



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA  
CENTRO DE CIÊNCIAS NATURAIS E EXATAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA**

Bário em soluções de nutrição parenteral e medicamentos:  
origem, níveis de contaminação e avaliação da distribuição no  
organismo em modelo animal.

**TESE DE DOUTORADO**

**Vanessa Domingues Mörschbacher**

**Santa Maria, RS, Brasil**

**2012.**

**Bário em soluções de nutrição parenteral e medicamentos:  
origem, níveis de contaminação e avaliação da distribuição no  
organismo em modelo animal.**

**por**

**Vanessa Domingues Mörschbacher**

Tese apresentada ao Curso de Doutorado do Programa de  
Pós-Graduação em Química, Área de Concentração em  
Química Analítica, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como  
requisito parcial para obtenção do grau de  
**Doutor(a) em Química.**

**Orientador(a): Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Denise Bohrer do Nascimento**

**Santa Maria, RS, Brasil**

**2012**

Ficha catalográfica elaborada através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Central da UFSM, com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Domingues Mörschbacher, Vanessa  
Bário em soluções de nutrição parenteral e medicamentos: origem, níveis de contaminação e avaliação da distribuição no organismo em modelo animal. / Vanessa Domingues Mörschbacher.-2012.  
125 p.; 30cm

Orientadora: Denise Bohrer  
Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa Maria, Centro de Ciências Naturais e Exatas, Programa de Pós-Graduação em Química, RS, 2012

1. Contaminação por Ba em NP e medicamentos 2. Interação do Ba com os compostos das formulações parenteriais 3. Distribuição do Ba no organismo de ratos Wistar I. Bohrer, Denise II. Título.

**Universidade Federal de Santa Maria  
Centro de Ciências Naturais e Exatas  
Programa de Pós-Graduação em Química**

A Comissão Examinadora, abaixo assinada,  
aprova a Tese de Doutorado

Bário em soluções de nutrição parenteral e medicamentos: origem,  
níveis de contaminação e avaliação da distribuição no organismo em  
modelo animal.

elaborada por  
**Vanessa Domingues Mörschbacher**

como requisito parcial para obtenção do grau de  
**Doutor(a) em Química**

**COMISSÃO EXAMINADORA:**

---

**Denise Bohrer do Nascimento, Dr<sup>a</sup>.  
(Presidente/Orientador)**

---

**Vera Maria Melchiors Morsch, Dr<sup>a</sup>. (UFSM)**

---

**Clarice Madalena Breno Rolim, Dr<sup>a</sup>. (UFSM)**

---

**Paulo Cícero do Nascimento, Dr. (UFSM)**

---

**Carine Viana Silva, Dr<sup>a</sup>. (UNIPAMPA)**

Santa Maria, 21 de Março de 2012.

## **DEDICO ESTE TRABALHO**

**À minha família em especial à minha mãe, Zildenir Domingues Mörschbacher, que foi quem mais me apoiou, me ajudou, me incentivou e me compreendeu.**

*Mãezinha! Não tenho palavras para descrever o quanto sou grata por toda a tua ajuda, sem você não teria conseguido chegar ao final de mais esta etapa.*

**Ao meu pai, pelo exemplo de perseverança e pelo amor, à sua maneira, que ele tem por nós.**

**À minha irmã, Deborah e sobrinhas Júlia e Luiza que apesar de tudo eu as amo muito e sinto muita falta.**

**Principalmente à minha irmã Priscilla pelo amor, amizade, preocupação e carinho.**

**À minha família que se formou durante esta jornada, ao meu “eterno namorado” Juarez pela compreensão da importância deste passo em minha vida e o respeito que teve por mim durante este tempo.**

**Ao meu VERDADEIRO e GRANDE AMOR de várias jornadas meu FILHO MATHEUS. Obrigada por teres aceitado mais uma empreitada ao meu lado.**

## **AGRADECIMENTOS**

**A Deus e ao meu Mentor, por toda força e  
proteção.**

**Não tenho como descrever minha gratidão!!!**

**Com grande carinho e respeito agradeço à Professora Denise Bohrer pela orientação, ensinamento, críticas e principalmente pela paciência.**

**Ao Professor Paulo Cícero Nascimento pela convivência e ensinamentos.**

**Às minhas amigas do coração que me deram grande apoio, incentivo e ajuda: Marlei Veiga, Sandra Ribeiro, Claudia Wollman. Principalmente à Simone Noremborg e Cristiane Jost que além de tudo fizeram uma revisão nesta tese me ajudando a escrevê-la.**

**Aos colegas de Laboratório Denise Bertagnolli, Maurício Hilgemann, Daiane Dias, Mariele, Fernanda Lima, Josué Missel, Alexandre Schneider, Ana Paula Lima, Larissa Sabo Müller, Luciana Assis Gobo, Luís Ferraz, Thaís Dal Molin, Cibele Mensh Canabarro, Luís Claussen, Lucas Trindade Soares, Henrique Faccin, Gêssica Domingos da Silveira, pelo convívio, pelos ensinamentos e pela colaboração.**

**À equipe do Labtox que foi extremamente prestativa e atenciosa. Principalmente à Rosélia, Jamile, Roberta e ao meu companheiro de injeção Jessié.**

**Às professoras Rosa Maria e Vera Morsch que se interessaram pelo meu estudo em modelo animal e aceitaram realizá-lo em conjunto.**

**Às professoras Vera Morsch, Márcia Messias, Solange Garcia, Clarice Rolim por aceitarem ser banca examinadora deste trabalho, pelas sugestões e críticas que aceitei de coração aberto, pois foram de grande importância.**

**À professora Carine Viana que além de uma amiga muito querida, que me compreendeu me apoiou e me incentivou durante o período do doutorado, aceitou com entusiasmo ser participante da banca de defesa. Serei sempre grata!!!**

**A todos os professores e funcionários que contribuíram de alguma maneira para o bom desenvolvimento deste trabalho.**

**A UFSM pela oportunidade da realização deste trabalho.**

**A CAPES pelo suporte financeiro.**



*"A compaixão pelos animais está intimamente ligada à bondade de caráter, e pode ser seguramente afirmado que quem é cruel com os animais não pode ser um bom homem."*

(Arthur Schopenhauer)

## RESUMO

Bário em soluções de nutrição parenteral e medicamentos: origem, níveis de contaminação e avaliação da distribuição no organismo em modelo animal.

Autor(a): Vanessa Domingues Mörschbacher

Orientador(a): Dr<sup>a</sup> Denise Bohrer Nascimento

A contaminação por Bário (Ba) em soluções para nutrição parenteral (NP) e em medicamentos foi estudada. A concentração de Ba foi determinada por F-AAS em embalagens de vidro e plástico que armazenam estas formulações, uma vez que, os compostos de Ba podem ser usados como matérias-primas destes materiais. As NP e os medicamentos utilizados nos recém-nascidos prematuros da Unidade de Terapia Intensiva (UTI) Neonatal do Hospital da Universidade Federal de Santa Maria (HUSM) foram analisados por GF-AAS.

Os recipientes de vidro, frascos e ampolas, apresentaram de 4,1 mg/g a 4,9 mg/g de Ba. Bolsas de PVC e frascos de polietileno apresentaram 0,15 mg/g e 0,04 mg/g de Ba, respectivamente. Nas tampas de borracha entre 0,02 mg/g e 0,04 mg/g Ba foi encontrado, e 4,4 mg/g de Ba foi medido nos êmbolos das seringas.

As soluções comerciais de NP, com exceção das soluções salinas de KCl e NaCl, apresentaram Ba como contaminante. As concentrações variaram entre 27 µg/L e 262 µg/L, sendo que, vitaminas, sulfato de magnésio, gluconato de cálcio e aminoácidos pediátricos encontraram-se mais contaminados. Constatou-se que as soluções de NP preparadas e armazenadas nas bolsas, apresentaram uma maior contaminação do que seria o esperado pela contribuição de cada constituinte individualmente. As frações das soluções de NP das buretas, que é um dispositivo ligado às bolsas para auxiliar no controle do volume a ser administrado, se mostraram mais contaminadas por Ba que as respectivas bolsas, concluindo-se que a preparação e adição de medicamentos nas soluções deste compartimento aumenta significativamente a quantidade de Ba. A maioria dos medicamentos estudados não apresentou contaminação por Ba. Entretanto, após diluição nas seringas, concentrações entre 87 e 585 µg/L foram encontradas nas amostras de fosfato dissódico de dexametasona, sulfato de amicacina e sulfato de gentamicina. Como os medicamentos armazenados nas seringas

permanecem em contato direto, por vários dias, com o êmbolo, esta deve ser a origem do Ba nos medicamentos analisados.

Ensaio de contato entre uma resina de troca iônica condicionada com Ba e soluções dos constituintes das NP e dos medicamentos foram realizados para simular a interação dos compostos com o Ba das embalagens. Os resultados mostraram que o gluconato de cálcio e o ácido cítrico foram os que mais interagiram com o metal, retirando-o da resina em maior quantidade e transferindo-o para as soluções. Estes resultados comprovaram que o Ba pode ser extraído das embalagens para as soluções pelos constituintes das NP e dos medicamentos.

Experimentos em modelo animal foram realizados para verificar os efeitos do Ba no organismo vivo quando administrado diretamente na corrente sanguínea, como é o caso das formulações parenterais. A dose letal 50 (DL50) de 9,6 mg/kg do BaCl<sub>2</sub> em ratas Wistar por via intraperitoneal foi determinada devido à necessidade de se conhecer uma dosagem segura a ser administrada no estudo sobre o efeito do Ba no organismo e o por não ter sido encontrado na literatura valores concordantes. Após este estudo, ratos machos adultos Wistar foram submetidos aos tratamentos com Ba combinados ou não com citrato de sódio e gluconato de cálcio. Posteriormente a 30 administrações os animais foram sacrificados e amostras de rim, fígado, coração, osso do fêmur, músculo da coxa e sangue foram coletados.

Vários procedimentos para a digestão dos tecidos foram testados para suprimir, o máximo possível, a interferência causada pela matriz na determinação do Ba por GF-AAS. O procedimento mais adequado foi o qual se digeriu as amostras com 1 mL de HNO<sub>3</sub> e se realizou a análise com calibração por adição do padrão. Os resultados mostraram a deposição do metal no músculo, osso e precipitado sanguíneo. Quando o Ba foi administrado juntamente com o citrato, observou-se um aumento significativo na deposição total do Ba no organismo, sendo que o metal foi encontrado predominantemente nos ossos. Já o tratamento com Ba combinado com o gluconato diminuiu o acúmulo total deste metal no organismo, mas também favoreceu a deposição nos ossos. Esses compostos ajudaram a amenizar a deposição do Ba no músculo e precipitado sanguíneo com relação à administração apenas de Ba.

Este estudo mostrou a contaminação de Ba em NP e em alguns medicamentos, proveniente das embalagens que os armazenam. Sendo o citrato, utilizado em muitos medicamentos, contribuinte para uma maior absorção no organismo. A gravidade disso é devido ao grande potencial de toxicidade do Ba e a forma direta em que este metal é administrado em pacientes debilitados.

## ABSTRACT

Barium in parenteral nutrition solutions and drugs: origins, contamination level and distribution evaluation in organism on animal models.

Author: Vanessa Domingues Mörschbacher

Academic Supervisor: Dr<sup>a</sup> Denise Bohrer Nascimento

Barium (Ba) contamination in solution for parenteral nutrition (PN) and drugs was studied. The concentration of Ba was determined by F-AAS in glass and plastic packaging used to store the formulations, since the compounds of Ba can be used as material raw of these materials. PN and drugs administered to preterm infants in the neonatal Intensive Care Unit (ICN) of the Hospital of Federal University of Santa Maria (HUSM) were analyzed by GF-AAS.

Glass containers, bottles and ampoules, showed from 4.1 mg/g to 4.9 mg/g of Ba. PVC bags and polyethylene bottles showed from 0.15 mg/g to 0.04 mg/g of Ba, respectively. In rubber stoppers were found between 0.02 mg/g and 0.04 mg/g of Ba, and 4.4 mg/g of Ba was measured in the plunger of the syringes. Commercial solutions of the constituents of PN, with exception of solutions of KCl and NaCl, showed Ba as a contaminant. The concentration ranged from 27 µg/L and 262 µg/L, and the most contaminated formulations were: vitamins, magnesium sulfate, calcium gluconate and amino acid pediatric. It was found that the PN solution prepared and stored in bags were more contaminated than would be expected for the contribution of each individual constituent. The fractions of PN solutions that remained in burettes, which is a device connected to the bag to help control volume to be administered, were more contaminated by Ba than their respective bags, concluding that the preparation and addition of drugs in the solutions in this compartment significantly increases the amount of Ba. The drugs studied showed no contamination by Ba. However, after dilution in syringes, concentration between 87 and 585 µg/L were found in samples of dexamethasone disodium phosphate, amikacin sulfate and gentamicin sulfate. As drugs stored in syringes remained in direct contact, for several days, with the rubber plungers, this must be the source of Ba in the analyzed drugs.

Contact testing using an ion-exchange resin conditioned with Ba and solutions of constituents of the PN solutions and the drugs were performed to simulate the interaction of

the compounds with Ba packaging. The test results showed that calcium gluconate and citric acid were the constituents of PN and drugs that interacted with Ba at most, removing greater amount of the metal from the resin. These results confirmed that the Ba can be removed from the packaging material into solutions by action of constituents of PN solutions.

Experiments in animal model were carried out to verify the effect of Ba in the living organism when directly administered into the bloodstream, as it occurs in the administration of PN solutions. The lethal dose 50 (LD 50) of 9.6 mg/kg was determined for the BaCl<sub>2</sub> in adult female Wister rats by intraperitoneal via due to the need to know a safe dosage to be administered in the study on the effect of Ba in organism and has not been consistent values in literature. After this study, adult male Wister rats were subjected to treatment with Ba combined or not with sodium citrate and calcium gluconate. Posteriorly 30 administrations the animals were sacrificed, then, samples of brain, heart, liver, kidney, muscle, bone and blood were collected. Several procedures for digestion of tissue were tested to suppress, as much as possible, the interference caused by matrix in determination of Ba by GF-AAS. The most suitable procedure which was digestion sample with 1 mL of HNO<sub>3</sub> and analysis was carried out the standard addition calibration.

The results of the administration of Ba combined or not with gluconate calcium and sodium citrate showed the deposition of metal in tissue such as muscle, bone and blood precipitated. When the Ba was administered together with citrate, there was a significant increase in total deposition of Ba in the body, and the metal was found predominantly in the bones. The treatment with Ba combined with gluconate decreased the total accumulation of this metal in the body, but also favored the deposition in the bones. These compounds helped to soften the deposition of Ba in the muscle and blood precipitated regarding the administration with only Ba.

This study showed the contamination of Ba in PN and some medicines from the packaging that it store. Since the sodium citrate, used in many drugs, contributing to a greater absorption in the body. The severity of this is due to the large potential toxicity of Ba direct way in which this metal is administrated in debilitated patients.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 4.1 - Esquema resumo do primeiro capítulo.....	38
Figura 4.2 - Curvas de pirólise (temperatura de atomização 2600 °C) e atomização (temperatura de pirólise 800 °C) de 100 µg/L de Ba. ....	41
Figura 4.3 - Bureta e mangueiras utilizadas na administração de soluções de nutrição parenteral. ....	50
Figura 4.4 - Representação gráfica da curva padrão de Ba obtida por GF-AAS. ....	54
Figura 4.5 – Análise da contaminação de Ba nas soluções de NP. (A) Constituição média de todas as soluções de NP analisadas. Resultado expresso em % (v/v). (B) Contribuição de cada constituinte das NP na contaminação por Ba nas soluções. Valores expressos em % (v/v), relativo à concentração de Ba encontrada nas soluções estudadas (Apêndice B). ....	62
Figura 4.6 - Ensaio de Contato: Ba retirado da resina pelas soluções 0,2mM de: ornitina, arginina, gluconato de cálcio, ácido cítrico, ácido glutâmico, ácido aspártico e EDTA nos intervalos de tempo 1; 3; 24;48; 72; 96 horas; 1; 2; 3 e 8 meses.....	67
Figura 4.7 - Fórmula estrutural (A) gluconato de cálcio e (B) ácido cítrico.....	72
Figura 4.8 - Molécula de EDTA. ....	73
Figura 4.9 – Estrutura duplo <i>zwitterion</i> do EDTA ....	73
Figura 4.10 - Estrutura dos aminoácidos em diferentes pH. ....	75
Figura 4.11 – Estrutura do vidro com modificador de rede BaO. ....	78
Figura 5.1 – Esquema resumo do capítulo II.....	81
Figura 5.2 - Gráfico do cálculo do DL 50 do Ba em BaCl <sub>2</sub> em ratos Wistar machos, cálculo por análise de regressão, realizado através do <i>software</i> BioStat 2009 Professional. ....	93
Figura 5.3 - Representação gráfica da curva padrão de Ba obtida por GF-AAS. ....	103
Figura 5.4 - Concentração de Ba (µg/g) em amostra de (A) músculo, (B) osso e (C) precipitado sanguíneo de ratos machos Wistar submetidos aos tratamentos. Barras representam médias + DP. Grupos com diferentes letras são estatisticamente diferentes (p< 0,05, n=5) por ANOVA e teste de Duncan. ....	108
Figura 5.5 - Comparação da deposição do Ba nas diversas partes do organismo em relação aos tratamentos que os ratos Wistar foram submetidos. ....	109

## LISTA DE TABELAS

Tabela 2.3.1 - Classificação dos tipos de vidro de acordo com a resistência hidrolítica .....	32
Tabela 4.1 - Parâmetros para determinação de Ba por F-AAS .....	40
Tabela 4.2 - Parâmetros de operação do GF-ASS para determinação de Ba .....	40
Tabela 4.3 - Composição percentual (m/m) das embalagens tipo I (borossilicato), utilizadas em nutrição de nutrição parenteral.....	47
Tabela 4.4 - Material polimérico, sua unidade estrutural, usos farmacêuticos e catalisadores utilizados na reação de polimerização e aditivos.....	49
Tabela 4.5 - Concentração de Ba encontrada em recipientes de plásticos e de vidros, e em tampas de borrachas dos recipientes .....	51
Tabela 4.6 - Recuperação de 50 (µg/L) de Ba em amostras de solução de NP e medicamento com e sem adição de 0,5% (v/v) de HNO <sub>3</sub> .....	52
Tabela 4.7 – Medida da absorção do Ba obtida na determinação da curva padrão .....	53
Tabela 4.8 - Valores dos Brancos para o cálculo dos limites de detecção e quantificação.....	54
Tabela 4.9 - Determinação da precisão intradia na análise do Ba em amostras de solução de NP e medicamento .....	55
Tabela 4.10 - Determinação da precisão interdía na análise do Ba em amostras de solução de NP e medicamento .....	55
Tabela 4.11 - Teste de Recuperação da adição de 20 µg/L de Ba em amostras de solução de NP e medicamentos.....	56
Tabela 4.12 - Concentração de Ba encontrada nos constituintes das soluções de NP.....	58
Tabela 4.13 - Concentração de Ba em soluções de NP armazenadas em bolsas e concentração de Ba calculado através da contribuição de cada constituinte.....	60
Tabela 4.14 – Concentração de Ba em soluções de NP armazenadas nas bolsas e buretas e, concentração teórica de Ba calculada através da contribuição de cada constituinte .....	61
Tabela 4.15 - Concentração de Ba (µg/L) encontrado em medicamentos comerciais em ampolas.....	63
Tabela 4.16 – Concentração de Ba encontrada em soluções contidas nas seringas de administração.....	65
Tabela 5.1 - Parâmetros para a determinação de Ba por GF-AAS .....	83

Tabela 5.2 - Combinação de reagentes para o estudo da eliminação da interferência causada pelo HNO <sub>3</sub> contido em excesso nos Brancos das digestões dos tecidos.....	88
Tabela 5.3 – Volumes utilizados de solução 20% (v/v) de HCl, de HNO <sub>3</sub> concentrado e de solução de Ba para o preparo das soluções de estudo.....	89
Tabela 5.4 – Teste da digestão de fígado com 5 mL de HNO <sub>3</sub> e com 5 mL de HNO <sub>3</sub> e HClO <sub>4</sub> [4:1 (v/v)] .....	94
Tabela 5.5 - Teste de digestão de fígado com 5 mL de HNO <sub>3</sub> em frascos de vidro.....	95
Tabela 5.6 - Teste de digestão de fígado em banho-maria com 1 mL de HNO <sub>3</sub> concentrado em <i>vials</i> plásticos.....	96
Tabela 5.7 - Resultados da determinação de Ba em HNO <sub>3</sub> reduzido com ácido oxálico e ácido ascórbico.....	98
Tabela 5.8 – Teste de digestão de tecido de fígado com 1 mL de HCl e 500 µL de HNO <sub>3</sub> .....	99
Tabela 5.9 - Estudo da interferência de HCl com e sem adição de 1% (v/v) de HNO <sub>3</sub> na determinação de Ba por GF-AAS .....	100
Tabela 5.10 – Teste de decomposição do fígado utilizando diferentes volumes das soluções de 25% e 5% de HTMA.....	101
Tabela 5.11 - Determinação da concentração de Ba por GF-AAS com calibração por adição de padrão .....	102
Tabela 5.12 – Medida da absorção do Ba obtida na determinação da curva padrão .....	103
Tabela 5.13 - Determinação da precisão intradia na análise do Ba em amostras de tecidos ....	104
Tabela 5.14 - Determinação da precisão interdia na análise do Ba em amostras de tecidos ....	104
Tabela 5.15- Teste de recuperação da adição de 1000 µg/L de Ba em amostras de fígado.....	105
Tabela 5.16 - Resultado do teste de recuperação para cada tipo de amostra de tecido e sangue	107



## LISTA DE ABREVIATURAS

ANOVA: Análise da Variância

INMETRO: Instituto Nacional de Metrologia

BP: *British Pharmacopeia*

CV%: Coeficiente de Variação

DP: Desvio padrão

EVA: Etil Vinil Acetato

FDA: *Food and Drugs Administration*

F-AAS: Espectrometria de Absorção Atômica em Chama (*Flame Atomic Absorption Spectrometric*)

FB: Farmacopeia Brasileira

GF-AAS: Espectrometria de Absorção Atômica em Forno de Grafite (*Graphite Furnace Atomic Absorption Spectrometric*)

HDPE: Polietileno de Alta Densidade

HUSM: Hospital da Universidade de Santa Maria

LD: Limite de Detecção

LQ: Limite de Quantificação

NIST: *National Institute of Standards and Technology*

NP: Nutrição Parenteral

MRC: Material de Referência Certificado

PE: Polietileno

PET: Polietileno tereftalato

PMA: *Pharmaceutical Manufactures Association*

PP: Polipropileno

ppb: Partes por bilhão

PTFE: Polietrafluoretileno

PS: Poliestireno

PVC: Polivinilcloreto

r: Coeficiente de correlação linear

RPM: Rotação por Minuto

DPR: Desvio Padrão Relativo

UTI: Unidade de Terapia Intensiva

# SUMÁRIO

<b>DEDICATÓRIA</b> .....	5
<b>AGRADECIMENTOS</b> .....	6
<b>RESUMO</b> .....	10
<b>ABSTRACT</b> .....	12
<b>LISTA DE TABELAS</b> .....	15
<b>LISTA DE ABREVIATURAS</b> .....	17
<b>SUMÁRIO</b> .....	19
<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	21
<b>2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	23
<b>2.1 Bário</b> .....	23
2.1.1 Toxicologia.....	24
<b>2.2 Nutrição Parenteral (NP)</b> .....	26
2.2.1 Indicação.....	27
2.2.2 Principais componentes.....	27
<b>2.3 Recipientes para uso farmacêutico</b> .....	28
2.3.1 Recipientes de vidro.....	28
2.3.2 Embalagens plásticas.....	32
<b>2.4 Tampas de borracha</b> .....	34
2.4.1 Características das tampas.....	35
<b>3 OBJETIVOS</b> .....	36
<b>3.1 Objetivos gerais</b> .....	36
<b>3.2 Objetivos específicos</b> .....	36
<b>4 Capítulo 1: Investigação da contaminação de Ba em NP e medicamentos</b> .....	38
<b>4.1 Materiais e Métodos</b> .....	39
4.1.1 Reagentes e Soluções.....	39
4.1.2 Instrumentação.....	39
4.1.3 Obtenção das amostras.....	41
4.1.4 Preparo das embalagens de vidro e plásticas, ampolas de vidro, tampas de borracha, borracha vedante dos êmbolos das seringas e mangueiras dos equipos.....	42
4.1.5 Otimização do método para determinação de Ba em soluções para NP e em medicamentos por GF-ASS.....	43
4.1.6 Validação da metodologia para determinação de Ba nas amostras de solução de NP e em medicamentos por GF-ASS.....	43
4.1.7 Determinação de Ba em NP.....	45
4.1.8 Determinação de Ba em medicamentos comerciais e em seringas de administração.....	45
4.1.9 Preparação da resina na forma de Ba para o ensaio de contato.....	46
4.1.10 Ensaio de contato para a investigação da interação do Ba das embalagens com as soluções dos constituintes das NP.....	46

<b>4.2 Resultados e Discussão</b> .....	47
4.2.1 Determinação de Ba em amostras de recipientes de vidro e plástico, ampolas de vidro âmbar e transparente, tampas de borracha, borrachas das seringas e mangueiras dos equipos	47
4.2.2 Otimização da metodologia para determinação de Ba em soluções para NP e medicamentos .....	52
4.2.3 Validação do método.....	53
4.2.4 Determinação de Ba em soluções comerciais para NP e em soluções de NP em bolsas e buretas .....	57
4.2.5 Determinação de Ba em medicamentos comerciais armazenados em ampolas e em medicamentos armazenados em seringas .....	63
4.2.6 Ensaio de contato para a investigação da interação do Ba das embalagens com as soluções dos constituintes das NP .....	66
<b>4.3 Discussão</b> .....	77
<b>4.4 Conclusão</b> .....	79
<b>5 Capítulo 2:ESTUDO EM MODELO ANIMAL</b> .....	81
<b>5.1 Materiais e Métodos</b> .....	82
5.1.1 Reagentes e Soluções .....	82
5.1.2 Instrumentação .....	82
5.1.3 Procedimento para determinação do DL 50 .....	83
5.1.4 Animais para o estudo do comportamento do Ba em organismo vivo combinado ou não com gluconato de cálcio e citrato de sódio .....	84
5.1.5 Tratamento dos ratos para o estudo do comportamento do Ba em organismo vivo combinado ou não com gluconato de cálcio e citrato de sódio .....	84
5.1.6 Procedimentos para os testes de digestão das amostras de tecido retirados dos ratos ....	85
5.1.7 Teste da determinação de Ba em amostras de tecidos por GF-AAS com calibração por adição de padrão .....	90
5.1.8 Validação do método para a determinação de Ba em amostras de tecido e sangue .....	91
5.1.9 Digestão das amostras de tecido e sangue .....	91
5.1.10 Análise Estatística .....	92
<b>5.2 Resultado e Discussão</b> .....	92
5.2.1 Determinação do DL 50 .....	92
5.2.2 Otimização da decomposição e medida das amostras de tecido .....	93
5.2.3 Calibração por adição de padrão .....	101
5.2.4 Validação do método.....	102
5.2.5 Estudo do comportamento do Ba em organismo vivo combinado ou não com gluconato de cálcio e citrato de sódio .....	106
<b>5.3 Conclusão</b> .....	110
<b>6 CONCLUSÃO DO TRABALHO</b> .....	112
<b>7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	113
<b>APÊNDICES</b> .....	118
Apêndice A - Reagentes utilizados.....	118
Apêndice B - Composição Bolsas/Buretas.....	119

## 1 INTRODUÇÃO

Os compostos solúveis de Ba são extremamente tóxicos, pois este metal possui um grande potencial de absorção pelo organismo (IPCS-ICHEM, 2001). O Ba está presente na constituição de vidros na forma de óxidos, e na constituição de plásticos como aditivos, em forma de sabões. Esses materiais são utilizados na indústria farmacêutica como embalagens para armazenar NP e medicamentos (AVIS, 1986; MANO e MENDES, 2004).

A prática da administração parenteral, tanto de nutrientes quanto de medicamentos, é bastante comum em pacientes debilitados que estão impossibilitados de utilizar a via oral ou ainda pela necessidade de uma rápida ação do medicamento (WAITABERG, 1995; HANSON, 1992). O risco desta prática está na presença de contaminantes que, dependendo de sua natureza, podem causar graves danos por causa da forma direta (corrente sanguínea) de administração (BERTAGNOLLI, 2008).

Existem poucos estudos sobre a contaminação de metais em soluções para NP e em medicamentos principalmente referentes ao Ba e sobre os seus efeitos no organismo. No entanto, trabalhos anteriores mostraram uma significativa contaminação das soluções de NP por metais como cromo, chumbo, arsênio, bário, germânio, alumínio e manganês (BUCHMAN, 2001). Esta contaminação pode levar à deposição em órgãos e, conseqüentemente, às anomalias e aos danos em pacientes submetidos a tratamento com tais soluções.

Os contaminantes podem ser provenientes da matéria-prima, de aditivos ou da decomposição dos constituintes das formulações (BOHRER et al., 2002a; BOHRER et al., 2003). Também, podem ser oriundos dos solventes residuais, embalagens (frascos e/ou tampas) e materiais particulados. O processo de lixiviação pode implicar na passagem de metais constituintes das embalagens à solução e interagir com componentes com maior afinidade.

Dependendo da fonte, um mesmo produto, proveniente de lotes diferentes, pode apresentar variações na concentração dos contaminantes (BOHRER et al., 2003). O tipo de frasco em que o produto foi embalado também pode ser outro fator de contaminação. As tampas de borracha também podem contribuir para um aumento da contaminação por metais, pois a borracha é uma mistura complexa de diversos constituintes.

Assim, apesar de muitos contaminantes das formulações farmacêuticas se apresentarem em níveis traços, quando são administrados em pacientes debilitados e com problemas de saúde, podem oferecer alto risco de toxicidade e um potencial de acúmulo (BOHRER, 2008).

Neste trabalho determinou-se a quantidade de Ba presente nas embalagens plásticas e de vidro que armazenam as formulações farmacêuticas de uso parenteral. Estudou-se a contaminação por Ba em soluções para nutrição e medicamentos de uso parenteral. E, estes resultados foram comparados com a concentração de Ba obtidos nas soluções de NP preparadas a partir dessas formulações comerciais e medicamentos que foram diluídos para serem administrados aos pacientes da Unidade de Terapia Intensiva (UTI) - Neonatal do Hospital da Universidade Federal de Santa Maria (HUSM).

A interação entre os constituintes das NP e medicamentos foi investigada através de um ensaio de contato entre estes e uma resina de troca iônica condicionada com Ba.

O comportamento tóxico do Ba foi avaliado após sua administração no organismo de ratos Wistar por via intraperitoneal. O efeito do gluconato de cálcio e citrato de sódio na deposição deste metal nos diversos tecidos também foi analisado.

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 Bário

Ba é um denso metal alcalino terroso, quinto elemento do Grupo 2 da tabela periódica com número atômico 56 e massa atômica 137,34 (LEE, 1999; PURDEY, 2004; IPCS-INCHEM, 2001).

