



UFSM

TESE DE DOUTORADO

**DETERMINAÇÃO DAS CONSTANTES DE ESTABILIDADE DOS
COMPLEXOS FORMADOS ENTRE OS AMINOÁCIDOS CISTEÍNA,
N-ACETILCISTEÍNA E LISINA COM CHUMBO EM SOLUÇÃO
AQUOSA**

Claudia Wollmann Carvalho

PPGQ

Santa Maria, RS, BRASIL

2011

**DETERMINAÇÃO DAS CONSTANTES DE ESTABILIDADE DOS
COMPLEXOS FORMADOS ENTRE OS AMINOÁCIDOS CISTEÍNA,
N-ACETILCISTEÍNA E LISINA COM CHUMBO EM SOLUÇÃO
AQUOSA**

Claudia Wollmann Carvalho

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

Orientador: Prof. Dr. Paulo Cícero do Nascimento

Santa Maria, RS, Brasil

2011

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

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

**DETERMINAÇÃO DAS CONSTANTES DE ESTABILIDADE DOS
COMPLEXOS FORMADOS ENTRE OS AMINOÁCIDOS CISTEÍNA, N-
ACETILCISTEÍNA E LISINA COM CHUMBO EM SOLUÇÃO AQUOSA**

elaborada por
Claudia Wollmann Carvalho

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

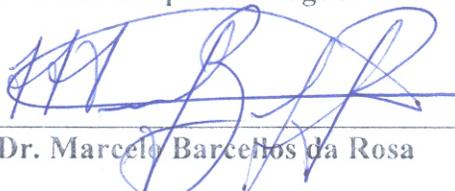
COMISSÃO EXAMINADORA:



Prof. Dr. Paulo Cícero do Nascimento
(Orientador)



Prof. Dra. Jacqueline Arguello



Prof. Dr. Marcelo Barcellos da Rosa



Prof. Dra. Simone Stülp



Prof. Dra. Vania Regina Gabbi Polli

Santa Maria, 18 de janeiro de 2011.

Resumo

Tese de Doutorado
Programa de Pós-Graduação em Química
Universidade Federal de Santa Maria

DETERMINAÇÃO DAS CONSTANTES DE ESTABILIDADE DOS COMPLEXOS FORMADOS ENTRE OS AMINOÁCIDOS CISTEÍNA, N-ACETILCISTEÍNA E LISINA COM CHUMBO EM SOLUÇÃO AQUOSA

AUTORA: CLAUDIA WOLLMANN CARVALHO
ORIENTADOR: PROF. DR. PAULO CÍCERO DO NASCIMENTO
Data e local de defesa: Santa Maria, 18 de janeiro de 2011.

Neste trabalho investigou-se a interação entre chumbo e os aminoácidos cisteína, N-acetilcisteína e lisina por meio de ensaios de contato de longa duração com resina de troca iônica e estudos para determinar as constantes de estabilidade dos complexos formados entre eles.

A importância de investigar a presença de chumbo em soluções de nutrição parenteral relaciona-se ao risco de contaminação interna destas soluções em decorrência da afinidade entre os aminoácidos que compõem as soluções e o chumbo presente nas embalagens plásticas. Os aminoácidos em função de suas afinidades relativas podem atuar como transportadores do metal nos organismos vivos.

Os resultados dos ensaios de contato com resina na forma Pb^{2+} mostraram que a maior extração do chumbo ocorre pelo aminoácido que possui maior afinidade pelo metal e isto é comprovado pelo valor da constante de estabilidade calculada, ou seja, houve relação direta dos valores das constantes obtidas através do cálculo das mesmas para os aminoácidos estudados com a taxa de extração do chumbo da resina pelos ligantes (aminoácidos). O efeito cinético, estabelecido pelas leis de velocidades não importaram nesse estudo, uma vez que os ensaios foram de longa duração. Ensaios com agentes complexantes, como EDTA e ácido cítrico, com constantes de estabilidade já conhecidas, também foram realizados para fins comparativos.

A quantificação de chumbo nos ensaios de longa duração foi realizada por espectrometria de absorção atômica (AAS) com atomizações por chama e eletrotérmica. As

constantes de estabilidade foram obtidas por potenciometria com o tratamento dos dados através do programa computacional BEST[®]. Titulações potenciométricas, de soluções aquosas com força iônica e temperatura constantes, mostraram que as espécies predominantes em solução são de razão molar 1:1 (L:M) para N-acetilcisteína e lisina e de 1:1 e 2:1 para cisteína.

As principais espécies encontradas foram para cisteína, Cys_2Pb e $CysPbOH$ com $\log K = 1,61$ e $24,00$ respectivamente, para N-acetilcisteína $N\text{-Acetil-}Cys_2Pb$, $N\text{-Acetil-}Cys_2PbH$ e $N\text{-Acetil-}CysPbOH$, com $\log K = -1,55$; $14,52$ e $21,49$ respectivamente, e para lisina $LysPb$, com $\log K = 9,69$.

A interação dos aminoácidos estudados com o chumbo também foi constatada pelos ensaios feitos com a matéria-prima das embalagens das soluções de Nutrição Parenteral através da análise por AAS.

Palavras-chave: cisteína, N-acetilcisteína, lisina, troca iônica, constante de estabilidade, aminoácido, chumbo.

Abstract

DETERMINATION OF STABILITY CONSTANTS FOR LEAD COMPLEXES WITH CYSTEINE, N-ACETYLCYSTEINE AND LYSINE IN AQUEOUS SOLUTIONS

Author: Claudia Wollmann Carvalho
Adviser: Prof. Dr. Paulo Cícero do Nascimento
Santa Maria, January 18th, 2011.

In this study we investigated the interaction between lead and the amino acid cysteine, lysine and N-acetylcysteine by testing long-term contact with ion exchanger resins and also the determination of stability constants. The importance of investigating the presence of lead in solutions for parenteral nutrition is related to the risk of internal contamination of these solutions due to the affinity between amino acids that compose these solutions and lead present in plastic packaging. The amino acids according to their relative affinities can act as carriers of metal in living organisms. The long term tests with adsorbents in form of Pb^{2+} showed that the higher extraction of lead occurs at amino acid that has a greater affinity for the metal and this is evidenced by the value of stability constant calculated, i.e., there was a direct relationship of the values of the calculated stability constants. Kinetic effects were not significant in this study, since the trials were of long duration. Tests with complexing agents such as EDTA and citric acid, that have known stability constants, were also performed for comparison purposes. The quantification of lead in long term tests was performed by atomic absorption spectrometry with flame and electrothermal atomization. The stability constants were obtained by potentiometry by processing the data through the software BEST[®]. Titrations in aqueous solutions with constant ionic strength and temperature showed that the predominant species in solution have molar ratio of 1:1 (L: M) to N-acetyl-cysteine and lysine and 1:1 and 2:1 for cysteine. The main species found for cysteine were Cys_2Pb and $CysPbOH$ with $\log K = 1.61$ and 24.00 , respectively, for N-acetylcysteine $N-Acetyl-Cys_2Pb$, $N-Acetyl-Cys_2PbH$ and $N-Acetyl-CysPbOH$ with $\log K = -1.55$, 14.52 and 21.49 respectively, and for lysine $LysPb$ with $\log K = 9.69$. The interaction of amino acids studied with lead was also detected by the tests made with the raw material of the packaging of parenteral nutrition solutions through the analysis by AAS.

Keywords: cysteine, N-acetylcysteine, lysine, ionic exchange, stability constant, amino acid, lead.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 01 - Gráfico de Scatchard.....	49
FIGURA 02 - Sistema de titulação potenciométrica.....	57
FIGURA 03 - Concentração de Pb^{2+} em solução versus tempo de contato da resina catiônica na forma Pb^{2+} (0,1 g) com água, solução de Cys e solução de N-Acetil-Cys 20 mM, separadamente.....	64
FIGURA 04 - Concentração de Pb^{2+} em solução versus tempo de contato da resina catiônica na forma Pb^{2+} (0,1g) com solução dos complexantes 20 mmol L ⁻¹ , separadamente (A); tempo em escala logaritma (B).....	66
FIGURA 05 - Concentração de Pb^{2+} em água versus tempo de contato da resina catiônica na forma Pb^{2+} (0,1 g), em diferentes pHs: A (pH 8,0; 10,0 e 12,0); B (pH 2,0 e 14,0).....	67
FIGURA 06 - Concentração de Pb^{2+} / Lys (mg L ⁻¹) em solução (100 mL) versus tempo de contato (dia) resina – solução de cinco soluções de lisina.....	68
FIGURA 07 - Concentração de chumbo na resina/concentração de chumbo em solução versus concentração dos ligantes: Lys, EDTA e ácido cítrico em solução (100 mL), em contato com resina catiônica na forma Pb^{2+} (0,1 g) em 96 h de contato.....	69
FIGURA 08 - Isotherma de troca iônica para soluções contendo lisina em diferentes concentrações em equilíbrio com resina catiônica na forma Pb^{2+} (0,1 g) (A). Diagrama de Scatchard para lisina em solução combinada com Pb^{2+} extraído da resina catiônica (B).....	71
FIGURA 09 - pH versus volume de $Pb(NO_3)_2$ 10 mM, na titulação de 30 mL de solução (A) 3,3 mM de cisteína e (B) primeira derivada 3,3 mM de cisteína, separadamente.....	72
FIGURA 10 - pH versus volume de $Pb(NO_3)_2$ 100,0 mM, na titulação de 20 mL de solução 50,0 mM de lisina.....	73
FIGURA 11 - Titulação potenciométrica dos aminoácidos, com solução de KOH, na ausência e presença do metal, em diferentes proporções L:M (A: cisteína; B: N-acetilcisteína; C: lisina).....	74
FIGURA 12- Curvas de titulação potenciométrica com KOH de soluções de cisteína e cisteína-Pb nas proporções 1:1 e 2:1, (A) pH vs a e (B) pH vs C m.....	79
FIGURA 13 - Curvas de titulação potenciométrica com KOH de soluções de Lys e Lys-Pb nas proporções 1:1 e 2:1, (A) pH vs a e (B) pH vs m.....	81
FIGURA 14 - Curvas de titulação potenciométrica com KOH de soluções de N-acetilcisteína (curva 1) e N-acetilcisteína-Pb nas proporções 2:1(curva 2) e 1:1 (curva 3), (A) pH versus a e (B) pH versus m.....	82

FIGURA 15 - Diagrama de equilíbrio de espécies para cisteína (30 mM) em solução aquosa com $\mu = 0,1 \text{ mol L}^{-1}$	86
FIGURA 16 - Porcentagem das espécies em solução para uma relação molar 1:1 de cisteína/Pb, como função do pH, $\mu = 0,1 \text{ mol L}^{-1}$ e $T = 25 \text{ }^\circ\text{C}$	93
FIGURA 17 - Diagrama de equilíbrio de espécies para N-acetilcisteína (30 mmol L ⁻¹) em solução aquosa com $\mu = 0,1 \text{ mol L}^{-1}$	94
FIGURA 18 - Porcentagem das espécies em solução para uma relação molar 1:1 de N-acetilcisteína/Pb, como função do pH, $\mu = 0,1 \text{ mol L}^{-1}$ e $T = 25 \text{ }^\circ\text{C}$	95
FIGURA 19 - Diagrama de equilíbrio de espécies para lisina (30 mmol L ⁻¹) em solução aquosa com $\mu = 0,1 \text{ mol L}^{-1}$	97
FIGURA 20 - Porcentagem das espécies em solução para uma relação molar 1:1 de lisina/Pb, como função do pH, $\mu = 0,1 \text{ mol L}^{-1}$ e $T = 25 \text{ }^\circ\text{C}$	99

LISTA DE TABELAS

TABELA 01 – Ponto Isoelétrico (pI) dos aminoácidos.....	18
TABELA 02 – Valores de pKas para os aminoácidos.....	19
TABELA 03 - Ácidos e bases, duros e moles.....	37
TABELA 04 - Constante de estabilidade como log K de complexos de aminoácidos divalentes com metais.....	44
TABELA 05 - Métodos para determinação de constantes de estabilidade.....	45
TABELA 06 – Lista dos reagentes utilizados para o desenvolvimento do trabalho.....	52
TABELA 07 - Ensaio para quantificação do chumbo extraível em embalagens comerciais de solução de nutrição parenteral (NP) utilizando Espectroscopia de Absorção Atômica por Forno de Grafite (GFAAS).....	53
TABELA 08 - Misturas de soluções e resinas utilizadas no item 3.5.2.....	54
TABELA 09 - Dados das titulações potenciométricas para verificação da relação metal:ligante predominante.....	59
TABELA 10 - Concentração de chumbo extraído pelas soluções de aminoácidos das embalagens de soluções de NP.....	62
TABELA 11 - Logaritmo da constante de estabilidade para complexos formados entre MEA e íons metálicos divalentes medidos potenciometricamente em água a 25 °C e força iônica 0,1 mol L ⁻¹ KCl	63
TABELA 12 - Comparativo da concentração de chumbo (mg L ⁻¹) em solução (50 mL) 20 mM extraído pelas soluções dos ligantes estudados.....	69
TABELA 13 - Constantes de hidrólise do chumbo (log β')	85
TABELA 14 - Constantes de protonação da cisteína (log β).....	86
TABELA 15 - Resultado da computação dos dados da titulação potenciométrica para obtenção de constantes de estabilidade dos complexos formados entre chumbo e cisteína, na proporção de 1:1, μ = 0,1 mol L ⁻¹ e T = 25 °C.....	92
TABELA 16 - Constantes de protonação da N-acetilcisteína	93
TABELA 17 - Resultado da computação dos dados da titulação potenciométrica para obtenção de constantes de estabilidade dos complexos formados entre chumbo e N-acetilcisteína, na proporção de 1:1, μ=0,1 mol L ⁻¹ e T = 25 °C.....	95
TABELA 18 - Constantes de protonação da lisina.....	97

Tabela 19 - Resultado da computação dos dados da titulação potenciométrica para obtenção de constantes de estabilidade dos complexos formados entre chumbo e lisina, na proporção de 1:1, $\mu = 0,1 \text{ mol L}^{-1}$ e $T = 25 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 98

LISTA DE SIGLAS E ABREVIACOES

AAS – Espectrometria de Absorção Atômica

BEST – programa computacional para cálculo de constantes de estabilidade

Cys – cisteína

EDTA - cido etilenodiaminotetracético

EVA - etilvinil acetato

HSAB – Hard and Soft Acids and Bases

IDA - iminodiacético

IDAEC – cido etil celulose iminodiacético

K – constante de equilíbrio

L – ligante

Lys – lisina

M – metal

MEA - 2-mercaptoetilamina ($\text{HSCH}_2\text{CH}_2\text{NH}_2$)

N-Acetil-Cys – N-acetilcisteína

NP - nutrição parenteral

NPT – nutrição parenteral total

pI – ponto isoelétrico

pK_w - produto iônico da água

β – constante de estabilidade

μ – fora iônica

σ – desvio padrão de unidades de pH

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	15
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	17
2.1 Aminoácidos.....	17
2.1.1 Definição e configuração.....	17
2.1.2 Classificação	18 26
2.1.3 Aminoácidos sulfurados.....	21
2.2 Chumbo.....	21
2.2.1 Toxicidade do Chumbo.....	22
2.2.2 Toxicocinética do Chumbo.....	22
2.2.3 Distribuição do chumbo no organismo humano.....	25
2.3 Propriedades químicas e capacidade de ligação.....	27
2.3.1 Ligações Metais-Aminoácidos.....	27
2.3.2 Hidrólise do chumbo.....	28
2.4 Nutrição Parenteral.....	28
2.4.1 Complicações da Nutrição Parenteral.....	28
2.4.2 Preparo das soluções de Nutrição Parenteral.....	29
2.5 Embalagens utilizadas para armazenar soluções de Nutrição Parenteral.....	29
2.5.1 Embalagens poliméricas.....	30
2.5.2 Embalagens de vidro.....	31
2.6 Resinas trocadoras de íons.....	32
2.7 Complexos.....	32
2.7.1 Reações de formação de complexos.....	32
2.7.2 Estabilidade dos Complexos.....	33
2.7.3 Habilidade de complexação dos metais.....	34
2.7.4 Habilidade de complexação dos ligantes	35
2.7.5 Teoria HSAB (ácidos e bases/ duros e moles - <i>Hard and Soft Acids and Bases</i>).....	35
2.8 Constante de estabilidade (β)	38
2.8.1 Influência da força iônica sobre a constante de equilíbrio.....	39
2.8.2 Interação metais-aminoácidos.....	40
2.8.2.1 Interação cisteína-metais.....	41
2.8.2.2 Interação N-acetilcisteína-metais.....	42

2.8.2.3 Interação lisina-metais.....	43
2.9 Princípios básicos para determinação de constantes de estabilidade	44
2.9.1 Métodos para a determinação das constantes de estabilidade	45
2.9.2 Titulação Potenciométrica.....	47
2.9.3 Método Scatchard.....	48
2.9.4 Cálculos de constante de estabilidade.....	49
3 MATERIAIS E MÉTODOS.....	51
3.1 Instrumentação.....	51
3.2 Reagentes e Soluções.....	51
3.3 Cuidados com a contaminação.....	52
3.4 Quantificação do chumbo em embalagens comerciais de Nutrição Parenteral (NP) utilizando Espectrometria de Absorção Atômica por Forno de Grafite (GFAAS)	52
3.5 Estudo da interação do chumbo com os aminoácidos cisteína, N-acetilcisteína e lisina através do uso de resina catiônica.....	53
3.5.1 Preparo da resina catiônica.....	54
3.5.2 Interação dos agentes complexantes com a resina na forma Pb^{2+}	54
3.5.3 Interação dos aminoácidos cisteína, N-acetilcisteína e lisina com resina na forma Pb^{2+}	55
3.5.4 Avaliação das constantes de estabilidade dos complexos Pb-lisina através do método Scatchard.....	55
3.5.5 Avaliação da constante de estabilidade do complexo Pb-lisina.....	55
3.6 Titulação complexométrica.....	56
3.7 Determinação de constantes de estabilidade.....	56
3.7.1 Titulação Potenciométrica.....	56
3.7.1.1 Calibração do sistema potenciométrico.....	57
3.7.1.2 Sistema chumbo/cisteína (Pb/Cys).....	57
3.7.1.3 Sistema chumbo/ lisina (Pb/Lys).....	58
3.7.1.4 Sistema chumbo/N-acetilcisteína (Pb/N-Acetil-Cys).....	58
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	60
4.1 Avaliação da migração de chumbo das embalagens de armazenagem das soluções de nutrição parenteral para as soluções dos aminoácidos cisteína, N-acetilcisteína e lisina utilizando a Espectrometria de Absorção Atômica por Forno	61

de Grafite (GFAAS).....	
4.2 Estudo da interação do chumbo com os aminoácidos em estudo através do uso de resina de troca iônica.....	62
4.2.1 Interação dos aminoácidos cisteína e N-acetilcisteína com resina na forma Pb^{2+}	64
4.2.2 Interação do aminoácido lisina e outros agentes complexantes com resina na forma Pb^{2+}	65
4.2.3 Avaliação das constantes de estabilidade do complexo Pb-lisina através do método Scatchard.....	70
4.3 Titulação Potenciométrica.....	72
4.4 Determinação das constantes de estabilidade.....	75
4.4.1 Determinação das constantes de estabilidade chumbo-aminoácido por titulação potenciométrica.....	75
4.4.1.1 Calibração do sistema potencimétrico.....	75
4.4.2 Determinação do produto iônico da água (pK_w).....	76
4.4.3 Estudo da proporção metal-ligante.....	78
4.4.4 Determinação das constantes de estabilidade dos complexos cisteína-chumbo.....	85
4.4.5 Determinação das constantes de estabilidade dos complexos N-acetilcisteína-chumbo.....	93
4.4.6 Determinação das constantes de estabilidade dos complexos lisina-chumbo.....	96
5 CONCLUSÕES.....	101
6 REFERÊNCIAS.....	103
7 ANEXOS.....	109
Anexo A.....	109
Anexo B.....	110
Anexo C.....	111
8 APÊNDICES.....	113
Apêndice A.....	113
Apêndice B.....	115
Apêndice C.....	116
Apêndice D.....	120
Apêndice E.....	123
Apêndice F.....	127

Apêndice G..... 132

1 INTRODUÇÃO

Os aminoácidos desempenham funções importantes no metabolismo animal [1,2]. Dentre os muitos aminoácidos, há os constituídos de átomos de enxofre, como a metionina, a cistina e a cisteína. Estes integram a composição da maioria das soluções de aminoácidos, utilizadas como nutrição parenteral para fornecimento de nutrientes, administrados via intravenosa, a pacientes com problemas de desnutrição e respiratórios, pré e pós-operatórios e outros.

Como a nutrição parenteral é aplicada a pacientes debilitados e com problemas de saúde, a administração via intravenosa, com a presença do metal pesado chumbo, como contaminante, mesmo em nível de traços, é prejudicial, pois além da conhecida toxicidade do chumbo, estudos demonstram que o Pb(II) liga-se fortemente a doadores de elétrons em cisteína, mas que este íon não estabiliza os compostos respectivos com a mesma geometria do Zn(II). Estes estudos sugerem que os problemas associados com a toxicidade do Pb(II) seja por sua ligação com estes locais de ligação Zn-cisteína[3]. Os mecanismos bioquímicos pelos quais o chumbo provoca os malefícios ao organismo são: ligação com aminoácidos sulfurados, inativação de várias enzimas plasmáticas e intracelulares, imunossupressão, aumento do risco de carcinogênese, ligação a grupos carboxil e fosforil e agressão do trato gastrointestinal [4].

O conhecimento de constantes de estabilidade não é restrito a estudos do comportamento químico *in vitro*. Interação entre íons metálicos com uma ampla variedade de ligantes, tem sido de grande interesse para bioquímicos. Além disso, a determinação de constantes de estabilidade tem estendido seu domínio por também tornar-se necessária para cientistas do solo e oceanógrafos [5].

Os metais pesados são cumulativos no organismo, principalmente no tecido adiposo, lá ficam armazenados sob forma orgânica ou inorgânica, prontos a se combinarem com proteínas e lipídios circulando pelo sangue e danificando os rins, pulmões e aparelho cardiovascular.

A toxicidade de metais pesados pode ser causada por vários mecanismos, incluindo bloqueios de grupos funcionais essenciais de biomoléculas tais como proteínas e enzimas, deslocando íons de metais essenciais de biomoléculas, rompendo a integridade de

biomembranas ou ligações com bioânions resultando na diminuição do nível de bioânions essenciais [6].

Neste trabalho investigou-se a interação entre chumbo e os aminoácidos cisteína, N-acetilcisteína e lisina por meio de estudos para determinar as constantes de estabilidade dos complexos formados entre eles. Na primeira parte do presente trabalho, foi estudada a interação entre chumbo e os três aminoácidos estudados, primeiramente através da medida da quantidade extraível de chumbo, de partes das embalagens das soluções de NP, pela solução dos aminoácidos, separadamente, e, em seguida, usando um sistema de troca iônica. Na segunda parte, os valores das constantes de estabilidade dos complexos formados entre os mesmos aminoácidos e o chumbo foram obtidos a partir de dados de titulação potenciométrica.

A importância de investigar a presença de chumbo em soluções de nutrição parenteral relaciona-se ao risco de contaminação interna destas soluções [7] em decorrência da afinidade entre os aminoácidos que compõem as soluções e o chumbo presente nas embalagens plásticas. Na fabricação das embalagens o chumbo é adicionado ao plástico na forma de um sabão como estabilizante do material das embalagens. O chumbo, em virtude de sua conhecida toxicidade, não deve fazer parte da composição das soluções de nutrição parenteral, principalmente considerando que as soluções são administradas diretamente na corrente sanguínea dos pacientes sem passagem pelo sistema digestivo. Os aminoácidos em função de suas afinidades relativas podem atuar como transportadores do metal nos organismos vivos. A avaliação do risco de contaminação e da distribuição do chumbo entre os diferentes aminoácidos pode incluir a determinação de constantes de estabilidade.

Geralmente, os elementos metálicos de transição na forma de seus respectivos sais ou óxidos (compostos inorgânicos) não são a melhor fonte de biodisponibilidade destes elementos. Uma forma biodisponível de íons metálicos são seus complexos, formados da ligação química entre o íon metálico e seu respectivo ligante que constitui uma molécula orgânica.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Aminoácidos

2.1.1 Definição e configuração

Os aminoácidos são substâncias que apresentam um grupo de amina e um carboxílico ligados ao mesmo carbono. Os aminoácidos de importância biológica têm estes grupos ligados a carbono α . As espécies de aminoácidos diferem uma das outras por possuírem diferentes cadeias laterais ligados ao carbono α , assim a cadeia lateral dá a cada aminoácido a sua identidade [24]. Os aminoácidos podem apresentar-se na forma carregada ou neutra, dependendo do pH do meio no qual se encontram [25]. Todos os 20 aminoácidos comumente encontrados em proteínas, exceto a prolina, possuem os grupos α amino e α carboxílico livres.

A cadeia lateral dos aminoácidos assegura diversas classificações como polaridade, acidez e basicidade.

Todos os aminoácidos naturais ou os obtidos por hidrólise de proteínas têm sempre um grupo amínico ou imínico adjacente ao grupo carboxílico. Todos esses aminoácidos, com exceção da glicina, apresentam pelo menos um átomo de carbono quiral, e conseqüentemente existem em duas formas oticamente ativas, denominadas D-aminoácido e L-aminoácido. Essas configurações, D e L, referem-se à configuração de determinados carbonos quirais e não ao sentido da rotação ótica desses compostos.

O valor nutritivo de uma proteína está estritamente relacionado à proporção de aminoácidos que a compõem. Alguns destes devem ser fornecidos por meio da dieta aos organismos adultos, aos jovens em crescimento ou a ambos, uma vez que o organismo não tem capacidade de sintetizá-los, chamados de aminoácidos essenciais, entre os quais estão incluídos a alanina, valina, isoleucina, leucina, lisina, triptofano, fenilalanina, metionina e treonina [23].

2.1.2 Classificação

Aminoácidos têm sido classificados de várias maneiras, como, por exemplo, em alifáticos, aromáticos e heterocíclicos; ou em aminoácidos monoamino-monocarboxílicos (neutros), monoamino-dicarboxílicos (ácidos) e diamino-monocarboxílicos (básicos). A classificação mais significativa baseia-se na polaridade dos radicais R, ligados ao carbono em α carboxila e de acordo com essa propriedade os aminoácidos são classificados em:

- 1) aminoácidos nos quais R é não polar ou hidrofóbico: aminoácidos alifáticos, todos com caráter hidrofóbico (alanina, fenilalanina, glicina, isoleucina, leucina, metionina, prolina, triptofano, valina).
- 2) aminoácidos nos quais R é polar, mas sem cargas: Os resíduos ligados ao carbono adjacente à carboxila têm grupos polares (hidroxilas, sulfidrilas etc.) e, portanto, com capacidade de formar ligações de hidrogênio. Também neste caso os resíduos poderão ser alifáticos ou aromáticos (asparagina, cisteína, glutamina, hidroxiprolina, serina, tirosina, treonina).
- 3) aminoácidos nos quais R é carregado positivamente: as cargas positivas são causadas por um segundo grupo amínico ou por um grupo imínico. São denominados básicos (arginina, hidroxilisina, histidina, lisina).
- 4) aminoácidos nos quais R é carregado negativamente: a carga negativa é causada pela presença de um segundo grupo carboxílico. São denominados ácidos (ácido aspártico, ácido glutâmico).

Existe um valor de pH chamado ponto isoelétrico (pI), que é característico para cada aminoácido, (tabela 1), no qual o aminoácido não apresenta carga, pois a carga positiva do grupo NH_3^+ é neutralizada pela negativa do grupo COO^- . Quando o pH do meio for superior ao seu pI este se apresentará na forma predominante negativa enquanto que se o pH do meio for inferior ao seu pI o aminoácido se apresentará na sua forma positiva [26]. Devido a esta propriedade os aminoácidos são chamados “zwitterion”[27].

Tabela 01 – Ponto Isoelétrico (pI) dos aminoácidos

Aminoácidos	pI	Aminoácidos	pI
Alanina	6,00	Arginina	10,76
Lisina	9,74	Glicina	5,97
Prolina	6,30	Cisteína	5,07

Continuação tabela 01

Leucina	5,98	Triptofano	5,89
Isoleucina	6,02	Ácido Glutâmico	3,22
Metionina	7,54	Ácido Aspártico	2,77
Fenilalanina	5,48	Serina	5,68
Treonina	5,64	Glutamina	5,65
Tirosina	5,66	Valina	5,96
Histidina	7,59	Asparagina	5,41
Ornitina	9,70		

Os aminoácidos que possuem além dos grupos amino e carboxílico, outros grupos (Tabela 02) podem reagir de diferentes formas dependendo da natureza do grupo funcional. Ácido aspártico e glutâmico possui um segundo grupo carboxílico e apresentam um caráter mais ácido, enquanto lisina, arginina e histina possuem um segundo grupo amino sendo, portanto, aminoácidos com um caráter básico maior.

A capacidade dos aminoácidos em atuarem como ligantes para íons metálicos estão relacionadas não só à presença dos grupos amino e carboxílico, mas também a estes outros grupos funcionais. Entretanto, como os grupos são diferentes em sua natureza, a capacidade dos aminoácidos de se ligarem a metais também é diferente. Por exemplo, os grupos R-OH, R-NH₂, R-CO₂ podem ser classificados como ligantes duros, enquanto que os grupos R-SH, R₂S podem ser classificados como moles. Com isso, os aminoácidos não podem ser classificados de uma única maneira e estão aptos a combinarem-se de diferentes formas com diferentes íons metálicos [28].

Tabela 02 – Valores de pKas para os aminoácidos

Aminoácidos	Grupamento α -COOH	Grupamento α -NH ₃ ⁺	Cadeia Lateral
Alanina	2,30	9,90	
Lisina	2,20	9,20	10,80
Asparagina	2,02	8,80	
Ornitina	1,94	8,65	10,76
Prolina	2,10	10,60	
Leucina	2,40	9,60	
Isoleucina	2,40	9,70	

Continuação tabela 02

Metionina	2,30	9,20	
Fenilalanina	1,80	9,10	
Treonina	2,60	10,40	13,0
Tirosina	2,20	9,10	10,90
Histidina	1,80	9,20	6,00
Arginina	1,80	9,00	12,50
Glicina	2,40	9,80	
Cisteína	1,80	10,80	8,30
Triptofano	2,38	9,39	
Ácido Glutâmico	2,20	9,70	4,30
Ácido Aspártico	2,00	10,00	3,90
Serina	2,10	9,20	
Glutamina	2,17	9,13	
Valina	2,30	9,60	

Em solução aquosa, os aminoácidos contêm grupos α -carboxila fracamente ácidos e grupos α -amino fracamente básicos. Além disso, cada aminoácido ácido e cada aminoácido básico contêm um grupo ionizável na cadeia lateral. Assim, tanto os aminoácidos livres quanto alguns aminoácidos combinados por meio de ligações peptídicas podem atuar como tampões. Os ácidos podem ser definidos como doadores de prótons e as bases como aceptoras de prótons. Ácidos (ou bases) são descritos como “fracos” quando ionizam em proporção limitada. A concentração de prótons em solução aquosa é expressa como pH, onde $\text{pH} = \log 1/[\text{H}^+]$ ou $-\log[\text{H}^+]$. A relação quantitativa entre o pH da solução e a concentração de um ácido fraco (HA) e sua base conjugada (A^-) é descrita pela equação de Henderson-Hasselbalch.

Considere a liberação de um próton por um ácido fraco, representado por $\text{HA} \leftrightarrow \text{H}^+ + \text{A}^-$.

O “sal” ou base conjugada, A^- , é a forma ionizada de um ácido fraco. Por definição, a constante de dissociação do ácido, K_a , é $K_a = \frac{[\text{H}^+][\text{A}^-]}{[\text{HA}]}$.

Quanto maior o K_a , mais forte o ácido, pois indica que a maior parte de HA dissociou-se em H^+ e A^- . Por outro lado, quanto menor o K_a , menos ácido foi dissociado e, portanto, mais fraco é o ácido. Isolando $[\text{H}^+]$ na equação anterior, tomando o logaritmo de ambos os lados da equação, multiplicando ambos os lados por -1 e substituindo $\text{pH} = -\log [\text{H}^+]$ e $\text{p}K_a = -\log K_a$, obtém-se a equação de Henderson-Hasselbalch:

$$\text{pH} = \text{pKa} + \frac{\log [\text{A}^-]}{[\text{HA}]} \quad (1)$$

Os aminoácidos abordados no presente estudo são a cisteína, N-acetilcisteína e a lisina.

2.1.3 Aminoácidos sulfurados

Aminoácidos sulfurados são muito importantes do ponto de vista fisiológico e bioquímico. Encontram-se amplamente distribuídos nas células humanas, fazendo parte de proteínas ou como moléculas independentes, os tióis são envolvidos em numerosas reações do metabolismo. Suas funções incluem, entre outras, detoxificação e transporte de metais pesados, defesa antioxidante celular e síntese de proteínas e DNA. Na estrutura protéica, as pontes dissulfeto entre resíduos das cadeias laterais de cisteínas são responsáveis pela estruturação tridimensional da proteína, sendo desta maneira responsável pela estabilidade e manutenção da função biológica de proteínas e enzimas endógenas [29, 30].

Os tióis biológicos podem ser classificados como tióis protéicos de alto peso molecular e tióis livres de baixo peso molecular (LMW). Tióis de LMW, como cisteína, metionina, glutatona, homocisteína e N-acetilcisteína, são componentes celulares críticos que fazem numerosos papéis importantes na homeostase do organismo. Cisteína é um substrato crítico para síntese protéica, precursor da síntese de glutatona e taurina.

2. 2 Chumbo

O chumbo interfere com a função de minerais essenciais: cálcio, ferro, cobre e zinco. Além disso, o metal diminui a síntese de hemoglobina e interrompe a atividade de várias enzimas eritrocitárias incluindo a α -aminolevulínico desidratase e a ferroquelase. O chumbo é considerado como neurotoxina, capaz de provocar sérias alterações nervosas e cerebrais de caráter irreversível. Sobre o tecido ósseo o chumbo age deslocando o cálcio e provocando osteoporose.

Os mecanismos bioquímicos pelos quais o chumbo provoca os malefícios ao organismo são: ligação com aminoácidos sulfurados, inativação de várias enzimas plasmáticas e intracelulares, imunossupressão, aumento do risco de carcinogênese, ligação a grupos carboxil e fosforil e agressão do trato gastrointestinal [8]. Estudos recentes demonstram que o Pb(II) liga-se fortemente a doadores de elétrons em cisteína, mas que este íon não estabiliza os compostos respectivos com a mesma geometria do Zn(II). Estes estudos sugerem que os

problemas associados com a toxicidade do Pb(II) seja por sua ligação com estes locais de ligação Zn-cisteína [9].

2.2.1 Toxicidade do Chumbo

O chumbo foi um dos primeiros metais que o homem aprendeu a usar. Há evidências de que já era utilizado na Ásia Menor no ano 4.000 A.C.. Por ser utilizado de forma tão intensiva por tão longo tempo, a história de sua intoxicação é extensa. No entanto, foi Hipócrates o primeiro a ligar os sintomas de intoxicação por chumbo a seu fator causal. Durante a Idade Média a intoxicação por chumbo foi totalmente esquecida e somente no século XVI apareceu novamente na literatura médica quando Paracelso descreveu a “doença dos mineiros”.

