



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA**  
**INSTITUTO DE QUÍMICA**  
**PROGRAMA DE PÓS – GRADUAÇÃO EM QUÍMICA**  
**GRUPO DE PESQUISA EM QUÍMICA ANALÍTICA**



**DETERMINAÇÃO DE ELEMENTOS ESSENCIAIS E CONTAMINANTES EM  
AMOSTRAS BIOLÓGICAS EMPREGANDO ESPECTROMETRIA ATÔMICA**

**Luiz Raimundo Seneterri Silva Rodrigues dos Santos**

Salvador, BA, Brasil

2010

**DETERMINAÇÃO DE ELEMENTOS ESSENCIAIS E CONTAMINANTES EM  
AMOSTRAS BIOLÓGICAS EMPREGANDO ESPECTROMETRIA ATÔMICA**

**Luiz Raimundo Seneterri Silva Rodrigues dos Santos**

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado em Química do Programa de Pós-Graduação, Grupo de Pesquisa em Química Analítica do Instituto de Química, da Universidade Federal da Bahia, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre.

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Maria das Graças Andrade Korn

Co-orientador: Prof. Dr. Aníbal de Freitas Santos Junior.

Salvador, BA, Brasil

2010

*“Excelência é uma habilidade conquistada através de treinamento e prática,*

*Nós somos aquilo que fazemos repetidamente.*

*Excelência, então, não é um ato, e sim, um hábito”*

Aristóteles [384-322] aC.

A Maria das Graças, pela paciência, amizade, confiança e colaboração para o meu aprendizado  
ao longo do mestrado.

A Aníbal, pelos longos momentos de pesquisa e discussão científica e pela relação de confiança e amizade construída desde a graduação.

## AGRADECIMENTOS

A Deus, por tudo.

A minha mãe, Maria Monteiro.

A minha esposa Maria Tatiana pelo amor, cuidado e compreensão.

A toda a minha família.

Aos membros da Comissão Examinadora.

A professora Maria das Graças Korn pela orientação no presente trabalho.

Ao professor Aníbal pela co-orientação neste trabalho e por promover o interesse pela Química Analítica aplicada à Farmácia.

A Orestes Dias da Paixão pela amizade, paciência e apoio no fornecimento de subsídios para parte da pesquisa desenvolvida no Biotério Central da UEFS.

Aos funcionários do Biotério Central da UEFS, em especial a Junior por abdicar dos finais de semana para dar apoio à pesquisa.

À Sadi, Hadla, Gabriel, Mauro, Raildo pela amizade e apoio e em especial a Suzana e Tiago, pela paciência e disponibilidade para ajudar na pesquisa.

A todos os professores do Curso de Ciências Farmacêuticas da UEFS e do Instituto de Química da UFBA, pela contribuição na minha formação.

A todos os funcionários do Instituto de Química da UFBA que estão sempre dispostos a colaborar em especial a Wilson, Cristóvão e Paulo.

Ao pessoal do SONOFIA/UNEB: Wedson, Eduardo, Jorginho, Rodolfo.

Ao Programa de Pós – Graduação em Química da UFBA pela oportunidade.

A todos os meus verdadeiros amigos que torcem pelo meu sucesso.

E a todos que contribuíram de alguma forma para a realização deste trabalho.

**MUITO OBRIGADO!**

## RESUMO

O estudo de elementos essenciais e contaminantes nas amostras biológicas é de grande importância visto que a variação da concentração destes é um parâmetro para detecção de diversas doenças e distúrbios metabólicos provocados pela exposição a substâncias tóxicas e medicamentos. O objetivo deste trabalho foi propor um método analítico visando avaliar o efeito da furosemida (diurético de alça) sobre a composição mineral (Mg, Cu, Fe, Se, Zn, Cd e Pb) em amostras biológicas (fígado, rim, coração, pulmão e soro) de ratos *Wistar* por espectrometria de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado (ICP OES). Para a decomposição das amostras foi utilizado um procedimento por via úmida, com adição de ácido nítrico e peróxido de hidrogênio, empregando forno de microondas com cavidade. As figuras analíticas de mérito (precisão, limites de detecção (LOD) e quantificação (LOQ) e efeito de matriz) foram determinadas para o procedimento proposto. A exatidão foi verificada com material de referência certificado fígado bovino NIST 1577b e por comparação com método de referência da AOAC (*Association of Official Analytical Chemists*). O procedimento proposto foi aplicado para avaliação dos efeitos da furosemida sobre a composição corporal de elementos essenciais e contaminantes de ratos *Wistar*. Os dados para Se, Cd e Pb foram abaixo do LOQ, sendo necessário a utilização de técnicas mais sensíveis como GF AAS e ICP-MS para a quantificação desses elementos em amostras biológicas. Em relação ao comportamento dos minerais nas amostras biológicas estudadas, o Cu, nas amostras biológicas dos ratos machos, este apresenta uma redução no fígado, rim e coração, mantendo-se constante no pulmão. Nas fêmeas há um aumento no fígado e redução no rim, coração e pulmão. Para o Fe, o comportamento é semelhante entre machos e fêmeas, com redução no fígado, rim e soro e aumento no coração e pulmão. O Mg apresenta uma constância no fígado e pulmão, redução no rim, coração e aumento no soro para machos, enquanto para fêmeas, em fígado e rim permanecem constantes e há redução no coração, pulmão e soro. Já o Zn reduz no fígado e rim dos machos e se mantém constante no coração e pulmão, sendo o inverso para as fêmeas. Foi encontrando como resultados uma extração dos elementos Mg, Cu e Zn em todos os tecidos biológicos estudados em uma magnitude de 16,8; 15,1 e 6,4 % para ratos machos e 13,0; 16,5 e 8,1 % para fêmeas, após a administração da furosemida em todos os animais estudados. O Fe apresentou um aumento de 21,8% e 5,1%, em todos os tecidos biológicos estudados, para ratos machos e fêmeas respectivamente, concluindo que a furosemida não traz prejuízos para a saúde com relação à perda de elementos essenciais.

*Palavras-Chave: metais e metalóides; amostras biológicas; espectrometria*

## ABSTRACT

The study of essential elements and contaminants in biological samples is of great importance since the variation of the concentration of these is a parameter for the detection of various diseases and metabolic disorders caused by exposure to toxic substances and medicines. The aim of this study was to propose an analytical method to evaluate the effect of furosemide (loop diuretic) on the mineral composition (Mg, Cu, Fe, Se, Zn, Cd and Pb) in biological samples (liver, kidney, heart, lung and serum) of rats by optical emission spectrometry with inductively coupled plasma (ICP OES). For decomposition of the samples we used a procedure by wet, with the addition of nitric acid and hydrogen peroxide, using a microwave cavity. The analytical figures of merit (precision, limit of detection (LOD) and quantification (LOQ) and matrix effect) were determined for the proposed procedure. The accuracy was checked with certified reference material NIST 1577b bovine liver and by comparison with reference method AOAC (Association of Official Analytical Chemists). The proposed procedure was applied to assess the effects of furosemide on body composition of essential elements and contaminants in rats. The data for Se, Cd and Pb were below the LOQ, necessitating the use of more sensitive techniques such as GF AAS and ICP-MS for quantification of these elements in biological samples. As for the behavior of minerals in biological samples studied, the Cu in biological samples from male rats, this presents a reduction in the liver, kidney and heart, remaining constant in the lung. In females there is an increase in the liver and reduction in kidney, heart and lung. For Fe, the behavior is similar between males and females, with a reduction in the liver, kidney and serum and increased heart and lung. Magnesium has a constancy in the liver and lung, reduction in kidney, heart and an increase in serum for males as for females, liver and kidney remain constant and there is a reduction in heart, lung and serum. Already reduces the Zn in the liver and kidney of males and remained constant in the heart and lungs, and the converse for females. Was found as a result of the extraction elements Mg, Cu and Zn in all biological tissues studied in a magnitude of 16.8, 15.1 and 6.4% for males and 13.0, 16.5 and 8.1 % for females, after administration of furosemide in all animals studied. Fe showed an increase of 21.8% and 5.1% in all biological tissues studied, for males and females respectively, concluding that furosemide does not bring harm to health in relation to loss of essential elements.

*Keywords: metals and metalloids; biological samples; spectrometry.*

## LISTA DE TABELAS

TABELA 1 – Artigos científicos com procedimentos para digestão de amostras biológicas...	30
TABELA 2 – Programa de aquecimento do forno de microondas com cavidade.....	49
TABELA 3 – Condições experimentais utilizadas no experimento de ICP OES com configuração axial.....	51
TABELA 4 – Limites de Detecção e de Quantificação obtidos para decomposição ácida em microondas.....	58
TABELA 5 – Comparação dos teores (n=3) de macro, micro e elementos traço obtidos por decomposição em microondas para o material de referência NIST 1577b.....	59
TABELA 6 – Peso corporal e tecidual dos grupos animais.....	59
TABELA 7 – Teor médio ( $\mu\text{g g}^{-1}$ ) $\pm$ desvio padrão (n=3) de Cu, quantificados por ICP OES em amostras de digeridos de tecidos e soro de ratos Wistar por decomposição em forno de microondas.....	60
TABELA 8 – Teor médio ( $\mu\text{g g}^{-1}$ ) $\pm$ desvio padrão (n=3) de Fe, quantificados por ICP OES em amostras de digeridos de tecidos e soro de ratos Wistar por decomposição em forno de microondas.....	62
TABELA 9 – Teor médio ( $\mu\text{g g}^{-1}$ ) $\pm$ desvio padrão (n=3) de Mg, quantificados por ICP OES em amostras de digeridos de tecidos e soro de ratos Wistar por decomposição em forno de microondas.....	63
TABELA 10 – Teor médio ( $\mu\text{g g}^{-1}$ ) $\pm$ desvio padrão (n=3) de Zn, quantificados por ICP OES em amostras de digeridos de tecidos e soro de ratos Wistar por decomposição em forno de microondas.....	64
TABELA 11 – Concentrações ( $\mu\text{g g}^{-1}$ ) para Cu, Fe, Mg e Zn em amostras biológicas de ratos machos no presente estudo.....	65
TABELA 12 – Percentual de eliminação dos metais nos tecidos e soro dos animais.....	67
TABELA 13 – Comparação das concentrações ( $\mu\text{g g}^{-1}$ ) para Cu, Fe, Mg, Se, Zn, Cd e Pb em fígado e rim de ratos adultos entre trabalhos anteriores e no presente estudo.....	68
TABELA 14 – Comparação das faixas de concentrações ( $\mu\text{g g}^{-1}$ ) para Cu, Fe, Mg, Se, Zn, Cd e Pb em fígado de ratos Wistar fêmeas adultos entre trabalhos anteriores e no presente estudo.....	69

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURA 1 – Estrutura do néfron e mecanismo de ação dos diuréticos .....	40
FIGURA 2 – Fórmula estrutural da furosemida .....	42
FIGURA 3 – Rato Wistar albino .....	44
FIGURA 4 – Sala dos animais e gaiolas metabólicas.....	47
FIGURA 5 – Liofilizador .....	50
FIGURA 6 – Forno de microondas com cavidade, utilizado para digestão das amostras .....	50
FIGURA 7 – Equipamento ICP OES e a tocha na configuração axial.....	51
FIGURA 8 – Curvas de calibração construídas em HNO <sub>3</sub> (65%) e Triton X-100 (0,01%) para os elementos Cu, Fe, Mg, Se, Zn, Cd e Pb .....	57

## LISTA DE REDUÇÕES

<b>AAS</b>	do Inglês <i>Atomic Absorption Spectrometry</i> (Espectrometria de absorção atômica).
<b>Ad libitum</b>	expressão latina que significa "à vontade".
<b>ANVISA</b>	Agência Nacional de Vigilância Sanitária.
<b>AOAC</b>	Do Inglês <i>Association of Official Analytical Chemists</i> .
<b>ATP</b>	Do Inglês <i>Adenosine Tri- Phosphate</i> .
<b>CEUA</b>	Comitê de Ética no Uso de Animais.
<b>ET AAS</b>	do Inglês <i>Electrothermal Atomic Absorption Spectrometry</i> (Espectrometria de absorção atômica com atomização eletrotérmica).
<b>FAAS</b>	do Inglês <i>Flame Atomic Absorption Spectrometry</i> (Espectrometria de Absorção atômica com chama).
<b>GF AAS</b>	do Inglês <i>Grafite Furnace Plasma Atomic Absorption Spectrometry</i> (Espectrometria de Absorção Atômica com Forno de Grafite).
<b>ICP MS</b>	do Inglês <i>Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry</i> (Espectrometria de Massas com Plasma Indutivamente Acoplado).
<b>ICP OES</b>	do Inglês <i>Inductively Coupled Plasma Optical Emission Spectrometry</i> (Espectrometria de Emissão Óptica com Plasma Indutivamente Acoplado).
<b>INMETRO</b>	Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial.
<b>LOD</b>	do inglês <i>Limit of Detection</i> (Limite de Detecção).
<b>LOQ</b>	do inglês <i>Limit of Quantification</i> (Limite de Quantificação).
<b>NIST</b>	do Inglês <i>National Institute of Standards and Technology</i> .

## LISTA DE ANEXOS

FIGURA 1 – Parecer Técnico do Comitê de Ética no uso de animais (CEUA) da Universidade Estadual de Feira de Santana (UEFS).....	74
---	----

## SUMÁRIO

<b>CAPÍTULO 1 - INTRODUÇÃO .....</b>	<b>15</b>
<b>CAPÍTULO 2 – REVISÃO BIBIOGRÁFICA .....</b>	<b>18</b>
<b>2.1 Amostras biológicas e clínicas .....</b>	<b>18</b>
2.2.2 O sangue: composição, características e importância biológica.....	18
2.2.3 Tecidos corporais.....	18
<b>2.2 Bioquímica dos elementos estudados .....</b>	<b>19</b>
2.2.1 Ferro (Fe) .....	19
2.2.2 Zinco (Zn) .....	20
2.2.3 Selênio (Se) .....	21
2.2.4 Cobru (Cu).....	22
2.2.5 Magnésio (Mg).....	23
2.2.6 Cadmio (Cd) .....	24
2.2.7 Chumbo (Pb).....	25
<b>2.3 Procedimentos para preparo de amostras biológicas.....</b>	<b>26</b>
<b>2.4 Análise instrumental para determinação de metais em amostras biológicas.....</b>	<b>28</b>
<b>2.5 Procedimentos para avaliação de elementos essenciais e contaminantes em amostras biológicas .....</b>	<b>29</b>
<b>2.6 Determinação de elementos em amostras biológicas, em ratos .....</b>	<b>34</b>
<b>2.7 Diuréticos de Alça e Furosemida .....</b>	<b>39</b>
<b>2.8 Aspectos farmacológicos e toxicológicos da Furosemida.....</b>	<b>41</b>
<b>2.9 Ratos Wistar (<i>Rattus norvegicus</i>) .....</b>	<b>43</b>
<b>2.10 Aspectos éticos da experimentação animal .....</b>	<b>44</b>
<b>CAPÍTULO 3 – PARTE EXPERIMENTAL.....</b>	<b>46</b>
<b>3.1 Reagentes e soluções .....</b>	<b>46</b>
<b>3.2 Amostras .....</b>	<b>46</b>
<b>3.3 Desenho experimental.....</b>	<b>47</b>
3.3.1 Coleta e preparo de amostras .....	47
3.3.2 Liofilização .....	48
3.3.3 Homogeneização .....	48

3.3.4 Procedimento para a digestão das amostras .....	48
<b>3.4 Instrumentação .....</b>	<b>49</b>
3.4.1 Obtenção das amostras .....	49
3.4.2 Determinação dos analitos .....	50
<b>3.5 Curvas analíticas de calibração .....</b>	<b>51</b>
<b>3.6 Validação dos procedimentos para quantificação dos elementos por ICP OES.....</b>	<b>52</b>
3.6.1 Avaliação do efeito de matriz .....	52
3.6.2 Avaliação da precisão .....	53
3.6.3 Limites de Detecção e de Quantificação .....	53
3.6.4 Avaliação da exatidão .....	54
<b>CAPÍTULO 4 – APRESENTAÇÃO E DISCUSSÃO DOS RESULTADOS .....</b>	<b>55</b>
<b>4.1 Validação dos procedimentos para quantificação dos elementos Cu, Mg, Fe, Se, Zn, Cd e Pb por ICP OES.....</b>	<b>55</b>
4.1.1 Estudo da linearidade das curvas analíticas .....	55
4.1.2 Precisão.....	57
4.1.3 Limites de Detecção (LOD) e Quantificação (LOQ).....	58
4.1.4 Exatidão .....	58
<b>4.2 Parâmetros das amostras analisadas.....</b>	<b>59</b>
<b>4.3 Resultados obtidos para os diferentes tipos de tecidos .....</b>	<b>60</b>
4.3.1 Concentração de Cobre (Cu) em amostras de tecidos e soro .....	60
4.3.2 Concentração de Cobre (Fe) em amostras de tecidos e soro .....	61
4.3.3 Concentração de Cobre (Mg) em amostras de tecidos e soro.....	62
4.3.4 Concentração de Cobre (Zn) em amostras de tecidos e soro .....	64
4.3.5 Concentração de Selênio (Se), Cádmio (Cd) e Chumbo (Pb) em amostras de tecidos e soro .....	65
4.3.6 Comparação das concentrações de Cu, Fe, Mg e Zn em amostras biológicas dos animais do grupo controle.....	65
<b>CAPÍTULO 5 – CONSIDERAÇÕES FINAIS .....</b>	<b>70</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>73</b>

## CAPÍTULO I - INTRODUÇÃO

Durante as últimas décadas, o progresso tecnológico na química analítica tem fornecido técnicas sensíveis para a pesquisa de elementos traço no organismo dos homens e animais. Isto permite um amplo conhecimento quanto à composição desses elementos nos tecidos e fluidos corporais, sobretudo na análise dos níveis de elementos essenciais e contaminantes em tecidos biológicos relacionados com possíveis alterações no metabolismo destes minerais, provocada por doenças e, principalmente, frente ao uso ou abuso de alguma substância, dieta ou administração de medicamento, a exemplo dos agentes diuréticos.

Recentemente, com os estudos sobre biodisponibilidade, permitiu-se saber que o metabolismo dos minerais não pode ser considerado de maneira isolada. Fatores fisiológicos e externos (nutricionais, medicamentos, etc) podem interferir na sua absorção, no transporte e no armazenamento, com subsequente aumento da suscetibilidade à deficiência ou toxicidade (LOBO; TRAMONTE 2004).

Elementos essenciais são aqueles que são requeridos pelo organismo para manutenção de sua função fisiológica normal. Sem eles, o organismo não pode completar seu ciclo de vida normal ou alcançar o crescimento saudável. Numerosas atividades enzimáticas utilizam elementos essenciais como componentes chaves de metaloenzimas para auxiliar os processos de metabolismo e catabolismo no organismo ou são envolvidos em funções biológicas cruciais, tais como transporte, eliminação de radicais livres ou atividade hormonal (PARSONS; BARBOSA JR., 2007).

A importância da quantificação de elementos essenciais e contaminantes em amostras biológicas está associada à evidente necessidade de monitoramento desses elementos no corpo para a prevenção de quaisquer distúrbios no organismo causados pela ingestão excessiva ou baixa dos mesmos, e alteração desses elementos em função do uso de medicamentos e outras substâncias.

Uma melhor quantificação destes elementos em tecidos e fluidos biológicos, assim como o conhecimento dos mecanismos através dos quais exercem suas funções no organismo, só foi possível através do desenvolvimento de técnicas mais sensíveis e precisas que ocorreram a partir da década de setenta (LOBO; TRAMONTE, 2004).

Para a determinação das espécies químicas de interesse se faz necessária a decomposição da matéria orgânica presente nas amostras biológicas, numa etapa de tratamento prévio da amostra, sendo esta etapa essencial para a aplicação das técnicas de espectrometria de absorção atômica com chama (FAAS) e a espectrometria de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado (ICP OES), as quais são as mais empregadas na quantificação de macro e micro nutrientes em amostras biológicas (COELHO, 2001).

Matrizes orgânicas como a fígado, coração, rim e pulmão e outros tecidos devem passar por etapas de decomposição agressivas no intuito de eliminar a fração orgânica. Deve-se salientar que decomposições ineficazes implicam sérios erros pelo fato dos analitos não serem totalmente liberados da matriz.

Dada a complexidade das diversas matrizes existentes, a realização de algumas operações preliminares à quantificação das espécies químicas de interesse, como o pré-tratamento de amostras, é a fase na qual maior número de erros é cometido e mais tempo é consumido, cerca de 60 a 90 % do tempo total do processo analítico. Consomem grandes quantidades de amostras e de reagentes e envolvem várias etapas as quais podem induzir riscos de contaminação. A escolha apropriada de reagentes e do procedimento adequado para a decomposição e dissolução é um aspecto decisivo para o sucesso de uma análise, e para tanto, são utilizados comumente dois tipos de procedimentos para decomposição: via seca e via úmida (KINGSTON; JASSIE, 1986).

Considerando que as concentrações críticas para os efeitos essenciais ou tóxicos dos elementos presentes nestas amostras são relativamente baixas, há necessidade de se dispor de métodos analíticos altamente sensíveis e precisos para a determinação destes elementos em amostras de interesse biológico (urina, sangue e tecidos) (COELHO, 2001).

Segundo Harris (2006), a instrumentação analítica para análise de tecidos e fluidos corporais tem avançado significativamente na última década com destaque para técnicas como espectrometria de massas (MS), espectrometria de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado (ICP OES) e técnicas de espectrometria de absorção atômica com atomização eletrotérmica (ET AAS) e com chama (F AAS). Destas técnicas, o ICP OES vem sendo constantemente aplicada devido a vantagens como alta sensibilidade e precisão, bem como análise multielementar simultânea.

O consumo indiscriminado de diuréticos constitui uma séria ameaça à saúde pública no tocante a alteração dos níveis corporais de elementos essenciais e ao conseqüente aparecimento de enfermidades diversas provocadas pelas perdas desses nutrientes. A furosemida é um diurético que causa a eliminação de muitos elementos do organismo, os principais sendo Na, K, Ca e Mg, causando redução da pressão arterial. Por outro lado, a eliminação de outros elementos essenciais do organismo pode causar distúrbios pela falta dos mesmos, o que requer a avaliação da disponibilidade desses metais em pacientes que fazem uso de furosemida, em longo prazo. Porém, a literatura atual não apresenta muitas informações acerca das alterações fisiológicas quali-quantitativas dos elementos essenciais e contaminantes na composição dos tecidos de animais frente a administração destes medicamentos.

