

Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz



ESCOLA NACIONAL DE SAÚDE PÚBLICA  
SERGIO AROUCA  
ENSP

**“Análise de especiação de estanho em plasma de trabalhadores expostos”**

*por*

***Débora Resende de Souza Lima***

*Dissertação apresentada com vistas à obtenção do título de Mestre em  
Ciências na área de Saúde Pública.*

*Orientadora: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Maria de Fátima Ramos Moreira*

**Rio de Janeiro, julho de 2010.**

*Esta dissertação, intitulada*

**“Análise de especiação de estanho em plasma de trabalhadores expostos”**

*apresentada por*

***Débora Resende de Souza Lima***

*foi avaliada pela Banca Examinadora composta pelos seguintes membros:*

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Silvia Maria Sella

Prof. Dr. Filipe Soares Quirino da Silva

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Maria de Fátima Ramos Moreira

*Dissertação defendida e aprovada em 09 de julho de 2010.*

Crescer significa mudar e  
mudar envolve riscos, uma  
passagem do conhecido  
para o desconhecido.

## **Agradecimentos**

Primeiramente gostaria de agradecer à Deus, por colocar pessoas iluminadas no meu caminho, são iluminadas tanto de sabedoria quanto de boa vontade ao me ajudar no desenvolvimento da minha dissertação.

Ao setor de Imunobiológicos, do laboratório de Biológicos e Artigos e Insumos de Saúde, do Departamento de Química, INCQS. Não tenho palavras para agradecer à Sinéa Mendes, uma pessoa admirável pela sua paciência, desempenho ao explicar, determinação para conseguir fazer mil coisas ao mesmo tempo e ainda ter que desenvolver sua dissertação. Tornou-se uma amiga em pouco tempo e meu conhecimento de cromatografia devo a ela, e boa parte da minha dissertação também. Ao Filipe Quirino, que tem uma memória invejável e uma sabedoria divina, também agradeço pela sua paciência e disposição de tempo, pois sei que é curto, perante aos seus inúmeros deveres, também se fez presente em mais da metade do meu trabalho. À Claudia M<sup>a</sup> da Conceição e Diego Cavatti pela ajuda no laboratório e pelas risadas de descontração necessárias em um momento de tensão.

À Anna Maria Barreto Silva Fust e à Renata de Freitas Dalavia Vale, do setor de Artigos e Insumos de Saúde, do DQ, do INCQS, por me proporcionar o uso do seu HPLC, sem qualquer restrição e ter sido sempre solícita quando necessário.

Ao Leandro Carvalho, do laboratório de indicadores biológicos, do CESTEHE, por iniciar meu aprendizado em uma nova técnica, cromatografia líquida, mesmo tendo seu laboratório para administrar, tirou um tempo para me auxiliar. Além das caronas sem cobranças, por ouvir meus desabafos e minhas “crises nervosas”, e ainda por nossas conversas de amizade e descontração.

O mesmo posso dizer de Renato Marçullo, do laboratório de metais, do CESTEHE, foi um grande amigo, me chamava atenção com sutileza, me mostrando a responsabilidade de um mestrado. Sua sabedoria na parte instrumental e em cálculos, além da sua flexibilidade em assuntos diversos, fez dele um grande amigo, um companheiro para todas as horas.

Do laboratório de metais, do CESTEHE, não posso esquecer de ninguém, cada um teve papel importante na minha dissertação. Regina Aderne me ajudava em qualquer coisa sem reclamar, sempre de bom coração; com Sayonara Azevedo pude dividir viagens de campo e congressos, que se tornaram divertidas, além de sua alegria contagiante; à Fernanda Baptista foi minha amiga de desabafos e histórias, não posso

esquecer da sua ajuda com qualquer coisa relacionada à química; Thalita Dallapícula é uma figura admirável pela sua doçura, também foi uma amiga nesse momento.

Aos meus amigos de mestrado Daniel Souza, Daniele Rocha, Beatriz Brum e Deise Coelho, foram pessoas maravilhosas que conheci, de ótimo convívio tanto para estudos como para uma mesa de bar. Não deixar saudades e lembranças.

Ao laboratório da D<sup>ra</sup> Silvia Sella, do departamento de Química Analítica da UFF, Monique Souza e Luana Bacellar se mostraram muito solícitas, foi de grande ajuda nos meus resultados para ICP-MS. Além da própria D<sup>ra</sup> Silvia que se apresentou muito prestativa ao emprestar seu laboratório e suas alunas.

Agradeço também à Rejane Correa Marques e José Garrofe Dórea, da Universidade Federal de Rondônia, pelo apoio financeiro e a ajuda sua equipe.

Não posso esquecer-me da minha orientadora Maria de Fátima Ramos Moreira, pois me proporcionou ao oferecer esse tema, uma oportunidade para o meu desenvolvimento em conhecimentos metodológicos, instrumentais e analíticos. Estou muito grata aos benefícios profissionais que esse estudo me gerou, além de ter tornado oportuno em novas amizades, me fez alcançar relações profissionais.

Aos meus pais, Neuzely e Luís Cláudio de Souza Lima, e ao meu namorado Igor Aragon, sempre me deram apoio e força durante o desenvolvimento da minha dissertação. Foram pessoas a quem eu recorria perante ao desespero, e onde eu encontrava a paz. À minha avó Cerly Chaves Resende, onde sempre pude me inspirar no ato de estudar, é a pessoa em que dedico toda minha sabedoria, foi sempre uma grande base nos estudos, desde a pré-escola. Obrigada *vó* por estar comigo mesmo de longe.

## Resumo

O estanho (Sn) é um elemento natural na crosta terrestre obtido a partir do minério cassiterita. Devido à sua utilização em processos industriais, é encontrado distribuído pelo ambiente, e sendo um potencial contaminante. Na natureza, aparece nas formas inorgânicas e orgânicas, e quanto menor a cadeia orgânica associada ao metal, maior toxicidade do composto. Compostos organoestânicos de cadeia curta, como trimetil e trietil Sn, são bem absorvidos no trato gastrointestinal. Compostos organoestânicos podem penetrar nas membranas celulares, causando danos celulares e nas mitocôndrias, e ainda interromper a fosforilação oxidativa. Desta forma, podem ser imuno e genotóxicos. O interesse na especiação dos compostos de Sn é devido à toxicidade ser dependente da espécie. O plasma sanguíneo contém a fração biodisponível do analito e pode intermediar a predição de algumas formas de toxicidade crônica. No entanto, há poucos trabalhos sobre como o Sn se encontra no plasma. Portanto, a caracterização dos constituintes que se ligam e / ou transportam esse elemento ajustam na compreensão de seu metabolismo, elucidação dos mecanismos de toxicidade, uma melhor compreensão da distribuição de Sn na célula e sua deposição nos tecidos. Neste estudo, foi desenvolvido um método analítico para separação das espécies de Sn no plasma sanguíneo de trabalhadores que beneficiam o minério de cassiterita, através de cromatografia líquida por filtração em gel, enquanto a concentração do Sn nas frações coletadas foi determinada por espectrometria de absorção atômica por forno de grafite. O uso de Sepharose CL-4B, uma coluna com altura de 1 m, fase móvel de 50 milimolares (mM) Tris-HCl + 30 mM NaHCO<sub>3</sub>, pH 7,4, fluxo de 0,7 mililitros por minuto (ml min<sup>-1</sup>), volumes de plasma injetado e frações coletadas iguais a 2 ml cada, apresentou melhor separação das proteínas, com o aparecimento de três picos. Para a determinação do Sn, temperaturas de pirólise e de atomização iguais a 1400 e 2100°C, respectivamente, e massa do modificador de 10 µg Pd + 5 µg Mg(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> foram utilizadas. O Sn se apresentou apenas na inclusão total, representando possivelmente a albumina e as imunoglobulinas, que são as proteínas mais abundantes do plasma. Contudo não se sabe se o metal se apresenta ligado às proteínas ou livre, para isso seria necessária a determinação por espectrômetro de massas das frações selecionadas.

## Abstract

Tin is a natural element in the earth's crust and is obtained from cassiterite ores. Owing to their wide use in industrial processes, tin is relatively distributed in the environment. In nature, it occurs in both inorganic and organic forms and shorter organic chain associated to the metal, higher the toxicity of the compound. Short-chain organotin compounds such as trimethyl and triethyl tin are well absorbed in the gastrointestinal tract. Organotin compounds can penetrate cell membranes causing damage to cell and mitochondria, as well as interrupt oxidative phosphorylation. Thus organic compounds can be immunotoxic and genotoxic. The interest on speciation of the organotin compounds is due to species-dependent toxicity. The blood plasma contains the bioavailable fraction of the analyte and can mediate the prediction of some forms of chronic toxicity. However, very few species of tin existing in the plasma are known. Therefore, the characterization of the constituents that bind to and / or transporting the element of interest is critical to full understanding of metabolism, elucidation of the mechanisms of toxicity, a better understanding of the distribution of tin in the cell and its deposition in tissues. In this study, we developed an analytical method for the separation of tin species in blood plasma using gel filtration liquid chromatography while tin concentration in the collected fractions was determined by graphite furnace atomic absorption spectrometry. The use of Sepharose CL-4B, height of 1 m, mobile phase of 50mM Tris-HCl + 30mM NaHCO<sub>3</sub>, pH 7,4, flow 0,7 ml min<sup>-1</sup>, fractions collected volume of 2 ml, plasma injected volume of 2 ml, showed the best protein separation with three peaks. For the determination of tin, pyrolysis and atomization temperatures of 1400 and 2100°C, respectively, and a modifier mass of 10 µg Pd + 5 µg Mg(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> were used. The Sn is presented only in total inclusion, possibly representing albumin and immunoglobulins, which are the most abundant proteins from plasma. However it is not known if the metal appears bound to protein or free, for it would require a determination by mass spectrometry of selected fractions.

## **Sumário**

1- Introdução	1
2- Objetivos	4
2.1- Objetivo geral	4
2.2- Objetivos Específicos	4
3- Justificativa	5
4- Estanho	6
4.1- Propriedades físico-químicas	6
4.2- Ocorrência, produção e uso	7
4.3- Toxicocinética	9
4.3.1- Absorção	9
4.3.2- Distribuição	11
4.3.3- Metabolismo	12
4.3.4- Eliminação	13
4.4- Toxicodinâmica	14
4.4.1- Formação dos compostos de estanho em meio biológico	14
4.4.2- Efeitos causados pelos compostos de estanho	16
5- Plasma e sua importância para o monitoramento biológico	19
6- Exposição Ocupacional e Ambiental	20
7- Garimpo como um problema de saúde pública	22
8- Especificação e análise de especificação	25
9- Metodologias envolvidas na análise de especificação de fluidos biológicos	28
10- Experimental	36
11- Resultados e Discussão	42



11.1- Determinação do Estanho no Plasma Total	42
11.1.1- Programa de temperatura	42
11.1.2- Curvas de Pirólise e de Atomização	43
11.1.3- Diluição	44
11.1.4- Massa do Modificador	46
11.1.5- Linearidade	47
11.1.6 - Massa Característica e Razão de Sensibilidade	48
11.1.7- Limite de Detecção e Quantificação	48
11.1.8- Exatidão	49
11.1.9- Análise de Plasmas de Trabalhadores Expostos	50
11.2. Separação e Identificação das Frações Plasmáticas	51
11.2.1- Estudo da fase móvel e do método cromatográfico	51
11.3 – Frações Plasmáticas	56
11.3.1- Programa de temperatura	56
11.3.2- Curvas de pirólise e atomização	57
11.3.3- Diluição	58
11.3.4- Massa do modificador	58
11.3.5- Linearidade	59
11.3.6- Massa Característica e Razão de Sensibilidades	60
11.3.7- Limite de detecção e quantificação	61
11.4- Determinação do Sn nas frações plasmáticas	61
11.5- Eletroforese	67
12- Conclusão	72
13- Bibliografias	75
14- Anexo	82

## Índice de Tabelas

<b>Tabela 1:</b> Programa de temperatura utilizado na determinação de estanho no plasma.	43
<b>Tabela 2:</b> Avaliação das massas características, nas curvas aquosa e no plasma, utilizando-se diferentes massas de modificador.	46
<b>Tabela 3:</b> Razão de sensibilidade para as curvas aquosa e no plasma com adição de analito.	48
<b>Tabela 4:</b> Concentração de estanho encontrada no plasma de trabalhadores expostos ocupacionalmente.	50
<b>Tabela 5:</b> Programa de temperatura utilizado na determinação de estanho nas frações.	56
<b>Tabela 6:</b> Avaliação das massas características, nas curvas aquosa e no tampão, utilizando-se diferentes massas de modificador.	58
<b>Tabela 7:</b> Massa característica e razão de sensibilidades para as curvas aquosa e no tampão.	60

## Índice de Figuras

<b>Figura 1:</b> Curvas de pirólise e de atomização para solução aquosa e plasma enriquecido com 1000 pg Sn.	44
<b>Figura 2:</b> Influência da razão de diluição do plasma em Triton X-100 0,1% (v/v), em HNO <sub>3</sub> 0,2% e em água MilliQ.	45
<b>Figura 3:</b> Curvas de linearidade, na faixa de 10 a 300 µg L	47
<b>Figura 4:</b> Curva de calibração usando Blue Dextran 1% e Azida 0,05%.	54
<b>Figura 5:</b> Cromatograma do plasma, em um $\lambda = 220$ nm.	54
<b>Figura 6:</b> Cromatograma do plasma de indivíduo não exposto, sem adição, em um $\lambda = 280$ nm.	55
<b>Figura 7:</b> Cromatograma do plasma de indivíduo não exposto, com adição de 0,25 µg Sn mL <sup>-1</sup> .	55
<b>Figura 8:</b> Curvas de pirólise e atomização, no tampão 50mM Tris-HCl + 30mM NaHCO <sub>3</sub> .	57
<b>Figura 9:</b> Curvas de linearidade na curva aquosa e no tampão, na faixa de 2,5 a 100 µg L <sup>-1</sup> .	59
<b>Figura 10:</b> Cromatograma das frações plasmáticas de indivíduo não exposto;	61
<b>Figura 11:</b> Cromatograma das frações plasmáticas de indivíduo não exposto enriquecido com 250 ng de Sn.	61
<b>Figura 12:</b> Cromatograma de trabalhador exposto, amostra 01.	63
<b>Figura 13:</b> Cromatograma de trabalhador exposto, amostra 02.	63
<b>Figura 14:</b> Cromatograma de trabalhador exposto, amostra 03.	64
<b>Figura 15:</b> Cromatograma de trabalhador exposto, amostra 04.	64
<b>Figura 16:</b> Cromatograma de trabalhador exposto, amostra 05.	65

- Figura 17:** Cromatograma de trabalhador exposto, amostra 06. 65
- Figura 18 A:** Gel com agente redutor  $\beta$ -mercaptol, representam as frações 84 a 88, da amostra 1. 67
- Figura 18 B:** Gel com agente redutor  $\beta$ -mercaptol, representam as frações 89 a 93, da amostra 1. 67
- Figura 19 A:** Gel sem agente redutor  $\beta$ -mercaptol, representam as frações 89 a 93, da amostra 1. 68
- Figura 19 B:** Gel sem agente redutor  $\beta$ -mercaptol, representam as frações 89 a 93, da amostra 1. 69

## **Lista de Abreviaturas**

AAS – Atomic Absorption Spectrometry

APS – Persulfato de Amônio

BSA – Albumina de Soro Bovino

CEM – Cromatografia de Exclusão Molecular

CL – Cromatografia Líquida

CLBP – Cromatografia Líquida de Baixa Pressão

CG – Cromatografia Gasosa

CV-AAS – Cold Vapour Atomic Absorption Spectrometry

DBT – Dibutilestanho

EDTA – Ácido Etilenodiamino tetra-Acético

EG – Eletroforese em Gel

ETAAS – Electrothermal Atomic Absorption Spectrometry

FAAS – Flame Atomic Absorption Spectrometry

GC-OES – Gas Chromatography Optical Emission Spectrometry

GF AAS – Graphite Furnace Atomic Absorption Spectrometry

HG AAS – Hydride Generation Atomic Absorption Spectrometry

HPLC- High Performance Liquid Chromatography

iSn – Estanho inorgânico

IBMP – Índice Biológico Máximo Permitido

ICP MS – Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry

IgG – Imunoglobulina G

IUPAC – International Union for Pure and Applied Chemistry

kDa – Quilodalton

L – Litro

LD – Limite de Detecção

LQ – Limite de Quantificação

LPLC- Low Pressure Liquid Chromatography

Spectrometry

MBT – Monobutilestanho

mL - mililitro

MM – Massa Molecular

mM – milimol

$m_0$  – Massa Característica

$m_0Aq/m_0M$  – Razão de Sensibilidade  
 $\mu\text{L}$  – microlitro  
ng – nanograma  
NIOSH – National Institute for Occupational Safety and Health  
nm – nanômetro  
NR – Norma Regulamentadora  
OSHA – Occupational Safety and Health Administration  
OVA – Ovalbumina  
oSn – Estanho Orgânico  
PABA – Ácido para-Aminobenzóico  
PAGE – PolyAcrylamide Gel Electrophoresis  
ppm – Parte Por Milhão  
PVC – Cloreto de Polivinila  
RMN – Ressonância Magnética Nuclear  
RPM – Rotação por Minuto  
SDS – Dodecil Sulfato de Sódio  
SDS-PAGE – Sodium Dodecyl Sulphate PolyAcrylamide Gel Electrophoresis  
SNC – Sistema Nervoso Central  
STPF – Stabilized Temperature Platform Furnace  
 $T_A$  – Temperatura de Atomização  
 $T_p$  – Temperatura de Pirólise  
TAT – triálquilestanho  
TBT – Tributilestanho  
TET – Trietilestanho  
TEMED – N, N, N', N' Tetrametil Etilenodiamina  
TGI – Trato Gastrointestinal  
TLV-*TWA* – Threshold Limit Value - *Time-Weighted Average*  
TMT – Trimetilestanho  
Tris – Tris (Hidroximetil) Aminometano  
UV – Ultravioleta  
VR – Valor de Referência  
Vol. – Volume  
 $\lambda$  – Comprimento de Onda  
[Sn] – Concentração de estanho

## 1- Introdução

O interesse sobre acumulação e toxicidade de metais tem crescido nos últimos anos como consequência das exposições ocupacionais e ambientais, ou dos distúrbios causados por esses elementos. A detecção molecular ou estrutural de diversos elementos considerados tóxicos tem aumentado nas últimas décadas, sendo alvo de investigações nas pesquisas ambientais e de saúde humana<sup>1</sup>.

Em sua maioria, os elementos traço ocorrem naturalmente no solo, em baixas concentrações e em formas não prontamente disponíveis para plantas e organismos vivos. Em função de suas características específicas, os metais podem apresentar risco efetivo ou potencial à saúde humana, ou gerar impactos aos meios físico, biótico e sócio-econômico. Estes elementos podem causar danos eco-biológicos irreversíveis<sup>2,3</sup>.

O estanho (Sn) é um metal de ocorrência natural, obtido de minérios como a cassiterita ( $\text{SnO}_2$ ) ou polimetálicos. Industrialmente importante, os compostos de Sn podem ser categorizados como inorgânico, quando combinado com cloro, enxofre e oxigênio, na forma de  $\text{Sn}^{+2}$  ou  $\text{Sn}^{+4}$ , e orgânico, quando faz uma ligação covalente com o carbono, com substituições mono, di, tri e tetra na ligação deste elemento com o carbono<sup>4,5</sup>.

O Sn metálico assim como os compostos inorgânicos e orgânicos de Sn pode ser encontrado no ar, água e solo, próximo aos locais em que estão presentes nas rochas, minas e indústrias, e de uso. Em geral, os compostos orgânicos de Sn são provenientes de fontes antropogênicas e não ocorrem naturalmente no ambiente<sup>6</sup>.

O Sn metálico é usado no revestimento protetor de latas para alimentos, bebidas e aerossóis. Está presente em ligas tais como latão, bronze e peltre, e alguns materiais de solda. Os compostos inorgânicos deste metal (iSn) são usados na indústria de vidro e corantes, também presentes em pastas de dente, perfumes, sabões, aditivos de alimentos e tinturas. Por outro lado, os compostos orgânicos (oSn) são de origem sintética, e suas principais aplicações estão relacionadas às suas propriedades biocidas, no combate às bactérias, fungos, insetos, moluscos e pequenos animais. E ainda é utilizado na prevenção do crescimento de colônias de moluscos em cascos de navios, além de seu uso comercial como estabilizador do cloreto de polivinila (PVC)<sup>5,7</sup>.

O iSn apresenta baixa absorção qualquer que seja sua rota de entrada, além de ter pequena retenção nos tecidos, tempo de meia vida curto e rápida eliminação. O iSn absorvido se deposita nos ossos, apesar de apresentar também elevadas concentrações

em tecidos moles como os pulmões, rins e fígado. Já o oSn é mais rapidamente absorvido, sendo que a absorção é maior para os compostos de cadeias curtas. Após a absorção, apresentam a mesma distribuição dos compostos iSn nos tecidos moles<sup>5, 6, 8</sup>.

A exposição ao Sn e seus compostos pode produzir diversos efeitos neuro, hemato e imunológicos. Os iSn produzem a pneumoconiose não fibrinogênica e efeitos gastrointestinais, enquanto que os oSn inibem síntese do heme oxigenase e também podem ser genotóxicos. Causam ainda irritação severa e queimação na pele, quando absorvidos por esta via. Outros efeitos são danos renais e hepáticos<sup>8, 9</sup>.

Estudos desenvolvidos na área da química analítica nas duas últimas décadas sustentam que a determinação total do elemento não fornece informações adequadas sobre mobilidade, biodisponibilidade, metabolismo, mecanismos, interações e deposição nos tecidos, assim como, o impacto dos elementos sobre os sistemas ecológicos e organismos biológicos. Somente a especiação, ou seja, o conhecimento das espécies químicas dos elementos pode levar ao entendimento das reações químicas e bioquímicas que envolvem essas espécies e, assim, fornecer informações sobre toxicidade ou essencialidade<sup>10</sup>.

A presença de Sn gera efeitos imediatos do ambiente físico-biológico, levando a problemas na saúde humana que podem ser observados nas regiões de mineração, gerando graves conseqüências para a qualidade de vida. É necessário controlar a crescente exposição dos trabalhadores e da população vizinha à mineração aos resíduos derivados da atividade humana<sup>11</sup>.

A extração de cassiterita feita a céu aberto, emprega um processo de lavra quase que totalmente mecânico, porém seus trabalhadores nem sempre fazem uso de equipamentos de proteção. O tráfego intenso de máquinas e equipamentos altera sensivelmente as propriedades do solo a ser minerado. No entanto, essas alterações não decorrem somente desse tráfego, mas de todas as operações que antecedem ou sucedem a retirada do minério<sup>12</sup>.

As operações de extração de Sn ocorrem em processos molhados, porém o pó e o SnO<sub>2</sub> podem ser emitidos durante as operações de fundição, ensacamento e limpeza do local, expondo os trabalhadores à inalação de poeiras e fumos, e deposição sobre a pele dos compostos de Sn, como também à sílica, chumbo e arsênio<sup>5, 9</sup>.

A extração do mineral tem um grande impacto no meio ambiente, na saúde dos trabalhadores bem como da comunidade local. As condições de saúde da população exposta a essa situação são de amplo interesse da saúde pública. O uso descontrolado



dos solos para a retirada de metais expõe diretamente os próprios mineradores, além de proporcionar uma exposição prolongada do meio ambiente e acúmulo dos metais na cadeia alimentar<sup>13</sup>.

O acesso limitado dos mineradores às informações e ao tratamento de saúde resulta em sofrimento dos próprios trabalhadores. A falta de informação abrangente e confiável sobre a situação atual revela a não disponibilidade de dados sólidos para fundamentar intervenções para correção dos problemas. Contudo, é necessário executar projetos, estudos e atividades específicas que possam contribuir de maneira efetiva para o desenvolvimento econômico e social, além da melhoria da qualidade de vida<sup>14</sup>.

## **2- Objetivos**

### **2.1- Objetivo geral**

O objetivo desse trabalho é determinar a concentração total de Sn no plasma dos trabalhadores expostos à cassiterita e desenvolver uma análise de especiação do metal, visando assim, uma melhor compreensão da distribuição do Sn no organismo. Contribui-se, desta forma, na avaliação dos riscos à saúde dos trabalhadores envolvidos no processo de beneficiamento de cassiterita.

### **2.2- Objetivos Específicos**

- Estabelecimento das condições analíticas para a determinação do Sn no plasma por espectrometria de absorção atômica eletrotérmica;
- Estabelecimento de metodologia analítica para separação das proteínas do plasma, através da cromatografia líquida de baixa pressão com uma coluna de exclusão de tamanho;
- Estudos das condições analíticas para a determinação do Sn nas frações eluídas do plasma por espectrometria de absorção atômica eletrotérmica;
- Determinação dos pesos moleculares das proteínas fracionadas pela cromatografia líquida, através da eletroforese em gel;
- Aplicação das metodologias padronizadas nas amostras de plasma dos trabalhadores da área de produção de beneficiamento do minério de cassiterita em Rondônia;

### **3- Justificativa**

A exposição humana a agentes químicos provenientes da mineração desencadeia além de efeitos toxicológicos, uma série de efeitos sociais, econômicos e psicossociais que podem culminar em episódios de morbidade e mortalidade. Contudo, impedir o processo de trabalho dos mineradores e garimpeiros de cassiterita é inviável, pois nessas regiões, onde a infraestrutura e as condições econômicas são precárias, este é um dos poucos meios de subsistência da população<sup>11,15</sup>.

Os efeitos do Sn à saúde dos mineradores geram uma crescente preocupação com o modo de trabalho e vias de exposição ao metal durante esse processo, seja oral, respiratória ou dérmica. A compreensão do modo de exposição favorece o estudo deste elemento no organismo. Porém, o controle do Sn no meio biológico é um grande desafio, devido à escassez de estudos realizados com este metal<sup>5</sup>.