O Ba é um metal branco prateado, maleável e dúctil, que é estável em ar seco, mas oxida rapidamente em ar úmido reagindo com a água, formando óxido ou hidróxido e funde a 710°C (IPCS-INCHEM, 2001; VOGEL, 1981; JOURDAN et al., 2000). Ele não é encontrado na natureza na forma elementar, mas ocorre como cátion divalente em combinação com outros elementos. Comumente são encontradas duas formas de Ba, sulfato de Ba e carbonato de Ba em depósitos subterrâneos de minérios, sendo a barita, o mineral através do qual é produzido o sulfato de Ba.

Minérios de Ba são explorados por várias aplicações industriais, agricultura e médica (PURDEY, 2004). O sulfato de Ba insolúvel é usado em suspensão como contraste radiológico na medicina de humanos e na veterinária, enquanto que os sais solúveis de Ba (acetato, sulfitos, carbonatos, cloretos, hidróxidos, nitratos) são altamente tóxicos e usados extensivamente pela indústria, exército e agricultura, para a fabricação de papéis, de pesticidas, de borrachas, de ligas de metal/aço, de eletrodos de soldagem, de tintas, de tecidos, couro, aditivos de combustíveis, componentes de TV/eletrônicos, cerâmicas, vidros, sabões, de colas, entre outros.

Emissões de Ba na atmosfera podem ser resultados da mineração, refino, ou processos do mineral de Ba, durante a queima de carvão e combustíveis fósseis (IPCS-INCHEM, 2001). Ele também é descartado em esgotos através de processos industriais e através das atividades humanas na eliminação de cinzas de resíduos doméstico em aterros.

No solo o Ba substitui outros compostos, como dióxido de manganês, dióxido de silício e dióxido de titânio sob condições típicas do meio (IPCS-INCHEM, 2001). Contudo outros metais destrocam o Ba como o óxido de alumínio (MCCOMISH & ONG, 1988 *apud* CHOUDHURY & CARY, 2001). Apesar de concentrações relativamente altas nos solos, somente uma quantidade limitada de Ba acumula-se nas plantas. Este metal é ativamente

absorvido pelos legumes, leguminosas, plantas forrageiras, noz preta (*Juglans nigra*), noz amarga (*Carya* sp.), castanha do Brasil (*Bertholletia excelsa*), Douglas-fir (*Pseudotsuga menziesii*) e plantas do gênero *Astragallu*. Também, tem-se observado o acúmulo de Ba em cogumelos.

O Ba presente em águas varia dependendo das condições geológicas regionais (IPCS-INCHEM, 2001). O Ba solúvel e partículas em suspensão podem ser transportados por longas distâncias pelos rios, dependendo das taxas de fluxo e sedimentação. Enquanto algumas concentrações do metal são removidas através de precipitação trocando com o solo, ou outros processos, quantidades de Ba da superfície das águas que, finalmente, atingem os oceanos. Uma vez que fontes de água doce descarregam nas águas do mar, íons de Ba e de sulfatos presentes nas águas salgadas formam sulfato de Ba. A concentração marinha geralmente aumenta com a profundidade, sugerindo que o Ba pode ser incorporado aos organismos na zona eufótica e, subseqüentemente, sedimentado e liberado em águas ainda mais profundas. Em meio marinho contaminado com metais pesados, Guthrie et al. (1979) mensuraram concentrações de Ba de 7,7 mg/L em águas e 131,0 mg/kg por massa de sedimento.

A rota mais importante de exposição ao Ba é através da ingestão de água e alimentos (IPCS-INCHEM, 2001). Partículas contendo Ba podem ser inaladas para o pulmão, mas pouco se conhece em relação à absorção por esta via. Schroeder et al. (1972) estimaram a dose diária total de 1,33 mg/dia, incluindo alimentos, água e ar (0,001 mg). Estudos em ratos usando sal solúvel (cloreto de Ba) têm indicado que íons de Ba são distribuídos pelo sangue e depositados primeiramente no esqueleto. A principal rota de eliminação imediata à administração oral, à inalação ou à intraqueal é nas fezes. Seguido da introdução pelo trato respiratório o aparecimento de sulfato de Ba nas fezes representa a depuração mucociliar dos pulmões e subseqüente ingestão.

### 2.1.1 Toxicologia

A intoxicação aguda por sulfato de Ba e por outros compostos deste metal é rara, havendo limitadas citações na literatura internacional, envolvendo situações de tentativa de suicídio (PÉLISSER-ALICOT et al., 1999).

O Ba não é considerado um elemento essencial e dependendo da sua forma química pode ser tóxico, principalmente quando presente em sais solúveis (GONÇALVES et al.,



2009). Estes aspectos químicos foram observados no caso Celobar, ocorrido no Brasil em 2003, em que pacientes ao invés de ingerir um medicamento baseado em sulfato de Ba para melhorar o contraste nas radiografias, consumiram um medicamento cuja síntese foi realizada com carbonato de Ba, sendo este insolúvel em água, mas facilmente dissolvido em ácido diluído. Então, a incompleta solubilização da matéria-prima resultou na biodisponibilidade do Ba no organismo causando efeito tóxico letal.

O sulfato de Ba, insolúvel, não é absorvido no trato gastrointestinal (TGI) em condições rotineiras de administração, por via oral como contraste radiopaco para radiografias, em doses que podem chegar até 450 g/por pessoa (PÉLISSER-ALICOT et al., 1999). Entretanto, pode ser parcialmente absorvido se houver lesão do TGI ou obstipação intestinal.

A toxicocinética dos íons de Ba é a mesma para seus sais e bases solúveis (cloreto, nitrato, carbonato, sulfeto, hidróxido) (CUNHA, 2006 apud IPCS-INCHEM, 2001; AMDUR & KLAASSEN, 1991; ELLENHORN, 1997). Compostos, como o nitrato e o hidróxido, são irritantes locais da pele, pulmões e TGI.

Dentre os sinais e sintomas de intoxicação, a exposição a compostos solúveis do Ba pode levar a efeitos tóxicos em vários sistemas fisiológicos, incluindo o gastrointestinal (salivação, náusea, vômito, diarreia aquosa, intensa dor abdominal, aumento do peristaltismo ou movimento intestinal); o sistema nervoso (midríase, ansiedade, parestesia circumoral e periférica, diminuição de reflexos profundos de tendões, cefaleia, confusão e convulsão); o sistema respiratório (insuficiência respiratória e edema pulmonar); o sistema cardíaco (aumento da automaticidade ou do ritmo, hipertensão, arritmias – contrações ventriculares prematuras, prolongamento do intervalo QT, taquicardia ventricular, fibrilação ventricular e assistolia; e o sistema muscular (mioclonia, mialgias ou dores musculares, rigidez, paralisia, disartria ou dificuldade de articulação e paralisia flácida (com fraqueza muscular)) (IPCS-INCHEM, 2001).

A ingestão oral desde 0,8 a 1,5 g de composto solúvel do Ba pode levar a paralisia por hipocalemia (diminuição do potássio) e morte. O Ba estimula inicialmente a musculatura estriada, cardíaca e lisa e diminui o potássio sérico, que é forçado a permanecer dentro das células (CUNHA, 2006). Na sequência, há fraqueza muscular resultante da despolarização direta e bloqueio neuromuscular. Dentro de 1 a 2 horas após ingestão de algum composto solúvel de Ba, os pacientes apresentam formigamento ao redor da boca, diarreia, vômito e dor abdominal intensa, tipo cólica. Usualmente observa-se também hipertensão arterial. Em 2 a 3 horas o formigamento migra para as faces e para as mãos, as reações pupilares são diminuídas ou impedidas, os reflexos musculares ficam deprimidos e a flacidez muscular começa nas

extremidades superiores e inferiores. Em alguns casos, quadriplegia flácida completa aparece dentro de poucas horas; em outros, a paralisia torna-se grave no segundo dia da intoxicação. A sensibilidade é sempre preservada. Na maioria dos casos os sintomas desaparecem em 24 horas e os pacientes podem receber alta em 48 horas. Em alguns pacientes a paralisia muscular e a fraqueza podem persistir por mais de uma semana. O prognóstico em longo prazo é favorável, mas a síndrome aguda, que pode incluir arritmia cardíaca, pode ser fatal e deve ser prontamente tratada. A morte pode sobrevir em poucas horas, em consequência da parada cardíaca e paralisia respiratória, a não ser que um vigoroso tratamento com administração de potássio intravenoso seja conduzido.

É necessário fazer diagnóstico diferencial frente a outras circunstâncias que podem levar a sintomatologia semelhante àquela provocada pelo Ba, tais como o envenenamento pelo peixe ciguatera, o envenenamento parolítico e neurotóxico pelo peixe baiacu, botulismo, difteria, paralisia periódica hipocalêmica familiar, paralisia tirotóxica periódica, síndrome de Guillain-Barré e gastroenterite (IPCS-INCHEM, 2001). Como critério complementar de diagnóstico, a radiografia do abdômen deve indicar a presença de produto radiopaco no intestino delgado e cólon; concentrações sanguíneas de Ba elevadas são bons indicadores de absorção de composto baritado.

## **2.2 Nutrição Parenteral (NP)**

NP é definida como solução ou emulsão estéril e apirogênica, composta por carboidratos, aminoácidos, lipídeos, vitaminas e minerais, destinada à administração intravenosa, visando à síntese ou manutenção dos tecidos, órgãos ou sistemas. A NP consiste no aporte de substâncias nutritivas para satisfazer as necessidades nutricionais diárias do paciente (BERTOL et al., 2006).

A história da NP começou a ser traçada por volta de 1600 quando Sir Christopher Wren infundiu vinho e cerveja na corrente sanguínea de um cão. Após este episódio se passaram mais de 300 anos para surgir com Dr. Latta, em 1931, soluções venosas contendo carboidrato, cloreto de sódio e água para tratamento de algumas doenças como a cólera (RIBEIRO, 2007). A era moderna da NP começou em 1968, quando Stanley Dudrick demonstrou que filhotes de cães da raça Beagle, sob NP total e exclusiva cresceram de

maneira igual a seus controles ingerindo ração canina. Dudrick foi um dos maiores colaboradores para o desenvolvimento da NP moderna.

### 2.2.1 Indicação

Este tipo de nutrição pode ser realizado de forma total ou parcial. NP parcial se aplica a indivíduos capazes de se manter parcialmente por via oral, mas que necessitam de alguma assistência e apoio através de outros meios (HARRAKI et al., 1995). É prescrita a pacientes portadores de diversas doenças complexas como câncer ou AIDS, para pacientes cirúrgicos, pré e pós-operatório, e pacientes pediátricos.

### 2.2.2 Principais Componentes

Uma NP total típica pode ser representada pela composição abaixo (DI et al., 2009)

- Solução de aminoácidos totais
- Solução de glicose
- Cloreto de sódio
- Cloreto de potássio
- Fosfato de potássio
- Gluconato de cálcio
- Sulfato de magnésio
- Solução multivitamínica
- Solução de oligoelementos
- Solução de lipídios

## 2.3 Recipientes para uso farmacêutico

Um recipiente para uso farmacêutico, segundo a Farmacopeia Britânica (BP), 2012, é um artigo que contém, ou seja, destinado a conter um produto o qual fica, ou pode ficar, em contato direto com ele. A tampa é uma parte do recipiente.

O recipiente se apresenta de tal modo que o conteúdo possa ser removido em uma forma adequada para o uso pretendido da preparação. Ele fornece um grau de proteção variável, dependendo da natureza do produto e os perigos do ambiente e minimiza a perda de componentes. O recipiente não interage fisicamente ou quimicamente com o conteúdo de uma maneira que altere a sua qualidade além dos limites tolerados por exigências oficiais.

Basicamente, existem dois tipos de embalagens utilizadas para armazenar formulações para uso parenteral: embalagens plásticas e embalagens de vidro.

As embalagens plásticas tornaram-se comercialmente disponíveis somente na década de 80. Ao contrário do vidro, que é um produto inorgânico, o plástico é de natureza orgânica e polimérica. Os plásticos mais importantes para embalagens de soluções parenterais são as poliolefinas (polipropileno, polietileno e copolímeros de etileno e polipropileno) e o cloreto de polivinila (PVC) (AVIS et al., 1986).

### 2.3.1 Recipientes de vidro

O vidro é um líquido viscoso resfriado até a condição de rigidez, sem cristalizar (SHELBY, 1997). É produto de fusão de materiais cristalinos em temperaturas elevadas, caracterizando-se por não possuir uma temperatura de fusão definida. A composição básica do vidro pode ser expressa por três compostos inorgânicos sílica (73%),  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  (14%),  $\text{CaCO}_3$  (11%).

Na estrutura do vidro cada átomo de silício está ligado a quatro átomos de oxigênio (SHELBY, 1997). Os átomos de oxigênio se dispõem espacialmente formando um tetraedro. Os tetraedros estão ligados pelos vértices através do compartilhamento de um átomo de oxigênio por dois átomos de silício. Todos os quatro átomos de oxigênio de um tetraedro podem ser compartilhados com quatro outros tetraedros formando uma rede tridimensional

No vidro existem vários constituintes que podem ser divididos em cinco categorias, tomando-se por base a função que desempenham no processo: formador, fundente, agente modificador, agente de cor e agente de refino (ALVES et al., 2001). Os formadores de vidro são os responsáveis pela formação da rede tridimensional estendida aleatória; os principais formadores comerciais são:  $\text{SiO}_2$  (sílica),  $\text{B}_2\text{O}_3$  e  $\text{P}_2\text{O}_5$ . Os fundentes têm a função de reduzir a temperatura de processamento para valores inferiores a  $1600^\circ\text{C}$ , sendo os mais comuns os óxidos de metais alcalinos (lítio, sódio e potássio) e o  $\text{PbO}$ . A degradação das propriedades é usualmente controlada pela adição de agentes modificadores, os quais incluem os óxidos de metais de transição e de terras raras e, principalmente, a alumina ( $\text{Al}_2\text{O}_3$ ). Os agentes de refino são adicionados para promover a remoção de bolhas geradas no fundido, sendo utilizados em quantidades muito pequenas ( $<1\%$  mol). Incluem-se aí os  $\text{Sb}_2\text{O}_3$  e  $\text{As}_2\text{O}_3$ ,  $\text{KNO}_3$ ,  $\text{NaNO}_3$ ,  $\text{NaCl}$ ,  $\text{CaF}_2$ ,  $\text{NaF}$ ,  $\text{Na}_3\text{AlF}_6$  e alguns sulfatos. Os agentes de cor, como o próprio nome sugere, são utilizados para conferir cor aos vidros. Os vidros coloridos são, usualmente, produzidos pela adição de compostos de metais de transição 3d ou de terras raras 4f. Contudo, a cor final obtida depende do estado de oxidação do metal, da sua concentração, da composição do vidro e do tratamento térmico ao qual foi submetido.

Os vidros são muito utilizados como embalagens pelas indústrias farmacêuticas, em virtude de sua estrutura rígida, sua alta resistência química, facilidade de esterilização e transparência (AVIS et al., 1986). Recipientes de vidro são muito utilizados para o armazenamento de medicamentos. O uso de embalagens de vidro na indústria de soluções parenterais se deve, principalmente, às seguintes características:

- possui excelente resistência química na interação com o conteúdo, não absorvendo nem liberando componentes orgânicos;
- é impermeável à entrada ou à saída de gases;
- é facilmente limpo, por causa de sua superfície lisa;
- é transparente, facilitando a inspeção do conteúdo;
- é rígido, forte e dimensionalmente estável, suporta vácuo e pode ser aquecido a  $121^\circ\text{C}$  para esterilização a vapor, ou a  $260^\circ\text{C}$  para esterilização seca, sem deformação;
- pode ser facilmente confeccionado a partir de um molde.

A BP, 2012, define os recipientes de vidro para uso farmacêutico como artigos de vidro destinados a entrar em contato direto com produtos farmacêuticos. Existem vários tipos de recipiente de vidro, tais como:

- Ampolas:

São recipientes de vidro com paredes finas que, após o enchimento, são seladas por fusão do vidro. Os conteúdos são retirados após a ruptura do vidro, em uma ocasião única.

- Garrafas, frascos e seringas:

Estes são recipientes com paredes mais ou menos espessas com tampas de vidro ou de outro material diferente de vidro, tais como materiais plásticos e elastômeros. O conteúdo pode ser removido em diversas parcelas em uma ou mais ocasiões.

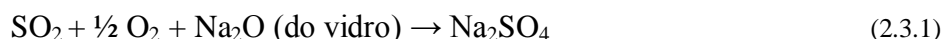
Uma característica importante do vidro para uso farmacêutico é a resistência ao ataque químico, ou a durabilidade química. Esta durabilidade, também denominada estabilidade química, é expressa pela resistência hidrolítica, isto é, a resistência em liberar substâncias minerais solúveis para a água, quando em contato com a superfície interna do recipiente. A resistência hidrolítica é calculada pela titulação da alcalinidade (AVIS et al., 1986).

Conforme a Farmacopeia Brasileira (FB), 2010, os recipientes de vidro são classificados de acordo com a resistência hidrolítica:

Tipo I: vidros borosilicatos, com elevada resistência hidrolítica, devido à sua composição química. Possuem uma quantidade relativamente baixa de  $\text{Na}_2\text{O}$  e uma quantidade relativamente alta de  $\text{B}_2\text{O}_3$  e  $\text{Al}_2\text{O}_3$ , responsáveis pela durabilidade química superior. A função mais importante do  $\text{B}_2\text{O}_3$  é agir como um fundente não alcalino, facilitando a fusão do vidro pobre em  $\text{Na}_2\text{O}$ . Na forma de tubos, são usados na fabricação de *vials*, ampolas, corpo das seringas e componentes para a administração de grandes volumes parenterais. As soluções de pequeno volume geralmente estão disponíveis em seringas ou cartuchos de vidro de dose única. Estes vidros são apropriados não só para uso parenteral, como também para sangue humano e seus componentes.

Tipo II: vidros sodocálcicos tratados. O processo usado para dealcalinizar a superfície é conhecido como tratamento sulfúrico e é feito para melhorar a resistência química. Tipicamente o dióxido de enxofre é introduzido nos frascos recém-formados, passando na

máquina da forma para o recozimento. O SO<sub>2</sub> reage com a superfície do vidro para formar sulfato de sódio. Frascos frios podem ser tratados pela introdução de enxofre ou um composto de enxofre, tais como ácido sulfúrico ou sulfato de amônio e reaquecidos dentro da faixa de temperatura de recozimento, em torno de 550°C ou mais. Com o tratamento com SO<sub>2</sub>, a reação global que ocorre é a seguinte:



Íons hidrogênio, provavelmente oriundos da umidade ambiente, têm um papel importante. Primeiro, ocorre a formação de ácido sulfúrico na superfície do vidro, seguida pela troca de íons hidrogênio com íons sódio do vidro.



O produto final é a troca iônica e difusão dos íons H<sup>+</sup> dentro do vidro. A intensidade de dealcalinização é indicada pela quantidade de sulfato de sódio produzido na superfície do vidro. Geralmente, a quantidade de sódio no depósito de sulfato é igual aquela na superfície do vidro, de alguns décimos de micrômetro de espessura. Os frascos são comercializados com uma “névoa” de sulfato de sódio presente. A névoa é retirada quando eles são lavados antes do envase, aumentando a eficiência da limpeza. Este processo não somente reduz a abundância de íons sódio disponíveis na superfície para a reação com o produto líquido, mas também a estabilidade da superfície alterada é grandemente aumentada, e a extração de todos os componentes do vidro pelo conteúdo do frasco é reduzido.

A dealcalinização pode também ser feita com outros gases ácidos. O gás clorídrico, por exemplo, conduz a formação de cloreto de sódio em vez de sulfato de sódio. Em geral, vidros Tipo II não são comumente usados para armazenar soluções parenterais, mas para preparações aquosas para uso parenteral com pH menor que 7, sendo necessário verificar a estabilidade de cada preparação neste tipo de recipiente (AVIS et al., 1986).

Tipo III: são vidros sodocálcicos não tratados. Possuem resistência hidrolítica moderada e são apropriados para soluções não aquosas e sólidos para uso parenteral e não parenteral, além de alimentos, vinhos, cervejas, água e cosméticos.

Tipo IV: são vidros sodocálcicos também denominados NP (Não Parenterais). Possuem baixa resistência hidrolítica e são utilizados para preparações sólidas, líquidas ou semissólidas, que não são empregadas por via parenteral.

Para o teste de resistência hidrolítica o vidro é moído em pequenos fragmentos, peneirado, lavado e levado à autoclave com água ultrapura por 30 minutos. Depois de decantada, uma porção é titulada com ácido sulfúrico 0,02 N (FB, 2010). Os vidros são classificados de acordo com o volume de ácido gasto na titulação. Vidros Tipo I, por exemplo, têm alta resistência e não devem consumir mais do que 1 mL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0,02 N. A Tabela 2.3.1 mostra a classificação dos tipos de vidro em função do teste.

Tabela 2.3.1 - Classificação dos tipos de vidro de acordo com a resistência hidrolítica

Tipo	Descrição do vidro	Tipo de teste	Limites	
			Capacidade do frasco* (mL)	mL H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 0,02 N
I	Borosilicato, alta resistência	Vidro moído	Todos	1,0
II	Sodocálcico tratado	Ataque da água**	100 mL ou menos Acima de 100 mL	0,7 0,2
III	Sodocálcico	Vidro moído	Todos	8,5
NP	Sodocálcicos	Vidro moído	Todos	15,0

\*Capacidade se refere ao volume que o frasco contém;

\*\*O teste do ataque da água ocorre somente com água dentro do frasco e com 60 min. de autoclavagem.

### 2.3.2 Embalagens plásticas

Os plásticos são materiais orgânicos poliméricos sintéticos, de constituição macrocelular constituído por pequenas moléculas ou monômeros (MANO & MENDES,



2004). Estes monômeros são unidos pelo processo de polimerização. Os monômeros geralmente se consistem de átomos de carbono, hidrogênio, oxigênio, nitrogênio e haletos (fluoretos, cloretos e brometos). Os plásticos podem ser subdivididos em:

- Termofixos são polímeros de cadeia ramificada, para os quais, o "endurecimento" (polimerização ou cura) é consequência de uma reação química irreversível.
- Termoplásticos têm como vantagem sua versatilidade e facilidade de utilização, dispensando, geralmente, a necessidade de máquinas e equipamentos muito elaborados e financeiramente dispendiosos.

Os plásticos podem conter resíduos do processo de polimerização, plastificantes, estabilizadores, antioxidantes, pigmentos e lubrificantes (FB, 2010). Fatores como a composição do plástico, processamento e procedimentos de limpeza, tratamento de superfície, meios de contato, corantes, adesivos, absorção e permeabilidade de conservantes e condições do armazenamento podem afetar a adequação de um plástico para um uso específico. Por isso, são realizados testes de extraíveis que são planejados para caracterizar os componentes extraídos e, assim, identificar os possíveis migrantes. O grau ou extensão dos testes para extrair substâncias de um componente depende da finalidade de uso e do grau de risco de impactar negativamente na eficácia do produto.

As exigências para os recipientes plásticos para soluções parenterais segundo a FB, 2010, são os seguintes:

- assegurar que a qualidade da solução parenteral se mantenha durante a vida útil do produto;
- possibilitar o envasamento, a esterilização, a embalagem, o armazenamento, o transporte, a manipulação e a administração da solução parenteral de forma segura e eficaz;
- evitar a contaminação microbiológica da solução;
- evitar interações físicas, químicas ou biológicas entre o recipiente e a solução, que afete a estabilidade da preparação e que ocasione problemas de toxicidade ao usuário;
- assegurar compatibilidade funcional com os equipos de infusão.

Os recipientes plásticos devem reunir as seguintes condições segundo especificações da FB, 2010:

- serem suficientemente transparentes ou translúcidos para permitir uma inspeção visual do conteúdo contra a luz;
- serem fabricados com materiais plásticos isentos de pigmentos e corantes;
- serem facilmente esvaziável sem insulflar ar, e resistente à tração e à pressão;
- serem de paredes uniformes, sem fissuras, rachaduras, rebarbas, bolhas de ar ou materiais estranhos;
- serem compatíveis com as NP durante o armazenamento;
- serem apirogênicos, atóxicos e relativamente impermeáveis a vapor de água;
- que possam ser fechados convenientemente, vazios ou cheios, a fim de evitar a contaminação das NP;
- serem providos de um elemento resistente para a sustentação a uma escala graduada de volume.

#### **2.4 Tampas de borracha**

Tampas de elastômero são fabricadas em materiais obtidos a partir da polimerização, poli adição ou poli condensação de substâncias orgânicas (FB, 2010). Os polímeros obtidos são, geralmente vulcanizados. As formulações das tampas contêm elastômeros naturais ou sintéticos e aditivos inorgânicos e orgânicos para auxiliar ou controlar a vulcanização, proporcionar propriedades físicas e químicas, coloração, ou estabilizar a formulação da tampa. Tampas de borracha podem ser classificadas em dois tipos:

- Tipo I são utilizadas para preparações aquosas;
- Tipo II são normalmente destinadas às preparações não aquosas.

#### 2.4.1 Características das tampas

As tampas de elastômero são translúcidas, ou opacas e não tem coloração característica, dependendo dos aditivos utilizados. São homogêneas e praticamente isentas de materiais luminosos e acidentais, como fibras, partículas estranhas, e resíduos de borracha.

## 3 OBJETIVOS

### 3.1 Objetivos gerais

Este trabalho teve por objetivo estudar a contaminação por Ba em soluções de NP e medicamentos oriunda das embalagens de vidro e plásticos nas quais são armazenados. Averiguar, através de estudos de contato com resina condicionada com Ba, os constituintes das NP e dos medicamentos que possuem afinidade e interage com o Ba, facilitando sua lixiviação das superfícies dos recipientes para a solução. Também, estudar a distribuição deste metal nos tecidos do organismo de ratos Wistar.

### 3.2 Objetivos específicos

- Otimizar a metodologia para a determinação de Ba em NP e medicamentos.
- Determinar a concentração de Ba, nas embalagens, de plástico e de vidro, que armazenam as NP e medicamentos, assim como, em tampas de borracha, cinzas e vermehas, das embalagens de vidro que armazenam as NP, nas borrachas pretas que vedam os embolos das seringas e nas manueiras dos equipos.
- Determinar a concentração de Ba em soluções comerciais para NP, em soluções de NP após serem preparadas e armazenadas em bolsas, nos medicamentos comerciais e nos medicamentos após serem diluídos e armazenados em seringas.
- Investigar a interação de alguns constituintes das NP e medicamentos com o Ba, através de ensaio de contato com resina catiônica condicionada com Ba.
- Determinar a DL 50 do BaCl<sub>2</sub> em ratos.

- Definir uma metodologia adequada para a digestão e para a determinação de Ba por GF-ASS em amostras de tecidos e sangue retirados de ratos.
- Investigar o comportamento do Ba em modelo animal introduzido por via intraperitoneal em combinação ou não com citrato de sódio e gluconato de cálcio.

## 4 Capítulo 1: Investigação da contaminação de Ba em NP e medicamentos

Este primeiro capítulo destinou-se ao estudo das NP e medicamentos, tendo por objetivo a determinação da contaminação das formulações farmacêuticas e a investigação das possíveis fontes de contaminação. Na primeira parte, deste capítulo, determinou-se a quantidade de Ba presente nas embalagens, já que este metal faz parte da constituição dos vidros e plásticos. Visando a possibilidade de ocorrer a passagem do metal das embalagens para as formulações farmacêuticas, sendo, então, as embalagens como uma provável fonte de contaminação. Também, determinou-se a quantidade de Ba nas soluções comerciais para NP, nos medicamentos comerciais, nas soluções de NP e nos medicamentos diluídos em seringas. Os resultados obtidos foram comparados para verificar se o preparo e/ou o maior tempo de contato com as superfícies das embalagens contribuiriam para aumentar a contaminação. A segunda parte, destinou-se ao estudo da interação individual dos constituintes das NP (aminoácidos e gluconato de cálcio) e dos medicamentos (ácido cítrico) com o Ba. Tendo como o objetivo verificar a possibilidade desses compostos se ligarem com o Ba das embalagens, transferindo-o para as soluções e, conseqüentemente contaminando-as. A Figura 4.1 esquematiza resumidamente este primeiro capítulo.

### Capítulo I: Investigação da contaminação de Ba em NP e medicamentos

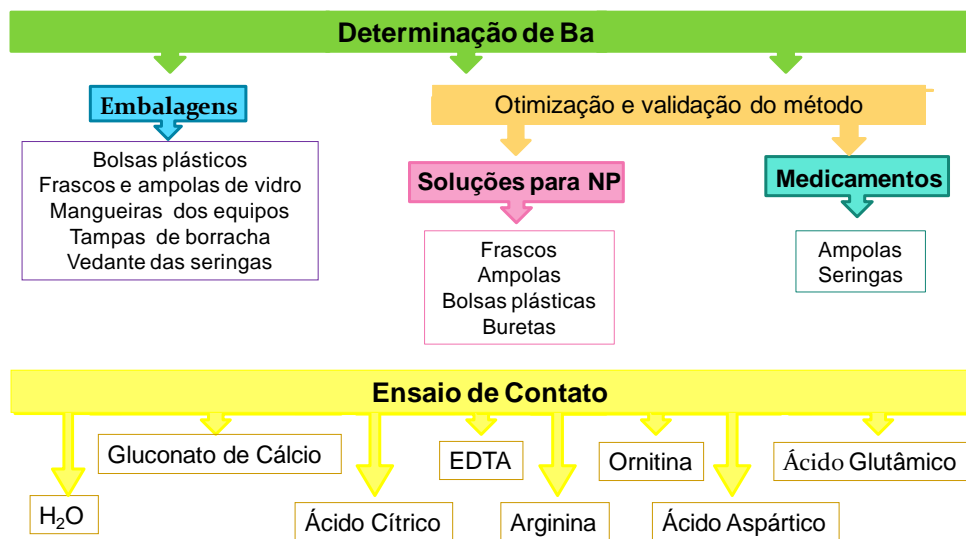


Figura 4.1- Esquema resumo do primeiro capítulo.

## 4.1 Materiais e Métodos

### 4.1.1 Reagentes e Soluções

Os reagentes utilizados neste trabalho estão listados no Apêndice A. As soluções foram preparadas com água, a qual sofreu processo de destilação, deionização e purificação em sistema de Milli-Q (Millipore, Bedford, MA, EUA).

A solução analítica de Ba foi preparada a partir de uma solução estoque de 1000 mg/L fornecido por *National Institute of Standards and Technology* (NIST).

A solução 1% (m/v) de cloreto de cálcio (Fluka, Alemanha) foi preparada pela sua dissolução em água.

Utilizou-se uma resina trocadora de cátions fortemente ácida DOWEX 50 x 4; 50-100 mesh com aproximadamente 4 meq/g; (Fluka, Alemanha).

Para evitar a contaminação de metais, todo o material de laboratório, de vidro e de plástico, foi lavado e submerso em solução 10% (v/v) de HNO<sub>3</sub> em etanol por 48 horas e novamente lavado com água purificada antes de serem utilizados.