Visando colaborar com o preenchimento de tal lacuna de conhecimento, o presente estudo objetiva aplicar um método analítico para caracterizar a composição elementar de amostras biológicas de ratos *Wistar* relacionado com o uso da furosemida, por espectrometria de emissão óptica por plasma indutivamente acoplado (ICP OES).

No Capítulo I consta uma introdução contendo a delimitação do tema, sua problemática, objetivos e justificativa do trabalho. No Capítulo II, fundamentação teórica acerca do tema, será apresentada uma discussão sobre a composição de amostras biológicas, as técnicas de preparo, e controle dos micronutrientes, bem como suas aplicações na área de saúde. No capítulo III, foram compiladas informações acerca dos materiais e métodos referentes ao tratamento dos animais utilizados na pesquisa, a coleta e preparo das amostras, com ênfase para o forno de microondas, a técnica utilizada para determinação dos elementos e as figuras de mérito utilizadas no processo de validação. Quanto ao Capítulo IV, foram realizadas as discussões acerca dos resultados encontrados no estudo, fazendo um comparativo com dados da literatura acerca da determinação de metais em amostras biológicas, bem como a aplicação da técnica no monitoramento bioquímico de pacientes e, finalmente, no Capítulo V, as considerações finais acerca dos achados do estudo em questão e seus benefícios sociais.

## **CAPÍTULO II - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

### **2.1 Amostras biológicas e clínicas**

#### **2.1.1 O sangue: composição, características e importância biológica**

O sangue é uma suspensão de células em uma matriz aquosa com proteínas e sais, com funções de transporte de nutrientes absorvidos, de metabólitos, de produtos de excreção, gases, hormônios, células de função não respiratória, de calor, coagulação e manutenção do meio interno (homeostase) com relação ao pH, íons, nutrientes (NOGUEIRA, 1990).

Separando-se as células vermelhas (eritrócitos), células brancas (leucócitos) e plaquetas (trombócitos), a parte líquida do sangue contém uma série de proteínas, muitas das quais, envolvidas no processo de coagulação que é denominada plasma ou soro, sendo o primeiro obtido pela separação do sangue, sem uso de anticoagulante e o segundo, com anticoagulante. Nos seres humanos, o plasma sanguíneo corresponde a 60% do volume de sangue de um adulto normal. A água é o principal componente do plasma sanguíneo, equivalendo a 91% do seu volume. Os 9% restantes correspondem a proteínas (7%) e outros elementos e substâncias (2%) tais como potássio, sódio, cloro, cálcio, magnésio, ferro, glicose, uréia, creatinina, colesterol, hormônios e outros oligoelementos. Estes elementos, em concentrações normais, são importantes para a manutenção das funções do organismo, pois contribuem para o controle do pH e para a regulação do equilíbrio entre os ácidos e as bases do sangue. Por isso, o sangue e o plasma são comumente utilizados para a quantificação de um elemento em relação a saúde e doença, especialmente para elementos tóxicos (SANTOS, 2006).

#### **2.1.2 Tecidos corporais**

Noventa e oito por cento do peso corporal do homem é constituído de água e nove elementos não metálicos e os elementos traço participam de apenas 0,012%. Os traços são os que apresentam concentrações da ordem de 0,01 – 100  $\mu\text{g g}^{-1}$ . A maioria desses elementos traço é indispensável e essencial para a manutenção da vida. Alguns, simplesmente, são inócuos ou inertes em concentrações de exposição normal, enquanto

outros exibem alta toxicidade mesmo em baixas concentrações. Em um organismo sadio, os elementos constituintes encontram-se dentro dos limites de normalidade. A manutenção dessa concentração é de suma importância e esses “limites de normalidade” são estritamente específicos a cada elemento. Funções como o equilíbrio hídrico, osmótico e ácido-básico, entre outros, que são vitais, são dependentes dos níveis dos elementos constituintes (HSIUNG, 1997).

A distribuição de metais e Se em diferentes tecidos está relacionada à produção de metalotioneínas e a acumulação dessas substâncias é influenciada pela idade, sexo e metabolismo do animal. O fígado, normalmente, é o órgão escolhido para estudos de contaminação por metais por exercer um papel importante no metabolismo (FAIRWEATHER-TAIT; HURREL, 1996).

## **2.2 Bioquímica dos elementos estudados**

Pequenas quantidades de elementos inorgânicos são requeridas para o próprio funcionamento do corpo humano. Os elementos traço que são conhecidos como essenciais são Fe, Cu, Mn, Co, Mo, Se, Sn, V, Si, Ni e As. Outros elementos não mostram nenhum efeito observável, pois são estimulantes, terapêuticos ou tóxicos. Alguns elementos tóxicos são Hg, Pb, Cd, Tl, Be e Cr(VI). Alguns elementos, em categorias essenciais, somente são tóxicos em níveis somente levemente mais altos, tais como Se, As, Ni, e V. Exposição a combinações desses elementos podem resultar em interações sinérgicas e antagônicas (HSIUNG, 1997).

### **2.2.1. Ferro (Fe)**

O ferro é um componente chave na manutenção da homeostase celular. Muitos processos biológicos são intermediados por enzimas que requerem o ferro como co-fator para seu funcionamento. A maior parte do ferro é transportada ligado à transferrina (uma  $\beta$ 1-globulina, produzida no fígado) para as células ou medula óssea. Grande parte do ferro do organismo está na hemoglobina (70%); uma pequena fração (5%) encontra-se na mioglobina e enzimas (LIMA; PEDROZO, 1996).

No adulto, 95% do Fe requerido para síntese de hemoglobina é derivado das células vermelhas degradadas. O corpo não possui mecanismo para excreção de Fe, e o excesso é estocado como ferritina ou hemosiderina principalmente no fígado e baço (FAIRWEATHER-

TAIT; HURREL, 1996). O excesso de ferro no organismo pode ocorrer nas seguintes situações: absorção anormal de ferro, excesso de ferro na dieta e transfusão sanguínea.

Tanto a deficiência quanto o excesso de ferro podem levar à disfunção do sistema imunológico com alterações em órgãos linfóides, na função de linfócitos, na resposta imune específica e na resistência a agentes infecciosos (LIMA; PEDROZO, 1996). Deficiência de Fe ocorre quando os estoques são diminuídos, e a anemia quando os níveis de hemoglobina no sangue cai abaixo dos níveis normais para o indivíduo. A anemia pode ocasionar efeito adverso no desenvolvimento psicomotor e mental, na performance do corpo e resistência a infecção e mortalidade e morbidade durante gestação (FAIRWEATHER-TAIT; HURREL, 1996).

### **2.2.2. Zinco (Zn)**

O Zinco (Zn) é um oligoelemento essencial, amplamente encontrado na natureza, sendo, após o Fe, o segundo mais abundante no corpo humano. Tem papel fundamental no metabolismo do ácido nucléico e de proteínas e, por conseqüência, nos processos fundamentais de multiplicação celular (VERSIECK; CORNELIS, 1980). A maior parte do Zn que entra no organismo está relacionada à dieta. Mais de 200 metaloenzimas requerem o Zn como cofator (DUARTE; PASQUAL, 2000). É um elemento estrutural ou ativador de muitas enzimas, necessário para a adequada formação e funcionamento do sistema imunológico na primeira fase da vida, nos processos de crescimento, desenvolvimento e funcionamento do sistema nervoso central. Boa parte do zinco contido na dieta é absorvido no duodeno, sendo, então mobilizado no fígado por uma proteína carreadora, a metalotioneína. O zinco, ao contrário dos demais elementos, não é estocado em nenhum órgão. Ele se constitui em “pool” móvel comandado por uma proteína específica, que o mobiliza para um tecido ou órgão de maior demanda (LEHNINGER, 1985).

O zinco presente nos alimentos é absorvido via processo de transporte mediado por carreador, o qual, sob condições fisiológicas normais, parece não ser saturado. Zn é transportado no plasma pela albumina e  $\alpha$ -2-macroglobulina, e está presente em todo organismo, tecidos e fluidos corporais. É primariamente um íon intracelular e apenas aproximadamente 0,1% do Zn do corpo estão no plasma. Osso e músculo esquelético acumulam para mais de 80% do Zn corporal. O conteúdo de Zn do corpo é regulado pelo mecanismo homeostático ao longo de uma ampla faixa de consumo por mudanças na

absorção fracional (20-40%) e excreção urinária (0,5mg/dia) e intestinal (1-3mg/dia) (FAIRWEATHER-TAIT; HURREL, 1996).

Substâncias orgânicas solúveis de baixo peso molecular tais como aminoácidos e ácidos orgânicos agem como ligantes de Zn e facilitam sua absorção. Outros compostos orgânicos formadores de complexos estáveis com Zn em pH intestinal reduzem sua absorção e íons com propriedades físico-químicas similares ao Zn competem por sítios de ligação. As manifestações clínicas de deficiência severa de Zn em homens são retardado no crescimento, uma queda na maturação sexual e do esqueleto, dermatite, alopecia, perda de apetite e mudanças comportamentais (FAIRWEATHER-TAIT; HURREL, 1996).

### **2.2.3. Selênio (Se)**

O selênio é um não metal que está ligado a um aminoácido (glutathiona), componente essencial do grupo prostético de várias enzimas, particularmente a glutathiona peroxidase. Essa enzima é estratégica na eliminação de radicais livres (peróxidos de hidrogênio) originados dos processos metabólicos e doenças que influenciam os mecanismos de defesa (exemplo: a função fagocitária dos neutrófilos polimorfonucleares), atuando juntamente com a vitamina E (LEHNINGER, 1985). Os efeitos biológicos do Se estão intimamente relacionados com os efeitos da vitamina E, pois ambos são caminhos catalíticos do metabolismo do peróxido, ou seja, antioxidantes (VERSIECK; CORNELIS, 1980).

O Se, quando presente em concentrações maiores do que aquelas permitidas pelo seu nível essencial, é considerado um elemento tóxico e o seu potencial de toxicidade é maior que o do Arsênio (MERTZ; CORNATZER, 1971).

Experiências demonstram que a concentração de Se no soro é dependente da idade. Hoje é sabido que este elemento está envolvido, juntamente com o cobre e o zinco, na formação e desenvolvimento dos órgãos de defesa na resposta imunitária e no combate ao estresse (LEHNINGER, 1985).

Os principais fatores que influenciam a biodisponibilidade do Se são Metionina (Met), tióis, metais pesados e vitamina C. Met influencia a absorção de selênio-metionina (Se-Met) devido a um mecanismo de absorção idêntico ao de ambos aminoácidos. Com uma dieta deficiente em Met, Se-Met será usado para repor Met em síntese de proteína, cujo resultará em aumento dos níveis de Se nos tecidos. Dieta com alta concentração de metionina pode

competir com a absorção intestinal de Se-Met e levar a mais baixos estados nutricionais de Se (FAIRWEATHER-TAIT; HURREL, 1996).

A eficiência da absorção de Se é apropriadamente alta (50-95%) e depende da forma da dieta. Se-Met é absorvido por um mecanismo ativo similar ao de seu análogo S-metionina. Comparado com formas inorgânicas, é absorvido muito rapidamente através do intestino delgado. A absorção é aumentada em baixos níveis de consumo de Metionina (FAIRWEATHER-TAIT; HURREL, 1996).

O metabolismo do Se não tem sido ainda elucidado, mas o fígado parece exercer uma função central no metabolismo e homeostase, e o plasma é o meio de transporte para componentes de Se absorvidos e metabolizados. O músculo esquelético é o maior acumulador do Se do corpo para aproximadamente metade do Se corporal total. Excreção do Se absorvido como compostos Se metilados (ex. trimetilselenonio), ocorre principalmente através da urina e a composição desta depende do nível de Se na dieta (FAIRWEATHER-TAIT; HURREL, 1996).

É sabido que este elemento está envolvido, juntamente com o Cu e Zn, na formação e desenvolvimento dos órgãos de defesa na resposta imunitária e no combate ao estresse. Deficiências de Se tem sido identificadas como fator de risco para muitas doenças, incluindo cardiovascular. Está também relacionado à infertilidade, o aborto, a retenção de placenta e ovário policístico, embora os mecanismos patológicos desses processos ainda não sejam conhecidos. Estudos identificaram a relação de doenças degenerativas do músculo com a deficiência de selênio (LEHNINGER, 1985).

#### **2.2.4. Cobre (Cu)**

Após o Zn e o Fe, o Cu é o terceiro oligoelemento mais abundante no corpo humano e está presente em sistemas biológicos com a valência +1 e +2, sendo a sua participação em reações de oxido-redução, a principal função das metaloproteínas que contém este metal (BARCELOUX, 1999).

O Cobre (Cu) é um oligoelemento essencial, cofator de diversos sistemas enzimáticos com importante papel na absorção e metabolismo do ferro (principalmente no mecanismo de síntese da hemoglobina e maturação da hemácia), desenvolvimento do tecido ósseo e conjuntivo e funcionamento dos sistemas: nervoso central, imunológico, enzimático e da musculatura cardíaca (VERSIECK; CORNELIS, 1980). Encontra-se distribuído em todos os

tecidos do organismo, principalmente sob a forma de metaloproteínas, funcionando como enzima (LEHNINGER, 1985).

No plasma, cerca de 90% do Cu circulante está ligado a uma proteína, denominado ceruloplasmina, que parece estar envolvida na mobilização do ferro. Entre os principais sintomas da sua deficiência estão a anemia hipocrômica e neutropenia, resultante de uma prolongada deficiência de cobre que impede a síntese da hemoglobina, principal componente das hemácias (LEHNINGER, 1985). O fato do Cu sérico ser encontrado baixo em alguns casos de anemia por deficiência de Fe, sugere que o estado do ferro tem um efeito no metabolismo do cobre. Interação entre Fe e Cu parece ser devido a utilização diminuída de um na ausência de outro (FAIRWEATHER-TAIT; HURREL, 1996).

Absorção de Cu em humanos varia de 25 a 70%, o maior sítio sendo o intestino delgado. Absorção intestinal (ativa e passiva) é regulada pelo estado nutricional, a forma química do elemento, e interações com componentes da dieta. Parece não haver efeito da idade ou sexo na absorção de Cu. Novamente, Cu absorvido é transportado no plasma ligado também a albumina e incorporado a proteínas no fígado. Muito pouca quantidade é excretada na urina, suor e pele (FAIRWEATHER-TAIT; HURREL, 1996).

#### **2.2.5. Magnésio (Mg)**

O elemento Mg é um cofator para todas reações fosfotransferase, em todas reações ATP-dependentes onde Mg-ATP é o substrato e em todas reações tiamina trifosfato dependente. Como tal, participa no metabolismo intermediário de lipídios, carboidratos e aminoácidos (DAKSHINAMURTI; DAKSHINAMURTI, 2001).

Magnésio é absorvido primariamente no intestino delgado, por um processo facilitado e por difusão passiva. A absorção aumenta, mas a absorção fracional cai com aumento da dose. Há uma ampla faixa na eficiência de absorção, variando de 10% em dietas com muito Mg a 75% em dietas com restrição de Mg. O magnésio absorvido é retido para o crescimento do tecido ou substituição, com o esqueleto agindo como um estoque, e o remanescente é excretado na urina. Quando o consumo diminui, o fígado é muito eficiente em conservar Mg a fim de manter a homeostase (FAIRWEATHER-TAIT; HURREL, 1996).

Deficiência clínica de Mg em humanos é rara. Hipomagnesemia, geralmente acompanhada por hipocalcemia, é também induzido por inanição, síndrome de malabsorção, pancreatite aguda, alcoolismo, e diarreia prolongada ou vômito, e é tratada

com Mg intravenoso. Suplementação de Mg aumenta o controle do diabetes em sujeitos humanos (DAKSHINAMURTI; DAKSHINAMURTI, 2001).

Uma deficiência celular de Mg, por diminuição da função de uma ampla faixa de enzimas, bombas de membrana e bombas de íon, exagerarão o estímulo celular  $\text{Ca}^{2+}$ -induzido em todas células e tecidos. Na vasculatura isto resultará em vasoconstrição. Elevação de  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  com um decréscimo recíproco em  $[\text{Mg}^{2+}]_i$  é consistentemente visto em sujeitos com hipertensão e obesidade. Estas mesmas mudanças são também observadas em células de pessoas idosas saudáveis (DAKSHINAMURTI; DAKSHINAMURTI, 2001).

### **2.2.6. Cadmio (Cd)**

O metal Cd é tóxico para seres humanos e animais. Intoxicações leves por Cd podem causar: salivação, fadiga, perda de peso, fraqueza muscular e disfunção sexual. Níveis moderadamente altos de Cd, entre 4 a 8  $\text{mgCd L}^{-1}$ , podem causar hipertensão, ao passo que níveis muito elevados podem causar hipotensão. Afeta os rins, pulmões, testículos, paredes arteriais, ossos e interfere com muitos sistemas enzimáticos (SALGADO, 1996). Em humanos, ele se concentra, principalmente, no tecido renal e hepático, podendo também ser encontrado em outros tecidos como: músculos, pele e ossos (CARDOSO, 2001).

De acordo com Fairweather-Tait e Hurrell (1996), o Cd é um elemento que não apresenta nenhuma função biológica e se concentra, primariamente, no rim e depois no fígado, adrenais e no sistema nervoso central. O fato de o rim ser o principal órgão para a acumulação do Cd, provavelmente, está ligado às funções de filtração e eliminação deste órgão e também, à forte ligação do Cd com as metalotioneínas presentes nos rins, proteínas importantes na detoxificação de elementos não-essenciais (tais como o Cd e o Hg).

Sinais de toxicidade por Cd em diversos órgãos e sistemas são bem documentados e processos patológicos, como disfunções renais, tumores testiculares, hipertensão e inibição do crescimento, podem estar associados à exposição ambiental ou experimental a este metal (CASTRO E SILVA, FREGONEZE, 2002).

Nos mamíferos, o rim é o órgão mais crítico em níveis de toxicidade para o Cd, pois este é o primeiro órgão a mostrar efeitos toxicológicos. Após a absorção do Cd e sua posterior distribuição no sangue, ele se liga às metalotioneínas no fígado. Ao chegar no fígado, o Cd é redistribuído em forma de complexo, concentrando-se nos rins. A acumulação

de Cd nos rins se dá por causa da baixa velocidade de eliminação deste metal, devido ao complexo Cd-metalotioneínas (CARDOSO, 2001).

Pequena quantidade de Cd é transportado do fígado para o rim. O complexo Cd-metalotioneína é filtrado pelos glomérulos renais e reabsorvido do filtrado glomerular no túbulo proximal e é biotransformado em peptídeos e aminoácidos menores. A excreção do Cd é muito lenta e, conseqüentemente, sua meia-vida é muito longa – 17 a 38 anos, sendo que nos rins estima-se uma meia-vida entre 6 e 38 anos e no fígado entre 4 a 19 anos, levando indivíduos cronicamente expostos a risco de danos aos túbulos renais (CARDOSO, 2001).

Esse elemento é rapidamente eliminado do plasma e associa-se ao eritrócito, desconsiderando-se a via de administração. O Cd é transportado no plasma por albumina, globinas, transferrina e também, em pequena extensão, pela metalotioneína. O aumento nos níveis de metalotioneína pode diminuir a quantidade de Cd livre e, assim, atenuar os efeitos tóxicos (LASKEY; REHNBERG, 1984).

Entre os efeitos da exposição ao Cd relatados em animais de laboratório, incluem-se necrose, atrofia e alterações vasculares nos testículos, redução de fertilidade, necrose placentária, danos hepáticos funcionais e estruturais, osteomalácia, malformações, anemias, hipertensão, danos aos túbulos renais, doenças pulmonares e danos ao sistema nervoso central. A intoxicação aguda por cádmio produz primariamente lesão testicular, entretanto exposições crônicas resultam em lesão renal (LASKEY; REHNBERG, 1984).

### **2.2.7. Chumbo (Pb)**

O elemento Pb pode ser absorvido através de ingestão, inalação ou através da pele e, uma vez absorvido, pode se concentrar em diversos órgãos. Sua vida média em tecidos moles corresponde a cerca de 4 a 6 semanas, podendo atingir décadas quando depositado no tecido ósseo. A toxicidade por chumbo afeta, especialmente, os sistemas renal, endócrino e nervoso (CASTRO E SILVA; FREGONEZE, 2002).

A penetração do Pb no sistema nervoso central pode dar-se através de lesões da barreira hematoencefálica ou via transporte axonal retrógrado. De fato, o acúmulo de chumbo em células endoteliais destrói a barreira, criando uma porta de acesso do metal ao encéfalo. A intoxicação crônica por chumbo em humanos pode levar a disfunções do sistema nervoso central, caracterizadas como hiperatividade idiopática, assim como dificuldades

auditivas, diminuição da atenção e problemas relacionados à linguagem e ao aprendizado. Do ponto de vista neuroquímico, a presença de chumbo no cérebro perturba a função de vários neurotransmissores, como a serotonina, a dopamina, o GABA (ácido  $\gamma$ -amino butírico), a noradrenalina e a acetilcolina (CASTRO E SILVA; FREGONEZE, 2002).

O Pb interfere em várias fases da biossíntese do grupo heme da hemoglobina, deslocando o Fe e causando a má formação da hemoglobina, gerando um tipo de anemia denominada microcítica hipocrômica (GOODMAN; GILMAN, 1985).

Entre os tecidos moles, fígado e rim são os que possuem maiores concentrações de Pb, seguido pela pele e, por último, cérebro e músculo. O tempo de meia-vida para o Pb, varia de 5 a 20 anos nos tecidos duros, e de apenas algumas semanas ou meses nos tecidos moles (ROSA, 2009). Cerca de 90% do chumbo corpóreo se armazena nos ossos, principal depósito do metal no corpo. Aproximadamente 5% da concentração do chumbo no sangue se situa no plasma, representando a fração lábil e biologicamente ativa do chumbo, capaz de cruzar as membranas celulares e causar seus efeitos tóxicos. O chumbo absorvido é excretado principalmente pela urina e fezes (MOREIRA; MOREIRA, 2004).

