

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

**CONTAMINANTES METÁLICOS EM CONTRASTES  
A BASE DE QUELATOS DE GADOLÍNIO E REAÇÕES  
DE TRANSMETALAÇÃO**

**TESE DE DOUTORADO**

**Marlei Veiga dos Santos**

**Santa Maria, RS, Brasil**

**2013**

**CONTAMINANTES METÁLICOS EM CONTRASTES A BASE  
DE QUELATOS DE GADOLÍNIO E REAÇÕES DE  
TRANSMETALAÇÃO**

**Marlei Veiga dos Santos**

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), como requisito parcial para obtenção do grau de **Doutora em Química.**

**Orientadora: Profa. Dra. Denise Bohrer do Nascimento**

**Santa Maria, RS, Brasil**

**2013**

**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

**CONTAMINANTES METÁLICOS EM CONTRASTES A BASE DE  
QUELATOS DE GADOLÍNIO E REAÇÕES DE TRANSMETALAÇÃO**

elaborada por  
**Marlei Veiga dos Santos**

como requisito parcial para a obtenção do grau de  
**Doutora em Química**

**COMISSÃO EXAMINADORA:**

**Profa. Dra. Denise Bohrer do Nascimento**  
(Presidente/Orientadora)

**Profa. Dra. Cristiane Luisa Jost (UFSC)**

**Profa. Dra. Maria Goreti Rodrigues Vale (UFRGS)**

**Profa. Dra. Clarice Madalena Bueno Rolim (UFSM)**

**Profa. Dra. Carine Viana Silva (UFSM)**

Santa Maria, 18 de outubro de 2013.

Dedico este trabalho

Aos meus pais, Claci e Valdir, pelas palavras de apoio, pelos sorrisos, pela preocupação, pelas lágrimas de saudade derramadas.

Aos meus irmãos, Márcia e Marcos, pelo incentivo e carinho.

Ao meu namorado, Fábio, pela compreensão em todos os momentos.

## Agradeço

À minha orientadora, Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Denise Bohrer do Nascimento, pela amizade, consideração, confiança e orientação durante todos os anos de convivência, desde a iniciação científica até a conclusão deste trabalho de doutorado.

## AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Paulo Cícero do Nascimento, por todos os ensinamentos, que se estendem da época da graduação, até os dias atuais.

Aos professores Leandro Machado de Carvalho e Marcelo Barcellos da Rosa, pelos esclarecimentos de dúvidas e convivência harmoniosa.

Às professoras Carine Viana Silva, Clarice Madalena Bueno Rolim, Cristiane Luisa Jost e Maria Goreti Rodrigues Vale, que se dispuseram a ler este trabalho e a participar da minha banca de defesa.

Aos colegas de laboratório, Vanessa Mörschbacher, Cristiane L. Jost, Simone Noremburg, Denise Bertagnolli, Raquel Stefanello, Carine V. Silva, Cláudia Carvalho, Adrian Ramirez e Maurício Hilgemann. A cada defesa, a partida de um grande amigo.

Aos demais colegas de laboratório, com muito carinho, pela amizade, pelos momentos de descontração, por tornarem os meus dias mais felizes. Em especial, Alexandre Schneider, Fábio Vieira da Silva Junior, Sandra Ribeiro, Diana Muratt, Carla Santanna, Larissa Sabo, Luís Claussen e Luis Ferraz, pela convivência mais próxima, pelos conselhos, pelas conversas, pela ajuda oferecida em diversos momentos, enfim, pela amizade.

À minha IC, Patrícia Mattiazzi, pela ajuda durante a realização deste trabalho, pelos bons e maus momentos que passamos juntas, caminhando ao seu lado a jornada pareceu mais leve.

À Luciana Gobo, que nunca foi minha IC, mas sempre achou que fosse, pela amizade, pelo companheirismo e pela disposição em ajudar.

À Cristiane L. Jost, por me receber em sua casa em Florianópolis e, principalmente, por todos os conselhos, pelas longas conversas, enfim, pelo grande carinho e amizade.

Ao Lucas Bressan e à Débora Monego, pela ajuda em algumas medidas.

Ao amigo e colega Henrique Faccin, pela formatação final deste texto.

À Carmen Rohr, pela revisão do português.

Às professoras Márcia S. Ferraz e Marília Boessio, pela constante disposição em ajudar, pelas muitas conversas, risadas e pelos conselhos.

Aos meus pais, pelo constante incentivo, pelos conselhos, pelas preocupações, por serem os alicerces das minhas conquistas.

Aos meus irmãos, pela certeza de ter com quem contar.

À Capes, pelo suporte financeiro.

“São os passos que fazem os caminhos”

Mário Quintana

## **RESUMO**

Tese de Doutorado

Programa de Pós-Graduação em Química

Universidade Federal de Santa Maria

### **CONTAMINANTES METÁLICOS EM CONTRASTES A BASE DE QUELATOS DE GADOLÍNIO E REAÇÕES DE TRANSMETALAÇÃO**

Autora: Marlei Veiga dos Santos

Orientadora: Profa. Dra. Denise Bohrer do Nascimento

Santa Maria, 18 de outubro de 2013.

O gadolínio (Gd) é a base do meio de contraste mais utilizado em ressonância magnética (RM). Por se tratar de um íon metálico muito tóxico, todos os meios de contraste com Gd possuem agentes quelantes em sua composição. As formulações de Gd estão comercialmente disponíveis em concentrações de 0,5 e 1 mol L<sup>-1</sup>, sendo estas, quase exclusivamente, excretadas por via renal, sem produzir efeitos tóxicos. Porém, em 2006, dois grupos europeus independentes sugeriram uma relação entre a administração de complexos gadolínicos e a ocorrência de fibrose sistêmica nefrogênica (FSN) em pacientes com insuficiência renal. A FSN é uma doença grave, atribuída a reações de transmetalção do Gd de seus complexos por metais endógenos. Neste trabalho, utilizaram-se técnicas de espectrometria de absorção atômica, espectrometria de massa com plasma indutivamente acoplado e cromatografia líquida com detector de massa para investigar metais presentes como impurezas e/ou contaminantes em cinco formulações de contrastes a base de Gd e suas reações de transmetalção. Os resultados encontrados mostraram que outros metais, além do Gd, estão presentes nas formulações, os elementos terras-raras (Sc, Y, La, Ce, Pr, Nd, Eu, Tb, Dy, Ho, Er e Tm) e elementos como Al, As e Pb, sabidamente tóxicos para o ser humano. Para verificar a transmetalção, o complexo Gd-DTPA (Gadopentetato dimeglumina) foi utilizado como modelo e verificou-se que, praticamente, todos os elementos presentes como contaminantes nas formulações substituíram o Gd no complexo, ou seja, mesmo a presença de metais endógenos como Cu e Fe, que não apresentariam potencial toxicológico podem, através da transmetalção, levar à presença de Gd<sup>3+</sup> livre.

Palavras-Chave: Contrastes a base de gadolínio, elementos terras-raras, transmetalção.

## **ABSTRACT**

Doctoral Thesis

Post-Graduate Program in Chemistry

Federal University of Santa Maria

### **METAL CONTAMINANTS IN CONTRAST OF GADOLINIUM CHELATES AND TRANSMETALATION REACTIONS**

Author: Marlei Veiga dos Santos

Advisor: Profa. Dra. Denise Bohrer do Nascimento

Santa Maria, October 18<sup>th</sup>, 2013

Gadolinium (Gd) is the basis of contrast media most used in magnetic resonance imaging (MRI). Because it is a very toxic metal ion, all Gd-based contrast media present chelating agents in their composition. Gd-based formulations are commercially available in concentrations of 1 and 0.5 mol L<sup>-1</sup>, which are almost exclusively excreted by the kidneys without producing toxic effects. In 2006, however, two European groups independently suggested a link between the administration of gadolinium chelates and the occurrence of nephrogenic systemic fibrosis (NSF) in patients with renal insufficiency. NSF is a serious disease, which origin is attributed to transmetalation reactions between Gd and endogenous metals. In this work, we used the techniques atomic absorption spectrometry, mass spectrometry with inductively coupled plasma and liquid chromatography with mass detector to investigate metals present as impurities and / or contaminants in five Gd-based contrast formulations and their possible transmetalation reactions. The results showed that several metals are present in the formulations, the rare earth elements (Sc, Y, La, Ce, Pr, Nd, Eu, Tb, Dy, Ho, Er and Tm) and others such as Al, As and Pb, notoriously toxic to humans. To evaluate transmetallation reactions the Gd-DTPA complex (gadopentetate dimeglumine) was used as template model. It was found that practically all elements present as contaminants in the formulation are able to replace Gd in the complex. Even endogenous metals such as Cu and Fe, which do not present any toxicological potential, may cause , due to transmetallation reations, free Gd<sup>3+</sup> to be formed.

Keywords: Contrasts to gadolinium, rare earth elements, transmetalation.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Agentes de contraste clinicamente utilizados. Apenas as partes que contêm Gd são mostradas em vez de uma fórmula química completa; moléculas de água coordenadas (1 em todos os casos) foram omitidas para maior clareza (HERMANN et al., 2008).....	24
Figura 2 - Processo Rhône-Poulenc de extração líquido-líquido para a separação de ETR. (McGILL; MATHEY, 1993). .....	27
Figura 3 - Constantes de estabilidade K para alguns quelatos de terras-raras (McGILL; MATHEY, 1993). .....	34
Figura 4 - Concentração estimada de Gd livre liberado dos complexos de Gd de diferentes estabilidades termodinâmicas e cinéticas, supondo mecanismo de primeira ordem (IDEÉ et al., 2008). .....	42
Figura 5 - Descomplexação cinética em pH 1,2, 37 °C, para agentes de contraste macrocíclicos a base de Gd comercializados: percentual do complexo versus tempo (PORT et al., 2008). .....	42
Figura 6 - Parâmetros que influenciam a relaxatividade das moléculas de água (RAYMOND; PIERRE, 2005). .....	43
Figura 7 - Preparo das amostras pelo procedimento 1.....	57
Figura 8 - Preparo das amostras pelo procedimento 2.....	57
Figura 9 – Preparo das amostras pelo procedimento 3.....	58
Figura 10 - Determinação de ETR em contrastes a base de quelatos de Gd usando a técnica de ICP-MS. a) Er, b) Ho, c) Ce, d) Sc, e) Dy, f) Pr, g) Ne, h)Y, i) Tm, j) La, k) Eu, l) Tb (n=3). .....	75
Figura 11 - Curvas de pirólise e atomização para Sm (amostra Dotarem® fortificada e digerida na mufla, Sm = 500 pg). Temperatura de atomização para a curva de pirólise: 2500 °C, temperatura de pirólise para a curva de atomização: 1700 °C. Modificadores: (1) permanente ZrCl <sub>4</sub> (0,5 mg) ; (2) Pd (NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> (10 µg) e CaCl <sub>2</sub> (50µg).....	77
Figura 12 - Curvas de pirólise e atomização para Yb (amostra Dotarem® fortificada e digerida na mufla, Yb = 200pg). Temperatura de atomização para a curva de pirólise: 2500 °C, temperatura de pirólise para a curva de atomização: 1300 °C. Modificadores: (1) permanete ZrCl <sub>4</sub> (0,5 mg) ; (2) Pd (NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> (10 µg) e CaCl <sub>2</sub> (50µg).....	77
Figura 13 - Curvas de pirólise e atomização para Lu (amostra Dotarem® fortificada e digerida na mufla, Lu = 1000 pg). Temperatura de atomização para a curva de pirólise: 2500 °C,	

temperatura de pirólise para a curva de atomização: 1400 °C. Modificadores: (1) permanente ZrCl <sub>4</sub> (0,5 mg) ; (2) Pd (NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> (10 µg) e CaCl <sub>2</sub> (50µg).....	77
Figura 14 - Curvas de pirólise e atomização para Al (amostra Dotarem® fortificada e digerida na mufla, Al= 500 pg). Temperatura de atomização para a curva de pirólise: 2500 °C, temperatura de pirólise para a curva de atomização: 1500 °C. Modificador permanente ZrCl <sub>4</sub> (0,5 mg). .....	80
Figura 15 - Curvas de pirólise e atomização para Si (amostra Dotarem® fortificada e digerida na mufla, Si= 5000 pg.). Temperatura de atomização para a curva de pirólise: 2500 °C, temperatura de pirólise para a curva de atomização: 1200 °C. Modificadores: (1) permanente ZrCl <sub>4</sub> (0,5 mg) ; (2) Pd (NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> (10 µg). .....	81
Figura 16 - Curvas de pirólise e atomização para Cr (amostra Dotarem® fortificada e digerida na mufla, Cr= 500 pg). Temperatura de atomização para a curva de pirólise: 2450 °C, temperatura de pirólise para a curva de atomização: 1100 °C. Modificador permanente: ZrCl <sub>4</sub> (0,5 mg). .....	81
Figura 17 - Curvas de pirólise e atomização para Fe (amostra Dotarem® fortificada e digerida na mufla, Fe=1000 pg). Temperatura de atomização para a curva de pirólise: 2500 °C, temperatura de pirólise para a curva de atomização: 1300 °C. Modificadores: (1) permanente ZrCl <sub>4</sub> (0,5 mg) ; (2) Mg (NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> (10 µg). .....	82
Figura 18 - Curvas de pirólise e atomização para Cu (amostra Dotarem® fortificada e digerida na mufla, Cu= 500 pg). Temperatura de atomização para a curva de pirólise: 2450 °C, temperatura de pirólise para a curva de atomização: 1100 °C. Modificador permanente: ZrCl <sub>4</sub> (0,5 mg). .....	82
Figura 19 - Curvas de pirólise e atomização para Zn (amostra Dotarem® fortificada e digerida na mufla, Zn= 500 pg). Temperatura de atomização para a curva de pirólise: 1800 °C, temperatura de pirólise para a curva de atomização: 900 °C. Modificadores: (1) permanente ZrCl <sub>4</sub> (0,5 mg) ; (2) Mg (NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> (10 µg). .....	83
Figura 20 - Sinais de absorvância do bário para amostra adicionada de 25 µg L <sup>-1</sup> . (a) Com o uso do modificador químico CaCl <sub>2</sub> 1%, (b) Sem o modificador. ....	84
Figura 21 - Curvas de pirólise e atomização para Ba (amostra Dotarem® fortificada e digerida na mufla, Ba= 500 pg). Temperatura de atomização para a curva de pirólise: 2500 °C, temperatura de pirólise para a curva de atomização: 1150 °C. Modificadores: (1) permanente ZrCl <sub>4</sub> (0,5 mg) ; (2) CaCl <sub>2</sub> (50µg). .....	84
Figura 22 - Curvas de pirólise e atomização para Pb (amostra Dotarem® fortificada e digerida na mufla, Pb = 500 pg). Temperatura de atomização para a curva de pirólise: 1800 °C,	

temperatura de pirólise para a curva de atomização: 900 °C. Modificador permanente: ZrCl <sub>4</sub> (0,5 mg).....	85
Figura 23 – Teores de metais presentes como contaminantes em amostras de contrastes a base de gadolínio, análise realizada por GF AAS. a) Pb, b) Ba, c) Zn, d) Fe, e) Cr, f) Cu, g) Al, h) Si.....	89
Figura 24 – Teor de Ba determinado nos contrastes a base de quelatos Gd, considerando o contato da solução com a tampa de borracha por um período de seis meses (n=3). .....	91
Figura 25 – Teor de Zn determinado nos contrastes a base de quelatos Gd, considerando o contato da solução com a tampa de borracha por um período de seis meses (n=3). .....	91
Figura 26 – Teor de Al determinado nos contrastes a base de quelatos Gd, considerando o contato da solução com a tampa de borracha por um período de seis meses (n=3). .....	92
Figura 27 – Teor de arsênio presente como contaminante nas amostras de contraste a base de Gd, análise realizada por HG AAS.....	94
Figura 28 – Teor de Cálcio presente nas amostras de contraste a base de Gd, análise realizada por F AAS.....	95
Figura 29 - Influência da concentração e do tempo na reação de transmetalção entre La e Gd no complexo Gd-DTPA.....	99
Figura 30 - Influência da concentração e do tempo na reação de transmetalção entre Nd e Gd no complexo Gd-DTPA.....	100
Figura 31 - Influência da concentração e do tempo na reação de transmetalção entre Sm e Gd no complexo Gd-DTPA.....	100
Figura 32 - Influência da concentração e do tempo na reação de transmetalção entre Eu e Gd no complexo Gd-DTPA.....	101
Figura 33 - Influência da concentração e do tempo na reação de transmetalção entre Tb e Gd no complexo Gd-DTPA.....	101
Figura 34 - Influência da concentração e do tempo na reação de transmetalção entre Dy e Gd no complexo Gd-DTPA.....	102
Figura 35 - Influência da concentração e do tempo na reação de transmetalção entre Ho e Gd no complexo Gd-DTPA.....	103
Figura 36 - Influência da concentração e do tempo na reação de transmetalção entre Tm e Gd no complexo Gd-DTPA.....	103
Figura 37 - Influência da concentração e do tempo na reação de transmetalção entre Yb e Gd no complexo Gd-DTPA.....	104

Figura 38 - Influência da concentração e do tempo na reação de transmetalção entre Lu e Gd no complexo Gd-DTPA. ....	104
Figura 39 - Comparativo da transmetalção do Gd pelos outros lantanídeos. Soluções onde a concentração de Gd é o dobro da concentração de Ln. ....	105
Figura 40 - Comparativo da transmetalção do Gd pelos outros lantanídeos. Soluções onde a concentração de Gd é igual à concentração de Ln. ....	106
Figura 41 - Comparativo da transmetalção do Gd pelos outros lantanídeos. Soluções onde a concentração de Gd é a metade da concentração de Ln. ....	106
Figura 42 - Comparativo da transmetalção do Gd por Ca, Fe, Cu e Zn. Soluções em que a concentração de Gd é o dobro da concentração dos outros elementos (1: 0,5), em que as concentrações são semelhantes (1:1) e onde a concentração do Gd é a metade (1:2). ....	107
Figura 43 - Comparativo da transmetalção do Gd por Al, Si, Cr, As, Ba e Pb. Soluções em que a concentração de Gd é o dobro da concentração dos outros elementos (1:0,5), em que as concentrações são semelhantes (1:1) e onde a concentração do Gd é a metade (1:2)...	108
Figura 44 - Comparativo em termos percentuais de cada ETR nos diferentes lotes do contraste Omniscan®. ....	110
Figura 45 - Comparativo em termos percentuais de cada ETR nos diferentes lotes do contraste Gadovist®. ....	111
Figura 46 - Comparativo em termos percentuais de cada ETR nos diferentes lotes do contraste Magnevistan®. ....	111
Figura 47 - Comparativo em termos percentuais de cada ETR nos diferentes lotes do contraste Dotarem®. ....	111
Figura 48 - Comparativo em termos percentuais de cada ETR nos diferentes lotes dos contrastes OptiMARK® e Viewgam®. ....	112
Figura 49 - Constantes de estabilidade termodinâmica de complexos formados com o ligante DTPA (IUPAC, 2005). ....	115
Figura 50 - Equação química do Gd-DTPA e possíveis produtos de transmetalção com íons endógenos (KÜNNEMEYER et al., 2009). ....	119

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Características gerais dos quelatos de Gd atualmente disponíveis comercialmente para RM. ....	25
Tabela 2 - Percentual de lantanídeos, ítrio e tório dos principais minerais. ....	26
Tabela 3 - Impurezas em óxido de gadolínio utilizado para produzir os meios de contraste fornecidos por diferentes empresas. ....	28
Tabela 4 - Algumas características dos quelatos de gadolínio disponíveis comercialmente: peso molecular, componentes da formulação, dosagem usual, LD50, quantidade calculada de Gd-quelato e de Gd livre considerando a maior dose de cada contraste para um paciente adulto (70 kg). ....	30
Tabela 5 - Quantidade de outros ETR presentes como impurezas em uma dose de cada contraste para um paciente adulto (70 Kg), assumindo os níveis de impurezas presentes no certificado de análise do óxido de gadolínio de empresas diferentes (Tabela 3). ....	31
Tabela 6 - Quantidade de impurezas (que não são ETR) considerando uma dose de cada contraste para um paciente adulto (70 kg), assumindo os níveis de impurezas presentes no certificado de análise de óxido de gadolínio originado de diferentes companhias (Tabela 3) ....	32
Tabela 7 - Limites para impurezas em alguns agentes de contraste a base de Gd. ....	35
Tabela 8 - Características físico-químicas dos contrastes para RM disponíveis comercialmente. ....	37
Tabela 9 - Valores de meia-vida ( $t_{1/2}$ ) de dissociação para complexos macrocíclicos de Gd. ....	40
Tabela 10 - Constantes de estabilidade termodinâmica e constante de estabilidade condicional para Gd e outros metais selecionados. ....	43
Tabela 11 - Pesos atômicos e configurações eletrônicas dos elementos terras-raras. ....	45
Tabela 12 - Possíveis interferentes na determinação de lantanídeos por ICP-MS. ....	49
Tabela 13 - Amostras utilizadas. ....	55
Tabela 14 - Amostras sintéticas para o estudo da transmetalção. ....	59
Tabela 15 - Determinação das espécies metálicas totais por titulação complexométrica das amostras de contraste Omniscan®, Magnevistan® e Gadovist® e de uma solução padrão de Gd. ....	66
Tabela 16 - Elementos selecionados para o estudo. ....	67

Tabela 17 - Faixa de concentração linear, e parâmetros da curva de calibração para determinação de metais em amostras de contraste por ICP-MS.....	68
Tabela 18 - Ensaio de recuperação na amostra OptiMARK® (Lote: X066A) fortificada com padrão multielementar de ETR na concentração de 5 µg L <sup>-1</sup> .....	70
Tabela 19 - Ensaio de recuperação na amostra Dotarem® (Lote: 10GD325B) fortificada com padrão multielementar de ETR na concentração de 5 µg L <sup>-1</sup> .....	70
Tabela 20 - Curvas de calibração e parâmetros de regressão para determinação de Yb, Sm e Lu em amostras de contraste por HR-CS AAS.....	78
Tabela 21 - Curvas de calibração e parâmetros de regressão para a determinação de metais em amostra de contraste a base de quelatos de Gd por GF AAS. ....	85
Tabela 22 - Total de impurezas e/ou contaminantes determinados em contrastes a base de Gd. ....	97
Tabela 23 - Reagentes utilizados. ....	134
Tabela 24 - Condições operacionais e parâmetros instrumentais do ICP-MS. ....	137
Tabela 25 - Parâmetros instrumentais para o recobrimento do forno de grafite com Zr.....	138
Tabela 26 - Parâmetros de operação do equipamento HR-CSAAS e programa de temperatura para a determinação de Sm. ....	138
Tabela 27 - Parâmetros de operação do equipamento HR-CSAAS e programa de temperatura para a determinação de Yb.....	139
Tabela 28 - Parâmetros de operação do equipamento HR-CSAAS e programa de temperatura para a determinação de Lu. ....	139
Tabela 29 - Parâmetros de operação do equipamento GF AAS e programa de temperatura para a determinação de Zn. ....	140
Tabela 30 - Parâmetros de operação do equipamento GF AAS e programa de temperatura para a determinação de Cu.....	141
Tabela 31 - Parâmetros de operação do equipamento GF AAS e programa de temperatura para a determinação de Fe. ....	141
Tabela 32 - Parâmetros de operação do equipamento GF AAS e programa de temperatura para a determinação de Al. ....	142
Tabela 33 - Parâmetros de operação do equipamento GF AAS e programa de temperatura para a determinação de Cr. ....	142
Tabela 34 - Parâmetros de operação do equipamento GF AAS e programa de temperatura para a determinação de Pb. ....	143

Tabela 35 - Parâmetros de operação do equipamento GF AAS e programa de temperatura para a determinação de Ba. ....	143
Tabela 36 - Parâmetros de operação do equipamento GF AAS e programa de temperatura para a determinação de Si. ....	144
Tabela 37 - Parâmetros de operação do equipamento HG AAS para a determinação de As. ....	145
Tabela 38 - Condições da fonte ESI para a análise do complexo Gd-DTPA.....	146

## LISTA DE APÊNDICES

APÊNDICE A .....	134
APÊNDICE B.....	137
APÊNDICE C .....	138
APÊNDICE D .....	140
APÊNDICE E.....	145
APÊNDICE F.....	146

## LISTA DE ABREVIATURAS

AAS - Espectrometria de Absorção Atômica  
DTPA - Ácido Dietileno Triamino Pentacético  
EDTA - Ácido Etilenodiamino Tetra-acético  
ESI - Ionização por Electrospray  
ETR - Elementos Terras-Raras  
F AAS - Espectrometria de Absorção Atômica com Chama  
FDA - *Food and Drug Administration*  
FSN - Fibrose Sistêmica Nefrogênica  
Gd-BOPTA - Gadobenato dimeglumina (Multihance®)  
Gd-BT-DO3A - Gadobutrol (Gadovist®/ Gad)  
Gd-DOTA - Gadoterato meglumina (Dotarem®/ Dot)  
Gd-DTPA BEMA - Gadoversetamida (OptiMARK®/ Opt)  
Gd-DTPA BMA - Gadodiamida (Omniscan®/ Omn)  
Gd-DTPA - Gadopentetato dimeglumina (Magnevistan®/Mag) e (Viewgam®/ Vie)  
Gd-EOB DTPA - Ácido Gadoxetic sal dissódico (Primovist®/Eovist®)  
Gd-HP-DO3A - Gadoteridol (ProHance®)  
AAS- Espectrometria de Absorção Atômica  
GF AAS - Espectrometria de Absorção Atômica com Forno de Grafite  
HG AAS - Espectrometria de Absorção Atômica com Geração de Hidretos  
HR-CS AAS - Espectrometria de Absorção Atômica de Alta Resolução com Fonte Contínua  
ICP-MS - Espectrometria de Massas com Plasma Indutivamente Acoplado  
IRM - Imagem por Ressonância Magnética  
Kcond - Constante de Estabilidade Condicional  
Ktherm - Constante de Estabilidade Termodinâmica  
Ksel - Constante de seletividade  
LC-MS - Cromatografia Líquida com detector de Massas  
LD – Limite de detecção  
LD50 - Dose Letal Mediana  
Ln- lantanídeos  
 $m/z$  - Razão massa/carga  
MS325 - Gadofosveset Trisódio (Vasovist®)

RM - Ressonância Magnética

USP - *The United States Pharmacopeia*

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	20
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	22
2.1 Relação entre ressonância magnética e fibrose sistêmica nefrogênica.....	22
2.2 O uso do gadolínio nos contrastes.....	23
2.2.1 Óxido de Gadolínio.....	25
2.2.2 Relação entre estrutura química e estabilidade dos complexos de Gd.....	36
2.2.3 Constante de estabilidade termodinâmica.....	38
2.2.4 Estabilidade associada à cinética de descomplexação e transmetalção.....	39
2.3 Elementos terras-raras (ETR).....	44
2.3.1 Determinação de Elementos Terras Raras (ETR).....	46
3 OBJETIVOS.....	50
3.1 Objetivos gerais.....	50
3.2 Objetivos específicos.....	50
3.3 Questões a serem respondidas com este estudo.....	50
4 MATERIAIS E MÉTODOS.....	51
4.1 Instrumentação.....	51
4.2 Reagentes.....	53
4.3 Soluções.....	53
4.4 Controle de contaminação.....	54
4.5 Amostras.....	55
4.5.1 Preparo das amostras.....	56
4.6 Avaliação das condições instrumentais.....	60
4.6.1 Determinação dos ETR por ICP-MS.....	60
4.6.2 Determinação de Sm, Yb e Lu por HR-CSAAS.....	61
4.6.4 Determinação de As por HG AAS.....	63
4.6.5 Determinação de Ca por F AAS.....	63

5 RESULTADOS .....	65
5.1 Determinação de metais por titulação de retorno .....	65
5.2 Determinação de metais por ICP-MS .....	66
5.2.1 Otimização dos parâmetros instrumentais para determinação de ETR por ICP-MS .....	67
5.2.2 Preparo das amostras para determinação de ETR por ICP-MS.....	69
5.3 Determinação de Sm, Yb e Lu por espectrometria de absorção atômica de alta resolução com fonte contínua (HR-CS AAS).....	75
5.4 Determinação de Al, Si, Ca, Cr, Fe, Cu, Zn, As, Ba e Pb por técnicas de espectrometria de absorção atômica.....	79
5.4.1 Determinação de metais em contrastes a base de quelatos de Gd por GF AAS.....	79
5.4.2 Determinação de As nos contrastes por HG AAS .....	93
5.4.3 Determinação de Ca nos contrastes por F AAS .....	95
5.5 Considerações sobre o total de contaminantes nos contrastes a base de Gd.....	96
5.6 Investigação da transmetalção do Gd do complexo Gd-DTPA por LC-MS .....	98
6 DISCUSSÃO DOS RESULTADOS .....	109
6.1 Contaminantes: ETR nos contrastes a base de quelatos de Gd .....	110
6.2 Contaminantes: Outros elementos nos contrastes a base de quelatos de Gd.....	115
7 CONCLUSÕES .....	120
8 REFERÊNCIAS .....	122

## 1. INTRODUÇÃO

O Gadolínio (Gd) é um elemento do grupo dos lantanídeos e ocorre naturalmente em minérios de monazita. Uma vez obtido como uma substância pura, o Gd pode ser utilizado na produção de contrastes, mas, para isso, ele deve estar complexado, devido à sua toxicidade como metal livre. Entre os vários quelatos propostos como candidatos para a complexação do Gd, estão os complexos poliamino carboxílicos lineares ou macrocíclicos que são termodinamicamente estáveis e cineticamente inertes, tendo osmolalidade e viscosidade compatível ao sangue. Assim, estes são os quelatos mais frequentemente utilizados em procedimentos clínicos de ressonância magnética (RM) que utilizam o Gd.

A RM é uma ferramenta de imagem não invasiva, que fornece resolução de contraste entre os tecidos, baseada nas características do hidrogênio presente nos mesmos. A administração de meios de contraste em RM objetiva melhorar o contraste entre os tecidos no corpo durante os procedimentos clínicos, visando ajudar a visualizar e identificar anormalidades suspeitas (MAZZOLA, 2009). Os agentes de contraste a base de quelatos de Gd, são considerados seguros, no entanto, existem complicações que devem ser reconhecidas, para orientação e tratamento adequados (ELIAS Jr et al., 2008). Diversas pesquisas associam o uso deste tipo de contraste ao desenvolvimento de uma doença dermatológica, a fibrose sistêmica nefrogênica (FSN), que ocorre em pacientes com insuficiência renal (COWPER et al., 2000; GALAN; COWPER; BUCALA, 2006; COWPER; KUO; BUCALA, 2007; MARCKMANN et al., 2007; BONGARTZ, 2007).

A associação entre a FSN e contrastes a base de quelatos de Gd levou a *Food and Drug Administration* (FDA) a recomendar aos fabricantes destes contrastes, a adição de um aviso sobre a FSN na bula dos produtos. Os aspectos clínicos salientados são a presença de insuficiência renal crônica e o uso de altas doses de Gd (FDA, 2006).

Vários pesquisadores atribuem o desenvolvimento da FSN, em pacientes renais, a excreção retardada do agente de contraste, de forma que o medicamento permanece maior tempo no corpo do paciente, aumentando o risco de reações biológicas. Tais reações incluem a transmetalção do Gd complexado por íons endógenos, geralmente aumentados em pessoas com insuficiência renal (GROBNER, 2006; BONGARTZ, 2007; PERAZELLA et al., 2007; PORT et al., 2008; HERMANN et al., 2008).

Esta troca de metais ocorre devido a diferenças existentes entre as constantes de estabilidades condicionais ( $K_{\text{cond}}$ ) e cinéticas do Gd e dos íons endógenos com os ligantes utilizados nos contrastes, que resultam na liberação de  $\text{Gd}^{3+}$ . Este é extremamente tóxico e um possível causador de FSN (GROBNER, 2006; BONGARTZ, 2007; PERAZELLA et al., 2007).

Tanto o  $\text{Gd}^{3+}$  quanto a maioria dos ligantes são tóxicos; portanto, a presença destas espécies livres na formulação farmacêutica também é uma questão importante. Contrastes a base de quelatos de Gd são fabricados a partir do óxido de gadolínio. Verificou-se que este óxido apresenta diversas impurezas (BOHRER, 2012). Portanto, este trabalho foi realizado com o objetivo de determinar os elementos presentes, como impurezas e outros possíveis contaminantes, neste tipo de formulação farmacêutica, bem como verificar a possível transmetalção do Gd por estes elementos. Cinco contrastes a base de quelatos de Gd,  $\text{Gd-DTPA}^{2-}$ ,  $\text{Gd-DOTA}^{1-}$ ,  $\text{Gd-DTPA-BMA}$ ,  $\text{Gd-DTPA-BMEA}$  e  $\text{Gd-BT-DO3A}$ , disponíveis para exames de RM, foram incluídos neste estudo.

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 Relação entre ressonância magnética e fibrose sistêmica nefrogênica

A ressonância magnética (RM) é hoje um método de diagnóstico por imagem, estabelecido na prática clínica e em crescente desenvolvimento. Dada à alta capacidade de diferenciar os tecidos, o espectro de aplicações estende-se a todas as partes do corpo humano e explora aspectos anatômicos e funcionais (MAZOLLA, 2009).

Resumidamente, a RM é o resultado da interação do forte campo magnético produzido pelo equipamento com os prótons de hidrogênio do tecido humano, criando uma condição para que se possa enviar um pulso de radiofrequência e, após, coletar a radiofrequência modificada, através de uma bobina ou antena receptora. Este sinal coletado é processado e convertido numa imagem ou informação (MAZOLLA, 2009).

A intensidade das imagens obtidas por RM depende de vários parâmetros, dentre os quais a densidade dos prótons da água e os tempos de relaxação nuclear (T1 e T2). Em geral, a densidade dos prótons nos tecidos é muito baixa e, portanto, as imagens obtidas destes tecidos apresentam um contraste pequeno. Desta maneira, torna-se necessário o uso de substâncias com a finalidade de realçar o contraste entre os tecidos normal e doente. Estas substâncias, denominadas meios de contrastes, funcionam aumentando a taxa de relaxação dos prótons da água, devido ao seu elevado paramagnetismo. O gadolínio (Gd) é a base dos meios de contrastes mais utilizada em procedimentos clínicos de RM (YAN et al., 2008; MAZZOLA, 2009).

Em 2006, dois grupos europeus independentes sugeriram uma relação entre a administração de complexos de Gd usados como meio de contraste em RM e a ocorrência de fibrose sistêmica nefrogênica (FSN) em pacientes com insuficiência renal (GROBNER, 2006; MARCKMANN et al., 2006). Várias análises retrospectivas se seguiram e confirmaram esta relação (SADOWSKI et al., 2007; BROOME et al., 2007; COLLIDGE et al., 2007; KHURANA et al., 2007).

Grobner descreve o desenvolvimento da FSN, associado ao uso do contraste Omniscan®, em cinco pacientes com insuficiência renal (GROBNER, 2006). Pacientes com

esta doença progressiva desenvolvem fibrose em vários órgãos, podendo manifestar graves contraturas das articulações secundárias à fibrose da pele. Os pacientes afetados apresentavam insuficiência renal crônica e foram submetidos à angiografia por RM, com contraste paramagnético. Em outro artigo, a ocorrência de FSN foi descrita em um grupo semelhante de treze pacientes, também após a administração de Omniscan® (MARCKMANN et al., 2006).

Outros estudos identificaram o desenvolvimento de FSN seguida às administrações únicas e múltiplas de agentes de contraste a base de Gd, em que, nem sempre, foi identificado um agente específico. Quando um agente específico foi identificado, o Omniscan® foi o mais relatado, seguido pelo Magnevist® e OptiMARK®. A FSN também se desenvolveu após a administração sequencial de Omniscan® e MultiHance® e Omniscan® e ProHance®, porém, não há estudos suficientes para se saber se o grau de risco para o desenvolvimento de FSN é o mesmo para todos os agentes. Não houve relatos de FSN em pacientes com função renal normal, ou com leve a moderada insuficiência renal (ELIAS Jr et al., 2008).

A associação entre a FSN e contrastes a base de quelatos de Gd levou a *Food and Drug Administration* (FDA) a recomendar aos fabricantes destes contrastes, a adição de um aviso sobre a FSN na bula dos produtos. Os aspectos clínicos salientados são a presença de insuficiência renal crônica e o uso de altas doses de Gd (FDA, 2006).

Até agosto de 2013, aproximadamente 380 casos de FSN haviam sido descritos no Registro Internacional de FSN da Universidade de Yale, nos Estados Unidos (ICNFDR, 2013).

## 2.2 O uso do gadolínio nos contrastes

O gadolínio ( $Z = 64$  e  $M = 157, 25$ ) é um elemento metálico pertencente aos lantanídeos com propriedades ferromagnéticas. Ocorre na natureza juntamente com outros 16 elementos, que são coletivamente conhecidos como elementos terras-raras (ETR). Eles existem na forma de óxidos, carbonatos, silicatos e fosfatos e são encontrados em toda a crosta terrestre em minerais como monazita, bastnaesite e apatita. O óxido de gadolínio corresponde de 0,7 a 4,0% das terras-raras presentes no mineral e a concentração total de ETR nos minerais é de cerca de 4% (McGILL; MATHEY, 1993). O Gd é um elemento de difícil extração do mineral que o contém, e apresenta-se como um cristal branco prateado, tem

aplicações em componentes eletrônicos e, em medicina, é utilizado na forma de quelatos em soluções compostas para realce em exames de imagem (ELIAS Jr et al., 2008).

Por ser um metal, o Gd deve estar na forma iônica ( $Gd^{3+}$ ) para se dissolver na água e funcionar como meio de contraste, entretanto, o  $Gd^{3+}$  livre é muito tóxico e pode precipitar em vários tecidos (PERAZELLA et al., 2007). Sendo assim, todos os meios de contraste contendo Gd possuem quelantes na sua composição, existindo duas categorias estruturais: as macrocíclicas, que possuem o  $Gd^{3+}$  localizado no interior da molécula, dificultando sua liberação e conferindo maior proteção, e as lineares, mais instáveis. Quanto à carga, podem ser iônicas e não iônicas (RUNGE, 2001).

O íon  $Gd^{3+}$  tem o maior número possível de elétrons desemparelhados (configuração eletrônica de valência  $4f^7$ ), fato que o torna o mais paramagnético entre os íons estáveis dos metais. Além disso, a relaxação lenta do *spin* eletrônico do  $Gd^{3+}$  é um fator favorável adicional, como também a alta estabilidade termodinâmica e cinética que esses compostos apresentam, pois possibilita menor dissociação entre o ligante e o metal no interior do corpo (TOTH et al., 1996; YAN et al., 2008; PORT et al., 2008; HERMANN et al., 2008; PARIS et al., 2006; MAZZOLA, 2009).

Os nove complexos de Gd predominantemente utilizados como agentes de contraste são mostrados na Figura 1.

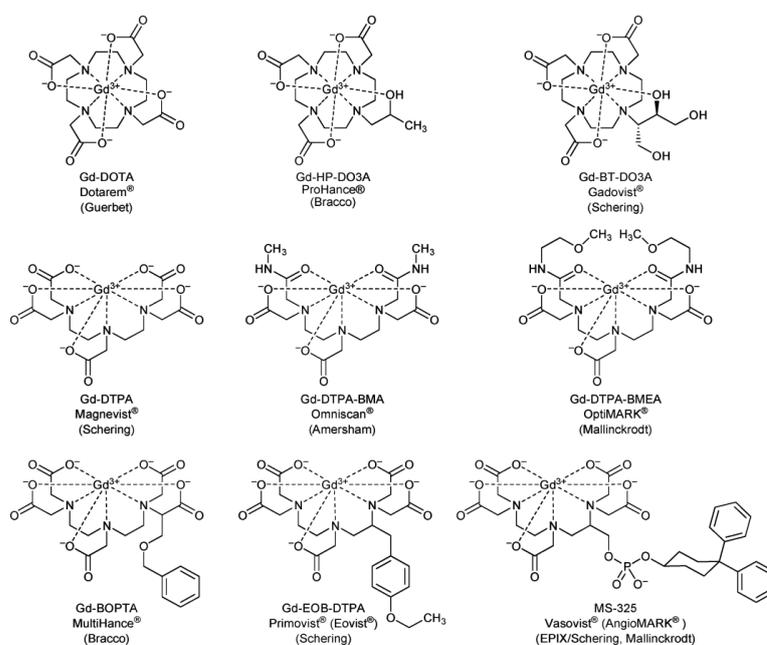


Figura 1 - Agentes de contraste clinicamente utilizados. Apenas as partes que contêm Gd são mostradas em vez de uma fórmula química completa; moléculas de água coordenadas (1 em todos os casos) foram omitidas para maior clareza (HERMANN et al., 2008).

E suas características são apresentadas na Tabela 1.

Tabela 1 - Características gerais dos quelatos de Gd atualmente disponíveis comercialmente para RM.

Composto	Abreviatura	Nome comercial	Companhia	Estrutura	Ano disponível
Gadopentato dimeglumina	Gd-DTPA	Magnevist®/ Magnevistan®	Schering, Alemanha	Linear/ Iônica	1988
Gadoterato meglumina	Gd-DOTA	Dotarem®	Guebert, França	Macrocíclica/ Iônica	1989
Gadoteridol	Gd-HP- DO3A	ProHance®	Bracco, Itália	Macrocíclica/ Não iônica	1992
Gadodiamida	Gd-DTPA BMA	Omniscan®	GE, Reino Unido	Linear/ Não iônica	1993
Gadoversamida	Gd-DTPA BEMA	OptiMARK®	Tyco, EUA	Linear/ Iônica	1999
Gadobutrol	Gd-BT- DO3A	Gadovist®	Schering, Alemanha	Macrocíclica/ Não iônica	2001
Gadobenato dimeglumina	Gd-BOPTA	Multihance®	Bracco, Itália	Linear/ Iônica	2004
Ácido Gadoxetic sal dissódico	Gd-EOB DTPA	Primovist®/ Eovist®	Schering, Alemanha	Linear/ Iônica	2004
Gadofosveset trissódico	MS325	Vasovist®	Schering, Alemanha	Linear/ Iônica	2005

Adaptada de BOHRER, 2012.

### 2.2.1 Óxido de Gadolínio

O óxido de gadolínio ( $Gd_2O_3$ ) é utilizado na fabricação de meios de contraste, este óxido é proveniente de minerais terras-raras. Entre os principais minerais de terras-raras, que apresentam interesse econômico, podem ser citados: monazita, bastnaesita e xenotímio. A monazita é essencialmente um ortofosfato de lantanídeos  $[Ln(PO_4)]$ , onde predominam os elementos leves (La, Ce, Nd, Pr e Sm). A bastnaesita é um fluorcarbonato  $[LnCO_3F]$ , contendo os elementos leves (La, Ce, Nd e Pr) e o xenotímio é um fosfato de Y  $[YPO_4]$ , onde

predomina os elementos pesados (Er, Dy, Gd e Yb). Na Tabela 2 observa-se a composição percentual de lantanídeos nos principais minerais (VIEIRA; LINS, 1997).

Tabela 2 - Percentual de lantanídeos, ítrio e tório dos principais minerais.

Elemento	Monazita	Bastnaesita	Xenotímio
La	23	32	-
Ce	46	50	-
Pr	5	4	-
Nd	19	13	-
Pm	-	-	-
Sm	3	0,5	1,2
Eu	0,1	0,1	0,01
Gd	1,7	0,15	3,6
Tb	0,16	-	1,0
Dy	0,5	0,12	7,5
Ho	0,09	-	2,0
Er	0,13	-	7,5
Tm	0,01	-	1,25
Yb	0,06	0,015	6,0
Lu	0,006	-	0,63

Adaptada de VIEIRA; LINS, 1997.

Como pode ser observado na Tabela 2, vários ETR estão presentes no mesmo mineral. A separação dos ETR representa um dos problemas mais difíceis da química inorgânica. Os métodos utilizados para a separação são geralmente pouco eficientes, devido à grande semelhança das propriedades físicas e químicas que estes elementos possuem entre si (LEE, 1999).

Os métodos clássicos de separação exploram as pequenas diferenças nas propriedades básicas, na estabilidade ou na solubilidade de seus compostos. Os métodos de separação mais utilizados atualmente incluem a separação por troca iônica e a separação por extração líquido-líquido (McGILL; MATHEY, 1993).

O processo de separação dos ETR inicia pelo aquecimento do minério com soda cáustica, para dissolver os fosfatos e deixar que os ETR precipitem como hidróxidos, que posteriormente são dissolvidos em ácido clorídrico ou nítrico. Seguem-se, então, sucessivos passos de separação, usando tanto procedimentos de extração líquido-líquido, quanto sólido-líquido (troca iônica). Embora o processo atual possa produzir todos os ETR individuais com pureza >99,999%, evidentemente isso tem um alto custo no produto final. Sendo assim, cada elemento individual de ETR, raramente contém menos de 5 ppm dos outros e o nível usual de pureza é 99,99% (McGILL; MATHEY, 1993).

A Figura 2 mostra o princípio da separação dos ETR, originalmente proposto pela empresa Rhone-Poulenc, em que, para uma separação bem sucedida, são necessárias mais de 1000 unidades de separação, utilizando diferentes agentes extratores.