O plasma sanguíneo contém a fração biodisponível do analito e pode intermediar a predição de algumas formas crônicas de toxicidade. Entretanto, muito poucas espécies de Sn existentes no plasma são conhecidas. Portanto, a especificação, ou seja, a caracterização dos constituintes que se ligam e/ou que transportam o elemento de interesse é fundamental para total entendimento do metabolismo, elucidação dos mecanismos de toxicidade, melhor compreensão da distribuição do Sn na célula e sua deposição nos tecidos<sup>1</sup>.

## 4- Estanho

### 4.1- Propriedades físico-químicas

O Sn apresenta número atômico igual a 50 e massa atômica de 118,71. Está situado na tabela periódica no grupo 14, juntamente com o carbono, silício e germânio e chumbo. É um metal branco prateado, maleável, pouco dúctil, altamente cristalino, com baixo ponto de fusão de 231,9°C e elevado ponto de ebulição, 2 603°C<sup>5</sup>.

Os compostos de Sn são apresentados em duas formas, a inorgânica, em dois estados de oxidação +2 e +4, ambos razoavelmente estáveis, enquanto que a forma orgânica contém ligações covalentes entre o Sn e o carbono (C), expressando uma fórmula geral RSnX, onde R é representado por um grupo alquil ou aril e X é uma espécie inorgânica. Exemplos desses compostos são tributilestanho, trietilestanho, trimetilestanho e dibutilestanho, entre outros. Nos compostos organoestanho, o número de carbonos e o comprimento da cadeia produzem efeitos sobre as propriedades físicas e químicas do composto, em geral, a hidrossolubilidade dos compostos diminui à medida que o tamanho da cadeia aumenta<sup>5, 6, 16</sup>.

Os derivados organometálicos de Sn (IV) são mais numerosos que os de Sn (II). Isto é devido, principalmente, à sensibilidade de compostos de Sn (II) frente ao ar e umidade. Esta maior sensibilidade está relacionada com a facilidade do Sn (II) em ser oxidado a Sn (IV) pela ação do O<sub>2</sub> ou hidrolisado na presença de umidade<sup>17</sup>. Os complexos de estanho orgânico (IV) e aminoácidos são, sobretudo, estáveis em contato com o ar e pouco solúveis em solventes orgânicos comuns<sup>18</sup>. Porém, estudos em animais de laboratório sugerem que esses estados de oxidação não são facilmente convertidos *in vivo*<sup>6</sup>.

Devido à natureza anfotérica, o Sn reage com ácidos e bases fortes, porém é resistente a soluções neutras como água<sup>16</sup>. Os compostos ligados aos peptídeos são solúveis em metanol, etanol, clorofórmio e sulfóxido de dimetila. Porém, alguns derivados do difenilestanho de dipeptídeos são moderadamente solúveis em solventes orgânicos comuns<sup>18</sup>.

O ácido sulfúrico concentrado reage com o Sn e forma o sulfato de estanho II, enquanto que o ácido diluído reage lentamente em temperatura ambiente. Reações com ácido nítrico diluído produzem compostos nitrados de estanho solúveis; em ácido nítrico

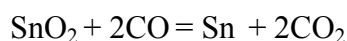
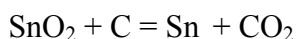
concentrado, o Sn é oxidado e forma compostos de dióxidos de estanho hidratados insolúveis<sup>6</sup>.

Apenas pequenas quantidades de alguns metais como o cobre, níquel, prata e ouro podem ser dissolvidos em uma solução pura de Sn líquido, próximo ao seu ponto de fusão. Porém, alguns compostos que têm uma fórmula química bem determinada e são constituídos por dois ou mais elementos metálicos que ocupam posições cristalográficas distintas e bem definidas, são livremente formados, sendo de grande importância metalúrgica<sup>9</sup>.

#### 4.2- Ocorrência, produção e uso

O Sn inorgânico é encontrado naturalmente na crosta terrestre em uma concentração de 2 - 3 ppm (parte por milhão). Em geral, os compostos orgânicos deste metal são provenientes de fontes antropogênicas (origem sintética)<sup>5</sup>.

O Sn é extraído principalmente da cassiterita (SnO<sub>2</sub>), geralmente associado a granitos. Sua extração ocorre pela redução do minério com carvão em alto forno, sendo depois refinado em forno revérbero, obtendo o Sn metálico, conforme as reações abaixo<sup>4</sup>:



Outro modo de produção da fusão do minério de Sn é a mistura do minério com sal, levada à cerca de 600°C e lavada com água. Então, um agente redutor é acrescentado e a mistura é fundida à 1500°C. Após o refino do Sn, o metal é moldado em barras<sup>9</sup>.

A produção mundial anual de Sn tem sido bastante estável, com uma média de 220000 toneladas ao longo de décadas. Apesar de, aproximadamente, 30 países produzirem o Sn, poucos apresentam as maiores reservas mensuradas e registradas como a China, Malásia, Indonésia, Brasil, Bolívia, Tailândia e Estados Unidos<sup>5</sup>. O Brasil é o 4º maior produtor de Sn, com produção aproximada de 12 mil toneladas por ano, significando 4% da produção mundial<sup>19</sup>.

O crescimento do consumo do Sn inorgânico pode ser associada, em grande parte, à evolução da sociedade industrial ou, mais diretamente, pelo uso de embalagens alimentícias e de veículos, as duas fontes mais importantes de consumo final do Sn ao longo do século XX<sup>19</sup>.

Em suas aplicações metalúrgicas, o Sn encontra-se quase sempre combinado com outros metais, quer como elemento de formação de liga ou revestimento<sup>14</sup>. As formas comercialmente mais importantes incluem os compostos inorgânicos de cloreto de estanho (II) e (IV), fluoreto de estanho (II), difluoroborato e pirofosfato de estanho (II)<sup>6</sup>. O cloreto de Sn (II),  $\text{SnCl}_2$ , é o mais importante comercialmente, usado como agente redutor em sínteses orgânicas e inorgânicas e na fabricação de vidros e pigmentos. Cloreto de Sn (IV),  $\text{SnCl}_4$ , também é usado em síntese orgânica, como intermediário na fabricação compostos organoestânicos e em plástico<sup>4</sup>. Os compostos inorgânicos de Sn também têm seu uso em pigmentos como o azul cerúleo, nome tradicional do estanato de cobalto (II),  $\text{CoSnO}_3$ <sup>9</sup>.

Fluoreto de Sn (II),  $\text{SnF}_2$ , é utilizado na odontologia preventiva, com uma ação protetora plenamente aceita. Um dos maiores problemas associados ao uso de  $\text{SnF}_2$  em formulações dentárias é a instabilidade de suas soluções aquosas, já que o íon Sn (II) pode oxidar-se facilmente a Sn (IV)<sup>5</sup>. No entanto, só Sn (II) apresenta a atividade antibacteriana<sup>9</sup>.

O óxido de estanho (IV) tem sido usado há milênios como opacificador em cerâmicas e em esmaltes vítreos. Películas com até 100 nanômetros (nm) de espessura tornam o vidro mais resistente a choques mecânicos e são usadas em copos e pratos de vidro de uso freqüente. Entre 100 e 1000 nm de espessura, efeitos de interferência luminosa nas películas produzem um aspecto iridescente, já que aí está a faixa visível do espectro. Acima de 1000 nm, a película é transparente, mas pode conduzir a corrente elétrica, sobretudo associada a óxido de índio. O vidro tratado dessa maneira tem inúmeras aplicações, entre as quais as janelas anti-congelantes de aviões e as telas eletroluminescentes, como em monitores de computadores<sup>5</sup>.

O revestimento de Sn pode ser aplicado em muitas superfícies metálicas por eletrodeposição, ainda que, quando molhado, o Sn fundido adere facilmente a ligas, como o aço, e a metais, como o ferro e cobre, fornecendo proteção à oxidação destes<sup>9</sup>. Porém, as aplicações mais relevantes continuam a ser o mercado de embalagens com as folhas de flandres e as soldas, estas últimas, destinadas às indústrias automobilísticas, de telecomunicações e eletro-eletrônicos<sup>19</sup>.

Os compostos organometálicos de Sn são de uso bem mais recente em comparação com os compostos inorgânicos, pois são de origem sintética. No entanto, sua utilização tem tido um crescimento<sup>5</sup>. O desenvolvimento crescente da química organoestânica pode ser atribuído principalmente à importância tecnológica dos

compostos organometálicos do Sn, os quais podem ser utilizados como agentes biocidas, pesticidas, catalisadores em diversas reações e mais recentemente como agentes antitumorais<sup>17</sup>. Além da importante aplicação comercial nos estabilizadores de PVC<sup>5</sup>.

Em alguns casos, os compostos organoestânicos (IV) têm apresentado uma atividade antiproliferativa aceitável *in vivo*, como um novo agente quimioterápico. No entanto, como muitos agentes antitumorais típicos, a eficiência e a aplicação dos derivados organoestânicos parecem ser limitadas pela fraca hidrossolubilidade. Portanto, a síntese de compostos organoestânicos com maior hidrossolubilidade tem recebido uma atenção especial<sup>20</sup>.

No início dos anos 60, o tributilestanho (TBT) foi introduzido na navegação como película protetora, prevenindo o crescimento de colônias de moluscos em cascos de navios. Existem dois tipos de películas, o primeiro tipo consiste num copolímero de acrilato e metacrilato de tributilestanho, que sofre hidrólise pela água do mar, liberando lentamente a espécie TBT, especialmente tóxica para animais marinhos. O segundo tipo de película utilizado consiste numa espécie triorganoestânica ancorada a um polissiloxano, formando uma estrutura tridimensional rígida, mais resistente do que a anterior<sup>16</sup>.

### **4.3- Toxicocinética**

A maioria das pesquisas desenvolvidas para o conhecimento da cinética do Sn foi realizada em animais como roedores e primatas e, depois extrapoladas para humanos. Entretanto, existem diferenças entre estudos conduzidos nas mesmas espécies, o que demonstra uma característica importante da toxicocinética dos compostos de Sn<sup>5</sup>.

#### **4.3.1- Absorção**

Estudos de toxicidade sugerem que compostos inorgânicos de Sn não são facilmente absorvidos por via oral ou após exposição por inalação, e mostram apenas um efeito limitado após exposição dérmica<sup>5</sup>.

A pobre absorção, a baixa retenção nos tecidos e rápida eliminação contribuem para a baixa toxicidade do Sn inorgânico (iSn)<sup>5</sup>. A absorção ocorrida por via gastrointestinal deste metal é inferior a 5% e é influenciada pelo seu estado de oxidação,

sendo os compostos de Sn (II) mais rapidamente absorvidos do que os de Sn (IV)<sup>8</sup>. Durante a inalação de poeiras e fumos, algumas partículas podem ficar retidas no pulmão, porém essa acumulação é baixa, devido a pouca absorção deste metal pelo organismo. Por outro lado, uma pequena concentração de Sn pode penetrar pela pele intacta<sup>5</sup>.

Um estudo realizado por Johnson e Greger sugere que a absorção gastrointestinal do iSn em humanos depende da presença de outras substâncias no meio e sua forma iônica. Indivíduos ingeriram 0,11 mg Sn/dia em uma dieta controlada, aproximadamente 45% da dose foram absorvidas pelo organismo. Outro grupo de indivíduos ingeriu alimentos com uma adição de 50 mg por dia de SnCl<sub>2</sub>, e apenas 3% foram absorvidas. A absorção do Sn resultou ser diferente entre as duas dietas, uma vez que o tipo de ligação do metal com o alimento não é o mesmo na suplementada. O Sn naturalmente incorporado nos alimentos pode ser mais prontamente absorvido do que aquele adicionado como cloreto estanhoso à comida<sup>5,6</sup>.

Como citado acima, uma das grandes fontes de Sn inorgânico é através dos alimentos armazenados em embalagens contendo este metal. Neste caso, o alimento está exposto mesmo congelado, fresco ou engarrafado. Estudos revelam que, ao ser aberto, o alimento pode apresentar de 40 a 150 µg Sn g<sup>-1</sup>, porém, quando armazenado por alguns dias, mesmo no refrigerador, a concentração do Sn sobe para 500 µg Sn g<sup>-1</sup>. Contudo, a ingestão estimada do metal para um indivíduo que consome 0,5 Kg/dia de alimentos expostos seria de 1 a 200 mg Sn/dia<sup>21</sup>.

A absorção por inalação de um composto orgânico é possível, apesar de haver poucos relatos. Os casos publicados são relativos à intoxicação aguda como, por exemplo, durante a limpeza de um caldeirão em uma indústria, seis trabalhadores inalaram uma mistura de vapor de cloridrato de dimetilestanho e trimetilestanho. Um deles morreu 12 dias após a exposição, com uma concentração elevada de Sn na urina, depressão respiratória e coma<sup>5</sup>.

Em geral, os compostos orgânicos são mais rapidamente absorvidos pelo organismo do que os inorgânicos<sup>8</sup>. Os derivados alquila de cadeia curta têm uma alta absorção no trato gastrointestinal (TGI), enquanto que os de cadeia longa são pouco absorvidos<sup>5</sup>. Logo, após uma exposição às diferentes espécies de Sn orgânico, os compostos mais tóxicos são aqueles de cadeia curta, como é o caso do trimetil e trietilestanho<sup>22</sup>.



Em humanos, não há estudos quantitativos sobre a absorção dos compostos de metilestanho, etilestanho e fenilestanho após a ingestão. Apenas a presença de butilestanho no sangue de animais e em amostras de fígado humano foi relatada, indicando a absorção desses compostos. Entretanto, um estudo em ratos mostra que, após a administração oral de 23 mg Sn kg<sup>-1</sup> de mono, di e tributilestanho, foi observada a excreção de 2, 20 e 35% desses compostos, respectivamente, na urina. Contudo, podemos concluir que maior excreção ocorre com o aumento do número de radicais butila no composto, mostrando que os compostos menores são mais absorvidos<sup>5</sup>.

Muitos compostos orgânicos são absorvidos pelo contato com a pele, porém, pesquisas quantitativas com humanos dessa absorção não foram encontradas<sup>5</sup>. Um relato de caso mostrou o envenenamento de 217 pessoas após o uso da solução de diiodato de dietilestanho combinado com ácido linóico para tratamento de furúnculo, resultando em 111 mortes. Trabalhadores que entram em contato com a película protetora de cascos de navios e pesticidas, contendo TBT e dibutilestanho (DBT), sofrem queimaduras, irritação, eritema e lesões pustulosas na pele<sup>22</sup>.

#### **4.3.2- Distribuição**

O corpo humano contém em média, menos de 17 mg de Sn, sendo que 6 mg se encontram nos tecidos moles, entre os quais se destacam os pulmões, fígado e rins, e a fração restante nos tecidos esqueléticos, principal sítio de deposição. Porém, o mecanismo de absorção e retenção deste metal não é bem elucidado. A fração de Sn ingerida e absorvida pelo trato gastrointestinal é transportada para a corrente sanguínea e 50% é imediatamente excretado, 35% é transferido para os ossos e 15% é distribuído de forma não uniforme entre os tecidos moles<sup>5</sup>.

Nos Estados Unidos, um estudo com indivíduos mostrou que o teor médio deste metal nas glândulas supra-renais, pulmão, fígado, rins, baço, músculos e cérebro foi de 5,1; 3,4; 1,8; 1,5; 0,8 e <0,4; <0,3 mg / kg peso úmido, respectivamente<sup>6</sup>. Porém, alguns estudos relatam uma distribuição muito variável de Sn em tecidos humanos, com diferenças significativas relacionadas à idade e localização geográfica<sup>8</sup>.

Em dois estudos com pessoas não expostas ocupacionalmente aos compostos de Sn, as concentrações encontradas deste metal no sangue variaram de 2 a 9 µg L<sup>-1</sup>. Outro estudo com doze voluntários, com idade média de 77,8 anos, revela que a concentração normal de Sn no plasma é de 1,38 ± 0,52 µg L<sup>-1</sup> e, nas células vermelhas do sangue,

$2,49 \pm 0,80 \mu\text{g L}^{-1}$ . Esses dados sugerem uma razão de, aproximadamente, 1,9 entre essas concentrações, ou seja, em torno de 65% do Sn podem ser encontrados ligados aos eritrócitos, enquanto que 35% estão presentes no plasma<sup>5,6</sup>.

Os pulmões são os únicos órgãos que apresentam acúmulo desse metal de acordo com a idade, isso devido à inalação em ar poluído com Sn, uma vez que este metal não se acumula em outros órgãos com o avançar da idade. O iSn não cruza facilmente a barreira hemato-encefálica, porém os dados existentes sugerem a possibilidade de uma pequena transferência através da placenta<sup>5,6,8</sup>.

Os trialkilestanhos (TAT) são transportados pelo organismo através da circulação enterohepática. Estudos em animais e peixes marinhos mostram que o TBT acumula-se nos músculos, enquanto o dimetilestanho apresenta maior concentração no fígado e nos rins. Isso ocorre devido à ligação do metal com proteínas tais como a metalotioneína ou com peptídeos como a glutathione, presentes no fígado e nos rins, que desempenham um papel importante na desalquilação dos radicais. Esses estudos em animais são importantes, uma vez que tais proteínas também estão presentes em humanos<sup>22</sup>.

Uma contaminação por compostos orgânicos de Sn, como butilestanho e fenilestanho, foi observada por um estudo realizado com golfinhos na costa da Tailândia. Concentrações desses compostos variando de 16 a 1152  $\mu\text{g kg}^{-1}$  e  $\leq 1$  a 62  $\mu\text{g kg}^{-1}$ , respectivamente, foram encontradas nos órgãos e tecidos. Um elevado teor de TBT foi encontrado no fígado, enquanto que o trifenilestanho não foi detectado devido à baixa concentração. Dentre os compostos butilados, o monobutilestanho (MBT) foi a espécie dominante nos tecidos e órgãos, com exceção do fígado, em que predominou o DBT. O MBT e DBT produzidos no fígado são distribuídos por vários órgãos e tecidos através da corrente sanguínea<sup>23</sup>.

#### **4.3.3- Metabolismo**

Existem poucos estudos realizados em humanos sobre o metabolismo dos compostos de Sn inorgânico ou orgânico, após a exposição por inalação, ingestão e dérmica<sup>5</sup>. Quando diferentes estudos são comparados, podem ser observadas variações nas espécies do metal encontradas em um mesmo órgão, isso sugere a ocorrência de alguns erros durante as análises, como uma separação mal sucedida, perdendo a espécie original, ou ainda, a dependência dos compostos de Sn que expuseram os humanos.

A diferença em relação à afinidade do Sn (II) e Sn (IV) pelos rins e fígado é indicada pela estabilidade da valência do Sn. Os resultados sugerem que estes dois estados de oxidação não são facilmente mutáveis *in vivo*, como ocorre frente ao ar e umidade. Pode-se concluir que os cátions deste metal não são rapidamente oxidados ou reduzidos durante a sua absorção e distribuição sistêmica em mamíferos<sup>6</sup>.

Já para os compostos orgânicos, uma pesquisa realizada *in vitro* observou que os microsossomos hepáticos realizam a desalquilação do TBT para a forma metabólica de di e monbutilestanho. Entretanto, a debutilação do DBT para o MBT pela monoxigenase microsossomal é consideravelmente mais baixa do que aquela do TBT para o DBT. O metabolismo do TBT ocorre rapidamente, e seus metabólitos são detectados no sangue 3 horas após ser ingeridos<sup>5, 22</sup>.

O estudo com golfinhos pode explicar, *in vivo*, a metabolização dos compostos butilados de Sn. O fígado foi o órgão alvo do TBT, assim como do DBT, devido à rápida metabolização do primeiro para o segundo, quando comparada a do DBT para MBT, pela enzima citocromo P450 presente neste órgão. Existem duas hipóteses para explicar a predominância do DBT no fígado em relação aos outros compostos butilados. A primeira possibilidade é a fácil excreção do MBT devido a sua alta polaridade frente aos compostos di e tributilados, enquanto que a debutilação restrita de DBT para MBT em comparação a do TBT para DBT pela monooxigenase microsossomal é a uma alternativa. A alta concentração de MBT em outros órgãos e tecidos pode ser dar pela rápida metabolização do DBT para MBT nesses locais<sup>23</sup>.

Análises *in vivo* de complexos peptídicos com trietil (TET) e tripropilestanho também apresentam uma progressiva desalquilação para dietil e dipropilestanho, respectivamente. Isso pode indicar que os peptídeos complexados ao Sn são capazes de desalquilar compostos trissubstituíveis. Essa desalquilação ocorre quando o Sn se liga ao enxofre, presente nos grupamentos tióis dos peptídeos, fazendo com que haja perda de um radical alquila<sup>24</sup>.

#### **4.3.4- Eliminação**

O iSn absorvido é excretado principalmente pela urina, porém apresenta baixa excreção pela bile (< 15%). A excreção diária do iSn pela fezes representa principalmente o metal não absorvido pelo sistema gastrointestinal<sup>7</sup>.

O organismo elimina o Sn inorgânico absorvido rapidamente, em dias ou semanas. Parte deste Sn, entretanto, pode ficar retido nos ossos por 2 ou 3 meses.

Estudos realizados para calcular o tempo de meia vida deste metal no organismo observaram que 20% de Sn absorvido foram excretados com um tempo de meia-vida de 4 dias, outros 20% em 25 dias, e os 60% restantes, em 400 dias<sup>6</sup>.

Para os compostos orgânicos, existem poucos estudos sobre a excreção realizados em humanos e em animais após exposição por inalação, ingestão e dérmica<sup>1</sup>. A excreção dos compostos orgânicos de Sn depende da sua estrutura química, solubilidade e modo de administração<sup>22</sup>.

A rota de excreção do TBT absorvido ocorre principalmente pela urina e bile. Porém, aproximadamente de 90 a 96% do TBT ingerido são excretados pelas fezes<sup>22</sup>. Estudos em camundongos mostraram que a quantidade de Sn excretado na urina, após uma dose oral de diferentes espécies de butilestanho, tri-, di- e mono-, aumenta de acordo com o número de grupos butílicos. A excreção urinária de Sn, após cinco dias da administração oral, foi de 5% para TBT, 3% para DBT e 0,3% MBT<sup>5</sup>.

#### **4.4- Toxicodinâmica**

##### **4.4.1- Formação dos compostos de estanho em meio biológico**

A maioria dos compostos orgânicos de Sn é considerada bastante tóxica, mesmo em baixas concentrações. No entanto, a toxicidade é dependente da estrutura desses compostos, em que a atividade biológica é determinada pelo número e natureza dos grupamentos orgânicos ligados ao átomo central de Sn. No entanto, nesses compostos, parece que a natureza dos grupos aniônicos, geralmente representados por  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{F}^-$ ,  $\text{O}_2^-$ ,  $\text{OH}^-$ ,  $\text{COO}^-$  ou  $\text{S}^-$ , tem apenas importância secundária na atividade biológica<sup>25</sup>.

A solução para os problemas toxicológicos causados por essas espécies no organismo necessita de um profundo conhecimento dos mecanismos de ação, processos que envolvem importantes ligantes biológicos como aminoácidos e proteínas. Porém, o conhecimento específico ou seletivo das ligações ocorridas entre metal-proteína, os sítios doadores nas estruturas biológicas e até mesmo das moléculas funcionais são escassos<sup>18</sup>.

O mecanismo sugerido para a interação proteína-estanho é a formação da ligação covalente entre o átomo de Sn (IV) e os grupamentos tióis presentes nas proteínas<sup>24</sup>. A ligação das moléculas de TET em mitocôndrias de fígado de rato é atribuída a dois sítios, à histidina, de alta afinidade, e ao grupo tiol, de baixa afinidade. Os grupamentos

mais importantes de proteínas a que os compostos trialkilestanho ou dimetilestanho (IV) se ligam são hemoglobinas e sistema ATP-ase<sup>18</sup>.

A ligação covalente Sn-C pode ser clivada por uma série de fatores ambientais, incluindo ataques químicos, nucleofílico ou eletrofílico, radiação de ultravioleta (UV), alteração do pH e desalquilação por organismos procariontes e eucariontes, podendo gerar novas espécies. Nos mamíferos, em órgãos como o cérebro, fígado e rins, os compostos orgânicos são sistematicamente degradados a compostos inorgânicos de Sn, a desalquilação ocorre inversamente proporcional ao comprimento e a estabilidade da molécula alquila. Isto mostra que a degradação *in vivo* pode fornecer uma explicação sobre o atraso na resposta tóxica dos compostos orgânicos<sup>24</sup>.

Os compostos orgânicos de Sn podem interagir com a atividade da membrana devido a sua lipossolubilidade, tornando a membrana celular, um sítio inicial de sua ação. Alguns estudos mostram que a mitocôndria tem sido alvo dos triorganoestanhos, interferindo na produção de energia mitocondrial, inclusive na interrupção da fosforilação oxidativa, mudanças na permeabilidade exterior da membrana mitocondrial e supressão da atividade enzimática. Além disso, os compostos triorganoestanhos aumentam o fluxo de saída de cálcio da célula, contribuindo para o aumento da toxicidade<sup>7</sup>.

Billingsley e seus colaboradores identificaram uma proteína na membrana mitocondrial chamada “stannin” que, segundo o artigo, vem de *stannum* (Sn em latim) e sensibiliza as células neuronais por intoxicação do TMT. Essa proteína está fortemente representada na região do hipocampo e apresenta dois sítios com cisteína, que, por ser constituída de um grupamento tiol na sua cadeia lateral, pode contribuir para a ligação do TMT<sup>24</sup>.

Outro aminoácido abundante em proteínas do plasma é a glicina, onde são vistos complexos de aminoácidos e íons de Sn (II). Os íons desse metal podem bloquear o grupo terminal da glicina inibindo a transformação da ação enzimática. As proteínas podem se vincular aos íons de Sn (II) através de distintos sítios de ligação, constituídos por diferentes grupos funcionais<sup>26</sup>.

