendo o valor de 148,60 ppm do valor de abundância isotópica do deutério, o que está dentro do padrão de referência listado, onde é notável que para os demais indivíduos, o processo é válido para a composição da água analisada.

Isso demonstra que ambos valores não estão submetidos a um erro notável, já que estão dentro de um padrão de referência, o que mostra que para o parâmetro do enriquecimento isotópico de deutério na água, o teste para os 31 voluntários é válido.

8. Conclusão

É válido ressaltar a importância do estudo para determinação da composição corporal, uma vez que possibilita testes realizados de maneira simples, onde é fornecido detalhamento acerca da estrutura corpórea do indivíduo, para avaliação da saúde, desempenho atlético, prescrição de dietas e prevenções de possíveis doenças. Além do mais, com o uso da técnica para determinação a partir da ingestão de dióxido de deutério, como um marcador, faz com que o teste seja menos invasivo ao paciente, em que os dados serão obtidos de maneira segura e precisa, sendo considerado um exame padrão ouro para tal finalidade. Esta técnica oferece vantagens significativas, como a precisão na medição da água corporal e a minimização de riscos para os participantes.

No entanto, é importante notar que a presença de erros pode ter um grande impacto nos resultados finais, o que afeta a interpretação clínica e a eficácia das intervenções. O uso de dióxido de deutério para determinar a composição corporal é muito importante devido à sua precisão e segurança. É crucial buscar métodos aprimorados e estar sempre atento para identificar possíveis fontes de erro, a fim de garantir que as medições da composição corporal sejam clinicamente relevantes e confiáveis.

Entender a importância da precisão na determinação da composição corporal e buscar constantemente métodos mais confiáveis é fundamental para promover intervenções eficazes e melhorar a saúde e o bem-estar da população.

9. Referências Bibliográficas

- [1] FAGHIHI, V et al. **A thoroughly validated spreadsheet for calculating isotopic abundances (^2H , ^{17}O , ^{18}O) for mixtures of waters with different isotopic compositions.** Rapid Communications in Mass Spectrometry, 2015, 1351-1356. DOI: 10.1002/rcm.7232.
- [2] GODOY, J.M. et al. **Determinação em $\delta(\text{d})$ e $\delta(18\text{o})$ em águas minerais brasileiras,** Rev Águas subterrâneas, 2012. 2-3.
- [3] INTERNATIONAL ATOMIC ENERGY AGENCY. **Assessment of body composition and total energy expenditure in humans using stable isotope techniques.** IAEA Human Health Series, no 3. Vienna, July, 2009.
- [4] INTERNATIONAL ATOMIC ENERGY AGENCY. **Assessment of body composition and total energy expenditure in humans using stable isotope techniques.** IAEA Human Health Series, no 13. Vienna, Dec, 2010.
- [5] DELANY, JAMES P. **Doubly Labeled Water for Energy Expenditure.** In: **Committee on Military Nutrition Research, Food and Nutrition Board, Institute of Medicine. Emerging Technologies for Nutrition Research: Potential for Assessing Military Performance Capability.** Editado por Sydne J. Carlson-Newberry e Rebecca B. Costello. Washington, D.C.: National Academy Press, 1997. 181-184.
- [6] TABACNIKS, MANFREDO H. **Conceitos Básicos da Teoria de Erros.** Revisão 2009 por Alain A. Quivy, revisão 2011 por Marcelo Martinelli, José Roberto Oliveira, Alexandre Levin. São Paulo: Instituto de Física, Universidade de São Paulo, 2011. 6-8.
- [7] SANT'ANNA, Mônica de Souza L. et. al. **Métodos de avaliação da composição corporal em crianças.** Rev Paul Pediatr, São Paulo, v. 27, n. 3, p. 2009. 315-21.
- [8] COPLEN, T. B. **Guidelines and recommended terms for expression of stableisotope-ratio and gas-ratio measurement results,** Rapid Communications in Mass Spectrometry 2011, 2538–2560. DOI: 10.1002/rcm.5129