

Tatiana Sofia do Nascimento Pinheiro

Especiação de cobre e zinco em fluidos biológicos por voltametria de redissolução com
eléctrodo de filme de bismuto

Universidade Fernando Pessoa
Faculdade de Ciências da Saúde
Porto 2011

Tatiana Sofia do Nascimento Pinheiro

Especiação de cobre e zinco em fluidos biológicos por voltametria de redissolução com
eléctrodo de filme de bismuto

Universidade Fernando Pessoa
Faculdade de Ciências da Saúde
Porto 2011

Tatiana Sofia do Nascimento Pinheiro

Especiação de cobre e zinco em fluidos biológicos por voltametria de redissolução com
eléctrodo de filme de bismuto

Trabalho de Conclusão de Ciclo apresentado à
Universidade Fernando Pessoa como parte dos
requisitos para obtenção do grau de Mestre
em Ciências Farmacêuticas.

Orientadora:

Professora Doutora Fernanda Leal

Co-Orientadora:

Professora Doutora Rita Catarino

Porto 2011

Resumo

A voltametria de redissolução é uma poderosa técnica utilizada na monitorização de metais em diversas matrizes. Combina uma etapa de pré-concentração com uma etapa de medição electroquímica. Durante os últimos 20 anos os eléctrodos de filmes de mercúrio foram os mais utilizados como suporte nas técnicas voltamétricas. Com o aumento da preocupação ambiental, a toxicidade associada ao mercúrio começou a pôr em causa a sua utilização segura. Assim em 2000, é proposta pela primeira vez a utilização do bismuto como substituto do mercúrio, devido à sua baixa toxicidade. Nos últimos anos foram realizados vários trabalhos utilizando eléctrodos de filme de bismuto, para a determinação de metais por voltametria de redissolução. No entanto poucos se referem à especiação de metais em matrizes biológicas.

Neste trabalho são propostas metodologias que se baseiam na realização de voltametria de redissolução anódica usando um eléctrodo de carbono vítreo revestido com filme de bismuto, aplicadas à especiação na urina de dois metais, cobre e zinco, essenciais à saúde Humana em quantidades vestigiais.

A determinação dos metais foi realizada por voltametria de redissolução anódica de onda quadrada em tampão fosfato 0,25 M (pH 7,4). Os parâmetros experimentais foram optimizados para os metais em questão. A determinação das concentrações nas amostras de urina foi efectuada pelo método de adição padrão.

Sendo um trabalho de especiação, foi determinada a concentração livre e total dos metais em amostras de urina. Foi assim necessário recorrer à digestão da amostra utilizando uma técnica combinada de tratamento com reagentes oxidantes e digestão por microondas.

Comparando os valores obtidos para o metal total nas amostras de urina com os existentes na literatura, concluímos que os valores obtidos para o Cu (133 e 143 µg/L) se encontram ligeiramente aumentados, enquanto os de Zn (447 e 559 µg/L) correspondem ao intervalo considerado normal (300-600 µg/L). No entanto, a

concentração média de Cu livre obtida para as 5 amostras ($53,8 \pm 1,7 \mu\text{g/L}$) encontra-se no intervalo de valores de Cu total existentes na literatura (12-80 $\mu\text{g/L}$).

Como os estudos de especiação em fluidos biológicos não se encontram muito desenvolvidos, não existem valores de referência para as concentrações de metal livre em urina. Este facto mostra a importância de se continuarem a realizar estudos de especiação em fluidos biológicos, já que como podemos verificar pelos resultados obtidos só ~ 40 % do metal (Cu e Zn) excretado se encontra no seu estado livre.

Abstract

The stripping voltammetry is a powerful tool used to monitoring metals in various matrices. This technique combines a stage of pre-concentration with an electrochemical measurement step. During the past 20 years the mercury film electrodes were more used as a support in voltammetric techniques. With increasing environmental concern, the toxicity associated with the mercury began to jeopardize their safe use. So in 2000, is first proposed the use of bismuth as a substitute for mercury, due to its low toxicity. In recent years several studies were conducted using bismuth film electrodes for the determination of metals by stripping voltammetry. However, few refer to the speciation of metals in biological matrices.

This work proposes methodologies that are based on the performance of anodic stripping voltammetry using a glassy carbon electrode coated with bismuth film, applied to speciation in the urine of two metals, copper and zinc, essential to human health in trace amounts.

The determination of metals was performed by square wave anodic stripping voltammetry in 0,25 M phosphate buffer (pH 7,4). The experimental parameters were optimized for the metals in question. The determination in the urine samples was performed by the standard addition method.

As a work of speciation was determined free and total concentration of metals in the urine samples. It was therefore necessary to resort to sample digestion using a combined technique of treatment with oxidants and microwave digestion.

Comparing the values obtained for the total metal in the urine samples with those in the literature, we conclude that the values obtained for Cu (133 and 143 $\mu\text{g/L}$) are slightly increased, while Zn (447 and 559 $\mu\text{g/L}$) correspond to the range considered normal (300-600 $\mu\text{g/L}$). However, the average concentration of free Cu obtained for the 5 samples ($53,8 \pm 1,7$ $\mu\text{g/L}$) is in the range of values of total Cu in the literature (12-80 $\mu\text{g/L}$).

As the speciation studies in biological fluids are not highly developed, there are no reference values for concentrations of free metal in the urine. This shows the importance of continuing to perform speciation studies in biological fluids, since we can verify that in the results obtained only ~ 40% of the metal (Cu and Zn) is excreted in its free state.

Agradecimentos

Agradeço...

... à Universidade Fernando Pessoa pelo apoio financeiro, bem como instalações e material que disponibilizou para que fosse possível realizar a investigação laboratorial inerente a este estudo;

... à Professora Doutora Fernanda Leal e à Professora Doutora Rita Catarino, pela permanente orientação, ajuda, e disponibilidade demonstrada ao longo da realização deste trabalho;

... à Professora Doutora Renata Souto, que trabalhando no mesmo laboratório de investigação onde realizei este trabalho, sempre se mostrou disponível para colaborar e ajudar;

... ao Professor Doutor Costa Lima (REQUIMTE/ Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto) pela cedência do laboratório e equipamento que permitiu a digestão das amostras de urina;

... a todos os amigos que fiz ao longo desta caminhada e que ficaram para toda a vida, apoiando-me em todos os momentos;

... a toda a minha família que é o grande suporte na minha vida.

Dedicatória

Porque mesmo sem a tua presença...

... Sinto a tua força

Para Rita Seixas

Índice

Índice	12
Índice de Figuras	14
Índice de Tabelas	15
Lista de Abreviaturas.....	16
I – Introdução.....	17
1. Metais no organismo humano.....	17
i. Zinco.....	18
ii.Cobre	19
2. Importância da determinação de metais (Cu e Zn) em amostras biológicas	21
3. Especação de metais	23
i. Análise de especação de metais em fluidos biológicos	24
4. Técnicas voltamétricas para análise de especação de metais	26
i. Eléctrodo de filme de bismuto.....	28
ii.Digestão da amostra.....	30
5. Objectivos do trabalho experimental.....	31
II. Parte Experimental.....	32
1. Reagentes e Soluções.....	32
2. Instrumentação.....	33
3. Determinações voltamétricas.....	34
4. Digestão da amostra.....	35
III. Discussão dos Resultados.....	36

1. Otimização das condições de deposição de Cu e Zn	36
i. Otimização do potencial de deposição (E_d)	36
ii. Otimização do tempo de deposição (t_d)	37
iii. Otimização da concentração de Bi	38
iv. Deposição do Bi, Cu e Zn <i>in situ</i> vs <i>ex situ</i>	39
2. Curvas de calibração para Cu e Zn em tampão fosfato	41
3. Aplicação em fluidos biológicos (urina)	43
IV. Conclusão	47
V. Bibliografia	49

Índice de Figuras

Figura 1 - Potencióstato Ecochime/ Autolab modelo μ Autolab Type III	33
Figura 2 - Célula electroquímica utilizada	34
Figura 3 - Mls 1200 Mega da Milestone®	34
Figura 4 – Influência do E_d na i produzida por uma solução de Zn 100 μ g/L	37
Figura 5 – Influência do t_d na i produzida por uma solução de Zn 100 μ g/L.....	37
Figura 6 – i para Zn utilizando Bi 0,5 e 1 mg/L	38
Figura 7 – i para Cu utilizando Bi 0,5 e 1 mg/L.....	39
Figura 8 – Voltamograma obtido pelo método <i>in situ</i>	40
Figura 9 - Voltamograma obtido pelo método <i>ex situ</i>	41
Figura 10 – Curva de calibração de Cu em tampão fosfato 0,25 M (pH 7,4)	42
Figura 11 – Curva de calibração de Zn em tampão fosfato 0,25 M (pH 7,4).....	42
Figura 12 – Adição padrão de Zn à amostra de urina para determinação de Zn total...	44

Índice de Tabelas

Tabela 1 – Concentrações de Cu e Zn nas amostras de urina..... 44

Tabela 2 – Percentagem de metal livre em relação ao total 45

Lista de Abreviaturas

- ASV - Voltametria de redissolução anódica (*Anodic stripping voltammetry*)
- BFEs – Eléctrodos de filme de bismuto (*Bismuth film electrodes*)
- Bi – Bismuto
- CSV – Voltametria de redissolução catódica (*Cathodic stripping voltammetry*)
- Cu – Cobre
- Hg - Mercúrio
- IUPAC – União International para a Química Pura e Aplicada (*International Union for Pure and Applied Chemistry*)
- MFEs – Eléctrodo de filme de mercúrio (*Mercury film electrodes*)
- Pb - Chumbo
- WHO – Organização Mundial de Saúde (*World Health Organization*)
- Zn – Zinco

I – Introdução

1. Metais no organismo humano

Os metais são um importante componente da crosta terrestre. Estes encontram-se contidos nos depósitos minerais e difundidos nas rochas. A maioria dos metais encontra-se em pequenas quantidades, apesar de alguns como o crómio, o ferro e o manganês serem mais abundantes. A constituição mineral depende da região, ocorrendo zonas de excesso e de carência de determinado metal. As propriedades do metal em conjunto com as características do meio vão definir a sua distribuição. Normalmente apresentam-se na sua forma inorgânica, mas podem combinar-se com compostos orgânicos. Alguns são suficientemente estáveis para se encontrarem biodisponíveis na natureza (Caussy *et al.*, 2003).