### **2.3 Procedimentos para preparo de amostras biológicas**

A etapa de pré-tratamento da amostra é a fase mais crítica, na qual maior número de erros é cometido e mais tempo é consumido. Em geral, os procedimentos de tratamento convencionais são bastante demorados, já que o tempo consumido equivale de 60 a 90 % do tempo total do processo analítico. Além disso, consomem grandes quantidades de amostras e de reagentes e envolvem várias etapas as quais podem induzir riscos de contaminação. A escolha apropriada de reagentes e do procedimento adequado para a decomposição e dissolução é um aspecto decisivo para o sucesso de uma análise, e para tanto, são utilizados comumente dois tipos de procedimentos para decomposição: via seca e via úmida (KINGSTON; JASSIE, 1986).

O procedimento de decomposição por via seca é considerado simples e ainda muito utilizado por apresentar vantagens, tais como: ausência de contaminações advindas dos reagentes empregados e elevada eficiência de decomposição de matrizes orgânicas. Entretanto, existem sérias limitações com relação à perda de elementos mais voláteis como Se, S, Hb e Pb, maior risco de contaminação promovida pelas correntes de convecção geradas no interior aquecido das muflas e tempo de análise longo, o que configura a

necessidade da busca de alternativas mais viáveis para a etapa de preparo da amostra (HARRIS, 2006).

Os procedimentos de decomposição por via úmida apresentam-se como uma alternativa eficaz de decomposição de amostras biológicas, nos quais são empregados ácidos para a destruição da matéria orgânica sob temperaturas elevadas, exigindo temperaturas inferiores àquelas usadas na via seca, uma vez que a oxidação da fração orgânica das amostras se efetua pela adição de agentes oxidantes diversos em um tubo fechado ou aberto. Este procedimento é muito eficiente, permitindo a combinação de ácidos oxidantes com outros agentes oxidantes similarmente eficazes para degradação completa ou parcial da matéria orgânica presente nas amostras. Quanto à forma de operação, os procedimentos por via úmida são classificados como convencionais e assistidos por radiação microondas (HARRIS, 2006).

O modo convencional (ou convectivo) de aquecimento fundamenta-se no uso de superfícies eletricamente aquecidas, notadamente as chapas aquecedoras e os blocos digestores. Embora apresente custos reduzidos, não possui eficiências aceitáveis para amostras contendo altos teores de gordura, como o fígado, e de moléculas mais complexas, devido ao fato das decomposições ocorrerem em ambientes submetidos à pressão atmosférica e das temperaturas de operação se encontrar limitadas aos pontos de ebulição dos reagentes. Ademais, os frascos reacionais são confeccionados de vidro ou teflon com má condução térmica, o que confere morosidade e elevado consumo de ácidos (KINGSTON; JASSIE, 1986).

A utilização da radiação microondas promove o movimento acelerado e quantizado das moléculas de água em torno de seu eixo, podendo ser utilizadas em fornos focalizados ou de alta pressão, assim como a migração iônica no seio da solução reacional como resultado da aplicação do campo eletromagnético. Ambos os fenômenos induzem a liberação de grandes quantidades de energia calorífica, caracterizando um aquecimento na direção do meio reacional para o meio externo em oposição ao perfil de aquecimento convencional. Os principais resultados englobam excepcional diminuição do tempo de decomposição, economia de reagentes e decomposições completas (COELHO, 2001). As desvantagens são

Fornos comerciais com potência da ordem de 600-800 W têm sido utilizados na maioria dos trabalhos publicados, sendo que a massa da amostra empregada abrange um

intervalo de 20 mg até 1 g e, a quantidade mais freqüentemente usada está entre 200 e 500 mg. O tempo de digestão dura, geralmente, poucos minutos, mas alguns autores recomendam tratamentos de até 30 minutos ou mais. Entretanto, parece que pequenos intervalos de tempos são suficientes para assegurar uma recuperação total dos elementos de interesse (ARRUDA; SANTELLI, 1997).

#### **2.4 Análise instrumental para determinação de metais em amostras biológicas**

A determinação de elementos, inclusive em nível de traços em amostras biológicas como fluídos e tecidos é importante porque gera informações que auxiliam na resolução de problemas relacionados a estudos nutricionais, toxicológicos e bioquímicos (NOMURA; OLIVEIRA, 2006).

As técnicas mais utilizadas, atualmente, para a determinação de metais em amostras biológicas envolvem técnicas espectroscópicas altamente sensíveis, como as espectrometrias de absorção atômica com atomização em chama (F AAS) e GF AAS, ICP OES e ICP-MS. Os métodos espectroscópicos atômicos são empregados na determinação qualitativa e quantitativa de mais de 70 elementos e podem detectar quantidades de partes por bilhão e, em alguns casos, concentrações ainda menores. Além disso, os métodos espectroscópicos são rápidos, convenientes e, geralmente, apresentam alta seletividade (SKOOG et al., 2006).

A técnica ICP OES é amplamente empregada para determinação multielementar em diversos tipos de matrizes. Esta técnica se baseia no fato de que elétrons excitados emitem energia em um determinado comprimento de onda quando retornam ao estado fundamental. A característica fundamental deste processo é a emissão de energia em comprimentos de onda específicos para cada elemento. Embora cada elemento emita energia em múltiplos comprimentos de onda, na técnica ICP OES é mais comum a seleção de um único comprimento de onda (ou alguns) para determinado elemento (SKOOG et al., 2006).

A ICP OES é também uma técnica de análise bem estabelecida, que se firmou definitivamente na última década devido ao desenvolvimento de equipamentos com configuração axial e detectores de estado sólido que aumentaram a flexibilidade e sensibilidade. A incorporação de detectores de estado sólido ou dispositivo de carga acoplado (CCD) permitiram alcançar resolução espectral, faixa de resposta linear e leitura

simultânea de uma larga variedade de espectros eletromagnéticos, requeridos pelo ICP OES. O uso deste tipo de detector se tornou possível após o desenvolvimento de novos materiais semicondutores. A idéia de medidas visualizada axialmente foi proposta em 1970, contudo, a fim de aumentar a sensibilidade, o desempenho do sistema foi degradado devido ao aumento de interferências. Contudo, o senso comum nesta área ainda recomenda ICP OES com configuração axial para aplicações que requerem melhor sensibilidade, mas sem uma matriz complexa (SILVA et al, 2002a).

Em relação às outras técnicas, a ICP OES apresenta como vantagens a possibilidade de determinação multielementar e simultânea, com alta frequência de análise. A seletividade do ICP OES em espectrometria analítica a torna uma técnica aplicável à análise elementar em diferentes matrizes, embora tenha a desvantagem de apresentar limites de detecção insatisfatórios, quando comparados com os obtidos usualmente com ICP-MS, além da possibilidade de ocorrer mais interferências espectrais.

Silva e colaboradores (2002a) fazem uma comparação entre dois espectrômetros de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado (ICP), um com configuração axial e outro com configuração radial. Para o equipamento com vista radial, o tempo de aquecimento foi no mínimo 2 vezes menor do que aquele para a configuração axial. Por outro lado, a sensibilidade alcançada para Ni com o arranjo axial foi aproximadamente 20 vezes melhor do que com a radial. Em ambos modos de visão, e para muitos dos elementos avaliados, os valores de concentração equivalente a radiação de fundo (BEC – *Background Equivalent Concentration*) e os LOD foram similares para todas concentrações de carbono estudadas quando se trabalha com condições de plasma robusta. Determinações quantitativas foram executadas com sucesso usando ambos os sistemas.

## **2.5 Procedimentos de digestão para avaliação de elementos essenciais e contaminantes em amostras biológicas**

Na literatura foram encontrados alguns trabalhos científicos que relatam procedimentos para a determinação da composição elementar de amostras biológicas. A tabela 01 resume alguns trabalhos publicados para determinação de minerais essenciais e contaminantes em amostras de sangue, plasma e soro sanguíneo humanos, chamando a atenção para o procedimento de tratamento das amostras.

Tabela 01 – Artigos científicos com procedimentos para digestão de amostras biológicas.

Análito	Matriz	Condições de digestão	Técnica	Referencia
Cu, Fe, Zn, Cd, Cr, Pb	Biológica	250 mg de amostras com 1,5 mL de H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> e 1,5 mL de HNO <sub>3</sub>	AAS	ARRUDA (1997)
Al, As, Ba, Be	Biológica	200 mg com 5 mL HNO <sub>3</sub> /HCl e 2 mL de HF. 3 min, adição de H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	ICP AES	ARRUDA (1997)
Cr	Sangue ou tecido	Diluição com triton-X 100 <sup>®</sup> / digestão ácida com HNO <sub>3</sub> : HClO <sub>4</sub> : H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	ICP AAS	NIOSH, 1985
Cu	Tecido	Digestão ácida com HNO <sub>3</sub> : HClO <sub>4</sub> : H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (3:1:1)	ICP AAS	NIOSH, 1994
Fe	Fígado	Tecidos foram digeridos com HNO <sub>3</sub> e H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> .	ETA; AAS	TAYLOR, A. ET AL., 2000.
Mo	Tecidos	Amostras digeridas a 450 °C. Resíduo dissolvido em HNO <sub>3</sub> e 20 µL injetado no tubo de grafite.	AAS; ETAAS	TAYLOR, A. ET AL., 2000.
Co	Sangue e tecido	Sangue e tecido (0,3 g) de camundongo foi secada a 110 °C e digerida em banho maria a 80°C com 700 ml de HNO <sub>3</sub> -30% H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ( 1 + 1). Os digeridos foram diluídos em água. LODs foram 0,03 mg L <sup>-1</sup> para sangue e 0,03 ng g <sup>-1</sup> para tecidos.	AAS; ETAAS	TAYLOR, A. ET AL., 2006.
Co, Cu, Fé, Mn, Rb, Sr, Zn	Fígado bovino	Digestão com HNO <sub>3</sub> -HClO <sub>4</sub> / In	AAS	SUBRAMANIAN (1996).
Ca, Cd, Cu, Fé, Mg, Mn, Mo, Pb, Rb, Sr, Zn	Fígado bovino	Digestão com microondas com HNO <sub>3</sub>	AAS	SUBRAMANIAN (1996).
Al, Cd, Co, Cu, Fe, Mg, Mn, Mo, Rb, Sr, Zn	Tecidos	Microondas com HNO <sub>3</sub> / In	AAS	SUBRAMANIAN (1996).
Cd e Pb	Fígado bovino	200mg de amostra é digerida em microondas com 1 mL HNO <sub>3</sub> + 2 mL H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> + 3 mL H <sub>2</sub> O.	ETAAS	NOMURA, 2006
Zn, Cu	Sangue	HNO <sub>3</sub> + HCl; 10-30 µL amostra in vivo	FAAS	ARRUDA, 1997)
Co	Sangue	HNO <sub>3</sub> ; 2 mL de amostra	ETAAS	ARRUDA, 1997
Pb	Sangue	Diluir 1:10 em triton-X 100 <sup>®</sup> em 0,1% de HNO <sub>3</sub> e uma mistura de fostato de amônio diidrogenado e nitrato de magnésio foi usado como modificador de matriz.	GF AAS	HUANG et al. 2004
Cu		Digestão ácida com HNO <sub>3</sub> : HClO <sub>4</sub> : H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (3:1:1)	ICP AAS	NIOSH, 1994
Cd	Sangue e tecido	Volume: 10 mL de sangue; 1 g de tecido	ICP AAS	NIOSH, 1994
Mn	Sangue ou tecido	Volume: 10 mL (sangue) ou 1 g (tecido); Conservante: heparina e resfriamento (digestão com HNO <sub>3</sub> : HClO <sub>4</sub> : H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 3:1:1); Volume solução final: 10 mL sangue e 5 mL tecido; Comprimento de onda: 257,6 nm.	ICP-AES	NIOSH, 1994
Hg, Cu e Zn	Sangue e tecidos	0,3 g digerido em 5 mL de HNO <sub>3</sub> (65%) em microondas por 5 min. Após, por 2 min em 1 mL H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> em microondas. Dilui com 4% (v/v) HNO <sub>3</sub> para 25 mL e estocada a 4 °C.	ICP MS	HUANG et al. 2004
Cd	Urina, soro e sangue	Amostra diluídas com 0,015 % Triton X-100 <sup>®</sup> 0,1 % NH <sub>4</sub> H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> . 10 µL foi pipetado no forno com solução oxidante (15% H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> – 0,65 % HNO <sub>3</sub> ).	ET AAS	TAYLOR, A. ET AL., 2000.
Cr	Soro	Amostras analisadas após diluição com NH <sub>4</sub> H <sub>2</sub> PO <sub>3</sub> e triton X-100 <sup>®</sup> em 1 % HNO <sub>3</sub> .	ET AAS	TAYLOR, A. ET AL., 2000.
Mn	Sangue urina	Amostras diluídas: urina 1+1 com 0,2 % HNO <sub>3</sub> , sangue 1+9 com 0,1 % Triton X-100 <sup>®</sup> .	ET AAS	TAYLOR, A. ET AL., 2000.

Se	Sangue, soro	Diluição 1+9 em 1 % HNO <sub>3</sub> .	ICP MS	TAYLOR, A. ET AL., 2000.
Co, Cs, Cu, Fe, Mo, Rb, Sr, Zn,	Soro	Diluição com 0,14 M HNO <sub>3</sub> / In	AAS	SUBRAMANIAN (1996).
B, Cu, Fe, Li, Mg, Rb, Sr, Zn	Soro	Diluição com 1 % HNO <sub>3</sub> /Rh	AAS	SUBRAMANIAN (1996).

Hassan e colaboradores (2006) determinaram os metais pesados Pb, Cd, Ni e Cr em amostras biológicas (sangue, urina e cabelo humano) de trabalhadores da usina siderúrgica, a fim de estudar a influência da exposição ambiental nos trabalhadores da produção e do controle de qualidade. Foram coletadas de homens, entre 25 e 55 anos, não expostos para controle e expostos, 3-5 mL de amostras de sangue em tubo *Vacutainer* e 100mL de urina matinal foi filtrada e adicionada 1 mL de ácido nítrico (65%) às alíquotas; as amostras de cabelo foram cortadas em pedaços de 0,5 cm<sup>2</sup> da região occipital da cabeça. Após pré-tratamento com ácido nítrico e peróxido de hidrogênio, as amostras foram digeridas em forno de microondas e por um método de digestão ácida convencional. Para o procedimento em forno de microondas, 200 mg de couro cabeludo, 0,5 mL de sangue e 1 mL de urina foram digeridas em 2 mL de HNO<sub>3</sub> + 1 mL de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (30%). As amostras digeridas foram analisadas por GF AAS. Para o procedimento em bloco digestor foram digeridas 0,5 mL de urina certificada e amostras de sangue e 0,2 g de cabelo humano por 2-3 h em solução de HNO<sub>3</sub>-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (2:1 v/v) e as soluções finais foram determinadas em GF AAS. O modificador químico convencional usado para estabilização do analito foi 0,05% m/v de Pd + 0,03% m/v de Mg(NO<sub>2</sub>)<sub>3</sub>. Para ensaio de validação, urina humana e sangue total humano liofilizado foram usados como material de referência certificado. Não foram encontradas interferências de matriz e a média de recuperação encontrada foi em torno de 98,53%. Os níveis de Cd em sangue, urina e couro cabeludo de trabalhadores expostos foram significativamente maiores do que dos indivíduos controle não expostos, entretanto, considerada normal para urina pois a maioria encontrava abaixo de 20 µg L<sup>-1</sup>. Apenas cinco trabalhadores apresentaram concentração de Cd acima deste valor, devido a problemas nos rins e hipertensão.

Palmer e colaboradores (2006) compararam o desempenho da técnica ICP-MS com técnicas já estabelecidas de AAS para determinação de Pb, Cd e Hg em amostras de sangue total. Enquanto o método de ICP-MS foi otimizado para avaliar Pb, Cd e Hg em níveis ambientais, também demonstrou-se adequado para avaliar concentrações associadas com exposição ocupacional. Para análise direta por ICP-MS, 200 µL de sangue foi diluído 1+49. Os

LOD são  $0,05 \mu\text{g dL}^{-1}$  para Pb,  $0,09 \mu\text{g L}^{-1}$  para Cd; e  $0,17 \mu\text{g L}^{-1}$  para Hg. A repetibilidade variou na faixa de 1,4% a 2,8% para Pb; 3% a 10% para Cd; e 2,6% a 8,8% para Hg. Os limites de detecção do método GF AAS foram  $1 \mu\text{g dL}^{-1}$ ,  $0,54 \mu\text{g L}^{-1}$ , e  $0,6 \mu\text{g L}^{-1}$ , para Pb, Cd, and Hg, respectivamente. Para determinação de Pb em sangue por GF AAS com correção de fundo Zeeman, 50  $\mu\text{L}$  de sangue foi diluído 1+ 9 com 0,2% ( $\text{w v}^{-1}$ ) do modificador  $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$  + 0,5% ( $\text{v v}^{-1}$ ) Triton X-100®, e 0,2% ( $\text{v v}^{-1}$ )  $\text{HNO}_3$ . Para determinação de Cd por GF AAS, as amostras de sangue foram diluídas 1+9 com solução modificador contendo 0,2% ( $\text{v v}^{-1}$ )  $\text{HNO}_3$ , 0,1% ( $\text{v v}^{-1}$ ) Triton X-100® e 1,0% ( $\text{m v}^{-1}$ )  $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ . Assim, a partir dos resultados, um método de biomonitoramento para determinação de Pb, Cd e Hg em sangue total foi proposto baseado na determinação por ICP-MS, e foi validado usando NIST 966 Metais Tóxicos em Sangue.

Estudo recente (Olmedo et al, 2010) validou métodos de quantificação para a determinação de Cr, Cd, Mn, Ni e Pb em amostras de sangue total, urina, saliva e pelos das axilas de acordo com padrões europeus. Para o processo de digestão das amostras foi usado aproximadamente 50 mg de amostras de cabelo certificado e amostras de pelo de axilas, digeridas com 1 mL de  $\text{HNO}_3$  + 0,5 mL de HCl + 2 mL de  $\text{H}_2\text{O}_2$  + 2 mL de  $\text{H}_2\text{O}$  em vaso fechado durante 30 minutos. Temperatura de pirólise e atomização foram determinadas. Os parâmetros determinadas foram LOD e LOQ, linearidade, repetibilidade, reprodutibilidade, recuperação e incerteza. Os limites de detecção obtidos foram adequados, a exatidão foi testada com sangue total, urina e material de referência certificado e as recuperações das amostras ficaram em torno de 96,3 a 107,8%. Para todos os elementos analisados, CV% para a precisão mínima e intermediária e repetibilidade não excederam 20%, sendo sempre menor do que 5%. Os métodos propostos provaram serem confiáveis para a determinação dos cinco elementos nas quatro amostras biológicas com diferentes perfis toxicocinéticos. O método validado pode ser aplicado para biomonitoramento de metais selecionados para realizar padrões de toxicologia ocupacional e é possível usar os níveis de metais pesados em amostras biológicas como indicador do risco a saúde de indivíduos expostos ocupacionalmente.

Oliveira e colaboradores (2008) também propuseram um método de biomonitoramento para determinação simultânea de Cd e Pb em sangue total de 40 voluntários adultos acima de 18 anos, por GF AAS simultânea, para dois níveis ambientais. Um volume de 200  $\mu\text{L}$  de sangue total foi diluído em 500  $\mu\text{L}$  de solução contendo 0,2% ( $\text{w v}^{-1}$ )

<sup>1)</sup> de Triton X-100® + 2,0% (v v<sup>-1</sup>) HNO<sub>3</sub> em tubos Ependorf® de 1,5 mL. Ácido tricloroacético foi adicionado para precipitação de proteínas e o sobrenadante analisado. Uma mistura contendo 250 µg W + 200 µg Ru e 2,0% (w v<sup>-1</sup>) NH<sub>4</sub>H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> foi usada como modificador permanente. Massas características e limites de detecção (n=20, 3 s (desvio padrão)) para Cd e Pb foram de 1,26 e 33 pg e 0,026 µg L<sup>-1</sup> e 0,65 µg L<sup>-1</sup>, respectivamente. A faixa de repetibilidade para Cd foi 1,8 a 6,8% e para Pb 1,2 a 1,7%. A exatidão do método foi checada pela análise de três materiais de referência. As concentrações encontradas não apresentaram diferenças estatísticas ao nível de confiança de 95%. Amostras de sangue de 40 indivíduos sem exposição ocupacional foram analisadas e as concentrações variaram em torno de 0,13 a 0,71 µg L<sup>-1</sup> para Cd e 9,3 a 56,7 µg L<sup>-1</sup> para Pb.

D'haese e colaboradores (1999) realizaram a análise Al, Fe, Pb, Cd, Cu, Zn, Cr, Mg, Ca e Sr em amostras de biopsia de osso de 100 pacientes inscritos em um programa de hemodiálise tendo em vista possuírem alto risco de alteração destes elementos traço bem como por morbidade de desordens esqueléticas. O procedimento de decomposição das amostras para a determinação dos referidos elementos envolveu a pesagem de aproximadamente 20-500 mg, digerida a 90-100°C durante 3 h em frascos de PTFE com 1-2 mL de ácido nítrico concentrado. Perdas durante a digestão foram checadas pelo cálculo da recuperação e para cada elemento a recuperação foi perto de 100%. Magnésio e Cálcio foram determinados em digerido de osso por FAAS. As amostras foram diluídas em 1:100 para Mg e 1:500 para Ca. Já o Al, Cu, Zn, Fe, Pb, Cd, Cr e Sr foram determinados por GF AAS. As concentrações dos elementos no osso de pacientes com falha renal em estagio terminal sofrem alterações com destaque para os valores obtidos para Al, Cr e Cd, que se mostraram muito acima das concentrações dos outros analitos.