### 4.1.2 Instrumentação

A determinação de Ba em amostras de vidro, plástico e borrachas, assim como, nas soluções do ensaio de contato, foi realizada usando um espectrômetro de absorção atômica ANALYTIK Jena AG (Jena, Alemanha) modelo novAA 300 equipado com lâmpada de cátodo oco SpectrAA (Varian, Austrália) como fonte de radiação. A chama usada foi acetileno-óxido nitroso; o fluxo de gás e a altura do queimador foram ajustados para obter o máximo de sinal de absorvância. Os parâmetros instrumentais estabelecidos estão mostrados na Tabela 4.1.

Para estas análises foi utilizado cloreto de potássio como supressor de ionização. Aproximadamente 0,2 g do reagente foram adicionados em cada 10 mL de solução de amostra.

Tabela 4.1 - Parâmetros para determinação de Ba por F-AAS

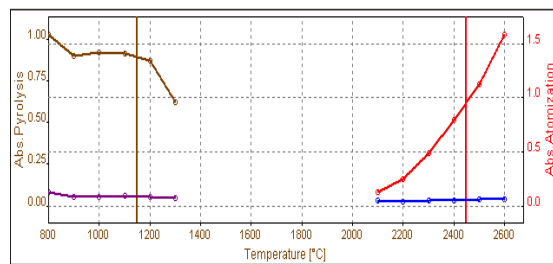
Comprimento de onda: 553,6 nm	Fenda: 0,2 nm	Corrente: 6 mA
Tempo de integração: 3 s	Tempo autozero: 3 s	Delay: 5 s
Chama		
Tipo: C <sub>2</sub> H <sub>2</sub> /N <sub>2</sub> O	Fluxo do C <sub>2</sub> H <sub>2</sub> : 180 L/h	Tipo do queimador: 50 mm
Altura do queimador: 5mm	Vazão do nebulizador: 5 mL/min	

As determinações de Ba em amostras de soluções para nutrição parenteral e em medicamentos foram executadas usando um espectrômetro de absorção atômica modelo ZEEnit 600 equipado com atomizador de grafite transversalmente aquecido (Analytik Jena, Jena, Alemanha), e com corretor de fundo com efeito *Zeeman*. A fonte de radiação foi uma lâmpada de Ba de cátodo oco (SpectrAA, Varian, Austrália). Argônio 99.996% (White Martins, São Paulo, Brasil) foi empregado como gás de arraste. Foi utilizado 5 µL de solução 1% (m/v) de CaCl<sub>2</sub> como modificador químico. Os parâmetros de operação do GF-AAS e as curvas de pirólise e atomização encontram-se respectivamente na Tabela 4.2 e na Figura 4.2.

Tabela 4.2 - Parâmetros de operação do GF-ASS para determinação de Ba

Comprimento de onda: 553,6 nm		Fenda: 0,2 nm	Corrente: 6 mA			
Modo de integração: Área de pico		Tempo de integração: 8 s				
No	Tipo	Temperatura (°C)	Rampa (°C/s)	Aquecimento (s)	Tempo (s)	Fluxo de gás (L/min)
1	Secagem	90	5	20	34,0	3,0
2	Secagem	105	3	20	25,0	3,0
3	Secagem	110	2	10	12,5	3,0
4	Pirólise	1150	250	10	14,2	3,0
5	Autozero	1150	0	6	6,0	3,0
6	Atomização	2600	FP	8	8,9	0,0
7	Limpeza	2700	500	6	6,2	3,0





—: Pirólise                      —: Atomização  
 —: Correção de fundo        —: Correção de fundo

Figura 4.2 - Curvas de pirólise (temperatura de atomização 2600 °C) e atomização (temperatura de pirólise 800 °C) de 100 µg/L de Ba.

Outros equipamentos:

- Sistema de purificação de água Milli-Q Millipore (resistividade 18,2 mΩ.cm);
- Balança analítica Sartorius com 4 casas de precisão;
- Câmara de fluxo laminar Trox do Brasil, Classe 100;
- Mufla elétrica Heraeus, MR-170E;
- Estufa Ehret;
- Potenciômetro Digital DM 20 Digimed;
- Agitador Mecânico Edmund Bühler 7400 KL1.

#### 4.1.3 Obtenção das amostras

Os frascos de vidro das formulações comerciais de NP foram obtidos no HUSM. As ampolas de vidro transparente e âmbar de 10 mL foram fornecidas pela Schott. As bolsas plásticas de polivinil cloreto (PVC) (Baxter) foram disponibilizadas das amostras das soluções de NP. Os frascos de polietileno (PE) foram fornecidos pela Fresenius-Kabi. As tampas de borracha cinza e vermelha foram retiradas dos frascos de vidro das formulações comerciais para NP.

As amostras de solução de NP foram fornecidas pela equipe de enfermagem da UTI – Neonatal do HUSM. Através de prescrição médica, os recém-nascidos recebiam algum tipo

de NP, trocada a cada 24 horas, sendo as bolsas descartadas após este período. O volume de solução de NP restante em cada bolsa foi suficiente para a realização deste estudo. A composição de cada bolsa está descrita no Anexo B.

As amostras das formulações comerciais utilizadas para o preparo das bolsas dos recém-nascidos foram fornecidas pelo setor de preparo de NP do Hospital Universitário.

As amostras de medicamentos foram fornecidas pela própria unidade de terapia intensiva, visto que o preparo destes é realizado pela equipe de enfermagem da UTI.

#### 4.1.4 Preparo das embalagens de vidro e plásticas, ampolas de vidro, tampas de borracha, borracha vedante dos êmbolos das seringas e mangueiras dos equipos

A quantificação de Ba foi realizada primeiramente nas embalagens que entram em contato direto com as formulações parenterais. As embalagens estudadas foram os recipientes de vidro que armazenam as formulações comerciais das soluções para NP, as tampas de borracha cinza e vermelha desses recipientes, as bolsas que armazenam as soluções de NP, as ampolas de vidro âmbar e transparente, as borrachas pretas que vedam os êmbolos das seringas e as mangueiras dos equipos.

Para a determinação do teor de Ba, os materiais plásticos e de borracha foram cortados em pequenos pedaços, lavados com água e colocados em câmara de fluxo laminar para secar. As amostras foram pesadas (0,3 g) em cadinhos de porcelana e, adicionou-se 1 g de fundente  $\text{NaNO}_3$ . Os cadinhos foram colocados na mufla por 6 horas a  $800^\circ\text{C}$ . A seguir, foram retirados da mufla, e, após estarem em temperatura ambiente, foram adicionados 3 mL de  $\text{HNO}_3$  e 2 mL de  $\text{HCl}$ . As soluções foram transferidas para *vials* de 50 mL e os volumes foram aferidos a 50 mL com água (BERTAGNOLLI, 2008). Em paralelo, realizou-se a digestão das amostras com adição de 500  $\mu\text{L}$  da solução do NIST de 1000 mg/L de Ba, obtendo-se uma concentração final da adição de 10 mg/L de Ba.

Os vidros transparentes dos recipientes das soluções para NP e as ampolas transparente e âmbar foram lavados com Extran 2% (v/v), enxaguados com água e colocados em câmara de fluxo laminar para secar. Estes foram enrolados em papelão e quebrados com um martelo. Os pedaços foram colocados em um gral e com o pistilo macerou-se até o vidro ficar um pó bem fino. Cerca de 0,1 g de pó de vidro foi pesado em frascos plásticos de 50 mL e foram adicionados 5 mL de HF. As soluções ficaram em repouso por 48 horas e, então o

volume foi aferido a 10 mL com água (BECKER, 2002). Realizou-se, em conjunto, a digestão das amostras com adição de 100  $\mu$ L da solução do NIST de 1000 mg/L de Ba, obtendo-se uma concentração final da adição de 10 mg/L de Ba.

#### 4.1.5 Otimização do método para determinação de Ba em soluções para NP e em medicamentos por GF-ASS

Verificou-se a contaminação por Ba em amostras comerciais de soluções constituintes das nutrições parenterais, em soluções de NP armazenadas em bolsas e buretas, assim como, em amostras de medicamentos armazenados em ampolas e em seringas. Contudo, antes de realizar a determinação de Ba nestas amostras, otimizou-se o procedimento de análise.

Para tal procedimento, foram transferidas quatro alíquotas de 1 mL de cada amostra para distintos *vials* de plásticos de 15 mL. Na primeira alíquota, apenas aferiu-se o volume a 10 mL. Na segunda, foram adicionados 50  $\mu$ L de HNO<sub>3</sub> e, a seguir, aferiu-se o volume a 10 mL. Na terceira, foram adicionados 50  $\mu$ L de uma solução de 10 mg/L de Ba, preparada a partir da solução de 1000 mg/L de Ba do NIST, e o volume foi aferido a 10 mL. Na quarta alíquota, foram adicionados 50  $\mu$ L de HNO<sub>3</sub> e 50  $\mu$ L da solução de 10 mg/L de Ba e, então, aferiu-se o volume a 10 mL.

Após o preparo das soluções, todas foram analisadas por GF-AAS e os resultados foram comparados.

#### 4.1.6 Validação da metodologia para determinação de Ba nas amostras de solução de NP e em medicamentos por GF-ASS

Após a otimização do procedimento para a determinação de Ba nas amostras das NP e em medicamentos foram avaliados os seguintes parâmetros para a validação da metodologia proposta:

a) Linearidade: avaliada através da construção de três curvas de calibração desenvolvidas em dias diferentes contendo seis níveis de concentração cada, avaliando-se a regressão linear;

b) Limite de detecção (LD): os valores de limites de detecção foram calculados a partir da fórmula 4.1(HARRIS, 2008; IUPAC, 1997):

$$LD = 3\sigma/IC, \quad (4.1)$$

Onde:

$\sigma$  é o desvio padrão do Branco

IC é a inclinação da curva padrão;

O valor de  $\sigma$  foi obtido experimentalmente através da realização de 10 medidas sucessivas da absorvância do Branco.

c) Limite de quantificação (LQ): os valores de limite de quantificação foram calculados através da formula 4.2:

$$LQ = 10\sigma/IC \quad (4.2)$$

Onde:

$\sigma$  é o desvio padrão do intercepto da curva

IC é a inclinação da curva padrão;

O valor de  $\sigma$  foi obtido experimentalmente através da realização de 10 medidas sucessivas da absorvância do Branco.

d) Precisão intradia ou repetitividade: para este ensaio foi determinada a concentração de Ba através de seis medidas de uma amostra de solução de NP e medicamento, após apropriada diluição e adição de 0,5% de HNO<sub>3</sub>. A amostra de medicamento foi adicionado 20 µg/L de Ba, pois a concentração de Ba nesta amostra apresentou-se abaixo do limite de detecção;

e) Precisão interdía ou precisão intermediária: para esta avaliação as amostras foram analisadas nas mesmas condições citadas para a determinação da precisão intradía, em três dias diferentes;

f) Exatidão: foi determinada através do percentual de recuperação de 20 µg/L de Ba adicionados em amostras de solução de NP armazenadas em bolsa e medicamentos armazenados em ampolas. O procedimento foi realizado pela adição de 20 µL de uma solução de 10 mg/L de Ba a 1 mL de amostra, que então foi acidificada com 0,5% (v/v) de HNO<sub>3</sub> e o volume foi aferido a 10 mL.

#### 4.1.7 Determinação de Ba em NP

Foram analisadas as soluções comerciais de NP, estes são: água para injeção, glicose, aminoácidos, oligoelementos, vitaminas e emulsão lipídica. Também foram analisadas as soluções de NP armazenadas nas bolsas preparadas conforme as necessidades de cada paciente e as soluções que permaneceram nas buretas.

Para esta investigação, foram transferidas alíquotas de 100 µL das soluções para *vials* plásticos de 15 mL nos quais foram adicionados 5 µL de HNO<sub>3</sub> e o volume aferido a 1mL.

#### 4.1.8 Determinação de Ba em medicamentos comerciais e em seringas de administração

As formulações comerciais injetáveis analisadas foram apresentadas em ampolas de vidro ou plástico. Já, as soluções que compuseram as seringas foram manipuladas pela equipe de enfermagem, de acordo com a prescrição médica. Alguns medicamentos comerciais necessitaram ser diluídos porque a dosagem administrada aos recém-nascidos é geralmente muito baixa. Estas diluições são realizadas em seringas plásticas com capacidade de 5, 10 e 20 mL. Todas as seringas são armazenadas em temperatura ambiente ou sob refrigeração e possuem um prazo de validade determinado, sendo descartadas após este prazo.

O procedimento executado para a análise dos medicamentos comerciais armazenados em ampolas e dos medicamentos preparados e armazenados em seringas foi o mesmo para as soluções de NP descrito no item 4.1.7.

#### 4.1.9 Preparação da resina na forma de Ba para o ensaio de contato

A resina catiônica DOWEX foi lavada pela passagem de 10 mL de uma solução 2 M de  $\text{HNO}_3$  através de uma coluna com 5 g de resina. Em seguida, lavou-se com água em abundância, até o pH se tornar neutro. Em seguida, converteu-se a resina em  $\text{Ba}^{2+}$ , através do emprego de 500 mL de uma solução 0,2 M de  $\text{BaCl}_2$  em vazão de 2 mL/min. Lavou-se novamente com bastante água até não se observar mais um precipitado branco quando a água de lavagem entrava em contato com uma solução de  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ . Retirou-se a resina da coluna, efetuando-se secagem da mesma em estufa por 4 horas.

#### 4.1.10 Ensaio de contato para a investigação da interação do Ba das embalagens com as soluções dos constituintes das NP

A resina, condicionada com Ba, foi pesada (0,1 g) em frascos de 100 mL de plástico. Foram preparados 100 mL de solução 0,2 mM de ornitina, arginina, gluconato de cálcio, ácido cítrico, ácido glutâmico, ácido aspártico. Também, foram preparados 100 mL de solução 0,2 mM de EDTA para testes comparativos. Os valores de pH das soluções foram ajustados em 7,0 utilizando soluções 2 M de HCl e 2 M de NaOH. A seguir, 50 mL das soluções foram transferidas para os frascos com 0,1 g de resina e os 50 mL remanescentes de cada solução foram transferidos para frascos sem resina. Realizou-se teste em branco, no qual se deixou a resina em contato apenas com água. Foram coletadas frações de 1 mL das soluções em contato com a resina e paralelamente das soluções sem contato com a resina nos intervalos de tempo de 1 hora, 3 horas, 24 horas, 48 horas, 72 horas, 96 horas, 1 mês, 2 meses, 3 meses e 8 meses. As soluções permaneceram sob agitação direta por 96 horas. Após este período desligou-se o agitador, sendo o mesmo ligado novamente 24 horas antes da coleta das alíquotas dos demais intervalos de tempo.

## 4.2 Resultados e Discussão

### 4.2.1 Determinação de Ba em amostras de recipientes de vidro e plástico, ampolas de vidro âmbar e transparente, tampas de borracha, borrachas das seringas e mangueiras dos equipos

Primeiramente, investigou-se a presença de Ba nas embalagens de vidro e plástico, nas quais se armazenam as formulações de NP e medicamentos pois, como já mencionado, estudos anteriores demonstraram que a principal fonte de contaminação em soluções de NP são as embalagens, ou seja, através do contato direto com as superfícies destas (BINOTTO, 2001).

A FB, 2010, não estipula limites para o Ba em recipientes de vidros e em tampas. Para embalagens plástica, menciona-se apenas um limite para materiais de PVC, sendo este inferior à 0,1 mg/g.

A Tabela 4.3 descreve a composição das embalagens de vidro utilizadas para armazenar as formulações de uso parenteral.

Tabela 4.3 - Composição percentual (m/m) das embalagens tipo I (borossilicato), utilizadas em nutrição de nutrição parenteral

Componente	Embalagens gerais	Ampola Transparente	Ampola Âmbar	Pequeno Volume
SiO <sub>2</sub>	70,0	65,0	70,0	67,0
B <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	10,0	10,5	7,0	5,0
Na <sub>2</sub> O	9,0	7,0	7,0	12,0
K <sub>2</sub> O	1,0	-	1,0	1,0
Al <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	6,0	5,0	6,0	7,0
Fe <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	-	-	1,0	2,0
<b>BaO</b>	2,0	<< 1,0	2,0	< 0,5
CaO	1,0	1,5	<<1,0	1,0
MgO	0,5	-	-	-
MnO <sub>2</sub>	-	-	-	0,5
TiO <sub>2</sub>	-	-	5,0	-
ZnO	0,5	-	-	-

Fonte: Boletins técnicos Schott do Brasil, 1999.

Os plásticos não são formados por diferentes componentes, como os vidros, mas por repetições de monômeros específicos. Todavia, além da adição de catalisadores empregados na polimerização dos monômeros, vários outros aditivos são utilizados para tornar os plásticos utilizáveis como embalagens (MANO & MENDES, 2004). A Tabela 4.4 mostra os principais plásticos utilizados como embalagens na indústria farmacêutica e os catalisadores e aditivos usados para cada um.



Tabela 4.4 - Material polimérico, sua unidade estrutural, usos farmacêuticos e catalisadores utilizados na reação de polimerização e aditivos

Polímero	Monômero	Usos em produtos	Catalisadores	Aditivos
		Formas orais sólidas	$\text{TiCl}_4 + \text{Al}(\text{C}_2\text{H}_5)_3$ ,	
Polietileno (PE)	Etileno	Soluções aquosas não injetáveis	$\text{CrO}_3/\text{SiO}_2$ ,	
		Infusões aquosas intravenosas	$\text{MoO}_3/\text{Al}_2\text{O}_3$	
		Formas orais sólidas		
Polipropileno (PP)	Propileno	Soluções aquosas não injetáveis	$\alpha\text{-TiCl}_4 + \text{Al}(\text{C}_2\text{H}_5)_3$	Benzoato de sódio Fosfato trissódico, óxido de zinco, talco, óxido de magnésio, estereato de cálcio/ zinco
		Infusões aquosas intravenosas		
		Formas orais sólidas		
Polivinil Cloreto (PVC)	Vinil cloreto	Soluções aquosas não injetáveis		Estereato de cálcio ou estereato de zinco
		Infusões aquosas intravenosas		
		Infusões aquosas intravenosas		Oleamida, estereato de cálcio ou de zinco, carbonato de cálcio, hidróxido de potássio, sílica
Polietileno vinil acetato (EVA)	Etileno e vinil acetato	Preparações de NP		
	Ácido tereftálico	Formas orais sólidas		Sais e sabões de bário/zinco e cálcio/zinco
Polietileno tereftalato (PET)	ou dimetil tereftalato e etileno glicol	Formas orais líquidas		

Fontes: *Food and Drugs Administration* (FDA).

Assim como os plásticos das embalagens de solução de NP, as borrachas, das tampas das embalagens de vidros e vedantes dos êmbolos das seringas, são polímeros (elastômeros) que sofreram processo de vulcanização (*cross-linking*) e possuem diversos aditivos.

Os aditivos podem ser: vulcanizadores (enxofre, peróxidos orgânico e óxidos metálicos), ativadores (óxido de zinco e ácido esteárico), plastificantes (óleos minerais), cargas (negro-de-fumo, caulinos, carbonato de cálcio, sílica hidratada e silicatos, óxido de zinco, hidróxido de alumínio, talco), pigmentos (branco Ti; amarelo Ti, FeO, Cr-Ti, sulfito de cádmio; vermelho FeO, cádmio sulfoselenato, sais de Ba; preto negro-de-fumo), antioxidantes químicos (aminas secundárias, fosfitos, fenóis e tioésteres), auxiliares de processo (dissulfureto de 2,2-dibenzamidodifenil, pentaclorotiofenol, sabões de zinco, ésteres de ácidos graxos, sabões metálicos, alcoóis graxos, amidas de ácidos graxos, misturas de resinas, organossilicones) (YAMASHITA, 2009).

Por haver uma grande diversidade de aditivos, foi de grande importância investigar, também, a concentração de Ba nas borrachas das tampas dos recipientes de vidro e nas borrachas vedantes dos êmbolos das seringas. Assim, verificou-se a concentração de Ba em embalagens plásticas, recipientes de vidro e em suas tampas de borracha. Da mesma forma determinou-se a concentração de Ba em tubulações plásticas (equipo), ou seja, mangueiras que conectam as bolsas às buretas e estas ao dispositivo de acesso venoso (agulhas), ou apenas conectam as bolsas às agulhas (Figura 4.3).



Figura 4.3 - Bureta e mangueiras utilizadas na administração de soluções de nutrição parenteral.

A eficiência da digestão e da análise destas amostras foi constatada pelas recuperações acima de 80% da adição de 10 mg/L de Ba.

Os resultados para os Brancos e testes de recuperação das amostras de vidro e polímeros estão mostrados na Tabela 4.5.

Tabela 4.5 - Concentração de Ba encontrada em recipientes de plásticos e de vidros, e em tampas de borrachas dos recipientes

Equipamento	Amostra		Volume (mL)	Massa (g)	Ba $\pm$ DP ( $n=3$ ) (mg/L)	Ba (mg/g)	Rec. (%)
	Material	Cor					
Branco				-	9,10 $\pm$ 1,2	-	-
Frasco	Vidro	Transparente	500	0,1001	51,91 $\pm$ 8,0	4,28	92,5
Ampola	Vidro	Transparente	10	0,1116	54,32 $\pm$ 1,6	4,05	90,3
Ampola	Vidro	Âmbar	10	0,1008	58,86 $\pm$ 7,7	4,94	90,1
Branco			-	-	2,03 $\pm$ 0,6	-	-
Tampa	Borracha	Vermelho	-	0,3012	2,27 $\pm$ 0,2	0,04	82,9
Tampa	Borracha	Cinza	-	0,3363	2,17 $\pm$ 0,1	0,02	82,5
Bolsa	PVC	Translúcido	-	0,3113	2,96 $\pm$ 0,1	0,15	81,8
Frasco	PE	Branco	250	0,3154	2,31 $\pm$ 0,1	0,04	83,6
Vedante							
Seringas	Borracha	Preta	-	0,3310	31,08 $\pm$ 2,5	4,38	84,7
Equipo	PVC	-	-	0,3103	2,72 $\pm$ 0,1	0,11	80,2

Os resultados obtidos para os vidros foram de 4,28 mg de Ba/g de amostra para frascos de grande volume, 4,05 mg/g para ampola transparente e 4,94 mg/g para ampola âmbar. Para compará-los com o teor de Ba especificado por Schott do Brasil (Tabela 4.3) nos diversos vidros, estes valores foram transformados para 0,42 g%; 0,40g% e 0,49g% respectivamente. Dessa forma, pôde-se observar que a concentração de Ba nos vidros apresentou-se conforme a especificação do fabricante (< 0,5 à 2,0 g%).

Em relação às embalagens plásticas, o PVC apresentou maior quantidade do metal (0,15 mg/g), estando a concentração de Ba neste polímero um pouco acima do limite de 0,1 mg/g estipulado pela BP, 2012.

Dentre as borrachas, a borracha preta das seringas apresentou o maior teor de Ba (4,38 mg/g), extrapolando, para todos os polímeros estudados, o limite de Ba estipulado pela BP para PVC, verifica-se que a concentração de Ba das borrachas pretas que vedam os êmbolos das seringas estaria muito acima deste limite.

#### 4.2.2 Otimização da metodologia para determinação de Ba em soluções para NP e medicamentos

Antes de realizar a determinação de Ba nas amostras das soluções para uso parenteral foram feitos ensaios preliminares para verificar a eficiência das análises através da comparação da recuperação da adição de 50 µg/L de Ba em amostras acidificadas com 0,5% (v/v) de HNO<sub>3</sub> e não acidificadas (Tabela 4.6).

Tabela 4.6 - Recuperação de 50 (µg/L) de Ba em amostras de solução de NP e medicamento com e sem adição de 0,5% (v/v) de HNO<sub>3</sub>

Amostra	Ba (µg/L)		Recuperação(%)	
	Sem HNO <sub>3</sub>	Com HNO <sub>3</sub>	Sem HNO <sub>3</sub>	Com HNO <sub>3</sub>
SNP	2,45	31,54	-	-
SNP + Ad*	26,85	78,29	48,8	93,5
Cloridrato de Ranitidina	34,60	78,10	-	-
Cloridrato de Ranitidina + Ad*	62,95	124,90	45,03	93,6

A Solução de NP utilizada para este teste foi a amostra 1 descrita no Apêndice B.

\*Amostra com adição.

Verificou-se, a partir da comparação dos resultados obtidos, a necessidade destas amostras estarem acidificadas com 0,5% (v/v) de HNO<sub>3</sub>, pois a recuperação nesta condição foi superior a 90%, enquanto que, a recuperação na amostra sem adição de ácido foi inferior a 63%.

### 4.2.3 Validação do método

A validação de um método tem como objetivo principal assegurar que determinado procedimento analítico forneça resultados reprodutíveis e confiáveis, que sejam adequados aos fins para os quais tenha sido planejado (MATIOLI et al., 2004).

Entende-se por validação analítica um conjunto de parâmetros a serem avaliados para comprovação, através do fornecimento de evidência objetiva, de que os requisitos para uma aplicação foram atendidos (NBR ISO 9000:2000). Dentre esses parâmetros, chamados de parâmetros de mérito, destacam-se: linearidade, limites de detecção e quantificação, exatidão e precisão.

A linearidade foi determinada através da medida da absorvância do Ba em seis níveis de concentração, definindo-se assim as suas curvas de calibração (Tabela 4.7).

Tabela 4.7 – Medida da absorção do Ba obtida na determinação da curva padrão

Concentração ( $\mu\text{g/L}$ )	Absorvância integrada/s			RSD (%)
	1º Dia	2º Dia	3º Dia	
0	0,0197	0,0202	0,0201	1,32
10,0	0,0994	0,1155	0,0992	8,93
20,0	0,2252	0,2194	0,2318	2,75
40,0	0,3542	0,3469	0,3699	3,29
60,0	0,4897	0,4971	0,486	1,15
80,0	0,6146	0,6201	0,6097	0,85
100,0	0,7769	0,7623	0,7732	0,98

A curva padrão e a equação da reta obtida por regressão linear pelo método dos mínimos quadrados encontram-se na Figura 4.4.

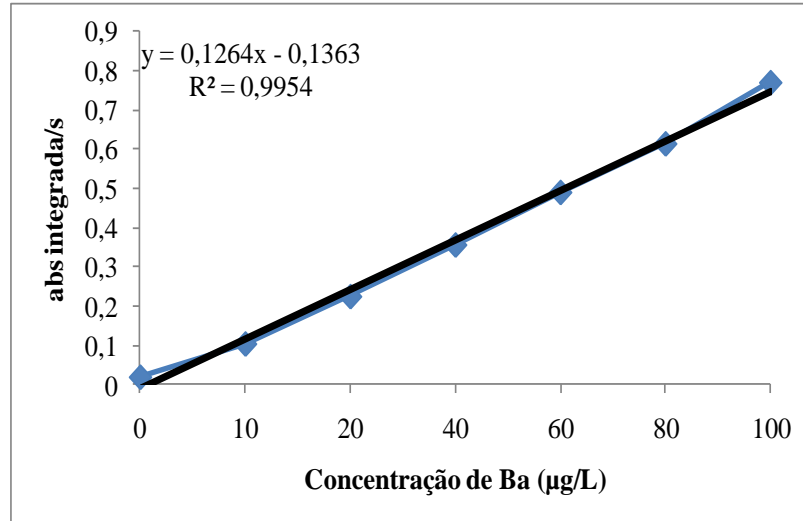


Figura 4.4 - Representação gráfica da curva padrão de Ba obtida por GF-AAS.

O coeficiente de correlação obtido a partir da média das áreas de picos referentes à absorção do Ba dos três dias foi 0,9954, sendo este valor próximo a 1,0, caracterizando uma boa correlação entre a absorvância e as concentrações. Os dados de linearidade validados por análise de variância (ANOVA) demonstraram regressão linear e nenhum desvio significativo da linearidade ( $p < 0,05$ ).

Os LD e LQ foram calculados a partir da análise do Branco (Tabela 4.8) e os valores obtidos foram 0,08 µg/L e 0,28 µg/L, respectivamente.

Tabela 4.8 - Valores dos Brancos para o cálculo dos limites de detecção e quantificação

Branco (Água ultrapura)	
(n=10)	
Abs integrada/s	0,02234
	0,01516
	0,02860
	0,01688
	0,03080
	0,02105
	0,03163
	0,02150
	0,01895
	0,02046

A partir da determinação destes valores, conclui-se que o método é sensível para a determinação de baixas concentrações de Ba nas amostras das soluções de NP e medicamentos.

A precisão intradia foi determinada a partir de seis medidas das amostras de solução de NP 1 e Aminofilina sob as mesmas condições e em um mesmo dia. A precisão intermediária (interdia) foi realizada através da análise das mesmas amostras em três dias diferentes e sob as mesmas condições.

Nas amostras do medicamento Aminofilina foi adicionada uma concentração conhecida de 20 µg/L de Ba, pois a concentração de Ba neste medicamento estava abaixo do limite de detecção. Este medicamento foi utilizado pela sua maior quantidade.

Os resultados obtidos dos ensaios para a determinação da precisão intradia e interdia encontram-se nas Tabelas 4.9 e 4.10.

Tabela 4.9 - Determinação da precisão intradia na análise do Ba em amostras de solução de NP e medicamento

Amostra	Concentração de Bário (µg/L)	
	SNP	Medicamento
1	34,07	21,45
2	33,26	17,97
3	34,02	20,05
4	28,62	19,45
5	29,63	21,13
6	28,57	18,63
Média	31,36	19,78
DPR (%)	8,60	6,93

Tabela 4.10 - Determinação da precisão interdia na análise do Ba em amostras de solução de NP e medicamento

Dia	Concentração de Bário (µg/L)	
	SNP	Medicamento
1	*31,36	*19,78
2	**32,34	*18,34
3	**31,87	*20,07
Média	31,85	19,40
DPR(%)	1,54	4,78

\*Média de seis determinações

As determinações de Ba em solução de NP e medicamentos apresentaram respectivamente DPR de 8,60% e 6,93% para análises realizadas no mesmo dia e 1,54 % e 4,78 % para análises realizadas em três dias diferentes, demonstrando uma boa precisão, já que o limite aceitável para concentrações de 21 a 100 µg/L é de até 15% (AOAC, 1993).

Através da análise da variância (ANOVA),  $p < 0,05$ , e Teste F, constatou-se que não houve diferença significativa entre as análises realizadas em dias diferentes.

Por existir a dificuldade de se encontrar um material de referência certificado (MRC) para o Ba, a exatidão foi determinada apenas através do teste de recuperação de 20 µg/L de Ba adicionados nas amostras diluídas 10 vezes. Os resultados (Tabela 4.11) foram expressos em percentual de recuperação e avaliados a partir do Teste T de Student.

Tabela 4.11 - Teste de Recuperação da adição de 20 µg/L de Ba em amostras de solução de NP e medicamentos

Tipo	Amostra	Recuperado (µg/L)	Recuperação (%)
Solução de NP	SNP 1	-	-
	SNP 1+Ad*	20,73	103,6
	SNP 2	-	-
	SNP 2+Ad*	19,57	97,8
	SNP 3	-	-
	SNP 3+Ad*	18,48	92,4
	SNP 4	-	-
	SNP 4+Ad*	17,37	86,8
	SNP 5	-	-
Medicamentos	SNP 5+Ad*	18,87	94,3
	Aminofilina	-	-
	Aminofilina+Ad*	19,78	98,9
	Cloridrato de Midazolan	-	-
	Cloridrato de Midazolan+Ad*	20,45	102,2
	Sulfato de Morfina	-	-
	Sulfato de Morfina+Ad*	18,76	93,8
	Cloridrato de Ranitidina	-	-
	Cloridrato de Ranitidina+Ad*	19,34	96,7
Furesemida	-	-	
Furesimida+Ad*	20,68	103,4	

\* Amostra com adição de 20 µg/L de Ba.