O Homem tem sido exposto aos metais continuamente, devido à sua utilização no comércio, indústria e medicina, através de processos naturais de bioacumulação, actividade vulcânica, erosão e de alguns fenómenos antropogénicos como a combustão fósil, incineração e indústria mineira (Caussy *et al.*, 2003).

Alguns minerais estão presentes na constituição dos tecidos humanos em pequenas concentrações. Apesar das baixas quantidades desempenham funções essenciais ao bom funcionamento do organismo, sendo por estas características considerados oligoelementos (WHO, 1996).

Os metais, quanto à sua existência no organismo humano, podem ser classificados como essenciais, não essenciais e tóxicos. O cobalto, cobre, ferro, manganês e zinco são alguns exemplos de metais essenciais e quando se encontram em deficiência podem ser responsáveis por anomalias clínicas. Todos os metais essenciais podem no entanto tornar-se tóxicos quando as suas concentrações se tornam mais elevadas. Outros metais como o arsénio, cádmio, chumbo e mercúrio não são essenciais para nenhum organismo vivo. A sua toxicidade vai depender da exposição, da forma como o metal entra no organismo e atinge os órgãos alvo. Cada metal tem o seu alvo de toxicidade principal. O

arsénio exerce principalmente a sua toxicidade sobre a pele, sistema nervoso central, sangue e tecido cancerígeno; o cádmio tem afinidade para os rins, pulmões e tecido cancerígeno; o chumbo tem afinidade para o sistema nervoso, sangue e rins; o mercúrio para o sistema nervoso e rins (Caussy *et al.*, 2003; WHO, 1996; Yokel *et al.*, 2006).

Os metais variam muito na sua biodisponibilidade ou capacidade de entrar no organismo e causar toxicidade. Alguns cientistas distinguem biodisponibilidade externa e interna. A biodisponibilidade externa é a capacidade que o metal tem de se solubilizar e difundir no meio ambiente. A biodisponibilidade interna determina a capacidade em ser absorvido e atingir o órgão alvo exercendo a sua função ou causando efeitos tóxicos (Caussy *et al.*, 2003).

A capacidade de um oligoelemento ser absorvido e exercer o seu papel depende de várias variáveis: (i) as características físico-químicas que o metal apresenta nas fontes provenientes da dieta alimentar, (ii) as interações de antagonismo ou sinergismo que ocorrem com os receptores do lúmen ou dos tecidos, (iii) as variáveis fisiológicas que em resposta à alteração da relação procura/oferta do metal, influenciam a absorção, armazenamento e incorporação nos locais alvo (WHO, 1996). Após a entrada do metal no organismo todos estes factores fazem com que uma parte seja absorvida e a restante expirada ou excretada pelo trato gastrointestinal.

i. Zinco

O zinco (Zn) é um oligoelemento que tem como funções bioquímicas a participação em processos enzimáticos, e a estabilização da estrutura molecular dos componentes subcelulares e da membrana. Pensa-se que o Zn seja essencial a todas as formas de vida. Encontra-se em todos os tecidos e fluidos corporais, estimando-se que existam cerca de 2g de Zn no organismo humano (Dutra *et al.*, 2006). A sua eliminação é feita através dos rins, da pele e do intestino. Num indivíduo saudável a excreção de Zn através da urina deve situar-se entre os 300 e 600 µg/L (Dutra *et al.*, 2006). Em casos de exercício

físico ou situações de maior transpiração os valores de zinco excretado no suor estão elevados (WHO, 1996).

As principais consequências da deficiência de Zn no organismo são atrasos no crescimento e na maturação sexual e esquelética, aparecimento de dermatite, alopecia, diarreia, falta de apetite e alterações comportamentais. O aumento da susceptibilidade a infecções leva a acreditar que a deficiência em Zn gera também alterações a nível do sistema imunológico. As deficiências mais ligeiras são facilmente ignoradas, pois os sintomas clínicos são mais leves manifestando-se essencialmente a susceptibilidade para infecções e ligeiro atraso no crescimento. A deficiência em Zn pode ser detectada através da diminuição das concentrações a nível do sangue, urina e cabelo (WHO, 1996). Poucos são os casos relatados de envenenamento por excesso de zinco, mas com doses entre os 4 e 8 g podem aparecer sintomas como náuseas, diarreia, vômitos e letargia (WHO, 1996).

A quantidade diária de Zn que deve ser ingerida é obtida pela soma dos requisitos para o crescimento do tecido, a manutenção, o metabolismo e as perdas endógenas. O factor mais difícil de estimar é a perda endógena, pois esta tem a capacidade de se reduzir quando as quantidades de Zn ingeridas são diminuídas. Foram realizados estudos que demonstram que em indivíduos submetidos a uma dieta pobre em Zn, os níveis excretados na urina e nas fezes vão sendo consideravelmente reduzidos ao longo das semanas. Esta diminuição ocorre sem no entanto alterar os níveis sanguíneos. Os estudos efectuados para estimar os níveis de Zn perdidos diariamente sugerem que a quantidade mínima a ingerir por dia seja de 1 mg nos homens e 0,7 mg nas mulheres (WHO, 1996).

ii. Cobre

O cobre (Cu) encontra-se distribuído por todo o organismo preferencialmente sobre a forma de complexo orgânico, normalmente associado a metaloproteínas com função enzimática. Estas enzimas encontram-se envolvidas em vários processos metabólicos

como por exemplo a respiração celular e a produção de energia. Estão também ligadas à síntese de proteínas constituintes do esqueleto e vasos sanguíneos e neurotransmissores essenciais à função nervosa (WHO,1996). Os níveis de Cu no organismo rondam os 80 mg, podendo variar entre 50 e 120 mg (WHO, 1996). Estes valores não são constantes em todo o organismo, variando de órgão para órgão. Também a idade do indivíduo é um factor condicionante destes valores, sendo que nos dois primeiros anos de vida o bebé possui cerca de 6 vezes mais Cu no fígado que no individuo adulto, que serve como um reservatório enquanto a alimentação é apenas à base de leite materno. Na alimentação diária o Cu encontra-se amplamente distribuído nos vegetais e nos produtos de origem animal. As melhores fontes alimentares de Cu são os frutos do mar, carnes, legumes, cereais refinados, açúcares, leite e derivados. A água que passa pela canalização e fica contaminada com Cu também se torna numa fonte significativa, já que cerca de 60 % das formas solúveis de Cu são absorvidas pelo lúmen do intestino (WHO, 1996).

A ingestão conjunta com outros metais funciona de forma antagónica reduzindo a quantidade de Cu que é assimilada no organismo. Um dos exemplos é a relação Cu/Zn, onde uma dieta com suplementação em Zn é responsável pela diminuição dos níveis de Cu no organismo. Outro exemplo é o aumento da absorção quando existe uma ingestão de proteínas superior a 100 g/dia, valor que por ser tão elevado não é significativo em termos reais. O tiomolibdato é um forte antagonista do Cu e é utilizado no tratamento da doença de Wilson (WHO, 1996).

O Cu no sangue encontra-se essencialmente nos eritrócitos e no plasma. Nos eritrócitos grande parte encontra-se no complexo enzimático Cu/Zn superóxido dismutase. Os níveis normais de cobre nos eritrócitos num adulto saudável são 0,9/1,0 µg/mL de concentrado de eritrócitos. No plasma, 93 % do Cu encontra-se fortemente ligado à enzima ceruloplasmina, responsável pelo transporte de ferro oxidado após a sua incorporação na transferrina. Os níveis normais no plasma rondam os 0,8/1,2 µg/mL e este valor é inalterado por ritmos cíclicos ou alimentação. As mulheres normalmente possuem mais 10% de Cu no plasma do que os indivíduos do sexo masculino, podendo aumentar até três vezes mais no último trimestre da gravidez ou em caso de toma de estrogénios. Quando o nível sérico de Cu se encontra abaixo dos 0,8 µg/mL estamos

perante um estado de hipocupremia, que geralmente está ligado a estado de deficiência de ceruloplasmina (WHO, 1996).

Vários sintomas têm sido associados, tanto em animais como em humanos, à deficiência em Cu. Os mais comuns são anemia hipocrômica, neutropenia, hipopigmentação do cabelo e da pele, osteoporose e formação óssea anormal, e anormalidades vasculares. Não existe actualmente nenhum marcador específico para a deficiência em Cu. São utilizados para o efeito os valores de referência de Cu sérico (0,64/1,56 µg/mL), Cu urinário (12 a 80 µg/L) e o cobre depositado no cabelo (10/20 µg/g) (Jacobs *et al.*, 2001).

O consumo de Cu considerado adequado para um adulto é de 0,7 e 0,8 mg/dia, para homens e mulheres respectivamente. Estes valores representam um aumento de 15 % em relação à quantidade necessária para que algum Cu seja armazenado no organismo (WHO, 1996).

São raros os casos de intoxicação por Cu e, normalmente acontecem devido a contaminação alimentar e ingestão voluntária ou acidental de grandes quantidades de sais de Cu. Os sintomas incluem salivacão excessiva, náuseas, vômitos, dor epigástrica e diarreia. Em alguns casos a intoxicação por Cu pode causar necrose hepática, proteinúria, hipotensão, taquicardia, insuficiência renal aguda, colapso vascular e morte. Estes sintomas só aparecem numa fase tardia da intoxicação, quando a capacidade do fígado em reter o Cu já se encontra no limite. Encontram-se reportados casos de ocorrência de mortes em bebés indianos, por cirrose devido à ingestão de leite que depois de ser armazenado em latas de bronze fica contaminado com Cu (WHO, 1996).

2. Importância da determinação de metais (Cu e Zn) em amostras biológicas

Os fluidos biológicos são reconhecidos como meios úteis para a determinação dos níveis de Cu e Zn para o diagnóstico e monitorização de determinados estados nutricionais e patologias.

