

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

ESTUDO DA INTERAÇÃO ENTRE AS
VITAMINAS LIPOSSOLÚVEIS COM CÁDMIO E
CHUMBO POR ASV EM MEIO ORGÂNICO

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Michele Pokulat Sauer

Santa Maria, RS, Brasil

2006

**ESTUDO DA INTERAÇÃO ENTRE AS
VITAMINAS LIPOSSOLÚVEIS COM CÁDMIO E
CHUMBO POR ASV EM MEIO ORGÂNICO**

por

Michele Pokulat Sauer

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

Orientador: Prof. Dr. Paulo Cícero do Nascimento

Santa Maria, RS, Brasil

2006

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

**A Comissão Examinadora, abaixo assinada,
aprova a Dissertação de Mestrado**

**ESTUDO DA INTERAÇÃO ENTRE AS
VITAMINAS LIPOSSOLÚVEIS COM CÁDMIO E
CHUMBO POR ASV EM MEIO ORGÂNICO**

elaborada por
Michele Pokulat Sauer

como requisito parcial para obtenção do grau de
Mestre em Química

COMISSÃO EXAMINADORA:

Paulo Cícero do Nascimento, Dr.
(Presidente/Orientador)

Leandro Machado de Carvalho, Dr. (UFSM)

Ana Lúcia Becker Rohlfes, Dra. (UNISC)

Santa Maria, 15 de setembro de 2006

DEDICO

A MINHA FAMÍLIA

em especial à minha mãe Marta,
pelo incentivo, exemplo e
dedicação. Obrigada!

RESUMO

Dissertação de Mestrado
Programa de Pós-Graduação em Química
Universidade Federal de Santa Maria

ESTUDO DA INTERAÇÃO ENTRE AS VITAMINAS LIPOSSOLÚVEIS COM CÁDMIO E CHUMBO POR ASV EM MEIO ORGÂNICO

AUTORA: MICHELE POKULAT SAUER

ORIENTADOR: PAULO CÍCERO DO NASCIMENTO

Data e Local da Defesa: Santa Maria, 15 de setembro de 2006.

No presente trabalho dois métodos voltamétricos foram investigados para o estudo da interação entre os metais, Cd e Pb, e vitaminas lipossolúveis (palmitato de retinol – VA; colecalciferol – VD; acetato de α -tocoferol – VE; filoquinona - VK). Devido à característica hidrofóbica destas vitaminas, a voltametria foi conduzida em meio orgânico. No primeiro método (Método I) utilizou-se acetona como meio, iodeto de tetrabutylamônio (ITBA) $0,2 \text{ mol L}^{-1}$ como eletrólito e um eletrodo de referência modificado de dupla junção líquida – Ag/AgCl/LiCl saturado em etanol/ITBA $0,02 \text{ mol L}^{-1}$ em N,N – dimetilformamida (DMF). No segundo método (Método II) utilizou-se etanol como meio, o tampão acetato pH 4,6 (em etanol) e o eletrodo de referência modificado de dupla junção líquida – Ag/AgCl/LiCl saturado em etanol/Tampão acetato pH 4,6 (em etanol). Na etapa de desenvolvimento dos métodos o comportamento dos metais nas condições estudadas foi avaliado e, após a otimização, estudou-se a modificação dos sinais voltamétricos em função das adições das vitaminas sobre os metais. Cada vitamina foi estudada individualmente. O Método I não foi o mais adequado ao estudo da interação metal-vitamina porque em muitos casos as vitaminas causaram um aumento dos sinais, comportamento contrário ao esperado. O Método II apresentou diminuição dos sinais do Cd e do Pb e ainda o deslocamento anódico dos potenciais de pico destes metais na presença de todas as vitaminas. A diminuição dos sinais para Cd e Pb aumentou na ordem: $VK < VD < VE < VA$, sendo que esta diminuição foi maior para o Pb com VA, VE e VD e maior para o Cd com VK. Medidas por voltametria de corrente alternada foram também realizadas para estudar a adsorção das vitaminas no eletrodo de mercúrio. Comparando os resultados obtidos pela voltametria de redissolução com aqueles de

corrente alternada, observou-se que as variações nos sinais voltamétricos estão relacionadas predominantemente ao efeito de adsorção para VA e VD enquanto que para VE e VK o efeito da adsorção não é predominante.

Palavras-chaves: Vitaminas lipossolúveis, cádmio, chumbo, voltametria.

ABSTRACT

Master Dissertation in Chemistry
Post-Graduate in chemistry
Federal University of Santa Maria

STUDY OF INTERACTION AMONG FAT-SOLUBLE WITH CADMIUM AND LEAD BY ASV IN ORGANIC MEDIA

AUTHOR: MICHELE POKULAT SAUER
ADVISOR: PAULO CÍCERO DO NASCIMENTO
Santa Maria, september 15, 2006.

In this work two voltammetric methods were investigated to study the interaction between metals, Cd and Pb, and fat-soluble vitamins (retinol palmitate – VA; cholecalciferol – VD; α -tocopherol acetate – VE; filloquinona - VK). Due to hydrophobic characteristic of these vitamins, the voltammetric measurements were conducted in non aqueous media. In the first method (Method I) acetone was used as organic media, tetrabutylammonium iodide (ITBA) 0.2 mol L^{-1} as electrolyte and an electrode modified reference with double liquid junction - Ag/AgCl/LiCl saturated in ethanol/ITBA 0.02 mol L^{-1} in N,N - dimethylformamide (DMF). In the second method (Method II) ethanol was used as organic media, acetate buffer pH the 4.6 (in ethanol) as electrolyte and an electrode modified reference with double liquid junction - Ag/AgCl/LiCl saturated in ethanol/acetate buffer pH 4,6 (in ethanol). During the method development the behavior of Cd and Pb in studied conditions was evaluated. Each vitamin was studied individually. Method I was not the more adequate to study the interaction metal-vitamin because in most of the case the vitamin additions caused an increase on the voltammetric signals.

Method II presented reduction of the Cd and Pb signals and the anodic shift of peak potentials in presence of the vitamins. The reduction of the signals increased in the order: $VK < VD < VE < VA$. High peak reduction was observed for Pb with the VA, VE and VD and for Cd with the VK. Measurements of alternating current voltammetry were also investigated to study the adsorption of vitamins on the electrode surface. Comparing the results obtained by the anodic stripping voltammetry with the results by alternated current, it was observed that the variations

on the voltammetric signals are related predominantly with to adsorptions of VA and VD while to VE and VK the effect of adsorption was not predominant.

Keys words: fat-soluble vitamins, cadmium, lead, voltammetry.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURA 1 – Formas químicas da vitamina A	21
FIGURA 2 – Formas químicas da vitamina D	22
FIGURA 3 – Formas químicas da vitamina E	24
FIGURA 4 – Formas químicas da vitamina K	25
FIGURA 5 – Estrutura química das vitaminas, em destaque os possíveis sítios de ligação através dos quais as vitaminas podem associar-se aos metais	38
FIGURA 6 – Sinal voltamétrico do Cd e do Pb, (a) em meio orgânico (acetona) e (b) em meio misto (acetona + água)(Cd: $E_d = -0,70$ V, $t_d = 90$ s; Pb: $E_d = -0,50$ V, $t_d = 20$ s)	52
FIGURA 7 – Representação gráfica da equação da reta obtida pela curva analítica do Cd e Pb na faixa de concentração $100 - 500 \mu\text{g L}^{-1}$ com o eletrólito ITBA $0,2 \text{ mol L}^{-1}$ em meio misto. (Cd: $E_d = -0,70$ V, $t_d = 90$ s; Pb: $E_d = -0,50$ V, $t_d = 20$ s)	53
FIGURA 8 – Efeito das adições de VA sobre o sinal do Cd e do Pb. (a) sinal voltamétrico dos metais ($0,6 \mu\text{M}$ de Cd e $0,33 \mu\text{M}$ de Pb) na ausência de VA. (b, c) sinal voltamétrico dos metais nas concentrações de $0,26$ e $0,52 \text{ mM}$ de VA respectivamente (Cd: $E_d = -0,70$ V, $t_d = 90$ s; b: $E_d = -0,50$ V, $t_d = 20$ s)	55
FIGURA 9 – Efeito das adições de VE sobre o sinal do Cd e do Pb. (a) sinal voltamétrico dos metais ($0,6 \mu\text{M}$ de Cd e $0,33 \mu\text{M}$ de Pb) na ausência de VE. (b, c, d) sinal voltamétrico dos metais nas concentrações de $0,3$; $0,6$ e $0,9 \text{ mM}$ de VE respectivamente. (Cd: $E_d = -0,70$ V, $t_d = 90$ s; Pb: $E_d = -0,50$ V, $t_d = 20$ s)	55
FIGURA 10 – Efeito das adições de VK sobre o sinal do Cd e do Pb (a) sinal voltamétrico dos metais ($0,6 \mu\text{M}$ de Cd e $0,33 \mu\text{M}$ de Pb) na ausência de VE. (b, c, d) sinal voltamétrico dos metais nas concentrações de $0,5$; $1,0$ e $1,5 \text{ mM}$ de VK respectivamente. (Cd: $E_d = -0,70$ V, $t_d = 90$ s; Pb: $E_d = -0,50$ V, $t_d = 20$ s)	

	56
FIGURA 11 – Sinal voltamétrico do Cd e do Pb na concentração de $100 \mu\text{g L}^{-1}$, em meio aquoso e orgânico (metanol, etanol e acetona). Eletrólito tampão acetato pH 4,6. ($E_d = - 0,70 \text{ V}$, $t_d = 90 \text{ s}$)	59
FIGURA 12 – Dependência do sinal (a) do Cd ($E_p = - 0,50 \text{ V}$) e (b) do Pb ($E_p = - 0,35 \text{ V}$) com o potencial de pré-concentração em diferentes concentrações de metal ($t_d = 90 \text{ s}$)	61
FIGURA 13 – Dependência do sinal do Cd (a) e do Pb (b) com o tempo de pré-concentração ($E_d = - 0,80 \text{ V}$) em diferentes concentrações de metal	62
FIGURA 14 – Sinal voltamétrico do Cd e do Pb na faixa de concentração de $10 - 200 \mu\text{g L}^{-1}$, para o método voltamétrico do tampão acetato ($E_d = - 0,70 \text{ V}$ e $t_d = 90 \text{ s}$). Concentrações: (a) $10 \mu\text{g L}^{-1}$ (b) $30 \mu\text{g L}^{-1}$ (c) $50 \mu\text{g L}^{-1}$ (d) $100 \mu\text{g L}^{-1}$ (e) $200 \mu\text{g L}^{-1}$	63
FIGURA 15 – Representação gráfica da equação da reta obtida pela curva analítica do Cd e Pb na faixa de concentração $10 - 200 \mu\text{g L}^{-1}$	63
FIGURA 16 – Efeito da adição de VA sobre o sinal do Cd e Pb ($0,89 \mu\text{M}$ e $0,48 \mu\text{M}$ respectivamente). Sinal voltamétrico dos metais (a) na ausência de VA; (b) na presença de VA ($0,125 \text{ mM}$) ($E_d = - 0,70 \text{ V}$, $t_d = 90 \text{ s}$)	65
FIGURA 17 – Efeito das adições de VD sobre o sinal do Cd e Pb ($0,89 \mu\text{M}$ e $0,48 \mu\text{M}$ respectivamente). Sinal voltamétrico dos metais (a) na ausência de VD; (b, c, d) na presença de VD ($0,125$; $0,25$ e $0,375 \text{ mM}$ respectivamente) ($E_d = - 0,70 \text{ V}$, $t_d = 90 \text{ s}$)	65
FIGURA 18 – Efeito das adições de VE sobre o sinal do Cd e Pb ($0,89 \mu\text{M}$ e $0,48 \mu\text{M}$ respectivamente). Sinal voltamétrico dos metais (a) na ausência de VE; (b, c, d) na presença de VE ($0,125$; $0,25$ e $0,375 \text{ mM}$ respectivamente) ($E_d = - 0,70 \text{ V}$, $t_d = 90 \text{ s}$)	66
FIGURA 19 – Efeito das adições de VK sobre o sinal do Cd e Pb ($0,89 \mu\text{M}$ e $0,48 \mu\text{M}$ respectivamente). Sinal voltamétrico dos metais (a) na ausência de VK; (b, c, d) na presença de VK ($0,125$; $0,25$ e $0,375 \text{ mM}$ respectivamente) ($E_d = - 0,70 \text{ V}$, $t_d = 90 \text{ s}$)	66
FIGURA 20 – Efeito do tempo sobre a interação metal-vitamina, (a) Cd; (b) Pb. ($E_d = - 0,70 \text{ V}$, $t_d = 90 \text{ s}$)	69

- FIGURA 21 – Voltamogramas AC em etanol (a) tampão acetato pH 4,6; concentrações crescentes de VA: (b) 0,125 mM, (c) 0,25 mM, (d) 0,375mM, (e) 0,5 mM e (f) 0,625 mM. ($E_d = - 0,70$ V, $t_d = 90$ s, $f = 60$ Hz, $\varphi = 90^\circ$) 70
- FIGURA 22 – Voltamogramas AC em etanol (a) tampão acetato pH 4,6; concentrações crescentes de VD: (b) 0,125 mM, (c) 0,25 mM, (d) 0,375mM, (e) 0,5 mM e (f) 0,625 mM. ($E_d = - 0,70$ V, $t_d = 90$ s, $f = 60$ Hz, $\varphi = 90^\circ$) 71
- FIGURA 23 – Voltamogramas AC em etanol (a) tampão acetato pH 4,6; concentrações crescentes de VE: (b) 0,125 mM, (c) 0,25 mM, (d) 0,375mM, (e) 0,5 mM e (f) 0,625 mM. ($E_d = - 0,70$ V, $t_d = 90$ s, $f = 60$ Hz, $\varphi = 90^\circ$) 71
- FIGURA 24 – Voltamogramas AC em etanol (a) tampão acetato pH 4,6; concentrações crescentes de VK: (b) 0,125 mM, (c) 0,25 mM, (d) 0,375mM, (e) 0,5 mM e (f) 0,625 mM. ($E_d = - 0,70$ V, $t_d = 90$ s, $f = 60$ Hz, $\varphi = 90^\circ$) 72

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 – Vitaminas lipossolúveis	20
TABELA 2 – Classificação dos ácidos e bases de Lewis usando o critério duros e moles	36
TABELA 3 – Reagentes utilizados no desenvolvimento do trabalho	41
TABELA 4 – Classificação de uma substância em função da sua solubilidade em partes de solvente	42
TABELA 5 – Resultado do ensaio de solubilidade das vitaminas em solventes orgânicos	48
TABELA 6 – Deslocamento dos potenciais de pico com o aumento da concentração dos metais na célula (eletrólito ITBA 0,2 mol L ⁻¹ Cd: E _d = - 0,70 V, t _d = 90 s; Pb: E _d = - 0,50 V, t _d = 20 s)	54
TABELA 7 – Resultados obtidos nos diferentes meios e eletrólitos testados	58
TABELA 8 – Resultados extraídos dos voltamogramas 16 – 19	67

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- AC** – Corrente alternada
- ASV** – Voltametria de Redissolução Anódica
- DC** – Corrente direta
- DMF** – N,N-Dimetilformamida
- DP** – Pulso Diferencial
- E_d** – Potencial de pré-concentração
- EDTA** – Ácido etileno diamino tetraacético
- E_m** – Potencial eletrocapilar
- E_p** – Potencial de pico
- HMDE** – Eletrodo de mercúrio de gota pendente
- HPLC** – Cromatografia Líquida de alta eficiência
- HSAB** – Hard and soft acids and bases
- ITBA** – Iodeto de tetrabutilamônio
- T_d** – Tempo de pré-concentração
- VA** – Vitamina A – Palmitato de retinol
- VD** – Vitamina D₃ – Colecalciferol
- VE** – Vitamina E – Acetato de α -tocoferol
- VK** – Vitamina K₁ – Fitoquinona
- ϵ - Constante dielétrica

SUMÁRIO

Dedicatória	iii
RESUMO	iv
ABSTRACT	vi
LISTA DE ILUSTRAÇÕES	viii
LISTA DE TABELAS	xi
LISTA DE ABREVIÇÕES E SIGLAS	xii
1 INTRODUÇÃO	16
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	18
2.1 Vitaminas lipossolúveis	18
2.1.1 Vitamina A	20
2.1.2 Vitamina D	22
2.1.3 Vitamina E	23
2.1.4 Vitamina K	25
2.2 Cádmio e chumbo	26
2.3 Voltametria	28
2.3.1 Determinação de metais por voltametria	28
2.3.2 Voltametria de redissolução anódica (ASV)	29
2.3.3 Voltametria em estudos de complexação	31
2.3.4 Voltametria em meio orgânico	31

2.3.5 Voltametria de corrente alternada (AC)	33
2.4 Complexos	34
2.4.1 Reação de formação de complexos	34
2.4.2 Teoria HSAB (<i>Hard and Soft Acids and Bases</i>)	35
2.5 Interação metal-vitamina	37
3 MATERIAIS E MÉTODOS	39
3.1 Instrumentação	39
3.2 Reagentes e soluções	40
3.3 Descontaminação do material	42
3.4 Solubilidade das vitaminas lipossolúveis	42
3.5 Voltametria do cádmio e chumbo em meio orgânico – Método I	43
3.5.1 Eletrodo de referência modificado I	43
3.5.2 Método voltamétrico I	43
3.6 Voltametria do cádmio e chumbo em meio orgânico – Método II	44
3.6.1 Solventes orgânicos utilizados	44
3.6.2 Eletrólitos suporte testados	44
3.6.3 Eletrodo de referência modificado II	45
3.6.4 Efeito do potencial de pré-concentração	45
3.6.5 Efeito do tempo de pré-concentração	45
3.6.6 Método voltamétrico II	45
3.6.7 Influência do tempo na interação do cádmio e chumbo com as vitaminas lipossolúveis	46
3.7 Voltametria de corrente alternada em meio orgânico – Tensametria .	46
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	47
4.1 Solubilidade das vitaminas lipossolúveis	47
4.2 Aplicação da ASV no estudo da interação do cádmio e chumbo com as vitaminas lipossolúveis	49
4.2.1 Método voltamétrico I	51
4.2.1.1 Estudo da interação metal-vitamina pelo método voltamétrico I	54
4.2.2 Método voltamétrico II	57
4.2.2.1 Estudo da interação metal-vitamina pelo método voltamétrico II	64

4.2.3 Efeito do tempo de reação na interação entre os metais e as vitaminas	68
4.3 Voltametria de corrente alternada em meio orgânico – Tensametria	69
4.4 Interpretação dos resultados	73
5 CONCLUSÕES	75
6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	76
7 APÊNDICES	83
Apêndice A – Parâmetros experimentais das medidas voltamétricas	83

1 INTRODUÇÃO

As vitaminas são compostos orgânicos necessários aos processos metabólicos, nosso corpo não as sintetiza ou não as produz em quantidades suficientes, devendo então ser obtidas pela dieta alimentar ou suplementos vitamínicos, por isso são chamadas de nutrientes essenciais. O termo vitamina é definido atualmente como “compostos orgânicos obtidos em uma dieta normal e capazes de manter a vida e promover o crescimento”.

Estudos nutricionais identificaram duas classes de compostos, baseados na solubilidade das vitaminas, uma solúvel em solventes orgânicos apolares (vitaminas lipossolúveis) e a outra solúvel em solventes aquosos (vitaminas hidrossolúveis).

O grupo das vitaminas lipossolúveis compreende a vitamina A, vitamina D, vitamina E e vitamina K, e alguns de seus principais derivados (palmitato de retinol, colecalciferol, acetato de α -tocoferol e filoquinona respectivamente) foram objetos de estudo no presente trabalho.

Sabe-se que algumas destas vitaminas controlam a síntese, a nível genético, de algumas enzimas. Essas vitaminas parecem agir, devido a sua lipossolubilidade, nas diversas membranas celulares e devido a sua função química, como agente antioxidante ou como ativadores de enzimas.

O retinol é considerado a forma primária da vitamina A, é desta forma que a vitamina A está presente nos medicamentos. A isomerização do retinol no organismo leva ao retinal, que está envolvido nos processos visuais.

O colecalciferol (vitamina D₃) apresenta eficácia na prevenção de algumas doenças dos ossos como coadjuvante na absorção de cálcio e na oncologia devido à ação na diferenciação e proliferação celular.

O α -Tocoferol é o ativo mais potente dos derivados da vitamina E. São compostos fenólicos e por isso possuem característica antioxidante.

A importância da vitamina K₁ (filoquinona) está relacionada à coagulação sanguínea, tendo ação anti-hemorrágica.

Recentemente um grupo de vitaminas tem atraído especial interesse por sua habilidade de proteção contra disfunções cardiovasculares, câncer, cataratas, deficiência na resposta imunológica, envelhecimento entre outros problemas de

saúde. Estas são chamadas de vitaminas antioxidantes, e incluem as vitaminas A e E.