Para avaliar a exatidão do método aplicou-se o Teste T, sendo 2,62 o valor tabelado para 9 graus de liberdade ( $p < 0,05$ ). O valor obtido para a recuperação de Ba adicionado à amostra foi de 1,86, portanto, pode-se considerar que o método apresenta boa exatidão.

#### 4.2.4 Determinação de Ba em soluções comerciais para NP e em soluções de NP em bolsas e buretas

Após a validação da metodologia, determinou-se a concentração de Ba nas soluções comerciais que constituem as NP avaliando a contribuição individual dos constituintes na contaminação (Tabela 4.12).

Tabela 4.12 - Concentração de Ba encontrada nos constituintes das soluções de NP

Constituinte das SNP	Marca	Lote	Ba ( $\mu\text{g/L}$ ) $\pm$ DP ( $n=3$ )
Frutovitam	Cristália	7042865	261,9 $\pm$ 13,0
Aminoácido Pediátrico 10%	n.i	n.i	105,2 $\pm$ 20,4
H <sub>2</sub> O para injeção	n.i	n.i	3,0 $\pm$ 1,1
Aminoácido Adulto 10%	n.i	n.i	42,4 $\pm$ 2,8
Lipídeos 20%	n.i	n.i	51,9 $\pm$ 1,7
Glicose 50%	Aster	8470	27,2 $\pm$ 10,8
Hypocálcio 10%	Hypofarma	07080792/ 4101174	166,4 $\pm$ 22,9
Ped elemento	Darrow	n.i	51,3 $\pm$ 4,3
Sulfato de Mg 10%	Halex Istar	AP 00401	193,3 $\pm$ 23,7
Hypomagne 50%	Hypofarma	07101092	129,4 $\pm$ 25,0
Frutovena	Farmalab	75400	31,8 $\pm$ 19,3
KCl 10%	Halex Istar	AP 004101	n.d
NaCl 20%	Halex Istar	AP 069601	n.d

n.d: não detectado

n.i: não informado

**Frutovitam** (ampola com 10 mL)-Cada ampola contém: palmitato de retinol (vitamina A) 10.000 UI, colecalciferol (vitaminaD)800 UI, riboflavina 5- fosfato sódica equivalente a 5 mg de riboflavina (vitamina B2), ácido ascórbico (vitaminaC)500 mg, nicotinamida (niacinamida) 100 mg, cloridrato de piridoxina (vitamina B6) 15 mg, dexpanenol (pantenol) 25 mg, acetato de tocoferol (vitaminaE) 50 mg, veículo estéril q.s.p. 10 mL (veículo: edetato de sódio, cloreto de benzalcônio, bicarbonato de sódio, polisorbato 80, água para injetáveis)

**Hypocálcio** (ampola 10 mL): gluconato de cálcio 10%

**Ped elemento** (ampola com 4 mL)-cada mL contém: zinco 400mcg, cobre 200mcg, manganês 200mcg, cromo 0,2 mcg, iodo 60 mcg e flúor 10 mcg

**Hypomagne** (ampola 10 mL): Sulfato de magnésio 50%

**Frutovena** (ampola 10 mL): cada ampola contém, frutose 2,500 g; vitamina B2 (riboflavina fosfato de sódio) 0,002 g; vitamina B6 (cloridrato de piridoxina) 0,010 g; vitaminaC (ácido ascórbico) 1,000 g; nicotinamida 0,015 g; água bidestilada q.s.p. 10,000 mL.

Observa-se que, com exceção das soluções salinas de cloreto de potássio e cloreto de sódio, todas as soluções dos constituintes das NP apresentaram Ba como contaminante. As concentrações variaram entre 31,80 e 261,90  $\mu\text{g/L}$ , sendo que, Frutovitam, Sulfato de Magnésio 10%, Hypomagne (sulfato de magnésio 50%), Hypocalcio (gluconato de cálcio) e aminoácidos pediátricos, foram os constituintes mais contaminados.

Determinou-se, também, o grau de contaminação das soluções armazenadas nas bolsas plásticas de infusão administradas aos recém-nascidos internados na UTI do HUSM, foram analisadas as bolsas de soro e de NP (Tabela 4.13).

Muitas bolsas apresentam um dispositivo de administração chamado de bureta que é um cilindro graduado de 150 mL e tem por finalidade estabelecer um melhor controle do volume da infusão administrada. Ela possui uma tampa que apresenta um dispositivo

autovedante para a introdução de medicação, sendo esta, outra finalidade para a escolha do seu uso.

As soluções que permaneceram nestas buretas tiveram contato com uma maior superfície que comprovadamente possui Ba. Estas soluções são preparadas nas bolsas e durante a administração passam através de mangueiras para as buretas e a seguir novamente passam por mangueiras até chegar aos pacientes. Por isso, foi de interesse analisar se todo esse percurso contribuiu para aumentar a contaminação dessas soluções. Portanto, também foi determinada a concentração de Ba nas soluções que permaneceram dentro das buretas de cada uma das bolsas e, compararam-se as concentrações medidas nas soluções das bolsas com as soluções de suas respectivas buretas (Tabela 4.14).

As soluções de NP armazenadas nas bolsas possuíam uma composição com quantidades específicas das soluções comerciais. Então, através dos valores da concentração de Ba encontrados nestas formulações comerciais (Tabela 4.12), pôde-se calcular e prever a concentração de Ba que deveria ter nas soluções de NP das bolsas. Portanto, as concentrações de Ba efetivamente determinadas nas soluções das bolsas e das buretas foram comparadas com as concentrações teórica de Ba. A constituição das soluções de NP em cada bolsa está descrita no Apêndice B.

Tabela 4.13 - Concentração de Ba em soluções de NP armazenadas em bolsas e concentração de Ba calculado através da contribuição de cada constituinte

Bolsa nº	Ba $\pm$ DP ( $n=3$ ) ( $\mu\text{g/L}$ )	Concentração Teórica de Ba* ( $\mu\text{g/L}$ )
1	31,4 $\pm$ 2,4	41,3
2	46,4 $\pm$ 1,2	41,7
3	69,2 $\pm$ 1,1	47,3
4	31,5 $\pm$ 1,3	38,6
5	15,3 $\pm$ 1,2	37,1
6	23,6 $\pm$ 7,3	2,7
7	50,7 $\pm$ 3,0	47,9
8	49,5 $\pm$ 2,6	53,2
9	60,0 $\pm$ 1,7	37,7
10	38,0 $\pm$ 2,5	45,9
11	65,9 $\pm$ 2,1	38,1
12	28,9 $\pm$ 1,6	25,6
13	53,9 $\pm$ 2,8	36,3
14	57,0 $\pm$ 2,1	48,4
15	38,5 $\pm$ 1,0	45,3
16	50,4 $\pm$ 0,5	38,1
17	65,7 $\pm$ 1,5	48,0
18	66,2 $\pm$ 1,7	47,9
19	41,2 $\pm$ 0,2	17,6
20	111,6 $\pm$ 5,4	41,2
21	50,4 $\pm$ 2,1	41,3

\*Valor calculado através do somatório das concentrações de Ba determinadas nas soluções comerciais, proporcional à quantidade em que estas foram adicionados para compor cada uma das bolsas.

Tabela 4.14 – Concentração de Ba em soluções de NP armazenadas nas bolsas e buretas e, concentração teórica de Ba calculada através da contribuição de cada constituinte

No	Bolsa Ba $\pm$ DP ( $n=3$ ) ( $\mu\text{g/L}$ )	Bureta Ba $\pm$ DP ( $n=3$ ) ( $\mu\text{g/L}$ )	Concentração Teórica de Ba ( $\mu\text{g/L}$ )
22	40,2 $\pm$ 8,9	62,7 $\pm$ 7,8	39,1
23	19,3 $\pm$ 4,6	23,1 $\pm$ 3,4	5,4
24	51,6 $\pm$ 4,8	55,7 $\pm$ 16,4	40,0
25	53,6 $\pm$ 3,3	78,2 $\pm$ 4,9	30,9
26	70,8 $\pm$ 3,4	74,5 $\pm$ 5,9	52,4
27	32,4 $\pm$ 0,5	48,1 $\pm$ 4,0	39,4
28	145,8 $\pm$ 9,9	151,4 $\pm$ 3,0	43,9
29	72,3 $\pm$ 2,2	130,5 $\pm$ 3,8	37,2
30	26,8 $\pm$ 12,6	336,2 $\pm$ 23,5	49,3
31	54,1 $\pm$ 5,2	85,5 $\pm$ 2,4	26,3
32	33,8 $\pm$ 2,4	38,8 $\pm$ 4,0	56,3
33	83,8 $\pm$ 4,9	129,2 $\pm$ 10,8	5,4
34	53,3 $\pm$ 1,9	58,1 $\pm$ 4,9	40,7
35	40,1 $\pm$ 4,2	47,7 $\pm$ 3,1	42,0
36	41,6 $\pm$ 6,9	67,3 $\pm$ 9,1	44,0

\*Valor calculado através do somatório das concentrações de Ba determinadas nas soluções comerciais, proporcional à quantidade em que estas foram adicionados para compor cada uma das bolsas.

Através dos dados apresentados nas Tabelas 4.13 e 4.14, constatou-se que a maioria das soluções de NP armazenadas nas bolsas apresentou uma maior concentração de Ba em relação ao valor teórico de Ba calculado a partir da composição das respectivas soluções. Ainda maior, foi a concentração de Ba encontrada nas soluções de NP armazenadas em buretas. Possivelmente, as concentrações mais elevadas não foram apenas devido ao contato e permanência em bolsas e buretas, mas também em consequência de sua preparação, pois as nutrições parenterais são preparadas através de produtos comerciais na farmácia hospitalar de acordo com as necessidades individuais de cada paciente. Assim, neste processo há a manipulação de vários produtos (OLIVEIRA et al., 2010).

Além disso, a maior concentração de Ba nas soluções que permaneceram nas buretas pode ter sido originada por causa da adição dos medicamentos. Como mencionado anteriormente, muitos destes medicamentos são administrados aos pacientes através deste dispositivo. Este procedimento é realizado para que ocorra a mistura de medicamentos e

infusões e que o fluido possa ser dispensado a uma vazão controlada. Estas medicações são diluídas para permitir uma medida mais precisa do volume contendo a dose exata. O método mais utilizado consiste na diluição do medicamento em seringas com o uso de solventes compatíveis, geralmente água para injeção, NaCl 0,9% e glicose 10% ou solução Ringer lactato. Embora, necessários, todos estes passos são possíveis fontes de contaminação, resultando num produto com maior quantidade de contaminante que os componentes de início.

Com a intenção de melhor analisar a contaminação observada nas soluções de NP, calculou-se a concentração percentual média (v/v) dos componentes e nas soluções de todas as bolsas estudadas neste trabalho (Figura 4.5 A). A partir disso, calculou-se a concentração de Ba percentual encontrada em cada constituinte proporcionalmente à quantidade em que cada um é adicionado nas soluções (Figura 4.5 B). Dessa forma, pôde-se constatar o constituinte que mais contribuiu com a contaminação das soluções de NP.

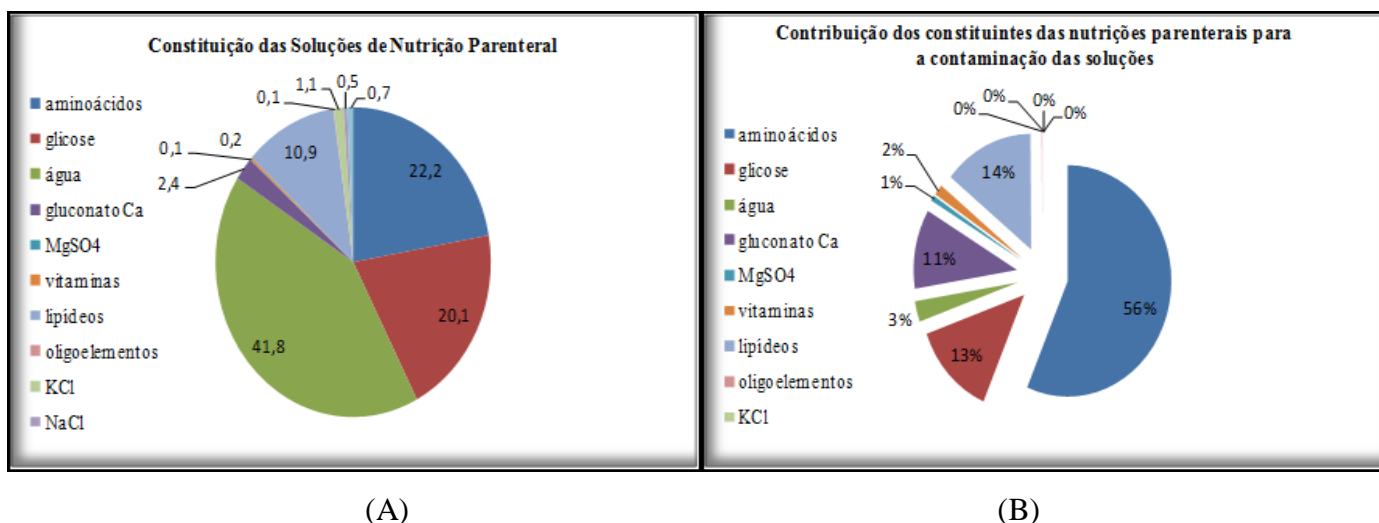


Figura 4.5 – Análise da contaminação de Ba nas soluções de NP. (A) Constituição média de todas as soluções de NP analisadas. Resultado expresso em % (v/v). (B) Contribuição de cada constituinte das NP na contaminação por Ba nas soluções. Valores expressos em % (v/v), relativo à concentração de Ba encontrada nas soluções estudadas (Apêndice B).

Pode-se observar na Figura 4.5 (A) que a água, aminoácidos, glicose e lipídeos foram os constituintes majoritários das soluções de NP analisadas neste trabalho, constituindo mais de 90% destas. Dessa forma, já era possível esperar que estes constituintes contribuíssem com uma maior quantidade de Ba nas soluções. Os aminoácidos contribuiriam com 56%, seguidos

pelos lipídeos 14,1%, e glicose 13,1%, (Figura 4.5 B). No entanto, a água, que também é um constituinte majoritário, consistindo cerca de 42% das soluções de NP contribuiu com apenas 2,9% da concentração de Ba. Já, o gluconato de cálcio, que apesar de estar presente em apenas 2,4% das soluções de NP, contribui com 11% de Ba. Sendo este valor muito próximo aos valores da contribuição da contaminação por Ba dos constituintes majoritários das soluções de NP. Isto, provavelmente se deve ao fato do ânion gluconato ter uma grande afinidade com o Ba.

#### 4.2.5 Determinação de Ba em medicamentos comerciais armazenados em ampolas e em medicamentos armazenados em seringas

Determinou-se a contaminação por Ba em medicamentos comerciais que foram administrados aos recém-nascidos da UTI do HUSM. Esses medicamentos estavam contidos em ampolas e suas concentrações, o princípio ativo, a marca, o lote e a concentração de Ba ( $\mu\text{g/L}$ ) determinada em cada um deles estão descritas na Tabela 4.15.

Tabela 4.15 - Concentração de Ba ( $\mu\text{g/L}$ ) encontrado em medicamentos comerciais em ampolas

Medicamento Princípio Ativo	Concentração do Medicamento	Marca do Laboratório	Lote	Ba $\pm$ DP (n=3) ( $\mu\text{g/L}$ )
Aminofilina	24 mg/mL	Hipolabor	E018/06	n.d
Cloridrato de Dobutamina	12 mg/mL	Hipolabor	Ago10/08	n.d
Cloridrato de Dopamina	5 mg/mL	Teuto	1073004	n.d
Cloridrato de Midazolan	50 mg/10 mL	Cristália	8074957	n.d
Cloridrato de Ranitidina	25 mg/mL	Farmace	840093	n.d
Fosfato Dissódico de Dexametasona	4mg/ mL	Hipolabor	T020/07 e 7001	87,0 $\pm$ 0,5
Furosemida	10 mg/mL	Teuto	F004/07	n.d
Sulfato de Amicacina	100 mg/mL	Novafarma	485027 e P007/06	511,8 $\pm$ 5,3
Sulfato de Gentamicina	80 mg/2 mL	Novafarma	540220	584,7 $\pm$ 10,9
Sulfato de Morfina	10 mg/mL	UQDoloMoff	807455	n.d

n.d: não detectado.

A Tabela 4.15 mostra que em muitos medicamentos não foi possível determinar a concentração de Ba, ou seja, o valor medido foi abaixo do limite de detecção. Contudo, concentrações de 87,0, 511,8 e 584,7  $\mu\text{g/L}$  foram encontrados para fosfato dissódico de dexametasona, sulfato de amicacina e sulfato de gentamicina, respectivamente.

Alguns medicamentos para poderem ser administrados aos pacientes recém-nascidos necessitaram de uma diluição. A diluição foi realizada apropriadamente para cada paciente utilizando seringas. Estes medicamentos podem permanecer nas seringas por até 14 dias dependendo das condições de armazenamento (temperatura, ambiente ou refrigeração) e de sua estabilidade (TRISSEL, 2008). Dessa forma, os medicamentos ficaram em contato com as superfícies das seringas e foram constantemente manipulados. Através da determinação da concentração de Ba nos medicamentos das seringas de administração, avaliou-se se por causa de todo esse processo houve um aumento na contaminação. Para esta análise, os resultados obtidos para os medicamentos nas seringas foram comparados com os resultados obtidos para os medicamentos comerciais considerando-se a diluição à qual foram submetidos (concentração teórica de Ba).

Na Tabela 4.16 encontram-se descritos a composição das seringas, os tipos de diluentes, o número de seringas analisadas de cada medicamento e o valor de Ba obtido nestes medicamentos e o valor teórico de Ba.



Tabela 4.16 – Concentração de Ba encontrada em soluções contidas nas seringas de administração

Medicamento Princípio Ativo	Diluyente	Concentração Medicamento	N	Ba $\pm$ DP ( $\mu\text{g/L}$ )	Valor teórico de Ba* ( $\mu\text{g/L}$ )
Cloridrato de Dopamina	SF	50 mg/10mL	6	116,1 $\pm$ 13,3	n.d
Cloridrato de Dobutamina	SF	12 mg/mL	3	140,4 $\pm$ 12,7	n.d
Aminofilina	SF, SG5%, SGF 1:1	240 mg/10 mL	6	44,3 $\pm$ 8,1	n.d
Cloridrato de Midazolan	SF, SG5%	50 mg/10 mL	3	83,1 $\pm$ 4,6	n.d
Sulfato de Gentamicina	SF, SG5%	40 mg/20 mL	3	158,8 $\pm$ 13,4	29,3
Sulfato de Morfina	SF	10 mg/10 mL	9	2,6 $\pm$ 0,2	n.d
Cloridrato de Ranitidina	SF, SG, RG	50 mg/10 mL	3	78,1 $\pm$ 11,8	n.d
Furosemida	SF, SG5%, RL	10 mg/mL	2	298,4 $\pm$ 2,0	n.d
Fosfato Dissódico de Dexametasona	SF, SG5%	4 mg/ mL	6	1333,0 $\pm$ 31,1	87,0
Cefurexima	SF, SG 5%	750 mg/50mL	3	37,8 $\pm$ 4,9	-
Sulfato de Magnésio	-	10%	3	4659,0 $\pm$ 20,0	193,3
Gluconato de Cálcio	-	10%	3	3769,0 $\pm$ 33,7	166,4
Cloreto de sódio	-	20%	3	128,4 $\pm$ 12,1	n.d
Solução Fisiológica	-	0,9%	3	111,3 $\pm$ 12,1	n.d
Soro Glicosado	-	50%	3	347,4 $\pm$ 13,1	27,2
Bicarbonato de sódio	-	8,4%	3	3106,0 $\pm$ 39,6	-
SFO	-	9%	3	274,3 $\pm$ 11,3	n.d
Cloreto de potássio	-	10%	3	568,7 $\pm$ 12,2	n.d

\* Concentração de Ba calculada a partir da concentração de Ba obtidas nos medicamentos comerciais considerando a diluição à qual foram submetidos.

n.d: não detectado (abaixo do limite de detecção)

N: número de amostras de medicamentos armazenadas em seringas analisadas.

RL: Ringer Lactato.

SG5%: Soro Glicosado 5%.

SF Soro Fisiológico (NaCl 0,9%).

SGF: Solução Glicofisiológica.

Através da comparação das concentrações de Ba encontradas nos medicamentos armazenados em seringas com as encontrados nos medicamentos originais (antes da diluição nas seringas), observa-se, na Tabela 4.16, que em todas as amostras houve aumento na concentração de Ba, destacando-se o bicarbonato de sódio, dexametasona, sulfato de magnésio e gluconato de cálcio que apresentaram uma concentração de Ba bastante elevada.

Pode-se, assim, concluir que o preparo e o armazenamento em seringas contribuem para a contaminação por Ba dos medicamentos, que provavelmente tem sua origem na borracha dos êmbolos das seringas.

#### 4.2.6 Ensaio de contato para a investigação da interação do Ba das embalagens com as soluções dos constituintes das NP

As formulações parenterais devem ser armazenadas em embalagens que não interajam fisicamente ou quimicamente com as soluções, ou seja, devem possuir uma elevada resistência hidrolítica (FB, 2010). Para aumentar a resistência hidrolítica dos vidros são adicionados à sua estrutura óxidos de boro e alumínio (BOHRER, 2002b). Estes vidros contêm uma menor quantidade de álcalis (LEE, 1999). Apesar da diminuição dos óxidos de metais alcalinos, eles são necessários para diminuir a temperatura de fusão, existindo, portanto, a possibilidade de ocorrer uma interação dos metais das superfícies do vidro com os constituintes das formulações parenterais. Dependendo da natureza das soluções, estas podem interagir com os metais dos vidros através de uma simples troca iônica como é o caso das soluções salinas e das soluções ácidas (BERTAGNOLLI, 2008). As soluções alcalinas podem promover a dissolução do vidro pelo ataque às ligações químicas. Contudo, muitas soluções das formulações parenterais, não possuem valores de pH extremos e, ainda assim, possuem a capacidade de extrair metais das superfícies das embalagens. Por isso, a ação destes compostos não pode ser relacionada com o pH e nem com um processo de troca iônica. O que provavelmente ocorre é a formação de complexos com os metais.

Para este estudo, foram escolhidos alguns aminoácidos (arginina, ornitina, ácido glutâmico e ácido aspártico) e o gluconato de cálcio como representantes dos constituintes das soluções de NP.

O ácido cítrico, além de ser um agente complexante, é muito utilizado em medicamentos, juntamente com o citrato de sódio, como agente tamponante. O pH das formulações farmacêuticas é de grande importância, pois o mesmo exerce influência na solubilidade das substâncias, na estabilidade química, na compatibilidade fisiológica com os tecidos orgânicos onde a forma farmacêutica será aplicada de forma a minimizar a irritação e o desconforto na aplicação e, finalmente, na garantia do efeito terapêutico esperado para o medicamento (FERREIRA et al., 2002).

O EDTA (ácido etilenodiaminoteracético) foi escolhido como um referencial para este estudo, pois possui uma aplicação geral bastante ampla por possuir uma poderosa ação complexante (JEFREY, 1992). Ele forma complexos estáveis com a maioria dos íons metálicos, sendo este, o agente de complexação de uso mais corrente em Química Analítica.

Praticamente todos os elementos da tabela periódica podem ser determinados quantitativamente pelo EDTA através de titulação (HARRIS, 2008).

O ensaio se iniciou através da análise de todas as soluções previamente ao contato com a resina. Isto mostrou que não havia Ba nestas soluções. Também não se detectou Ba em alíquotas retiradas nos diversos intervalos de tempo estudados das soluções que não permaneceram em contato com a resina.

Através de dados apresentados na Figura 4.6, pode-se inferir que todos os constituintes retiraram Ba da resina com o passar do tempo, sendo o gluconato de cálcio o constituinte que mais interagiu com o analito em questão, seguido pelo ácido cítrico, EDTA e aminoácidos.

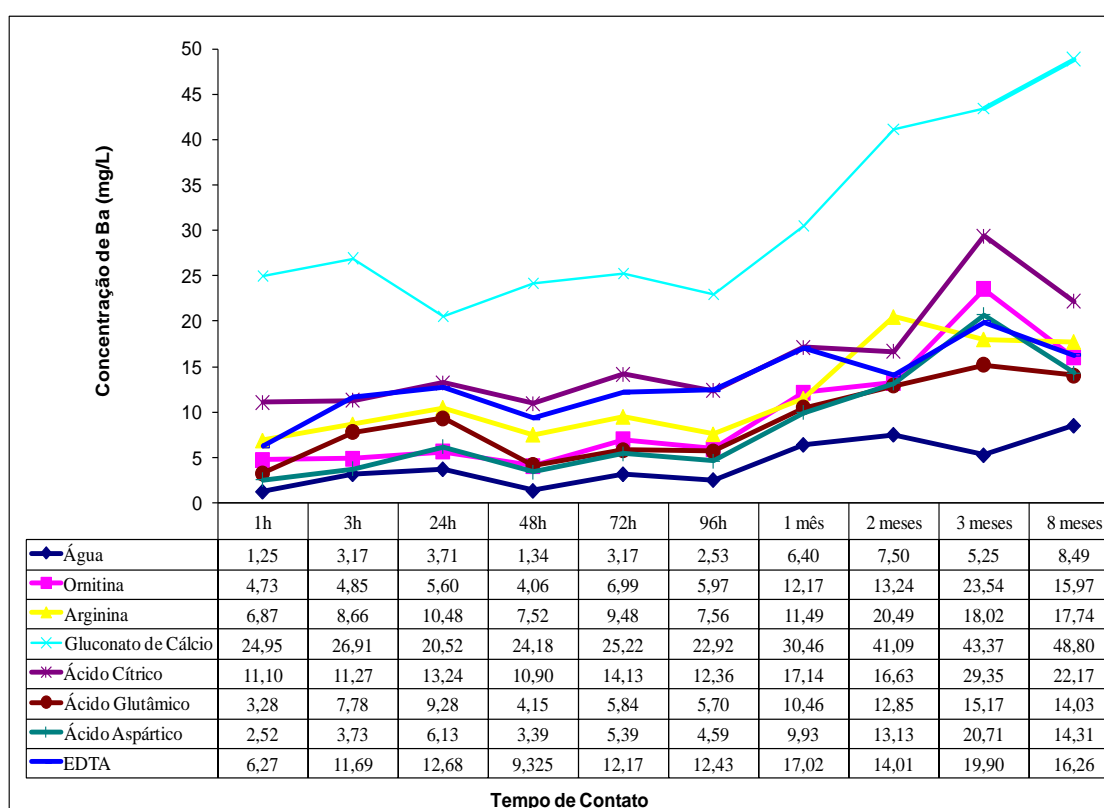


Figura 4.6 - Ensaio de Contato: Ba retirado da resina pelas soluções 0,2mM de: ornitina, arginina, gluconato de cálcio, ácido cítrico, ácido glutâmico, ácido aspártico e EDTA nos intervalos de tempo 1; 3; 24;48; 72; 96 horas; 1; 2; 3 e 8 meses.

Uma resina trocadora de cátions é constituída por grupos carregados negativamente, ligados covalentemente a um polímero, esses se ligam aos cátions ativos. Estes cátions podem permutar com os cátions da solução até atingir o equilíbrio (HARRIS, 2008). Por isso, é relevante conhecer a tendência de um íon ser preferencialmente ligado pela resina em relação

a outro íon, pois a retirada do Ba da resina poderia ter sido mais proeminente à afinidade da resina pelos outros cátions das soluções de contato ou até mesmo pelo sódio do hidróxido de sódio utilizado para o ajuste de pH.

Os fatores que determinam a distribuição dos íons inorgânicos entre uma resina de troca iônica e uma solução incluem (JEFREY et al., 1992):

1. A natureza dos íons permutantes: em concentrações aquosas baixas e em temperatura ambiente o grau da troca aumenta com o aumento da carga dos íons permutantes, ou seja,  $\text{Na}^+ < \text{Ca}^{2+} < \text{Al}^{3+} < \text{Th}^{4+}$ .
2. Em condições semelhantes, e com carga constante, o grau dos íons com carga unitária cresce com a diminuição do tamanho do cátion hidratado,  $\text{Li}^+ < \text{H}^+ < \text{Na}^+ < \text{NH}_4^+ < \text{K}^+ < \text{Rb}^+ < \text{Cs}^+$ , enquanto que com a carga dupla o tamanho iônico é um fator importante, mas há também a influencia da dissociação incompleta dos sais destes cátions,  $\text{Cd}^{2+} < \text{Be}^{2+} < \text{Mn}^{2+} < \text{Mg}^{2+} = \text{Zn}^{2+} < \text{Cu}^{2+} = \text{Ni}^{2+} < \text{Co}^{2+} < \text{Ca}^{2+} < \text{Sr}^{2+} < \text{Pb}^{2+} < \text{Ba}^{2+}$

Através das regras descritas, conclui-se que, em relação ao sódio do hidróxido, a resina se liga preferencialmente ao Ba, pois este possui carga maior. A mesma preferência ocorre pelo Ba em relação ao cálcio do gluconato, pois o Ba possui um tamanho iônico maior. No entanto, todas as soluções estudadas mostraram uma extração eficaz comprovando, assim que, por causa da ação complexante desses compostos ocorrem desvios nas distribuições previstas pela teoria de seletividade descrita.

A formação de íon complexo pode ser considerada uma reação ácido-base de Lewis. Os íons metálicos são ácidos de Lewis, receptores de pares de elétrons de um ligante doador de elétrons que são bases de Lewis (LEE, 1999). Um íon complexo, ou molécula, consta de um átomo central (íon) e vários ligantes acoplados a ele. O átomo central pode ser caracterizado pelo número de coordenação, que é definido como o número de ligações formadas pelo ligante ao átomo central em um complexo.

O ligante pode ser monodentado, bidentado, tridentado, e assim por diante, dependendo do número de sítios de ligação envolvidos na formação do complexo.

O efeito quelante é a habilidade de ligantes multidentados de formar complexos metálicos mais estáveis que os formados por ligantes monodentados similares. Os quelatos são mais estáveis, pois a dissociação deste tipo de complexo implica na ruptura de duas ou mais ligações em vez de apenas uma.

A estabilidade do complexo está relacionada com a capacidade de complexação dos metais, com as características do ligante e com a afinidade metal-ligante.

A relativa capacidade de complexação dos metais é convenientemente descrita em termos da classificação de Schwarzenbach, que é baseada na divisão dos metais em ácido de Lewis, ou seja, aceptores de elétrons classe A e classe B. Os metais da classe A são distinguidos pela seguinte ordem de afinidades (em solução aquosa) em relação aos halogênios  $F^- \gg Cl^- > Br^- > I^-$ , e formam seus complexos mais estáveis com o primeiro membro de cada grupo de átomos doadores na tabela periódica (N, O, F). Os metais da classe B se coordenam mais prontamente com o  $I^-$  do que com o  $F^-$  em soluções aquosas, e formam seus complexos mais estáveis com o segundo (ou o mais pesado) átomo doador de cada grupo (P, S, Cl). A classificação de Schwarzenbach define três categorias de íons metálicos aceptores de elétrons (JEFREY et al., 1992).