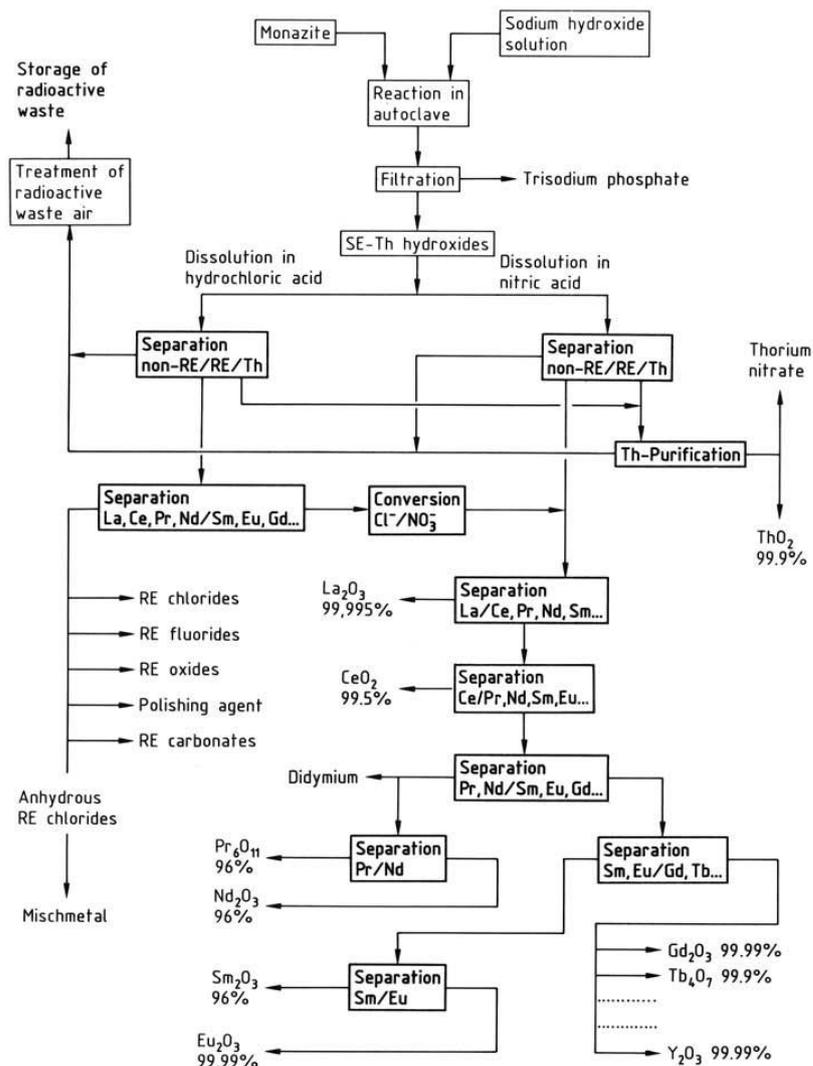


Figura 2 - Processo Rhône-Poulenc de extração líquido-líquido para a separação de ETR. (McGILL; MATHEY, 1993).

A Tabela 3 mostra as impurezas presentes nos óxidos de gadolínio comercializados por 5 empresas diferentes.

Tabela 3 - Impurezas em óxido de gadolínio utilizado para produzir os meios de contraste fornecidos por diferentes empresas.

Empresa fornecedora	1	2	3	4	5
Gd <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	> 99,99%	99,995%	99,5%	99,99%	99,99%
Impurezas	%				
Óxidos restantes	1				
La <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	-	0,05	-	0,0005	
CeO <sub>2</sub>	0,06	0,01	-	0,001	
Pr <sub>6</sub> O <sub>11</sub>	0,08	0,01	-	0,001	
Nd <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	0,11	0,05	-	0,001	
Sm <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	0,06	0,05	0,03	0,003	
Sc <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	0,03	-	-	-	
Eu <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	0,03	0,01	0,05	0,003	
Tb <sub>4</sub> O <sub>7</sub>	-	0,1	0,05	0,0005	
Dy <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	0,09	0,05	0,02	0,0005	
Ho <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	0,24	0,01	-	0,0005	
Er <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	0,03	0,05	-	0,0005	
Tm <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	-	0,05	-	0,0005	
Yb <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	0,02	0,1	0,02	0,0005	
Lu <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	0,05	0,05	-	0,0005	
Y <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	0,005	0,05	-	0,0005	
Fe <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	-	0,05	0,01	0,0005	< 0,1
SiO <sub>2</sub>	-	-	0,05	0,005	-
CaO	-	0,05	0,005	0,005	< 0,2
CuO	-	-	-	0,0005	-
PbO	-	-	-	0,0005	-
NiO	-	-	-	0,001	-
Cr <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	-	-	-	-	< 0,05
Co <sub>3</sub> O <sub>4</sub>	-	-	-	-	< 0,05
Cloretos	-	-	-	0,02	-

1: GFS; 2: Molycorp; 3: Baotou. 4: Metall.com; 5: Treibacher; - : não informada

Adaptada de BOHRER, 2012.

Como se pode observar na Tabela 3, o óxido de gadolínio apresenta como impurezas não somente óxidos de ETR, mas também outros óxidos metálicos, como o óxido de ferro.

Em geral, formulações de agentes de contraste são altamente concentradas (0,5-1,0 mol L<sup>-1</sup> de Gd), de modo que, em média, cerca de 1,2 g de Gd é administrada a um paciente para um exame por RM em cada dose (KUNNEMEYER et al., 2009). A Tabela 4 ilustra o peso molecular e a dose usual permitida para cada tipo de contraste a base de Gd disponíveis comercialmente, mostra também as massas de ambos, ligante e Gd, em uma dose de cada agente de contraste (considerando-se o valor máximo) administrado a um paciente (70 kg). Para os compostos mais pesados, a quantidade do ligante está em torno de 13-20 g e, para o Gd, a quantidade pode chegar a 3,3 g. Com estes valores, e considerando a via de administração, as impurezas presentes neste tipo de medicação podem possuir valores significativos. Nas Tabelas 5 e 6 são apresentadas as somas de outros ETR e também de outros metais presentes como impurezas. Estas impurezas seriam administradas juntamente com a dose de cada um dos agentes de contraste a base de Gd (como calculado na Tabela 4) a um paciente adulto (70 kg). Os valores foram estimados, considerando os níveis certificados de impurezas, em óxidos de gadolínio disponíveis comercialmente, apresentados pelas cinco diferentes empresas (Tabela 3) (BOHRER, 2012).

Tabela 4 - Algumas características dos quelatos de gadolínio disponíveis comercialmente: peso molecular, componentes da formulação, dosagem usual, LD50, quantidade calculada de Gd-quelato e de Gd livre considerando a maior dose de cada contraste para um paciente adulto (70 kg)

Composto	Nome comercial	Peso Molecular (g mol <sup>-1</sup> )	Outros constituintes da formulação	Dose permitida (mmol kg <sup>-1</sup> )	Quantidade de ligante por dose (mmol) e (g)	Quantidade de Gd por dose (mmol) e (g)	LD <sub>50</sub> , intravenoso em ratos (mmol kg <sup>-1</sup> )
Gadopentetato dimeglumina	Magnevist®	938	0,2% de DTPA livre (1 mmol/L) Ca-DTPA-BMA	0,1 - 0,3	25,218 / 19,689	20,998 / 3,302	5 - 6
Gadodiamida	Omniscan®	573,66	5% Na-DTPA-BMA (25 mmol/L) Ca-DTPA-BMEA	0,1 - 0,3	28,931 / 12,047	20,998 / 3,302	5 - 8
Gadoversamida	OptiMARK®	661,77	Na-DTPA-BMEA (50 mmol/L)	0,1	9,183 / 4,633	7,001 / 1,101	25-28
Gadobenato dimeglumina	MultiHance®	1058,2	–	0,05 - 0,1	8,221 / 7,407	7,001 / 1,101	5,8
Ácido Gadoxetic sal dissódico	Primovist/ Eovist®®	725,72	Ca- EOB-DTPA Na-sal	0,1	8,936 / 5,080	7,001 / 1,101	7,5
Gadofosveset trisódio	Vasovist®	976	Fosverset ligante (0,325 mmol/L) 97,6 mg/mL	0,01 - 0,05	4,172 / 3,416	3,497 / 0,550	*
Gadoterato meglumina	Dotarem®	558,64	meglumina	0,1 - 0,2	19,485 / 7,821	13,996 / 2,201	11
Gadoteridol	ProHance®	558,7	0,1% Ca-HP-DO3A (0,5 mmol/L)	0,1 - 0,2	19,485 / 7,822	13,996 / 2,021	12
Gadobutrol	Gadovist®	604,72	Ca-HP-DO3A + Na-HP-DO3A (1mmol/L)	0,1 - 0,3	28,379 / 12,699	20,998 / 3,302	7 - 9 ~30

\*A letalidade foi observada em roedores após a administração intravenosa única, em dose de duas ordens de grandeza maiores do que a dose prevista para seres humanos que é de 0,3 mmol kg<sup>-1</sup>. Adaptada de BOHRER, 2012.

Tabela 5 - Quantidade de outros ETR presentes como impurezas em uma dose de cada contraste para um paciente adulto (70 Kg), assumindo os níveis de impurezas presentes no certificado de análise do óxido de gadolínio de empresas diferentes (Tabela 3).

Contraste/nome comercial	Dose usual (mmol/Kg)	Gd por dose (mmol)	Gd por dose (g)	ETR impureza por dose (mg)				
				Empresa 1	Empresa 2	Empresa 3	Empresa 4	Empresa 5
Magnevist®								
Ominiscan®	0,1-0,3	21	3,3	26,6	21,1	5,6	0,45	33
Gadovist®								
ProHance®	0,1-0,2	14	2,2	17,7	14,1	3,7	0,30	22
OptiMARK®	0,1	7	1,1	8,9	7,0	1,9	0,15	11
Primovist®/Eovist®	0,05-0,1	7	1,1	8,9	7,0	1,9	0,15	11
MultiHance®								
Vasovist®	0,01- 0,05	21	0,55	4,4	3,5	0,9	0,07	5,5

Adaptada de BOHRER, 2012.

Tabela 6 - Quantidade de impurezas (que não são ETR) considerando uma dose de cada contraste para um paciente adulto (70 kg), assumindo os níveis de impurezas presentes no certificado de análise de óxido de gadolínio originado de diferentes companhias (Tabela 3)

Contraste	Dose usual (mmol/Kg)	Gd por dose(g)	ETR impureza por dose (mg)					
			Impurezas	Empresa 1	Empresa 2	Empresa 3	Empresa 4	Empresa 5
Magnevist® Ominiscan® Gadovist®	0,1-0,3	3,3	Fe <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	-	1,7	0,3	0,02	3,3
			CaO	-	1,7	0,17	0,17	6.6
			SiO <sub>2</sub>	-	-	1,7	0,17	-
			CuO	-	-	-	0,02	-
			PbO	-	-	-	0,02	-
			NiO	-	-	-	0,03	-
			Cr <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	-	-	-	-	1,7
			Co <sub>3</sub> O <sub>4</sub>	-	-	-	-	1,7
			Cloreto	-	-	-	0,66	-
			Fe <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	-	1,1	0,2	0,01	2,2
ProHance®	0,1- 0,2	2,2	CaO	-	1,1	0,1	0,11	4,4
			SiO <sub>2</sub>	-	-	1,1	0,11	-
			CuO	-	-	-	0,01	-
			PbO	-	-	-	0,01	-
			NiO	-	-	-	0,02	-
			Cr <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	-	-	-	-	1,1
			Co <sub>3</sub> O <sub>4</sub>	-	-	-	-	1,1
			Cloreto	-	-	-	0,44	-

Continuação Tabela 6

Contraste	Dose usual (mmol/Kg)	Gd por dose(g)	ETR impureza por dose (mg)					
			Impurezas	Empresa 1	Empresa 2	Empresa 3	Empresa 4	Empresa 5
OptiMARK® Primovist®/ Eovist® MultiHance®	0,1 0,05-0,1	1,1	Fe <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	-	0,6	0,1	0,01	1,1
			CaO	-	0,6	0,05	0,06	2,2
			SiO <sub>2</sub>	-	-	0,55	0,06	-
			CuO	-	-	-	0,01	-
			PbO	-	-	-	0,01	-
			NiO	-	-	-	0,01	-
			Cr <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	-	-	-	-	0,5
			Co <sub>3</sub> O <sub>4</sub>	-	-	-	-	0,5
			Cloreto	-	-	-	0,22	-
			Fe <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	-	0,3	0,06	0,006	0,6
Vasovist®	0,01-0,05	0,55	CaO	-	0,3	0,3	0,03	1,1
			SiO <sub>2</sub>	-	-	0,03	0,03	-
			CuO	-	-	-	0,006	-
			PbO	-	-	-	0,006	-
			NiO	-	-	-	0,01	-
			Cr <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	-	-	-	-	0,3
			Co <sub>3</sub> O <sub>4</sub>	-	-	-	-	0,3
			Cloreto	-	-	-	0,11	-

Adaptada de BOHRER, 2012.

Os valores apresentados na Tabela 5 revelam que a quantidade dos outros ETR pode ser maior que 30 mg e varia de acordo com a origem da matéria-prima. No entanto, apesar das quantidades de impurezas no total serem elevadas, principalmente para estes elementos, que são todos tóxicos (tão tóxicos quanto o Gd), uma vez que eles apresentam comportamento químico semelhante ao Gd. Isto significa que, dada a estabilidade entre eles, a diminuição do efeito tóxico é conseguida através de quelação. A Figura 3 mostra as constantes de estabilidade dos quelatos de ETR. As constantes de estabilidade dos complexos de ETR-DTPA, um dos ligantes usado na fabricação de contraste, são tão elevadas quanto a constante de estabilidade deste ligante com Gd, o que garante a presença dessas impurezas na mesma forma que o Gd, como um quelato.

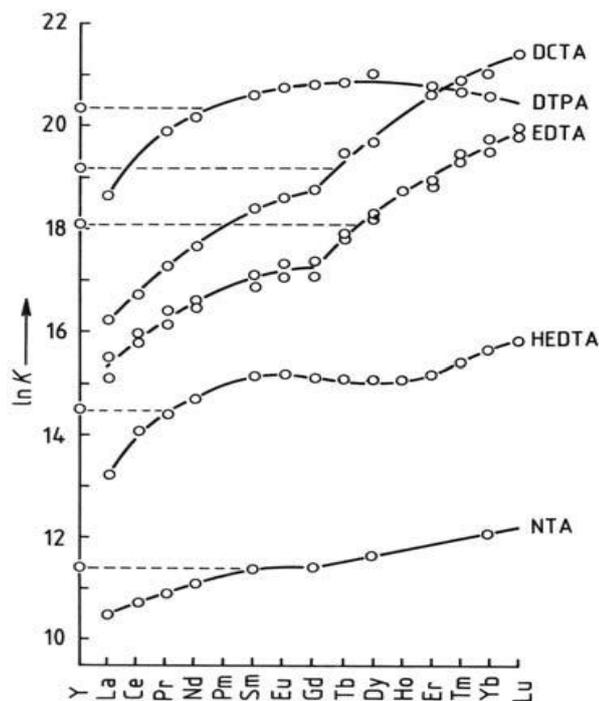


Figura 3 - Constantes de estabilidade K para alguns quelatos de terras-raras (McGILL; MATHEY, 1993).  
---- Posição do ítrio.

Apesar da possível contaminação com outros ETR, o principal problema associado aos contrastes à base de Gd é a liberação de  $Gd^{3+}$  e, conseqüentemente, do ligante livre, seja na formulação, ou *in vivo*. A Farmacopeia Americana (USP, do inglês *The United States Pharmacopeia*) estabelece em suas monografias limites para o Gd livre, onde são listados quatro contrastes a base de Gd (0,3% de Gd livre, maior concentração aceita, para o

gadodiamida) e para os ligantes livres ou compostos relacionados (2,0% também para gadodiamida). A Tabela 7 mostra as impurezas aceitas e os seus limites para os contrastes de Gd, baseado na USP. Como citado anteriormente, quelatos de Gd são regidos por um equilíbrio termodinâmico entre  $Gd^{3+}$ , ligante e o complexo, o que define a quantidade de  $Gd^{3+}$  e ligante livre gerados pela dissociação do complexo. Devido à toxicidade do  $Gd^{3+}$  e também da maioria dos ligantes, a presença destas espécies livres na formulação farmacêutica é uma questão importante. A dose típica para a maioria dos contrastes a base de Gd é  $0,1 \text{ mmol kg}^{-1}$ , sendo a razão Gd/ligante 1:1. A dose tem a mesma quantidade de Gd ( $0,1 \text{ mmol kg}^{-1}$ ). A  $DL_{50}$  para  $Gd^{3+}$  livre, quando administrado  $GdCl_3$  em ratos, é de  $0,3 \text{ mmol kg}^{-1}$ , ou seja, apenas 3 vezes maior do que a dose usual em humanos (BOUSQUET et al., 1988).

Tabela 7 - Limites para impurezas em alguns agentes de contraste a base de Gd.

Composto	Gd livre	Solvente residual	Metais pesados	Outras Impurezas
Gadodiamida (Omniscan®)	0,3%	Acetona 0,2% Álcool isopropílico 0,2% Álcool etílico 0,2%		Ácido dietileno triamino penta-acético bismetilamida 0,7% Metilamina 0,05% Compostos relatados (A e B) 2,0% Outras impurezas 0,5%
Gadopentetato dimeglumina (Magnevistan®)	-	-	0,002%	Ácido penta-acético 0,027%-0,04%
Gadoteridol (ProHance®)	0,02%			Compostos relatados: A 0,02% B 0,1% C 0,1% Matéria particulada 2-metoxietilamina 0,10%
Gadoversamida (OptiMARK®)	0,05%	Álcool isopropílico 0,1% Acetonitrila 0,025%		Gadodiamida Compostos relatados: A 1,0% B 0,5% Matéria particulada

Adaptada de USP, 2008.

### 2.2.2 Relação entre estrutura química e estabilidade dos complexos de Gd

A estabilidade termodinâmica dos complexos de Gd origina-se, essencialmente, da interação eletrostática entre o íon  $Gd^{3+}$  e os grupos doadores dos ligantes poliamino carboxílicos. Três fatores estruturais influenciam a estabilidade termodinâmica dos complexos de Gd (KUMAR et al., 1995): (1) A basicidade do suporte polimérico; (2) o número de anéis de cinco membros (N-Gd-N e N-Gd-O) formados entre o metal e os vários átomos doadores do ligante; (3) o efeito macrocíclico, que está relacionado com o tamanho da cavidade do anel do quelato e, também, a pré-organização, rigidez e conformação do ligante. Ligantes macrocíclicos parecem mais adequados para a complexação do íon  $Gd^{3+}$ , porque estes ligantes apresentam uma cavidade interna que permite que eles possam envolver-se em torno de  $Gd^{3+}$  (DESREUX, 1980). Estes aspectos estruturais têm maiores consequências para a estabilidade termodinâmica do quelato.

Quelatos macrocíclicos são caracterizados por diferentes constantes termodinâmicas, que podem ser correlacionadas com a sua estrutura química iônica ou não iônica. Desta maneira, as interações eletrostáticas entre o metal e os ligantes, seriam diminuídas se os grupos ionizáveis, dos anéis macrocíclicos, fossem substituídos por grupos ligantes não ionizáveis, como exemplo, a constante de estabilidade do Gd-DOTA (Dotarem®), que é 2-4 vezes maiores que a dos complexos macrocíclicos não iônicos, Gd-HP-DO3A (ProHance®) e Gd-BTDO3A (Gadovist®) (Tabela 8). Esta diferença é consequência direta de que quanto maior a carga negativa do ligante DOTA<sup>4-</sup>, maior a interação eletrostática entre ligante e metal (TOTH et al., 1994).

Quelatos lineares, por definição, não se beneficiam do efeito macrocíclico, sendo o número de anéis de cinco membros (N-Gd-N e N-O-Gd) reduzido de oito nos ligantes macrocíclicos, para seis nos de cadeia aberta. Isto explica a diferença observada em termos da estabilidade termodinâmica, entre os complexos iônicos de cadeia aberta Gd-DTPA (Magnevistan®), Gd-EOB-DTPA (Primovist®), MS325 (Vasosvist®), Gd-BOPTA (MultHance®) e o complexo iônico macrocíclico Gd-DOTA (Dotarem®) (Tabela 8).

Tabela 8 - Características físico-químicas dos contrastes para RM disponíveis comercialmente.

<i>Contrastes</i>	Gd-DTPA-gadopentetate dimeglumine	Gd-EOB-DTPA Ácido gadoxetic, sal dissódico	Gd-BOPTA <sup>†</sup> Gadobenate dimeglumine	MS325 Gadofosveset Sal trissódico	Gd-DTPA-BMA-gadodiamide	Gd-DTPA-BMEA-gadoversamide	Gd-HP-DO3A-gadoteridol	Gd-BT-DOA3-gadobutrol	Gd-DOTA gadoterate meglumine)
<i>Nomes Comerciais*</i>	Magnevist® Magnograf® Viewgam®	Primovist® Eovist®	MultHance®	Vasovist®	Omniscan®	OptiMARK®	ProHance®	Gadovist®	Dotarem® Artirem®
<i>Concentração (M)</i>	0,5	0,25	0,5	0,25	0,5	0,5	0,5	1,0	0,5
<i>Formulação</i>	DTPA livre (1mmol/L)	Ca-EOB-DTPA (sal trissódico) (1,5mmol/L)	-	Fosveset (0,325mmol/L)	Ca-DTPA-BMA (sal Na <sup>+</sup> ) (25mmol/L)	Ca-DTPA-BEMA (sal Na <sup>+</sup> ) (50mmol/L)	[Ca-HP-DO3A] <sub>2</sub> (sal Ca <sup>2+</sup> ) (0,5mmol/L)	Ca-BT-DO3A (sal Na <sup>+</sup> ) (1mmol/L)	-
<i>Quelato (excesso)</i>	0,4 mg/mL	-	0 mg/mL	-	12 mg/mL	28,4 mg/mL	0,23 mg/mL	-	-
<i>Estrutura Química</i>	Linear/ Cadeia aberta	Linear/ Cadeia aberta	Linear/ Cadeia aberta	Linear/ Cadeia aberta	Linear/ Cadeia aberta	Linear/ Cadeia aberta	Macrocíclica	Macrocíclica	Macrocíclica
<i>Carga</i>	di-iônica	di-iônica	di-iônica	tri-iônica	não iônica	não iônica	não iônica	não iônica	iônica
<i>log k<sub>therm</sub></i>	22,1	23,5	22,6	22,6	16,9	16,6	23,8	21,8	25,6
<i>log k<sub>cond</sub> pH7,4</i>	17,7	18,7	18,4	18,9	14,9	15,0	17,1	14,7	19,3
<i>Estabilidade<sup>a</sup></i>	baixa	média	média	média	baixa	baixa	alta	alta	alta
<i>Osmolalidade (mOsm/kgH<sub>2</sub>O a 37°C)</i>	1960	688	1970	825	789	1110	630	1603	1350

Tabela adaptada de ELIAS Jr et al., 2008, IDÉE et al., 2006 e Laurent et al., 2006, PORT et al., 2008, KARAM, 2008; BOHRER, 2012.

Como os átomos doadores não iônicos são menos básicos e, portanto, ligados mais fracamente do que os átomos doadores iônicos, comparando o Gd-DTPA (Magnevistan®) ao Gd-DTPA-BMA (Omniscan®) e ao Gd-DTPA-BMEA (OptiMARK®), percebe-se que a substituição de dois grupos carboxílicos aniônicos, do Gd-DTPA, por um grupo amida não iônico, coordenado ao átomo de Gd, através o oxigênio do grupo neutro carbonila em Gd-DTPA-BMA e em Gd-DTPA-BMEA, resulta numa diminuição de 3 vezes, na estabilidade dos complexos (BRÜCHER; SHERRY, 2001 *apud* PORT et al. 2008).

### 2.2.3 Constante de estabilidade termodinâmica

Por definição, como o Gd no contraste está quelado, existe um equilíbrio termodinâmico entre o metal [M], o ligante [L] e o complexo [ML]:



A estabilidade dos complexos de  $Gd^{3+}$  é expressa em termos de  $\log K_{\text{therm}}$ , onde  $K_{\text{therm}}$  é a constante de estabilidade termodinâmica, que é definida como:  $K_{\text{therm}} = [ML]/[M] \times [L]$ . Porém, o método mais adequado para comparar a estabilidade dos diferentes quelantes é pelo uso da constante de estabilidade condicional em pH 7,4 ( $\log K_{\text{cond}}$ ), que considera as constantes de protonação do ligante e descreve o equilíbrio no pH fisiológico (IDÉE *et al.*, 2006). Esta constante é definida como:  $K_{\text{cond}} = K_{\text{therm}} \times [L] / L_T$ . Onde  $L_T$  é a concentração total do ligante não complexado, ou seja,  $\{L + [HL] + [H_2L] \dots\}$ , onde [HL] e [H<sub>2</sub>L] são as formas protonadas do ligante livre.

Uma vez que a constante de estabilidade termodinâmica informa a afinidade do  $Gd^{3+}$  pelo ligante, quanto mais elevada a constante, mais estável é o complexo e menor a quantidade de Gd e ligante livres.

Como o objetivo inicial de prever a relação entre as constantes termodinâmicas e a toxicidade dos contrastes, alguns autores (CACHERIS *et al.*, 1990; SARKA *et al.*, 2000), realizaram estudos baseados em modelos sintéticos de plasma sanguíneo, onde utilizaram a constante de seletividade  $\log K_{\text{sel}}$ . Estes modelos tentaram simular o equilíbrio no plasma sanguíneo, onde foram incorporados certos cátions endógenos como  $H^+$ ,  $Ca^{2+}$ ,  $Cu^{2+}$  e  $Zn^{2+}$

(ferro não foi considerado) e outros componentes tais como: citrato, aminoácidos e albumina (fosfato não foi considerado). No entanto, a aplicabilidade de modelos teóricos de equilíbrio com base em constantes de seletividade é limitada por vários fatores, como: (1) a incapacidade de simular todos os equilíbrios que ocorrem *in vivo*, para definir uma modelação relevante do plasma; (2) a não consideração dos aspectos cinéticos relacionados à descomplexação e transmetalção.

#### 2.2.4 Estabilidade associada à cinética de descomplexação e transmetalção

A transmetalção é uma reação de troca de metais, que vem sendo relacionada à liberação de  $Gd^{3+}$  *in vivo*, enquanto a presença do Gd livre está sendo associada ao desenvolvimento FSN (GALAN et al., 2006; MORCOS, 2008; AGUILERA; AGUSTÍ, 2011).

A estabilidade dos complexos de Gd é o que determina o processo de transmetalção. Este é facilitado pelo zinco, cobre, ferro, cálcio ou ácidos endógenos, que liberam  $Gd^{3+}$ , pois desestabilizam tais complexos. O  $Gd^{3+}$  é pouco solúvel e pode formar precipitados com ânions endógenos (fosfatos, citratos, hidróxidos e carbonatos), sendo depositados nos tecidos, e então fagocitados por macrófagos que produzem citocinas. Algumas, com fator transformador de crescimento (TGF-  $\beta$ ), são particularmente fibrogênicas (GROBNER, 2006; GALAN et al., 2006; MORCOS, 2008). O fator TGF-  $\beta$  é uma proteína que controla a proliferação, diferenciação celular e outras funções na maioria das células.

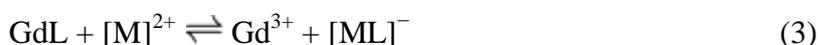
Estudos *in vivo*, utilizando ratos, apoiam a hipótese de que a estabilidade dos quelatos de Gd esta correlacionada com a sua liberação e ao seu depósito nos tecidos, principalmente na pele (SIEBER et al., 2008).

Constantes de estabilidade termodinâmica elevadas, determinadas em água, não são condições suficientes de estabilidade *in vivo* (TWEEDLE et al., 1991). Sendo assim, torna-se necessário outro parâmetro para compreender a relação de dissociação *in vivo*. Este parâmetro importante é a estabilidade cinética, descrita:

(1) a cinética da descomplexação do complexo Gd-ligante correspondente a uma reação de dissociação espontânea, representada por:



(2) a cinética de transmetalização do quelato de Gd por metais endógenos (em particular  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$  e  $\text{Zn}^{2+}$ ) correspondente com a reação:



Em pH 7,4, as taxas de dissociação de complexos de Gd são baixas. Já em soluções ácidas, os complexos dissociam-se mais rapidamente (BRÜCHER, 2002). Consequentemente, a taxa de dissociação espontânea do complexo de  $\text{Gd}^{3+}$  foi estudada através da medição da meia-vida de seus complexos a pH 1,0. Verificou-se que os quelatos macrocíclicos apresentam meia-vidas mais longas que os quelatos lineares. No entanto, valores diferentes têm sido relatados na literatura (KUMAR et al., 1993; TWEEDLE, 1992; WEDEKING et al., 1992; PULUKKODY et al., 1993). Uma vez que os valores de meia-vida ( $t_{1/2}$ ) dependem das condições experimentais utilizadas e do método de ensaio, os valores de  $t_{1/2}$  para os compostos macrocíclicos, comercializados atualmente, foram determinados seguindo um protocolo comparativo e rigoroso (ensaio arzenazo). Nessas condições, Port e colaboradores determinaram a estabilidade cinética e as  $t_{1/2}$  e verificaram que, para os três quelatos macrocíclicos, Gd-DOTA (gadoterate), Gd-BT-DO3A (gadobutrol) e Gd-HP-DO3A (gadoteridol) analisados em condições semelhantes (pH 1,2 a 37 °C) os resultados para  $t_{1/2}$  foram respectivamente 85, 18 e 4 horas. A estabilidade cinética dos quelatos macrocíclicos foi classificada na seguinte ordem: Gd-DOTA/Dotarem® > Gd-BT-DO3A/Gadovist® > Gd-HPDO3A/ProHance®, como esperado, a cinética encontrada foi mais rápida a 37 °C do que a 25 °C (Tabela 9). Por outro lado, os autores consideraram que não há como diferenciar os agentes de contraste macrocíclicos, devido à intrínseca variabilidade biológica e à falta de modelos *in vivo* disponíveis até o momento.

Tabela 9 - Valores de meia-vida ( $t_{1/2}$ ) de dissociação para complexos macrocíclicos de Gd.

	$t_{1/2}$ (h)		
	pH 1,2 (37 °C)	pH 1,0 (37 °C)	pH 1,0 (25 °C)
Gd-DOTA (gadoterate)	85	26,4	338
Gd-HP-DO3A (gadoteridol)	4	2,0	3,9
Gd-BT-DO3A (gadobutrol)	18	7,9	43
Complexos de cadeia aberta	N/D	N/D	< 5 s

N/D não disponível. Adaptada de PORT et al., 2008.

Há na literatura um método relaxométrico *in vitro* validado para avaliar, quantitativamente, a liberação de  $Gd^{3+}$  de seus complexos na presença de  $Zn^{2+}$  em pH 7,4 (LAURENT et al., 2001). Foi proposto pelos autores que esta abordagem pode ser utilizada para determinar três classes de complexos de Gd: (a) quelatos macrocíclicos, caracterizados por elevada estabilidade cinética (Gd-DOTA/Dotarem®, Gd-HP-DO3A/MultHance® e Gd-BT-DO3A/Gadovist®); (b) quelatos iônicos de cadeia aberta, para os quais a estabilidade cinética é moderada, e conduz a descomplexação significativa na presença de  $Zn^{2+}$  (Gd-DTPA/Magnevistan®, Gd-EOB-DTPA/Primovist®, Gd-BOPTA/MultHance® e MS325/Vasovist®); (c) quelatos não iônicos de cadeia aberta, que exibem estabilidade cinética pobre e a maior extensão de descomplexação (Gd-DTPA-BMA/Omniscan® e Gd-DTPA-BMEA/OptMARK®).

Por último, foi comparada a estabilidade de todos complexos de Gd em soro humano a 37 °C. Os complexos lineares não iônicos exibiram a menor estabilidade, enquanto os complexos macrocíclicos foram mais estáveis. O excesso de ligante livre, nas formulações de Gd-DTPA-BMA (Omniscan®) e Gd-DTPA-BMEA (OptMARK®), retardou a liberação  $Gd^{3+}$  por 2 - 3 dias, mas não alterou a taxa de dissociação para estas moléculas (FRENZEL, 2008).

Avaliando em conjunto os testes físico-químicos e *in vitro*, observa-se que os quelatos de cadeia aberta são menos estáveis cineticamente do que os quelatos macrocíclicos.

A baixa estabilidade cinética dos complexos de cadeia aberta deve-se à rápida abertura destes complexos, devido à sua mobilidade conformacional (KUMAR, 1997). Como na amida não iônica os átomos doadores são menos básicos, eles se ligam mais fracamente ao Gd que os átomos doadores carboxílicos que são iônicos. Provavelmente, isso acarreta mais flexibilidade e mobilidade conformacional nos complexos de Gd e explica a perda significativa de estabilidade cinética para Gd-DTPA-BMA (Omniscan®) e Gd-DTPA-BMEA (OptMARK®). A inércia cinética dos complexos macrocíclicos, provavelmente, decorre da sua disposição apertada e sua alta rigidez conformacional (TWEEDLE et al., 1991, MEYER et al., 1988).

O complexo mais estável cineticamente é o Gd-DOTA (Dotarem®), com os grupos carboxílicos iônicos que se ligam fortemente ao Gd, limitando o movimento conformacional do complexo (MEYER et al., 1988). Os pesquisadores Pollet e Marx (2007), utilizando simulação de dinâmica molecular em solução aquosa à temperatura ambiente, mostraram que as cadeias hidroxipropil no complexo Gd-HP-DO3A (Gadovist®), quebram a simetria de forma diferente do complexo Gd-DOTA (Dotarem®), e são dinamicamente flexíveis, em

comparação com os quatro grupos carboxílicos de Gd-DOTA. A Figura 4 mostra a concentração teórica de  $Gd^{3+}$ , liberado dos complexos, que exibem constantes de estabilidade termodinâmica elevada ou baixa, e alta ou baixa estabilidade cinética.

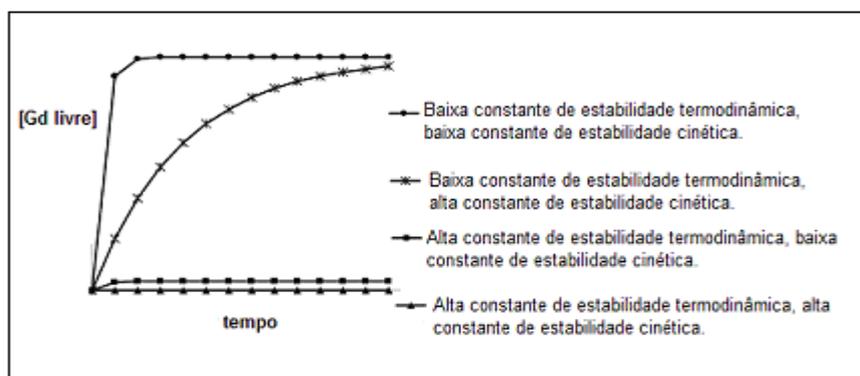


Figura 4 - Concentração estimada de Gd livre liberado dos complexos de Gd de diferentes estabilidades termodinâmicas e cinéticas, supondo mecanismo de primeira ordem (IDEÉ et al., 2008).

A Figura 5 mostra a taxa na qual os agentes de contraste macrocíclicos de Gd sofrem descomplexação em pH 1,2 e na temperatura de 30 °C. Evidentemente, estas não são as condições em que os complexos de Gd são utilizados como agentes de contraste, mas o gráfico demonstra que até mesmo os complexos mais estáveis (macrocíclicos) são capazes de liberar  $Gd^{3+}$ .

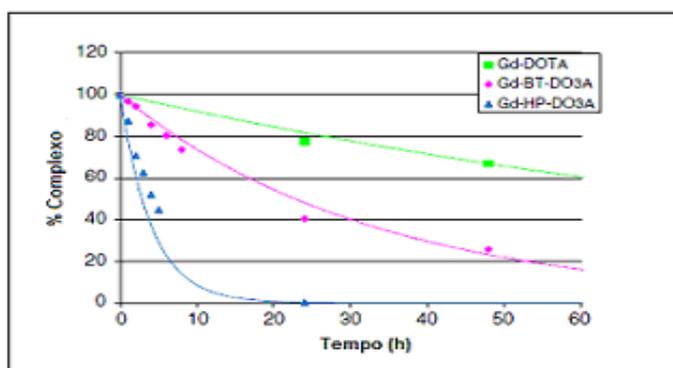


Figura 5 - Descomplexação cinética em pH 1,2, 37 °C, para agentes de contraste macrocíclicos a base de Gd comercializados: percentual do complexo versus tempo (PORT et al., 2008).

Como já mencionado anteriormente, o íon  $Gd^{3+}$  tem nove sítios de coordenação onde se ligam os ligantes, e atua como um agente de contraste por perturbar o relaxamento de prótons da água circundante. A fim de interagir com a água, um dos locais de coordenação deve ser deixado livre, como pode ser observado na Figura 6. Este requisito diminui a afinidade de ligação do ligante pelo metal e facilita a dissociação (MORCOS, 2008).

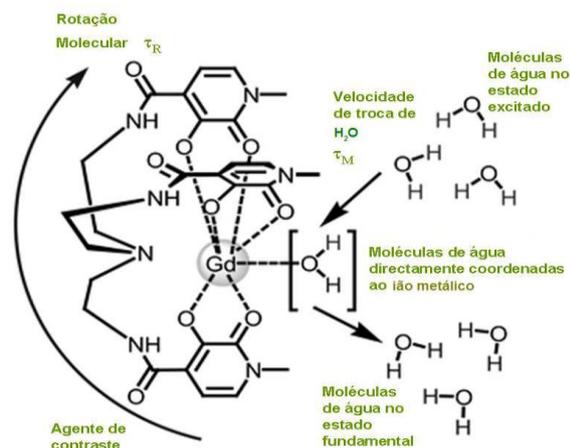


Figura 6 - Parâmetros que influenciam a relaxatividade das moléculas de água (RAYMOND; PIERRE, 2005).

Devido à estabilidade de determinados complexos de Gd ser relativamente baixa, algumas formulações farmacêuticas contêm ligante livre, sais de sódio ou sais de cálcio da molécula do ligante (Tabela 8). Estes excipientes são utilizados para garantir que não haja Gd livre na formulação farmacêutica (IDÉE et al., 2006).

Assim sendo, vários estudos sugerem como principal parâmetro físico-químico, para avaliar a transmetalção, a constante de estabilidade cinética, embora os dados disponíveis para a comparação sejam as constantes de estabilidade termodinâmica e condicional (Tabela 10).

Tabela 10 - Constantes de estabilidade termodinâmica e constante de estabilidade condicional para Gd e outros metais selecionados.

Compostos	Log $k_{\text{therm}}$				Log $k_{\text{cond}}$		
	Gd	Ca	Cu	Zn	Gd	Cu	Zn
Gadopentetato dimeglumina	22,1	10,75	21,38	18,29	17,7	16,8	13,8
Gadodiamina	16,9	7,17	13,03	12,04	14,9	11,1	10,1
Gadoversamida	16,6				15,0		
Gadobenato dimeglumina	22,6				18,4	17,3	13,9
Ácido gadoxético sal dissódico	23,5				18,7		
Gadofisveset trissódico	22,1	10,45	21,3	17,82	18,9	15,7	13,8
Gadoterato meglumina	25,8	17,23	22,63	21,05	18,8		
Gadoteridol	23,8	14,33	22,84	19,37	17,1		
Gadobutrol	21,8	11,74	22,87	19,26	14,7		

Adaptada de BOHRER, 2012.

A estabilidade das formulações farmacêuticas comerciais dos complexos de Gd gerou algumas controvérsias a respeito do desenvolvimento da FSN renal (GROBNER, 2006; MARCKMANN et al., 2006). A controvérsia resulta do pressuposto de que a estabilidade de quelatos macrocíclicos, determinados *in vitro*, pode ser estendida para a estabilidade *in vivo*. No entanto, embora a estabilidade cinética seja o principal critério utilizado para prever o destino dos complexos de Gd e a quantidade de  $Gd^{3+}$  liberado em condições fisiológicas, seja por descomplexação ou por transmetalção, os dados mostram que estes valores de estabilidade cinética e  $t_{1/2}$  diferem grandemente entre os complexos (Tabela 9). Até para os mesmos complexos, valores diferentes são encontrados, dependendo do tipo de estudo (LAURENT et al., 2001, LAURENT et al., 2006, MORCOS, 2007, PORT et al., 2008).

### 2.3 Elementos terras-raras (ETR)

Os lantanídeos, do lantânio ao lutécio (números atômicos 57 a 71), para os quais se utiliza o símbolo Ln, são membros do grupo III na tabela periódica e todos possuem propriedades químicas e físicas muito semelhantes. Esta similaridade é ocasionada pela natureza das configurações eletrônicas desses elementos, o que gera o estado de oxidação +3, particularmente estável, e um pequeno e constante decréscimo do raio iônico, com o aumento do número atômico para dado número de coordenação.

Esses elementos são também conhecidos como terras-raras e, segundo recomendações da IUPAC (*International Union for Pure and Applied Chemistry*), o termo “elementos terras-raras” compreende os lantanídeos e os elementos escândio e ítrio.

A expressão “terras-raras” está relacionada à origem desses elementos na natureza, como óxidos de aparência terrosa e, além disso, terem sido considerados raros (MARTINS; ISOLANI, 2005). Hoje em dia, sabe-se que essa denominação não é adequada, pois muitos deles não são particularmente raros. Por exemplo, o cério, elemento mais abundante entre os lantanídeos, ocorre em quantidades maiores que o cobre; o túlio é mais abundante que a prata (CARRIJO; ROMERO, 2000).

Neste trabalho, em conformidade com a IUPAC (2005), são considerados ETR o grupo de 15 elementos (lantânio, cério, praseodímio, neodímio, promécio, samário, európio, gadolínio, térbio, disprósio, hólmio, érbio, túlio, itérbio e lutécio) com números atômicos de 57 (La) a 71 (Lu), e ainda o escândio, número atômico 21, e o ítrio, número atômico 39. O

promécio, devido à rápida desintegração de seus isótopos, não ocorre na natureza e, portanto, não será considerado no presente trabalho.

As diversas aplicações que os lantanídeos possuem são devidas, principalmente, às suas propriedades químicas e físicas. Todos os átomos neutros dos elementos da série possuem em comum a configuração eletrônica  $6s^2$  e uma ocupação variável do nível 4f (com exceção do La), conforme mostra a Tabela 11. Entre os lantanídeos, o estado de oxidação mais estável termodinamicamente é o trivalente Ln (III). Entretanto, alguns elementos da série podem ser encontrados nos estados de oxidação II (por exemplo, o Eu) e IV (por exemplo, o Ce). Os orbitais 4f semipreenchidos do átomo no estado trivalente encontram-se protegidos do ambiente químico devido à sua maior proximidade do núcleo e à blindagem realizada pelos elétrons dos orbitais 5s e 5p. Esse fato explica a química de coordenação dos lantanídeos, pois, devido à proteção dos elétrons dos orbitais 4f, há um pequeno envolvimento desses orbitais com os orbitais dos ligantes. Devido a isso, os íons lantanídeos formam complexos com alto caráter iônico, ou seja, os efeitos eletrônicos são bem menos importantes na estabilidade e estrutura de compostos de metais do bloco f do que os efeitos estéricos. Os complexos de lantanídeos mais estáveis são aqueles em que o ligante é volumoso e pode saturar a esfera de coordenação por efeitos estéricos (LEE, 1999).

Tabela 11 - Pesos atômicos e configurações eletrônicas dos elementos terras-raras.

Número atômico	Peso atômico (g/mol)	Símbolo	Raio do íon trivalente em coordenação octaédrica (Å)	Configuração eletrônica do estado fundamental	Configuração eletrônica do íon trivalente
57	138,9055	La	1,032	(Xe)5d <sup>1</sup> 6s <sup>2</sup>	(Xe)4f <sup>0</sup>
58	140,12	Ce	1,01	(Xe)4f <sup>2</sup> 6s <sup>2</sup>	(Xe)4f <sup>1</sup>
59	140,9077	Pr	0,99	(Xe)4f <sup>3</sup> 6s <sup>2</sup>	(Xe)4f <sup>2</sup>
60	144,24	Nd	0,983	(Xe)4f <sup>4</sup> 6s <sup>2</sup>	(Xe)4f <sup>3</sup>
61	145	Pr		(Xe)4f <sup>5</sup> 6s <sup>2</sup>	(Xe)4f <sup>4</sup>
62	150,4	Sm	0,958	(Xe)4f <sup>6</sup> 6s <sup>2</sup>	(Xe)4f <sup>5</sup>
63	151,96	Eu	0,947	(Xe)4f <sup>7</sup> 6s <sup>2</sup>	(Xe)4f <sup>6</sup>
64	157,25	Gd	0,938	(Xe)4f <sup>7</sup> 5d <sup>1</sup> 6s <sup>2</sup>	(Xe)4f <sup>7</sup>
65	158,9254	Tb	0,923	(Xe)4f <sup>9</sup> 6s <sup>2</sup>	(Xe)4f <sup>8</sup>
66	162,50	Dy	0,912	(Xe)4f <sup>10</sup> 6s <sup>2</sup>	(Xe)4f <sup>9</sup>
67	164,9304	Ho	0,901	(Xe)4f <sup>11</sup> 6s <sup>2</sup>	(Xe)4f <sup>10</sup>
68	167,26	Er	0,890	(Xe)4f <sup>12</sup> 6s <sup>2</sup>	(Xe)4f <sup>11</sup>
69	168,9342	Tm	0,880	(Xe)4f <sup>13</sup> 6s <sup>2</sup>	(Xe)4f <sup>12</sup>
70	173,04	Yb	0,868	(Xe)4f <sup>14</sup> 6s <sup>2</sup>	(Xe)4f <sup>13</sup>
71	174,97	Lu	0,861	(Xe)4f <sup>14</sup> 5d <sup>1</sup> 6s <sup>2</sup>	(Xe)4f <sup>14</sup>

Adaptada HENDERSON, 1984; apud NAVARRO, 2004.