As vitaminas são analisadas em três tipos de amostras: fluidos biológicos, alimentos e medicamentos, e a importância desta determinação é devida à relação entre a deficiência em vitaminas e certas patologias. A principal técnica aplicada na determinação das vitaminas é a cromatografia líquida, e apesar da atividade eletroquímica destas vitaminas ser conhecida, há poucos estudos publicados que empregam técnicas voltamétricas.

A voltametria é uma técnica de importância reconhecida na análise de traços, apresentando alta sensibilidade, boa precisão entre outras vantagens estabelecidas. Os métodos voltamétricos possibilitam a determinação de substâncias em solução que podem ser oxidadas ou reduzidas na superfície do eletrodo, e assim são também apropriados à detecção de compostos orgânicos. Além da aplicação quantitativa, a voltametria é também empregada em estudos de complexação de metais, o que se deve ao fato de os voltamogramas fornecerem informações qualitativas bastante úteis aos cálculos de constante de estabilidade.

A determinação de metais tóxicos é de conhecida importância e amplamente utilizada também em amostras de medicamentos, alimentos e fluidos biológicos. Estudos eletroanalíticos envolvendo vitaminas lipossolúveis e metais como cádmio e chumbo não foram encontrados, porém há um considerável número de estudos bioquímicos publicados. Estes estudos mostram que os efeitos tóxicos dos metais nas células podem ser minimizados por essas vitaminas devido à sua capacidade antioxidante, mas, por outro lado, a distribuição e as funções das vitaminas no organismo ficam comprometidas, tendo os mesmos efeitos que sua deficiência.

Associando então a determinação de metais tóxicos por voltametria com as vitaminas lipossolúveis, empregou-se no presente trabalho a Voltametria de Redissolução Anódica (ASV) em meio orgânico para investigar a possível interação que pode ocorrer entre o palmitato de retinol, colecalciferol, acetato de α -tocoferol e filoquinona e os metais cádmio e chumbo.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Vitaminas lipossolúveis

Durante a década de trinta, no século passado, o maior foco das pesquisas em química fisiológica foi à identificação das vitaminas. Estudos nutricionais identificaram duas classes de tais compostos baseados na sua solubilidade em solventes orgânicos apolares (vitaminas lipossolúveis) e aqueles que podem ser extraídos por solventes aquosos (vitaminas hidrossolúveis). O grupo das vitaminas lipossolúveis compreende quatro subgrupos de vitaminas designadas pelas letras A, D, E e K (NELSON, 2000 apud LUQUE-GARCÍA, 2001, p. 3).

As vitaminas lipossolúveis são substâncias orgânicas de pequeno peso molecular, são compostos isoprenóides parcialmente cíclicos o que confere caráter hibróforo a essas vitaminas. As unidades de isopreno (grupo de cinco carbonos) estão envolvidas, em parte, na biossíntese dessas vitaminas (LEHNINGER, 1995).

Segundo Guiland (1995) as vitaminas agem em pequenas doses, sem qualquer valor energético intrínseco, que devem ser fornecidas ao organismo, que é incapaz de assegurar sua biossíntese, a fim de promover o crescimento, manter a vida e a capacidade de reprodução dos animais superiores e do homem. Essas vitaminas parecem agir, devido a sua lipossolubilidade, nas diversas membranas celulares, modificando sua permeabilidade e sua capacidade de transporte e, devido a sua função química, como agente antioxidante ou como ativadores de enzimas.

Recentemente um grupo de vitaminas tem chamado especial interesse pela habilidade de atuarem como agentes terapêuticos na proteção contra doenças cardiovasculares, câncer, cataratas, deficiência na resposta imune, problemas relacionados à idade, etc que são causadas pelo stress oxidativo, processo que envolve a produção de radicais livres (BENDICH, 1988 e DIPLOCK, 1995 apud PALACE, 1999). Estas vitaminas são chamadas de antioxidantes, e essa característica é dada devido a sua capacidade de inibir o processo dos radicais livres nos tecidos. Este grupo inclui as vitaminas A, E, C e o betacaroteno (ARNAO, 1999 apud KOROTKOVA, 2004, p. 729 e MU LEE, 2003).

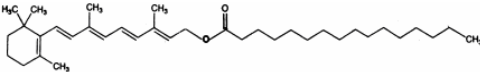
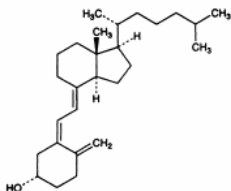
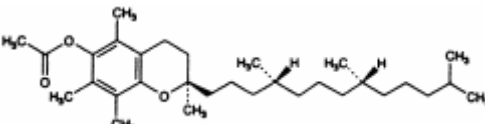
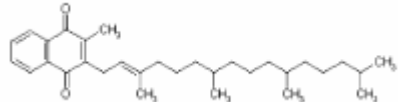
A ausência de uma vitamina pode bloquear uma ou mais reações metabólicas específicas na célula e pode, eventualmente, causar um distúrbio no balanço metabólico do organismo inteiro. O papel das vitaminas no organismo é extremamente importante, sempre que uma vitamina está ausente em uma dieta, ou não pode ser corretamente absorvida, surge uma doença específica. A deficiência em vitaminas pode causar sérias doenças tais como cegueira noturna (vitamina A), raquitismo (vitamina D), câncer (vitamina E) e doenças relacionadas à coagulação sanguínea (vitamina K). Entretanto o excesso também pode ser danoso à saúde. (McLAREN, 1993, p. 208 apud TURNER, 2001, p. 216). Estes fatores têm resultado em uma rigorosa regulamentação do uso destas vitaminas em alimentos e suplementos vitamínicos, requerendo a necessidade de análises contínuas destes produtos.

A importância da determinação das vitaminas e de seus metabólitos em fluidos humanos é devida à relação entre a suas deficiências e certas patologias. A quantificação dessas em fluidos humanos é considerada uma das mais difíceis em química clínica (LUQUE-GARCIA, 2001). As vitaminas lipossolúveis têm sido analisadas até então, em diferentes amostras (fluidos humanos, alimentos e medicamentos) por uma variedade de técnicas. Entre elas a mais amplamente aplicada é a cromatografia, principalmente cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) (CHATZIMICHALAKIS, 2004).

As vitaminas lipossolúveis são sensíveis à exposição a pH extremos, ao oxigênio, luz e calor, o que complica tanto a preparação quanto a determinação da amostra (BALL, 1988 apud TURNER, 2001, p. 216). Para amostras de matrizes complexas muitas vezes é necessário proceder uma hidrólise alcalina seguida de extração. A saponificação opera em pH extremamente alto o que pode causar a isomerização parcial da vitamina D e total degradação da vitamina K.

No presente estudo trabalhou-se com os principais derivados das vitaminas lipossolúveis, palmitato de retinol (vitamina A), colecalciferol (vitamina D₃), acetato do α -tocoferol (vitamina E) e filoquinona (vitamina K₁). A tabela 1 apresenta a estrutura química, função biológica básica e a dose diária recomendada das vitaminas estudadas.

Tabela 1 – Vitaminas lipossolúveis.

Estrutura das vitaminas estudadas	Forma ativa e sua principal função	Dose diária recomendada
Vitamina A (Palmitato de retinol)	11-cis-retinal Reação fotoquímica da visão	0,8 – 1,0 mg RE*
		
Vitamina D (colecalfiferol)	1,25-diidroxicolecalciferol Regula o metabolismo do cálcio e do fósforo	7,5 µg**
		
Vitamina E (acetato de α-tocoferol)	- Antioxidante	8 – 10 mg α-TE***
		
Vitamina K (filoquinona)	- Biosíntese da protrombina, necessária na coagulação sanguínea	-
		

* RE: equivalente de retinol; 1 RE = 1 mg de retinol.

** como colecalfiferol.

*** α-TE: equivalente de α-tocoferol; 1α-TE = 1 mg de D-α-tocoferol.

Fonte: (KLEJDUS, 2004)

2.1.1 Vitamina A

O hidrocarboneto extensamente insaturado β-caroteno é o precursor da vitamina A. Esta vitamina é um micronutriente essencial que existe nas formas de álcool (retinol), aldeído (retinal), ácido carboxílico (ácido retinóico) e ésteres (palmitato de retinol), cujas as estruturas químicas estão ilustradas na figura 1. Ela pode ser adquirida através de dieta por produtos de origem animal (como palmitato de retinol) e pelos seus precursores carotenóides encontrados em vegetais (convertida a all-trans-retinol no organismo) (BARRY LEE, 2005).

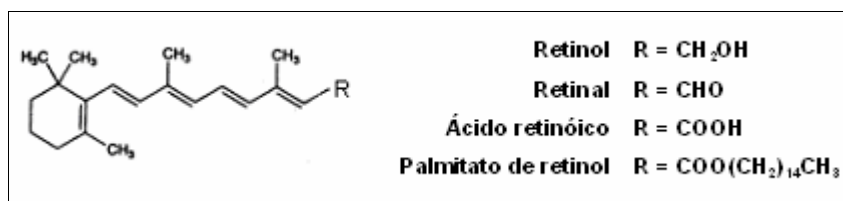


Figura 1 – Formas químicas da vitamina A.

O grupamento álcool do retinol pode ser enzimaticamente oxidado a um grupamento aldeído, formando o retinal, um metabólito que tem um papel crucial na visão quando ligado à proteína chamada opsina. O ácido retinóico, que contém uma carboxila terminal no lugar do álcool do retinol, ativa a transcrição de genes específicos que participam no crescimento e no desenvolvimento (LEHNINGER, 1995).

O retinol é estocado no fígado e pode estar presente na circulação sanguínea quando necessário (CHATZIMICHALAKIS, 2004).

A característica antioxidante da vitamina A foi primeiramente descrita por Monaghan e Schmitt (1932 apud DANELISEN, 2002) e esta é atribuída à presença do radical peroxil (D'AQUINO, 1989 apud DANELISEN, 2002).

A vitamina A desenvolve um papel chave em muitos processos biológicos essenciais (BLOMHOFF, 1994 apud MILLER, 1998) e é necessária não só para a visão, mas também para o desenvolvimento embrionário e regulação da proliferação e diferenciação de muitos tipos de células. Tanto a deficiência quanto o excesso de vitamina A podem ser teratogênicos para animais e humanos (ESKILD, 1994 apud MILLER, 1998 p. 75).

Recentes estudos epidemiológicos confirmam que altas doses de vitamina A (hipervitaminose) estão associadas com a baixa densidade óssea e um aumento no risco de fraturas (MICHAELSSON, 2003 apud OPOTOWSKY, 2004 p. 169). Quando esta ultrapassar o limite de armazenamento no organismo, ela se torna tóxica, causando cefaléias, náuseas, dor muscular, visão embaçada, perda de apetite, entre outros males. A hepatotoxicidade de vitamina A somente passou a ser um problema a partir da chegada dos suplementos vitamínicos, em cápsulas.

A deficiência em vitamina A é identificada pela WHO (organização mundial de saúde) como um problema de saúde pública em mais de sessenta países em desenvolvimento. Estima-se que cerca de 250 milhões de crianças no mundo inteiro corram o risco desta deficiência que tem como conseqüências a xeroftalmia, cegueira noturna e morte prematura (WHO, 1995 apud MARTINES, 1998, p. 1257). Outros sintomas que podem ocorrer pela deficiência desta vitamina incluem secura da pele, olhos e mucosa (RAW, 1983 apud LUQUE-GARCIA, 2001). Vários estudos ligam a deficiência em vitamina A ao aumento da severidade e duração de doenças infecciosas tais como as sarampo e AIDS (síndrome da imunodeficiência adquirida) (TANG, 1998 apud MITCHELL 2003).

O éster palmitato de retinol foi a forma química da vitamina A escolhida para ser utilizada no presente trabalho por ser a mais estável, e será citada pela abreviatura VA.

2.1.2 Vitamina D

O colesterol é o precursor da vitamina D. Embora cerca de 10 compostos diferentes exibam atividade de vitamina D apenas dois compostos são considerados importantes, as vitaminas D₂ (ergocalciferol) e D₃ (colecalfiferol). A figura 2 ilustra a estrutura química destes dois compostos.

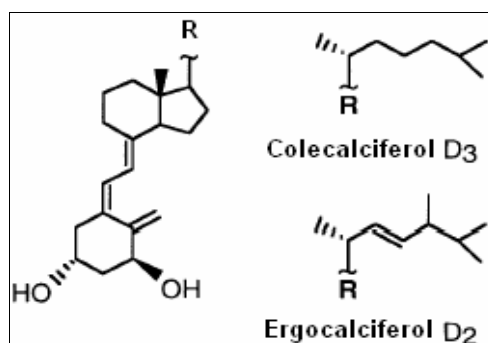


Figura 2 – Formas químicas da vitamina D.

As várias formas da vitamina D desempenham um papel importante na regulação do metabolismo do cálcio e do fósforo. Um dos compostos mais importantes é a vitamina D₃ (colecalfiferol), formado a partir do colesterol pela ação da radiação ultravioleta do sol sobre a pele. A vitamina D₃ é processada posteriormente no corpo para formar derivados hidroxilados, que são as formas metabolicamente ativas dessa vitamina. A presença da vitamina D₃ leva a um aumento da síntese de uma proteína que liga Ca⁺², que, por sua vez, aumenta a absorção intestinal do cálcio da dieta. Esse processo resulta na absorção de cálcio pelos ossos.

A deficiência em vitamina D e em seus metabólitos pode levar ao raquitismo, uma condição que é caracterizada pela calcificação inadequada da cartilagem e dos ossos de crianças em fase de crescimento, resultando em deformidades do esqueleto. Em adultos, a deficiência desta vitamina pode levar ao amolecimento e fraquezas dos ossos, doenças conhecidas com osteoporose e osteomalácia (LEHNINGER, 1995).

A vitamina D também tem importância na oncologia e na dermatologia devido a sua ação na diferenciação e proliferação celular (ORTIZ-BOYER, 1997 apud LUQUE-GARCIA, 2001).

A forma química da vitamina D utilizada no presente trabalho é o colecalfiferol e será citada pela abreviatura VD.

2.1.3 Vitamina E

Vitamina E é o nome dado a um grupo de lipídios conhecidos com tocoferóis que apresentam atividade antioxidante e estão naturalmente presente nos óleos vegetais. A sua estrutura contém uma parte cíclica e uma cadeia lateral isoprenóide com (tocotrienóis) e sem (tocoferóis) duplas ligações. As várias formas da vitamina E podem existir livres ou esterificadas (acetatos) (DIAZ, 2004, p. 231). Elas são classificadas de acordo com a substituição das metilas do anel fenólico com demonstra a figura 3.

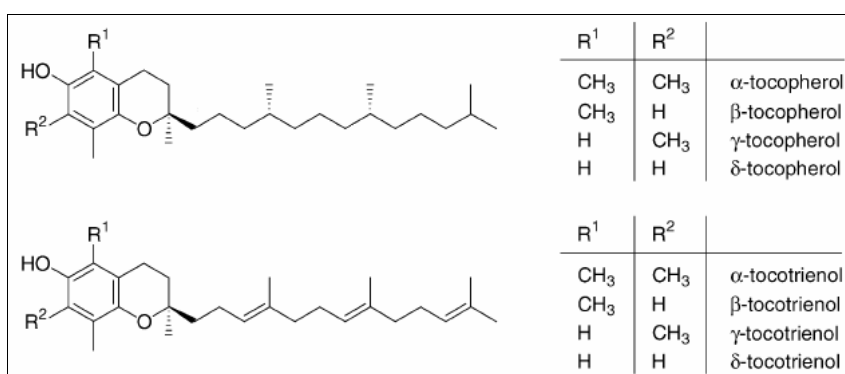


Figura 3 – Formas químicas da vitamina E

Uma propriedade química bem estabelecida da vitamina E é a capacidade antioxidante, isto é, um bom agente redutor, de tal forma que reage com agentes oxidantes antes que possam reagir com outras biomoléculas, interrompendo assim a propagação da peroxidação lipídica. O efeito antioxidante da vitamina E protege compostos importantes incluindo a vitamina A, provavelmente cumprindo essa função também nos organismos vivos. Outra função dos antioxidantes, como a vitamina E, é a de reagir e remover substâncias perigosas e muito reativas, conhecidas como radicais livres. Os radicais livres causam o stress oxidativo, importante no desenvolvimento de câncer e no processo de envelhecimento. A atividade da vitamina E aumenta com a atividade antioxidante na ordem α -, β -, γ - e δ -tocoferol, sendo assim o α -tocoferol a forma mais ativa da vitamina E.

A deficiência em vitamina E é muito rara e o principal sintoma é a fragilidade dos eritrócitos. Em ratos, a vitamina E é necessária para a reprodução (a deficiência causa a infertilidade) e para a prevenção da distrofia muscular, mas não se sabe ao certo se tal necessidade é válida para humanos (LEHNINGER, 1995).

O acetato de α -tocoferol foi a forma química da vitamina E escolhida para ser utilizada no presente trabalho por ser menos suscetível a oxidação, e será citada pela abreviatura VE.

2.1.4 Vitamina K

Existem três diferentes formas de vitamina K, sendo duas de ocorrência natural, a K₁ (filoquinona) e K₂ (menaquinona) e outra sintética, a K₃ (menadiona). Os mais de vinte compostos que exibem atividade de vitamina K₁ são sintetizados por folhas de plantas verdes. Os cerca de trinta membros da série da vitamina K₂ são produzidos por bactérias, no homem, por exemplo, certas bactérias residem no trato intestinal e produzem a partir do alimento a vitamina K₂ que é absorvida pelas paredes do intestino. A vitamina K₃ é uma variação sintética da vitamina K, para que esta se apresente na forma hidrodispersível (CHATZIMICHALAKIS, 2004).

A figura 4 ilustra as formas químicas da vitamina K.

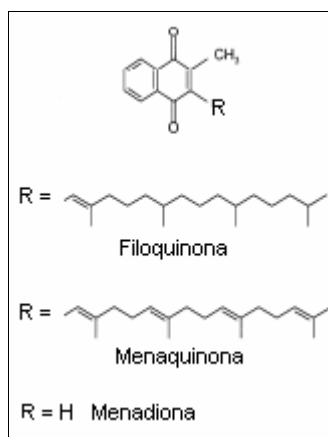


Figura 4 – Formas químicas da vitamina K.

O nome da vitamina K tem origem na palavra alemã “*Koagulation*”, pois essa vitamina é um fator importante no processo da coagulação sangüínea. Existe também uma longa cadeia lateral insaturada que consiste de unidades isoprenílicas repetitivas, cujo número determina a forma da vitamina K. Várias formas da vitamina podem ser encontradas em único organismo, não sendo bem compreendido o porquê dessas variações. A vitamina K não é a única que contém unidades isoprenílicas, sendo, no entanto, a única na qual o seu grau de saturação faz diferença.

A presença da vitamina K no organismo é necessária para modificar a protrombina envolvida no complexo processo da coagulação sanguínea. Ela participa na carboxilação do glutamato a γ -carboxiglutamato, e os dois grupamentos carboxíla próximos formam um ligante bidentado, que se liga ao íon Ca^{+2} , se a protrombina não for modificada dessa forma, ela não se ligará ao Ca^{+2} , necessário na coagulação (LEHNINGER, 1995).

A forma química da vitamina K utilizada no presente trabalho é a filoquinona e será citada pela abreviatura VK.

2.2 Cádmio e chumbo

A exposição humana a metais tóxicos presentes no meio ambiente tem aumentado muito durante os últimos 50 anos. O excesso de metais como mercúrio, chumbo, cádmio, alumínio, arsênio entre outros, que vão se acumulando no organismo por exposição crônica, podem causar uma enorme variedade de alterações, podendo ter uma influência direta em alterações do comportamento por diminuição das funções cerebrais, influenciando na produção e utilização dos neurotransmissores e alterando processos metabólicos. Além disso, os sistemas gastrintestinal, neurológico, cardiovascular e renal, também são suscetíveis.

Sabe-se que quantidades diminutas de determinados metais tóxicos causam efeitos deletérios, porém, estes efeitos variam com o modo, a quantidade e grau da exposição, com o estado nutricional, o metabolismo individual e a capacidade de detoxificação. Os mecanismos de toxicidade são múltiplos e incluem a inibição de enzimas e/ou co-fatores, interferência na permeabilidade das membranas celulares e outros processos de transporte, decréscimo na função neuronal ou dos processos de condução nervosa, interferência na estrutura e função de proteínas e ácidos nucléicos e aumento da formação de radicais livres (PAVANETTO, 1989).

Cádmio e chumbo são elementos tóxicos ao homem e seus efeitos são bem conhecidos. Estes elementos têm em comum o modo como atingem seus órgãos alvos percorrendo o corpo no sistema circulatório, sendo transportados por proteínas específicas ou por proteínas responsáveis pelo transporte não específico, como a albumina (GARCIA, 2004).

O cádmio ocorre exclusivamente no estado de valência 2 e, ao contrário de outros metais, não forma no organismo compostos organometálicos que tenham reconhecida e significativa atividade toxicológica. A absorção é preferencialmente pela via respiratória através da inalação de fumos e de poeiras (usualmente óxidos de cádmio). Após a absorção, metade do cádmio no organismo concentra-se no fígado e nos rins, órgãos ricos em metalotioneína, proteína com alta afinidade por metais. Os efeitos tóxicos mais exuberantes são devido a irritação na via absorptiva (respiração e digestão). O cádmio é um elemento de vida biológica longa (19 a 38 anos) e a principal via de excreção é renal, porém com equilíbrio muito moroso em relação ao teor de exposição (MELO, 2002).