Tais estudos, porém, sobre a ligação de compostos orgânicos de Sn e macromoléculas biológicas são ainda muito raros na literatura e poucos para uma descrição quantitativa. As pesquisas sobre esses compostos, e importantes ligantes biológicos, têm conquistado importância devido ao seu potencial de aplicação

farmacêutica, como a atividade anticâncer fornecida pelos derivados de dialquilestanho<sup>18</sup>.

#### **4.4.2- Efeitos causados pelos compostos de estanho**

Muitas das informações sobre os efeitos dos compostos de Sn na saúde humana vêm de estudos em indivíduos expostos no trabalho, voluntários expostos a quantidades controladas, e exposições acidental ou intencional. Além disso, numerosos estudos sobre efeitos têm sido realizados com uma variedade de animais, principalmente roedores. Apesar dos estudos com animais apresentarem uma ampla variedade de consequências, não é conhecido se a exposição de humanos a esses compostos encontrados no meio ambiente causará efeitos similares<sup>5</sup>.

A maioria dos estudos encontrados para os compostos inorgânicos utilizou animais de laboratório, uma vez que raras são as pesquisas realizadas em humanos com tempo médio de exposição. Assim, um dos efeitos de maior destaque após a administração de cloreto de Sn (II) foi o retardo no crescimento, avaliado através do decréscimo significativo do peso do fêmur e seu conteúdo de cálcio. Foram observadas também irritações do TGI, diminuição da eficiência alimentar, anemia leve e pequenas alterações nos tecidos hepáticos<sup>6</sup>.

Os efeitos metabólicos associados com a ingestão diária de 1 a 200 mg Sn, devido à exposição aos alimentos contidos em embalagens que apresentam este metal, têm recebido pouca atenção. Em estudos com animais de laboratório, a ingestão de 500 – 5000  $\mu\text{g Sn g}^{-1}$ , em uma dieta tem sido associada com a acumulação deste metal em tecidos como ossos, fígados e rins; com distúrbios no metabolismo dos minerais essenciais tais como ferro, cobre, zinco, cálcio e selênio, além da redução no crescimento desses animais<sup>21</sup>. Portanto, se a farmacocinética desses metais essenciais é alterada, é difícil de compreender se um determinado efeito é causado pela exposição ao Sn ou é devido às flutuações dos níveis dos outros metais nos tecidos<sup>5</sup>.

Suplemento diário de ferro é fator de proteção contra a anemia induzida pelo Sn, enquanto que uma diminuição do ferro na dieta exacerba o efeito. Contudo, o retardo no crescimento causado pelo metal não foi atenuado pelo enriquecimento da dieta com ferro ou cobre<sup>6</sup>.

Ratos de laboratório, quando alimentados com  $206 \mu\text{g Sn g}^{-1}$  por três semanas, apresentaram teores significativamente menores de cobre e zinco em seus rins e de zinco em suas tíbias, porém, maiores níveis de ferro em seus fígados, quando comparados a animais alimentados com  $1 \mu\text{g Sn g}^{-1}$  na dieta. Quando os animais foram expostos oralmente ao Sn, houve uma elevação no teor de cálcio contido na bile, enquanto que os níveis deste metal essencial no soro e fêmur diminuíram. Entretanto, humanos aparentemente absorvem menos zinco e selênio, quando 50 mg de iSn são adicionados às suas dietas<sup>21</sup>.

Não existem estudos que avaliem se as concentrações de compostos de Sn alteram a imunocompetência humana. Contudo, a exposição aguda em ratos expostos a altas concentrações de TBT e outros compostos orgânicos deste metal,  $> 2 \text{ mg/kg/dia}$ , tem causado alterações imunes. O efeito é caracterizado por redução de peso e tamanho do timus e depleção linfócica<sup>5</sup>.

Assim, sais de TBT e trifênil (TPhT) podem ser considerados imunotóxicos, enquanto o TET e trimetilestano (TMT) exibem uma atividade neurotóxica. Esses últimos compostos apresentam um comportamento diferenciado, induzindo danos seletivos em regiões distintas do sistema nervoso central (SNC). O TMT induz toxicidade localizada dentro do hipocampo e no neocórtex, enquanto TET afeta regiões da medula espinhal<sup>24</sup>.

Nos compostos alquilados, os homólogos menores, metil e etil, são mais tóxicos quando administrados oralmente, e a toxicidade vai diminuindo de acordo com o aumento do tamanho da cadeia como o octil, que não apresenta ação tóxica<sup>25</sup>. Entre os compostos metilados, o TMT é o mais tóxico, tendo sido demonstrado efeito neurotóxico em humanos nos casos de exposição acidental, resultando no aparecimento de mudanças comportamentais como agressividade, além de fraqueza, depressão, desorientação, perda de memória severa, doenças repentinas e, em alguns casos, a morte. Se a metilação do dimetil para o trimetilestano ocorre de forma significativa no homem, o efeito neurotóxico severo do dimetilestano em pacientes pode ser explicado<sup>27, 24</sup>.

Compostos trialkilestano, como o TET, podem causar encefalopatia e edema cerebral. Uma pesquisa com trabalhadores expostos ao TMT e TET apontou para o desenvolvimento de distúrbios físico-motores, tremores, convulsões e alucinações<sup>22</sup>.

Os compostos de Sn orgânico podem causar irritação severa e queimação na pele, dependendo do grau de exposição. Esses compostos são conhecidos por serem

irritantes da pele e olhos. A toxicidade sistêmica, também produzida após inalação ou ingestão, pode levar a anemia, danos renais e hepatocelulares, além de nefropatia e desordem no SNC. A produção de catecolaminas pode ser estimulada, levando a hiperglicemia, mudanças na pressão sanguínea e danos ao sistema imune<sup>5, 7</sup>.

Pessoas cronicamente expostas ao Sn inorgânico, como SnO<sub>2</sub> em poeiras e fumos, podem desenvolver uma forma benigna de pneumoconiose, conhecida como estanhose, que envolve principalmente a parte inferior do sistema respiratório<sup>5</sup>.

Presume-se que sejam capazes de reagir com membranas celulares, levando a alterações tais como aceleração dos processos de troca iônica e oxidação de lipídeos, inibição da fosforilação oxidativa e fotoquímica, além de inibir a síntese do heme oxigenase e causar efeito genotóxico<sup>22, 25</sup>.

Os compostos de Sn contendo grupamentos alquila e aromático são potentes neurotoxinas. Por exemplo, a exposição ao trifenilestanho pode causar espasmos musculares das mãos, contração nervosa facial e até choro involuntário. Além disso, anormalidades no SNC, neuropatia periférica, hepatite e leucopenia têm sido monitoradas entre 6 e 9 dias após a exposição a este composto<sup>22</sup>.

Os compostos trialquilestanhos ligados com a membrana das mitocôndrias induzem à rápida alcalinização na matriz energética dessas organelas, induzindo a interrupção da fosforilação oxidativa e o desacoplamento da transdução de energia mitocondrial. O ponto crucial desse mecanismo é a entrada dos compostos TAT na mitocôndria como cátions lipofílicos (alquil)<sub>3</sub>Sn<sup>+</sup>. Isto confirma a hipótese que os compostos de TAT não são somente trocadores iônicos, Cl<sup>-</sup> / OH<sup>-</sup>, da membrana biológica como também carreadores de prótons na membrana, sugerindo que o alvo preferencial desses compostos são as células nervosas<sup>28, 29</sup>.

Um estudo, com cultura de células, mostrou que linfócitos humanos, expostos ao dimetil, trimetil, butil e fenilestanho, são induzidos a aneuploidia. A genotoxicidade do tri-*n*-butilestanho e trifenilestanho em células de mamíferos também foram relatadas. O dietilestanho é conhecido por interagir com as membranas celulares de eritrócitos humanos<sup>30</sup>.



## 5- Plasma e sua importância para o monitoramento biológico

O sangue é constituído pelo plasma e por células sanguíneas. O plasma é um líquido amarelado formado por 90% de água, onde estão dissolvidos os componentes mais abundantes, as proteínas (6%). Apresenta também carboidratos, lipídeos, hormônios, íons como sódio, cloreto, fosfato, potássio, magnésio, cálcio, que são os menores constituintes do plasma e ainda produtos da atividade celular. Os constituintes do plasma têm a função de se ligar e transportar os elementos para os órgãos alvos, como os ossos<sup>31</sup>. As principais proteínas presentes são a albumina, com 57 – 71% e a imunoglobulina, com 8 – 26%<sup>32</sup>.

A fração plasmática do sangue é um dos principais informativos do ponto de vista clínico. O plasma é considerado uma valiosa janela para a avaliação do estado normal e fisiopatológico<sup>33</sup>.

Na separação do plasma, o sangue é coletado em um tubo à vácuo, contendo heparina, substância anticoagulante. Posteriormente, é centrifugado, as células se depositam e o sobrenadante corresponde ao **plasma**. Para se obter **soro**, a coleta é realizada em tubo sem anticoagulante. Em seguida, deixa-se coagular o sangue (no frio, para não haver degradação dos elementos a analisar), ficando o soro sobre o coágulo. Portanto, o soro é o plasma sem os fatores de coagulação, como a fibrina<sup>31</sup>.

## 6- Exposição Ocupacional e Ambiental

O aumento do uso dos compostos de Sn (IV) na indústria, agricultura e aplicações biológicas durante os últimos 50 anos leva ao acúmulo deste metal no meio ambiente e em sistemas biológicos. Desta forma, sua interação com organismos vivos aumentará nos próximos anos gerando um aumento nos problemas toxicológicos relacionados ao metal<sup>18</sup>.

Elevados teores de metais podem ser encontrados na cadeia trófica e no homem, nas regiões de garimpo, devido à dispersão desses elementos nos solos, cursos d'água e alimentos produzidos nestas áreas, podendo colocar em risco toda população localizada no entorno de locais com atividades relacionadas a minérios<sup>34</sup>.

No caso dos trabalhadores que realizam o beneficiamento do minério, a exposição ao Sn ocorre através da inalação de poeiras e fumos ou por deposição dos compostos de Sn sobre a pele. Para estes trabalhadores e para a população que vive nos arredores das indústrias, onde a concentração de Sn é elevada, a contaminação poder ocorrer através da inalação da poeira do minério ou fumos metálicos, contato com os minerais ou ingestão de água e alimentos contaminados pelo metal<sup>5</sup>. E ainda, a produção de Sn pode expor o trabalhador à sílica, chumbo e arsênico, durante a mineração do sulfeto de estanho, gerando pneumoconioses. Do mesmo modo, a preparação e utilização de Sn nas ligas e soldas representam uma exposição a estes metais<sup>9</sup>.

Sais de trimetilestanho ainda são encontrados na urina de indivíduos não expostos mesmo de áreas não contaminadas. Este composto não tem sido utilizado comercialmente nos últimos anos devido a sua alta toxicidade, o que reforça a preocupação com a contaminação ambiental<sup>24</sup>.

Um estudo de coorte investigou o risco de exposição à sílica em trabalhadores de minas de Sn na China, o maior produtor do metal, e observou a relação do desenvolvimento da silicose com a exposição à poeira acumulada. Foi observado que 33,7% dos trabalhadores apresentavam silicose. Desses, 67,4%, desenvolveram a doença após exposição ocupacional média de 3,7 anos<sup>35</sup>.

Uma exposição crônica pode levar a estanhose, que ocorre devido à respiração de poeiras e fumos com Sn. Partículas do metal que se depositam nas vias aéreas inferiores são fagocitadas por macrófagos alveolares. Esses, carregados com material cristalino, agregam-se ao redor de bronquíolos, vasos, septos interlobulares e paredes

alveolares, sem fibrose significativa. A estanhose não apresenta sintomas e a função pulmonar continua normal. O quadro radiológico é muito importante para o diagnóstico, associado à pobreza de sintomas<sup>36</sup>.

A absorção dérmica e inalatória são importantes rotas de exposição ocupacional para certos compostos organoestânicos, como o lactato de trifenilestanho, usados em fungicidas e inseticidas, e podem ocorrer durante a manipulação e aplicação dos produtos<sup>5</sup>.

Julião e colaboradores realizaram um estudo com trabalhadores de uma mina de nióbio na Floresta Amazônica, onde são obtidos concentrados de nióbio e tântalo, cassiterita e zirconita, através de separação eletromagnética e por hidrogravimetria. A concentração de Sn foi determinada na urina de três grupos de trabalhadores. No primeiro, a urina foi coletada antes da jornada de trabalho, enquanto que o segundo grupo fez a coleta no final do dia trabalhado. Pessoas não expostas ocupacionalmente constituíram o grupo controle. Os teores médios de Sn encontrados nas urinas coletadas antes e após a jornada de trabalho foram de  $0,13 \pm 0,2$  e  $0,5 \pm 0,9 \mu\text{g L}^{-1}$ , respectivamente. Por outro lado, o grupo não exposto apresentou concentração média de apenas  $0,1 \pm 0,1 \mu\text{g L}^{-1}$ . Os resultados apresentados mostram que a concentração média de Sn na urina do grupo exposto é estatisticamente maior do que a encontrada no grupo controle, indicando uma exposição ocupacional<sup>37</sup>.

A Occupational Safety and Health Administration (OSHA), dos Estados Unidos, e o National Institute for Occupational Safety and Health (NIOSH) estabeleceram um limite de  $0,1 \text{ mg m}^{-3}$  (Threshold Limit Value - Time-Weighted Average, TLV-TWA) para compostos orgânicos de Sn no ar do ambiente de trabalho. Porém, este nível de exposição deve ser de, no máximo, trinta minutos em um dia com 8 h de trabalho. Fixaram ainda, para os compostos inorgânico de Sn, um valor de  $2 \text{ mg m}^{-3}$ , exceto para  $\text{SnO}_2$ . Segundo o NIOSH, o tempo médio ponderado para a exposição ao metal inorgânico é de dez horas<sup>22</sup>.

Em um estudo sobre exposição ocupacional, as análises das amostras de poeiras coletadas durante a fundição de Sn indicaram a presença de Sn metálico superior a 33% em partículas com diâmetro menor do que  $5 \mu\text{m}$ , porém não mostraram indícios de sílica. As concentrações encontradas em alguns ambientes de trabalho foram  $2,22 \text{ mg m}^{-3}$  no galpão,  $1,10 \text{ mg m}^{-3}$  nos filtros de ar,  $1,55 \text{ mg m}^{-3}$  na fundição e  $0,82 \text{ mg m}^{-3}$  na refinação. Entretanto, os métodos de análises não foram descritos neste trabalho<sup>9</sup>.

## 7- Garimpo como um problema de saúde pública

As mudanças nos ecossistemas podem ocorrer em escala de magnitude tal que produzam um efeito catastrófico sobre os processos econômicos, sociais e políticos, dos quais a estabilidade social, o bem-estar humano e a boa saúde são dependentes<sup>5</sup>.

A degradação em curso decorrente da interferência humana nos sistemas hídricos amazônicos, como é o caso da mineração de cassiterita, deixa a área desmatada, e preenchida com rejeitos do metal. Assim, é uma barreira significativa para o alcance de bons indicadores de qualidade de vida<sup>38</sup>. A principal perda observada no solo é de sua fertilidade, onde a matéria orgânica, a fauna e os nutrientes se concentram, sendo desfavorável para o crescimento da vegetação. A recuperação de áreas degradadas por homens visa acelerar o processo sucessório e, se possível, melhorar tais áreas em conformidade com a sua utilização futura<sup>39</sup>.

É necessário controlar a crescente exposição dos trabalhadores e das comunidades ao redor da mineração, às substâncias tóxicas produzidas, com as quais os mineradores têm contato diário. A falta de medidas para a minimização de resíduos perigosos e a inexperiência em seu manejo, assim como, o destino inadequado, permitiram a exposição de muitas populações a estas substâncias. As conseqüências sobre a saúde destas populações são devidas à falta de profissionais especializados tais como epidemiologistas e toxicologistas ambientais e clínicos<sup>11</sup>.

O modo de trabalho dos garimpeiros pode justificar sua contaminação pelo metal, visto que o minério é produzido através de uma longa cadeia de processos, que acarretam em poluição e geração de resíduos, para os quais não foi observada nenhuma forma de controle ou armazenamento.

Apesar da situação de informalidade, os garimpeiros utilizam pesados equipamentos nas suas atividades; os garimpos se tornaram complexos sistemas informais de lavra mecanizada, utilizando equipamentos como dragas, tratores e até completas estações de tratamento de minérios.

Os garimpeiros que fazem o trabalho manualmente são chamados de requeiro ou reco. Trabalham com as sobras da escavadeira, nos veios dos barrancos e no lodo descartado dos separadores, para depois realizar o beneficiamento do minério, que tem como objetivo separar a cassiterita da matriz que a envolve. Desta forma, é reduzido a metal cru em altas temperaturas num fundidor, sendo posteriormente purificado numa refinaria por intermédio de refundição<sup>40, 41</sup>.

É necessário observar a qualidade de vida dos mineradores da Bacia Hidrográfica do Rio Jamari, com vistas a entender e minimizar a vulnerabilidade desses trabalhadores aos problemas relacionados à mineração de cassiterita. As condições de vida e trabalho dos garimpeiros permanecem bastante adversas, caracterizadas pela falta de infraestrutura, principalmente de saúde e educação. A saúde dos mineradores é pouco explorada, os centros de pesquisas ficam distantes e com pouco acesso, dificultando a promoção à saúde deste setor trabalhista<sup>15</sup>.

A saúde pública no Brasil dispõe das Normas Regulamentadoras, NRs, que têm como objetivo regulamentar e fornecer orientações sobre os procedimentos obrigatórios relacionados à medicina e segurança no trabalho no Brasil. A NR-22, que dispõe da Segurança e Saúde Ocupacional na Mineração, tem por objetivo disciplinar os preceitos a serem observados na organização e no ambiente de trabalho, de forma a tornar compatível o planejamento e o desenvolvimento da atividade mineradora com a busca permanente da segurança e saúde dos trabalhadores. Esta norma se aplica tanto a minerações subterrâneas, como as de céu aberto, garimpos e beneficiamentos minerais<sup>42</sup>.

A NR-22 apresenta critérios a serem impostos às empresas, tais como interromper todo e qualquer tipo de atividade que exponha os trabalhadores a condições de risco grave e iminente para sua saúde e segurança; fornecer às empresas contratadas as informações sobre os riscos potenciais nas áreas em que desenvolverão suas atividades, além de coordenar a implementação das medidas relativas à segurança e saúde dos trabalhadores; elaborar e implementar o Programa de Controle Médico e Saúde Ocupacional e o Programa de Gerenciamento de Riscos, incluindo riscos físicos, químicos e biológicos, além dos limites de exposição ocupacional, equipamentos de proteção individual, entre outros tipos de riscos incluídos nas NRs<sup>42</sup>.

Observando-se a NR 22, nota-se que diversas melhorias podem ser feitas nos garimpos da região. Entretanto, a realidade de muitas empresas é outra, podendo ser encontrados alguns problemas, como o uso de maneira inadequada dos equipamentos de proteção individual e a falta de tratamento dos rejeitos gerados pela mineração, os quais são critérios essenciais no Programa de Gerenciamento de Riscos.

Além das normas regulamentadoras que auxiliam na segurança do trabalho, existe a Comissão Interna de Prevenção de Acidentes, CIPA, que tem por objetivo a prevenção de acidentes e doenças decorrentes do trabalho, de modo a tornar compatível

permanentemente o trabalho com a preservação da vida e a promoção da saúde do trabalhador<sup>100</sup>. O conhecimento dos níveis de ocorrência de acidentes de trabalho é fator indispensável para a adoção de uma política trabalhista e empresarial que preserve o bem-estar do trabalhador e evite custos e prejuízos aos empresários. Porém, esses mecanismos técnicos, legais, sociais e jurídicos ainda não foram suficientes para reduzir de forma significativa os níveis de acidentes de trabalho e de doenças profissionais no Brasil. Os acidentes mais freqüentes ocorrem na construção civil, na indústria metalúrgica, na fabricação de móveis, no garimpo e nas atividades agrícolas<sup>43</sup>.

Ainda existem leis que antecedem a atividade garimpeira, como a Lei nº 11.685, que instituiu o Estatuto do Garimpeiro, destinado a disciplinar os direitos e deveres assegurados aos garimpeiros. E a Lei nº 3.295, que autoriza o Governo Federal a criar uma instituição denominada Fundação de Assistência aos Garimpeiros, cujo objetivo é a prestação de serviços sociais nas regiões garimpeiras, visando a melhoria das condições de vida das suas populações, notadamente no que diz respeito à saúde, educação e assistência sanitária, à habitação, alimentação e vestuário; ao incentivo à atividade extrativa-produtora e a quaisquer empreendimentos que visem ao amparo, assistência e valorização do garimpeiro; e à vinculação do garimpeiro ao regime de Previdência social<sup>44</sup>.

## 8- Especiação e análise de especiação

A “International Union for Pure and Applied Chemistry” (IUPAC) estabeleceu recomendações sobre o uso da terminologia comum em química, para facilitar a comunicação entre cientistas de diferentes campos e evitar interpretação errônea devido à terminologia ambígua. Assim, a IUPAC definiu a *especiação* como sendo a ocorrência de um elemento em diferentes formas em um sistema, como por exemplo, quais as formas orgânicas e inorgânicas presentes e a ligação destes com outras substâncias no organismo, como proteínas. E foi recomendado o uso do termo *análise de especiação* quando se referir à atividade analítica de identificar e determinar as diferentes espécies químicas em uma amostra e a determinação dos constituintes que se ligam ou que transportam o analito de interesse<sup>45</sup>.

A especiação é aplicada no campo ecológico, especialmente em solos, água e materiais particulados, além de haver um grande interesse na medicina e biologia sobre a acumulação e toxicidade de metais no organismo, principalmente para trabalhadores expostos ocupacionalmente<sup>10</sup>.

O conhecimento do conteúdo total do elemento no organismo é importante no monitoramento ocupacional. Todavia, é insuficiente para a compreensão do metabolismo, dos mecanismos de toxicidade, avaliação de risco de consumo, entendimento do modo de entrada e distribuição do elemento na célula, interações dos diferentes metais com biomoléculas e a deposição nos tecidos, além de ajudar a desenvolver estratégias de descontaminação e de detoxificação. Devido a essas informações, a utilização da detecção das formas molecular e estrutural tem ganhado popularidade ao longo das últimas décadas<sup>1, 46, 47</sup>.

A análise dos metais ligados aos compostos orgânicos tem se tornado cada vez mais importante nas últimas décadas, pois as formas orgânicas de alguns metais podem ser muito mais tóxicas do que sua forma inorgânica<sup>48</sup>.

A partição dos compostos organoestanho entre os compartimentos, bem como a sua toxicidade, bioatividade e biodisponibilidade, depende criticamente das propriedades físico-química em que as espécies estão realmente presentes. Esta é a razão pelo qual o conhecimento das concentrações relativas de todas as espécies químicas, presentes em um determinado meio, é muito mais relevante para avaliação da exposição do que as determinações do Sn total<sup>1, 49</sup>.

As espécies podem ser divididas em exógenas, tais como contaminantes ambientais e produtos de sua degradação, e endógenas como metabólitos naturais ou metais complexados com bioligantes. Do ponto de vista químico, as espécies podem ser categorizadas pelo seu estado redox, espécies organometálicas, quando ligadas ao átomo de carbono, e complexadas, quando ligadas a polipeptídeos, proteínas, fragmentos de DNA ou outros compostos macromoleculares<sup>50</sup>.

Devido às atividades microbiológicas e as condições de redução frequentemente presentes em matrizes ambientais, esses metais podem ser metilados. Em caso de permetilação, os metais tornam-se voláteis e entram na atmosfera. As mudanças na metilação alteram a mobilidade dos elementos<sup>48</sup>.

A análise das espécies deveria permitir a determinação das diferentes espécies do elemento em uma amostra, porém este objetivo não é facilmente alcançado. Durante a análise, diversas tarefas podem induzir a resultados errados no final do todo processo, tais como a coleta, armazenamento e preparação das amostras, separação das espécies e detecção do analito, que assim contribuem para que as espécies encontradas não sejam realmente aquelas de interesse<sup>10, 1</sup>.

Alguns motivos podem ser citados como causa da instabilidade das espécies, como reações químicas entre as próprias espécies, interação com o material de armazenamento, atividade microbiana, temperatura, pH, ação da luz e outros fatores, como a complexidade da matriz, especificidade insuficiente da separação dos biocompostos, contaminações fortuitas com o elemento de interesse e a quebra da ligação original metal-proteína<sup>1, 51</sup>.

A necessidade de abordagens sofisticadas envolvendo várias etapas analíticas também faz com que aumentem os erros dos resultados. Porém, existe uma forte tendência para reduzir o número de passos, graças à combinação de alguns deles. A preparação das amostras é de longe, a mais importante na fonte de erros nos métodos analíticos modernos<sup>22, 49</sup>.

A etapa de coleta da amostra é a mais crítica da análise de especiação, visto que pode ocorrer interferência no equilíbrio das espécies, causando erros irreversíveis. O processo de amostragem deve preservar a informação original sobre as espécies nativas e o equilíbrio entre elas. Entretanto, nem sempre isso acontece. Por exemplo, a contaminação do sangue pelo analito de interesse pode ocorrer através do material de coleta, assim como a perda da espécie original devido à pressão do tubo. Outros



problemas ainda podem vir a ocorrer, quando as espécies são adsorvidas nas paredes dos frascos coletores, e ainda há oxidação causada pelo oxigênio<sup>10</sup>.

Apenas a preparação de amostra é responsável por 60% do tempo gasto na execução de análise e até 50% do eventual erro de medição. Esses percentuais podem ser considerados ainda mais elevados na análise de especiação, onde as matrizes são complexas, apresentando uma baixa concentração das espécies e uma distribuição heterogênea<sup>52</sup>.

Durante o armazenamento das amostras, cuidados devem ser tomados para evitar as contaminações fortuitas, que podem surgir devido à descontaminação inadequada dos frascos utilizados, ou ainda, às propriedades de troca-iônica do material de que são fabricadas as paredes dos recipientes. Uma amostra estocada por um longo período terá mais chances de ser contaminada pelas paredes do frasco. Além dessas precauções, deve-se observar a temperatura conveniente para cada armazenamento, pois espécies voláteis podem ser perdidas<sup>10</sup>.