Desta maneira, o arranjo dos elétrons ao redor do núcleo dos diferentes ETR é um fator determinante de suas propriedades. A configuração eletrônica destes elementos envolve preenchimento regular da camada interna 4f (enquanto a camada externa 5d permanece vazia) do Ce ao Yb, com exceção do Gd, La e Lu, que apresentam um elétron na camada 5d. No estado oxidado, os elementos não possuem elétrons na camada externa 5d e, portanto, qualquer alteração no número de elétrons será refletida no nível interno 4f. O fato de a configuração eletrônica dos diferentes ETR estar mais confinada às camadas internas do que às externas, define o comportamento químico destes elementos. Desta maneira, a variação dos raios iônicos dos íons dos ETR mostra uma progressão homogênea com o número atômico, para um dado estado de oxidação. Os raios de alguns íons são também função do tamanho e do número de coordenação do sítio ocupado em um mineral. Em geral, quanto maior o número de coordenação, maior será o raio do íon coordenado.

Outra importante característica dos lantanídeos é a ocorrência da contração lantanídica (diminuição do tamanho atômico e iônico com o aumento do número atômico). Isso é devido ao efeito eletrostático associado ao aumento da carga nuclear blindada imperfeitamente pelos elétrons 4f e, como consequência, a basicidade dos elementos decresce ao longo da série (LEE, 1999). Deste modo, o La é o mais básico da série e apresenta o maior raio iônico, e o Lu o de menor basicidade e menor raio iônico. Essa diferença de basicidade ao longo da série influencia a hidrólise dos íons, a solubilidade e a decomposição dos sais, a formação de espécies complexas e é responsável pela separação dos mesmos por métodos de fracionamento (MARTINS; ISOLANI, 2005; JONES, 2001).

### 2.3.1 Determinação de Elementos Terras Raras (ETR)

Diversas técnicas têm sido utilizadas para a determinação de ETR. Dentre as quais, podem ser citadas: a espectrometria de fluorescência de raios-X (XRF) (MUIA; VAN GRIEKEN, 1991), a análise por ativação neutrônica (NAA) (EL-TAHER, 2010), a eletroforese capilar (CE) (SUN et al., 2006), a espectrometria de emissão atômica com atomização eletrotérmica em filamento de tungstênio (WC-AES) (DONATI et al., 2008), a espectrometria de massa com plasma indutivamente acoplado em conjunto com a ablação a *laser* (LA-ICP-MS) (BECKER et al., 2000), a espectrometria de emissão óptica com fonte de plasma

indutivamente acoplado (ICP-OES) (NAVARRO, et al. 2002), a espectrometria de massa com fonte de plasma indutivamente acoplado (ICP-MS) (PANDAY et al., 1997; AUGAGNEUR et al., 1996; LAWRENCE et al., 2006; JOEBSTL et al., 2010) e ICP-MS em conjunto com a vaporização eletrotérmica (ETV-ICP-MS) (HE et al., 2005).

As técnicas de ICP-OES e ICP-MS são as mais utilizadas, uma vez que são multielementares, conferem boa precisão, exatidão e rapidez de análise. A determinação de lantanídeos por ETV-ICP-MS é difícil, uma vez que esses elementos são refratários e formadores de carbetos com o material constituinte do atomizador (tubo de grafite), o que resulta em perda de sensibilidade e efeito de memória. A espectrometria de absorção atômica com forno de grafite (GF AAS) e a espectrometria de absorção atômica com chama (F AAS), muito utilizadas para a determinação de diversos elementos, não são recomendadas para a determinação de lantanídeos, a GF AAS, devido à formação de carbetos, e a F AAS, devido à formação de óxidos refratários na chama (BYRNE; CARAMBASSIS, 1996).

Nas determinações por ICP-MS, podem ocorrer interferências isobáricas causadas por íons atômicos e moleculares, Tabela 12. As principais interferências são causadas por isótopos, hidróxidos e óxidos de lantanídeos de massa molecular mais baixa, que interferem na determinação dos lantanídeos de massa molecular mais alta. Por exemplo,  $^{155}\text{Gd}$  e  $^{162}\text{Dy}$  sofrem interferências dos íons moleculares  $^{139}\text{La}^{16}\text{O}^+$  e  $^{139}\text{Nd}^{16}\text{O}^+$ , respectivamente. Além disso, caso o bário esteja presente nas amostras, seus óxidos e hidróxidos podem interferir nos sinais do Nd, Sm e Eu (BECKER; DIETZE, 1995; HALICZ et al., 2006, RAJU et al., 2010).

Com o uso de espectrômetros de alta resolução, grande parte das interferências anteriormente citadas, pode ser minimizada (BECKER; DIETZE, 1997). Entretanto, mesmo que o espectrômetro seja operado com a máxima capacidade de resolução, esta não é suficiente quando a concentração do interferente é maior que a do analito. Augagneur e colaboradores determinaram lantanídeos em vinho e observaram que, mesmo utilizando espectrômetro de ICP-MS de alta resolução, não foi possível reduzir as interferências isobáricas causadas pelos íons moleculares (AUGAGNEUR et al., 1996). Alternativas têm sido utilizadas como, por exemplo, a separação da matriz (DAY et al., 2000) ou a nebulização acoplada a um sistema de dessolvatação (D'LLIO et al., 2006). Neste tipo de nebulização, o número de moléculas do solvente que entram no plasma é reduzido significativamente e, conseqüentemente, a formação de óxidos e hidróxidos interferentes também é reduzida. Malik e colaboradores determinaram baixas concentrações de lantanídeos em amostras biológicas por ICP-MS, comparando a eletroforese capilar à nebulização pneumática associada a um

sistema com dessolvatação. Os dois métodos possibilitaram a determinação dos lantanídeos com redução das interferências isobáricas causadas por íons atômicos e poliatômicos (MALIK et al., 2007).

Uma maneira de evitar possíveis interferências é a separação da matriz antes da medida do analito. Neste sentido, Halicz e colaboradores determinaram lantanídeos por ICP-MS em amostras de água com alto teor de sais, utilizando resina quelante para retirar a matriz (HALICZ et al., 2006). Da mesma forma, Navarro e colaboradores determinaram lantanídeos por ICP-OES em materiais geológicos, utilizando uma coluna de troca catiônica para a separação da matriz e nebulização ultrassônica para a introdução das amostras no plasma (NAVARRO et al., 2002).

Em outro trabalho, Zang e colaboradores determinaram impurezas de lantanídeos em óxido de érbio de alta pureza, dissolvido em ácido nítrico, por ICP-MS. As interferências causadas por isótopos de Er nas determinações de  $^{165}\text{Ho}$  e  $^{169}\text{Tm}$  foram minimizadas mediante ajuste da resolução do quadrupolo de modo a obter uma separação entre 0,7 e 0,3 u. As interferências da matriz, ou seja, não isobáricas, causadas nas determinações dos outros elementos da série dos lantanídeos, foram compensadas mediante utilização de índio como padrão interno (ZHANG et al., 2006).

Tabela 12 - Possíveis interferentes na determinação de lantanídeos por ICP-MS.

Elemento	m/z	Abundância (%)	Espécies Interferentes
La	139	99,91	
Ce	140	84,48	
Pr	141	100	
Nd	142	27,13	$^{124}\text{Ce}^+$
Nd	144	23,80	$^{144}\text{Sm}^+$
Nd	146	17,19	$^{130}\text{Ba}^{16}\text{O}^+$
Sm	152	26,7	$^{136}\text{Ba}^{16}\text{O}^+$
Sm	154	22,7	$^{138}\text{Ba}^{16}\text{O}^+$
Eu	153	52,2	$^{137}\text{Ba}^{16}\text{O}^+$
Eu	154	47,8	$^{135}\text{Ba}^{16}\text{O}^+$
Gd	155	14,8	$^{139}\text{La}^{16}\text{O}^+$
Gd	156	30,47	$^{140}\text{Ce}^{16}\text{O}^+$
Gd	158	24,84	$^{142}\text{Ce}^{16}\text{O}^+$
Tb	159	100	$^{143}\text{Nd}^{16}\text{O}^+$
Dy	164	28,2	$^{148}\text{Sm}^{16}\text{O}^+$
Dy	162	25,5	$^{146}\text{Nd}^{16}\text{O}^+$
Dy	163	24,9	$^{147}\text{Sm}^{16}\text{O}^+$
Ho	165	100	$^{149}\text{Sm}^{16}\text{O}^+$
Er	166	33,6	$^{151}\text{Eu}^{16}\text{O}^+$
Er	167	22,9	$^{150}\text{Nd}^{16}\text{O}^+$
Tm	169	100	$^{153}\text{Eu}^{16}\text{O}^+$
Yb	174	31,8	$^{158}\text{Gd}^{16}\text{O}^+$
Yb	172	21,9	$^{156}\text{Gd}^{16}\text{O}^+$
Lu	175	97,4	$^{159}\text{Tb}^{16}\text{O}^+$

Adaptada DULSKI, 1994.

## **3 OBJETIVOS**

### **3.1 Objetivos gerais**

O objetivo deste trabalho é avaliar os metais presentes como contaminantes em contrastes a base de quelatos de gadolínio, utilizados em exames de ressonância magnética, e suas reações de transmetalção.

### **3.2 Objetivos específicos**

- Investigar o melhor tipo de preparo da amostra para a determinação dos metais.
- Determinar os ETR presentes como impurezas nas amostras por espectrometria de massas com plasma indutivamente acoplado e por espectrometria de absorção atômica de alta resolução com fonte contínua.
- Determinar outros elementos que possam estar presentes na forma de contaminantes, por técnicas de espectrometria de absorção atômica.
- Avaliar a possível transmetalção do Gd pelos metais presentes como contaminantes, por cromatografia líquida de alta eficiência com detecção por espectrometria de massa.

### **3.3 Questões a serem respondidas com este estudo**

- Os elementos presentes como impurezas nos óxidos de gadolínio estarão presentes, como contaminantes, nas formulações a base de quelatos de Gd?
- Estarão estes elementos na sua forma livre ou complexada?
- Serão estes elementos capazes de promover reações de transmetalção?

## 4 MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 Instrumentação

- Espectrômetro de absorção atômica Analytik Jena AG (Jena, Alemanha) modelo novAA 300.
- Espectrômetro de absorção atômica modelo ZEE nit 600 equipado com atomizador de grafite (Analytik Jena, Jena Alemanha); amostrador automático modelo MPE 60; corretor de fundo com efeito Zeeman.
- Espectrômetro de absorção atômica (Varian, Melbourne, Austrália), equipado com gerador de hidretos por fluxo contínuo VGA 77.
- Espectrômetro de absorção atômica de fonte contínua modelo ContrAA 700 equipado com: atomizador de grafite (Analytik Jena, Jena Alemanha); amostrador automático modelo MPE 60.
- Espectrômetro de massas com plasma indutivamente acoplado modelo ELAN 6000 (Perkin-Elmer Sciex, Thornhill, Toronto, Canadá), com introdução de amostras por nebulização pneumática de fluxo cruzado, acoplada a uma câmara de nebulização de dupla passagem do tipo *Scott* (Perkin-Elmer Sciex, Thornhill, Toronto, Canadá). Uma bomba peristáltica (Perkin-Elmer Sciex, Thornhill, Toronto, Canadá) foi utilizada para a aspiração das amostras.
- Cromatógrafo líquido (Agilent Technologies), equipado com bomba binária 1260 e detector de massas 6430 Tripe Quad.
- Digestor UV (fabricação própria) com lâmpada de mercúrio de alta pressão (400 W) e tubos de quartzo.

- Mufla elétrica (Heraeus, MR-170E).
- Lâmpadas de cátodo oco (Photron, Austrália).
- Coluna Analítica: SeQuant - ZIC®-HILIC (dimensões 150 x 2,1 mm, 3,5 $\mu$ m, 200Å) (Merck, Alemanha).
- Câmara de fluxo laminar classe 100, modelo FLK, série 683 (Trox Technik, Curitiba, Brasil).
- Destilador de ácidos (Distillacid, Bergrof BSB 939-IR, Eningen, Alemanha).
- pHmetro digital DM 20 (Digimed).
- Lavadora ultrassônica Ultra Cleaner (Unique).
- Balança Analítica com precisão de 0,1 mg (Sartorius).
- Sistema de purificação de água Milli-Q, resistividade 18,2 M $\Omega$  cm<sup>-1</sup> (Millipore, Bedford, MA, USA).
- Sistema de filtração de eluente (Sartorius).
- Bureta - Graduação 0,5 mL - Tolerância  $\pm$  0,05 mL - Capacidade 25 mL (Labor).
- Micropipeta mecânica monocanal volume variável 10  $\mu$ L a 100  $\mu$ L (Digipet).
- Micropipeta mecânica monocanal volume variável 100  $\mu$ L a 1000  $\mu$ L (Digipet).
- Pipeta mecânica monocanal volume variável 5 mL a 10 mL (Digipet).
- Refrigerador R310 (Electrolux).

## 4.2 Reagentes

Todos os reagentes utilizados estão listados no Apêndice A. Os ácidos  $\text{HNO}_3$  e  $\text{HCl}$  foram previamente purificados com destilação *sub-boiling*, utilizando um destilador (Berghof). Para análise no ICP-MS, foi utilizada solução padrão multielementar de lantanídeos contendo  $100 \text{ mg L}^{-1}$  (SpecSol), além de uma solução padrão de Rh  $1000 \text{ mg L}^{-1}$  (SpecSol). Para análise por AAS, utilizaram-se soluções padrão unielementares contendo  $1000 \text{ mg L}^{-1}$  de cada elemento, todas obtidas da SepcSol.

## 4.3 Soluções

O preparo das soluções e manipulação das amostras foi realizado em câmara de fluxo laminar classe 100 (Trox Technik). A água deionizada de alta pureza (resistividade  $18,2 \text{ M}\Omega \text{ cm}^{-1}$ ) foi obtida usando um sistema destilação/deionização seguida de um Milli-Q. Todas as soluções foram estocadas em tubos de polietileno previamente descontaminados. Para análise por titulação complexométrica, foram preparadas soluções de EDTA e de sulfato de zinco, ambas na concentração de  $0,025 \text{ mol L}^{-1}$ , solução-tampão  $\text{NH}_4\text{Cl}/\text{NH}_4\text{OH}$  ( $\text{pH}=10$ ), bem como o indicador sólido negro de eriocromo - T 1% (m/m) em  $\text{NaCl}$ .

Para a realização das medidas por GF AAS, soluções padrão estoque individuais de Si (IV), Gd (III), Al (III), Cr (III), Fe (III), Ba (II), Cu (II), Pb (II) e Zn (II) foram preparadas em 0,1% (v/v) de  $\text{HNO}_3$  na concentração  $10 \text{ mg L}^{-1}$  pela diluição apropriada de soluções padrão unielementares de concentração  $1000 \text{ mg L}^{-1}$ . O modificador cloreto de cálcio ( $\text{CaCl}_2$ ) foi preparado pesando quantidade suficientes para preparar solução 1% (m/v). Nitrato de magnésio ( $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$ ) e nitrato de paládio ( $\text{Pd}(\text{NO}_3)_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ) foram preparados na concentração de  $2 \text{ g L}^{-1}$ . O volume utilizado do modificador foi de  $5 \mu\text{L}$ .

Na determinação de Ca por F AAS, as soluções de calibração foram preparadas a partir de diluições apropriadas da solução padrão de Ca (II)  $1000 \text{ mg L}^{-1}$ . Na determinação de As (III) por HG AAS foram preparadas soluções padrão individuais, a partir da diluição da solução padrão de As  $1000 \text{ mg L}^{-1}$ . Também foi preparada a solução do redutor boro-hidreto de sódio ( $\text{NaBH}_4$ ) 1% (m/v) em  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  de  $\text{NaOH}$ .

Para as medidas por ICP-MS, as soluções de calibração foram preparadas, a partir de diluições apropriadas de solução padrão multielementar (contendo 100 mg L<sup>-1</sup> de Ce, Dy, Er, Eu, Gd, Ho, La, Lu, Nd, Pr, Sm, Sc, Tb, Tm, Yb e Y). Em todas as determinações foi utilizada a calibração externa.

Na determinação de Yb, Sm e Lu, por espectrometria de absorção atômica de alta resolução com fonte contínua (HR-CS AAS), foram preparadas soluções padrão individuais, a partir da diluição da solução padrão de 1000 mg L<sup>-1</sup> de cada um dos elementos. O modificador cloreto de cálcio (CaCl<sub>2</sub>) foi preparado pesando quantidade suficiente para preparar soluções 1% (m/v) e o nitrato de paládio (Pd(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O) na concentração de 2 g L<sup>-1</sup>. O volume utilizado do modificador foi de 5 µL.

Para a investigação das reações de transmetalção por cromatografia líquida com detecção por espectrometria de massas (LC-MS), foram preparadas amostras sintéticas. As soluções preparadas tiveram o pH ajustado e foram filtradas. A solução eluente foi preparada no dia da análise, sendo constituída de formiato de amônio 10 mmol L<sup>-1</sup> em uma mistura de acetonitrila/água (10:90), filtrada em um sistema de filtração de eluentes (Sartorius) e posteriormente desaerada em uma lavadora ultrassônica (Ultra Cleaner Unique).

#### 4.4 Controle de contaminação

Todos os materiais plásticos utilizados, balões volumétricos, béqueres, ponteiras, tubos, foram descontaminados pela imersão em solução de 10% (v/v) de HNO<sub>3</sub> em etanol por 48 horas, enxaguados de 3 a 5 vezes com água ultrapura e secos em câmara de fluxo laminar antes do uso. A bureta, os *erlenmeyers* e demais recipientes de vidro foram descontaminados por imersão em solução de 10% (v/v) HNO<sub>3</sub> em água por no mínimo 24 horas e lavados com água ultrapura em abundância.

A contaminação pelo ar foi evitada utilizando-se câmara de fluxo laminar classe 100 para a secagem do material, preparo de soluções e amostras. A câmara de fluxo laminar foi limpa com etanol comercial e ligada 30 minutos antes de seu uso.

#### 4.5 Amostras

As amostras utilizadas neste estudo foram agentes de contraste a base de quelatos de Gd, utilizados para exames de RM. As amostras foram obtidas a partir de doações da Clínica DIX-Serviço de diagnóstico por imagem do Hospital de Caridade Dr. Astrogildo de Azevedo (Santa Maria-RS) e também por colaboração do Grupo Hospitalar Conceição e da Clínica Clinoson (Porto Alegre-RS). Neste trabalho, foram usadas as seguintes amostras:

Tabela 13 - Amostras utilizadas.

Nome comercial	Abreviatura	Composto	Excipientes	Fabricante
Magnevistan®	Gd-DTPA <sup>2-</sup>	gadopentetato de dimeglumina 469 mg (0,5 mmol)	água para injetáveis	Bayer Schering Pharma AG/ Alemanhã
Viewgam®	Gd-DTPA <sup>2-</sup>	gadopentetato de dimeglumina 46 9 mg (0,5mmol)	água para injetáveis	Bacon/ Argentina
OptiMARK®	Gd-DTPA-BMEA	Gadoversetamida 330,9 mg (0,5 mmol)	versetamida sódica, versamida de cálcio, cloreto de cálcio di-hidratado, água para injetáveis.	Mallinckrodt/ Estados Unidos
Omniscan®	Gd-DTPA-BMA	Gadodiamida 287 mg (0,5 mmol)	caldiamida sódica, água para injetáveis.	GE/ Estados Unidos
Dotarem®	Gd-DOTA <sup>1-</sup>	ácido gadotérico 0,27932g (0,5 mmol)	meglumina, água para injetáveis.	Guerbet Produtos Radiológicos Ltda/Brasil
Gadovist®	Gd-BTDO3A	Gadobutrol 604,72 mg (1,0mmol)	calciobutrol sódico, trometamol, ácido clorídrico, água para injetáveis.	Bayer Schering Pharma AG / Alemanhã

#### 4.5.1 Preparo das amostras

##### 4.5.1.1 Preparo das amostras para a análise por titulação de retorno

Uma alíquota de 1 mL de cada amostra (Omniscan®, Magnevistan® e Gadovist®) foi transferida para um cadinho de porcelana, previamente descontaminado. O mesmo foi tampado e levado à mufla por 6 horas (2 horas a 100 °C e 4 horas a 800 °C). Após serem retirados da mufla, os cadinhos foram esfriados a temperatura ambiente em dessecador. Foram adicionados 1 mL de HNO<sub>3</sub> bidestilado e 1 mL de água ultrapura. Os cadinhos foram deixados em repouso em câmara de fluxo laminar por 15 minutos. A solução obtida foi transferida para um frasco graduado de polietileno e o volume foi aferido a 25 mL. O procedimento foi realizado em triplicata.

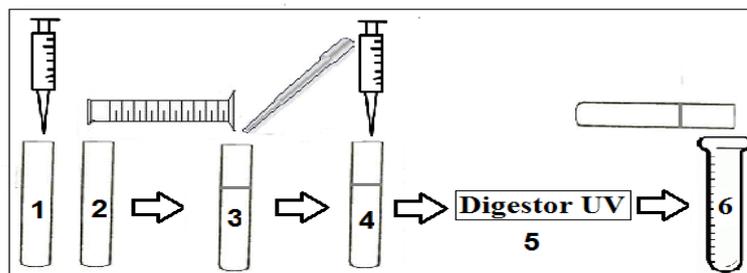
Posteriormente, em câmara de fluxo laminar, foram transferidos 5 mL de cada amostra, submetidos ao procedimento descrito acima, para frascos de polipropileno descontaminados, aos quais também foram adicionados 1 mL do tampão NH<sub>4</sub>Cl/NH<sub>4</sub>OH (pH=10) e 10 mL de EDTA 0,025 mol L<sup>-1</sup>. Os frascos foram fechados, agitados e colocados em banho-maria a 70 °C por 3 horas. Ao término das 3 horas, as soluções foram esfriadas a temperatura ambiente e, então, transferidas para *erlenmeyers*, onde foram adicionadas de uma ponta de espátula do indicador eriocromo-T 1%, para serem tituladas com solução padrão de sulfato de zinco 0,025 mol L<sup>-1</sup>.

##### 4.5.1.2 Preparo das amostras para a análise por técnicas espectrométricas

As amostras foram decompostas por três procedimentos diferentes:

**Procedimento 1:** Uma alíquota de 200 µL de cada amostra foi transferida para tubos de quartzo, aos quais foram adicionados inicialmente 6 mL de água ultrapura, 100 µL de HNO<sub>3</sub> destilado e 100 µL de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. A mistura foi levada a um digestor UV equipado com uma lâmpada de mercúrio de alta pressão (400 W). O sistema foi mantido na temperatura de 40 °C. O tempo total de decomposição UV foi de 4 horas, sendo que a cada hora foram

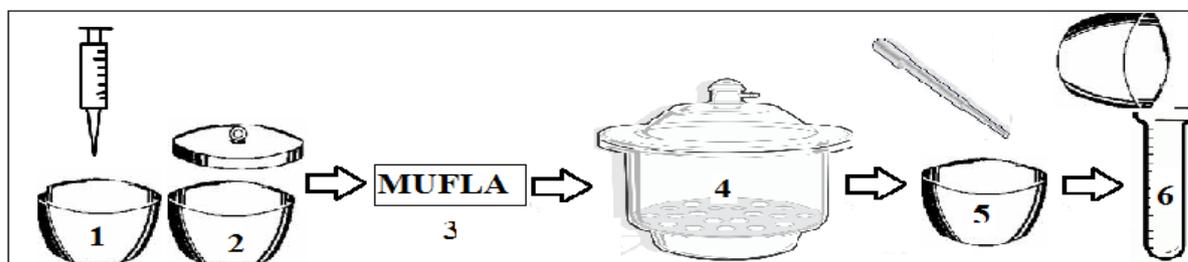
adicionados 100  $\mu\text{L}$  de  $\text{H}_2\text{O}_2$ , totalizando 400  $\mu\text{L}$  de  $\text{H}_2\text{O}_2$  adicionado as amostras. Após o resfriamento, a temperatura ambiente, a solução obtida foi transferida para um frasco graduado de polietileno e o volume foi elevado a 10 mL com água ultrapura. Na figura 7 pode ser observado o esquema de como foi realizado este procedimento.



- |  |   |
|--|---|
| 1- Alíquota de 200 $\mu\text{L}$ amostra         | 4- Adição de 100 $\mu\text{L}$ de $\text{H}_2\text{O}_2$                            |
| 2- Adição de 6 mL de água ultrapura              | 5- Digestor UV (a cada hora adição de 100 $\mu\text{L}$ de $\text{H}_2\text{O}_2$ ) |
| 3- Adição de 100 $\mu\text{L}$ de $\text{HNO}_3$ | 6- Transferência de frasco e aferição de volume a 10 mL                             |

Figura 7 - Preparo das amostras pelo procedimento 1.

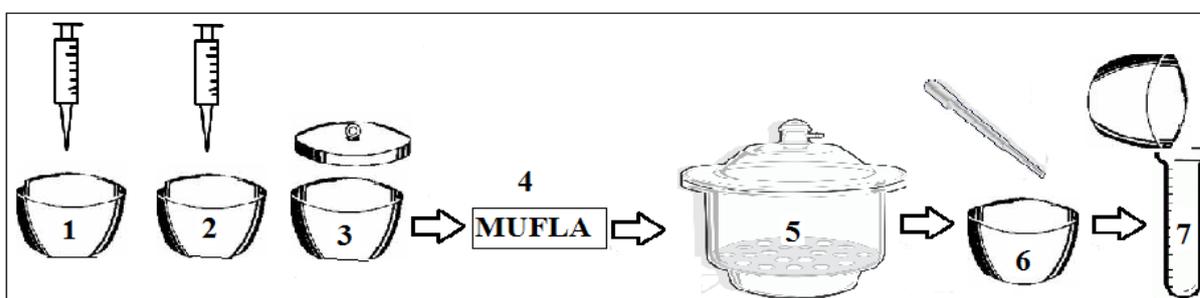
**Procedimento 2:** Uma alíquota de 500  $\mu\text{L}$  de cada amostra foi transferida para cadinhos de porcelana, previamente descontaminados. Os mesmos foram tampados e levados à mufla por 5 horas (1 hora a 100  $^{\circ}\text{C}$  e 4 horas a 800  $^{\circ}\text{C}$ ). Após serem retirados da mufla, os cadinhos foram esfriados a temperatura ambiente em dessecador. Foram adicionados 500  $\mu\text{L}$  de  $\text{HNO}_3$  destilado e 1 mL de água ultrapura. Os cadinhos foram deixados em repouso em câmara de fluxo laminar por 15 minutos. A solução obtida foi transferida para um frasco graduado de polietileno e o volume foi elevado a 25 mL. A Figura 8 representa este procedimento.



- |  |   |
|--|---|
| 1- Alíquota de 500 $\mu\text{L}$ de cada amostra                             | 4- Dessecador ( $T^{\circ}\text{C}$ ambiente)                             |
| 2- Cadinho tampado   | 5- Adição de 500 $\mu\text{L}$ de $\text{HNO}_3$ e 1 mL de água ultrapura |
| 3- Mufla: 5 h (1 h a 100 $^{\circ}\text{C}$ e 4 h a 800 $^{\circ}\text{C}$ ) | 6- Transferência de frasco e aferição de volume a 25 mL                   |

Figura 8 - Preparo das amostras pelo procedimento 2.

**Procedimento 3:** Uma alíquota 200  $\mu\text{L}$  de cada amostra foi transferida para cadinhos de porcelana previamente descontaminados, aos quais foram adicionados 200  $\mu\text{L}$  de  $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$   $2\text{g L}^{-1}$ , os cadinhos foram tampados e levados à mufla por 5 horas (1 hora a  $100\text{ }^\circ\text{C}$  e 4 horas a  $800\text{ }^\circ\text{C}$ ). Após serem retirados da mufla, os cadinhos foram esfriados a temperatura ambiente em dessecador. Foram adicionados 200  $\mu\text{L}$  de HCl destilado e 1 mL de água ultrapura. Os cadinhos foram deixados em repouso em câmara de fluxo laminar por 15 minutos. A solução obtida foi transferida para um frasco graduado de polietileno e o volume foi elevado a 10 mL, como pode ser observado na Figura 9.



- |  |  |
|--|--|
| 1- Alíquota de 200 $\mu\text{L}$ de cada amostra                                       | 4- Dessecador ( $T\text{ }^\circ\text{C}$ ambiente)            |
| 2- Alíquota de 200 $\mu\text{L}$ de $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$ $2\text{g L}^{-1}$      | 5- Adição de 200 $\mu\text{L}$ de HCl e 1 mL de água ultrapura |
| 3- Cadinho tampado   | 6- Transferência de frasco e aferição de volume a 10 mL        |
| 4- Mufla: 5 h (1 h a $100\text{ }^\circ\text{C}$ e 4 h a $800\text{ }^\circ\text{C}$ ) |  |

Figura 9 – Preparo das amostras pelo procedimento 3.

#### 4.5.1.3 Preparo das amostras para a análise por cromatografia

Para a análise cromatográfica, foram utilizadas amostras sintéticas, ou seja, preparadas a partir das soluções padrão dos metais em estudo, misturadas ao complexante ácido dietileno triamino penta-acético (DTPA). Todas as soluções foram preparadas e manipuladas em câmara de fluxo laminar.

Primeiramente foi preparada uma solução estoque de DTPA, na concentração de  $6,360\text{ m mol}^{-1}$ , em 0,6% (v/v) de  $\text{NH}_4\text{OH}$ . Esta solução foi utilizada para preparar a solução de trabalho Gd-DTPA  $0,636\text{ m mol}^{-1}$ , que teve seu pH ajustado a 7,30. Esta, por sua vez, foi utilizada para preparar as amostras utilizadas neste estudo.

A concentração de  $0,0636 \text{ m mol}^{-1}$  do complexo Gd-DTPA foi mantida em cada solução, sendo a concentração do outro metal em investigação variada de modo a ter em solução as proporções 1:0,5, 1:1 e 1:2 em relação à concentração de Gd. Todas as soluções foram preparadas em frascos descontaminados de polietileno de 50 mL, e tiveram seu pH ajustado entre 7,20 - 7,30, utilizando ácido acético e nitrato de amônio. Após o ajuste do pH, as soluções foram transferidas para balões volumétricos de 50 mL, previamente descontaminados, tiveram seu volume aferido. Cada solução foi individualmente filtrada, utilizando filtros de seringa de acetato de celulose esterilizados, e armazenadas em frascos de polietileno descontaminados, guardados em geladeira na temperatura de 4 - 5°C.

No dia da análise cromatográfica, uma alíquota de 2 mL de cada amostra sintética foi retirada, filtrada e transferida para os frascos do amostrador automático do LC-MS, os frascos foram previamente descontaminados. Na Tabela 14 podem ser observadas as amostras sintéticas preparadas para o estudo da transmetalção, utilizando análise cromatográfica.

Tabela 14 - Amostras sintéticas para o estudo da transmetalção.

Metal	Conc.1 ( $\text{m mol}^{-1}$ )	pH	Conc.2 (mM)	pH	Conc.3 (mM)	pH
Lantânio	0,0288	7,22	0,0648	7,28	0,1440	7,25
Neodímio	0,0277	7,22	0,6933	7,25	0,1386	7,23
Samário	0,0266	7,24	0,0665	7,21	0,1330	7,22
Európio	0,0263	7,27	0,0658	7,22	0,1316	7,20
Térbio	0,0252	7,27	0,0629	7,26	0,1259	7,25
Disprósio	0,0246	7,21	0,0615	7,30	0,1231	7,28
Hólmio	0,0242	7,21	0,0606	7,21	0,1213	7,22
Túlio	0,0237	7,24	0,0651	7,28	0,1184	7,27
Itérbio	0,0231	7,24	0,0693	7,20	0,1156	7,23
Lutécio	0,0229	7,23	0,6858	7,22	0,1143	7,22
Cálcio	0,0250	7,24	0,0649	7,23	0,1247	7,27
Zinco	0,0306	7,29	0,0612	7,25	0,1224	7,29
Cobre	0,0315	7,29	0,0629	7,27	0,1259	7,20
Ferro	0,0358	7,20	0,0712	7,28	0,1432	7,24
Alumínio	0,0370	7,20	0,0741	7,28	0,1482	7,23
Cromo	0,0385	7,27	0,0769	7,20	0,1538	7,24
Chumbo	0,0289	7,27	0,0675	7,25	0,0965	7,28
Bário	0,0291	7,21	0,0655	7,20	0,1165	7,27
Silício	0,0356	7,25	0,0712	7,26	0,1424	7,23
Arsênio	0,0267	7,25	0,6673	7,26	0,1335	7,27
Gd-DTPA	0,0636	7,27	0,0636	7,20	0,0636	7,23
DTPA	0,0636	7,29	0,0636	7,22	0,0636	7,30
Tampão pH=7	-	7,13	-	7,14	-	7,14
Tampão pH=4	-	4,27	-	4,23	-	4,09

## 4.6 Avaliação das condições instrumentais

### 4.6.1 Determinação dos ETR por ICP-MS

Para a determinação dos ETR, foi utilizado um espectrômetro de ICP-MS (Perkin-Elmer Sciex), modelo ELAN 6000. Argônio de pureza mínima de 99,996% (White Martins) foi utilizado para a geração do plasma, como gás de nebulização e gás auxiliar. O equipamento de ICP-MS foi disponibilizado pelo Laboratório de Análise de Resíduos do Centro de Ciências Físicas e Matemáticas da Universidade Federal de Santa Catarina – UFSC.

Para a avaliação das condições instrumentais, foram feitas leituras da solução no *Daily Performance* antes do início das análises. Foram avaliados os valores de contagens obtidos e a razão  $\text{CeO}^+/\text{Ce}^+$ . Os parâmetros ficaram dentro da faixa especificada pelo fabricante.

Foi utilizado o nebulizador pneumático de fluxo cruzado acoplado a uma câmara de nebulização de dupla passagem do tipo *Scott* Perkin-Elmer Sciex. Os principais parâmetros instrumentais utilizados e o sistema de introdução da amostra no plasma estão listados no Apêndice B.

O método foi otimizado pela determinação das condições operacionais, com o objetivo de atingir máxima sensibilidade para os analitos investigados. Para a vazão do gás nebulizador foi obtido o valor de  $1,05 \text{ L min}^{-1}$  e aplicado nas medidas. O fluxo do gás auxiliar foi de  $1,2 \text{ L min}^{-1}$ , em função do aumento nas intensidades dos sinais para os isótopos estudados. A potência da radiofrequência foi otimizada para o padrão aquoso contendo  $10 \mu\text{g L}^{-1}$  de ETR entre 800 e 1200 W; a maioria dos analitos aumentou a intensidade dos sinais a um máximo de 1100 W.

De posse destes valores otimizados, a determinação dos ETR foi realizada utilizando introdução da amostra no plasma por nebulização pneumática e calibração externa com padrões aquosos com o uso de Rh como padrão interno.

As determinações iniciaram pela avaliação do branco da curva e após as soluções aquosas de calibração, sendo o mesmo procedimento realizado para as amostras. Em todas as amostras foi acrescentado Rh  $10 \mu\text{g L}^{-1}$  para uso como padrão interno nas determinações. As amostras analisadas foram decompostas tanto na mufla elétrica, como no digestor UV, conforme descrito no item 4.5.1.2.

#### 4.6.2 Determinação de Sm, Yb e Lu por HR-CSAAS

As medidas de Sm, Yb e Lu foram realizadas no espectrômetro de absorção atômica de fonte contínua ContrAA 700 (Analytik Jena, Jena Alemanha), equipado com atomizador de grafite e amostrador automático modelo MPE 60. As leituras foram feitas com a absorvância integrada, modo área do pico, e as medidas foram realizadas em duplicata. As amostras analisadas por HR-CSAAS foram decompostas em mufla elétrica, conforme descrito no item 4.5.1.2. A parede interna dos fornos de grafite foram revestidas com 0,5 mg de zircônio, através de um programa específico (Apêndice C). O recobrimento do forno foi necessário a cada 80 queimas, ou quando a recuperação dos padrões aquosos não era satisfatória. Foi aceito um limite de recuperação de 80 a 120% da concentração de Yb, Sm e Lu.

Curvas de pirólise e de atomização foram realizadas para certificar as temperaturas que deveriam ser escolhidas para cada metal. A amostra selecionada para confecção das curvas de pirólise e atomização foi Dotarem®. Uma alíquota de 200 µL desta amostra foi fortificada com os padrões Yb, Sm e Lu na concentração de 20, 50 e 100 µg L<sup>-1</sup>, respectivamente. As amostras fortificadas com os padrões foram decompostas em mufla em triplicata. Ao final da digestão, foram adicionados 200 µL de HNO<sub>3</sub> às amostras. As mesmas foram transferidas para balões volumétricos, onde tiveram seu volume aferido a 10 mL com água ultrapura. As amostras digeridas foram diluídas duas vezes, de modo que a concentração dos metais adicionados ficasse em 10, 25 e 50 µg L<sup>-1</sup> e que a concentração de Gd da matriz fosse reduzida em 100 vezes, ficando em torno de 786 mg L<sup>-1</sup>. Após esta diluição, as mesmas foram utilizadas para a obtenção das curvas de pirólise e atomização de cada metal em questão. No Apêndice C podem ser observados os parâmetros selecionados para a determinação de Sm, Yb e Lu.

As curvas de calibração foram confeccionadas automaticamente pela diluição de padrões estoques unielementares de cada metal, nas concentrações de Sm 50 µg L<sup>-1</sup>, Yb 10 µg L<sup>-1</sup> e Lu 150 µg L<sup>-1</sup>. Para a otimização dos métodos, foram verificados os coeficientes de correlação linear (r), obtidos pelas curvas de calibração (HARRIS, 2008). A sensibilidade do método foi determinada pelas massas características e os limites de detecção foram calculados pela inclinação das curvas (ANVISA, 2003). Testes de recuperação foram executados e os respectivos desvios padrão das medidas calculados.

#### 4.6.3 Determinação de metais por GF AAS

As medidas de Zn, Cu, Fe, Al, Cr, Pb, Ba e Si foram realizadas em um espectrômetro de absorção atômica com forno de grafite (Analytik Jena, Jena Alemanha). Lâmpadas de cátodo oco de cada um dos elementos em estudo foram utilizadas. As leituras foram feitas com a absorvância integrada, modo área do pico, correção de fundo Zeeman e com gás inerte argônio de elevada pureza 99,9997% (White Martins). As medidas foram realizadas em duplicata.

As amostras analisadas por GF AAS foram decompostas em mufla elétrica, conforme descrito no item 4.5.1.2. A parede interna ou a plataforma dos fornos de grafite foram revestidos com Zr (Apêndice C). O recobrimento do forno foi necessário a cada 80 queimas, ou quando a recuperação das amostras fortificadas não era satisfatória. Foi aceito um limite de recuperação entre 80 e 120% do padrão adicionado às amostras (RIBANI et al., 2004).

Curvas de pirólise e de atomização foram realizadas para certificar as temperaturas que deveriam ser escolhidas para cada metal. A amostra selecionada para confecção das curvas de pirólise e atomização foi o Dotarem®. Uma alíquota 200 µL desta amostra foi fortificada dos padrões Zn, Cu, Al, Ba, Cr e Pb na concentração de 25 µg L<sup>-1</sup> cada, do padrão de Fe 50 µg L<sup>-1</sup> e do padrão de Si 250 µg L<sup>-1</sup>. O procedimento de decomposição na mufla foi utilizado e realizado em triplicata (Procedimento 2, item 4.5.1.2). Para os metais Zn, Si, Ba e Fe, as curvas de pirólise e atomização foram obtidas sem a utilização de modificador e com a utilização de modificador. Os modificadores utilizados, bem como os programas de temperatura para a análise dos metais acima citados, estão descritos no Apêndice D.

As curvas de calibração foram confeccionadas automaticamente pela diluição de padrões estoques unielementares de cada metal, nas concentrações de 30 µg L<sup>-1</sup> para o Zn, 50 µg L<sup>-1</sup> para o Cu, Al, Ba, Cr e Pb, 100 µg L<sup>-1</sup> para o Fe e 500 µg L<sup>-1</sup> para o Si. Para a otimização dos métodos, foram verificados os coeficientes de correlação linear (r) obtidos pelas curvas de calibração. A sensibilidade dos métodos foi determinada pelas massas características e os limites de detecção foram calculados pela inclinação das curvas. Testes de recuperação e os desvios padrão das medidas também foram considerados.

#### 4.6.4 Determinação de As por HG AAS

Para a determinação do As foi utilizado um espectrômetro de absorção atômica (Varian), equipado com gerador de hidretos por fluxo contínuo VGA 77. As amostras decompostas em mufla elétrica, conforme descrito no item 4.5.1.2, foram aspiradas numa vazão de  $8 \text{ mL min}^{-1}$ ; e as soluções de HCl e  $\text{NaBH}_4$  1% (m/v) em NaOH  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ , a  $1 \text{ mL min}^{-1}$ . A arsina gerada foi separada em um separador gás-líquido e carregada por um fluxo de nitrogênio à cela de atomização, a qual foi aquecida por um controlador térmico. As condições do equipamento estão descritas no Apêndice E.

A curva analítica foi feita pela determinação de quatro padrões de As, nas concentrações de 5 a  $40 \mu\text{g L}^{-1}$ . Todas as medidas foram realizadas em triplicata.

Para a otimização do método, foi verificado o coeficiente de correlação linear (r) obtido pelas curvas de calibração. O limite de detecção foi calculado pela inclinação da curva, testes de recuperação e os desvios padrão das medidas também foram considerados.

#### 4.6.5 Determinação de Ca por F AAS

As medidas de Ca foram realizadas usando um espectrômetro de absorção atômica Analytik Jena, modelo novAA 300. A chama usada foi constituída por uma mistura de acetileno-óxido nítrico, o fluxo de gás e a altura do queimador foram ajustados para obter o máximo do sinal de absorvância do Ca. Foi utilizada uma lâmpada de cátodo de cálcio SpectAA (Varian), em comprimento de  $422,7 \text{ nm}$ , corrente da lâmpada de  $4,0 \text{ mA}$ , largura da fenda  $1,2 \text{ nm}$  e tempo de integração de  $3,0 \text{ s}$ .

As amostras analisadas foram decompostas em mufla elétrica, conforme descrito no item 4.5.1.2. As determinações foram realizadas em triplicata. A curva analítica foi feita pela análise de cinco padrões de cálcio, nas concentrações de  $0,5$  a  $8,0 \text{ mg L}^{-1}$ . Para a otimização do método, foi verificado o coeficiente de correlação linear (r) obtido pelas curvas de calibração. A sensibilidade do método foi determinada pelo cálculo da concentração características e os limites de detecção foram calculados pela inclinação das curvas. Testes de recuperação e os desvios padrão das medidas também foram considerados.

#### 4.6.6 Investigação da transmetalção do Gd do complexo Gd-DTPA por LC-MS

Para a investigação da possível transmetalção do Gd do complexo Gd-DTPA pelos outros metais presentes como contaminantes nos contrastes, foi utilizado um cromatógrafo líquido (Agilent), equipado com bomba binária 1260 e detector de massas 6430 Triplo Quadrupolo. A fonte utilizada foi a *electrospray* (ESI) no modo positivo, as condições da fonte estão listadas no Apêndice F. O modo de operação do quadrupolo foi monitoramento seletivo do íon (modo MS2SIM) massa 549 m/z.

A separação do complexo Gd-DTPA foi realizada por cromatografia líquida de interação hidrofílica (HILIC). Esta é uma técnica para a separação de compostos altamente polares e hidrofílicos com pouca ou nenhuma retenção em colunas de fase reversa. Neste trabalho utilizou-se a coluna ZIC®-HILIC, com dimensões de 150 mm x 2,1 mm d.i., 3,5 µm tamanho de partícula, 200 Å tamanho do poro (SeQuant; Merck). Para proteger a coluna analítica foi utilizada uma pré-coluna de dimensões 20 mm x 2,1 mm i.d., 5 µm tamanho de partícula, 200 Å tamanho do poro (SeQuant; Merck). A taxa de fluxo da fase móvel foi de 0,5 mL min<sup>-1</sup>. A separação foi isocrática e a fase móvel constituída de 10 mmol L<sup>-1</sup> de formiato de amônio em uma mistura de 10% de acetonitrila e 90% de água ultrapura, com pH resultante de 6,02. O volume de injeção foi de 5 µL, e o tempo de corrida de 1 minuto.