2. Cátions com configurações de metais nobres: os metais alcalinos, alcalino-terrosos e alumínio pertencem a este grupo que exhibe as propriedades de aceptores da classe A. Na formação dos complexos predominam forças eletrostáticas, de modo que as interações entre íons pequenos de carga elevada são particularmente fortes, conduzindo a complexos estáveis.

3. Cátions com subcamadas  $d$  completamente preenchidas: elementos típicos com este grupo são o cobre (I), prata (I), que exibem propriedades de aceptores da classe B. Estes íons têm alto poder de polarização e as ligações formadas em seus complexos têm caráter covalente apreciável. Os complexos são tanto mais estáveis quanto mais nobres são os metais e menos eletronegativo é o átomo doador do ligante.

4. Íons de metais de transição com subcamadas  $d$  incompletas: neste grupo tanto a classe A quanto a classe B tem tendências que podem ser distinguidas. Elementos com características da classe B formam um grupo aproximadamente triangular dentro da tabela periódica, com o ápice no cobre e a base se estendendo do rênio ao bismuto. À esquerda deste grupo, os elementos em seus estados de oxidação mais elevados tendem a exhibir propriedades da classe A, enquanto que, à direita do grupo, os estados de oxidação mais elevados de um dado elemento apresentam mais caráter da classe B.

Entre as características do ligante que são, geralmente, reconhecidas como influentes na estabilidade dos complexos em que estão envolvidos, estão:

1. Força do ligante;
2. Propriedades de quelação (se as tiver) e;
3. Efeito estérico.

Outra maneira de classificar os íons metálicos e os seus ligantes é através da teoria dos ácidos e bases duros e moles introduzida por Pearson em 1963 (Tabela 4.17) (LEE, 1999).

Tabela 4.17 - Classificação dos ácidos e bases duros e moles

Ácidos Duros	Bases Duras
$H^+$ , $Li^+$ , $Na^+$ , $K^+$ , $Rb^+$ , $Cs^+$ , $Be^{2+}$ , $Be(CH_3)_2$ , $Mg^{2+}$ , $Ca^{2+}$ , $Sr^{2+}$ , $Ba^{2+}$ , $Sc^{3+}$ , $La^{3+}$ , $Ce^{4+}$ , $Gd^{3+}$ , $Lu^{3+}$ , $Th^{4+}$ , $U^{4+}$ , $UO_2^{2+}$ , $Pu^{4+}$ , $Ti^{4+}$ , $Zr^{4+}$ , $Hf^{4+}$ , $VO^{2+}$ , $Cr^{3+}$ , $Cr^{6+}$ , $MoO^{3+}$ , $WO^{4+}$ , $Mn^{2+}$ , $Mn^{7+}$ , $Fe^{3+}$ , $Co^{3+}$ , $BF_3$ , $BCl_3$ , $B(OR)_3$ , $Al^{3+}$ , $Al(CH_3)_3$ , $AlCl_3$ , $AlH_3$ , $Ga^{3+}$ , $In^{3+}$ , $CO_2$ , $RCO^+$ , $NC^+$ , $Si^{4+}$ , $Sn^{4+}$ , $CH_3Sn^{3+}$ , $(CH_3)_2Sn^{2+}$ , $N^{3+}$ , $RPO^{2+}$ , $ROPO^{2+}$ , $As^{3+}$ , $SO_3$ , $RSO^{2+}$ , $ROSO^{2+}$ , $Cl^{3+}$ , $Cl^{7+}$ , $I^{5+}$ , $I^{7+}$ , $HX$ (moléculas com ligação hidrogênio)	$NH_3$ , $RNH_2$ , $N_2H_4$ , $H_2O$ , $OH^-$ , $O^{2-}$ , $ROH$ , $RO^-$ , $R_2O$ , $CH_3COO^-$ , $CO_3^{2-}$ , $NO_3^-$ , $PO_4^{3-}$ , $SO_4^{2-}$ , $ClO_4^-$ , $F^-$ ( $Cl^-$ )
Ácidos Intermediários	Bases Intermediárias
$Fe^{2+}$ , $Co^{2+}$ , $Ni^{2+}$ , $Cu^{2+}$ , $Zn^{2+}$ , $Rh^{3+}$ , $Ir^{3+}$ , $Ru^{3+}$ , $Os^{2+}$ , $B(CH_3)_3$ , $GaH_3$ , $R_3C^+$ , $C_6H_5^+$ , $Sn^{2+}$ , $Pb^{2+}$ , $NO^+$ , $Sb^{3+}$ , $Bi^{3+}$ , $SO_2$	$C_6H_5NH_2$ , $C_5H_5N$ , $N^{3-}$ , $N_2$ , $NO^{2-}$ , $SO_3^{2-}$ , $Br^-$
Ácidos Moles	Bases Moles
$Co(CN)_5^{3-}$ , $Pd^{2+}$ , $Pt^{2+}$ , $Pt^{4+}$ , $Cu^+$ , $Ag^+$ , $Au^+$ , $Cd^{2+}$ , $Hg^+$ , $Hg^{2+}$ , $CH_3Hg^+$ , $BH_3$ , $Ga(CH_3)_3$ , $GaCl_3$ , $GaBr_3$ , $GaI_3$ , $Tl^+$ , $Tl(CH_3)_3$ , $CH_2$ , carbenos aceitadores $\pi$ : trinitrobenzeno, cloroanil, quinonas, tetracianoetileno, etc., $HO^+$ , $RO^+$ , $RS^+$ , $RSe^+$ , $Te^{4+}$ , $RTe^+$ , $BR_2$ , $Br^+$ , $I_2$ , $I^+$ , $ICN$ , etc., $O$ , $Cl$ , $Br$ , $I$ , $N$ , $RO\cdot$ , $RO_2\cdot$ $M0$ (átomos metálicos) e metais volumosos	$HR^-$ , $C_2H_4$ , $C_6H_6$ , $CN^-$ , $RNC$ , $COSCN^-$ , $R_3P$ , $(RO)_3P$ , $R_3AsR_2S$ , $RSH$ , $RS^-$ , $S_2O_3^{2-}$ $I$

De acordo com esta teoria, uma base mole pode ser definida como aquela cujo átomo doador possui polarizabilidade elevada e baixa eletronegatividade, e é facilmente oxidada, bem como associada a orbitais vacantes baixos. Estes termos descrevem, por diferentes modos, uma base cujos elétrons do átomo doador não estão fortemente presos, mas são fortemente destorcidos e removíveis. Bases duras têm propriedades opostas a estas, ou seja, o átomo doador tem baixa polarizabilidade e alta eletronegatividade, é de difícil redução e está

relacionada com orbitais vacantes de alta energia que são inacessíveis.

Desta forma, os aceitadores de elétrons da classe A, preferem se ligar a bases duras com átomos doadores, como nitrogênio, oxigênio e flúor, enquanto que os aceitadores de elétrons da classe B preferem se ligar a bases moles, como: átomos doadores P, As, S, Se, Cl, Br, I. Um exame dos aceitadores da classe A mostra que eles têm as seguintes características importantes:

- Tamanho pequeno;
- Estado de oxidação positivo elevado;
- Ausência de elétrons mais externos que sejam facilmente excitáveis a estados mais elevados.

Estes são todos os fatores que levam a baixa polarizabilidade, e tais aceitadores são chamados ácidos duros.

Os aceitadores da classe B, no entanto, têm uma ou mais das seguintes propriedades:

- Estado de oxidação positivo baixo ou zero;
- Tamanho grande;
- Muitos elétrons externos facilmente excitáveis (no caso dos metais estes são elétrons *d*).

Todas estas propriedades conduzem à polarizabilidade elevada, e assim, os ácidos da classe B podem ser chamados de ácidos moles.

De modo geral, pode-se correlacionar a capacidade de complexação dos metais pelo enunciado: “Os ácidos duros preferem se associar com as bases duras e os ácidos moles com as bases moles”. Este princípio não deve ser encarado como exclusivo, isto é, sobre condições adequadas, ácidos moles podem complexar com bases duras ou, ácidos duros com bases moles, resultando, entretanto, em complexos de baixa estabilidade, uma vez que ambos são incompatíveis.

Na teoria HSAB (*hard and soft acid and bases* = ácidos e bases duros e moles), o Ba é considerado um ácido duro, portanto prefere se ligar a bases duras com átomos doadores como o oxigênio do grupo carboxilato, o qual está presente em todos os complexantes estudados (LEE, 1999).

O gluconato de cálcio é derivado de uma base fraca e um ácido fraco que, em solução, libera o ânion gluconato, possibilitando uma maior disponibilidade do ânion gluconato para se combinar (VOGEL, 1981)

O ácido cítrico no pH estudado, encontra-se completamente desprotonado, pois os pKas são 3,13; 4,76 e 6,40.

As estruturas do gluconato de cálcio e do ácido cítrico estão ilustradas nas Figuras 4.7 (A) e (B), respectivamente.

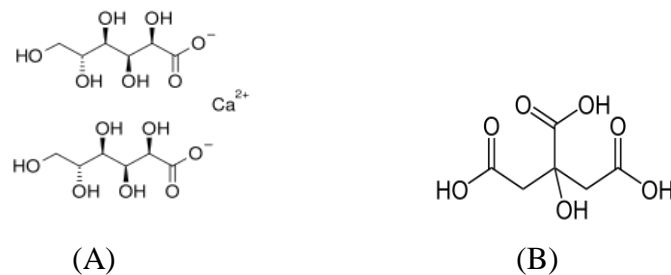


Figura 4.7 - Fórmula estrutural (A) gluconato de cálcio e (B) ácido cítrico.

Apesar de o ânion citrato possuir três sítios de ligações ativos, o que acarreta numa atração maior do íon Ba do que o ânion gluconato, que possui apenas um sítio de ligação ativo, a preferência do Ba em se ligar ao gluconato é devido ao íon cálcio ser mais semelhante ao íon Ba, em tamanho e carga. Portanto, a força de atração da resina por esses dois cátions são semelhantes. Já o íon hidrogênio é pequeno e possui apenas uma carga. Assim, o íon Ba é mais facilmente trocado pelo íon cálcio do que pelo íon hidrogênio.

O EDTA tem quatro grupos carboxila e dois grupos amina, que podem atuar como doadores de pares de elétrons, ou bases de Lewis, como ilustra a Figura 4.8 (HARRIS, 2008).



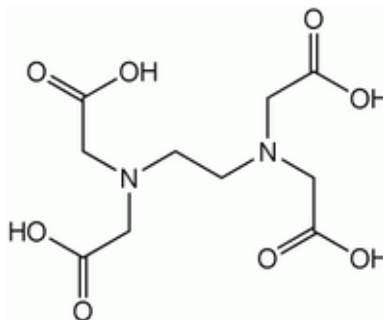


Figura 4.8 - Molécula de EDTA.

A estrutura espacial do seu ânion, que tem seis átomos doadores, permite que satisfaça o número de coordenação seis, frequentemente encontrado nos íons metálicos, bem como a formação de anéis de cinco membros sem tensões na quelação. Os complexos resultantes têm estruturas semelhantes, mas diferem uns dos outros pela carga que possuem.

O EDTA apresenta-se uma estrutura dipolar típica de um aminácido. Neste caso, no entanto, uma estrutura duplo “*zwitterion*” é formada como mostra a Figura 4.9 (SCHWARZENBACH, 1955). Esta estrutura contém quatro prótons dissociáveis dois relacionados aos grupos carboxílicos e os outros dois grupos amínicos. Esta espécie pode ser simbolizada por  $H_4Y$ , e as demais espécies mono, di, tri e tetra neutralizadas representadas respectivamente por  $H_3Y^-$ ;  $H_2Y^{2-}$ ;  $HY^{3-}$  e  $Y^{4-}$ . As constantes de dissociação para a desprotonação do  $H_4Y$  são:  $K_1=1,02 \times 10^{-2}$ ;  $K_2=2,14 \times 10^{-3}$ ;  $K_3=6,92 \times 10^{-7}$  e  $K_4=5,50 \times 10^{-11}$ . A capacidade complexante do EDTA diminui com o aumento da concentração dos íons  $H^+$  no meio analítico, pois estes tendem a competir com os íons metálicos pelo ligante. As reações com cátions, como por exemplo  $M^{2+}$ , podem ser escritas como na equação (4.3).

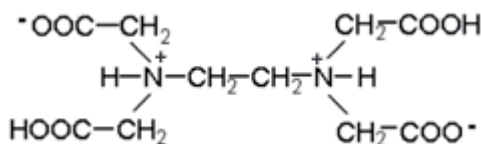


Figura 4.9 – Estrutura duplo *zwitterion* do EDTA



A Tabela 4.18 indica os valores mínimos do pH para a existência de complexos de EDTA de alguns metais (JEFREY et al., 1992).

Tabela 4.18 - Estabilidade em relação ao pH de alguns complexos metal-EDTA

pH mínimo em que o complexo existe	Metais
1-3	Zr <sup>4+</sup> , Hf <sup>4+</sup> , Th <sup>4+</sup> , Bi <sup>3+</sup> , Fe <sup>3+</sup>
4-6	Pb <sup>2+</sup> , Cu <sup>2+</sup> , Zn <sup>2+</sup> , Co <sup>2+</sup> , Ni <sup>2+</sup> , Mn <sup>2+</sup> , Fe <sup>2+</sup> , Al <sup>3+</sup> , Cd <sup>2+</sup> , Sn <sup>2+</sup>
8-10	Ca <sup>2+</sup> , Sr <sup>2+</sup> , Ba <sup>2+</sup> , Mg <sup>2+</sup>

Pode-se observar, na Tabela 4.18, que o complexo de EDTA com Ba<sup>2+</sup> é estável em soluções alcalinas, onde predomina a espécie desprotonada Y<sup>4-</sup> que proporciona uma maior estabilidade dos complexos. Como, neste estudo, a solução permaneceu em pH próximo a 7,0, e a espécie do EDTA que predominou foi a HY<sup>3-</sup>, observou-se uma estabilidade maior dos complexos entre o analito e os complexantes gluconato e citrato frente ao complexo entre Ba e EDTA.

Os aminoácidos são substâncias que apresentam um grupo amino e um grupo carboxílico ligados ao mesmo carbono (GREINSTEIN & WINTZ, 1984). Os aminoácidos diferem entre si por possuírem diferentes cadeias laterais ligadas ao carbono  $\alpha$ . Os aminoácidos podem se apresentar na forma neutra (*zwitterion*) ou carregada dependendo do pH do meio em que se encontram, comportando-se como ácidos ou bases, ou seja os aminoácidos são anfóteros (Figura 4.10). Assim, os aminoácidos possuem pelo menos dois hidrogênios dissociáveis, podendo haver mais hidrogênios que podem se dissociar nas cadeias laterais grupo R.

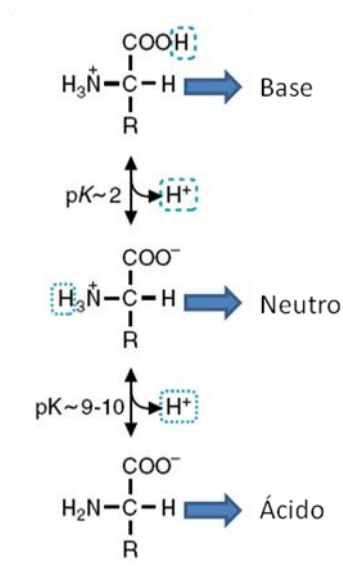


Figura 4.10 - Estrutura dos aminoácidos em diferentes pH.

Desta forma, a capacidade de os aminoácidos formarem complexos não está relacionada apenas à presença dos grupos aminos e carboxílicos, mas também ao grupo funcional constituinte da cadeia lateral. Entretanto, como os grupos são diferentes em sua natureza a capacidade de os aminoácidos se ligarem aos metais também é diferente. Por exemplo, os grupos R-OH, R-NH<sub>2</sub>, R-CO<sub>2</sub> podem ser classificados como ligantes duros e os grupos R-SH, R<sub>2</sub>S podem ser classificados como moles.

São conhecidas muitas constantes de estabilidade de complexos formados entre aminoácidos e íons de metais de transição, contudo para elementos como o Ba os estudos com constante de estabilidade são mais raros (SMITH & MARTELL, 2004). Constantes de estabilidade entre o Ba e alguns aminoácidos estão expressas na Tabela 4.19.

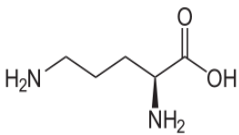
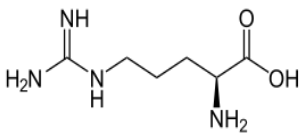
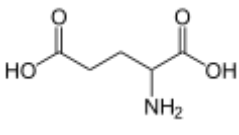
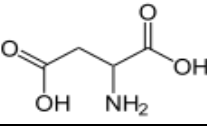
Tabela 4.19 – Constante de estabilidade conhecidos dos complexos entre o Ba e aminoácidos

Aminoácido	logK
Ácido aspártico	1,10
Ácido glutâmico	1,28
Glicina	0,77

T=25°C, espécie 1:1 M-L (M-metal, L-ligante)

Os aminoácidos estudados foram a ornitina, arginina, ácido glutâmico e ácido aspártico, cujas fórmulas estruturais e seus valores de pKa estão mostrados na Tabela 4.20.

Tabela 4.20 - Fórmula estrutural e pKa dos aminoácidos estudados

Aminoácido	Estrutura	pKa <sub>1</sub>	pKa <sub>2</sub>	pKa <sub>3</sub>
Ornitina		1,94	8,65	10,76
Arginina		1,82	8,99	12,48
Ácido Glutâmico		2,10	9,47	3,90
Ácido Aspártico		1,99	9,90	4,07

Nota-se, que em todos os aminoácidos estudados há três hidrogênios ionizáveis devido a um grupo na cadeia lateral, em adição aos grupos  $\alpha$ -amino e carboxílico, que são potencialmente aptos a coordenar um íon metálico. Na ornitina e na arginina estes prótons correspondem a um grupo carboxílico e a dois grupos aminos. Nos ácidos aspártico e glutâmico, correspondem a um grupo amino e a dois carboxílicos.

Em pH 7,0, utilizado neste estudo, os grupos carboxílicos dos aminoácidos se encontram desprotonados já que todos os valores de pKa<sub>1</sub> são, aproximadamente, 2,0. Assim, a arginina e a ornitina, nessas condições, são ligantes monodentados e os ácidos aspártico e glutâmico ligantes bidentados. Com isto, os aminoácidos estudados possuem menor número de sítios de ligações ativos que o ácido cítrico e o EDTA, e os hidrogênios ionizados dos aminoácidos possuem menor preferência de ligação na resina do que o cálcio do gluconato de cálcio. Por tais motivos, os aminoácidos foram os compostos que menos retiraram Ba da resina.

### 4.3 Discussão

A proposta deste trabalho foi avaliar a possível contaminação das soluções de NP e de alguns medicamentos, procurando definir as principais fontes de contaminação.

Os resultados encontrados revelaram uma grave realidade de contaminação por Ba nas soluções de NP e nos medicamentos avaliados, sobretudo porque todos estes são administrados diretamente na corrente sanguínea.

Foi constatada a presença de Ba em todas as soluções comerciais dos constituintes das nutrições parenterais e nas soluções preparadas com estes constituintes que são armazenadas em bolsas. Concentrações de Ba ainda maiores foram encontradas nas frações das soluções que permaneceram nas buretas. O estudo também mostrou que a maioria dos medicamentos comerciais estudados não apresentou contaminação por Ba. No entanto, o Ba foi encontrado em todos os medicamentos diluídos e armazenados em seringas, evidenciando que todos estes procedimentos contribuem para a contaminação dos medicamentos.

Na literatura, são raros os estudos referentes ao Ba principalmente no que diz respeito à presença deste metal como contaminante em soluções de NP e medicamentos. A maioria dos estudos sobre a contaminação em soluções de NP é referente ao alumínio e sobre a interação das embalagens de vidro com as soluções, investigando a migração do alumínio e arsênio (BINOTTO, 2001; BECKER, 2002). Estes metais são adicionados ao vidro na forma de óxidos como formador de rede e como agente de refino, respectivamente (BECKER, 2002; BOHRER et al., 2001a; BOHRER et al., 2001b; BOHRER et al., 2002a). Os estudos demonstraram que, através da interação dos constituintes com os metais da superfície das embalagens, há a passagem destes para as soluções, sendo que as altas temperaturas, utilizadas para a esterilização dos produtos, são um acelerador para este processo.

O Ba também é adicionado aos vidros. Este possui a função de reduzir a temperatura de fusão dos vidros, viabilizando, dessa forma, a sua industrialização. Os elementos que provocam a diminuição do ponto de fusão do material vítreo são chamados de modificadores de redes (PRISON, 2003).

Os vidros são compostos por redes ligadas tridimensionalmente. A unidade de uma rede é formada por tetraedros de  $\text{SiO}_2$ , onde um átomo de silício está ligado a quatro átomos de oxigênio. Os tetraedros estão ligados pelos vértices, através do compartilhamento de um átomo de oxigênio por dois de silício. Todos os quatro átomos de oxigênio de um tetraedro podem ser compartilhados com quatro outros tetraedros (SHELBY, 1997).

O mecanismo de ação dos modificadores de rede é a ligação iônica com o oxigênio que interrompe a continuidade da rede, uma vez que os átomos de oxigênio não mais compartilhados entre dois tetraedros, mas ligados apenas a um átomo de silício, diminuindo assim, a temperatura de fusão do vidro (Figura 4.11).

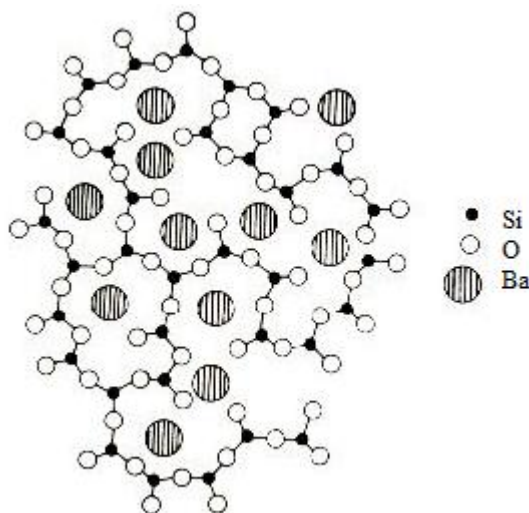


Figura 4.11 – Estrutura do vidro com modificador de rede BaO.

Os cátions, modificadores de rede, ligados aos oxigênios podem ser trocados por outros. Portanto, a superfície do vidro é quimicamente reativa, sendo esta característica de funcionamento dos eletrodos de vidro sensíveis ao pH (SKOOG, 1997).

Como pode ser atribuído aos vidros propriedades de trocadores de íons, utilizou-se uma resina trocadora de cátions na forma de  $Ba^{2+}$  para mostrar que os vidros podem ser uma fonte de contaminação das soluções para NP e dos medicamentos devido à afinidade dos componentes por este metal das superfícies das embalagens.

Bertagnolli (2008), em um estudo sobre migração dos metais por interação das embalagens com soluções parenterais, encontrou Ba nos componentes das SNP: glicose 5% a 50% de  $12,1 \mu\text{g/L} \pm 2,8$  a  $22,3 \mu\text{g/L} \pm 2,0$ ; gluconato de cálcio,  $144,2 \mu\text{g/L} \pm 11,2$ ; sulfato de magnésio,  $27,9 \mu\text{g/L} \pm 6,2$ ; água para injeção,  $11,9 \mu\text{g/L} \pm 2,9$ ; Frutovena,  $73,0 \mu\text{g/L} \pm 4,2$ ; Aminoped 10%,  $99,2 \mu\text{g/L} \pm 4,2$ ; Aminoplasmal,  $81,2 \mu\text{g/L} \pm 6,2$ ; Aminosteril,  $98,7 \mu\text{g/L} \pm 3,6$ ; Lipofundin,  $47,2 \mu\text{g/L} \pm 5,4$ ; Lipovenos,  $92,4 \mu\text{g/L} \pm 3,8$ ; Ped elemento,  $50,2 \mu\text{g/L} \pm 5,1$ . No entanto, constatou que as matérias-primas das soluções apresentaram baixas concentrações de Ba concluindo que estas não são uma fonte de contaminação significativa para as soluções

para NP. Porém, confirmou que a contaminação pode ser oriunda da interação dos metais das embalagens com as soluções. Mostrou que as embalagens plásticas consideradas livres de contaminação por metal também contribuem para a contaminação das soluções parenterais. Seus resultados mostraram que mesmo quando a água pura é esterilizada em embalagens dos diferentes plásticos e de vidro há a liberação de espécies metálicas, incluindo o Ba e que o processo de esterilização das soluções dos constituintes das nutrições aumentou a extração dos metais.

A extração dos metais das superfícies das embalagens pode ocorrer pela existência de diversos tipos de interação das substâncias em solução com os metais. As soluções podem promover uma troca iônica entre os cátions das soluções e os íons metálicos das superfícies. No caso dos aminoácidos existe a possibilidade destes atuarem como quelatos.

#### **4.4 Conclusão**

Foi confirmada a presença de Ba nas embalagens de vidro e plástico que armazenam as soluções para NP, nas tampas de borrachas dos frascos de vidro, nos equipos (tubulações por onde passam as soluções) e nas borrachas pretas que vedam os êmbolos das seringas. Esta determinação foi de grande importância, pois todas estas superfícies entram em contato direto com as infusões parenterais e medicamentos.

Para os materiais de PVC analisados (bolsa e mangueiras dos equipos) obtiveram-se concentrações de Ba ligeiramente acima do limite estipulado pela BP, 2012. Surpreendente foi a quantidade de Ba na borracha preta que veda os êmbolos das seringas, sendo que esta borracha permanece em contato direto por vários dias com os medicamentos que são diluídos em seringas e administrados aos pacientes recém nascidos.

Foi constatado que todas as soluções comerciais dos constituintes das NP (água para a injeção, vitamina, aminoácidos, gluconato de cálcio, oligoelementos, glicose, sulfato de magnésio e lipídeos) estavam contaminados com Ba, com exceção das soluções dos sais de cloreto de potássio e cloreto de sódio.

As soluções de NP armazenadas em bolsas plásticas, preparadas a partir das necessidades particulares de cada paciente, apresentaram uma concentração de Ba superior ao valor teórico de Ba calculado proporcionalmente a partir da composição de cada bolsa. As frações de solução que permaneceram nas buretas se mostraram mais contaminadas por Ba do

que as frações das suas respectivas bolsas, concluindo-se que a preparação e adição de medicamentos nas soluções deste dispositivo, aumenta significativamente a quantidade de Ba.

A maioria dos medicamentos comerciais analisados neste trabalho não apresentou contaminação por Ba. Mas, foi encontrado Ba como contaminante nos medicamentos fosfato dissódico de dexametasona, sulfato de amicacina e sulfato de gentamicina. Os medicamentos que foram preparados e armazenados em seringas apresentaram uma maior concentração de Ba do que o esperado em relação aos medicamentos comerciais armazenados em ampolas, destacando que o bicarbonato de sódio, dexametasona, sulfato de magnésio e gluconato de cálcio apresentaram as concentrações de Ba mais elevadas. Assim, pode-se sugerir que as borrachas dos êmbolos podem ser uma fonte de contaminação destes medicamentos.

Uma resina trocadora de cátions na forma de  $Ba^{2+}$  foi usada para simular a superfície de vidro de uma embalagem que armazena formulações de uso parenteral. A troca de íons é possibilitada pela superfície vítrea. Através deste procedimento, confirmou-se que todos os compostos estudados são capazes de interagir com o Ba, retirando-o da resina e transferindo-o para as soluções.

O mecanismo de ação dos compostos em relação ao metal depende da natureza de cada espécie. Contudo, sabe-se que o EDTA, o ácido cítrico e o gluconato de cálcio são agentes complexantes de metais. Os aminoácidos também podem ser incluídos nesta categoria, apesar de não ser conhecida a constante de estabilidade de complexos para a maioria dos complexos de aminoácidos com o Ba.

O composto que mais retirou o metal da resina foi o gluconato de cálcio, sendo este um dos constituintes das nutrições parenterais que no ensaio anterior (item 4.1) se apresentou mais contaminado. Já, o ácido cítrico foi o segundo composto a retirar mais Ba da resina. Este fato é preocupante, já que este composto é frequentemente utilizado em medicamentos para o ajuste de pH.

Os aminoácidos, compostos que retiraram Ba em menor quantidade, também se mostraram, no estudo anterior, bastante contaminados, sendo os responsáveis por mais de 50% da concentração de Ba em soluções de NP (Figura 4.1.).

Dessa forma, o gluconato de cálcio, o ácido cítrico e os aminoácidos são hábeis a retirar o Ba da superfície do vidro e, conseqüentemente, as embalagens são uma fonte de contaminação de Ba das soluções para NP e dos medicamentos.



## 5 Capítulo 2: ESTUDO EM MODELO ANIMAL

O segundo capítulo deste trabalho refere-se ao estudo executado em modelo animal utilizando ratos da espécie Wistar. Como são raros os estudos sobre o Ba, procurou-se elucidar as consequências deste metal no organismo quando administrado juntamente com as soluções de NP e medicamentos contaminados. Na primeira parte, determinou-se a DL50 do BaCl<sub>2</sub>. Este estudo foi realizado por não ter sido encontrado na literatura valores concordantes da DL50 do BaCl<sub>2</sub> e pela necessidade de se conhecer uma dosagem segura a ser administrada no estudo sobre o efeito do Ba no organismo, sem causar a mortes dos ratos. Na segunda parte estão descritos os ensaios realizados para se determinar a maneira mais adequada de digerir as amostras de tecidos, e o melhor procedimento de se analisar estas amostras por GF-AAS. Dessa forma, buscou-se a otimização e a validação da metodologia para a realização da determinação de Ba nas amostras de tecidos retirados dos ratos. E, finalmente, a última parte destina-se à análise dos resultados obtidos da determinação de Ba nos tecidos dos ratos após 30 administrações do mesmo combinado ou não com citrato de sódio e gluconato de cálcio. Avaliou-se a deposição do metal nas diversas partes do organismo observando o efeito desses dois compostos na deposição. A Figura 5.1 ilustra o esquema da proposta deste capítulo.