Estudos recentes têm demonstrado que o Cu e o Zn são os factores de mediação na Doença de Alzheimer e na doença de Parkinson. O aparecimento destas duas doenças neurodegenerativas envolve a formação de placas devido à agregação de proteínas, e *stress* oxidativo. Como consequência os neurónios são danificados provocando alterações na função cerebral. Actualmente, os estudos sugerem que iões metálicos, entre eles Cu e Zn, possam exercer um papel fundamental, actuando como mediadores de neurotoxicidade, favorecendo o aparecimento de placas e *stress* oxidativo. Por exemplo, na doença de Alzheimer, a relação entre a agregação do péptido β -amilóide e o *stress* oxidativo foi provada. Tal facto deve-se a alterações na homeostase dos metais Cu, Fe e Zn que se ligam ao péptido em reacções redox. Um aumento da concentração destes metais foi relatado em casos de doença de Alzheimer (Cuajungco, 2002 e Nischwitz *et al.*, 2008).

O controlo dos níveis de Cu é uma forma de controlar a evolução da doença de Wilson, já que esta se caracteriza por um aumento dos mesmos (Oliveira, 2006). Também em certos carcinomas ocorre uma elevação do Cu, sendo utilizadas terapias quelantes, semelhantes às usadas na Doença de Wilson (Lin, 2009).

A determinação dos níveis de metais pesados foi também utilizada para testar a segurança de medicamentos tradicionais africanos à base de plantas. Avaliando a quantidade de zinco, cobre e ferro na urina de pacientes sujeitos a tratamento com estes medicamentos pode-se concluir se as plantas utilizadas na sua preparação estavam sujeitas a contaminação (Steenkamp, 2000).

A água é também sujeita a um controlo em termos de concentração em metais pesados, evitando a exposição de animais e seres humanos a quantidades tóxicas. São vários os estudos realizados em água superficiais para determinar os níveis de Cu e Zn (Muller, 2001).

Por todos estes motivos, surge na actualidade uma necessidade de desenvolver métodos que sejam eficazes na determinação das concentrações em Cu e Zn, principalmente a nível dos fluidos biológicos.

3. Especação de metais

Os metais podem existir na natureza na sua forma inorgânica, na forma de sal, ou na forma orgânica quando combinados com compostos orgânicos (Caussy *et al.*, 2003). Apesar de para fins de monitorização ambiental e ocupacional os valores totais do metal serem suficientes, para compreender o metabolismo, toxicidade, distribuição celular e deposição nos tecidos é necessário quantificar todas as formas em que o metal ocorre (Moreira, 2004). Ao estudo da forma em que o metal se apresenta numa dada matriz está associado o termo especação.

O termo especação foi tendo ao longo do tempo alterações no seu significado, não havendo ainda hoje um consenso na sua definição. Segundo a União International para a Química Pura e Aplicada (IUPAC, *International Union for Pure and Applied Chemistry*), o termo especação deve ser apenas utilizado para descrever a distribuição das espécies químicas numa determinada matriz. Define ainda três termos específicos a utilizar em situações distintas (IUPAC, 2000):

- i) Espécie Química: forma específica de um elemento definido quanto à composição isotópica, estrutura electrónica, estado de oxidação ou estrutura molecular.
- ii) Análise de Especação: actividades de análise/medição das quantidades de uma ou mais espécies individuais numa amostra.
- iii) Especação de um Elemento: distribuição das espécies químicas de um elemento num dado sistema.

As variáveis que contribuem para a especação são o número de átomos de valência, a existência de isótopos, os ligandos associados, o tamanho das partículas e o estado morfológico (Yokel *et al.*, 2006 e Gonzalez *et al.*, 2009). Vários metais encontram-se na Natureza em mais do que um estado de valência. Por exemplo, o Cu apresenta o

estado 0, I e II enquanto o Zn só se encontra no estado 0 e II. O estado de valência em que o metal se encontra vai influenciar a sua absorção, distribuição, biotransformação, eliminação e conseqüentemente a sua toxicidade. O tamanho da partícula é um factor preponderante no que respeita à deposição do metal nos pulmões. As partículas com diâmetros mais pequenos conseguem penetrar nos alvéolos e bronquíolos podendo nesse caso ser absorvidas para a corrente sanguínea. Também o facto de o metal se encontrar associado a ligandos afecta a sua forma química. Os ligandos são iões, átomos ou grupos funcionais que se ligam a um ou mais átomos centrais do metal formando normalmente um complexo. Esta ligação pode afectar tanto a solubilidade como a absorção pulmonar, distribuição, biotransformação, e eliminação do metal. A ligação do metal a proteínas transportadoras é influenciada pela espécie química. Estas têm a capacidade de reconhecer uma determinada espécie em detrimento de outra. Também em termos de formas orgânicas e inorgânicas do metal a absorção difere, sendo que as formas orgânicas são melhor absorvidas do que as inorgânicas. Um último factor que influencia a toxicocinética e a toxicodinâmica é a biotransformação (Yokel *et al.*, 2006 e Gonzalez *et al.*, 2009).

Neste sentido, a determinação da quantidade total de um elemento numa dada amostra é claramente insuficiente, e informação adicional sobre especiação está a ser crescentemente exigida no meio científico (Moreira, 2004).

Numa matriz complexa como os fluidos biológicos e tecidos, os elementos podem ocorrer como iões livres ou mononucleares, como complexos de baixo peso molecular, ou como complexos macromoleculares, reversíveis ou irreversíveis. Para trabalhos com especiação existe a necessidade de separar os compostos biologicamente activos aos quais o metal se encontra ligado, seguida da medição do elemento nas suas diferentes fracções.

i. Análise de especiação de metais em fluidos biológicos

Como já definido anteriormente, a análise de especiação refere-se à actividade analítica de identificar e determinar as diferentes espécies químicas numa dada amostra. É considerada a última barreira na análise elementar, pois implica a determinação de concentrações muito baixas e envolve dificuldades em encontrar métodos suficientemente selectivos (Gonzalez *et al.*, 2009). A amostragem, o armazenamento e a manipulação da amostra são as tarefas mais difíceis na análise de especiação, devendo por isso evitar-se qualquer procedimento que altere o equilíbrio ou transforme as diferentes espécies contidas na amostra (Moreira, 2004 e Gonzalez *et al.*, 2009).

Muitas das espécies químicas em análise apresentam o problema de serem instáveis termicamente e o simples acto de manipulação da amostra pode alterar irreversivelmente os dados obtidos. Outro factor que pode influenciar os resultados é a alteração do meio biológico. Estas mudanças alteram o equilíbrio físico-químico existente, de modo que no final as espécies químicas determinadas não representam as originalmente existentes. As baixas concentrações das diferentes formas de metal existentes após a separação são também um desafio pois para serem detectadas nas quantidades reais são necessários detectores extremamente sensíveis e selectivos. Além disso essas pequenas quantidades encontram-se ainda encobertas pelas matrizes muito complexas dos fluidos biológicos. Por estas razões todos os métodos de análise de especiação desenvolvidos até ao momento necessitam de processos de pré-tratamento (Moreira, 2004).

A análise de especiação já superou actualmente todos os problemas acima referidos e tornou-se evidente que hoje em dia o seu desenvolvimento tem proporcionado soluções exactas e precisas para vários problemas ambientais e para medições químicas de muitos elementos (Gonzalez *et al.*, 2009).

Com o crescente interesse da comunidade científica sobre a bioacumulação e toxicidade dos metais, têm sido desenvolvidos vários métodos analíticos para a determinação destes elementos em fluidos biológicos. O procedimento analítico ideal deve permitir a identificação e separação das diversas espécies químicas, a sua quantificação e a manutenção das ligações metal-ligando (Moreira, 2004).

A colheita e o armazenamento dos fluidos biológicos deve ser realizada com o máximo de precaução, uma vez que este tipo de amostras se altera e contamina facilmente, alterando assim os valores originais do metal. Devem-se ter em conta factores como a hora e o modo da colheita, o material usado na fabricação dos utensílios de recolha e a adição de conservantes. Todos estes factores podem alterar a análise de especiação feita (Moreira, 2004).

São usados vários métodos para pré-concentrar a amostra ou isolar uma determinada espécie para posterior quantificação. Estão descritos na literatura a utilização de métodos cromatográficos como cromatografia líquida de alta resolução (HPLC), troca iónica e exclusão de tamanho, que são muito úteis na determinação de diferentes espécies ao mesmo tempo (Moreira, 2004 ; Das, 1996). São ainda utilizados outros métodos como ultrafiltração, ultracentrifugação, extracção com solvente, destilação e pirólise (Moreira, 2004).

Após a separação das diferentes espécies na amostra são usadas outras técnicas para detecção e quantificação. As técnicas espectrofotométricas são largamente utilizadas para a determinação de metais devido à elevada sensibilidade e selectividade e tornam-se bastante atractivas porque a maioria dos laboratórios possui equipamentos de absorção atómica disponíveis. As mais usadas são a espectrofotometria de absorção atómica utilizando diferentes atomizadores tais como forno de grafite, chama, vapor frio, de massa e de emissão óptica (Moreira, 2004; Arabinda, 1996). No entanto, estas técnicas utilizadas sozinhas não são adequadas para a determinação *in situ* de metais, pois devido à elevada temperatura a que os atomizadores estão sujeito não se consegue diferenciar as diferentes espécies químicas (Moreira, 2004).

As técnicas voltamétricas de redissolução anódica (ASV, *anodic stripping voltammetry*) e de redissolução catódica (CSV, *cathodic stripping voltammetry*) são também actualmente bastante usadas devido à grande selectividade e sensibilidade que apresentam na determinação de metais em qualquer tipo de matriz (Carvalho, 2008).

4. Técnicas voltamétricas para análise de especiação de metais

Historicamente, o ramo da voltametria desenvolveu-se a partir da descoberta da polarografia em 1922, pelo Prémio Nobel Jaroslav Heyrovsky. Os métodos mais antigos passaram por uma série de dificuldades e só nas décadas de 60 e 70 é que ocorreram avanços significativos que permitiram melhorar quer as técnicas quer as teorias, tornando as metodologias mais sensíveis, permitindo o seu uso como método analítico de rotina (Kounaves, 1997).