Mesmo com amplo conhecimento de sua causa, apresentação clínica e prevenção, esta patologia ainda é comum em todo o mundo, principalmente nos países em desenvolvimento.

Os casos atuais de intoxicação são, em geral, mais brandos do que os de 50 anos atrás. No entanto, as estatísticas demonstram apenas a ‘ponta do iceberg’ e geralmente não consideram a intoxicação subclínica.

O chumbo é virtualmente onipresente no meio ambiente como resultado de sua ocorrência natural e sua utilização industrial. A ingestão diária média de um adulto é de 0,1 mg a 2 mg. Os casos de toxicidade resultam tanto de exposição ambiental quanto da industrial. É considerada uma doença crônica, às vezes com episódios sintomáticos agudos que levam a efeito crônico irreversível [10].

2.2.2 Toxicocinética do Chumbo

A maioria das intoxicações por chumbo é lenta e gradual devido à sua exposição e acúmulo frequentes. Seus compostos inorgânicos apresentam duas vias de absorção: respiratória e digestiva, sendo aumentada quando há deficiência orgânica de ferro, cálcio e zinco.

Apenas seus compostos orgânicos conseguem penetrar no organismo por via cutânea, por exemplo, o chumbo tetraetila, que penetra rapidamente no organismo pelos pulmões, pelo trato gastrointestinal e pela pele. Pela via respiratória a absorção varia com a forma (fumos metálicos x partículas), a concentração e com as variações patológicas e fisiológicas individuais [10].

As partículas de chumbo que são inaladas do ar atmosférico são absorvidas pelo organismo e serão então, depositadas nas regiões nasofaríngeas, traqueobrônquica e alveolar, de onde serão eliminadas pelo mecanismo mucociliar da faringe, ou serão engolidas e absorvidas, ou eliminadas pelo trato gastrointestinal (com exceção da região alveolar) [11].

A absorção de chumbo pelo trato gastrointestinal é de aproximadamente 10% nos adultos, já que a maior parte do chumbo ingerido é excretado in natura, mas o índice de absorção pode chegar a 50% quando ingerido como solução. Nas crianças essa absorção chega a 40% do total de chumbo ingerido com os alimentos. Cumpre ressaltar que a absorção de chumbo pela via digestiva depende principalmente de fatores dietéticos, como o estado de jejum, a ingestão de proteínas e de presença de cálcio, ferro e fósforo. Uma deficiência desses nutrientes aumenta a absorção de chumbo e vice-versa, provavelmente pela competição destes minerais por um mesmo mecanismo de transporte. Estudos demonstram que há uma relação recíproca entre o conteúdo de cálcio da dieta e a absorção do chumbo.

Setenta por cento do chumbo que ingerimos provem dos alimentos (frutos e legumes, cereais, mariscos...) e das bebidas (vinho, sumo de frutos, água...). O chumbo ingerido é em grande parte eliminado pelas fezes, urina e suor. O saturnismo, intoxicação pelo chumbo, conhecido desde há muito tempo, corresponde a absorções deste elemento muito mais elevadas do que os teores normalmente encontrados nos alimentos e nas bebidas. Esta intoxicação está na maior parte das vezes ligada a uma poluição acidental, podendo ser fatal. Entretanto, a absorção regular de pequenas quantidades de chumbo pode conduzir a efeitos nefastos para a saúde, particularmente em indivíduos de risco. É por isso que devem ser desenvolvidos todos os esforços no sentido de se reduzir ao mínimo os efeitos associados a esse metal [10,11]. Depois de sua penetração na corrente sanguínea, o chumbo é depositado na forma de bifosfato no fígado, rins, baço, pulmões, cérebro e na medula óssea, fixando-se então nos ossos como trifosfatos [12].

Os primeiros sintomas são a dor de cabeça e muscular, fadiga, emagrecimento, obstipação, vômitos, anemia e dificuldade de concentração. Uma intoxicação maior dá seguimento à agitação, irritabilidade, perda de memória e de coordenação, vertigens e depressão. Mais aguda, dá origem a fortes dores abdominais, náuseas, vômitos, debilidade muscular e encefalopatia [13].

A legislação brasileira, a partir da portaria 518/2004 do Ministério da Saúde, determina como padrão de potabilidade a presença de, no máximo, $0,01 \text{ mg L}^{-1}$ de chumbo na água para consumo humano [14].

2.2.3 Distribuição do chumbo no organismo humano

A concentração de chumbo no sangue, denominada plumbemia, é função da absorção, armazenamento e excreção do metal no organismo. Assim, plumbemia é igual ao total de chumbo absorvido menos o total de chumbo armazenado e excretado [$Pb_{sg} = Pb_{absorvido} - (Pb_{armazenado} + Pb_{excretado})$]. No sangue, 90 a 99% do chumbo é encontrado nos eritrócitos. A natureza da ligação do chumbo nesse local ainda não está bem elucidada, mas parece que ele se liga, principalmente à proteína dos eritrócitos, notadamente a hemoglobina e, também, à membrana celular. Esta fração é denominada chumbo não difusível, ou seja, incapaz de ser distribuída pelo organismo. No plasma, traços de chumbo podem estar ligados à albumina. É no plasma, também, que se encontra a chamada fração difusível do chumbo (0,1 a 1%), ou seja, aquela capaz de atravessar as membranas biológicas e ser distribuída pelo organismo.

A forma sob a qual o chumbo circula ainda é discutível. Alguns autores afirmam que seria como fosfato plúmbico, mas a maioria dos pesquisadores acredita que o chumbo seria distribuído sob a forma de um complexo com biomoléculas, suficientemente pequeno para transpor membranas.

O chumbo segue o movimento do cálcio no organismo, depositando-se nos ossos como fosfato de chumbo, sendo que até 94% do chumbo absorvido pode ser armazenado nesse local. A concentração do chumbo nos ossos varia de acordo com a idade e o tipo de osso. Alguns autores afirmam, ainda, que o sexo também poderá influenciar na porcentagem de chumbo armazenado nos ossos. Este armazenamento ocorre na superfície inorgânica dos ossos, basicamente na matriz inorgânica da superfície óssea, formada pelos cristais de hidroxiapatita [$Ca_3(PO_4)_2CaOH$].

Acredita-se que o chumbo se ligue principalmente a dois tipos de ossos: o trabeculares e os corticais. Nos primeiros, a ligação é mais fraca podendo ser desfeita na presença de quelantes e/ou outros fatores. A $t_{1/2}$ é de 2,4 anos. A fração cortical do chumbo ósseo representa $3/4$ do total de Pb presente neste tecido e $2/3$ do total do metal no organismo. É uma fração fortemente ligada aos ossos e não é, geralmente, movimentada, mesmo com a administração de quelantes. Este tipo de armazenamento resulta de precipitação do chumbo na forma de fosfato insolúvel, deslocando o Ca^{2+} da matriz inorgânica da superfície óssea. A $t_{1/2}$ do Pb no osso cortical é, geralmente, de 9,5 anos.

A volta do chumbo ósseo para a corrente circulatória pode ser desencadeado por alguns fatores tais como a atividade osteoclástica, osteolítica, a acidose e a troca iônica.

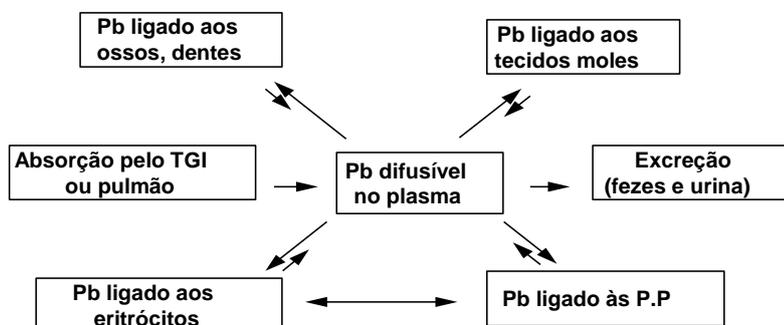
Em relação à troca iônica é importante ressaltar o íntimo relacionamento Ca-Pb. Geralmente, todo fator que auxilia na fixação ou facilita na liberação do Ca^{2+} dos ossos, exercerá igual papel em relação ao chumbo. Além disto, deve-se considerar a influência da dieta nesta troca iônica. Por exemplo, a absorção aumentada de fosfato favorece a deposição do chumbo nos ossos e a baixa concentração deste íon leva a maior concentração do metal no sangue e tecidos moles. Nos casos de indivíduos pré-expostos ao chumbo, uma absorção maior de Ca^{2+} , especialmente na ausência de fosfato, vai também aumentar a concentração sanguínea do chumbo. Isto porque o Ca pode deslocar o Pb depositado nos ossos, que no caso de exposição antiga pode ser grande. Mesmo em exposição recente, quando a concentração de chumbo nos ossos não é significativa, o cálcio vai competir pelo fosfato, logo o chumbo se depositará menos e ficará mais no sangue.

A acidose, que resulta na diminuição do pH do meio orgânico, provoca a solubilização da hidroxiapatita e, conseqüentemente, a liberação do Pb armazenado.

É importante ressaltar que, no trabalhador exposto ao chumbo, a concentração do metal nos ossos aumenta progressivamente no decorrer da exposição, enquanto a dos tecidos moles não. Assim a concentração de chumbo nos ossos reflete exposição antiga e nos tecidos moles, exposição recente. Estudos cinéticos feitos no homem indicam que o chumbo no organismo se encontra essencialmente em três compartimentos. O primeiro deles, representado pelo sangue, contém cerca de 2 mg de chumbo (pessoas não expostas ocupacionalmente), com $t_{1/2}$ de 35 dias. O segundo compartimento é composto pelos tecidos moles e contém 0,3 a 0,9 mg de Pb, cuja $t_{1/2}$ é de 40 dias. O terceiro compartimento é representado pelos ossos e contém 90% do conteúdo total de chumbo no organismo. A $t_{1/2}$ é de cerca de 2 a 10 anos. Esquematicamente, a distribuição do chumbo no organismo é a seguinte (esquema 02):

Esquema 02 – Distribuição do chumbo no organismo

Distribuição do Pb no organismo



Fonte: extraído de Baloh, 1974 IN: Cezard & Maguenoer, Toxicologie du plomb chez l'homme,1992.

O chumbo transpõe rapidamente a barreira placentária e sua concentração no sangue do recém-nascido é semelhante a da mãe. Os compostos orgânicos de chumbo não alcançam concentrações significativas no esqueleto e se distribuem mais ou menos uniformemente no organismo.

2.3 Propriedades químicas e capacidade de ligação

2.3.1 Ligações Metais-Aminoácidos

A complexação dos metais por aminoácidos basicamente se dá por reação do grupamento amino e do grupamento carboxílico com formação de anel. Nestes casos o aminoácido atua como ligante bidentado. Quando o aminoácido possui além dos grupamentos amino e carboxílico outro grupo funcional, o aminoácido pode atuar como um ligante bidentado de três formas diferentes ou como um ligante tridentado.

Quando o aminoácido possui em sua cadeia lateral outro centro reativo além do grupamento aminoácido e atua mesmo assim como um ligante bidentado, a formação do anel pode ocorrer por reação do grupamento amino e carboxílico, pelo grupamento amino e grupamento da cadeia lateral, ou pelo grupamento carboxílico e o grupamento da cadeia lateral [18,19,20].

2.3.2 Hidrólise do chumbo

A hidrólise do chumbo (II) resulta na formação de hidróxi íons mono e polinucleares; a reação de equilíbrio pode ser representada pela equação geral



Quando a hidrólise do chumbo (II) é investigada por titulação potenciométrica (meio iônico 1,0 M NaClO₄) e os dados tratados e calculados pelo programa SUPERQUAD, apresenta as seguintes espécies: Pb(OH)⁺, Pb₃(OH)₄²⁺, Pb₃(OH)₅⁺, Pb₄(OH)₄⁴⁺ e Pb₆(OH)₈⁴⁺, na faixa de pH 5,5 – 8,5. No meio iônico KNO₃, a concentração da espécie Pb₃(OH)₅⁺, em pH ~7,5 é inferior a encontrada com NaClO₄. Por exemplo, em solução de Pb²⁺ 0,0025 M, a concentração máxima de Pb₃(OH)₅⁺ obtida em 1 M KNO₃, em pH 7,2 foi apenas 3,5 % do total de chumbo comparado com 18,2 % em pH 7,7 em 1,0 M NaClO₄. As constantes de equilíbrio determinadas no meio iônico nitrato concorda com as determinadas em perclorato quando se considera a complexação de chumbo II com OH⁻ [21].

2.4 Nutrição parenteral

A nutrição parenteral pode ser definida como a administração, parcial ou total, de nutrientes necessários para a sobrevivência por via intravascular [20]. Esta inclui a administração de micro e macronutrientes, sendo capaz de fornecer todos os nutrientes importantes aos seres humanos. Os nutrientes que sofrem uma depleção rápida, como a água e os minerais, que atuam regulando o metabolismo enzimático, mantendo o equilíbrio ácido-base e na pressão osmótica, são administrados via venosa, através de uma veia menor, geralmente na mão ou no antebraço. Já as proteínas e as calorias, são administradas através de soluções concentradas, por intermédio de uma veia de grande diâmetro, geralmente subclávia ou jugular interna, que chega diretamente ao coração. Para isto, na maioria das vezes é necessário puncionar uma veia central [22,23].

2.4.1 Complicações da nutrição parenteral

O uso de nutrição parenteral total (NPT) não é isento de complicações. Além dos problemas relacionados à administração, podem ocorrer complicações metabólicas muito importantes, pois incluem o coma hiperglicêmico, devido à sobrecarga de NPT e glicose, manifestações tóxicas devido à sobrecarga de aminoácidos, bem como a “síndrome do roubo

celular”, que segundo Fischer [22], ocorre em pacientes desnutridos graves ou em jejum prolongado, quando submetidos a um suporte nutricional não balanceado. Esta síndrome gera deficiência dos oligoelementos, que são o F, Si, V, Cr, Mn, Fe, Co, Ni, Cu, Zn, Se, Mo, Sn e I, gerando sinais característicos devidos à deficiência.

Os oligoelementos essenciais à vida atuam como cofatores essenciais de enzimas e como organizadores de estruturas moleculares das células (como as mitocôndrias) e da membrana celular. Existe uma concentração ideal para estes minerais em nosso organismo. A falta gera insuficiência metabólica e o excesso pode ser tóxico. Além dos oligoelementos, a matéria viva é formada, na maior parte por outros elementos, todos correspondendo aos átomos dos números atômicos mais baixos da tabela periódica, como o H, C, N, O, Na, Mg, P, S, Cl, K e Ca. Do mesmo modo, estes também apresentam uma concentração tecidual ideal.

2.4.2 Preparo das soluções de nutrição parenteral

Estabelecidos os componentes de uma NPT, é necessário considerar, para o seu preparo, a ordem de adição e a concentração de cada íon, pois as alterações dos mesmos podem ocasionar incompatibilidades físico-químicas, que implicam na degradação irreversível de alguns componentes da solução. Também, a quantidade e multiplicidade de aditivos, injetados em um frasco, podem levar a riscos de contaminação, exigindo condições rigorosas de vigilância, controle e assepsia em todas as fases de seu preparo, para garantir esterilidade e qualidade. Atualmente, a indústria farmacêutica tem desenvolvido técnicas e equipamentos, onde uma série de soluções de aminoácidos e glicose, pré-esterilizadas, pode ser combinada assepticamente e, as soluções resultantes, se estocadas a 4 °C, podem ter uma vida média de aproximadamente três meses.

2.5 Embalagens utilizadas para armazenar soluções de NP

As embalagens utilizadas para armazenar soluções de NP podem ser de plásticos: polivinil cloreto (PVC), polipropileno (PP) etil vinil acetato (EVA) ou de vidro, sendo as embalagens de vidro mais amplamente utilizadas [31].

2.5.1 Embalagens poliméricas

As embalagens plásticas para soluções parenterais tornaram-se comercialmente disponíveis somente na década de 80. Ao contrário do vidro que é um produto inorgânico, o plástico é de natureza orgânica e polimérica. Um polímero é simplesmente uma grande molécula constituída da união de pequenas moléculas ou monômeros [32].

Os plásticos estão divididos basicamente em duas classes: termoplásticos e termorrígidos. Termoplásticos são polímeros que amolecem quando aquecidos à altas temperaturas e solidificam por resfriamento. Termorrígidos são polímeros que são somente amolecidos durante a fabricação de um artigo e solidificam permanentemente, entretanto, eles não podem ser amolecidos novamente com aquecimento. Para embalagens parenterais, polímeros termoplásticos são preferidos aos polímeros termorrígidos, devido à sua disponibilidade, reutilização e processabilidade [32].

A FDA (*Food and Drugs Administration*) tem dado uma importância em relação à avaliação e testes de materiais poliméricos. Para introduzir um plástico para uso como material na embalagem de soluções parenterais, a seguinte estrutura básica de testes deve ser considerada:

- a) Determinar procedimentos para testes biológicos e físico-químicos, a quantidade e tipos de substâncias potencialmente lixiviáveis em qualquer embalagem plástica aplicada às soluções parenterais;
- b) Determinar a integridade ou estabilidade, testando os efeitos das condições de armazenagem (tempo, temperatura, luz e umidade) e o efeito do ciclo de esterilização nas propriedades físicas, químicas e biológicas da embalagem;
- c) Realizar quaisquer outros testes e gerar uma base de dados apropriada para garantir a segurança da embalagem.

Uma vez determinado o tipo de plástico para o uso em embalagens de soluções parenterais, o próximo passo é processar o novo material para o produto final. Todas as embalagens para soluções parenterais disponíveis no mercado estão na forma de bolsas ou garrafas. As bolsas são fabricadas a partir de filmes, enquanto as garrafas são feitas num molde por sopro [33].

Na fabricação das embalagens são utilizados antioxidantes e plastificantes. No produto final devem ser feitos testes garantindo a qualidade do produto acabado.

O EVA pode conter não mais que três antioxidantes, sendo especificado os limites para cada aditivo na Farmacopéia Britânica. Dentre os principais antioxidantes usados, pode-

se citar o butil-hidroxi-tolueno (até 0,125%), a oleamida (até 0,5%), o estearato de cálcio ou de zinco (até 0,5%), o carbonato de cálcio ou hidróxido de potássio (até 0,5% de cada) e a sílica coloidal (até 0,2%) [34].

2.5.2 Embalagens de vidro

O vidro é um líquido viscoso resfriado até à condição de rigidez, sem cristalizar. É um produto da fusão de materiais cristalinos em temperaturas elevadas, caracteriza-se por não possuir uma temperatura de fusão definida. A composição básica do vidro pode ser expressa por três compostos inorgânicos: sílica (SiO_2) 73%, Na_2CO_3 14%, CaCO_3 11% [35].

Como a manufatura de vidro de sílica é muito cara devido à utilização de altas temperaturas (em torno de 2000 °C), utilizam-se os modificadores de rede que são capazes de reduzir a temperatura tornando mais viável o processo. Os modificadores de rede mais comuns são os óxidos alcalinos Na_2O , PbO , K_2O e Li_2O . O mecanismo de atuação desses átomos, nos vidros silicatos alcalinos, é a ligação iônica com o oxigênio que interrompe a continuidade da rede, uma vez que alguns átomos de oxigênio não são compartilhados entre dois tetraedros, mas ligados somente a um átomo de silício, diminuindo assim a temperatura de fusão do vidro [35].

A adição de grandes quantidades de óxidos alcalinos resulta na degradação das propriedades do vidro, tornando o vidro solúvel em água. Esta degradação pode ser diminuída pela ação de modificadores de propriedades, incluindo os óxidos de metais alcalinos terrosos. Estes vidros são denominados sodo-cálcicos, sendo adicionados óxidos como alumina (Al_2O_3) e vidros borossilicatos com a adição de óxido de boro (B_2O_3) e alumina. Estes óxidos diminuem a temperatura de trabalho do vidro e conferem maior resistência hidrolítica e a choques térmicos [35].

Corantes são usados apenas no controle final da cor do vidro como mecanismo de proteção às substâncias sensíveis à luz. Em muitos casos, corantes são óxidos de metais de transição, como os óxidos de ferro, cobalto, manganês, níquel, cromo e outros. Para promover a remoção de bolhas da fusão dos óxidos, adicionam-se os agentes finalizadores. Esses agentes incluem óxidos de arsênio e antimônio, nitratos de potássio e sódio, fluoreto de sódio, cálcio e alumínio bem como sulfatos. São utilizados em pequenas quantidades apenas para a remoção de bolhas [35].

2.6 Resinas trocadoras de íons

Resinas são partículas amorfas de matéria orgânica (poliestireno). Os trocadores de cátions contêm grupos carregados negativamente como o sulfonato ($-\text{SO}_3^-$) enquanto os trocadores de ânions grupos carregados positivamente ($-\text{NR}_3^+$) [36].

As resinas de troca iônica contêm grupos que são também, capazes de complexar íons metálicos. O mecanismo de ação pode ser através de quelação em lugar de uma simples troca iônica, e como consequência, elas se tornam muito mais seletivas. Elas são largamente usadas para separação e pré-concentração de íons metálicos [37,38,39].

Pasavento et al. [40] observaram que quando íons metálicos são sorvidos por Chelex 100 (grupo iminodiacético) de soluções aquosas, o mecanismo que prevalece é quelação com formação de complexos estáveis como no caso do cobre e do zinco, embora complexação por carboxilato prevaleça quando íons metálicos com baixa constante de complexação com iminodiacetato, tais como zinco, cádmio e cálcio estão envolvidos.

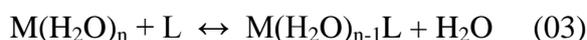
Pasavento e Biesuz [41] observaram que a presença do complexante em solução (IDA), afeta grandemente a sorção de íons metálicos (cobre II), diminuindo a fração sorvida do metal pela resina, na presença de IDA em solução; mudando isto em altos valores de pH, quando as frações sorvidas de metal tendem para o mesmo valor.

Resinas quelantes contendo grupos iminodiacético que formam complexos estáveis com íons de metais pesados, formam também complexos com o íon divalentes como cobre, chumbo, zinco, cálcio, entre outros, nos mais diversos tipos de amostras, como, por exemplo, águas e solos [40].

Resina Chelex 100 tem sido usada para determinação da capacidade de complexação de metais tri e divalentes como zinco, cádmio, níquel, cobre e alumínio [40, 42], bem como determinação de constantes de estabilidade para a formação de complexos entre o íon metálico em solução e o contra íon da resina, usando o modelo de equilíbrio de Gibbs-Donnan [41,43].

2.7 Complexos

2.7.1 Reações 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 se denominam ligantes (L), o número máximo de átomos doadores dos ligantes (n) se denomina 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 [44]. Quelante é o ligante com no mínimo dois grupos funcionais participando da formação do complexo quelato, apresentando maior estabilidade do que complexos monodentados [45].

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 [44].

2.7.2 Estabilidade dos Complexos

A estabilidade termodinâmica de uma espécie é uma medida da extensão na qual esta será formada a partir de outras espécies sob determinadas condições, desde que se estabeleça equilíbrio no sistema [46].

O conhecimento dos valores das constantes de estabilidade é de considerável importância em química analítica, pois elas fornecem informações sobre as concentrações dos vários complexos formados por um metal em dadas misturas em equilíbrio. Isto é valioso no estudo da complexometria e de vários processos de separação analítica, como os de extração por solvente, troca iônica e cromatografia [46].

A estabilidade dos complexos, do mesmo tipo, está relacionada com [46,47]:

- a) habilidade de complexação dos metais,
- b) habilidade de complexação dos ligantes,
- c) afinidade metal-ligante.

2.7.3 Habilidade de complexação dos metais

Cada íon metálico fornece uma combinação distinta de preferência geométrica de coordenação, raio iônico, troca de ligante, densidade de carga e outras propriedades que podem ser exploradas pelo ligante para complexação [48].

A relativa habilidade de complexação, para ligantes simples, principalmente aqueles contendo N e O como átomos doadores, com metais, é convenientemente descrita em termos da classificação de Schwarzenbach, que é amplamente baseada na divisão dos metais em ácidos de Lewis, ou seja, aceptores de elétrons classe A e classe B. Os metais da classe A são distinguidos pela seguinte ordem de afinidade (em solução aquosa) face aos halogênios $F^- > Cl^- > Br^- > I^-$, e formam os seus complexos mais estáveis com o primeiro membro de cada grupo de átomos doadores na tabela periódica (N, O, F). Os metais da classe B se coordenam mais prontamente com I do que com F em soluções aquosas, e formam os seus complexos mais estáveis com o segundo (ou mais pesado) átomo doador de cada grupo (P, S, Cl). A classificação de Schwarzenbach define três categorias de íons metálicos aceptores de elétrons:

1. Cátions com configuração de metais nobres. Os metais alcalinos, alcalinos-terrosos e alumínio pertencem a este grupo que exhibe as propriedades de aceptores da classe A. Na formação dos complexos predominam forças eletrostáticas, de modo que as interações entre íons pequenos de carga elevada são particularmente fortes, conduzindo a complexos estáveis.
2. Cátions com subcamadas-d completamente preenchidas. Elementos típicos deste grupo são cobre (I), a prata (I), que exibem propriedades de aceptores classe B. Estes íons tem um alto poder de polarização e as ligações formadas nos seus complexos tem caráter covalente apreciável. O complexo formados são tanto mais estável quanto mais nobre for o metal e menos eletronegativo o átomo doador do ligante.
3. Íons de metais de transição com subcamadas-d incompletas. Neste grupo tanto a classe A como a classe B tem tendências que podem ser distinguidas. Elementos com características da classe B formam um grupo aproximadamente triangular dentro da tabela periódica, com o ápice no cobre e a base estendendo-se do rênio ao bismuto. À esquerda deste grupo, os elementos em seus estados de oxidação mais elevados tendem a exhibir propriedades da classe A, enquanto a direita do grupo os estados de oxidação mais elevados de um dado elemento apresentam mais caráter da classe B [46,47].

2.7.4 Habilidade de complexação dos ligantes

Se aplicarmos o conceito ácido-base de Lewis a reação de complexação, esta reação poderá ser tomada como uma reação de neutralização. O ligante é um doador de pares eletrônicos e atua como uma base, desde que o íon metálico aceite o par de elétrons e funcione como um ácido [47].

Entre as características do ligante que são, geralmente, reconhecidas como influentes na estabilidade dos complexos em que estão envolvidos, estão [46]:

- a força básica do ligante;
- as suas propriedades de quelação (se as tiver) e
- efeitos estéricos.

O termo “efeito quelante” refere-se ao fato de que um complexo quelato, isto é, que seja formado por um ligante bidentado ou multidentado, é mais estável do que o correspondente complexo com ligantes monodentados: quanto maior o número de pontos de ligação ao íon metálico, maior a estabilidade do complexo [47].

A geometria do anel quelante é tal que anéis quelantes com 5 membros preferem íons metálicos grandes e anéis quelantes com 6 membros combinam melhor com íons metálicos pequenos, com o mínimo de tensão e comprimento de ligação metal-ligante, estabilizando o complexo formado [48,49].

O efeito estérico mais comum é o da inibição da formação do complexo devido a presença de um grupo grande ligado ou próximo ao átomo doador [46].

Cineticamente os complexos podem ser classificados em complexos lábeis e complexos inertes. O termo complexo lábil é aplicado aos casos em que a substituição nucleofílica é completa dentro do intervalo de tempo requerido para se fazer a mistura dos reagentes. O termo inerte é aplicado aos complexos que sofrem reações de substituição lentas, isto é, reações com meia-vida na ordem de hora e até dias [46].

2.7.5 Teoria HSAB (ácidos e bases/duros e moles – *Hard and Soft Acids and Bases*)

Em 1963 Pearson usou termos “Duro” e “Mole” para descrever interações entre íons metálicos (ácidos de Lewis) e ligantes (bases de Lewis). Ele 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 um partilhamento 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 partilhamento destas, havendo entre eles um aumento na covalência da ligação, 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 seus trabalhos que certos íons e ligantes dispõem de uma classificação intermediária podendo, com isso, serem capazes de interagir reacionalmente bem como ambas as espécies moles e duras.

Na prática, a teoria de Pearson de ácidos e bases duros e moles (HSAB), indica as possíveis combinações favoráveis entre íons metálicos e ligantes.

A seletividade entre íons metálicos e ligantes no meio biológico depende não somente da natureza dos dois, segundo a teoria HSAB, mas também de vários outros fatores como, por exemplo, estados de oxidação, geometria de coordenação, tamanho do íon e pH do meio [50, 51]. Estes termos descrevem, por diferentes modos, uma base cujos elétrons do átomo doador não estão fortemente presos, mas são facilmente distorcidos e removíveis. Bases duras têm propriedades opostas a estas, ou seja, o átomo doador tem baixa polarizabilidade e alta eletronegatividade, é difícil de reduzir-se e está relacionada com orbitais vacantes de alta energia que são inacessíveis [46].

Segundo a classificação de Pearson os íons metálicos, como mencionado anteriormente, podem ser divididos em 3 grupos. O primeiro grupo é a classe de metais denominados duros onde estão incluídos os elementos dos grupos IA, IIA e IIIA da tabela periódica, esses metais possuem um único estado de oxidação e, com exceção do Be e do IA, complexam fracamente ligantes orgânicos. Ao segundo grupo, pertencem os metais classificados como intermediários. Eles complexam de diferentes maneiras e mais fortemente os ligantes orgânicos do que os metais classificados como duros. Aqui estão incluídos todos os metais pertencentes à primeira série de transição do Ti ao Ga. Ao terceiro e último grupo

pertencem os metais classificados como moles que são os metais do período do Mo ao Sb e do W ao Bi, e, ainda, aqueles da série de transição da tabela periódica [52].

Na Tabela 3 estão classificados exemplos específicos de ácidos e bases, duros e moles [50].

Tabela 03 - Ácidos e bases, duros e moles.

	Ácidos	Bases
Duros	H^+ , Li^+ , Na^+ , K^+ , Mg^{2+} , Ca^{2+} , Mn^{2+} , Al^{3+} , Ln^{3+}	H_2O , ROH , NH_3 , RNH_2 , RCO_2^- , Cl^- , F^- , PO_4^{3-} , HPO_4^{2-} , $H_2PO_4^-$
Intermediários	Cr^{3+} , Co^{3+} , Fe^{3+} , VO^{2+} , MoO^{3+} , Fe^{2+} , Co^{2+} , Ni^{2+} , Cu^{2+} , Zn^{2+} , Pb^{2+} , Sn^{2+} , SO_2 , NO^+ , Ru^{2+}	SO_4^{2-} , Imidazol, pyridine
Moles	Cu^+ , Ag^+ , Au^+ , Tl^+ , Hg^+ , Cd^{2+} , Pd^{2+} , Pt^{2+} , Hg^{2+}	RSH , R_2S , CN^- , I^- , $S_2O_3^{2-}$

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: nitrogênio, oxigênio e flúor, enquanto que os aceitadores da classe B preferem ligar-se a bases moles, como átomos doadores P, As, S, Se, Cl, Br, I. Um exame dos aceitadores da classe A, mostra que eles têm as seguintes características importantes: tamanho pequeno, estado de oxidação positivo elevado e ausência de elétrons mais externos que sejam facilmente excitáveis a estados mais elevados. Estes são todos fatores que 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 [46].

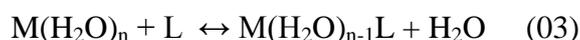
De um modo geral, pode-se correlacionar a capacidade de complexação dos metais pelo enunciado: “Os ácidos duros preferem se associar com as bases duras e os ácidos moles com as bases moles”. Este princípio não deve ser encarado como exclusivo, isto é, sobre condições adequadas, ácidos moles podem complexar com bases duras ou ácidos duros com

bases moles resultando, entretanto em complexos de baixa estabilidade, uma vez que ambos os componentes são incompatíveis [46,50].

Uma das melhores ilustrações desta teoria em química bioinorgânica é a formação dos complexos de proteínas de baixo peso molecular, (30-35% dos aminoácidos desta classe de pequenas proteínas são resíduos de cisteína) através de grupos sulfidríla que complexam fortemente metais como Cd^{2+} , Hg^{2+} , Pb^{2+} e Tl^{2+} [52].

2.8 Constante de estabilidade (β)

A reação de formação de complexos pode ser expressa como:



“Constante geral de estabilidade” (β) é meramente a constante de equilíbrio para formação de um complexo em particular, a partir dos componentes apropriados M e L [5], podendo ser representada por:

$$\beta = \frac{[\text{M}(\text{H}_2\text{O})_{n-1}\text{L}]}{[\text{M}(\text{H}_2\text{O})_n][\text{L}]} \quad (04)$$

sendo, no equilíbrio: $[\text{M}(\text{H}_2\text{O})_{n-1}\text{L}]$ = concentração do complexo formado

$[\text{M}(\text{H}_2\text{O})_n]$ = concentração do íon metálico

$[\text{L}]$ = concentração do ligante

Medidas de variação da concentração livre de somente uma espécie com a composição geral da solução podem em princípio, levar a valores da constante de estabilidade [5].

Variação de propriedades adequadas com a composição da solução pode, entretanto, ser exploradas para dar informações sobre os complexos que são formados. Por exemplo, medidas potenciométricas podem ser designadas de maneira que sua f.e.m. forneça uma medida da concentração do íon metálico não complexado [5].

Na formação sucessiva de complexos de índice de coordenação superior a unidade, se tem as seguintes reações e constantes:



As constantes K_1 , K_2 e K_3 são denominadas constantes sucessivas de formação dos distintos complexos. O subíndice nos indica de forma clara a etapa de complexação, bem como o número de ligantes unidos ao metal no complexo [53].

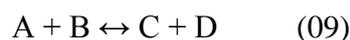
Às vezes é conveniente utilizar as constantes globais de formação (β), que para o complexo ML_3 é dada pela relação [44]



2.8.1 Influência da força iônica sobre a constante de equilíbrio

Constantes de equilíbrio para formação de complexos em solução a uma dada temperatura são usualmente representadas em função do cociente de atividade (constante de estabilidade termodinâmica), que deveria ser independente do meio iônico, ou em função do cociente de concentração (constante de estabilidade estequiométrica), que são válidas somente em uma solução de composição particular. Se a constante de estabilidade estequiométrica for determinada na presença de um grande excesso de um eletrólito forte inerte e as soluções em estudo forem bastante diluídas, pode ser assumido que os coeficientes de atividade são independentes da concentração das espécies reagentes e dependem somente da natureza e concentração do eletrólito principal. Constantes de estabilidade estequiométricas obtidas sob estas condições são também quantidades termodinâmicas, referentes ao estado padrão no qual todos os coeficientes de atividade são unitários. Contudo, em respeito ao uso convencional, o termo constante de estabilidade termodinâmica se refere ao cociente de atividade [54].

Se no tratamento matemático do equilíbrio químico se utilizar a constante termodinâmica, K_1 , esta não se modifica com a força iônica, já que é constante e independente dos fatores de atividade. Entretanto a constante de equilíbrio K , não termodinâmica, está relacionada com K_1 pelos coeficientes de atividade das espécies que interferem no equilíbrio. Para a reação: [44]



a relação entre K e K_1 é:

$$K_1 = \left[\frac{\gamma_C}{\gamma_A} \quad \frac{\gamma_D}{\gamma_B} \right] \cdot K \quad (10)$$

Sendo K_1 constante, só será K , se o termo correspondente aos coeficientes de atividade o for.