A intoxicação pelo cádmio pode ser aguda ou crônica. No quadro agudo, após a ingestão de altas concentrações os efeitos tóxicos compreendem principalmente distúrbios gastrintestinais. A inalação de doses elevadas pode causar pneumonite difusa e edema pulmonar, o que pode levar a morte (MELO, 2002). No quadro crônico, os rins são afetados após a exposição respiratória ou digestiva, os efeitos pulmonares são observados após a exposição por inalação. Está associada também, com frequência, à lesão renal, hipertensão, litíase renal, cardiomegalia, aterosclerose, imunodepressão em fumantes, dores osteoarticulares, disfunção pulmonar, enfisema, anemia moderada, lesões nos testículos e infertilidade masculina. Há transmissão materno-fetal nos casos de mães intoxicadas. Quantidades adequadas no organismo de zinco, cálcio, magnésio e cobre inibem a absorção e retenção do cádmio (PATRIARCA, 2005).

O chumbo é virtualmente onipresente no meio ambiente como resultado de sua ocorrência natural e sua utilização industrial e os casos de toxicidade resultam tanto de exposição ambiental quanto industrial (SADAO, 2002).

O chumbo é o metal pesado mais disseminado no meio ambiente. Vários estudos já demonstraram que a intoxicação por chumbo está associada com deficiência de funcionamento do sistema nervoso central. Níveis aumentados de chumbo e cádmio no cabelo são correlacionados com níveis reduzidos de inteligência, diminuição no rendimento escolar e alterações no comportamento.

A intoxicação por chumbo pode levar à distúrbios de aprendizagem em crianças, cefaléia intensa, vertigem, tremores, dores articulares, anemia, irritabilidade, agressividade, distúrbios mentais, hiperatividade, anorexia, lesões musculares e dores abdominais. Induz, também, alterações na produção de

hormônios como tiroxina, hipofisários e catecolaminas. Níveis adequados de cálcio, ferro, zinco, fosfatos, vitamina C e proteínas inibem a absorção de chumbo pelo organismo (PAVANETTO, 1989).

A intoxicação por chumbo pode ocorrer de forma crônica ou aguda, sendo esta última de difícil ocorrência, já que para tal é necessária a ingestão de 10 a 40g do metal. A intoxicação crônica, denominada saturnismo, pode acontecer a partir da absorção diária de 1 a 2 mg de chumbo, durante uma semana (COUTINHO, 2004).

O chumbo mostra efeitos danosos nas crianças, tanto no crescimento quanto no desenvolvimento. Os metais tóxicos podem prejudicar processos enzimáticos e neurológicos gradualmente e progressivamente. Vários estudos já demonstraram que a contaminação de chumbo não tratada predispõe o indivíduo ao insucesso, desde a infância até a vida adulta (PAVANETTO, 1989).

2.3 Voltametria

2.3.1 Determinação de metais por voltametria

A voltametria estuda as relações entre a voltagem, a corrente e o tempo, durante a eletrólise numa célula. A técnica envolve o estudo da influência das variações da voltagem aplicada sobre a corrente que passa pela célula e, em alguns casos, investiga-se a variação da corrente com o tempo. O procedimento envolve o uso de uma célula com três eletrodos: (1) um eletrodo de trabalho no qual ocorre a eletrólise que se está investigando; (2) um eletrodo de referência, que é usado para medir o potencial do eletrodo de trabalho; e (3) um eletrodo auxiliar que, juntamente com o eletrodo de trabalho, permite a passagem da corrente da eletrólise (VOGEL, 1992).

O uso do eletrodo de mercúrio de gota pendente (HMDE), como eletrodo de trabalho, apresenta como vantagem o fato de que cada nova gota pode ser facilmente formada e este processo de renovação remove problemas que possam ser causados por contaminação de uma análise prévia.

A voltametria ocupa uma importante posição entre os métodos eletroquímicos para a investigação de compostos orgânicos. Muitos grupos

funcionais podem ser oxidados ou reduzidos no eletrodo de trabalho, o que torna possível a determinação de uma grande variedade de compostos (SKOOG, 1992).

A voltametria oferece potencialidades para investigar e estudar a especiação de metais pesados dissolvidos em águas naturais (BAREK, 2001). Por outro lado, certas espécies de metais dissolvidos, principalmente complexos orgânicos estáveis, são inacessíveis para determinação voltamétrica. Portanto, para determinação dessas espécies faz-se necessário um pré-tratamento para transformar os metais acessíveis de se determinar por voltametria.

Há diversas técnicas voltamétricas: voltametria de pulso normal (NPV), voltametria de pulso diferencial (DPV), voltametria de pulso reverso (RPV) e voltametria de onda quadrada (SWV). A escolha de uma delas depende do analito e da concentração do mesmo, entre outros fatores.

Outra técnica voltamétrica muito utilizada em análise de traços, referida na literatura como voltametria inversa, inclui a pré-concentração do analito no eletrodo, e, por uma inversão no sentido de varredura dos potenciais, obtém-se o sinal do analito pré-concentrado que é dependente do tempo de pré-concentração.

O curto tempo de análise e a seletividade combinada com alta confiabilidade, devido a boa exatidão nas medidas, tem feito da voltametria uma melhor alternativa quando comparada a AAS para análise de traços de metais pesados em diversas matrizes ambientais. Associado a isto, tem-se ainda o baixo custo analítico, rapidez de detecção, alto potencial de automatização e possibilidade de determinação simultânea de diversos metais (NURNBERG, 1983).

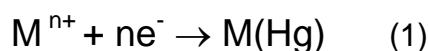
2.3.2 Voltametria de redissolução anódica (ASV)

Diversos métodos analíticos são utilizados para a determinação quantitativa de traços de metais pesados em amostras ambientais, alimentícias e farmacêuticas tais como os métodos espectroscópicos e eletroquímicos. Dentre os métodos eletroquímicos, a voltametria de redissolução anódica (ASV) é muito utilizada para a determinação de cádmio e chumbo, entre outros metais (GHONEIM, 2000).

A pré-concentração de substâncias em concentração em nível de traços aumenta a sensibilidade da medida analítica. A etapa de redissolução após a pré-

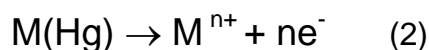
concentração possibilita determinações seletivas de diferentes substâncias assumindo que elas também têm diferentes potenciais de pico. (KUBIAK, 2001).

Na determinação de metais pesados por ASV, empregando eletrodo de mercúrio, estes devem ser solúveis no mercúrio, pois durante a etapa de pré-concentração formam uma amálgama com o mercúrio (Hg), ou seja, o metal se reduz no mercúrio. A equação a seguir representa a redução.



Onde, M= metal, por exemplo: Cd e Pb.

Após o período de deposição do metal na gota de mercúrio, ocorre a redissolução do metal, ou seja, ocorre a oxidação dos metais para a solução (GHONEIM, 2000 e HARRIS, 2001). A redissolução é representada na equação a seguir.



No entanto, nas determinações voltamétricas, a matéria orgânica pode interferir de diversas formas: 1) pela formação de fortes complexos com metais, os quais não são detectados durante a análise, levando à quantificação apenas da fração eletroquimicamente lábil; 2) competindo com o metal pela superfície do eletrodo, diminuindo assim a intensidade do sinal do analito ou provocando o aparecimento de sinais interferentes; 3) a própria matéria orgânica pode sofrer redução ou oxidação eletroquímica, aumentando a corrente residual ao ponto de impedir a execução da análise (VAN DEN BERG, 1988).

No presente trabalho utilizou-se ASV combinada com DPV (DP-ASV) para o estudo da interação dos metais cádmio e chumbo na presença das vitaminas A, D₃, E e K₁ com o eletrodo de mercúrio de gota pendente (HMDE).

2.3.3 Voltametria em estudos de complexação

A voltametria é usada em sistemas nos quais o íon metálico pode ser reversivelmente reduzido no eletrodo de mercúrio gotejante (MARQUES, 1998). A formação do complexo resulta em uma mudança no potencial de redução do íon para valores mais negativos, pois íons complexos resistem à redução eletrolítica mais efetivamente do que íons simples (ROSE, 1964 e LINGANE, 1941).

Métodos voltamétricos como a ASV têm sido empregados em estudos de complexação envolvendo metais pesados. Abate (2002) estudou a complexação do cádmio e do chumbo com ácidos húmicos por DP-ASV. Santos (2001) aplicou a ASV para estudar a extensão da interação entre o chumbo partículas de sedimentos de águas naturais.

A ASV permite a determinação da concentração do metal lábil, que é a fração total de metal, que pode ser reduzida na superfície do eletrodo. Esta fração inclui íons do metal livres hidratados e complexos lábeis de metal, que são complexos que dissociam muito rapidamente tornando o metal livre. A fração não lábil inclui o metal ligado em complexos (FLORENCE, 1986, p. 489-505)

A diferenciação entre o metal livre e o complexado pode ser observada pela mudança no potencial de pico de redissolução. Esta mudança pode ser interpretada no mesmo modo que o potencial de meia onda na polarografia clássica, como uma indicação da formação de complexos reduzíveis em solução. A observação da mudança do potencial de pico em função da concentração do ligante ou pH da solução tem sido usada para avaliar a constante de estabilidade e número de coordenação ou como evidência da formação de diferentes complexos do metal (WANG, 1985).

O objetivo do presente trabalho é investigar a ocorrência de interação entre vitaminas lipossolúveis e íons metálicos por voltametria de redissolução anódica.

2.3.4 Voltametria em meio orgânico

Os solventes orgânicos são importantes no campo da eletroquímica por causa da ampla faixa de potenciais que pode ser alcançada. Uma característica

relevante dos solventes orgânicos, que deve ser levada em consideração nas medidas voltamétricas, é a constante dielétrica, geralmente menor que a da água ($\epsilon = 80$) (WAEL, 2006).

A constante dielétrica é uma indicação macroscópica da polaridade do solvente, sendo é a medida da capacidade de o solvente isolar, umas das outras, cargas elétricas de sinais opostos. As atrações e repulsões eletrostáticas entre íons são menores nos solventes que tem constantes dielétricas mais elevadas. A água é o solvente mais eficiente para promover a ionização, no entanto, a maioria dos compostos orgânicos não se dissolve apreciavelmente em água (SOLOMONS, 1996).

Os solventes com baixa constante dielétrica correspondem com um meio altamente resistivo implicando em limitações sobre os efeitos na corrente de difusão e no potencial de meia onda, alterando as propriedades da onda polarográfica. A corrente de difusão em todos os solventes é menor do que em água, devido ao coeficiente de difusão dos íons do grau de dissociação (HUERTAS, 1971).

A análise da condutividade dos solventes de baixa permissividade foi feita primeiramente por Fuoss e Krauss (1933 apud WAEL, 2006). Contudo a falta de condutividade nos métodos eletroquímicos em meios não aquosos, pode ser superada pelo uso de eletrólitos suportes adequados. Meios suficientemente condutores podem ser obtidos pelo uso de sais de amônio como eletrólitos, entretanto se a concentração salina for muito baixa, prevalece a associação dos íons, por causa da baixa constante dielétrica ($\epsilon = 2 - 4$) (WAEL, 2006).

Sais quaternário de amônio são comumente utilizados como eletrólitos em solventes orgânicos como acetonitrila ($\epsilon = 36$), acetona ($\epsilon = 21$), N,N-dimetilformamida ($\epsilon = 37$) e diclorometano ($\epsilon = 8$) (DUFFY, 2006).

Solventes como metanol ($\epsilon = 33$), etanol ($\epsilon = 24$) e acetona ($\epsilon = 21$) são frequentemente utilizados na voltametria, sendo capazes de extrair algumas substâncias, devido a suas constantes dielétricas.

Neste trabalho desenvolveu-se um método voltamétrico em meio predominantemente orgânico para o estudo da interação metal-vitamina devido a necessidade de assegurar a solubilidade das vitaminas lipossolúveis (caráter hidrofóbico) no meio de medida durante a análise.

2.3.5 Voltametria de corrente alternada (AC)

Esta técnica voltamétrica aplica pulsos de potencial de corrente alternada (AC) de pequena amplitude (alguns mV) e onda senoidal constante superposto à varredura linear do potencial DC na forma de degraus. Mede-se o potencial DC na forma habitual e os resultados são acoplados às medidas com a AC (a AC é medida – filtrada – e plotada contra o potencial DC no voltamograma).

Devido à corrente residual muito grande, o limite de sensibilidade da voltametria AC (10^{-4} M) não é muito diferente do limite de sensibilidade da DC (10^{-5} M). A elevada corrente residual é uma consequência da corrente capacitiva, que é muito grande em relação a corrente de difusão (VOGEL, 1992).

O estudo dos processos de adsorção por voltametria AC é chamado de tensametria. A introdução do novo termo tornou-se necessária para diferenciar entre processos AC, que envolvem transferência de elétrons (faradaicos) e processos de adsorção-desorção, sem transferência de elétrons (não faradaicos).

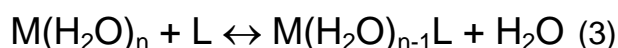
Estes processos não faradaicos ocorrem em potenciais positivos ou negativos, onde uma espécie adsorvida é deslocada do eletrodo por virtude de um aumento da afinidade do eletrólito suporte (BOND, 1980).

A eletro-sorção dos compostos orgânicos é resultado da adsorção competitiva entre compostos orgânicos e os íons do eletrólito suporte. O grau de adsorção na superfície do eletrodo é determinado por várias interações entre três componentes: metal, eletrólito e compostos orgânicos. Como resultado da adsorção as moléculas orgânicas uma diminuição da capacitância da dupla camada pode ser observada. A extensão desta mudança depende da concentração do composto orgânico na superfície do eletrodo que devido à dependência linear, provoca uma diminuição na corrente capacitiva. Esta diminuição é geralmente maior próxima ao potencial do máximo de adsorção (E_m). Além da diminuição da corrente capacitiva os voltamogramas AC mostram também correntes de pico em ambos os lados do E_m , que definem os limites dos potenciais positivos e negativos da região de adsorção (SANDER, 1995). Se a faixa de potenciais de adsorção dos interferentes orgânicos é conhecida pode ser possível minimizar estas interferências, trabalhando fora da faixa de potenciais de adsorção ou realizar o pré-tratamento da amostra.

As correntes capacitiva e faradaica dependem da otimização de três fatores: frequência (20 – 100 Hz), ângulo de fase e amplitude (5 – 50 mV). Em geral se utilizam os ângulos de 90 e 45° quando se quer uma maior sensibilidade das correntes capacitiva e faradaica respectivamente, fora de fase com o potencial AC aplicado. (BOND, 1980).

2.4 Complexos

2.4.1 Reação de formação de complexos



Apesar da amplitude do conceito de compostos complexos, se considera normalmente uma reação de formação de complexos aquela na qual uma ou várias moléculas do solvente são deslocadas por outras espécies químicas, estas espécies químicas unidas ao íon central são denominadas ligantes (L) e o número máximo de átomos doadores dos ligantes (n), número de coordenação do íon central.

O ligante pode ser monodentado, bidentado, tridentado..., dependendo do número de sítios de ligação envolvidos na formação do complexo (MARTI, 1994). Quelante é o ligante com no mínimo dois grupos funcionais participando da formação do complexo quelato, apresentando maior estabilidade do que complexos monodentados (YOKEL, 2002).

A formação do complexo é o resultado de uma interação ácido-base de Lewis, na qual o átomo central com um orbital vago atrai um par de elétrons de um átomo doador do ligante. Para isto, o íon central deve dispor de orbitais simetricamente adequados, estericamente disponíveis e de baixa energia. O ligante deve ter átomos (N, O, S, etc.) com pares eletrônicos não compartilhados (MARTI, 1994).

2.4.2 Teoria HSAB (*Hard and Soft Acids and Bases*)

Pearson (1963 apud VOGEL, 1981, p. 195) usou termos duro e mole para descrever interações entre íons metálicos (ácidos de Lewis) e ligantes (bases de Lewis). De acordo com sua teoria, uma base mole pode ser definida como aquela cujo átomo doador tem polarizabilidade elevada e baixa eletronegatividade, é facilmente oxidada, bem como associada com orbitais vacantes baixos. Estes termos descrevem, por diferentes modos, uma base cujos elétrons do átomo doador não estão fortemente presos, e são facilmente distorcidos e removíveis. Bases duras têm propriedades opostas, ou seja, o átomo doador tem baixa polarizabilidade e alta eletronegatividade, é difícil de reduzir e está relacionado com orbitais vacantes de alta energia que são inacessíveis.

Pearson (1968) convencionou que cátions duros são aqueles que formam complexos estáveis com ligantes duros e cátions moles, com ligantes moles. De acordo com essa classificação, os íons duros são caracterizados por pequeno raio e grande carga, ou seja, íons duros têm uma nuvem eletrônica pouco disponível para compartilhamento com o ligante. Enquanto que ligantes duros, também, não entregam com facilidade ao íon metálico suas densidades eletrônicas, logo a combinação de ambos, íons metálicos e ligantes duros resultam em um complexo estabilizado por simples força eletrostática. Por outro lado, íons metálicos e ligantes moles são aqueles que possuem nuvem eletrônica polarizada, estando assim mais disponíveis para o compartilhamento destas, formando entre si complexos com uma alta estabilidade. Pearson não eliminou a hipótese de interação entre íons metálicos e ligantes de classificação diferente, explica ele que caso ocorra, por exemplo, a combinação entre um íon metálico duro com um ligante mole, o metal não aceitará facilmente a densidade eletrônica que o ligante oferece e o resultado será um complexo com uma estabilidade baixa. Também é dito em seu trabalho que certos íons e ligantes dispõem de uma classificação intermediária sendo, por isso, capazes de interagir reacionalmente bem com ambas as espécies, moles e duras.

Na prática, a teoria de Pearson indica apenas possíveis combinações favoráveis entre íons metálicos e ligantes.

A seletividade, segundo a teoria HSAB, entre íons metálicos e ligantes no meio biológico depende não somente da natureza dos dois, mas também de vários

outros fatores como, por exemplo, estados de oxidação, geometria de coordenação, tamanho do íon e pH do meio (PEARSON, 1968 e COWAN, 1993).

Na Tabela 2 estão classificados exemplos específicos de ácidos e bases duros, intermediários e moles (COWAN, 1993).

Tabela 2 – Classificação dos ácidos e bases de Lewis usando o critério duros e moles.

	Ácidos	Bases
(A) Duros	H ⁺ , Li ⁺ , Na ⁺ , K ⁺ Mg ²⁺ , Ca ²⁺ , Mn ²⁺ , Al ³⁺ Ln ³⁺ , Cr ³⁺ , Co ³⁺ , Fe ³⁺ VO ²⁺ , MoO ³⁺	H ₂ O, ROH, NH ₃ , RNH ₂ RCO ₂ ⁻ , Cl ⁻ , F ⁻ , PO ₄ ³⁻ HPO ₄ ²⁻ , H ₂ PO ₄ ⁻ , SO ₄ ²⁻
Intermediários	Fe ²⁺ , Co ²⁺ , Ni ²⁺ , Cu ²⁺ Zn ²⁺ , Pb ²⁺ , Sn ²⁺ , SO ₂ NO ⁺ , Ru ²⁺	Imidazol, piridina
(B) Moles	Cu ⁺ , Ag ⁺ , Au ⁺ , Tl ⁺ Hg ⁺ , Cd ²⁺ , Pd ²⁺ , Pt ²⁺ , Hg ²⁺	RSH, R ₂ S, CN ⁻ , I ⁻ , S ₂ O ₃ ²⁻

R: representa uma cadeia lateral orgânica.

Desta forma, vê-se que os aceitadores da classe A preferem ligar-se a bases duras, com átomos doadores, como N, O, Cl e F, enquanto que os aceitadores da classe B preferem ligar-se a bases moles, como átomos doadores S e I. Um exame dos aceitadores da classe A, mostra que eles têm as seguintes características importantes: tamanho pequeno, estado de oxidação positivo elevado e ausência de elétrons mais externos que sejam facilmente excitáveis a estados mais elevados. Todos estes fatores levam a baixa polarizabilidade, e tais aceitadores são chamados ácidos duros. Os aceitadores classe B, no entanto, tem uma ou mais das seguintes propriedades: estado de oxidação positivo baixo ou zero, tamanho grande e muitos elétrons externos facilmente excitáveis (no caso dos metais estes são elétrons d). Todas estas propriedades conduzem à polarizabilidade elevada, e assim os ácidos classe B podem ser chamados de ácidos moles (VOGEL, 1981).

De um modo geral, pode-se correlacionar a capacidade de complexação dos metais pelo enunciado: “Os ácidos duros preferem se associar com bases duras e os ácidos moles com as bases moles.” Este princípio não deve ser encarado como exclusivo, isto é, sob condições adequadas, ácidos moles podem complexar com bases duras e ácidos duros, com bases moles. Entretanto, neste caso, são formados complexos de baixa estabilidade, uma vez que ambos os componentes são incompatíveis (VOGEL, 1981 e COWAN, 1993).