As vantagens da utilização deste tipo de técnicas são várias, tais como: elevada sensibilidade a uma grande gama de concentrações, tanto para espécies orgânicas como inorgânicas; podem ser utilizadas a uma vasta gama de temperaturas e numa grande variedade de matrizes e solventes orgânicos; rapidez de análise; análise de vários elementos simultaneamente; e capacidade de determinar com relativa exactidão parâmetros cinéticos desconhecidos (Kounaves, 1997).

A característica comum a todas as técnicas voltamétricas é a aplicação de um potencial (E) a um eléctrodo e a monitorização da corrente resultante (i) que flui através da célula electroquímica. Normalmente a diferença de potencial gerada é monitorizada durante um período de tempo (t) pré-definido (Kounaves, 1997).

A análise voltamétrica é realizada numa célula electroquímica, que consiste num eléctrodo principal ou de trabalho, um eléctrodo de referência, e normalmente, num eléctrodo auxiliar. O eléctrodo de trabalho é onde a reacção ou transferência ocorre. A reacção de oxidação ou redução da substância na superfície do eléctrodo gera uma corrente eléctrica que é quantificada (Kounaves, 1997).

A voltametria de redissolução possui os limites de detecção mais baixos de todos os métodos electroanalíticos. Combina uma etapa de pré-concentração com uma etapa de medição electroanalítica dos analitos acumulados, e engloba três passos diferentes (Leal *et al.*, 2009). O primeiro passo de pré-concentração consiste na deposição do metal a analisar no eléctrodo, aplicando um potencial de corrente adequado. A solução em análise é agitada durante todo o processo para maximizar a quantidade de metal depositada. Numa segunda etapa a solução permanece em repouso não se dando

nenhuma reacção nesta fase. Na última fase o metal é retirado do eléctrodo ocorrendo um varrimento de potencial. A diferença de potencial é relacionada com a quantidade de metal em solução (Bott, 1992).

A voltametria de redissolução pode ser ainda anódica ou catódica de acordo com o tipo de processo, oxidação ou redução, respectivamente. Assim a ASV e CSV são duas técnicas específicas no que diz respeito à forma de varrimento de potencial (Bott, 1992).

A indústria farmacêutica é um exemplo de uma área onde esta técnica é bastante usada para quantificar o teor de substância activa. Também na química orgânica e analítica a voltametria é uma técnica aplicada na determinação de contaminantes e potenciais de redução (Bás *et al.*, 2010).

Para a análise de especiação de metais a voltametria é o método de eleição. Possibilita a medição mesmo em situações em que outras técnicas poderosas como a cromatografia ou absorção de massa são impossíveis de utilizar. Com esta técnica é possível detectar diferentes estados de oxidação dos metais e especificar a biodisponibilidade (Bás *et al.*, 2010).

i. Eléctrodo de filme de bismuto

Nas últimas duas décadas, os eléctrodos mais utilizados nas técnicas voltamétricas de redissolução foram os eléctrodos de filme de mercúrio (MFEs , *mercury-film electrodes*), preparados através do revestimento de um substrato apropriado com um fino filme de mercúrio. Este tipo de eléctrodo revelou-se uma óptima escolha principalmente na ASV e na voltametria de redissolução absorptiva (Economou, 2005).

Com o aumento da consciência ecológica no mundo desenvolvido, a toxicidade do mercúrio (Hg) e dos seus sais tornou-se uma desvantagem na utilização de MFEs. Por esse motivo na última década vários cientistas têm nos seus trabalhos tentado encontrar um potencial substituto para o Hg.

Em 2000, Wang propõe pela primeira vez a utilização de bismuto (Bi) como substituto do Hg (Wang *et al.*, 2000). Os eléctrodos de filme de bismuto (BFEs, *bismuth film electrodes*) são preparados da mesma forma que os MFEs, substituindo o filme de Hg por Bi. A vantagem mais significativa atribuída aos BFEs é a sua desprezível toxicidade para o ambiente, ao contrário dos MFEs. No entanto, podemos ainda encontrar outras vantagens analíticas já que o Bi forma ligas com os metais pesados, análogas às amálgamas que o Hg forma (Economou, 2005). Para além disso o Bi aparenta uma certa insensibilidade para o oxigénio dissolvido (Jia *et al.*, 2008). O Bi é um metal mais facilmente oxidável que o Hg, o que faz com que o BFE tenha em comparação com o MFE, um limite anódico negativo. A janela de potenciais aceitáveis torna-se assim mais pequena com a utilização do BFE o que é desvantajoso (Economou, 2005). Desde então têm sido desenvolvidos alguns trabalhos utilizando BFEs.

A área em que a utilização de BFE tem mais aplicações é a análise de metais vestigiais por técnicas de voltametria de redissolução (Economou, 2005).

O Bi pode ser normalmente depositado nos mesmos substratos que o Hg. Diferentes formas de carbono foram já utilizadas com o Bi, entre elas encontram-se o carbono vítreo, grafite, pasta de carbono e lápis de chumbo. O carbono vítreo produz um ruído de fundo quase insignificante, mas tem a desvantagem de ser o material mais caro. A pasta de carbono e o lápis de chumbo são materiais mais baratos que se encontram disponíveis comercialmente. Também têm sido testados microeléctrodos de carbono, ouro ou platina (Economou, 2005).

O método utilizado para o revestimento do BFE com o Bi é crítico para o seu bom funcionamento. Existem três metodologias diferentes que podem ser utilizadas (Economou, 2005):

O primeiro método, utilizado por Alberich, consiste numa deposição *ex situ* do Bi, ou seja, a sua deposição no eléctrodo antes deste ser transferido para a solução a analisar (Alberich *et al.*, 2009). Uma das vantagens associadas a este método é a possibilidade de otimizar as condições de deposição do Bi independentemente das condições de

análise da amostra, o que leva a uma maior versatilidade. A complexidade e morosidade do processo tornam-se uma desvantagem face a outros métodos (Alberich *et al.*, 2009).

Num segundo método, *in situ*, o Bi, numa concentração entre 400-1000 µg/L é adicionado directamente à amostra a analisar e a sua deposição é feita durante a análise. Neste tipo de deposição a concentração em Bi deve ser pelo menos dez vezes superior à concentração esperada do analito na amostra para evitar efeitos de saturação. As condições de deposição do Bi são, neste caso, condicionadas pelas condições ideais para análise da amostra (Economou, 2005). Esta técnica foi utilizada por Kefala nos seus estudos com chumbo (Pb) e Zn em águas e cabelo humano obtendo resultados satisfatórios (Kefala *et al.*, 2003).

O terceiro método de formação de BFEs está essencialmente confinado à utilização em eléctrodos de pasta de carbono. Consiste na modificação do eléctrodo com um precursor do Bi. É utilizado por exemplo o Bi₂O₃ que se incorpora no eléctrodo misturando-se com a pasta de carbono. Este método de modificação dos sensores é fácil de preparar e o seu procedimento é simples (Economou, 2005).

ii. Digestão da amostra

A presença de matéria orgânica na amostra, em análises voltamétricas pode comprometer a determinação da concentração real de metais, devido à formação de complexos estáveis inertes à detecção (Carvalho *et al.*, 2008 e Leal *et al.*, 2009). Além disso, a matéria orgânica pode competir com a espécie de interesse pela superfície do eléctrodo de trabalho, reduzindo a sensibilidade e provocando o aparecimento de sinais de fundo. Pode ainda sofrer oxidação ou redução, aumentando o sinal residual impedindo a execução da análise (Carvalho *et al.*, 2007). Por todos estes motivos a etapa de eliminação da matéria orgânica presente na amostra é de grande importância nos métodos voltamétricos.

São normalmente utilizados três métodos na digestão da matéria orgânica: digestão com químicos oxidantes, digestão por ultravioleta (UV) e digestão por microondas (Carvalho

et al., 2007; Leal *et al.*, 2009; Eilola, 2009). O método clássico é a digestão com reagentes oxidantes com a adição de químicos oxidantes como o peróxido de hidrogénio, ácido sulfúrico, ácido nítrico ou outros ácidos concentrados. Este método apresenta a desvantagem de oferecer um alto risco de contaminação da amostra, além de exigir um grande volume de reagentes. Como alternativa a este método é utilizada a digestão por irradiação com raios ultravioleta, ou por aquecimento com microondas em vasos fechados a alta pressão (Carvalho *et al.*, 2007 e Leal *et al.*, 2009).

A digestão por UV consiste em expor a amostra num tubo de sílica, a uma lâmpada UV por um período de tempo suficientemente longo para destruir a matéria orgânica. O tempo de exposição varia com a intensidade da lâmpada e com a quantidade e concentração da amostra (Leal *et al.*, 2009).

O método de digestão por microondas é normalmente usado em combinação com a oxidação por compostos químicos. A digestão torna-se assim mais completa e diminui a quantidade de reagentes necessários na digestão por químicos. São utilizados vasos fechados, normalmente de Teflon, onde são adicionados os reagentes oxidantes à amostra. São depois submetidos a aquecimento com microondas até atingir temperaturas de destruição de decomposição da matéria orgânica (Leal *et al.*, 2009 e Eilola, 2009).

5. Objectivos do trabalho experimental

Neste trabalho são propostas metodologias que se baseiam na realização de voltametria de redissolução anódica usando um eléctrodo de carbono vítreo revestido com filme de bismuto, aplicadas à especiação de dois metais, essenciais à saúde Humana em quantidades vestigiais, Cu e Zn, em amostras de urina. São descritas todas as etapas de optimização do método e análise das amostras, antes e após digestão em microondas com a associação de reagentes oxidantes.

II. Parte Experimental

1. Reagentes e Soluções

Os reagentes utilizados na execução experimental deste trabalho, foram todos de qualidade p.a. ou semelhante e a água usada na preparação das soluções e diluições das amostras foi purificada em sistema Mili Q (resistividade $\geq 18\text{M}\Omega\text{cm}$).