Se numa reação química houver só espécies moleculares, não carregadas, os coeficientes de atividade são unitários, e a constante de equilíbrio será igual a termodinâmica; não dependendo da força iônica do meio [44].

A adoção do assim chamado método do meio iônico constante, valores dos coeficientes de atividade podem permanecer efetivamente constantes. De acordo com este método, um grande excesso de um sal, eletrólito de baixa valência é adicionado a solução sob investigação (ex. NaCl, NaClO₄ ou KNO₃). Estes íons monovalentes, que são escolhidos serem inertes dentro do possível, dominam a força iônica da solução e o conjunto de coeficientes de atividade para todos os íons e moléculas formados nos sistemas sob investigação serão constantes. Na prática, isto se mantém enquanto a concentração equivalente dos compostos investigados não excederem a ~10 % da concentração do eletrólito suporte. Isto corresponde ao limite superior de uma “janela” experimental, na qual os coeficientes de atividade podem ser incorporados ao valor de β , e na qual concentrações químicas podem ser usadas no lugar das atividades [55].

Constantes condicionais (determinadas neste trabalho) sofrem efeito do meio, portanto dependem do solvente usado, da força do meio, da temperatura e englobam a dissociação da água [47].

2.8.2 Interação metais-aminoácidos

A capacidade dos aminoácidos de formarem complexos metálicos não é somente de importância teórica, mas também prática, estando relacionada não só a presença dos grupos amino e carboxílico, mas também ao grupo funcional constituinte da cadeia lateral. Entretanto, como os grupos são diferentes em sua natureza, a capacidade dos aminoácidos se ligarem a metais também é diferente. Por exemplo, os grupos R-OH, R-NH₂, RCO₂ podem ser classificados como ligantes duros, enquanto que os grupos R-SH, R₂S podem ser classificados como moles. Com isso, os aminoácidos não podem ser classificados de uma única maneira e estão aptos a combinarem-se de diferentes formas com diferentes íons metálicos [25].

O primeiro complexo preparado entre um metal e um aminoácido foi obtido em 1854 por Gossman, através da reação do cobre com a leucina, seguido pela complexação de cobre com a glicina [56].

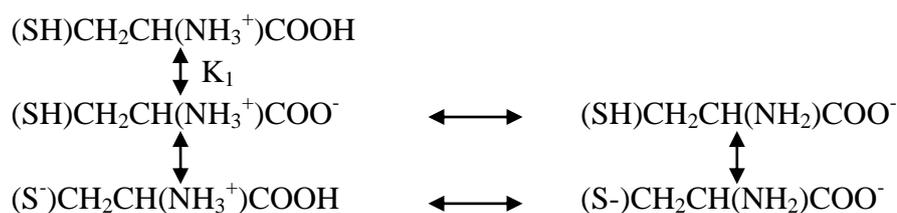
Li e Doody através de polarografia, condutometria e espectrofotometria estudaram a formação de complexos de prolina, alanina, leucina, metionina, glicilglicina com cobre e zinco [57].

Albert usando titulação potenciométrica determinou as constantes de estabilidade de complexos formados entre os metais cobre e níquel, com os aminoácidos ornitina, glicina, ácido diaminobutírico e ácido diaminopropanóico [58].

2.8.2.1 Interação cisteína-metais

A cisteína tem três prótons dissociáveis (sítios de ligação) (anexo 01). A dissociação do próton a partir do grupo carboxílico ocorre em baixos valores de pH ($pK_1 = 1,71$). A dissociação dos outros dois prótons dos grupos $-SH$ e NH_3^+ tem pK_s 8,33 e 10,78, respectivamente [56]. E podem ser representados pelos seguintes passos [59]:

Esquema 03



Uma característica da desprotonação da cisteína está na dificuldade de designar o grupo envolvido nos dois passos de equilíbrio mais básicos. Os modos de ionização estão descritos no esquema 03 acima, que tem sido discutido por várias décadas. Atualmente é aceito que a ionização da cisteína ocorra simultaneamente a partir dos grupos SH e NH_3^+ [60].

Durante a formação de complexos entre a cisteína e os metais cobre, cobalto e ferro, há formação de cistina, dificultando a determinação das constantes de estabilidade dos complexos formados, devido a capacidade da cisteína de oxidar metais que apresentam mais de um estado de oxidação [56].

O aminoácido cisteína pode sofrer oxidação se transformando em cistina. Em virtude desta tendência de sofrer oxidação, a hidrólise de uma proteína onde a cisteína estiver normalmente presente, conduz sob condições normais, ao isolamento final de cistina em vez da forma reduzida do aminoácido [56,61].

Çakir e colaboradores [62] estudaram a complexação de cisteína com o íon Cu^{2+} através de polarografia, usando voltametria de onda quadrada.

Quimicamente, grupos tióis diferem unicamente de outros grupos funcionais por serem prontamente oxidados para formar dissulfetos, especialmente na presença de uma grande variedade de metais em níveis traços, tais como Fe^{2+} , Co^{2+} e Mn^{2+} [63]. Para a complexação de cisteína com íons metálicos divalentes Disbudak e colaboradores [64] encontraram a seguinte ordem de afinidade metal-ligante em função das constantes de estabilidade obtidas $\text{Cd(II)} > \text{Pb(II)} > \text{Cu(II)}$. Ordem esta que está de acordo com o previsto pela teoria de Pearson, pois o Cd(II) é classificado como um ácido mole, apresentando maior afinidade pelo $-\text{SH}$ (base mole) da cisteína do que o Pb(II) e o Cu(II) , que são intermediários [48].

Dolinska [65] observou que o aminoácido cisteína combina com Zn(II) para formar complexos sólidos na faixa de concentração de 4 a $90 \mu\text{mol L}^{-1}$, possuindo três sítios de ligação com o metal, sendo que o complexo (1:1) formado entre Zn(II) e cisteína é de média estabilidade com $\log \beta = 2,23$. Na formação de complexos cisteína-zinco (1:2), dois anéis quelantes de cinco membros coordenados com o metal são formados, cada anel envolvendo enxofre e nitrogênio, enquanto o grupo carboxílico está livre [66]. A cisteína pode atuar como um ligante tridentado para o chumbo, os sítios de ligação envolvendo grupos enxofre, amino e carboxílico. Esta pode ser a razão da maior estabilidade dos complexos de chumbo que de zinco. A prata é outro metal que forma mercaptídeo insolúveis com cistina ou cisteína e que possui a capacidade de causar a redução da cistina [56,58].

2.8.2.2 Interação N-acetilcisteína-metals

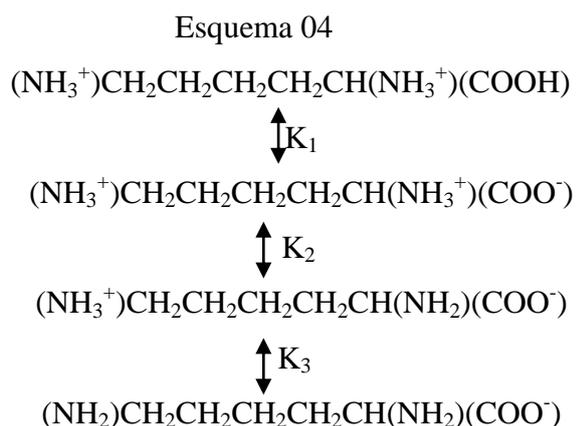
A N-Acetil-Cys contém grupos tióis em sua estrutura (anexo 01) e também é utilizada como antioxidante em condições de estresse oxidativo [67]. Sabe-se que a N-Acetil-Cys pode estimular a síntese de glutathiona [67] e proteger os tecidos contra a peroxidação lipídica [68].

Vários estudos têm indicado que a N-acetilcisteína também possui atividade quelante com relação a diversos metais pesados [69].

A utilização da N-Acetil-Cys como agente antioxidante ou quelante, entretanto, requer certos cuidados, já que Ritter e colaboradores [70] descreveram que o uso da N-Acetil-Cys pode ter algumas limitações e apresentar efeitos pró-oxidantes, devido à facilidade com que interage com o ferro.

2.8.2.3 Interação lisina-metais

O aminoácido lisina apresenta três hidrogênios ionizáveis (anexo 01), correspondendo ao grupo carboxílico, e a dois grupos amino, com pKs a 25 °C de 2,20; 8,90 e 10,28, respectivamente [56]. Os passos de dissociação estão representados no esquema 04:



A lisina contém na cadeia lateral o grupo amino, que é potencialmente apto a coordenar íons metálicos, podendo atuar como ligante tridentado [71]. Tem sido mostrado que sais de cobre de lisina envolvem principalmente ambos os grupos aminos e com pequena extensão o α -amino com o grupo carboxílico [56,72], o que foi comprovando através de dados de titulação potenciométrica publicados por Albert [58].

A lisina pode complexar com alguns íons metálicos, como V(III) [72] e Fe(III) [73].

A cadeia lateral do grupo amino do aminoácido lisina é um grupo doador para coordenação de oligopeptídeos e proteínas com íons metálicos. Dados da literatura neste tópico são crescentes, mas habilidade real deste grupo para participar da formação de complexos metálicos é ainda uma questão discutida. Não tem sido observado evidências de ligação $-\text{NH}_2$ -metal, cadeia lateral, para complexos Cu(II)/Lys e Ni(II)/dipeptídeos [74,75]. De outro modo, recentes investigações [76,77] do equilíbrio de formação de complexos de oligopeptídeos contendo Lys com íon Cu(II), sustentam a hipótese de que o grupo $-\text{NH}_2$ do aminoácido Lys interage com cobre, mas somente em pH alcalino. A desprotonação do $-\text{NH}_2$ (e subsequente interação com cobre) não foi encontrada em pH neutro, assim sustentando a hipótese que, sob condições fisiológicas resíduos protonados de Lys de metalo-peptídeos podem agir como “âncora” para receptores biológicos. Sharma [78], obteve as constantes de estabilidade dos complexos formados entre L-lisina e os metais divalentes, Zn(II), Cd(II) e Hg(II). A tendência nas estabilidades destes 1:2 complexos metálicos foi encontrado ser

Zn(II) > Hg(II) > Cd(II). O Cd(II) e o Hg(II) são classificados como ácidos moles segundo a classificação de Pearson [50] e o Zn(II) como intermediário, isto explica a ordem encontrada por Sharma, pois a lisina apresenta os grupos amino (base dura) e carboxílico (base dura) em sua molécula, possuindo, portanto mais afinidade pelo ácido intermediário do que pelos ácidos moles.

Albert [58] através de dados de titulação potenciométrica, obteve constantes de estabilidade para complexos formados entre aminoácidos a íons metálicos alguns valores obtidos estão mostrados na Tabela 04.

Tabela 04 - Constante de estabilidade como log K de complexos de aminoácidos divalentes com metais [48]

aminoácido	Cu ²⁺	Ni ²⁺	Zn ²⁺	Co ²⁺	Fe ²⁺	Mn ²⁺	Mg ²⁺
Cisteína	-	19,3	18,2	-	6,2 ^a	4,1	2
Ornitina	13,0	8,3	6,9	6,3	5,0 ^a	< 2	-
Lisina	13,7	8,8	7,5	6,8	4,5 ^a	2	-

^a Valores somente do log de K_(ML), insolubilidade do complexo interfere na determinação do log K₂.
K é a constante geral de estabilidade dos complexos formados.

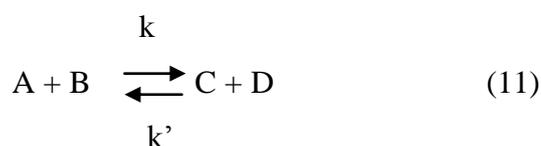
2.9 Princípios básicos para determinação de constantes de estabilidade

Constantes de estabilidade podem ser determinadas por métodos cinéticos e por métodos de equilíbrio, usando as variáveis discutidas a seguir.

Método cinético: em poucos casos, onde as velocidades de formação e dissociação de complexos são suficientemente lentas para serem medidas experimentalmente, a constante de estabilidade pode ser obtida a partir da relação de Guldberg e Vaage,

Constante de equilíbrio = constante de velocidade da reação direta / constante da velocidade da reação reversa = $\frac{k}{k'}$

desde que a solução contenha somente uma espécie considerada, que seja formada na etapa determinante de velocidade. Assim a razão entre as constantes de velocidade direta e reversa da reação:



fornece a constante geral de estabilidade (β_n)

A velocidade de formação de um complexo está relacionada com a estrutura eletrônica do grupo central, e reações lentas (mensuráveis) são restritas principalmente aos complexos de íons de metais de transição. Embora a aproximação cinética possa, em princípio, ser usada para o estudo destes sistemas, métodos de equilíbrio são geralmente mais convenientes [47].

Método do equilíbrio: um grande número de sistemas de complexos atinge rapidamente o equilíbrio em temperaturas ordinárias e podem ser estudados mais convenientemente pelo método do equilíbrio. Este método pressupõe a determinação de variáveis de concentração através de propriedades coligativas ou outras propriedades físicas, tais como espectros de absorção ou medidas de condutividade, os quais dependem de variáveis intensivas de várias espécies presentes [47].

2.9.1 Método de obtenção de constantes de estabilidade

Vários métodos podem ser usados para determinação da concentração com razoável exatidão, de pelo menos uma das espécies no equilíbrio, que junto com a composição analítica da solução experimental pode levar a determinação de constantes de estabilidade [79].

Métodos para medidas de constantes de estabilidade podem ser classificados de acordo com a natureza das espécies existentes, ou não, em mais de uma fase [5]. Alguns métodos utilizados na determinação de constantes de estabilidade estão citados na tabela 05.

Tabela 05 - Métodos para determinação de constantes de estabilidade [79].

Potenciometria
Espectrofotometria
Espectroscopia de ressonância magnética nuclear
Polarografia
Troca iônica
Condutividade iônica
Distribuição entre duas fases
Cinética de reação
Medidas de pressões parciais
Solubilidade
Eletroforese
Eletroforese capilar

Medidas de solubilidade de um sólido pouco solúvel em solução aquosa de um agente complexante é um dos métodos mais antigos para o estudo de equilíbrio em solução. O método tem sido aplicado ao estudo do equilíbrio em misturas de solventes aquoso-orgânicos

e em sistemas saturados com respeito a líquidos ou gases pouco solúveis. Se um complexo formado em solução aquosa for eletricamente neutro, ele pode ser parcialmente extraído por um solvente orgânico imiscível. A determinação do efeito da concentração do ligante livre no equilíbrio de partição permite em princípio, o cálculo da constante de estabilidade do complexo formado na fase aquosa [54].

Estudos de absorção de radiação no visível e ultravioleta têm sido usados para obter informações sobre equilíbrios em solução. As mudanças de energia que são estudadas em diferentes regiões do espectro são de diferentes tipos: nuclear, eletrônico ou mudanças moleculares, os vários ramos da espectroscopia dão informações sobre a concentração de espécies constituintes do sistema em estudo [54]. Medidas espectrofotométricas podem ser difíceis de interpretar, já que a absorvidade molar é a soma das absorvidades molares de todas as espécies que absorvem radiação no λ usado. Porém, se a adição do ligante ao íon metálico resultar em uma mudança significativa na absorvância, devido a formação de um único complexo, a concentração desta espécie pode ser determinada espectrofotometricamente e levar então a obtenção de constantes de estabilidade [5].

A polarografia [80] é usada em sistemas nos quais o íon metálico pode ser reversivelmente reduzido no eletrodo de mercúrio gotejante, mas alguns sistemas podem ser melhor estudados potenciométricamente pelo uso de eletrodo de amálgama [5]. Análises polarográficas são baseadas nas curvas características, corrente-voltagem (polarogramas) para soluções diluídas (10^{-6} a 10^{-12} mol L⁻¹) [54]. A formação de complexo resulta em uma mudança no potencial de redução do íon para valores mais negativos, pois íons complexos resistem a redução eletrolítica mais efetivamente que íons simples [81].

O uso de troca iônica para a determinação de constantes de estabilidade é mais difícil do que a distribuição entre fases líquidas, exceto para casos especiais, onde o único cátion formado seja o íon metálico livre. A quantidade de metal sorvida na resina só pode ser obtida pela diferença entre a quantidade inicial e final em solução [5]. Pasavento e Biasuz determinaram constantes de complexação para adsorção de Cu(II) em resina IDA [41].

O método de Gulberg e Waage para determinação da constante de estabilidade de um complexo BAn pressupõe a medida da velocidade de formação do complexo. Se uma ou mais das espécies BAn ($n \geq 0$) ou A reagem espontaneamente permitindo uma medida da velocidade de formação do complexo, ou determinação da velocidade de decomposição do mesmo como uma função das concentrações de A e B [54], é possível chegar às constantes de estabilidade dos complexos.

Eletroforese em papel foi usada por Tewari [82] para determinação de constantes de estabilidade dos complexos formados entre os metais Fe(III) e Cr(III), e metilcisteína, através de medidas da mobilidade eletroforética.

Eletroforese capilar é um método com aplicação na determinação de constantes de estabilidade relativamente novo, como mostra Havel et al. [83] na determinação de constantes de estabilidade para complexos do sulfato com metais alcalinos e alcalinos terrosos. O cálculo de constantes de estabilidade envolvendo eletroforese capilar se baseia no efeito causado sobre a migração eletroforética de um íon, quando o mesmo sofre complexação.

2.9.2 Titulação potenciométrica

A potenciometria é uma das mais convenientes e úteis técnicas empregadas para a avaliação de complexos metálicos no equilíbrio. Embora medidas de concentração de íons metálicos possam ser feitas com eletrodos específicos para íons, ou com eletrodos metálicos, é usual o emprego do eletrodo de vidro de alta exatidão para medidas da concentração do íon hidrogênio em um procedimento de titulação potenciométrica. Neste procedimento, uma solução padrão de uma base é adicionada em incrementos a uma solução ácida bem caracterizada do ligante na ausência e na presença de uma conhecida concentração do íon metálico. Na maioria dos casos, o pH varia entre 2 e 12, durante tempo no qual 50-100 leituras de equilíbrio são obtidas, constituindo a curva de equilíbrio potenciométrico [79].

Uma grande vantagem do uso de medidas com eletrodos íon-seletivo, é que uma série de dados pode ser facilmente coletada através de titulações. A partir da composição analítica inicial, mudanças parciais com adições da base feitas com auxílio de uma bureta [55], permitem a determinação da atividade dos íons em solução [84].

A determinação de constantes de equilíbrio de complexos metal-ligante em meio aquoso, requer primeiro o conhecimento, com grande exatidão, do pK_w específico para a temperatura e meio iônico usado. Este valor pode ser obtido durante a calibração do eletrodo, trabalhando no intervalo de pH dentro do qual a resposta do eletrodo de vidro é rigorosamente Nernstiana. O segundo estágio é a determinação da interação do ligante com o próton e do metal com o ânion hidroxila. Nos metais com a interação hidróxido-metal fraca, a mesma pode ser negligenciada, uma vez que o uso das constantes de hidrólise disponíveis na literatura pode acarretar erros insignificantes de cálculo [85].

As medidas potenciométricas do íon hidrogênio podem ser empregadas para cálculo de constantes de estabilidade, quando a formação do complexo for sensível à concentração do

íon hidrogênio, isto é, o grau de formação apresentar mudanças mensuráveis conforme o pH for mudado [79].

O perfil de pH obtido para o ligante sozinho é usado para calcular a constante de protonação do ligante. Um ou mais perfis de pH, quando necessário, são medidos para o sistema contendo uma ou mais razões molares de metal/ligante. Quando este é uma competição aproximada entre o número de grupos doadores efetivos do ligante e o número de coordenação (em solução) do íon metálico, uma razão molar 1:1 é usualmente suficiente. O perfil de pH assim obtido é empregado para calcular a constante de estabilidade do complexo formado em solução, como descrito por exemplo por Martell e Motekaitis, usando o programa computacional BEST[®] [79].

O programa BEST[®] refina constantes de estabilidade pelo ajuste iterativo não linear dos mínimos quadrados das curvas de equilíbrio através de um conjunto de equações de balanço de massa simultâneas para todos os componentes expressos em termos de constantes de equilíbrio conhecidas e desconhecidas. Com o uso apropriado do programa é possível obter um alto grau de discriminação na seleção de espécies químicas [86].

O programa computacional BEST[®] tem sido usado para determinação de constantes de estabilidade, através de dados obtidos nas titulações potenciométricas do ligante e do ligante mais o íon metálico, em solução com força iônica constante, com uma base forte; dentre os trabalhos publicados usando o referido programa estão:

- Li e Martell [86]: determinação das constantes de estabilidade de complexos formados entre íons metálicos divalentes (Pb^{2+} , Cd^{2+} e Ni^{2+}) e os trivalentes (Ga^{3+} , In^{3+} e Al^{3+}) com 2-mercaptoetilamina (MEA),
- Chen et al. [87]: determinação das constantes de equilíbrio para a formação de complexos entre Fe(III) e sorbitol,
- Inoue et al.[88]: determinação das constantes de estabilidade de complexos formados entre o dissociado ácido epigallocatequina galato e Al^{3+} ,
- Gholivand et al [89]: determinaram a constante de equilíbrio para os complexos formados entre xilenol orange e íons alcalinos terrosos (Mg^{2+} , Ca^{2+} , Sr^{2+} e Ba^{2+}) e o Al^{3+} .

2.9.3 Método Scatchard

Existem vários caminhos para linearizar dados que fornecem a relação entre quantidades de uma dada substância combinada e livre em solução, os diagramas Scatchard (mais precisamente atribuído a Rosenthal) são frequentemente usados para este fim [90]. Um

gráfico de $[PA]/[A]$ (concentração do componente A ligado sobre concentração do componente A livre) versus $[PA]$, terá uma inclinação de $-K$ (constante de equilíbrio do complexo formado PA) e é chamado diagrama de Scatchard [36]. Como mostra a Figura 01:

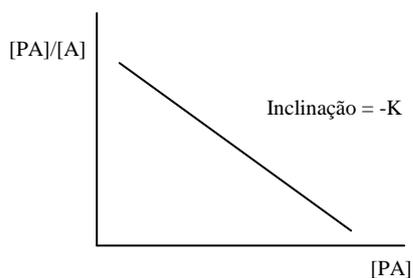


Figura 01 - Gráfico de Scatchard

Abate e Masini [84,91] usando o diagrama Scatchard determinaram as constantes de estabilidade de complexos formados entre ácidos húmicos e os metais: cobre, chumbo, cádmio e zinco.

O método Scatchard tem sido usado por vários pesquisadores para determinação de constantes de estabilidade de complexos formados entre Cu^{2+} e diferentes ligantes [92-95].

Embora o diagrama de Scatchard seja muito útil para visualização dos dados, não é o caminho mais exato para análise de dados. O problema é que a transformação linear distorce os erros experimentais [90].

2.9.4 Cálculo de constantes de estabilidade

Se o sistema puder ser descrito por somente um ou dois parâmetros, métodos gráficos podem ser usados no cálculo de constantes de estabilidade. Métodos gráficos são de dois tipos principais [5]:

- 1) Método linear: até dois parâmetros podem ser obtidos de um único gráfico. O valor médio de β pode ser encontrado convenientemente a partir do gráfico linear $\log [\alpha/(\alpha-1)]$ versus $\log a$, que fornece uma linha reta de intercepção $\log \beta$.
- 2) Método de ajuste de curva: usualmente baseado no gráfico semi-logarítmico envolvendo uma variável normalizada. Se um único complexo for formado, a curva n e $\log a$ (α) é de forma única. O valor de β pode ser obtido por combinação de pontos experimentais com a curva teórica n e $\log a$ (α) [5,54].

Onde: n = número médio do ligante complexado

a = concentração do ligante livre no equilíbrio

α = fração do metal complexado

O desenvolvimento de métodos computacionais para processamento de dados de equilíbrio, provendo mais exatidão e rapidez nos cálculos de constantes de estabilidade, representou um grande avanço nesta área. Constantes de estabilidade podem ser usadas, com a ajuda de programas computacionais apropriados para elucidação de espécies moleculares e iônicas presentes em meios biológicos e sistemas ambientais [79].

Muitos programas computacionais para cálculo de constantes de estabilidades são usados e citados na literatura, como SPECFIT 209 V [96], Hyperquad [97], CELET [83], BEST[®] [98] e PSEQUAD [99]. O programa BEST é um programa computacional FORTRAN para computação de dados das curvas de titulação potenciométrica. Devido a ser interativo ele é uma ferramenta poderosa para computação de constantes de estabilidade com algum grau prático de complexidade. Nesta consideração o BEST[®] é usado para minimizar o desvio padrão do ajuste (σ – sigfit), entre os valores de pH observados e calculados de toda a curva de titulação. Esta minimização é executada manualmente ou com variação automática da constante de estabilidade selecionada. O refinamento de constantes de estabilidade é um processo por meio do qual o computador ajusta um parâmetro ou alguns parâmetros com um algoritmo programado com o propósito de obter o melhor ajuste possível dos mínimos quadrados entre os dados observados e os dados obtidos. A boa qualidade do ajuste é medida por σ_{fit} que é uma medida da soma ponderada do quadrado da diferença entre pH_{obs} – pH_{calc} e o objetivo é minimizar σ_{fit} através do refinamento dos parâmetros [79].

$$\sigma_{\text{fit}} = \left(\frac{\sum w(\text{pH}_{\text{obs}} - \text{pH}_{\text{calc}})^2}{\sum w} \right)^{1/2} \quad (12)$$

onde: w = fator ponderante, dado pela equação,

$$w = \left(\frac{1}{(\text{pH}_{i+1} - \text{pH}_{i-1})^2} \right) \quad (13)$$

i = Número do componente da titulação.

O programa computacional BEST[®] foi usado no presente trabalho para tratamento dos dados obtidos experimentalmente através de titulações potenciométricas de soluções do ligante e soluções do ligante mais o metal, com o objetivo de obter as constantes de estabilidade dos complexos formados em solução aquosa.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Instrumentação

- Espectrômetro de absorção atômica com atomizador por chama e com atomizador eletrotérmico em forno de grafite novAA300 e Zeenit 600 com amostrador automático MPE60, respectivamente (AnalytikJena)
- potenciômetro digital (modelo 827 pHlab, Metrohm, Suíça)
- Balança analítica Sartorius com quatro casas decimais
- Chapa de aquecimento – IKAMA G[®] RET-GS
- agitador magnético de bancada – IML Labor Labortechnik, tipo THYS
- Câmara de fluxo laminar – Trox do Brasil, classe 100
- Frascos plásticos de 13 mL com tampa
- Frascos plásticos de 40 mL com tampa
- Frascos plásticos de 100 mL com tampa
- Banho termostático Julabo U3 (25 -37 °C) (Alemanha)
- Bureta automática - Dosimat 665 com teclado para programação (Metrohm, Suíça)
- Célula para titulação potenciométrica de acrílico com tampa de nylon (Santa Maria, Brasil)

3.2 Reagentes e Soluções

Todos os reagentes utilizados foram produtos de qualidade para análise e a água utilizada para o preparo das soluções foi purificada em sistema de Milli-Q (resistividade de $18,2 \Omega \text{ cm}^{-1}$). As soluções dos aminoácidos, bem como, as soluções padrões de chumbo e KOH foram armazenadas em recipientes plástico que foram antes do uso, submetidos ao processo de descontaminação descrito no capítulo 3.3.

Os reagentes utilizados para o desenvolvimento deste trabalho estão listados na Tabela 06.

Tabela 06 – Lista dos reagentes utilizados para o desenvolvimento do trabalho

Reagentes	Fabricante
Ácido nítrico destilado	Merck
Hidróxido de sódio	Merck
Ácido clorídrico	Merck
Etanol	Synth
Resina catiônica Dowex 50 x 4 (50 – 100 mesh)	Fluka
Nitrato de chumbo	Sigma
Cisteína	Merck
N-acetilcisteína	Sigma
Lisina	Sigma
KCl	Merck
KNO ₃	Merck

3.3 Cuidados com a contaminação

Durante todas as etapas deste trabalho, foi utilizado apenas material plástico (polietileno, polipropileno), a fim de evitar contaminação com Chumbo e outros metais provenientes do vidro.

Esses materiais foram armazenados em soluções alcoólicas de HNO₃ 10% (v/v), por 48 horas antes do uso. Após este período, o material foi lavado com água Milli-Q em abundância, estando assim pronto para o uso.

Sempre que necessário, foi usada a câmara de fluxo laminar, que foi ligada, pelo menos meia hora antes do início dos trabalhos.

3.4 Quantificação do chumbo em embalagens comerciais de solução de nutrição parenteral (NP) utilizando Espectrometria de Absorção Atômica por Forno de Grafite (GFAAS)

Apesar dos vidros usados para armazenar medicamentos possuírem uma elevada resistência hidrolítica, não se deve assumir que vidros em geral não são solúveis em soluções aquosas. Estes vidros podem se dissolver se expostos às soluções alcalinas, havendo a

dissolução da superfície do vidro pelo ataque às ligações químicas. Quando em contato com soluções ácidas é favorecida a troca de íons metálicos do meio para o vidro e vice-versa [100].

Para determinar a concentração de chumbo livre que migra da embalagem de vidro, bem como, das tampas de borracha em que as soluções NP são armazenadas, soluções dos aminoácidos em estudo foram preparadas (100,0 mL), separadamente, nas concentrações usuais encontradas nas soluções de NP, bem como ajustados os valores de pH de acordo com o descrito na embalagem da mesma (5,5-6,0). Nos ensaios de contato das soluções dos aminoácidos estudados, separadamente, com partes da embalagens das soluções de NP (embalagem de vidro inteira, embalagem de vidro triturada, tampas de borracha e EVA). As soluções dos aminoácidos foram colocados em contato com a embalagem de vidro, com o vidro triturado da embalagem, com as tampas de borracha cinza e vermelha trituradas e EVA (etilvinil acetato) triturado. Alíquotas de 1,0 mL eram retiradas em intervalos de tempo de contato de: 0 (logo após o processo de esterilização (4 h em estufa a 120 °C)); 4; 6; 12; 16 e 19 semanas e a concentração de chumbo medido por AAS. A Tabela 07 resume os dados utilizados nos ensaios de contato.

Tabela 07 - Ensaios para quantificação do chumbo extraível em embalagens comerciais de solução de nutrição parenteral (NP) utilizando Espectroscopia de Absorção Atômica por Forno de Grafite (*GFAAS*)

Aminoácido (g L ⁻¹)	Espécie da embalagem (concentração)
Cisteína (0,52)	Vidro triturado (14,613g/100 mL)
N-acetilcisteína (0,52)	Embalagem de vidro- 250 mL
Lisina (8,51)	Borracha vermelha (3 g/50 mL)
	Borracha cinza (3 g/25 mL)
	EVA (3 g/50 mL)

3.5 Estudo da interação do chumbo com os aminoácidos cisteína, N-acetilcisteína e lisina através do uso de resina catiônica

O estudo foi feito em batelada, e constituiu em colocar certa quantidade de resina catiônica de interesse em contato com a solução em estudo, sob mesa agitadora na temperatura ambiente. A escolha dos aminoácidos se deveu à sua estrutura, ou seja, a cisteína e n-acetilcisteína pela presença do grupo tiol que favorece a formação de complexos com

metais pesados e a lisina por conter sítios ativos diferentes da cisteína e n-acetilcisteína, além da importância bioquímica que os mesmos possuem.

3.5.1 Preparo da resina catiônica

Antes do preparo da resina, a mesma foi descontaminada com solução alcoólica de HNO_3 10% (v/v), conforme descrito no item 3.3.

Resina catiônica na forma Pb^{2+} : 5 g de resina descontaminada foram condicionadas, em coluna, com 500 mL de solução de $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ 0,5 M, numa vazão de 2 mL/min. Após a resina foi lavada com água Milli-Q até o descarte não acusar a presença de chumbo por reação com dicromato de potássio.

3.5.2 Interação dos agentes complexantes com a resina na forma Pb^{2+}

Para verificar a capacidade dos agentes complexantes em extrair chumbo da resina catiônica, soluções de agentes complexantes listadas na Tabela 08 foram colocadas em contato, sob agitação mecânica, com uma massa de resina na forma Pb^{2+} .

O pH e a concentração de chumbo presentes nestas soluções, foram determinados antes do contato destas com a resina.

Após intervalos de tempos de 24, 48 e 96 h, do início do contato com a resina, o pH das soluções foi novamente medido e simultaneamente, alíquotas de, aproximadamente, 1 mL foram recolhidas para posterior determinação de chumbo por espectroscopia de absorção atômica com chama.

Tabela 08 - Misturas de soluções e resinas utilizadas no item 3.5.2

Substância	Concentração (mmol L ⁻¹)	pH inicial	Volume solução (mL)	Massa Resina (g)	pH final
H ₂ O		6,53	100	0,1	6,55
EDTA	2,00	6,51	100	0,1	6,52
EDTA	4,00	6,53	100	0,1	6,54
EDTA	10,0	6,52	100	0,1	6,53
EDTA	20,0	6,55	100	0,1	6,56
EDTA	30,0	6,52	100	0,1	6,53
Ácido cítrico	2,00	6,50	100	0,1	6,52
Ácido cítrico	4,00	6,54	100	0,1	6,56

Continuação					
Ácido cítrico	10,0	6,53	100	0,1	6,54
Ácido cítrico	20,0	6,54	100	0,1	6,56
Ácido cítrico	30,0	6,50	100	0,1	6,51

3.5.3 Interação dos aminoácidos cisteína, N-acetilcisteína e lisina com resina na forma Pb^{2+}

Porções de 0,1 g de resina catiônica na forma Pb^{2+} foram colocadas em contato com 100 mL de água ou de solução dos aminoácidos em estudo (20 mM), separadamente. Após tempos de contato pré-estabelecidos (resina-solução), alíquotas de aproximadamente 1,0 mL foram retiradas das soluções em equilíbrio com a resina, amostras estas que foram analisadas usando espectroscopia de absorção atômica com chama para a determinação da concentração de chumbo.

3.5.4 Avaliação das constantes de estabilidade dos complexos chumbo-lisina através do método Scatchard

Este estudo foi feito em batelada, para determinação da constante de estabilidade usando os dados obtidos por espectroscopia de absorção atômica (AAS) para determinação da concentração de chumbo em solução contendo aminoácido, em equilíbrio com resina catiônica na forma Pb^{2+} , o método Scatchard [88] foi usado para tratamento dos dados.

3.5.5 Avaliação da constante de estabilidade dos complexos chumbo-lisina

Para determinação das constantes de estabilidade dos complexos formados entre Pb-Lis, porções de 0,1 g de resina catiônica na forma Pb^{2+} , foram colocadas em contato com 100 mL de água ou de solução de lisina com concentração entre 2,0 e 30,0 mM, separadamente, sob agitação constante, em agitador de bancada. Após tempos de contato estabelecidos, alíquotas da solução em equilíbrio com a resina foram retiradas e analisadas usando espectroscopia de absorção atômica (AAS) com atomização por chama para determinação da concentração de chumbo.