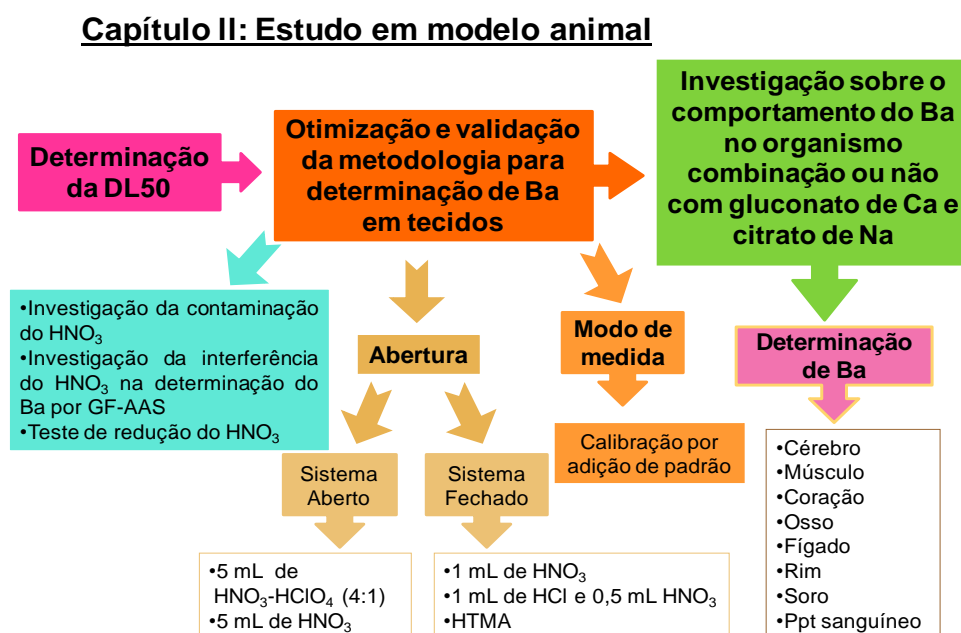


Figura 5.1 – Esquema resumo do capítulo II.

## 5.1 Materiais e Métodos

### 5.1.1 Reagentes e Soluções

Os reagentes utilizados neste trabalho estão listados no Apêndice A. As soluções foram preparadas com água, a qual sofreu processo de destilação, deionização e purificação em sistema de Milli-Q.

A solução de Ba contendo 10 g/L foi preparada a partir da dissolução da quantidade apropriada de  $\text{BaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ .

As soluções estoques, para a administração nos ratos, de 5g/L de Ba; 10 g/L de citrato de sódio e gluconato de cálcio; 5g/L de Ba e 10 g/L de gluconato de cálcio combinados foram preparadas pela dissolução das massas apropriadas de seus respectivos reagentes.

A solução analítica de Ba foi obtida a partir da diluição da solução estoque de 1000 mg/L fornecido por *National Institute of Standard and Technology* (NIST, EUA).

A solução do modificador químico 1% (m/v) de  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  P.A (Fluka, Alemanha) foi preparada pela dissolução em água da massa adequada do reagente.

Para evitar a contaminação por metais, todo o material de laboratório, de vidro e plástico, foi lavado e submerso em solução 10% (v/v) de  $\text{HNO}_3$  em etanol por 48 horas e novamente lavado com água purificada antes de serem utilizados.

### 5.1.2 Instrumentação

A determinação de Ba em amostras de tecido e sangue foi executada usando um espectrômetro de absorção atômica modelo ZEE nit 600 equipado com atomizador de grafite transversalmente aquecido (Analytik Jena, Jena, Alemanha) e com corretor de fundo com efeito *Zeeman*. A fonte de radiação foi uma lâmpada de Ba de cátodo oco (SpectrAA, Varian, Austrália). Argônio 99.996% (White Martins, São Paulo, Brasil) foi empregado como gás de arraste. Foi utilizado 5  $\mu\text{L}$  de solução 1% de  $\text{CaCl}_2$  (m/v) como modificador químico. Os parâmetros de operação do GF-AAS encontram-se na Tabela 5.1.

Tabela 5.1 - Parâmetros para a determinação de Ba por GF-AAS

Comprimento de onda: 553,6 nm		Fenda: 0,2 nm		Corrente: 6,0 mA		
Modo de integração: Área de pico		Tempo de integração: 8,0 s				
No	Tipo	Temperatura (°C)	Rampa (°C/s)	Aquecimento (s)	Tempo (s)	Fluxo de gás (L/min)
1	Secagem	90	5	20	34,0	3,0
2	Secagem	105	3	20	25,0	3,0
3	Secagem	110	2	10	12,5	3,0
4	Pirólise	1150	250	10	14,2	3,0
5	Autozero	1150	0	6	6,0	3,0
6	Atomização	2600	FP	8	8,9	0,0
7	Limpeza	2700	500	6	6,2	3,0

Outros equipamentos:

- Sistema de purificação de água Milli-Q Millipore (resistividade 18,2 M.Ωcm);
- Balança analítica Sartorius com precisão de 0,1 mg;
- Balança digital JB A1500S com precisão de 1 mg;
- Seringas para injeção plástica de 1 mL;
- Agitador magnético com aquecimento Heidolph MR 2002;
- Centrífuga Jouan C412 ,Saint Herblain, França.

### 5.1.3 Procedimento para determinação do DL 50

Os animais foram submetidos a uma única administração de BaCl<sub>2</sub> por via intraperitoneal. As ratas adultas Wistar foram divididas aleatoriamente em quatro grupos e antes da administração da solução contendo Ba, os animais foram pesados. Então, a partir de uma solução de 10 g/L de Ba, administrou-se no primeiro grupo, constituído por 7 ratas, uma dose de 5,0 mg/kg de Ba, no segundo grupo, com 6 ratas, 7,5 mg/kg, no terceiro grupo, com 6 ratas, 10,0 mg/kg e no quarto grupo, com 6 ratas 15,0 mg/kg. Após 48 horas foi observada a mortalidade das ratas de cada grupo e os resultados foram analisados através do *software* BioSat 2009 Professional.

#### 5.1.4 Animais para o estudo do comportamento do Ba em organismo vivo combinado ou não com gluconato de cálcio e citrato de sódio

Ratos Wistar machos com aproximadamente 70 - 90 dias e peso 220 - 300g foram usados neste experimento. Os animais foram mantidos à temperatura constante ( $23\pm 1^{\circ}\text{C}$ ) em ciclos de 12 horas dia/noite com livre acesso a ração e água. Todos os procedimentos com os animais foram aprovados pelo Comitê de Ética Animal da Universidade Federal de Santa Maria (sob o protocolo número: 073/2010).

#### 5.1.5 Tratamento dos ratos para o estudo do comportamento do Ba em organismo vivo combinado ou não com gluconato de cálcio e citrato de sódio

As 30 administrações foram realizadas por via intraperitoneal, utilizando uma seringa de 1 mL, durante cinco dias da semana consecutivos seguidos por dois dias sem tratamento. Os ratos foram pesados, marcados e divididos em seis grupos: (I) Controle, que recebeu 100  $\mu\text{L}$  de solução fisiológica ( $n=5$ ); (II) os animais foram tratados com 2,5 mg/kg de Ba ( $n=5$ ); (III) animais tratados com 5,0 mg/kg de gluconato de cálcio ( $n=5$ ); (IV) animais tratados com 2,5 mg/kg de Ba combinado com 5,0 mg/kg de gluconato de cálcio ( $n=5$ ); (V) animais tratados com 5,0 mg/kg de citrato de sódio ( $n=5$ ); (VI) animais tratados com 2,5 mg/kg de Ba e 5,0 mg/kg de citrato de sódio ( $n=5$ ).

A pesagem dos ratos foi repetida a cada 15 dias para a administração adequada do volume das soluções em relação à massa corpórea.

Os animais foram mortos após 48 horas da última dose e foram coletados: fígado, rim, coração, músculo da coxa, cérebro e osso do fêmur. Estes foram colocados em frascos fechados e congelados. O sangue também foi coletado, por punção cardíaca, e após foi centrifugado a 8000 rpm por 5 minutos. O soro foi separado do precipitado sanguíneo com auxílio de uma micropipeta e, então, as amostras foram congeladas.

### 5.1.6 Procedimentos para os testes de digestão das amostras de tecido retirados dos ratos

Os testes de digestão das amostras de fígado de ratos Wistar se sucederam com o uso de ácidos concentrados, bem como com misturas de ácidos sob aquecimento em sistemas aberto e fechado. Também, realizou-se um teste de solubilização das amostras em meio alcalino com o hidróxido de tetrametilamônio (HTMA).

Os testes preliminares foram feitos com fígado, pois este tipo de tecido possui um alto teor de gordura proporcionando maior dificuldade para a realização de uma digestão eficiente. Portanto, se uma digestão fosse satisfatória para este tipo de amostra seria, então, adequada para os outros tipos de tecidos.

a) Sistema aberto: com 5 mL de  $\text{HNO}_3$  e  $\text{HNO}_3\text{-HClO}_4$ [4:1(v/v)] em tubos de vidro (bloco digestor).

Testou-se a digestão ácida com  $\text{HNO}_3$  e com a mistura de ácidos 4:1(v/v) de  $\text{HNO}_3\text{-HClO}_4$ . Para isto, as amostras de fígado foram divididas em duas partes, que foram pesadas (0,5-1,0 g) e transferidas para tubos de vidro. Em uma das partes das amostra de tecido foram adicionados 10  $\mu\text{L}$  da solução de 1000 mg/L de Ba do NIST, resultando em uma concentração final da adição de 1000  $\mu\text{g/L}$  de Ba. Então, em ambas as partes, foram adicionados 5 mL de  $\text{HNO}_3$  e, para a digestão com a mistura ácida, foram adicionados 5 mL dos ácidos 4:1 (v/v) de  $\text{HNO}_3\text{-HClO}_4$ .

Os frascos foram colocados em bloco digestor sob aquecimento de 120° C por um período diário de 8 horas em dois dias, sendo o sistema de aquecimento desligado durante o pernoite.

Após a digestão, as soluções foram transferidas para *vials* plásticos de 15 mL e aferidos a 10 mL com água. Estas foram diluídas 1:100 antes da determinação de Ba.

O procedimento de digestão com 5 mL de  $\text{HNO}_3$  foi repetido para a confirmação dos resultados sendo o Branco analisado nas diluições 1:100 e 1:200.

b) Sistema fechado: com 1 mL de  $\text{HNO}_3$  em frascos plásticos (banho-maria).

As amostras de fígado foram cortadas em duas partes, estas foram pesadas (cerca de 0,5 g) em *vials* plásticos de 15 mL. Em uma das partes das amostras foram adicionados 10  $\mu\text{L}$  de solução de 1000 mg/L de Ba do NIST (concentração final da adição de 10  $\mu\text{g/L}$ ), para a realização do teste de recuperação.

Transferiu-se 1 mL de  $\text{HNO}_3$  concentrado aos *vials*. Estes foram fechados e submetidos ao aquecido em banho-maria por 8 horas diárias por um período de dois dias, sendo o sistema desligado durante o pernoite. A seguir, aferiu-se o volume com água a 10 mL. Antes da determinação de Ba por GF-AAS as amostras foram diluídas 1:100.

O procedimento foi repetido para confirmação dos resultados, mas com diluição final de 1:200.

b.1) Estudo da interferência do  $\text{HNO}_3$  na determinação de Ba por GF-AAS

Como em todos os ensaios de digestão obteve-se elevados valores para os Brancos, verificou-se a interferência que este ácido poderia estar causando na determinação de Ba.

O  $\text{HNO}_3$  foi diluído: 2; 5; 10; 20; 50; 100; 200; 500 e 1000 vezes em água.

Realizou-se o teste de recuperação de 50  $\mu\text{g/L}$  de Ba em cada uma das amostras de ácido, assim, 50  $\mu\text{L}$  de solução 10 mg/L de Ba foram transferidos para *vials* de 15 mL aos quais continham 5; 2; 1 mL; 500; 200; 100; 50; 20 e 10  $\mu\text{L}$  de ácido, o volume foi aferido a 10 mL e realizou-se a determinação da concentração de Ba.

b.2) Teste de redução do  $\text{HNO}_3$

Este estudo teve por objetivo eliminar a provável interferência causada pelo excesso de  $\text{HNO}_3$  contido nos Brancos durante a determinação do Ba. Para isto, compostos redutores, como ácido oxálico e ácido ascórbico, foram usados para reagirem com o  $\text{HNO}_3$  e, da mesma

maneira que ocorre nas amostras, ser eliminado em forma de vapores nitrosos. Assim, 0,66g de ácido oxálico e 1,30 g de ácido ascórbico foram pesados e armazenados em envelopes.

Soluções de ácido sulfâmico 10% (m/v) e ureia 10% (m/v) foram preparadas para ajudarem na eliminação dos vapores nitrosos. Também, para esta função na reação, utilizou-se o peróxido de hidrogênio 10% (v/v).

Transferiu-se para *vials* plásticos 1 mL de HNO<sub>3</sub> concentrado e, a seguir, foram adicionados os reagentes redutores, ácido oxálico e ácido ascórbico.

Os *vials* foram aquecidos em banho-maria por 8 horas, observou-se a eliminação de vapores nitrosos, e então, pipetou-se 1 mL de peróxido de hidrogênio ou 1 mL de solução de ácido sulfâmico ou 1 mL de solução de ureia, conforme as combinações descritas na Tabela 5.2. Prosseguiu-se o aquecimento por mais 2 horas e após o arrefecimento dos frascos, o volume foi aferido a 10 mL com água.

Realizou-se o teste de recuperação, assim, em paralelo foram preparadas as mesmas soluções, entretanto, com adição de 600 µg/L de Ba. Para isto, pipetou-se 60 µL de solução 100 mg/L de Ba. Todas as amostras foram diluídas 1:20 antes das análises. Desde modo, resultou uma adição final de 30 µg/L de Ba.

Tabela 5.2 - Combinação de reagentes para o estudo da eliminação da interferência causada pelo HNO<sub>3</sub> contido em excesso nos Brancos das digestões dos tecidos

1 mL de HNO <sub>3</sub>	0,66g de ácido oxálico	1,30g de ácido ascórbico	1 mL de ácido sulfâmico 10%	1 mL de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 10%	1mL de ureia 10%	600 µg/L de Ba
+	-	-	-	-	-	-
+	-	-	-	-	-	+
+	+	-	-	-	-	-
+	+	-	-	-	-	+
+	+	-	+	-	-	-
+	+	-	+	-	-	+
+	+	-	-	+	-	-
+	+	-	-	+	-	+
+	+	-	-	-	+	-
+	+	-	-	-	+	+
+	-	+	-	-	-	-
+	-	+	-	-	-	+
+	-	+	+	-	-	-
+	-	+	+	-	-	+
+	-	+	-	+	-	-
+	-	+	-	+	-	+
+	-	+	-	-	+	-
+	-	+	-	-	+	+

c) Sistema fechado: com HNO<sub>3</sub>-HCl em frascos de plásticos (banho-maria)

As amostras de fígado foram pesadas (cerca de 1,0 g) em *vials* plásticos de 15 mL, adicionou-se 1 mL de HCl concentrado, os frascos foram fechados e colocados sob aquecimento em banho-maria por 8 horas. O sistema foi desligado durante o pernoite. A seguir, foram adicionados 200 µL de HNO<sub>3</sub> e o aquecimento continuou por mais 8 horas. Após o arrefecimento das amostras, completou-se o volume a 10 mL com água. Então, duas alíquotas de 1 mL de cada solução foram transferidas para distintos *vials* de plástico de 15 mL, sendo que em um deles foram adicionados 50 µL de solução estoque de 10 mg/L de Ba para a realização do teste de recuperação de 50 µg/L de Ba. Finalmente, aferiu-se o volume a 10 ml e a determinação de Ba foi realizada.



## c.1) Estudo da interferência do HCl na determinação do Ba

Após a análise dos resultados verificou-se que as recuperações foram insatisfatórias. Por este motivo, estudou-se a interferência do HCl na determinação de Ba através da análise deste ácido nas concentrações 10%; 5%; 2%; 1%; 0,5% e 0,2% (v/v) com e sem adição de 1% (v/v) de HNO<sub>3</sub>.

As soluções de HCl foram preparadas através de uma solução “mãe” de 20% (v/v), para isto, pipetaram-se para *vials* de 15 mL os volumes indicados na Tabela 5.3 e logo após aferiu-se o volume a 10 mL.

Tabela 5.3 – Volumes utilizados de solução 20% (v/v) de HCl, de HNO<sub>3</sub> concentrado e de solução de Ba para o preparo das soluções de estudo

Volume de HCl 20% (v/v) (mL)	Volume de HNO <sub>3</sub> (μL)	Volume de Ba 10000 μg/L (μL)
5,0	-	-
5,0	-	50
5,0	100	-
5,0	100	50
2,5	-	-
2,5	-	50
2,5	100	-
2,5	100	50
1,0	-	-
1,0	-	50
1,0	100	-
1,0	100	50
0,5	-	-
0,5	-	50
0,5	100	-
0,5	100	50
0,25	-	-
0,25	-	50
0,25	100	-
0,25	100	50
0,1	-	-
0,1	-	50
0,1	100	-
0,1	100	50

d) Sistema fechado: com Hidróxido de Tetrametilamônio (HTMA)

As amostras de fígado foram pesadas (0,2-0,3 g) em *vials* plásticos de 15 mL, nos quais foram adicionados diferentes volumes de solução de HTMA 25%: 1,0; 1,5 e 2,0 mL, da mesma forma para diferentes volumes de solução de HTMA a 5%: 4,0; 5,0 e 6,0 mL. As amostras ficaram em repouso por 48 horas, sem aquecimento, e então, completou-se o volume a 10 mL com água.

Antes da determinação de Ba, duas alíquotas de 100  $\mu$ L de cada solução foram transferidas para distintos *vials* de 15 mL. Em uma dessas alíquotas foram adicionados 50  $\mu$ L de solução 10 mg/L de Ba para a realização do teste de recuperação de 50  $\mu$ g/L de Ba. Os volumes foram aferidos a 10 mL.

#### 5.1.7 Teste da determinação de Ba em amostras de tecidos por GF-AAS com calibração por adição de padrão

Testou-se a determinação de Ba usando calibração por adição padrão com o objetivo de suprimir o efeito do  $\text{HNO}_3$  na determinação do Ba por GF-AAS.

As amostras de fígado foram cortadas em duas partes e pesadas (1,0-2,0 g) em *vials* plásticos. Em uma das partes das amostra foram adicionados 10 mg/L de Ba, através da adição de 10  $\mu$ L de solução do NIST 1000 mg/L de Ba. A seguir, em cada parte foram adicionados 1,0-2,0 mL de  $\text{HNO}_3$ , os frascos foram fechados e, estes, permaneceram em banho-maria por 8 horas diárias em um período de dois dias. O aquecimento era desligado durante o pernoite. Após a digestão o volume foi aferido a 10 mL com água.

As amostras foram diluídas 1:50 antes das análises. Estas foram realizadas nos mesmos parâmetros citados no item 5.1.2, mas com calibração no modo de adição de padrão.

### 5.1.8 Validação do método para a determinação de Ba em amostras de tecido e sangue

Após a definição das melhores condições de digestão e das análises por GF-AAS para a determinação de Ba em tecidos, realizou-se a validação desta metodologia. Os parâmetros avaliados foram: linearidade, limite de detecção, limite de quantificação, precisão e exatidão, sendo o procedimento conforme descrito no item 4.1.6 do capítulo 1. Entretanto, a precisão intradia ou repetitividade foi determinada a partir da concentração de Ba em seis amostras de tecido de fígado após a digestão com 1,0-2,0 mL de HNO<sub>3</sub> diluiu-se 50 vezes e efetuou-se as análises por GF-AAS com calibração por adição de padrão e a exatidão foi determinada através do percentual de recuperação de 1000 µg/L de Ba de uma solução padrão do NIST adicionada à amostra de tecido de fígado antes do procedimento de digestão, o ensaio foi realizado em triplicata.

### 5.1.9 Digestão das amostras de tecido e sangue

As amostras de tecidos (cérebro, músculo da coxa, osso do fêmur, coração, rim e fígado) foram pesadas, 0,5 a 1,0 g, em *vials* de plástico de 15 mL, nos quais foram adicionados 1,0- 2,0 mL de HNO<sub>3</sub>. O soro foi pipetado (500 µL- 1 mL) para *vials* plásticos. O precipitado sanguíneo foi transferido para *vials* com massa conhecida e pesados. E, em ambas as amostras foi adicionado 1 mL de HNO<sub>3</sub>. Então, os *vials* de todas as amostras foram fechados e mantidos sob aquecimento em banho-maria por 8 horas diárias em dois dias, sendo o sistema desligado durante o pernoite. Após a digestão os volumes foram aferidos a 10 mL e antes das análises todas as soluções foram diluídas 1:50.

Testes de recuperação foram realizados em seis amostras de cada tipo de tecido. Estas foram divididas em duas partes, em uma das partes foi adicionado 10 µL de solução 1000 mg/L de Ba do NIST e, então, realizou-se o procedimento de digestão e diluição. Dessa forma, resultou em uma adição final de 20 µg/L de Ba.

Os testes de recuperação nos soro e precipitado do sangue também foram realizados em seis amostras. Para os testes de recuperação nestas amostras, duas alíquotas de 200 µL da solução digerida foram transferidas para distintos *vials*, em uma das alíquotas foi adicionado

50 µL da solução de 1000 mg/L de Ba do NIST e, então se completou o volume a 10 mL. Portanto, resultou em uma diluição final 1:50 e uma adição final de 50 µg/L de Ba.

#### 5.1.10 Análise Estatística

Os dados foram analisados pela análise da variância (*One-way* ANOVA) seguido pelo teste de Duncan, e  $p < 0.05$  foi considerado para representar a diferença significativa entre as análises. Todos os dados foram expressos como média  $\pm$  desvio padrão (DP).

## 5.2 Resultado e Discussão

### 5.2.1 Determinação do DL 50

DL50 é a quantidade de uma substância, administrada em uma única dose, que provoca a morte de 50% (metade) de um grupo de animais de laboratório. A DL50 é uma forma de medir o potencial de intoxicação em curto prazo (toxicidade aguda) de um material (*Canadian Center for Occupational Health and Safety*, 2011). Podem-se usar muitos tipos de animais, mas na maioria das vezes o teste é feito com ratos e camundongos.

Para o  $\text{BaCl}_2$  foram encontrados os seguintes valores de DL50 para ratos por via intraperitoneal, 15,8 mg de  $\text{Ba}^{2+}/\text{kg}$  (FRIBERG et al., 1986 apud Maretic et al., 1957), 28,7 mg de  $\text{Ba}^{2+}/\text{kg}$  (MSDS-Sigma-Aldrich), 25,7 mg de  $\text{Ba}^{2+}/\text{kg}$  (MSDS-Cleantec e MSDS-Anachemia). Por serem estes valores bastante diferentes houve a necessidade de se realizar um ensaio para definir a dosagem adequada de Ba ( $\text{BaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ), por via intraperitoneal, para que não ocorresse incidência de mortes na próxima etapa deste trabalho referente ao estudo do comportamento do Ba em organismos vivos combinados ou não com citrato de sódio ou gluconato de cálcio.

As mortes observadas após 48 horas da administração de  $\text{BaCl}_2$  por via intraperitoneal foram: no Grupo (I), constituído por 7 ratas nas quais foram administrados uma dosagem de 5,0 mg de  $\text{Ba}^{2+}/\text{kg}$ , não houve mortes. No Grupo (II), com 6 ratas, administrou-se 7,5 mg

Ba<sup>2+</sup>/kg, resultando em 1 morte. No Grupo (III), com 6 ratas, injetou-se 10,0 mg de Ba<sup>2+</sup>/kg, morreram 4 indivíduos. E, por último, no Grupo (IV), com 6 ratas, administrou-se 15,0 mg de Ba<sup>2+</sup>/kg houve a morte de todos os indivíduos. Com estes dados obtidos calculou-se a dose letal 50 do Ba em ratos Wistar fêmeas através do Programa BioStat 2009 Professional. A Figura 5.2 representa, por análise de estatística de regressão, o gráfico indicando a DL50 em 9,6 mg/kg  $\pm$  1,1.

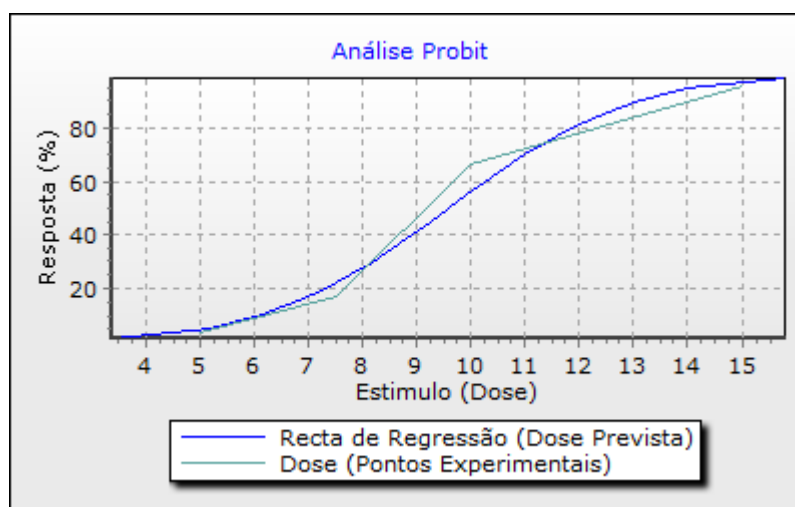


Figura 5.2 - Gráfico do cálculo do DL 50 do Ba em BaCl<sub>2</sub> em ratos Wistar machos, cálculo por análise de regressão, realizado através do *software* BioStat 2009 Professional.

### 5.2.2 Otimização da decomposição e medida das amostras de tecido

A maioria das técnicas analíticas para análise de elementos químicos requer que as amostras sejam convertidas em solução. Esses procedimentos envolvem uma decomposição da amostra, visando à destruição da matéria orgânica presente (GONZALEZ, 2007). Idealmente, um procedimento de digestão de uma amostra deve apresentar simplicidade, rapidez, utilizar pequenos volumes de reagentes, permitir a dissolução de grande número de amostras e, finalmente, produzir resultados precisos e exatos. Mesmo amostras líquidas podem necessitar de um preparo prévio para a análise (ARRUDA & SANTELLI, 1997).

Um procedimento bastante utilizado é a digestão úmida das amostras (OLIVEIRA, 2003). Para a decomposição úmida de amostras orgânicas são usados agentes oxidantes.

Normalmente, utilizam-se ácidos concentrados ou misturas de ácidos sob aquecimento. Alguns aspectos importantes devem ser considerados como: força do ácido, seu poder oxidante e complexante, a solubilidade dos sais resultantes, segurança na manipulação e o grau de pureza. Outra alternativa para solubilizar as amostras biológicas é o uso do hidróxido de tetrametilamônio (TMAH) em temperatura ambiente, sem a necessidade de aplicação de energia para o aquecimento (GHISI et al., 2007). O TMAH é uma base orgânica forte, solúvel em água ou alcoóis resultando em soluções incolores com odor de amina, sendo capaz de complexar e estabilizar elementos voláteis.

Dentro do contexto de se buscar um procedimento de digestão eficiente na qual os reagentes utilizados não interferissem nas análises, realizaram-se testes de digestão com alguns ácidos puros, misturas de ácidos e solubilização com HTMA. Também, testou-se a melhor maneira de medir as amostras por GF-AAS de modo a suprimir qualquer interferência causada pela matriz.

a) Sistema aberto: teste das digestões em bloco digestor utilizando 5 mL de HNO<sub>3</sub> e 5 mL de HNO<sub>3</sub>-HClO<sub>4</sub>[4:1(v/v)] em frascos de vidro.

As eficiências da digestão utilizando 5 mL de HNO<sub>3</sub> e da digestão utilizando 5 mL da mistura de ácidos HNO<sub>3</sub>-HClO<sub>4</sub>[4:1(v/v)] foram testadas através da recuperação de 1000 µg/L de Ba adicionados em uma das partes das amostras de tecidos (Tabela 5.4).

Tabela 5.4 – Teste da digestão de fígado com 5 mL de HNO<sub>3</sub> e com 5 mL de HNO<sub>3</sub> e HClO<sub>4</sub> [4:1 (v/v)]

Ácido	Amostra	Ba (µg/L)	Rec. (%)
HNO <sub>3</sub>	Branco	3245,0	-
	Branco + Ad*	3102,0	ND
	Fígado 1	3695,0	-
	Fígado 1 + Ad*	3583,0	ND
HNO <sub>3</sub> -HClO <sub>4</sub>	Branco	1878,0	-
	Branco + Ad*	1750,0	ND
	Fígado 2	1039,0	-
	Fígado 2 + Ad	1027,0	ND

\* Amostra com adição de 1000 µg/L de Ba

ND: Não determinado (valor do Branco ou concentração de Ba na amostra sem adição superior à concentração de Ba na amostra com adição)

Pode-se observar que os valores da concentração de Ba obtidos nos Brancos foram 3245 µg/L para HNO<sub>3</sub> e 1878 µg/L para a mistura HNO<sub>3</sub>-HClO<sub>4</sub>, sendo estes bastante altos. Devido a isto não se pôde calcular a concentração de Ba nas amostras e, também, não houve recuperação da adição de 1000 µg/L de Ba nas amostras. Apesar disso, pôde-se observar que na digestão com a mistura dos ácidos ocorreu a diminuição de aproximadamente 50% do sinal da medida em relação à digestão com apenas HNO<sub>3</sub>.

Para observar melhor o comportamento da digestão com HNO<sub>3</sub> e confirmar os valores obtidos nos Brancos, repetiu-se o procedimento já descrito, porém os Brancos foram medidos também após uma diluição 1:200 (Tabela 5.5).

Tabela 5.5 - Teste de digestão de fígado com 5 mL de HNO<sub>3</sub> em frascos de vidro

Amostra	Diluição	Ba (µg/L)	Rec.(%)
Branco 1	100	3560,0	-
Branco 1 + Ad*	100	4830,0	127,1
Branco 2	200	7158,0	-
Branco 2 + Ad*	200	8560,0	140,2
Branco 3	200	6700,0	-
Branco 3 + Ad*	200	9468,0	276,7
Fígado 1	100	2882,0	-
Fígado 1 + Ad*	100	4524,0	96,4
Fígado 2	100	3078,0	-
Fígado 2 + Ad*	100	3890,0	33,0
Fígado 3	100	3219,0	-
Fígado 3 + Ad*	100	7795,0	423,5

\* Amostras com adição de 1000 µg/L de Ba

ND: Não determinado (valor do Branco ou concentração de Ba na amostra sem adição superior à concentração de Ba na amostra com adição).

Na Tabela 5.5, observa-se que os valores dos Brancos continuaram altos, para diluição 1:100 foi de 3559 µg/L e para diluição 1:200 foram de 7158 e 6702 µg/L. Neste caso, nota-se que quando se aumentou a diluição, aumentou-se, também, o valor dos Brancos.

Em diversas amostras não se pôde calcular a concentração de Ba por causa dos valores obtidos para os Brancos ser superior aos valores obtidos para estas amostras. Devido a isto, também não houve recuperação do Ba adicionado. Além disso, ocorreu uma oscilação dos resultados das recuperações em valores muito baixos ou muito altos.

Concluí-se que pode ter ocorrido uma grande interferência do  $\text{HNO}_3$  nas análises das amostras para a determinação do Ba por GF-AAS.

b) Sistema fechado: digestão em banho-maria com 1 mL de  $\text{HNO}_3$  em frascos plásticos

Este teste foi realizado com o objetivo de descartar a possibilidade de contaminação das amostras pelo ambiente e pelo contato com a superfície do vidro e verificar se o excesso de  $\text{HNO}_3$  interfere na determinação do Ba. Por isso, foram utilizados frascos de plásticos fechados e reduziu-se o volume de  $\text{HNO}_3$  na digestão (Tabela 5.6).