A perturbação do equilíbrio físico-químico existente faz com que, no final, as espécies determinadas pelas medições podem não representar completamente aquelas originalmente existentes nas amostras. Outros desafios são as concentrações excessivamente baixas que, após o fracionamento das diferentes formas do metal, necessitarão de detectores extremamente sensíveis e seletivos<sup>1</sup>.

O controle de qualidade é fundamental nas análises de especiação, uma vez que mostra a existência de erros, contribuindo assim para a sua identificação e remoção. É importante ter em mente, que as principais fontes de erros, normalmente ocorrem durante a amostragem, armazenamento, tratamento e a manipulação da amostra, tarefas difíceis na análise de especiação, que requer muita cautela<sup>51</sup>.

## 9- Metodologias envolvidas na análise de especiação de fluidos biológicos

Os exemplos de toxicidade mostrados no decorrer do trabalho mostram a necessidade crescente de conhecimentos sobre a análise de especiação e o desenvolvimento de metodologias analíticas. Um grande número de técnicas e métodos analíticos tem sido usado para determinar compostos inorgânico e orgânico de Sn<sup>22</sup>. A preocupação sobre o potencial de toxicidade do TBT e seus produtos de degradação, DBT e MBT, gera o aumento do interesse no desenvolvimento de métodos analíticos mais sensíveis e precisos para a sua determinação<sup>53</sup>.

As frações sanguíneas, eritrócitos e plasma, contêm uma grande variedade de substâncias que variam de massa molecular elevada à pequenos íons metálicos. Daí, há necessidade de eficiência nos métodos de separação. Por exemplo, nos eritrócitos, que representam 94% do montante total de proteínas no sangue, com essa alta concentração protéica é difícil a identificação de alguns compostos. A separação das proteínas de acordo com o tamanho é útil, pois é aproximadamente diretamente proporcional à massa das partículas<sup>54</sup>.

O processo analítico compreende uma série de etapas sucessivas, começando com a concepção de uma estratégia adequada para um dado analito em uma determinada matriz, e terminando com a interpretação dos dados obtidos através do instrumento escolhido. Um método ideal permite realizar amostragem, preparação das amostras, separação e quantificação, incluindo tratamento de dados estatísticos em um único processo, e sem intervenção de um operador<sup>52</sup>.

A moderna análise de especiação geralmente conta com a extração, separação e detecção, onde técnicas como a cromatografia líquida de alta e baixa pressão (High Pressure Liquid Chromatography – HPLC, Low Pressure Liquid Chromatography - LPLC), cromatografia gasosa (CG) e eletroforese realizam a separação das espécies, e espectrometrias como ICP MS (Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry) e AAS (Atomic Absorption Spectrometry) detectam e quantificam o analito em questão.

Ainda existem os métodos diretos, que incluem *ressonância magnética nuclear* (RMN) e *voltametria*. Porém, a faixa de concentração detectável pelo RMN é demasiada elevada para as amostras reais, de relevância ecológica e biológica. E com a voltametria, a quantificação é impossível em amostras com alta carga orgânica<sup>10</sup>.

A escolha da técnica depende do objetivo da pesquisa, da acuracidade e sensibilidade, principalmente quando a concentração da espécie do analito é muito pequena ou apresenta um baixo limite de detecção<sup>1</sup>.

A *cromatografia gasosa* apresenta um elevado poder de resolução quando comparado a uma cromatografia líquida, e é relativamente fácil seu acoplamento a detectores sensíveis e seletivos. Por exemplo, um cromatógrafo gasoso hifenado a um espectrômetro de emissão ótica (GC - OES) foi recentemente proposto para a análise de especiação dos compostos orgânicos de Sn, em amostras ambientais, mostrando boa seletividade e sensibilidade. Porém, já para a técnica de absorção atômica, em teoria, qualquer tipo de atomizador pode ser acoplado a um cromatógrafo a gás, contudo, na prática, várias condições precisam ser atendidas, a fim de obter boa sensibilidade e seletividade para problemas específicos de análise<sup>49</sup>.

Entretanto, para realizar a separação por CG, as espécies organometálicas devem ser suficientemente voláteis, caso isso não seja possível, ocorre um processo de derivatização da amostra, deixando o analito mais volátil. Esse processo pode causar a decomposição da espécie, perdendo assim a espécie original<sup>55</sup>. Outra desvantagem dessa técnica em relação à análise da ligação metal-proteína é o perigo de ocorrer o bloqueio, por água ou outros compostos da matriz, do microcapilar utilizado por essa técnica<sup>48</sup>.

Uma das vantagens da *cromatografia líquida* (CL) é a extensa flexibilidade dos mecanismos de separação com o uso de diferentes fases móveis e estacionárias, podendo assim prevenir alguns erros ou solucioná-los<sup>56</sup>. Diferentes técnicas de CL são utilizadas para a análise de especiação tais como troca-iônica, fase-reversa e exclusão de tamanho. A seguir, as vantagens e desvantagens de cada uma frente a esse objetivo.

A *cromatografia de troca-iônica* apresenta uma eficiente separação e ampla aplicabilidade, fornecendo soluções para muitos problemas ocorridos em análises de especiação. O tamanho dos poros da resina da fase estacionária é um parâmetro importante para o sucesso da resolução. Seu mecanismo de separação ocorre de acordo com a carga positiva ou negativa apresentada pela molécula. Contudo, muitas vezes os íons metálicos ligados vagamente são perdidos ou substituídos por outros metais provenientes do tampão utilizado para a corrida<sup>10</sup>.

Como foi o caso da pesquisa desenvolvida por Alfredo Sanz-Medel e sua equipe, ao realizar a especiação química do alumínio no soro humano. A resolução apresentada pela coluna de exclusão de tamanho levou os pesquisadores a procurar técnicas cromatográficas alternativas, que oferecessem melhor resolução na separação das

proteínas do soro. Entretanto, ao utilizarem a cromatografia de troca-iônica, foi observado o risco de deslocamento do alumínio da proteína, pois os íons metálicos das fases, móvel ou estacionária, utilizadas podiam competir com o metal de interesse pelo seu sítio protéico natural<sup>33</sup>.

A principal vantagem da *cromatografia de fase-reversa* é o amplo espectro dos possíveis analitos. A separação eficaz produzida por esta técnica fornece alta resolução. Esse método ainda apresenta resultados rápidos e fáceis de serem alcançados, assim como ótima reprodutibilidade. Contudo, na prática, os problemas são similares aos da técnica anterior, a fase estacionária mostra propriedades de troca-iônica e de adsorção, especialmente em analitos de caráter básico, quando o  $\text{pH} > 4$ <sup>10</sup>.

Outra desvantagem da fase reversa é seu efeito desnaturante. O uso do HPLC com uma coluna de fase-reversa pode aumentar o risco de degradação dos compostos de butilestanho<sup>53, 54</sup>. Solventes orgânicos e ácidos podem facilmente mudar as espécies do complexo metal-proteína. A estrutura das proteínas pode ser desnaturada, liberando o elemento complexado, fazendo com que os metais liberados formem complexos com outros novos ligantes, resultando em reações de transferência de espécies. Portanto, espécies com ligações covalentes são as mais apropriadas para esta técnica<sup>10</sup>.

Contudo, este método tem sido usado sucessivamente na determinação de di e tributilestanho em sedimentos e mexilhões<sup>53</sup>. A pesquisa desenvolvida por Hueih-Jen Yang e seus colaboradores determinou compostos de Sn inorgânico, trimetil, trietil, tripropil, tributil e trifenilestanho em amostras de sedimentos e água, utilizando um ICP MS, com nebulização ultra-sônica, acoplado a um cromatógrafo líquido de fase reversa<sup>57</sup>.

A *cromatografia de exclusão molecular* (CEM) é o método cromatográfico mais simples, previsível e requerido entre as outras modalidades cromatográficas, oferecendo uma série de vantagens em relação aos outros métodos: (1) amostras de peso desconhecido são caracterizadas por uma curva de calibração; (2) é um método de separação suave e normalmente não resulta na perda da espécie ou em alterações durante a corrida cromatográfica; (3) apresenta menor esforço no desenvolvimento de métodos analíticos; (4) possui insensibilidade a solventes e temperatura<sup>58, 59, 60</sup>.

Esse método também é conhecido como filtração em gel, permeação em gel, ou cromatografia em peneira molecular de difusão restrita. Isso é devido a sua característica de determinar a massa molecular e a forma das macromoléculas a serem eluídas pela coluna<sup>45</sup>. Este método separa as substâncias de acordo com seu tamanho

efetivo. Como o tamanho efetivo de uma molécula em solução e seu peso molecular são parâmetros proporcionais nessas condições, essa modalidade cromatográfica fica habilitada tanto para a determinação do peso molecular quanto para a distribuição dos mesmos<sup>58</sup>.

A eficiência desse método cromatográfico de separação protéica é influenciada pelos parâmetros de pH, temperatura, concentração salina e o fluxo. Todos esses fatores devem ser otimizados para permanência da espécie nativa<sup>54</sup>. Contudo, devido a diversidade da preparação dos tampões, pode-se otimizar todas essas variáveis de acordo com o objetivo a ser alcançado.

Existem dois tipos de fase estacionária, sílica e polímeros, a sílica gel é a mais utilizada, devido à sua alta eficiência, em razão do menor tamanho das partículas, e pela sua robustez. A coluna empacotada com sílica gel só permite a entrada de moléculas pequenas fazendo com que haja uma distribuição homogênea entre o líquido e o gel. Para moléculas maiores, este acesso é muito mais complicado, induzindo-as a emergir da coluna mais cedo do que as pequenas moléculas. O caráter da fase estacionária controla o movimento das proteínas, variando suas velocidades e assim promovendo a separação<sup>54, 56, 59, 61</sup>.

Uma vez que o tempo de retenção não é baseado em interações químicas, a fase móvel não desempenha um papel crítico. Porém, é necessário observar alguns fatores que podem intervir nessa variável, uma vez que a coluna de CEM exhibe efeitos eletrostático e hidrofóbico, em força iônica baixa ou alta, respectivamente. Em ambos os casos, os componentes da amostra são retidos por interação na superfície da coluna<sup>54, 62</sup>.

O pH exerce um efeito significativo na formação do pico e no tempo de eluição da amostra, isso se deve ao efeito no equilíbrio das cargas das moléculas, além da modificação ocorrida no gel da coluna cromatográfica, que deve ser observado no seu manual antes de injetar qualquer eluente<sup>62</sup>.

Esta técnica tem crescido na aplicação em material biológico. Esse tipo de separação é ideal para compostos de alto peso molecular como proteínas, polímeros e peptídeos, além de separar monômeros, dímeros e trímeros agregados, e imunoglobulinas e anticorpos<sup>61, 62</sup>. Em matrizes complexas como os fluidos biológicos, alguns elementos traço ocorrem como íons livres e outros como complexos de baixo peso molecular ou macromolecular, reversíveis ou irreversíveis<sup>1</sup>.

Um exemplo do uso da CEM para fluidos biológicos foi a pesquisa realizada por Bernhard Michalke e sua equipe, na qual analisaram as espécies de manganês (Mn) presentes no soro humano e no fluido cérebro-espinhal. O grupo utilizou dois tipos de coluna, de acordo com seus objetivos. No caso do soro, foi utilizada uma coluna com capacidade de peneiração de 7 – 200 kDa, enquanto que a coluna empregada para o fluido cérebro-espinhal apresentava malha de menor tamanho, de 100 – 2000 Da. A concentração de Mn nas frações separadas foram determinadas por ICP MS. A pesquisa concluiu que a albumina e a transferrina são as proteínas carreadoras predominantes de Mn no soro, ao passo que o complexo de citrato-Mn foi o mais encontrado no fluido entre as frações de menor peso molecular<sup>63</sup>.

Entretanto, existem algumas desvantagens nessa técnica, pois para obter uma separação adequada, os picos devem ser estreitos, para que proporcione pesos moleculares distintos. Contudo, a coluna de gel filtração apresenta um limite na capacidade de separação, principalmente quando se trata de uma amostra complexa, como o caso de uma matriz biológica, ocasionando nas frações eluídas, a presença de diferentes moléculas com peso molecular similar<sup>60</sup>.

Outra desvantagem é a adsorção das moléculas na fase estacionária, devido a interações hidrofóbicas ou efeitos eletrostáticos e, até mesmo, ao comprimento da coluna. A liberação do metal para sua forma original pode ocorrer, especialmente, se o tampão contém uma baixa concentração salina. Entretanto, concentrações elevadas de sal podem desnaturar o complexo organometálico. Este efeito pode causar várias alterações, entre elas, a destruição ou transformação da espécie<sup>60</sup>.

A cromatografia de alto desempenho, ou alta pressão como também é conhecida, é vantajosa devido a sua velocidade e melhor resolução, quando comparada àquela de baixa pressão. Porém, tão importante quanto a resolução, é a preservação das espécies originais, pois algumas fases estacionárias e tampões podem desnaturar a espécie primitiva, assim como a alta pressão exercida pelo equipamento<sup>10</sup>.

Outra técnica utilizada na separação das proteínas é a *eletroforese em gel* (EG). É uma ferramenta amplamente utilizada no meio científico, sendo uma técnica baseada na separação de partículas em um determinado gel de acordo com sua massa e carga. A migração de partículas carregadas em um determinado meio acontece sob a influência de uma diferença de potencial elétrico. As moléculas podem ser separadas através das suas características de mobilidade frente a campos elétricos, constituindo o fundamento da eletroforese<sup>64, 65</sup>.

Nos dias atuais, a eletroforese de proteínas e polipeptídeos ainda é muito realizada em meios gelatinosos tais como gel de poliacrilamida (PAGE) e de agarose. Uma das grandes vantagens do PAGE, quando comparado à agarose, é praticamente não apresentar problemas de adsorção, devido à diminuta quantidade de grupos carregados em sua estrutura química. E ainda, nos sistemas a base de poliacrilamida, a porosidade do gel pode ser ajustada ao diâmetro das partículas protéicas, através de uma concentração fixa do monômero (acrilamida) e do agente de ligação cruzada (bisacrilamida)<sup>65</sup>.

O avanço mais promissor na metodologia eletroforética está relacionado à implantação definitiva da *eletroforese capilar* na purificação e análise de proteínas, devido à alta resolução, eficiência, velocidade e uso de pequena quantidade de amostras. Porém, infelizmente, este sistema é bem mais caro do que aquele desenvolvido em PAGE<sup>65</sup>.

A eletroforese de proteínas permanece como uma forma fácil e comum de investigação, possibilitando a detecção de alterações que não poderiam ser vistas através das técnicas tradicionais. Pode-se também determinar o peso molecular das proteínas, a partir de um padrão protéico com diferentes pesos moleculares. É um dos métodos mais utilizados para esse fim, devido sua simplicidade e boa resposta alcançada<sup>64</sup>.

As técnicas como o ICP MS e AAS são métodos capacitados para a determinação exata de elementos em baixas concentrações, logo após uma separação cromatográfica<sup>43</sup>. Atualmente, a AAS está sofrendo forte concorrência do ICP MS, que vem ganhando popularidade devido à sua capacidade multi-elementar, oferecendo a possibilidade de analisar todos os elementos de interesse simultaneamente, além dos baixos limites de detecção, em nanograma por litro ( $\text{ng L}^{-1}$ ), e a possibilidade de diluição isotópica “on line”. Entretanto, seu uso tem sido dificultado pelos custos elevados de instrumentação e de manutenção<sup>48</sup>.

A espectrometria de absorção atômica apresenta diferentes atomizadores tais como forno de grafite (GFAAS), chama (FAAS), vapor frio (CVAAS) e geração de hidretos (HGAAS)<sup>1</sup>. O método de AAS com chama foi amplamente usado no passado para a determinação de Sn inorgânico em alimentos e material biológico. Contudo, novos atomizadores para a AAS foram sendo desenvolvidos, entre eles, o GF AAS<sup>22, 49</sup>.

A espectrometria de absorção atômica com atomização eletrotérmica (ETAAS) tem sido bastante usada para análise de diferentes tipos de amostras, devido a sua sensibilidade e exatidão. Entretanto, para matrizes com alto teor salino, como a água do

mar, ou concentrações do metal abaixo do limite de detecção, que necessitem de pré-concentração, esses fatores podem tornar esta técnica mais difícil de ser utilizada em análises de rotina<sup>55</sup>. Logo, deve-se observar a composição do tampão, pois, ao usar uma fase móvel com elevada concentração salina, pode-se aumentar a altura do fundo<sup>66</sup>.

A combinação da HPLC, sendo um método de separação, com a GFAAS, método de quantificação, aumenta a seletividade e sensibilidade do processo de análise, sendo que sozinhas não são adequadas para a determinação “in situ” das espécies metálicas. Em teoria, qualquer tipo de atomizador pode ser acoplado a um cromatógrafo, todavia, na prática, várias condições precisam ser cumpridas, a fim de obter boa sensibilidade e seletividade analítica para problemas específicos<sup>49, 51, 53</sup>.

As técnicas hífenadas ocorrem quando há uma combinação da separação com a análise quantitativa, permitindo a determinação simultânea das espécies. Na análise de especiação, as técnicas de acoplamento direto levam a resultados reprodutivos com menor risco de contaminação ou perdas do analito em um curto período de tempo. Geralmente, cromatografia e espectrometria podem ser acopladas “on line”. No entanto, a preferência por uma técnica de atomização discreta e altamente sensível, como a ET AAS, e a disponibilidade no laboratório, foram as razões para a escolha desta técnica de acoplamento “off line”<sup>1</sup>.

Como a análise de especiação de metais traço é relativamente recente e extremamente complexa, o número de revisões sobre o assunto tem sido crescente. Alguns pesquisadores utilizam a interface entre HPLC e ICP MS para separar e quantificar as espécies metálicas existentes em amostras biológicas<sup>67</sup>. Vários estudos apresentam a determinação das espécies de arsênio em soro, água ou urina, utilizando técnicas hífenadas de HPLC – HGAAS<sup>68, 69, 70</sup>. Este mesmo acoplamento também permitiu a análise de especiação de selênio em material biológico<sup>70, 71</sup>. Uma técnica híbrida entre HPLC e CVAAS foi desenvolvida para a determinação das espécies de mercúrio e metilmercúrio em uma amostra de água fortificada<sup>72</sup>. Espécies de germânio inorgânico são determinadas por SEC - HG/GFAAS<sup>73</sup>.

Contudo, algumas desvantagens também são vistas nas técnicas hífenadas. O controle da qualidade da análise fica comprometido, uma vez que pode ser realizado com mais facilidade no modo off-line, assim como a otimização da separação e da detecção, sem interferências e melhor limite de detecção. Todos esses fatores são mais fáceis de serem manipulados quando não há hífenação das técnicas<sup>60</sup>.



A especificação exige um tratamento substancialmente diferente e tem que ser seletivamente desempenhada para aquela espécie metálica naquela amostra, já que nenhum método proporciona uma identificação universal e inequívoca de todos os metais<sup>1</sup>.

## **10- Experimental**

### **✓ Descrição da área de estudo**

A área selecionada foi uma indústria de beneficiamento da cassiterita na cidade de Ariquemes, Rondônia. O setor de interesse foi a produção, onde ocorre o processo de beneficiamento da cassiterita, que compreende as seguintes etapas: britagem - para a redução da granulometria; moagem - para a liberação da maior parte dos minerais de minério disseminados no pegmatito; e mesas vibratórias - concentração mecânica (método gravimétrico) dos minerais pesados. O produto concentrado não magnético obtido é composto por cassiterita, microlita, quartzo e feldspato, que então é submetido a um separador eletrostático para a retirada da cassiterita. Os rejeitos são estocados e a cassiterita recebe um tratamento metalúrgico na própria indústria, cujo produto final para a venda é o Sn.

### **✓ População alvo**

O estudo foi realizado com dois grupos populacionais, um constituído por seis trabalhadores da área de produção, em uma indústria de beneficiamento de minérios, (área de estudo) e outro grupo, composto por cinco adultos expostos ambientalmente, apresentando qualidades de vida semelhantes às dos trabalhadores expostos ocupacionalmente. Ambos concordaram em participar através da assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (Anexo 1).

### **✓ Critérios de Seleção**

#### **• Inclusão:**

1. Concordância em participar do estudo por meio da assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE);
2. Trabalhadores do setor de produção da indústria de beneficiamento da cassiterita.

#### **• Exclusão:**

1. Trabalhadores em que não concordaram em participar do estudo;
2. Pacientes que estivessem em situações em que normalmente ocorre uma maior mobilização como nos estados fisiológicos e patológicos, que promovem a

reabsorção óssea tais como distúrbios no equilíbrio ácido-base, infecções, intervenções cirúrgicas, osteoporose, tirotoxicose, e terapias com certas drogas.

3. Indivíduos que não trabalhassem no setor de produção da indústria.

#### ✓ **Coleta e Armazenamento das Amostras**

O risco de contaminação das amostras e perdas das espécies originais durante amostragem, transporte, armazenamento, separação e determinação foram minimizados seguindo as recomendações já descritas em diversos trabalhos<sup>1, 9, 26, 31, 39</sup>.

Amostras de sangue venoso foram coletadas em tubos a vácuo, 7ml, específicos para a determinação de metais traço, contendo heparina como anticoagulante e etiquetados com nome e data. Após a coleta, as amostras foram acondicionadas em sacos plásticos em posição vertical e transportadas em gelo para o Laboratório de Toxicologia do Centro de Estudos da Saúde do Trabalhador e Ecologia Humana (CESTEH), onde foram centrifugadas à 3500 rotação por minuto (rpm) por 15 min. para a obtenção do plasma, quando então o sobrenadante era retirado e congelado a  $-20^{\circ}\text{C}$  até a análise.

Uma parte deste plasma era destinada para a determinação da concentração total de Sn nesta matriz, enquanto a outra era utilizada na análise de especiação do metal.

#### ✓ **Descontaminação do Material**

A descontaminação cuidadosa de todo o material é fundamental para a análise de traços e, principalmente, para a especiação. Toda a vidraria e utensílios plásticos utilizados ficam de molho em uma solução de Extran (Merck) a 5% (v/v), por um período mínimo de 24 horas. Após este tempo, são enxaguados copiosamente em água corrente e, em seguida, imersos em uma solução de ácido nítrico a 10% (v/v) para a descontaminação por, pelo menos, 48 horas. Depois de lavado inúmeras vezes com água deionizada, o material é seco em estufa a  $40^{\circ}\text{C}$ , devidamente protegido de contato com superfícies metálicas e de poeira até seu uso. Todos os reagentes utilizados são de caráter analítico.

#### ✓ **Instrumental**

O equipamento utilizado na determinação de Sn no plasma e nas frações foi um espectrômetro de absorção atômica AAnalyst 800 equipado com atomizador eletrotérmico transversal, corretor de fundo Zeeman longitudinal e amostrador

automático AS-800, todos Perkin-Elmer. Tubos “end cap” recobertos com grafite pirolítico (Perkin Elmer) foram usados nesses experimentos. O comprimento de onda da lâmpada de catodo oco (Perkin-Elmer) de Sn foi de 286,3 nm, enquanto que a corrente e largura de fenda usadas foram de 55 mA e de 0,7 nm, respectivamente. Todas as leituras foram realizadas em área de pico (absorvância integrada) e o uso de rampa zero e interrupção do fluxo de argônio na etapa de atomização, completam a obediência às condições “Stabilized Temperature Platform Furnace” (STPF).

As condições STPF foram adotadas no forno de grafite para reduzir, ou até mesmo eliminar, as interferências. Entre elas, está a utilização de um modificador químico, necessário em matrizes mais complexas, como é o caso de fluidos biológicos.

Uma coluna XK 16/100 (16 mm di X 100 cm, Amersham Pharmacia Biotech) empacotada com o gel Sepharose CL 4B, faixa de fracionamento: 60 - 200000 kDa, foi conectada a um sistema cromatográfico de baixa pressão Pharmacia Biotech AB (GE), modelo GradiFrac™ System, coletor de fração GradiFRac, para separação das proteínas do plasma. O detector utilizado foi o UV-Visible Spectrophotometer, modelo UV-1601, produzido pela Shimadzu Corporation Analytical Instruments Division, em um comprimento de onda de 280nm. Algumas frações coletadas no GradiFRac foram concentradas no Savant SPD 131DDA SpeedVac Concentrator, para posterior uso na eletroforese.

A eletroforese foi realizada por meio de um sistema Mini-Protean, da Bio-Rad, ligado à fonte EPS 3501 XL (Amersham Pharmacia Biotech). Os géis obtidos foram digitalizados no densitômetro, GS-800, Bio-Rad, com o auxílio do programa Quantity One (Bio-Rad).

#### ✓ Reagentes e Soluções

Todos os reagentes utilizados foram, pelo menos, de grau analítico. A solução padrão intermediária contendo  $1000 \mu\text{g L}^{-1}$  de Sn foi preparada a partir da solução estoque de  $1000 \mu\text{g mL}^{-1}$  em solução 20% HCl (Perkin Elmer - part nº 9300161). As soluções analíticas de calibração foram preparadas diariamente em ácido nítrico 0,2% (v/v), tendo sido a água de diluição previamente purificada pelo sistema Milli-Q (Millipore).

Na preparação do modificador químico, foi utilizada uma solução de nitrato de paládio  $10 \text{ g L}^{-1}$  e de nitrato de magnésio  $10 \text{ g L}^{-1}$  diluídos em ácido nítrico 0,2% (v/v).

Uma mistura com volumes apropriados dessas soluções foi preparada de modo que uma alíquota de 10 microlitros ( $\mu\text{L}$ ) do modificador contivesse 10  $\mu\text{g}$  de paládio elementar e 5  $\mu\text{g}$  de nitrato de magnésio.

Uma solução de 50mM Tris – HCl e 30mM  $\text{NaHCO}_3$  foi utilizada como fase móvel, com seu pH ajustado em 7,4. Contudo, inicialmente foram testados soluções de tampão 50mM Tris – HCl + 0,15mM NaCl; 0,02M  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  + 0,30M NaCl; 50mM Tris – HCl + 30mM NaCl. Todos os reagentes até aqui mencionados são da marca Merck.