Recentemente, Bohrer e colaboradores (2008) estudaram quatro procedimentos decomposição para quantificação de Al em fígado, coração, cérebro, osso e rins de camundongos albinos machos da espécie Swiss, digeridas por quatro métodos de digestão e analisadas por GF AAS. Os camundongos foram divididos em dois grupos: um controle e o outro recebeu por via oral 100 µL de solução 1 mmol/Kg/dia de Al<sub>2</sub>(SO<sub>4</sub>)<sub>3</sub> cinco vezes/semana durante 6 meses. Cerca de 0,5 g de cada amostra coletada foram digeridas pelos métodos: (1) secagem em forno a 65 °C por 24 h. Uma alíquota de 3 mL de HNO<sub>3</sub> foi adicionado, e deixado em repouso por 48 h e avolumado para 10 mL; (2) secagem como o processo acima. Amostras foram trituradas e 4 mL de 2:3 metanol/diclorometano foi

adicionado, sob agitação por 1 h. O resíduo resultante da secagem foi digerido com 1,5 mL de HNO<sub>3</sub> por 48 h e avolumado para 10 mL; (3) os tecidos foram digeridos em microondas por 10 minutos. Após, adicionado 3 mL de HNO<sub>3</sub> e deixado em repouso por 72 h e avolumado para 10 mL; (4) digestão em forno de microondas e adicionado 4 mL de mistura 2:3 metanol/diclorometano. Agitado por 1 h e o resíduo digerido com 2,5 mL de HNO<sub>3</sub> por 60 h e avolumado para 10 mL. Os resultados indicam que a etapa de secagem da amostra antes da digestão é vantajosa, pois a quantidade de ácido necessário é reduzida. Finalmente, o Al não foi encontrado na fração de gordura das amostras, em ratos expostos, demonstrando que o Al não acumula nesta parte dos tecidos.

A partir da análise dos artigos acima, percebe-se que a maioria dos trabalhos, independente da técnica utilizada para determinação dos elementos, utiliza procedimentos de digestão para abertura das amostras quando em estado sólido e diluição simples com mistura de ácidos e um tensoativo, a fim de aumentar a eficiência da nebulização, demonstrando uma maior eficiência nos métodos de digestão que utilizam sistemas fechados.

## **2.6 Determinação de elementos em amostras biológicas, em ratos.**

A toxicidade e a acumulação de elementos essenciais e tóxicos em animais experimentais vêm ganhando, nos últimos anos, bastante destaque em investigações realizadas em todo o mundo por diversos grupos de pesquisas. Por serem freqüentemente utilizados em pesquisas clínicas e terem sua composição mineral dos tecidos e fluidos corporais semelhantes aos humanos, são considerados bons modelos para o monitoramento em curto e longo prazo, com relação ao acúmulo de elementos tóxicos e alterações nos níveis dos elementos essenciais, frente a ingestão de alimentos contendo altos teores de metais específicos, que possam causar interação, bem como quanto ao uso e abuso de medicamentos. O monitoramento da concentração de elementos essenciais é de grande importância, visto que possuem funções nos diversos tecidos corporais, provocando doenças quando em baixas concentrações ou concentrações acima dos limites preestabelecidos.

Em animais experimentais, a idade e o sexo são fatores básicos para avaliação de resultados experimentais, sabendo que há diferenças para idade e sexo em aspectos bioquímicos, fisiológicos e anatômicos. Os dados das concentrações de metais nos organismos animais são úteis, mas quando se parte para verificação do efeito de um dos

elementos *in vivo*, a presença de outros não pode ser negligenciada nos campos da nutrição e toxicologia, particularmente para o efeito de exposição simultânea a elementos tóxicos (ex. Hg, Cd e Pb) ou a interação entre tóxicos e essenciais (ex. Cu, Zn e Mn) (UCHINO et al, 1990).

A distribuição dos metais nos tecidos de ratos varia com a idade. Segundo Uchino e colaboradores (1990), as concentrações de Fe, Cu, Zn, Mn, Hg, Cd e Pb variam no fígado, rim e cérebro de ratos machos e fêmeas da espécie *Sprague-Dawley* com idade entre 1 a 365 dias. Cu, Hg e Cd em rim de machos e fêmeas aumentou até os 127 dias de idade, assim como o Fe em fígado e rim de fêmeas. Após os 127 dias, especialmente a concentração de Cu em rim de fêmeas e concentração de Cd em rim de macho e fêmea aumentaram bastante. Diferenças, estatisticamente significante e consistente ( $P > 0,05$ ), entre os sexos nas concentrações dos elementos são encontradas para Fe, Cu e Zn. Exceto para concentração de Zn no fígado de ratos entre 50 e 72 dias, as concentrações de Fe (fígado e rim), Zn (rim) e Cu (fígado, rim e cérebro) em ratas fêmeas durante o estagio adulto, foram todas maiores do que nos ratos machos adultos. Diferenças isoladas para Mn, Hg e Cd foram também encontradas. Para o Cd as concentrações foram maiores em fígado, rim e cérebro de fêmeas do que nos machos.

Outros autores estudaram a variação da composição mineral em tecidos de ratos Wistar com a idade e sexo, a exemplo de Takahashi e colaboradores (2000), que determinaram os elementos P, K, Na, Fe, Mg, Ca, Zn, Rb, Cu, Mn, Mo, Al, Co, Sr, Cs, Pb e Cd, em fígado de ratos adultos, sendo os cinco maiores elementos (P, K, Na, Fe, Mg, Ca) determinados por ICP OES e os outros por ICP-MS, com a finalidade de determinar variações relacionadas com a idade nas concentrações dos elementos constituintes nos fígados de ratos Wistar de 1 semana a 12 meses de idade. As amostras congeladas, bem como as amostras de referencia (fígado bovino e de porco) foram fracionadas em pequenos pedaços e liofilizadas a  $-20^{\circ}\text{C}$  por aproximadamente 12h em um liofilizador e a  $70^{\circ}\text{C}$  por 3 h em um forno elétrico. A massa de 200  $\mu\text{g}$  de amostras de referência e de amostras de fígado de rato foram pré-digeridas em frasco de teflon com solução de 7,5 mL  $\text{HNO}_3$  (68%) e 1,0 mL HF (38%) a  $80^{\circ}\text{C}$  por 3 h. Então as amostras em solução ácida foram aquecidas em forno de microondas por 2 h. Sendo adicionado 1,0 mL  $\text{HNO}_3$  (65%) e 0,5 mL  $\text{HClO}_4$  (70%). Finalmente, o resíduo foi dissolvido em 1,0 mL  $\text{HNO}_3$  (27%) e avolumado para 20 mL. As alterações nas concentrações desses elementos relacionadas com a idade foram categorizadas em três

padrões gerais: (1) as concentrações permanecem essencialmente constantes ao longo das idades dos animais, como observado para P, K, Na, Mg, Ca, Rb, Sr, Cs e Pb; (2) aumento com a idade, observado para Fe, Mn, Mo, Co e Cd; e (3) diminuição com a idade, especialmente nos primeiros estágios de crescimento, observado para Cu e Zn.

Fayed (2009) determinou os níveis de Zn, Cu, Fe, Se e Cr no cérebro de ratos tratados com Vincamina. Trata-se de uma planta alcalóide usada clinicamente como vasodilatador periférico que aumenta o fluxo sanguíneo cerebral e o uso de oxigênio e glicose pelo tecido neural para combater os efeitos da idade. Doenças neurodegenerativas associadas com a idade são caracterizadas por um distúrbio nos níveis de elemento traço no cérebro, cujo ajudam na formação de neurotransmissores e estão envolvidos na defesa antioxidante e regulação redox intracelular e modulação das células neurais. Cerca de  $15 \text{ mg Kg}^{-1}$  de Vincamina foi injetada nos ratos por 14 dias e após sacrificados. O cérebro foi coletado e digerido em microondas e as concentrações dos elementos traço determinadas por F AAS. Os resultados mostraram que o Zn foi o elemento traço mais elevado no cérebro de ratos controle ( $3,134 \pm 0,072 \mu\text{g g}^{-1}$ ) e Cr o mais baixo ( $0,386 \pm 0,027 \mu\text{g g}^{-1}$ ). A administração de Vincamina ( $\text{m m}^{-1}$ ) reduziu a concentração de Fe quando comparado ao controle, o que sugere um efeito benéfico para prevenir um estresse oxidativo do Fe em doenças neurodegenerativas como Alzheimer e Parkinson.

Huang e colaboradores (2004) estudaram a ação da metalotioneína como biomarcador de Hg em fígado, rim, coração, cérebro, testículo e sangue de ratos que receberam Cinabar via oral. O Cinabar é uma droga utilizada na medicina chinesa tradicional como sedativo e hipnótico no tratamento da epilepsia, porém, é composto principalmente por mercúrio sulfurado ( $\geq 96\% \text{ HgS}$ ). Os níveis de Hg, Cu e Zn e Metalotioneína foram determinados por ICP-MS. Os resultados indicaram que o Hg foi facilmente acumulado nos tecidos dos ratos expostos ao Cinabar, especialmente nos rins e em todos os grupos estudados, os níveis de Hg no fígado e rins foram significativamente mais altos, comparados aos obtidos nas amostras controle. O estudo demonstrou que a metalotioneína pode ser usada como um biomarcador para o Hg nos tecidos e demonstrou também que o acúmulo do Hg, Cu e Zn no fígado e rins está relacionado com os níveis de metalotioneína produzidas por esses órgãos, havendo maior acúmulo de Hg no fígado, órgão mais sensível ao aumento de metais tóxicos.

É escassa a literatura à respeito da ação de medicamentos sobre a concentração de minerais e elementos traços em humanos e animais. Naze e colaboradores (1987) avaliaram o efeito da Cimetidina (droga antissecretora) na distribuição tecidual de alguns elementos traço e minerais em amostras biológicas de ratos (osso, cérebro, coração, rins, fígado, músculo, baço e testículos). A cimetidina é um medicamento antagonista do receptor H1 da histamina, usado no tratamento de pacientes com úlceras gástricas e duodenais e outras condições hipersecretórias. Esta droga tem uma estrutura que sugere poder agir como agente quelante. Tecidos foram digeridos em uma mistura 2:1 ou 3:1 de HNO<sub>3</sub>:HClO<sub>4</sub>, aquecido em bloco digestor a 200 °C e diluído com água deionizada. Concentração de Cu, Zn, Fe, Mn, Ca, Mg, K e Na foram determinadas por F AAS. A recente pesquisa usou 38 ratos machos *Spreague-Dawley*, divididos em 5 grupos: HD (1750 mg/Kg/dia), grupo HD controle, ID (875 mg/Kg/dia), ID alimentados e LD (87,5 mg/Kg/dia). Diferenças significantes (P<0,05) encontrada entre os grupos para ratos machos estudados incluíram alto cobre no plasma nos grupos HD e ID, alto Na no plasma, Cu no fígado, Ca e Zn no coração no grupo HD e uma baixa porcentagem de excreção fecal de todos os metais divalentes estudados nos grupos HD e ID comparado com seus controles. Em um grupo de 20 fêmeas estudadas, foi encontrado alto teor de Zn no coração e plasma, alto Cu no coração, rins, fígado, jejuno, íleo e útero, alto Mn em estômago e íleo, baixo Fe em rins e fígado, baixo Ca no rim e alto Ca no estômago e baixo Mg no fígado comparado com os controles. Os níveis de metalotioneína no fígado e rim nos dois grupos foram comparáveis. Machos e fêmeas que receberam altas doses de Cimetidina apresentaram mudanças significativas nas concentrações teciduais de alguns dos metais traços e minerais estudados.

O conteúdo de Se em amostras de plasma sanguíneo de ratos Sprague-Dawley foi investigado por Kabirov e colaboradores (2008). Os animais foram tratados com L-selenometilselenocisteína (SeMC) por 7 e 13 semanas. As amostras de sangue foram coletadas de 10 ratos/sexo, do plexo orbital e separado o plasma, que foi diluído 10 vezes pela mistura de 50 µL do plasma com 200 µL de agente redutor (30 mmol de ácido ascórbico e 2 mL de Triton X-100® por litro), 200 µL de solução com modificador (9,4 mmol de PdCl<sub>2</sub> em 65 mmol de HCl) e 50 µL de Triton-X-100® (0,2%). A concentração de Se foi determinada por GF AAS com corretor de fundo Zeeman. A concentração de Se (média ± S.D), em amostras de plasma de ratos machos e fêmeas, respectivamente, foram observados em sete semanas: 655,9 ± 96,2 e 625,3 ± 78,4 ng mL<sup>-1</sup> (grupo controle), 912,3 ± 85,2 e 905,7 ± 128,5

ng mL<sup>-1</sup> (0,4 mg/Kg/grupo dose dia), 1147,3 ± 95,8 e 1139,4 ± 115,3 ng mL<sup>-1</sup> (0,8 mg kg<sup>-1</sup> por grupo dose dia), e 1351,5 ± 226,7 and 1315,0 ± 153,6 ng/mL (2,0 mg/kg por grupo dose dia). Em 13 semanas, os níveis de Se seguintes em machos e fêmeas, respectivamente, foram observados: 655,5 ± 48,8 e 595,8 ± 43,9 ng mL<sup>-1</sup> (grupo controle), 927,9 ± 85,3 e 859,3 ± 164,3 ng mL<sup>-1</sup> (0.4 mg Kg<sup>-1</sup> por grupo dose dia), 1238,9 ± 182, 4 e 1169,9 ± 112,6 ng mL<sup>-1</sup> (0.8 mg Kg<sup>-1</sup> por grupo dose dia), e 1476,5 ± 138,1 e 1320,1 ± 228,6 ng mL<sup>-1</sup> (2.0 mg kg<sup>-1</sup> por grupo dose dia). Os níveis de Se no plasma foram dose-dependente e aumentaram significativamente em machos e fêmeas a 0,4, 0,8 e 2,0 mg Kg<sup>-1</sup> por grupo dose dia em 7 e 13 semanas comparado ao grupo controle. Nenhuma diferença significativa foram vistas entre o grupo dos níveis de Se no mesmo grupo de dose em 7 semanas versus 13 semanas. Não houve diferença significativa entre níveis de Se no plasma do grupo principal em grupos de machos e fêmeas tratados com droga. Uma diferença significativa entre machos e fêmeas foi observado somente no grupo controle em 13 semanas. Esta mudança não foi relacionada a administração da droga. Nenhuma diferença significativa entre sexos em níveis de Se em plasma foram vistos nos grupos tratados com SeMC. Nenhuma diferença significativa em níveis de Se no plasma foram vistas entre níveis no plasma a 7 e 13 semanas. O método descrito é simples, rápido, acurado, preciso e pode ser facilmente aplicado em outros laboratórios para um largo número de amostras.

Paul e colaboradores (2004) estudaram a distribuição normal de uma faixa de elementos no tecido cerebral de ratos Wistar saudáveis usando SF-ICP-MS. Um protocolo foi desenvolvido para determinar concentrações de Ag, Cd, Hg, Pb, Bi, U V, Cr, Mn Fe, Co, Ni, Cu, Zn, As e Se em regiões específicas do cérebro. As concentrações destes elementos foram determinadas na faixa de 2 ± 1 ng ml<sup>-1</sup> (diencéfalo) e 7558 ± 450 ng mL<sup>-1</sup> (bulbo olfatório). Os limites de detecção dos 16 elementos variam entre 5 e 300 pg ml<sup>-1</sup>, com U apresentando valores mais baixos e Fe mais altos valores.

Um estudo sobre a avaliação de 5 elementos químicos em diferentes regiões de amostras de cérebro de ratos Wistar machos, foi executado por Saito e Saito (1996), os quais empregaram decomposição em vaso de Teflon a 120 °C por 2 h com HNO<sub>3</sub> ultra puro. As concentrações dos elementos traço Zn, Cu, Rb, Mn e Mo foram determinadas por ICP-MS. Medidas de controle de qualidade usando um material de referência padrão (SRM 1577b fígado bovino) mostrou que o método de análise multielementar estabelecido no estudo é acurado e útil para determinação de concentrações de elementos traço em amostras

biológicas. Usando este procedimento, foram determinadas as concentrações dos 05 elementos em sete regiões discretas do cérebro de ratos e Zn e Mn em suas frações sinaptosomal.

Petering e colaboradores (1984) estudaram a função da metalotioneína e seus sítios de ligação no metabolismo de Cu, Zn e Cd em rins de ratos machos. Estudaram o efeito da deficiência de Zn sobre a distribuição de Cd, Zn e Cu. Ratos adultos foram suplementados com 100 µg Cd/mL de água 20 µg Cd/mL. As amostras do citosol dos rins foram eluidas em coluna e as frações analisadas para Zn, Fe, Cu e Cd por F AAS. Os autores concluíram que a deficiência de Zn afeta o complemento dos metais ligados a metalotioneína: Zn é diminuído e Cu é reduzido a uma amplitude muito pequena. Cd é inalterado. Rim dos controles, não exposto a Cd, normalmente contém uma quantidade substancial de Zn, CuMT. O experimento aponta para a MT como uma única metaloproteína, cuja é metabolicamente sensível ao estado nutricional do organismo. A ligação do Cd a MT ocorre com a perda de Zn e Cu da proteína, assim aparentemente reduzindo o número de sítios de ligação na MT para Cu e Zn cujo são usados por suas funções normais não especificadas no rim.

## **2.7. Diuréticos de Alça e Furosemida**

O órgão alvo primário para os diuréticos é o rim, onde estas drogas inibem a reabsorção de sódio e outros íons da luz dos néfrons, unidades funcionais dos rins (Figura 01). A quantidade de íons e a água acompanhante que são excretados como urina seguida da administração de um diurético, contudo, é determinado por muitos fatores, incluindo a estrutura química do diurético, o sítio ou sítios de ação do agente, o consumo de sal ou a quantidade de fluido extracelular presente (SILVA, 2002b).

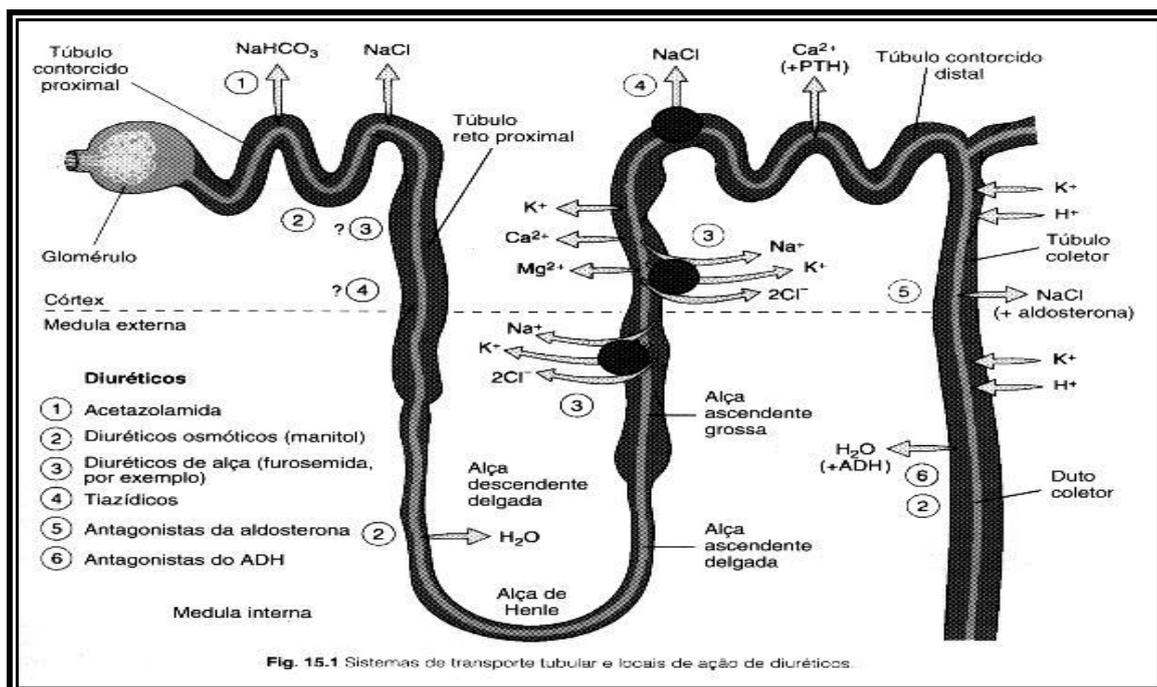


Figura 01 – Estrutura do néfron e mecanismo de ação dos diuréticos (Katzung, 1998).

O principal efeito dos diuréticos é a perda urinária de eletrólitos. Contudo, em pacientes em uso de diuréticos, perda de potássio é o principal interesse/preocupação por causa dos severos problemas de saúde. Apesar da ênfase dada ao potássio, diuréticos também aumentam a perda urinária de outros nutrientes essenciais solúveis em água e metabolitos tais como cálcio, magnésio, cloreto, bicarbonato, vitamina C, B6 e tiamina. Isto indica que indivíduos em uso de diuréticos podem estar em risco de desenvolver deficiências nutricionais. Em contraste com o potássio, estas deficiências podem ser assintomáticas em curto prazo (BERNÉ et al, 2005).

Os diuréticos podem ser prescritos para uso por tempo prolongado. Desse modo, se perdas de nutrientes não são prevenidas, eles podem eventualmente pôr em risco o estado nutricional daqueles que os usam. Isto é importante porque vários micronutrientes têm sido associados com a prevenção da hipertensão que é uma das doenças para a qual os diuréticos são prescritos. Contudo, sua utilização tem recentemente aumentado porque eles são extensivamente usados como parte de uma “prática insalubre” para perda de peso entre adolescentes com sobrepeso e adultos, através das fórmulas para emagrecimento, bem como em esportes cujo emagrecimento é considerado vantajoso, ou até mesmo para eliminar algum agente dopante (SILVA, 2002a).

Diuréticos de alça possuem como mecanismo de ação o bloqueio do transportador luminal  $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - 2\text{Cl}^-$ , receptor para diuréticos de alça, na porção ascendente da alça de Henle. A inibição do cotransportador  $\text{Na}^+ / \text{K}^+ / 2\text{Cl}^-$  reduz drasticamente a absorção de NaCl e, em consequência, também a de  $\text{K}^+$ ,  $\text{Ca}^{+2}$  e  $\text{Mg}^{+2}$ . Os diuréticos de alça alcançam os transportadores que estão inseridos na membrana luminal por serem ativamente secretados do sangue para a urina no túbulo proximal. A alta ligação desses diuréticos com albumina (95%) minimiza a sua filtração glomerular, mantendo o diurético no plasma e transportando-o para sítios secretores de ácido orgânico no túbulo proximal. Estas bombas secretoras têm muita afeição pelos diuréticos de alça deslocando a droga da albumina e transportando-a através da célula para o lúmen, onde ganha acesso aos transportadores  $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - 2\text{Cl}^-$  que são liberados dos sítios secretores (SHANKAR; BRATER, 2003).

Devido à localização estratégica da porção espessa da alça de Henle, a natriurese e diurese provocada pelos diuréticos de alça são extremamente intensas, caracterizando-os como de alta potência. Por essa razão, esse grupo de diuréticos é largamente utilizado na prática clínica em situações que requeiram a perda de grande quantidade de sódio, tal como nos estados edematosos resultantes de disfunção cardíaca (insuficiência cardíaca congestiva) ou renal (síndrome nefrótica), ou quando é imperioso o “enxugamento” rápido de fluido acumulado em áreas críticas, como no edema pulmonar agudo (SHANKAR, BRATER, 2003).