3.6 Titulação complexométrica

Com o propósito de observar a interação entre o chumbo e os aminoácidos cisteína, N-acetilcisteína e lisina, foram feitas titulações complexométricas usando pHmetro com eletrodo de vidro combinado, sistema termostaticado a 25 °C e desaeração com nitrogênio puro, para titulações de 30,0 mL de solução de cisteína e N-acetilcisteína 3,3 mmol L⁻¹, separadamente, com solução de Pb(NO₃)₂ 10,0 mmol L⁻¹ e titulações de 20,0 mL de solução de lisina 50,0 mmol L⁻¹ com Pb(NO₃)₂ 100,0 mmol L⁻¹. As concentrações utilizadas foram as mesmas utilizadas em trabalhos anteriores [103].

3.7 Determinação das constantes de estabilidade

Para determinar as constantes de estabilidade dos complexos formados entre o metal chumbo e os ligantes cisteína, N-acetilcisteína e lisina foi utilizado o método potenciométrico.

3.7.1 Titulação potenciométrica

Todas as titulações e calibrações para medidas potenciométricas foram realizadas em uma célula (Figura 02) de acrílico de parede dupla termostaticada (25,0 ± 0,1 °C), com capacidade de 80 mL, em atmosfera inerte (N₂), com força iônica constante (KNO₃ 0,1 mol L⁻¹). O sistema era fechado com uma tampa de nylon com 4 orifícios, sendo um para colocação do eletrodo de vidro combinado, com sensibilidade superior (três casas decimais) - específico para este fim, o qual apresenta um para o borbulhamento de gás inerte, um para introdução da bureta automática e o último para saída do N₂. O sistema foi mantido sob agitação magnética desaerando por 15 minutos antes do início e durante toda a titulação. Os incrementos do titulante variaram de 0,01 mL no início da titulação, até 0,5 mL no seu final e foram feitas através de uma bureta automática de pistão Dosimat. Todas as titulações potenciométricas foram feitas em triplicata, e a média usada para calcular as constantes de estabilidade dos complexos formados, com o programa computacional BEST[®] [79]. No total foram feitos três cálculos para cada aminoácido estudado, sendo que em cada cálculo foi usada a média das três titulações.

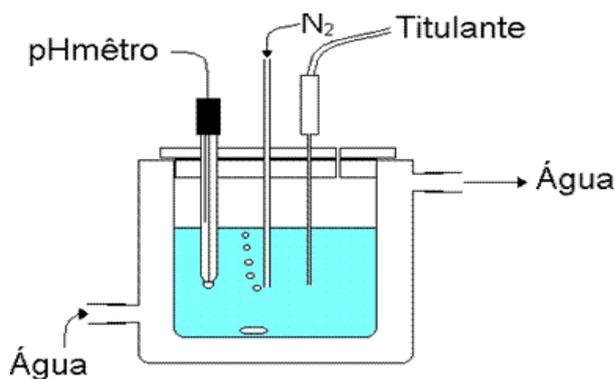


Figura 02 - Sistema de titulação potenciométrica.

3.7.1.1 Calibração do sistema potenciométrico

O sistema eletrodo e medidor de pH foi inicialmente calibrado usando soluções tampão Merck com pHs 4,0 e 7,0.

A calibração foi feita em termos de pH para pHmetro e eletrodo usando 22 mL de uma solução de HCl 45,0 mmol L⁻¹ e KCl 91,0 mmol L⁻¹, com solução de KOH 93,0 mmol L⁻¹. O método Gran foi aplicado para avaliar o grau de contaminação por carbonato das soluções de KOH.

3.7.1.2 Sistema chumbo/cisteína (Pb / Cys)

Para verificação da proporção metal-ligante, no complexo formado, foram feitas titulações de soluções de cisteína-chumbo, nas proporções de (1:1), (2:1), (3:1) e (10:1), mantendo sempre a concentração do ligante constante em relação a do metal. Para tal, foram titulados 30 mL de solução de cisteína 0,01 mol L⁻¹ e 0,01 mol L⁻¹ de Pb(NO₃)₂ com KOH 0,05 mol L⁻¹; solução de cisteína 0,01 mol L⁻¹ e 0,005 mol L⁻¹ de Pb(NO₃)₂ com KOH 0,05 mol L⁻¹; solução de cisteína 0,01 mol L⁻¹ e 0,003 mol L⁻¹ de Pb(NO₃)₂ com KOH 0,05 mol L⁻¹ e solução de cisteína 0,01 mol L⁻¹ e 0,001 mol L⁻¹ de Pb(NO₃)₂ com KOH 0,05 mol L⁻¹. A força iônica do meio foi mantida em 0,1 mol L⁻¹ com KNO₃.

Para a determinação das constantes de estabilidade dos complexos formados entre chumbo e cisteína, foram titulados 30,0 mL de solução de cisteína 0,01 mol L⁻¹ na ausência e presença de solução de Pb(NO₃)₂ 0,01 mol L⁻¹ com KOH 0,05 mol L⁻¹; a força iônica do meio foi mantida em 0,1 mol L⁻¹ com KNO₃. Foram feitas titulações de soluções de cisteína-

chumbo nas proporções (1:1), (2:1) e (3:1) mantendo sempre constante a concentração do ligante em relação à do metal.

3.7.1.3 Sistema chumbo/ lisina (Pb/Lys)

Para verificação da proporção metal-ligante, no complexo formado, foram feitas titulações de soluções de Lys-Pb, nas proporções de (1:1), (2:1), (3:1) e (10:1), mantendo sempre a concentração do ligante constante em relação a do metal. Para tal, foram titulados 30 mL da solução do aminoácido e solução do metal com solução de KOH 0,05 mol L⁻¹ padronizada e a força iônica do meio foi mantida em 0,1 mol L⁻¹ com KNO₃, conforme mostrado na Tabela 09.

Para a determinação das constantes de estabilidade dos complexos formados entre chumbo e lisina, foram titulados 30,0 mL de solução de lisina 0,01 mol L⁻¹ na ausência e presença de solução de Pb(NO₃)₂ 0,01 mol L⁻¹ com KOH 0,05 mol L⁻¹; a força iônica do meio foi mantida em 0,1 mol L⁻¹ com KNO₃. Foram feitas titulações de soluções de lisina-chumbo nas proporções (1:1), (2:1) e (3:1) mantendo sempre constante a concentração do ligante em relação à do metal.

3.7.1.4 Sistema chumbo/ N-Acetil-Cisteína (Pb/ N-Acetil-Cys)

Para verificação da proporção metal-ligante, no complexo formado, foram feitas titulações de soluções de N-acetilcisteína-chumbo, nas proporções de (1:1), (2:1), (3:1) e (10:1), mantendo sempre a concentração do ligante constante em relação a do metal. Para tal, foram titulados 30 mL da solução do aminoácido e solução do metal com solução de KOH 0,05 mol L⁻¹ padronizada e a força iônica do meio foi mantida em 0,1 mol L⁻¹ com KNO₃, conforme mostrado na Tabela 09.

Para a determinação das constantes de estabilidade dos complexos formados entre chumbo e N-acetilcisteína, foram titulados 30,0 mL de solução de N-acetilcisteína 0,01 mol L⁻¹ na ausência e presença de solução de Pb(NO₃)₂ 0,01 mol L⁻¹ com KOH 0,05 mol L⁻¹, a força iônica do meio foi mantida constante em 0,1 mol L⁻¹ com KNO₃. Foram feitas titulações de soluções de N-acetilcisteína-chumbo nas proporções (1:1) e (2:1) mantendo sempre constante a concentração do ligante em relação à do metal.

Os dados das titulações potenciométricas feitas para verificação da proporção ligante:metal nos complexos formados entre os três aminoácidos em estudo e o chumbo, estão resumidos na Tabela 09.

Tabela 09 - Dados das titulações potenciométricas para verificação da relação metal:ligante predominante.

Ligante (L)	[Ligante] (mmol L ⁻¹)	[Metal] (mmol L ⁻¹)	Proporção molar (L:M)	Força iônica (mol)	[KOH] (mmol L ⁻¹)
Cisteína	0,01	0,010	1:1	0,10	0,05
Cisteína	0,01	0,005	2:1	0,10	0,05
Cisteína	0,01	0,003	3:1	0,10	0,05
Cisteína	0,01	0,001	10:1	0,10	0,05
N-Acetil-Cys*	0,01	0,010	1:1	0,10	0,05
N-Acetil-Cys*	0,01	0,005	2:1	0,10	0,05
N-Acetil-Cys*	0,01	0,003	3:1	0,10	0,05
N-Acetil-Cys*	0,01	0,001	10:1	0,10	0,05
Lisina	0,01	0,010	1:1	0,10	0,05
Lisina	0,01	0,005	2:1	0,10	0,05
Lisina	0,01	0,003	3:1	0,10	0,05
Lisina	0,01	0,001	10:1	0,10	0,05

* N-Acetil-Cisteína

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A compreensão de muitos sistemas biológicos passa pelo estudo da ligação de íons de metais pesados por peptídeos, proteínas e aminoácidos, e técnicas potenciométricas são adequadas para a determinação de valores exatos de constantes de estabilidade [101].

Estudos demonstram que o chumbo (II) liga-se fortemente a grupos funcionais em cisteína, mas que este íon não estabiliza os respectivos compostos com a mesma geometria do zinco (II), sugerindo que os problemas associados com a toxicidade do chumbo (II) se deve ao fato deste ocupar o sítio de ligação que seria do zinco ou o organismo carregar o chumbo livre ou coordenado, ao invés do zinco, que é um elemento essencial [102].

Desta forma, a proposta deste trabalho consistiu em investigar as possíveis interações entre alguns aminoácidos, que compõem as soluções de nutrição parenteral, com o chumbo, através da determinação das constantes de estabilidade.

Na primeira parte do presente trabalho, foi estudada a interação entre chumbo e os três aminoácidos estudados, primeiramente através da medida da quantidade extraível de chumbo, de partes das embalagens das soluções de NP, pela solução dos aminoácidos, separadamente, e, em seguida, usando um sistema de troca iônica. Na segunda parte, os valores das constantes de estabilidade dos complexos formados entre os mesmos aminoácidos e o chumbo foram obtidos a partir de dados de titulação potenciométrica.

A técnica da titulação potenciométrica foi escolhida devido à diversidade de sistemas a que pode ser aplicada, pela instrumentação requerida ser corrente na maioria dos laboratórios e por fornecer valores bastante precisos. Se no estudo de um sistema em equilíbrio existir uma espécie iônica cuja concentração (ou atividade) seja afetada pela formação de complexos moleculares e se existir um eletrodo sensível a esta espécie com comportamento nernstiano na zona de concentração a estudar, é possível utilizar os valores de potencial da célula para soluções com diferentes composições por forma a obter as constantes de equilíbrio do sistema. E, quando se utiliza um eletrodo sensível ao cátion hidrogênio e se as espécies em estudo tiverem caráter ácido/base fraco ou intermediário, é usual seguir a variação da concentração do cátion hidrogênio em função da quantidade de ácido ou base adicionada a uma solução com concentrações totais do ligante e outras espécies conhecidas.

4.1 Avaliação da migração de chumbo das embalagens de armazenagem das soluções de nutrição parenteral para as soluções dos aminoácidos cisteína, n-acetil-cisteína e lisina utilizando Espectrometria de Absorção Atômica por Forno de Grafite (GFAAS)

Nos ensaios de contato das soluções dos aminoácidos estudados, separadamente, com partes da embalagens das soluções de NP (embalagem de vidro inteira, embalagem de vidro triturada, tampas de borracha e EVA)

A soluções permaneceram em contato com esses materiais, por 19 semanas, sob constante agitação e temperatura em 25 °C, e delas foram feitas cinco coletas, de 1,0 mL cada uma, para posterior análise.

Na Tabela 10, encontra-se a média da concentração de chumbo que as soluções dos aminoácidos em estudo extraíram dessas embalagens e verificou-se que a lisina foi o aminoácido que mais extraiu chumbo do vidro, seguido da cisteína e N-acetilcisteína. A mesma ordem observou-se quando as soluções de aminoácidos permaneceram em contato com embalagem de EVA triturada, por um período de 0 (logo após o período de esterilização); 4; 6; 12; 16 e 19 semanas, respectivamente. Em relação às borrachas que constituem a tampa das embalagens de vidro das soluções de NP, a ordem decrescente de extração de chumbo foi: lisina > N-acetilcisteína > cisteína.

Embora não haja um aumento proporcional da concentração de chumbo em solução em relação ao aumento do período de contato (embalagem – solução do aminoácido), através desses ensaios pode-se comprovar que existe a contaminação, dessas embalagens por chumbo, mesmo em concentração extremamente baixa e que os aminoácidos estudados possuem interação com esse metal. A partir desta constatação, o estudo do mecanismo dessas interações foi possível através dos cálculos das constantes de estabilidade entre os mesmos.

Tabela 10 - Concentração de chumbo extraído pelas soluções de aminoácidos das embalagens de soluções de NP

	Concentração ($\mu\text{g L}^{-1}$) de Pb extraída por:		
	Cys	N-Acetil-Cys	Lis
Embalagem de vidro	10,21	2,58	19,80
Embalagem de vidro*	2,88	0,83	0,29
Tampa de borracha 1**	0,49	0,65	14,43
Tampa de borracha 2***	0,37	0,557	2,65
EVA	1,68	0,01	4,22

*embalagem de vidro triturada

** tampa de borracha cinza (triturada)

*** tampa de borracha vermelha (triturada)

Em trabalho recente, desenvolvido pelo grupo deste laboratório, Bertagnolli [100], constatou que os aminoácidos extraíram vários metais das embalagens plásticas e de vidro. Porém, a ação destes aminoácidos não pode ser relacionada com o pH, já que as soluções de aminoácidos não possuem valores de pH extremos. O que, provavelmente, ocorre é a formação de complexos destes aminoácidos com os metais. Neste ensaio, pelo período de 225 dias de armazenamento das soluções de aminoácidos em embalagens de EVA, se obteve os seguintes resultados: o chumbo extraído pela cisteína e lisina alcançou a concentração de 641,3 $\mu\text{g/g}$ e 23,1 $\mu\text{g/g}$ de aminoácido, respectivamente, analisados por AAS. O estudo indica que não há especificação de limites estabelecidos pelas Farmacopeias para metais em embalagens plásticas. No ensaio com as embalagens de vidro, as soluções de aminoácidos foram armazenadas por um período de até 90 dias, sendo feita análises, por AAS, em 30; 60 e 90 dias. O chumbo extraído do vidro pela cisteína foi de 7,6 $\mu\text{g/g}$ de aminoácido em embalagem de pequeno volume e 6,0 $\mu\text{g/g}$ em embalagem de grande volume no período máximo de 90 dias [100].

4.2 Estudo da interação do chumbo com os aminoácidos através do uso de resina de troca iônica

Para os aminoácidos investigados, devido à natureza dos ligantes, presença de enxofre na molécula da cisteína e N-acetilcisteína e à afinidade que estes ligantes podem apresentar por íons intermediários como o chumbo, foram realizados ensaios com resina de troca iônica

para verificar a distribuição do chumbo entre uma resina catiônica e a solução contendo o aminoácido. Pela teoria de Pearson, é possível que ocorra a ligação entre um ácido intermediário e uma base mole, e existem exemplos onde estes complexos se formam. Li e Martell [86], através de titulação potenciométrica determinaram as constantes de estabilidade dos complexos formados entre íons trivalentes (Ga^{3+} , In^{3+} e Al^{3+}), íons divalentes (Pb^{2+} , Cd^{2+} e Ni^{2+}) e MEA (2-mercaptoetilamina – $\text{HSCH}_2\text{CH}_2\text{NH}_2$). Como se pode observar na Tabela 11, as constantes de estabilidade para os íons trivalentes são maiores do que para os íons divalentes para os mesmos tipos de complexo formado: ML.

Como neste caso as únicas ligações possíveis são com os grupos tiol e amino, não há dúvidas de que a formação do complexo se dá através da ligação destes dois grupos com os metais.

Tabela 11 - Constantes de estabilidade para complexos formados entre MEA* e íons metálicos divalentes medidos potenciometricamente em água a 25 °C e força iônica 0,1 mol L⁻¹ KCl.

Íon metálico (M)	Log K		
	[ML]/[M][L]	[MHL]/[ML][H]	[M(OH)L]/[ML][OH]
Ga^{3+}	14,82	3,67	-
In^{3+}	12,25	4,31	-
Al^{3+}	11,74	5,86	-
Pb^{2+}	10,10	4,22	6,42
Cd^{2+}	9,84	5,78	7,07
Ni^{2+}	9,14	-	7,46
Zn^{2+}	8,77	-	6,83

MEA : 2-mercaptoetilamina ($\text{HSCH}_2\text{CH}_2\text{NH}_2$) [80].

Os resultados obtidos através da titulação potenciométrica (descritos adiante na seção 4.3) mostram que as espécies presentes em maior quantidade em solução aquosa para o sistema cisteína-Pb são Cys_2Pb e CysPbOH , para o sistema N-acetilcisteína-Pb são: N-Acetil- Cys_2Pb , N-Acetil- CysPbOH e N-Acetil- Cys_2PbH e para o sistema lisina-Pb são LysPb e LysPbOH , indicando o envolvimento de espécies hidrolisadas de chumbo e aquo íon, uma vez que os complexos existem na faixa de pH, onde as espécies hidrolisadas de chumbo e aquo íon estão presentes em solução aquosa, na ausência de ligante.

A coordenação entre o chumbo e os ligantes acima não é ainda bem definida, podendo ser com o aquo íon (Pb^{2+}) ou com Pb(OH)_n^{2-n} .

4.2.1 Interação dos aminoácidos cisteína e N-acetilcisteína com resina na forma Pb^{2+}

Os resultados dos ensaios envolvendo resina catiônica na forma Pb^{2+} em contato com água, solução de cisteína e N-acetilcisteína (Figura 03), separadamente, mostram que o chumbo permaneceu ligado à resina, quando a mesma ficou em contato com água, mas quando a resina foi colocada em contato com solução contendo cisteína ou N-acetilcisteína, o Pb foi extraído da resina, devido à interação entre chumbo e os aminoácidos em estudo, provavelmente por formação de complexos entre o Pb e os aminoácidos: cisteína e N-acetilcisteína.

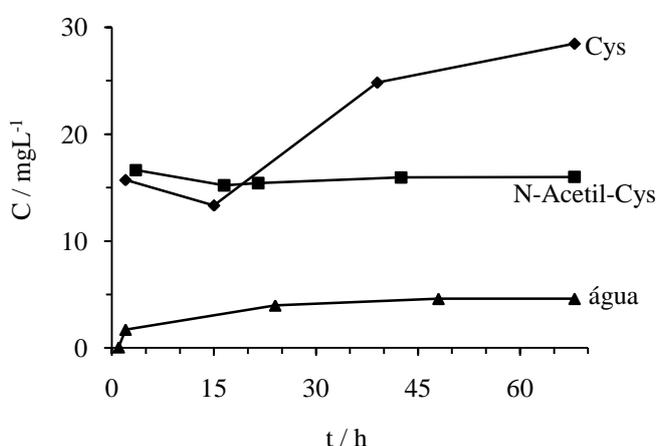


Figura 03 - Concentração de Pb^{2+} em solução versus tempo de contato da resina catiônica na forma Pb^{2+} (0,1 g) com água, solução de Cys e solução de N-Acetil-Cys 20 mmol L⁻¹, separadamente.

A partir do ensaio, pode-se constatar que a cisteína em solução extrai mais chumbo da resina catiônica e que quanto maior o tempo de contato com a mesma, maior a quantidade de chumbo extraído da resina catiônica, o que não se reproduz para a N-acetilcisteína. Observa-se na Figura 08, que a extração de chumbo pela cisteína começa com 50 % de extração e alcança o máximo em 60 h, comportamento que deve estar associado à oxidação da cisteína em solução, onde grupos tióis da mesma formam ligações dissulfeto [103] resultando na formação de cistina em solução.

4.2.2 Interação do aminoácido lisina e outros agentes complexantes com resina na forma Pb^{2+}

Os complexantes estudados foram ácido cítrico, ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) e a lisina.

A finalidade deste ensaio consistiu em comparar os agentes complexantes entre si, uma vez que todos os complexantes em estudo possuem o grupo funcional carboxílico, onde seu ânion carboxilato é considerado uma base dura, segundo classificação de Pearson [28] que se liga ao Pb^{2+} (ácido intermediário) para formar complexos pouco estáveis.

Como EDTA, ácido cítrico e lisina possuem 4, 3 e 1 grupos carboxílicos respectivamente, complexos de EDTA com chumbo prevalecem, uma vez que o EDTA é um ligante multidentado que forma complexos estáveis 1:1 com a maioria dos íons metálicos, com ligação através de quatro átomos de oxigênio e dois átomos de nitrogênio [36]. A maior afinidade do EDTA em complexar o Pb^{2+} é devido a sua estrutura espacial, com 6 átomos doadores de elétrons, permite satisfazer o número de coordenação seis frequentemente encontrado nos íons metálicos e formar na quelação anéis de cinco átomos que tem pouca tensão [46].

Os resultados dos ensaios envolvendo resina catiônica na forma Pb^{2+} em contato com solução dos agentes complexantes, separadamente, mostraram que o chumbo foi extraído da resina, devido à interação entre o chumbo e os complexantes em estudo, provavelmente por formação de complexos entre o chumbo e os agentes complexantes. A figura 04 A e B mostram a concentração de chumbo em solução em relação ao tempo de contato da resina catiônica na forma Pb^{2+} (0,1 g) com a solução dos complexantes na concentração de 20 mmol L^{-1} . Aos dados originais foi aplicada a escala logaritma, no eixo x, para melhor visualização (figura 04 B).

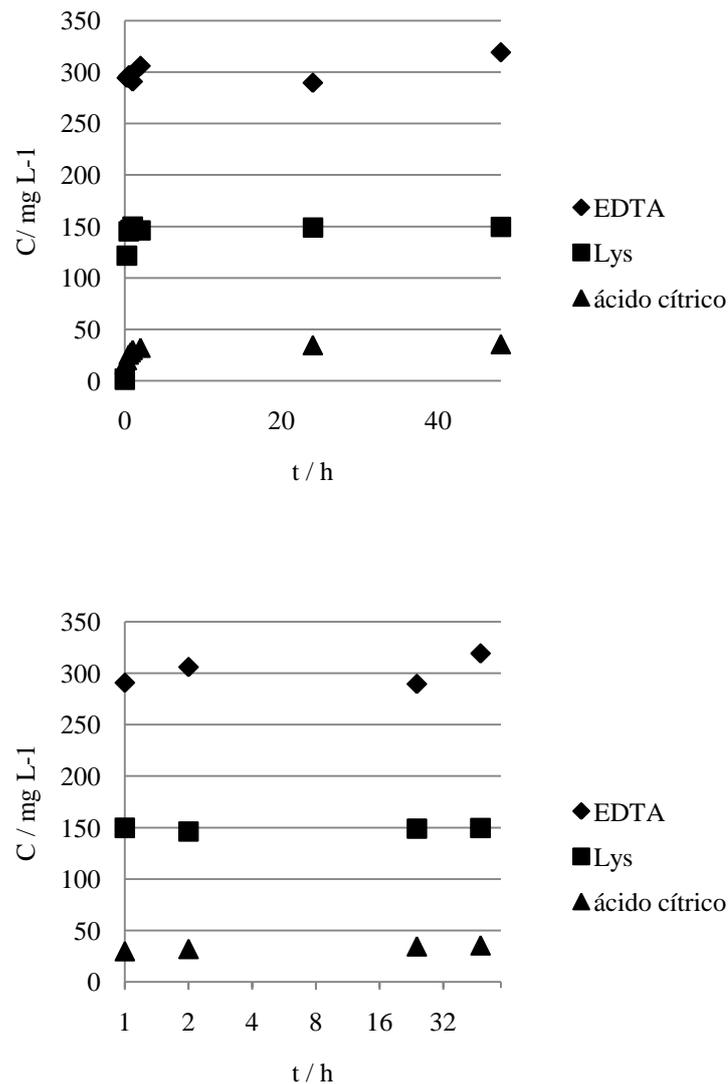
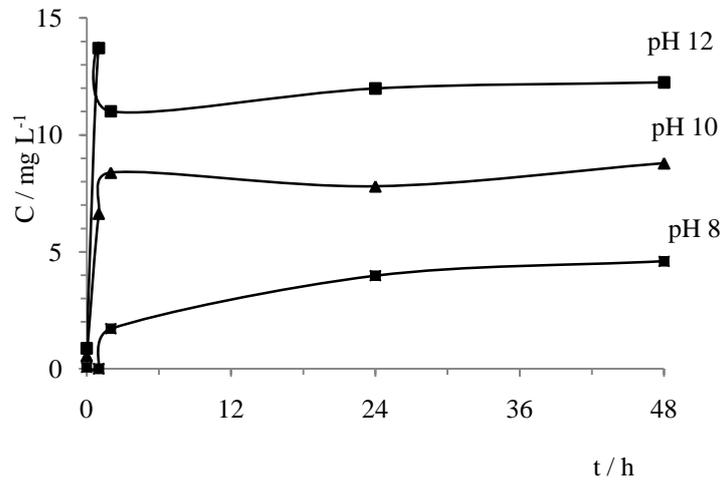


Figura 04 - Concentração de Pb^{2+} em solução versus tempo de contato da resina catiônica na forma Pb^{2+} (0,1g) com solução dos complexantes 20 mmol L⁻¹, separadamente (A); tempo em escala logaritma (B).

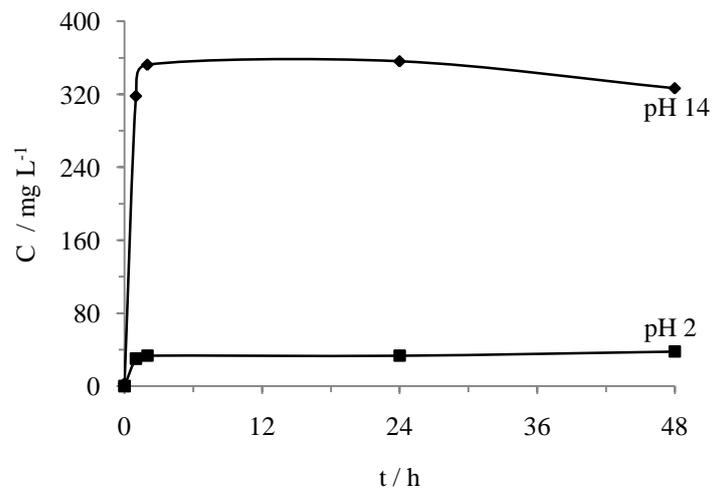
Pode-se concluir dos resultados deste ensaio, que a resina catiônica na forma Pb^{2+} , pode atuar como uma fonte de íons Pb^{2+} , onde os complexantes EDTA e lisina extraíram maior quantidade de chumbo da resina do que a solução de ácido cítrico. Assim, a quantidade de chumbo extraída pelas diferentes soluções analisadas está relacionada com a estabilidade do complexo formado, ou seja, soluções que extraem mais chumbo da resina formam complexos muito mais estáveis do que soluções que extraem pouco chumbo.

Com o objetivo de verificar qual o pH que propicia uma maior migração do metal para água pura, realizou-se ensaios colocando-se em contato 0,1g de resina catiônica na forma Pb^{2+} com água de Milli-Q (100 mL) ajustando os valores de pH em: 2 (com solução de ácido

clorídrico $0,1 \text{ mol L}^{-1}$), 8, 10, 12 e 14 (com solução de hidróxido de sódio $0,1 \text{ mol L}^{-1}$). Foram retiradas alíquotas em tempos de 1; 2; 24 e 48 h (Figura 05 A e B). O resultado mostra que a extração aumenta conforme aumenta o pH e que permanece estável independente do tempo de contato.



(A)



(B)

Figura 05 - Concentração de Pb^{2+} em água versus tempo de contato da resina catiônica na forma Pb^{2+} (0,1 g), em diferentes pHs: A (pH 8,0; 10,0 e 12,0); B (pH 2,0 e 14,0)

A Figura 06 mostra a concentração de chumbo em solução em relação ao tempo de contato da resina catiônica na forma (0,1 g) com a solução do aminoácido lisina, em pH fisiológico (pH 7,0), nas concentrações de 2, 4, 10, 20 e 30 mmol L^{-1} , ou seja, na proporção ou relação 1:1, 1:2, 1:5, 1:10 e 1:15 metal:ligante (M:L).

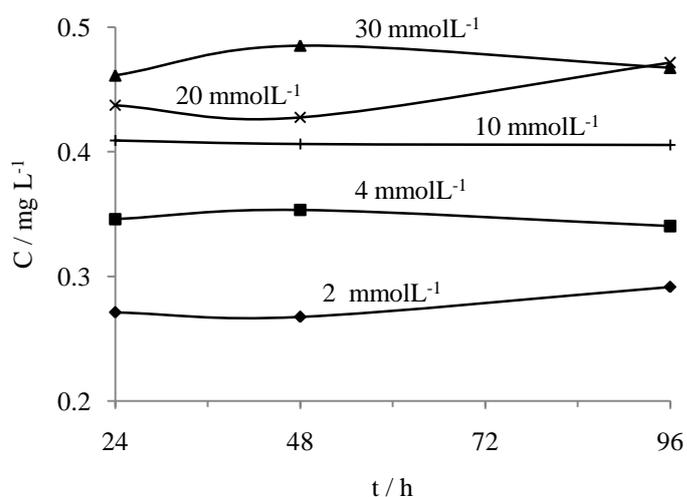


Figura 06 - Concentração de Pb / Lys (mg L^{-1}) em solução (100 mL) versus tempo de contato (dia) resina – solução de cinco soluções de lisina (pH 7,0).

Os ensaios mostraram que o tempo de contato utilizado no estudo não foi um determinante para o aumento da extração de chumbo e sim, o aumento da concentração do ligante. O equilíbrio de troca é atingido logo nas 48 h de contato para as concentrações 4 e 20 mmol L^{-1} , para a concentração de 2 e 20 mM ocorre em 96 h e para concentração de 30 mmol L^{-1} , a partir de 48 h ocorre um decréscimo na extração do metal.

A Figura 07 mostra que a relação $[\text{Pb}]_{\text{resina}}/[\text{Pb}]_{\text{solução}}$ diminui com o aumento da concentração do ligante em solução, indicando que o aumento da concentração do ligante em solução, aumenta a concentração de chumbo extraído da resina. O chumbo em solução deve estar complexado com o ligante, e a extensão da troca para cada ligante usado pode estar relacionada com a constante de estabilidade do complexo formado em solução.

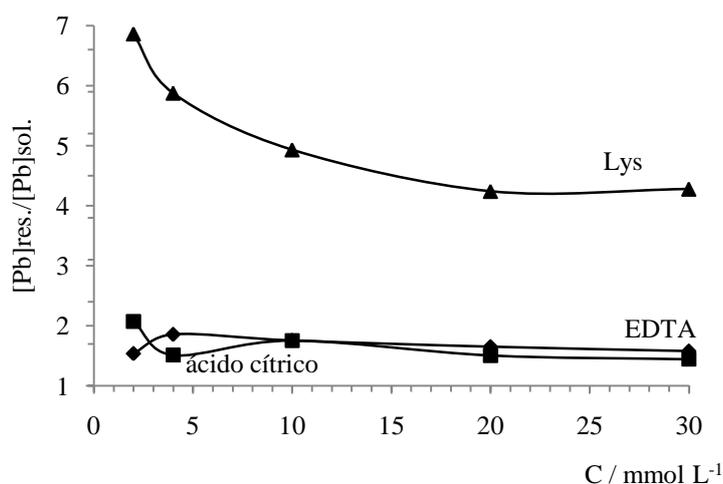


Figura 07 - Concentração de chumbo na resina/concentração de chumbo em solução versus concentração dos ligantes: Lys, EDTA e ácido cítrico em solução (100 mL), em contato com resina catiônica na forma Pb^{2+} (0,1 g) em 96 h de contato.

Na Tabela 12, observa-se as extrações de chumbo da resina catiônica em contato com soluções de todos os ligantes estudados, em concentração 20 mmol L^{-1} .

Tabela 12 - Comparativo da concentração de chumbo (mg L^{-1}) em solução (50 mL) 20 mM extraído pelas soluções dos ligantes estudados.

Ligante	Concentração de Pb^{2+} (mg L^{-1}) extraído pelas soluções nos tempos			
	2 h	24 h	48 h	5 dias
EDTA	294,30	296,70	296,90	305,90
Ácido cítrico	32,13	34,66	35,62	-
Cys	15,71	20,00	28,50	31,12
Lys	146,20	149,00	149,50	-
N-Acetil-Cys	40,40	38,20	16,00	-

A partir da Tabela 12, constata-se a maior extração de chumbo pelo ligante, na seguinte ordem decrescente: EDTA > Lys > N-Acetil-Cys > ácido cítrico > Cys. Embora os tempos de contato da resina Pb^{2+} com os ligantes sejam diferentes, constata-se que a complexação entre o Pb e a N-Acetil-Cys é mais rápida, uma vez que, em um período de apenas duas horas, ocorre uma extração de $40,40 \text{ mg L}^{-1}$ de N-Acetil-Cys pelo metal. E, para extrair a mesma quantidade pela cisteína, o período requerido foi de pelo menos 5 dias. Porém, a extração de chumbo pela cisteína se mantém constante por um longo período de

tempo e pela N-Acetil-Cys, a extração alcança um máximo, num período curto de tempo, e em seguida, diminui gradativamente.

4.2.3 Avaliação das constantes de estabilidade do complexo Pb-Lisina através do método Scatchard

O método de Scatchard tem sido usado para determinação de constantes de estabilidade dos complexos formados entre íons metálicos e substâncias húmicas [104, 105] e principalmente de associações entre fármacos e os constituintes do sangue como as proteínas.

Para obter uma constante de equilíbrio, devemos medir as concentrações (atividades) das espécies envolvidas no equilíbrio.

Um gráfico da relação entre a concentração da espécie combinada e concentração da espécie livre, versus a concentração da espécie combinada, terá uma inclinação $-K$ (constante de equilíbrio) e é chamado de diagrama de Scatchard. Ele é muito utilizado para medir as constantes de equilíbrio, especialmente em estudos de bioquímica [36].

Para a aplicação do método Scatchard na determinação de constantes de estabilidade dos complexos formados entre o íon Pb^{2+} e o aminoácido em estudo, os resultados trabalhados são correspondentes ao tempo máximo de contato resina-solução estudado, ou seja, quando o equilíbrio de troca foi atingido.

Como foi visto em 4.2.2, sem a presença de lisina em solução, o chumbo permanece ligado à resina, portanto o chumbo extraído da resina catiônica Pb^{2+} pela lisina, dever estar ligado à mesma, e a concentração de chumbo em solução correspondendo à concentração de chumbo combinado com a lisina (lisina combinada). Pela diferença de concentração inicial de lisina obteve-se a concentração de lisina livre. Dados que estão mostrados na Figura 08 (A) e (B). A partir da inclinação da reta mostrada no gráfico da Figura 08 (A) (diagrama Scatchard), obteve-se a constante de estabilidade do complexo Lys- Pb em solução, nas condições do experimento.