Para calibração da coluna na cromatografia de baixa pressão foi utilizada a Azida 0,05% (m/v), para a determinação do volume de inclusão total, e o Blue Dextran 1% (m/v) para a determinação do volume de exclusão total.

Na eletroforese, para o preparo dos géis, as concentrações da acrilamida (Aldrich) utilizada nos géis fracionador de 15 e 12% e concentrador de 5%. O gel fracionador continha Tris-HCl 370  $\text{mmol L}^{-1}$  (pH=8,8), dodecil sulfato de sódio (SDS) 0,1% (m/v), persulfato de amônio (APS) 0,05% (m/v) e tetrametiletenodiamina (TEMED) 0,00033% (v/v). Uma solução com Tris-HCl 125  $\text{mmol L}^{-1}$  (pH=6,8), SDS 0,1% (m/v), APS 0,13% (m/v) e TEMED 0,001% (v/v) fez parte da preparação do gel concentrador. Água deionizada foi utilizada na preparação dos géis.

No preparo da amostra para SDS-PAGE (do inglês, sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis), foi utilizado um tampão de aplicação de amostra contendo Tris-HCl 10  $\text{mmol L}^{-1}$  (pH=6,8),  $\beta$ -mercaptoetanol 5% (v/v), SDS 0,1% (m/v), glicerol 20% (v/v) e azul de bromofenol 0,00005% (m/v). Além deste, outro tampão contendo os mesmo reagentes, exceto o agente redutor  $\beta$ -mercaptoetanol, também foi aplicado, conforme a necessidade.

O Tris-HCl, glicerol,  $\beta$ -mercaptoetanol, APS, TEMED foram de procedência Merck, enquanto que o SDS, azul de bromo fenol, ácido acético, metanol e Comassie Blue R-250 foram fabricados pela Sigma. Para a revelação por nitrato de prata ( $\text{AgNO}_3$ ), foram necessários etanol 95% (v/v), ácido acético, acetato de sódio, glutaraldeído 25% (v/v),  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ , formaldeído 35% (v/v), carbonato de sódio,  $\text{AgNO}_3$ , ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) e timerosol. Água deionizada foi utilizada no preparo das soluções.

Dois conjuntos de proteínas serviram para a calibração na eletroforese, um de baixo massa molecular (MM) (Amersham PharmaciaBiotech), em que fosforilase B (MM = 92 kDa), albumina (BSA) (MM = 66 kDa), ovalbumina (OVA) (MM = 45 kDa),

anidrase carbônica (MM = 30 kDa), inibidor tripsina (MM = 21 kDa),  $\alpha$  lactalbumina (MM = 14,4 kDa) e aprotinina (MM = 6,5 kDa) fazem parte deste grupo. E o outro conjunto de proteínas, com uma variedade de massa molecular, (Broad Range, BioRad) inclui miosina (MM = 200 kDa),  $\beta$ -galactose (MM = 116,3 kDa), BSA (MM = 66 kDa), OVA (MM = 45 kDa), anidrase carbônica (MM = 30 kDa), inibidor tripsina (MM = 21 kDa), lisozima (MM = 14,4 kDa) e aprotinina (MM = 6,5 kDa).

### ✓ **Preparação das Amostras**

Para a injeção na coluna cromatográfica de baixa pressão, foram preparadas duas alíquotas de um mesmo plasma, pertencente a indivíduo não exposto, sendo que uma delas foi enriquecida com 250 ng mL<sup>-1</sup> de SnCl<sub>2</sub>. O plasma foi diluído 1+1 em 50 mM Tris-HCl + 30mM NaHCO<sub>3</sub>, resultando em uma massa de 250 ng de Sn e uma concentração final de 125 ng mL<sup>-1</sup>. Após filtração (filtro de celulose regenerada, 0,45  $\mu$ m de poro), essa solução de plasma diluído duas vezes era injetada em um loop de 2mL para a separação das proteínas por exclusão de tamanho através da cromatografia de baixa pressão. O tampão passou por filtração à vácuo (filtro de acetato de celulose, poro de 0,2  $\mu$ m e 47 mm de diâmetro) e degaseificação com hélio por 15 min antes do uso.

Volume de 1000  $\mu$ L de cada fração coletada foi utilizado sem diluição para a determinação do Sn por ET AAS. Diariamente, uma curva de calibração era preparada nas concentrações de 2,5; 5,0; 10,0; 25,0  $\mu$ g Sn L<sup>-1</sup> a partir do padrão de 1  $\mu$ g mL no próprio tampão (sem ser passado na coluna).

A concentração total de Sn no plasma de cada trabalhador foi determinada por ET AAS. A diluição do plasma foi de 1+4 em Triton X-100 0,1% (v/v). Com o plasma de um indivíduo não exposto preparou-se uma curva de calibração, seguindo as mesmas concentrações anteriores. A exatidão dos resultados foi verificada através da análise dos materiais de referência Contox Trace Metal Serum Control (Kaulson Laboratories, USA), Level I, lot. TM 144 1097: 3,0  $\pm$  2,0  $\mu$ g L<sup>-1</sup>. A diluição do soro seguiu a mesma das amostras.

Para o plasma da amostra 1, somente as frações que apresentaram Sn após leitura por ET AAS foram selecionadas para eletroforese. Aos 10  $\mu$ L da fração concentrada no SpeedVac foram adicionados 10  $\mu$ L do tampão de aplicação (contendo e não contendo

$\beta$ -mercaptoetanol) e levados à ebulição por 5 min. Os valores de tensão e trabalho oscilavam de acordo com a necessidade do equipamento, já a corrente era fixa em 25mA, para uma placa de gel, e 50mA para duas placas. As corridas levavam em média 1h.

A solução reveladora Comassie Blue R250 era usada com elevados teores de proteínas, uma vez que seu limite de detecção é de 0,1-10 mg / banda, enquanto que a revelação por  $\text{AgNO}_3$  apresenta uma sensibilidade ideal para baixas concentrações, com um limite de detecção da ordem de 1-10 ng proteína / banda.

Na revelação por  $\text{AgNO}_3$ , o gel ficou 1 hora em solução contendo 50% de metanol (v/v) e 10% de ácido acético (v/v) para fixação. A seguir, procedeu-se à incubação por 2 horas em solução descorante (ácido acético a 7% e metanol a 5% (v/v)). Após esta etapa, o gel foi lavado abundantemente em água deionizada por 1 hora (a cada 20 minutos a água era trocada) e, em seguida, incubado com solução de por  $\text{AgNO}_3$  a 0,1% (m/v) por 30 minutos. Para a revelação, o gel foi lavado rapidamente em água deionizada e colocado em solução contendo formaldeído a 0,0185% (v/v) e carbonato de sódio a 3% (m/v) até o aparecimento das proteínas. A reação foi inativada pela adição de 115mM de citrato de sódio.

Já para a coloração com Comassie Blue, foram necessárias apenas três etapas, uma de fixação (45% de metanol e 10% ácido acético (v/v)), deixando agir por 5 minutos sob agitação. Em seguida, adicionou-se a solução corante (0,1% de Comassie Blue G-250, 25% de Metanol, 5% de Ácido Acético (v/v)), sob agitação por 30 minutos. Depois, adicionou-se a solução descorante, que foi a mesma utilizada na fixação, para lavagem do gel até o desaparecimento de toda a coloração azulada e revelação das bandas.

## **11- Resultados e Discussão**

A fim de compreender os mecanismos e processos pelo qual os elementos traços são absorvidos, transportados e incorporados nas proteínas, é importante monitorar esses elementos, devido às suas diversas interações. O desenvolvimento de um método analítico para a separação de proteínas e a determinação dos metais nas frações geradas necessita de vários pré-requisitos a serem cumpridos, como a contaminação que deve ser evitada, o sistema de separação deve ser otimizado, interferências durante a detecção espectroscópica tem de ser eliminada e a sensibilidade para os metais de interesse deve ser otimizada na matriz<sup>51</sup>.

### **11.1- Determinação do Estanho no Plasma Total**

O objetivo deste capítulo foi o desenvolvimento de uma metodologia para a determinação direta de Sn no plasma humano por ET AAS, com um pré-tratamento mínimo da amostra, sempre visando a redução de possíveis contaminações.

Os valores de absorvância integrada (área de pico), contidos nas tabelas e figuras deste trabalho, representam a média de duas leituras, já descontadas do branco, salvo no caso de disparidade entre as mesmas, quando era realizada, pelo menos, mais uma medição.

#### **11.1.1- Programa de temperatura**

A análise consiste na medida do elemento de interesse em um volume conhecido de amostra dentro do forno. Essa alíquota é submetida a um programa de temperatura, e a absorvância é medida durante a etapa de atomização<sup>67</sup>. Fazem parte de um programa de temperatura a secagem, utilizada para a remoção do solvente, pirólise, necessária para a destruição da matriz, atomização, quando o analito passa para o estado fundamental, limpeza e resfriamento do forno<sup>74</sup>.

Amostra e modificador são dispensados sucessivamente, antes da inicialização do programa de temperatura. Contudo, foi observada a presença da formação de resíduos carbônicos no interior do tubo, mesmo secando toda a amostra de acordo com o programa de temperatura. Com isso, era necessária a limpeza constante do forno. Na



tabela 1, o programa de temperatura utilizado com êxito para a determinação de Sn em plasma.

**Tabela 1:** Programa de temperatura utilizado na determinação de Sn no plasma.

<b>Etapa</b>	<b>Temperatura (°C)</b>	<b>Rampa (s)</b>	<b>“Hold” (s)</b>	<b>Fluxo Argônio (mL min<sup>-1</sup>)</b>
1*	110	1	10	250
2	130	20	20	250
3	400	30	10	250
4	1400	10	10	250
5**	2200	0	5	0
6	2450	5	3	250

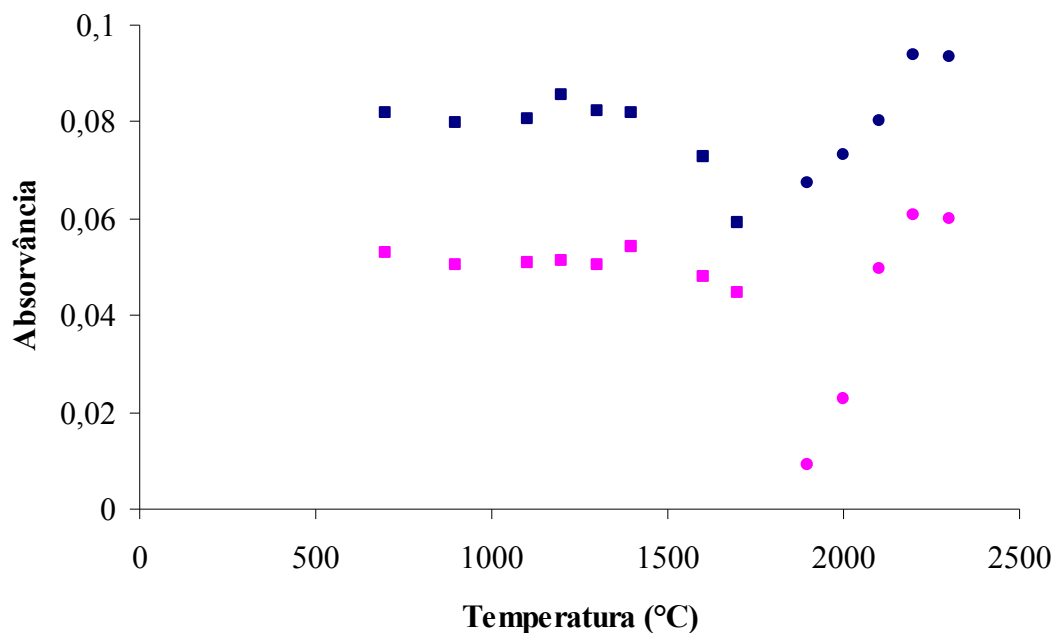
\* Introdução Modificador 10 µL + amostra 20 µL

\*\* Leitura

### 11.1.2- Curvas de Pirólise e de Atomização

As curvas de pirólise e de atomização têm, por objetivo estabelecer as temperaturas ótimas de pirólise, onde ocorre decomposição da matriz sem perda do analito, e também sua temperatura ótima de atomização, onde o melhor compromisso entre sensibilidade, tempo de vida do forno e tempo de atomização deve ser buscado.

Na figura 1, encontram-se as curvas de pirólise e atomização para 1000 pg de Sn em solução aquosa (curva efetuada com Triton X 100 0,1% (v/v)) e o plasma de um indivíduo não exposto enriquecido com 1000 pg de Sn e diluído 1+4 em Triton X-100 0,1% (v/v). Neste estudo, a temperatura de atomização foi fixada em 2200°C, enquanto a de pirólise era variada de 700 a 1700°C, com intervalos de 100°C, exceto nos valores de 700°C a 1100°C que variou com intervalos de 200°C. A temperatura ótima de pirólise encontrada foi de 1400°C, tanto na solução aquosa quanto na matriz. A seguir, procedeu-se uma variação da temperatura de atomização entre 1900 e 2300°C, com gradiente de temperatura de 100°C, com 1400°C fixada aleatoriamente como temperatura de pirólise. Neste caso, a temperatura ótima de atomização ficou em 2200°C. A esta temperatura, o pulso de absorção do Sn resolveu-se num tempo de 5 segundos.



**Figura 1:** Curvas de pirólise (quadrado) e de atomização (círculo) para 1000 pg Sn em solução aquosa (símbolo azul) e plasma enriquecido com 1000 pg Sn (símbolo rosa).

### 11.1.3- Diluição

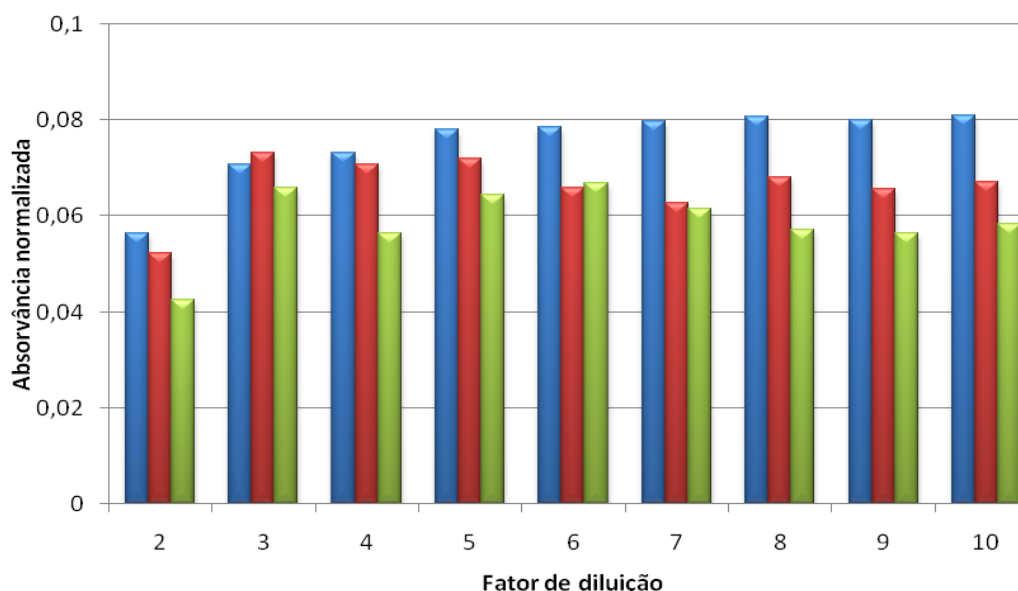
A figura 2 apresenta o comportamento do sinal corrigido para o plasma enriquecido com 1 ng de Sn. A partir desse plasma adicionado, foram estudados diferentes diluentes e proporções de diluição, além de observar a atenuação de fundo em altura de pico. Vale ressaltar que este padrão de Sn foi preparado com Triton X-100 0,1% (v/v), uma vez que o plasma se tornava turvo após a adição do padrão preparado em ácido.

O ácido nítrico age também como modificador químico. No entanto, quando em contato com plasma, desnatura as proteínas, fazendo com que precipitem. O seu uso como solvente para o plasma tornou turva a solução, além ser difícil a dispensa do material pela ponteira, desperdiçando assim a amostra e, conseqüentemente, perdendo o analito. Já para a diluição em água, foi observado que a sensibilidade alcançada era a menor entre os três diluentes testados.

Normalmente, o Triton é usado como diluente do sangue e seus derivados, por diminuir a tensão superficial e facilitar assim a pipetagem. Assim, a diluição do plasma em Triton X-100 0,1% (v/v) se mostrou a melhor alternativa entre as pesquisadas. O

sinal de Sn foi o maior, enquanto que o da atenuação de fundo se manteve adequadamente dentro da capacidade de correção do efeito Zeeman.

As proporções de diluição do plasma testadas foram 1+1, 1+2, 1+3, 1+4, 1+5, 1+6, 1+7, 1+8, 1+9. A figura 2 mostra o comportamento do sinal normalizado de uma amostra de plasma enriquecido com 1 ng de Sn.



**Figura 2:** Influência do fator de diluição. Em azul, plasma diluído em Triton X-100 0,1% (v/v); Em de vermelho, HNO<sub>3</sub> 0,2% (v/v) e em verde, água. T<sub>p</sub> = 1400°C e T<sub>A</sub> = 2200°C, Vol amostra = 20µL; modificador: 10 µg Pd + 5 µg Mg(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> em 10µL;

A leitura do plasma sem diluição não foi tentada devido às enormes dificuldades de pipetagem, uma vez que esta matriz é muito densa e facilmente causa a obstrução do capilar do amostrador. A diluição 1+1 apresenta o menor sinal corrigido devido à complexidade da matriz que, nesta pequena diluição, dificulta a liberação do analito.

O pequeno acréscimo no sinal do analito nas diluições 1+2 e 1+3 sugere a existência de considerável efeito de matriz, além da maior produção de resíduos carbônicos encontrada no interior do tudo nessas baixas diluições.

A diluição 1+4 foi a escolhida, pois, a partir desta proporção, a sensibilidade se manteve constante, sem diferenças estatisticamente significativas, de acordo com o teste *t* de Student (95% de confiança). O uso de diluições maiores pode aumentar a propagação do erro e piorar o limite de detecção.

### 11.1.4- Massa do Modificador

Massas diferentes de nitrato de paládio juntamente com nitrato de magnésio em 10  $\mu\text{L}$  de solução foram usadas para estudar o efeito da concentração do modificador químico sobre a sensibilidade. A massa de modificador mais adequada foi avaliada através das massas características alcançadas pelas curvas analíticas, geradas com o uso de diferentes massas de modificador.

Neste estudo, três massas (em  $\mu\text{g}$ ) para a mistura de Pd + Mg foram investigadas, 30 + 20, 15 + 10 e 10 + 5. Os volumes injetados no tubo de grafite foram sempre os mesmos, 20  $\mu\text{L}$  da amostra e uma alíquota de 10  $\mu\text{L}$  de modificador contendo a massa estudada. Foram utilizadas apenas três soluções para a calibração nas concentrações iguais a 10, 25 e 50  $\mu\text{g L}^{-1}$ , uma vez que se desejava tão somente um estudo comparativo de sensibilidades. Este estudo foi realizado em meio aquoso e na presença da matriz, neste caso diluída 1+4 com Triton X-100 0,1% (v/v). A tabela 2 mostra os valores encontrados da massa característica de cada massa de modificador estudada, nas curvas aquosa e no plasma.

**Tabela 2:** Avaliação das massas características, nas curvas aquosa e no plasma, utilizando-se diferentes massas de modificador.

<b>Massa do Modificador Pd/Mg (<math>\mu\text{g}</math>)</b>	<b>Massa Característica <math>\text{HNO}_3</math> 0,2% (pg)</b>	<b>Massa Característica do plasma (pg)</b>
10 + 5	50,9	52,4
15 + 10	51,5	50,3
30 + 20	49,7	49,7

Volume de injeção da amostra = 20 $\mu\text{L}$ ; modificador: Pd e  $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$  = 10 $\mu\text{L}$ ;  $T_p$  = 1400°C;  $T_A$  = 2200°C. Diluição: 1+4; diluente, triton 0,1 % (v/v).

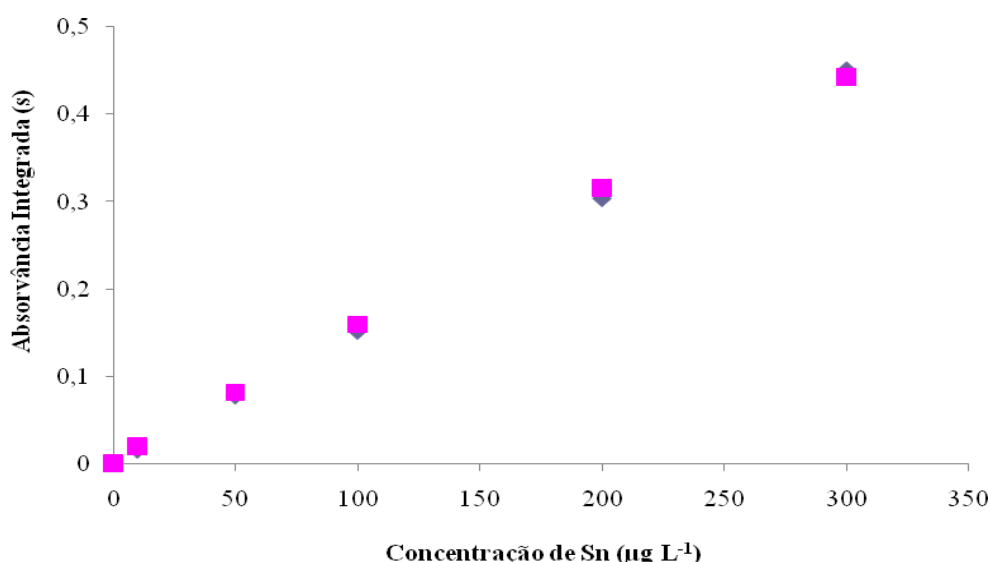
O desvio padrão da massa característica ( $m_0$ ) para a curva aquosa foi de 3% entre as três massas analisadas e o desvio padrão da  $m_0$  para a curva na matriz foi de 5%, não apresentando em ambos, uma diferença estatisticamente significativa, de acordo com o teste  $t$  de Student (95% de confiança). Com isso, segundo os dados obtidos, não seria necessário usar uma massa de modificador três vezes maior para obter uma sensibilidade semelhante. Conclui-se que, a massa 10 + 5  $\mu\text{g}$  de paládio e

magnésio, respectivamente, seria a melhor escolha, já que se trata de uma solução de alto custo.

### 11.1.5- Linearidade

Linearidade é a capacidade de um método analítico em produzir resultados diretamente proporcionais à concentração do analito em amostras, em uma dada faixa de concentração<sup>71</sup>.

As curvas analíticas, aquosa e no plasma, foram analisadas em três dias consecutivos. Todas as condições já estabelecidas anteriormente foram mantidas, como mostra a figura 3.



**Figura 3:** Curvas de adição de analito em amostra de plasma, na faixa de 10 a 300  $\mu\text{g L}^{-1}$ ; Curva aquosa (◆), Plasma (■). Vol. de injeção = 20 $\mu\text{L}$ ; modificador: 10  $\mu\text{g Pd}$  + 5  $\mu\text{g Mg(NO}_3)_2$  em 10 $\mu\text{L}$ ;  $T_p = 1400^\circ\text{C}$ ;  $T_A = 2200^\circ\text{C}$ . Amostras diluídas 1+4 com diluente, Triton X-100 0,1 % (v/v).

A curva aquosa se mostrou linear até o ponto de 300  $\mu\text{g L}^{-1}$ , enquanto que a curva no plasma permaneceu linear até a concentração de 200  $\mu\text{g L}^{-1}$ . Isso, devido uma diferença de 19% entre os pontos de 200 e 300  $\mu\text{g L}^{-1}$ . Comparando com o desvio de linearidade entre 100 e 200  $\mu\text{g L}^{-1}$  de apenas 1%, a curvatura para as concentrações inferiores, não foi estatisticamente significativa, de acordo com o teste *t* de Student (95% de confiança). Da mesma forma, a curva aquosa apresentou um desvio padrão de 3% na faixa de concentração entre 200 e 300  $\mu\text{g L}^{-1}$ .

### 11.1.6 - Massa Característica e Razão de Sensibilidade

A sensibilidade foi avaliada pela massa característica ( $m_0$ ) relativa às curvas de adição de analito (iSn) em cinco diferentes amostras de plasma, como mostra a tabela 3, assim como, seus respectivos coeficientes de correlação. A interferência de matriz foi avaliada pela razão de sensibilidades ( $m_{0aq} / m_{0m}$ ), em que  $m_{0aq}$  é a massa característica obtida pela curva aquosa, enquanto  $m_{0m}$  foi alcançada com a matriz. O efeito da matriz não existe se essa razão se aproxima da unidade. A melhor sensibilidade é obtida com uma menor  $m_0$ .

**Tabela 3:** Razão de sensibilidade para as curvas aquosa e no plasma com adição de analito.

Amostras de Plasma	Razão de Sensibilidades ( $m_{0aq}/m_{0m}$ )	Massa Característica (pg)	Coefficiente de correlação ( $r^2$ )
HNO <sub>3</sub> 0,2 % (v/v)	-	57,89	0,9999
Plasma 1	0,97	59,46	0,9998
Plasma 2	1,03	56,41	0,9999
Plasma 3	1,04	55,70	0,9999
Plasma 4	0,91	63,77	0,9997
Plasma 5	0,93	62,41	0,9999

Vol. de injeção da amostra = 20 $\mu$ L; modificador: 10  $\mu$ g Pd + 5  $\mu$ g Mg(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> em 10 $\mu$ L; T<sub>F</sub>=1400°C; T<sub>A</sub>=2200°C. Diluição: 1+4; diluente, Triton X-100 0,1 % (v/v).