## **2.8 Aspectos farmacológicos e toxicológicos da Furosemida**

As propriedades farmacológicas dos diuréticos têm levado ao uso no tratamento de condições edematosas resultantes de uma variedade de patologias (ex. insuficiência cardíaca congestiva, síndrome nefrótica, doença crônica do fígado), bem como no manejo da hipertensão (SILVA, 2002a).

Furosemida (Figura 02) é um diurético de alça que tem um efeito salurético 8-10 vezes maior que os diuréticos tiazídicos (hidroclorotiazida, por exemplo), contudo, tem uma mais curta duração de ação, entre 6 e 8 h, causando uma rápida excreção de íons sódio, cloreto, potássio, cálcio, magnésio e bicarbonato, sendo efetiva para o tratamento de edemas ligados com sítios cardíacos, hepáticos e renais. É eficaz por via oral, mas pode ser usada por via parenteral (principalmente endovenosa) quando um efeito diurético mais pronunciado é desejado. A dosagem da furosemida, 20-80 mg por dia, pode ser administrada

em doses divididas por causa da curta duração de ação da droga e, cuidadosamente, aumentada para um máximo de 600 mg por dia (SILVA, P., 2002).

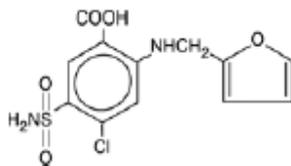


Figura 02 - Fórmula estrutural da furosemida

Segundo Berné e colaboradores (2005), a dose terapêutica usual da furosemida em pacientes hipertensivos fica na faixa de 40 a 240 mg, administrada uma ou duas vezes por dia que corresponde a, aproximadamente, 0,61 a 7 mg kg<sup>-1</sup>. Contudo, pacientes com congestão severa dos pulmões, fígado e baço, bem como efusão pleural (derrame pleural) e edema periférico associado com infarto cardíaco são tratados com altas doses de diuréticos.

Em média, metade da dose da furosemida é absorvida, mas com uma ampla faixa (10-100%). Esta variabilidade torna difícil prever quanto de furosemida será absorvida. Clinicamente, isto significa que se pode necessitar de uma ampla faixa de doses para determinar a dose oral apropriada. A meia-vida plasmática da furosemida varia de 3 a 4 h. Metade da dose da furosemida é excretada pela urina como ativa (não modificada). O remanescente permanece conjugado ao ácido glicurônico no próprio fígado. Em pacientes com insuficiência renal, a meia vida plasmática da furosemida é prolongada porque a excreção urinária e a conjugação renal estão deprimidas (SHANKAR, BRATER, 2003).

A própria eficácia da furosemida é também a causa dos importantes efeitos colaterais que acompanham o uso crônico dessas drogas. O mais ameaçador desses efeitos é sem dúvida a hipopotassemia. Conforme discutido anteriormente, a secreção de K<sup>+</sup> nas porções finais do néfron, especialmente aos túbulos coletores, depende da oferta de sódio e do fluxo intratubular que chegam a esses segmentos, além da atividade da aldosterona. Considerando ainda que em grande parte dos casos que requerem o uso continuado dessas drogas ocorre um aumento da atividade da aldosterona (hiperaldosteronismo secundário), tendo a secreção de K<sup>+</sup> nesses segmentos aumenta tremendamente, levando a uma excreção exagerada desse íon (SHANKAR; BRATER, 2003).

Ao passo que o uso de diuréticos é bem tolerado, podem ocasionalmente ocorrer reações adversas que envolvem: distúrbios do equilíbrio hidroeletrolítico e ácido-base,

alteração dos metabolismos dos carboidratos e lipídios e alterações do metabolismo do ácido úrico. Alguns deles precipitados ou agravados com associações entre diuréticos e outros medicamentos (SILVA, 2002a).

Berné e colaboradores (2005) estudaram o efeito da furosemida na perda urinária de nutrientes essenciais e água e as conseqüências da administração deste diurético no estado nutricional de ratos em crescimento, alimentados com dieta enriquecida com todos os nutrientes essenciais e concentrações crescentes de furosemida (0, 0,5, 1,0 e 1,5 mg g<sup>-1</sup>), encontrando como resultados a redução do peso corporal devido à grande eliminação dos nutrientes e água consumidos. Este trabalho trata essencialmente da perda de nutrientes nitrogênio, fósforo, sódio, potássio, magnésio, zinco e retinol em função do crescimento animal, não avaliando a perda dos mesmos nos diversos tecidos corporais, bem como não foi encontrada literatura acerca da deterioração dos níveis teciduais de nutrientes em função do uso de diuréticos. Portanto, este trabalho de mestrado é inédito no sentido de estudar a perda de minerais em amostras biológicas relacionada com a administração da furosemida.

## **2.9 Ratos Wistar (*Ratus norvegicus*)**

O *ratus norvegicus* (Figura 03) é de origem Asiática, do sul da Rússia e nordeste da China e em 1800, começou a ser usado em laboratórios. As variedades comuns incluem *Sprague Dawley* (albino com cabeça estreita e cauda mais longa que o corpo); *Wistar* (albino com cabeça larga e cauda curta) e *Long-Evans* (muito pequeno com colorações preta e marrom). Os albinos têm visão curta (quase cegos). Em termos de comportamento, os machos não brigam muito, vivem mais ou menos 3 anos, pesam entre 450-520 g e fêmeas 250-300 g; estas procriam entre 9-12 filhotes, com 21-23 dias de gestação. A mãe deve ser isolada dos filhotes ou ela pode destruí-los. Raramente mordem e vivem bem em gaiolas plásticas com fundo sólido ou gaiolas de metal com fundo de arame. A temperatura deve estar em torno de 18-27 °C, sendo melhor em 22 °C, e a alimentação é peletizada *ad libitum* (BAZIN; CONSTANTIN; GINDRE, 2004).



Figura 03: Rato Wistar albino.

Desde a metade do século XIX este animal tem ocupado lugar importante na pesquisa biomédica e comportamental, com fisiologia bastante conhecida. Da mesma forma que os camundongos, os ratos estão disponíveis em muitas variedades genéticas. Dentre os trabalhos que mais freqüentemente usam ratos, devem-se citar: estudos sobre envelhecimento, neoplasias, efeito e toxicidade de drogas, cáries dentárias, metabolismo de lipídios, efeitos de vitaminas, comportamento, alcoolismo, cirrose, fenilcetonúria, icterícia, intolerância a frutose, hipertensão, embriologia, teratologia, diabetes insipidus e doenças infecciosas (ANDRADE, 2002).

### **2.10 Aspectos éticos da experimentação animal**

É incalculável o valor da contribuição dos animais de laboratório as novas descobertas para a prevenção de doenças e para a sua cura, bem como para o desenvolvimento de novas técnicas para tratamento cirúrgico. O resultado de testes de fármacos em animais contribui para o controle de mais de dez mil produtos farmacêuticos em uso corrente e que, testados quanto a eficácia, esterilidade e potência, resultam na sobrevivência de muitos pacientes (ANDRADE, 2002).

O uso de animais em pesquisa é aceitável somente se prometer contribuir para o entendimento de princípios biológicos fundamentais, para o desenvolvimento do conhecimento que pode ser racionalmente esperado beneficiar humanos e animais ou se os melhores esforços dos pesquisadores para encontrar uma alternativa tenham falhado.

Se animais devem ser usados, eles devem ser mantidos de uma maneira que forneça para eles conforto físico e bem-estar psicológico. Animais não devem ser sujeitos a dor ou

estresse desnecessários. O plano experimental deve oferecer proteção. Por outro lado, se um animal observado for severamente experienciado, apresentando dor não aliviada ou desconforto, deve imediatamente ser humanamente sacrificado, usando um método que forneça rápida inconsciência inicial (CACC, 1993).

A literatura geral que trata sobre animais de laboratório demonstra que a análise de cinco aspectos do estado do animal permite avaliar o seu sofrimento, estresse e desconforto: variação do peso do animal associado ao nível de ingestão de alimentos e água; aparência física externa; sinais clínicos mensuráveis, como, por exemplo, o ritmo respiratório; alteração nos comportamentos e respostas comportamentais a estímulos externos. Além das medidas comportamentais e fisiológicas, também catecolaminas, corticosteróides, interleucinas e outras são utilizadas para medir a intensidade do sofrimento (CACC, 1993).

Em termos de princípios éticos inerentes a esta questão, é preciso reter que os animais só devem ser utilizados quando não existem métodos alternativos aplicáveis. Significa que não basta à existência do método, é também necessária toda uma legislação que o suporte. Quando os métodos não são aplicáveis, pelas mais diversas razões, então, se devem atender a outros dois aspectos. Em primeiro lugar é necessário reduzir o número de espécies usadas até um limite que permita a viabilidade da informação. O segundo aspecto relaciona-se com o apuramento da técnica, a melhoria do protocolo visando um menor desconforto (CRUZ; CORREIA; DIAS, 2001).

Segundo o Guia para Cuidados e Uso de Animais de Laboratório (CCAC), em 1993, vários métodos de eutanásia são descritos, sendo os mais bem aceitos: a) Eutanásia por decapitação, menos traumático para o animal, não requerendo anestesia. Requer uma guilhotina específica para pequenos animais. b) Eutanásia por deslocamento cervical, aplicável quando o número de animais é relativamente pequeno e quando não é preciso coletar tecido cerebral e c) Eutanásia por anestésico, de custo elevado pelo preço do anestésico e, pode não ser aplicável quando os tecidos coletados não devem conter anestésicos (CACC, 1993).

Diante disso, há uma grande necessidade de regulamentação de estudos experimentais com o fim de reivindicar maior respeito na manipulação de animais de laboratório através de normas e protocolos aprovadas por Comitês de Ética.

## CAPÍTULO III - PARTE EXPERIMENTAL

### 3.1 Reagentes e soluções

Toda a vidraria e plásticos utilizados na coleta e análise das amostras foram descontaminadas em banho de HNO<sub>3</sub> 10% (v v<sup>-1</sup>) por, no mínimo 24 h e, em seguida, lavadas com água destilada ultrapura do tipo Milli QR<sup>®</sup> (Millipore<sup>®</sup>, Bedford, MA, USA).

Todas as soluções utilizadas no desenvolvimento do trabalho foram de pureza analítica. Os digeridos das amostras foram obtidos utilizando os seguintes reagentes: ácido nítrico 65% (Merck<sup>®</sup>, Alemanha), peróxido de hidrogênio 30% (m v<sup>-1</sup>) (Merck<sup>®</sup>, Alemanha).

As soluções multielementares contendo 20,0 mg L<sup>-1</sup> de Cd, Cu, Fe, Se, Pb e Zn e 60,0 mg L<sup>-1</sup> de Mg, foram preparadas por diluição com uma solução 2,0 mol L<sup>-1</sup> de HNO<sub>3</sub> em água, das soluções estoques de cada um dos elementos a 1000,0 mg L<sup>-1</sup> (todas da marca QHEMIS, Brasil).

Para administração do medicamento foram usadas ampolas de 2mL contendo 40mg de furosemida.

### 3.2 Amostras

Foram usados 40 ratos albinos *Wistar* machos adultos (com mesmo período de crescimento), com peso entre 200-400 g, adquiridos do Biotério Central da Universidade Estadual de Feira de Santana (UEFS). Os ratos foram expostos a condições convencionais (22 ± 1°C, com uma umidade relativa de 50 ± 10% e ciclo claro/escuro de 12 horas) e mantidos de acordo com o Guia para Cuidados de Animais de Laboratório (CACC, 1993) para o uso de animais experimentais. O procedimento experimental foi aprovado pelo CEUA da Universidade Estadual de Feira de Santana-UEFS sob número 008/07, em 04 de junho de 2008, cuja cópia está em anexo.

De acordo com as recomendações propostas por Berné (2005), os ratos foram colocados em gaiolas convencionais (Figura 07) de aço inox e foram oferecidas dieta e água *ad libitum* por 8 dias. Após este período de tempo o peso corporal foi medido. As coletas das amostras foram realizadas uma semana após administração da furosemida (30 mg/kg/dia). A

escolha da dose se baseou no volume a ser administrado por via intraperitoneal no rato, não permitindo uma dose maior, tendo em vista que o volume a ser administrado na cavidade peritoneal não pode ultrapassar 1mL.

Os ratos foram sacrificados no final do dia do experimento por deslocamento da cervical. Amostras de sangue foram coletadas por punção intracardíaca, conforme recomendado por Carlini (1973), os tecidos foram dissecados e as carcaças remanescentes foram congeladas para posterior descarte adequado. Todos os experimentos foram submetidos/ adaptados aos princípios padrões no Guia para cuidados e uso de animais de laboratório (CACC, 1993).



Figura 04 - sala dos animais e gaiolas convencionais.

### 3.3 Desenho Experimental

O estudo foi dividido em duas fases: controle, em que se formou um grupo de 8 animais (4 machos e 4 fêmeas), que receberam a dieta padrão, 15 mL de soro fisiológico/ Kg de peso corporal via intraperitoneal e foram sacrificados para coleta de sangue e tecidos (fígado, rim, pulmão e coração).

Na segunda fase, um grupo de 8 animais receberam a mesma dieta padrão e furosemida (30 mg/kg/dia) via intraperitoneal e foram sacrificados para coleta das amostras. Não houve intervalo de tempo entre as duas fases, sendo uma realizada após a outra.

#### 3.3.1 Coleta e preparo das amostras

As amostras de sangue foram coletadas de cada animal devidamente eutanasiado, por punção intracardíaca após exposição do miocárdio (para não haver contaminação com outros fluidos) pelo sistema de coleta a vacuo da BD Vacutainer®, sem anticoagulante. Para as punções foram utilizadas agulhas de coleta com calibre 22G. As amostras de sangue

foram deixadas em repouso por 60 segundos, então centrifugadas a 3500 rpm por 30 minutos. Os sobrenadantes foram usados como amostras de soro. As amostras de soro obtidas foram pipetadas com pipeta automática em novos tubos similares aos da coleta, e armazenadas em freezer a  $-20^{\circ}\text{C}$ , junto com os tecidos, para evitar decomposição e crescimento bacteriano. Todo o manuseio das amostras foi realizado no Biotério Central da Universidade Estadual de Feira de Santana (UEFS).

Após o período de administração do medicamento, os animais foram sedados e sacrificados e os órgãos dissecados em partes de fígado, rim, coração e pulmão. As amostras biológicas não usadas imediatamente após amostragem foram lavados em solução fisiológica salina gelada [0,9% ( $\text{w v}^{-1}$ ) NaCl], limpadas, secadas em papel de filtro, pesadas e estocadas a  $-80^{\circ}\text{C}$  para posterior liofilização (HUANG et al, 2004).

### **3.3.2 Liofilização**

Os tecidos dos ratos foram fragmentados em pequenos pedaços e congelados usando um freezer até temperatura final de congelamento de aproximadamente  $-20^{\circ}\text{C}$ . As amostras, após congelamento, foram colocadas em recipientes de vidro e acondicionadas no liofilizador por um período de 24 h.

### **3.3.3 Homogeneização**

Após a liofilização, as amostras foram pulverizadas em gral e pistilo de porcelana. Depois da pulverização da amostra, esta foi homogeneizada em peneiras de nylon (previamente descontaminadas), devidamente identificadas e colocadas em frascos de polietileno de 50,0 mL (potes coletores). Essas amostras foram imediatamente colocadas em dessecadores sob vácuo contendo sílica gel até o momento das análises.

### **3.3.4 Procedimento para a digestão das amostras**

Para o procedimento de digestão das amostras, alíquotas de cerca de 0,5000 g de cada amostra de tecido foram transferidas para frascos de politetrafluoretileno (PTFE). Volumes de 3,5 mL de  $\text{HNO}_3$  65% ( $\text{m m}^{-1}$ ), 3,5 mL de  $\text{H}_2\text{O}$  (Milli Q) e 1,0 mL de  $\text{H}_2\text{O}_2$  30% ( $\text{v v}^{-1}$ ) foram adicionados aos frascos reacionais. Em seguida, os frascos foram fechados e colocados no carrossel do microondas com cavidade. O programa de aquecimento usado está descrito na Tabela 02.

Tabela 02 - Programa de aquecimento do forno de microondas com cavidade.

Etapa	Tempo (min)	Pmáx(W)	T(°C)	P(bar)
1	6	750	90	35
2	4	750	90	35
3	8	1000	180	35
4	15	1000	180	35
Ventilação	20	-	-	-

Após o término do programa de aquecimento, os frascos foram retirados do carrossel do forno e deixou-se esfriar a temperatura ambiente. Logo após, a pressão residual foi cuidadosamente desprendida em cada frasco, por abertura gradual em ambiente com exaustão. Esses frascos foram abertos, e os digeridos foram transferidos para frascos de polipropileno e avolumados com água desionizada até o volume de 20 mL.

O processamento das amostras de soro seguiu o protocolo proposto por Fernandez (2005): uma alíquota de 0,1 mL das amostras de plasma foi diluída 100 vezes com Triton X-100® 0,01% (v v<sup>-1</sup>) para um volume final de 10 mL e estocada em geladeira antes da análise.

### 3.4 Instrumentação

#### 3.4.1 Obtenção das Amostras

A liofilização das amostras foi efetuada em um liofilizador (modelo Terroni Fauvel LT 1000/8), acoplado a uma bomba a vácuo (Figura 4).

O procedimento de digestão foi realizado em forno de microondas com cavidade, (Ethos Ez, Milestone, Itália) (Figura 5).



Figura 05- Liofilizador.

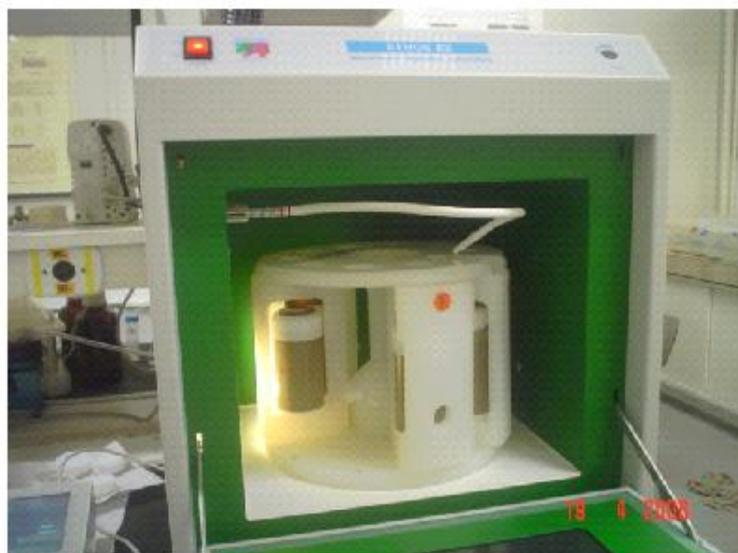


Figura 06 - Forno de microondas com cavidade, utilizado para a digestão das amostras.

### 3.4.2 Determinação dos Analitos

As determinações foram realizadas empregando um espectrômetro de emissão óptica com plasma de argônio indutivamente acoplado (VARIAN, Mulgrave, Austrália) simultâneo, com arranjo axial e detector do estado sólido (Figura 06). O sistema óptico do ICP OES foi calibrado com solução estoque multielementar enquanto que para o alinhamento óptico utilizou-se uma solução contendo Mn  $5,0 \text{ mg L}^{-1}$ . As linhas espectrais foram selecionadas de acordo com a ausência de interferências espectrais e sensibilidade adequada para a determinação de elementos em baixas e altas concentrações, mediante estudo de linhas de emissão dos elementos a serem investigados. A Tabela 03 mostra as condições experimentais utilizadas para as determinações.

Tabela 03 - Condições experimentais utilizadas no equipamento de ICP OES com configuração axial

Potência RF (kW)	1,3																		
Vazão do gás de nebulização (L min <sup>-1</sup> )	0,70																		
Vazão do gás auxiliar (L min <sup>-1</sup> )	1,5																		
Vazão do gás do plasma (L min <sup>-1</sup> )	15																		
Tempo de integração (s)	1,0																		
Tempo de estabilização (min)	15																		
Tempo de leitura (min)	1																		
Replicatas	3																		
Nebulizador	V-Groove																		
Câmara de Nebulização	Sturman - master																		
Linhas Espectrais (nm)	<table border="0"> <tbody> <tr> <td>Cd (II)</td> <td>Fe (II)</td> <td>Cu (I)</td> </tr> <tr> <td>226,502</td> <td>238,203</td> <td>327,398</td> </tr> <tr> <td>Mg (II)</td> <td>Pb (II)</td> <td>Zn (I)</td> </tr> <tr> <td>280,267</td> <td>220,354</td> <td>213,858</td> </tr> <tr> <td>Se (II)</td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td>196,026</td> <td></td> <td></td> </tr> </tbody> </table>	Cd (II)	Fe (II)	Cu (I)	226,502	238,203	327,398	Mg (II)	Pb (II)	Zn (I)	280,267	220,354	213,858	Se (II)			196,026		
Cd (II)	Fe (II)	Cu (I)																	
226,502	238,203	327,398																	
Mg (II)	Pb (II)	Zn (I)																	
280,267	220,354	213,858																	
Se (II)																			
196,026																			

(I) linha de emissão atômica / (II) linha de emissão iônica

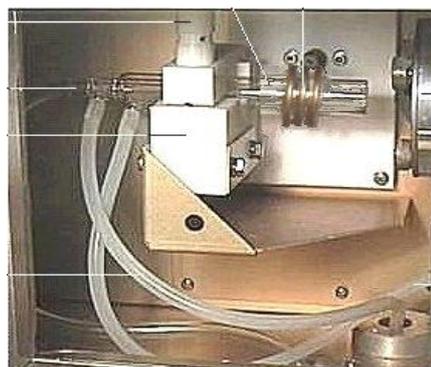


Figura 07 - Equipamento ICP OES utilizado neste trabalho e a tocha na configuração axial.