Tabela 5.6 - Teste de digestão de fígado em banho-maria com 1 mL de  $\text{HNO}_3$  concentrado em *vials* plásticos

Amostra	Ba ( $\mu\text{g/L}$ )	Recup. (%)
Branco	2507,0	-
Branco + Ad*	1887,0	ND
Fígado	1315,0	-
Fígado + Ad*	1422,0	ND

\* Amostra com adição de 1000  $\mu\text{g/L}$  de Ba.

ND: Não determinado (valor do Branco maior que a concentração de Ba na amostra).

Apesar da troca de recipiente em sistema fechado e diminuição da quantidade de  $\text{HNO}_3$  o valor do Branco, 2507,0  $\mu\text{g/L}$ , continuou muito alto. Este valor foi superior aos determinados para as amostras, mesmo com a adição de 1000  $\mu\text{g/L}$  de Ba. Por este motivo, não se pôde calcular a concentração de Ba nos tecido e as recuperações das adições. Concluí-se, com isto, que o motivo deste comportamento não foi devido à contaminação do ácido pelo vidro ou pelo ambiente, mas provavelmente, por causa do volume do  $\text{HNO}_3$  ainda estar muito grande, provomevendo uma interferência na determinação do Ba por GF-AAS.



### b.1) Estudo da interferência do HNO<sub>3</sub> na determinação de Ba por GF-AAS

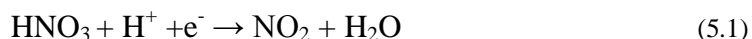
Para verificar se houve interferência do HNO<sub>3</sub> na determinação do Ba por GF-AAS, soluções de diversas concentrações do ácido sem e com a adição de 50µg/L de Ba foram analisadas.

Dessa forma, pôde-se observar que em diluições do ácido superiores a 200 vezes ocorreram recuperações acima de 80%, sendo este valor considerado satisfatório. Assim, confirmando a hipótese de que o HNO<sub>3</sub> em altas concentrações interfere na determinação de Ba por GF-AAS e em menores concentrações auxiliam na sensibilidade do sinal. Sendo, este último comportamento confirmado na necessidade das soluções para NP e dos medicamentos estarem acidificados com 0,5 % (v/v) para uma exata determinação do Ba (capítulo 1).

### b.2) Teste de redução do HNO<sub>3</sub> excedente

Após a confirmação de que o HNO<sub>3</sub> interfere, resultando em altos valores dos Brancos, testou-se fazer uma redução do HNO<sub>3</sub> excedente. Uma explicação plausível para este comportamento é que o HNO<sub>3</sub> como agente oxidante reage com a matéria orgânica e se decompõe formando óxido nitroso que é volatilizado e eliminado. Dessa forma, ficando apenas uma mínima concentração que não interfere na determinação do Ba. No Branco, como não há matéria orgânica, o HNO<sub>3</sub> em grande concentração permanece em solução interferindo nas análises.

A equação (5.1) mostra a reação de redução do HNO<sub>3</sub> concentrado:



O potencial de redução padrão do HNO<sub>3</sub> é + 0,940 V, portanto para que a reação de redução do HNO<sub>3</sub> aconteça é necessário utilizar compostos com potencial de redução menor que este, assim, fez-se uso do ácido oxálico e ácido ascórbico cujos potenciais são - 0,432 V e

+ 0,390 V respectivamente, as semiequações de oxidação destes compostos estão mostradas nas equações (5.2) e (5.3).

Também se buscou o auxílio de peróxido de hidrogênio, ácido sulfâmico e ureia, pois estes reagentes ajudam na eliminação dos óxidos nitrogênio (Tabela 5.7).

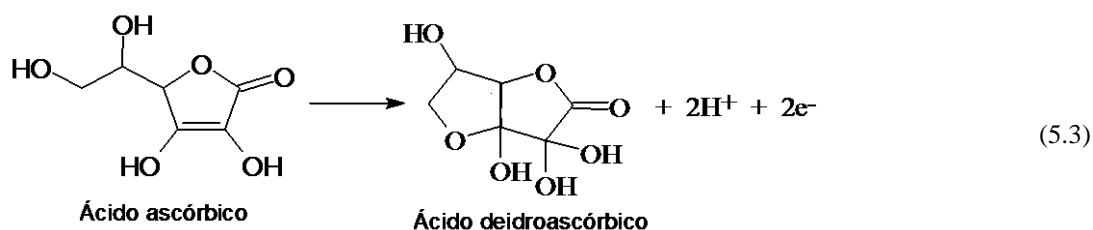


Tabela 5.7 - Resultados da determinação de Ba em  $\text{HNO}_3$  reduzido com ácido oxálico e ácido ascórbico

Reagentes	Ba (ug/L)	Recup. (%)
$\text{HNO}_3$	464,4	-
$\text{HNO}_3 + \text{Ad}^*$	838,0	62,4
$\text{HNO}_3 + \text{ác. Oxálico}$	1740,0	-
$\text{HNO}_3 + \text{ác. oxálico} + \text{Ad}^*$	1690,0	ND
$\text{HNO}_3 + \text{ác. oxálico} + \text{ác. Sulfâmico}$	1810,4	-
$\text{HNO}_3 + \text{ác. oxálico} + \text{ác sulfâmico} + \text{Ad}^*$	1824,0	2,3
$\text{HNO}_3 + \text{ác. oxálico.} + \text{H}_2\text{O}_2$	1766,4	-
$\text{HNO}_3 + \text{ác. oxálico.} + \text{H}_2\text{O}_2 + \text{Ad}^*$	1380,0	ND
$\text{HNO}_3 + \text{ác. oxálico} + \text{ureia}$	1819,8	-
$\text{HNO}_3 + \text{ác. oxálico} + \text{ureia} + \text{Ad}^*$	1778,0	ND
$\text{HNO}_3 + \text{ác. Ascórbico}$	959,8	-
$\text{HNO}_3 + \text{ác. ascórbico} + \text{Ad}^*$	840,0	ND
$\text{HNO}_3 + \text{ác. ascórbico} + \text{ác sulfâmico}$	1256,2	-
$\text{HNO}_3 + \text{ác. ascórbico} + \text{ác sulfâmico} + \text{Ad}^*$	1084,0	ND
$\text{HNO}_3 + \text{ác. ascórbico} + \text{H}_2\text{O}_2$	1654,2	-
$\text{HNO}_3 + \text{ác. ascórbico} + \text{H}_2\text{O}_2 + \text{Ad}^*$	1664,0	1,6
$\text{HNO}_3 + \text{ác. ascórbico} + \text{ureia}$	900,4	-
$\text{HNO}_3 + \text{ác. ascórbico} + \text{ureia} + \text{Ad}^*$	838,0	ND

\* Amostra com adição de 600  $\mu\text{g/L}$  de Ba.

ND: Não determinado (valor da concentração de Ba da solução sem adição maior que o valor da concentração de Ba da solução com adição).

Os resultados da concentração de Ba continuaram altos, os valores das recuperações foram insatisfatórios, tornando-se muito piores de quando foi utilizado apenas HNO<sub>3</sub>. Portanto pode-se concluir que a adição de mais reagentes nas soluções aumentou ainda mais as interferências na determinação do Ba por GF-AAS.

c) Digestão com HCl- HNO<sub>3</sub>

Com o intuito de diminuir ainda mais o volume de HNO<sub>3</sub> utilizado na digestão das amostras de tecido e resolver o problema apresentado nos ensaios anteriores, testou-se uma digestão com HCl em combinação com HNO<sub>3</sub>.

Na Tabela 5.8 estão mostrados os valores das análises desse ensaio, assim como, os resultados do teste de recuperação.

Tabela 5.8 – Teste de digestão de tecido de fígado com 1 mL de HCl e 500 µL de HNO<sub>3</sub>

Amostra	Ba (µg/L)	Recup* (%)
Branco	1888,0	33,7
Fígado	2547,0	36,1

\* Recuperação da adição de 50 µg/L de Ba nas amostras diluídas.

As recuperações de 33,7 e 36,1% da adição de 50 µg/L de Ba foram muito baixas. Sugerindo-se que a diminuição da sensibilidade da medida ocorreu em consequência da interferência do HCl.

c.1) Estudo da interferência do HCl na determinação de Ba por GF-AAS

Verificou-se a hipótese da interferência do HCl na determinação do Ba através da medida da concentração de Ba em diversas concentrações de ácido sem e com adição de 1% de HNO<sub>3</sub>. Comparou-se a recuperação da adição de 50 µg/L em cada solução (Tabela 5.9).

Tabela 5.9 - Estudo da interferência de HCl com e sem adição de 1% (v/v) de HNO<sub>3</sub> na determinação de Ba por GF-AAS

Concentração HCl (%) (v/v)	Ba (µg/L)		Rec. (%)	
	sem 1% de HNO <sub>3</sub>	com de 1% de HNO <sub>3</sub>	sem 1% de HNO <sub>3</sub>	com de 1% de HNO <sub>3</sub>
10	n.d	7,8	-	-
10 + Ad*	10,2	13,5	20,5	11,4
5	n.d	15,2	-	-
5 + Ad*	5,2	26,9	10,4	23,4
2	n.d	25,6	-	-
2 + Ad*	3,4	44,4	6,9	37,8
1	n.d	34,0	-	-
1 + Ad*	3,0	61,8	6,1	55,6
0,5	n.d	39,7	-	-
0,5 + Ad*	3,0	69,0	6,1	58,6
0,2	n.d	44,2	-	-
0,2 + Ad*	3,4	76,4	6,9	64,3

n.d: não detectado ( resultado da medida abaixo da curva de calibração).

\* Solução de HCl com adição de 50 µg/L de Ba.

Através da análise dos dados apresentados, observou-se a interferência do HCl nas determinação do Ba, pois os resultados das recuperações nas soluções do HCl foram muito baixos. Já, nas soluções de HCl com adição de 1% (v/v) de HNO<sub>3</sub> pôde-se observar que com menores concentrações de HCl maior o valor da recuperação, entretanto, ainda não sendo satisfatórios. Concluindo-se que uma grande quantidade de cloretos na determinação do Ba por GF-AAS interferiu e diminuiu a sensibilidade do sinal.

d) Com Hidróxido de Tetrametilamônio (HTMA)

Realizaram-se os ensaios de decomposição utilizando soluções de HTMA. Verificou-se a eficiência do procedimento utilizando diferentes volumes das soluções de HTMA em diferentes concentrações.

Os valores das análises estão mostrados na Tabela 5.10, assim como, os resultados do teste de recuperação.

Tabela 5.10 – Teste de decomposição do fígado utilizando diferentes volumes das soluções de 25% e 5% de HTMA

HTMA	Amostra	Volume (mL)	Ba ( $\mu\text{g/L}$ )	Recup.* (%)
25%	Branco	1,0	3028,0	29,9
	Branco	1,5	3301,0	40,0
	Branco	2,0	3045,0	37,0
	Fígado 1	1,0	3614,0	53,0
	Fígado 2	1,5	4320,0	58,0
	Fígado 3	2,0	4621,0	42,8
5%	Branco	4,0	2591,0	56,0
	Branco	5,0	26,54	26,3
	Branco	6,0	2903,0	21,1
	Fígado 4	4,0	3072,0	50,8
	Fígado 5	5,0	3168,0	51,3
	Fígado 6	6,0	3811,0	21,5

\* Recuperação da adição de 50  $\mu\text{g/L}$  de Ba nas amostras diluídas.

Verifica-se que os valores dos Brancos também foram elevados, variaram entre 2591,0 a 3301,0  $\mu\text{g/L}$ . Também se observa que as recuperações foram baixas, inferiores a 58%.

### 5.2.3 Calibração por adição de padrão

Diversas tentativas de digestão das amostras de tecido foram realizadas e apesar de todas cumprirem com eficiência o objetivo de dissolver a matéria orgânica, em todas ocorreram interferência dos reagentes na medida para a determinação do Ba. Portanto, devido à necessidade comprovada de baixas concentrações de  $\text{HNO}_3$  na determinação da concentração de Ba, optou-se por realizar mais alguns testes utilizando a digestão com este ácido.

Com a finalidade de suprimir a interferência causada pelo  $\text{HNO}_3$ , testou-se determinar a concentração de Ba por GF-AAS realizando uma calibração por adição padrão, uma vez que neste modo a curva de calibração é feita sobre uma amostra.

Os valores da concentração de Ba descritos na Tabela 5.11 são das amostras diluídas.

Tabela 5.11 - Determinação da concentração de Ba por GF-AAS com calibração por adição de padrão

Amostra	Ba (ug/L)	Recup* . (%)
Branco	1605,0	87,5
Fígado1	1585,0	93,6
Fígado 2	2205,0	98,3
Fígado 3	3535,0	102,9

\* Recuperação da adição de 1000 µg/L de Ba em uma das partes das amostras antes da digestão.

O valor da concentração de Ba obtido no Branco através da calibração por adição de padrão foi de 1605,0 µg/L, sendo, ainda, muito elevado, entretanto, a recuperação de 87,5% da adição de 1000 µg/L em HNO<sub>3</sub> foi satisfatória. Portanto, calculou-se a concentração de Ba sem a subtração do valor do Branco, e todos os valores obtidos para as recuperações nas amostras foram acima de 90%.

#### 5.2.4 Validação do método

Através dos diversos ensaios realizados encontrou-se a maneira mais adequada para se determinar Ba em tecidos. Esta se deu pela digestão das amostras com um pequeno volume de HNO<sub>3</sub> (1,0- 2,0 mL) e pela análise por GF-AAS com calibração por adição de padrão. Assim, avaliaram-se os seguintes parâmetros para validar a metodologia proposta: linearidade, limite de detecção, limite de quantificação, precisão e exatidão.

A linearidade foi determinada através da determinação de seis níveis de concentração de Ba para definir a reta em suas curvas de calibração e a absorvância do Ba referentes a cada uma das concentrações (Tabela 5.12).

Tabela 5.12 – Medida da absorção do Ba obtida na determinação da curva padrão

Concentração ( $\mu\text{g/L}$ )	Absorvância integrada/s			RSD %
	1º Dia	2º Dia	3º Dia	
0,0	0,02774	0,02822	0,03078	5,65
10,0	0,3075	0,2832	0,2932	4,14
20,0	0,5053	0,5193	0,5389	3,24
40,0	0,7519	0,7336	0,7462	1,26
60,0	0,9642	0,9500	0,9837	1,75
80,0	1,141	1,1420	1,1610	0,98
100,0	1,3620	1,3890	1,4003	1,42

A curva padrão e a equação da reta obtida por regressão linear pelo método dos mínimos quadrados encontram-se na Figura 5.3.

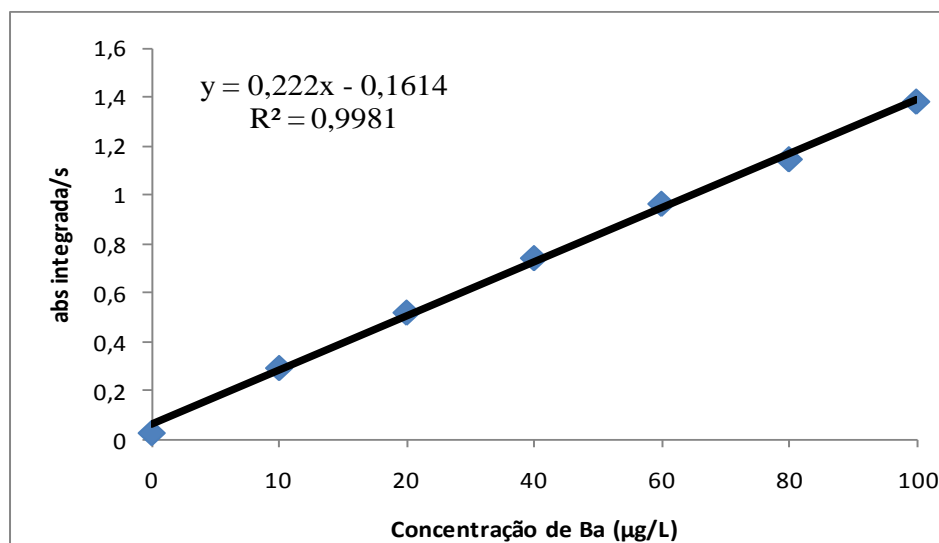


Figura 5.3 - Representação gráfica da curva padrão de Ba obtida por GF-AAS.

O coeficiente de correlação obtido a partir da absorvância integrada por segundo referentes à absorção do Ba dos três dias foi 0,9981, sendo este valor próximo a 1,0, caracterizando uma boa correlação entre a absorvância e as concentrações. Os dados de linearidade validados por análise de variância (ANOVA) demonstraram regressão linear e nenhum desvio significativo da linearidade ( $p < 0,05$ ).

Os LD e LQ foram calculados a partir da análise do Branco e os valores obtidos foram 0,07  $\mu\text{g/L}$  e 0,23  $\mu\text{g/L}$ , respectivamente.

A partir da determinação destes valores, conclui-se que o método é sensível para a determinação de pequenas concentrações de Ba nas amostras de tecidos.

A precisão foi realizada a partir da determinação da concentração de Ba, em seis medidas de uma amostra de tecido de fígado sob as mesmas condições em um mesmo dia. A precisão intermediária (interdia) foi realizada a partir da análise da mesma amostra em três dias diferentes e sob as mesmas condições. Os resultados obtidos dos ensaios para a determinação da precisão intradia e interdia encontram-se nas Tabelas 5.13 e 5.14.

Tabela 5.13 - Determinação da precisão intradia na análise do Ba em amostras de tecidos

Amostra	Bário ( $\mu\text{g/g}$ )
1	17,09
2	18,63
3	15,88
4	18,84
5	16,03
6	17,00
Média	17,24
DPR (%)	7,29

Tabela 5.14 - Determinação da precisão interdia na análise do Ba em amostras de tecidos

Dia	Bário ( $\mu\text{g/L}$ )
1	* 17,09
2	* 17,59
3	* 17,24
Média	17,31
DPR(%)	1,49

\*Média de seis determinações

A determinação de Ba em tecidos apresentou desvios padrões de 7,3% e 1,5% para análises realizadas no mesmo dia e em três dias diferentes, respectivamente, mostrando uma



boa precisão, já que os limites aceitáveis para concentrações de  $10^{-6}$  a  $10^{-5}$  % são de 16% a 11% (AOAC, 1993.)

Através da análise da variância (ANOVA) e Teste F, constatou-se que não houve diferença significativa ( $p < 0,05$ ) entre as análises realizadas em dias diferentes.

A exatidão foi determinada através do teste de recuperação, sendo expressa em percentual de recuperação e avaliada a partir do Teste T de Student. Para este teste foi adicionado ao tecido de fígado 1000  $\mu\text{g/L}$  de Ba a partir de uma solução estoque do NIST. A amostra foi digerida com  $\text{HNO}_3$  e diluída 50 vezes. Então, realizou-se a análise por GF-AAS com calibração por adição de padrão. Os valores obtidos neste teste estão mostrados na Tabela 5.15

Tabela 5.15- Teste de recuperação da adição de 1000  $\mu\text{g/L}$  de Ba em amostras de fígado

Amostra	Recuperado ( $\mu\text{g/L}$ )	Recuperação (%)
1	-	-
1+Ad*	1009,0	100,9
2	-	-
2+Ad*	1007,0	100,7
3	-	-
3+Ad*	997,0	99,7

\* Amostra com adição de 1000  $\mu\text{g/L}$  de Ba.

Para avaliar a exatidão do método aplicou-se o Teste T, sendo 4,30 o valor tabelado para 2 (n-1) graus de liberdade ( $p < 0,05$ ) e o valor obtido para a recuperação de Ba adicionado à amostra foi de 1,65, portanto, pode-se considerar o método com exatidão satisfatória.

### 5.2.5 Estudo do comportamento do Ba em organismo vivo combinado ou não com gluconato de cálcio e citrato de sódio

Estudos mostraram que 90% do Ba absorvido se encontram nos ossos (PÉLISSER-ALICOT et al., 1999), pois os estes são formados predominantemente por cálcio, em forma de fosfato ou carbonatos (MOTA, 2000), assim, o Ba é trocado pelo cálcio. Os remanescentes 10% podem ser distribuídos nos tecidos moles como o cérebro e sistema cardiovascular. As intoxicações por Ba também induzem a distúrbios na bomba de íons sódio-potássio (Na-K), levando a hipocalemia extracelular, onde os íons de Ba competitivamente bloqueiam o efluxo celular dos íons potássio, sobre o qual, a contínua atividade da bomba de íons Na-K leva ao acúmulo de Potássio e uma hipocalemia extracelular (PURDEY, 2003).

O Ba tem sido considerado um metal de efeitos neurotóxicos. Em todos os casos relatados na literatura sobre intoxicação por Ba envolvem manifestações neurológicas e cardiovasculares (PÉLISSER-ALICOT et al., 1999).

Purdey, 2003, constaou que altas incidências de pessoas com Esclerose Múltipla e outras doenças neurodegenerativas, tais como Encefalopatias Espongiformes Transmissíveis e Esclerose Lateral Amiotrófica, foram identificadas em regiões com altos níveis de contaminação por Ba por fontes naturais e industriais (PURDEY, 2003). Segundo a este autor, o Ba pode causar esses danos devido à sua conjugação com sulfatos livres de moléculas, privando-as de seus cofatores, dessa forma, interrompendo a sua ação no organismo. Estes cofatores são dependentes dos íons cálcio e magnésio, que durante escassez desses metais, o Ba pode ser trocado pelo cálcio nos canais de cálcio causando fadiga nos sistemas neurais.

Nos ensaios realizados neste trabalho comprovou-se a contaminação por Ba das soluções para NP e dos medicamentos utilizados em pacientes recém-nascidos pretermos da UTI do HUSM.

Com o objetivo de analisar os efeitos da administração de Ba ao organismo diretamente à corrente sanguínea, como é o caso das formulações de uso parenteral, realizou-se ensaios em modelo animal, os quais receberam uma dosagem de Ba em combinação ou não com gluconato de cálcio e citrato de sódio.

Esses compostos foram escolhidos para a realização deste ensaio, pois, o gluconato de cálcio se mostrou o componente da NP mais contaminado pelo Ba. Além disso, os ânions gluconato e citrato foram os compostos que mais interagiram com o Ba da resina, comprovando que estes podem retirar o Ba presente nas embalagens que armazenam as

nutrições parenterais passando-o para as soluções. Assim, avaliou-se o tecido que haveria maior deposição e a influência de ambos os compostos nos efeitos causados pelo metal.

As recuperações da adição de 20 µg/L de Ba nos tecidos variaram entre 90% a 104%, sendo estes valores considerados satisfatórios. Para o soro e o precipitado, as recuperações da adição de 50 µg/L foram superiores a 90% e inferiores a 103,5%, conferindo, também, um ótimo resultado (Tabela 5.16).

Tabela 5.16 - Resultado do teste de recuperação para cada tipo de amostra de tecido e sangue

Tecido	Recuperação (%)
Cérebro	92,7 – 99,9
Coração	99,1 – 103,8
Músculo	92,5 – 104,1
Fígado	99,0 – 104,0
Rim	94,9 – 103,1
Osso	96,0 – 102,8
Soro	95,7 – 103,5
Precipitado Sanguíneo	90,5 – 103,0

Na Figura 5.4 estão ilustrados os resultados da concentração de Ba determinados nos tecidos dos ratos em que se observou diferença significativa ( $p < 0,05$ ) entre os tratamentos com relação ao Controle.

Os dados encontrados para o músculo (Figura 5.4 A) mostram que houve um aumento na concentração de Ba em 40,4% no grupo em que se administrou Ba e 35,5% no grupo em que se administrou gluconato + Ba.

No osso os dados mostram (Figura 5.4 B) que quando foi administrado Ba nos ratos a concentração deste metal aumentou 275,0%; 198,7% quando administrado gluconato + Ba e 400,0% quando administrado citrato + Ba.

No precipitado sanguíneo (5.4 C), houve um aumento na concentração de Ba no grupo do Bário de 62,0% e no grupo citrato + Ba de 30,1%.

No coração, fígado, rim, cérebro e soro não se observaram alterações nos resultados em nenhum dos tratamentos em relação ao grupo Controle.

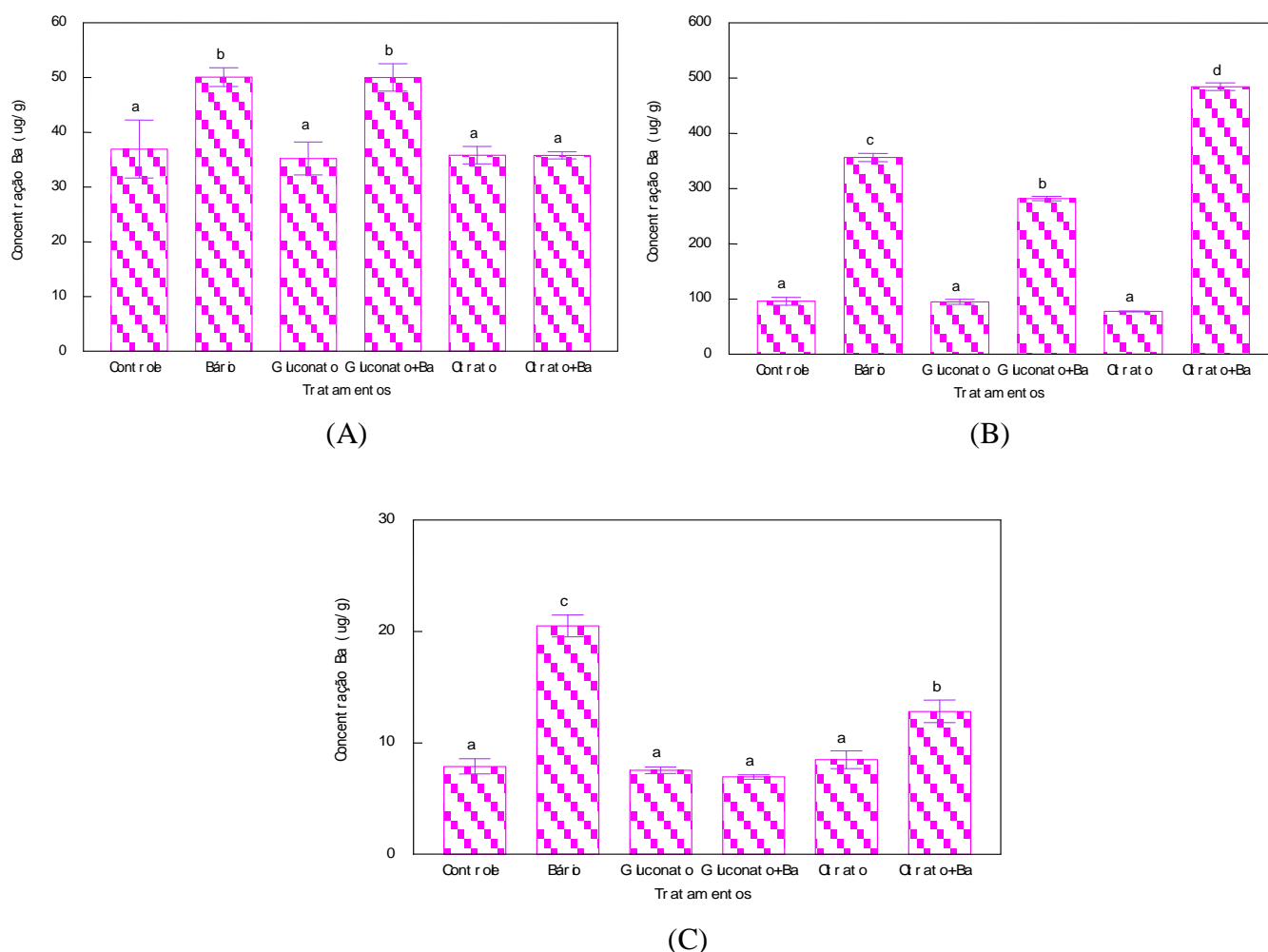


Figura 5.4 - Concentração de Ba ( $\mu\text{g/g}$ ) em amostra de (A) músculo, (B) osso e (C) precipitado sanguíneo de ratos machos Wistar submetidos aos tratamentos. Barras representam médias + DP. Grupos com diferentes letras são estatisticamente diferentes ( $p < 0,05$ ,  $n=5$ ) por ANOVA e teste de Duncan.

As maiores concentrações de Ba no organismo são encontradas nos ossos (IPCS-INCHEM, 2001). Bauer et al. (1956) relataram que taxas de deposição de Ba para o esqueleto inteiro, tíbia e incisivos foram 1,4-2,4 vezes maiores do que taxas de deposição de cálcio. Reeves (1986) notou que a absorção óssea de Ba é de 1,5 a 5 vezes maior do que a de cálcio ou de estrôncio. O restante do Ba no organismo é encontrado nos tecidos moles, ou seja, aorta, cérebro, coração, rim, baço, pâncreas e pulmão.

Os resultados também foram analisados de maneira geral entre os tratamentos, levando em consideração o somatório da concentração de Ba encontrada em todos os tecidos estudados (Figura 5.5). Assim, os dados mostraram que, em relação ao Controle, no grupo do Ba houve um aumento de 141% na concentração total deste metal no organismo. Um

aumento, ainda maior, de 197% da concentração corpórea foi observado quando se administrou Ba combinado com o citrato. No entanto, o Ba administrado juntamente com o gluconato apesar de aumentar 96% a concentração em relação ao controle, este tratamento reduziu a absorção do metal em 18% em relação ao grupo Bário. Sugerindo que a absorção do Ba no organismo é aumentada pelo citrato e diminuída pelo gluconato.

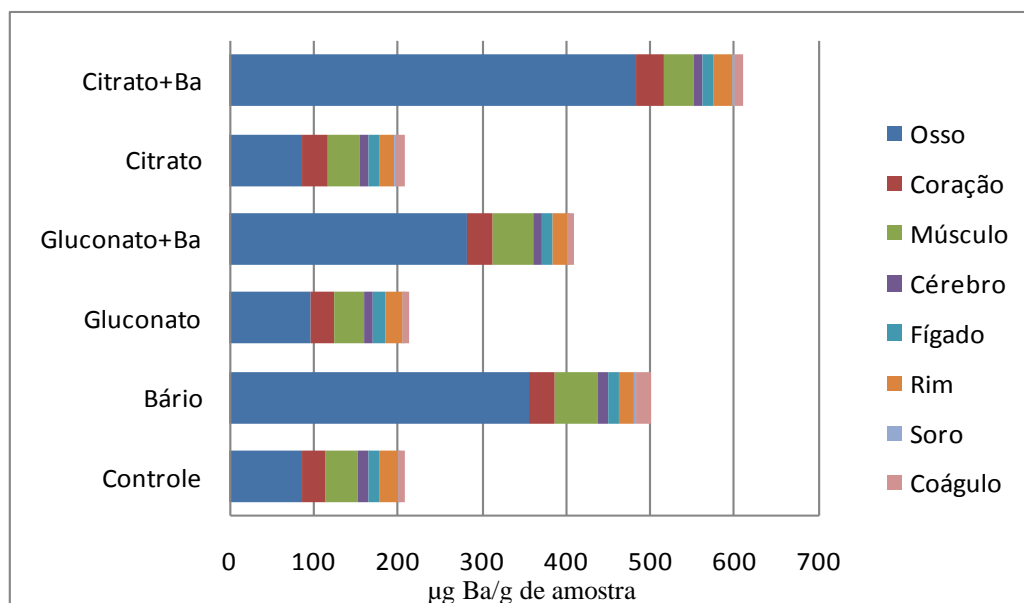


Figura 5.5 - Comparação da deposição do Ba nas diversas partes do organismo em relação aos tratamentos que os ratos Wistar foram submetidos.