Apesar de o plasma ser considerado uma matriz complexa, foi observada uma notável semelhança entre as sensibilidades das curvas na matriz e no meio aquoso, uma vez que as razões se aproximaram de 1,0, de acordo com o teste *t* de Student (95% de confiança). Assim, não há interferência dos concomitantes e a calibração externa com soluções aquosas é possível.

### 11.1.7- Limite de Detecção e Quantificação

Segundo o INMETRO<sup>75</sup>, o limite de detecção do método é “a concentração mínima de uma substância medida e declarada com 95% ou 99% de confiança de que a concentração do analito é maior do que zero”. Na prática, é a menor concentração que

pode ser detectada, mas não necessariamente quantificada. Pode ser calculado de acordo com a expressão:

$$\text{LOD}=3.s.b^{-1}$$

Onde  $s$  é o desvio padrão estimado para 10 medidas do branco, ou amostra isenta do analito e  $b$  é inclinação da curva de calibração.

O limite de detecção (LD) para a determinação de Sn em plasma foi obtido a partir da leitura de dez soluções de uma mesma amostra sem sinal detectável do metal, diluídas cinco vezes, conforme já descrito anteriormente. O valor encontrado foi de  $1,44 \pm 0,17 \mu\text{g Sn L}^{-1}$  na amostra original (já considerando o fator de diluição), mostrando que o método proposto pode ser confortavelmente usado para análise de amostras de populações expostas a este analito.

O limite de quantificação (LQ) é definido pelo INMETRO<sup>75</sup> como “a menor concentração do analito que pode ser determinada com precisão e veracidade”. Na prática, corresponde à concentração mínima possível de ser quantificada pelo método. É calculado através da expressão:

$$\text{LOQ}=10.s.b^{-1}$$

Assim, o limite de quantificação obtido como resultado de 10 determinações de uma amostra com baixa concentração do analito foi de  $4,79 \pm 0,65 \mu\text{g Sn L}^{-1}$  a amostra original. As mesmas considerações feitas para o LOD são aqui também válidas.

#### **11.1.8- Exatidão**

A exatidão do método foi verificada pela análise da amostra de referência Contox Trace Metal Serum Control (Kaulson Laboratories, USA), Level I, lot. TM 144 1097, cuja concentração é  $3,0 \pm 2,0 \mu\text{g.L}^{-1}$ .

Realizaram-se quatro replicatas da amostra de referência em dias diferentes, gerando uma concentração média de  $4,4 \pm 0,2 \mu\text{g L}^{-1}$ , apresentando um resultado dentro do desvio padrão da amostra certificada. Apesar do resultado se encontrar dentro da faixa de referência, foi observado que, embora todos os cuidados tenham sido tomados, houve algum tipo de contaminação, uma vez que todas concentrações obtidas se encontravam acima da média.

### 11.1.9- Análise de Plasmas de Trabalhadores Expostos

Foram analisadas amostras de plasma de trabalhadores que operam no beneficiamento do mineral de cassiterita, sendo expostos ocupacionalmente ao Sn. Esses resultados, conforme já esperado, estavam acima da faixa encontrada para populações não expostas ocupacionalmente. A legislação brasileira de Normas Regulamentadoras de Segurança e Saúde no Trabalho (NR-7) não estabelece limites, valor de referência (VR) e índice biológico máximo permitido (IBMP) para Sn. Assim, os resultados encontrados na população ocupacionalmente exposta foram comparados com os teores de Sn de uma população exposta ambientalmente, por se tratar indivíduos da mesma região, mesmos hábitos e nível sócio-econômico. Na tabela 4, são apresentadas as concentrações de Sn encontradas no plasma de ambas as populações.

**Tabela 4:** Concentração de Sn encontrada no plasma de trabalhadores expostos ocupacionalmente e ambientalmente.

Amostra	Populações Expostas ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	
	Ocupacionalmente	Ambientalmente
01	3,90	$\leq 1,44$
02	3,59	$\leq 1,44$
03	3,28	$\leq 1,44$
04	3,59	$\leq 1,44$
05	2,98	$\leq 1,44$
06	3,77	$\leq 1,44$

Resultados correspondem a uma única preparação,  $T_p = 1400^\circ\text{C}$ ,  $T_A = 2200^\circ\text{C}$ , 20  $\mu\text{L}$  plasma diluído 1+5 em Triton X-100 0,1% (v/v) e 10  $\mu\text{L}$  10  $\mu\text{g}$  Pd + 5  $\mu\text{g}$   $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$ .

Apesar de esses resultados corresponderem a uma única preparação, já é possível observar as diferenças existentes entre as concentrações de Sn no plasma das duas populações. Pode-se observar que a média das concentrações da população exposta ocupacionalmente é 4,3 vezes maior do que aquela encontrada para a população ambientalmente exposta.

Os indivíduos expostos ambientalmente são moradores de uma vila localizada na área de mineração da cassiterita, também na cidade de Ariquemes, RO. Portanto,



expostos a níveis mais baixos de Sn no ar do que aqueles encontrados em um ambiente de trabalho (“indoor”). Assim, os trabalhadores do setor de produção, da indústria de beneficiamento da cassiterita, apresentaram concentrações de Sn no plasma significativamente mais elevadas do que aquelas encontradas em pessoas também expostas, mostrando a existência de contaminação ocupacional.

## **11.2. Separação e Identificação das Frações Plasmáticas que contém Sn**

A especiação é realizada utilizando diferentes procedimentos analíticos. Essas técnicas consistiram de uma unidade de separação, como a cromatografia líquida, com uma coluna de gel filtração, e para a determinação do metal, a espectrometria de absorção atômica. Para a determinação da faixa fracionária das proteínas foi necessária outra técnica de separação, a eletroforese em gel.

### **11.2.1- Estudo da fase móvel e do método cromatográfico**

Métodos efetivos de separação são necessários, uma vez que as frações do plasma contêm uma grande variedade de substâncias, que vão desde proteínas de elevada massa molecular até pequenos íons metálicos. A separação das proteínas de acordo com o tamanho é conveniente, visto que este é, aproximadamente, diretamente proporcional ao raio molecular das partículas<sup>51</sup>.

A técnica da cromatografia de exclusão molecular permite a preservação da forma nativa das proteínas nos sistemas de separação. Como já citado anteriormente, no caso da análise de especiação é fundamental preservar a ligação original entre o metal e o ligante. A combinação com outras técnicas permite uma separação mais efetiva, porém deve-se ter sempre o cuidado para não usar procedimentos mais agressivos que possam vir a quebrar a ligação original<sup>50</sup>.

A separação das proteínas plasmáticas pela cromatografia por exclusão de tamanho foi otimizada, com vistas a uma maior eficiência, que é influenciada principalmente pelo pH, força iônica da fase móvel e fluxo. Assim, um estudo dessas variáveis foi desenvolvido.

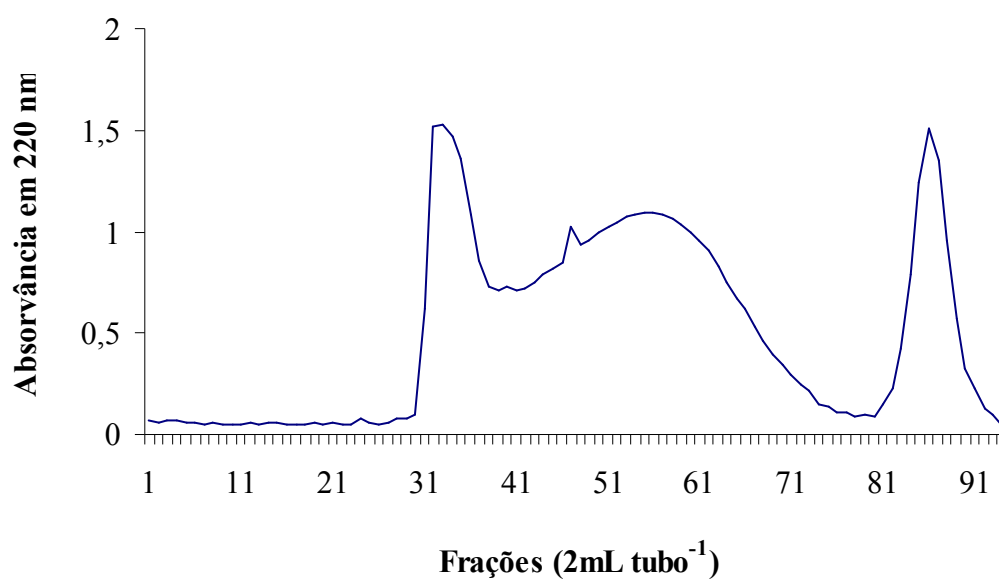
Concomitantemente, foram desenvolvidos estudos em um cromatógrafo líquido de alta pressão, HPLC, porém, os resultados não foram satisfatórios, isso porque, devido ao pequeno volume de plasma injetado, cerca de 100 µL, foi observado que a concentração do Sn presente nas frações geradas poderia permanecer abaixo do limite de detecção. Portanto, essa técnica foi inviabilizada.

Por conseqüência disso, para a separação do plasma usou-se um cromatógrafo líquido de baixa pressão, com uma coluna de gel filtração, em escala preparativa. O uso dessa escala preparativa foi importante para obtermos frações do plasma em escala suficiente para as análises subseqüentes por AAS.

Uma coluna XK 16/100, de exclusão molecular, empacotada com o gel Sepharose CL 4B, com uma faixa de fracionamento de 60 - 200000 kDa foi utilizada. Com o fluxo fixado em  $0,7 \text{ mL min}^{-1}$ ; foram injetados 2 mL de plasma diluído 1+1 em tampão. Entretanto, diferentes fases móveis foram testadas, a fim de encontrar o melhor perfil cromatográfico: 50mM Tris – HCl + 0,15mM NaCl; 50mM Tris – HCl + 30mM NaCl; 0,02M  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  + 0,30M NaCl; 50mM Tris – HCl + 30mM  $\text{NaHCO}_3$ . Todas as fases móveis avaliadas apresentaram um nítido perfil cromatográfico, entretanto, a razão da escolha do tampão 50mM Tris – HCl + 30mM  $\text{NaHCO}_3$  foi por não apresentar interferências na relação sinal/ruído na determinação por AAS, como será visto mais adiante. O volume coletado foi de 2 mL em tubos falcon.

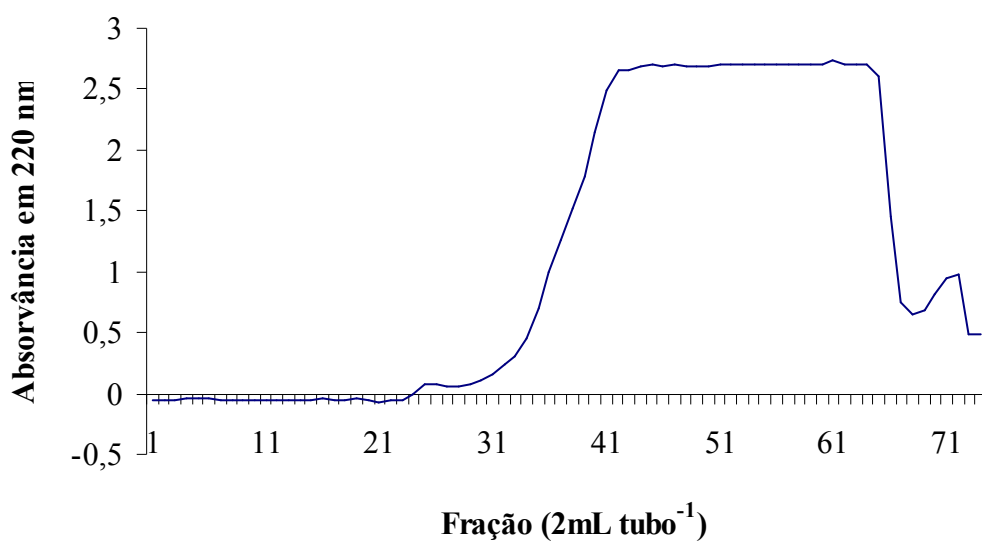
De acordo com o manual do fabricante do gel,  $0,7 \text{ mL min}^{-1}$  era o fluxo máximo permitido para não haver deformação dos poros, uma vez que um fluxo menor aumentaria o tempo de corrida e os picos seriam mais largos, tornando ambos desfavoráveis. Como o loop usado era de 2 mL, esse foi o volume injetado, enquanto que o plasma foi diluído duas vezes para evitar uma futura saturação dos poros da coluna. Por se tratar de uma coluna com uma faixa de fracionamento de médio a alto peso molecular, optou-se por coletar um volume de 2 mL, pois as frações certamente apresentariam as mesmas proteínas com um volume menor.

Para a determinação dos volumes de exclusão e inclusão total da coluna foi usado Blue Dextran 1% (m/v) e azida 0,05% (m/v), respectivamente. A figura 4 mostra a exclusão e inclusão totais, representadas por uma solução de Blue Dextran e a azida, onde o primeiro pico representa a exclusão e o segundo, a inclusão total, respectivamente.



**Figura 4:** Curva de calibração usando Blue Dextran 1% e Azida 0,05%. Primeiro pico, a partir da fração 30, representa o blue dextran e o segundo pico, a partir da fração 81, a azida. Condições do equipamento: Cromatografia Líquida de Baixa Pressão, fluxo 0,7 mL min<sup>-1</sup>,  $\lambda = 220$  nm, vol. injetado 2 mL, vol. coletado 2 mL, pH 7,4, tampão 50mM Tris – HCl + 30mM NaHCO<sub>3</sub>.

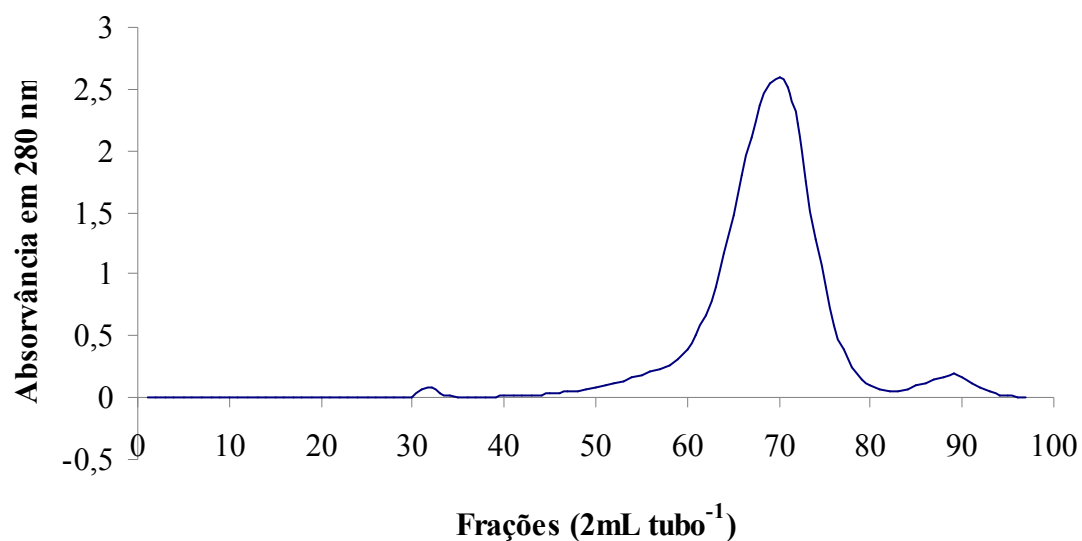
Uma amostra de plasma de um indivíduo não exposto foi injetada de acordo com as condições anteriores. Contudo, na figura 5, pode-se observar uma saturação do detector do espectrofotômetro ao ser lido em um  $\lambda = 220$  nm. Esse comprimento de onda absorve ligações peptídicas e de alguns aminoácidos, como metionina, cisteína e histidina, além de grupamentos sulfidrilas livres<sup>76</sup>.



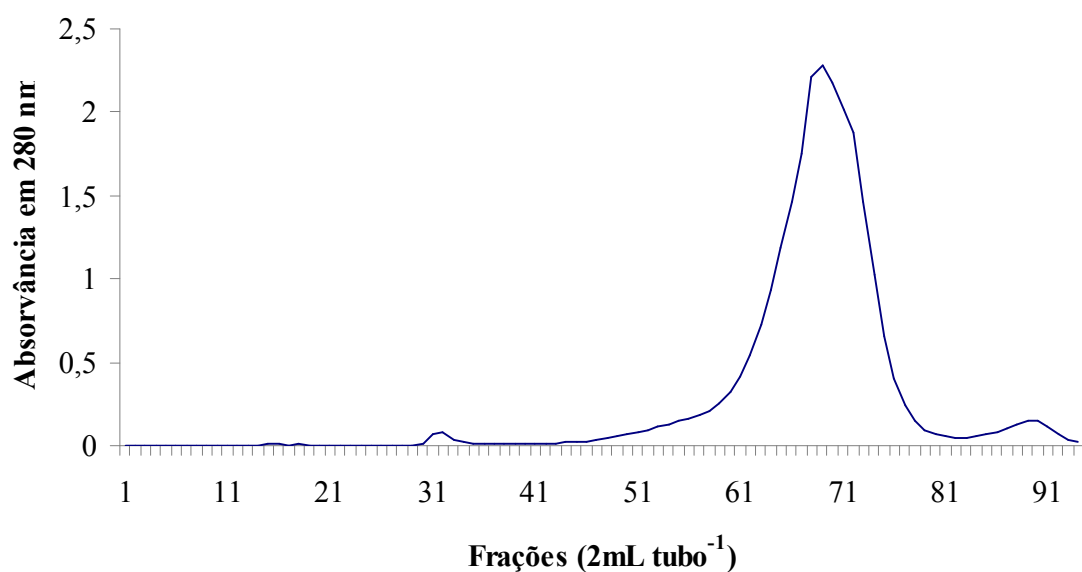
**Figura 5:** Cromatograma do plasma, em um  $\lambda = 220$  nm. Plasma de indivíduo não exposto. Condições do equipamento: Cromatografia Líquida de Baixa Pressão, fluxo  $0,7 \text{ mL min}^{-1}$ , vol. injetado 2 mL, vol. coletado 2 mL, pH 7,4, tampão 50mM Tris – HCl + 30mM  $\text{NaHCO}_3$ .

Deste modo, as frações foram absorvidas em um  $\lambda = 280$  nm, pois neste comprimento de onda apenas traduz as bandas relativas aos cromóforos das cadeias laterais<sup>76</sup>. Essas são as ligações que mais se predominam nas proteínas presentes no plasma. Assim, o perfil cromatográfico se apresentou de forma mais nítida. A maior parte das proteínas presentes no plasma formou um único pico, ente as frações 50 a 80. Um pico, menor, na inclusão e exclusão total também foi observado.

A figura 6 mostra uma amostra de plasma sem adição do metal. A figura 7 representa um plasma com adição de  $0,25 \mu\text{g mL}^{-1}$  de  $\text{SnCl}_2$ . O padrão de Sn foi preparado com Triton X-100 0,1% (v/v). Para certificar, foram testados três diferentes plasmas nas mesmas condições que apresentaram o perfil cromatográfico.



**Figura 6:** Cromatograma do plasma sem adição de  $\text{SnCl}_2$ , em um  $\lambda = 280 \text{ nm}$ . Plasma de indivíduo não exposto. Fluxo  $0,7 \text{ ml min}^{-1}$ , vol. injetado  $2 \text{ mL}$  ( $1 \text{ mL}$  plasma +  $1 \text{ mL}$  tampão), vol. coletado  $2 \text{ mL}$ , pH  $7,4$ , tampão  $50 \text{ mM}$  Tris – HCl +  $30 \text{ mM}$   $\text{NaHCO}_3$ .



**Figura 7:** Cromatograma do plasma enriquecido com  $\text{SnCl}_2$ , em um  $\lambda = 280 \text{ nm}$ . Plasma de indivíduo não exposto adicionado de  $0,25 \mu\text{g mL}^{-1}$  de cloreto de estanho. Fluxo  $0,7 \text{ mL min}^{-1}$ , vol. injetado  $2 \text{ mL}$  ( $1 \text{ mL}$  plasma +  $1 \text{ mL}$  tampão), vol. coletado  $2 \text{ mL}$ , pH  $7,4$ , tampão  $50 \text{ mM}$  Tris – HCl +  $30 \text{ mM}$   $\text{NaHCO}_3$ .

Como se pode observar pelas figuras acima, o perfil cromatográfico é semelhante para ambas as amostras injetadas. Todavia, a absorvância do plasma sem adição do analito está entre  $2,5 - 3,0$ , enquanto que o sinal do plasma enriquecido está

entre 2,0 - 2,5. Essa pequena diferença não é significativa para a definição da proteína bem como para a determinação da concentração do metal em cada fração.

A cromatografia de gel filtração realiza uma separação mecânica das proteínas, evitando sua desnaturação, porém apresenta picos largos região onde se encontram as principais proteínas presentes no plasma, como a albumina, transferrina e o complexo de imunoglobulinas. Com isso, normalmente esta técnica é usada para pré-análise, e posteriormente, outros métodos com melhor resolução são realizados, permitindo assim, uma identificação apropriada dessas proteínas<sup>32</sup>.

Após a separação do plasma, um novo estudo foi realizado para otimizar as condições com o tampão, 50mM Tris - HCl + 30mM NaHCO<sub>3</sub>, em AAS, para determinar as concentrações de Sn em cada fração coletada.

### 11.3 – Frações Plasmáticas

#### 11.3.1- Programa de temperatura

Amostra e modificador são dispensados sucessivamente, antes da inicialização do programa de temperatura. Após a etapa de secagem, foi observada a expansão da amostra devido ao aquecimento rápido do forno, levando a perda do analito antes da pirólise, uma vez que ocorre a dispersão da solução por todo o tubo ao estourar a bolha. Para evitar o viés nos resultados, inserimos uma temperatura pré-pirólise. Na tabela 5 abaixo, o programa de temperatura utilizado com êxito para a determinação de Sn em frações geradas pelo cromatógrafo.

**Tabela 5:** Programa de temperatura utilizado na determinação de Sn nas frações.

Etapa	Temperatura (°C)	Rampa (s)	“Hold” (s)	Fluxo Argônio (mL min <sup>-1</sup> )
1*	110	1	10	250
2	130	20	20	250
3	400	30	10	250
4	1400	10	10	250
5**	2100	0	5	0
6	2450	5	3	250

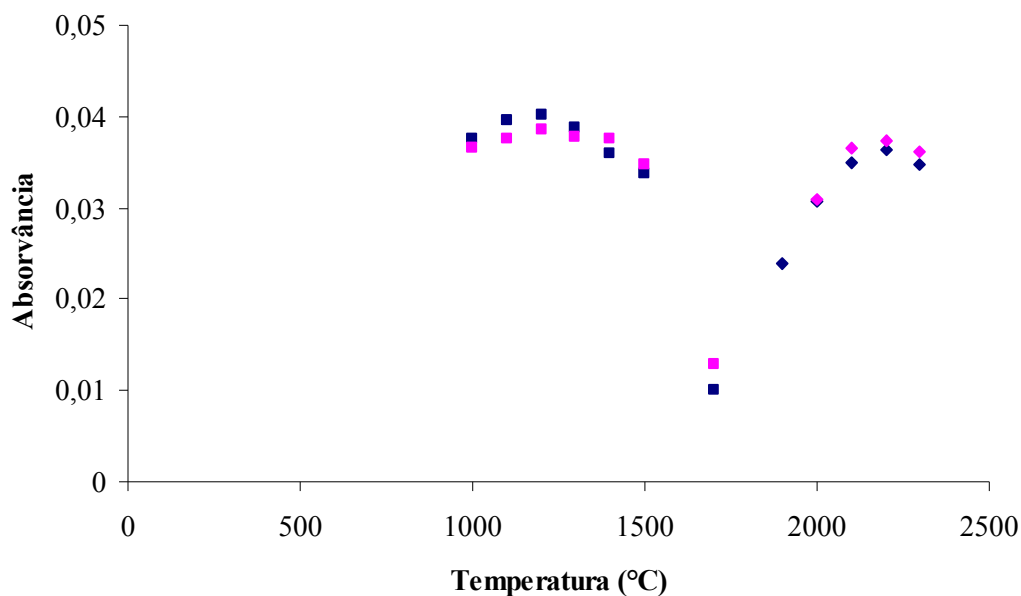
\* Introdução Modificador 10 µL + amostra 20 µL

\*\* Leitura

Uma revisão da literatura mostrou que o Tris-HCl é um dos tampões mais utilizados pela maioria dos pesquisadores na cromatografia líquida para separação de proteínas. No entanto, a presença de íons cloreto faz com que a atenuação de fundo no forno de grafite seja muito elevada<sup>77, 78</sup>. Assim, a melhor opção para diminuir íons de cloro no tubo de grafite foi substituir o NaCl, estudado anteriormente, por NaHCO<sub>3</sub>. Com isso, a relação sinal/ruído não se mostrou ruim, pois sem diluição apresentou um fundo igual a  $0,114 \pm 0,006$ . Além de encontrar dentro da capacidade de correção do efeito Zeeman, as leituras do sinal corrigido para Sn.

### 11.3.2- Curvas de pirólise e atomização

O levantamento das curvas de pirólise e de atomização para o tampão enriquecido com 500 pg de Sn (figura 8) apontou para uma temperatura ótima de pirólise igual 1400°C, enquanto que a temperatura ideal de atomização ficou em 2100°C. No teste com todas as temperaturas, o pico fecha entre 3 e 4 segundos, exceto na temperatura de atomização 1900°C e a de pirólise em 1400°C o pico fecha em 5 segundos.



**Figura 8:** Curvas de pirólise (quadrado) e de atomização (losango) para 500 pg Sn em solução aquosa (símbolo azul) e tampão 50mM Tris-HCl + 30mM NaHCO<sub>3</sub> enriquecido com 500 pg Sn (símbolo rosa). Apresentando uma temp. ótima de pirólise em 1400°C e temp. ótima de atomização em 2100°C.

### 11.3.3- Diluição

A diluição das amostras não se mostrou interessante, uma vez que algumas concentrações se encontram próximas ao limite de detecção, visto que, as frações já se encontram diluídas ao passarem pela coluna. Além de apresentar um sinal de fundo em altura igual a  $0,1141 \pm 0,0063$ , sem interferência no sinal/ruído, como foi citado anteriormente.