### 3.5 Curvas analíticas de calibração

Para a execução deste estudo foram construídas curvas analíticas de calibração nos meios: ácido (HNO<sub>3</sub>) a 65%, Triton X-100® 0,01%, branco digerido e o digerido de tecidos e soro utilizando o procedimento de forno de microondas com radiação focalizada:

1. Ácido diluído: a curva analítica de calibração (0,0; 0,1; 0,25; 0,5; 1,0; 2,5; 5,0; 7,5; 10,0 µg mL<sup>-1</sup>) foi preparada tomando-se alíquotas da solução estoque 20 µg mL<sup>-1</sup> de Cu, Fe, Mg (60 µg mL<sup>-1</sup>), Se, Zn, Cd e Pb e o volume foi completado com água Milli-Q® para 5,0 mL em frasco de polipropileno;
2. Triton X-100®: a curva analítica de calibração (0,0; 0,1; 0,25; 0,5; 1,0; 2,5; 5,0; 7,5; 10,0 µg mL<sup>-1</sup>) foi preparada tomando-se alíquotas da solução estoque 20 µg mL<sup>-1</sup> de Cu, Fe, Mg

(60  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ), Se, Zn, Cd e Pb e o volume foi completado com solução de Triton X-100® (0,01%) para 5,0 mL em frasco de polipropileno;

Os coeficientes angulares das curvas analíticas construídas nos diferentes meios foram comparados, utilizando o teste t-pareado para 95% de confiança.

### **3.6 Validação dos procedimentos propostos para quantificação dos elementos por ICP OES**

A validação é uma das etapas do processo analítica capaz de garantir a qualidade e aplicabilidade de um método, através da estimativa das figuras de mérito (RIBEIRO et al., 2002). Para que o método atenda às exigências das aplicações analíticas, este deve apresentar precisão, exatidão, linearidade, sensibilidade, faixa de aplicação, especificidade, reprodutibilidade e estabilidade adequados à análise (INMETRO, 2007).

Alguns parâmetros neste trabalho foram investigados no processo de validação, no intuito de medir a qualidade analítica dos resultados obtidos pelo método aplicado. Os parâmetros foram: Efeito de matriz, precisão, limites de detecção (LOD), limite de quantificação (LOQ) e exatidão.

#### **3.6.1 Avaliação do efeito de matriz**

Em trabalho anterior, realizado por Rosa e colaboradores (2009) foram estudados procedimentos para determinação de metais e Se em tecidos de cetáceos, entre eles rim, músculo, fígado e músculo. Para avaliação do efeito de matriz, utilizou-se a técnica de adição de analito, considerando que as amostras de tecidos são complexas, possuindo espécies que podem afetar as propriedades dos elementos a serem determinados. As curvas analíticas foram preparadas com padrões de 7 níveis de concentração, na faixa de 0,1 a 2,0  $\mu\text{g L}^{-1}$ , e mais um branco em meio de  $\text{HNO}_3$  a 2,0  $\text{mol L}^{-1}$ . Foram comparadas as inclinações obtidas com as curvas analíticas preparadas em meio de  $\text{HNO}_3$  a 2,0  $\text{mol L}^{-1}$  e de soluções resultantes de procedimento de digestão usando soluções ácidas diluídas e peróxido de hidrogênio. Os autores concluíram que esses efeitos não são estatisticamente significativos para os analitos investigados, para o nível de confiança de 95%.

A comparação das curvas analíticas (inclinações das curvas de regressão linear), com adição de alíquotas da solução multielementar nos digeridos da amostra, com uma curva analítica sem a presença da matriz, é recomendada de forma a avaliar a influência da solução final dos digeridos sobre a intensidade de emissão dos analitos. Se as duas curvas

analíticas forem paralelas, ou seja, a razão entre as inclinações das duas curvas sejam iguais ou próximas a unidade, o método é considerado seletivo, não havendo a interferência de matriz na determinação do analito de interesse.

Assim, como neste estudo foi utilizado o mesmo procedimento do trabalho citado acima para preparo das curvas analíticas, pode-se concluir que o processo de digestão dos tecidos foi eficiente e não se verifica efeito relacionado à matriz.

### **3.6.2 Avaliação da precisão**

A precisão é dada pelo grau de concordância entre os resultados do teste analítico aplicado repetidamente a várias amostragens de uma mesma amostra sob condições definidas. Geralmente, a precisão é expressa por meio da repetibilidade e reprodutibilidade do método analítico sob condições normais de operação. Com os valores dos resultados obtidos, são calculados a média, o desvio padrão (SD), determinando-se o coeficiente de variação (CV) para cada analito de interesse presentes na amostra, que deve estar em torno de 1 a 2% para compostos em macro quantidades, enquanto que para traços o CV deve ser até 20%, dependendo da complexidade da amostra (INMETRO, 2007).

Neste estudo, a precisão foi determinada pela repetibilidade (sete repetições), utilizando as amostras nas mesmas concentrações, no mesmo dia. O cálculo da precisão pode ser efetuado como descrito abaixo:

$$CV\% = DP/CMD \times 100$$

Onde:

DP = desvio padrão;

CMD = concentração média determinada

### **3.6.3 Limite de detecção (LOD) e limite de quantificação (LOQ)**

Os limites de detecção e quantificação foram obtidos a partir dos reagentes em branco após os mesmos procedimentos que as amostras das soluções dos digeridos de rim, fígado, coração, pulmão e ração. Para a determinação do LOD e do LOQ, foram realizados 10 ensaios, ou seja, dez soluções correspondentes ao branco foram submetidas ao processo de decomposição e os sinais (intensidade de emissão) foram medidos por ICP OES e calculou-se o LOD e o LOQ baseando-se na razão entre o desvio padrão dos brancos e a inclinação da

curva analítica (INMETRO, 2007). O cálculo do limite de detecção pode ser efetuado como descrito abaixo:

$$\text{LOD} = 3s / S$$

Onde:

**s** = desvio padrão correspondente às intensidades de sinal de 10 brancos

**S** = coeficiente angular da curva analítica de calibração

O limite de quantificação corresponde a menor quantidade do analito em uma amostra que pode ser determinada com precisão e exatidão aceitáveis sob as condições experimentais estabelecidas. O cálculo do limite de quantificação pode ser efetuado como descrito a seguir:

$$\text{LOQ} = 10s / S$$

Onde:

**s** = desvio padrão correspondente às intensidades de sinal de 10 brancos

**S** = coeficiente angular da curva analítica de calibração

#### **3.6.4 Avaliação da exatidão**

A exatidão do método representa o grau de concordância entre o resultado de um ensaio e o valor de referência aceito como verdadeiro. A exatidão é considerada sempre dentro de limites a um dado nível de confiança (ou seja, aparece sempre associada a valores de precisão). Os processos geralmente utilizados para avaliação da exatidão de um método são: materiais de referências, comparação interlaboratoriais, ensaios de recuperação e técnica de adição de analitos (INMETRO, 2007).

A exatidão do método proposto foi avaliada pela comparação dos resultados das amostras com os de referência NIST 1557b de fígado bovino (Gaithersburg, Maryland, USA). O material certificado foi digerido com o mesmo programa utilizado para as amostras de tecido. Cada porção teste foi preparada em triplicata e analisada cinco vezes a fim de obter a média, desvio padrão e desvio padrão relativo. Como forma de comparar os resultados obtidos utilizou-se como método estatístico de significância o teste t a fim de decidir se são estatisticamente diferentes ou não.

## **CAPÍTULO 4 - APRESENTAÇÃO E DISCUSSÃO DOS RESULTADOS**

A seguir estão apresentados e discutidos os resultados obtidos para a definição dos procedimentos de decomposição das amostras de tecidos e soro sanguíneo, visando determinação de elementos essenciais e não essenciais por ICP OES.

### **4.1 Validação dos procedimentos para quantificação dos elementos Cu, Mg, Fe, Se, Zn, Cd e Pb por ICP OES.**

Após a definição do procedimento de preparo das amostras, foi efetuado o processo de validação, com o objetivo de assegurar que o procedimento analítico proposto produza resultados reprodutíveis e confiáveis, e que estejam de acordo com os fins aos quais foram elaborados.

Neste trabalho, alguns parâmetros foram investigados no processo de validação, com o intuito de medir a qualidade analítica dos resultados obtidos pelo método. Os parâmetros investigados foram: precisão, limites de detecção (LOD), limite de quantificação (LOQ) e exatidão.

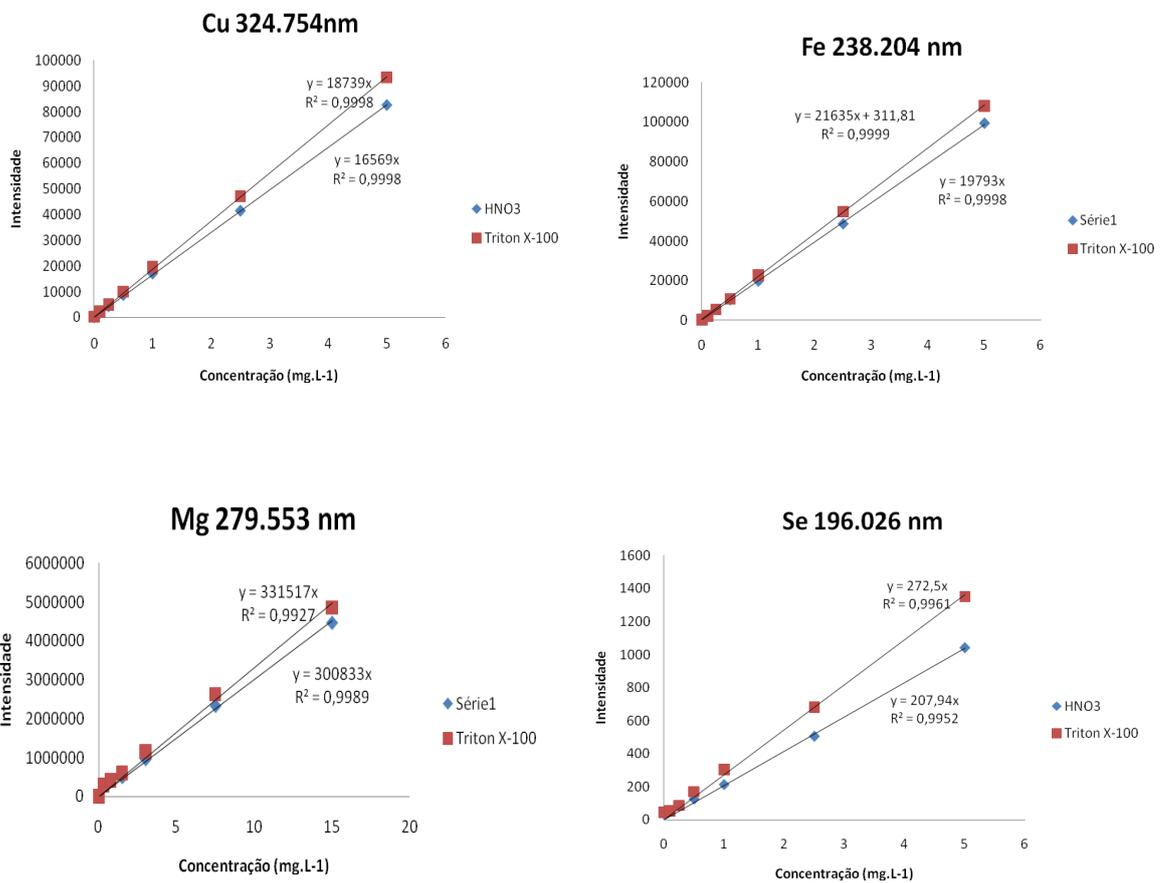
#### **4.1.1 Estudo da linearidade das curvas analíticas**

As linhas de emissão de cada analito foram estudadas (Tabela 02) e foram construídas curvas de calibração (Figura 08) em soluções de ácido nítrico 2,0 mol L<sup>-1</sup> e de triton X-100® 0,01% para avaliação da sensibilidade, de forma a selecionar adequadamente o comprimento de onda a ser utilizado na determinação dos elementos de interesse pela técnica ICP OES.

Considerando soluções ácidas, algumas propriedades físicas são diferentes em comparação a soluções aquosas. Alterações na viscosidade e tensão superficial promovem alterações na aspiração e nebulização das soluções, enquanto que propriedades como densidade e volatilidade afetam o transporte do aerossol através da câmara de nebulização.

Em relação aos coeficientes angulares obtidos para as curvas analíticas (Figura 08) preparadas nos meios estudados, para cada analito estudado, os valores obtidos para as soluções preparadas em Triton X-100® 0,01% foram superiores àqueles obtidos para o meio

nítrico. Estes resultados podem ser creditados a menor tensão superficial do meio associado a esta solução de surfactante, que torna mais eficiente a etapa de nebulização e transporte, com a geração de gotículas menores do aerossol primário no ICP OES. Assim, para a determinação nas amostras de soro, que são avolumadas em meio de Triton X-100® 0,01%, as soluções para a curva analítica de calibração devem ser preparadas neste meio. Observa-se também que as curvas de calibração em meio Triton X-100® foram calculadas até o ponto 5 mg L<sup>-1</sup>, tendo em vista que, com o ajuste da curva, foi necessário retirar os pontos acima deste, a fim de obter um melhor valor de R<sup>2</sup>, bem como para efeito de comparação com as curvas em Triton®.



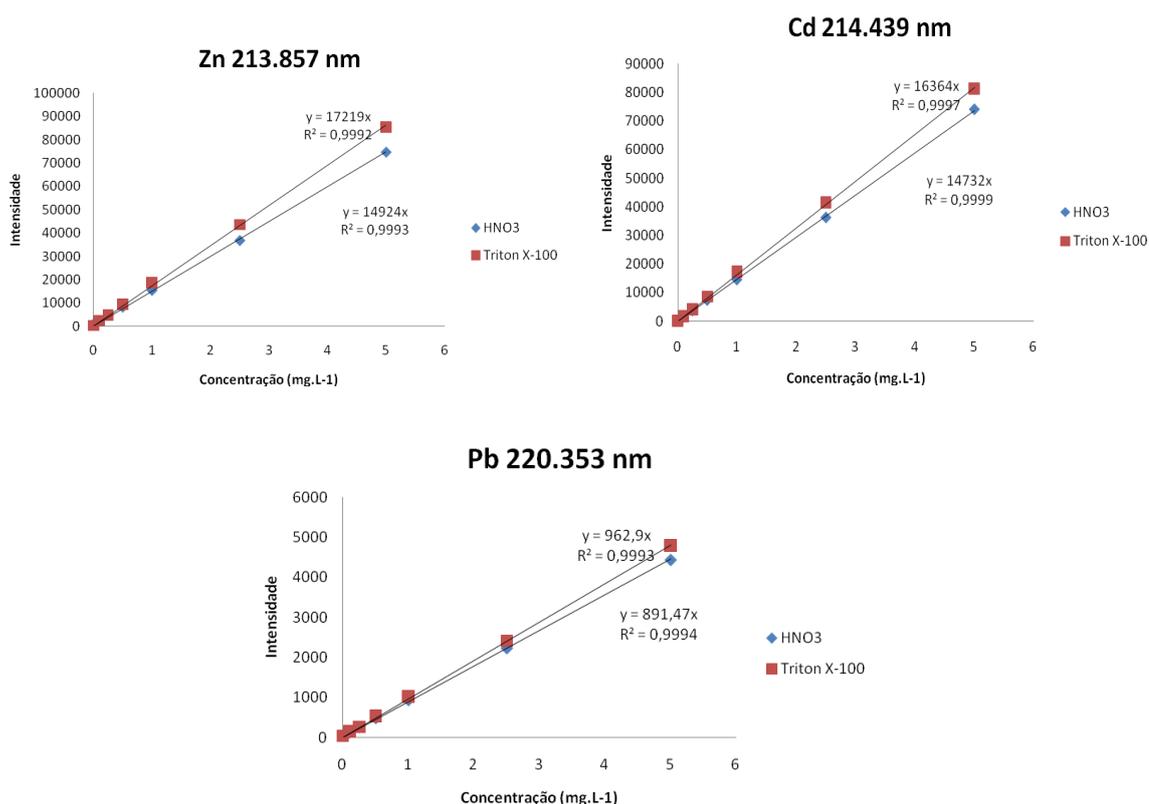


Figura 07. Curvas de calibração construídas em HNO<sub>3</sub> (65%) e Triton X-100® 0,01% para os elementos Cu, Fe, Mg, Se, Zn, Cd e Pb.

#### 4.1.2 Precisão

Foram realizadas sete repetições da mesma amostra para o método proposto sob a mesma condição, e feito o cálculo do CV para o Cu, Fe, Mg, Se, Zn, Cd e Pb presentes nas soluções de digeridos de tecidos e soro sanguíneo de ratos.

Os valores de CV para Cu, Fe, Mg, Se e Zn encontraram-se dentro do limite de até 20%, pois quando se faz análise de traços em amostras complexas tais como as de tecidos de ratos. Os elementos encontrados para as amostras de rim e coração apresentaram CV mais próximos a 20%, em relação a outros tecidos, tendo em vista a dificuldade em liofilizar e triturar estas amostras, devido à própria constituição química, o que dificultou uma melhor homogeneização das mesmas para fins de obtenção de dados com maior precisão. Para os elementos Pb, Mg e Se foram obtidos valores inferiores a 10% enquanto que os valores para os elementos Cu, Fe, Zn e Cd foram inferiores a 5%. Pode-se concluir que o método apresenta precisão para a determinação de Cu, Fe, Mg, Se, Zn, Cd e Pb nas soluções dos digeridos de fígado, coração, pulmão, rim e soro de ratos do grupo controle.

#### 4.1.3 Limites de detecção (LOD) e Quantificação (LOQ)

O limite de detecção corresponde a menor quantidade do analito presente numa amostra passível de ser detectado embora não necessariamente quantificado nas condições de trabalho estabelecidas. O limite de quantificação corresponde à menor quantidade do analito em uma amostra que pode ser determinada com precisão e exatidão aceitáveis sob as condições experimentais estabelecidas. Os cálculos do limite de detecção e quantificação podem ser efetuados como descrito a seguir (RIBEIRO; ZEZZI, CADORE, 2002).

O LOD foi determinado com base no desvio padrão das intensidades de sinal de 10 brancos analíticos, multiplicado por 3, e sua relação com a inclinação da reta (coeficiente angular) na curva de calibração padrão construída a baixas concentrações. Já LOQ foi definido como dez vezes o desvio padrão de dez leituras do branco, dividido pela inclinação da curva (coeficiente angular) de calibração (INMETRO, 2007).

Os valores obtidos para LOD e LOQ para os elementos Cu, Fe, Mg, Pb, Cd, Se e Zn estão listados na tabela 04:

Tabela 04 - Limites de Detecção e de Quantificação obtidos para decomposição ácida em microondas.

Elementos	LOD em mg L <sup>-1</sup>	LOQ em mg L <sup>-1</sup>
<b>Cu</b>	0,003	0,010
<b>Fe</b>	0,038	0,128
<b>Mg</b>	0,020	0,800
<b>Pb</b>	0,019	0,064
<b>Cd</b>	0,001	0,003
<b>Se</b>	0,036	0,119
<b>Zn</b>	0,012	0,041

#### 4.1.4 Avaliação da Exatidão

Neste trabalho, a exatidão foi estimada através do material de referência certificado de fígado bovino NIST 1577b para cada solução de digerido de tecidos de ratos do grupo controle. As amostras do material certificado foram submetidas aos procedimentos de decomposição em microondas e os resultados obtidos são evidenciados na Tabela 06. Para os elementos Cu, Fe, Zn, Mg e Cd foram encontradas diferenças significativas entre os valores certificados e aqueles obtidos para os procedimentos de decomposição sugeridos após aplicação do teste-t pareado, ao nível de 95% de confiança. Após a aplicação do teste t, verificou-se que os valores de t calculado para Cu, Fe, Zn e Mg apresentaram-se acima do valor de t tabelado, concluindo que os resultados são diferentes do valor conhecido,

fornecido pelo NIST 1557b e que a chance de que tenha sido cometido erro ao se concluir que eles são diferentes é menor do que 5%. Ao contrário, o valor de t calculado para os valores referentes ao Cd foi menor que o t tabelado, demonstrando que não há uma diferença significativa, ao nível de confiança de 95%.

Para os elementos Se e Pb foram encontrados valores abaixo do LOQ da técnica. Infelizmente não foi possível repetir este experimento devido a problemas relacionados à interdição dos laboratórios e no equipamento ICP OES.

Tabela 05 - Comparação dos teores (n = 3) de macro, micro e elementos traço obtidos por decomposição em microondas para o material de referência NIST 1577b.

Elemento	Microondas $\mu\text{g g}^{-1}$	Valores certificados $\mu\text{g g}^{-1}$	Valor medido/ certificado
<b>Cu</b>	151 $\pm$ 1	160 $\pm$ 8	0,95
<b>Fe</b>	166 $\pm$ 2	184 $\pm$ 15	0,91
<b>Zn</b>	110 $\pm$ 1	127 $\pm$ 16	0,87
<b>Mg</b>	585 $\pm$ 8	601 $\pm$ 28	0,83
<b>Se</b>	< LOQ	0,73 $\pm$ 0,06	-
<b>Cd</b>	0,56 $\pm$ 0,06	0,50 $\pm$ 0,03	1,16
<b>Pb</b>	< LOQ	0,129 $\pm$ 0,04	-

#### 4.2 Parâmetros das amostras analisadas

Os pesos do corpo e dos tecidos são mostrados na tabela 06. Com base na tabela acima, percebe-se que não há uma variação perceptível do peso corporal nem dos tecidos entre animais do grupo controle e do grupo que recebeu furosemida por uma semana, tendo em vista estes animais possuem um metabolismo acelerado e ganharem peso rapidamente, o que tornou difícil a perda de peso corporal com o uso do agente diurético.

Tabela 06 – Peso corporal e tecidual dos grupos animais.

Animais corporais/grupos	Peso corporal (g)	Peso úmido médio(g)				Peso seco medio(g)			
		Fígado	Rim	Coração	Pulmão	Fígado	Rim	Coração	Pulmão
Macho sem diurético	370 $\pm$ 19	10,11	2,03	0,84	2,09	2,78	0,53	0,25	0,49
Fêmea sem diurético	212 $\pm$ 34	7,94	1,59	0,97	1,74	2,43	0,47	0,16	0,33
Macho com diurético	367 $\pm$ 24	10,66	2,67	1,38	2,77	2,95	0,51	0,37	0,72
Fêmea com diurético	213 $\pm$ 29	7,21	1,60	0,93	1,66	2,24	0,59	0,25	0,43

Em relação ao peso seco dos tecidos dos animais, há uma perda média de água para os tecidos dos ratos machos em 72%, 78%, 72% e 75% para fígado, rim, coração e pulmão e para as fêmeas em 69%, 67%, 78% e 77% para os mesmos tecidos.