Nos estudos realizados foram utilizadas soluções de tampão fosfato 0,25 M (pH 7,4) e tampão acetato 0,10 M (pH 4,5), que serviram para preparar as soluções de Bi, Cu e Zn utilizadas.

A solução de Bi foi preparada por diluição de uma solução 1000 mg/L (Fluka) em tampão acetato 0,10 M (pH 4,5).

As soluções de Cu e Zn foram preparadas por diluição de soluções 1000 mg/L (Fluka) em tampão fosfato 0,25 M (pH 7,4).

O tampão fosfato 0,25 M (pH 7,4) foi preparado adicionando 400,00 mL de solução de Na_2HPO_4 0,25 M e 100,00 mL de uma solução de NaH_2PO_4 0,25 M, ambas preparadas no laboratório a partir dos reagentes puros.

O tampão acetato 0,10 M (pH 4,5) foi preparado através da adição de 9,00 mL de ácido acético 99,8% (Sigma Aldrich) a 9,203g de acetato de sódio e quantidade de água ultra-pura de modo a perfazer 1,00 L.

As amostras de urina utilizadas na análise foram recolhidas de pessoas saudáveis.

Todo o material usado foi previamente descontaminado por imersão num banho de ácido nítrico 2 M (Panreac) e lavado abundantemente com água desionizada.

2. Instrumentação

As determinações voltamétricas foram realizadas num potencióstato Ecochime/ Autolab modelo μ Autolab Type III, ao qual foi acoplado um Stand da Metrohm 663 VA (Figura 1). O potencióstato foi controlado por um computador Acer® com um software GPES 4,9.



Figura 1 - Potencióstato Ecochime/ Autolab modelo μ Autolab Type III (in: Metrohm, 2011)

Empregou-se uma célula convencional de três eléctrodos (ver Figura 2). O eléctrodo de trabalho, onde foi depositado o filme de Bi, era constituído por carbono vítreo com diâmetro de 2 mm. Como eléctrodo de referência foi utilizado um eléctrodo de AgCl/Ag (KCl, 3,0 M). O eléctrodo auxiliar, tal como o eléctrodo de trabalho, foi de carbono vítreo. Durante as etapas de deposição as soluções foram agitadas com o eléctrodo rotativo de politetrafluoretileno (PTFE) a 2500 rpm.

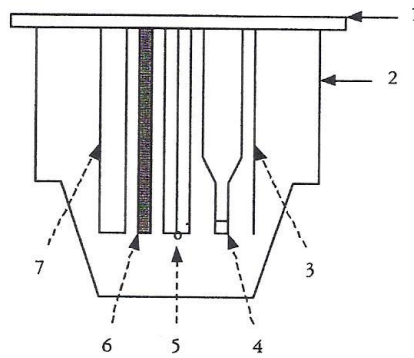


Figura 2 - Célula electroquímica utilizada: 1) tampa; 2) recipiente de medição; 3) tubo para o gás inerte; 4) eléctrodo de referência; 5) eléctrodo de trabalho; 6) eléctrodo auxiliar; 7) agitador

O aparelho de irradiação com microondas utilizado foi um High Performance microwave digestion unit MIs 1200 Mega da Milestone® (Figura 3).



Figura 3 - MIs 1200 Mega da Milestone® (in: Milestone, 2010)

3. Determinações voltamétricas

No início de cada dia o eléctrodo de trabalho foi limpo manualmente através da fricção da sua superfície com pó de alumina (Buehler 40-6603-030-016), sendo os resíduos removidos através da passagem abundante de água desionizada.

Seguidamente efectuou-se uma limpeza electroquímica com tampão acetato 0,10 M (pH 4,5) aplicando um potencial de 1,8 V durante 10 minutos.

As determinações voltamétricas foram efectuadas com 40,00 mL da solução a analisar, com uma purga de 180 segundos (s) com azoto livre de oxigénio a uma pressão de 1 baar. A etapa de deposição ocorreu a um determinado potencial sob agitação, seguida de um período de repouso de 10 s. Na última etapa, verificou-se o varrimento de potencial.

A formação do filme de Bi foi realizada com Bi em tampão acetato 0,10 M (pH 4,5), aplicando um potencial de deposição (E_d) de -1,4 V durante 90 s (parâmetros previamente optimizados) (Leal *et.al.*, 2009).

Os parâmetros de deposição do Cu e Zn foram optimizados em tampão fosfato 0,25 M (pH 7,4).

Os parâmetros de varrimento utilizados (previamente optimizados) (Leal et al., 2009), foram: voltametria de onda quadrada, frequência de 10 Hz, amplitude 0,0501 V e degrau de variação de potencial de 0,0051 V.

Para a remoção do filme de Bi fez-se um varrimento anódico entre -1,1 e 1,8 V em tampão acetato 0,10 M (pH 4,5).

4. Digestão da amostra

A análise das amostras de urina foi efectuada antes e após destruição da matéria orgânica. Para digerir as amostras utilizou-se um processo combinado, microondas e oxidação por compostos químicos (Eilola, 2009).

A 4 mL de amostra foram adicionados 4 mL de ácido nítrico concentrado (Panreac) e 2 ml de peróxido de hidrogénio (Panreac) (Eilola, 2009).

O aparelho de irradiação com microondas foi programado para uma potência de 600 W durante 16 minutos, atingido a temperatura máxima de 140°C. A uma das amostras foi

adicionada uma sonda para possibilitar o controlo da temperatura máxima atingida durante a digestão. As amostras foram refrigeradas até posterior análise (Eilola, 2009).

Depois do processo de digestão, e antes da diluição, foi necessário proceder à neutralização da urina com NaOH concentrado (Panreac). Esta mistura foi ainda diluída 10 vezes com água ultra-pura.

III. Discussão dos Resultados

1. Optimização das condições de deposição de Cu e Zn

Para a primeira fase de optimização das condições de deposição dos metais utilizou-se uma solução de Bi 1 mg/L em tampão acetato 0,10 M (pH 4,5), e uma solução padrão de Zn 100 µg/L preparada em tampão fosfato 0,25 M (pH 7,4). Estes parâmetros foram optimizados só para o Zn, visto este ser o metal que se apresenta a um potencial mais negativo após o varrimento de potencial.

i. Optimização do potencial de deposição (E_d)

O primeiro parâmetro avaliado foi o E_d . Variou-se o potencial entre -1,3 e -1,7 V, verificando-se que a intensidade de corrente (i) obtida para o Zn aumentava até -1,6 V diminuindo para -1,7 V (Figura 4).

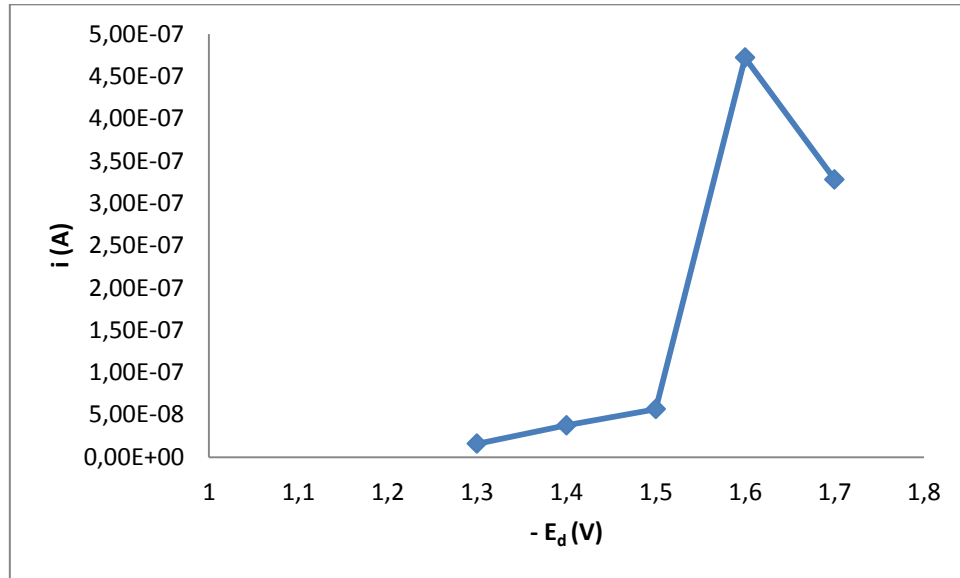


Figura 4 – Influência do E_d na i produzida por uma solução de Zn 100 $\mu\text{g/L}$

ii. Otimização do tempo de deposição (t_d)

O segundo parâmetro avaliado foi o tempo de deposição. Avaliaram-se três tempos de deposição diferentes: 60, 90 e 180 s, obtendo-se um valor máximo de intensidade de corrente produzida pelo Zn aos 90s de deposição (Figura 5).

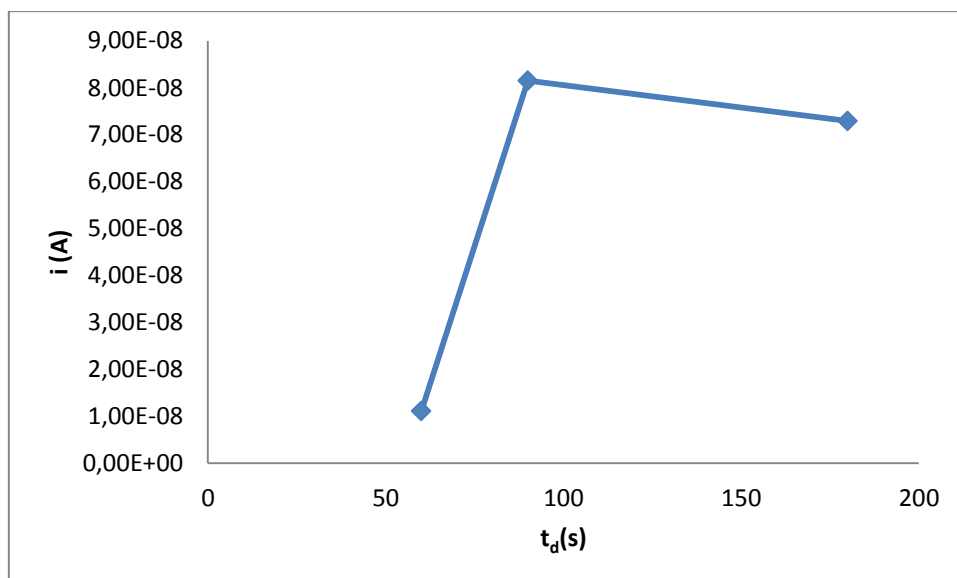


Figura 5 – Influência do t_d na i produzida por uma solução de Zn 100 $\mu\text{g/L}$

iii. Otimização da concentração de Bi

Por fim optimizou-se a concentração de Bi a utilizar para as determinações de Cu e Zn. Variou-se a concentração de Cu e Zn entre 100 e 500 $\mu\text{g/L}$ para concentrações de Bi 0,5 e 1 mg/L.