A curva analítica foi obtida pela injeção de cinco padrões de Gd-DTPA, nas concentrações de 0,0127 a 0,127 mmol L<sup>-1</sup>. Para a otimização do método, foi verificado o coeficiente de correlação linear (r) obtido pelas curvas de calibração e calculado o limite de detecção pela inclinação da curva. Testes de recuperação também foram realizados.

## 5 RESULTADOS

Este trabalho foi dividido em duas partes. Na primeira investigou-se o grau de contaminação dos contrastes a base de quelatos de Gd por metais e, na segunda, a possível transmetalção do Gd pelos metais presentes como contaminantes.

### 5.1 Determinação de metais por titulação de retorno

Com a finalidade de verificar a concentração total de metais presentes no medicamento, primeiramente foram realizadas titulações complexométricas em algumas amostras selecionadas. Optou-se em realizar a técnica de titulação de retorno, onde o excesso de EDTA é quantificado após sua reação de complexação com os metais presentes no titulado (HARRIS, 2008). Na volumetria, a titulação com EDTA é utilizada como suporte ao processo de separação dos lantanídeos e as titulações complexométricas são bastante utilizadas, pois geram complexos estáveis, solúveis em água, com um grande número de aminas terciárias contendo grupos carboxílicos (MENEZES; SANTOS, 1991).

Ao planejar a titulação, constatou-se a necessidade de abertura das amostras de contraste, uma vez que este medicamento é constituído por quelatos de Gd e, em alguns casos, o complexante é adicionado em excesso, para garantir que não haja Gd livre, de forma que tanto o Gd, como qualquer outro metal presente como contaminante, esteja na forma complexada. O procedimento empregado no preparo das amostras para a titulação está descrito em Materiais e Métodos (4.5.1.1). As amostras selecionadas para a titulação de retorno foram: Omniscan® L: 11094196; Magnevistan® L:11526A e Gadovist® L:11552D. A Tabela 15 mostra os resultados encontrados efetuando-se as titulações.

Tabela 15 - Determinação das espécies metálicas totais por titulação complexométrica das amostras de contraste Omniscan®, Magnevistan® e Gadovist® e de uma solução padrão de Gd.

	Solução padrão de Gd	Omniscan ® L: 11094196	Magnevistan® L:11526A	Gadovist® L:11552D
Concentração (mol L <sup>-1</sup> )	0,0064	0,5000	0,5000	1,0000
1	0,0064	0,5324	0,5030	1,0245
2	0,0065	0,5275	0,5310	1,0155
3	0,0064	0,5405	0,4890	1,0145
Média	0,0064	0,5334	0,5076	1,0182
Desvio padrão	4,5092E-05	0,0065	0,0213	0,0055
Excesso (mol/L)	0,0000	0,0334	0,0076	0,0182

Na Tabela 15 observa-se a diferença de concentração encontrada nos contrastes analisados, ou seja, os resultados foram superiores à concentração de Gd indicada no rótulo do contraste, fato que sugere a presença de outros metais no medicamento. Com a finalidade de comprovar a eficiência da técnica de titulação, foram realizadas titulações em triplicata do padrão de Gd. Este passou pelo mesmo procedimento das amostras e apresentou recuperação de 101%, o que comprova que esta técnica pode ser utilizada para quantificar o total de elementos metálicos no medicamento.

## 5.2 Determinação de metais por ICP-MS

Após este ensaio inicial, com o objetivo de investigar quais metais, além do Gd, estavam presentes no medicamento, foi realizada uma “varredura” nestas amostras (Omniscan®, Magnevistan® e Gadovist®) utilizando a técnica de ICP-MS.

A técnica de ICP-MS foi selecionada para a determinação destes metais, tendo-se em vista a boa sensibilidade, precisão e caráter multielementar, pois há na literatura diversos trabalhos que salientam o quanto as técnicas de espectrometria de massa, baseadas na separação de átomos em função do seu peso, são eficazes para determinação da abundância relativa de cada um dos ETR, mesmo quando em quantidades extremamente baixas

(AUGAGNEUR et al., 1996; LAWRENCE et al., 2006; JOEBSTL, 2010). A Tabela 16 mostra os elementos encontrados na varredura realizada. Desta forma, foram os elementos selecionados para o estudo.

Tabela 16 - Elementos selecionados para o estudo.

<i>Metais selecionados</i>	
Terras-raras	Sc, Y, La, Ce, Pr, Nd, Sm, Eu, Tb, Dy, Ho, Er, Tm, Yb e Lu
Outros elementos	Al, Si, Ca, Cr, Fe, Cu, Zn, As, Ba e Pb.

Observa-se na Tabela 16 que todos os ETR foram encontrados como contaminantes dos contrastes a base de quelatos de Gd, de forma que se quantificou cada um destes metais no medicamento.

### 5.2.1 Otimização dos parâmetros instrumentais para determinação de ETR por ICP-MS

Foram feitas investigações das possíveis interferências isobáricas causadas por íons atômicos e poliatômicos. Considerando que a vazão do gás de nebulização e a potência de radiofrequência aplicada ao plasma têm efeito sobre a intensidade do íon e a formação de óxidos, esses parâmetros foram avaliados, a fim de maximizar a intensidade dos sinais dos analitos e minimizar a formação de óxidos (GINÉ-ROSIAS, 1999). As condições instrumentais utilizadas estão descritas no item 4.6.1 de Materiais e Métodos. Para a otimização dos métodos, foram verificados os coeficientes de correlação linear, obtidos pelas curvas de calibração e calculados os limites de detecção e os desvios padrão das medidas. Os resultados são mostrados na Tabela 17.

O limite de detecção (LD) para cada isótopo monitorado foi calculado a partir da equação:  $LD = 3,3*(s/a)$ , onde **a** é o coeficiente angular da curva analítica e **s** é o desvio padrão de sete medidas consecutivas do branco (ICH, 1996; ANVISA, 2003). Cabe ressaltar que o branco passou pelo mesmo procedimento de abertura que as amostras; desta forma, os

LDs apresentados na Tabela 17 são relativos ao método. Os LDs instrumentais apresentaram valores negativos e não são mostrados na Tabela 17.

Tabela 17 - Faixa de concentração linear, e parâmetros da curva de calibração para determinação de metais em amostras de contraste por ICP-MS.

Isótopo	Faixa Linear ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	Inclinação	Intercepto	R <sup>2</sup>	LD ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )
<sup>153</sup> Eu	0,05 - 150	0,0661	0,0076	1	1,56
<sup>165</sup> Ho	0,05 - 150	0,1072	0,0185	0,9999	0,51
<sup>142</sup> Nd	0,05 - 150	0,0370	0,0041	0,9999	2,91
<sup>164</sup> Dy	0,05 - 150	0,0313	0,0071	0,9999	1,91
<sup>139</sup> La	0,05 - 150	0,1166	0,0286	0,9999	2,19
<sup>45</sup> Sc	0,05 - 150	0,0405	0,0196	0,9998	4,03
<sup>89</sup> Y	0,05 - 150	0,0817	0,0004	0,9999	3,63
<sup>140</sup> Ce	0,05 - 150	0,1089	0,1024	0,9999	2,23
<sup>166</sup> Er	0,05 - 150	0,0360	0,0042	1	4,54
<sup>141</sup> Pr	0,05 - 150	0,1376	0,0334	0,9999	0,07
<sup>159</sup> Tb	0,05 - 150	0,1138	0,0192	0,9999	1,07
<sup>169</sup> Tm	0,05 - 150	0,1062	0,0048	0,9999	0,77

\*Parâmetros de calibração em 1% HNO<sub>3</sub> 65% v/v utilizando 10  $\mu\text{g L}^{-1}$  de Rh como padrão interno.

Durante a otimização da metodologia, verificou-se uma grande interferência nas determinações dos elementos Sm, Lu e Yb. Nas determinações por ICP-MS podem ocorrer interferências isobáricas causadas por íons atômicos e moleculares, conforme mostrado na Tabela 12. As principais interferências são causadas por isótopos, hidróxidos e óxidos de lantanídeos de massa molecular mais alta. Conforme descrito na literatura (BECKER; DIETZE, 1995; HALICZ et al., 2006) a maior intensidade relativa  $\text{MO}^+/\text{M}^+$  para La, Gd e Lu, deve-se ao orbital 4f vazio, semipreenchido e completamente preenchido, respectivamente (Tabela 11). Além disso, o Ba foi encontrado na varredura realizada e este, quando em concentrações mais altas que a dos lantanídeos, pode interferir pela formação de óxidos e hidróxidos de bário. No caso do Sm, a interferência pode ter sido causada pela formação do íon  $\text{BaO}^+$  (TAN; HORLICK, 1986; DULSKI, 1994).

Pode-se observar pela Tabela 12, que os dois isótopos de Yb possuem como interferente o próprio óxido de gadolínio. Uma vez que o Gd é a matriz da amostra e está presente em concentração elevada, tornando-se bastante difícil contornar esta interferência. A determinação de Lu também não foi possível por ICP-MS, fato que pode estar relacionado à presença do Tb, pois, como demonstrado na Tabela 12, o óxido de térbio é interferente do Lu. Da mesma maneira, interferências isobáricas podem ter ocorrido para o Sm, devido aos seus dois isótopos sofrerem interferência por óxidos de bário. Desta forma, não foi possível a determinação destes três elementos por ICP-MS nas amostras de contraste a base de quelatos de Gd.

### 5.2.2 Preparo das amostras para determinação de ETR por ICP-MS

Para evitar a deposição de sólidos sobre a interface do espectrômetro e problemas como efeitos de matriz e interferências, as amostras foram digeridas. Testaram-se dois procedimentos de preparo de amostras, por digestão no UV e por degradação térmica em mufla, sendo que, em ambos, realizou-se fortificação das amostras e verificaram-se as recuperações. Nas Tabelas 18 e 19 podem-se observar os resultados obtidos nos testes de recuperação para as amostras OptiMARK® e Dotarem®. Tais amostras foram fortificadas com padrão multielementar de ETR nas concentrações de  $5 \mu\text{g L}^{-1}$ . Sendo o procedimento realizado em triplicata.

Tabela 18 - Ensaio de recuperação na amostra OptiMARK® (Lote: X066A) fortificada com padrão multielementar de ETR na concentração de 5 µg L<sup>-1</sup>.

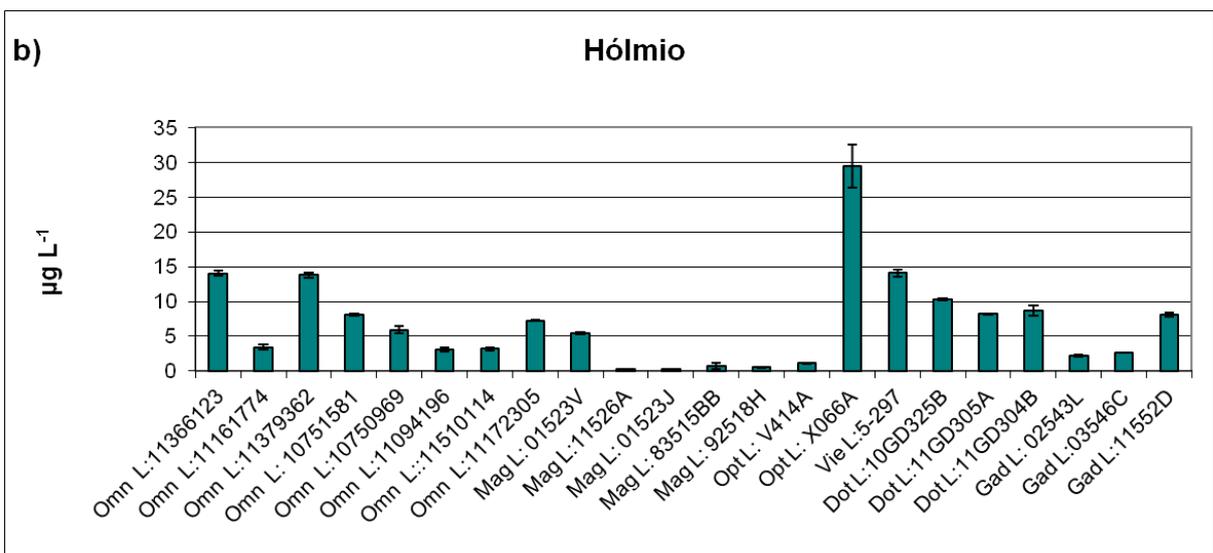
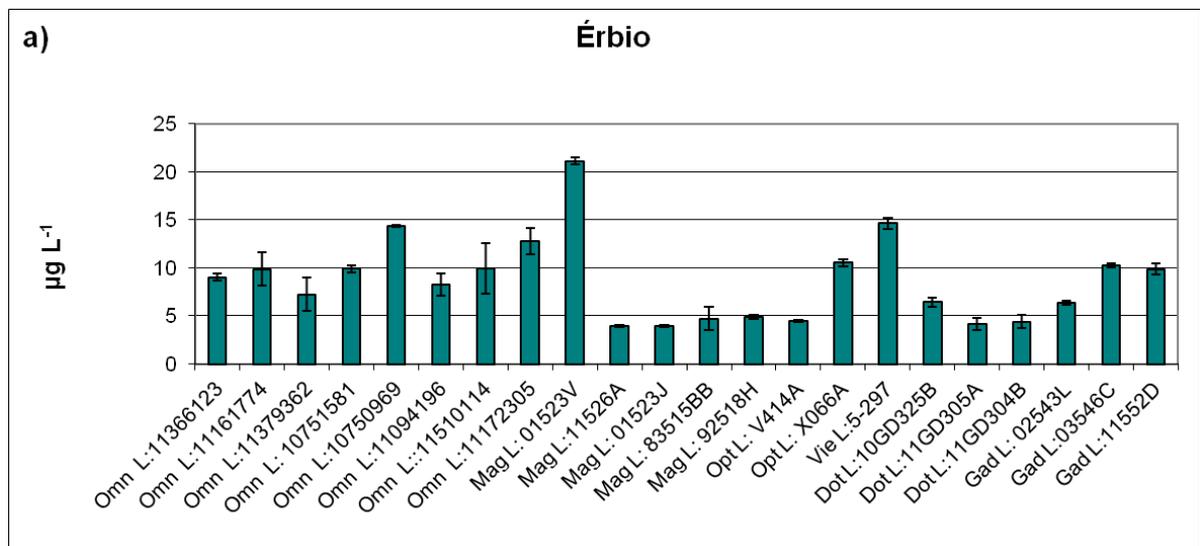
Adição de padrão		Mufla		UV	
Recuperação (%)		Média	Desvio padrão	Média	Desvio Padrão
Metal		(n=3)		(n=3)	
	Eu	98	3,0	92	7,1
	Ho	84	3,2	72	6,1
	Nd	108	3,7	95	0,8
	Dy	80	2,0	73	6,0
	La	106	0,4	97	1,5
	Sc	55	28	126	7,6
	Y	109	4,9	110	3,3
	Ce	102	0,1	95	3,8
	Er	80	0,8	72	7,3
	Pr	101	3,1	98	3,5
	Tb	103	6,2	86	3,7
	Tm	91	12,6	79	3,0

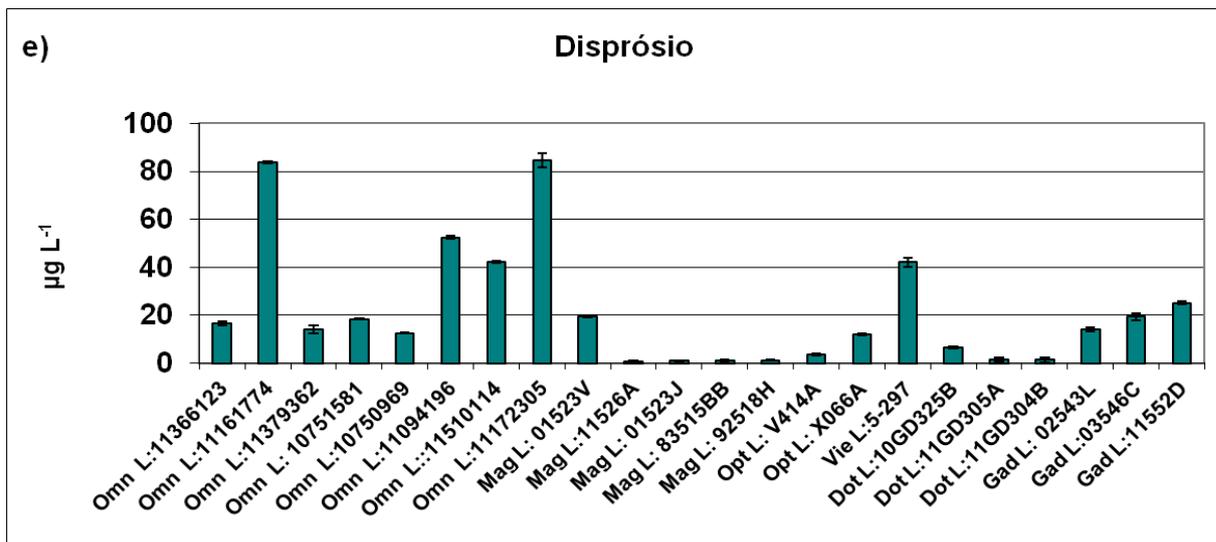
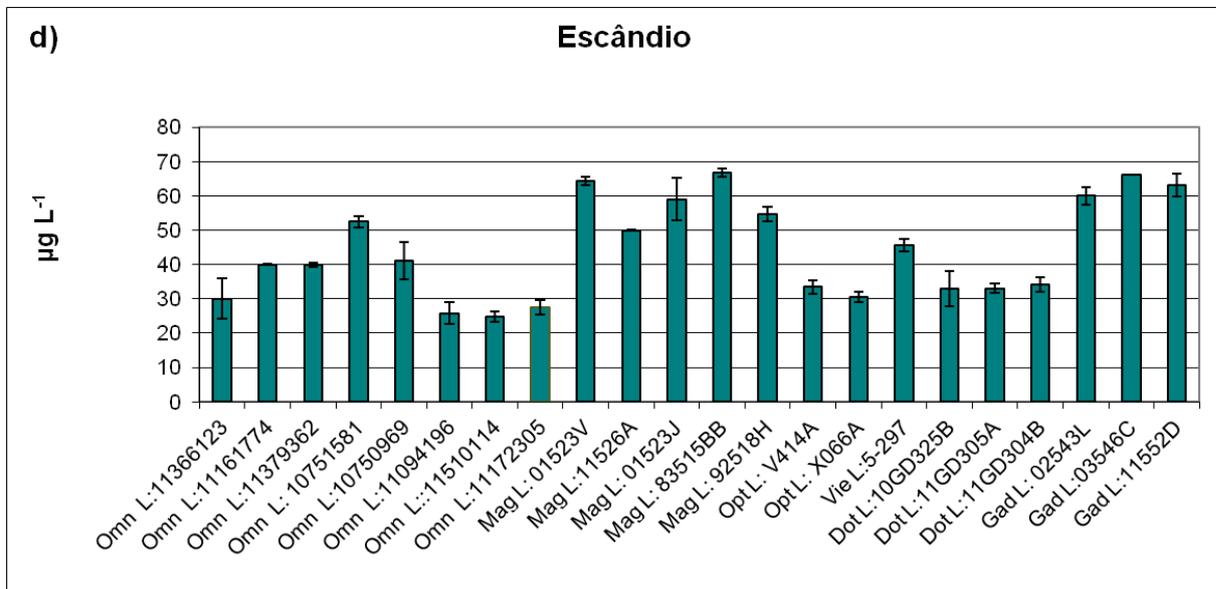
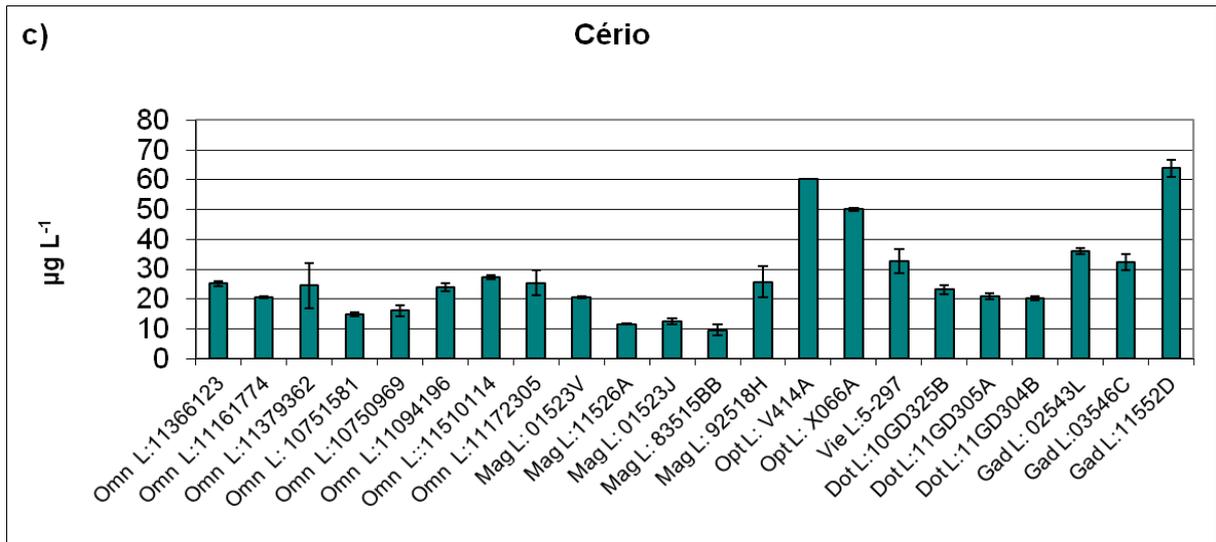
Tabela 19 - Ensaio de recuperação na amostra Dotarem® (Lote: 10GD325B) fortificada com padrão multielementar de ETR na concentração de 5 µg L<sup>-1</sup>.

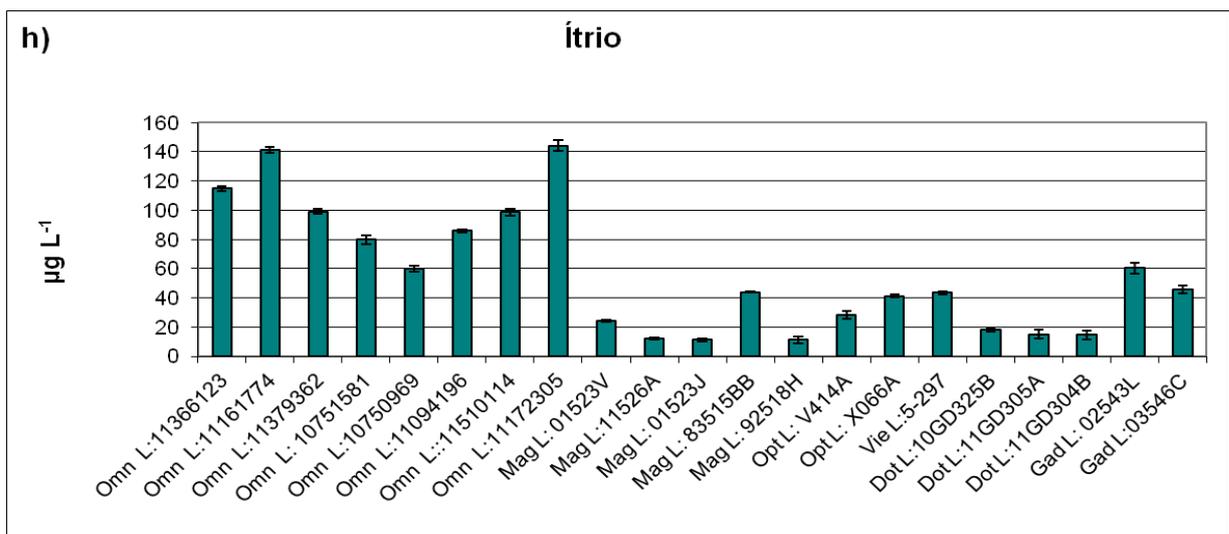
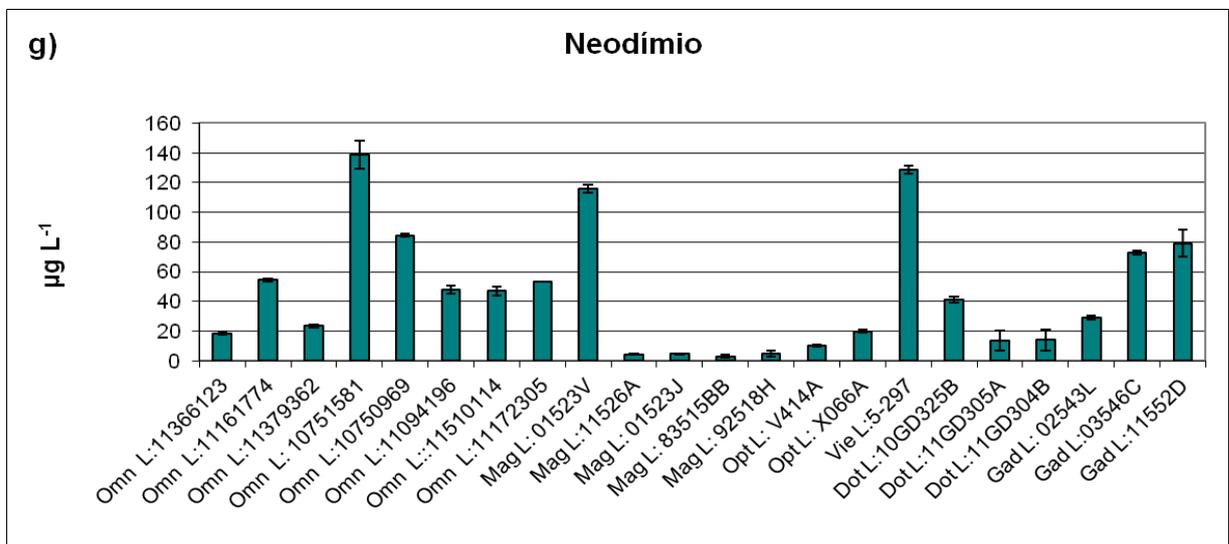
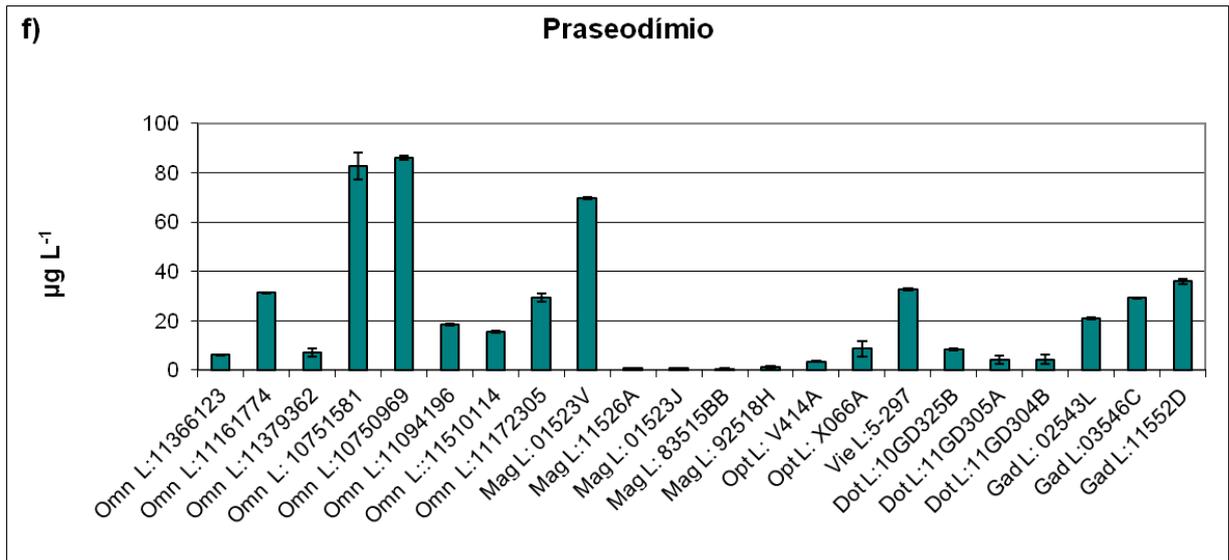
Adição de padrão		Mufla		UV	
Recuperação (10%)		Média	Desvio padrão	Média	Desvio Padrão
Metal		(n=3)		(n=3)	
	Eu	91,8	11,7	94,9	8,4
	Ho	83,9	7,8	77,5	8,3
	Nd	88,5	7,1	101,4	7,1
	Dy	83,3	1,0	77,3	7,2
	La	92,8	3,5	103,5	8,3
	Sc	100,6	40,7	121,5	1,8
	Y	95,8	8,9	118,9	7,5
	Ce	99,0	2,1	102,7	7,9
	Er	82,6	2,2	75,7	8,1
	Pr	101,5	10,6	103,1	7,1
	Tb	86,5	3,7	97,6	15,4
	Tm	80,2	5,4	90,0	16,2

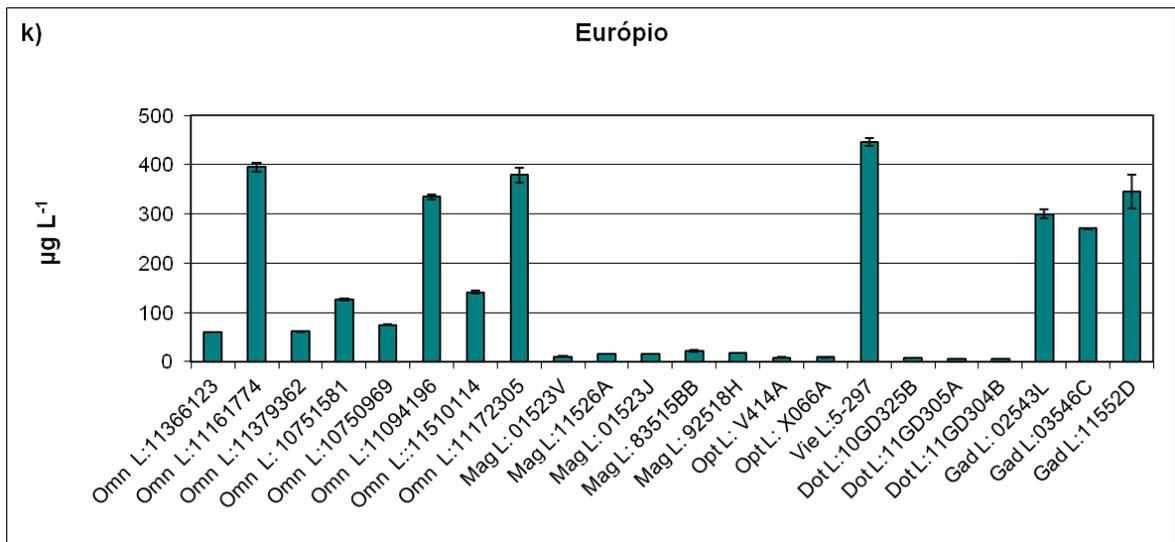
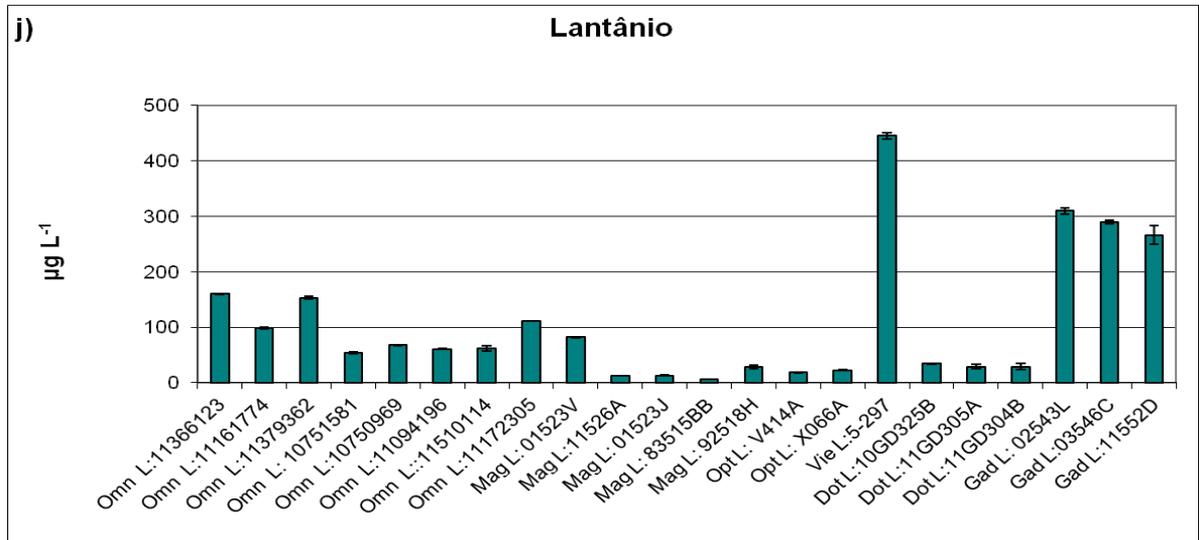
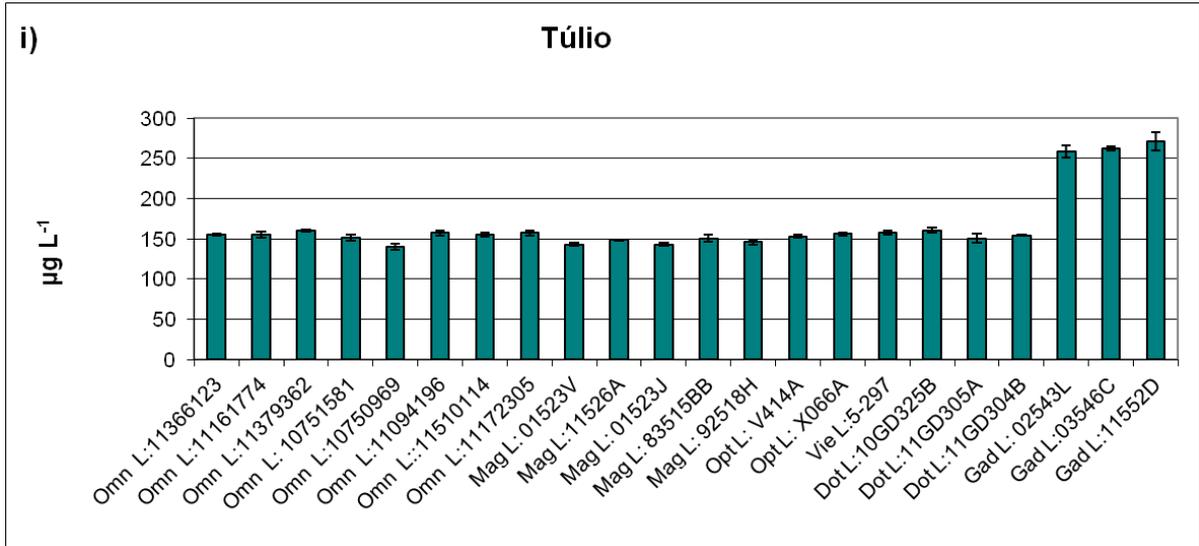
Como podem ser observadas nas Tabelas 18 e 19, as recuperações foram satisfatórias, para os dois tipos de tratamento de amostra. Considerando os dois medicamentos (OptiMARK® e Dotarem®), a degradação térmica em mufla apresentou as melhores

recuperações, exceto para o Sc. Em relação ao Sc, a abertura por digestão UV parece ser mais apropriada, pois, além de apresentar melhor valor de recuperação, também apresenta desvios padrão menores em comparação à abertura realizada em mufla. Desta maneira, foram realizados os dois procedimentos de abertura em todas as amostras, porém, os resultados mostrados incluem a abertura realizada em mufla para todos os elementos, com exceção do Sc, para o qual utilizou-se os resultados obtidos na digestão por UV. Na Figura 10 encontram-se os resultados das determinações de ETR por ICP-MS em cada uma das amostras utilizadas neste estudo. Para facilitar a visualização destes resultados, as figuras apresentam escalas diferentes e foram dispostas em ordem crescente.









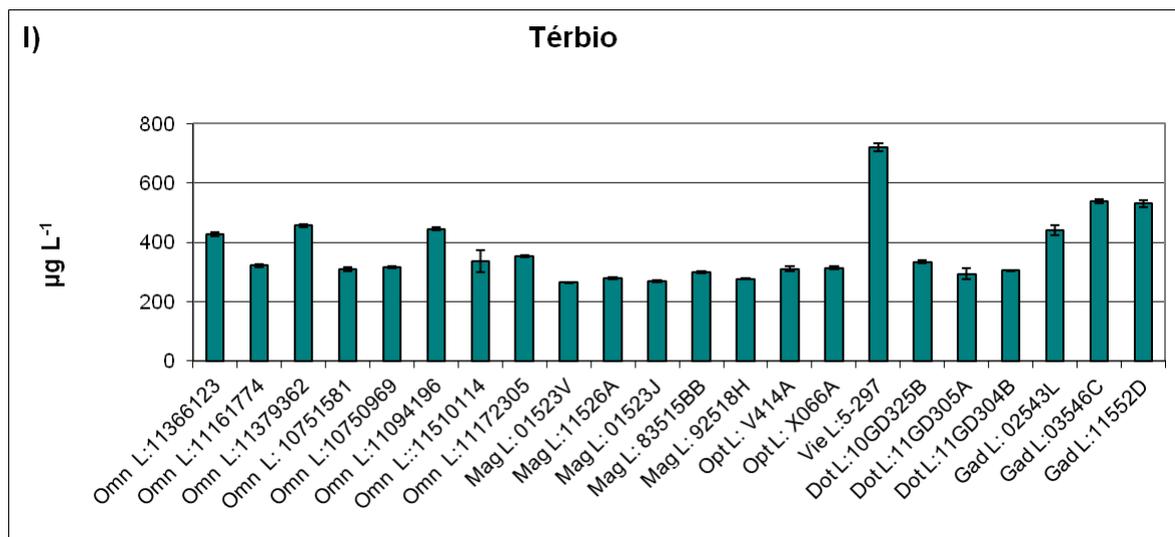


Figura 10 - Determinação de ETR em contrastes a base de quelatos de Gd usando a técnica de ICP-MS. a) Er, b) Ho, c) Ce, d) Sc, e) Dy, f) Pr, g) Ne, h) Y, i) Tm, j) La, k) Eu, l) Tb (n=3).

De acordo com a Figura 10, é possível verificar que todas as amostras apresentam ETR como impurezas. Os elementos presentes em maiores quantidades são o Tb, Eu, La e Tm, para os quais concentrações superiores a  $0,5 \text{ mg L}^{-1}$  foram encontradas em algumas amostras. Também é possível verificar que há variações nas concentrações da maioria dos ETR para os diferentes lotes da mesma marca de contraste. Estas impurezas provêm do óxido de gadolínio utilizado na fabricação dos medicamentos (McGILL; MATHEY, 1993).

### 5.3 Determinação de Sm, Yb e Lu por espectrometria de absorção atômica de alta resolução com fonte contínua (HR-CS AAS)

Devido às interferências isobáricas, Sm, Yb e Lu não foram determinados por ICP-MS. Portanto, foram desenvolvidas metodologias para a determinação destes elementos por HR-CS AAS. Há na literatura técnicas para determinar os ETR por espectrometria de absorção atômica com forno de grafite, porém, as mesmas relatam que estes elementos são formadores de carbeto e sugerem a utilização de fornos de grafite com superfície modificada, seja por revestimento por tântalo, ou forno adaptado com filamento de tungstênio (GUPTA, 1984; BYRNE; CARAMBASSIS, 1996; SILVA et al., 2001). Entre os modificadores

químicos permanentes, são usualmente empregados os elementos do grupo da platina (Pt, Ir, Ru, Rh), os elementos formadores de carbetos (Zr, W, Nb, Ta) e, ainda, misturas destes (FROES et al., 2003).

Os elementos do grupo da platina atuam formando compostos de intercalação com os átomos de carbono da superfície da plataforma ou paredes do forno na etapa de secagem e a consequente ativação dos átomos intercalados. Os átomos ativados do metal formam fortes ligações covalentes com o analito, promovendo a estabilização do mesmo até elevadas temperaturas. Na etapa de pirólise ocorre a quebra dessa ligação e a liberação e atomização do analito (ORTNER et al., 2002).

Os elementos formadores de carbetos atuam formando uma cobertura de carbetos refratários na superfície da plataforma. Com a adição da amostra e a elevação da temperatura, ocorre a formação de uma mistura de óxidos de elevada estabilidade térmica contendo óxido do analito e óxido do metal refratário. A elevação da temperatura na etapa de atomização ocasiona na quebra de ligações, promovendo a reconversão do óxido do metal refratário em carbeto, evolução de CO e atomização do analito livre (ORTNER et al., 2002).

Deste modo, para aumentar a vida útil do forno de grafite, houve a necessidade de modificação de sua superfície. Todos os fornos de grafite, utilizados neste trabalho, foram recobertos com zircônio previamente às análises. Após os recobrimentos, foram realizadas curvas de pirólise e atomização usando padrões aquosos e amostras fortificadas com padrões, a fim de definir as condições apropriadas para a determinação de cada analito. Além disso, foram investigadas as influências dos modificadores químicos cloreto de cálcio ( $\text{CaCl}_2$ ) 1% (m/m) e o nitrato de paládio ( $\text{Pd}(\text{NO}_3)_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ )  $2\text{g L}^{-1}$ . Todos os resultados foram baseados em medidas das áreas do pico.

Nas Figuras 11, 12 e 13 pode-se observar as curvas de pirólise e atomização para estes três metais.

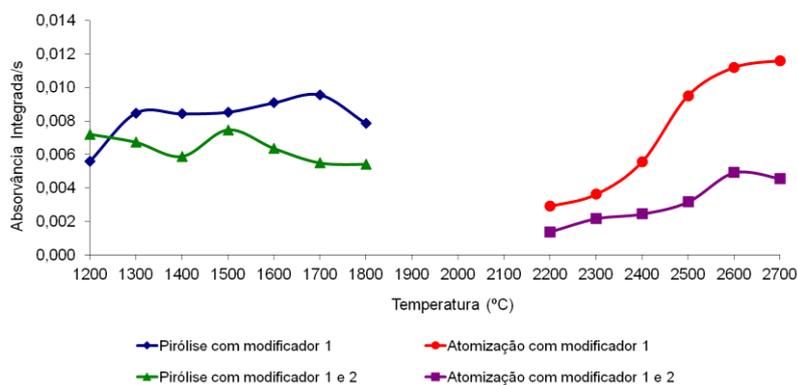


Figura 11 - Curvas de pirólise e atomização para Sm (amostra Dotarem® fortificada e digerida na mufla, Sm = 500 pg). Temperatura de atomização para a curva de pirólise: 2500 °C, temperatura de pirólise para a curva de atomização: 1700 °C. Modificadores: (1) permanente  $ZrCl_4$  (0,5 mg) ; (2)  $Pd(NO_3)_2$  (10  $\mu g$ ) e  $CaCl_2$  (50 $\mu g$ ).

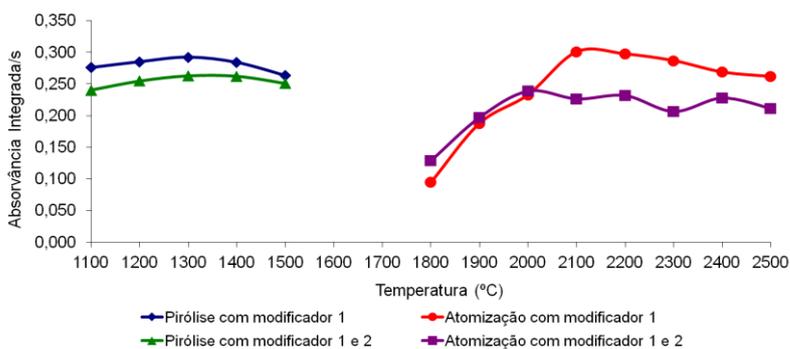


Figura 12 - Curvas de pirólise e atomização para Yb (amostra Dotarem® fortificada e digerida na mufla, Yb = 200pg). Temperatura de atomização para a curva de pirólise: 2500 °C, temperatura de pirólise para a curva de atomização: 1300 °C. Modificadores: (1) permanente  $ZrCl_4$  (0,5 mg) ; (2)  $Pd(NO_3)_2$  (10  $\mu g$ ) e  $CaCl_2$  (50 $\mu g$ ).

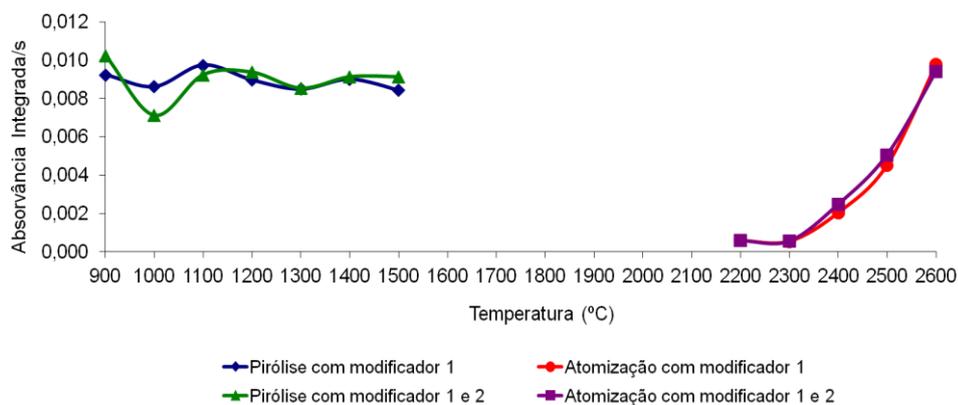


Figura 13 - Curvas de pirólise e atomização para Lu (amostra Dotarem® fortificada e digerida na mufla, Lu = 1000 pg). Temperatura de atomização para a curva de pirólise: 2500 °C, temperatura de pirólise para a curva de atomização: 1400 °C. Modificadores: (1) permanente  $ZrCl_4$  (0,5 mg) ; (2)  $Pd(NO_3)_2$  (10  $\mu g$ ) e  $CaCl_2$  (50 $\mu g$ ).