Uma das melhores ilustrações desta teoria em química bioinorgânica é a formação dos complexos de proteínas de baixo peso molecular, através de grupos sulfidrílica que complexam fortemente metais como Cd^{2+} , Hg^{2+} , Pb^{2+} e Tl^{2+} (STEPHEN, 1994).

2.5 Interação metal-vitamina

Sabe-se que há uma pequena fração de metal que está livre em matrizes orgânicas. Esta fração livre, entretanto, não é realmente livre, mas apresenta-se ligada a pequenos ligantes (ou compostos de baixo peso molecular), também presentes na matriz. Dependendo da afinidade do metal pelo ligante, o transporte da fração livre do metal é feito através de sua distribuição entre estes ligantes.

No organismo, o cádmio, por exemplo, apresenta afinidade muito forte por estruturas biológicas contendo grupos sulfidrílicos, como proteínas, enzimas e ácidos nucleicos. O chumbo, por outro lado, é transportado no sangue ligado, principalmente, aos eritrócitos, além de albumina e algumas globulinas; é desconhecido, entretanto, se estas formas ligadas constituem a fração ativa para a distribuição do chumbo em tecidos e células.

Embora a fração de complexos de baixo peso molecular – íons metálicos – seja pequena em comparação com a fração metal-proteína, é de grande significância devido ao importante papel destes complexos em muitos processos fisiológicos e bioquímicos vitais. Acredita-se que os complexos de baixo peso molecular estejam envolvidos: (1) como intermediários quando íons metálicos são inseridos ou removidos de certas metaloenzimas ou proteínas transportadoras, (2) na transferência de certos íons através de membranas, (3) na preservação de metais essenciais em solução e (4) alterando o potencial redox de certos pares. O

conhecimento acerca da distribuição destes íons metálicos entre estes ligantes pequenos, em fluidos biológicos, pode auxiliar a explicar a absorção, distribuição e excreção de um metal no corpo humano (BERTINI, 1994 e BERTHON, 2002).

Segundo a teoria de Pearson a capacidade da vitamina D (coleciferol) em formar complexos metálicos está relacionada à presença do grupamento hidroxila (OH) na sua estrutura, sendo, portanto um ligante duro. As vitaminas A, E e K, segundo Pearson, não apresentam grupamentos reconhecidos como ligantes. A figura 5 destaca os possíveis sítios de ligação através dos quais as vitaminas podem associar-se aos metais.

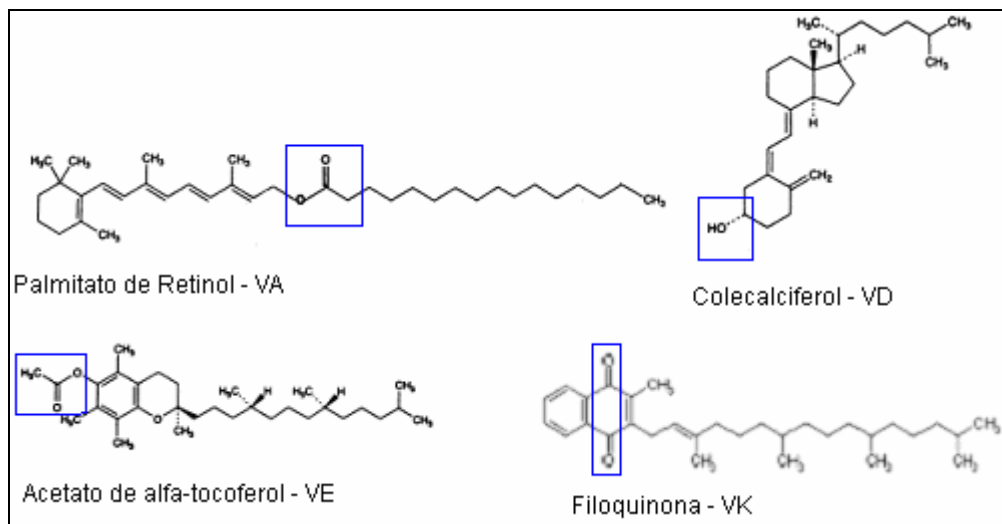


Figura 5 – Estrutura química das vitaminas, em destaque os possíveis sítios de ligação através dos quais as vitaminas podem associar-se aos metais.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Instrumentação

– Polarógrafo:

Processor 646 VA (Metrohm, Heriseau - Suíça);

Sample Changer 675 VA (Metrohm, Heriseau - Suíça);

Eletrodo de Referência (dupla junção líquida): Ag/AgCl/LiCl saturado em etanol/Iodeto de tetrabutilamônio $0,02 \text{ mol L}^{-1}$ em DMF;

Eletrodo de Referência: Ag/AgCl/KCl 3 mol L^{-1} ;

Eletrodo de Referência (dupla junção líquida): Ag/AgCl/LiCl saturado em etanol/Tampão acetato em etanol pH 4,6;

Contra Eletrodo: Platina;

Eletrodo de Trabalho: eletrodo de mercúrio de gota pendente (HMDE);

– Polarógrafo:

Processor 693 VA (Metrohm, Heriseau - Suíça);

Stand 694 VA (Metrohm, Heriseau - Suíça);

Eletrodo de Referência (dupla junção líquida): Ag/AgCl/LiCl saturado em etanol/Tampão acetato em etanol pH 4,6;

Contra Eletrodo: Platina;

Eletrodo de Trabalho: eletrodo de mercúrio de gota pendente (HMDE);

– Outros:

Balança Analítica (Sartorius) com quatro casas decimais de precisão;

Potenciômetro digital (Digimed DM 20) como eletrodo de vidro combinado;

Sistema de purificação de água Milli – Q Millipore ($18,2 \text{ M}\Omega \text{ cm}^{-1}$);

Ultra-som (Thornton) potência 200 W;

3.2 Reagentes e soluções

Utilizou-se água destilada, deionizada e purificada em sistema Milli-Q (resistividade de $18,2 \text{ M}\Omega \text{ cm}^{-1}$) para o preparo de soluções.

Os solventes orgânicos acetonitrila, acetona, N,N-dimetilformamida (DMF), etanol, éter etílico, hexano e metanol foram utilizados no teste de solubilidade das vitaminas e também para o preparo de algumas soluções.

As soluções padrão estoque individuais dos metais Cd (II) e Pb (II), ambas na concentração de 1000 mg L^{-1} , foram preparadas pela dissolução de quantidades apropriadas dos sais CdSO_4 (Merck) e $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ (Sigma) em água ultra pura.

As soluções padrão de trabalho contendo os metais Cd (II) e Pb (II) simultaneamente, foram preparadas nas concentrações de 5, 10, 20 e 25 mg L^{-1} , de ambos os metais, por diluição da solução padrão estoque (1000 mg L^{-1}) em água ultra pura.

A solução saturada de LiCl (aproximadamente $4,5 \text{ mol L}^{-1}$) foi obtida por dissolução de quantidade adequada do sal em etanol.

As soluções de iodeto de tetrabutilamônio (ITBA) $0,02$ e $0,2 \text{ mol L}^{-1}$ foram preparadas por dissolução do sal em DMF.

A solução de KCl 3 mol L^{-1} foi preparada por dissolução de quantidade apropriada do sal em água ultra pura.

A solução de HClO_4 10% foi cuidadosamente preparada por diluição do ácido em água ultra pura.

A solução de H_2SO_4 1:1 (v/v) foi preparada por conveniente diluição do ácido em água ultra pura.

As soluções aquosa e etanólica de tampão acetato foram preparadas a partir das soluções de hidróxido de amônio 1 mol L^{-1} e de ácido acético glacial 2 mol L^{-1} . O pH das soluções foi ajustado com ácido acético glacial até o valor de 4,6. O pH era ajustado sempre antes do uso.

As soluções estoque da VA, VE e VK foram preparadas em quantidades apropriadas pela solubilização destes insumos farmacêuticos em acetona e a solução estoque de VD foi preparada pela dissolução adequada do sal em etanol. Todas as soluções estoque das vitaminas foram armazenadas ao abrigo da luz e sob refrigeração, assim como seus insumos.

As soluções analíticas da VA, VD, VE e VK utilizadas nas medidas voltamétricas e nas medidas espectrofométricas foram preparadas por conveniente diluição das soluções estoque em etanol, imediatamente antes do uso.

Todos os reagentes empregados no presente trabalho foram produtos de grau analítico, suas especificações e respectivos fabricantes estão descritos na tabela 3.

Tabela 3 – Reagentes utilizados no desenvolvimento do trabalho.

Reagentes	Fabricantes
Colecalciferol 100 % – Vitamina D ₃ (VD)	Galena
Palmitato de retinol – Vitamina A (VA)	Galena
Acetato de α -tocoferol 96,6 % – Vitamina E (VE)	Galena
Filoquinona – Vitamina K ₁ (VK)	Deg
Acetona	Vetec
Acetonitrila	Tedia
Ácido acético glacial 99,8 %	Merck
Ácido nítrico 65 %	Quimex
Ácido perclórico 70 %	Merck
Ácido sulfúrico 95 - 97 %	Merck
Cloreto de lítio	Merck
Cloreto de Potássio	Merck
Etanol	Quimex
Éter etílico	Vetec
Hexano	EM science
Hidróxido de Amônio 25 %	Merck
Iodeto de tetrabutylamônio (ITBA)	Sigma Aldrich
Metanol	Merck
N,N – Dimetilformamida (DMF)	Merck
Nitrato de chumbo	Sigma
Sulfato de cádmio	Merck

3.3 Descontaminação do material

O material plástico (polietileno) utilizado para o preparo e o armazenamento das soluções foi colocado por pelo menos 48 horas antes do uso em solução etanólica de HNO₃ 10 % (v/v) e a vidraria em uma solução aquosa de HNO₃ 1 % (v/v) por no mínimo 24 horas. Posteriormente, o material foi lavado com água ultra pura em abundância antes do uso.

3.4 Solubilidade das vitaminas lipossolúveis

Para a escolha do solvente orgânico ideal para o preparo das soluções das vitaminas foi realizado um teste de solubilidade com a uma série de solventes orgânicos: acetonitrila, acetona, DMF, etanol, éter, hexano e metanol.

Para a realização deste ensaio utilizou-se o critério de solubilidade descrito na farmacopéia USP XXI (*United States Pharmacopeia*), que direciona o teste da seguinte forma: determinar a solubilidade a 25 °C de 1 g (sólidos) ou 1 mL (líquidos) de matéria-prima dissolvida nas partes (mL) do solvente especificado na monografia conforme os termos descritos na tabela 4 abaixo.

Tabela 4 – Classificação de uma substância em função da sua solubilidade em partes de solvente.

Termo descrito	Partes do solvente
Muito solúvel	Menos de 1 parte
Facilmente solúvel	De 1 a 10 partes
Solúvel	De 10 a 30 partes
Ligeiramente solúvel	De 30 a 100 partes
Pouco solúvel	De 100 a 1000 partes
Muito pouco solúvel	De 1000 a 10000 partes
Praticamente insolúvel	Mais de 10000 partes

Fonte: Farmacopéia USP

A realização deste teste baseou-se nas condições da tabela 4. Utilizou-se aproximadamente 0,1 g de vitamina em 3 mL de solvente, pois se a solubilização das vitaminas ocorrer nestas condições poderíamos considerá-las solúvel em tal solvente. Quando a solubilização das vitaminas não foi possível por simples dissolução, submeteu-se as mesmas soluções à um banho de ultra-som por tempo necessário para a solubilização. Caso fosse necessário ou não pudesse ser evitada a presença de água durante o desenvolvimento do método voltamétrico, foram testadas adições de pequenos volumes de água sobre as mesmas soluções, até mesmo nas soluções submetidas ao banho de ultra-som, para saber qual o solvente admite melhor a presença de água.

3.5 Voltametria do cádmio e chumbo em meio orgânico – Método I

3.5.1 Eletrodo de referência modificado I

O eletrodo de referência foi modificado para ser utilizado em meio orgânico. A parte interna foi preenchida com uma solução de cloreto de Lítio saturado em etanol (eletrólito interno). Na parte na externa do eletrodo utilizou-se uma solução de iodeto de tetrabutylamônio $0,02 \text{ mol L}^{-1}$ em DMF (eletrólito externo) (POLAK, 1986 apud HILGEMANN, 2005, p. 9).

3.5.2 Método voltamétrico I

O eletrodo de mercúrio foi empregado no modo HMDE, para analisar o comportamento dos metais em meio orgânico por ASV no modo DP (pulso diferencial).

O procedimento constituiu em adicionar na célula voltamétrica 12 mL de acetona juntamente com 2 mL de água ultra pura, 0,5 ml do eletrólito suporte iodeto de tetrabutylamônio $0,2 \text{ mol L}^{-1}$. O desaeramento da solução foi feito por borbulhamento de nitrogênio (99,999 % de pureza) durante 5 minutos.

Os voltamogramas foram obtidos utilizando dois segmentos, o primeiro para o cádmio com o potencial de pré-concentração em $-0,70$ V e tempo de pré-concentração de 90 s, e o segundo para o chumbo com o potencial de pré-concentração em $-0,50$ V e tempo de pré-concentração de 20 s. Na etapa de redissolução o intervalo de potenciais usado no primeiro segmento foi de $-0,70$ a $-0,45$ V, e no segundo segmento foi de $-0,5$ a $-0,25$ V, ambos com velocidade de varredura de 10 mV s^{-1} .

O método da adição do padrão foi empregado para determinar a linearidade deste método voltamétrico.

Para o estudo da interação metal-vitamina, realizaram-se medidas aplicando o Método I onde estudou-se a modificação dos sinais voltamétricos em função das adições das vitaminas sobre os metais. Cada vitamina foi estudada individualmente.

3.6 Voltametria do cádmio e chumbo em meio orgânico - Método II

3.6.1 Solventes orgânicos testados

Três solventes orgânicos foram escolhidos (pela solubilidade das vitaminas nesses e também pela diferença de polaridade entre eles) para serem testados como um meio orgânico adequado a determinação voltamétrica do cádmio e do chumbo, deste modo escolheu-se a acetona, o etanol e o metanol. Foram adicionados 9 mL do solvente diretamente na célula voltamétrica.

3.6.2 Eletrólitos suporte testados

Para observar o efeito do eletrólito suporte ao meio orgânico, foram testadas substâncias de grau analítico. Os eletrólitos suporte utilizados foram: solução aquosa de ácido perclórico 10 % (v/v), solução aquosa de ácido sulfúrico 1:1 (v/v), solução etanólica de Tampão Acetato pH 4,6.

3.6.3 Eletrodo de referência modificado II

A modificação do eletrodo de referência para uso em meio orgânico utilizou uma solução de cloreto de Lítio saturado em etanol como eletrólito interno e como eletrólito externo uma solução etanólica de tampão acetato pH 4,6 (hidróxido de amônio 1 mol L^{-1} e ácido acético, o pH foi ajustado em 4,6 com ácido acético glacial).

Para os ensaios em meio aquoso utilizou-se o eletrodo de referência no sistema: Ag/AgCl/KCl 3 mol L^{-1} .

3.6.4 Efeito do potencial de pré-concentração

O efeito do potencial de pré-concentração na determinação dos metais (Cd e Pb) em meio orgânico, foi avaliado utilizando-se as concentrações: 50, 100, 200 e $250 \mu\text{g L}^{-1}$ de Cádmio e de Chumbo em um tempo de pré-concentração de 60 s. Os seguintes potenciais foram testados: - 1,00, - 0,90, - 0,80, e - 0,70 V.

3.6.5 Efeito do tempo de pré-concentração

Para estudar o efeito do tempo de pré-concentração na determinação dos metais em meio orgânico, utilizou-se as concentrações: 50, 100, 200 e $250 \mu\text{g L}^{-1}$ de Cádmio e de Chumbo no potencial de pré-concentração de - 0,80 V. Foram investigados os tempos de 30 s, 60 s, 90 s, 120 s e 150 s.

3.6.6 Método voltamétrico II

O eletrodo de mercúrio foi empregado no modo HMDE, para analisar o comportamento dos metais em meio orgânico por ASV no modo DP (pulso diferencial).

O procedimento constituiu em adicionar 9 mL de solvente (acetona, etanol e metanol) na célula juntamente com 1 mL do eletrólito suporte tampão acetato

pH 4,6. O desaeramento da solução foi feito por borbulhamento de nitrogênio (99,999 % de pureza) durante 5 minutos.

Os voltamogramas foram obtidos utilizando o potencial de pré-concentração em $-0,70$ V, e tempo de pré-concentração de 90 s. Na etapa de redissolução o intervalo de potenciais empregado foi de $-0,70$ V a $0,0$ V, com velocidade de varredura de 10 mV s^{-1} .

O método da adição do padrão ($n = 5$) foi empregado para determinar a linearidade deste método voltamétrico.

Para o estudo da interação metal-vitamina, realizaram-se medidas aplicando o Método II onde estudou-se a modificação dos sinais voltamétricos em função das adições das vitaminas sobre os metais. Cada vitamina foi estudada individualmente.

3.6.7 Influência do tempo na interação de cádmio e chumbo com as vitaminas lipossolúveis

Para saber a respeito da influência do tempo que a interação metal-vitamina leva para ocorrer, logo após da primeira adição de vitamina foram estudados os tempos de 0 s, 60 s, 180 s, 300 s e 600s antes da medida voltamétrica.

3.7 Voltametria de corrente alternada em meio orgânico – Tensametria

Com o objetivo de verificar a ocorrência ou não da adsorção das vitaminas lipossolúveis estudadas no eletrodo de mercúrio, foram realizadas medidas tensamétricas. A faixa de potenciais utilizada foi de $-0,70$ a $0,0$ V com o ângulo de fase em 90° . (os demais parâmetros estão descritos no apêndice A). As medidas foram realizadas no mesmo meio, eletrólito suporte e concentração das adições de vitamina usadas no método voltamétrico II.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Solubilidade das vitaminas lipossolúveis

Para a realização do trabalho foi necessário estudar na prática a solubilidade das vitaminas para a escolha de um solvente orgânico adequado ao preparo das soluções destas.

As forças intermoleculares têm importância fundamental na explicação da solubilidade das substâncias. A regra prática para prever a solubilidade é: “os iguais se dissolvem”. (SOLOMONS, 1996).

As vitaminas lipossolúveis são compostos orgânicos isoprenóides parcialmente cíclicos o que lhes confere caráter hifrofóbico (baixa solubilidade em água) (LEHNINGER, 1995). A diferença de polaridade entre elas é devida a presença de diferentes grupos funcionais em sua estrutura e tamanho da cadeia lateral (DUBBS, 1998).

Como se tratava então de substâncias de baixa polaridade, a solubilidade das vitaminas foi testada frente a uma série de solventes orgânicos (polaridades diferentes). A escolha dos solventes para a realização do teste foi baseada na solubilidade característica de cada derivado das vitaminas estudadas descrita nas monografias das farmacopéias Portuguesa e Brasileira. Baseou-se também nos solventes comumente utilizados na extração destas vitaminas de matrizes diversas, como a acetonitrila, hexano, DMF, etanol, acetona, metanol, tetrahidrofurano e éter de petróleo (LUQUE-GARCÍA, 2001, p. 4) e (WOOLLARD, 1981 apud TURNER, 2001, p. 216). Assim os solventes escolhidos para a realização do teste de solubilidade foram: acetona, etanol, éter, metanol, acetonitrila, DMF e hexano.

Para a escolha do solvente orgânico ideal para o preparo das soluções das vitaminas foi realizado um teste de solubilidade (vide seção 3.4) e os resultados deste ensaio estão descritos na tabela 5.

A partir da análise dos resultados do teste de solubilidade observa-se que a acetonitrila não foi capaz de solubilizar nenhuma das vitaminas, assim como a dimetilformamida para com a VA, os solventes etanol e metanol não solubilizaram as

VA, VE e VK. Porém, esses dois últimos solventes solubilizaram estas vitaminas quando as soluções foram submetidas ao banho de ultra-som.

Tabela 5 – Resultado do ensaio de solubilidade das vitaminas em solventes orgânicos.

	VA	VD	VE	VK
Acetonitrila	Insolúvel	insolúvel	insolúvel	insolúvel
Acetona	solúvel ^b	solúvel ^b	solúvel ^b	solúvel ^b
DMF	insolúvel ^a	Solúvel	Solúvel	solúvel
Etanol	insolúvel ^a	Solúvel	insolúvel ^a	insolúvel ^a
Éter	Solúvel	Solúvel	Solúvel	solúvel
Metanol	insolúvel ^a	Solúvel	insolúvel ^a	insolúvel ^a
Hexano	Solúvel	Solúvel	Solúvel	solúvel

0,1 g de vitamina em 3 mL de solvente.

^a auxílio de banho de ultra-som.

^b tolerante a presença de água (0,2 mL).

Por outro lado observa-se que os solventes hexano e éter etílico solubilizaram prontamente todas as vitaminas assim como a acetona, e a dimetilformamida solubilizou as VD, VE e VK e o etanol e o metanol solubilizaram somente a VD.