Os resultados obtidos demonstraram que para uma concentração de Bi 0,5 mg/L a intensidade de corrente obtida para o Zn era superior, à obtida para Bi 1 mg/L. No entanto, para o Cu obteve-se uma intensidade de corrente superior para Bi 1 mg/L (Figura 6 e 7).

Como a intensidade de corrente obtida para as soluções de Zn é muito inferior (cerca de 10 vezes) à obtida para as soluções de Cu de igual concentração, e a determinação de Cu e Zn nas amostras será efectuada em simultâneo, a concentração de Bi a usar nas determinações de Cu e Zn será de 0,5 mg/L.

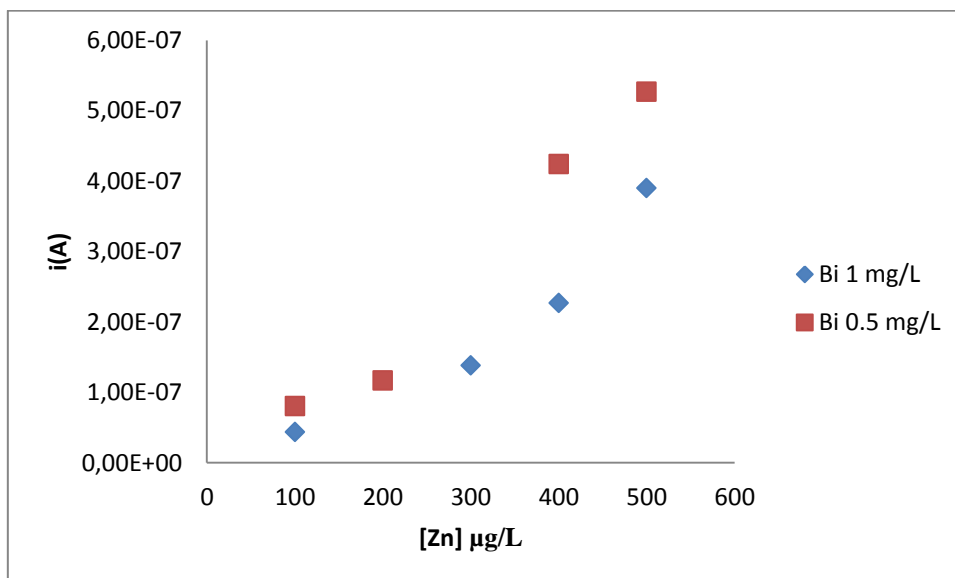
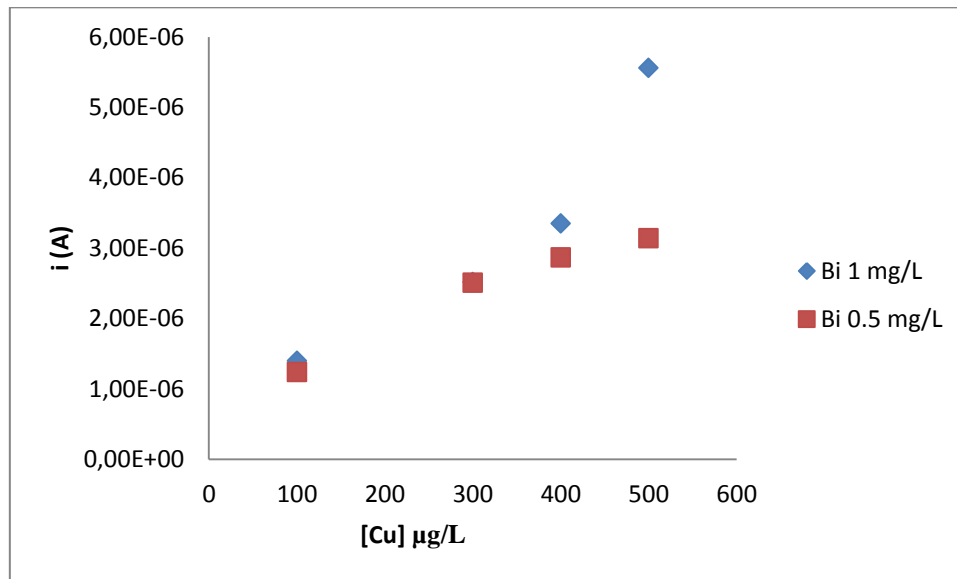


Figura 6 – i para Zn utilizando Bi 0,5 e 1 mg/L

Figura 7 – i para Cu utilizando Bi 0,5 e 1 mg/L

iv. Deposição do Bi, Cu e Zn *in situ* vs *ex situ*

Durante os estudos de otimização foram também testados dois métodos diferentes: deposição do Bi, Cu e Zn *in situ* e *ex situ*.

Para os estudos *in situ* utilizou-se uma solução de tampão fosfato 0,25 M (pH 7,4) contendo Cu e Zn 100 µg/L e Bi 0,5 mg/L. A deposição tanto dos metais como do Bi foi feita simultaneamente, utilizando as condições de deposição já otimizadas.

Foram realizadas várias determinações voltamétricas e nos voltamogramas obtidos o Zn não era detectado e o pico de intensidade do Cu (a ~ -0,10 V) era mascarado pelo do Bi (a ~ -0,25 V) (Figura 8).

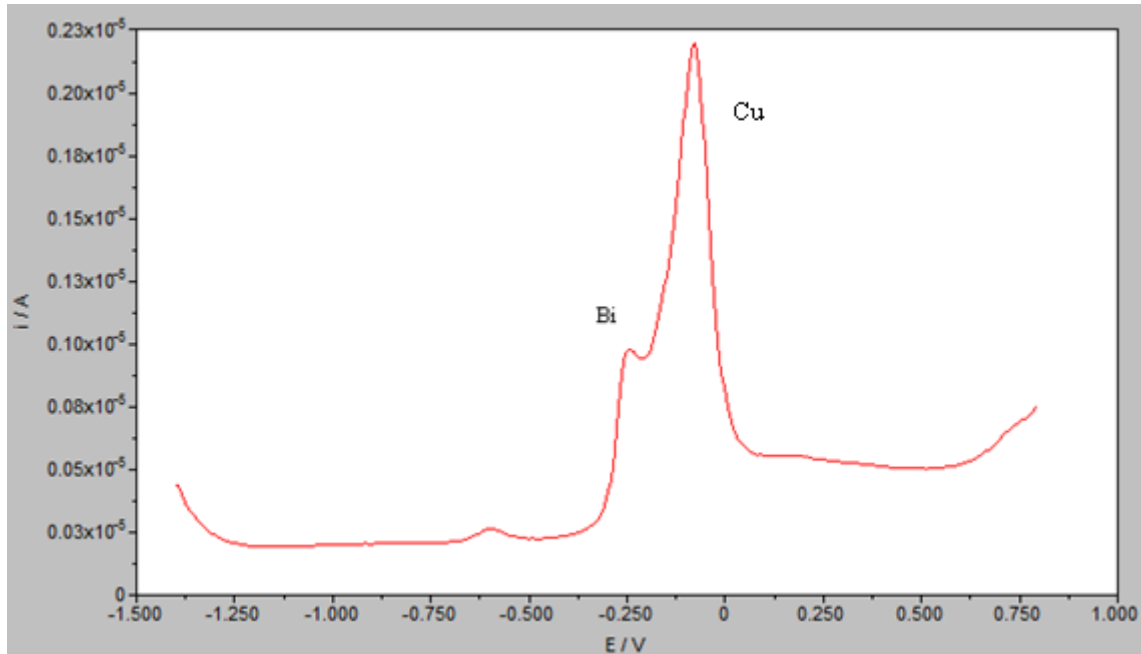


Figura 8 – Voltamograma obtido pelo método *in situ* para Cu e Zn 100 µg/L e Bi 0,5 mg/L

Para os estudos *ex situ* fez-se a deposição prévia de Bi numa solução de tampão acetato 0,10 M (pH 4,5) e Bi 0,5 mg/L e a posterior deposição do Cu e Zn numa solução tampão de fosfato 0,25 M (pH 7,4) contendo Cu e Zn 100 µg/L, utilizando as condições de deposição já optimizadas.

Nos voltagramas obtidos, dos quais o voltagrama abaixo (Figura 9) é um exemplo, podemos verificar a existência de dois picos de corrente correspondendo ao Zn (a ~ -0,96 V) e ao Cu (a ~ -0,10 V), não sendo o Bi detectado.