### 11.3.4- Massa do modificador

Massas diferentes de nitrato de paládio juntamente com nitrato de magnésio em 10  $\mu\text{L}$  de solução foram avaliadas através das sensibilidades alcançadas pelas curvas analíticas, geradas pelas diferentes massas de modificador investigadas.

Neste estudo, foram investigadas três massas (em  $\mu\text{g}$ ) para Pd + Mg: 30 + 20, 15 + 10 e 10 + 5, para estudar a influência da concentração de modificador sobre a massa característica. Os volumes injetados no tubo de grafite foram sempre os mesmos, 20  $\mu\text{L}$  da amostra e uma alíquota de 10  $\mu\text{L}$  de modificador contendo a massa estudada. Três pontos de calibração com concentrações iguais a 2,5; 5 e 10  $\mu\text{g L}^{-1}$  foram utilizados, uma vez que se desejava tão somente um estudo comparativo de sensibilidades. Este estudo foi realizado em meio aquoso e na presença do tampão. A tabela 6 mostra uma avaliação das massas características obtidas por diferentes massas de modificador nas curvas aquosas e na matriz, respectivamente.

**Tabela 6:** Avaliação das massas características, nas curvas aquosa e no tampão, utilizando-se diferentes massas de modificador.

<b>Massa do Modificador Pd/Mg (<math>\mu\text{g}</math>)</b>	<b>Massa Característica Curva Aquosa <math>\text{HNO}_3</math> 0,2% (pg)</b>	<b>Massa Característica do Tampão (pg)</b>
10 + 5	61,1	62,0
15 + 10	68,8	69,3
30 + 20	77,2	73,9

Volume de injeção da amostra = 20 $\mu\text{L}$ ; modificador: Pd e  $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$  = 10 $\mu\text{L}$ ;  $T_P$  = 1400°C;  $T_A$  = 2100°C. Sem diluição.

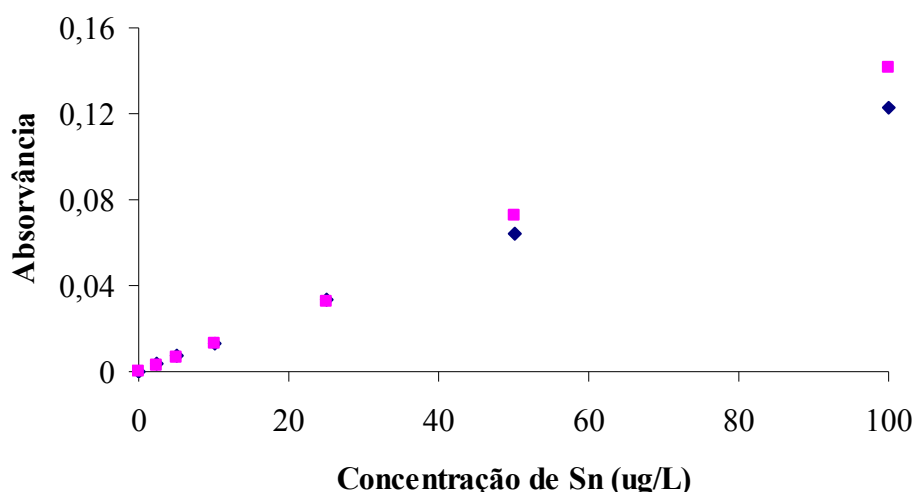
O estudo da massa característica no tampão não apresentou sensibilidades semelhantes entre as diferentes massas de modificadores analisadas, como foi



determinado no estudo no plasma. O desvio padrão para a curva aquosa foi de 21% e para a curva no tampão foi de 16%. Sabendo-se que a menor  $m_0$  representa uma melhor sensibilidade, a massa  $10 + 5 \mu\text{g}$  de paládio e magnésio, respectivamente, foi a melhor opção. Além disso, pode-se afirmar que o modificador de Pd/Mg é apto a reduzir a absorção de fundo.

### 11.3.5- Linearidade

Neste estudo, foram utilizadas seis soluções de calibração, nas concentrações 2,5; 5; 10; 25; 50; 100  $\mu\text{g Sn L}^{-1}$ , tendo como objetivo verificar a linearidade através das inclinações encontradas. A figura 9 apresenta a inclinação para a curva aquosa e no tampão.



**Figura 9:** Curvas de adição de analito em ambas as matrizes, na faixa de 2,5 a 100  $\mu\text{g.L}^{-1}$ ; Curva aquosa ( $\blacklozenge$ ) e curva no tampão 50mM Tris-HCl + 30mM  $\text{NaHCO}_3$  ( $\blacksquare$ ). Vol. de injeção = 20 $\mu\text{L}$ ; modificador: 10  $\mu\text{g Pd} + 5 \mu\text{g Mg}(\text{NO}_3)_2$  em 10 $\mu\text{L}$ ;  $T_p = 1400^\circ\text{C}$ ;  $T_A = 2100^\circ\text{C}$ . Amostras sem diluição.

A curva aquosa se mostrou linear até o ponto de 50  $\mu\text{g L}^{-1}$ , enquanto que a curva no tampão permaneceu linear até a concentração de 25  $\mu\text{g L}^{-1}$ , para ambos, foi aplicado o teste  $t$  Student e 95% de grau de confiança. Entretanto, houve uma diferença significativa na linearidade e no grau de curvatura para concentrações mais elevadas de Sn, para o tampão, cerca de 17% para as faixas de 25 a 50  $\mu\text{g L}^{-1}$  e entre as faixas de 50 a 100  $\mu\text{g.L}^{-1}$  o desvio de linearidade foi de 15%. Contudo, na curva aquosa a faixa de concentração 25 a 50  $\mu\text{g L}^{-1}$  apresentou um desvio padrão de 5% e para a faixa de 50 a 100  $\mu\text{g L}^{-1}$  se mostrou com um desvio de 7%.

### 11.3.6- Massa Característica e Razão de Sensibilidades

A sensibilidade foi avaliada pela média, calculada entre dias, das massas características ( $m_0$ ) relativas às curvas aquosa e no tampão, com adição de analito (iSn), como mostra a tabela 7. O efeito da matriz foi avaliado pela razão de sensibilidades ( $m_{0aq} / m_{0m}$ ) entre as massas características obtidas pela curva aquosa e a curva na matriz adicionada com padrão de Sn.

**Tabela 7:** Massa característica e razão de sensibilidades para as curvas aquosa e no tampão.

<b>Matriz</b>	<b>Razão de Sensibilidades (<math>m_{0aq}/m_{0m}</math>)</b>	<b>Massa Característica (pg)</b>
HNO <sub>3</sub> 0,2% (v/v)	-	64,0 ± 2,8
Tampão	0,99	64,6 ± 2,4

Vol. de injeção da amostra = 20µL; modificador: Pd e Mg(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> = 10µL; T<sub>p</sub> = 1400°C; T<sub>A</sub> = 2100°C. Sem diluição.

Pode-se observar uma notável semelhança entre as sensibilidades das curvas na matriz e no meio aquoso, uma vez que as razões se aproximaram de 1,00, de acordo com o teste *t* de Student (95% de confiança). Sugerindo que não há interferência e a calibração externa com soluções aquosas é adequada.

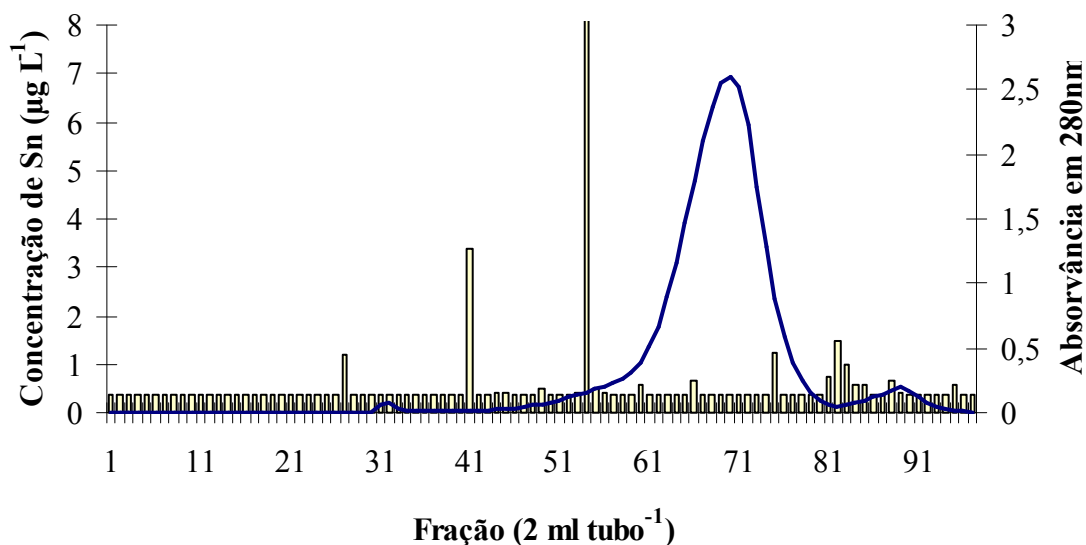
### 11.3.7- Limite de detecção e quantificação

O limite de detecção e quantificação, calculado para a determinação de Sn em tampão, foi obtido a partir da leitura de dez frações de uma mesma fase móvel sem sinal detectável do metal. O valor encontrado para LD foi de 0,38 µg L<sup>-1</sup> e para LQ foi de 1,27 µg L<sup>-1</sup> de Sn nas frações eluídas sem diluição, mostrando que o método proposto pode ser usado para análise das frações de plasma de populações expostas a este analito.

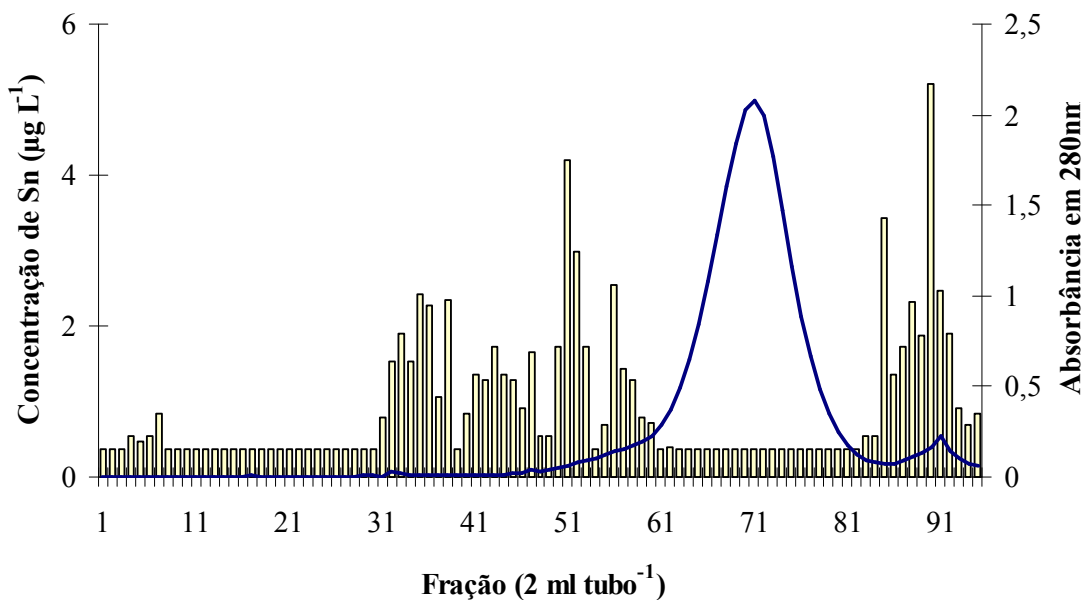
### 11.4- Determinação do Sn nas frações plasmáticas

De acordo com a metodologia desenvolvida para a separação das proteínas e determinação do Sn com o tampão 50mM Tris-HCl + 30mM NaHCO<sub>3</sub>, foram injetados

plasmas de um indivíduo não exposto sem adição do metal (Figura 10) e o mesmo plasma enriquecido com 250 ng de Sn (Figura 11).



**Figura 10:** Cromatograma das frações plasmáticas de indivíduo não exposto. Fluxo 0,7 mL min<sup>-1</sup>,  $\lambda = 280$  nm, vol. injetado 2 mL, plasma dil 2X no tampão 50mM Tris – HCl + 30mM NaHCO<sub>3</sub>, pH 7,4, vol. coletado 2 ml. ET AAS - 800: T<sub>P</sub> = 1400°C, T<sub>A</sub> = 2100°C, sem diluição.



**Figura 11:** Cromatograma das frações plasmáticas de indivíduo não exposto enriquecido com 250 ng de Sn. Recuperação de 90%, determinada pelo somatório do conteúdo de Sn nas frações coletadas após leitura por ETAAS. Fluxo 0,7 mL min<sup>-1</sup>,  $\lambda = 280$  nm, vol. injetado 2 mL, plasma dil 2X no tampão 50mM Tris – HCl + 30mM NaHCO<sub>3</sub>, pH 7,4, vol. coletado 2 ml. T<sub>P</sub> = 1400°C, T<sub>A</sub> = 2100°C, fração plasmática sem diluição.

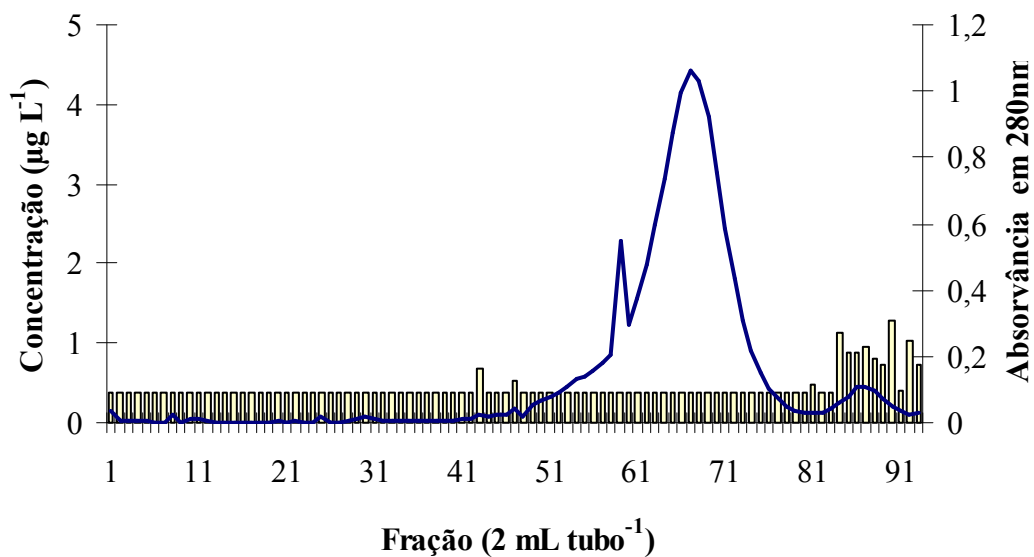
Após a leitura por ET AAS das frações do plasma adicionado, houve uma recuperação de aproximadamente 90%, significando que pode haver adsorção do metal na coluna ou um erro na pipetagem. Para o plasma sem adição, os picos apresentados podem ser resultado de uma possível contaminação, enquanto que, o Sn presente no plasma enriquecido, se mostrou presente nas frações de exclusão total, indicando as proteínas de alto peso molecular e também se apresentou nas frações de inclusão total, apontando as proteínas de baixo peso.

A localização do Sn nas frações eluídas se mostrou diferente no plasma enriquecido com padrão de SnCl<sub>2</sub> e naqueles de trabalhadores expostos à SnO<sub>2</sub>. Três fatores podem ter interferido nessa diferença tais como a massa adicionada ser 100 vezes maior do que a encontrada, o composto do metal adicionado ser diferente daquele em que o trabalhador se expõe e o tipo de ligação do Sn adicionado ser diferente daquele em meio biológico.

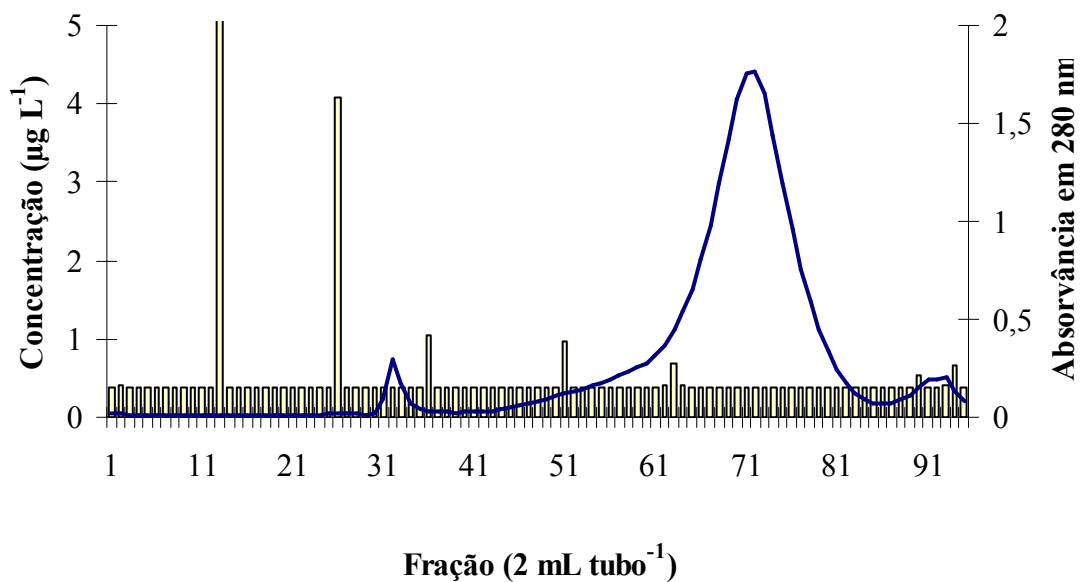
Quando se adiciona uma massa cem vezes maior do que aquela naturalmente encontrada em pessoas ocupacionalmente expostas, a probabilidade dos sítios de ligação das proteínas que estejam disponíveis, serem então ocupados devido ao excesso de metal disposto no meio. Em razão da falta de um valor de referência, a massa adicionada no plasma foi 100 vezes maior que uma amostra real. Em relação à diferença entre a espécie adicionada (SnCl<sub>2</sub>) e a espécie encontrada ambientalmente (SnO<sub>2</sub>), proporcionou ligações do metal em diferentes frações, isso devido à diferença na toxicocinética de cada espécie, e vale lembrar que, se trata de análises *in vitro* e *in vivo*.

Durante o desenvolvimento da metodologia, o volume de injeção foi igual a 2 mL. Contudo, o volume de plasma disponível não alcançou 2 ml, chegando, no máximo, até 1,5 mL. Porém, no decorrer das análises, foi observado que essa variação no volume injetado não alterava o perfil cromatográfico. Dos seis plasmas coletados, os três primeiros analisados foram injetados diluídos duas vezes no tampão, como desenvolvido na metodologia, e as últimas três amostras foram injetadas sem diluição, para assim conseguir melhor observar o Sn nas frações, já que se tratava de um plasma com uma concentração menor de metal do que a matriz estudada.

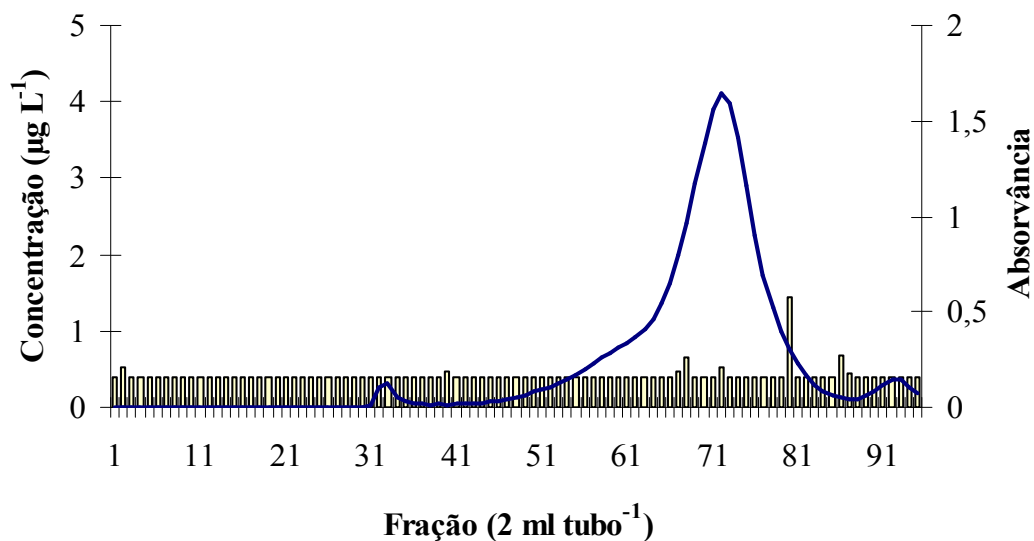
As figuras 12, 13, 14, 15, 16 e 17 apresentam os plasmas dos trabalhadores expostos à cassiterita, com Sn determinado por AAS, de acordo com a metodologia desenvolvida para a separação das proteínas e determinação do metal.



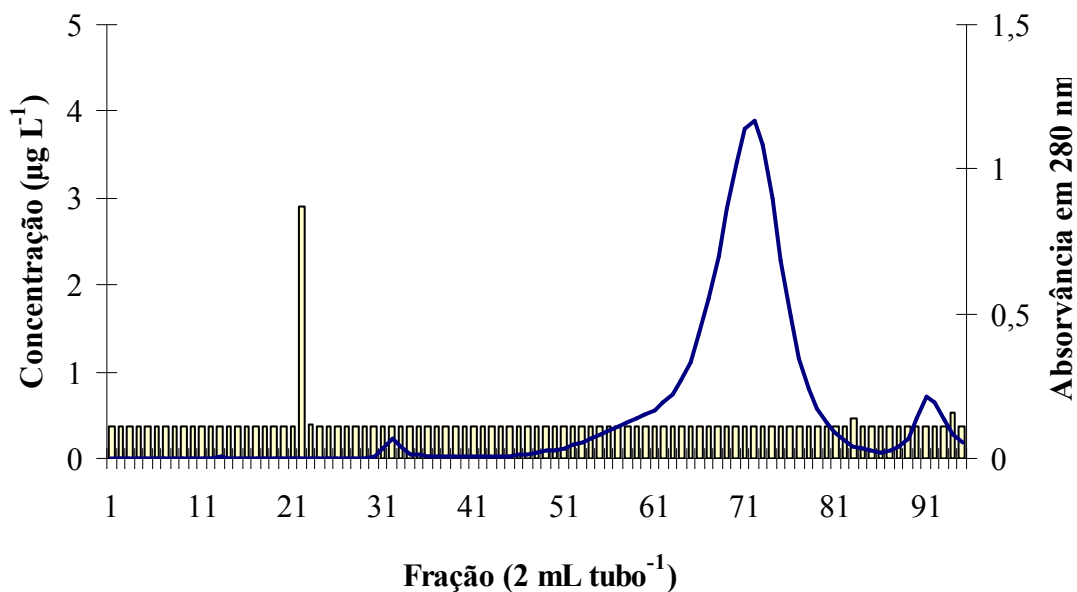
**Figura 12:** Cromatograma de trabalhador exposto. Amostra 01:  $[Sn] = 3,90 \mu\text{g L}^{-1}$ . Vol. de plasma injetado: 700  $\mu\text{l}$ ; fluxo: 0,7  $\text{ml min}^{-1}$ ;  $\lambda = 280 \text{ nm}$ , plasma dil 2X no tampão 50mM Tris – HCl + 30mM  $\text{NaHCO}_3$ ; pH 7,4; vol. coletado: 2 ml.  $T_p = 1400^\circ\text{C}$ ,  $T_A = 2100^\circ\text{C}$ , fração plasmática sem diluição.



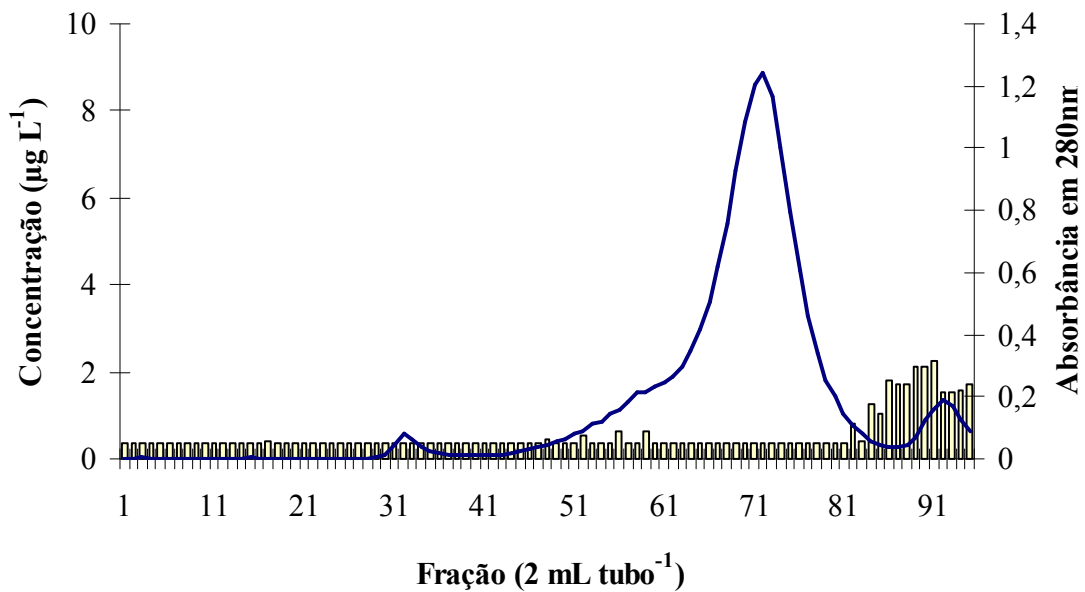
**Figura 13:** Cromatograma de trabalhador exposto. Amostra 02:  $[Sn] = 3,59 \mu\text{g L}^{-1}$ . Vol. de plasma injetado: 1000  $\mu\text{l}$ ; fluxo: 0,7  $\text{ml min}^{-1}$ ;  $\lambda = 280 \text{ nm}$ , plasma dil 2X no tampão 50mM Tris – HCl + 30mM  $\text{NaHCO}_3$ ; pH: 7,4; vol. Coletado: 2 ml.  $T_p = 1400^\circ\text{C}$ ,  $T_A = 2100^\circ\text{C}$ , fração plasmática sem diluição.