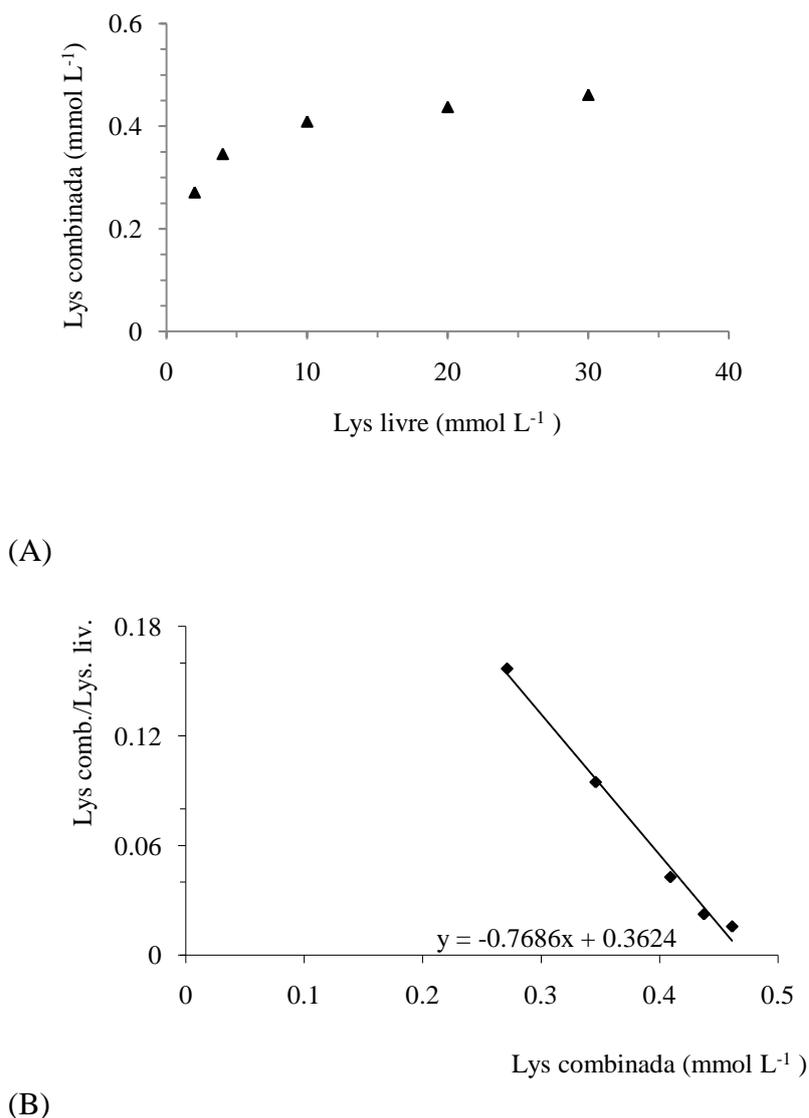


Figura 08 - Isotherma de troca iônica para soluções contendo lisina em diferentes concentrações em equilíbrio com resina catiônica na forma Pb^{2+} (0,1 g) (A). Diagrama de Scatchard para lisina em solução combinada com Pb^{2+} extraído da resina catiônica (B).

Os valores obtidos para $\log K$, usando o método Scatchard (resina de troca iônica), a partir do coeficiente angular da curva 13 (B) ($K = -0,77$) foi $-0,11$ (Pb-Lys).

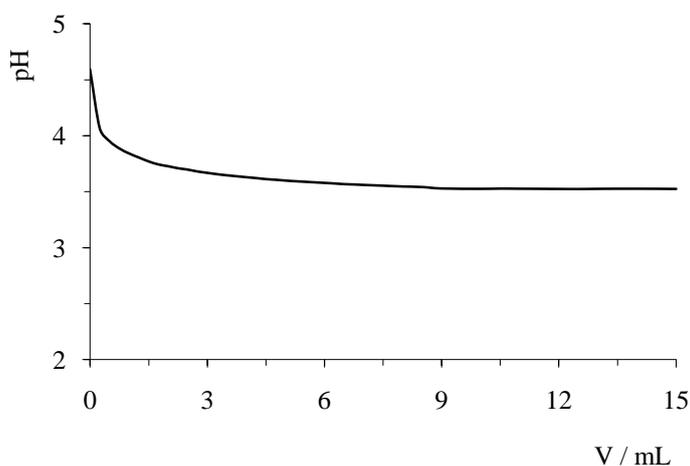
O valor da constante (que foi superior ao do gráfico de Scatchard) obtido com dados das titulações potenciométricas e calculada pelo program BEST[®] será discutido na seção 4.3. Esta divergência nos resultados deve-se provavelmente ao método Scatchard, que fornece valores aproximados para constantes de estabilidade [89] e as condições de complexação não serem as mesmas, com o pH que para o estudo envolvendo troca iônica foi $< 6,0$. Este pH propicia a formação de espécies protonadas em solução, que não foram encontradas como

espécies predominantes usando titulação potenciométrica, provavelmente devido à faixa de pH trabalhada.

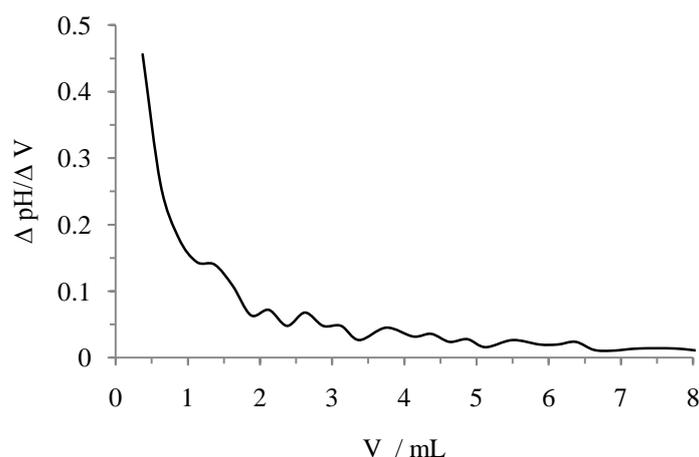
4.3 Titulação complexométrica

A titulação com formação de complexos ou complexometria baseia-se em reações envolvendo um íon metálico e um agente complexante, com formação de um complexo. A variação da concentração do metal em solução em torno do ponto de equivalência é dependente da constante de estabilidade do complexo formado [106].

Segundo Li e Doody [57], o formato da curva de titulação complexométrica, indica a intensidade da interação metal-ligante, ou seja, a estabilidade dos complexos formados. Quando complexos de menor estabilidade são formados, as variações de declividade na curva de titulação são pouco nítidas e, às vezes, não perceptíveis tanto visualmente quanto através de derivações das curvas primitivas. Para observar o efeito descrito acima, foram feitas titulações potenciométricas de soluções dos ligantes cisteína, N-Acetil-Cisteína e Lisina, separadamente, com o íon metálico, as curvas obtidas estão representadas nas Figuras 09 (A e B), 10 e 11.



(A)



(B)

Figura 09 - pH versus volume de $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ 10 mmol L^{-1} , na titulação de 30 mL de solução (A) $3,3 \text{ mmol L}^{-1}$ de cisteína e (B) primeira derivada $3,3 \text{ mmol L}^{-1}$ de cisteína, separadamente.

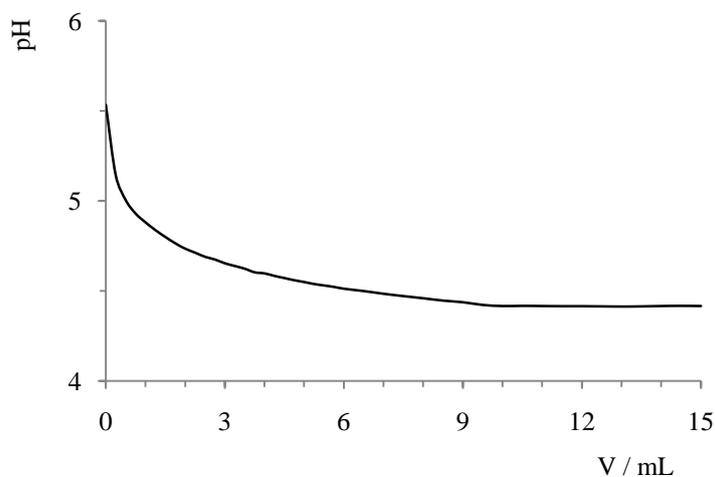


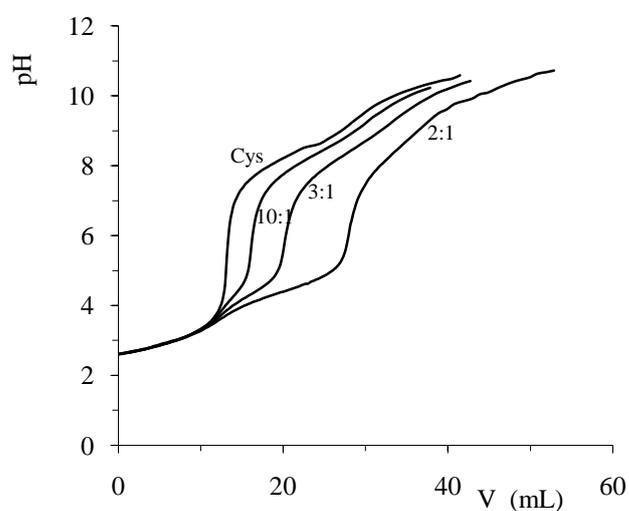
Figura 10 - pH versus volume de $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ $100,0 \text{ mmol L}^{-1}$, na titulação de 20 mL de solução $50,0 \text{ mmol L}^{-1}$ de lisina.

Pelo aspecto das curvas de titulação complexométrica da cisteína e da lisina, pode-se observar comportamento semelhante, no qual mostra que a interação metal- ligante foi fraca devido ao salto potencimétrico não ser acentuado [57]. Tanto para a titulação complexométrica da solução de cisteína quanto a da lisina, a proporção metal-ligante de 1:1 é atingida com 10 mL adicionados de solução de $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$, pois a partir deste volume o pH torna-se constante com a continuação da adição de incrementos da solução de chumbo, exibindo a curva paralela ao eixo x. O gráfico da derivada do pH vs a derivada do volume

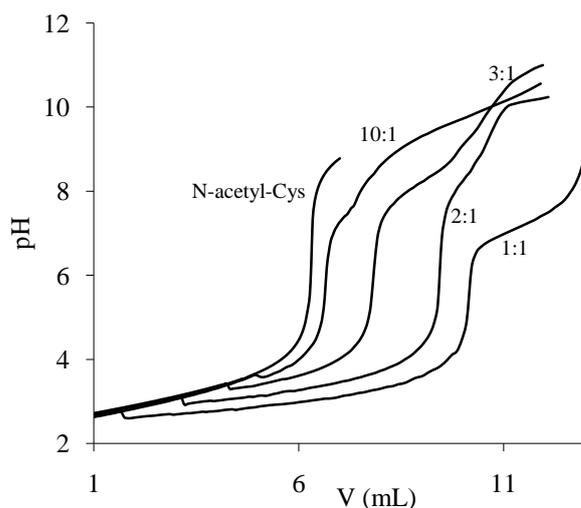
confirma o pH constante já a partir da adição de um volume de 7,0 mL de $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$, sendo que a partir deste ponto não se observa nenhuma oscilação na curva de titulação (figura 09 B).

A curva de titulação complexométrica da N-Acetil-Cisteína não mostrou o mesmo comportamento daquele observado para cisteína e lisina. Isto pode ser atribuído à presença do grupamento acetil. Entretanto, quando foi realizada a titulação com solução de KOH dos aminoácidos em estudo, na ausência e na presença do metal, em diferentes proporções de L:M, as curvas dos três aminoácidos apresentaram características semelhantes, conforme Figura 11 (A, B, C).

(A)



(B)



(C)

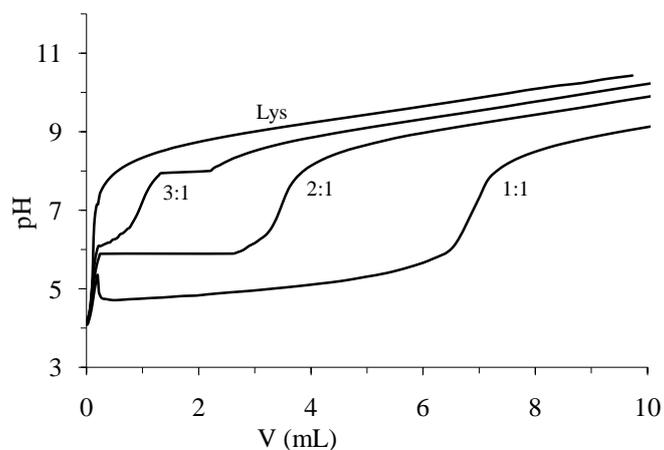


Figura 11 – Titulação potenciométrica dos aminoácidos, com solução de KOH, na ausência e presença do metal, em diferentes proporções L:M (A: cisteína; B: N-acetilcisteína; C: lisina).

4.4 Determinação das constantes de estabilidade

Para determinação das constantes de estabilidade dos complexos formados entre chumbo e os aminoácidos cisteína, N-acetilcisteína e lisina, foi usado o método potenciométrico. Este método consiste na obtenção dos dados da titulação potenciométrica de soluções do ligante e do ligante mais o metal com uma solução alcalina e posterior tratamento dos dados usando o programa computacional BEST, próprio para cálculos de constantes de estabilidade. Para a lisina foi usado também o diagrama de Scatchard. Em estudos feitos por Scatchard [107], foi possível calcular constantes de equilíbrio relativas e a avaliação dessas constantes, através do Diagrama Scatchard, a partir da determinação da concentração das espécies em equilíbrio em solução, e ainda, possibilitou estabelecer um conjunto de constantes de estabilidade relativas metal:ligante (chumbo: lisina).

4.4.1 Determinação das constantes de estabilidade Pb-aminoácido por titulação potenciométrica

4.4.1.1 Calibração do sistema potenciométrico

Visando obter resultados confiáveis na determinação das constantes de estabilidade, as condições experimentais precisam ser objeto de cuidadoso planejamento.

Antes de cada conjunto de titulações potenciométricas, o sistema eletrodo-pHmetro era calibrado. O método Gran era aplicado para determinação da contaminação por carbonato das soluções de KOH, conforme descrito por Martell e Motekaitis [79]. As soluções de KOH preparadas usando água purificada pelo sistema Milli-Q, se mostraram isentas de CO₂. O CO₂ absorvido em soluções de KOH pode formar carbonato de potássio [108]. A presença de carbonato de potássio aumenta o pH do meio, e conseqüentemente, a leitura do pH na faixa básica sofrerá alteração, ou seja, observar-se-á um desvio na região de pH básico observado pela modificação nos valores de pH, interferindo nos resultados das titulações potenciométricas, por isso da necessidade prévia da determinação de carbonato. No apêndice A está descrito o cálculo, bem como o gráfico resultante desta determinação.

O produto iônico da água é um parâmetro importante, pois trata-se de uma constante condicional que depende do sistema utilizado e, como tal, deve ser determinado para as condições experimentais em que se irão realizar as várias determinações potenciométricas [109].

4.4.2 Determinação do produto iônico da água (pK_w)

Muitos solventes em estado de absoluta pureza possuem, não obstante, uma pequena condutividade que se deve atribuir a uma auto-ionização ou autoprotólise. Assim, no caso da água, tem-se a reação $\text{H}_2\text{O} + \text{H}_2\text{O} \leftrightarrow \text{H}_3\text{O}^+ + \text{OH}^-$, que é o inverso da neutralização entre o ácido forte H_3O^+ e a base forte OH^- .

A constante deste equilíbrio será então $K = \frac{a_{\text{H}_3\text{O}^+} \cdot a_{\text{OH}^-}}{a_{\text{H}_2\text{O}}^2}$. Esta constante prevalece, evidentemente, não só na água pura, mas também na presença de solutos. Mas a atividade da água pura é igual à unidade, podendo-se admitir que, em soluções diluídas, o seu valor pouco se altera. Neste caso, será constante o produto $K_w = a_{\text{H}^+} \cdot a_{\text{OH}^-}$ (14)

Esta quantidade é chamada *produto iônico* da água e significa que, na água pura e nas soluções aquosas diluídas, é constante o produto das atividades dos íons hidrogênio (hidrônio) e hidroxila. Expressando a atividade em função da concentração molar,

$$K_w = c_{\text{H}^+} \cdot c_{\text{OH}^-} \cdot \gamma_{\pm}^2 \quad (15)$$

Porém, em sistemas aquosos de alta pureza e nas soluções de pequena força iônica, o coeficiente de atividade iônico médio é próximo da unidade, podendo-se admitir como aproximadamente constante o produto das concentrações dos íons hidrogênio e hidróxido:

$$K'_w = c_{\text{H}^+} \cdot c_{\text{OH}^-} \quad (16)$$

O valor deste produto pode ser determinado a partir da condutividade da água pura que, a 25°C, é igual a $k = 5,54 \cdot 10^{-8} \text{ ohm}^{-1}\text{cm}^{-1}$. Por outro lado, as condutâncias equivalentes dos íons H^+ e OH^- , em pequenas concentrações, existentes na água pura podem ser consideradas idênticas às condutâncias em diluição infinita, isto é,

$$\nu_{\text{H}^+}^0 + \nu_{\text{OH}^-}^0 = 349,8 + 198,6 = 548,4 \text{ ohm}^{-1} \quad (17)$$

Esta condutância corresponde a um equivalente-grama, ou um mol de íons H^+ em água pura. Como consequência, o número de mols de íons H^+ existentes em um centímetro cúbico de água pura será $\frac{5,54 \cdot 10^{-8}}{548,4} = 1,01 \cdot 10^{-10} \text{ mols cm}^{-3}$

Por isso, em um litro (1000 cm^{-3}) de água pura, a concentração de íons H^+ (que é igual à dos íons OH^-) será $c_{\text{H}^+} = c_{\text{OH}^-} = 1,01 \cdot 10^{-7} \text{ mols L}^{-1}$

Tem-se então, para o produto iônico aproximado da água:

$$K'_w = c_{\text{H}^+} \cdot c_{\text{OH}^-} = 1,02 \cdot 10^{-14} \quad (18)$$

em 25 °C, valor que pode ser considerado igual ao verdadeiro produto iônico, K_w , porque as concentrações iônicas na água pura são muito baixas.

O procedimento conhecido como calibração interna, foi usado para determinação do produto iônico da água [57]. Ele consiste basicamente na titulação de um ácido fraco com uma base forte no meio iônico considerado, as constantes de protonação do ácido fraco sendo conhecidas e o produto iônico da água pode ser determinado usando programas computacionais apropriados (BEST) para a titulação potenciométrica. Neste trabalho, utilizou-se o programa BEST para o cálculo do produto iônico da água, o qual oferece maior rapidez na determinação. O valor de K_w assim determinado serve também como um teste de qualidade do sistema de medidas. Após conhecido este parâmetro, os valores das constantes de protonação são calculadas com maior exatidão.

Com o uso dos dados da titulação potenciométrica de soluções de ácido acético com as soluções de KOH, foi obtido o $\text{pKw}_{(\text{exp.})} = -14,28$ e $\text{pKw}_{(\text{calc.})} = -14,24$ para a força iônica da solução 0,1 M. $\text{pKw}_{(\text{calc.})}$ usando

$$K_w = C_{\text{H}^+} \cdot C_{\text{OH}^-} \cdot \gamma_{\pm}^2 \text{ (apêndice B)} \quad (19)$$

Os valores de pKw foram confirmados, para cada ligante, no refinamento de suas constantes de protonação.

A construção do diagrama da distribuição das espécies sempre começa com a especificação da concentração de cada componente adicionado e sua certeza depende diretamente da qualidade de todas as constantes de equilíbrio envolvidas, inclusive a concentração hidrogeniônica do sistema estudado (apêndice B).

4.4.3 Estudo da proporção metal-ligante

No cálculo das constantes de estabilidade, as curvas A, B e C, da figura 16, são importantes porque informam sobre a relação molar do metal-ligante, informando a estequiometria da reação.

Conforme descrito por Martell e Motekaitis [79], uma ou mais curvas de pH devem ser obtidas para sistemas contendo uma ou mais relações molares do metal-ligante. Quando existir uma igualdade aproximada entre o número efetivo de grupos doadores do ligante e o número de coordenação do íon metálico em solução, uma relação molar (1:1) é suficiente.

A caracterização do ligante é o primeiro passo para posterior cálculo da constante de estabilidade, que experimentalmente, é feita pela determinação da estequiometria da reação e da constante de protonação desse ligante. Para isso, uma solução ácida do ligante é titulada com incrementos da solução titulante (base padronizada) de modo a fornecer, em média, cinquenta pontos experimentais, dos quais acima de dez pontos representarão “a” (mols da base / mols do ligante).

Na potenciometria, a variável medida é $-\log[H^+]$, que se destina a cálculos com um algoritmo, o qual calcula pH diretamente e minimiza a soma dos quadrados da massa de $-\log[H^+]$ residuais. O íon Pb^{2+} geralmente apresenta número de coordenação 4, desta forma, é esperado que coordene com os ligantes em estudo nas relações ligante:metal de 1:1 ou 2:1, visto que os ligantes cisteína, N-acetilcisteína e lisina, de acordo com o número de hidrogênios ionizáveis, apresentam 3, 2 e 3 sítios de ligação, respectivamente [55].

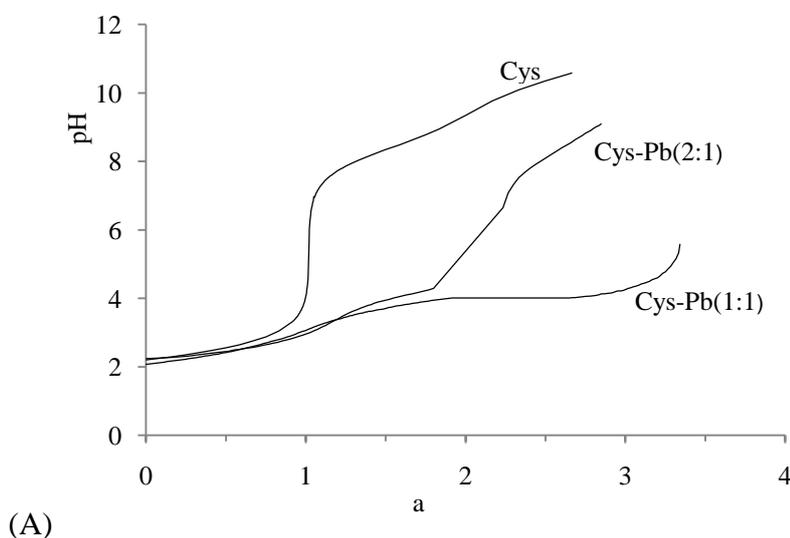
No cálculo da constante de estabilidade, as curvas obtidas por pH vs a (razão mols da base: mols do ligante) e m (razão mols da base: mols do íon metálico) dão uma informação importante sobre a razão molar dos complexos formados e portanto, são fundamentais para o cálculo das constantes de estabilidade. Inamul-Haq [110], encontrou, para os complexos entre o aminoácido L-hidroxiprolina e Pb(II) e com Cd (II), as espécies L e HL presentes em solução, a partir dos valores obtidos do grau de formação do ligante estarem compreendidos entre 0 e 1, indicando a presença do equilíbrio $L^- + H^+ \leftrightarrow LH$.

Em outro estudo, Ronald and Mark [111] obtiveram a formação de dois complexos entre Hg^{2+} e BAL (2,3-dimercaptopranol-1), quando plotaram pH vs a (mols da base: mols de BAL (BAL: Hg^{2+} = 2:1)), pois a curva mostrou pronunciados pontos de equivalência em dois e quatro equivalentes de base por Hg^{2+} . As constantes de estabilidade dos complexos HgBAL e $HgBAL_2^{2-}$ foram: $\log K_1$: $25,74 \pm 0,45$ e $8,61 \pm 0,10$, respectivamente, usando um método titrimétrico envolvendo o uso simultâneo de um eletrodo de vidro, mercúrio e calomelano.

De forma semelhante, Li e Martell [86], determinaram as constantes de estabilidade dos complexos de 2-mercaptoetilamina (MEA) com alguns íons metálicos trivalentes e outros divalentes por potenciometria. Na curva da titulação potenciométrica de MEA com KOH observou-se dois saltos em $a = 0$ e $a = 1$, indicando processos de dissociação de dois prótons. O primeiro correspondeu a forma diprotonada (H_2L^+) do ligante e o segundo fornecido pelo excesso do ácido mineral.

Zih-Perényi e colaboradores [112], na determinação das constantes de estabilidade de Pb-IDAEC (*imino diacetic acid-ethyl cellulose*), observaram dois pontos de equivalência na curva de titulação de Pb-IDAEC (1:2) vs a : $a = 1,5$ e $a = 2$. O primeiro ponto indica a formação do quelato Pb-IDAEC ($Pb + H_2L = PbL + 2H$) e ocorre a desprotonação de IDAEC restante ($H_2L = HL + H$). O segundo expressa a formação de $Pb(IDAEC)_2$ ($PbL + HL = PbL_2 + H$). Os gráficos de pH vs a , indicam o grau da titulação, ou seja, a razão molar da base adicionada e os grupos funcionais a serem titulados e, a mudança no ponto de equivalência representa a quantidade de prótons envolvidos durante a interação.

As curvas de pH versus a (mols da base/mol do ligante) e versus m (mols da base/mol do íon metálico) obtidas para relações molares de 1:1 e 2:1 ligante:metal dos sistemas contendo cisteína, N-acetilcisteína e lisina com chumbo, estão apresentados nas Figuras 12 (A e B), 13 (A e B) e 14 (A e B), respectivamente.



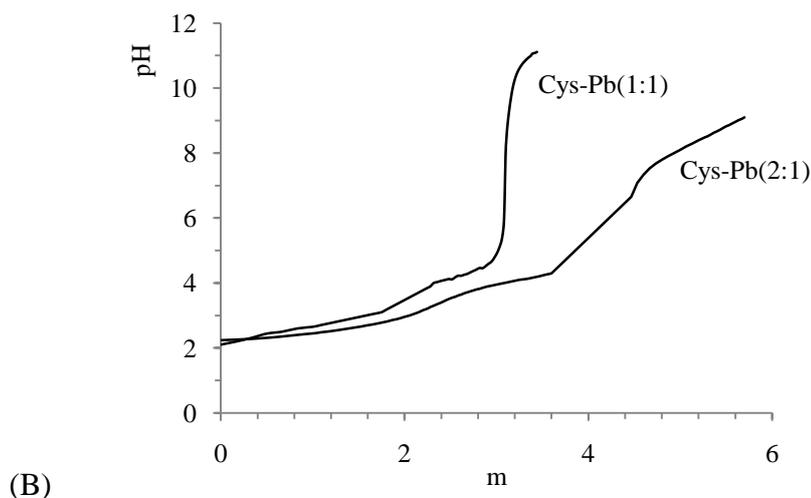


Figura 12 - Curvas de titulação potenciométrica com KOH de soluções de cisteína e cisteína-Pb nas proporções 1:1 e 2:1, (A) pH vs a e (B) pH vs m.

A principal característica da curva de titulação potenciométrica da cisteína com KOH padronizado (Figura 12 A) é a ocorrência de dois pontos de equivalência, $a = 1$ e $a = 2,5$, indicando processo de dissociação de dois prótons. O primeiro encontra-se em valores baixos de pH (3-6) devido a neutralização da própria dissociação do ácido da solução e corresponde a forma diprotonada do ligante (H_2L). O segundo encontra-se em valores mais altos de pH (8-10) obtido pela completa dissociação do ligante $L^-(HL)$, concordando com a estrutura da cisteína, que possui três prótons dissociáveis. A dissociação do próton a partir do grupo carboxílico ocorre em valores baixos de pH e os outros prótons ($-SH$ e $-NH_3^+$), pela dificuldade de designar o grupo envolvido no equilíbrio na região mais básica, aceita-se a ocorrência da ionização simultânea pelos dois grupos. Ainda é possível visualizar que, pela coincidência das curvas na região mais ácida ($pH < 3$) do ligante sozinho e o ligante e Pb contidas no gráfico indicam que o complexo com Pb não é formado nesta região. No comparativo entre essas curvas, é possível observar que o grande aumento de pH ocorre próximo de $a = 1,5$ sugerindo formação de complexo 1:1. As outras duas curvas obtidas na Figura 12 (A), é possível visualizá-las, com maior clareza na Figura 12 (B), pH vs m, que traz as titulações feitas na presença do íon metálico. Na curva Cys-Pb (1:1) observa-se dois pontos de equivalência, ou seja, dois valores de a . O primeiro ($a = 1$) (pH 2-4) sugerindo a formação de $CysPb$ ($Pb + H_2Cys = CysPb + 2H$) e o segundo ($a = 3$) (pH 4-6) correspondendo a Cys_2Pb ($CysPb + HCys = Cys_2Pb + H$). Na curva Cys-Pb (2:1), os valores obtidos para a diferem da anterior, $a = 2$; $a = 4$ porém, representa a formação das mesmas formas. O primeiro ponto de

equivalência ($\text{pH} = 2-4$) sugere a formação de CysPb ($(\text{Pb} + \text{H}_2\text{Cys} = \text{CysPb} + 2\text{H}^+, 0,3 \text{ mmol CysPb}, 0,3\text{mmol H}^+)$) e ocorre a primeira desprotonação do ligante restante ($\text{H}_2\text{Cys} = \text{HCys} + \text{H}^+, 0,3 \text{ mmol}$). Então, $0,6 \text{ mol H}^+$ são liberados durante esses dois processos, causando um ponto de equivalência em $a = 2$ ($0,6 \text{ mmol de H}^+ \text{ tituláveis} / 0,3 \text{ mmol dos grupos funcionais}$). O segundo ponto ($\text{pH} 4-6$) expressa a formação de Cys_2Pb ($\text{CysPb} + \text{HCys} = \text{Cys}_2\text{Pb} + \text{H}^+, 0,3 \text{ mmol}$) que aparece em $a = 2 + 2$ ($0,6 \text{ mmol H}^+ \text{ tituláveis} / 0,3 \text{ mmol grupos funcionais}$). A razão da proporção ligante:metal do complexo pode ainda se confirmar através da razão a / m , que para as curvas Cys-Pb (1:1) e Cys-Pb (2:1) corresponde a 1, indicando a estequiometria predominante 1:1.

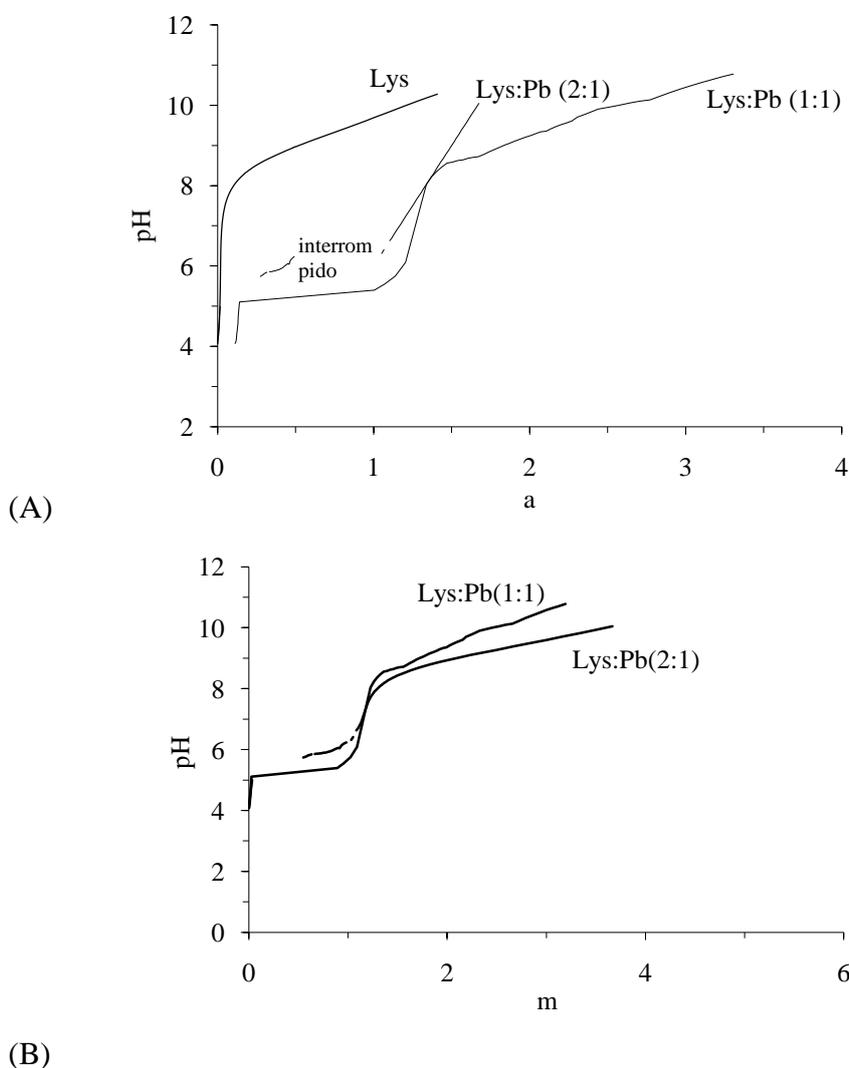
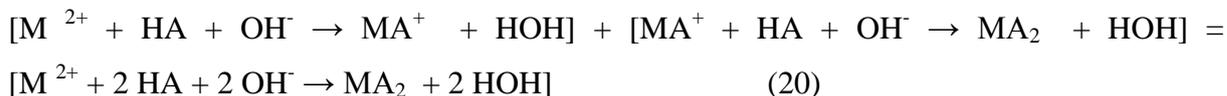


Figura 13 - Curvas de titulação potenciométrica com KOH de soluções de Lys e Lys-Pb nas proporções 1:1 e 2:1, (A) pH vs a e (B) pH vs m .

A principal característica da curva da lisina, Figura 13 (A), está em $a=0$, indicando o processo de dissociação de um próton [99]. Quando o pH é aumentado, cada átomo de

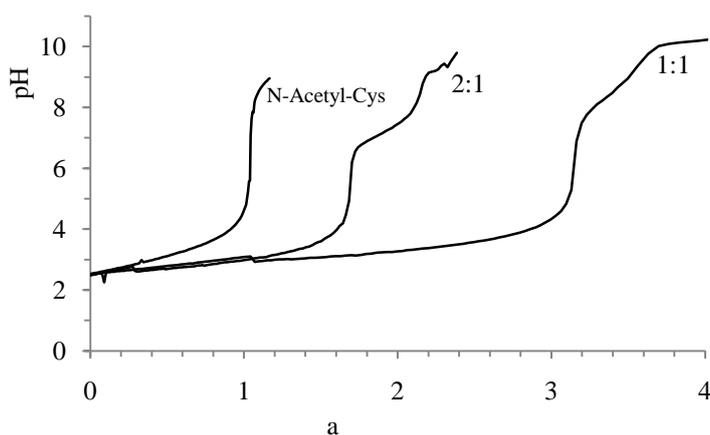
chumbo é combinado com duas moléculas do aminoácido e portanto, liberando dois íons H^+ . A evidência está no ponto de equivalência observado, onde a diferença de três unidades de pH mostra que os íons H^+ estão sendo liberados e supostamente usam os átomos de nitrogênio e o grupo carboxila para formação dos complexos, confirmando a estequiometria 1:1 [60].