Os resultados ainda comprovaram que o Ba se encontra preferencialmente nos ossos, foi observado no grupo Controle que aproximadamente 41% da concentração de Ba está localizado neste tecido. Podendo ser, ainda mais, evidenciado esta situação em todos os grupos em que foi administrado 2,5 mg de Ba/kg, pois em todos eles o metal foi predominantemente depositado nos ossos. Podendo ser observado que, em relação a concentração total no organismo, o Ba depositado neste tecido aumentou para 71% no grupo do Ba, 69% no grupo gluconato+Ba e 80% no grupo citrato+Ba.

No músculo a fração da concentração corpórea no Controle representava cerca de 18% e nos demais grupos: Bário, Gluconato + Ba, Citrato + Ba, passou para 10% , 12% e 5%, respectivamente. Observa-se, com isto, uma diminuição representativa na concentração do metal nestes grupos em relação ao Controle. Isto se deve, provavelmente, pelo fato deste elemento ter uma grande afinidade com os ossos, o que acarretou no aumento da concentração

total de Ba no organismo. Portanto, mesmo que a deposição deste metal no músculo tenha aumentado, estes valores toram-se relativamente menores ao total de Ba no organismo.

No precipitado a concentração de Ba aumentou no grupo do Bário em relação ao Controle provavelmente por causa da presença do Cálcio, sendo este metal o elemento essencial para a coagulação sanguínea (MOTA, 2000). No grupo Citrato + Ba os resultados mostraram que o citrato diminui o acúmulo de Ba, provavelmente este composto aumentou a absorção do Ba reduzindo sua concentração nos componentes do sangue, isto, sendo comprovado no aumento do acúmulo de Ba no osso do neste tratamento.

Com isto, conclui-se que nesta dosagem, o Ba depositou-se praticamente em sua totalidade nos ossos, restando uma menor percentagem para ser distribuído nos demais tecidos do organismo e que os compostos gluconato e, principalmente o citrato contribuíram para este comportamento.

### 5.3 Conclusão

A proposta do estudo em modelo animal foi elucidar o comportamento do Ba em um organismo vivo. Comparando-se, assim, a administração deste metal através das soluções de NP e por medicamentos que comprovadamente estão contaminados por Ba. Todavia, houve a necessidade de se realizar um ensaio para determinar a DL50 do BaCl<sub>2</sub> nas condições experimentais que seriam efetuadas este estudo. Definiu-se que a DL50 foi 9,6 mg/kg, sendo este valor diferente dos valores encontrados na literatura. Conferiu-se, então, a esta etapa uma importância na decisão de uma dosagem segura que não causasse a morte dos animais.

Foram necessários, também, realizar testes preliminares de digestão para a determinação de Ba nas amostras de tecidos dos ratos Wistar por GF-AAS. Assim, misturas de ácidos como HNO<sub>3</sub>-HClO<sub>4</sub> [4:1(v/v)] e HNO<sub>3</sub>-HCl [1:2 (v/v)], HNO<sub>3</sub> concentrado e HTMA foram os reagentes utilizados. Todos proporcionaram com eficiência a digestão da amostra, no entanto, causaram interferências nas determinações do Ba. Para a digestão com HNO<sub>3</sub>-HClO<sub>4</sub> [4:1(v/v)] e HNO<sub>3</sub> foram observados elevados valores dos Brancos, estes muitas vezes maiores que os obtidos para as amostras com e sem adição de Ba. Para a digestão com HNO<sub>3</sub>-HCl [1:2 (v/v)] e HTMA, observou-se que as recuperações da adição de Ba nas amostras foram muito baixas.

Com a intenção de eliminar o problema encontrado dos altos valores dos Brancos, testou-se uma reação de redução do  $\text{HNO}_3$ , entretanto, os resultados se mostraram ainda piores, sugerindo que a adição de mais reagentes na solução aumenta a interferência do sinal do Ba.

Como foi necessária a acidificação das amostras com  $\text{HNO}_3$ , comprovada nos estudos anteriores das determinações de Ba em amostras de NP e medicamentos, optou-se por realizar a digestão das amostras com pequenos volumes deste ácido e para suprimir a interferência causada pela matriz utilizou-se a calibração por adição do padrão. Esta maneira não eliminou o problema encontrado dos altos valores dos Brancos, entretanto, resultou em recuperações satisfatórias. Assim, o método foi validado, mostrando-se linear, sensível e com boas precisão e exatidão.

Os resultados obtidos da administração de Ba combinados ou não com citrato de sódio e gluconato de cálcio mostraram a deposição do metal no músculo, osso e precipitado sanguíneo.

No tratamento Ba com o citrato, observou-se um aumento significativo na deposição corpórea do Ba, sendo que o metal foi predominantemente encontrado nos ossos. Já o tratamento dos ratos com Ba combinado com o Gluconato diminuiu o acúmulo deste metal no organismo, mas também favoreceu a deposição nos ossos. Assim, esses compostos ajudaram a amenizar, mas não eliminar, a deposição do Ba no músculo e no precipitado sanguíneo com relação à administração com apenas de Ba.

Estes dados mostram a necessidade de um maior controle da contaminação por Ba em soluções de NP e medicamentos, já que são administrados em pacientes debilitados.

## 6 CONCLUSÃO DO TRABALHO

Com este trabalho pode-se evidenciar a contaminação por Ba das NP e medicamentos, proveniente, principalmente, da interação dos constituintes dessas formulações farmacêuticas com as embalagens.

O citrato, que é largamente usado em medicamentos, demonstrou-se um composto que possui uma grande afinidade com este metal e auxilia em sua absorção no organismo, mais precisamente nos ossos.

A gravidade desta realidade está na administração do Ba, que é extremamente tóxico, diretamente na corrente sanguínea e em pacientes debilitados. Sobretudo, em pacientes recém-nascidos cujo organismo está em acelerado crescimento.



## 7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALVES, O. L.; GIMENEZ, I. F.; MAZALI, I. O. Vidros. **Cadernos Temáticos de Química Nova na Escola**. p. 9-20, 2001. Edição especial.

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. **AOAC: Peer-verified Methods Program, Manual on Policies and Procedures**. USA, 1993.

ARRUDA, M. A. Z.; SANTELLI, R. E. Mecanização no preparo de amostras por microondas: o estado da arte, **Química Nova**, v. 20, p. 638-643, 1997.

AVIS, K. E.; LACHMAN, L.; LIEBMAN, H. A. **Pharmaceutical dosage forms: Parenteral Medications**. New York: Marcel Dekker Inc., 1986.

BECKER, E. **Investigação sobre a origem da contaminação pelas espécies de arsênio em soluções de nutrição parenteral**. 2002. 157 f. Dissertação (Mestrado em Química)-Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2002.

BERTAGNOLLI, D.C. **Migração de metais por interação das embalagens com soluções parenterais**. 2008. 258 f. Tese (Doutorado em Química)- Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2008.

BERTOL, C. D.; ADAMS, A. I. H.; WERLANG, M. C. Procedimento para validação do processo de preparação de nutrição. **Revista Brasileira Nutrição Clínica**, v. 21, p.193-197, 2006.

BINOTTO, R., **Investigação sobre a origem da contaminação por alumínio em soluções de nutrição parenteral**. 2001. 150 f. Dissertação (Mestrado em Química)-Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2001.

BOHRER, D., et al., Influence of the glass packing on the contamination of pharmaceutical products by aluminum. Part I: salts, glucose, heparin and albumin. **Journal of trace elements in medicine and biology: organ of the Society for Minerals and Trace Elements**, v. 15, p. 95-101, 2001a.

BOHRER, D., et al., Influence of the glass packing on the contamination of pharmaceutical products by aluminum. Part II: amino acids for parenteral nutrition. **Journal of trace elements in medicine and biology: organ of the Society for Minerals and Trace Elements**, v. 15, p. 103-8, 2001b.

BOHRER, D., et al. Contribution of the raw material to the aluminum contamination in parenteral. **Journal Parenteral Enteral Nutrition**, v. 26, p. 382-388, 2002a.

BOHRER, D., et al. Availability of aluminum from glass and an Al form ion exchanger in the presence of complexing agents and amino acid. **Analytica Chimica Acta**, v. 459, p. 267-276, 2002b.

BOHRER, D., et al. Influence of the glass packing on the contamination of pharmaceutical products by aluminum. Part III: Interaction container-chemicals during the heating for sterilization. **Journal of Trace Element Medicine and Biology**, v. 17, p. 107-115, 2003

BOHRER, D. Contamination and Contamination Control. In: **Pharmaceutical Manufacturing Handbook Regulation and Quality**, Shayne ed., 2008.

BRASIL. Farmacopeia Brasileira, 5. ed., v.1, p. 546. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Brasília, 2010.

**BRITISH PHARMACOPEIA**, 2012 ed., England: The Stationary Office, 2012. CD-ROM.

BUCHMAN, A. L., et al. Organ Heavy-Metal Accumulation During Parenteral Nutrition Is Associated With Pathologic Abnormalities In Rats. **Nutrition**, v. 17, p. 600-606, 2001.

CCOHS. **Canadian Centre for Occupational Health and Safety**. Disponível em: <http://www.ccohs.ca/oshanswers/chemicals/ld50.html>. Acessado 24 de Abril de 2011.

CUNHA, L. C., et al. Contrastes Baritados: A toxicologia experimental como ferramenta no estabelecimento de nexo causal de intoxicação maciça por Bário. **Revista Eletrônica de Farmácia**, v. 3, p. 68-74, 2006.

DI, M. G., et al. **Nutrição Parenteral Total: A produção a Administração**. Pharmacia Brasileira, 2009. Encarte organizado pela Comissão do Conselho Federal de Farmácia (COMFARHOSP).

ELLENHORN, M. J. **Ellenhorn's Medical Toxicology - Diagnosis and Treatment of Human Poisoning**. 2<sup>nd</sup> ed. Baltimore: Williams & Wilkins, 1997.

FERREIRA, A. O. F., *et al.* **Guia Prático da Farmácia Magistral**. 2. ed. São Paulo: Pharmabooks, 2002.

FISCHER, J. E. **Nutrição Parenteral**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1978.

FRIBERG, L., *et al.*, **Handbook of the Toxicology of Metals**. 2<sup>nd</sup> ed. Amsterdam: Elsevier Science Publishers B.V., 1986.

GHISI, M., *et al.* Avaliação de diferentes formas de introdução de amostra biológica tratada com hidróxido de tetrametilamônio em espectrometria de absorção atômica com chama. **Analytica**, v. 28, p.58-65, 2007.

GONÇALVES, A.M., *et al.* Determination and Fractionation of Barium in Brazil Nuts. **Journal Brazilian Chemical Society**, v. 20, p. 760-769, 2009.

GONZALEZ, M. H. **Identificação de produtos de reação presentes em soluções resultantes de digestões ácidas de amostras agronômicas**. 2007. 88 f. Dissertação (Mestrado em Química) - Universidade de São Paulo - Instituto de Química de São Carlos, 2007.

GREENSTEIN, J.P.; WINITS, M. **Chemistry of the Amino Acid**. Florida: Krieger Publishing Company, 1984.

HANSON, J. Draft. guidelines on quality assurance for pharmacy-prepared sterile products. **American Journal Hospital Pharmacy**, v. 49, p. 407-417, 1992.

HARRIS, D. **Análise Química Quantitativa**, 7. ed., Rio de Janeiro: LTC, 2008.

HARRAKI, B., *et al.* Interactions related to trace elements in parenteral nutrition. **Pharmaceutica Acta Helvetiae**, v. 70, p. 269-278, 1995.

International Program of Chemical Safety. IPCS-INCHEM (ONU, ILO, WHO). **Barium and Barium Compounds**, Concise International Chemical Assessment Document 33, Geneva, 2001. Disponível em <http://www.inchem.org/documents/cicads/cicads/cicad33.htm>. Acessado em 15 de Novembro de 2010.

IUPAC. Compendium of Chemical Terminology. 2 nd ed., 1997.

JEFREY, G. H.; BASSETT, J.; DENNEY, R. C. **Vogel - Análise Química Quantitativa**. 5. ed. Rio de Janeiro: LTC, 1992.

JOURDAN, S., et al. Suicidal poisoning with barium chloride. **Forensic Science International**, v. 119, p. 263-265, 2001.

LEE, J. D. **Química Inorgânica não tão Concisa**, 5. ed., São Paulo: E. Blücher LTDA, 1999.

MANO, E. B., MENDES, L. C. **Introdução a Polímeros**. 2. ed., São Paulo: E. Blücher Ltda., 2004.

Material Safety Data Sheet (MSDS) Anachemia. Disponível em: <http://www.anachemia.com/msds/english/0935.pdf>. Acessado 24 de Abril de 2011.

Material Safety Data Sheet (MSDS) Cleantec. Disponível em: <http://www.cleantec.com.au/product%20information/MSDS/Cleantec/REAGENTS/barium%20chloride%20msds.pdf>. Acessado 24 de Abril 2011.

Material Safety Data Shett (MSDS) Sigma-Aldrich. Disponível em: <http://www.wku.edu/msds/docs/4424.pdf>. Acessado 24 de Abril de 2011.

MATIOLI, G.; VALENTINI, S. R; SOMMER, W. A. Validação de métodos analíticos na quantificação de comprimidos de captopril - comparação de metodologias para um programa de garantia da qualidade. **Acta Scientiarum Health Sci**, v. 16, p. 357-64, 2004.

MOTA, V. T. **Bioquímica Clínica: Princípios e Interpretações, Metabolismo Mineral e ósseo**, 3. ed., Porto Alegre: Médica Missau, 2000.

NBR ISO/IEC 9000:2000 Sistemas de gestão da qualidade - Fundamentos e vocabulário.

OLIVEIRA, E. Sample Preparation for Atomic Spectroscopy: Evolution and Future Trends. **J. Braz. Chem. Soc.**, v. 14, p. 174-182, 2003.

OLIVEIRA, S. R., et al. Aluminum Content in Intravenous Solutions For Administration to Neonates: Role of Product Preparation and Administration Methods. **Journal of Parenteral and Enteral Nutrition**, v. 34, p. 322-328, 2010.

PÉLISSER-ALICOT, et al. A. Fatalpoisoning due to intravasation after oral administration of barium sulfate for contrast radiography. **Forensic Science International**, v. 106, p. 109-113, 1999.

PRISON, J. M. **Avaliação dos efeitos causados por inclusões, solarização e modificadores na transmitância óptica do vidro 40BaO:60P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>**. 2007. 120 f. Tese (Doutorado em Tecnologia Nuclear - Materiais) – Instituto de Pesquisa de Energia Nuclear, São Paulo, 2003.

PURDEY, M. Chronic barium intoxication disrupts sulphated proteoglycan synthesis: a hypothesis for the origins of multiple sclerosis. **Medical Hypothesis**, v. 62, p. 746-754, 2004.

RIBEIRO, D. O. **Influência da Relação Cálcio: Fósforo na Estabilidade Físico-Química de Misturas 3 em 1 para Uso Neonatal**. 2007. 152 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade Federal do rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2007.

SCHWARZENBACH, G. The complexones and their analytical application. **Analyst**, v. 80, p. 995, 1955.

SHELBY, J. E. Introduction to glass science and technology. In: The Royal Society of Chemistry, USA, 1997.

SKOOG, D. A.; WEST, D. M.; HOLLER, F. J. **Fundamentals of Analytical Chemistry**, 7th ed., USA: Souders College Publishing, 1997.

SMITH, R. M.; MARTELL, A. E. NIST. **NIST Standard Reference Database 46**, 2004. Disponível em: [http://www.nist.gov/srd/upload/46\\_8.htm](http://www.nist.gov/srd/upload/46_8.htm). Acessado em 03 de Maio de 2011.

TRISSEL, L.A. **Guia de Bolso para Fármacos Injetáveis**, 14. ed., Porto Alegre: Artmed, 2008.

VOGEL, A. I. **Química Analítica Qualitativa**, 5 ed., São Paulo: Mestre Jou, 1981.

WAITABERG, D. L., **Nutrição Enteral e Parenteral na prática clínica**, 2. ed., Rio de Janeiro: Athenneu, 1995.

YAMASHITA, D. M. Compostos de Borracha, Boletim de tecnologia e Desenvolvimento em embalagem. Informativo do Instituto de Tecnologia de Alimentos (ITAL), v. 21, p.1-9, 2009.

## APÊNDICES

### Apêndice A - Reagentes utilizados

Reagente	Fórmula Molecular	Massa Molecular (g)	Grau de pureza	Fabricante
Ácido Nítrico	HNO <sub>3</sub>	63,0	P.A	Merck
Nitrato de Sódio	NaNO <sub>3</sub>	85,0	P.A	Merck
Arginina	C <sub>6</sub> H <sub>14</sub> N <sub>4</sub> O <sub>2</sub> .HCl	210,67	P.A	Vetec
Gluconato de Cálcio anidro	C <sub>12</sub> H <sub>22</sub> CaO <sub>14</sub>	430,37	P.A	Sigma-Aldrich
Ácido Glutâmico	C <sub>5</sub> H <sub>9</sub> NO <sub>4</sub>	147,13	P.A	Merck
L-Ornitina	C <sub>5</sub> H <sub>12</sub> N <sub>2</sub> O <sub>2</sub> .HCl	168,62	P.A	Aldrich
Ácido Ascórbico	C <sub>6</sub> H <sub>8</sub> O <sub>6</sub>	176,13	P.A	Vetec
Arginina	C <sub>6</sub> H <sub>14</sub> N <sub>4</sub> O <sub>2</sub>	174,19		Vetec
Ácido Aspártico	C <sub>4</sub> H <sub>7</sub> NO <sub>4</sub>	133,10	P.A	Aldrich
EDTA	C <sub>10</sub> H <sub>14</sub> O <sub>8</sub> N <sub>2</sub> Na <sub>2</sub> .H <sub>2</sub> O	372,7	P.A	Fluka
Hidróxido de Tetrabutilamônio	C <sub>4</sub> H <sub>13</sub> NO	91,15	P.A (solução a 25%)	Merck
Cloreto de Bário	BaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	244,28	P.A	Merck
Citrato de Sódio	Na <sub>3</sub> C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> O <sub>7</sub> .	258,03	P.A	Reagen
Ácido Oxálico	(COOH) <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	126,07	P.A	Nuclear
Ureia	CH <sub>4</sub> NO <sub>2</sub>	60,06	P.A	Merck
Ácido Sulfâmico	NH <sub>2</sub> SO <sub>3</sub> H	96,0	P.A	Merck
Peróxido de Hidrogênio	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	34,0	P.A	Vetec
Ácido Fluorídrico	HF	20,0	P.A	Merck
Cloreto de Sódio	NaCl	58,45	P.A	Merck
Cloreto de Potássio	KCl	74,55	P.A	Merck
Cloreto de Cálcio	CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	146,98	P.A	Vetec

### Apêndice B - Composição Bolsas/Buretas

Bolsa/Bureta	Constituinte	Concentração (%)	Volume (mL)
1	Aminoácido Pediátrico	10	60,0
	Água Destilada	-	108,1
	Glicose	50	44,0
	Fósforo Orgânico	-	2,0
	Cloreto de potássio	10	6,0
	Gluconato de Cálcio	10	8,0
	Lipídeos	20	30,0
	Sulfato de Magnésio	50	0,25
	Cloreto de Sódio	20	1,7
2	Aminoácido Pediátrico	10	36,0
	Água Destilada	-	63,06
	Glicose	50	26,0
	Fósforo Orgânico	-	1,0
	Cloreto de potássio	10	2,0
	Gluconato de Cálcio	10	3,0
	Lipídeos	20	18,0
	Oligoelementos Pediátricos	-	0,1
	Vitaminas	-	1,0
3	Aminoácido Pediátrico	10	40,0
	Água Destilada	-	69,4
	Glicose	50	40
	Cloreto de potássio	10	2,7
	Gluconato de Cálcio	10	14,0
	Lipídeos	20	52,6
	Cloreto de Sódio	20	4,1
4	Aminoácido Pediátrico	10	60,0
	Água Destilada	-	92,6
	Glicose	50	48,0
	Fósforo Orgânico	-	2,0
	Oligoelementos Pediátrico	-	0,4
	Vitaminas	-	1,0
	Lipídeos	20	30,0
	Cloreto de Sódio	20	6,0
5	Aminoácido Pediátrico	10	150,0
	Água Destilada	-	293,0
	Glicose	50	130,0
	Vitaminas	-	1,0
	Cloreto de potássio	10	12,0
	Gluconato de Cálcio	10	10,0
	Lipídeos	20	25,0
	Oligoelementos Pediátrico	-	0,3
	Cloreto de Sódio	20	8,0

Bolsa/Bureta	Constituinte	Concentração (%)	Volume (mL)
6	Glicose	5	-
7	Aminoácido Pediátrico	10	60,0
	Água Destilada	-	69,9
	Glicose	50	48,0
	Fósforo Orgânico	-	2,0
	Cloreto de potássio	10	3,0
	Gluconato de Cálcio	10	6,0
	Lipídeos	20	30,0
	Oligoelementos Pediátrico	-	0,1
8	Vitaminas	-	1,0
	Aminoácido Pediátrico	10	60,0
	Água Destilada	-	55,8
	Glicose	50	44,0
	Gluconato de Cálcio	10	8,0
	Lipídeos	20	30,0
	Sulfato de Magnésio	50	0,5
9	Cloreto de Sódio	20	1,7
	Aminoácido Pediátrico	10	108,0
	Água Destilada	-	195,0
	Glicose	50	100,8
	Fósforo Orgânico	-	3,5
	Cloreto de potássio	10	5,3
	Lipídeos	20	54,0
10	Oligoelementos Pediátrico	-	0,3
	Vitaminas	-	1,0
	Aminoácido Pediátrico	10	60,0
	Água Destilada	-	86,9
	Glicose	50	52,0
	Fósforo Orgânico	-	2,0
	Gluconato de Cálcio	10	8,0
11	Lipídeos	20	30,0
	Oligoelementos Pediátrico	-	0,1
	Vitaminas	-	1,0
	Aminoácido Pediátrico	10	40,0
	Água Destilada	-	84,2
	Glicose	50	48,0
	Fósforo Orgânico	-	2,0
11	Cloreto de Sódio	20	0,6
	Gluconato de Cálcio	10	4,0
	Lipídeos	20	20,0
	Oligoelementos Pediátrico	-	0,2
	Vitaminas	-	1,0



Bolsa/Bureta	Constituinte	Concentração (%)	Volume (mL)
12	Aminoácido Pediátrico	10	20,0
	Água Destilada	-	134,0
	Glicose	50	28,0
	Gluconato de Cálcio	10	8,0
	Lipídeos	20	10,0
13	Aminoácido Pediátrico	10	105,0
	Água Destilada	-	248,0
	Glicose	50	28,0
	Fósforo Orgânico	-	3,5
	Sulfato de Magnésio	50	1,2
	Cloreto de potássio	10	5,2
	Gluconato de Cálcio	10	4,0
	Lipídeos	20	53,0
	Oligoelementos Pediátrico	-	0,3
	Vitaminas	-	1,0
14	Aminoácido Pediátrico	10	60,0
	Água Destilada	-	58,9
	Glicose	50	48,0
	Fósforo Orgânico	-	2,0
	Cloreto de potássio	10	6,0
	Gluconato de Cálcio	10	4,0
	Lipídeos	20	30,0
	Oligoelementos Pediátrico	-	0,1
	Vitaminas	-	1,0
15	Aminoácido Pediátrico	10	100,0
	Água Destilada	-	138,4
	Glicose	50	96,0
	Cloreto de Sódio	20	4,0
	Gluconato de Cálcio	10	12,0
	Lipídeos	20	50,0
16	Aminoácido Pediátrico	10	40,0
	Água Destilada	-	80,8
	Glicose	50	48,0
	Fósforo Orgânico	-	2,0
	Cloreto de Sódio	20	1,1
	Cloreto de potássio	10	3,0
	Gluconato de Cálcio	10	4,0
	Lipídeos	20	20,0
	Oligoelementos Pediátrico	-	0,1
	Vitaminas	-	1,0

Bolsa/Bureta	Constituinte	Concentração (%)	Volume (mL)
17	Aminoácido Pediátrico	10	60,0
	Água Destilada	-	96,6
	Glicose	50	68,0
	Fósforo Orgânico	-	5,0
	Sulfato de Magnésio	50	0,7
	Gluconato de Cálcio	10	20,0
	Lipídeos	20	30,0
18	Aminoácido Pediátrico	10	60,0
	Água Destilada	-	67,5
	Glicose	50	56,0
	Fósforo Orgânico	-	2,0
	Sulfato de Magnésio	50	0,5
	Cloreto de potássio	10	6,0
	Gluconato de Cálcio	10	8,0
Lipídeos	20	30,0	
19	Aminoácido Pediátrico	10	20,0
	Água Destilada	-	215,9
	Glicose	50	44,0
	Fósforo Orgânico	-	2,0
	Cloreto de potássio	10	3,0
	Gluconato de Cálcio	10	4,0
	Lipídeos	20	10,0
	Oligoelementos Pediátrico	-	0,1
	Vitaminas	-	1,0
20	Aminoácido Pediátrico	10	60,0
	Água Destilada	-	101,3
	Glicose	50	48,0
	Fósforo Orgânico	-	2,0
	Cloreto de Sódio	20	0,6
	Cloreto de potássio	10	3,0
	Gluconato de Cálcio	10	4,0
	Lipídeos	20	30,0
	Oligoelementos Pediátrico	-	0,1
Vitaminas	-	1,0	
21	Aminoácido Pediátrico	10	80,0
	Água Destilada	-	115,0
	Glicose	50	68,0
	Fósforo Orgânico	-	2,5
	Cloreto de potássio	10	4,0
	Lipídeos	20	40,0
	Oligoelementos Pediátrico	-	0,3
	Vitaminas	-	1,0

Bolsa/Bureta	Constituinte	Concentração (%)	Volume (mL)
22	Sulfato de Magnésio	50	60,0
	Cloreto de Sódio	20	113,0
	Glicose	50	48,0
	Fósforo Orgânico	-	2,0
	Cloreto de potássio	10	3,0
	Gluconato de Cálcio	10	4,0
	Lipídeos	20	30,0
23	Glicose	10%	-
24	Aminoácido Pediátrico	10	60,0
	Água Destilada	-	104,8
	Glicose	50	56,0
	Fósforo Orgânico	-	2,0
	Cloreto de potássio	10	3,0
	Gluconato de Cálcio	10	4,0
	Lipídeos	20	30,0
	Sulfato de Magnésio	50	0,25
25	Aminoácido Pediátrico	10	70,0
	Água Destilada	-	261,0
	Glicose	50	63,0
	Fósforo Orgânico	-	3,5
	Cloreto de potássio	10	6,3
	Gluconato de Cálcio	10	14,0
	Lipídeos	20	35,0
	Sulfato de Magnésio	50	0,4
	Cloreto de Sódio	20	2,0
	Oligoelementos Pediátricos	-	0,7
26	Aminoácido Pediátrico	10	105,0
	Água Destilada	-	101,0
	Glicose	50	70,0
	Cloreto de potássio	10	2,7
	Gluconato de Cálcio	10	14,0
	Lipídeos	20	52,6
	Cloreto de Sódio	20	4,1
27	Aminoácido Pediátrico	10	40,0
	Água Destilada	-	97,2
	Glicose	50	32,0
	Gluconato de Cálcio	10	8,0
	Lipídeos	20	20,0
	Oligoelementos Pediátrico	50	0,1
	Cloreto de Sódio	20	1,7
	Vitaminas		1,0

Bolsa/Bureta	Constituinte	Concentração (%)	Volume (mL)
28	Aminoácido Pediátrico	10	60,0
	Água Destilada	-	83,4
	Glicose	50	56,0
	Fósforo Orgânico	-	2,0
	Cloreto de potássio	10	3,0
	Gluconato de Cálcio	10	4,0
	Lipídeos	20	30,0
	Sulfato de Magnésio	50	0,5
	Oligoelementos Pediátrico		0,1
	Vitaminas		1,0
29	Aminoácido Pediátrico	10	96,0
	Água Destilada	-	208,0
	Glicose	50	106,0
	Cloreto de potássio	10	7,1
	Gluconato de Cálcio	10	9,6
	Lipídeos	20	48,0
	Cloreto de Sódio	20	4,2
	Oligoelementos Pediátrico	-	0,2
	Vitaminas	-	1,0
30	Aminoácido Pediátrico	10	60,0
	Água Destilada	-	71,4
	Glicose	50	44,0
	Fósforo Orgânico	-	2,0
	Sulfato de Magnésio	50	0,5
	Cloreto de potássio	10	3,0
	Gluconato de Cálcio	10	8,0
	Lipídeos	20	30,0
	Oligoelementos Pediátrico	-	0,1
	Vitaminas	-	1,0
31	Aminoácido Pediátrico	10	40,0
	Água Destilada	-	217,0
	Glicose	50	90,0
	Fósforo Orgânico	-	4,0
	Sulfato de Magnésio	50	0,6
	Cloreto de Sódio	20	1,0
	Cloreto de potássio	10	6,0
	Gluconato de Cálcio	10	10,0
	Lipídeos	20	20,0
	Oligoelementos Pediátrico	-	0,2
	Vitaminas	-	1,0

Bolsa/Bureta	Constituinte	Concentração (%)	Volume (mL)
32	Aminoácido Pediátrico	10	64,0
	Água Destilada	-	46,7
	Glicose	50	38,0
	Sulfato de Magnésio	50	0,4
	Cloreto de Sódio	20	1,9
	Cloreto de potássio	10	2,3
	Gluconato de Cálcio	10	6,4
	Lipídeos	20	32,0
	Oligoelementos Pediátrico	-	0,3
	Vitaminas	-	1,0
	33	Glicose	10
34	Aminoácido Pediátrico	10	40,0
	Água Destilada	-	66,7
	Glicose	50	56,0
	Fósforo Orgânico	-	7,0
	Cloreto de potássio	10	3,0
	Gluconato de Cálcio	10	6,0
	Lipídeos	20	20,0
	Oligoelementos Pediátrico	-	0,3
	Vitaminas	-	1,0
35	Aminoácido Pediátrico	10	72,0
	Água Destilada	-	110,0
	Glicose	50	70,0
	Fósforo Orgânico	-	2,5
	Cloreto de potássio	10	3,5
	Gluconato de Cálcio	10	5,0
	Lipídeos	20	30,0
	Oligoelementos Pediátrico	-	0,2
	Vitaminas	-	1,0
36	Aminoácido Pediátrico	10	20,0
	Água Destilada	-	26,1
	Glicose	50	28,0
	Fósforo Orgânico	-	1,0
	Cloreto de potássio	10	1,5
	Gluconato de Cálcio	10	2,0
	Lipídeos	20	10,0
	Oligoelementos Pediátrico	-	0,4
	Vitaminas	-	1,0