Como as maiores absorvâncias para o Sm ocorreram em temperatura de pirólise 1700 °C e atomização 2600 °C, estas temperaturas foram usadas para a sua determinação. Para o Yb, as maiores absorvâncias ocorreram na temperatura de pirólise de 1300 °C e atomização 2100 °C e, para o Lu, as melhores temperaturas de pirólise e atomização foram respectivamente, 1400 °C e 2600 °C. Também se pode observar que o uso da mistura de modificadores 5 µL CaCl<sub>2</sub> e 5 µL Pd (NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O causou diminuição na sensibilidade da medida para Sm e Yb e, praticamente, não influenciou a determinação do Lu. Portanto, não foram utilizados e estes modificadores.

Foram construídas três curvas de calibração para cada metal e foram usados os resultados obtidos para calcular as equações de regressão. A curva para o Yb teve comportamento linear, enquanto para o Sm e o Lu o comportamento foi não linear. Na Tabela 20 podem ser observados os dados de linearidade, bem como a massa característica ( $m_0$ ) e o limite de detecção.

Tabela 20 - Curvas de calibração e parâmetros de regressão para determinação de Yb, Sm e Lu em amostras de contraste por HR-CS AAS.

Metal	Faixa (pg)	Equação da regressão	$m_0$ (pg)	$R^2$	LD (pg)
Yb	40- 200	$y = 0,0031158 + 0,0055056x$	16	0,9727	30
Sm	200 - 1000	$y = (- 0,02120 + 0,0000396x) / (1 + 0,0275142x)$	194	0,9584	80
Lu	600 - 3000	$y = (-0,0024713 + 0,0001452x) / (1 + 0,0040974 x)$	561	0,9685	134

\*Parâmetros de calibração em 1% HNO<sub>3</sub> (v/v).

Foram realizados testes de recuperação utilizando a amostra Dotarem® fortificada com os padrões Yb, Sm e Lu nas concentrações de 4, 20 e 60 µg.L<sup>-1</sup>, respectivamente. Esta foi digerida por degradação térmica em mufla, juntamente com a amostra sem fortificação. Verificou-se para o Yb recuperação de 110 %, para o Sm a recuperação de 118 % e para o Lu 76 %.

Nas amostras abertas por degradação térmica em mufla, os metais Yb, Sm e Lu não foram detectados. As amostras foram, então, abertas por digestão UV, nas quais os três metais

em estudo também não foram detectados. Como descrito anteriormente, as amostras foram diluídas 100 vezes para reduzir a concentração de Gd na matriz e, assim, juntamente com o recobrimento com Zr, minimizar a interação do Gd com a superfície do forno de grafite. Ainda assim, com a diluição, a concentração de Gd fica em torno de  $786 \text{ mg L}^{-1}$ . Considerando os LDs observados, para Yb, Sm e Lu, e a diluição necessária, verifica-se que, para a sua determinação, seria necessário que a concentração destes elementos nas amostras fosse superior a  $147 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$ ,  $402 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$  e  $670 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$ , respectivamente.

#### **5.4 Determinação de Al, Si, Ca, Cr, Fe, Cu, Zn, As, Ba e Pb por técnicas de espectrometria de absorção atômica.**

Como pode ser observado na Tabela 16, outros elementos, além dos ETR, foram identificados na varredura realizada por ICP-MS. Devido à possibilidade de alguns destes elementos transmetalarem o Gd dos complexos, eles foram investigados. Técnicas de espectrometria absorção atômica foram selecionadas para quantificá-los. Ca foi determinado por FAAS, As por HG AAS e os demais Al, Si, Cr, Fe, Cu, Zn, Ba e Pb, por GF AAS.

##### **5.4.1 Determinação de metais em contrastes a base de quelatos de Gd por GF AAS**

A técnica de espectrometria de absorção atômica com forno de grafite foi utilizada na determinação dos elementos Al, Si, Cr, Fe, Cu, Zn, Ba e Pb em amostras de contraste a base de quelatos de Gd. As amostras foram digeridas por degradação térmica em mufla.

Devido à matriz das amostras conter elevada concentração de Gd, que é um elemento formador de carbetos e possui grande interação com o grafite do forno, os fornos de grafite tiveram sua superfície revestida com Zr, pela aplicação do programa de recobrimento descrito no Apêndice C. As amostras foram diluídas para minimizar a quantidade de Gd injetado no forno de grafite e, assim, evitar o desgaste da sua superfície. O recobrimento com Zr foi feito a cada 80 queimas e as amostras foram medidas em duplicatas.

#### 5.4.1.1 Determinação das condições analíticas

Curvas de pirólise e atomização foram estabelecidas para encontrar as condições apropriadas para a determinação de cada analito. Para a obtenção destas curvas, foi utilizada uma amostra fortificada e submetida ao preparo por degradação térmica em mufla. A amostra ao final do tratamento foi diluída 100 vezes, o que resultou em, aproximadamente,  $786 \text{ mg L}^{-1}$  de Gd. Além disso, a influência de modificadores também foi investigada, conforme descrito a seguir, para cada elemento.

#### *Alumínio*

As curvas de pirólise e atomização para o Al foram construídas pela fortificação da amostra Dotarem® com  $25 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$  do padrão de Al. Na Figura 14, observa-se que as maiores absorvâncias ocorreram em temperaturas de pirólise de  $1500 \text{ } ^\circ\text{C}$  e atomização  $2600 \text{ } ^\circ\text{C}$ . Portanto, foram estas as temperaturas selecionadas para as medidas.

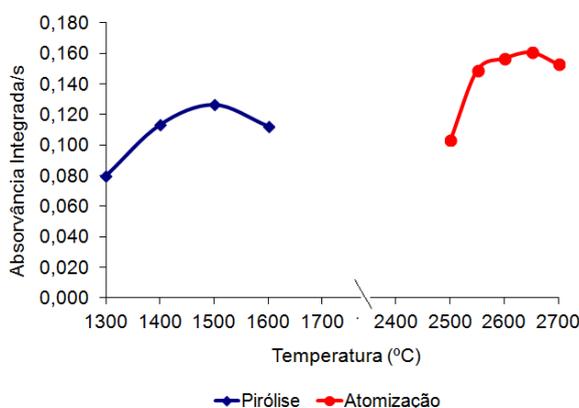


Figura 14 - Curvas de pirólise e atomização para Al (amostra Dotarem® fortificada e digerida na mufla, Al= 500 pg). Temperatura de atomização para a curva de pirólise:  $2500 \text{ } ^\circ\text{C}$ , temperatura de pirólise para a curva de atomização:  $1500 \text{ } ^\circ\text{C}$ . Modificador permanente  $\text{ZrCl}_4$  (0,5 mg).

#### *Silício*

Foram construídas curvas de pirólise e atomização para o Si pela fortificação com  $250 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$  do padrão a amostra Dotarem®, Figura 15. Em trabalho anterior realizado neste grupo de pesquisa (NOREMBERG, 2010) foi avaliada a influência dos modificadores  $\text{CaCl}_2$   $50 \text{ } \mu\text{g}$ , Pd  $10 \text{ } \mu\text{g}$  + Ca  $50 \text{ } \mu\text{g}$ , Pd  $10 \text{ } \mu\text{g}$  + Mg  $10 \text{ } \mu\text{g}$ , e somente Pd  $10 \text{ } \mu\text{g}$  na determinação de Si. O

uso do Pd 10  $\mu\text{g}$  fez com que os sinais se tornassem mais altos e estreitos, sendo o modificador de melhor resultado entre os testados, por este motivo este modificador foi adotado no presente trabalho.

Na Figura 15 pode-se notar o aumento significativo na absorvância com o uso do modificador de Pd. As maiores absorvâncias ocorreram em temperatura de pirólise de 1200  $^{\circ}\text{C}$  e de atomização de 2600  $^{\circ}\text{C}$ , sendo estas as temperaturas selecionadas para as medidas de Si.

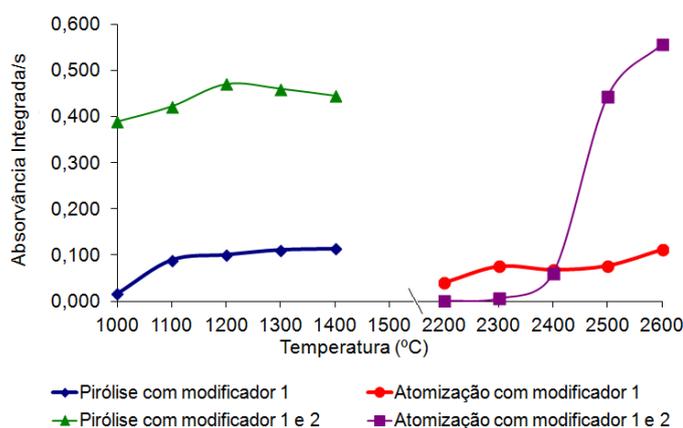


Figura 15 - Curvas de pirólise e atomização para Si (amostra Dotarem® fortificada e digerida na mufla, Si= 5000 pg.). Temperatura de atomização para a curva de pirólise: 2500  $^{\circ}\text{C}$ , temperatura de pirólise para a curva de atomização: 1200  $^{\circ}\text{C}$ . Modificadores: (1) permanente  $\text{ZrCl}_4$  (0,5 mg); (2) Pd ( $\text{NO}_3$ )<sub>2</sub> (10  $\mu\text{g}$ ).

### Cromo

Foram construídas curvas de pirólise e atomização para o Cr pela fortificação com 25  $\mu\text{g L}^{-1}$  do padrão na amostra Dotarem®. Na Figura 16 observa-se que maiores absorvâncias ocorreram em temperatura de pirólise de 1100  $^{\circ}\text{C}$  e atomização 2450  $^{\circ}\text{C}$ , sendo estas as temperaturas selecionadas para as medidas de Cr.

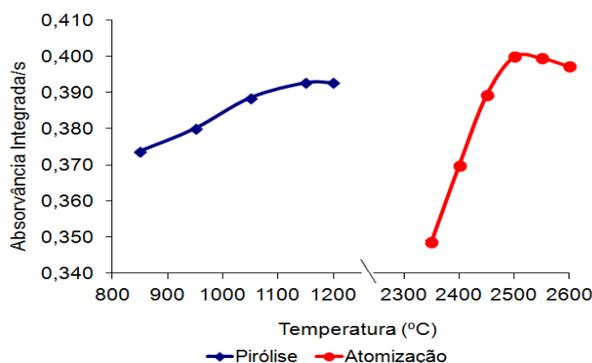


Figura 16 - Curvas de pirólise e atomização para Cr (amostra Dotarem® fortificada e digerida na mufla, Cr= 500 pg.). Temperatura de atomização para a curva de pirólise: 2450  $^{\circ}\text{C}$ , temperatura de pirólise para a curva de atomização: 1100  $^{\circ}\text{C}$ . Modificador permanente:  $\text{ZrCl}_4$  (0,5 mg).

### Ferro

Foram construídas curvas de pirólise e atomização para o Fe pela fortificação com  $50 \mu\text{g L}^{-1}$  do padrão na amostra Dotarem®. Para Fe, foi testada uma solução contendo  $2 \text{g L}^{-1}$  de  $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$  como modificador, porém, observou-se um comportamento decrescente do sinal do ferro com o número de determinações. Sem modificador, as temperaturas de pirólise e de atomização escolhidas foram, respectivamente, 1300 e 2600 °C (Figura 17).

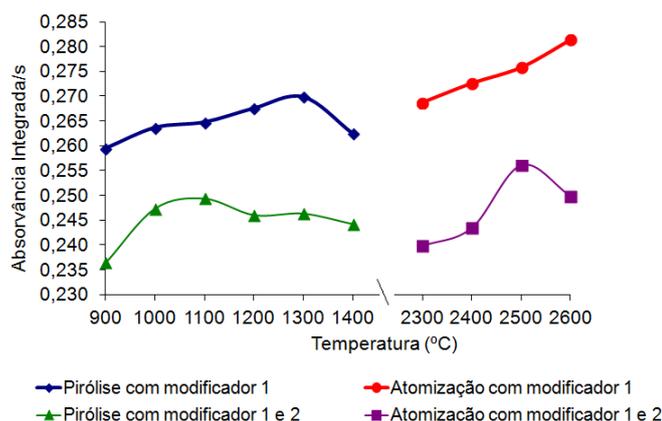


Figura 17 - Curvas de pirólise e atomização para Fe (amostra Dotarem® fortificada e digerida na mufla, Fe=1000 pg). Temperatura de atomização para a curva de pirólise: 2500 °C, temperatura de pirólise para a curva de atomização: 1300 °C. Modificadores: (1) permanente  $\text{ZrCl}_4$  (0,5 mg); (2)  $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$  (10  $\mu\text{g}$ ).

### Cobre

Foram construídas curvas de pirólise e atomização para o Cu pela fortificação da amostra Dotarem® com  $25 \mu\text{g L}^{-1}$  do padrão. Para Cu não foi testado modificador, já que este analito é termicamente estável. As temperaturas de pirólise e de atomização escolhidas foram 1000 e 2500 °C, respectivamente (Figura 18).

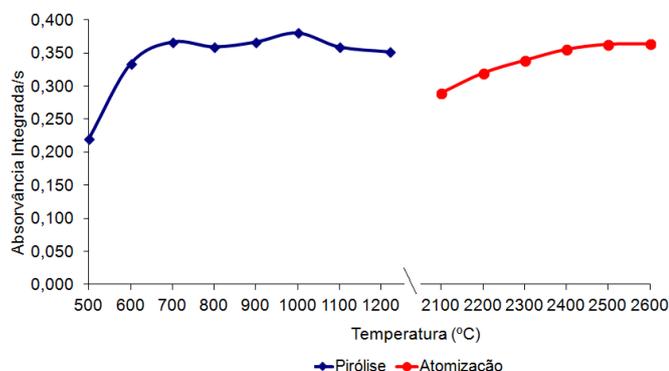


Figura 18 - Curvas de pirólise e atomização para Cu (amostra Dotarem® fortificada e digerida na mufla, Cu=500 pg). Temperatura de atomização para a curva de pirólise: 2450 °C, temperatura de pirólise para a curva de atomização: 1100 °C. Modificador permanente:  $\text{ZrCl}_4$  (0,5 mg).

### Zinco

Foram construídas curvas de pirólise e atomização para o Zn pela fortificação da amostra Dotarem® com  $25 \mu\text{g L}^{-1}$  do padrão de Zn. Para o Zn, foi testada uma solução contendo  $2\text{g L}^{-1}$  de  $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$  como modificador, porém, observaram-se absorvâncias menores durante a pirólise com o uso do modificador, quando comparada à pirólise sem o uso do modificador. Entretanto, quando considerada a atomização, as absorvâncias foram maiores como o uso do modificador. Conseqüentemente, optou-se pelo uso do mesmo. As temperaturas de pirólise e de atomização escolhidas foram 900 e 1700 °C, respectivamente (Figura 19).

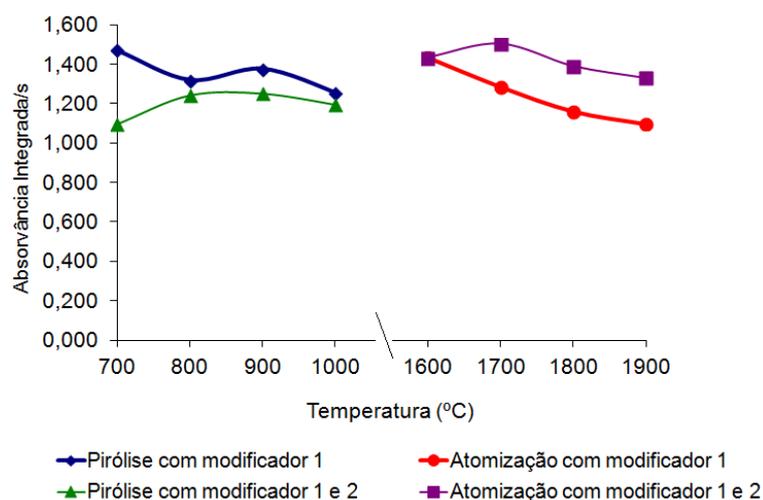


Figura 19 - Curvas de pirólise e atomização para Zn (amostra Dotarem® fortificada e digerida na mufla, Zn= 500 pg). Temperatura de atomização para a curva de pirólise: 1800 °C, temperatura de pirólise para a curva de atomização: 900 °C. Modificadores: (1) permanente  $\text{ZrCl}_4$  (0,5 mg) ; (2)  $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$  (10  $\mu\text{g}$ ).

### Bário

Foram construídas curvas de pirólise e atomização para o Ba, fortificação da amostra Dotarem® com  $25 \mu\text{g L}^{-1}$  de padrão de Ba. Para o Ba, foi testada uma solução contendo 1% de  $\text{CaCl}_2$  como modificador; porém, verificou-se que a absorvância ficou menor com o uso do modificador, como pode ser observado na Figura 20.

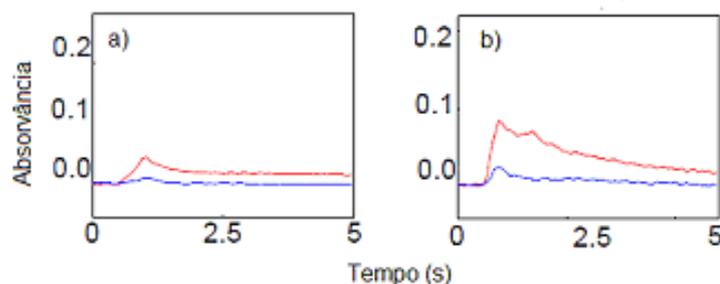


Figura 20 - Sinais de absorvância do bário para amostra adicionada de  $25 \mu\text{g L}^{-1}$ . (a) Com o uso do modificador químico  $\text{CaCl}_2$  1%, (b) Sem o modificador.

Primeiramente, optou-se por realizar as medidas sem o uso do modificador. Porém, os valores de desvios padrão das medidas no decorrer da análise tornavam-se muito elevados. Assim, optou-se pelo uso do modificador, que tornou o sinal da absorvância mais reprodutível. As temperaturas de pirólise e de atomização escolhidas foram  $1150$  e  $2600$  °C, respectivamente (Figura 21).

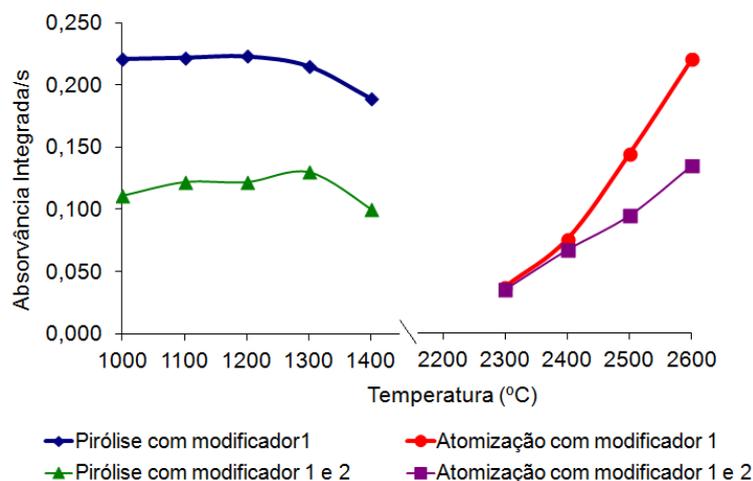


Figura 21 - Curvas de pirólise e atomização para Ba (amostra Dotarem® fortificada e digerida na mufla,  $\text{Ba} = 500 \text{ pg}$ ). Temperatura de atomização para a curva de pirólise:  $2500$  °C, temperatura de pirólise para a curva de atomização:  $1150$  °C. Modificadores: (1) permanente  $\text{ZrCl}_4$  ( $0,5 \text{ mg}$ ); (2)  $\text{CaCl}_2$  ( $50 \mu\text{g}$ ).

### Chumbo

Foram construídas curvas de pirólise e atomização para o Pb, fortificação com  $25 \mu\text{g L}^{-1}$  do padrão na amostra Dotarem®. Na Figura 22 observa-se que maiores absorvâncias ocorreram em temperatura de pirólise de  $900$  °C e atomização  $1700$  °C, sendo estas as temperaturas selecionadas para as medidas de Pb.

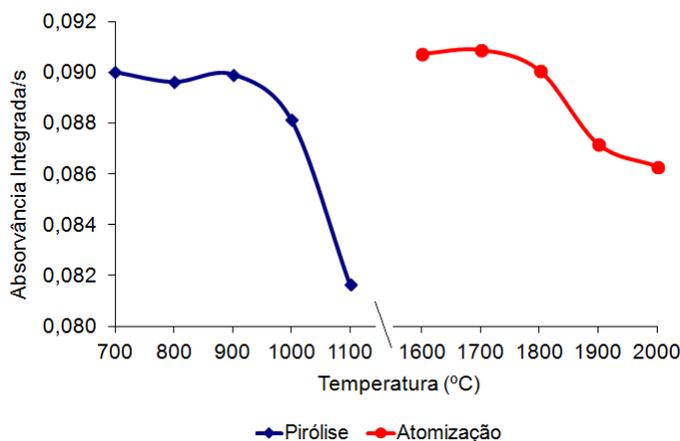


Figura 22 - Curvas de pirólise e atomização para Pb (amostra Dotarem® fortificada e digerida na mufla, Pb = 500 pg). Temperatura de atomização para a curva de pirólise: 1800 °C, temperatura de pirólise para a curva de atomização: 900 °C. Modificador permanente:  $ZrCl_4$  (0,5 mg).

#### 5.4.1.2 Características do desempenho dos métodos

Foram construídas três curvas de calibração para cada metal e foram usados os resultados obtidos para calcular as equações de regressão. Os parâmetros analíticos dos métodos estão resumidos na Tabela 21. Em todos os casos, o coeficiente de determinação ( $R^2$ ) foi considerado adequado para o propósito (HARRIS, 2008).

Tabela 21 - Curvas de calibração e parâmetros de regressão para a determinação de metais em amostra de contraste a base de quelatos de Gd por GF AAS.

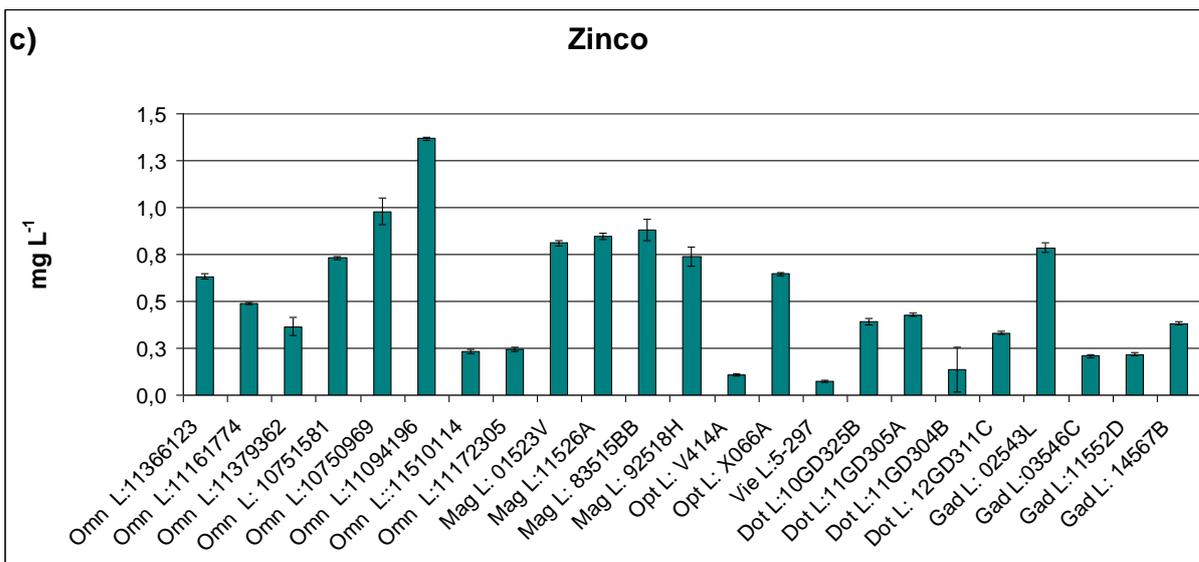
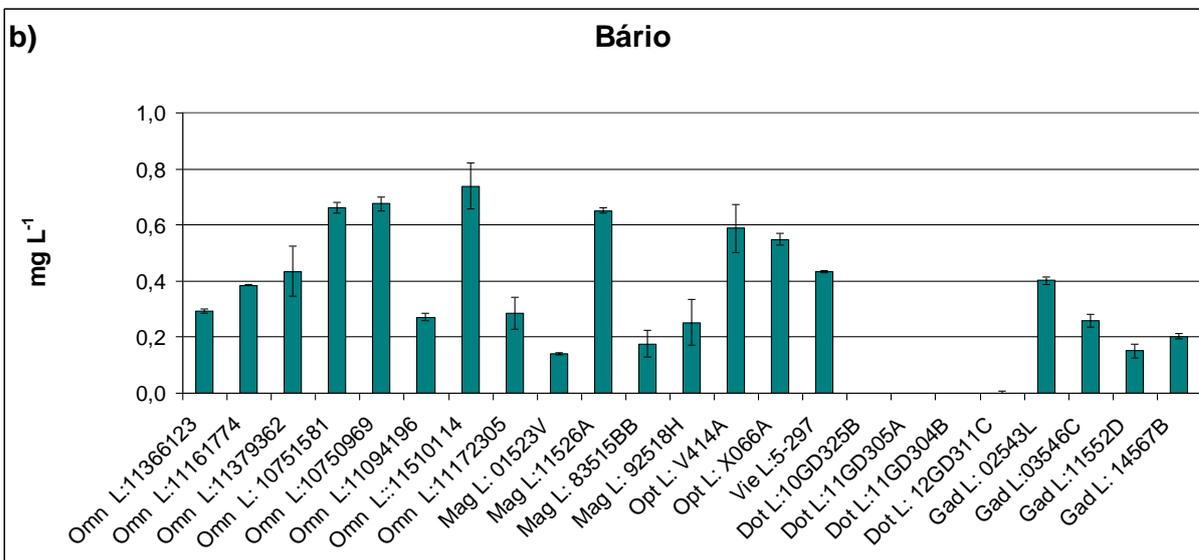
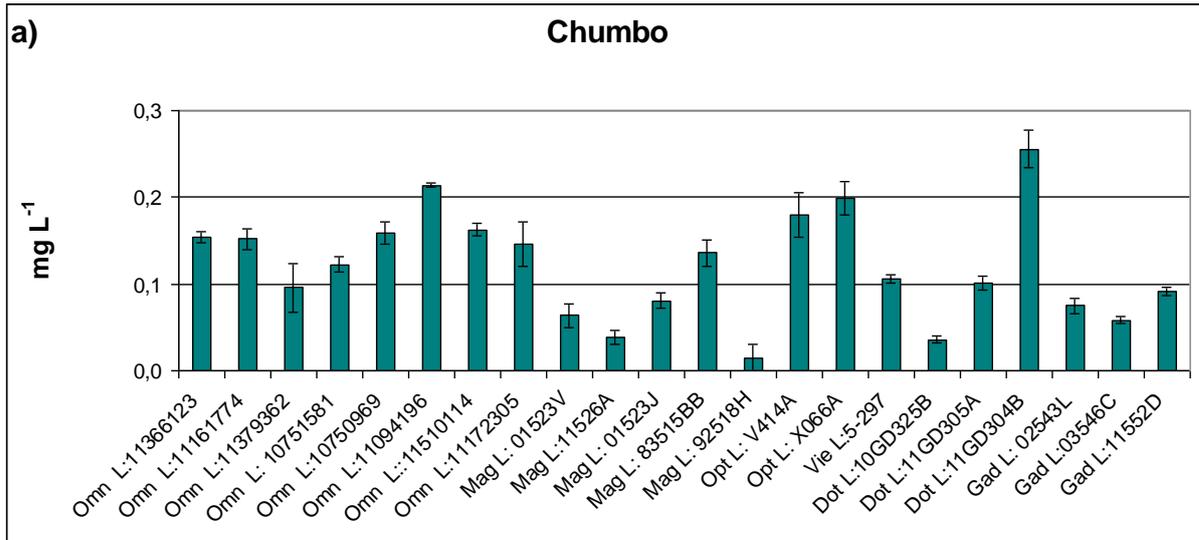
Metal	Faixa (pg)	Equação de regressão	$R^2$	$m_0$ (pg)	LD (pg)
Al	200 - 1000	$y = 0,0037x + 0,0061$	0,9923	19	5,8
Si	1000- 10000	$y = -4E^{-06}x^2 + 0,0049x + 0,0795$	0,9997	14	38
Cr	200 - 1000	$y = 0,0115x + 0,051$	0,9768	7,6	6,8
Fe	400 - 2000	$y = 0,0034x + 0,0209$	0,9896	25	35
Cu	200 - 1000	$y = 0,0048x + 0,0136$	0,9868	18	17
Zn	100 - 600	$y = -0,0017x^2 + 0,0996x + 0,3212$	0,9970	1,5	8,9
Ba	200 - 1000	$y = 0,0002x^2 - 0,0027x + 0,0132$	0,9927	40	67
Pb	200 - 1000	$y = 0,0035x + 0,0107$	0,9889	24	5,4

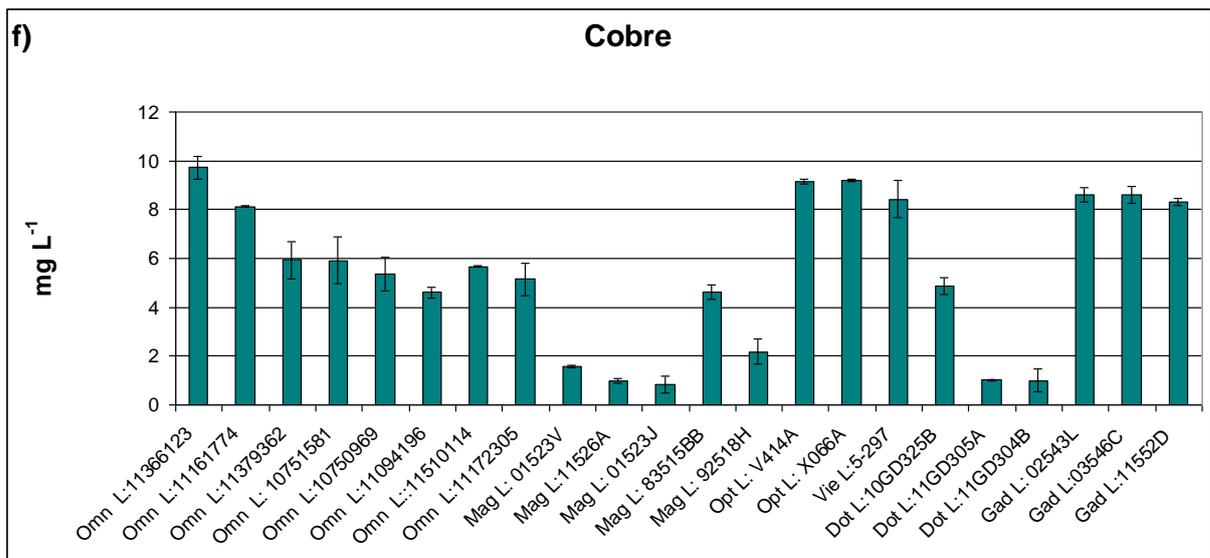
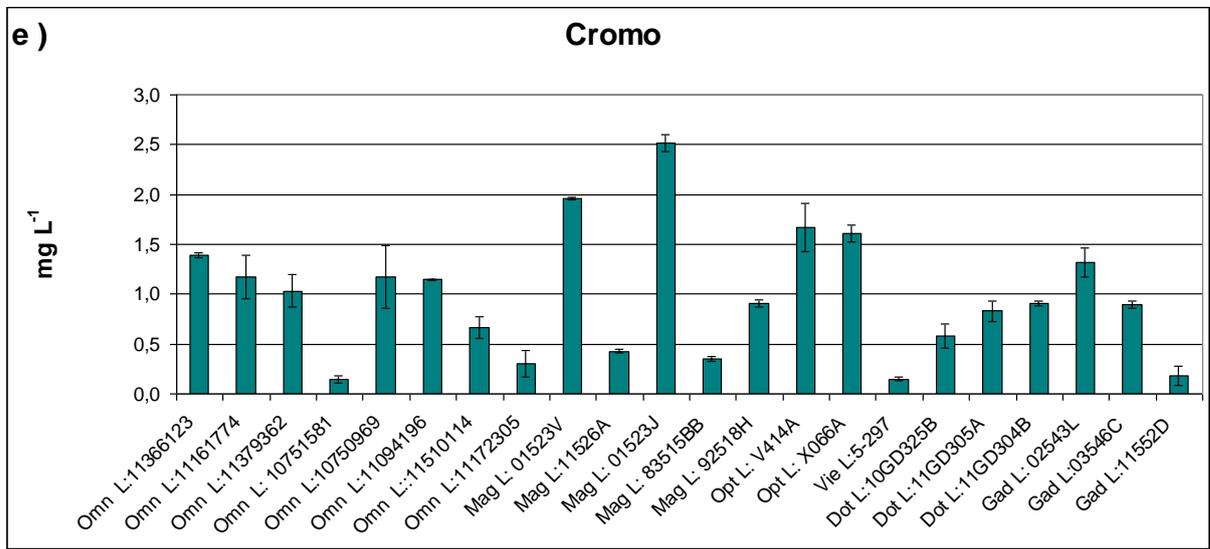
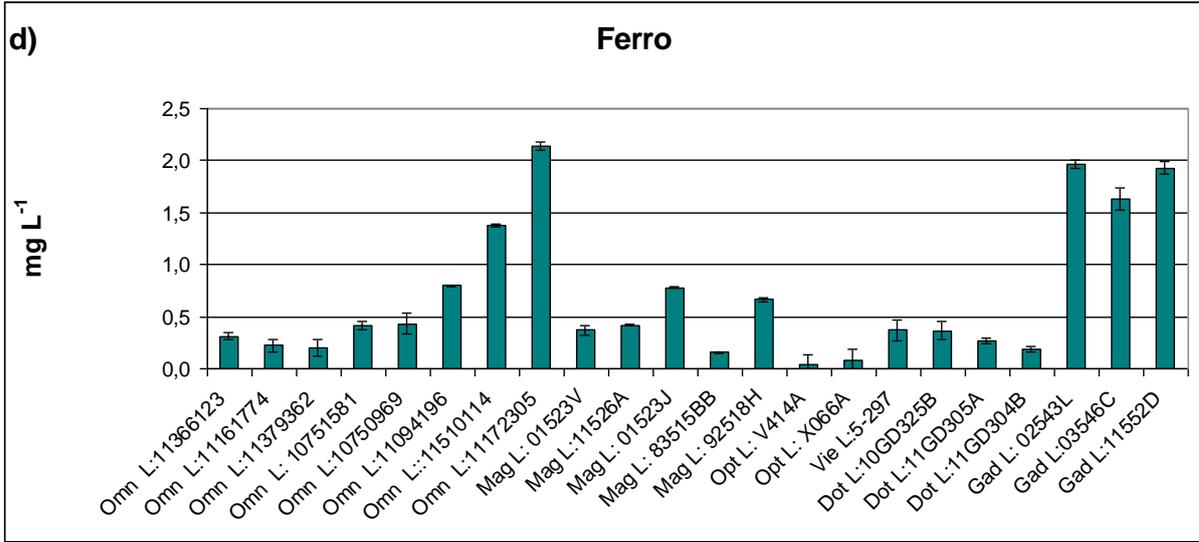
A recuperação foi determinada pela fortificação das amostras Magnevistan® e Dotarem®. As amostras foram fortificadas nas concentrações de 25 µg L<sup>-1</sup> de Al, Cr, Ba, Cu, Zn e Pb, 50 µg L<sup>-1</sup> de Fe e 250 µg L<sup>-1</sup> de Si. As amostras fortificadas foram decompostas em mufla. As recuperações para a amostra Magnevistan® foram Al 82%, Cr 101%, Cu 93%, Ba 59 %, Pb 80%, Zn 85%, e Si 88%. Para amostra Dotarem®, as recuperações foram Al 79,52%, Cr 109%, Cu 90%, Ba 35%, Pb 84%, Zn 82%, e Si 110%. Como pode ser observado, ambas as amostras apresentaram recuperações similares e, com exceção do Ba, todos os metais apresentaram boas recuperações, valores aceitos de 80-120%.

Devido ao Ba ter apresentado baixos valores de recuperações, houve a suspeita de perdas durante o preparo das amostras. Novas aberturas foram realizadas e observaram-se os melhores resultados de recuperação com a adição de Mg(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> durante a abertura e posterior dissolução da amostra com HCl. As recuperações, considerando este procedimento de abertura, foram de 75% para a amostra Magnevistan® e de 76% para a Dotarem®. Esta melhora na recuperação pode estar relacionada à menor volatilização do Ba durante a digestão devido à formação de Ba(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>.

#### 5.4.1.3 Aplicação em amostras de contrastes

Os métodos propostos foram aplicados na determinação de Al, Si, Ca, Cr, Fe, Cu, Zn, As, Ba e Pb em diferentes amostras de contrastes a base de quelatos Gd (Tabela 12). Foram utilizados oito lotes diferentes do medicamento Omniscan®, cinco lotes do Magnevistan®, dois lotes do OptiMARK®, um lote do Viewgam®, quatro lotes do Dotarem® e quatro lotes do Gadovist®. As amostras foram abertas em triplicatas e as medidas em cada amostra realizadas em duplicatas. Os resultados estão mostrados na Figura 23. Os desvios apresentados nas figuras são referentes às triplicatas da abertura. Na Figura 23, os elementos analisados estão dispostos em ordem crescente de contaminação. A menor contaminação nas amostras é por chumbo, enquanto a maior deve-se ao silício.





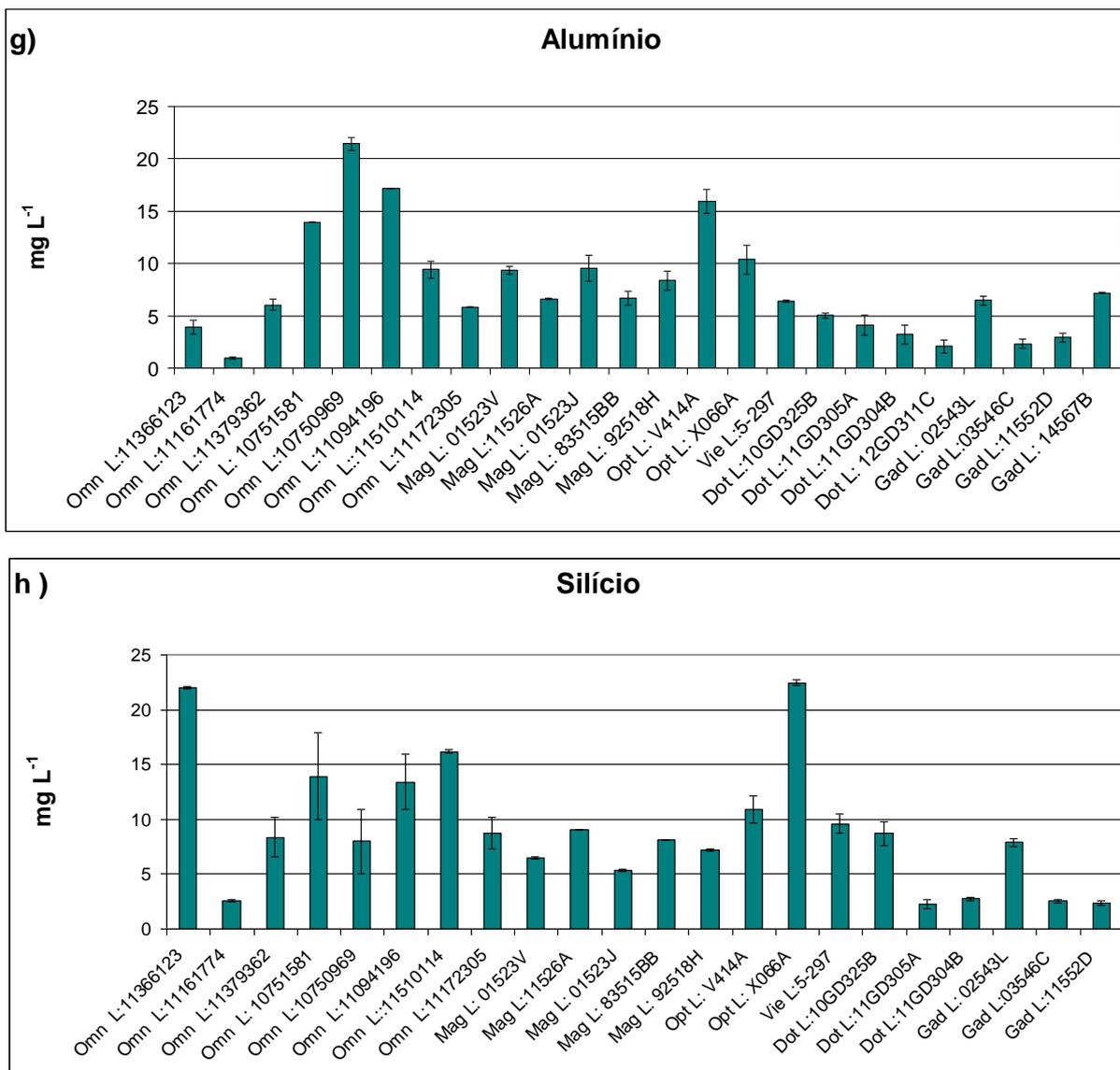


Figura 23 – Teores de metais presentes como contaminantes em amostras de contrastes a base de gadolínio, análise realizada por GF AAS. a) Pb, b) Ba, c) Zn, d) Fe, e) Cr, f) Cu, g) Al, h) Si.

Na Figura 23 observa-se que as amostras apresentam contaminação pelos analitos investigados, com exceção da amostra Dotarem®, que não apresentou Ba nos lotes analisados. Também, é possível observar que há variação entre os lotes com relação ao mesmo analito.

Al, Si e Cu foram os contaminantes presentes em maior concentração nos contrastes. Porém, os outros analitos também estão presentes em quantidades consideráveis na maioria dos medicamentos. Como se pode observar na Tabela 6, os óxidos de gadolínio utilizados para produzir os meios de contrastes apresentam como impurezas não somente os outros

óxidos de ETR, mas também óxidos metálicos, como óxido de silício, óxido de cobre, óxido de ferro, óxido de cromo e óxido de chumbo, podendo ser a matéria-prima do próprio medicamento a fonte de sua contaminação por estes elementos. A contaminação por Al pode ser relacionada ao fato de todos os contrastes serem armazenados em recipientes de vidro, que contêm Al em sua composição (BOHRER et al., 2003; BOHRER, 2012).

#### 5.4.1.4 Origem da contaminação por Al, Ba e Zn

A contaminação por Al, Ba e Zn em produtos farmacêuticos usados parenteralmente vem sendo relacionada aos recipientes de estocagem, devido ao vidro e à borracha (das vedações) conterem estes metais em sua composição (HERING et al., 1986; BOHRER et al., 2003; BOHRER et al., 2007; MORSCHBACHER, 2011). Desta forma, a presença destes elementos nos contrastes a base de quelatos de Gd pode ser relacionada às embalagens onde são armazenadas as formulações. Tais embalagens são frascos-ampolas de vidro, que possuem como vedantes tampas de borracha.

No experimento realizado, os três analitos foram determinados nos contrastes Magnevistan®, Viewgam®, OptiMARK®, Omniscan®, Gadovist® e Dotarem®. Os frascos foram mantidos invertidos (com as tampas para baixo), de modo que a solução entrou em contato direto com a tampa. Uma alíquota do medicamento foi retirada ao completar dois meses de armazenamento nestas condições e outra, aos seis meses. Ambas foram decompostas em mufla elétrica e seus teores de Al, Ba e Zn foram determinados por GF AAS. Os resultados podem ser observados nas Figuras 24, 25 e 26.