Apesar de todas as vitaminas terem se mostrado solúveis em éter etílico e hexano o uso destes solventes foi descartado. O éter devido a sua tendência de formar peróxidos quando exposto ao ar e a luz, e o uso do hexano foi descartado, pois caso fosse necessária a presença de água no meio este solvente não seria apropriado devido a sua imiscibilidade em água.

Assim utilizou-se a acetona para o preparo das soluções estoque de todas as vitaminas no método I e no método II a acetona para a VA, VE e VK e o etanol para a VD.

Para as soluções analíticas de todas as vitaminas utilizou-se o etanol, já que elas seriam diluídas pelo menos duas vezes a partir da solução estoque.

Um fator que também colaborou na escolha pela acetona para o preparo das soluções estoque foi o da tolerância à presença de água.

Os solventes que precisaram do auxílio do banho de ultra-som não foram escolhidos para serem usados no preparo das soluções estoque, pois talvez o ultra-som pudesse acelerar a degradação das vitaminas.

4.2 Aplicação da ASV no estudo da interação do cádmio e chumbo com as vitaminas lipossolúveis

Voltametria em meio orgânico

Para investigar o comportamento do cádmio e do chumbo em meio orgânico as medidas foram realizadas aplicando-se a DP-ASV e o eletrodo de mercúrio no modo HMDE.

O método voltamétrico deveria ser desenvolvido em meio orgânico para que a realização da etapa de investigação da interação das vitaminas lipossolúveis com esses metais fosse possível, já que, devido à característica hidrofóbica dessas vitaminas, o meio aquoso não permitiria tal estudo, pois ocorreria a precipitação das mesmas quando adicionadas na célula voltamétrica.

Portanto a escolha do solvente orgânico que seria usado diretamente na célula voltamétrica, além de considerar as implicações na determinação dos metais neste meio, teria de considerar a solubilidade das vitaminas nesse solvente, e ainda as características físicas e químicas desse solvente.

A partir disso tomou-se conhecimento das limitações que o meio orgânico impõe a voltametria.

Uma característica relevante dos solventes orgânicos, que deve ser levada em consideração nas medidas voltamétricas, é a constante dielétrica, geralmente menor do que a água ($\epsilon = 80$) (WAEL, 2006). Os solventes com baixa constante dielétrica correspondem com um meio altamente resistivo implicando em limitações sobre os efeitos na corrente de difusão e no potencial de meia onda, alterando as propriedades da onda polarográfica. A corrente de difusão em todos os solventes é menor do que em água, devido ao coeficiente de difusão dos íons e do grau de dissociação (HUERTAS, 1971).

A escolha por acetona, etanol e metanol para serem testados como meio orgânico levou em consideração os resultados do teste solubilidade das vitaminas descrito na tabela 5, na seção 4.1. Outro fator de escolha é que estes solventes são frequentemente utilizados na voltametria por serem capazes de extrair algumas substâncias, devido a suas constantes dielétricas. [acetona ($\epsilon = 21$), etanol ($\epsilon = 24$) e metanol ($\epsilon = 33$)].

Interação metal-vitamina

Não foram encontrados, na literatura, trabalhos que tenham empregado técnicas voltamétricas para estudar a interação entre os metais, cádmio e chumbo com as vitaminas lipossolúveis.

O primeiro complexo preparado entre um metal e uma vitamina foi estudado em 1989 por Qitao (apud MERCÊ, 1998, p.87), este estudo mostrou que a vitamina D₃ é capaz de formar complexos com o cálcio (II) e com o cádmio (II).

Mercê (1998) determinou as constantes de estabilidade dos complexos formados entre a vitamina D₃ e os metais Co (II), Ni (II), Cu (II) e (1999) com Mn (II), Fe (II), Fe (III) e Zn (II) empregando a titulação potenciométrica. Segundo Mercê (1998) a vitamina D₃ atua como ligante pelo OH desprotonado da sua molécula.

Na voltametria se determina a fração de metal livre na célula que reage no eletrodo de mercúrio. A ocorrência da ligação entre um metal e um ligante pode ser observada através da redução do sinal voltamétrico do metal. Devido a complexação, a concentração de metal livre dentro da célula diminui em função da concentração do ligante, pois o metal complexado se torna indisponível para reagir no eletrodo levando à quantificação apenas da fração eletroquimicamente lábil (VAN DEN BERG, 1988).

A ASV permite a determinação da concentração de metal lábil, que é a fração total do metal (livre e complexado) que pode ser reduzido na superfície do eletrodo durante a varredura de potenciais (FLORENCE, 1986).

Em geral a formação de complexos resulta na mudança do potencial de redução para valores mais negativos, pois os íons complexos resistem a redução eletrolítica mais eficientemente que íons simples (LINGANE, 1941).

O potencial de pico pode mudar ao longo do eixo dos potenciais em função da concentração do ligante. Esta mudança depende da natureza do complexo formado (WANG, 1985).

Neste trabalho o estudo da interação metal-vitamina foi realizado para cada vitamina individualmente aplicando-se o método voltamétrico desenvolvido para a determinação de metais em meio orgânico.

4.2.1 Método voltamétrico I

O método foi testado em meio de acetona utilizando o HClO_4 e o eletrodo de referência Ag/AgCl/KCl 3 mol L^{-1} , mas como se esperava estes, eletrólito e eletrodo, não foram eficientes para vencer a resistividade do meio.

A falta de condutividade nos métodos eletroquímicos em meio não aquoso pode ser superada pelo uso de eletrólitos suportes adequados. Meios suficientemente condutores podem ser obtidos pelo uso de sais de amônio quaternário como eletrólitos (WAEL, 2006).

A partir disso a voltametria em meio exclusivamente orgânico (acetona) passou a utilizar solução de ITBA $0,2 \text{ mol L}^{-1}$ (concentração na célula $15,4 \text{ mM}$) como eletrólito suporte. A troca de eletrólito implicou na modificação do eletrodo de referência, que passou a ter a seguinte configuração: a parte interna contendo solução etanólica de LiCl , e a parte externa contendo solução ITBA $0,02 \text{ mol L}^{-1}$ (vide seção 3.5.1).

Nestas condições o voltamograma obtido com três adições de $100 \mu\text{g L}^{-1}$ de ambos os metais, ilustrado na figura 6 (a), mostra que o eletrólito suporte é eletroativo na faixa de potenciais próximos ao potencial de pico do chumbo, e, portanto, interfere no sinal do chumbo ($E_p \cong -0,35 \text{ V}$), sobrepondo-o, em concentrações inferiores a $200 \mu\text{g L}^{-1}$.

Para melhorar o sinal do chumbo estudou-se a possibilidade de se trabalhar em meio misto, ou seja, admitir a presença de pequenas proporções de água no meio orgânico. Assim testou-se diferentes proporções de água e também foram testadas menores concentração de eletrólito suporte na célula. Conseguiu-se uma melhora no sinal do chumbo com a adição de água (na proporção 6:1 acetona:água)

no meio e com adição de 0,5 mL de ITBA 0,2 mol L⁻¹ (7 mM na célula). Esta melhora no sinal do chumbo pode ser observada pelo voltamograma, obtido com adições 100 µg L⁻¹ de cada metal, ilustrado na figura 6 (b).

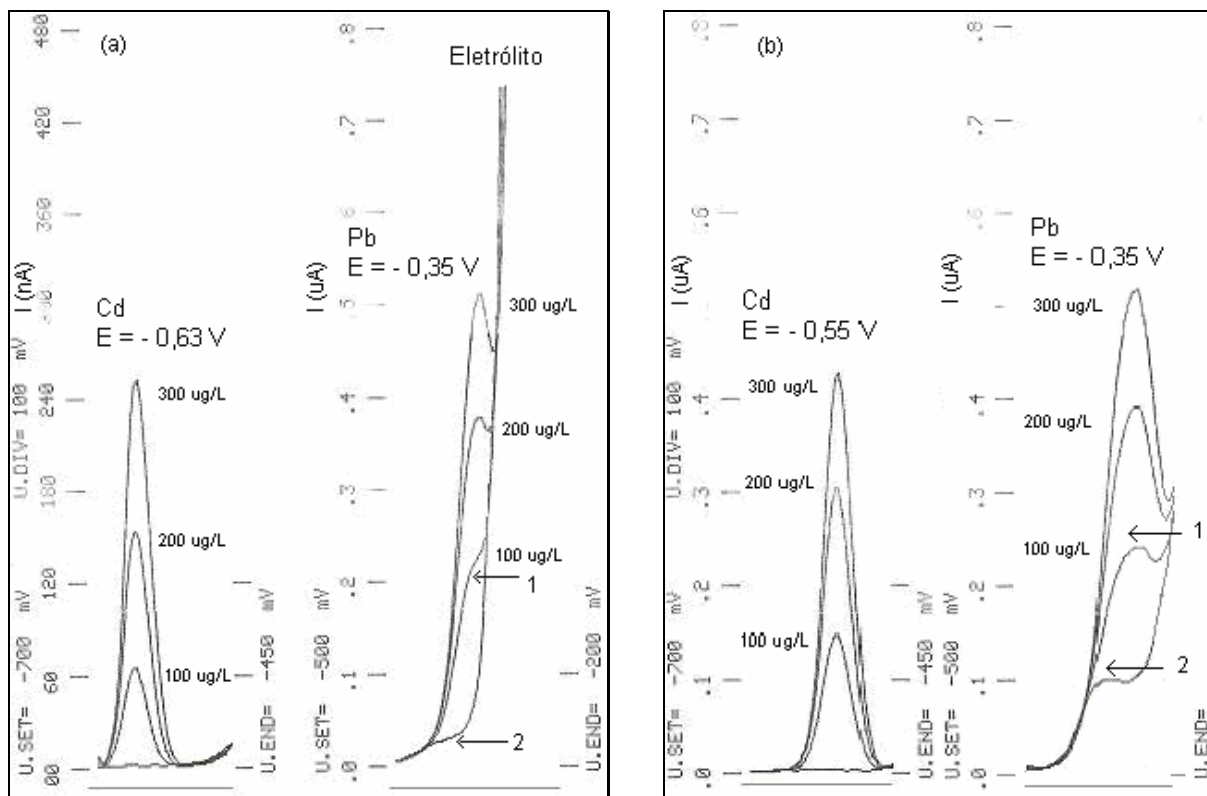


Figura 6 – Sinal voltamétrico do Cd e do Pb, (a) em meio orgânico (acetona) e (b) em meio misto (acetona + água). (Cd: E_d = - 0,70 V, t_d = 90 s; Pb: E_d = - 0,50 V, t_d = 20 s).

A seta 1 na figura 6 (b) indica a separação entre o sinal do chumbo e do eletrólito, o que antes da presença de água 6 (a) só seria possível em concentrações superiores a 200 µg L⁻¹. A seta 2 do voltamograma obtido em meio misto 6 (b) aponta para a contaminação do meio (provavelmente da acetona) por chumbo, o que não pode ser observado no voltamograma da figura 6 (a).

O sinal voltamétrico do cádmio é bem definido em ambos os voltamogramas da figura 6 e pode-se observar a influência da presença de água no meio (aumento da polaridade) no voltamograma 6 (b), uma vez que a altura do seu sinal duplicou e o potencial de pico deslocou em relação ao sinal no voltamograma 6 (a).

A influência da água sobre o sinal do cádmio e do chumbo pode ser associada à polaridade do meio. Com a presença de água o meio fica mais polar, visto que a constante dielétrica da água é 80 enquanto que da acetona é de 21. As atrações e as repulsões eletrostáticas entre os íons são menores nos solventes que tem constantes dielétricas mais elevadas (SOLOMONS, 1996), promovendo um transporte mais efetivo dos íons à superfície do eletrodo, e, portanto, um aumento da corrente.

A linearidade do método foi determinada empregando-se o método da adição do padrão. A curva analítica para a faixa de concentração de 100 – 500 $\mu\text{g L}^{-1}$, apresentou um coeficiente de correlação linear entre os pontos de 0,999 ($n=4$), para o cádmio e para o chumbo. A equação da reta obtida através da curva analítica na faixa de concentração de 100 – 500 $\mu\text{g L}^{-1}$ está representada na figura 7.

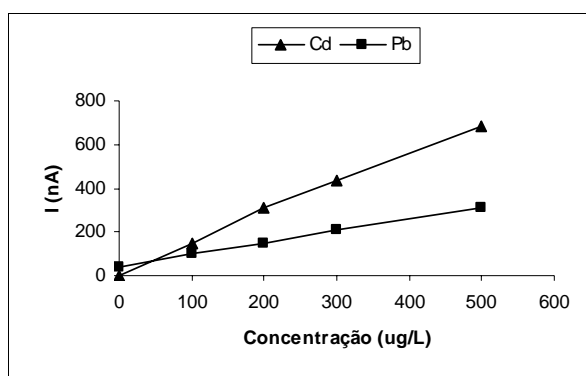


Figura 7 – Representação gráfica da equação da reta obtida pela curva analítica do Cd e Pb na faixa de concentração 100 – 500 $\mu\text{g L}^{-1}$ com o eletrólito ITBA 0,2 mol L^{-1} em meio misto. (Cd: $E_d = -0,70\text{ V}$, $t_d = 90\text{ s}$; Pb: $E_d = -0,50\text{ V}$, $t_d = 20\text{ s}$).

Através da regressão linear pode-se quantificar a contaminação do meio (acetona) pelo chumbo, observada na figura 6(b), o valor encontrado foi de 43 $\mu\text{g L}^{-1}$.

Optou-se trabalhar com os metais na concentração de 100 $\mu\text{g L}^{-1}$, nesta concentração o chumbo apresenta um sinal mais definido.

Através do voltamograma obtido para a confecção da curva analítica na faixa de concentração de 100 – 500 $\mu\text{g L}^{-1}$ pôde-se observar que houve o deslocamento dos potenciais de pico com as adições de metal para ambos os metais, e que esse deslocamento foi para potenciais anódicos, ou seja, para valores mais positivos. Na

tabela 6 constam os potenciais de pico registrados em relação às adições de metal (aumento da concentração dos metais na célula).

Através dos dados da tabela 6 observa-se que a mudança no potencial de pico é muito mais pronunciada para o chumbo do que para o cádmio. A variação total do potencial para o cádmio é praticamente a mesma (em torno de 0,01 V), porém para o chumbo a mudança de potencial se dá ao longo das adições.

Tabela 6 – Deslocamento dos potenciais de pico com o aumento da concentração dos metais na célula (eletrólito ITBA 0,2 mol L⁻¹ Cd: E_d = - 0,70 V, t_d = 90 s; Pb: E_d = - 0,50 V, t_d = 20 s).

	Concentração µg L ⁻¹				
	0	100	200	300	500
E _p Cd	-	- 0,55	- 0,547	- 0,545	- 0,54
E _p Pb	- 0,375	- 0,316	- 0,313	- 0,31	- 0,306

E_p = (V)

4.2.1.1 Estudo da interação metal-vitamina pelo método voltamétrico I

O método foi aplicado para cada vitamina separadamente fazendo-se a leitura do sinal do cádmio e do chumbo (100 µg L⁻¹ = 0,6 µM de Cd e 0,33 µM de Pb) primeiramente na ausência da vitamina e depois com adições consecutivas de vitamina. Para cada vitamina foram feitas adições na mesma concentração, cada adição de VA, VE e VK corresponde a 0,26; 0,3 e 0,5 mM respectivamente (estas adições representam um excesso molar em relação à concentração molar dos metais na célula), e observou-se nos voltamogramas obtidos o efeito dessas adições sobre o sinal voltamétrico dos metais.

As figuras 8, 9 e 10 mostram os voltamogramas obtidos para o cádmio e chumbo com as VA, VE e VK respectivamente.

VA e VE não apresentam eletroatividade na faixa de potenciais utilizada por este método, assim não se observa nenhum sinal interferente nos voltamogramas das figuras 8 e 9 respectivamente.

Na figura 10 pode-se notar o surgimento de um sinal muito grande ($E = -0,51$ V) com as adições de VK, este sinal encobre ao sinal do cádmio. Este sinal é provavelmente devido à eletroatividade da VK, que está associada à presença do oxigênio de dois grupamentos carbonila presente em sua molécula (quinona).

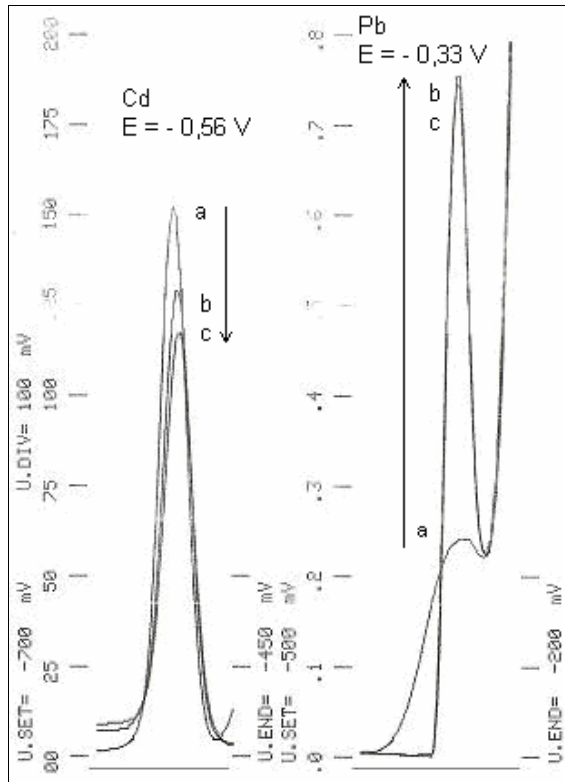


Figura 8 – Efeito das adições de VA sobre o sinal do Cd e do Pb. (a) sinal voltamétrico dos metais ($0,6 \mu\text{M}$ de Cd e $0,33 \mu\text{M}$ de Pb) na ausência de VA. (b, c) sinal voltamétrico dos metais nas concentrações de $0,26$ e $0,52$ mM de VA respectivamente. (Cd: $E_d = -0,70$ V, $t_d = 90$ s; Pb: $E_d = -0,50$ V, $t_d = 20$ s).

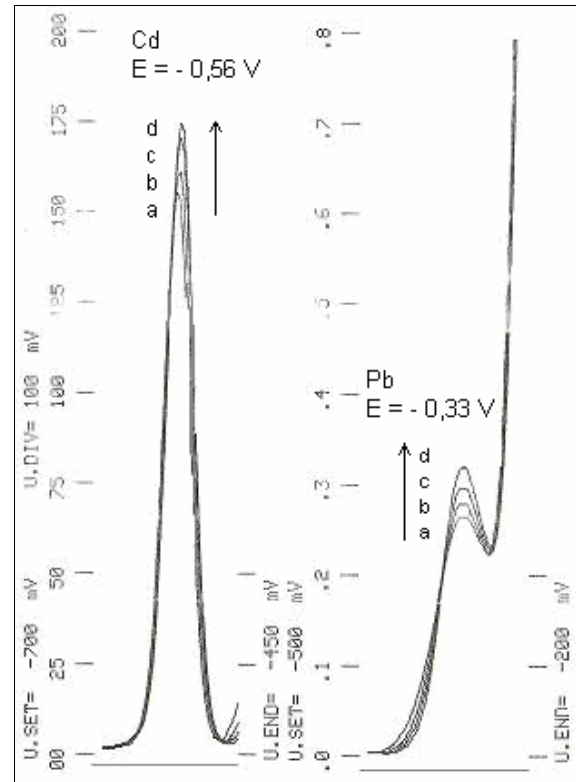


Figura 9 – Efeito das adições de VE sobre o sinal do Cd e do Pb. (a) sinal voltamétrico dos metais ($0,6 \mu\text{M}$ de Cd e $0,33 \mu\text{M}$ de Pb) na ausência de VE. (b, c, d) sinal voltamétrico dos metais nas concentrações de $0,3$; $0,6$ e $0,9$ mM de VE respectivamente. (Cd: $E_d = -0,70$ V, $t_d = 90$ s; Pb: $E_d = -0,50$ V, $t_d = 20$ s).

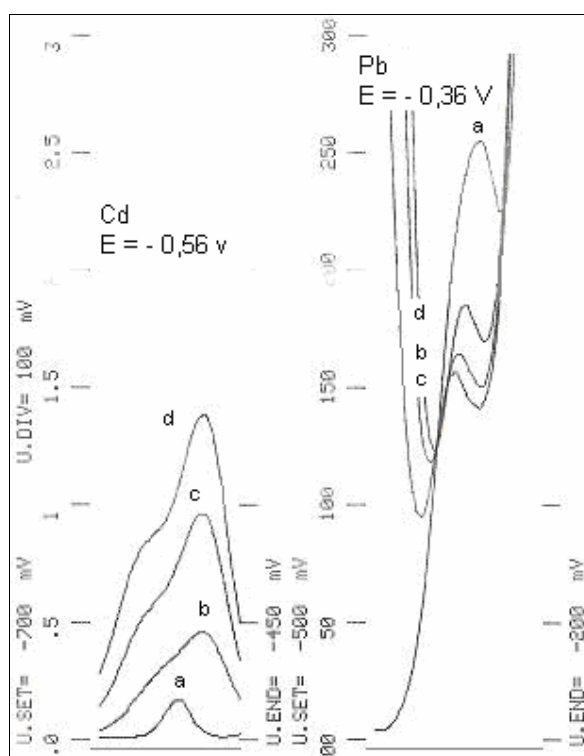


Figura 10 – Efeito das adições de VK sobre o sinal do Cd e do Pb (a) sinal voltamétrico dos metais ($0,6 \mu\text{M}$ de Cd e $0,33 \mu\text{M}$ de Pb) na ausência de VE. (b, c, d) sinal voltamétrico dos metais nas concentrações de 0,5; 1,0 e 1,5 mM de VK respectivamente. (Cd: $E_d = -0,70 \text{ V}$, $t_d = 90 \text{ s}$; Pb: $E_d = -0,50 \text{ V}$, $t_d = 20 \text{ s}$).