A composição do complexo formado durante a interação dos íons metálicos com L-lisina foi estabelecida pela medida da magnitude da substituição do próton durante a titulação do ligante na ausência e presença dos íons metálicos em diferentes razões indicando a formação do complexo. $M^{n+} + HA \leftrightarrow MA^{(n-1)} + H^+$, onde M^{n+} representa Zn(II), Cd (II) e Hg (II), quando o íon metálico e ligante são misturados nas razões 1:4, 1:2 e 1:1 inflexões foram obtidas em $n = 0,5$; 1,0 e 2,0, respectivamente (n sendo mol de NaOH por mol de HA). Inflexões sugerem a formação de MA_2 correspondendo aos complexos de acordo com as equações:

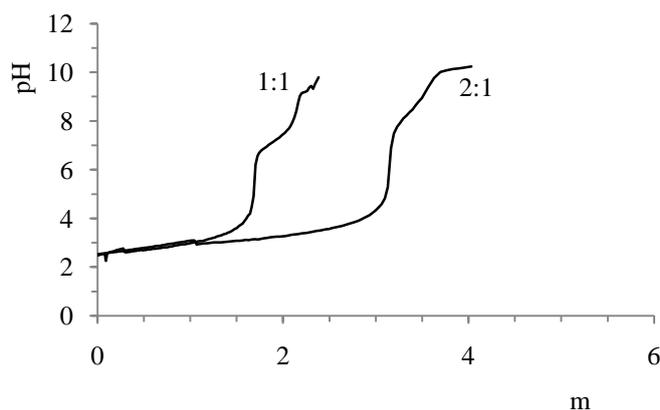


Os complexos 1:2 foram formados espontaneamente [75].

As curvas Lys-Pb (1:1) e Lys-Pb (2:1), Figura 13 (A), apresentam $a = 1,5$ e 1,0, respectivamente, ambas na faixa de pH entre 5-8. O mesmo comportamento foi exibido pelas curvas Lys-Pb (1:1) e Lys-Pb (2:1) na Figura 13 (B) (pH vs m), confirmando a estequiometria 1:1, conforme equação $Pb^{2+} + Lys + OH^- \rightarrow PbLys + HOH$. (21)



(A)



(B)

Figura 14 - Curvas de titulação potenciométrica com KOH de soluções de N-acetilcisteína (curva 1) e N-acetilcisteína-Pb nas proporções 2:1 (curva 2) e 1:1 (curva 3), (A) pH versus a e (B) pH versus m.

A partir das curvas da Figura 14 (A) se observa dois pontos de equivalência na titulação de N-acetilcisteína com chumbo, $a = 1,5$ e $2,0$ para razão 1:1 e $a = 3,0$ e $3,5$ para razão 2:1 e um ponto na titulação do ligante sem o metal, $a = 1$. Semelhante comportamento observa-se no sistema Pb-IDA (ácido iminodiacético), nas curvas de IDA e Pb-IDA (2:1). A coincidência das curvas na região ácida do sistema contendo ligante sozinho e o ligante e Pb (II) indica que o complexo com Pb(II) não é formado nessa região. O grande aumento de pH que ocorre próximo à $a = 1,5$ sugere a formação do complexo 1:1. A subsequente região tamponada em $a = 1,5$ continua além de $a = 2,0$ sendo indicativo de dissociação da água para forma coordenada OH^- , e conseqüentemente, o cálculo da formação de PbL_2 é concluído [77]. O gráfico B da Figura 14 informa os valores de $m = 1,5$ e $2,0$ para curva da titulação N-Acetil-Cys-Pb (1:1) e $m = 3,0$ e $3,5$ para N-Acetil-Cys-Pb (2:1) que permite verificar a estequiometria predominante do complexo (1:1), a partir da razão a/m , que resulta em 1.

A partir de então se adotou no cálculo das constantes a proporção 2:1 e 1:1 para as titulações Pb-Cys e 1:1 para Pb-Lys e Pb- N-Acetil-Cys.

Com o objetivo de minimizar erros sistemáticos devido a alterações nos coeficientes de atividade como resultado de pequenas mudanças nas condições experimentais, constantes de protonação dos ligantes usadas como referência no cálculo das constantes de formação dos complexos foram redeterminadas sob condições idênticas às da formação dos complexos.

O programa computacional BEST[®] foi usado para refinar constantes de formação estimadas e desconhecidas de prováveis complexos presentes em solução. Nos cálculos das

constantes de estabilidade dos complexos em solução, foram usadas as constantes de hidrólise do chumbo, Tabela 13, e o diagrama de equilíbrio das espécies hidrolisadas, no Anexo B.

Para as reações com proporções do ligante: metal (1:1) para os três ligantes, não foi observada a formação de precipitado, indicando assim que todo o chumbo (II) livre foi complexado pelos ligantes. Isto foi comprovado através dos cálculos das constantes de estabilidade destes complexos, uma vez que sem o uso das constantes de hidrólise do chumbo obteve-se valores menores (Cys e N-Acetil-Cys) ou igual (Lys) para o desvio padrão de unidades de pH (σ) do que com o uso das constantes de hidrólise do chumbo.

Para as curvas de titulação das soluções ligante-chumbo na proporção (2:1) para N-acetilcisteína e lisina o uso das constantes de hidrólise foi necessária em vista do íon Pb^{2+} , nestas condições, sofrer o processo de hidrólise. A hidrólise foi observada após a adição de incrementos da base, onde ocorreu a formação de uma turvação ao atingir, aproximadamente, pH 3,0 na titulação com N-acetilcisteína e para lisina, o mesmo foi observado ao atingir o pH 5,0. Assim, tempos extremamente grandes foram necessários para estabelecer o equilíbrio do sistema após sucessivas adições de pequenos volumes de base. Isto indica que a concentração de chumbo (II) livre foi suficiente para precipitar $Pb(OH)_2$ apresentando uma segunda fase (solução turva) na faixa de pH entre 3,0 e 4,5 para N-acetilcisteína e entre 5,0 e 7,0 para lisina. Contudo, a dissolução do precipitado em valores altos de pH sugere que envolvem a formação do complexo $Pb(OH)_3^-$. Mesmo assim, todos os dados obtidos na região de pH acima referidos foram empregados no cálculo das constantes de estabilidade.

Através do adequado uso do programa, é possível obter um alto grau de discriminação na seleção das espécies químicas. Complexos de metais multinucleares e outras espécies, tais como $M(HL)_2$, $M(OH)_2L$ e $ML(OH)_n$, incluídas em vários estágios de refinamento foram rejeitadas devido ao aumento no valor de " σ ". A inclusão dessas espécies não melhorou os desvios padrões estimados, porém isso foi necessário em todos os sistemas envolvendo o chumbo e os ligantes estudados para introduzir uma forma hidrolizada do complexo, $M(OH)L$, para minimizar os desvios padrão estimados [86].

Tabela 13 - Constantes de hidrólise do chumbo ($\log \beta'$) [101].

	$\log \beta'$	β'
$\text{Pb}(\text{OH})^+$	-7,8	$1,58 \cdot 10^{-8}$
$\text{Pb}_3(\text{OH})_4^{2+}$	-22,69	$2,04 \cdot 10^{-23}$
$\text{Pb}_3(\text{OH})_5^+$	-30,8	$1,58 \cdot 10^{-31}$
$\text{Pb}_4(\text{OH})_4^{4+}$	-19,58	$2,63 \cdot 10^{-20}$
$\text{Pb}_6(\text{OH})_8^{4+}$	-42,43	$3,71 \cdot 10^{-43}$

Tendo em vista o valor das constantes de hidrólise do chumbo (terceira coluna da Tabela 13) constatou-se que a inclusão das mesmas no cálculo das constantes de estabilidade não contribuiu para uma minimização do desvio (valor “ σ ”), ou seja, devido aos valores insignificantes das hidrólises de chumbo, foi possível obter os mesmos resultados sem a inclusão das mesmas.

4.4.4 Determinação das constantes de estabilidade dos complexos cisteína-chumbo

Cisteína com três prótons ionizáveis é propensa naturalmente a formação de complexos protonados. Além disso, o tamanho do átomo de enxofre facilita a formação de complexos polinucleares [60].

Após a calibração do sistema de titulação potenciométrica, foi feita a determinação do valor de pK_w nas condições experimentais adotadas, bem como a determinação experimental das constantes de protonação da cisteína, conforme descrito por Martell [79]. O diagrama de equilíbrio das espécies presentes na solução titulada de cisteína (30 mmol L^{-1}) em KNO_3 $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ está mostrado na Figura 15. Os valores obtidos para as constantes de protonação da cisteína ($\log \beta$) bem como os valores tabelados ($\log \beta^*$), estão listados na Tabela 14.

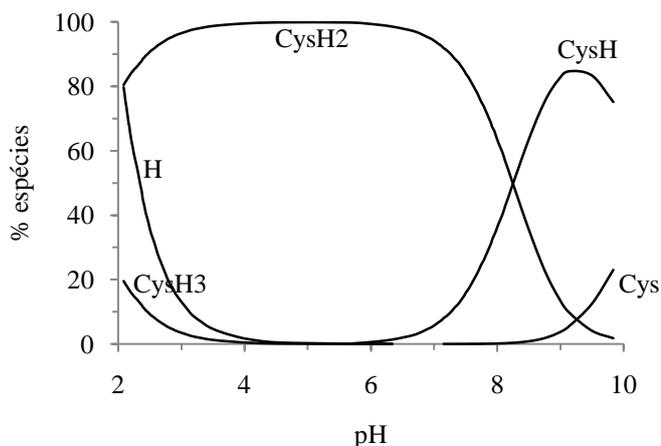


Figura 15 - Diagrama de equilíbrio de espécies para cisteína (30 mmol L^{-1}) em solução aquosa com $\mu = 0,1 \text{ mol L}^{-1}$.

Na Figura 15 constata-se no sistema, a existência em menos de 20%, da espécie CysH3 na faixa de pH 2 a 4. Na maior faixa de pH utilizada, constata-se a existência da espécie CysH2 (pH 2 a 10) em uma expressiva porcentagem, bem como a espécie CysH, porém em uma faixa de pH mais restrita (7 a 10).

Tabela 14 - Constantes de protonação da cisteína ($\log \beta$).

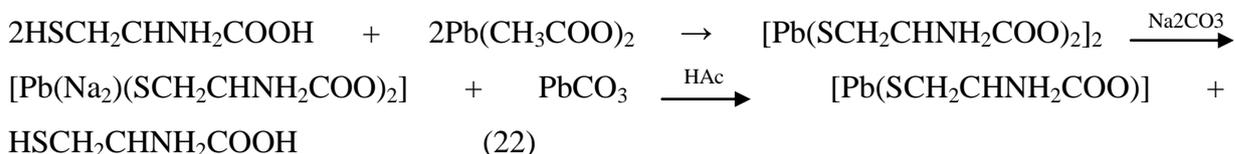
Espécie	$\log \beta$	$\log \beta^*$
HL	10,48	10,87
H ₂ L	18,81	19,07
H ₃ L	20,81	22,04
	$\sigma = 0,0087$	

β obtido experimentalmente a $25 \text{ }^\circ\text{C}$, $\mu=0,1\text{M}$ e $\text{pKw} = -13,99$

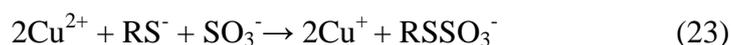
β^* valores tabelados [55]

Segundo a classificação de Pearson [50] o esperado é que o chumbo forme complexo com a cisteína através dos grupos $-\text{SH}$, que é base mole, $-\text{COO}^-$ e $-\text{NH}_2$, são bases duras. Entretanto, o Pb^{2+} que atua como um ácido intermediário deveria formar complexos mais estáveis com bases intermediárias. Porém neste trabalho, verificou-se a ligação de um ácido intermediário com bases duras e uma base mole. Então, a cisteína pode atuar como um ligante tridentado para o chumbo. Comportamento semelhante observa-se entre cisteína e zinco e cisteína e cobre. No caso de complexos de Zn-cisteína na proporção 1:2, dois anéis de cinco membros são quelados ao metal, sendo que cada um desses anéis são formados pelo envolvimento de grupos sulfidrilas e amino, ficando o grupamento carboxilato livre. O Zn

também pode ser coordenado pela cisteína numa proporção 1:1, neste caso, o enxofre, do grupo sulfidril, o nitrogênio do grupo amino e o oxigênio do grupo carboxila estão envolvidos na reação [113]. Complexos de chumbo e cisteína podem se formar a partir da interação da cisteína com o acetato de chumbo, na presença de carbonato de sódio, através da seguinte reação:



A cisteína neste caso atua como um ligante tridentado onde o enxofre, os grupos amino e o carboxílico estão envolvidos, tendo este complexo uma alta estabilidade [28]. Na reação entre cisteína e cobre II ocorre a redução dos íons cobre II a cobre I e a oxidação da cisteína a cistina formando o complexo cobre I e cistina.



A partir dos exemplos apresentados acima, pode-se concluir que a cisteína forma complexos com vários metais, sendo que cada complexo formado possui características próprias variando com o tipo de metal.

Usando os dados e resultados das titulações potenciométricas de soluções de cisteína e cisteína mais solução de nitrato de chumbo com hidróxido de potássio, foi montado um arquivo de introdução dos dados no programa computacional BEST[®]. O processamento dos dados foi feito através do refinamento das constantes de estabilidade estimadas ou desconhecidas, introduzidas no arquivo dos dados, feitos até um valor mínimo no desvio padrão de unidades de pH (σ) ser alcançado; significando que o modelo proposto descreve o sistema real, fornecendo então os valores das constantes de estabilidade dos complexos formados entre cisteína e chumbo num arquivo mostrado no apêndice D.

O programa BEST[®] permite a resolução do conjunto das constantes de equilíbrio correspondente ao modelo selecionado e todas suas variações.

O uso do algoritmo para computação das constantes de equilíbrio no BEST[®] envolve a seguinte sequência: 1^o) começa-se com um conjunto de constantes de estabilidade conhecidas ou estimadas (β 's) e calcula [H] e todos os pontos de equilíbrio; 2^o) calcula-se o quadrado da soma da massa dos desvios no pH como: $U = \sum w(\text{pH}_{\text{obs}} - \text{pH}_{\text{calcd}})^2$ onde $w = 1/(\text{pH}_{i+1} - \text{pH}_{i-1})^2$, um fator importante que serve para reduzir a influência da menor

precisão dos valores de pH em alguma região de pH em que a curva apresente maior inclinação; 3^o) ajusta-se as constantes de estabilidade desconhecidas e repete os cálculos até a obtenção da máxima minimização do “sigma fit (σ)” e desta maneira fornecer os valores finais de β calculados [76].

Metodologia dos Cálculos das Constantes de Formação:

O cálculo das constantes de formação envolve a determinação da estequiometria e das concentrações das espécies presentes em uma mistura, contendo o ligante, o íon metálico, o íon de fundo e a base adicionada em cada etapa da curva de titulação. Em muitas situações, a mistura titulada também contém um ácido forte, adicionada para protonar completamente o ligante.

Na determinação das constantes de formação, todos os equilíbrios importantes no sistema estudado precisam ser considerados, incluindo as reações de protonação e desprotonação do ligante e as reações de hidrólise do íon metálico.

As equações de balanço de massa relacionam as concentrações totais de metal (M_t), ligante (L_t) e ácido (H_t) em cada ponto da curva de titulação com as concentrações analíticas $[M]$, $[L]$ e $[H]$

$$M_t = [M] + \sum_{i=1}^n p \cdot [M_p L_q H_r] \quad (24)$$

$$L_t = [L] + \sum_{i=1}^n q \cdot [M_p L_q H_r] \quad (25)$$

$$H_t = [H] - [OH] + \sum_{i=1}^n r \cdot [M_p L_q H_r] \quad (26)$$

Definindo-se a concentração da espécie i em relação às concentrações dos reagentes livres e à constante de formação cumulativa β_{pqr} :

$$C = [M_p L_q H_r] = \beta_{pqr} [M]^p [L]^q [H]^r \quad (27)$$

pode-se escrever:

$$M_t = [M] + \sum_{i=1}^n p \cdot \beta_{pqr} [M]^p [L]^q [H]^r \quad (28)$$

$$L_t = [L] + \sum_{i=1}^n q \cdot \beta_{pqr} [M]^p [L]^q [H]^r \quad (29)$$

$$H_t = [H] - [OH] + \sum_{i=1}^n r \cdot \beta_{pqr} [M]^p [L]^q [H]^r \quad (30)$$

O balanço das cargas pode ser expresso como:

$$[H] + [B] + m \cdot [M] - [X] - [OH] - 1 \cdot [L] + \sum_{i=1}^n (pm+r-ql) \cdot \beta_{pqr} \cdot [M]^p [L]^q [H]^r = 0 \quad (31)$$

Assim, as determinações das constantes de formação por método potenciométrico requerem a medida do titulante B adicionado (V_{oh}) e das concentrações dos íons hidrogênio $[H]$ ou íons metálicos $[M]$ com eletrodos adequados, na presença do ligante $[L]$ e do íon não complexante $[X]$, adicionado para manter a força iônica.

No sistema de equações (5) - (8), as concentrações M_t , L_t e H_t são conhecidas. As incógnitas são as concentrações livres do metal, ligante e íons hidrogênio e as constantes de formação β_{pqr} .

As concentrações hidrogeniônica livre e do metal não complexado, podem ser determinados experimentalmente. Em titulações potenciométricas usando o eletrodo de vidro, a medida da concentração hidrogeniônica $[H]$ pode ser feita adequadamente, conforme calibração do mesmo.

Em cada ponto da curva de titulação as espécies presentes na solução titulada estão em equilíbrio e as expressões (5) - (8) se aplicam.

O problema matemático, no caso de um sistema contendo um íon metálico e um ligante, consiste em resolver um sistema com três equações (5) - (7) e $2 + m$ incógnitas (onde $m =$ número de constantes de estabilidade desconhecidas) para os n pontos da curva de titulação.

Valores iniciais para as constantes de formação de todas as espécies são fornecidas e usam-se as medidas experimentais da concentração hidrogeniônica.

A partir de H_t , pode-se calcular o volume do titulante correspondente pela relação:

$$H_t = [A] + n_p \cdot L_t - [B] \quad (32)$$

onde: $[A]$ = concentração de ácido forte na mistura titulada

$[B]$ = concentração do titulante e n_p = número de prótons dissociáveis do ligante.

Desta expressão, pode-se calcular o volume do titulante adicionado, considerando o número de moles de cada componente da solução pela expressão (10) (onde V_i = volume inicial da mistura e V_{oh} = volume do titulante):

$$V_{oh} = \frac{V_i \cdot ([A] + n_p \cdot L_t) - V_t \cdot H_t}{(H_t + [B])} \quad (33)$$

O conjunto de informações usadas neste cálculo constitui o modelo matemático, o qual relaciona os dados experimentais (medidas de volume, pH e concentrações) com o parâmetro químico cujo valor se quer determinar, no caso as constantes de formação.

Para determinar os parâmetros é necessário encontrar valores que forneçam o melhor ajuste entre os valores experimentais e calculados.

Geralmente, define-se o melhor ajuste pelo critério dos mínimos quadrados, de tal forma que a soma dos quadrados dos resíduos de uma quantidade medida (y_i (exp)) e a calculada (y_i (calc)) com os dados do modelo proposto seja mínima, ou seja, U seja mínimo

$$\text{para expressão: } U = \sum_{i=1}^n [(y_i(\text{calc}) - y_i(\text{exp}))^2] \quad (34)$$

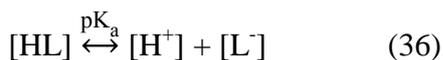
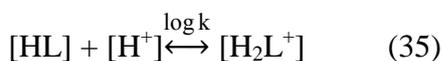
No caso de determinação das constantes de estabilidade, U pode ser calculado em relação a variação nos volumes de titulante medidos e calculados ou em relação às concentrações totais M_t e L_t . O programa BEST[®], além das constantes de formação, refina também as concentrações dos reagentes livres, envolvendo também as equações de balanço de massa, ou seja, todas as concentrações totais dos reagentes são consideradas como sujeitas a erro experimental e não apenas H_t . O valor de U é calculado como a soma dos quadrados dos resíduos de todas as equações do balanço de massa.

A temperatura da solução, força iônica do meio e a composição iônica do meio são fatores importantes que devem ser controlados rigorosamente. As medidas são feitas usando-se um sal não complexante para manter a força iônica em um valor fixo, e assim, passa a valer a premissa de que os coeficientes de atividade são constantes para todas as medidas e que o eletrólito usado não forma complexo com as espécies presentes na solução.

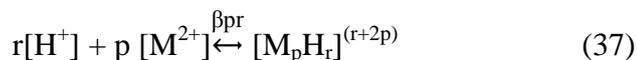
Como a análise matemática requer medidas feitas em várias concentrações totais iniciais de metal e de ligante é importante executar titulações mantendo-se fixa a concentração de um dos reagentes e variando-se as demais.

Na determinação das constantes de formação, num sistema constituído de um íon metálico divalente M^{2+} e do ácido HL, podem ocorrer as seguintes reações:

Reações de protonação e desprotonação do ligante:



Reações de hidrólise do íon metálico:



Reações de formação de complexos binários metal-ligante:



Os equilíbrios próton-ligante devem ser avaliados separadamente e os resultados usados sem outros ajustamentos no estudo dos equilíbrios dos sistemas contendo metal. A possibilidade da hidrólise do metal deve ser considerada (escolhidos da literatura aqueles obtidos na mesma temperatura e força iônica, que são considerados constantes nos cálculos posteriores, relativos aos equilíbrios metal-ligante), que para este estudo não foi significativa, como descrito anteriormente.

O objetivo do cálculo das constantes de formação consiste em encontrar o modelo matemático, ou seja, os valores dos coeficientes estequiométricos (p, q e r) e o conjunto de constantes correspondentes β_{pqr} que melhor reproduzam os dados experimentais.

A análise matemática pode ser executada em quatro etapas: 1) proposição da composição estequiométrica das espécies existentes a partir das inflexões nas curvas de titulação e do aspecto das curvas de formação, calculadas para titulações do ligante e dos sistemas binários metal-ligante. 2) cálculo das constantes de protonação do ligante e de formação dos complexos binários metal-ligante através de métodos gráficos. 3) refinamento dos valores obtidos na etapa anterior com a utilização do programa BEST. Cálculo da distribuição quantitativa das espécies em função do pH, para verificar se as espécies consideradas existem em concentrações significativas na faixa de pH investigada. 4) escolha do melhor modelo matemático (entre os investigados), comparando-se os valores de sigma. Aqueles que apresentarem os menores valores são usados para gerar curvas de titulação potenciométrica e de formação, às quais permitem, quando comparadas às curvas experimentais, verificar a adequação do ajuste.

As constantes para cada espécie proposta são refinadas. O processamento exige, para o refinamento das constantes, além das medidas de volume e de pH, que sejam fornecidas as concentrações iniciais do metal e do ligante na solução titulada e a constituição de cada espécie, com um valor estimado de sua respectiva constante de formação. A escolha do modelo não pode se basear apenas em resultados numéricos exigindo uma avaliação crítica do sistema químico estudado.

A análise do sistema metal-ligante deve ser iniciada pelo refinamento dos valores das constantes de protonação do ligante, calculadas a partir das titulações feitas na ausência do íon metálico. As espécies complexas formadas em solução contendo o íon metálico são incluídas no modelo progressivamente. O modelo vai se tornando mais complexo e o refinamento continua até que todas as espécies predominantes e também aquelas menos significativas tenham sido avaliadas [114]. O processamento simultâneo de dados de várias titulações feitas usando proporções metal:ligante diferentes permite chegar a uma boa discriminação das espécies.

Na Tabela 15, estão os resultados obtidos para o log das constantes de estabilidade dos complexos formados entre cisteína e chumbo, usando as constantes de protonação da cisteína ($\log \beta$) e os resultados obtidos com a inclusão das constantes de hidrólise do chumbo nos cálculos ($\log \beta^*$). O arquivo com os resultados está mostrado no apêndice C.

Tabela 15 - Resultado da computação dos dados da titulação potenciométrica para obtenção de constantes de estabilidade dos complexos formados entre chumbo e cisteína, na proporção de 1:1, $\mu = 0,1 \text{ mol L}^{-1}$ e $T = 25 \text{ }^\circ\text{C}$.

$\log \beta$	$\log \beta^*$	$\log \beta_{\text{literatura}}$	Complexo formado
12,5425	12,0288	-	ML
13,8563	12,2830	16,16	MHL
1,6173	0,8655	2,04	MLOH
-16,3774	-16,8263	-	ML(OH) ₂
23,9841	25,8622	25,10	MHL ₂
24,0022	25,7140	-	ML ₂
$\sigma=0,0589$	$\sigma= 0,0974$		

β = cálculos sem as constantes de hidrólise do chumbo

β^* = cálculos com as constantes de hidrólise do chumbo

O desvio padrão de unidades de pH (σ) obtido para os cálculos usando as constantes de hidrólise do chumbo foi maior ($\sigma = 0,0974$), mesmo assim foram destacados os $\log \beta^*$ dos complexos predominantes em solução, obtidos com as constantes de hidrólise do chumbo, valores estes considerados como resultados dos cálculos das constantes de estabilidade dos complexos formados em solução aquosa para o sistema cisteína-Pb.

As espécies predominantes em solução nas condições usadas, ou seja, $\mu = 0,1 \text{ mol L}^{-1}$ e $T = 25 \text{ }^\circ\text{C}$, foram, com os respectivos valores do log da constante de estabilidade:

$$\text{CysPbOH} \quad \log \beta = 1,62 \pm 0,13$$

$$\text{Cys}_2\text{Pb} \quad \log \beta = 24,00 \pm 0,11$$

Estes valores são valores médios de uma série de três cálculos para cada conjunto de três titulações.

O diagrama de equilíbrio das espécies presentes no sistema constituído de cisteína-Pb, para os cálculos usando as constantes de hidrólise do chumbo, está representado na Figura 16, mostrando as espécies predominantes em solução em função do pH.

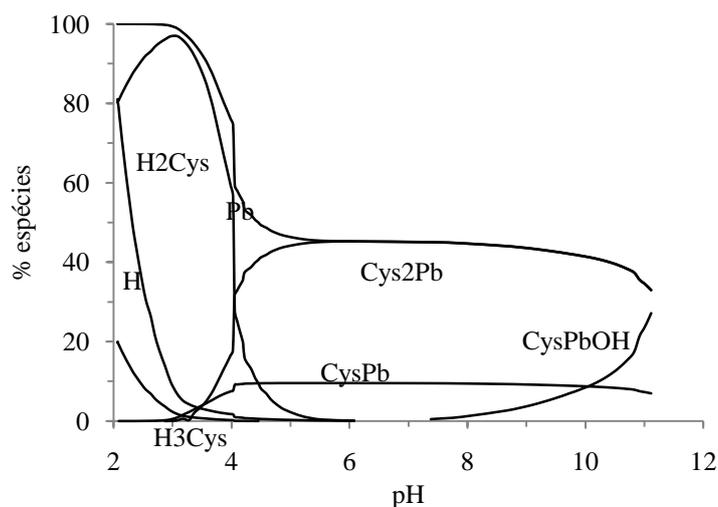


Figura 16 - Porcentagem das espécies em solução para uma relação molar 1:1 de cisteína/Pb, como função do pH, $\mu = 0,1 \text{ mol L}^{-1}$ e $T = 25 \text{ }^{\circ}\text{C}$.

Através do diagrama de equilíbrio das espécies, pode-se observar que na faixa de pH de 3,0 a 11,0 a espécie predominante é Cys_2Pb e que acima de pH 7,0 a espécie CysPbOH aparece e aumenta sua porcentagem em solução. As duas espécies existentes correspondem a formação de complexos 1:1 e 2:1.

Segundo Li e Manning [98], a ligação é via grupos sulfidríla, amino e carboxilato. A coordenação via grupos S, N e O também foi verificada por Lenz e Martell [115], que propuseram que metionina, S-metilcisteína e etionina foram todos bidentados em seus complexos com íons chumbo (II). Hay e Porter registraram o complexo ML_2 entre chumbo (II) e metilestercisteína, com grupos N e S, e em maiores valores de pH, via titulação, apresentaram as espécies PbL^+ , PbL_2 , PbHL^{2+} , $\text{Pb}(\text{HL})_2^{2+}$ e PbHL_2^+ [116].

4.4.5 Determinação das constantes de estabilidade dos complexos N-acetilcisteína-chumbo

A N-acetilcisteína possui grande semelhança estrutural com a cisteína, conforme Anexo A, respectivamente, portanto, é possível afirmar que ela possua dois prótons ionizáveis, sendo um grupo carboxilato e um grupo tiol, podendo a N-acetilcisteína atuar como ligante bidentado para o chumbo.

Os dados foram tratados da mesma forma como foram para cisteína, o diagrama de equilíbrio das espécies para N-acetilcisteína está mostrado na Figura 17 e os resultados obtidos no cálculo das constantes de protonação da N-acetilcisteína, estão na Tabela 16.

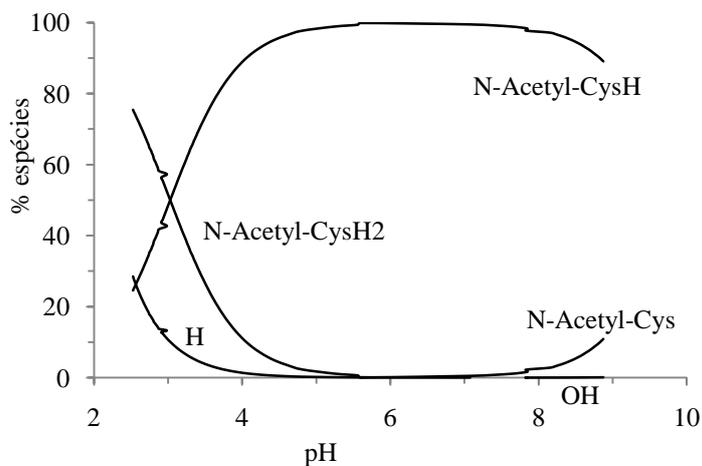


Figura 17 - Diagrama de equilíbrio de espécies para N-acetilcisteína (30 mmol L^{-1}) em solução aquosa com $\mu = 0,1 \text{ mol L}^{-1}$.

Tabela 16 - Constantes de protonação da N-acetilcisteína

Espécie	$\log \beta$	$\log \beta$ literatura
HL	9,6076	-
H ₂ L	12,6233	-
	$\sigma = 0,0080$	

β obtido experimentalmente a $25 \text{ }^\circ\text{C}$, $\mu = 0,1 \text{ mol L}^{-1}$ e $\text{pKw} = -13,95$

β literatura: não há registro de valores na literatura.

Usando os dados e resultados da titulação potenciométrica de soluções de N-acetilcisteína e nitrato de chumbo em KNO_3 , mais as constantes de protonação da N-acetilcisteína, foram montados os arquivos para introdução dos dados, com e sem as constantes de hidrólise do chumbo. Feitos os cálculos, as constantes de estabilidade ($\log \beta$) foram obtidas sem o uso das constantes de hidrólise do chumbo e $\log \beta^*$, com a inclusão das constantes de hidrólise, os resultados obtidos estão mostrados na Tabela 17. Os dados usados e obtidos no cálculo com as constantes de hidrólise do chumbo estão no apêndice D.

Tabela 17 - Resultado da computação dos dados da titulação potenciométrica para obtenção de constantes de estabilidade dos complexos formados entre chumbo e N-acetilcisteína, na proporção de 1:1, $\mu = 0,1 \text{ mol L}^{-1}$ e $T = 25 \text{ }^\circ\text{C}$.

$\log \beta$	$\log \beta^*$	$\log \beta_{\text{literatura}}$	Complexo formado
5,2914	1,3139	-	MHL
21,7325	-10,3029	-	MLOH
17,7753	21,2403	-	MHL ₂
-1,0017	4,1709	-	ML ₂
$\sigma = 0,0687$	$\sigma = 0,0863$		

β = cálculos sem as constantes de hidrólise do chumbo
 β^* = cálculos com as constantes de hidrólise do chumbo

O desvio padrão de unidades de pH (σ) obtido para os cálculos sem usar as constantes de hidrólise do chumbo foi mais baixo do que os obtidos usando as mesmas ($\sigma = 0,0687$), destacando, assim, os $\log \beta$ dos complexos predominantes em solução, obtidos sem as constantes de hidrólise do chumbo, valores estes considerados como resultados dos cálculos das constantes de estabilidade dos complexos formados em solução aquosa para o sistema N-acetilcisteína-Pb. Como não há registros, na literatura, de valores de constantes calculadas anteriormente para este ligante, os mesmos obtidos neste estudo representam novos dados, sem valores referenciais para comparação.

As espécies existentes em solução, em maior quantidade, nas condições usadas, ou seja, $\mu = 0,1 \text{ mol L}^{-1}$ e $T = 25 \text{ }^\circ\text{C}$, foram, com os respectivos valores da constante de estabilidade:

N-Acetil-Cys ₂ Pb	$\log \beta = -1,00 \pm 0,18$
N-Acetil-CysPbOH	$\log \beta = 21,7325 \pm 0,23$
N-Acetil-Cys ₂ PbH	$\log \beta = 17,7753 \pm 0,20$

Estes resultados são valores médios de uma série de três cálculos para cada conjunto de três titulações.

O diagrama de equilíbrio das espécies, para o sistema N-Acetilcisteína-Pb, está representado na Figura 18 e mostra as espécies predominantes em solução em função do pH.

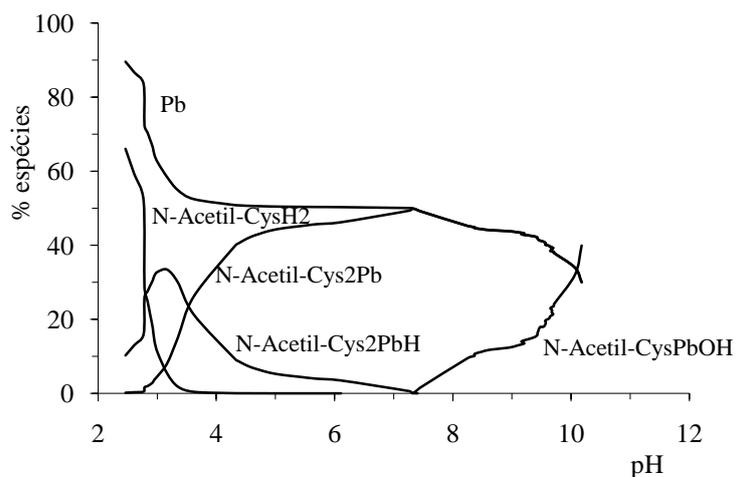


Figura 18 - Porcentagem das espécies em solução para uma relação molar 1:1 de N-acetilcisteína/Pb, como função do pH, $\mu = 0,1 \text{ mol L}^{-1}$ e $T = 25 \text{ }^{\circ}\text{C}$.

Através do diagrama de equilíbrio das espécies (Figura 18) sem o uso das constantes de hidrólise do chumbo, se pode observar que na faixa de pH de 2,5 a 11,0, as espécies predominantes são N-Acetil-Cys₂Pb, N-Acetil-CysH₂, N-Acetil-Cys₂PbH e N-Acetil-CysPbOH. As espécies existentes correspondem a formação de complexos 2:1 e 1:1. Em pH fisiológico (7,4) tem-se somente a espécie N-Acetil-Cys₂Pb ($\approx 50\%$). Segundo Raghavan [103] a coordenação via grupos carboxilato e amino e interação com o grupo tiol é o que predomina na reação da N-acetilcisteína e chumbo (II), em complexos 1:1.