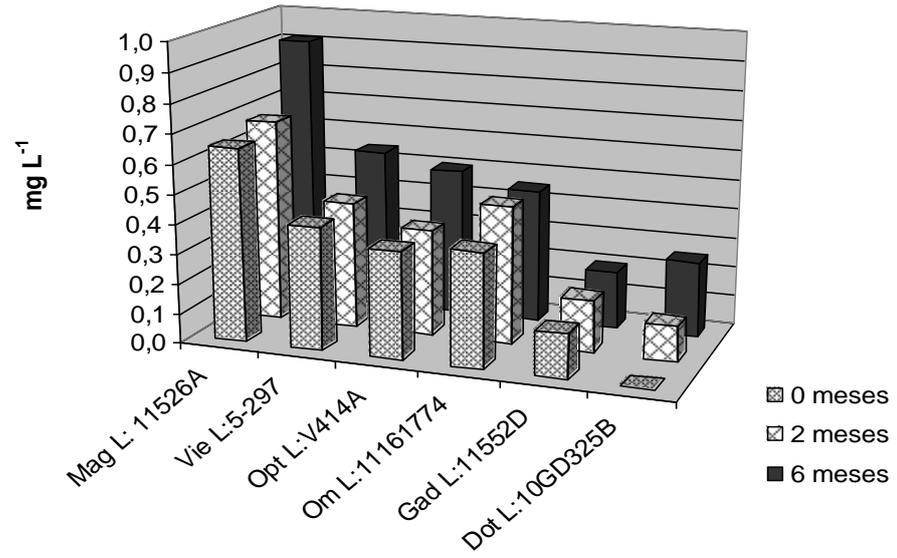


Figura 24 – Teor de Ba determinado nos contrastes a base de quelatos Gd, considerando o contato da solução com a tampa de borracha por um período de seis meses (n=3).

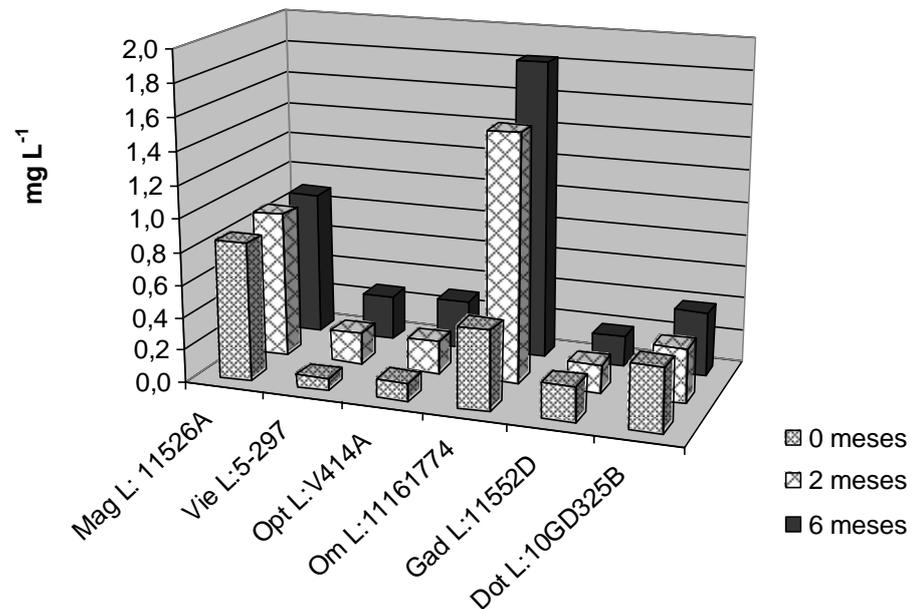


Figura 25 – Teor de Zn determinado nos contrastes a base de quelatos Gd, considerando o contato da solução com a tampa de borracha por um período de seis meses (n=3).

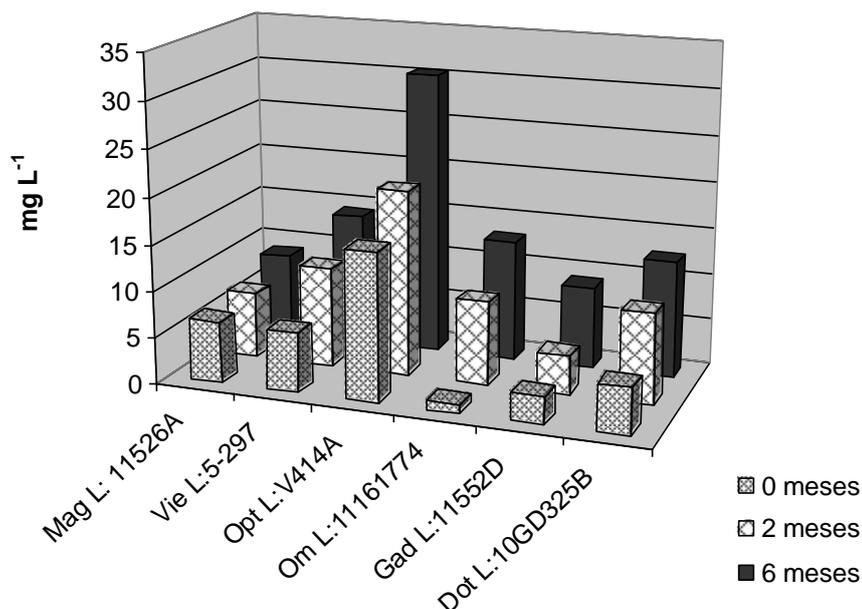


Figura 26 – Teor de Al determinado nos contrastes a base de quelatos Gd, considerando o contato da solução com a tampa de borracha por um período de seis meses (n=3).

Pode-se observar nas Figuras 24, 25 e 26, que o contato com a tampa promoveu um aumento da concentração destes metais na solução. Para a maioria dos contrastes, quanto maior o tempo de contato, maior a contaminação. Como citado anteriormente, em algumas formulações é adicionado um excesso de ligante, o que facilitaria a extração dos metais presentes na borracha. Mesmo sem a adição do excesso de complexante, os metais em estudo podem substituir do Gd do complexo, pelo processo de transmetalção.

As borrachas que compõem as tampas são constituídas de uma mistura complexa de componentes, que lhes confere a característica de resselagem depois de perfuração da agulha. O principal componente da borracha é o elastômero; porém, ela é constituída também de agentes vulcanizantes, aceleradores, ativadores, antidegradantes, plastificantes, cargas e pigmentos. Estes compostos compreendem substâncias orgânicas e inorgânicas, que podem ser lixiviados para os produtos embalados. A lixiviação depende principalmente da natureza da formulação e do tempo de contato (BOHRER, 2012). Portanto, sendo as formulações dos contrastes compostas por complexantes, supõe-se grande afinidade pelos metais presentes na borracha.

Nas Figuras 24, 25 e 26, observa-se que o medicamento mais contaminado por Ba e Zn é o Magnevistan®, enquanto que para o Al é o OptiMARK®. Ambos apresentam excesso de ligante em suas formulações. Os contrastes que apresentam ligante livre são

Magnevistan®/Viewgam® 0,4 mg mL<sup>-1</sup>, Omniscan® 12 mg mL<sup>-1</sup> e OptiMARK® 28,4 mg mL<sup>-1</sup>.

Ao considerar o tempo de contato, verifica-se que, para o elemento Ba, os medicamentos Magnevistan®, Viewgam®, OptiMARK®, Omniscan® e Dotarem® extraíram cerca de 0,2 mg L<sup>-1</sup> no decorrer dos seis meses. Este comportamento já era esperado, devido à presença de ligante livre nos quatro primeiros contrastes citados. Porém, a ação do Dotarem® é surpreendente, uma vez que, além de não possuir ligante livre, é classificado como macrocíclico iônico, que apresenta grande estabilidade.

Observando o tempo de contato na extração do Zn da embalagem, verifica-se que o Omniscan® foi o contraste que extraiu a maior quantidade, chegando a 1,3 mg L<sup>-1</sup>. Os contrastes Viewgam® e OptiMARK®, também, apresentaram concentrações crescentes de Zn com o passar do tempo, chegando a 0,2 mg L<sup>-1</sup>. A extração de Zn nestas três marcas de contraste pode estar relacionada ao excesso de ligante nas formulações. Os contrastes das marcas Magnevistan®, Dotarem® e Gadovist® apresentaram concentrações de Zn constantes com o passar do tempo, fato que pode estar relacionado às constantes de estabilidade termodinâmicas, que são maiores para os complexos de gadolínio do que para os complexos de zinco (Tabela 10).

Considerando o Al, pode-se observar que é o metal presente em maior quantidade em todas as amostras. O medicamento mais contaminado por Al é o Magnevistan® e o menos contaminado o Omniscan®. Com o tempo de contato, os teores de Al aumentaram em todos os medicamentos, com destaque para o Omniscan® e para o OptiMARK®. A concentração de Al extraída pelo OptiMARK® triplicou após seis meses e, para o Omniscan®, ficou seis vezes maior comparada a sua concentração inicial. Como os dois contrastes apresentam excesso de ligante em suas formulações, esta pode ser a razão para a extração do metal da borracha.

#### 5.4.2 Determinação de As nos contrastes por HG AAS

O As foi determinado por espectrometria de absorção atômica com geração de hidretos. Os parâmetros para realização da análise estão no Apêndice E. As amostras de contraste a base de quelatos de Gd foram digeridas por degradação térmica em mufla.

A curva analítica foi feita pela determinação de quatro padrões de As, nas concentrações de 5 a 40  $\mu\text{g L}^{-1}$ . Todas as medidas foram realizadas em triplicata. A equação de regressão para o As,  $y = 0,0012x + 0,0005$ , apresentou um coeficiente de correlação linear igual a 0,9964 e o limite de detecção, considerando 11 medidas do branco, foi de 1,4  $\mu\text{g L}^{-1}$ . Foi realizado fortificação na amostra Dotarem® e a recuperação foi de 92,9%. Na Figura 27 podem-se observar os resultados da determinação de As nas amostras de contraste a base de Gd, sendo os desvios padrão relativos à duplicata da abertura.

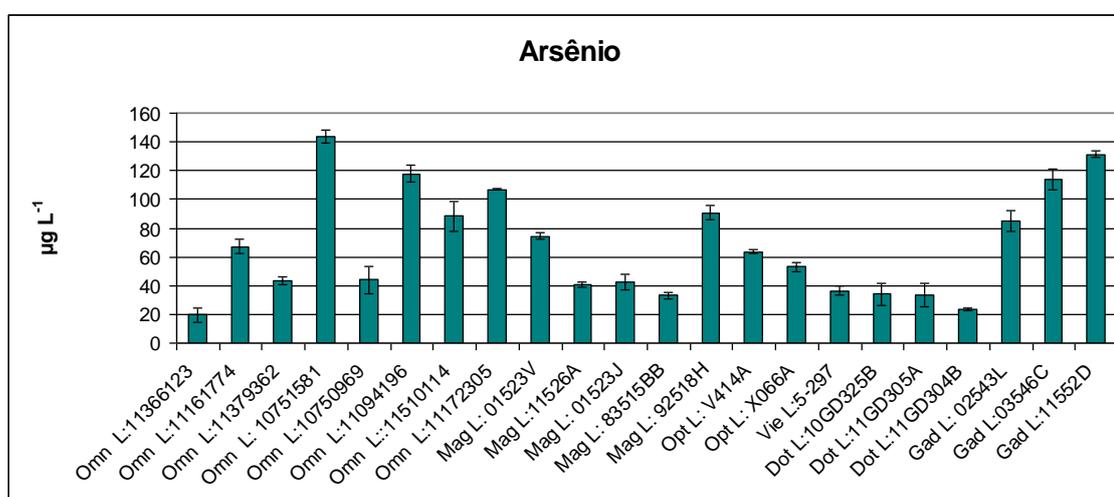


Figura 27 – Teor de arsênio presente como contaminante nas amostras de contraste a base de Gd, análise realizada por HG AAS.

Na Figura 27 pode-se observar que todos os medicamentos apresentaram contaminação por As, sendo que o teor varia de 20 a 140  $\mu\text{g L}^{-1}$ , ocorrendo variações consideráveis entre lotes diferentes do mesmo contraste. Em estudos anteriores, comprovou-se que o As pode ser extraído por infusões armazenadas em vidro (BOHRER et al., 2005). O trióxido de arsênio é utilizado na produção de vidros para evitar a formação de bolhas e, assim, garantir a sua transparência, sendo esta uma propriedade indispensável em embalagens para medicamentos que requerem inspeção visual imediatamente antes do uso (NASCIMENTO et al., 2005). Assim sendo, acredita-se que a contaminação das amostras de contraste por As pode ser proveniente da embalagem.

### 5.4.3 Determinação de Ca nos contrastes por F AAS

As medidas de Ca foram realizadas por espectrometria de absorção atômica em chama. As amostras analisadas foram decompostas em mufla elétrica, conforme descrito no item 4.5.1.2. As determinações foram realizadas em triplicata. A curva analítica foi feita pela análise de cinco padrões de cálcio, nas concentrações de 0,5 a 8,0 mg L<sup>-1</sup>. A equação de regressão para o Ca,  $y = 0,1112x + 0,0091$ , apresentou coeficiente de correlação linear igual a 0,9995 e limite de detecção, considerando 11 medidas do branco, de 0,03 mg L<sup>-1</sup>. Foi realizada a fortificação da amostra Dotarem® e a recuperação foi de 88%. Na Figura 28 podem-se observar os resultados da determinação de Ca nas amostras de contraste a base de Gd, cabe ressaltar, que os desvios padrão apresentados são relativos à triplicata da abertura.

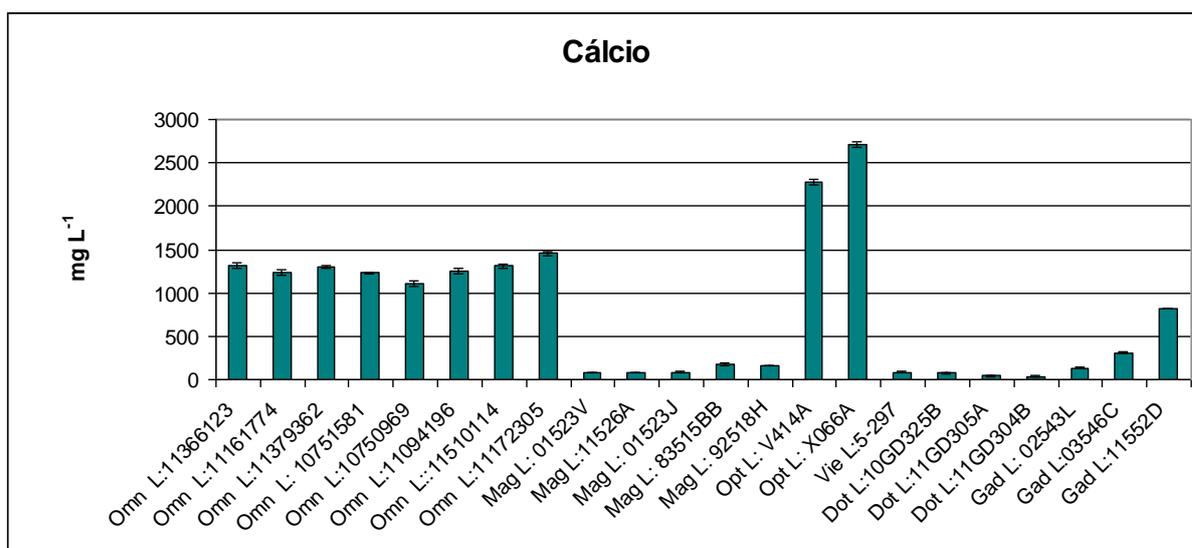


Figura 28 – Teor de Cálcio presente nas amostras de contraste a base de Gd, análise realizada por F AAS.

Observa-se na Figura 28 que os medicamentos que mais apresentam Ca são o Omniscan® e o OptiMARK®, seguidos pelo Gadovist®. Isso se deve ao fato destes contrastes apresentarem Ca como excipiente em sua formulação. O Omniscan® apresenta caldiamida sódica (Ca-DTPA-BMA, 25 mmol L<sup>-1</sup>), o OptiMARK® versetamida de cálcio (Ca-DTPA-BMEA, 50 mmol L<sup>-1</sup>) e também cloreto de cálcio di-hidratado e o Gadovist® apresenta calciobutrol (Ca-HP-DO3A, 1 mmol L<sup>-1</sup>), como pode ser observado, o Ca presente

como excipiente nos três contrastes é adicionado na forma de complexos, com exceção do OptiMARK® em que é adicionado na forma de cloreto. Observa-se também, que a quantidade de Ca no Omniscan® é bem regular entre os diferentes lotes, situando-se em torno de  $1,2 \text{ g L}^{-1}$ , valor próximo da quantidade já presente na formulação, de  $1,0 \text{ g L}^{-1}$ . Para o OptiMARK®, a concentração média foi de  $2,5 \text{ g L}^{-1}$ , sendo  $2,0 \text{ g L}^{-1}$  a quantidade presente na formulação. Para o Gadovist®, a quantidade determinada foi em média  $0,4 \text{ g L}^{-1}$ , sendo 10 vezes superior à adicionada, que é de  $0,04 \text{ g L}^{-1}$ .

Considerando os outros três contrastes em estudo, eles não apresentam Ca em suas formulações. Portanto, o Ca presente nestes medicamentos deve ser proveniente de impurezas no óxido de gadolínio, ou mesmo da embalagem em que é estocado o medicamento, uma vez que o vidro possui 0,5 % de CaO (BERTGNOLLI, 2008). O Magnevistan® apresenta, em média,  $116 \text{ mg L}^{-1}$  de Ca, enquanto o Viewgam® e o Dotarem® apresentam, em média, 80 e  $160 \text{ mg L}^{-1}$ , respectivamente.

O Ca foi analisado, pois quando presente na forma livre  $\text{Ca}^{2+}$ , não complexada, provoca reação de transmetalção *in vivo*, uma vez que seu raio iônico 114 pm se aproxima do raio iônico do  $\text{Gd}^{3+}$ , que é 107,8 pm (PALASZ; CZEKAJ, 2000; IDEÉ et al., 2006).

## 5.5 Considerações sobre o total de contaminantes nos contrastes a base de Gd

Na tabela 22 pode ser observada a relação de todos os elementos determinados nas seis marcas contrastes a base de quelatos de Gd utilizadas neste estudo.

Destaca-se nesta tabela a quantidade total de metais determinados e o excesso de ligante que poderia estar complexando estes metais. Sendo assim, observa-se que todos os compostos lineares (Omniscan®, OptiMARK®, Magnevistan® e Viewgam®) apresentam ligante em excesso, devido à maior facilidade de transmetalção. Enquanto os compostos Dotarem® e Gadovist®, classificados como macrocíclicos, são mais estáveis e teoricamente não necessitariam de ligante em excesso.

Tabela 22 - Total de impurezas e/ou contaminantes determinados em contrastes a base de Gd.

Contraste	Omniscan <sup>®</sup>	Dotarem <sup>®</sup>	Gadovist <sup>®</sup>	Magnevistan <sup>®</sup>	OptiMARK <sup>®</sup>	Viewgam <sup>®</sup>
Concentração Gd (mmol/mL)	0,5	0,5	1,0	0,5	0,5	0,5
Ligante excesso (mmol/mL)	0,025	-	0,001	0,001	0,050	0,001
Total de metais (mmol/mL)*	0,032	0,002	0,011	0,033	0,063	0,002
ETR (µmol/mL)	0,008	0,005	0,011	0,044	0,005	0,014
Metais endógenos (µmol/mL)**	0,122	0,046	0,348	0,053	0,668	0,140
Cálcio (µmol/mL)	31,875	1,343	10,500	2,925	62,300	2,035
Outros metais*** (µmol/mL)	0,386	0,149	0,193	0,327	0,039	0,243
Arsênio (µg/mL)	0,079	0,030	0,110	0,056	0,058	0,036
Silício (µg/mL)	11,651	4,585	4,244	7,243	16,694	9,618

\* Sc, Y, La, Ce, Pr, Nd, Sm, Eu, Tb, Dy, Ho, Er, Tm, Yb, Lu, Al., Ca, Cr, Fe, Cu, Zn., Ba e Pb.

\*\* Cu, Fe e Zn.

\*\*\* Al, Cr, Ba e Pb.

Verifica-se pela tabela 22, que em todas as marcas de contraste, o excesso de ligante é inferior à quantidade de metais presentes como contaminantes. Isso sugere que as formulações apresentam algum elemento metálico em sua forma livre e que, sendo capaz de competir com o Gd pelo ligante, podem provocar reações de transmetalção e liberar  $Gd^{3+}$ .

Além disso, o ligante na sua forma livre também é considerado potencialmente tóxico. O excesso de ligante presente nas formulações está na forma de quelatos de cálcio (caldiamida sódica, versetamida de cálcio e calciobutrol). Isto sugere que, mesmo grandes quantidades de ligante, não garantem que os íons metálicos provenientes das impurezas e/ou contaminantes estejam complexados.

## 5.6 Investigação da transmetalção do Gd do complexo Gd-DTPA por LC-MS

A possível transmetalção do Gd do complexo Gd-DTPA pelos outros metais foi estudada através da determinação da concentração do complexo Gd-DTPA e do DTPA livre por cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas.

Foi utilizado um cromatógrafo a líquido, equipado com bomba binária, detector de massas e fonte por *electrospray* operada no modo positivo. Foram monitoradas as razões massa/carga 549,0 e 394,1 que correspondem, respectivamente, ao complexo Gd-DTPA e ao DTPA livre. Observou-se o decréscimo do sinal correspondente à massa/carga do complexo na presença de outros metais, o que indica a substituição do Gd no complexo, uma vez que não houve aumento de sinal correspondente ao DTPA livre. As condições da fonte foram otimizadas de forma a se obter maior intensidade de sinal para o complexo Gd-DTPA.

A faixa linear obtida a partir de três curvas de calibração pela injeção de cinco padrões de Gd-DTPA, em triplicata, foi de 0 a 0,1270 mM, sendo a faixa de trabalho de 0,0127 a 0,1270 mM. A equação de regressão,  $y = 6128753,02 x - 2371,47$ , onde  $x$  é a concentração e  $y$  a resposta instrumental, apresentou coeficiente de correlação linear de 0,9992 e o limite de detecção foi de 0,01 mM.

Foram realizados testes de recuperação utilizando os padrões 1 (0,0127 mM) e 3 (0,0636 mM), injetados como se fossem amostras. Os resultados das recuperações foram 106% e 98%, respectivamente.

Para a análise cromatográfica, foram utilizadas amostras sintéticas, preparadas a partir das soluções padrões dos metais em estudo, misturadas ao ligante ácido dietileno triamino penta-acético (DTPA). Este ligante forma com o Gd o complexo Gd-DTPA, classificado como linear. Neste complexo, o  $Gd^{3+}$  é coordenado com cinco grupos carboxílicos e três grupos amino; o sítio remanescente é coordenado com uma molécula de água (BRÜCHER; SHERRY, 2001). Na Tabela 14 estão descritas as amostras sintéticas utilizadas neste estudo. A concentração de 0,0636 mM do complexo Gd-DTPA foi mantida e em cada solução variou-se a concentração do outro metal, de modo que as razões Gd-DTPA/metal foram 1:0,5; 1:1 e 1:2, ou seja, o outro metal estava presente na metade da concentração do Gd-DTPA, na mesma concentração e em concentração duas vezes maior.

As amostras foram injetadas em diferentes intervalos de tempo: 5, 60 e 120 dias após o preparo, para avaliar a influência do tempo na reação de transmetalção, uma vez que a

literatura estabelece como principal parâmetro físico-químico, para avaliar a transmetalção, a constante de estabilidade cinética dos complexos.

As Figuras 29 a 38 mostram os resultados da transmetalção do Gd pelos outros lantanídeos, considerando as variações de concentração do outro lantanídeo em relação ao Gd e ao tempo de armazenamento. Os valores mostrados são relativos ao complexo Gd-DTPA; portanto, a diminuição do sinal corresponde à substituição do Gd no complexo.

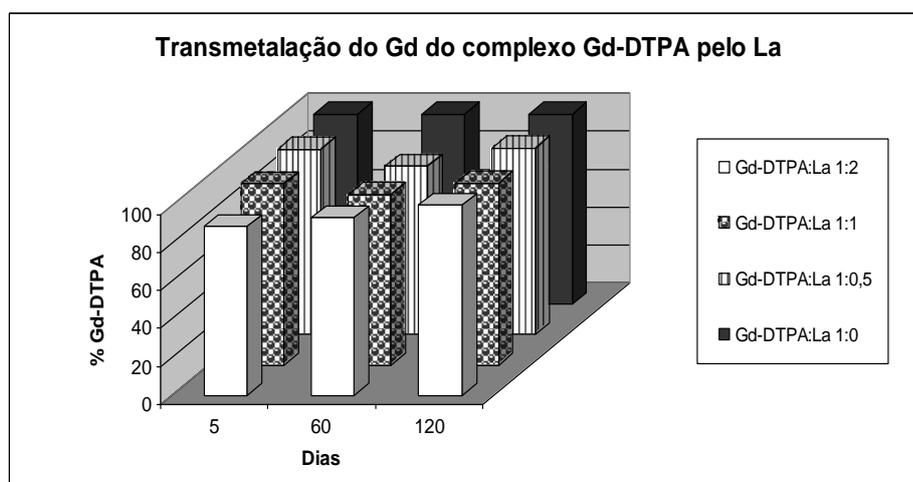


Figura 29 - Influência da concentração e do tempo na reação de transmetalção entre La e Gd no complexo Gd-DTPA.

É possível observar, na Figura 29, que o La apresenta pouca influência na estabilidade do complexo Gd-DTPA, pois tanto as concentrações crescentes de La, quanto o tempo de armazenagem, mostraram que apenas cerca de 20% do Gd foi substituído.

Na Figura 30 pode-se observar que o Nd causa significativa transmetalção do Gd no complexo Gd-DTPA. Concentrações crescentes de Nd causam gradual substituição do Gd em 20%, 40% e 60%. Verifica-se, também, que o tempo de armazenagem não influenciou significativamente a transmetalção Gd-DTPA/Nd-DTPA.

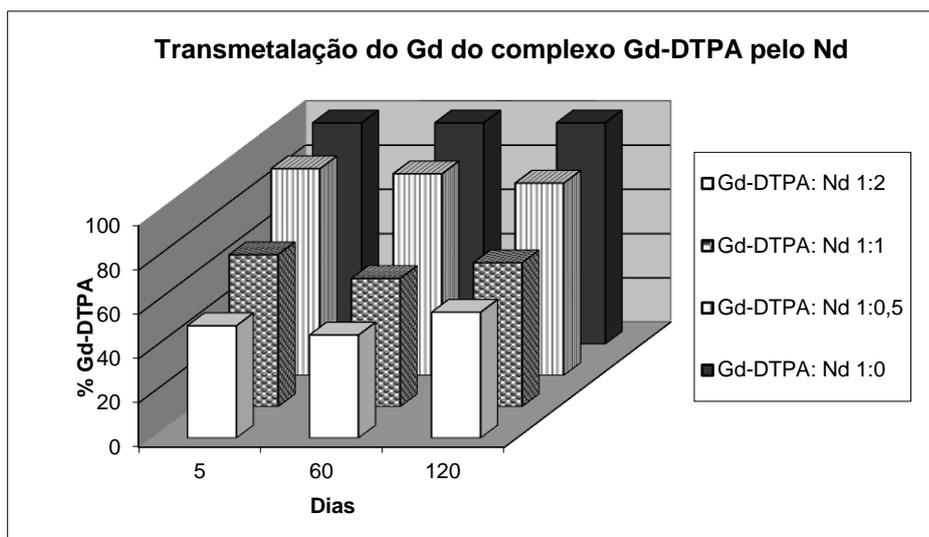


Figura 30 - Influência da concentração e do tempo na reação de transmetalção entre Nd e Gd no complexo Gd-DTPA.

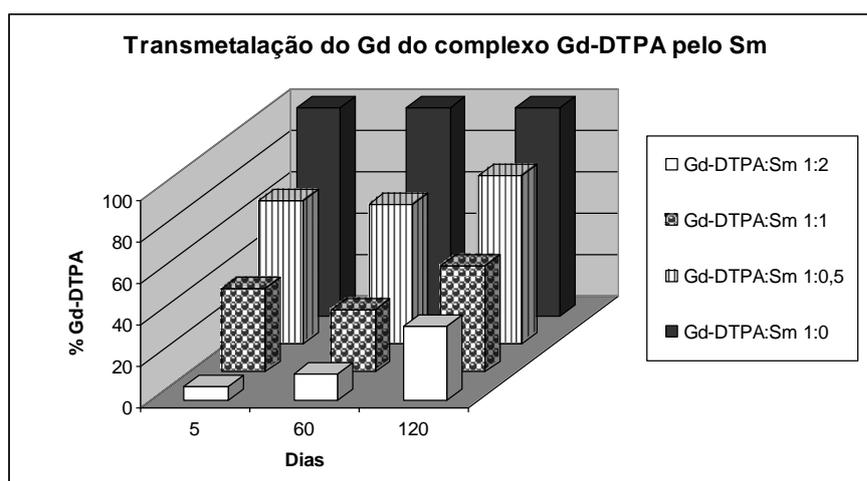


Figura 31 - Influência da concentração e do tempo na reação de transmetalção entre Sm e Gd no complexo Gd-DTPA.

A Figura 31 mostra o efeito do Sm sob o complexo Gd-DTPA. Nesta figura pode-se ver que as concentrações crescentes de Sm substituem, respectivamente, 40%, 70% e 90% do Gd do complexo. Entretanto, após 120 dias, um novo equilíbrio é estabelecido e cerca de 20% do complexo Gd-DTPA é refeito.

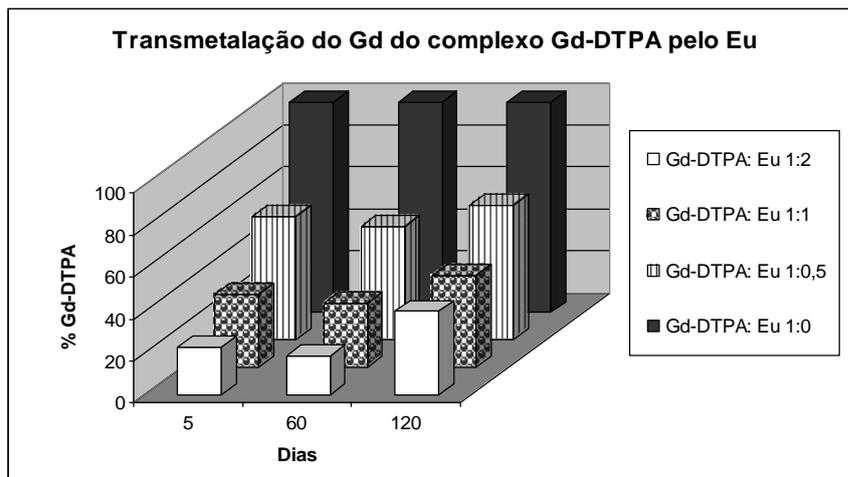


Figura 32 - Influência da concentração e do tempo na reação de transmetalção entre Eu e Gd no complexo Gd-DTPA.

Na Figura 32 observa-se o efeito do Eu sob o complexo Gd-DTPA. Inicialmente as concentrações crescentes de Eu trocam cerca de 50%, 80% e 90% do Gd do complexo. Da mesma maneira como ocorreu para o Sm, quando comparados os tempos de armazenagem de 5 e 120 dias, verifica-se que o Gd também consegue substituir o Eu do novo complexo formado Eu-DTPA, uma vez que a concentração de Gd-DTPA aumenta 20%.

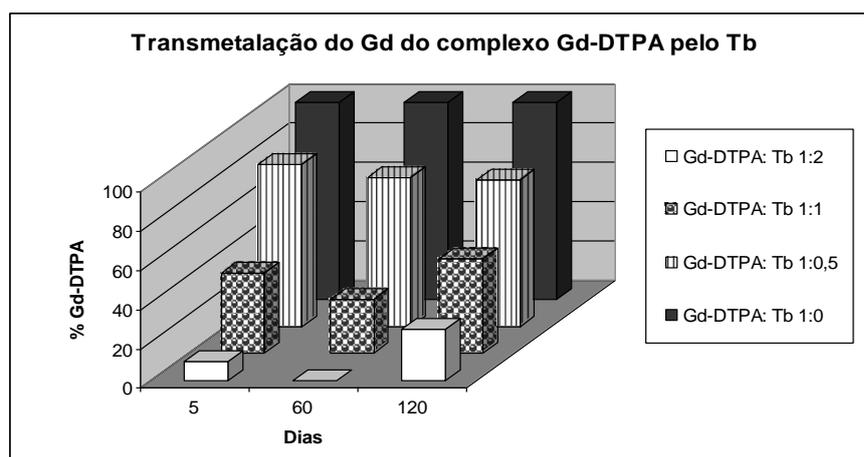


Figura 33 - Influência da concentração e do tempo na reação de transmetalção entre Tb e Gd no complexo Gd-DTPA.

Considerando a transmetalção do Gd pelo Tb (Figura 33), é possível observar que, inicialmente, as concentrações crescentes de Tb substituem 25%, 65% e 90% do Gd complexado. Após 60 dias, o Gd foi totalmente substituído por Tb na solução constituída de Gd-DTPA:Tb 1:2, e ainda, verifica-se, considerando esta mesma solução, que ao chegar aos 120 dias de armazenagem, um novo equilíbrio se estabelece, com o aumento da concentração do Gd-DTPA em 30%.

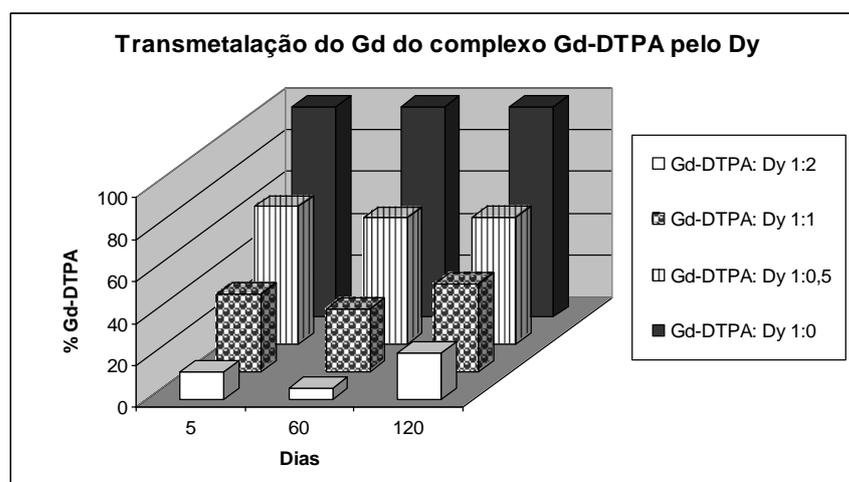


Figura 34 - Influência da concentração e do tempo na reação de transmetalção entre Dy e Gd no complexo Gd-DTPA.

Na Figura 34 está mostrada a influência de concentrações crescentes de Dy sob o complexo Gd-DTPA, onde se pode observar que o Gd é gradualmente substituído em 40%, 70% e 90%. Nesta figura, também pode ser observado que o tempo de armazenagem não influenciou significativamente a transmetalção Gd-DTPA/Dy-DTPA. Considerando a solução Gd-DTPA:Dy 1:2, verifica-se que a concentração do complexo de Gd diminui do dia 5 para o dia 60. Isso sugere que o Gd é substituído do complexo. Porém, após 120 dias, a concentração Gd-DTPA aumenta, o que demonstra que o Gd também substitui o Dy do complexo formado Dy-DTPA.

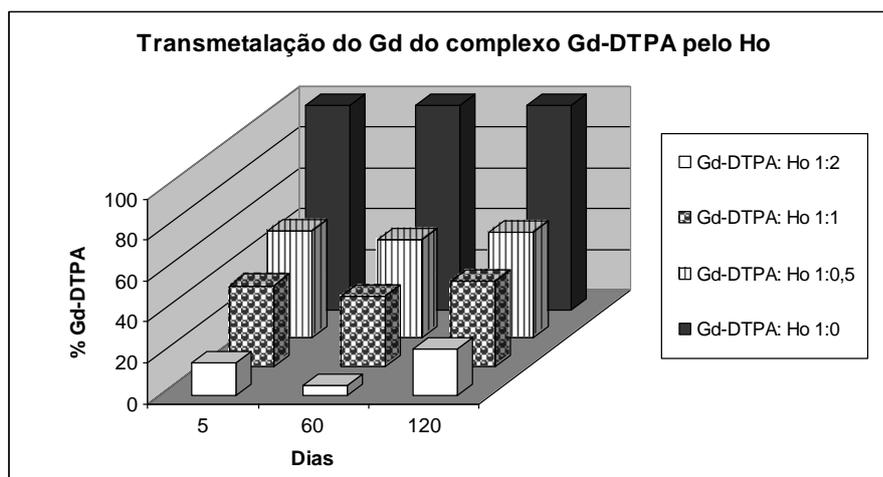


Figura 35 - Influência da concentração e do tempo na reação de transmetalção entre Ho e Gd no complexo Gd-DTPA.

A Figura 35 mostra o efeito do Ho sob o complexo Gd-DTPA. Observa-se que, com as concentrações crescentes de Ho, há a substituição de 60%, 70% e 90% do Gd complexado. Também se verifica que, com o tempo de armazenagem, o equilíbrio se restabelece e o Gd substitui parcialmente o Ho no complexo Ho-DTPA.

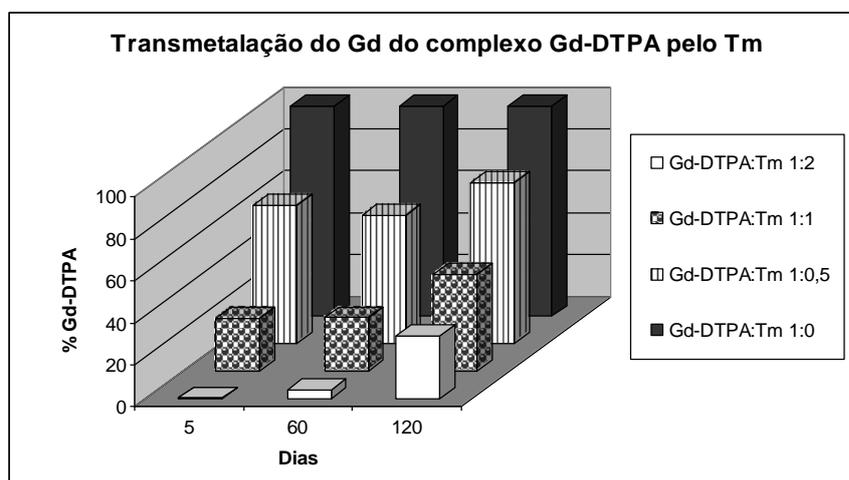


Figura 36 - Influência da concentração e do tempo na reação de transmetalção entre Tm e Gd no complexo Gd-DTPA.

Considerando a transmetalção do Gd pelo Tm (Figura 36), observa-se que, inicialmente, as concentrações crescentes de Tm substituem 40%, 70% e 100% do Gd

complexado. Observa-se que o Gd, também substitui o Tm do complexo, pois as concentrações de Gd-DTPA aumentam ao se comparar o tempo inicial com o final para as três soluções.

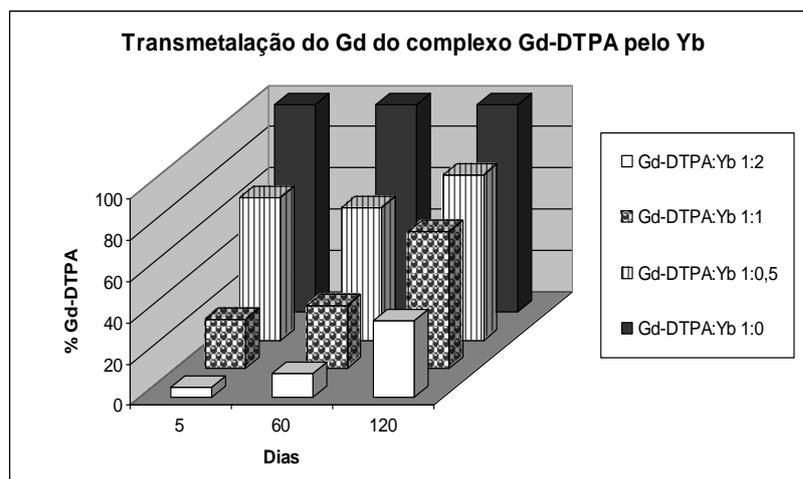


Figura 37 - Influência da concentração e do tempo na reação de transmetalção entre Yb e Gd no complexo Gd-DTPA.

Na Figura 37 pode-se observar a transmetalção do Gd pelo Yb, onde se verifica que, as concentrações crescentes de Yb, substituem 40%, 80% e 95% do Gd complexado, e quando comparado o tempo de armazenagem inicial e final, observa-se que o Gd também substitui o Yb do complexo formado entre Yb-DTPA.

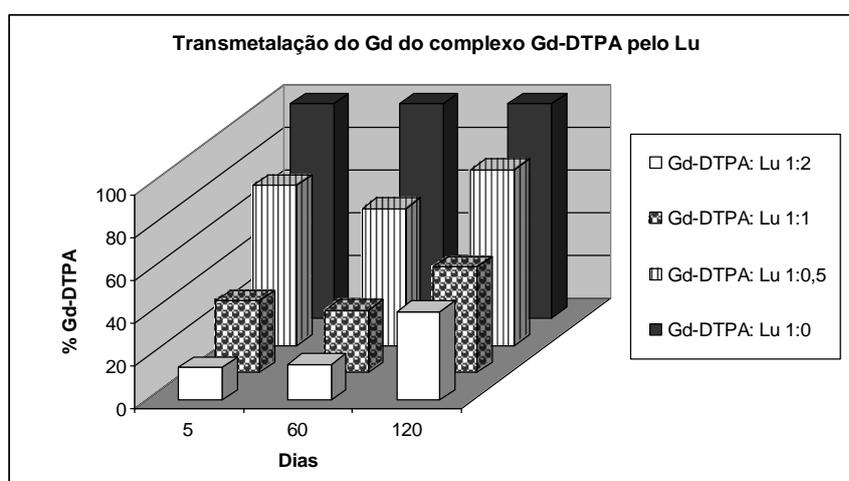


Figura 38 - Influência da concentração e do tempo na reação de transmetalção entre Lu e Gd no complexo Gd-DTPA.

A Figura 38 demonstra a transmetalização do Gd pelo Lu, onde se pode observar comportamento similar aos outros lantanídeos, ou seja, as concentrações crescentes de Lu substituem o Gd do complexo Gd-DTPA e quando comparado o tempo inicial de estocagem (5 dias) ao tempo final (120 dias), verifica-se que o Gd substitui o Lu do complexo Lu-DTPA, uma vez que a concentração de Gd-DTPA aumenta em torno de 20%.

De maneira geral, com exceção do La, todos os outros lantanídeos comportaram-se de modo bastante similar, tanto quando comparado o aumento das suas concentrações, quanto o decorrer do tempo de armazenagem. Destaca-se (Figura 3) que o complexo La-DTPA apresenta valor de constante de estabilidade termodinâmica menor do que Gd-DTPA, o que justifica este ter sido o lantanídeo que gerou a menor transmetalização.

As Figuras 39, 40 e 41 mostram o comparativo entre os lantanídeos em estudo, os dados presentes nestas figuras consideram a média das concentrações encontradas nos três tempos de armazenagem investigados. Pode-se observar o percentual de Gd substituído do complexo Gd-DTPA, quando a concentração do outro lantanídeo é a metade da concentração do Gd, quando as concentrações de Gd e do outro lantanídeo são iguais e quando a concentração do outro lantanídeo é o dobro da concentração de Gd.

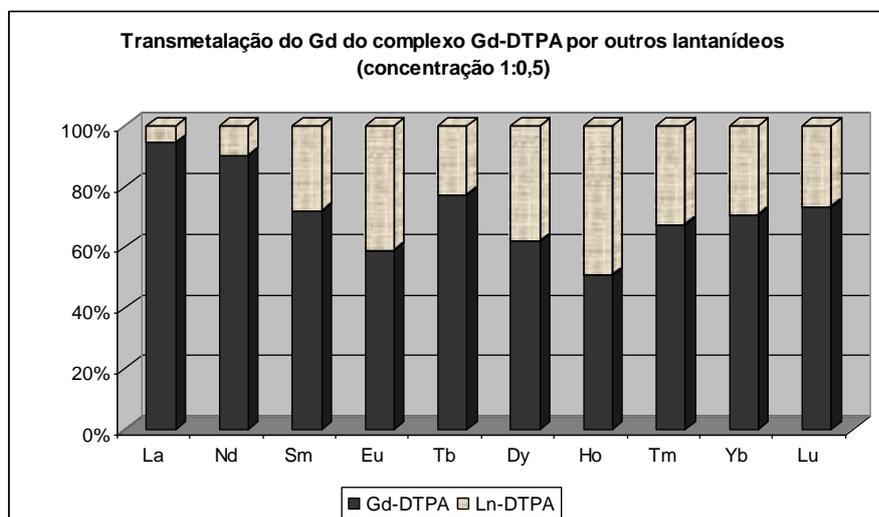


Figura 39 - Comparativo da transmetalização do Gd pelos outros lantanídeos. Soluções onde a concentração de Gd é o dobro da concentração de Ln.

Na Figura 39 observa-se que, quando a concentração do outro lantanídeo é inferior a do Gd, os elementos que mais substituem o Gd no complexo Gd-DTPA são o Ho e o Eu, deslocando praticamente 50% do Gd complexado, o que também sugere que todo o Ho e o Eu

presentes se ligam ao DTPA. Os elementos que menos substituem são o La e o Nd, substituindo em torno de 10% do Gd.