Analisando os resultados para as vitaminas separadamente, no voltamograma da figura 8 pode-se observar que houve redução do sinal do cádmio com as adições de VA em relação ao seu sinal na ausência da vitamina, sugerindo a ocorrência de uma interação metal-vitamina entre o cádmio e a VA. O sinal do chumbo aumentou consideravelmente com as adições de VA, apresentando um comportamento contrário ao esperado. Ao final das adições de VA observou-se um pequeno deslocamento anódico (sentido dos potenciais mais positivos) dos potenciais de pico, menor que 10 mV, tanto do cádmio quanto do chumbo em relação ao potencial de pico destes na ausência da vitamina.

A figura 9 ilustra o voltamograma obtido para o cádmio e para o chumbo com adições de VE, e observou-se que o efeito sobre o comportamento de ambos os sinais ocorreu de maneira contrária à esperada, ou seja, as adições de VE causaram

o aumento do sinal destes em relação ao seu sinal obtido na ausência da vitamina. O deslocamento do potencial de pico dos metais não foi maior que 5 mV com as adições de vitamina.

O voltamograma ilustrado na figura 10 mostra que o sinal do cádmio ficou comprometido pela eletroatividade da VK e o sinal do chumbo diminuiu com as duas primeiras adições de VK em relação ao seu sinal na ausência de vitamina e a terceira adição aumentou o sinal do chumbo em relação a 1° e a 2° adição. A VK deslocou o potencial de pico do chumbo primeiro para potenciais mais catódicos e depois para os anódicos. A primeira adição de VK deslocou o potencial de pico do chumbo (- 0,34 V na ausência de vitamina) em cerca de 30 mV para potenciais catódicos, a segunda e a terceira adições deslocaram para potenciais mais anódicos em relação a primeira, mais ainda mais catódicos do que o potencial na ausência de vitamina. O aumento dos sinais do chumbo com a VA e VE e do cádmio com a VE pode ser entendido pela formação de um complexo metal-vitamina que facilita a redução dos metais na superfície do HMDE, nas condições estudadas neste método.

Embora este método, com algumas dificuldades (evaporação do solvente, interferência do eletrólito, etc.) tenha possibilitado a determinação dos metais em meio orgânico (seção 4.2.1), este não foi capaz de mostrar se houve ou não a interação metal-vitamina, uma vez que o comportamento esperado, ou seja, diminuição do sinal e deslocamento do potencial de pico, não ocorreu em todos os casos e ainda que o efeito causado pelas adições das vitaminas em outros casos foi o aumento do sinal. Sendo assim houve a necessidade de desenvolver um outro método.

4.2.2 Método voltamétrico II

Para escolher o solvente e o eletrólito mais adequado, testou-se acetona, etanol e metanol, sob as mesmas condições, com os eletrólitos H₂SO₄ (concentrado), HClO₄ (solução aquosa 10%) e tampão acetato pH 4,6 e procedeu-se da mesma forma com meio aquoso.

O tampão acetato utilizado como eletrólito em meio aquoso foi preparado em água, e para o meio orgânico foi preparado em etanol (escolhido pela polaridade intermediária, entre a acetona e o metanol).

Quando se trabalhou em meio aquoso utilizou-se dois eletrodos de referência o Ag/AgCl/KCl e o Ag/AgCl/LiCl saturado em etanol /tampão acetato em etanol pH 4,6. Para o meio orgânico utilizou-se o eletrodo de referência com a seguinte configuração: Ag/AgCl/LiCl saturado em etanol /tampão acetato em etanol pH 4,6 (vide seção 3.6.3).

Os voltamogramas dos três meios orgânicos e do meio aquoso, como os diferentes eletrólitos, foram registrados e os valores de corrente obtidos para cada metal estão descritos na tabela 7.

Tabela 7 – Resultados obtidos nos diferentes meios e eletrólitos testados.

Solventes	Corrente (nA)					
	Tampão Acetato pH 4,6		HClO ₄		H ₂ SO ₄	
	Cd (II)	Pb (II)	Cd (II)	Pb (II)	Cd (II)	Pb (II)
Acetona	2,1	10,7	39,5	166,8	107,2	64,0
Etanol	44,3	33,8	134,3	10,0	89,5	2,0
Metanol	125,5	86,2	211,0	136,7	173,2	120,1
Água	174,5	94,8	322,0	158,0	316,0	192,0

(E_d = - 0,70 V, t_d = 90 s)

Devido à concentração molar do cádmio (0,89 μM) na célula voltamétrica ser praticamente o dobro da concentração molar de chumbo (0,48 μM) espera-se que os valores de corrente do cádmio sejam maiores do que os do chumbo.

O etanol apresentou valores de corrente muito baixas para o chumbo usando o HClO₄ e o H₂SO₄ (menos de 10 % dos valores apresentados em água), o que sugere que estes eletrólitos são impróprios para serem utilizados nestas condições. O tampão acetato mostrou-se adequado ao uso em etanol, apesar dos baixos valores de corrente registrados (cerca de um terço dos valores apresentados em água).

O metanol apresentou os valores de corrente mais próximos aos valores obtidos em água, com os três eletrólitos testados, o que deve ser atribuído a polaridade do metanol.

A constante dielétrica (ϵ) é uma indicação macroscópica da polaridade do solvente. As atrações e as repulsões eletrostáticas entre os íons são menores nos solventes que tem constantes dielétricas mais elevadas, e assim a água é o solvente mais eficiente para promover a ionização (SOLOMONS, 1996). Água ($\epsilon = 80,0$) \gg Metanol ($\epsilon = 33,0$) $>$ Etanol ($\epsilon = 24,0$) $>$ Acetona ($\epsilon = 21,0$)

O efeito da polaridade dos solventes nos sinais voltamétricos do cádmio e do chumbo pode ser melhor observado pelos voltamogramas ilustrados na figura 11.

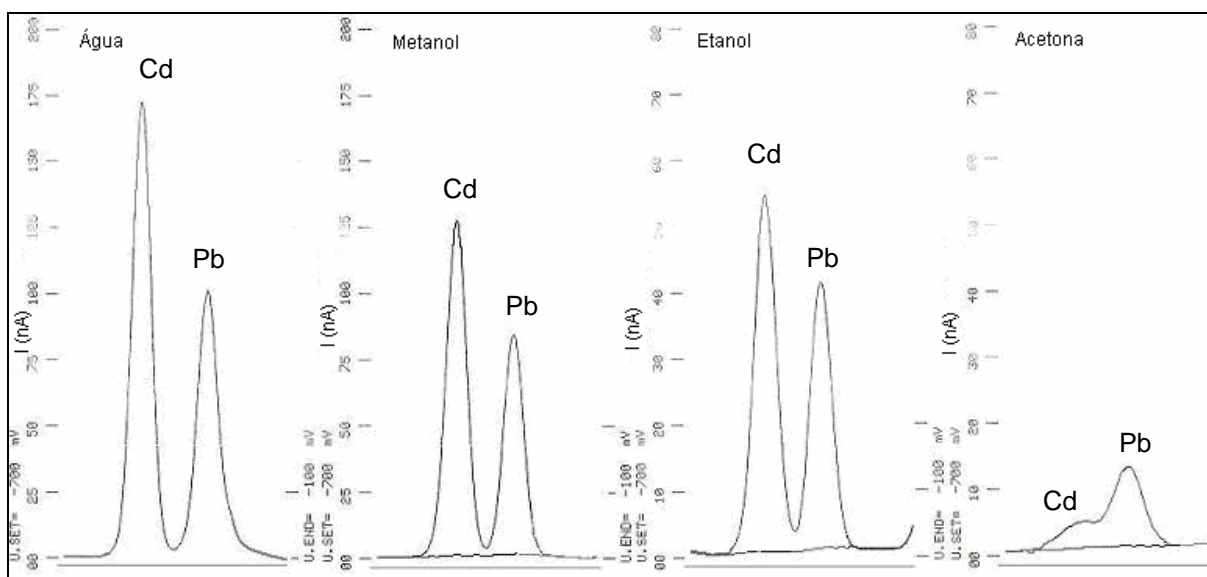


Figura 11 – Sinal voltamétrico do Cd e do Pb na concentração de $100 \mu\text{g L}^{-1}$, em meio aquoso e orgânico (metanol, etanol e acetona). Eletrólito tampão acetato pH 4,6. ($E_d = -0,70 \text{ V}$, $t_d = 90 \text{ s}$).

O uso do metanol como meio orgânico foi descartado para o desenvolvimento do estudo devido aos seus conhecidos efeitos tóxicos ao homem. Considerou-se também a solubilidade das vitaminas que é maior em etanol do que neste.

Assim a única opção seria utilizar o etanol como meio orgânico e o tampão acetato como eletrólito suporte para o desenvolvimento do estudo. Apesar dos baixos valores de corrente obtidos o tampão acetato cumpriu sua função. Segundo

Wang (1985) o eletrólito ideal deve dar picos bem separados e bem formados para todas as espécies analisadas, para elas poderem se determinadas simultaneamente e este efeito é apresentado em meio de etanol usando o tampão acetato com eletrólito suporte.

A voltametria em meio não aquoso em geral utiliza eletrólitos miscíveis em solventes orgânicos como, entre outros, sais orgânicos contendo como substituintes um ou mais grupos amônio quaternário (KITATSUJI, 1998, GALVEZ, 2000 e CASTRO, 2001).

Prosseguindo com o desenvolvimento do método, parâmetros experimentais descritos a seguir mostram a sua influência no processo de deposição do analito no eletrodo e foram investigados considerando sua influência sobre o sinal voltamétrico.

A sensibilidade na voltametria de redissolução está relacionada, entre outros fatores, ao potencial e ao tempo de pré-concentração da espécie no eletrodo (WANG, 1985).

Efeito do potencial de pré-concentração

O potencial de pré-concentração, E_d , é aplicado ao eletrodo de trabalho para causar o interesse do metal em se depositar na superfície do eletrodo. Este potencial é usualmente, vários décimos de volt (0,3 – 0,5 V) mais negativos que o potencial calculado pela equação de Nernst para determinado metal. Tal sobre-potencial é requerido devido à concentração do metal no mercúrio ser usualmente de 100 – 1000 vezes a concentração do íon em solução. Potenciais de pré-concentração de – 0,9 e – 1,1 V são empregados usualmente para a deposição do chumbo e do cádmio (WANG, 1985).

Assim testou-se uma pequena faixa de potenciais de pré-concentração, de – 1,00 a – 0,70 V, com intervalo de 0,10 V.

A figura 12 mostra a influência dos potenciais de pré-concentração testados no sinal dos metais em diferentes concentrações (50, 100, 200 e 250 $\mu\text{g L}^{-1}$).

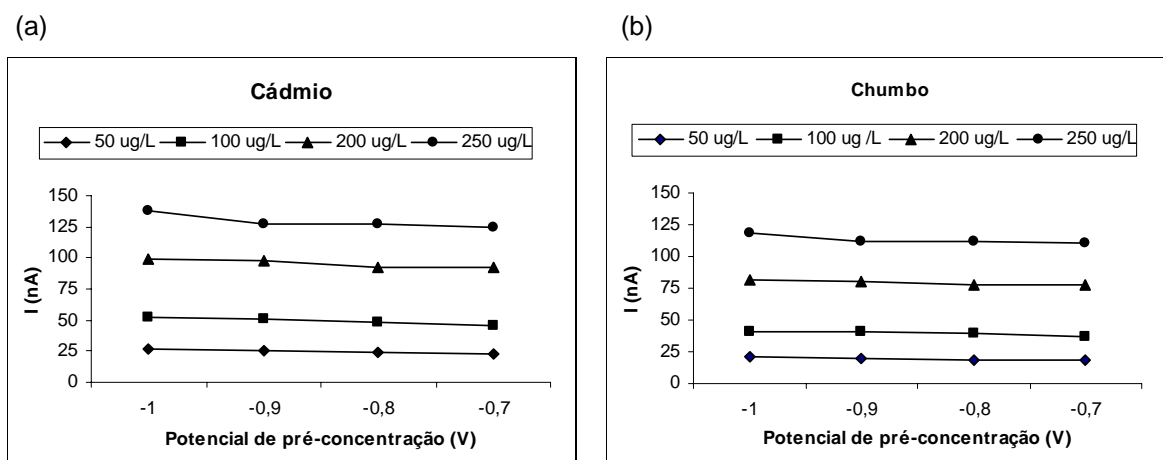


Figura 12 – Dependência do sinal (a) do Cd ($E_d = -0,50$ V) e (b) do Pb ($E_d = -0,35$ V) com o potencial de pré-concentração em diferentes concentrações de metal ($t_d = 90$ s).

Como pode se observar na figura 12, para ambos os metais, a corrente de pico em todas as concentrações de metal é menor em potenciais menos negativos e não se nota uma diferença muito grande de sensibilidade entre eles. Optou-se então por utilizar o potencial de pré-concentração em $-0,70$ V, uma vez que o potencial de pico do chumbo é em torno de $-0,36$ V.

Efeito do tempo de pré-concentração

Um tempo de pré-concentração, t_d , longo leva a uma grande quantidade de analito disponível no eletrodo durante a etapa de redissolução. Geralmente, para concentrações de 10^{-9} , 10^{-8} e 10^{-7} mol L^{-1} metal em solução, os tempos de pré-concentração de 12, 5 e 2 minutos, respectivamente, são suficientes quando se utiliza a ASV (WANG, 1985).

Diferentes tempos de pré-concentração (30, 60, 90, 120 e 150 s) foram escolhidos para avaliar a sua influência no sinal dos metais em várias concentrações (50, 100, 200 e 250 $\mu\text{g L}^{-1}$). A figura 13 mostra a dependência do sinal dos metais, utilizando a faixa de concentração de 50 a 250 $\mu\text{g L}^{-1}$, em função do tempo de pré-concentração.

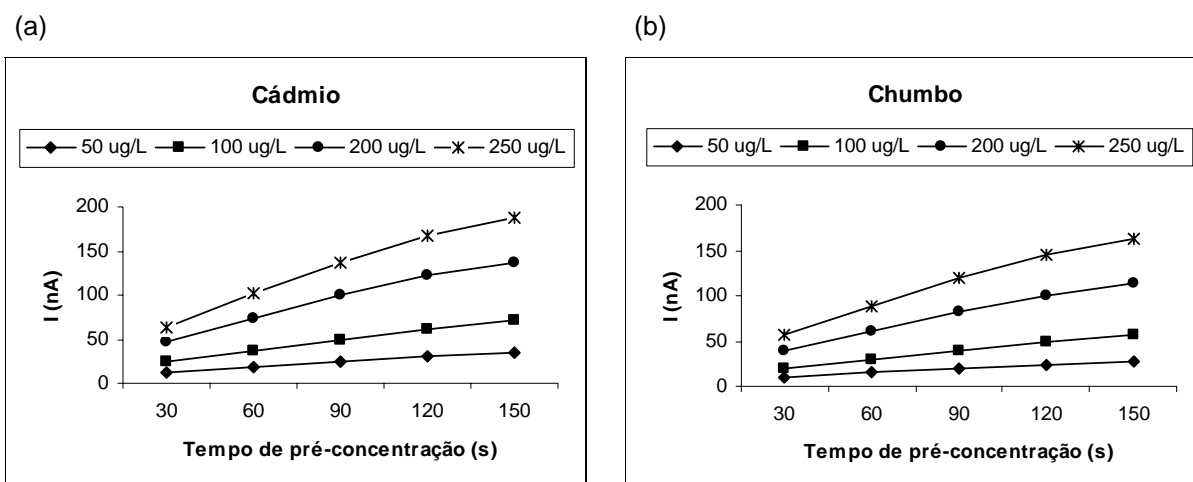


Figura 13 – Dependência do sinal do Cd (a) e do Pb (b) com o tempo de pré-concentração ($E_d = -0,80$ V) em diferentes concentrações de metal.

A corrente de pico, de ambos os metais, aumenta com o tempo de pré-concentração (t_d), e este efeito é maior para concentrações maiores. Em função de não haver necessidade de uma sensibilidade tão elevada para desenvolver o estudo escolheu-se, portanto, o tempo de pré-concentração de 90 s.

Linearidade do método

Para verificar a linearidade do método voltamétrico construiu-se uma curva analítica na faixa de concentração de 10 – 200 $\mu\text{g L}^{-1}$ para ambos os metais ($n = 5$). A figura 14 ilustra o voltamograma obtido para esta faixa de concentração. A equação da reta obtida através da curva analítica apresentou um coeficiente de correlação linear entre os pontos de 0,999 ($n= 5$) para o cádmio e o chumbo e está representada na figura 15.

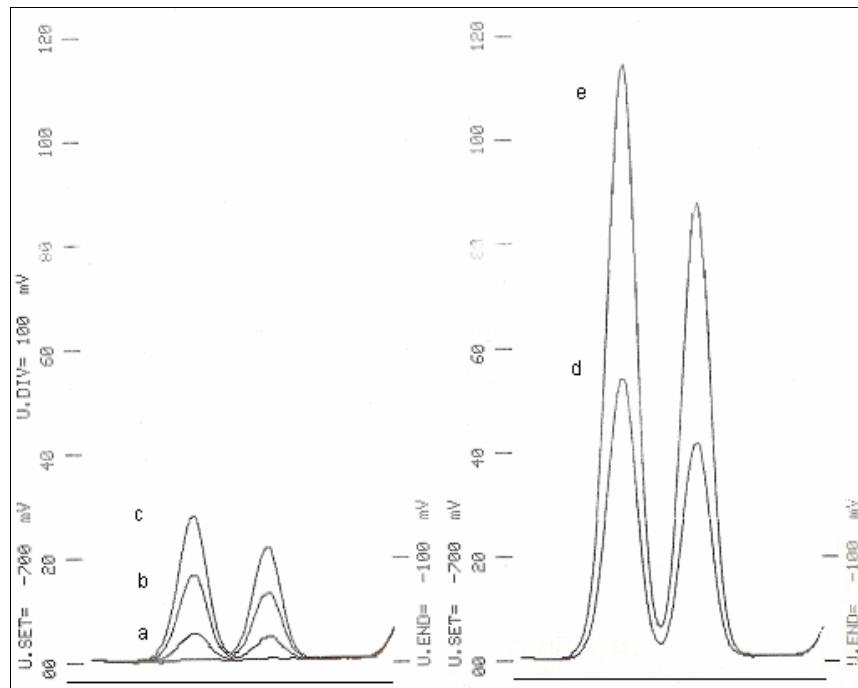


Figura 14 – Sinal voltamétrico do Cd e do Pb na faixa de concentração de 10 – 200 $\mu\text{g L}^{-1}$, para o método voltamétrico do tampão acetato ($E_d = -0,70\text{ V}$ e $t_d = 90\text{ s}$). Concentrações: (a) 10 $\mu\text{g L}^{-1}$ (b) 30 $\mu\text{g L}^{-1}$ (c) 50 $\mu\text{g L}^{-1}$ (d) 100 $\mu\text{g L}^{-1}$ (e) 200 $\mu\text{g L}^{-1}$.

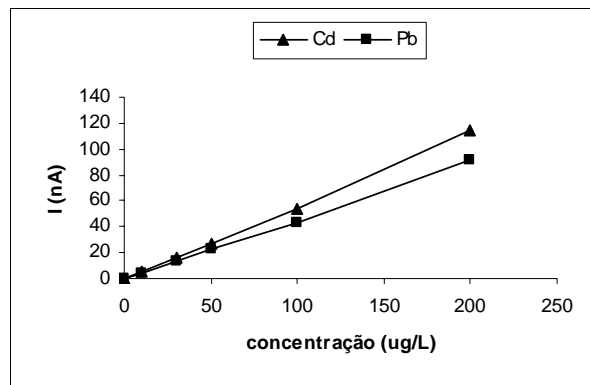


Figura 15 – Representação gráfica da equação da reta obtida pela curva analítica do Cd e Pb na faixa de concentração 10 – 200 $\mu\text{g L}^{-1}$.

Observou-se, através do voltamograma da figura 14, que não houve deslocamento dos potenciais de pico para nenhum dos metais com as adições crescentes destes ao longo da medida voltamétrica.