4.4.6 Determinação das constantes de estabilidade dos complexos lisina-chumbo

A lisina possui três hidrogênios ionizáveis, três sítios de coordenação, sendo um grupo COO⁻ e dois -NH₂, todos sujeitos a coordenação com íons metálicos [115].

Para a obtenção das constantes de estabilidade dos complexos formados entre lisina e chumbo, foi adotado o mesmo procedimento usado nos casos anteriores, ou seja, através de dados de titulação potenciométrica de soluções de lisina com e sem chumbo, foram obtidas inicialmente as constantes de protonação da lisina e pK_w, o diagrama de equilíbrio das espécies presentes na solução titulada de lisina (30 mmol L⁻¹) em KNO₃ 0,1 mol L⁻¹ está mostrado na Figura 19 e logo após, a obtenção das constantes de estabilidade dos complexos formados, usando o programa computacional BEST, conforme descrito por Martell [79]. Os resultados obtidos para as constantes de protonação da lisina estão colocados a seguir, na Tabela 18.

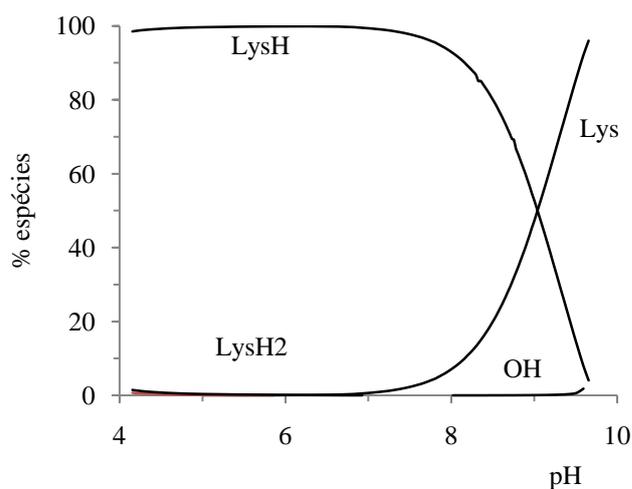


Figura 19 - Diagrama de equilíbrio de espécies para lisina (30 mmol L^{-1}) em solução aquosa com $\mu = 0,1 \text{ mol L}^{-1}$.

Tabela 18 - Constantes de protonação da lisina.

Espécie	$\log \beta$	$\log \beta^*$
HL	10,2086	10,28
H ₂ L	19,3625	19,18
H ₃ L	21,6855	21,28
	$\sigma = 0,0499$	

β obtido experimentalmente a $25 \text{ }^\circ\text{C}$, $\mu=0,1 \text{ mol L}^{-1}$ e $\text{pKw} = -14,28$

β^* valores tabelados [57].

Os arquivos foram montados para introdução dos dados, com e sem as constantes de hidrólise do chumbo, feitos os cálculos, as constantes de estabilidade dos complexos formados entre lisina e chumbo ($\log \beta$) foram obtidas sem o uso das constantes de hidrólise do chumbo e $\log \beta^*$, com a inclusão das constantes de hidrólise, os resultados obtidos estão mostrados na Tabela 19. O arquivo com os dados usados e obtidos nos dois cálculos, com o programa computacional BEST[®] com as constantes de hidrólise do chumbo, estão no Apêndice E.

Tabela 19 - Resultado da computação dos dados da titulação potenciométrica para obtenção de constantes de estabilidade dos complexos formados entre chumbo e lisina, na proporção de 1:1, $\mu = 0,1 \text{ mol L}^{-1}$ e $T = 25 \text{ }^\circ\text{C}$.

$\log \beta$	$\log \beta^*$	$\log \beta_{\text{literatura}}$	Complexo formado
9,2563	9,2552	-	ML
7,2199	7,2229	-	MHL
0,2644	0,2640	-	MLOH
-10,4278	-10,4288	-	ML(OH) ₂
-21,5476	-21,5463	-	ML(OH) ₃
$\sigma=0,1639$	$\sigma=0,1639$		

β = cálculos sem as constantes de hidrólise do chumbo

β^* = cálculos com as constantes de hidrólise do chumbo

As mesmas espécies e valores das respectivas constantes de estabilidade foram encontradas quando efetuou-se o cálculo com e sem as constantes de hidrólise do chumbo. O desvio padrão de unidades de pH (σ) obtido para ambos cálculos foi aceitável ($\sigma = 0,1639$), mesmo assim foram destacadas os $\log \beta^*$ dos complexos predominantes em solução, obtidos com as constantes de hidrólise do chumbo, valores estes considerados como resultados dos cálculos das constantes de estabilidade dos complexos formados em solução aquosa para o sistema lisina-Pb.

As espécies predominantes em solução nas condições usadas, ou seja, $\mu = 0,1 \text{ mol L}^{-1}$ e $T = 25 \text{ }^\circ\text{C}$, foram, com os respectivos valores do log da constante de estabilidade:

LisPb	$\log \beta = 9,2563 \pm 0,18$
LisPbOH	$\log \beta = 0,2644 \pm 0,16$
LisPb(OH) ₃	$\log \beta = -21,5463 \pm 0,22$

Esses valores são valores médios de uma série de três cálculos para cada conjunto de três titulações.

O diagrama de equilíbrio das espécies presentes em maior quantidade nas soluções contendo lisina e chumbo (1:1), força iônica $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ e temperatura de $25 \text{ }^\circ\text{C}$, está representado na Figura 20.

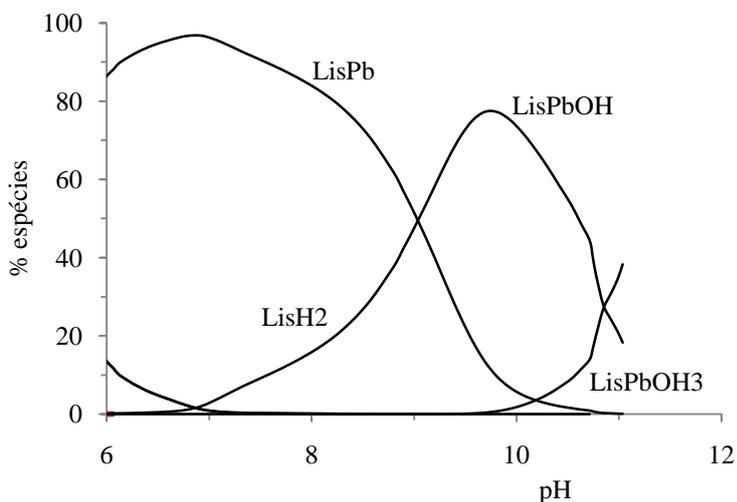


Figura 20 - Porcentagem das espécies em solução para uma relação molar 1:1 de lisina/Pb, como função do pH, $\mu = 0,1 \text{ mol L}^{-1}$ e $T = 25 \text{ }^{\circ}\text{C}$.

Na Figura 20 pode-se observar que o complexo LisPb apresenta uma porcentagem média de 90% na faixa de pH de 6,0 a 8,0; o complexo LisPbOH atinge uma porcentagem máxima de 80% em pH 10,0, diminuindo expressivamente até pH 11,5.

Dados termodinâmicos obtidos por Conato et.al. [74], indicam que a lisina complexa cobre como um aminoácido simples, muito provavelmente devido ao comprimento da cadeia lateral, havendo formação de complexo do tipo LisHCu com $\log \beta = 7,54$ ($25 \text{ }^{\circ}\text{C}$ e $\mu = 0,1 \text{ mol L}^{-1}$).

O valor obtido neste trabalho para a constante de estabilidade ($\log \beta^*$) do complexo predominante em solução, formado entre lisina e o íon Pb (II) é de 9,69, indicando que a lisina nas condições estudadas ($25 \text{ }^{\circ}\text{C}$ e $\mu = 0,1 \text{ mol L}^{-1}$) pode estar atuando como um aminoácido simples. Além dos fatores considerados pela teoria de Pearson para explicar a interação entre um íon metálico e um ligante, existem outros relacionados ao processo de complexação, como o arranjo estérico e a capacidade quelante com formação de anéis, onde o número de membros dos anéis formados é um fator determinante da estabilidade do complexo formado.

Também foram feitos cálculos envolvendo a espécie ML_2 (1:2) para os complexos entre chumbo e cisteína e chumbo e N-acetilcisteína. Os valores das constantes de estabilidade para essa espécie estão mostrados nos arquivos dos dados obtidos a partir dos cálculos, nos apêndices F e G, para Cys e N-Acetil-Cys, respectivamente. O valor de σ aumentou e as espécies predominantes em solução continuaram sendo 1:1 e 2:1, metal:ligante.

Os resultados dos ensaios de contato com resina na forma Pb^{2+} mostraram que a maior extração do chumbo ocorre pelo aminoácido que possui maior afinidade pelo metal e isto é

comprovado pelo valor da constante de estabilidade calculada, ou seja, houve relação direta dos valores das constantes obtidas através do cálculo das mesmas para os aminoácidos estudados com a taxa de extração do chumbo da resina pelos ligantes (aminoácidos).

Com este estudo foi possível constatar que o chumbo forma complexos com aminoácidos com cadeias laterais polares e que esta interação é crescente na seguinte ordem: lisina < cisteína < N-acetilcisteína, podendo estes aminoácidos, quando presentes na composição das soluções de NP, serem os responsáveis pela contaminação de chumbo encontradas nas mesmas.

5 CONCLUSÕES

Devido ao grande emprego dos concentrados de aminoácidos como soluções de nutrição para pacientes debilitados e com falta de nutrientes, e ainda, à toxicidade do chumbo para o homem, o cálculo da constante de estabilidade nesses aminoácidos constituintes das soluções de NP comerciais são de grande importância. Além disso, são desconhecidas as consequências da degradação que essas soluções sofrem a partir de fatores como exposição à luz, temperatura de armazenamento e no processo de pasteurização e tempo de armazenamento.

O uso de resinas de troca iônica é um método eficiente para a avaliação e quantificação das frações de uma espécie que se encontra livre ou combinada em um determinado meio.

A aplicação deste método no estudo da interação entre Pb e aminoácidos mostrou quais que complexam o chumbo e relativamente, quais são os mais estáveis. A comparação dos resultados encontrados para o chumbo e aminoácidos e com agentes complexantes validam os resultados encontrados, concluindo que o chumbo se combina com os aminoácidos cisteína, N-acetilcisteína e lisina.

Através de titulação potenciométrica foi possível obter as constantes de estabilidade ($\log \beta$) dos complexos formados entre os aminoácidos cisteína, N-acetilcisteína e lisina, separadamente, com o íon Pb^{2+} a 25 °C, força iônica constante ($0,1 \text{ mol L}^{-1}$) usando para o tratamento dos dados o programa computacional BEST[®], próprio para este cálculo. Para a região de pH 6 - 7, foram encontradas as espécies 1:1 e 2:1 do ligante-metal, ao passo que para as proporções 3:1 e 10:1 não foi possível obter alguma espécie do gênero.

Os valores de σ obtidos nos cálculos das constantes estão na faixa de 0,2 a 0,04, sem o uso das constantes de hidrólise do chumbo, bastante semelhantes aos valores com o uso das constantes de hidrólise, valores estes considerados aceitáveis [86].

Os valores calculados para as constantes de estabilidade dos complexos formados em maior proporção em solução entre o chumbo e os três aminoácidos estudados seguiram a seguinte ordem: lisina < cisteína < N-acetilcisteína. Esta ordem de interação foi também confirmada no estudo da extração de Pb da resina catiônica na forma Pb^{2+} , onde os ligantes mostraram uma eficaz extração do chumbo da resina, comprovando assim suas ações complexantes para o íon chumbo.

Para fins comparativos fez-se a extração do chumbo da resina catiônica na forma Pb^{2+} por agentes complexantes já conhecidos, EDTA e ácido cítrico. Os resultados mostraram que as soluções de EDTA extraíram maior quantidade de chumbo da resina do que as soluções dos ligantes em estudo. Este fato está relacionado com a estabilidade do complexo formado, comprovando assim os altos valores encontrados na literatura para as constantes de estabilidade desse complexante com o chumbo, ao passo que complexos de Cys, N-Acetil-Cys e Lys apresentam valores bem menores para as constantes de estabilidade.

A interação dos aminoácidos estudados com o chumbo também foi constatada pelos ensaios feitos com a matéria-prima das embalagens das soluções de Nutrição Parenteral, através da análise por AAS.

O método Scatchard foi usado como um método alternativo para determinação de constantes de estabilidade da lisina com o chumbo, porém os valores não coincidiram com aqueles encontrados usando o programa BEST[®], provavelmente devido às condições distintas usadas nos dois cálculos de $\log \beta$.

6 REFERÊNCIAS

- [1] DREISBACH, R.H., *J. Chromatogr.*, Handbook of Poisoning, Lange Medical: Los Altos, CA, p. 162 - 199, 1969.
- [2] ERIC P. ACHTERBERG et al., *Anal. Chim. Acta*, v. 440, p. 27 –36, 2001.
- [3] GODWIN, H. A., PAYNE, J. C., HORST, M. A. e PADIA, S., Resumos da Reunião Anual da American Chemical Society, Seção Inorgânica. nº 648, 1998.
- [4] BARAN, E. J., Química Bioinorgânica, McGraw Hill, Interamericana de España. Madrid, 1995.
- [5] ROSSOTI, H. S., *Talanta*, v. 21, p 809, 1974.
- [6] DISBUDAK, A., BEKTAS, S., PATIR, S., GENÇ, O., DENIZLI, A., *Sep. Purif. Techn.*, v. 26, p 273, 2002.
- [7] NASCIMENTO, P., BOHRER, D., MARQUES, M., DEL-FABRO, L., *Anal. Letters*, 35, p 2617, 2002.
- [8] GRAZIANO, J.H., *Clin. Chem*, 40(7): 1387 - 1390, 1994.
- [9] PAPANIKOLAOU, N.C, HATZIDAKI, E.G., BELIVANIS,S. TZANAKAKIS, G.N., TSATSAKIS, A.M., *Med Sci Monit*, v.11, n.10, p. 329-336, 2005.
- [10] SADAQ, M., *Revista de Oxicologia* (Jan, Fev, Março), 2002.
- [11] SILVA, A.M.M., et al. *J. Bras. Nefrol.*, v. 18(2), p 180, 1996.
- [12] PAVANETTO, F. et al., *J. Pharm*, 54, p 143, 1989.
- [13] EVANGELISTA, José. Alimentos – um estudo abrangente. São Paulo: Atheneu, 1992.
- [14] Portaria n 518/ 2004, Ministério da Saúde. Disponível em : < <http://www.saude.gov.br>>. Acesso em março 2009.
- [15] Portaria n 82/ 2000, Ministério da Saúde. Disponível em : < <http://www.anvisa.gov.br>> Acesso em maio 2009.
- [16] JORNAL BRASILEIRO DE NEFROLOGIA, *Nephrol. Dial Transplant*, 17 (7):45, 2002.
- [17] GOES, Roberto Charles, Toxicologia industrial; Rio de Janeiro: Revinter, 1998, 205 p.
- [18] GOULD, R.K., WOSBURGH, W.C., *J. Am. Chem. Soc.* 64:1630, 1942.
- [19] DAVIES, C.W., WAIND, G.M., *J. Chem. Soc.* 301, 1950 (In Greenstein Winitz, Chemistry of the amino acids vol. II, Krieger Publishing Company, 1961).
- [20] NEVILLE, R.G., GORIN, G., *J. Am.Chem. Soc.* 77:5225, 1995 (In Greenstein Winitz, Chemistry of the amino acids vol. II, Krieger Publishing Company, 1961).
- [21] CRUYWAGEN, J.J., VAN DE WATER, R.F., *Talanta*, 40(7) p 1091, 1993.

- [22] FISCHER, J. E., *Nutrição Parenteral*, Ed. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, 1978.
- [23] WAITABERG, D. L., *Nutrição Enteral e Parenteral na prática clínica*, Ed. Atheneu, Rio de Janeiro, 1995.
- [24] GREENSTEIN, J.P., WINITZ, M., *Chemistry of the Amino Acids*; vol. II, Krieger Publishing Company, 1961.
- [25] MARTINS, P., *Estudo da interação entre alumínio e aminoácidos que compõem soluções de nutrição parenteral*. Dissertação de mestrado, UFSM, 2000.
- [26] GARRET, R.H. AND GRISHAM, C.H., *Biochemistry*, International Edition, Saunders College Publishing.
- [27] HOLLUM, J.R., *Fundamentals of General, Organic and Biological Chemistry*, Fifth Edition, John Wiley & Sons, 1994.
- [28] PERSON, R.G., *J. Chem. Ed.* 45 (9): 581-87, 1968.
- [29] PELLETIER, S., LUCY, C.A., *J Chrom A*, 972, 221–229, 2002.
- [30] BALD, E., CHOWATKO, G., GLOWACKI, R., KUSMIEREK, K., *J Chrom A*, 1032, 109–115, 2004.
- [31] Portaria n 272, de 08 de abril de 1998. Aprova o regulamento técnico para fixar os requisitos mínimos exigidos para a terapia de nutrição parenteral. Ministério da Saúde, Secretaria da Vigilância Sanitária.
- [32] MANO, E.B. *Introdução à Polímeros*, Editora Edgar Blücher Ltda, 1985.
- [33] AVIS, K.E. LACHMAN, L., LIEBERMAN, H. A., *Pharmaceutical dosage forms: Parenteral medications*, v. 2, Editora Marcel Bekker Inc, New York, 1986.
- [34] *British Pharmacopeia (BP)*, London, version 7.0, 2003.
- [35] SHELBY, J. E., *Introduction to glass science and technology*, The Royal Society of Chemistry, USA, 1997.
- [36] HARRIS, D. C. *Química Analítica Quantitativa*, Rio de Janeiro: LTC Editora, 2001, p. 469, 412.
- [37] FIGURA, P., MCDUFFIE, B. *Anal. Chem.*, v.51, p 120, 1979.
- [38] YUCHI, A., SATO, T., MORIMOTO, Y., MIZUNO, H., WADA, H., *Anal. Chem.*, v. 69, p 2941, 1997.
- [39] AYAR, A., PEKACAR, A.I., MERCIMEK, B., *Colloids and Surfaces A: Physicochem. Eng. Aspects*, v. 212, p 51, 2003.
- [40] PASAVENTO, M., BIESUZ, R., GALLORINI, M., PROFUMO, A., *Anal. Chem.* v. 65, p 2522, 1993.

- [41] PASAVENTO, M., BIESUZ, R., *Anal. Chem. Acta*, v.367, p 215, 1998.
- [42] PASAVENTO, M., ALBERTI, G., PROFUMO, A., *Anal. Chim. Acta*, v. 405, p 309, 2000.
- [43] PASAVENTO, M., BIESUZ, R., PALET, C. *Analyst*, v.123, p 1295, 1988.
- [44] MARTI, F.B., JIMENO, S.A., CONDE, F.L., MENDEZ, J.H. Química analítica cualitativa, Espanha: Paraninfo, 1994, p 23.
- [45] YOKEL, R.A., *Coord. Chem. Reviews*, v. 228, p 97, 2002.
- [46] VOGEL, A.I., *Análise Inorgânica Quantitativa*, Guanabara Dois S.A. Editora, 1981, p 195.
- [47] RINGBOM, A., *Complexation in Analytical Chemistry*, London: Interscience Publishers, 1963, p 7.
- [48] HATI, S., BOLES, A.R., ZABORSKE, J., BERGMAN, B., POSTO, A. L., BURKE, D. H., *Chemistry & Biology*, v. 10, p 1129, 2003.
- [49] MARTELL, A.E., HANCOCK, R.D., SMITH, R.M., *Coord. Chem. Reviews*, v. 149, p 311, 1996.
- [50] PERSON, R.G., *J. Chem. Ed.* 45 (9): 581-87, 1968.
- [51] COWAN, J. A., *Inorganic Biochemistry and Introduction*, VCH, Publishers, 1993, p7.
- [52] FRAUSTO DA SILVA, J.J.R, and WILLIANMS, R.J.P., *The Biological Chemistry of Elements. "The inorganic Chemistry of life"*, New York, 1993.
- [53] STEPHEN J. LIPPARD and JEREMY M. BERG., *Principles of Bioinorganic Chemistry*, University Science Books, 1994.
- [54] AGUILAR, M., CORTINA, J.L., MARTINEZ, M., MIRALLES, N., *Tablas de constantes de Equilíbrio*, Centre Publicacions D'Abast, Barcelona, 1996, p 53.
- [55] ÖHMAN, L-O., *Chem Geol*, v. 151, p. 41, 1998.
- [56] GREENSTEIN, J.P.; WINITZ, M. *Chemistry of the Amino Acids*. Florida: Krieger Publishing Company, 1984, p 487.
- [57] LI, N.C, DOODY,E., *J. Am. Chem.Soc.* v. 76(1), p 221, 1954.
- [58] ALBERT, B.A., *Biochem. J.*, v. 50, p 690, 1952.
- [59] BENESCH, R.E., BENESCH, R., *J. Am. Chem. Soc.*, v. 77, p 5877, 1955.
- [60] BERTHON, G., *Pure & Appl.Chem.* v. 67(7), p 1117, 1995.
- [61] GILES, N.M., GILES, G.I.; JACOB, C., *Biochem. And Res. Commun.* V.300, p1, 2003.
- [62] ÇAKIR, S., ÇAKIR, O., BIÇER, E., *Electrochem Commun.*, v.2, p 124, 2000.
- [63] KIM, D.H., SUHAN, M., *Bior. & Medic. Chem. Letter*, v. 13, p 2543, 2003.

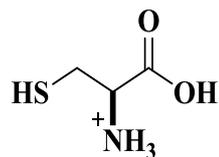
- [64] DISBUDAK, A., BEKTAS, S., PATIR, S., GENÇ, O., DENIZLI, A., *Sep. Purif. Technol.*, v. 26, p 273, 2002.
- [65] DOLINSKA, B., *Il Fàrmaco*, v. 56, p 737, 2001.
- [66] BERTHON, G., *J. Inorg.Biochem.* v. 20, p 113, 1984.
- [67] MOLDEUS, P., COTGREAVE, I.A., BERGGREN, M., *Respiration* 50, 31-42, 1986.
- [68] ARUOMA, O.I., HALLIWELL, B., HOEY, B.M., BUTLER, J., *Free Rad. Biol. Med.* 6, 593-597, 1989.
- [69] BANNER, W. Jr., KOCH, M., CAPIN, D.M., HOPF, S.B., CHANG, S., TONG, T.G., *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 83, 142-147, 1986.
- [70] RITTER, C., ANDRADES, M.E., REINKE, A., MENNA-BARRETO, S., MOREIRA, J.C.F., DAL-PIZZOL, F., *Crit. Care Med.* 32, 342-349, 2004.
- [71] CONATO, C., CONTINO, A., MACCARRONE, G., MAGRI, A., REMELLI, M., TABBI, G., *Thermochim. Acta*, v. 362, p 13, 2000.
- [72] WILSON, E. W.Jr., KASPERIAN, M. H.; MARTIN, R. B., *J. Amer. Chem. Soc.* v. 92(18), p 5365, 1970.
- [73] NIGOVIC, B.; KUJONDZIC, N., *Polyhedron*, v.21, p 1661, 2002.
- [74] CONATO, C.; KOZLOWSKI, H.; MLYNARZ, P.; PULIDORI, F.; REMELLI, M., *Polyhedron*, v. 21, p 1469, 2002.
- [75] NAGYPÁL, I.; FARKAS, E.; GERGELY, A. *J. Inorg. Nuclear Chem.* V. 37(10), p 2145, 1975.
- [76] CONATO, C., GAVIOLI, R., GUERRINI, R., KOZLOWSKI, H., MLYNARZ, P., PASTI, C., PULIDORI, F., REMELLI, M., *Biochim. Bioph. Acta*, v. 1526, p 199, 2001.
- [77] CONATO, C., FERRARI, S., KOZLOWSKI, H., PULIDORI, F., REMELLI, M., *Polyhedron*, v. 20, p 615, 2001.
- [78] SHARMA, U. *Thermochim. Acta*, v. 66, p 369, 1983.
- [79] MARTELL, A., MOTEKAITIS, R.J. *Determination and Use of Stability Constants*, New York: Wiley – VCH, 1992.
- [80] MARQUES, A.L.B., CHIERICE, G.O. *J. Braz. Chem. Soc.* V. 9(6). P 531, 1998.
- [81] ROSE, J. *Advanced Physico-Chemical Experiments*, London: Sir Isaac Pitman and Son Ltda, 1964, p76.
- [82] TEWARI, B.B., *J.Chrom. A*, v.962, p233,2002.
- [83] HAVEL, J., JANOS, P., JANDIK, P., *J. Chrom. A*, v. 745, p. 127, 1996.
- [84] ABATE, G., MASINI, J.C., *Química Nova*, v.22(5), p 661, 1999.
- [85] BERTHON, G., *Coord.Chem.Reviews*, v. 228, p 319, 2002.

- [86] LI, Y., MARTELL, A.E., *Inorg.Chim. Acta*, v. 231, p 159, 1995.
- [87] CHEN, D.; MARTELL, A.E.; MOTEKAITIS, J.; NIU, S.; MACMANUS, D., *Inorg.Chim.Acta*, v. 293, p 206, 1999.
- [88] INOUE, M.B.; INOUE, M.; FERNANDO, Q.; VALCIC, S.; TIMERMANN, B.N. J., *Inorg. Biochem.*, v. 88, p 7, 2002.
- [89] GHOLIVAND, M.B. BAMDAD, F.; GHASEM., *Talanta*, v. 46, p 875, 1998.
- [90] MOTULSKY, H. *The Graphpad Guide to Analysing Radioligant Binding Data*, CA, USA: Graphpad Software Ind., 1995-96, p 5-6.
- [91] ABATE, G.; MASINI, J.C., *Braz. Chem. Soc.*, v. 12(1), p 109, 2001.
- [92] GONZÁLEZ-DÁVILA, M.; SANTANA-CASIANO, J.M.; LAGLERA, L.M., *Marine Chem.*, v. 70, p 161, 2000.
- [93] SABOURY, A.A.; SARRI-SARRAF, N.; SAIDIAN, S., *Thermochim. Acta*, v. 381, p 147, 2002.
- [94] KARAMI-T EHRAMI, F.; SALAMI, S.; MOKARRAM, P., *Clin. Biochem*, v. 34, p 603, 2001.
- [95] NIEROP, K.G.J., JANSEN, B.; VRUGT, J.A., VERSTRATEN, J.M., *Chemosphere*, v. 49, p 1191, 2002.
- [96] BIRUS, M., BUDIMIR, A., GABRICEVIC, M. J. *Inorg. Biochem.* v. 75, p 85, 1999.
- [97] BUKIETYNSKA, K., PODSIADLY, H., KARWECKA, Z., *J. Inorg. Biochem.* v. 94, p 317, 2003.
- [98] LI, Y.J.; MARTELL, A.E., *Inorg.Chim.Acta*, v. 214, p 103, 1993.
- [99] MERCERA, J.M., FOWLER, J.E., UGALDE, J.U., *J. Phys. Chem. A*, v. 102, p 7006, 1998.
- [100] BERTAGNOLLI, D. C., Migração de metais por interação das embalagens com Soluções Parenterais, Tese Doutorado, UFSM, 2008.
- [101] DÍAZ-CRUZ, J.M., CRUZ, B.H., *J. Electroanal. Chem.*, v. 516, p 110, 2001.
- [102] GODWIN, H.A., PAYNE, J.C., HORST, M.A. e PADIA, S., Resumos da Reunião Anual da American Chemical Society, Seção Inorgânica. nº 648, 1998.
- [103] POLLI, V. R. G., Determinação das constantes de estabilidade dos complexos formados entre os aminoácidos cisteína, cistina, ornitina e lisina com alumínio em solução aquosa, Tese Doutorado, UFSM, 2004.
- [104] ARAUJO, A.B., ROSA, A.H., ROCHA, J.C., RAMOS, L.P.C., *Química Nova*, v.25(6B), p 1103, 2002.
- [105] ABATE, G.; MASINI, J.C., *Química Nova*, v. 22(5), p 661, 1999.

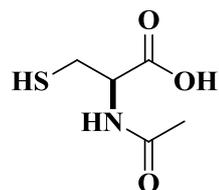
- [106] OHLWEILER, O.A.; Química Analítica Quantitativa, Rio de Janeiro: Livros Técnicos e Científicos Editora S.A., v. 2, 1976, p 519.
- [107] SCATCHARD, G., *Ann. N. Y. Acad. Sci.* v. 51, p 660, 1949.
- [108] ASSUMPÇÃO, R.M.V.; MORITA, T. Manual de Soluções, Reagentes e Solventes, Editora Edgar Blücher Ltda – EDUSP, 1968, p 357.
- [109] BRAIBANTI, A. et al., *Talanta*, v. 33, p 471, 1986.
- [110] INAMUL-HAQ, *J. Inorg. Nuclear Chem.*, v. 40(6), p 1182, 1978.
- [111] RONALD, L.; MARK, M. J.; *J. Inorg. Nucl. Chem.*,39, p 677, 1977.
- [112] ZIH-PERÉNYI, K. et al., *J. Microchem.*, v. 85, p 149, 2007.
- [113] GREENSTEIN, J.P., WINITZ, M., Chemistry of the Amino Acids; vol. I, Krieger Publishing Company, 1961.
- [114] PANIAGO, E. B., CARVALHO, S., *Química Nova*, 11 (4) 1988.
- [115] MCAULIFFE, C.A. and MURRAY, S.G., *Inorg. Chim. Acta Reviews*, v.6, p. 103, 1972.
- [116] BABU, M.S; RAO, G.N.; RAMANA, K.V.; M.S.P., *J. Indian Chem. Soc.*, v. 78, p 280, 2001.
- [117] PILLA, L., Físico-Química, Rio de Janeiro: Livros Técnicos e Científicos Editora, v. 2, 1980, p 799.

7 ANEXOS

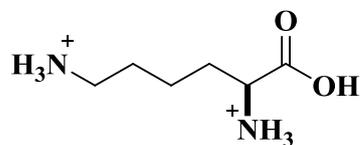
Anexo A



Estrutura Cisteína (Cys)



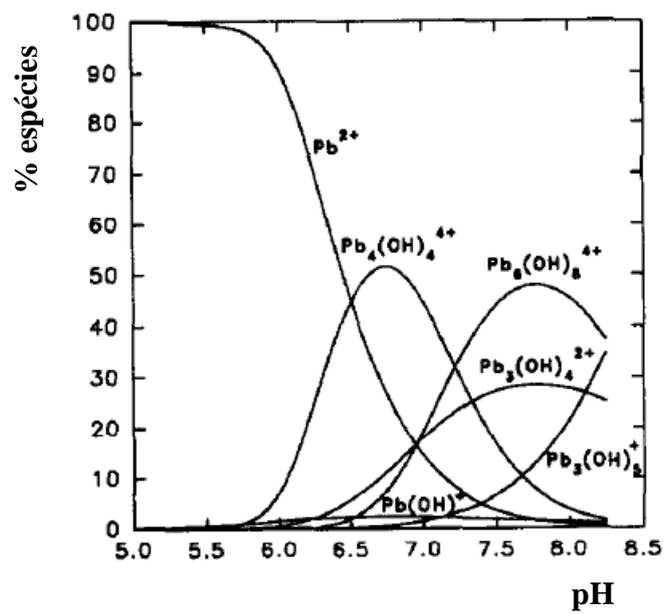
Estrutura N-acetilcisteína (N-Acetil-Cys)



Estrutura Lisina (Lys)

Anexo B

Diagrama de equilíbrio de espécies para soluções aquosas de chumbo na concentração de 0,01 M. [109]



Anexo C

Composição química das soluções de nutrição parenteral (g L⁻¹)

Espécie (g)	1	2	3	4	5	6	7	8
L	- 10,4	5,10	3,7	5,1	5,0	6,40	7,5	7,0
Isoleucina								
L - Leucina	13,1	8,9	9,8	8,9	7,4	10,8	11,4	11,0
L - Lisina	6,9	7,9	5,9	7,9	6,6	7,1	9,6	11,3
Acetato								
L	- 1,1	3,8	5,3	3,8	4,3	4,6	6,6	11,0
Metionina								
L - Cistina	0,5	-	0,3	-	-	-	-	-
L	- 0,9	5,10	5,4	5,1	5,1	4,6	7,8	11,0
Fenilalanina								
L - Treonina	4,4	4,10	8,9	4,1	4,4	5,2	6,8	5,0
L - Alanina	4,6	13,7	10,3	13,7	15,0	7,2	-	-
L	- -	1,8	1,8	1,8	2,0	1,8	2,9	2,5
Triptofano								
L - Valina	-	4,8	5,3	4,8	6,2	7,1	9,5	8,0
L - Arginina	-	9,2	10,6	9,2	12,0	6,4		
L - Histidina	-	5,2	4,6	5,2	3,0	4,1	4,9	5,5
L - Prolina	5,8	8,9	8,4	8,9	15,0	16,2	-	-
L	- -	3,3	3,8	3,3	-	-	-	-
Asparagina								
Ácido L	- -	1,30	2,7	1,3	-	-	-	-
Aspártico								
L - Cisteína	-	0,72	-	0,65	-	0,4	-	-
Cloridrato								
Ácido L	- -	4,60	2,5	4,6	-	-	-	-
Glutâmico								
L - Ornitina	-	3,20	2,6	3,2	-	-	-	-
Cloridrato								
L - Serina	-	2,4	2,5	2,4	-	9,0	-	-
N - Acetil L	-	1,60	1,6	1,6	-	5,5	-	-
- Tirosina								
Glicina	-	7,90	-	-	-	-	-	-
L - Ácido	-	-	-	-	-	4,8	6,5	-
Málico								

continuação								
Glicina*	5,5		8,0	7,9	14,0	4,1		
Ácido	7,2				8,0			
Acético								
Nitrogênio	12,9	15,5	15,5	15,5	16,4	14,4	8,8	8,8
Total (g L ⁻¹)								
Água q.s.p.	1000	1000	1000	1000	1000	1000	1000	1000
(mL)								
pH	5,7 - 6,3	6,0-6,3	6,0-6,7	6,0 - 7,0	5,7 - 6,3			5,7 - 6,0
Osmolarida	770	939	890	890	939	848	835	545
de Teórica								
(mosm L ⁻¹)								

* Ácido Aminoacético

1: Aminosteril hepa 8% Fabricante: FRESENIUS LABORATÓRIOS LTDA

2 : Aminon 20 - Fabricante: JP INDÚSTRIA FARMACÊUTICA S.A.

3: Soramin 10% Fabricante: DARROW LABORATÓRIOS S.A.

4: Aminoplasma I-10^a - Fabricante: LABORATÓRIOS B. BRAUN S.A

5: Aminosteril 10% - Fabricante: FRESENIUS LABORATÓRIOS LTDA. (sorbitol = 25,0 g; xilitol = 8,8 g)

6: Aminoped 10% - Fabricante: FRESENIUS LABORATÓRIOS LTDA.