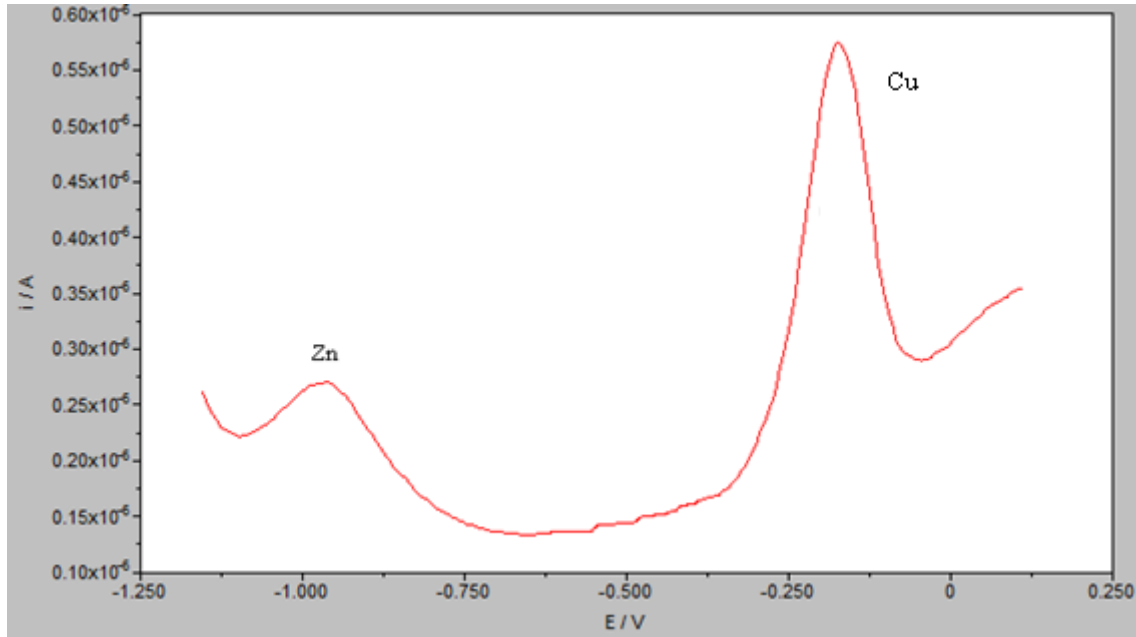


Figura 9 - Voltamograma obtido pelo método *ex situ* para Cu e Zn 100 µg/L e Bi 0,5 mg/L

O método *in situ* foi então abandonado e o método utilizado para o estudo das amostras de urina foi o método *ex situ*.

2. Curvas de calibração para Cu e Zn em tampão fosfato

Após otimização das condições de deposição foram realizadas calibrações para o Cu e Zn, utilizando as condições otimizadas, E_d -1,6 V, t_d 90 s, e Bi 0,5 mg/L. As soluções-padrão de Cu e Zn foram preparadas em tampão fosfato 0,25 M (pH 7,4) entre 50 e 200 µg/L.

Para o Cu, apresenta-se como exemplo a recta de calibração representada pela equação $i = 6,53 \times 10^{-10}c - 1,52 \times 10^{-8}$, em que i corresponde à intensidade de corrente e c à concentração de Cu. O coeficiente de correlação obtido foi de 0,9937 (Figura 10).

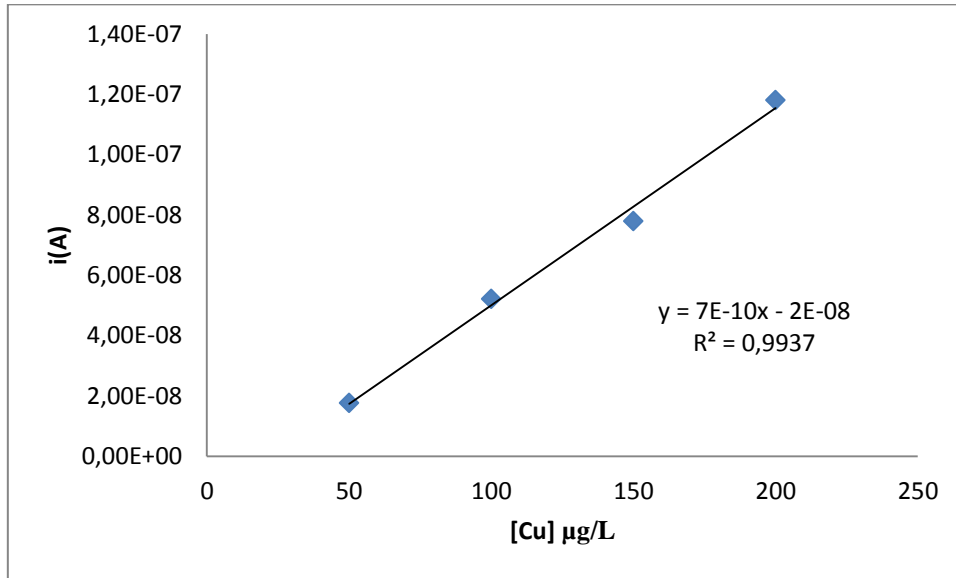


Figura 10 – Curva de calibração de Cu em tampão fosfato 0,25 M (pH = 7,4)

Para o Zn, foram também realizadas calibrações entre 50 e 200 µg/L, apresentando-se como exemplo a curva de equação $i = 1,55 \times 10^{-10}c - 6,34 \times 10^{-9}$ com um índice de correlação de 0,9915 (Figura 11).

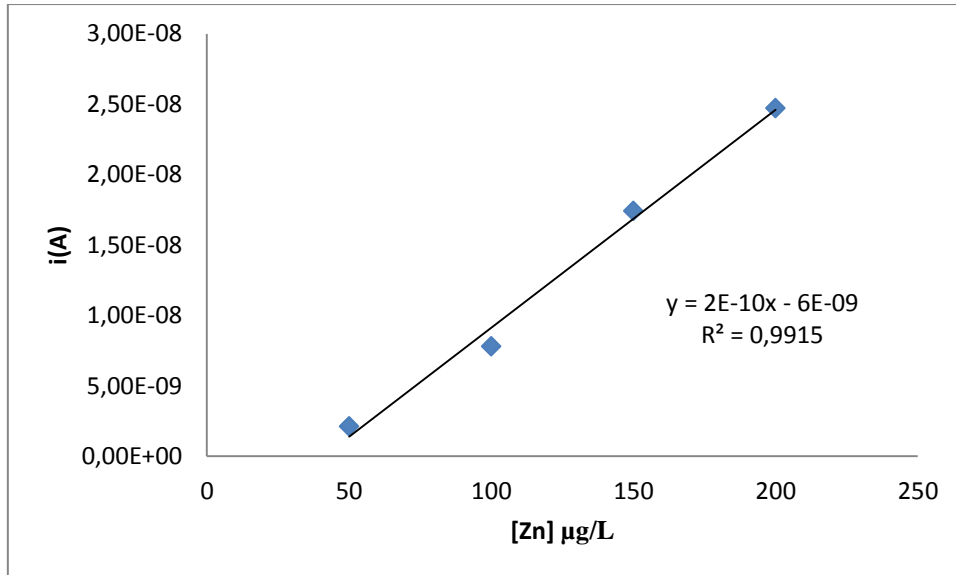


Figura 11 – Curva de calibração de Zn em tampão fosfato 0,25 M (pH = 7,4)

3. Aplicação em fluidos biológicos (urina)

Após otimização do método procedeu-se à sua aplicação a amostras de fluidos biológicos, concretamente urina.

As amostras de urina foram diluídas 2 e 10 vezes em tampão fosfato 0,25 M (pH 7,4) consoante a análise para metal livre e total, respectivamente.

Para a determinação da concentração de Cu e Zn, as amostras diluídas foram analisadas após deposição de Bi 0,5 mg/L em tampão acetato 0,10 M (pH 4,5). As curvas de calibração foram construídas por adições sucessivas de padrão de Cu e Zn às amostras.

Para a determinação de metal livre foi obtida linearidade para concentrações entre 100 e 500 µg/L, tanto para o Cu como para o Zn.

Para a determinação de metal total foi obtida linearidade para concentrações entre 50 e 200 µg/L para o Cu, e entre 50 e 150 µg/L para o Zn.

As amostras de urina foram analisadas em triplicado, tanto para a determinação de metal livre, como para a determinação de metal total.

Um exemplo de curva de calibração obtida é representado pela equação $i = 2,44 \times 10^{-10}c - 1,09 \times 10^{-8}$, em que i corresponde à intensidade da corrente e c à concentração total de Zn, com um coeficiente de correlação de 0,9751 (Figura 12).

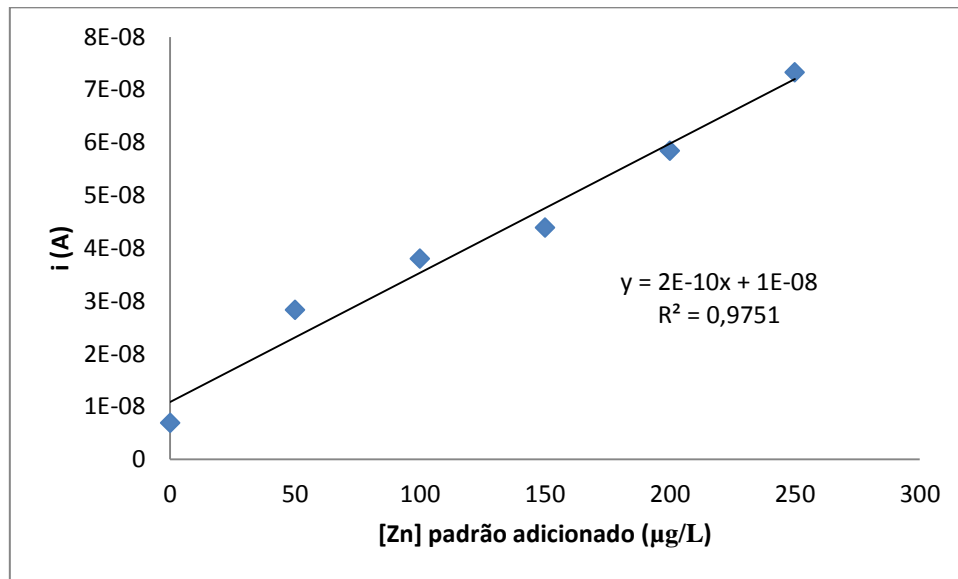


Figura 12 – Adição padrão de Zn à amostra de urina para determinação de Zn total

O valor de c encontrado para $i = 0$ corresponde à concentração final de 447 µg/L de Zn total na amostra (Tabela 1).