Escolheu-se para prosseguir o estudo de interação metal-vitamina a concentração de $100 \mu\text{g L}^{-1}$ de cada metal, o que corresponde a uma concentração de $0,89 \mu\text{M}$ de Cd e $0,48 \mu\text{M}$ de Pb na célula voltamétrica.

4.2.2.1 Estudo da interação metal-vitamina pelo método voltamétrico II

O método foi aplicado fazendo-se a leitura do sinal do cádmio e do chumbo, primeiramente na ausência da vitamina e depois com consecutivas adições de cada vitamina individualmente (em excesso molar em relação à concentração molar dos metais na célula), e observou-se nos voltamogramas obtidos o efeito dessas adições sobre o sinal voltamétrico dos metais.

As figuras 16, 17, 18 e 19 ilustram os voltamogramas obtidos para o cádmio e chumbo com VA, VD, VE e VK, respectivamente. Para todas as vitaminas trabalhou-se com adições de mesma concentração molar, $0,125 \text{ mM}$, e a concentração dos metais na célula voltamétrica foi de $0,89 \mu\text{M}$ de Cádmio e $0,48 \mu\text{M}$ de Chumbo.

Em uma primeira análise dos voltamogramas das figuras 16 a 19 é possível observar que a primeira adição de cada vitamina na mesma concentração molar (b), causou uma diminuição no sinal dos metais em proporções diferentes. A diminuição dos sinais foi maior com VA (figura 16) seguida da VE (figura 17), VD (figura 18) e por último VK (figura 19). Esta diminuição do sinal é o comportamento esperado no estudo da interação metal-ligante por voltametria.

Quando ocorreu o deslocamento dos potenciais de pico dos metais, este aconteceu no sentido anódico, contrário ao esperado. Em geral a formação de complexos resulta na mudança do potencial de pico para valores mais negativos (catódicos), pois os íons complexos resistem a redução mais eficientemente que íons simples (LINGANE, 1941).

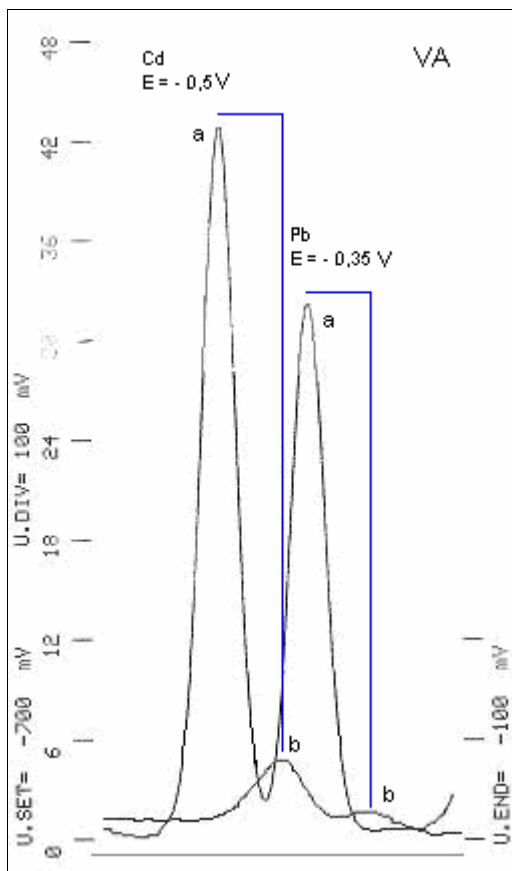


Figura 16 – Efeito da adição de VA sobre o sinal do Cd e Pb ($0,89 \mu\text{M}$ e $0,48 \mu\text{M}$ respectivamente). Sinal voltamétrico dos metais (a) na ausência de VA; (b) na presença de VA ($0,125 \text{ mM}$) ($E_d = -0,70 \text{ V}$, $t_d = 90 \text{ s}$).

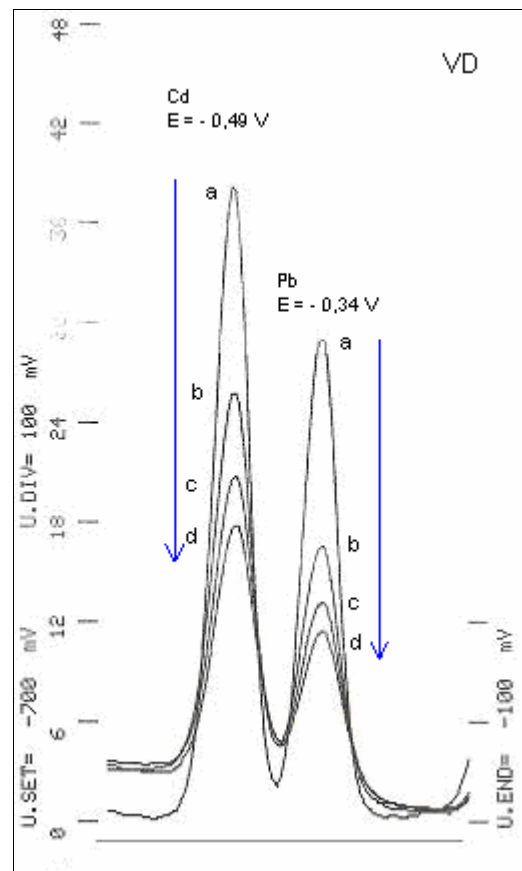


Figura 17 – Efeito das adições de VD sobre o sinal do Cd e Pb ($0,89 \mu\text{M}$ e $0,48 \mu\text{M}$ respectivamente). Sinal voltamétrico dos metais (a) na ausência de VD; (b, c, d) na presença de VD ($0,125$; $0,25$ e $0,375 \text{ mM}$ respectivamente) ($E_d = -0,70 \text{ V}$, $t_d = 90 \text{ s}$).

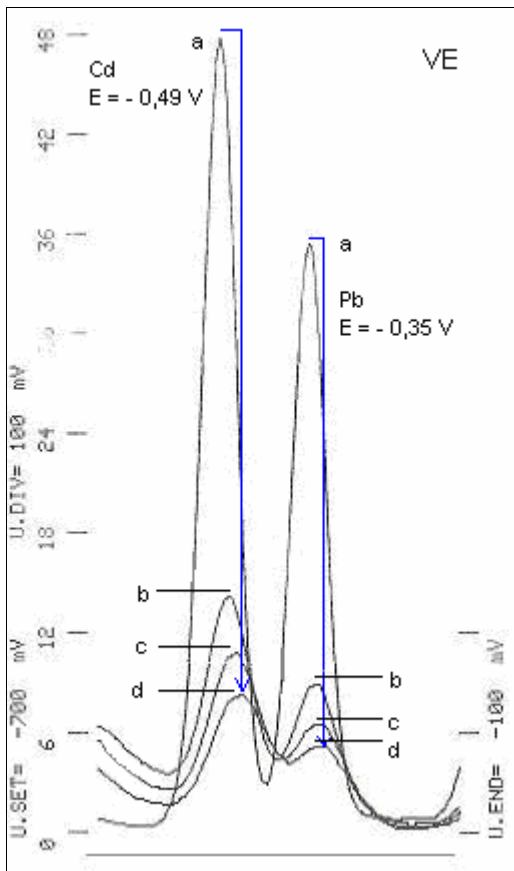


Figura 18 – Efeito das adições de VE sobre o sinal do Cd e Pb ($0,89 \mu\text{M}$ e $0,48 \mu\text{M}$ respectivamente). Sinal voltamétrico dos metais (a) na ausência de VE; (b, c, d) na presença de VE ($0,125$; $0,25$ e $0,375 \text{ mM}$ respectivamente) ($E_d = -0,70 \text{ V}$, $t_d = 90 \text{ s}$).

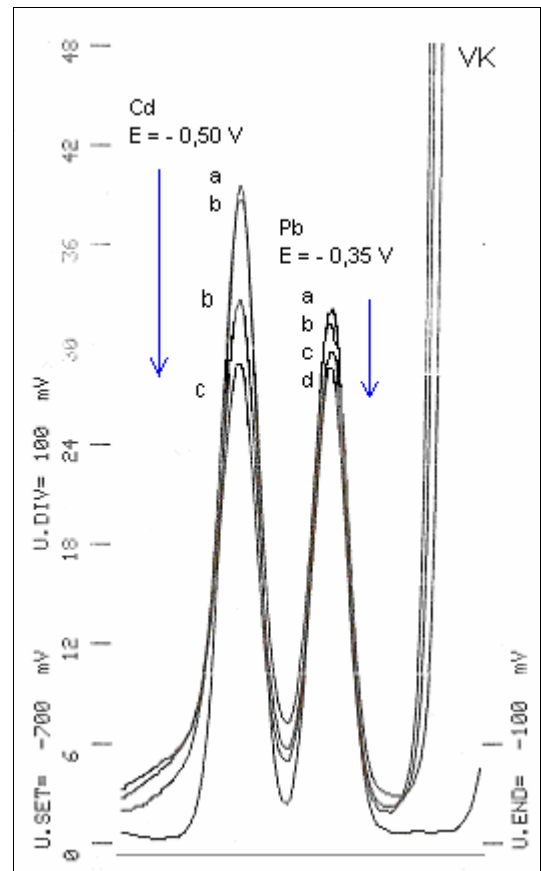


Figura 19 – Efeito das adições de VK sobre o sinal do Cd e Pb ($0,89 \mu\text{M}$ e $0,48 \mu\text{M}$ respectivamente). Sinal voltamétrico dos metais (a) na ausência de VK; (b, c, d) na presença de VK ($0,125$; $0,25$ e $0,375 \text{ mM}$ respectivamente) ($E_d = -0,70 \text{ V}$, $t_d = 90 \text{ s}$).

Na tabela 8 constam os valores de corrente do metal na ausência de vitamina (a) e com as adições consecutivas de vitamina (b, c, d), a percentagem da diminuição dos sinais e o deslocamento total dos potenciais de pico dos metais.

Tabela 8 – Resultados extraídos dos voltamogramas 16 a 19.

	Corrente (nA)				Potencial de pico (mV)		
	A	b	c	d	Diminuição do sinal ($\neq a - b$)	($\neq a - d$)	ΔE anódico
Cd							
VA	40,5	3,2	-	-	92 %	-	100
VD	36,0	21,7	17,0	14,2	40 %	60 %	5
VE	44,6	11,0	8,0	6,4	75 %	86 %	38
VK	37,2	31,6	26,3	23,6	15 %	36,5 %	-
Pb							
VA	33,0	0,6	-	-	98 %	-	84
VD	29,4	14,3	10,3	8,7	51 %	70 %	-
VE	34,6	6,5	4,3	2,6	81 %	92 %	43
VK	31,1	27,6	26,2	25,7	11 %	17,5 %	-

a ausência de vitamina

b 0,125 mM de vitamina

c 0,25 mM de vitamina

d 0,375 mM de vitamina

O voltamograma da figura 16 mostra que a diminuição que as adições de VA causaram tanto no sinal do cádmio quanto do chumbo e é maior do que a diminuição do sinal causada pelas demais vitaminas. Comparando o efeito que a VA causa sobre o sinal do chumbo, esta foi maior (redução de 98 % do sinal do chumbo) do que com o cádmio (92 %), embora o efeito no deslocamento dos potenciais de pico sejam menores para o chumbo (84 mV) do que com o cádmio (100 mV).

O efeito das adições de VD sobre o sinal dos metais pode ser observado no voltamograma da figura 17. A VD diminuiu o sinal de ambos os metais porém quase não deslocou os potenciais de pico destes. A diminuição do sinal do chumbo com as adições de VD foi maior (51 %) do que a diminuição do sinal do cádmio (40 %). Em um teste realizado com adições mais concentradas de VD (0,5 mM), ela foi capaz de

diminuir ainda mais os sinais voltamétricos dos metais e de deslocar o potencial de pico destes.

Pode-se observar no voltamograma da figura 18 que a VE foi a segunda vitamina que mais diminuiu os sinais voltamétricos dos metais. Esta interagiu mais fortemente com chumbo (92 %) ao final das adições do que com o cádmio (86%). O deslocamento dos potenciais de pico dos metais também ocorreu no sentido anódico e este foi maior para o chumbo (43 mV) do que para o cádmio (38 mV).

Entre as vitaminas a VK mostrou exercer menor efeito sobre o sinal dos metais. No voltamograma da figura 19 pode-se observar uma pequena diminuição de ambos sinais voltamétricos, sendo a interação com o cádmio mais forte (36,5 %) do que com o chumbo (17,5 %). Não houve deslocamento dos potenciais de pico dos metais com as adições de VK. Pode-se observar também o aparecimento de um sinal após o sinal do chumbo e este é provavelmente devido à eletroatividade da VK, que está associada à presença do oxigênio de dois grupamentos carbonila presentes em sua molécula (quinona).

Em um teste realizado com adições mais concentradas da VK (1,9 mM), ocorreu uma diminuição maior dos sinais voltamétricos dos metais e o deslocamento dos potenciais de pico dos metais não foi muito grande e ocorreu primeiro para o sentido anódico e depois para o sentido catódico.

O deslocamento dos potenciais para valores mais positivos pode ser assumido por um ligante de efeito catalítico e está relacionado com a habilidade do ligante agir como uma ponte na dupla camada elétrica facilitando a transferência dos elétrons na reação no eletrodo (MARK, 1962, p. 189).

4.2.3 Efeito do tempo de reação na interação entre os metais e as vitaminas

Da mesma forma (mesmas concentrações de vitamina e dos metais) como para o estudo da interação dos metais com as vitaminas pelo Método II, avaliou-se o efeito do tempo de reação entre os metais e as vitaminas. Logo após a adição da vitamina na célula testou-se um intervalo de tempo (tempo de reação) antes a etapa de pré-concentração. Os intervalos de tempo estudados foram de 0, 60, 180, 300 e 600 s. Confeccionou-se um gráfico com a diferença entre a corrente obtida para o

metal na ausência da vitamina e a corrente obtida para o metal com uma adição de vitamina em relação ao tempo de reação.

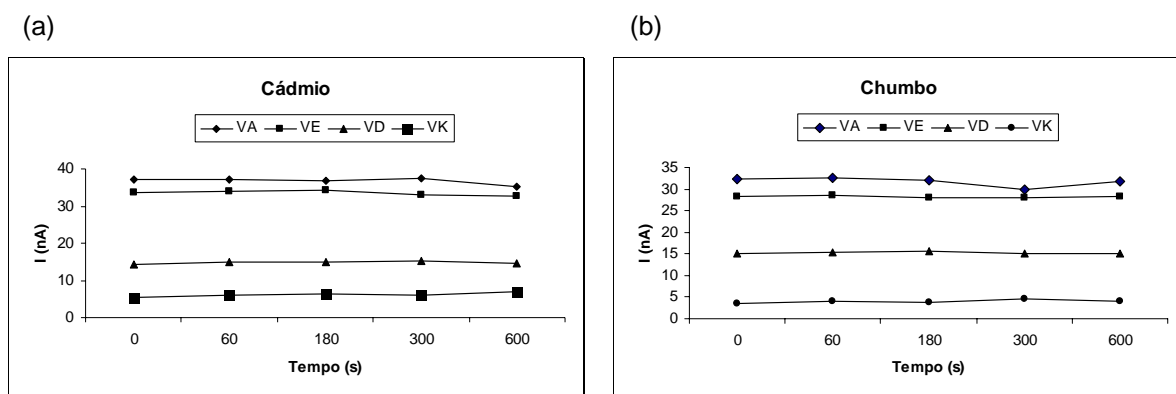


Figura 20 – Efeito do tempo sobre a interação metal-vitamina, (a) Cd; (b) Pb. ($E_d = -0,70$ V, $t_d = 90$ s).

Não se observou, analisando os gráficos da figura 20 (a) e 20 (b), que a reação dependa de tempo para ocorrer, pois as diferenças apresentadas não podem ser consideradas influência do tempo. Isto foi verificado pela realização de um branco, ou seja, com adições de etanol ao invés de vitamina sobre o metal, o que apresentou uma pequena diminuição do sinal. Por tanto as variações apresentadas podem ser esperadas.

4.3 Voltametria de corrente alternada em meio orgânico – Tensametria

Deve-se levar em consideração que a determinação direta de metais pode ser complicada pela presença de compostos orgânicos, particularmente as substâncias que apresentam a atração pela superfície do eletrodo de mercúrio, pois estas têm a tendência de se adsorver no eletrodo de mercúrio, inibindo a deposição do metal ou o processo de redissolução. Como resultado, tanto a corrente de pico como o potencial de pico podem ser afetados (ACEBAL, 1983 apud WANG, 1985 p. 104).

Assim para verificar a ocorrência ou não da adsorção das vitaminas lipossolúveis estudadas no eletrodo de mercúrio, foram realizadas medidas tensamétricas.

A faixa de potências utilizada foi de $-0,70$ a $0,0$ V com o ângulo de fase em 90° , (os demais parâmetros estão descritos no apêndice A). As medidas foram realizadas no mesmo meio (etanol), eletrólito suporte (tampão acetato pH 4,6) e concentração das adições de vitamina (cada adição de $0,125$ mM) usadas no método voltamétrico II. A faixa de potências utilizada abrange a faixa de potenciais do estudo da interação entre as vitaminas e os metais por voltametria de redissolução.

Os voltamogramas AC ilustrados nas figuras 21 a 24 mostram o comportamento das vitaminas na faixa de potenciais onde o cádmio ($\cong -0,5$ V) e o chumbo ($\cong -0,35$ V) são eletroativos nas condições estudadas (vide figura 14).

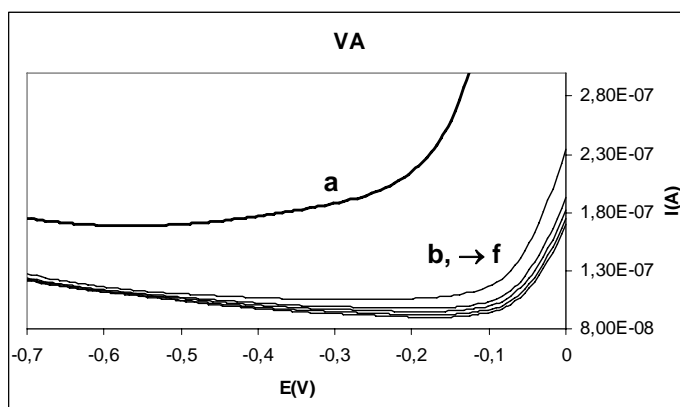


Figura 21 – Voltamogramas AC em etanol (a) tampão acetato pH 4,6; concentrações crescentes de VA: (b) $0,125$ mM, (c) $0,25$ mM, (d) $0,375$ mM, (e) $0,5$ mM e (f) $0,625$ mM. ($E_d = -0,70$ V, $t_d = 90$ s, $f = 60$ Hz, $\varphi = 90^\circ$).

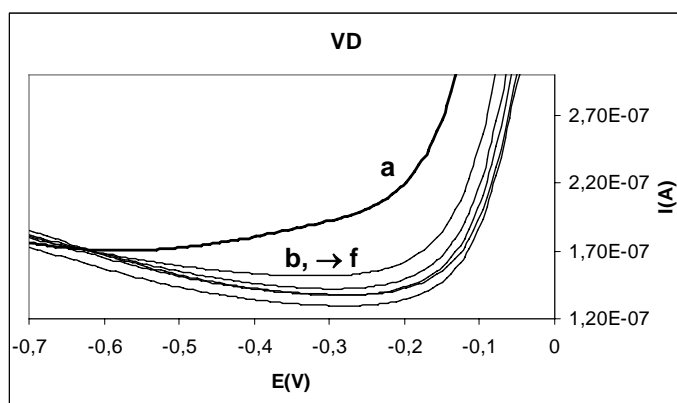


Figura 22 – Voltamogramas AC em etanol (a) tampão acetato pH 4,6; concentrações crescentes de VD: (b) 0,125 mM, (c) 0,25 mM, (d) 0,375mM, (e) 0,5 mM e (f) 0,625 mM. ($E_d = -0,70$ V, $t_d = 90$ s, $f = 60$ Hz, $\varphi = 90^\circ$).

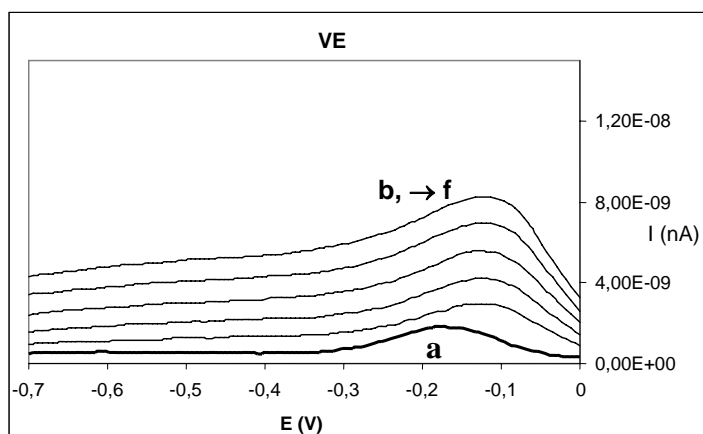


Figura 23 – Voltamogramas AC em etanol (a) tampão acetato pH 4,6; concentrações crescentes de VE: (b) 0,125 mM, (c) 0,25 mM, (d) 0,375mM, (e) 0,5 mM e (f) 0,625 mM. ($E_d = -0,70$ V, $t_d = 90$ s, $f = 60$ Hz, $\varphi = 90^\circ$).