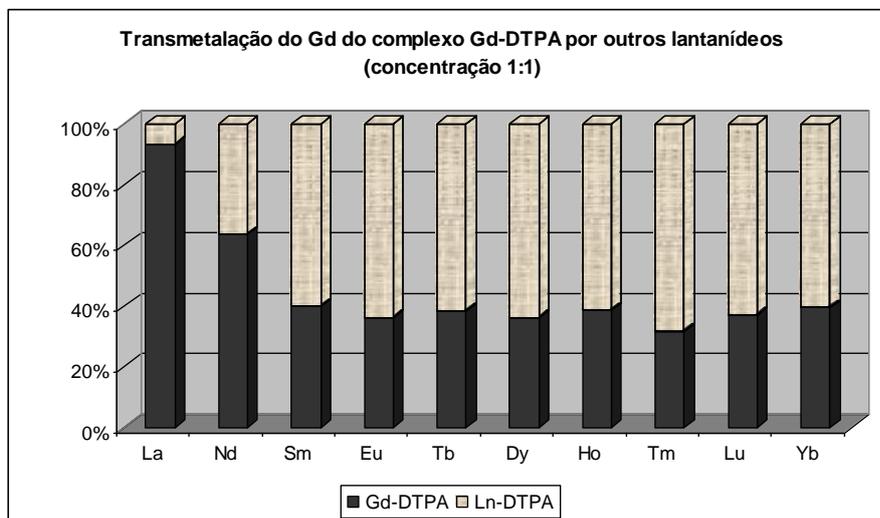


Figura 40 - Comparativo da transmetalção do Gd pelos outros lantanídeos. Soluções onde a concentração de Gd é igual à concentração de Ln.

Na Figura 40 pode-se observar que, quando os outros lantanídeos estão presentes na mesma concentração que o Gd na solução, eles substituem em torno de 70% do Gd do complexo Gd-DTPA, excetuando-se o La, que desloca 10% e o Nd, que desloca 40%. Isto sugere que os lantanídeos Sm, Eu, Tb, Dy, Ho, Tm, Lu e Yb possuem maior afinidade pelo ligante DTPA que o próprio Gd.

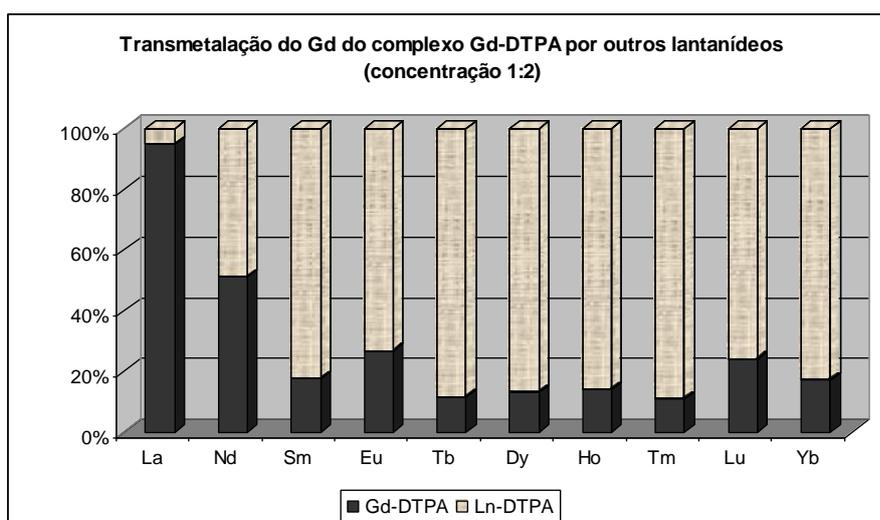


Figura 41 - Comparativo da transmetalção do Gd pelos outros lantanídeos. Soluções onde a concentração de Gd é a metade da concentração de Ln.

Na Figura 41, têm-se os outros lantanídeos em concentrações superiores ao Gd, onde pode ser observado que a transmetalização ocorre em extensão ainda maior, 80 a 90% do Gd presente. O La foi o elemento que menos deslocou o Gd do complexo Gd-DTPA, deslocando somente 10%, seguido do Nd que deslocou 50%. Entretanto, mesmo estando em concentração inferior a dos outros elementos, o Gd não foi totalmente transmetalado em nenhuma das soluções.

Devido ao  $Gd^{3+}$  ser potencialmente tóxico e sofrer transmetalização quando complexado, também foi investigado o efeito de outros elementos, além dos lantanídeos, presentes como contaminantes nas amostras de contraste. Nas Figuras 42 e 43 pode-se observar a transmetalização do Gd pelos outros metais presentes como contaminantes.

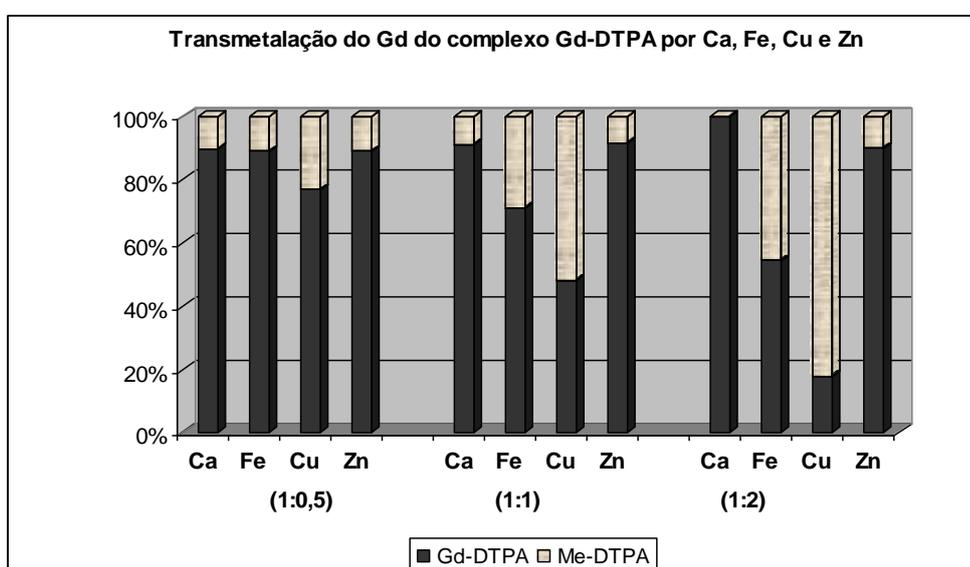


Figura 42 - Comparativo da transmetalização do Gd por Ca, Fe, Cu e Zn. Soluções em que a concentração de Gd é o dobro da concentração dos outros elementos (1: 0,5), em que as concentrações são semelhantes (1:1) e onde a concentração do Gd é a metade (1:2).

A Figura 42 mostra o efeito dos metais Ca, Fe, Cu e Zn sobre o complexo Gd-DTPA. Observa-se que, quando a concentração dos outros metais é inferior a do Gd (1:0,5), o Cu é o metal que causa a maior transmetalização, em torno de 25% do Gd é substituído, sendo que os outros metais (Ca, Fe e Zn) substituem cerca de 10% do Gd. Com o aumento da concentração dos metais investigados, de forma que atinjam a mesma concentração do Gd na solução, observa-se que o Cu substitui praticamente 50% do Gd complexado, seguido do Fe, em torno de 30%. Para o Ca e o Zn, a troca se mantém em torno de 10%. Quando a concentração dos

metais em estudo ultrapassa a concentração de Gd, solução 1:2, observa-se que o Cu substitui 85% e o Fe substitui 50% do Gd do complexado, o Zn permanece substituindo os 10% e o Ca, nesta concentração, não substitui o Gd do complexo.

Segundo Grobner, a transmetalção é facilitada pelo Zn, Cu, Fe, Ca ou ácidos endógenos, que desestabilizam complexos de Gd, liberando o  $Gd^{3+}$  (GROBNER, 2006). Cabe ressaltar que os metais Ca, Fe, Cu e Zn foram encontrados como contaminantes nos contrastes, de forma que o Gd pode ser transmetalado por estes metais, antes de ser administrado no paciente.

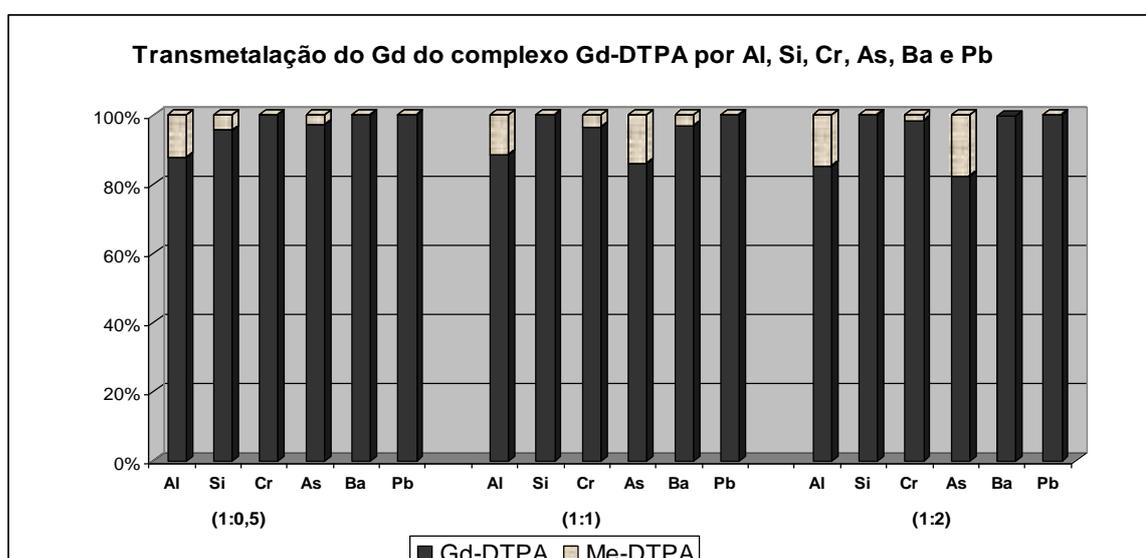


Figura 43 - Comparativo da transmetalção do Gd por Al, Si, Cr, As, Ba e Pb. Soluções em que a concentração de Gd é o dobro da concentração dos outros elementos (1:0,5), em que as concentrações são semelhantes (1:1) e onde a concentração do Gd é a metade (1:2).

Na Figura 43 observa-se a transmetalção do Gd do complexo Gd-DTPA por outros elementos encontrados como contaminantes nos contrastes analisados. Nesta figura pode-se verificar que, quando a concentração do outro elemento investigado é inferior a do Gd (1:0,5), o Al, o Si e o As são os elementos que mais substituem o Gd, cerca de 15%, 10% e 5%, respectivamente. Considerando a proporção 1:1, observa-se que o As é o elemento que mais substitui o Gd, cerca de 18%, seguido do Al 15%, Cr e Ba 5%. Quando é considerada a solução em que os outros elementos estão em concentração superior a do Gd verifica-se, que o As e o Al substituem aproximadamente 20% do Gd, enquanto os outros elementos não substituem o Gd do complexo nestas condições.

## 6 DISCUSSÃO DOS RESULTADOS

Nos últimos anos, tem havido um maior interesse nas propriedades físico-químicas dos quelatos de Gd, utilizados como agentes de contraste em RM. Alguns autores têm sugerido que a descomplexação do Gd destas moléculas pode estar envolvida no mecanismo de uma doença nova, que ocorre em pacientes com insuficiência renal grave ou crônica terminal, a fibrose sistêmica nefrogênica (FSN) (COWPER, et al. 2005; COWPER; BUCALA, et al. 2003, MORCOS, 2007; ABRAHAM; THAKRAL, 2008 ; MUNDIM, 2009).

Desde 2006, pesquisadores têm sugerido relação entre a administração de quelatos de Gd e o desenvolvimento de FSN em pacientes com insuficiência renal (GROBNER 2006; MARCKMANN et al., 2006.). Nestes estudos, foi encontrada uma relação de tempo direta entre a injeção do contraste e o posterior início da doença. A maioria dos casos publicados e que relacionam o uso do contraste a base de Gd com a FSN, destacam o quelato gadodiamida (Gd-DTPA-BMA/Omniscan®) e associam o fato deste quelato ser classificado como de cadeia aberta e não iônico (PORT et al., 2008). Para ligantes macrocíclicos, que formam complexos cineticamente mais estáveis com o Gd, esta doença não foi observada (FRENZEL,2008).

Os contrastes são administrados ao paciente por via endovenosa e sua excreção ocorre pela via renal. A meia-vida de eliminação plasmática é de cerca de 1,5 horas em indivíduos saudáveis. Porém, em pacientes com insuficiência renal, o tempo para eliminação é maior, chegando a exceder 30 horas (BELLIN et al., 2003; JOFFE et al., 1998). Sendo assim, dentre as hipóteses propostas para explicar essa doença, a mais amplamente aceita é a combinação de insuficiência renal e a permanência do quelato de Gd no corpo do paciente, uma vez que a chance de dissociação dos complexos aumenta com o tempo, especialmente para compostos de cadeia aberta e não iônicos (PORT et al., 2008).

Sabe-se que reações de transmetalção ocorrem com íons endógenos, frequentemente aumentados na insuficiência renal, e dependem dos agentes de contraste individuais (COWPER et al., 2000; BOYD et al., 2006; MARCKMANN et al., 2006). Estas reações são responsáveis pelo acúmulo de Gd no corpo do paciente, uma vez que biópsia na pele de pacientes renais, que fizeram uso deste tipo de contraste, revela a presença deste elemento (HIGH et al., 2007). Também se verificou a presença Gd em análise de sangue e cabelo de



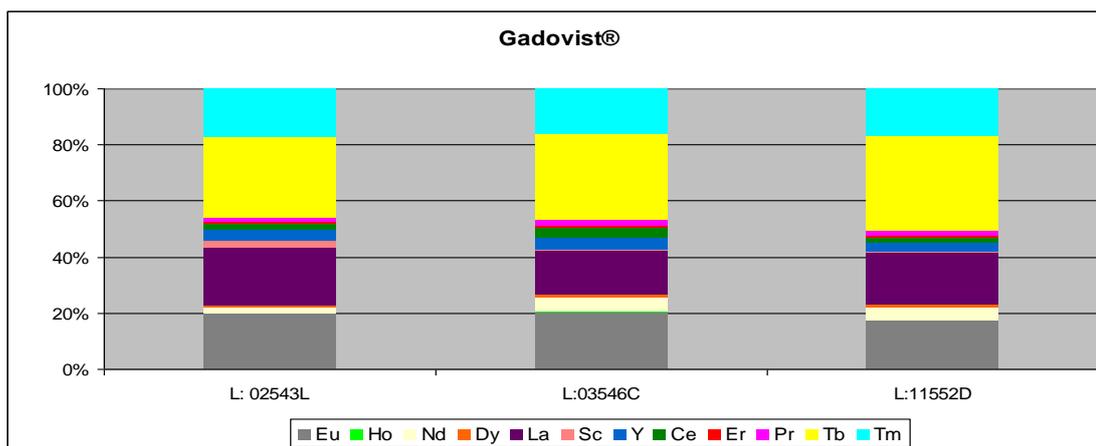


Figura 45 - Comparativo em termos percentuais de cada ETR nos diferentes lotes do contraste Gadovist®.

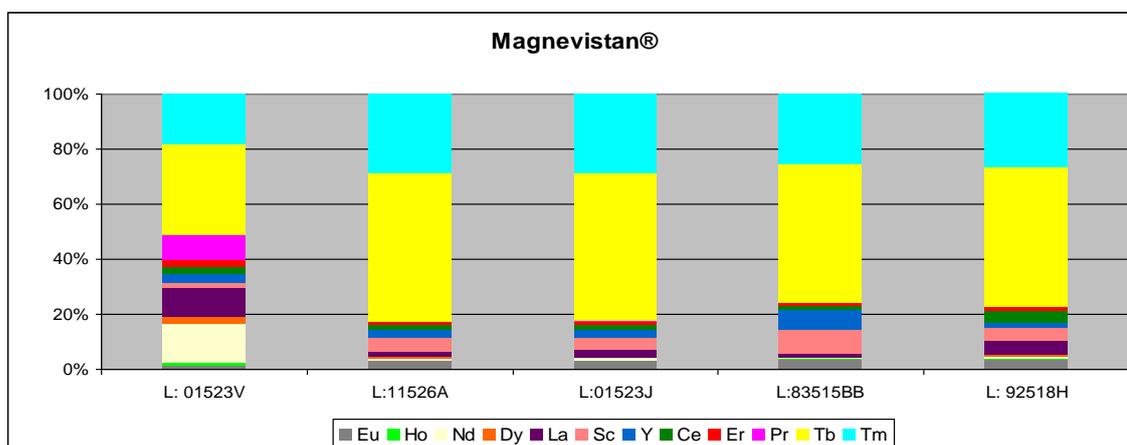


Figura 46 - Comparativo em termos percentuais de cada ETR nos diferentes lotes do contraste Magnevistan®.

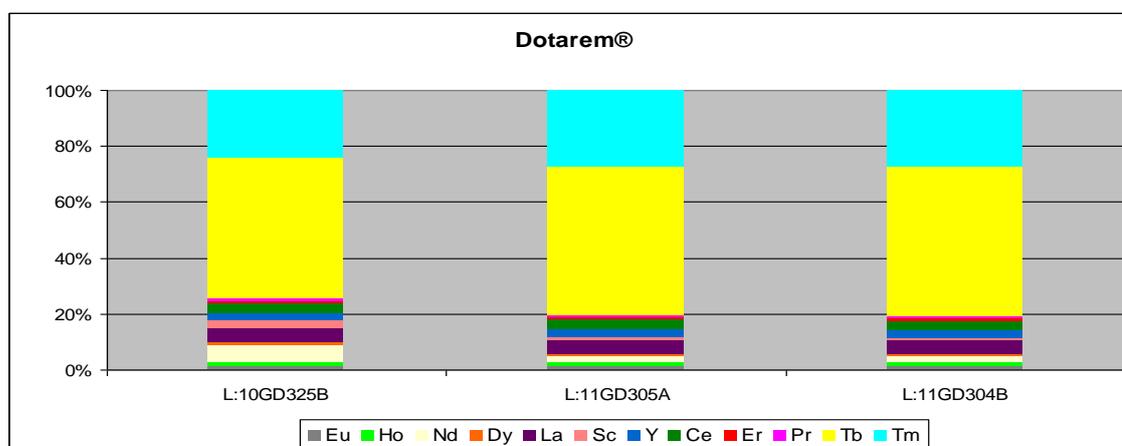


Figura 47 - Comparativo em termos percentuais de cada ETR nos diferentes lotes do contraste Dotarem®.

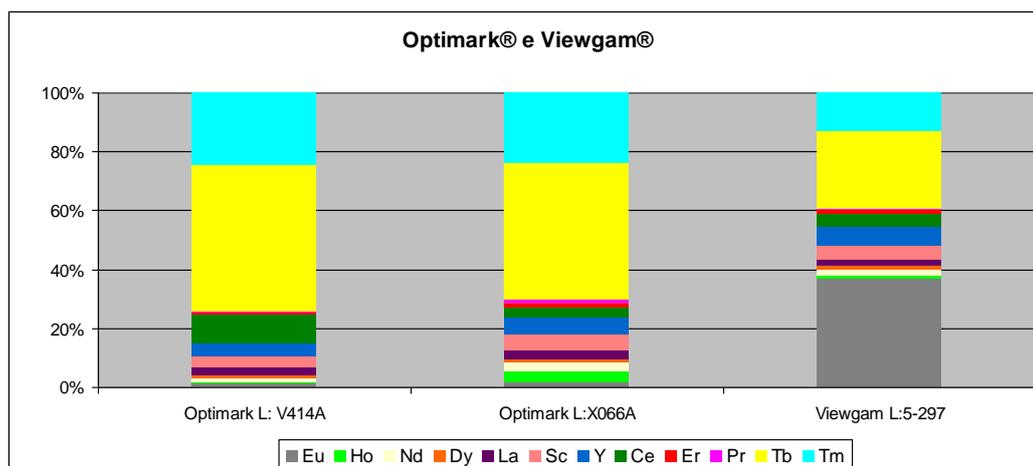


Figura 48 - Comparativo em termos percentuais de cada ETR nos diferentes lotes dos contrastes OptiMARK® e Viewgam®.

Ao se observar as figuras acima, percebe-se que, praticamente todos os medicamentos apresentam maiores contaminações por térbio e túlio. Considerando os contrastes individualmente, é possível verificar que o Omniscan® (Figura 44), na maioria dos lotes analisados, apresenta maiores quantidades de térbio, európio e túlio, com destaque ainda para lantânio, ítrio e neodímio. O contraste Gadovist® (Figura 45) também apresenta maiores quantidades de térbio, európio, túlio e lantânio, apresentando menor variação entre os lotes quando comparado ao Omniscan®. Os contrastes Magnevistan®, Dotarem® e OptiMARK® apresentaram teores maiores para o térbio e túlio, não sendo observada grande variação dos outros ETR entre os lotes investigados, já o contraste Viewgam® apresenta maior contaminação por európio, seguida por térbio e túlio, respectivamente.

A presença destes elementos como contaminantes dos contrastes a base de quelatos de Gd já era esperada, uma vez que o medicamento é fabricado a partir do óxido de gadolínio, que, sabidamente, contém os outros ETR como impurezas (Tabela 3). Os métodos utilizados para a separação dos ETR são considerados pouco seletivos, pois estes elementos possuem grande semelhança entre si, tanto nas suas propriedades físicas, quanto nas químicas (LEE, 1999). A maior proporção de térbio, európio e túlio pode estar relacionada a estes três elementos permanecerem juntos durante as etapas de separação do processo Rhone-Poulenc de extração líquido-líquido para a separação de ETR, demonstrado na Figura 1 (McGILL; MATHEY, 1993).

Quando comparados os elementos európio ( $Z = 63$ ), gadolínio ( $Z = 64$ ) e térbio ( $Z = 65$ ), verifica-se grande similaridade nas suas propriedades (Tabela 11). Os raios iônicos destes

elementos são muito similares 0,947, 0,938 e 0,923 Å, respectivamente. Suas configurações eletrônicas demonstram que enquanto o  $Gd^{3+}$  (Xe)  $f^7$  apresenta os 7 elétrons desemparelhados, fato que o torna o mais paramagnético entre os íons estáveis dos metais, o  $Eu^{3+}$  (Xe)  $f^6$  e o  $Tb^{3+}$  (Xe)  $f^8$  apresentam 6 elétrons desemparelhados. Outra importante característica dos lantanídeos é a contração lantanídica, diminuição do tamanho atômico e iônico com o aumento do número atômico. Isto ocorre devido ao efeito eletrostático associado ao aumento da carga nuclear blindada imperfeitamente pelos elétrons 4f. Como consequência, a basicidade dos elementos decresce ao longo da série (LEE, 1999). Desta maneira, estando estes três elementos próximos e em sequência na tabela periódica, a diferença de basicidade entre eles é pequena, o que dificulta o processo de separação, uma vez que, ao longo da série dos lantanídeos, a diferença de basicidade é responsável pela separação nos métodos de fracionamento (MARTINS; ISOLANI, 2005; JONES, 2001).

Devido aos outros ETR apresentarem comportamento químico semelhante ao Gd, e estarem presentes como contaminantes nas formulações dos contrastes, surge a preocupação relativa à presença destes elementos na sua forma livre, pois são todos potencialmente tóxicos; na verdade, tão tóxicos quanto o Gd. Sabe-se que o  $Gd^{3+}$  precisa ser associado a quelantes, formando complexos estáveis, evitando seus efeitos tóxicos (PALASZ; CZEKAJ, 2000; IDEÉ et al., 2006; PERAZELLA et al., 2007). Isto significa que estes elementos, assim como o Gd, devem ser quelados.

Sais de lantanídeos geralmente hidrolisam na forma de hidróxidos, que se acumulam no corpo, especialmente no baço, fígado e ossos. Os caminhos de excreção são urina e fezes. Na forma de complexo metálico, a excreção renal é aumentada e, conseqüentemente, a toxicidade diminui (THUNUS; LEJEUNE, 1999). Assim, surge a suspeita do Gd não ser o único possível causador da FSN, mas qualquer outro íon lantanídeo presente no contraste como impureza.

Com a finalidade de investigar as reações de transmetalção do  $Gd^{3+}$  por íons lantanídeos, utilizou-se como modelo o ligante DTPA, caracterizado por formar complexos lineares e iônicos. Foram preparadas amostras sintéticas; nestas, a proporção do complexo Gd-DTPA foi mantida constante 1:1. Variou-se a concentração do outro íon sob investigação, de modo a este conter proporção inferior (0,5:1), igual (1:1) e superior (1:2) ao Gd-DTPA. O pH de todas as amostras sintéticas foi ajustado a 7,3, pois se objetivava ter o complexo íntegro, ou seja, que as soluções em estudo não apresentassem  $Gd^{3+}$  e ligante livres. Segundo a

literatura, em pH 7,4, as taxas de dissociação de complexos de Gd são baixas (BRÜCHER, 2002).

Verificou-se de uma maneira geral que, com exceção do lantânio, todos os outros lantanídeos substituem consideravelmente o Gd de seu complexo Gd-DTPA, e a medida que aumenta a proporção do outro lantanídeo em relação ao Gd, aumenta a transmetalção. Sendo assim, é importante considerar a presença dos mesmos e adicionar maior quantidade de ligante às formulações, do contrário haverá Gd livre em solução. Além disso, é necessário considerar que os outros lantanídeos, comprovadamente presentes nestes agentes de contraste, também são potencialmente tóxicos, quando presentes na sua forma livre ( $\text{Ln}^{3+}$ ) e, por isso, também devem ser complexados.

Muitos agentes de contraste a base de Gd apresentam excesso de ligante, na forma de quelatos de cálcio, em suas formulações. Porém, verificou-se no presente trabalho, que a quantidade de elementos metálicos, presentes como contaminantes, é superior a este “excesso”, ou seja, os mesmos estão na sua forma livre na formulação.

Quelatos de Gd são regidos por um equilíbrio termodinâmico entre  $\text{Gd}^{3+}$ , ligante e complexo, que define a quantidade de  $\text{Gd}^{3+}$  e ligante livres gerados pela dissociação do complexo. Quanto maior a constante de estabilidade termodinâmica, mais estável será o complexo formado. Estas constantes permitem comparar estabilidades no equilíbrio, mas podem ser inadequadas para se prever reações, uma vez que a termodinâmica não leva em conta o fator tempo. Desta forma as constantes de estabilidades cinéticas, que consideram a velocidade em que o equilíbrio é atingido, devem ser levadas em consideração. O estudo da velocidade de reação é importante para determinar porque alguns complexos transmetalam facilmente e outros não (PORT et al., 2008). Está estabelecido que os ligantes macrocíclicos têm cinética de descomplexação mais lenta que os lineares, e que esta baixa estabilidade cinética dos complexos de cadeia aberta deve-se à rápida abertura destes complexos, devido à sua mobilidade conformacional (KUMAR, 1997; MORCOS, 2007). Sendo assim, o principal parâmetro físico-químico para avaliar a transmetalção é a constante de estabilidade cinética, apesar dos dados disponíveis serem as constantes de estabilidade termodinâmica e condicional, e estes ainda não incluem os lantanídeos para a maioria dos ligantes.

Neste trabalho o fator tempo foi levado em consideração. As medidas foram realizadas considerando os períodos de 5, 60 e 120 dias. Porém, verificou-se que o tempo não influenciou significativamente na transmetalção. Na figura 49 é possível observar as constantes de estabilidade termodinâmica do Gd e de outros elementos com o ligante DTPA.

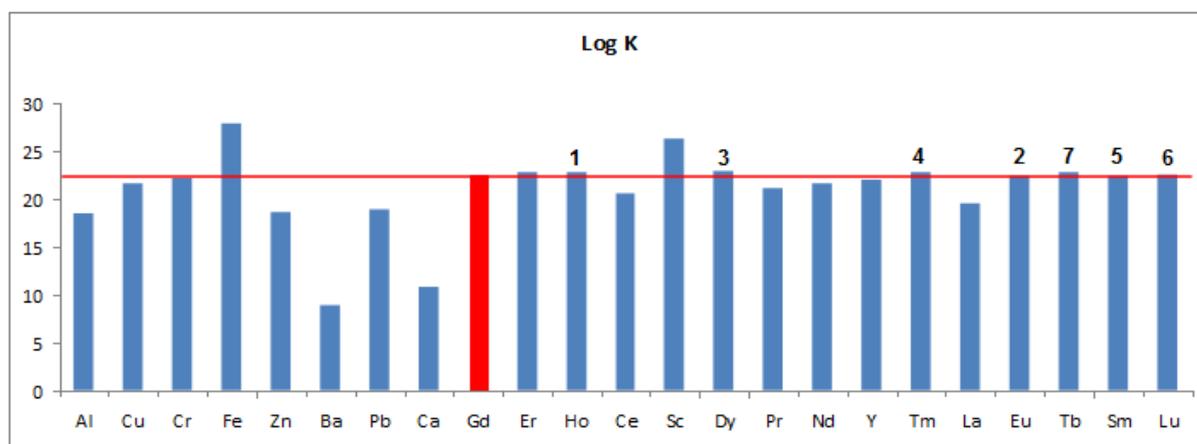


Figura 49 - Constantes de estabilidade termodinâmica de complexos formados com o ligante DTPA (IUPAC, 2005).

Na Figura 49, os números (1 ao 6) estão dispostos em ordem decrescente dos resultados obtidos nas reações de transmetalção. Verifica-se que os valores de constante de estabilidade termodinâmica, dos elementos destacados, são similares ao valor da constante Gd-DTPA.

## 6.2 Contaminantes: Outros elementos nos contrastes a base de quelatos de Gd

Além da contaminação pelos ETR, outro problema associado aos contrastes a base de quelatos Gd é a contaminação por metais endógenos e a liberação de  $Gd^{3+}$  e do ligante livre, seja na formulação, ou *in vivo*. O ligante livre causa desequilíbrios nos níveis de eletrólitos no sangue, enquanto o  $Gd^{3+}$  livre vem sendo atribuído a reações de transmetalção (SWAMINATHAN et al., 2007).

Há relatos na literatura de que, após a administração intravenosa de meios de contraste a base de quelatos de Gd, o cobre e o zinco intravasculares, que têm afinidade competitiva pelo quelato, substituem parte do Gd na molécula quelante, como por exemplo, o DTPA (ELIAS Jr, 2008). Cacheris e colaboradores realizaram estudos *in vitro* e *in vivo* desta relação entre estabilidade do quelato de Gd, transmetalção e toxicidade dos complexos de Gd. Estes pesquisadores demonstraram que a quantidade de Gd transmetalado por íons metálicos

endógenos, é um fator determinante para a toxicidade associada aos complexos de Gd (CACHERIS et al., 1990).

A transmetalização é facilitada por zinco, cobre, ferro, cálcio ou ácidos endógenos, que desestabilizam os complexos de Gd dos contrastes (GROBNER, 2006). Porém, em ensaios *in vivo*, é necessário considerar que a maior parte dos íons metálicos endógenos é estável, uma vez que se encontram ligados a proteínas ou enzimas. Por exemplo, ferro é mais provável que esteja ligado a ferritina e hemossiderina. Deste modo, a concentração ferro livre é pequena e supostamente insuficiente para causar transmetalização (CACHERIS et al., 1990). No entanto, vários fatores podem agravar a liberação de  $\text{Fe}^{3+}$  em pacientes com insuficiência renal. Sabe-se que a aplicação de agentes de contraste provoca elevação de ferro sérico, mesmo em indivíduos saudáveis. Além disso, pacientes renais crônicos são comumente tratados intravenosamente com suplementos de ferro, o que torna esta associação perigosa (VOROBIOV et al., 2003).

Com o objetivo de estudar os efeitos da transmetalização *in vivo* no agente de contraste Gd-DTPA (Magnevistan®), Künnemeyer e colaboradores desenvolveram um método para a determinação simultânea de Gd-DTPA, DTPA livre e seus produtos de transmetalização (Cu-DTPA, Fe-DTPA e Zn-DTPA). Estes autores utilizaram a eletroforese com ionização por *electrospray* e detecção por espectrometria de massa por tempo de voo (CE/ESI-TOF-MS) para a determinação simultânea dos analitos em amostras de plasma sanguíneo de pacientes com função renal normal. Os autores não observaram nenhum tipo de transmetalização e atribuíram a não ocorrência da reação ao fato dos pacientes não apresentarem insuficiência renal. Para simular a suplementação de ferro, que muitos pacientes renais precisam, os autores incubaram amostras de plasma com Gd-DTPA na concentração de  $0,5 \text{ mmol L}^{-1}$ , com e sem adição de quantidade equimolar de ferro. Neste ensaio foi observado que 74,5% do Gd-DTPA foi transmetalado a Fe-DTPA (KÜNNEMEYER et al., 2009).

Ensaio de transmetalização, *in vivo*, realizados por Puttagunta e colaboradores investigaram a excreção de zinco, após a administração dos contrastes Gd-HP-DO3A (ProHance®), Gd-DTPA (Magnevistan®) e Gd-DTPA-BMA (Omniscan®), e verificaram que o Gd-DTPA-BMA causou o maior aumento na excreção de zinco entre os três agentes, enquanto o Gd-HP-DO3A foi o mais inerte cineticamente (PUTTAGUNTA et al., 1996). Kimura e Ishiguchi investigaram a excreção de zinco e cobre em amostras de urina, após a administração intravenosa de Gd-DTPA-BMA (Omniscan®), Gd-DTPA (Magnevistan®) e Gd-DOTA (Dotarem®). Os autores verificaram que o Gd-DTPA-BMA causou o maior

aumento na excreção de zinco entre os três agentes, o Gd-DTPA causou um aumento moderado e o Gd-DOTA não provocou aumento. A excreção de cobre não teve diferença significativa entre os três agentes (KIMURA; ISHIGUCHI, 2005). Ambos os trabalhos concluíram que a diferença na excreção de zinco, entre os agentes de contraste, está, possivelmente, relacionada à transmetalção *in vivo* dos quelatos de Gd, e correlacionada à estabilidade variável dos agentes de contraste.

Estudos realizados para investigar a possibilidade de transmetalção do cálcio, sugerem que, *in vivo*, a transmetalção do cálcio é maior do que a do zinco. Devido à concentração sanguínea de  $\text{Ca}^{2+}$  (cerca de  $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$ ) ser maior que a de  $\text{Zn}^{2+}$  (cerca de  $10 - 50 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$ ) o equilíbrio se desloca para a formação de Ca-DTPA, mesmo que a constante de estabilidade termodinâmica do Zn-DTPA seja maior do que a do Ca-DTPA (Figura 49), uma vez que o que prevalece é a estabilidade cinética (IDÉE et al., 2006, IDÉE et al., 2008).

Em outro trabalho, foi investigado o efeito dos agentes de contrastes sobre a pressão sanguínea de ratos e verificou-se que os agentes de contrastes lineares Gd-DTPA (Magnevistan®) e Gd-DTPA-BMA (Omniscan®) apresentaram efeito hipotensor, enquanto os agentes de contraste macrocíclicos Gd-DOTA (Dotarem®) e Gd-HP-DO3A (ProHance®) não apresentaram efeito significativo sobre a pressão sanguínea. Neste mesmo estudo, administrou-se  $\text{Ca}^{2+}$  livre junto aos contrastes Gd-DTPA e Gd-DTPA-BMA e verificou-se que não houve diminuição na pressão. Os autores concluíram que, os dois complexos macrocíclicos, ao contrário dos lineares, não induzem diminuição da pressão sanguínea, e que a osmolaridade não é o único parâmetro envolvido em o efeito hipotensor do Gd-DTPA, uma vez que um fenômeno transmetalção rápida e transitória do  $\text{Gd}^{3+}$  pelo  $\text{Ca}^{2+}$  pode ocorrer *in vivo*, no caso dos agentes de contraste lineares (IDÉE et al., 1998).

Sendo comprovado que *in vivo* o equilíbrio entre o Gd-ligante pode ser alterado por vários cátions tais como  $\text{Fe}^{3+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ , ou  $\text{Ca}^{2+}$ , que competem com o  $\text{Gd}^{3+}$ , resultando em reações de transmetalção, buscou-se neste trabalho, investigar a presença tanto de metais endógenos (Fe, Cu, Zn e Ca), quanto de outros elementos que possam estar presentes como contaminantes (Al, Si, Cr, Pb, Ba e As) nos agentes de contrastes. Também, investigar as possíveis reações de transmetalção, *in vitro*, de modo que o Gd possa estar na sua forma livre na formulação.

As amostras analisadas incluíram diferentes lotes e marcas comerciais de contrastes a base de quelatos de Gd. Verificou-se que todas as amostras apresentam como contaminantes os metais Cu, Fe e Zn, e que existe variação na quantidade dos analitos quando considerados

lotes diferentes da mesma marca de contraste. O cobre encontra-se em quantidades elevadas em todas as amostras, chegando a cerca de  $10 \text{ mg L}^{-1}$  nos contrastes das marcas Omniscan®, OptiMARK® e Gadovist®. O ferro também foi encontrado em todas as amostras, chegando a cerca  $2 \text{ mg L}^{-1}$  em alguns lotes de Omniscan® e de Gadovist®. O zinco está presente em menor concentração nas amostras analisadas, sendo determinado cerca de  $1,5 \text{ mg L}^{-1}$  para o Omniscan® e aproximadamente  $0,8 \text{ mg L}^{-1}$  para Gadovist®, OptiMARK® e Magnevistan®. Estes elementos podem ter origem na matéria-prima utilizada na fabricação dos agentes de contraste. O óxido de gadolínio pode apresentar como impurezas outros óxidos metálicos, dentre eles, o óxido de cobre e o óxido de ferro (Tabela 3). Já a contaminação por zinco pode ter origem no recipiente onde está armazenada a formulação farmacêutica (HERING, 1986).

O cálcio também foi determinado nas amostras de contraste a base de quelatos de Gd. Este elemento foi selecionado para a investigação *in vitro*, uma vez que *in vivo* ocorre reação de transmetalção entre estes elementos, de forma que Gd atua inibindo processos fisiológicos que dependem do cálcio (PALASZ; CZEKAJ, 2000; IDEÉ et al., 2006). Porém, cabe ressaltar que alguns agentes de contraste, com o objetivo de garantir que não haja Gd livre em suas formulações, apresentam como excipientes sais de sódio ou sais de cálcio da molécula do ligante (IDÉE et al., 2006). O composto caldiamida sódica está presente no Omniscan®, calciobutrol no Gadovist® e no OptiMARK® versetamida de cálcio e também cloreto de cálcio di-hidratado, de forma que estas três marcas de contrastes foram as que mais apresentaram cálcio nas determinações realizadas. Bianchi e colaboradores sugerem que o  $\text{Ca}^{2+}$  é liberado de seus complexos, uma vez que estes apresentam constante estabilidade termodinâmica relativamente baixa, existindo  $\text{Ca}^{2+}$  livre pode haver a transmetalção do  $\text{Gd}^{3+}$  (BIANCHI et al., 2000).

Os contrastes das marcas Magnevistan®, Viewgam® e Dotarem® também apresentaram cálcio, porém, em menor quantidade. A origem deste elemento pode ser tanto impurezas presentes na matéria-prima, quanto a embalagem em que é armazenado o medicamento (BOHRER, 2012).

Com o objetivo de investigar a possível transmetalção do Gd por estes metais (Ca, Fe, Cu e Zn) realizou-se experimento similar ao efetuado, ou seja, prepararam-se soluções sintéticas de Gd-DTPA 1:1 e variou-se a concentração do outro metal sob investigação, de modo a este conter proporção inferior (0,5:1), igual (1:1) e superior (1:2) ao Gd-DTPA. Verificou-se que, dentre os quatro metais avaliados, o cobre, seguido pelo ferro, causa maior transmetalção, e que a mesma aumenta como o aumento da concentração destes metais. A

transmetalção causada pelo zinco mantém-se constante nas três concentrações investigadas. Já o efeito do cálcio sob o complexo Gd-DTPA é decrescente, ou seja, com o aumento da concentração de cálcio diminui a proporção de Gd deslocado do complexo.

Na Figura 50 é possível observar as constantes de estabilidade termodinâmicas destes quatro elementos, Gd-DTPA e seus produtos de transmetalção com ferro, cobre e zinco. Verifica-se que o Fe-DTPA possui valor superior ao Gd-DTPA, e que o complexo Cu-DTPA possui valor próximo ao da constante termodinâmica do Gd-DTPA podendo ser este o fator que faz com que o cobre e o ferro troquem maior quantidade de Gd, do complexo Gd-DTPA, em comparação com o zinco. Quando considerado o cálcio, verifica-se pela Figura 49, que ele possui constante de estabilidade termodinâmica menor do que o Gd-DTPA, o que justifica a baixa transmetalção observada experimentalmente.

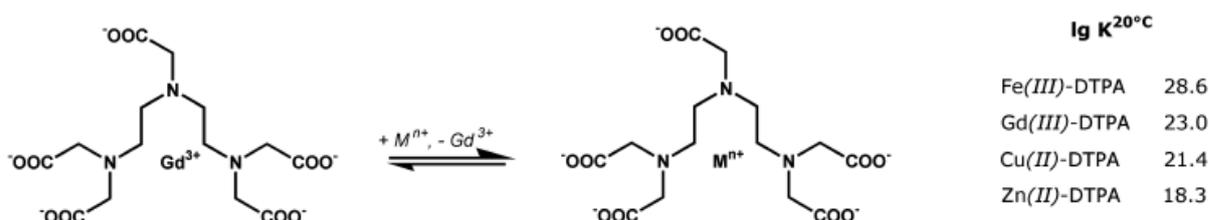


Figura 50 - Equação química do Gd-DTPA e possíveis produtos de transmetalção com íons endógenos (KÜNNEMEYER et al., 2009).

Destaca-se, ainda, que os resultados encontrados são a média das determinações realizadas durante quatro meses de armazenagem. Portanto, o fator tempo e a estabilidade cinética foram considerados, uma vez que, segundo a literatura, a estabilidade cinética prevalece sobre a estabilidade termodinâmica (IDÉE et al., 2006; IDÉE et al., 2008). Porém, não houve variação significativa nas concentrações com a passar do tempo.

Os outros elementos investigados (Al, Si, Cr, Pb, Ba e As) foram encontrados, como contaminantes, nas seis marcas de contraste a base de quelatos de Gd utilizadas neste trabalho (exceto Ba no Dotarem®). O interesse por estes analitos surgiu devido à identificação de sua presença em uma varredura realizada por ICP-MS, em algumas amostras selecionadas. Ao se investigar as possíveis reações de transmetalção, causadas por estes elementos no complexo Gd-DTPA, verificou-se que, somente o Al e o As, transmetalam o Gd do complexo.

## 7 CONCLUSÕES

Na primeira parte deste trabalho, foram investigados os elementos presentes como impurezas e/ou contaminantes em contrastes a base de quelatos de Gd. Devido à elevada concentração do quelato neste tipo de formulação e em virtude dos ligantes utilizados em sua composição, foi necessária uma avaliação dos procedimentos para o preparo das amostras. Entre a digestão por UV e a degradação térmica em mufla, o segundo procedimento gerou melhores resultados.

A análise realizada por ICP-MS mostrou que as seis marcas de contrastes a base de quelatos de Gd, utilizadas neste estudo, apresentam os ETR como impurezas. Verificou-se que os elementos presentes em maiores proporções são Tb, Eu, Tm e La. A presença destes elementos está relacionada à matéria-prima utilizada em sua fabricação, o óxido de gadolínio, que é comercializado com pureza de 99,9% e pode conter até 5 ppm dos outros ETR.

A partir dos resultados obtidos pelas técnicas de AAS, verificou-se que o Cu está presente em altas concentrações em praticamente todas as amostras, seguido pelo Fe e Zn. O Ca também foi encontrado nas amostras, chegando a concentrações de  $2,5 \text{ g L}^{-1}$ . Porém, compostos de Ca são adicionados como excipientes para estabilizar as formulações. Contudo, os outros três elementos não possuem esta aplicação. O Fe e o Cu são impurezas provenientes do óxido de gadolínio, enquanto o Zn apresenta-se como um contaminante e sua origem pode estar associada à embalagem em que é armazenada a formulação.

Al, Si, Ba, As, Pb e Cr estão presentes em praticamente todas as amostras de contrastes analisadas. Al e Si apresentam concentrações elevadas, o que corrobora com o fato destes elementos possuírem mais de uma origem de contaminação, a matéria-prima e a embalagem de vidro.

A investigação da possível transmetalção do Gd complexado por estes elementos, realizada por LC-MS, mostrou que todos os ETR estudados substituem o Gd do complexo Gd-DTPA. Considerando os metais endógenos (Cu, Fe, Zn e Ca), que são associados à transmetalção *in vivo*, observou-se que *in vitro*, o Cu foi o responsável pela maior transmetalção, seguido pelo Fe. Dos outros elementos avaliados, somente o Al e o As substituíram o Gd do complexo Gd-DTPA, e em pequena proporção.

Pode se concluir, através dos resultados obtidos, que os elementos presentes como impurezas nos óxidos de gadolínio estão presentes, como contaminantes, nas formulações dos agentes de contraste. Baseado nos experimentos realizados constatou-se que, nos contrastes investigados, a quantidade total de elementos metálicos ultrapassa o excesso do ligante adicionado para estabilizar as formulações. Desta maneira, estes metais podem estar na sua forma livre, o que possibilita a transmetalção do Gd de seus complexos e, conseqüentemente, a liberação do mesmo. Além disso, pelos ensaios de transmetalção, verificou-se que a maioria dos elementos investigados são capazes de transmetalizar o Gd de seu complexo com o DTPA.