7: Aminosteril nefro - Fabricante: FRESENIUS LABORATÓRIOS LTDA.

8 : Nefroamino - Fabricante: LABORATÓRIOS B. BRAUN S.A.

- : ausente.

8 APÊNDICE

Apêndice A

Abaixo está representado um dos gráficos obtidos pela aplicação do método de Gran para determinação do grau de contaminação de uma solução de KOH por carbonato. Onde:

$$\Phi = (V_o + V_{\text{KOH}}) \times 10^{\pm R}$$

V_o = volume inicial

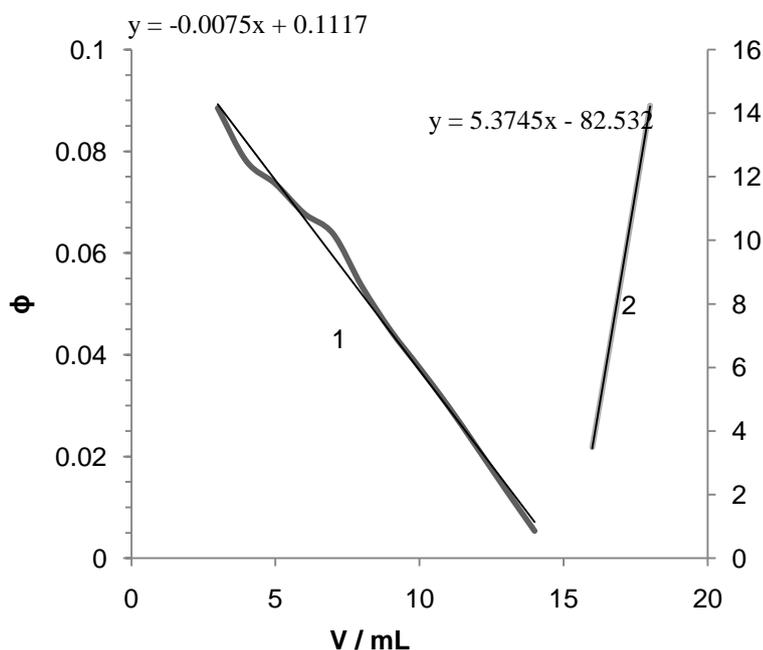
V_{KOH} = volume de KOH adicionado

R = leitura do pHmetro

“-“ = usado na região ácida

“+” = usado na região alcalina

Gráfico de Φ versus volume de KOH 0,006 M adicionado a 25 mL de solução de HCl 0,0045 M.



Dois conjuntos de dados são obtidos: Um deles é a partir da multiplicação do volume total (V_T), onde $V_T = V_o + V_b$ por $10^{-\text{pH}}$ na região onde o pH está na faixa ácida e então teremos: $V_T \times 10^{-\text{pH}}$ (linha 1).

O segundo conjunto de dados é obtido na região básica, por $V_T \times 10^{+\text{pH}}$ (linha 2). De posse desses dois conjuntos de dados (o da região ácida e da básica), estes são plotados contra o volume de base utilizado (V_b) no eixo y. A partir disto, obtém-se o valor em que as duas retas

interceptam o eixo x, o que foi feito com o uso da equação da reta, fazendo $y = 0$. Estes valores foram 15,35 e 14,89. Esta diferença em termos percentuais é $\sim 1,5\% \left(100 \times \frac{\frac{0,46}{2}}{15,35} \right)$.

Segundo Martell [p39] esta diferença não deve exceder 2%.

Observação: os valores da região básica foram multiplicados por 10^{-11} com a finalidade de uma maior aproximação da ordem de grandeza dos valores da região ácida e obtenção mais precisa dos valores da reta “a” e “b” (sendo $y = ax + b$).

Apêndice B

Determinação do produto iônico da água (pKw) [116].

$$K_w = C_{H^+} \cdot C_{OH^-} \cdot \gamma_{\pm}^2$$

C_{H^+} , C_{OH^-} = concentração dos íons H^+ e OH^- em solução

γ_{\pm} = Coeficiente de atividade iônico médio da solução

O valor de C_{H^+} e C_{OH^-} pode ser determinado a partir da condutividade da água a 25 °C.

Para água do Milli-Q : $R = 18,2 \times 10^6 \Omega \text{ cm}$

$C = 1/R = 5,495 \times 10^{-8} \Omega^{-1} \text{ cm}^{-1} = 5,495 \times 10^{-8} \text{ S/cm}$

A condutância equivalente para água pura: $\lambda_{H^+} + \lambda_{OH^-} = 548,4 \Omega^{-1}$

$$\frac{5,495 \times 10^{-8}}{548,4} = 1,002 \times 10^{-7} \text{ mols L}^{-1}$$

Para solução de KNO_3 $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, $\gamma_{\pm} = 0,764$, então:

$$K_w = 1,002 \times 10^{-7} \cdot 1,002 \times 10^{-7} \cdot (0,764)^2$$

$$K_w = 5,8603 \times 10^{-15}$$

$$pK_w = -14,23$$

Apêndice C

Resultados da computação dos dados da titulação potenciométrica para obtenção de constantes de estabilidade dos complexos formados entre chumbo e cisteína, usando nos cálculos as constantes e hidrólise do chumbo, na proporção de 1:1, $\mu = 0,1 \text{ mol L}^{-1}$ e $T = 25 \text{ }^\circ\text{C}$.

Program BEST vers.10/10/91

cisteína

volume inicial 30.0

normalidade da base 0.08

milimoles de ácido 0.0023

número de pontos da titulação 89

Componentes:

1 cisteína 0.30 mM

2 chumbo 0.30 mM

3 próton 0.90 mM

Log β	Espécies
1) 0.000	1 cist. 0 chumbo 0 proton
2) 0.000	0 cist. 1 chumbo 0 proton
3) 0.000	0 cist. 0 chumbo 1 proton
4) -7.800	0 cist. 1 chumbo -1 proton
5) -22.690	0 cist. 3 chumbo -4 proton
6) -19.580	0 cist. 4 chumbo -4 proton
7) -30.800	0 cist. 3 chumbo -5 proton
8) -42.430	0 cist. 6 chumbo -8 proton
9) 8.455	1 cist. 0 chumbo 1 proton
10) 17.256	1 cist. 0 chumbo 2 proton
11) 18.608	1 cist. 0 chumbo 3 proton
12) 12.029	1 cist. 1 chumbo 0 proton
13) 12.283	1 cist. 1 chumbo 1 proton
14) 0.865	1 cist. 1 chumbo -1 proton
15) -16.826	1 cist. 1 chumbo -2 proton
16) 25.862	2 cist. 1 chumbo 1 proton
17) -7.965	2 cist. 1 chumbo 0 proton

18) -13.995 0 cist. 0 chumbo -1 proton

$$\sigma = 0.0974$$

	Vb	a	PHexp	PHcalc	diferença
1	.000	-.008	2.064	2.071	-.007
2	.025	-.001	2.070	2.074	-.004
3	.050	.006	2.075	2.078	-.003
4	.100	.019	2.085	2.084	.001
5	.150	.032	2.092	2.091	.001
6	.250	.059	2.107	2.105	.002
7	.350	.086	2.123	2.119	.004
8	.450	.112	2.138	2.133	.005
9	.550	.139	2.155	2.147	.008
10	.750	.192	2.189	2.178	.011
11	.950	.246	2.224	2.210	.014
12	1.150	.299	2.262	2.245	.017
13	1.350	.352	2.300	2.282	.018
14	1.550	.406	2.340	2.321	.019
15	1.750	.459	2.389	2.364	.025
16	1.950	.512	2.438	2.410	.028
17	2.150	.566	2.490	2.461	.029
18	2.350	.619	2.548	2.516	.032
19	2.550	.672	2.634	2.578	.056
20	2.750	.726	2.693	2.646	.047
21	2.950	.779	2.775	2.721	.054
22	3.150	.832	2.875	2.802	.073
23	3.350	.886	2.965	2.886	.079
24	3.550	.939	3.075	2.967	.108
25	3.750	.992	3.177	3.043	.134
26	3.950	1.046	3.283	3.112	.171
27	4.150	1.099	3.370	3.174	.196
28	4.350	1.152	3.446	3.229	.217

29	4.550	1.206	3.514	3.280	.234
30	4.750	1.259	3.575	3.326	.249
31	4.950	1.312	3.624	3.369	.255
32	5.150	1.366	3.672	3.410	.262
33	5.350	1.419	3.712	3.448	.264
34	5.550	1.472	3.751	3.485	.266
35	5.750	1.526	3.789	3.521	.268
36	5.950	1.579	3.828	3.556	.272
37	6.150	1.632	3.866	3.590	.276
38	6.350	1.686	3.907	3.624	.283
39	6.550	1.739	3.947	3.658	.289
40	6.750	1.792	3.986	3.691	.295
41	6.950	1.846	4.024	3.725	.299
42	9.150	2.432	4.053	4.151	-.098
43	9.350	2.486	4.094	4.203	-.109
44	9.550	2.539	4.140	4.259	-.119
45	9.750	2.592	4.190	4.320	-.130
46	9.850	2.619	4.199	4.354	-.155
47	10.050	2.672	4.218	4.427	-.209
48	10.150	2.699	4.258	4.468	-.210
49	10.250	2.726	4.321	4.512	-.191
50	10.350	2.752	4.363	4.560	-.197
51	10.450	2.779	4.400	4.613	-.213
52	10.550	2.806	4.455	4.673	-.218
53	10.650	2.832	4.498	4.741	-.243
54	10.750	2.859	4.592	4.820	-.228
55	10.850	2.886	4.658	4.916	-.258
56	10.950	2.912	4.758	5.036	-.278
57	11.050	2.939	4.888	5.200	-.312
58	11.150	2.966	5.106	5.464	-.358
59	11.175	2.972	5.177	5.566	-.389
60	11.200	2.979	5.254	5.700	-.446
61	11.250	2.992	5.526	6.245	-.719
62	11.275	2.999	6.079	7.468	-1.389

63	11.300	3.006	7.376	8.804	-1.428
64	11.325	3.012	7.890	9.144	-1.254
65	11.350	3.019	8.203	9.338	-1.135
66	11.375	3.026	8.465	9.474	-1.009
67	11.400	3.032	8.671	9.579	-.908
68	11.425	3.039	8.852	9.664	-.812
69	11.450	3.046	9.013	9.736	-.723
70	11.475	3.052	9.157	9.799	-.642
71	11.500	3.059	9.283	9.854	-.571
72	11.525	3.066	9.407	9.904	-.497
73	11.550	3.072	9.520	9.949	-.429
74	11.575	3.079	9.629	9.990	-.361
75	11.600	3.086	9.727	10.028	-.301
76	11.625	3.092	9.836	10.063	-.227
77	11.650	3.099	9.927	10.096	-.169
78	11.675	3.106	10.021	10.127	-.106
79	11.700	3.112	10.105	10.156	-.051
80	11.750	3.126	10.246	10.210	.036
81	11.800	3.139	10.366	10.258	.108
82	11.850	3.152	10.470	10.303	.167
83	11.900	3.166	10.559	10.344	.215
84	12.000	3.192	10.708	10.418	.290
85	12.100	3.219	10.823	10.484	.339
86	12.300	3.272	10.915	10.597	.318
87	12.400	3.299	10.991	10.646	.345
88	12.500	3.326	11.055	10.692	.363
89	12.600	3.352	11.112	10.736	.376

SIGMA PH FIT (σ) = 0.097461

Apêndice D

Resultados da computação dos dados da titulação potenciométrica para obtenção de constantes de estabilidade dos complexos formados entre chumbo e N-acetilcisteína, usando nos cálculos as constantes e hidrólise do chumbo, na proporção de 1:1, $\mu = 0,1 \text{ M}$ e $T = 25^\circ\text{C}$.

Program BEST vers.10/10/91

N-acetilcisteína

volume inicial	30.0
normalidade da base	0.05
milimoles de ácido	0.01234
número de pontos da titulação	60

Componentes:

1 N-acetilcisteína	0.30 mM
2 chumbo	0.30 mM
3 próton	0.60 mM

	Log β	Espécies
1)	.0000	1 nac. 0 chumbo 0 proton
2)	.0000	0 nac. 1 chumbo 0 proton
3)	.0000	0 nac. 0 chumbo 1 proton
4)	9.6076	1 nac. 0 chumbo 1 proton
5)	12.6233	1 nac. 0 chumbo 2 proton
6)	5.2914	1 nac. 1 chumbo 1 proton
7)	21.7325	2 nac. 1 chumbo 1 proton
8)	17.7753	2 nac. 1 chumbo 0 proton
9)	-1.0017	1 nac. 1 chumbo -1 proton
10)	-13.9500	0 nac. 0 chumbo -1 proton

SIGMA PH FIT (σ) = 0.068729

Vb	a	pHexperimental	pHcalculado	DIFF
.000	-.041	2.462	2.311	.151
1.000	.126	2.610	2.391	.219
2.000	.292	2.769	2.474	.295

5.075	.805	2.783	2.763	.020
5.575	.888	2.835	2.821	.014
6.075	.971	2.880	2.884	-.004
6.575	1.055	2.924	2.953	-.029
7.075	1.138	2.952	3.031	-.079
7.575	1.221	3.009	3.121	-.112
8.575	1.388	3.169	3.348	-.179
9.575	1.555	3.348	3.658	-.310
10.575	1.721	3.618	4.047	-.429
11.575	1.888	4.325	4.599	-.274
11.610	1.894	4.376	4.627	-.251
11.645	1.900	4.430	4.656	-.226
11.680	1.906	4.487	4.687	-.200
11.715	1.911	4.552	4.719	-.167
11.750	1.917	4.632	4.753	-.121
11.785	1.923	4.730	4.790	-.060
11.820	1.929	4.830	4.828	.002
11.855	1.935	4.961	4.870	.091
11.890	1.941	5.148	4.915	.233
11.925	1.946	5.421	4.965	.456
11.960	1.952	5.688	5.019	.669
11.995	1.958	6.106	5.080	1.026
12.205	1.993	7.263	5.882	1.381
12.240	1.999	7.314	6.589	.725
12.275	2.005	7.361	7.861	-.500
12.310	2.011	7.405	8.208	-.803
12.345	2.016	7.449	8.401	-.952
12.835	2.098	8.249	9.214	-.965
12.870	2.104	8.362	9.241	-.879
12.905	2.110	8.365	9.268	-.903
12.940	2.116	8.484	9.293	-.809
12.975	2.121	8.625	9.317	-.692
13.010	2.127	8.947	9.340	-.393
13.045	2.133	9.085	9.362	-.277

13.080	2.139	9.205	9.384	-.179
13.115	2.145	9.158	9.404	-.246
13.150	2.151	9.268	9.424	-.156
13.185	2.156	9.378	9.443	-.065
13.220	2.162	9.426	9.462	-.036
13.255	2.168	9.430	9.480	-.050
13.290	2.174	9.444	9.498	-.054
13.325	2.180	9.471	9.515	-.044
13.360	2.186	9.531	9.532	-.001
13.395	2.191	9.559	9.548	.011
13.430	2.197	9.570	9.564	.006
13.465	2.203	9.563	9.580	-.017
13.500	2.209	9.627	9.595	.032
13.535	2.215	9.644	9.610	.034
13.570	2.221	9.695	9.625	.070
13.605	2.226	9.670	9.639	.031
13.640	2.232	9.676	9.653	.023
13.675	2.238	9.648	9.667	-.019
13.710	2.244	9.708	9.680	.028
13.745	2.250	9.711	9.694	.017
14.245	2.333	10.066	9.865	.201
14.745	2.416	10.177	10.013	.164
15.245	2.500	10.266	10.148	.118

SIGMA PH FIT (σ) = 0.068729

Apêndice E

Resultados da computação dos dados da titulação potenciométrica para obtenção de constantes de estabilidade dos complexos formados entre chumbo e lisina, usando nos cálculos as constantes e hidrólise do chumbo, na proporção de 1:1, $\mu = 0,1$ M e $T = 25^\circ\text{C}$.

Program BEST vers.10/10/91

lisina

volume inicial	30.0
normalidade da base	0.05
milimoles de ácido	0.0055
número de pontos da titulação	74

Componentes:

1 lisina	0.30 mM
2 chumbo	0.30 mM
3 próton	0.30 mM

	Log β	Espécies		
1)	.0000	1 lis.	0 chumbo	0 proton
2)	.0000	0 lis.	1 chumbo	0 proton
3)	.0000	0 lis.	0 chumbo	1 proton
4)	9.1432	1 lis.	0 chumbo	1 proton
5)	18.0000	1 lis.	0 chumbo	2 proton
6)	20.0000	1 lis.	0 chumbo	3 proton
7)	7.2199	1 lis.	1 chumbo	1 proton
8)	9.2563	1 lis.	1 chumbo	0 proton
9)	-10.4278	1 lis.	1 chumbo	-2 proton
10)	0.2644	1 lis.	1 chumbo	-1 proton
11)	-21.5476	1 lis.	1 chumbo	-3 proton
10)	-14.2800	0 lis.	0 chumbo	-1 proton

SIGMA PH FIT (σ) = 0.163909

Vb	a	pHexp.	pHcalc.	DIFF
----	---	--------	---------	------

1	.000	-.018	4.907	5.511	-.604
2	.010	-.017	5.022	5.512	-.490
3	.020	-.015	5.116	5.513	-.397
4	.030	-.013	5.202	5.514	-.312
5	.040	-.012	5.273	5.515	-.242
6	.050	-.010	5.340	5.516	-.176
7	.060	-.008	5.400	5.517	-.117
8	.070	-.007	5.449	5.519	-.070
9	.080	-.005	5.498	5.520	-.022
10	.090	-.003	5.540	5.521	.019
11	.100	-.002	5.577	5.522	.055
12	.110	.000	5.614	5.523	.091
13	.120	.002	5.646	5.524	.122
14	.130	.003	5.675	5.526	.149
15	.140	.005	5.701	5.527	.174
16	.150	.007	5.726	5.528	.198
17	.160	.008	5.745	5.529	.216
18	.170	.010	5.751	5.530	.221
19	2.700	.432	5.785	5.864	-.079
20	2.900	.465	5.800	5.896	-.096
21	3.100	.498	5.835	5.930	-.095
22	3.300	.532	5.843	5.966	-.123
23	3.500	.565	5.880	6.004	-.124
24	3.700	.598	5.910	6.044	-.134
25	3.900	.632	5.927	6.087	-.160
26	4.100	.665	5.947	6.134	-.187
27	4.300	.698	5.965	6.185	-.220
28	4.500	.732	5.998	6.240	-.242
29	4.700	.765	6.061	6.302	-.241
30	4.900	.798	6.116	6.373	-.257
31	5.100	.832	6.208	6.454	-.246
32	5.300	.865	6.318	6.551	-.233
33	5.500	.898	6.450	6.671	-.221
34	5.700	.932	6.614	6.827	-.213

35	5.900	.965	6.773	7.043	-.270
36	6.100	.998	6.934	7.340	-.406
37	6.300	1.032	7.115	7.647	-.532
38	6.500	1.065	7.329	7.879	-.550
39	6.700	1.098	7.588	8.049	-.461
40	6.900	1.132	7.833	8.182	-.349
41	7.100	1.165	8.045	8.292	-.247
42	7.300	1.198	8.220	8.386	-.166
43	7.500	1.232	8.361	8.469	-.108
44	7.700	1.265	8.480	8.544	-.064
45	7.900	1.298	8.582	8.614	-.032
46	8.100	1.332	8.669	8.679	-.010
47	8.300	1.365	8.750	8.740	.010
48	8.500	1.398	8.827	8.799	.028
49	8.700	1.432	8.887	8.856	.031
50	8.900	1.465	8.949	8.911	.038
51	9.100	1.498	9.008	8.965	.043
52	9.300	1.532	9.064	9.018	.046
53	9.500	1.565	9.119	9.071	.048
54	9.700	1.598	9.171	9.124	.047
55	9.900	1.632	9.221	9.177	.044
56	10.400	1.715	9.340	9.312	.028
57	10.900	1.798	9.457	9.453	.004
58	11.400	1.882	9.573	9.600	-.027
59	11.900	1.965	9.690	9.750	-.060
60	12.400	2.048	9.810	9.897	-.087
61	12.900	2.132	9.933	10.033	-.100
62	13.400	2.215	10.058	10.154	-.096
63	13.900	2.298	10.182	10.261	-.079
64	14.400	2.382	10.303	10.356	-.053
65	14.900	2.465	10.417	10.441	-.024
66	15.400	2.548	10.532	10.518	.014
67	15.900	2.632	10.625	10.589	.036
68	16.400	2.715	10.714	10.656	.058

69	16.900	2.798	10.745	10.720	.025
70	17.400	2.882	10.774	10.780	-.006
71	18.400	3.048	10.845	10.897	-.052
72	18.900	3.132	10.914	10.954	-.040
73	19.400	3.215	10.983	11.010	-.027
74	19.900	3.298	11.053	11.066	-.013

SIGMA PH FIT (σ) = 0.163909

Apêndice F

Resultados da computação dos dados da titulação potenciométrica para obtenção de constantes de estabilidade dos complexos formados entre chumbo e cisteína, na proporção de 2:1, $\mu = 0,1$ M e $T = 25$ °C.

Program BEST vers.10/10/91

cisteína

volume inicial	30.0
normalidade da base	0.05
milimoles de ácido	0.0005
número de pontos da titulação	102

Componentes:

1 cisteína	0.30 mM
2 chumbo	0.15 mM
3 próton	0.90 mM

	Log β	Espécies
1	.0000	1 cisteína 0 chumbo 0 proton
2	.0000	0 cisteína 1 chumbo 0 proton
3	.0000	0 cisteína 0 chumbo 1 proton
4	10.4781	1 cisteína 0 chumbo 1 proton
5	18.7399	1 cisteína 0 chumbo 2 proton
6	20.1861	1 cisteína 0 chumbo 3 proton
7	8.3379	1 cisteína 1 chumbo 0 proton
8	14.8305	1 cisteína 1 chumbo 1 proton
9	2.3066	1 cisteína 1 chumbo -1 proton
10	32.2643	2 cisteína 1 chumbo 1 proton
11	21.8651	2 cisteína 1 chumbo 0 proton
12	24.1399	2 cisteína 1 chumbo -1 proton
13	-13.9950	0 cisteína 0 chumbo -1 proton

SIGMA PH FIT (σ) = 0.081738

	Vb	a	PHexp	PHcalc	diferença
1	.000	.000	2.610	2.088	.522
2	1.500	.250	2.680	2.234	.446
3	3.000	.500	2.750	2.422	.328
4	4.500	.750	2.830	2.664	.166
5	5.000	.833	2.860	2.745	.115
6	6.000	1.000	2.920	2.888	.032
7	6.500	1.083	2.960	2.951	.009
8	7.500	1.250	3.030	3.065	-.035
9	8.000	1.333	3.070	3.118	-.048
10	8.500	1.417	3.120	3.171	-.051
11	9.000	1.500	3.170	3.224	-.054
12	9.500	1.583	3.220	3.277	-.057
13	10.000	1.667	3.270	3.331	-.061
14	10.500	1.750	3.340	3.387	-.047
15	11.000	1.833	3.400	3.443	-.043
16	11.500	1.917	3.470	3.501	-.031
17	11.750	1.958	3.510	3.530	-.020
18	12.000	2.000	3.550	3.559	-.009
19	12.250	2.042	3.590	3.588	.002
20	12.500	2.083	3.630	3.618	.012
21	13.000	2.167	3.700	3.676	.024
22	13.250	2.208	3.740	3.705	.035
23	13.500	2.250	3.770	3.733	.037
24	13.750	2.292	3.810	3.762	.048
25	14.250	2.375	3.870	3.816	.054
26	14.500	2.417	3.900	3.843	.057
27	15.000	2.500	3.960	3.896	.064
28	16.000	2.667	4.060	3.997	.063
29	16.250	2.708	4.090	4.022	.068
30	17.000	2.833	4.150	4.097	.053
31	17.500	2.917	4.200	4.150	.050
32	18.000	3.000	4.240	4.205	.035

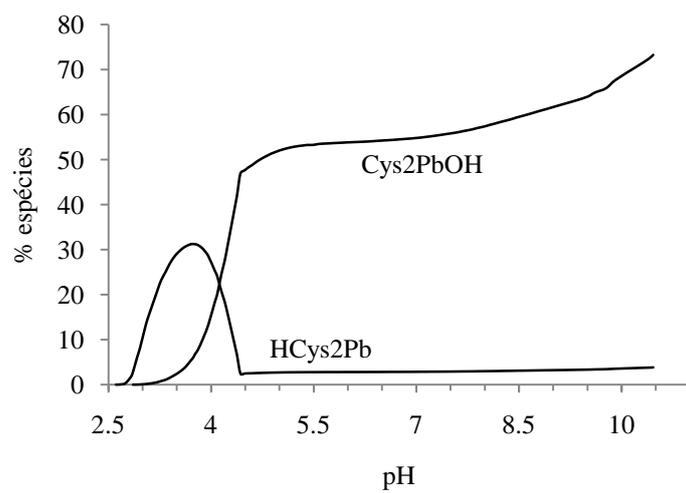
33	18.500	3.083	4.280	4.265	.015
34	19.500	3.250	4.360	4.416	-.056
35	19.750	3.292	4.380	4.466	-.086
36	20.500	3.417	4.430	4.701	-.271
37	21.250	3.542	4.490	.000	.000
38	22.000	3.667	4.550	.000	.000
39	22.500	3.750	4.600	.000	.000
40	23.250	3.875	4.660	.000	.000
41	23.750	3.958	4.710	.000	.000
42	24.250	4.042	4.760	.000	.000
43	25.000	4.167	4.850	.000	.000
44	25.250	4.208	4.880	.000	.000
45	25.500	4.250	4.920	.000	.000
46	25.750	4.292	4.960	.000	.000
47	26.000	4.333	5.000	.000	.000
48	26.480	4.413	5.100	.000	.000
49	26.720	4.453	5.160	.000	.000
50	26.840	4.473	5.200	.000	.000
51	26.960	4.493	5.240	.000	.000
52	27.080	4.513	5.290	.000	.000
53	27.200	4.533	5.350	.000	.000
54	27.320	4.553	5.410	.000	.000
55	27.440	4.573	5.490	.000	.000
56	27.560	4.593	5.580	.000	.000
57	27.680	4.613	5.700	.000	.000
58	27.800	4.633	5.840	.000	.000
59	27.920	4.653	5.980	.000	.000
60	28.040	4.673	6.150	.000	.000
61	28.160	4.693	6.310	.000	.000
62	28.280	4.713	6.410	.000	.000
63	28.400	4.733	6.530	.000	.000
64	28.520	4.753	6.650	.000	.000
65	28.640	4.773	6.740	.000	.000
66	28.760	4.793	6.840	.000	.000

67	28.880	4.813	6.930	.000	.000
68	29.000	4.833	7.010	.000	.000
69	29.120	4.853	7.080	.000	.000
70	29.240	4.873	7.140	.000	.000
71	29.360	4.893	7.200	.000	.000
72	29.610	4.935	7.310	.000	.000
73	29.860	4.977	7.410	.000	.000
74	30.110	5.018	7.510	.000	.000
75	30.360	5.060	7.610	.000	.000
76	30.610	5.102	7.680	.000	.000
77	30.860	5.143	7.760	.000	.000
78	31.110	5.185	7.830	.000	.000
79	31.360	5.227	7.890	.000	.000
80	31.610	5.268	7.960	.000	.000
81	31.860	5.310	8.020	.000	.000
82	32.110	5.352	8.070	.000	.000
83	32.360	5.393	8.130	.000	.000
84	32.860	5.477	8.240	.000	.000
85	33.360	5.560	8.360	.000	.000
86	33.860	5.643	8.460	.000	.000
87	34.360	5.727	8.570	.000	.000
88	34.860	5.810	8.680	.000	.000
89	35.360	5.893	8.780	.000	.000
90	35.860	5.977	8.890	.000	.000
91	36.860	6.143	9.100	.000	.000
92	37.860	6.310	9.310	.000	.000
93	38.860	6.477	9.500	.000	.000
94	39.860	6.643	9.610	.000	.000
95	40.860	6.810	9.770	.000	.000
96	42.860	7.143	9.910	.000	.000
97	45.860	7.643	10.200	.000	.000
98	47.860	7.977	10.390	.000	.000
99	48.860	8.143	10.460	.000	.000
100	49.860	8.310	10.520	.000	.000

101	50.860	8.477	10.630	.000	.000
102	52.860	8.810	10.720	.000	.000

SIGMA PH FIT (σ) = 0.081738

Gráfico da distribuição das espécies para Cys: Pb (2:1)



Apêndice G

Resultados da computação dos dados da titulação potenciométrica para obtenção de constantes de estabilidade dos complexos formados entre chumbo e N-acetilcisteína, na proporção de 2:1, $\mu = 0,1 \text{ mol L}^{-1}$ e $T = 25 \text{ }^\circ\text{C}$.

Program BEST vers.10/10/91

N-acetilcisteína

volume inicial	30.0
normalidade da base	0.05
milimoles de ácido	0.1234
número de pontos da titulação	112

Componentes:

1 N-acetilcisteína	0.60 mM
2 chumbo	0.30 mM
3 próton	1.20 mM

	Log β	Espécies
1	.0000	1 nac. 0 chumbo 0 proton
2	.0000	0 nac. 1 chumbo 0 proton
3	.0000	0 nac. 0 chumbo 1 proton
4	9.6076	1 nac. 0 chumbo 1 proton
5	12.6233	1 nac. 0 chumbo 2 proton
6	.2781	1 nac. 1 chumbo 1 proton
7	10.0821	2 nac. 1 chumbo 1 proton
8	10.7716	2 nac. 1 chumbo 0 proton
9	-4.5709	1 nac. 1 chumbo -1 proton
10	-13.9500	0 nac. 0 chumbo -1 proton

SIGMA PH FIT (σ) = 0.217784

	Vb	a	PHexp	PHcalc	diferença
1	.000	-.021	2.492	2.380	.112
2	.035	-.018	2.499	2.384	.115
3	.070	-.015	2.505	2.388	.117
4	.105	-.012	2.511	2.391	.120
5	.140	-.009	2.517	2.395	.122
6	.175	-.006	2.523	2.399	.124
7	.210	-.003	2.529	2.403	.126
8	.245	.000	2.535	2.407	.128
9	.280	.003	2.541	2.411	.130
10	.315	.006	2.547	2.414	.133
11	.350	.009	2.552	2.418	.134
12	.385	.012	2.559	2.422	.137
13	.420	.014	2.565	2.426	.139
14	.455	.017	2.571	2.430	.141
15	.490	.020	2.577	2.434	.143
16	.525	.023	2.583	2.438	.145
17	.560	.026	2.588	2.441	.147
18	.595	.029	2.595	2.445	.150
19	.630	.032	2.601	2.449	.152
20	.665	.035	2.607	2.453	.154
21	.700	.038	2.613	2.457	.156
22	.735	.041	2.619	2.461	.158
23	.770	.044	2.625	2.465	.160
24	.805	.047	2.631	2.469	.162
25	.840	.049	2.637	2.473	.164
26	.875	.052	2.644	2.476	.168
27	.945	.058	2.656	2.484	.172
28	.980	.061	2.662	2.488	.174
29	1.015	.064	2.669	2.492	.177
30	1.050	.067	2.675	2.496	.179
31	1.085	.070	2.681	2.500	.181
32	1.120	.073	2.688	2.504	.184
33	1.155	.076	2.690	2.508	.182

34	1.190	.079	2.699	2.512	.187
35	1.225	.082	2.706	2.516	.190
36	1.260	.084	2.712	2.520	.192
37	1.295	.087	2.719	2.524	.195
38	1.330	.090	2.726	2.528	.198
39	1.365	.093	2.732	2.531	.201
40	1.400	.096	2.738	2.535	.203
41	1.435	.099	2.745	2.539	.206
42	1.470	.102	2.752	2.543	.209
43	1.505	.105	2.758	2.547	.211
44	1.540	.108	2.765	2.551	.214
45	1.575	.111	2.771	2.555	.216
46	1.610	.114	2.778	2.559	.219
47	1.645	.117	2.785	2.563	.222
48	1.680	.119	2.791	2.567	.224
49	1.715	.122	2.798	2.571	.227
50	1.785	.128	2.811	2.579	.232
51	1.820	.131	2.818	2.583	.235
52	1.855	.134	2.824	2.587	.237
53	1.890	.137	2.832	2.591	.241
54	1.925	.140	2.838	2.595	.243
55	1.960	.143	2.845	2.599	.246
56	1.995	.146	2.852	2.603	.249
57	2.030	.149	2.859	2.607	.252
58	2.065	.152	2.866	2.611	.255
59	2.100	.154	2.873	2.615	.258
60	2.135	.157	2.880	2.619	.261
61	2.205	.163	2.894	2.627	.267
62	2.275	.169	2.907	2.635	.272
63	2.310	.172	2.915	2.639	.276
64	2.345	.175	2.922	2.643	.279
65	2.380	.178	2.929	2.647	.282
66	2.415	.181	2.936	2.651	.285
67	2.450	.184	2.943	2.655	.288

68	2.485	.187	2.950	2.659	.291
69	2.520	.189	2.958	2.663	.295
70	2.555	.192	2.962	2.667	.295
71	2.590	.195	2.970	2.671	.299
72	2.625	.198	2.977	2.675	.302
73	2.660	.201	2.984	2.679	.305
74	2.695	.204	2.992	2.683	.309
75	2.765	.210	3.007	2.691	.316
76	2.800	.213	3.015	2.695	.320
77	2.835	.216	3.021	2.699	.322
78	2.870	.219	3.028	2.703	.325
79	2.920	.223	3.033	2.708	.325
80	2.970	.227	3.036	2.714	.322
81	4.720	.373	3.037	2.916	.121
82	4.820	.381	3.047	2.928	.119
83	4.870	.385	3.059	2.934	.125
84	4.970	.394	3.067	2.945	.122
85	5.070	.402	3.079	2.957	.122
86	5.120	.406	3.082	2.963	.119
87	5.220	.414	3.094	2.975	.119
88	5.320	.423	3.107	2.987	.120
89	5.370	.427	3.112	2.993	.119
90	5.470	.435	3.122	3.005	.117
91	5.570	.444	3.133	3.017	.116
92	5.620	.448	3.141	3.023	.118
93	5.670	.452	3.156	3.029	.127
94	5.720	.456	3.164	3.035	.129
95	5.820	.464	3.184	3.047	.137
96	5.870	.469	3.189	3.053	.136
97	5.920	.473	3.192	3.059	.133
98	5.970	.477	3.205	3.065	.140
99	6.020	.481	3.209	3.071	.138
100	6.120	.489	3.219	3.084	.135
101	6.170	.494	3.223	3.090	.133

102	6.220	.498	3.234	3.096	.138
103	6.320	.506	3.265	3.109	.156
104	6.420	.514	3.284	3.121	.163
105	6.520	.523	3.307	3.134	.173
106	6.620	.531	3.339	3.146	.193
107	6.720	.539	3.351	3.159	.192
108	6.920	.556	3.391	3.185	.206
109	7.120	.573	3.435	3.211	.224
110	7.620	.614	3.575	3.280	.295
111	8.120	.656	3.747	3.352	.395
112	9.120	.739	4.793	3.515	1.278

SIGMA PH FIT (σ) = 0.217784