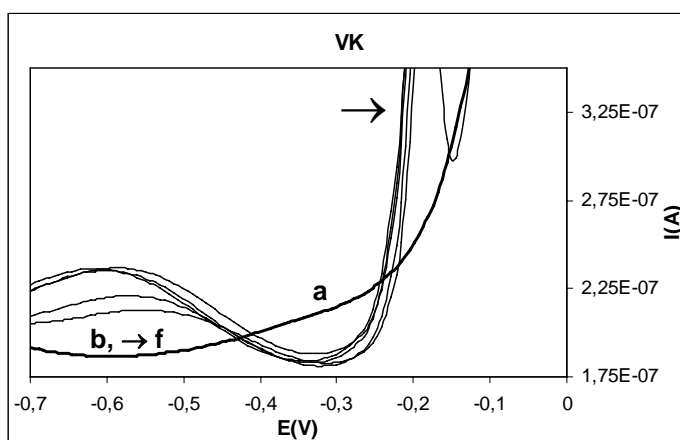


Figura 24 – Voltamogramas AC em etanol (a) tampão acetato pH 4,6; concentrações crescentes de VK: (b) 0,125 mM, (c) 0,25 mM, (d) 0,375mM, (e) 0,5 mM e (f) 0,625 mM. ($E_d = - 0,70$ V, $t_d = 90$ s, $f = 60$ Hz, $\varphi = 90^\circ$).

Os voltamogramas AC das figuras 21 e 22 mostram que a VA e a VD respectivamente, adsorvem-se na superfície do eletrodo de mercúrio. Este efeito foi observado em toda a faixa de potenciais utilizada pela diminuição da corrente capacitiva com o aumento da concentração das vitaminas, assim a redução do cádmio e do chumbo na presença destas vitaminas fica comprometida.

O voltamograma AC da figura 23 mostrou que a VE não se adsorve na superfície do eletrodo na faixa de potenciais trabalhada, pois as adições de VE não causaram diminuição da corrente capacitiva, sendo assim esta não interfere na redução dos metais no eletrodo,

Na figura 24 pode-se observar que a adsorção da VK no eletrodo ocorre somente após o potencial de redução do cádmio ($- 0,50$ V) não interferindo na reação deste com eletrodo. A adsorção começa a ocorrer a partir de $- 0,43$ V estendendo-se até $- 0,25$, e assim a adsorção da VK interfere na redissolução do chumbo ($- 0,35$ V) impedindo que este se reduza no eletrodo. A partir de $- 0,25$ V pode-se observar a formação de um pico indicado na figura 24 por uma seta, este pico indica o processo dessorção da vitamina do eletrodo.

As medidas tensamétricas foram capazes de mostrar que a adsorção da VA e VD ocorre em toda a faixa de potenciais de $- 0,70$ a $0,0$ V, portanto a presença destas dificulta a redução do cádmio e chumbo no eletrodo. A faixa de potenciais

onde ocorreu a adsorção da VK é próxima ao potencial de redução do chumbo, sendo assim a presença de VK interfere somente no sinal do chumbo, sem impedir a redução do cádmio. A presença da VE não interfere na redução dos metais, pois não se adsorve no eletrodo na faixa de potenciais trabalhada.

4.4 Interpretação dos resultados

No presente trabalho a diminuição dos sinais voltamétricos dos metais observada com as adições de vitamina nos voltamogramas realizados quando se aplicou o Método II (figuras 16 – 19) pode ser explicada, para cada vitamina, por dois efeitos distintos:

- a) Adsorção das vitaminas no HMDE.
- b) Formação de complexos entre os metais e as vitaminas.

A presença das vitaminas no meio poderia causar um aumento da linha base (corrente residual) devido à adsorção delas na superfície do eletrodo, o que não foi observado, assim como não foram observados outros sinais interferentes. Porém esta informação não era suficiente para se descartar a hipótese de adsorção das vitaminas no eletrodo. Por isso foram realizadas medidas tensamétricas que mostraram quais as vitaminas que se adsorvem no eletrodo durante a varredura dos potenciais.

Os resultados das medidas tensamétricas (figuras 21 - 24) mostraram a ocorrência de adsorção da VA, VD e da VK (somente na faixa de potenciais de redução do chumbo) e que a VE não se adsorve no eletrodo na faixa de potenciais trabalhada.

Assim diminuição dos sinais voltamétricos do cádmio e do chumbo, com as adições de vitamina apresentada pelo método voltamétrico II foi explicada pelo fenômeno de adsorção para VA e VD. A diminuição do sinal do chumbo com as adições de VK é dada pela adsorção da VK, porém para a diminuição do sinal do cádmio o efeito pode ser explicado pela interação assim como para a VE com ambos os metais.

Comparando o efeito das adições de VE sobre o sinal do cádmio e do chumbo, pode-se observar que esta diminuição é maior para o chumbo do que para o cádmio (tabela 8), logo pode-se inferir que a VE forma compostos mais estáveis

com o chumbo do que com o cádmio. A interação do cádmio e do chumbo com a VE pode ser compreendida pela associação destes metais com o oxigênio do grupamento éster presente na molécula de VE e a interação do cádmio com a VK é compreendida pela associação do metal pelo oxigênio da quinona (figura 5).

5 CONCLUSÕES

Os métodos voltamétricos I e II foram analisados segundo o comportamento dos sinais dos metais em meio orgânico. Ambos os métodos apresentaram boa linearidade nas faixas de concentração estudadas ($r = 0,999$). Entretanto para o estudo da interação metal-vitamina o Método I não foi adequado, apresentando comportamento contrário ao observado em estudos de complexação por voltametria. Tal comportamento foi observado quando o Método II foi aplicado porque a redução dos sinais voltamétricos do cádmio e do chumbo ocorreu para todas as vitaminas, com intensidades diferentes, e em alguns casos houve o deslocamento anódico do potencial de pico.

As medidas realizadas por voltametria de corrente alternada, nas mesmas condições do Método II, mostraram que o efeito causado nos sinais do cádmio e do chumbo observado na presença da VA e VD é devido à adsorção destas na superfície do eletrodo e o mesmo aconteceu com a VK somente para o chumbo.

Assim a voltametria de redissolução anódica foi capaz de fornecer voltamogramas úteis para o estudo da interação entre os metais cádmio e chumbo com a VE e entre o cádmio com a VK. Através dos resultados obtidos dos voltamogramas pode-se dizer ainda que a interação, entre o chumbo e a VE é mais forte do que com o cádmio.

Sugestões para trabalhos futuros:

- Investigar a presença de metais contaminantes nas vitaminas lipossolúveis.
- Estudar a adsorção das vitaminas lipossolúveis em uma ampla faixa de potencias (potencias positivos e negativos) e estudar o efeito que ela pode causar em um estuda da interação destas com outros metais, tóxicos e bioessenciais.
- Estudar a interação entre o cádmio e o chumbo com a vitamina E através de outros métodos, como o potenciométrico, e também estimar as suas constantes de estabilidade.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABATE, G.; MASINI, J.C. **Organic. Geochem.**, v. 33, p. 1171-1172, 2002.

ACEBAL, S.A.; REBELLO, A. L. **Anal. Chim. Acta**, v. 148, p. 71, 1983.

AGUILAR, M. et al. **Tablas de constantes de equilibrio**, Centre Publicacions D' Abast, Barcelona, p. 53, 1996.

BAREK, J. et al. Polarography and voltammetry at mercury electrodes, **Crit Rev. Anal. Chem.**, v. 31, 291, 2001.

BARRY LEE, W. et al. Ocular complications of hipovitaminosis A after bariatric surgery. **Ophthalmology**, v.112 (6), p.1031, 2005.

BERTNI, I., GRAY, H.B., LIPPARD, S. J., VALENTINE, J. S. **Bioinorganic Chemistry**, University Science Books, Califórnia, 1994.

BERTHON, G. Aluminium speciation in relation to aluminium bioavailability, metabolism and toxicity, **Coord. Chem. Ver.**, v. 228 (2), p. 319, 2002.

BRANICA, M.; PIZETA, I.; BRANICA-JURKOVIC, G.; ZELIC, M. **Mar. Chem.**, v. 28, p. 227, 1989.

BRANICA, M.; NOVAK, D.M.; BUBIC, S. **Croat Chem. Acta**, v. 49, p. 539, 1977.

BRANICA, G.; LOVRIC, M. **Electrochim. Acta**, v. 42 (8), p. 1247, 1997.

BROWN, S.D.; KOWALSKI, B.R. **Anal. Chem.**, v. 51, p. 2133, 1979.

BUBIC, S.; BRANICA, M. **Thalassia Jugos.**, v. 9, p. 47, 1973.

BUCHMAN, A L., NEELY, M., BRUCE GROSSIE JR, V., TRUONG, L., LYKISSA, E. and AHN, C. Organ Heavy-Metal accumulation during Parenteral Nutrition is associated with pathologic abnormalities in rats, **Nutrition**, v. 17, p. 600, 2001.

CASTRO, R. et al. **J. of Chromatography A**, v. 914, p. 111, 2001.

CHATZIMICHALAKIS, P.F. et al. Development of a validated liquid chromatography method for the simultaneous determination of eight fat-soluble vitamins in biological fluids after solid-phase extraction. **J. of chromatography B**, v. 805, p. 289, 2004.

COWAN, J. A. **Inorganic Biochemistry: An Introduction**, New York: VCH Editora, p. 7, 1993.

COUTINHO, F.M.B, GOMES, A.S., TEIXEIRA, V.G. Resinas poliméricas para separação e pré-concentração de chumbo, **Quim. Nova**, v. 27(2), p. 277, 2004.

DANELISEN I. et al. Maintenance of myocardial levels of vitamin A in heart failure due to adriamycin. **J. Mol. Cell. Cardiol.**, v. 34, p. 789, 2002.

DELGADO-ZAMARRENO, M.M. et al. **Anal. Chim. Acta**, v. 315, p. 205, 1995.

DIAZ, T.G. et al. Voltammetric behavior and determination of tocopherols with partial least squares calibration: analysis in vegetable oil samples. **Anal. Chim. Acta**, v. 511, p. 231, 2004.

DUFFY, N.W.; BOND, A.M. **Electrochem. Com.**, v. 8, p. 892, 2006.

FILELLA, M.; TOWN, R.M. **J. of Electroanal. Chem.**, v. 485, p. 21, 2000.

GARCIA, T.A.; CORREDOR, L. Biochemical changes in the kidneys after perinatal intoxication with lead and/or cadmium and their antagonistic effects when coadministered. **Ecotox. Environ. Safe**, v. 57, p. 184, 2004.

GALVEZ, R. et al. **Fresen. J. Anal. Chem.**, v. 367, p. 454, 2000.

GADAIS, J.F.; KHAN, M.A.; BOUET, G. **Transition Met. Chem.**, v. 19, p. 651, (1994)

GHONEIM, N. M. et al. Simultaneous determination of Cd, Pb, Cu, Sb, Bi, Se, Zn, Mn, Ni, Co and Fe in water samples by differential pulse stripping voltammetry at a hanging mercury drop electrode. **Fresen. J. Anal. Chem.**, v. 367, p. 378, 2000.

GOODMAN, S.I.; MACE, J.W.; POLLACK, S. **The Lancet**, v. 1, p. 234, (1971).

GUILLAND, J.C.; LEQUEU, B. **As vitaminas: do nutriente ao medicamento**. São Paulo: Santos, 2. ed. 1995.

HARRIS, D.C. **Química Analítica Quantitativa**, Rio de Janeiro: LTC Editora, 2001.

HATI, S.; BOLES, A.R.; ZABORSKE, J.; BERGAMAN, B.; POSTO, A.L. **Chemistry & Biology**, v. 10, p. 1129, 2003.

JAISWAL, P.V. et al. Voltammetric behavior of α -tocopherols and its determination using surfactant + ethanol + water and surfactant + acetonitrile + water mixed solvent system. **Anal. Chim. Acta**, v. 441, p. 201, 2001.

KITATSUJI, Y. et al. **Analytical Sciences**, v. 14, p. 67, 1998.

KLEJDUS, B. et al. **Anal. Chim. Acta**, v. 520, p. 65, 2004.

KOROTKOVA, E.I. et al. **Talanta**, v. 63, p. 729, 2004.

KUBIAC, W.W. et al. **Talanta**, v. 53, p.1211, 2001.

LINGANE, J.J. Interpretation of the polarographic waves of complex metal ions. **Chem. Rer.**, v. 29, p. 1, 1941.

LUQUE-GARCÍA, J.L. et al. Extraction of fat-soluble vitamins, Espanha. **J. of Chromatography A**, v. 935, p. 3, 2001.

MARTELL, A. E.; HANCOCK, R.D.; SMITH, R.M. **Coord. Chem. Ver.**, v. 149, p. 311, 1996.

MARTI, F.B.; JIMENO, S.A.; CONDE F.L.; MENDEZ, J.H. **Química Analítica Cualitativa**, Espanha: Paraninfo, 1994, p. 23.

MARTELL, A.; MOTEKAITIS, R.J. **Determination and Use of Stability Constants**, New York: Wiley-VCH, 1992.

MARQUES, A.L.B.; CHIERICE, G.O. **J. Braz. Chem. Soc.**, v. 9(6), p. 531, 1998.

MARK, C.N.; Reilley, A. **J. Electroanal. Chem.**, v. 4, p. 189, 1962.

MARTINES, J. Randomised trial to assess benefits and safety of vitamin A supplementation linked to immunisation in early infancy. Division of child health and development, WHO, 1211 Geneva 27, Switzerland. **The Lancet**, v. 352, October, p. 1257, 1998.

MERCÊ, A.L.R. et al. Potentiometric study of vitamin D3 complexes with cobalt (II), nickel (II) and copper (II) in water-ethanol medium, **J. of Inor. Biochem.**, v. 71 p. 87, (1998).

MELO, M. **Cádmio**. SAE Lab. Médico, São Paulo, setembro, 2002.

MERCÊ, A.L.R. et al. Potentiometric study of vitamin D3 complexes with manganese(II), iron(II), iron(III) and zinc(II) in water-ethanol medium, **J. of Inor. Biochem.**, v. 73, p. 167-172, (1999).

MITCHELL, B.L. et al. Siplementation with vitamins or minerals and immune function: can the elderly benefit? **Nut. Research**, v. 23, p. 1117, 2003.

MILLER, R. K. et al. Periconceptional vitamin A use: how much is teratogenic? **Reproductive Toxicology**, v. 12 (1), p. 75, 1998.

MU LEE, B.; PARK, K-K. **Mutation Research**, v. 523-524, p. 268, 2003

NELSON D.L.; COX, M.M. **Principles of Biochemistry**, Worth, 2000.

NURNBERG, H.W., VALENTA, P. **Trace metals in sea water**, New York: Plenum Press, 1983.

OPOTOWSKY, A.R. et al. Serum vitamin A concentration and the risk of hip fracture among Women 50 to 74 years old in the US: a prospective analysis of the NHANES I follow-up study. **The Am. J. of Med.**, v. 117, p.169, 2004.

ÖHMAN, L-O. **Chemical Geology**, v. 151, p. 41, 1998.

OMANOVIC, D.; BRANICA, M. **J. of Electroanal. Chem.**, v. 543 p. 83, 2003.

PAVANETTO, F., GENTA, I., CONTI, B., et al; Aluminum, cadmium and lead in large volume parenterals-contamination levels and sources. **Int. J. Pharm.**, v. 54 (2), p. 143, 1989.

PATRIARCA, M. et al. Levels of cadmium and lead in blood: an application of validated methods in a group of patients with endocrine/metabolic disorders from the Rome area. **Microchem. J.**, v. 79, p. 349, 2005.

PALACE, V.P. et al. Antioxidant potential of vitamin A and carotenoids and their relevance to heart disease. **Free Rad. Biol. & Med.**, v. 26, p. 746, 1999

PEARSON, R. G. Hard and soft acids and bases. part I. **J. Chem.**, ed. 45 (9), p. 581-587, 1968.

QITAO, L.; YI, L.; FENG, Z. **Polyhedron**, v. 8, p. 1953, (1989).

RINGBOM, A. **Complexation in Analytical Chemistry**, London: Interscience Publishers, 1963, p. 7.

ROSSOTTI, H. S. Design and publication of work on stability-constants. **Talanta**, v. 21 (8), p. 809, 1974.

ROSSOTTI, F.J.C.; ROSSOTTI, H. **The Determination of Stability Constants**, New York: McGraw-Hill Book Company, 1961, p. 17.

- ROSE, J. **Advanced Physico-Chemical Experiments**, London: Sir Isaac Pitman and Son Ltda, 1964, p. 76.
- SANDER, S.; HENZE, G. Alternating current investigations at the mercury drop electrode on the adsorption potential of metal complexes. **Electroanalysis**, v. 8 (3), p. 253, 1995
- SANTOS dos, M.M.C.; VILHENA, M.F.; GONÇALVES, M.L.S. **Anal. Chim. Acta**, v. 441, p.191, 2001.
- SADAO, M. **Revista de Toxicologia**, (Janeiro – Março) 2002.
- SHUMAN, M.S.; CROMER, J.L. **Anal. Chem.**, v. 51, p. 1546, 1979.
- SKOOG, D.A., LEARY, J.J. **Principles of Instrumental analysis**, 4^a ed., Saunders College Publishing, 1992.
- SOLOMONS, T.W.G. **Química Orgânica**, v. 1, Rio de Janeiro: LTC, 1996, p. 83, 263-264.02.
- STEPHEN, J. L., BERG, J. M. **Principles of Bioinorganic Chemistry**, University Science Books, California, 1994.
- TOWN, R.M.; FILELLA, M. **J. of Electroanal. Chem.**, v. 488, p. 1, 2000.
- TURNER, C. et al. **J. of Chromatography A**, v. 936, p. 216-217, 2001.
- VAN DEN BERG, C.M.G. **In Chemical Oceanography**, London: Academic Press, p. 198, 1988.
- VAN DEN HOOP, M.A.G.T.; van LEEUWEN, H.P. **Anal. Chim. Acta**, v. 273, p. 275, 1993.
- VAN LEEUWEN, H.P.; CLEVEN, R.; BUFFLE, J. **Pure Appl. Chem.**, v. 61, p. 255, 1989.

VEGA, M.; PARDO, R.; HERGUEDAS, M.M.; BARRADO, E.; CASTRILLEJO, Y. **Anal. Chim. Acta**, v. 310, p.131, 1995.

VOGEL, A. **Análise Inorgânica Quantitativa**, Guanabara Dois S. A. Editora, p. 195, 1981.

VOGEL, A. **Análise química quantitativa**, 5ª ed, Rio de Janeiro: LTC, 1992.

WAEEL, K.; ADRIAENS, A.; TEMMERMAN, E. **Talanta**, v. 68, p. 1247, 2006.

WANG, J. **Stripping Analysis: Principles, Instrumentation and Applications**. VCH, 1985

YOKEL, R.A. **Coord. Chem. Ver.**, v. 228, p.97, 2002.

ZELIC, M.; BRANICA, M. **Electroanalysis**, v. 4, p. 701, 1992.

7 APÊNDICE

APÊNDICE A – Parâmetros experimentais das medidas voltamétricas

– Método I:

Volume na célula voltamétrica: 14,5 mL (0,5 mL de eletrólito, 2 mL de água e 12 mL de acetona)

Eletrodo de trabalho: HMDE

Tamanho da gota: 0,6 mm²

Modo de medida: pulso diferencial

Amplitude de pulso: 0,05 V

Duração do pulso: 600 ms

Potencial de pré-concentração: – 0,70 V para o Cd e – 0,5 V para o Pb

Tempo de pré-concentração na gota: 90 s para o Cd e 20 s para o Pb

Faixa de varredura de potenciais: – 0,70 a – 0,25 V

Velocidade de varredura: 0,01 V s⁻¹

– Método II:

Volume na célula voltamétrica: 10 mL (9 mL de etanol e 1 mL de eletrólito)

Eletrodo de trabalho: HMDE

Tamanho da gota: 0,6 mm²

Modo de medida: pulso diferencial

Amplitude de pulso: 0,05 V

Duração do pulso: 600 ms

Potencial de pré-concentração: – 0,70 V

Tempo de pré-concentração na gota: 90 s

Faixa de varredura de potenciais: – 0,70 a – 0,10 V

Velocidade de varredura: 0,01 V s⁻¹

– Corrente alternada – tensametria

Volume na célula voltamétrica: 10 mL (9 mL de etanol e 1 mL de eletrólito)

Eletrodo de trabalho: HMDE

Tempo de pré-concentração na gota: 90 s

Tamanho da gota: 0,6 mm²

Amplitude de pulso: 0,02V

Ângulo de fase: 90°

Potencial de pré-concentração: – 0,70 V

Faixa de varredura de potenciais: – 0,70 a 0,0 V

Freqüência: 60 Hz

Velocidade de varredura: 0,02 V s⁻¹