Tabela 1 – Concentrações de Cu e Zn nas amostras de urina

	[Cu livre] (µg/L)	[Cu total] (µg/L)	[Zn livre] (µg/L)	[Zn total] (µg/L)
Amostra 1	55,1	----	171	----
Amostra 2	56,0	----	156	----
Amostra 3	51,2	----	276	----
Amostra 4	52,7	133	243	559
Amostra 5	54,2	143	179	447
Média ± Desvio Padrão	53,8 ± 1,7	----	205 ± 46	----

Não existem na literatura valores de referência para as concentrações de metal livre. Sendo assim, este trabalho é inovador em relação a esse aspecto.

Para o Cu, as concentrações de metal total obtida nas amostras 4 e 5 (133 e 143 $\mu\text{g/L}$) são elevadas quando comparados com os valores existentes na literatura (12-80 $\mu\text{g/L}$). No entanto, a concentração média de Cu livre, ou seja, o mais biodisponível, obtida para as 5 amostras ($53,8 \pm 1,7$) fica abaixo destes valores.

Para o Zn, a concentração de metal total obtida nas amostras 4 e 5 (559 e 447 $\mu\text{g/L}$) encontra-se dentro do intervalo de valores referenciados como normais na literatura (300-600 $\mu\text{g/L}$).

Comparando as concentrações de metal livre e total, para as amostras 4 e 5, verificamos que se obteve valores superiores quando se analisou a amostra digerida. Para ambos os metais, procedeu-se posteriormente ao cálculo da percentagem de metal livre em relação ao total (Tabela 2).

Tabela 2 – Percentagem de metal livre em relação ao total

	% Cu livre	% Zn livre
Amostra 4	39,6	43,5
Amostra 5	37,9	40,0

Para o Cu, e para as amostras 4 e 5, a percentagem de metal livre em relação ao metal total foi de 39,6 e 37,9 %, respectivamente (Tabela 2). Para o Zn, e também para as amostra 4 e 5, a percentagem de metal livre em relação ao total foi de 43,5 e 40,0 %, respectivamente. Verifica-se então que a percentagem de metal livre em relação ao metal total é muito idêntica para ambos os metais (~ 40 %).

Estes resultados revelam a importância da especiação de metais em fluidos biológicos, concretamente na urina, pois a informação isolada do metal total pode levar a conclusão precipitada de certa patologia. Neste caso em concreto, do Cu e Zn total excretado na urina só ~ 40 % se encontra livre, ou seja, biodisponível, e 60 % complexados com diversos ligandos, sendo menos biodisponível.

O presente método para determinação de Cu e Zn total está a ser aplicado a amostras de urina de referência, e será também de futuro aplicado a outros fluidos biológicos, concretamente soro.

IV. Conclusão

Neste trabalho, o eléctrodo de carbono vítreo revestido com filme de bismuto foi preparado e utilizado para a determinação de Cu e Zn em amostras de urina. Os metais foram detectados utilizando voltametria de redissolução anódica.

A análise segundo estas metodologias resulta num processo mais económico que os métodos espectrofotométricos e menos tóxico pois evita a utilização do Hg. A optimização do método permitiu detectar concentrações dos metais, Cu e Zn, nas amostras de urina utilizadas dentro de valores fisiológicos.

No que se refere às condições de electrodeposição dos metais, foi possível concluir que as condições que permitem obter uma melhor intensidade de corrente são um E_d -1,6 V com um t_d de 90s. As condições de deposição do filme de Bi encontravam-se já optimizadas em estudos anteriores. Comparando os resultados obtidos utilizando Bi 0,5 e 1 mg/L foi possível concluir que para o método e condições de deposição em questão se obtém melhores utilizando Bi 0,5 mg/L.

Foi possível concluir também que para a determinação da concentração deste metais a deposição *in situ* não é viável. Quando a deposição do Bi é feito ao mesmo tempo que a deposição de Cu e Zn, os picos de corrente do Bi e do Cu encontram-se sobrepostos, impedindo a sua medição. Assim a técnica de deposição *ex situ* do filme de Bi revela-se como a mais vantajosa, para as determinações a pH fisiológico.

Comparando os valores obtidos para o metal total nas amostras de urina com os existentes na literatura, concluímos que os valores obtidos para o Cu (133 e 143 $\mu\text{g/L}$) se encontram ligeiramente aumentados, enquanto os de Zn (447 e 559 $\mu\text{g/L}$) correspondem ao intervalo considerado normal (300-600 $\mu\text{g/L}$). No entanto, a concentração média de Cu livre obtida para as 5 amostras ($53,8 \pm 1,7 \mu\text{g/L}$) encontra-se no intervalo de valores de Cu total existentes na literatura (12-80 $\mu\text{g/L}$).

Como os estudos de especiação em fluidos biológicos não se encontram muito desenvolvidos, não existem valores de referência para as concentrações de metal livre em urina.

Este facto mostra a importância de se continuarem a realizar estudos de especiação em fluidos biológicos, já que como podemos verificar pelos resultados obtidos só ~40% do metal (Cu e Zn) excretado se encontra no seu estado livre.

O presente método para determinação de Cu e Zn total está a ser aplicado a amostras de urina de referência, e será também de futuro aplicado a outros fluidos biológicos, concretamente soro.

V. Bibliografia

- Alberich, A. et al. (2009). Bismuth film electrodes for the study of metal thiolate complexation: An alternative to mercury electrodes, *Talanta*, 78, pp. 1017–1022.
- Baś, B. et al. (2010). New multipurpose electrochemical analyser for scientific and routine tasks. *Instrumentation Science & Technology*, 38, pp. 421–435.
- Bott A., (1992). Stripping Voltammetry, *Current Separations*, 12(3), pp.141-147.
- Carvalho, L. et al. (2008). Determinação Voltamétrica de metais em águas e fluidos biológicos empregando mineralização de amostras com radiação ultravioleta. *Química Nova*, 31 (6), pp. 1336-1342.
- Caussy, D. (2003). Lessons from case studies of metals:investigating exposure, bioavailability, and risk, *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 56, pp. 45–51.
- Cuajungco, M. e Faget, K. (2003). Zinc takes the center stage: its paradoxical role in Alzheimer’s disease, *Brain Research Reviews*, 41, pp. 44–56.
- Das, A. et al. (1996). Metal speciaton in biological fluids - a review, *Nikrochim Acta*, 122, pp. 209-246.
- Dutra, L., Carasek, A., e Cantos, E. (2006). Determinação de zinco em amostra de urina de 24 horas de pacientes com danos renais pelo método de Faas. *RBAC*, 38 (4), pp. 217-220.
- Economou, A. (2005). Bismuth-film electrodes: recent developments and potentialities for electroanalysis, *Trends in Analytical Chemistry*, 24 (4),pp. 334-340.

- Eilola, K. e Perämäki, P. (2009). Microwave-assisted double insert vapour-phase digestion of organic samples, *Analytica Chimica Acta*, 634, pp. 205–208.
- Gonzalvez, A., Cervera, M. e Guardia, M. (2009). A review of non-chromatographic methods for speciation analysis. *Analytica Chimica Acta*, 636, pp. 129–157.
- IUPAC. (2000). Guidelines for terms related to chemicals speciation and fractionation of elements. Definitions, structural aspects and methodological approaches, *Pure Appl. Chem.*, 72 (8), pp. 1453–1470.
- Jacobs, D., DeMott, R. e Oxley K. (2001). Copper. In: *Laboratory Test Handbook*. 5th ed. Hudson, OH: Lexi-Comp. pp.816-818.
- Jia, J., et al. (2008). Properties of Poly (sodium 4-styrenesulfonate)-Ionic Liquid Composite Film and Its Application in the Determination of Trace Metals Combined with Bismuth Film Electrode, *Electroanalysis*, 20 (5), pp. 542-549.
- Kefala, G. (2003). A study of bismuth-film electrodes for the detection of trace metals by anodic stripping voltammetry and their application to the determination of Pb and Zn in tapwater and human hair, *Talanta*, 61, pp. 603-610.
- Kounaves, S. (1997). Voltammetric Techniques, In: Settle, F. *Handbook of Instrumental Techniques for Analytical Chemistry*. Prentice-Hall, pp.709-725.
- Leal, F. et al. (2009). Importância da especiação de metais na avaliação do seu impacto na saúde humana - desenvolvimento de técnicas voltamétricas com eléctrodos de filme de bismuto, *Revista da Faculdade de Ciências da Saúde*, 6, pp. 220-230.

- Lin, C., Wang, L. e Shen, K. (2009). Determining Urinary Trace Elements (Cu, Zn, Pb, As, and Se) in Patients With Bladder Cancer, *Journal of Clinical Laboratory Analysis*, 23, pp. 192–195.
- Moreira, F., Moreira, J. (2004). A importância da análise do chumbo em plasma para avaliação dos riscos à saúde, *Química Nova*, 27 (2), pp. 251-260.
- Muller, F., Gulín, S. e Kalvøy, A. (2001). Chemical speciation of copper and zinc in surface waters of the western Black Sea. *Marine Chemistry*, 76, pp. 233–251.
- Nischwitz, V., Berthele, A. e Michalke, B. (2008). Speciation analysis of selected metals and determination of their total contents in paired serum and cerebrospinal fluid samples: An approach to investigate the permeability of the human blood-cerebrospinal fluid-barrier, *Analytica Chimica Acta*, 627, pp. 258–269.
- Oliveira, A. (1996). Determinação de Cu, Zn e Se em soro humano por ICP-MS, *Revista Analytica*, 25, pp. 76-83.
- Steenkamp, V., Arb, M. e Stewart, M. (2000). Metal concentrations in plants and urine from patients treated with traditional remedies, *Forensic Science International*, 114, pp. 89-95.
- Wang, J. et al. (2000). Bismuth-Coated Carbon Electrodes for Anodic Stripping Voltammetry. *Analytical Chemistry*, 72, pp. 3218-3222.
- WHO. (1996). *Trace elements in human nutrition and health*, Bélgica, World Health Organization.
- Yokel, A. et al. (2006). The speciation of metal in mammals influences their toxicokinetics and toxicodynamics and therefore human health risk assessment, *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part B*, 9, pp. 63–85.