## 8 REFERÊNCIAS

ABRAHAM, J. L.; THAKRAL C. Tissue distribution and kinetics of gadolinium and nephrogenic systemic fibrosis. **Eur J Radiol**, v. 66, p. 200-207, 2008.

AGUILERA C.; AGUSTÍ A. Nephrogenic systemic fibrosis and gadolinium contrast agents. **Med Clin (Barc)**, v. 136, n.14, p. 643-645, 2011.

AUGAGNEUR, S. et al. Determination of Rare Earth Elements in Wine by Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry Using a Microconcentric Nebulizer. **J Anal Atom Spectrom**, v. 11, p. 713-721, 1996.

BECKER S., PICKHARDT C., DIETZE H. Laser Ablation Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry. **Mikrochim Acta**, v.135, p. 71-80, 2000.

BECKER, J.S., DIETZE, H.J. Double-focusing sector field inductively coupled plasma mass spectrometry for highly sensitive multi-element and isotopic analysis: Invited lecture. **J Anal Atom Spectrom**, v.12, n.9, p. 881-889, 1997.

BECKER, S.; DIETZE, H.J. Cluster Formation Processes in Laser and Spark Plasmas of Rare Earth Oxide-Graphite Mixtures. **J Anal Atom Spectrom**, v. 10, p. 637-641, 1995.

BELLIN MF, VASILE M, MOREL-PRECETTI S. Currently used non-specific extracellular MR contrast media. **Eur Radiol**, v. 13, p. 2688-2698, 2003.

BERTAGNOLLI, Denise de Castro. Migração de metais por interação das embalagens com soluções parenterais. **Tese de doutorado**. (Doutorado em Química Analítica) - Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2008.

BIANCHI, A.; CALABI, L.; GIORGI, C. et al. Thermodynamic and structural properties of Gd<sup>3+</sup> complexes with functionalized macrocyclic ligands based upon 1,4,7,10-tetraazacyclododecane. **J Chem Soc Dalton Trans**, p. 697-705, 2000.

BOHRER, D. et al, Investigação sobre a origem do alumínio em soluções de nutrição parenteral. **Rev Bras Nutr**, v 18(2), p.47-56, 2003.

BOHRER, D. et al. Arsenic species in solutions for parenteral nutrition. **J Parenter Enteral Nutr**, v. 29 (1), p. 1-7, 2005.

BOHRER, D.; BERTAGNOLLI, D.C.; OLIVEIRA, S.M.R. et al. Drugs as hidden source of aluminum for chronic renal patients. **Nephrol Dial Transplant**, v. 22, p. 605-611, 2007.

BOHRER, D.; DO NASCIMENTO, P. C.; BINOTTO, R. et al. Influence of the glass packing on the contamination of pharmaceutical product by aluminum. Part III: Interaction container-chemicals during the heating for sterilisation. **J Trace Elem Med Biol**, v. 17, p. 107-115, 2003.

BOHRER, D. Sources of Contamination in Medicinal Products and Medical Devices. 1<sup>st</sup> ed. Hoboken: John Wiley & Sons, 2012 v.1 592 p.

BONGARTZ, E. Imaging in the time of NFD/NSF: do we have to change our routines concerning renal insufficiency? **Magn Reson Mater Phy**, v. 20, p.57-62, 2007.

BOUSQUET, J. C. et al. Gd-DOTA: characterization of a new paramagnetic complex. **Radiology**, v.166, p.693-698, 1988.

BOYD, K. E.; XIAO, Y. Y.; FAN, K.; POHOLEK, A.; COPELAND, N. G.; JENKINS, N. A.; Perkins, A. S. Gadolinium deposition in nephrogenic fibrosis dermopathy. **Blood**, v.107, p. 733-741, 2006.

BRASIL. **Agência Nacional de Vigilância Sanitária**. Resolução n° 899, de 29 de maio de 2003. Determina a publicação do guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos. Disponível em < [http:// www.anvisa.gov.br](http://www.anvisa.gov.br)>. Acesso em: 14 jan. 2013.

BROOME D. R. et al. Gadodiamide-associated nephrogenic systemic fibrosis: why radiologists should be concerned. **Am J Roentgenol**, v. 188, p. 586-592, 2007.

BYRNE, J.P., CARAMBASSIS, A.L. Vaporization and atomization of neodymium in graphite furnace atomic absorption spectrometry. **Spectrochimica Acta Part B**, v. 51, p.87-96, 1996.

BRÜCHER, E. Kinetic stability of gadolinium (III) chelates used as MRI contrast agents. **Top Curr Chem**, v. 221, p. 103-122, 2002.

BRÜCHER, E. ; SHERRY A.D. Stability and toxicity of contrast agents. In: Merbach AE, Toth E (eds). The chemistry of contrast agents in medical magnetic resonance imaging. Wiley, New York, 2001.

CACHERIS W. P.; QUAY S.C.; ROCKLAGE S.M. The relationship between thermodynamics and the toxicity of gadolinium complexes. **Magn Reson Imaging**, v.8, p. 467-481, 1990.

CARRIJO, R. M.; ROMERO, J. R.; Oxidações catalíticas e eletrocatalíticas de substratos orgânicos. O cério como oxidante. **Quím Nova**, v.23, n.3, p. 331-337, 2000.

COLLIDGE T. A. et al. Simpson K, Roditi GH. Gadolinium-enhanced MR imaging and nephrogenic systemic fibrosis: retrospective study of a renal replacement therapy cohort. **Radiology**, v. 245, p. 168-175, 2007.

COWPER, S. E. et al. Scleromyxoedema-like cutaneous diseases in renal-dialysis patients. **Lancet**, v. 356, p. 1000-1001, 2000.

COWPER, S. E.; BUCALA R. Nephrogenic fibrosing dermatopathy: suspect identified, motive unclear. **Am J Dermatopathol**, v. 25, p. 358, 2003.

COWPER, S. E.; KUO, PH, BUCALA, R. Nephrogenic systemic fibrosis and gadolinium exposure: association and lessons for idiopathic fibrosing disorders. **Arthritis Rheum**, v. 56, p. 3173-3175, 2007.

COWPER, S. E; BUCALA, R.; LEBOIT, P. E. Case 35-2004: nephrogenic fibrosing dermatopathy. **N Engl J Med**, v. 352, p. 1723, 2005.

Critical evaluation of stability constants of metal complexes of complexones for biomedical and environmental applications. **IUPAC technical report. Pure Appl Chem**, 77(8), p. 1445-1495, 2005.

D'LLIO, N. et al. Determination of trace elements in serum by dynamic reaction cell inductively coupled plasma mass spectrometry: Developing of a method with a desolvating system nebulizer. **Anal Chim Acta**, v. 573-574, p. 432-438, 2006.

DAY J. A. et al. Application of capillary electrophoresis interfaced to double focusing sector field ICP-MS for nuclide abundance determination of lanthanides produced via

spallation reactions in an irradiated tantalum target. **J Anal At Spectrom**, v. 15, p.1343-1348, 2000.

DESREUX, J.F. Nuclear magnetic resonance spectroscopy of lanthanide complexes with a tetraacetic-tetraaza macrocycle. Unusual conformation properties. **Inorg Chem**, v. 19, p.1319-1324, 1980.

DONATI G. L. et al. Simultaneous determination of the Lanthanides by tungsten coil atomic emission spectrometry. **J Anal At Spectrom**, v. 23, p. 361–366, 2008.

DULSKI, P. Interferences of oxide, hydroxide and chloride analyte species in the determination of rare earth elements in geological samples by inductively coupled plasma-mass spectrometry. **Fresenius J Anal Chem**, v. 350, p.194-203, 1994.

ELIAS Jr, J. et al. Complicações do uso intravenoso de agentes de contraste à base de gadolínio para ressonância magnética. **Radiol Bras**, v. 41, n. 4, p. 263-267, 2008.

EL-TAHER A. Rare earth elements content in geological samples from eastern desert, Egypt, determined by instrumental neutron activation analysis. **Appl Radiat Isto**, v.68, p.1859–1863, 2010.

FDA. **Information for Healthcare Professionals: Gadolinium-Based Contrast Agents for Magnetic Resonance Imaging (marketed as Magnevist, MultiHance, Omniscan, OptiMARK, ProHance.** Disponível em: <<http://www.fda.gov/Drugs/DrugSafety/PostmarketDrugSafetyInformationforPatientsandProviders/ucm142884.htm>>. Publicada em: jun. 2006. Atualizada em: dez. 2006 e 23 maio 2007. Acesso em: 29 out. 2012.

FDA. **Public Health Advisory - Gadolinium-containing Contrast Agents for Magnetic Resonance Imaging (MRI)** Disponível em: <<http://www.fda.gov/Drugs/DrugSafety/PostmarketDrugSafetyInformationforPatientsandProviders/DrugSafetyInformationforHealthcareProfessionals/PublicHealthAdvisories/ucm053112.htm>>. Publicada em: 06 ago. 2006. Acesso: 31 out. 2012.

FDA. **Requests Boxed Warning for Contrast Agents Used to Improve MRI Images.** Disponível em: <<http://www.fda.gov/NewsEvents/Newsroom/PressAnnouncements/2007/ucm108919.htm>>. Publicada em: 23 maio 2007. Atualizada em: 18 jun. 2009. Acesso: 31 out. 2012.

FRENZEL, T. Stability of gadolinium-based contrast agents in human serum. **Eur Radiol**, v.18 , n.1, p. 162, 2008.

FROES, R.E.S; WINDMÖLLER, C.C.; DA SILVA, J.B.B. Emprego da Modificação Química Permanente para a determinação de metais em matrizes diversas por Espectrometria de Absorção Atômica em Forno de Grafite. **Revista Analytica**, Junho/Julho n. 23, 2006.

GALAN, A.; COWPER, S. E.; BUCALA R. Nephrogenic systemic fibrosis (nephrogenic fibrosing dermopathy). **Curr Opin Rheumatol**, v. 18, p. 614-617, 2006.

GINÉ-ROSIAS, M. F. Espectrometria de massas com fonte de plasma.(ICP-MS) / Maria Fernanda Giné-Rosias - Piracicaba: CENA, 1999. p.118. (Série Didática, v.4)

KÜNNEMEYER GROBNER T. Gadolinium: a specific trigger for the development of nephrogenic fibrosing dermopathy and nephrogenic systemic fibrosis? **Nephrol Dial Transplant**, v. 21, p. 1104-1108 2006.

GUPTA, S. J.G.Determination of scandium, yttrium and lanthanides in silicate rocks and four new Canadian iron-formation reference materials by flame atomic-absorption spectrometry with microsample injection. **Talanta**, v. 31, p.1045-1051, 1984

HALICZ, L. et al. Characterization of natural water resources in Israel by inductively coupled plasma mass spectrometry. **Int J Mass Spectrom**, v. 249-250, p. 296-302, 2006.

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

HE M., HU B., JIANG Z. Electrothermal vaporization inductively coupled plasma massspectrometry for the determination of trace amount oflanthanides and yttrium in soil with polytetrafluroethylene emulsion as a chemical modifier. **Anal Chim Acta**, v.530, p.105–112, 2005.

HENDERSON, P. **General geochemical properties and abundances of the rare earth elements**. In: HENDERSON, P. Ed Rare Earth Elements Geochemistry, Elsevier Science B. V., Amsterdam, 1984, p. 1- 29.

HERING, S. E. et al. Contaminant zinc content in solutions routinely used in rehydration and or parenteral feeding. **Arq gastroenterol**, v. 23, n. 1 , p.47-51, 1986.

HERMANN, P. et al, Gadolinium (III) complexes as MRI contrast agents: ligand design and properties of the complexes. **Dalton Trans**, n. 23, p. 3027–3047, 2008.

HIGH, W. A.; REED A. A.; JOHN CHANDLER, *et al.* Gadolinium is detectable within the tissue of patients with nephrogenic systemic fibrosis **J Am Acad Dermatol**, January p. 22 a 26, 2007.

ICH. **International Conference on Harmonisation of Technical Requerimentes for Registration of Pharmaceutical for Human Use**: Validation of analytical procedures:methodology. ICH Steering Committee, 1996.

IDÉE J. M.; BERTHOMMIER C., GOULAS V. *et al.* Haemodynamic effects of macrocyclic and linear gadolinium chelates in rats: role of calcium and transmetallation. **Biomaterials**, v. 11, p. 113-123, 1998.

IDÉE, J. M. ; Port, M. Medina, C. *et al.* Possible involvement of gadolinium chelates in the pathophysiology of nephrogenic systemic fibrosis: A critical review. **Toxicology**, v. 248, p. 77-88, 2008.

IDÉE, J. M. et al. Clinical and biological consequences of transmetallation induced by contrast agents for magnetic resonance imaging: a review. **Fundam Clin Pharmacol**, v. 20, p. 563-576, 2006.

IUPAC. **Nomenclature Of Inorganic Chemistry IUPAC Recommendations 2005**. Published for the International Union of Pure and Applied Chemistry by The Royal Society of Chemistry, Thomas Graham House, Science Park, Milton Road, Cambridge CB4 0WF, UK, 2005, p.51.

JOEBSTL, D. et al. Identification of the geographical origin of pumpkin seed oil by the use of rare earth elements and discriminant analysis. **Food Chem**, v. 123 1303–1309, 2010.

JOFFE, P.; THOMSEN, H. S; MEUSEL ,M. Pharmacokinetics of gadodiamide injection in patients with severe renal insufficiency and patients undergoing hemodialysis or continuous ambulatory peritoneal dialysis. **Acta Radiol**, v. 5, p. 491-502, 1998.

JONES, C. J. **d- and f- Block Chemistry**. The Royal Society of Chemistry: Cambrigde, 2001, p 175.

KARAM M.A.H. Risk of nephrogenic systemic fibrosis with the use of gadolinium containing contrast media on chronic kidney disease. **J Bras Nefrol**, v. 30, n.1, p. 66-71, 2008.

KHURANA A. et al. Nephrogenic systemic fibrosis. A review of 6 cases temporally related to gadodiamide injection (Omniscan). **Invest Radiol**, v. 42, p. 139-145, 2007.

KIMURA, J.; ISHIGUCHI, T.; MATSUDA, J. et al. Human comparative study of zinc and copper excretion via urine after administration of magnetic resonance imaging contrast agents. **Rad Med**, v. 23, p. 322-326, 2005.

KUMAR, K. et al. Synthesis, stability, and crystal structure studies of some  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ , and  $\text{Zn}^{2+}$  complexes of macrocyclic polyamino carboxylates. **Inorg Chem**, v. 34, p. 6472-6480, 1995.

KUMAR, K. Macrocyclic polyamino carboxylate complexes of Gd (III) as magnetic resonance imaging contrast agents. **J Alloys Comp**, v. 249, p. 163-172, 1997.

KUMAR, K.; CHANG, C.; TWEEDLE, A. Equilibrium and kinetic studies of lanthanide complexes of macrocyclic polyamino carboxylates. **Inorg Chem**, v. 32, p. 587-593, 1993.

KÜNNEMEYER, J. Et al. Speciation Analysis of Gadolinium Chelates in Hospital Effluents and Wastewater Treatment Plant Sewage by a Novel HILIC/ICP-MS Method. **Environ Sci Technol**, v. 43, n.8, p.2884–2890, 2009.

LAURENT, S., et al. Stability of MRI paramagnetic contrast media. A proton relaxometric protocol for transmetallation assessment. **Invest Radiol**, v. 36, p. 115–122, 2001.

LAURENT, S.; VANDER ELST, L; MULLER, R.N. Comparative study of the physicochemical properties of six clinical low molecular weight gadolinium contrast agents. **Contrast Med Mol Imaging**, v. 1, p.128-137, 2006.

LAWRENCE, M. G. et al. Direct quantification of rare earth element concentrations in natural waters by ICP-MS. **Appl Geochem**, v 21, p. 839–848, 2006.

LEE, J. D. **Química inorgânica não tão concisa**. Edgard Blucher Ltda: São Paulo, 1999, cap 29.

MALIK, A.K et al. Methodologies for the determination of low concentrations of lanthanides in biological samples by ICP-MS. **At. Spectrosc**, v.28, n. 4, p. 123-128, 2007.

MARCKMANN P. et al. Case-control study of gadodiamide-related nephrogenic systemic fibrosis. **Nephrol Dial Transplant**, v. 22, p. 3174-3178, 2007.

MARCKMANN P. et al.. Nephrogenic systemic fibrosis: suspected causative role of gadodiamide used for contrast-enhanced magnetic resonance imaging. **J Am Soc Nephrol**, v. 17, p. 2359-2362, 2006.

MARTINS, T.S.; ISOLANI, P.C. Terras Raras: Aplicações Industriais e Biológicas **Quím Nova**, v. 28, n.1, p. 111-117, 2005.

MAZZOLA, A. A. Ressonância magnética: princípios de formação da imagem e aplicações em imagem funcional. **Rev Bras Fis Med**, v. 3, n. 1, p.117-219, 2009.

MCGILL I, MATHEY J. **Rare earth elements**. **Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry**. Wiley-VCH, v. 31, p. 607-649, 1993.

MENEZES, M. F.; SANTOS, H.F. Titulação Indireta ou de retorno dos lantanídeos usando EDTA como complexante e ditizona como indicador. Dept<sup>a</sup>. de Metalurgia Extrativa – **CETEM/CNPq-RJ**, 1991.

MEYER, D.; SCHAEFER, M.; BONNEMAIN, B. Gd-DOTA, a potential MRI contrast agent, Current status of physicochemical knowledge. **Invest Radiol**, v. 23, p. 232-235, 1988.

MORCOS S. K. Extracellular gadolinium contrast agents: differences in stability. **Eur J Radiol**, v. 66, p.175-179, 2008.

MORCOS S. K. Nephrogenic systemic fibrosis following the administration of extracellular gadolinium based contrast agents: is the stability of the contrast agent molecule an important factor in the pathogenesis of this condition? **Br J Radiol.**, v. 80, p. 73-76, 2007.

MORSCHBACHER, Vanessa Domingues. Bário em soluções de nutrição parenteral e medicamentos: origem, níveis de contaminação e avaliação da distribuição no organismo em modelo animal. **Tese de doutorado**. (Doutorado em Química Analítica) - Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2011.

MUIA L.; VAN GRIEKEN R. Determination of rare earth elements in geological materials by total reflection x-ray fluorescence. **Anal Chim Act**, v.251, p. 177-181, 1991.

NASCIMENTO, P.C. et al. Comparison of different samples treatments for arsenic speciation in glass samples. **J Non-Cryst Solids**, v. 351, p. 1312-1316, 2005.

NAVARO M. S. A implementação de rotina, e seu refinamento, para a determinação de elementos terras raras em materiais geológicos por ICP-OES e ICP-MS. Aplicação aos casos dos granitóides de Piedade-Ibiúna (SP) e Cunhaporanga (PR). **Dissertação** (Mestrado em Mineralogia e Petrologia)-Universidade de São Paulo, São Paulo, 2004.

NAVARRO M. S. ULBRICH H.H.G.J, ANDRADE S., JANASI V.A.. A daptation of ICP-OES routine determination techniques for the analysisof rare earth elements by chromatographic separation in geologic materials: tests with reference materials and granitic rocks. **J Alloys Compd**, v. 344,p. 40 - 45, 2002.

NOREMBERG, Simone Moraes da Silva. A influência da formação de hidroxialuminosilicatos na biodisponibilidade do alumínio. **Dissertação de Mestrado**. (Mestrado em Química Analítica) - Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2010.

ORTNER, HM; BULSKA, E; ROHR, U. *et al.*, Modifiers and coatings in graphite furnace atomic absorption spectrometry – mechanisms of action (a tutorial review). **Spectrochim. Acta part B**, v. 57, p. 1835, 2002.

PALASZ,A.; CZEKAJ, P. Toxicological and cytophysiological aspects of lanthanides action. **Acta Biochim Pol**, v. 47, p.1107–1114, 2000.

PANDAY, V.K., HOPPSTOCK, K., BECKER, J.S., DIETZE, H.J. Determination of Rare Earth Elements in Environmental Materials by ICP-MS after Liquid-Liquid Extraction. **Atomic Spectroscopy**, v.17, n.2, p. 98-105, 1996.

PARIS, J. et al, Auto-Assembling of ditopic macrocyclic lanthanide chelates with transition-metal Ions. Rigid multimetallic high relaxivity contrast agents for magnetic resonance imaging. **Inorg Chem**, v. 45, n. 13, p. 5092-5102, 2006.

PERAZELLA, M.A.; RODBY R. A. Gadolinium use in patients with kidney disease: a cause for concern. **Sem Dialysis**, v.20, n.3, p. 179-185, 2007.

POLLET, R., MARX, D. Ab initio simulation of a gadolinium-based magnetic resonance imaging contrast agent in aqueous solution. **J Chem Phys**, v. 126, p.181102, 2007.

PORT, M. et al. Efficiency, thermodynamic and kinetic stability of marketed gadolinium chelates and their possible clinical consequences: a critical review. **Biometals**, v. 21, n. 4, p. 469-490, 2008.

PORT, M.; IDÉE, J.M.; MEDINA, C. et al. Stability of gadolinium chelates and their biological consequences: new data and some comments. **Br J Radiol**, v.81, p. 258-259, 2008.

PULUKKODY, K.P. et al. Synthesis of charged and uncharged complexes of gadolinium and yttrium with cyclic polyazaphosphinic acid ligands for in vivo applications. **J Chem Soc Perkin Trans**, v. 2, p.605-620, 1993.

PUTTAGUNTA, N. et al. Human In Vivo Comparative Study of Zinc and Copper Transmetallation After Administration of Magnetic Resonance Imaging Contrast Agents. **Invest Radiol**, v. 31(12), p. 739-742, 1996.

RAJU C. S. K. et al. novel solid phase extraction method for pre-concentration of gadolinium and gadolinium based MRI contrast agents from the environment. **J Anal At Spectrom**, v. 25, p.1573–1580, 2010.

RAYMOND K. N.; PIERRE, V. C., Next generation, high relaxivity gadolinium MRI agents. **Bioconj Chem**, v.16, p.3-8, 2005.

RIBANI, M. et al. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Quim. Nova**, v. 27, n. 5, 771-780, 2004

RUNGE, V. M. Safety of magnetic resonance contrast media. **Top Magn Reson Imaging**, v. 12, p. 309-314, 2001.

MUNDIM, J. S. et al. Fibrose sistêmica nefrogênica: uma complicação grave do uso do gadolínio em pacientes com insuficiência renal. **Rev Assoc Med Bras**, v. 55, n. 2, 220-225, 2009.

SADOWSKI E. A. et al. Nephrogenic systemic fibrosis: risk factors and incidence estimation. **Radiology**, v. 243 p.148-1571, 2007.

SARKA, L.; BURAI, L.; BRÜCHER, E. The rates of the exchange reactions between  $[\text{Gd}(\text{DTPA})]^{2-}$  and the endogenous ions  $\text{Cu}^{2+}$  and  $\text{Zn}^{2+}$ : a kinetic model for the prediction of the in vivo stability of  $[\text{Gd}(\text{DTPA})]^{2-}$ , used as a contrast agent in magnetic resonance imaging. **Chem Eur J**, v.6, p.719-724, 2000.

SAUSSEREAU, E. C.; LACROIX, A.; CATTANEO, L. *et al.* Hair and fingernail gadolinium ICP-MS contents in an overdose case associated with nephrogenic systemic fibrosis. **Forensic Sci Int**, v. 176, p.54-57, 2008.

SIEBER MA, LEGSFELD PH, FRENZEL T, GOLFIER S, et al. Preclinical investigation to compare different gadolinium-based contrast agents regarding their propensity to release gadolinium in vivo and to trigger nephrogenic systemic fibrosis-like lesions. **Eur Radiol**, v. 18, p. 2164-73, 2008.

SILVA, J.C.J.; GARCIA, E.E.; NOGUEIRA, A.R.A.; NÓBREGA, J.A.. Determination of dysprosium and europium in sheep faeces by graphite furnace and tungsten coil electrothermal atomic absorption spectrometry. **Talanta**. v. 55, p. 847–854, 2001.

SUN Y, SUN M, ZHAO G. Applicability of capillary electrophoresis to the analysis of trace rare earth elements in geological samples. **Anal Sci**, v. 22, n.4, p.551-555, 2006.

SWAMINATHAN S.; SHAH S.V. New insights into nephrogenic systemic fibrosis. **J Am Soc Nephrol**, v. 18, p 2636-2643, 2007.

TAN, S.H. ; HORLICK, G. Background Spectral Features in Inductively Coupled Plasma/Mass Spectrometry. **Appl Spectrosc**, v. 40, p.445, 1986.

The International Center for Nephrogenic fibrosing dermopathy research. Citada em 29/10/2012. Disponível em: <<http://www.icnfd.org>>. Acesso: 31 set. 2013.

**The United States Pharmacopeia (USP)**, n. 32, p. 4-18, 2008.

THUNUS, L., LEJEUNE, R. Overview of transition metal and lanthanide complexes as diagnostic tools. **Coord Chem Rev**, v.184,p. 125–155, 1999.

TOTH, E. et al. Equilibrium and kinetic studies on complexes of 10-[2,3-dihydroxy-(1-hydroxymethyl)-propyl]-1,4,7,10-tetraazacyclododecane-1,4,7-triacetate. **Inorg Acta**, v. 249, p. 191-199, 1996.

TOTH, E., BRÜCHER,.; E; LAZAR, I., TOTH, I. Kinetics of formation and dissociation of lanthanide(III)-DOTA complexes. **Inorg Chem**, v.33, p. 4070-4076, 1994.

TWEEDLE, M.F. et al. Reaction of gadolinium chelates with endogenously available ions. **Magn Reson Imaging**, v. 9, p. 409-415, 1991.

TWEEDLE, M.F. Physicochemical properties of gadoteridol and other magnetic resonance contrast agents. **Invest Radiol**, v. 27, p. 2-6, 1992.

VIEIRA, E. V.; LINS, F. F. **Concentração de minérios de terras raras: uma revisão**. CETEM/CNPQ, Rio de Janeiro, 1997, p 53.

VOROBIOV, M.; BASOK, A.; TOVBIN, D. et al., Iron-mobilizing properties of the gadolinium–DTPA complex:clinical and experimental observations. **Nephrol Dial Transplant**, v.18, p. 884–887, 2003.

WEDEKING, P.; KUMAR, K.; TWEEDLE, M.F. Dissociation of gadolinium chelates in mice: relationship to chemical characteristics. **Magn Reson Imaging**, v. 10, p. 641–648, 1992.

YANG, J. J. et al. Rational design of protein-based MRI contrast agents. **J Am Chem Soc**, v.130, p. 9260, 2008.

ZHANG, X. et al. Direct determination of rare earth impurities in high purity erbium oxide dissolved in nitric acid by inductively coupled plasma mass spectrometry. **Anal Chim Acta**, v. 555, p 57-62, 2006.

## APÊNDICE A

Tabela 23 - Reagentes utilizados.

Reagentes	Fabricante
Solução Padrão de mulielementar de ETR 100 mg g <sup>-1</sup>	SepcSol, rastreado ao SRM 928 NIST-USA
Solução Padrão de Gadolínio (1000 mg g <sup>-1</sup> ± 8 mg g <sup>-1</sup> )	SepcSol, rastreado ao SRM 3118a NIST-USA
Solução Padrão de Samário (1000 mg g <sup>-1</sup> ± 0, mg g <sup>-1</sup> )	SepcSol, rastreado ao SRM 3147a NIST-USA
Solução Padrão de Lutécio (1000 mg g <sup>-1</sup> ± 0,003 mg g <sup>-1</sup> )	SepcSol, rastreado ao SRM 313a NIST-USA
Solução Padrão de Itérbio (1000 mg g <sup>-1</sup> ± 0,003 mg g <sup>-1</sup> )	SepcSol, rastreado ao SRM 3147a NIST-USA
Solução Padrão de Neodímio (1000 mg g <sup>-1</sup> ± 0,003 mg g <sup>-1</sup> )	SepcSol, rastreado ao SRM 3135a NIST-USA
Solução Padrão de Disprósio (1000 mg.g <sup>-1</sup> ± 0,003 mg.g <sup>-1</sup> )	SepcSol, rastreado ao SRM 3115a NIST-USA
Solução Padrão de Hólmio (1000 mg g <sup>-1</sup> ± 0,003 mg g <sup>-1</sup> )	SepcSol, rastreado ao SRM 3123a NIST-USA
Solução padrão de Európio (1000 mg g <sup>-1</sup> ± 0,003 mg g <sup>-1</sup> )	SepcSol, rastreado ao SEM 3117a NIST-USA
Solução padrão de Lantânio (0,999 mg g <sup>-1</sup> ± 0,003 mg g <sup>-1</sup> )	SepcSol, rastreado ao SRM 3127a NIST-USA
Solução padrão de Térbio (1000 mg g <sup>-1</sup> ± 0,003 mg g <sup>-1</sup> )	SepcSol, rastreado ao SRM 3157a NIST-USA
Solução padrão de Túlio (1000 mg g <sup>-1</sup> ± 0,003 mg g <sup>-1</sup> )	SepcSol, rastreado ao SRM 3160a NIST-USA
Solução Padrão de Ródio 1000 mg g <sup>-1</sup>	SepcSol, rastreado ao SRM 3144 NIST-USA
Solução Padrão de Alumínio (1000 mg g <sup>-1</sup> ± 0,003 mg g <sup>-1</sup> )	SepcSol, rastreado ao SRM 3101a

HCl 5%.	NIST-USA
Solução Padrão de Silício 1000 mg g <sup>-1</sup>	SepcSol, rastreado ao SRM 3150 NIST-USA
Solução Padrão de Cromo 1000 mg g <sup>-1</sup>	SepcSol, rastreado ao SRM 3112a NIST-USA
Solução Padrão de Ferro 1000 mg g <sup>-1</sup>	SepcSol, rastreado ao SRM 3216a NIST-USA
Solução Padrão de Arsênio 1000 mg g <sup>-1</sup>	SepcSol, rastreado ao SRM 3103a NIST-USA
Solução Padrão de Bário 1000 mg g <sup>-1</sup>	SepcSol, rastreado ao SRM 3104a NIST-USA
Solução Padrão de Cobre 1000 mg g <sup>-1</sup>	SepcSol, rastreado ao SRM 3114 NIST-USA
Solução Padrão de Chumbo 1000 mg g <sup>-1</sup>	SepcSol, rastreado ao SRM 3128a NIST-USA
Solução Padrão de Zinco 1000 mg g <sup>-1</sup>	SepcSol, rastreado ao SRM 3168a NIST-USA
Cloreto de Cálcio	Merck
Cloreto de Magnésio	Sigma Aldrich
Nitrato de paládio	Fluka
Nitrato de amônio	Sigma
Cloreto de zircônio	Merck
Borohidreto de sódio	Vetec
DTPA- Ácido Dietilenotriaminopentacético	Fluka
Hidróxido de Sódio P.A	Merck
Ácido Acético Glacial P.A	Merck
Ácido Clorídrico P.A 37%	Vetec
Ácido Nítrico P.A 65% bidestilado	Merck
Peróxido de Hidrogênio	Merck
EDTA-Ácido etilenodiaminotetracético	Merck
Sulfato de zinco	Merck
Negro de eriocromo -T (indicador complexométrico)	Merck

Cloreto de sódio P.A	Vetec
Cloreto de amônio	Sigma-Aldrich
Hidróxido de Amônio	Merck
Ácido fórmico 99.99%	Supelco
Formiato de amônio 5M	Supelco
Acetonitrila Hipergrade LC-MS	Lichrosolv Merck

---

## APÊNDICE B

### Parâmetros instrumentais do ICP-MS.

Tabela 24 - Condições operacionais e parâmetros instrumentais do ICP-MS.

Cone e “Skimmer”	Pt
Pocessamento do sinal	<i>Peak hopping</i>
Varreduras por leitura:	50
Leituras por replicata:	1
Numero de replicatas	3
Voltagem das lentes	8 V
Potência de radiofrequência	1100 W
Tensão no estágio analógico	-2156 V
Tensão no estágio digital	1250 V
Fluxo do gás do auxiliar	1,2 L min <sup>-1</sup>
Fluxo do gás do plasma	15 L min <sup>-1</sup>
Fluxo do gás do nebulizador	~1,05 L min <sup>-1</sup>
Nebulizador	Pneumático de fluxo cruzado
Câmara de nebulização	Camâra de nebulização de dupla passagem do tipo <i>Scott</i>
Vazão da amostra	~1,3 mL min <sup>-1</sup>
Tempo morto	50 ns
Modo de operação do detector	Dual
Tempo de permanência ( <i>dwel time</i> )	50 ms
Equações de correção	-0,125653 * <sup>140</sup> Ce para o <sup>142</sup> Nd -0.0479028 * <sup>166</sup> Er

## APÊNDICE C

Parâmetros instrumentais para recobrimento do forno de grafite e parâmetros de operação do HR-CSAAS.

Tabela 25 - Parâmetros instrumentais para o recobrimento do forno de grafite com Zr.

Modificador: $ZrCl_4$			Massa: 0,5 mg
<i>Etapa</i>	$T$ ( $^{\circ}C$ )	Taxa ( $^{\circ}C\ s^{-1}$ )	Aquecimento (s)
Secagem	90	7	15
Secagem	140	10	15
Pirólise	1000	100	10
Atomização	2000	FP	5

FP: Potência máxima

Tabela 26 - Parâmetros de operação do equipamento HR-CSAAS e programa de temperatura para a determinação de Sm.

Elemento	Comprimento de onda ( $\lambda$ -nm)	Fenda (nm)	Corrente da lâmpada (mA)	Modificador/ massa (mg)	Volume da amostra ( $\mu L$ )
Samário	429,6750			$ZrCl_4$ (0,5)	20

### Programa de temperatura

Etapa	$T$ ( $^{\circ}C$ )	Taxa ( $^{\circ}C\ s^{-1}$ )	Aquecimento (s)	Tempo (s)	Gás inerte ( $L\ min^{-1}$ )
Secagem	80	6	20	26,2	2,0
Secagem	90	3	20	23,3	2,0
Secagem	110	5	10	14,0	2,0
Pirólise	350	50	20	24,8	2,0
Pirólise	1700	300	10	14,5	2,0
Auto Zero	1700	0	5	5,0	0,0
Atomização	2600	FP	8	8,0	0,0
Limpeza	2600	0	4	4,0	2,0

FP: Potência máxima

Tabela 27 - Parâmetros de operação do equipamento HR-CSAAS e programa de temperatura para a determinação de Yb.

Elemento	Comprimento de onda ( $\lambda$ -nm)	Fenda (nm)	Corrente da lâmpada (mA)	Modificador/ massa (mg)	Volume da amostra ( $\mu$ L)
Itérbio	398,7994			ZCl <sub>4</sub> (0,5)	20
Programa de temperatura					
Etapa	T (°C)	Taxa (°C s <sup>-1</sup> )	Aquecimento (s)	Tempo (s)	Gás inerte (L min <sup>-1</sup> )
Secagem	80	6	20	28,3	2,0
Secagem	90	3	20	23,3	2,0
Secagem	110	5	10	14,0	2,0
Pirólise	350	50	20	24,8	2,0
Pirólise	1300	300	10	13,0	2,0
Auto Zero	1300	0	5	5,0	0,0
Atomização	2100	1500	7	7,0	0,0
Limpeza	2500	500	4	4,7	2,0

Tabela 28 - Parâmetros de operação do equipamento HR-CSAAS e programa de temperatura para a determinação de Lu.

Elemento	Comprimento de onda ( $\lambda$ -nm)	Fenda (nm)	Corrente da lâmpada (mA)	Modificador/ massa (mg)	Volume da amostra ( $\mu$ L)
Lutécio	335,9560			ZCl <sub>4</sub> (0,5)	20
Programa de temperatura					
Etapa	T (°C)	Taxa (°C s <sup>-1</sup> )	Aquecimento (s)	Tempo (s)	Gás inerte (L min <sup>-1</sup> )
Secagem	80	6	20	28,3	2,0
Secagem	90	3	20	23,3	2,0
Secagem	110	5	10	14,0	2,0
Pirólise	350	50	20	24,8	2,0
Pirólise	1400	300	10	12,8	2,0
Auto Zero	1400	0	5	5,0	0,0
Atomização	2600	FP	8	8,0	0,0
Limpeza	2600	0	6	6,0	2,0

FP: Potência máxima

## APÊNDICE D

Parâmetros de operação do equipamento e programa de temperatura para a análise dos metais determinados por GF AAS.

Tabela 29 - Parâmetros de operação do equipamento GF AAS e programa de temperatura para a determinação de Zn.

Elemento	Comprimento de onda ( $\lambda$ -nm)	Fenda (nm)	Corrente da lâmpada (mA)	Modificador/ massa	Volume da amostra ( $\mu$ L)
Zinco	213,9	0,8	4,0	ZCl <sub>4</sub> / 0,5 mg Mg(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> / 10 $\mu$ g	20
Programa de temperatura					
Etapa	T (°C)	Taxa (°C s <sup>-1</sup> )	Aquecimento (s)	Tempo (s)	Gás inerte (L min <sup>-1</sup> )
Secagem	90	5	20	34,0	2,0
Secagem	105	3	20	25,0	2,0
Secagem	110	2	10	12,5	2,0
Pirólise	900	250	10	13,2	2,0
Auto Zero	900	0	4	4,0	0,0
Atomização	1700	FP	3	3,6	0,0
Limpeza	2000	0	4	5,1	2,0

FP: Potência máxima

Tabela 30 - Parâmetros de operação do equipamento GF AAS e programa de temperatura para a determinação de Cu.

Elemento	Comprimento de onda ( $\lambda$ -nm)	Fenda (nm)	Corrente da lâmpada (mA)	Modificador/ massa (mg)	Volume da amostra ( $\mu$ L)
Cobre	324,8	0,8	3,0	ZCl <sub>4</sub> (0,5)	20
Programa de temperatura					
Etapa	T (°C)	Taxa (°C s <sup>-1</sup> )	Aquecimento (s)	Tempo (s)	Gás inerte (L min <sup>-1</sup> )
Secagem	90	5	20	34,0	2,0
Secagem	105	3	20	25,0	2,0
Secagem	120	2	10	17,5	2,0
Pirólise	1000	250	8	11,5	2,0
Auto Zero	1000	0	5	5,0	0,0
Atomização	2500	FP	4	4,0	0,0
Limpeza	2600	0	4	4,2	2,0

FP: Potência máxima

Tabela 31 - Parâmetros de operação do equipamento GF AAS e programa de temperatura para a determinação de Fe.

Elemento	Comprimento de onda ( $\lambda$ -nm)	Fenda (nm)	Corrente da lâmpada (mA)	Modificador/ massa (mg)	Volume da amostra ( $\mu$ L)
Ferro	248,3	0,2	6,0	ZCl <sub>4</sub> (0,5)	20
Programa de temperatura					
Etapa	T (°C)	Taxa (°C s <sup>-1</sup> )	Aquecimento (s)	Tempo (s)	Gás inerte (L min <sup>-1</sup> )
Secagem	90	5	10	24,0	2,0
Secagem	105	3	15	20,0	2,0
Secagem	110	2	10	12,5	2,0
Pirólise	1300	250	10	14,4	2,0
Auto Zero	1300	0	5	5,0	0,0
Atomização	2600	FP	4	4,0	0,0
Limpeza	2600	0	4	4,0	2,0

FP: Potência máxima

Tabela 32 - Parâmetros de operação do equipamento GF AAS e programa de temperatura para a determinação de Al.

Elemento	Comprimento de onda ( $\lambda$ -nm)	Fenda (nm)	Corrente da lâmpada (mA)	Modificador/ massa (mg)	Volume da amostra ( $\mu$ L)
Alumínio	309,3	0,8	6,0	ZCl <sub>4</sub> (0,5)	20
Programa de temperatura					
Etapa	T (°C)	Taxa (°C s <sup>-1</sup> )	Aquecimento (s)	Tempo (s)	Gás inerte (L min <sup>-1</sup> )
Secagem	90	5	20	34,0	2,0
Secagem	105	3	20	25,0	2,0
Secagem	110	2	10	12,5	2,0
Pirólise	1500	250	10	15,6	2,0
Auto Zero	1500	0	4	4,0	0,0
Atomização	2600	FP	5	5,0	0,0
Limpeza	2650	0	4	4,1	2,0

FP: Potência máxima

Tabela 33 - Parâmetros de operação do equipamento GF AAS e programa de temperatura para a determinação de Cr.

Elemento	Comprimento de onda ( $\lambda$ -nm)	Fenda (nm)	Corrente da lâmpada (mA)	Modificador/ massa (mg)	Volume da amostra ( $\mu$ L)
Cromo	357,9	0,8	4,0	ZCl <sub>4</sub> (0,5)	20
Programa de temperatura					
Etapa	T (°C)	Taxa (°C s <sup>-1</sup> )	Aquecimento (s)	Tempo (s)	Gás inerte (L min <sup>-1</sup> )
Secagem	90	5	20	34,0	2,0
Secagem	105	3	20	25,0	2,0
Secagem	110	2	10	12,5	2,0
Pirólise	1100	250	10	13,4	2,0
Auto Zero	1100	0	6	6,0	0,0
Atomização	2450	FP	5	5,0	0,0
Limpeza	2550	0	4	4,2	2,0

FP: Potência máxima

Tabela 34 - Parâmetros de operação do equipamento GF AAS e programa de temperatura para a determinação de Pb.

Elemento	Comprimento de onda ( $\lambda$ -nm)	Fenda (nm)	Corrente da lâmpada (mA)	Modificador/ massa (mg)	Volume da amostra ( $\mu$ L)
Chumbo	283,3	0,8	4,0	ZCl <sub>4</sub> (0,5)	20
Programa de temperatura					
Etapa	T (°C)	Taxa (°C s <sup>-1</sup> )	Aquecimento (s)	Tempo (s)	Gás inerte (L min <sup>-1</sup> )
Secagem	90	5	20	34,0	2,0
Secagem	105	3	20	25,0	2,0
Secagem	110	2	10	12,5	2,0
Pirólise	900	250	10	13,2	2,0
Auto Zero	900	0	4	4,0	0,0
Atomização	1700	1400	4	4,6	0,0
Limpeza	2300	0	4	5,0	2,0

Tabela 35 - Parâmetros de operação do equipamento GF AAS e programa de temperatura para a determinação de Ba.

Elemento	Comprimento de onda ( $\lambda$ -nm)	Fenda (nm)	Corrente da lâmpada (mA)	Modificador/ massa	Volume da amostra ( $\mu$ L)
Bário	553,6	0,5	6,0	ZrCl <sub>4</sub> /0,5 mg CaCl <sub>2</sub> /50 $\mu$ g	20
Programa de temperatura					
Etapa	T (°C)	Taxa (°C s <sup>-1</sup> )	Aquecimento (s)	Tempo (s)	Gás inerte (L min <sup>-1</sup> )
Secagem	90	5	20	34,0	2,0
Secagem	105	3	20	25,0	2,0
Secagem	110	2	10	12,5	2,0
Pirólise	1150	250	10	14,2	2,0
Auto Zero	1150	0	6	6,0	0,0
Atomização	2600	FP	6	6,0	0,0
Limpeza	2600	0	4	4,0	2,0

FP: Potência máxima

Tabela 36 - Parâmetros de operação do equipamento GF AAS e programa de temperatura para a determinação de Si.

Elemento	Comprimento de onda ( $\lambda$ -nm)	Fenda (nm)	Corrente da lâmpada (mA)	Modificador/ massa	Volume da amostra ( $\mu$ L)
Silício	251,6	0,2	10,0	ZrCl <sub>4</sub> / 0,5 mg Pd(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> / 10 $\mu$ g	20
Programa de temperatura					
Etapa	T (°C)	Taxa (°C s <sup>-1</sup> )	Aquecimento (s)	Tempo (s)	Gás inerte (L min <sup>-1</sup> )
Secagem	90	5	20	34,0	2,0
Secagem	105	3	20	25,0	2,0
Secagem	110	2	10	12,5	2,0
Pirólise	1200	250	10	13,2	2,0
Auto Zero	1200	0	4	4,0	0,0
Atomização	2600	1500	3	3,6	0,0
Limpeza	2650	0	4	5,1	2,0

## APÊNDICE E

Parâmetros de operação do equipamento HG AAS para a determinação de As.

Tabela 37 - Parâmetros de operação do equipamento HG AAS para a determinação de As.

Elemento	Comprimento de onda ( $\lambda$ -nm)	Fenda (nm)	Corrente da lâmpada (mA)
Arsênio	193,7	0,5	7,0
Parâmetros de operação			
Tipo de aquecimento			eletrotérmico
Temperatura de aquecimento do atomizador			925°C
Fluxo de N <sub>2</sub>			1,5 l mL min <sup>-1</sup>
Tempo de Integração			3 x 5 s

## APÊNDICE F

### Condições da fonte ESI.

Tabela 38 - Condições da fonte ESI para a análise do complexo Gd-DTPA.

Parâmetros	ESI (+)-MS
Temperatura do gás de secagem (N <sub>2</sub> )	350 °C
Pressão do nebulizador	40 psi
Fluxo de gás (N <sub>2</sub> )	8 L/min
Voltagem do capilar	3000 V