### 4.3 Resultados obtidos para os diferentes tipos de tecidos

Após a definição dos parâmetros instrumentais, foi realizada a determinação de Cu, Fe, Mg, Se, Zn, Cd e Pb em soluções dos digeridos de fígado, coração, rim, pulmão e soro de ratos por ICP OES no grupo controle e no grupo que recebeu a furosemida.

A distribuição de Cu, Fe, Mg, Se, Zn, Cd e Pb nos diferentes tipos de tecidos e soro de ratos foi estudada, no intuito de relacionar o nível de concentração corporal desses elementos com as possíveis implicações no funcionamento do organismo animal frente a administração do diurético furosemida. Espera-se que ocorra uma variação significativa nas concentrações nos diferentes tecidos de cada animal, entre os grupos de ratos estudados de ambos os sexos, bem como entre os grupos controle e dos animais que receberam o diurético, por via intraperitoneal. Isto se deve ao fato do diurético furosemida ser um excelente extrator de líquidos corporais, que poderá carrear junto, diversos microelementos essenciais para fora do organismo. A diferença entre os tecidos deve-se a característica intrínseca de cada elemento em possuir afinidade específica por certas estruturas fisiológicas de certos tecidos corporais.

#### 4.3.1 Concentração de Cobre (Cu) em amostras de tecidos e soro.

As concentrações obtidas para Cu nas soluções de digeridos de tecidos e soro sanguíneo de ratos Wistar estão apresentadas na Tabela 07.

Tabela 07 - Teor médio ( $\mu\text{g g}^{-1}$ )  $\pm$  desvio padrão (n = 3) de Cu quantificados por ICP OES em amostras de digeridos de tecidos e soro de ratos Wistar por decomposição em forno de microondas.

Elementos	Média $\pm$ SD do Cu / grupos			
	Grupo controle		Grupo Furosemida	
	Macho	Fêmea	Macho	Fêmea
Fígado	13,3 $\pm$ 0,2	17,0 $\pm$ 0,2	12,1 $\pm$ 0,1	17,1 $\pm$ 0,1
Rim	29,4 $\pm$ 1,1	48,7 $\pm$ 5,8	20,3 $\pm$ 0,04	41,4 $\pm$ 3,3
Coração	18,4 $\pm$ 0,5	21,6 $\pm$ 0,6	17,6 $\pm$ 1,2	18,0 $\pm$ 1,4
Pulmão	5,18 $\pm$ 0,13	7,38 $\pm$ 0,34	5,11 $\pm$ 0,1	5,93 $\pm$ 0,00
Soro	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ

Da análise dos dados obtidos na tabela acima, pode-se inferir que há um maior acúmulo de Cu nos rins que em outros tecidos biológicos, diferindo de resultados para humanos. Segundo a literatura, em humanos, os tecidos que apresentam maiores concentrações de Cu são fígado, cérebro, baço, osso e músculo esquelético; sendo fígado e

baço considerados órgãos de reserva, cujas concentrações observadas têm sido inversamente proporcionais à idade (PEDROZA; CAMPOS, COZZOLINO, 1999).

Por outro lado, segundo Uchino e colaboradores (1990), é de se esperar concentrações de Cu no fígado e rim de ratas fêmeas mais elevadas quando comparadas a estes tecidos de ratos machos. Isto pode ser relacionado com uma acumulação de Cu-tioneína, que é dependente da idade e sexo. No presente estudo, as ratas fêmeas apresentaram quantidades de Cu superiores aos machos em todos os tecidos.

As perdas de Cu nos tecidos variaram de 1 a 31 % para os machos e de 15 a 20 % entre as fêmeas. Para os machos a maior perda foi verificada nos rins, enquanto que para as fêmeas as maiores perdas foram para pulmão seguida de coração, sendo que para ambos os sexos houve semelhança na redução da concentração de Cu (em torno de 16%) para todos os tecidos. Isso se deve ao fato de o Cu ser reabsorvido pelos rins e extraído do sangue para suprir a deficiência em outros tecidos, enquanto é eliminado pela via urinária, após efeito da furosemida.

A importância biológica, funcional e estrutural do cobre em animais e humanos está relacionada com as funções metabólicas de enzimas cobre-dependentes (cuproenzimas). Estas catalisam reações fisiológicas importantes relacionadas com fosforilação oxidativa, inativação de radicais livres, biossíntese de colágeno e elastina, formação de melanina, coagulação sangüínea, metabolismo de ferro e síntese de catecolaminas (PEDROZA; CAMPOS, COZZOLINO, 1999). Isto explica o fato do Cu não ser detectado no soro, tendo em vista estas enzimas estarem em maior quantidade na parte vermelha do sangue que no soro.

Os níveis de Cu no soro foram abaixo do LOQ. Segundo Uchino (1990), o cobre é transportado do soro ligado a albumina para ser incorporado a proteínas no fígado (metalotioneínas), principalmente em situações que provoquem redução em seus níveis. Isto é demonstrado pela pequena variação dos níveis de Cu no fígado em ambos os sexos, após administração da furosemida, pois proteína não é filtrada/eliminada pelos rins normalmente.

#### **4.3.2 Concentração de Ferro (Fe) em amostras de tecidos e soro.**

As concentrações obtidas para Fe nas soluções de digeridos de tecidos e soro sanguíneo de ratos Wistar estão apresentadas na Tabela 08.

Tabela 08 – Teor médio ( $\mu\text{g g}^{-1}$ )  $\pm$  desvio padrão (n = 3) de Fe quantificados por ICP OES em amostras de digeridos de tecidos e soro de ratos Wistar por decomposição em forno de microondas.

Elementos	Média $\pm$ SD de Fe / grupos			
	Grupo controle		Grupo Furosemida	
	Macho	Fêmea	Macho	Fêmea
<b>Fígado</b>	531 $\pm$ 18	1023 $\pm$ 95	523 $\pm$ 5	914 $\pm$ 4
<b>Rim</b>	362 $\pm$ 9	416 $\pm$ 97	263 $\pm$ 1	370 $\pm$ 14
<b>Coração</b>	643 $\pm$ 31	454 $\pm$ 9	903 $\pm$ 27	640 $\pm$ 15
<b>Pulmão</b>	408 $\pm$ 4	644 $\pm$ 40	679 $\pm$ 26	742 $\pm$ 39
<b>Soro</b>	2,11 $\pm$ 0,3	3,05 $\pm$ 0,04	1,01 $\pm$ 0,05	2,69 $\pm$ 0,23

Da análise dos dados obtidos na tabela 08, observa-se que há um acúmulo de Fe no fígado dos animais machos e fêmeas. A literatura (FAIRWEATHER-TAIT; HURRELL, 1996) diz que em machos adultos, 95% do Fe requerido para síntese de hemoglobina é derivado das células sanguíneas vermelhas degradadas. O corpo não tem um mecanismo ativo para excreção de Fe e qualquer excesso é estocado como ferritina ou hemossiderina, principalmente, no fígado e baço. A maior parte do ferro encontra-se na hemoglobina, o transportador de oxigênio aos tecidos e uma fração menor está contida na mioglobina (LIMA, 1996). Segundo Uchino e colaboradores (1990), é de se esperar concentrações de Fe no fígado e rim de ratos fêmeas mais elevadas quando comparadas a estes tecidos de ratos machos.

As maiores perdas de Ferro foram para o soro, em torno de 52% para os machos e 12% para as fêmeas. Houve uma grande redução no ferro sérico tendo em vista que, com a excreção pelos rins e do soro (sangue), é requisitado para os tecidos de maior perfusão sanguínea, neste caso, o coração e pulmão, explicando o grande aumento desse metal nestes órgãos vitais.

As mais baixas concentrações de Ferro no soro em relação aos tecidos são explicadas pelo fato de se tratar de parte do sangue onde não contém hemáceas, e possivelmente hemoglobina, proteína carreadora de ferro no sangue. A água compõe a maior porção do plasma, compreendendo 91%.

#### 4.3.3 Concentração de Magnésio (Mg) em amostras de tecidos e plasma.

As concentrações obtidas para Mg nas soluções de digeridos de tecidos e plasma sanguíneo de ratos Wistar estão apresentadas na Tabela 09.

Tabela 09 - Teor médio ( $\mu\text{g g}^{-1}$ )  $\pm$  desvio padrão ( $n = 3$ ) de Mg quantificados por ICP OES em amostras de digeridos de tecidos e plasma de ratos Wistar por decomposição em forno de microondas.

Elementos	Média $\pm$ SD de Mg / grupos			
	Grupo controle		Grupo Furosemida	
	Macho	Fêmea	Macho	Fêmea
<b>Fígado</b>	592 $\pm$ 44	615 $\pm$ 13	561 $\pm$ 14	603 $\pm$ 12
<b>Rim</b>	605 $\pm$ 5	538 $\pm$ 9	452 $\pm$ 32	519 $\pm$ 7
<b>Coração</b>	681 $\pm$ 1	820 $\pm$ 2	569 $\pm$ 73	613 $\pm$ 33
<b>Pulmão</b>	496 $\pm$ 2	613 $\pm$ 6	429 $\pm$ 8	428 $\pm$ 18
<b>Soro</b>	19,5 $\pm$ 1,2	29,5 $\pm$ 0,4	22,5 $\pm$ 3,2	19,8 $\pm$ 1,4

Da análise dos dados obtidos na tabela 09, observa-se que há um maior acúmulo de Mg no coração tanto de ratos machos quanto fêmeas, porém, nos outros tecidos não há um padrão de uniformidade na distribuição do Mg, demonstrando um maior acúmulo no fígado e rim.

Segundo Fairweather-Tait e Hurrell (1996), o Mg absorvido é retido tanto para crescimento do tecido ou reposição, com o esqueleto agindo como estoque e o remanescente é excretado na urina. Quando o consumo diminui, o fígado é muito eficiente em conservar Mg a fim de manter a homeostase. Sua absorção ocorre de 30 a 50% na ingestão oral, na porção jejunoileal do intestino delgado. Circula ligado à albumina e é armazenado nos ossos (60 a 65%), músculos (26%) e o restante em tecidos moles e líquidos corporais (6 a 8%). Reabsorvido de forma ativa no néfron e passiva no túbulo proximal. Ocorre excreção urinária (1,4 mg/Kg/dia) e fecal (0,5 mg/Kg/dia). Os rins conservam o magnésio de forma eficiente, em particular quando sua ingestão está baixa (DUARTE, 2003).

Segundo Duarte (2003), o Mg tem papel fundamental em várias reações biológicas, como ativador de sistemas enzimáticos que controlam o metabolismo de carboidratos, lipídeos, proteínas e eletrólitos; influencia a integridade e transporte da membrana celular; media as contrações musculares e transmissões de impulsos nervosos e é co-fator da fosforilação oxidativa. O Mg é indispensável a fixação de cálcio nos ossos, podendo causar ou agravar quadros de osteopenia e osteoporose no adulto e dificultar a calcificação correta dos ossos na infância e adolescência.

De acordo com a tabela 09, a extensão da redução das concentrações de Mg nos tecidos variaram de 5 a 25% para os machos, enquanto que para as fêmeas variaram de 2 a 33%, sendo as maiores perdas no rim dos ratos machos (25%) e no soro das fêmeas (33%).

#### 4.3.4 Concentração de Zinco (Zn) em amostras de tecidos e plasma.

As concentrações obtidas para Zn nas soluções de digeridos de tecidos e plasma sanguíneo de ratos Wistar estão apresentadas na Tabela 10.

Tabela 10 - Teor médio ( $\mu\text{g g}^{-1}$ )  $\pm$  desvio padrão ( $n = 3$ ) de Zn quantificados por ICP OES em amostras de tecidos e plasma de ratos *Wistar* por decomposição em forno de microondas.

Elementos	Média $\pm$ SD de Zn / grupos			
	Grupo controle		Grupo Furosemida	
	Macho	Fêmea	Macho	Fêmea
<b>Fígado</b>	103 $\pm$ 0,5	92,7 $\pm$ 0,7	99,4 $\pm$ 1,2	93,0 $\pm$ 0,8
<b>Rim</b>	80,4 $\pm$ 1,1	74,0 $\pm$ 0,3	66,7 $\pm$ 1,3	73,8 $\pm$ 2,1
<b>Coração</b>	62,9 $\pm$ 0,3	68,7 $\pm$ 0,4	60,9 $\pm$ 1,0	56,3 $\pm$ 2,6
<b>Pulmão</b>	63,2 $\pm$ 2,5	79,7 $\pm$ 1,5	63,4 $\pm$ 0,3	66,8 $\pm$ 3,1
<b>Soro</b>	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ

Da análise dos dados obtidos na tabela 10, observa-se que há um maior acúmulo de Zn no fígado, seguido dos rins, embora para as fêmeas há um acúmulo no fígado, seguido do pulmão. No soro, os níveis de Zn foram abaixo do LOQ.

Boa parte do zinco contido na dieta é absorvida no duodeno, sendo, então, mobilizado no fígado por uma proteína carreadora específica, denominada metalotioneína. O Zn ao contrário dos demais elementos, não é estocado em nenhum órgão. Ele se constitui “pool” móvel, comandado por uma proteína específica, que o mobiliza para um tecido ou órgão de maior demanda (LEHNINGER, 1985).

O Zn é transportado no plasma pela albumina e  $\alpha$ -2-macroglobulina, e está presente em todos órgãos, tecidos e fluidos do corpo. É primariamente um íon intracelular e somente aproximadamente 0,1% do Zn do corpo é encontrado no soro. O osso e músculo esquelético contam com mais de 80% do Zn corporal. O conteúdo de Zn é regulado pelos mecanismos homeostáticos por mudanças na absorção (normalmente 20-40%) e excreção urinária ( $0,5\text{mg dL}^{-1}$ ) e excreção intestinal ( $1-3\text{ mg dL}^{-1}$ ) (FAIRWEATHER-TAIT; HURREL, 1996).

Com base na tabela 10, ocorreram reduções de Zn entre 3 a 17 % para os machos do grupo controle e entre 16 a 18 % para as fêmeas do grupo controle, sendo que a maior redução foi para o rim, com 17% para machos e para as fêmeas, o coração com 18%. O fígado foi o órgão que menos sofreu perdas de Zn, mantendo-se praticamente constante para ambos os sexos.

A acumulação do Cu e Zn principalmente no fígado e rins é mediada pela ligação com proteínas de baixo peso molecular ricas em cisteína, metalotioneína (TOWNSEND, 1998). Isso explica também a baixa eliminação desses dois elementos no fígado mesmo com o uso do diurético.

#### 4.3.5 Concentração de Se, Cd e Pb em amostras de tecidos e soro.

As concentrações obtidas para Se, Cd e Pb nas soluções de digeridos de tecidos e no soro sanguíneo de ratos Wistar se encontraram abaixo do LOQ. Assim, não foi possível fazer uma análise sobre o comportamento destes elementos nas amostras digeridas.

#### 4.3.6 Comparação das concentrações de Cu, Fe, Mg, e Zn em amostras biológicas dos ratos do grupo controle.

De acordo com a tabela 11, para os ratos machos, há uma maior acúmulo de Cu nos rins, Fe e Mg no coração e Zn no fígado. Após administração da furosemida, os elementos Cu e Zn mantiveram seus níveis no coração e pulmão que são órgãos vitais. Em relação ao Fe, os tecidos que mais sofreram acúmulo foram o coração e pulmão, semelhante ao Cu e Zn.

Tabela 11: Concentrações ( $\mu\text{g g}^{-1}$ ) para Cu, Fe, Mg e Zn em amostras biológicas de ratos machos no presente estudo.

Animais/ Amostras	Elementos			
	Cu	Fe	Mg	Zn
Controle (Macho)				
Fígado	13,3 ± 0,2	531 ± 18	592 ± 44	103 ± 0,4
Rim	29,4 ± 1,1	361 ± 9	605 ± 5	80,4 ± 1,1
Coração	18,4 ± 0,5	643 ± 31	681 ± 1	62,9 ± 0,3
Pulmão	5,18 ± 0,1	408 ± 4	496 ± 2	63,2 ± 2,5
Soro ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )	< LOQ	2,11 ± 0,26	19,5 ± 1,2	< LOQ
Furosemida (Macho)				
Fígado	12,1 ± 0,1	523 ± 5	561 ± 14	99,4 ± 1,2
Rim	20,3 ± 0,04	263 ± 1	452 ± 32	66,7 ± 1,3
Coração	17,6 ± 1,2	903 ± 27	569 ± 73	60,9 ± 1,0
Pulmão	5,11 ± 0,1	679 ± 26	429 ± 8	63,4 ± 0,3
Soro ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )	< LOQ	1,01 ± 0,05	22,5 ± 3,2	< LOQ
Controle (Fêmea)				
Fígado	17,0 ± 0,2	1023 ± 95	615 ± 13	92,7 ± 0,7
Rim	48,7 ± 5,8	416 ± 97	538 ± 9	74,0 ± 0,3
Coração	21,6 ± 0,6	454 ± 9	820 ± 2	68,7 ± 0,4
Pulmão	7,38 ± 0,34	644 ± 40	613 ± 6	79,7 ± 1,5
Soro ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )	< LOQ	3,05 ± 0,04	29,5 ± 0,4	< LOQ
Furosemida (Fêmea)				
Fígado	17,1 ± 0,1	914 ± 4	603 ± 12	93,0 ± 0,8
Rim	41,4 ± 3,3	370 ± 14	519 ± 7	73,8 ± 2,1
Coração	18,0 ± 1,4	640 ± 15	613 ± 33	56,3 ± 2,6
Pulmão	5,93 ± 0,00	742 ± 39	428 ± 18	66,8 ± 3,1
Soro ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )	< LOQ	2,69 ± 0,23	19,8 ± 1,4	< LOQ

Zn e Fe têm uma relação mais complicada onde seus efeitos nos distúrbios fisiológicos (ex. anemia) são concebidos. Fe e Zn competem primariamente pela absorção no sítio. O Zn pode inibir absorção de Fe (e vice-versa), mas parece ser dose e razão dependente (FAIRWEATHER-TAIT; HURREL, 1996). Peres e colaboradores (1999) estudaram a influência da relação Fe e Zn e da deficiência de Fe na absorção do Zn em ratos. Acima da razão molar de 2:1 houve inibição da absorção do Zn. Os dados apresentados pelos autores revelam que a inibição da absorção do Zn pelo Fe depende não só de suas quantidades, mas também do estado nutricional do indivíduo, ressaltando a importância de não se descuidar do Zn quando se inicia um programa de suplementação de Fe.

Todavia, os efeitos da suplementação de Fe sobre a biodisponibilidade de Zn de uma dieta regional em ratos também foram estudados por Pedroza e colaboradores (1999), demonstrando que um aumento da concentração de ferro na dieta (4 vezes o teor encontrado) interferiu negativamente no aproveitamento do Zn.

De acordo com Fairweather-Tait e Hurrel (1996), as interações de cobre e ferro contam que o fato do Cu sérico ter sido encontrado baixo em alguns casos de anemia por deficiência de Fe, sugere-se que o estado do ferro tem um efeito no metabolismo do Cu. Interação entre Fe e Cu parece ser devido a utilização diminuída de um na ausência de outro. Além disso, a deficiência de Cu inibe absorção de Fe em ratos e pode prevenir suplementação de Fe de ser efetiva ao passo que o Cu exerce uma função chave na absorção de Fe e transferência dentro do corpo. Níveis de Cu (e níveis de Se) diminuem se um indivíduo é deficiente em Fe.

Diante das informações acima, não se pode afirmar que a redução dos níveis de Zn e Cu nos tecidos, principalmente nos rins, com 17 % e 31 %, respectivamente, se deve a interação entre estes elementos e o Fe, tendo em vista que o trabalho não se fundamentou no estudo da interação entre estes elementos através do consumo, podendo apenas explicar o mecanismo com que o organismo promoveu a redução desses minerais.

Segundo análise da literatura, a redução do Zn nos tecidos, principalmente nos rins pode ser explicado pelo fato do Zn ser um *pool* móvel e o mesmo ser requisitado para suprir a demanda de outros tecidos. Já a redução dos níveis de Cu nos rins, pode ser explicada por sua participação no metabolismo do Fe para formação da hemoglobina.

A tabela 12 revela os percentuais de perdas dos elementos estudados nas amostras analisadas de ratos Wistar sob efeito de furosemida.

Tabela 12 – Percentual de eliminação dos metais nos tecidos e soro dos animais

Animais/sexo	Cu	Fe	Mg	Zn
Machos	16,81	- 21,83	15,08	6,36
Fêmeas	13,00	- 5,09	16,52	8,07

De um modo geral, houve acúmulo de Fe no organismo dos animais, principalmente em órgãos muito perfundidos como coração e pulmão, sugerindo que o aumento nos níveis de Fe acompanhou o aumento do volume de sangue e massa corporal dos animais.

A baixa eliminação do Zn em relação aos outros elementos pode ser explicado pela sua importância como cofator enzimático de um grande número de enzimas essenciais para a bioquímica do funcionamento do organismo, pois, segundo Uchino e colaboradores (1990), Zn compõe mais de 70 metaloenzimas em organismos e exerce uma importante função no metabolismo de ácidos nucléicos, proteínas, açúcar e lipídios ou na síntese de Ácido Desoxirribonucléico (DNA) e Ácido Ribonucléico (RNA). Os resultados sugerem que metalotioneína exercem uma função importante como estoque de Zn cujo é um elemento essencial.

A partir da observação e os dados da Tabela 11, verifica-se que os resultados encontrados, em ratos machos, para Cu, Fe, Mg e Zn são similares a valores reportados por outros autores (UCHINO et al, 1999; TAKAHASHI et al, 2002), que também detectaram baixas concentrações destes elementos em amostras biológicas de ratos de diferentes espécies, demonstrado nas tabelas 13 e 14.

Tabela 13 – Comparação das concentrações ( $\text{mg g}^{-1}$ ) para Cu, Fe, Zn, Cd e Pb em fígado e rim de ratos adultos entre trabalhos anteriores e no presente estudo.

	Presente estudo		Referência*	
Amostras de fígado				
Elemento	Macho	Fêmea	Macho	Fêmea
Cu	13,3 ± 0,2	17 ± 0,16	11,7 ± 0,8	14,6 ± 1,0
Fe	531 ± 18	1023 ± 95	410 ± 82	1080 ± 110
Zn	103 ± 0,5	92,7 ± 0,7	91,3 ± 5,0	89,1 ± 3,9
Mn	Nd	Nd	7,97 ± 0,8	9,12 ± 1,02
Hg	Nd	Nd	0,035 ± 0,006	0,043 ± 0,009
Cd	< LOQ	< LOQ	0,017 ± 0,003	0,028 ± 0,006
Pb	< LOQ	< LOQ	0,068 ± 0,019	0,085 ± 0,035
Mg	592 ± 44	615 ± 13	-	-
Amostras de rim				
Elementos	Machos	Fêmeas	Machos	Fêmeas
Cu	29,4 ± 1,1	48,7 ± 5,8	39,9 ± 10,6	77,7 ± 18,1
Fe	362 ± 9	416 ± 97	402 ± 46	687 ± 155
Zn	80,4 ± 1,1	74,0 ± 0,3	90,0 ± 3,3	100 ± 6
Mn	Nd	Nd	2,76 ± 0,37	2,59 ± 0,33
Hg	Nd	Nd	0,946 ± 0,119	0,762 ± 0,060
Cd	< LOQ	< LOQ	0,221 ± 0,057	0,244 ± 0,036
Pb	< LOQ	< LOQ	0,098 ± 0,065	0,067 ± 0,031
Mg	605 ± 5	538 ± 9	-	-

\* Uchino et al, 1999.

Nd = não determinado.

A tabela 13 faz uma comparação dos valores de concentração para elementos Cu, Fe, Mg, Zn, Cd e Pb, determinados no presente estudo com um estudo referência realizado por Uchino e colaboradores (1990) no qual as amostras de fígado e rim de ratos adultos (237 dias de idade) Sprague-Dawley são digeridas com uma mistura de  $\text{HNO}_3$  e  $\text{HClO}_4$  e determinados pela técnica de F AAS. Percebe-se que, no fígado e rins, não há uma diferença significativa quanto a concentração dos elementos Fe, Cu e Zn, demonstrando que a técnica de ICP OES aplicada no presente estudo é adequada para determinação de metais em amostras biológicas de ratos. A pequena divergência entre os valores pode estar relacionada com o peso e a idade, bem como com a espécie.

Apesar da semelhança entre os valores da maioria dos elementos, estes resultados analíticos não podem ser facilmente comparados com nossos dados, porque a acurácia destes métodos não é clara e há também diferenças na espécie, idade e condições de alimentação, bem como entre espécies.

Os dados obtidos foram comparados também com os achados de Takahashi e colaboradores (2002) para os elementos Cu, Fe, Mg, Zn, Cd e Pb entre amostras de fígado de ratos *Wistar* fêmeas, conforme demonstrado na tabela 14.

Tabela 14 - Comparação das faixas de concentrações ( $\text{mg g}^{-1}$ ) para Cu, Fe, Mg, Se, Zn, Cd e Pb em fígado de ratos *Wistar* fêmeas adultos entre trabalhos anteriores e no presente estudo.

Elementos	Referência*	Presente estudo
<b>Cu</b>	15,6 ± 0,7 (14,8 – 16,2)	17 ± 0,2
<b>Fe</b>	1011 ± 266 (745 – 1277)	1023 ± 95
<b>Mg</b>	692 ± 27 (665 – 719)	615 ± 13
<b>Se</b>	-	< LOQ
<b>Zn</b>	90,5 ± 6,6 (83,9 - 97,1)	92,7 ± 0,7
<b>Cd</b>	0,036 ± 0,014 (0,022 - 0,05)	< LOQ
<b>Pb</b>	0,044 ± 0,027 (0,017 – 0,071)	< LOQ

\*Os dados foram determinados por TAKAHASHI ET AL (2002) por ICP OES e ICP MS

Comparando-se com os dados da tabela 14 com os da tabela 11, verifica-se que para as ratas fêmeas, os metais Cu, Fe e Mg se encontram em maior concentração, no fígado, em relação aos ratos machos, corroborando também com os diferentes estudos anteriores com diferentes espécies de ratos.

Em relação a tabela 14, verifica-se que os resultados encontrados para os metais Cu, Fe, Mg e Zn são similares a valores reportados por Takahashi e colaboradores (2002) que, detectaram concentrações dos elementos Cu, Fe, Mg, Zn, Cd e Pb, em fígado digerido em  $\text{HNO}_3$  e determinado também por técnicas de plasma indutivamente acoplado (Mg e Fe por ICP OES e os outros por ICP MS). Isso demonstra mais uma vez a eficácia da técnica de ICP OES na determinação de elementos essenciais e traço em amostras biológicas de ratos.

## CAPÍTULO 5 - CONSIDERAÇÕES FINAIS

O presente trabalho teve seu objetivo principal alcançado que era o de aplicar um método analítico para determinar Cu, Fe, Mg, Se, Zn, Cd e Pb a diferentes amostras biológicas de ratos *Wistar* sob efeito do diurético furosemida, empregando ICP OES.

O método analítico proposto para determinação dos elementos acima citados por ICP OES em tecidos e soro de ratos foi validado utilizando os seguintes parâmetros: efeito de matriz, precisão, limites de detecção (LOD), limite de quantificação (LOQ) e exatidão.

Como foi utilizado o mesmo procedimento que o proposto por Rosa (2009), através da utilização da técnica de adição de analitos, verificou-se que não houve efeito de matriz quando do processo de digestão dos tecidos.

Em relação a precisão do método empregado para a determinação dos elementos nas soluções dos digeridos das amostras biológicas, os coeficientes de variação obtidos para Cu, Fe, Mg, Se, Zn, Cd e Pb encontram-se dentro do limite de até 20%. Os limites de detecção (LOD) e de quantificação (LOQ), demonstram que o método mostra-se bastante sensível para a determinação de Cu, Fe, Mg e Zn nas soluções dos digeridos de cada tecido.

O teste de exatidão demonstrou que o método de quantificação de Cu, Fe, Mg, Zn e Cd em amostras de tecidos e soro de ratos apresenta boa exatidão, quando comparado com valores de referência dos mesmos elementos no material de referência certificado NIST 1577b de fígado bovino. Os valores encontrados foram na faixa de 83 a 116% para a relação valor medido/certificado, o que mostra que o método proposto para os elementos estudados é adequado para as análises.

A comparação feita entre os valores medidos e os certificados mostrou que as concentrações obtidas para Cu, Fe, Mg, Zn e Cd nas amostras dos digeridos de material certificado de fígado bovino não diferiram significativamente em nível de 95% de confiança, indicando a concordância e exatidão entre os resultados, exceto para o Se e Pb, cujos valores encontrados ficaram abaixo do LOQ calculado.

Para os ratos machos, a maior concentração de Cu foi observada nos rins, Fe e Mg no coração e Zn no fígado. Para as ratas fêmeas, os metais Cu, Fe e Mg se encontraram em maior concentração em relação aos ratos machos em praticamente todos os tecidos. Além

disso, os teores de Cu, Fe, Mg e Zn encontrados nestes tecidos, são semelhantes aos reportados na literatura.

Em relação ao comportamento dos minerais nas amostras biológicas estudadas, os mesmos não seguem um padrão semelhante entre os sexos frente à ação da furosemida. Para o Cu, nas amostras biológicas dos ratos machos, este apresenta uma redução no fígado, rim e coração, mantendo-se constante no pulmão. Nas fêmeas há um aumento no fígado e redução no rim, coração e pulmão. Para o Fe, o comportamento é semelhante entre machos e fêmeas, com redução no fígado, rim e soro e aumento no coração e pulmão. A concentração de Mg apresenta-se constante no fígado e pulmão, reduzida no rim e coração e, aumentada no soro para machos, enquanto para fêmeas, no fígado e rim permanecem constantes e há redução no coração, pulmão e soro. Já a concentração de Zn foi reduzida no fígado e rim dos machos e se mantém constante no coração e pulmão, sendo o inverso para as fêmeas.

Em geral, o Cu e Mg apresentaram percentagens de eliminação semelhantes, porém o Zn apresentou baixa eliminação, tendo em vista ser um elemento essencial utilizado como co-fator de inúmeras enzimas biológicas, participantes de reações bioquímicas essenciais para a manutenção da vida. Já para o Fe, não houve eliminação, mas ganho, tendo em vista o crescimento dos animais estudados ser acelerado, havendo um acompanhamento do teor de Fe no crescimento da massa tecidual, não havendo risco de anemia.

As concentrações de Se, Cd e Pb foram abaixo do LOQ em todas as amostras biológicas, sendo necessário a utilização de técnicas mais sensíveis como GF AAS e ICP-MS para a quantificação desses elementos em amostras biológicas, considerando que o Se é um elemento essencial, em níveis fisiológicos, sendo de grande interesse sua quantificação.

Comparando-se os resultados obtidos com as informações da literatura, pode-se inferir que as condições ambientais e parâmetros biológicos, tais como sexo, idade, peso, consumo de ração e de água e nível de estresse, influenciam na acumulação dos elementos essenciais e contaminantes nesses animais.

Os animais não apresentaram durante o experimento nenhuma reação que representasse efeito adverso ao uso da furosemida ou causa da eliminação desses elementos, nem ao menos perda de peso. Isto demonstra que a furosemida não é capaz de alterar a bioquímica desses elementos em ratos, no sentido de causar graves distúrbios, pois, a eliminação desses elementos pode ser suprida através da manutenção de uma dieta

que contenha esses elementos essenciais. Porém, não se pode prever que, em humanos, a furosemida venha a causar distúrbios do equilíbrio hidroeletrólítico, tendo em vista que o período de administração da droga foi curto (1 semana).

Por outro lado, este estudo indica que a utilização da furosemida, em humanos, não possa resultar na deterioração do estado nutricional de elementos essenciais e contaminantes. Porém, baseado nos resultados, parece que indivíduos recebendo altas doses deste diurético, por longos períodos de tempo, devem prestar atenção especial ao consumo de dieta de todos nutrientes essenciais. Estudos em humanos e com animais parecem ser necessários para determinar quais precauções nutricionais necessitam serem tomadas quando o uso de diuréticos é recomendado.

Este trabalho foi importante no sentido de propor um método analítico validado que tornou possível fazer uma avaliação preliminar das concentrações de Cu, Fe, Mg, Se e Zn em diferentes tecidos e soro de ratos *Wistar*, podendo servir de comparação com resultados obtidos em estudos com seres humanos, como forma de controle dos níveis de elementos essenciais em indivíduos que fazem uso constante de furosemida.

Dessa forma, o trabalho vem contribuir para a construção do conhecimento acerca dos aspectos farmacológicos e toxicológicos dos diuréticos, bem como dos micronutrientes presentes no organismo, contribuindo assim para a prescrição e utilização correta desses medicamentos, bem como na avaliação de dietas.

Sendo assim, recomendam-se estudos mais aprofundados e continuidade do monitoramento destes elementos, principalmente Se, Cd e Pb, em ratos e seres humanos, em diversos tipos de tecidos biológicos, assim como relacionando com suas taxas de absorção e excreção.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANDRADE, A. **O Bioterismo: evolução e importância**. In: ANDRADE, A; PINTO, S.C.; OLIVEIRA, R. S. (orgs.) *Animais de Laboratório – criação e experimentação*. Editora Fiocruz, Rio de Janeiro (2002), 338p.

ARRUDA, M.A.Z.; SANTELLI, R.E. Mecanização no preparo de amostras por microondas: o estado da arte. **Química nova**, v. 20, n. 6, 1997.

BARCELOUX, D. G. Copper. **Journal of Toxicology**, v. 37, p. 217-30, 1999.

BAZIN, J.E.; CONSTANTIN, J.M.; GINDRE, G. Laboratory animal anaesthesia: influence of anaesthetic protocols on experimental models. **Annales Françaises d'anesthésie et de réanimation**, n. 23, p. 811-18, 2004.

BERNÉ, Y. et al. Effect of the diuretic furosemide on urinary essential nutrient loss and on body stores in growing rats. **Archivos latinoamericanos de nutrición**, n. 2, v.55, p. 56-63, jun 2005.

BOHRER, D. et al. Tissue digestion for aluminum determination in experimental animal studies. **Analytical Biochemistry**, v. 377, p. 120-7, 2008.

CANADIAN COUNCIL ANIMAL CARE (CCAC). **Guide to care and use of experimental animals**. Ottawa: CCAC, v. 2, 1993.

CARDOSO, L. M. N. Ecotoxicologia do cádmio e seus compostos. V. 6. **Cadernos de Referencia ambiental**. Salvador: CRA, 2001.

CARLINI, E. A. **Farmacologia prática sem aparelhagem**. São Paulo: Sarvier, 1973.

CASTRO E SILVA, E.; FREGONEZE, J. Efeitos de metais pesados sobre o controle central do equilíbrio hidroeletrólítico. **Revista de Ciências Médicas e Biológicas**, v. 1, n. 1, p. 116-23, nov. 2002.

COELHO, N. M. M. **Digestão em microondas - uma nova proposta para o tratamento de amostras**. Em: Mostra de trabalhos financiados pela FAPEMIG - Ciência para o

desenvolvimento, 2001, Belo Horizonte. Mostra de trabalhos financiados pela FAPEMIG. Belo Horizonte, FAPEMIG, 2001.

COZZOLINO, S.M.F. **Biodisponibilidade de Nutrientes**, Barueri: Ed. Manole Ltda, 2005, p. 878.

CRUZ, C. A.; CORREIA, L. C.; DIAS, R. **Métodos alternativos à experimentação toxicológica: ética, vantagens e desvantagens**. Universidade Técnica de Lisboa. Faculdade de Medicina, 2001.

DAKSHINAMURTI, K.; DAKSHINAMURTI, S. Blood pressure regulation and micronutrients. **Nutrition research reviews**, v. 14, p. 3-43, 2001.

D'HAESE, P. C. et al. Aluminum, Iron, Lead, Cadmium, Copper, Zinc, Chromium, Magnesium, Strontium, and Calcium Content in Bone of End-Stage Renal Failure Patients. **Clinical Chemistry**, v. 45, n. 9, p. 1548–56, 1999.

DUARTE A.C. **Semiologia Imunológica Nutricional**. Rio de Janeiro: Axcel Books do Brasil, 2003.

DUARTE, R. P. S., PASQUAL, A. Avaliação do cádmio (cd), chumbo (pb), níquel (ni) e zinco (zn) em solos, plantas e cabelos humanos. **Energia na Agricultura**, v. 15, n.1, p. 46-58, 2000.

FAIRWEATHER-TAIT, S.; HURRELL, R. F. Bioavailability of minerals and trace elements. **Nutrition Research Reviews**, n. 9, p. 295-324, 1996.

FAYED, A. A. Brain Trace Element Concentration of Rats Treated with the Plant Alkaloid, Vincamine. **Biological Trace Elements Research**, 2009.

FERNANDEZ et al. Medical Application of fast furnace program used in the ET AAS determination of Cu and Zn in blood plasma of children with down syndrome. **Atomic spectroscopy**, v. 26, n. 3, p.117-24, 2005.

GOODMAN, L.S., GILMAN, A. **As bases farmacológicas da terapeutica**, 7. ed. Nova York: McMillan, 1985.

HASSAN, I. A. et al. Evaluation of toxic metals in biological samples (scalp hair, blood and urine) of steel mill workers by electrothermal atomic absorption spectrometry. **Toxicology and Industrial Health**, v. 22, p. 381-93, 2006.

HARRIS, D. C. **Análise química quantitativa**. 6. ed. Rio de Janeiro: LTC, 2006.

HSIUNG, C. et al. Minimizing interferences in the quantitative multielement analysis of trace elements in biological fluids by inductively coupled plasma mass spectrometry. **Clinical chemistry**, v. 43, n.12, p. 2303-2311, 1997.

HUANG, Z. Y. et al. Metallothionein as a biomarker for mercury in tissues of rat fed orally with cinnabar. **Appl. Organometal Chem**, n. 18, p. 255-61, 2004.

INMETRO. Orientações sobre validação de métodos de ensaios químicos. **Normalização e qualidade industrial**. DOQ-CGCRE-008, 2007.

KABIROV, K.K. et al. Direct determination of selenium in rat blood plasma by Zeeman atomic absorption spectrometry. **Chemico-Biological Interactions**, v. 171, p. 152–8, 2008.

KINGSTON, H. M.; JASSIE, J. Introduction to microwave sample preparation: theory and practice. Washington: USA. **American Chemical Society**, p 248, 1986.

LASKEY J.W.; REHNBERG, G.L. Reproductive effects of low acute doses of cadmium chloride in adult male rats. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v.73, p. 250-5, 1984.

LEHNINGER, A. L. **Princípios de Bioquímica**. São Paulo: Savier, p. 194-5, 1985.

LIMA, I. V.; PEDROZO, M.F. M.. **Ecotoxicologia do ferro e seus compostos**. v. 4. 1996.

LOBO, A. S.; TRAMONTE, V. L. C.. Efeitos da suplementação e da fortificação de alimentos sobre a biodisponibilidade de minerais. **Revista de Nutrição**, n. 1, v. 17, p. 23-33, jan-mar 2004.

MERTZ, W; CORNATZER, W.E. **Newer tracer elements in nutrition**, Marcel Decker: New York, 1971.

MOREIRA, F. R.; MOREIRA, J. C. A cinética do chumbo no organismo humano e sua importância para a saúde. **Ciência e Saúde Coletiva**, v. 9, n. 1, p. 167-81, 2004.

NAZEH, Y. et al. Effect of Cimetidine on Tissue Distribution of Some Trace Elements and Minerals in the Rat. **Journal of Nutrition**, v. 117, p. 1576-87, 1987.

NOGUEIRA, D.M. **Métodos de bioquímica clínica: técnica e interpretação**. São Paulo: Pancast, 1990, 468p.

NOMURA, C. S.; OLIVEIRA, P. V.. Preparação de amostra de fígado bovino e estudo de micro homogeneidade para a Determinação de cd e pb por espectrometria de absorção atômica com atomização Eletrotérmica e amostragem direta de sólido **Química Nova**, v. 29, n. 2, p. 234-239, 2006.

OLIVEIRA, P. V. et al. Biomonitoring method for the simultaneous determination of cadmium and lead in whole blood by electrothermal atomic absorption spectrometry for assessment of environmental exposure. **Talanta**, v. 75, p. 246–52, 2008.

OLMEDO, P. et al. Validation of a method to quantify chromium, cadmium, manganese, nickel and lead in human whole blood, urine, saliva and hair samples by electrothermal atomic absorption spectrometry. **Analytica Chimica Acta**, v. 659, p. 60–7, 2010.

PALMER, C. D. et al. Determination of lead, cadmium and mercury in blood for assessment of environmental exposure: A comparison between inductively coupled plasma–mass spectrometry and atomic absorption spectrometry. **Spectrochimica Acta Part B**, v. 61, p. 980–90, 2006.

PAUL, M. C. et al. Multi-elemental analysis of brain tissue from healthy Wistar rats using sector field inductively coupled plasma mass spectrometry. **Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy**, v. 59, n. 9, p. 1485-90, 2004.

PARSONS, P. J.; BARBOSA JR. F. Atomic spectrometric and trends in clinical laboratory medicine. **Spectrochimica Acta Part B**, v. 12, p. 234-46, 2007.

PEDROZA. L.F.; CAMPOS, S.M.F.; COZZOLINO, Alterações metabólicas e funcionais do cobre em diabetes mellitus, Rev. Nutr., Campinas, 12(3): 213-224, set./dez., 1999.

PETERING, D. H. et al. Metabolism of Cadmium, Zinc and copper in the rat kidney: the role of metallothionein and other binding sites. **Environmental Health Perspectives**, v. 54, p. 73-81, 1984.

PERES, J.M. et al. Inhibition of zinc absorption by iron depends on their ratio. **Journal of Trace Elem Med Biol**, v.15, n.4, 237-41, 2001.

RIBEIRO, A. S.; ZEZZI, M. A.; CADORES, A. S.. Espectrometria de absorção atômica com atomização eletrotérmica em filamento de tungstênio. uma re-visão crítica. **Química Nova**, v. 25, n. 3, p. 396-405, 2002.

ROSA, S. M. **Estratégias para determinação de metais e selênio em tecidos de mamíferos aquáticos encalhados no litoral do Estado da Bahia por espectrometria atômica**. 2009. Tese (Doutorado em Química) — Instituto de Química, Universidade Federal da Bahia, Bahia.

SAITO, Takeshi; SAITO, Kazuo. Simultaneous multi-determination of brain trace element concentrations by inductively coupled plasma mass spectrometry. **Tohoku Journal Exp. Med.**, v. 178, p. 11-6, 1996.

SANTOS, R. A. A.L. **Determinação de concentrações de elementos traço presentes no tecido sanguíneo de animais de pequeno porte por ICP MS**. 2006, 60p. (Mestrado em Ciência) - CTG, Tecnologias energéticas e nucleares – PROTEN, Universidade Federal de Pernambuco-Pernambuco.

SHANKAR, S. S.; BRATER, D. Loop diuretics: from the Na-K-2Cl transporter to clinical use. **American Journal of Renal Physiology**, v. 284, p.11–21, 2003.

SILVA, F. V. et al. Evaluation of inductively coupled plasma optical emission spectrometers with axially and radially viewed configurations. **Spectrochimica Acta Part B**, n. 57, p. 1905–13, 2002a.

SILVA, P. et al. **Farmacologia**. 6. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2002b.

SKOOG, D. A. et al. **Fundamentos de Química Analítica**. 8ª edição. (Tradução Marco Grassi, revisão técnica Célio Pasquini). São Paulo: Thomson, 2006.

TAKAHASHI, S. et al. Determination of major and trace elements in the liver of Wistar rats by inductively coupled plasma- atomic emission spectrometry and mass spectrometry. **Laboratory Animals**, n. 34, p. 97-105, 2002.

TOWNSEND, A. T. et al. The determination of copper, zinc, cadmium and lead in urine by high resolution ICP-MS. **J.Anal. At. Spectrom**, v. 13, n. 11, p. 1213-19, 1998.

UCHINO, E. et al. The effects of age and sex on seven elements in Sprague-Dawley rat organs. **Laboratory Animals**, v. 24, p, 253-64, 1990.

VERSIECK, J.; CORNELIS, R. F. Normal levels of trace elements in human blood plasma or serum. **Analytica Chimica Acta**, v. 116, p. 217-54, 1980.