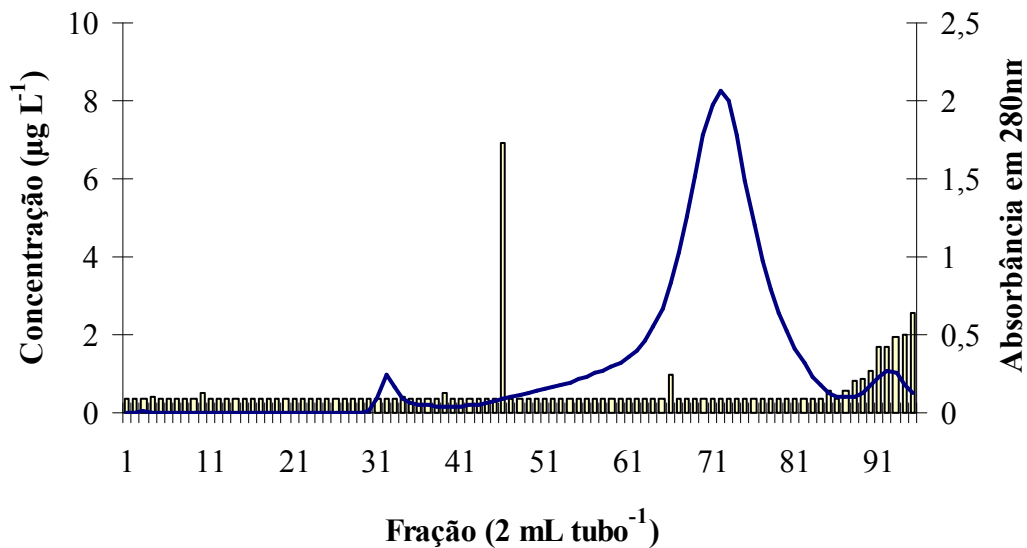
**Figura 14:** Cromatograma de trabalhador exposto. Amostra 03: [Sn] = 3,28 µg L<sup>-1</sup>. Vol. de plasma injetado; 1500 µl; fluxo: 0,7 ml min<sup>-1</sup>; λ = 280 nm; plasma dil 2X no tampão 50mM Tris – HCl + 30mM NaHCO<sub>3</sub>; pH: 7,4; vol. coletado: 2 ml. T<sub>p</sub> = 1400°C, T<sub>A</sub> = 2100°C, fração plasmática sem diluição.



**Figura 15:** Cromatograma de trabalhador exposto. Amostra 04: [Sn] = 3,59 µg L<sup>-1</sup>. Vol. de plasma injetado; 500 µl; fluxo: 0,7 ml min<sup>-1</sup>; λ = 280 nm; plasma não diluído no tampão 50mM Tris – HCl + 30mM NaHCO<sub>3</sub>; pH: 7,4; vol. coletado 2 ml. T<sub>p</sub> = 1400°C, T<sub>A</sub> = 2100°C, fração plasmática sem diluição.



**Figura 16:** Cromatograma de trabalhador exposto. Amostra 05: [Sn] = 2,98 µg L<sup>-1</sup>. Vol. de plasma injetado 700 µl; fluxo 0,7 ml min<sup>-1</sup>; λ = 280 nm; plasma não diluído no tampão 50mM Tris – HCl + 30mM NaHCO<sub>3</sub>; pH: 7,4; vol. coletado: 2 ml. T<sub>p</sub> = 1400°C, T<sub>A</sub> = 2100°C, fração plasmática sem diluição.



**Figura 17:** Cromatograma de trabalhador exposto. Amostra 06: [Sn] = 3,77 µg L<sup>-1</sup>. Vol. de plasma injetado: 1000 µl; fluxo: 0,7 ml min<sup>-1</sup>; λ = 280 nm; plasma não diluído no tampão 50mM Tris – HCl + 30mM NaHCO<sub>3</sub>; pH: 7,4; vol. coletado: 2 ml. T<sub>p</sub> = 1400°C, T<sub>A</sub> = 2100°C, fração plasmática sem diluição.

Pode-se dizer que, dos seis plasmas analisados, três não apresentaram Sn nas frações. Possivelmente, os picos expostos, se tratam de contaminação, já que alguns

desses picos se mostraram presentes no volume morto. A falta de detecção do metal, talvez se deve à baixa concentração de Sn no plasma, ou à falta de sensibilidade do equipamento. Já nas outras três amostras, o Sn se mostra presente na inclusão total, referindo-se às frações 85 a 95, correspondendo às proteínas de menor massa molecular.

### 11.5- Eletroforese

A resolução de colunas de gel filtração preparativas é baixa, separando as proteínas por faixas de peso molecular. Esse tipo de coluna, freqüentemente é usada para primeira abordagem, assim, seria necessário submeter a uma cromatografia de alta resolução, como a de troca-iônica e fase reversa, porém é possível o deslocamento do metal da proteína<sup>33</sup>.

Para tentar esclarecer quais as proteínas presentes nas frações onde aparece o Sn, foi usada a eletroforese do tipo SDS-PAGE, que permite uma avaliação mais precisa do peso molecular das proteínas.

A incubação das amostras na presença de SDS normaliza a carga e a forma das proteínas, de modo que o elemento de distinção entre estes passa a ser o peso molecular (PM). O agente redutor  $\beta$ -mercaptoetanol, ao romper as fontes de dissulfeto presentes em boa parte das proteínas, torna o acesso do SDS mais facilitado às partes internas das proteínas. O uso desta técnica permite a determinação dos PM de polipeptídeos<sup>62</sup>. Foram feitos dois tipos de análises, com e sem  $\beta$ -mercaptoetanol, para avaliar se as frações com Sn tinham proteínas com mais de uma sub-unidade.

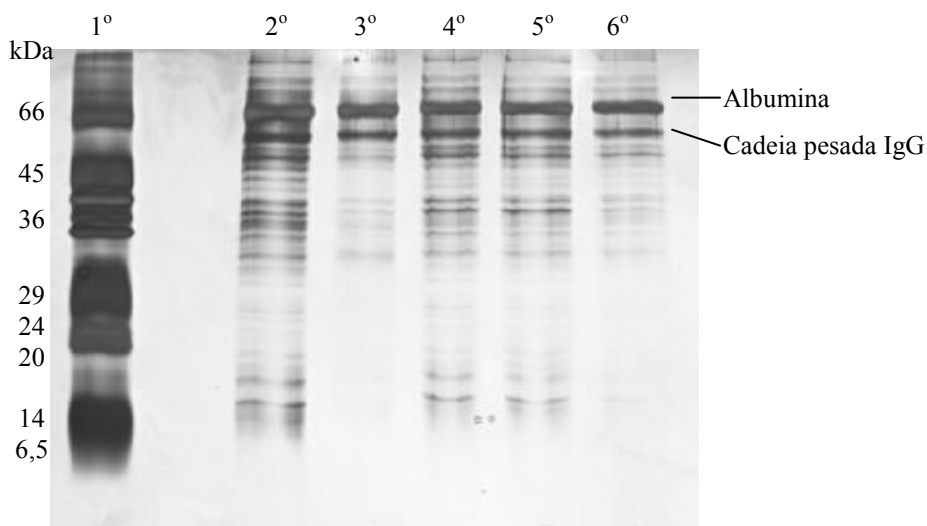
As densidades de géis estudadas foram 12 e 15%, com uma faixa de fracionamento de proteínas variável. Foram discernidas as frações da amostra 1 que apresentaram Sn, entre 84 a 93. Dois tipos de estudos foram realizados, as figuras 18A e 18B representam os géis com  $\beta$ -mercaptoetanol presente nas frações, gel com densidade de 15% e um padrão de proteína de intervalos entre 6,5 – 66 kDa. As figuras 19A e 19B representam os géis sem o agente redutor nas frações, gel com densidade 12% e um padrão de proteínas de MM = 6,5 a 200 kDa, pré-corado da BioRad.

Primeiramente o gel foi corado com Comassie Blue, porém a revelação não foi satisfatória. A concentração das frações no Speed Vac não resolveu o problema, desta maneira, foi necessária a coloração por  $\text{AgNO}_3$ . Devido a essa mudança de corante no mesmo gel, o padrão de PM das proteínas das figuras 18A e 18B se mostrou muito

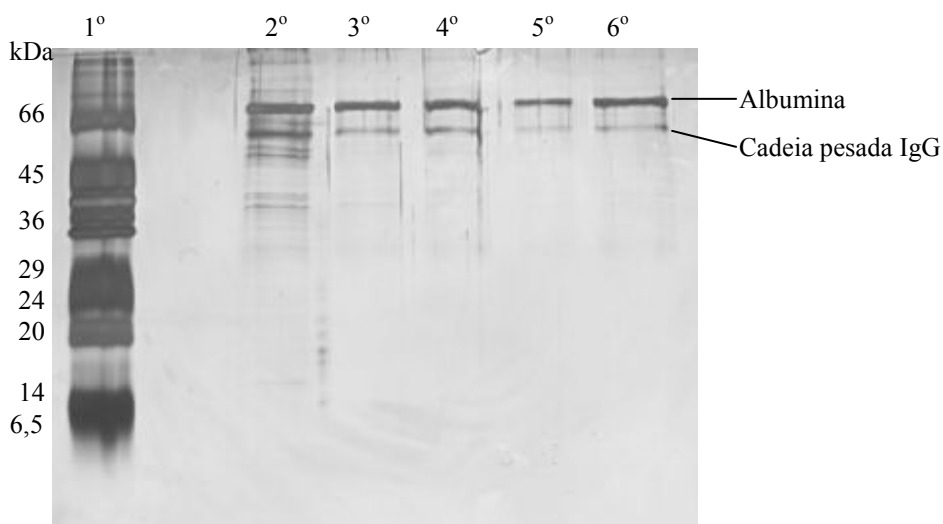


concentrado. Contudo, nos géis mostrados nas figuras 19A e 19B, o padrão de PM foi preparado para a coloração por  $\text{AgNO}_3$ .

Na figura 18A, no primeiro poço foi aplicado o padrão de PM, do 2º ao 6º poço foram aplicadas são as frações entre 84 a 88, respectivamente. Na figura 18B o primeiro poço também representa o padrão de proteínas e do 2º ao 6º poço as frações entre 89 a 93, respectivamente. Nos géis mostrados nas figuras 19A e 19B as frações foram aplicadas na mesma ordem.



**Figura 18A:** Gel com agente redutor  $\beta$ -mercaptoetanol, corado com  $\text{AgNO}_3$ , densidade 15% e padrão de proteínas de baixo PM (6,5 – 66 kDa). 1º poço padrão, da 2º ao 6º poço representam as frações 84 a 88, respectivamente, da amostra 1.

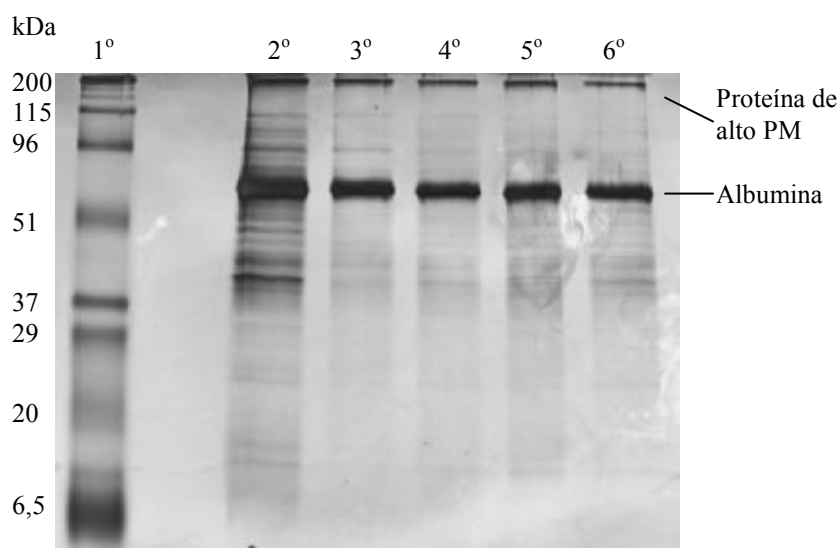


**Figura 18B:** Gel com agente redutor  $\beta$ -mercaptoetanol, corado com  $\text{AgNO}_3$ , densidade 15% e padrão de proteínas de baixo PM (6,5 – 66 kDa). 1º poço padrão, da 2º ao 6º poço representam as frações 89 a 93, respectivamente, da amostra 1.

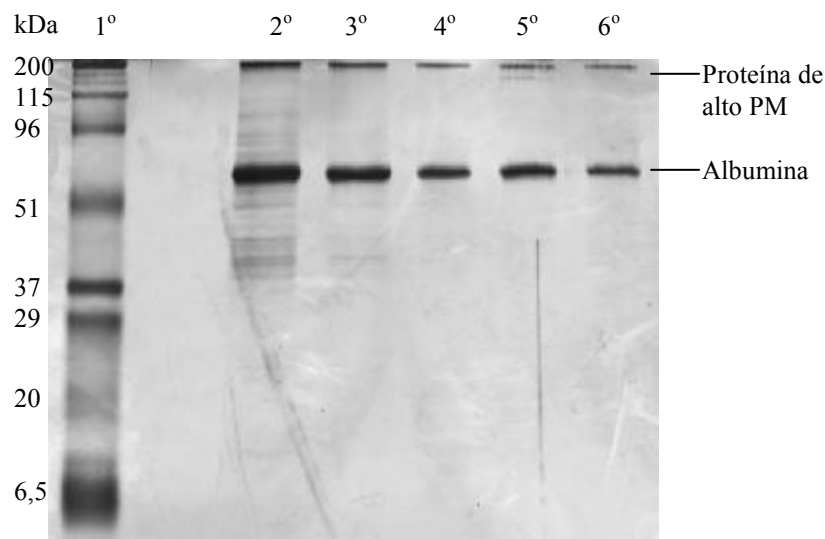
A análise desses géis demonstra que há um grande número de proteínas diferentes nas frações iniciais (84-88), com bandas de 85, 77, 71, 66, 63, 57, 53, 51, 48, 46, 43, 39, 37, 35, 33, 33, 30, 16 e 15 kDa. A medida que as frações caminham para a inclusão total, a variedade de bandas diminui. Possivelmente as bandas de menor PM fazem parte de proteínas formadas por mais de uma subunidade.

A banda principal em todas as frações tem peso molecular de 66 kDa, que em amostras de plasma humano corresponde a soro albumina. Essa é a principal proteína plasmática, correspondendo a cerca de 60% da proteína total presente nesse fluido<sup>79</sup>.

Além da soro albumina, outra banda presente em todas as frações apresenta PM de 57 kDa. Essa banda está relacionada a cadeia pesada das imunoglobulinas, segunda maior fração das proteínas plasmáticas<sup>79</sup>.



**Figura 19A:** Gel sem agente redutor  $\beta$ -mercaptoetanol, corado com  $\text{AgNO}_3$ , densidade 12% e padrão de proteínas de MM = 6,5 – 200 kDa. 1ª banda padrão, da 2ª a 6ª banda representam as frações 84 a 88, respectivamente, da amostra 1.



**Figura 19B:** Gel sem agente redutor  $\beta$ -mercaptoetanol, corado com  $\text{AgNO}_3$ , densidade 12% e padrão de proteínas de  $\text{MM} = 6,5 - 200$  kDa. 1º poço padrão, da 2º ao 6º poço representam as frações 89 a 93, respectivamente, da amostra 1.

A análise das mesmas frações em condições não redutoras, mostradas nas figuras 19A e 19B, demonstrou uma redução significativa nas bandas de menor peso molecular, e um aumento da fração de alto peso, apresentando bandas de 92, 112 e 193 kDa, isso devido a baixa resolução da coluna.

A banda de alto PM, possivelmente, representa frações de imunoglobulinas<sup>79</sup>. Estas bandas se mostraram de forma agregada, isso porque não houve fragmentação da proteína devido à ausência do agente redutor  $\beta$ -mercaptoetanol, impossibilitando sua migração. A banda representando a albumina, mais uma vez se torna presente nitidamente.

De acordo com a literatura, o Sn (IV) se encontra ligado a importantes ligantes biológicos de baixo PM<sup>18</sup>. Possivelmente, o Sn está ligado também à metalotioneínas, já que se trata de uma proteína que desempenha a detoxificação dos metais não essenciais<sup>80</sup>. Entretanto, a separação de proteínas de baixo PM, pelo método cromatográfico desenvolvido, não é possível, devido à baixa resolução. Seria necessária uma coluna com uma faixa de fracionamento menor, para aumentar a resolução. Esse tipo de coluna, no entanto, tem uma capacidade menor, levando a uma redução do volume injetado, o que dificultaria a determinação do Sn por AAS.

Não é possível afirmar se o metal estava ou não ligado a essas proteínas, uma vez que ele foi observado na inclusão total. Essa observação reforça a necessidade de mais experimentos para confirmar a ligação do Sn à proteína.

## 12- Conclusão

A determinação de Sn em plasma humano foi um trabalho analítico complexo. O desenvolvimento dessa metodologia foi uma tarefa difícil, devido aos níveis basais do elemento nos plasmas dos trabalhadores expostos à cassiterita,  $< 3,5 \mu\text{g L}^{-1}$ . Além disso, essa concentração ainda era diluída ao ser fracionada pela coluna cromatográfica. Apesar de todas as dificuldades, a metodologia foi desenvolvida com êxito. O metal foi determinado por ET AAS, tanto no plasma, como nas frações, e para o processo de separação das proteínas foi utilizada cromatografia líquida de baixa pressão, com uma coluna de gel filtração.

As temperaturas ótimas de pirólise ( $1400^{\circ}\text{C}$ ) e de atomização ( $2200^{\circ}\text{C}$ ) para as amostras de plasma e padrão aquoso foram as mesmas. A curva analítica no plasma se manteve linear até  $200 \mu\text{g L}^{-1}$ . As massas de modificadores estudadas apresentaram uma sensibilidade semelhante, assim, a massa de  $10 \mu\text{g}$  de Pd e  $5 \mu\text{g}$  de  $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$  foi eleita, por utilizar um menor volume da solução, em razão ao alto custo. A diluição do plasma em Triton X-100 0,1% (v/v) se mostrou a melhor alternativa entre as pesquisadas, pois além de ser usado como diluente do sangue e seus derivados, diminui a tensão superficial e facilita assim a pipetagem. Já a diluição 4 + 1 do plasma se mostrou mais eficiente, pois possibilitou uma diminuição do fundo, sem comprometer a razão de sensibilidades e o limite de detecção. O limite de detecção encontrado foi de  $1,4 \pm 0,2 \mu\text{g Sn L}^{-1}$  e o limite de quantificação obtido foi de  $4,8 \pm 0,7 \mu\text{g Sn L}^{-1}$ . Mesmo se tratando de uma matriz complexa, as sensibilidades foram semelhantes entre as matrizes aquosa e no plasma, assim, a calibração pode ser realizada através da curva aquosa. E o método se mostrou exato.

A análise do plasma dos trabalhadores expostos ocupacionalmente mostrou elevados teores de Sn total,  $\bar{x} = 3,5 \mu\text{g Sn L}^{-1}$ . Infelizmente, não existe um valor de referência para este metal. Porém, a comparação à população ambientalmente exposta evidencia essa diferença, apresentando-se 4,3 vezes menor do que a encontrada na população de trabalhadores. Além do setor de produção da indústria apresentar uma concentração de Sn maior do que aquela existente no ambiente da vila, a via de exposição, assim como, o tipo de composto também são importantes.

O uso da cromatografia de baixa pressão por gel filtração, em uma coluna de 1m de altura, empacotada com Sepharose CL-4B, para a separação das proteínas do plasma,

permitiu uma excelente recuperação de Sn nas frações eluídas, além de ser uma técnica que contribui para a preservação da forma nativa das proteínas. Contudo, existem fatores que impedem que apenas esta técnica seja utilizada para a análise de especiação, como a baixa resolução, que não permitiu uma identificação apropriada. Por isso, esta técnica é usada para análise preliminar, e posteriormente, outras com melhor resolução são empregadas.

A fase móvel escolhida foi 50 mM Tris-HCl + 30 mM NaHCO<sub>3</sub>, pH 7,4 para manter o pH fisiológico, o fluxo foi 0,7 mL min<sup>-1</sup> e o volume coletado foi 2 mL/fração. O plasma para injeção sofreu diluição de 1 + 1 com o tampão, porém, devido à baixa concentração de Sn encontrada no plasma dos trabalhadores, três amostras não sofreram diluição, contudo, não alterou o perfil cromatográfico. Além disso, o volume de injeção da amostra variou de 500 a 1500 µL, também não havendo alteração do cromatograma.

A determinação do Sn nas frações levou a uma otimização das condições analíticas, por ET AAS. A temperatura ótima de pirólise se mostrou como no plasma, 1400°C, entretanto, a temperatura ótima de atomização foi de 2100°C. As frações não sofreram diluição, e o sinal de fundo se apresentou numa faixa de absorvância aceitável para um corretor com efeito Zeeman. A curva no tampão permaneceu linear até a concentração de 25 µg L<sup>-1</sup>. A massa de 10 µg de Pd e 5 µg de Mg(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> apresentou uma sensibilidade melhor nas leituras das frações. Além disso, pode-se observar uma notável semelhança entre as sensibilidades das curvas na matriz e no meio aquoso. O valor encontrado para LD foi de 0,38 µg L<sup>-1</sup> e para LQ foi de 1,27 µg L<sup>-1</sup> de Sn nas frações eluídas.

O Sn apareceu no final da corrida, próximo a faixa de inclusão total. A análise dessas frações por SDS PAGE demonstrou a presença das principais proteínas plasmáticas, albumina e imunoglobulinas, além de proteínas de menor peso molecular.

Como o Sn foi encontrado próximo a inclusão total, não é possível afirmar se ele se encontra ligado ou livre, já que se trata de um composto de baixo peso molecular. A identificação do complexo metal-proteína não é possível apenas com técnicas de separação e determinação do metal. Essa ligação metal-proteína só pode ser confirmada através de métodos analíticos que apresentam a identificação seletiva da massa de proteína com o peso do metal.

Nenhum trabalho foi encontrado no desenvolvimento de uma metodologia analítica para a especiação de Sn em plasma humano. Entretanto, os estudos

encontrados para esse tipo de análise, se tratavam do alumínio, manganês, arsênio, mercúrio e chumbo, em matrizes biológicas semelhantes ao plasma.

Apesar das técnicas utilizadas realizarem a separação protéica e determinação do metal, existem outras com melhor resolução e sensibilidade. Diante disso, sugerimos as técnicas hífenadas, que permitem a separação e determinação, como a LC-ICP-MS, e na identificação do complexo metal-proteína, o Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization - Time Of Flight Mass Spectrometry.

### 13- Referências Bibliográficas

- 1- Moreira FR, Moreira JC. **A importância da análise de especiação do chumbo em plasma para a avaliação dos riscos à saúde.** Química Nova. Vol. 27(2), p. 251-260, 2004.
- 2- Shona McSheehy, Zoltan Mester. **The speciation of natural tissues by electrospray-mass spectrometry. I: Biosynthesized species, As and Se.** Trends in Analytical Chemistry, Vol. 22, No. 4, 2003
- 3- Oliveira RC. **Avaliação do movimento de cádmio, chumbo e zinco em solo tratado com resíduo calcário.** Dissertação de Mestrado. Programa de Pós-Graduação em Agronomia. Universidade Federal de Lavras. 2003.
- 4- Carlos A. L. Filgueiras. **A nova química do estanho.** Química Nova, v. 2, p. 21, 1998.
- 5 - Toxicological Profile for Tin and Tin Compounds. U.S. Department Of Health And Human Services. Public Health Service Agency for Toxic Substances and Disease Registry, August 2005.
- 6- IPCS. Tin and tin compounds. Geneva, Internatinal Programme of Chemical Safety (documento 65). 2005.
- 7- Tsalev, D. L., Zaprianov, Z.K.. **Atomic absorption spectrometry in occupational and environmental health practice.** V. 1, p. 201, 2000.
- 8- [http://www.ff.up.pt/toxicologia/monografias/ano0708/g14\\_estanho/site.swf](http://www.ff.up.pt/toxicologia/monografias/ano0708/g14_estanho/site.swf), acessado em 12 de fevereiro de 2009.
- 9- Bente Westrum and Yngvar Thomassen. **Tin and inorganic tin compounds.** The Nordic Expert Group for Criteria Documentation of Health Risks from Chemicals and The Dutch Expert Committee on Occupational Standards, 2002.
- 10- Bernhard Michalke. **Element speciation definitions, analytical methodology, and some examples.** Ecotoxicology and Environmental Safety, p. 122–139, vol. 56, 2003.
- 11- Washington, D.C. **Atenção Primária Ambiental (Apa).** Organização Pan-Americana da Saúde Divisão de Saúde e Ambiente Programa de Qualidade Ambiental. Junho 1999.
- 12- Citterio, S., Prato, N., Fumagalli, P., Aina, R., Massa, N., Santagostino, A., Sgorbati, S., Berta, G., 2005. **The arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus mosseae* induces growth and metal accumulation changes in *Cannabis sativa* L.** Chemosphere 59, p. 21-29.



- 13- OIT (1999). Organização Internacional do Trabalho. Programa de Atividades Sectoriais. **Los problemas Sociales y laborales en las explotaciones mineras pequeñas**. Ginebra.
- 14- DAI - Divisão de Atos Internacionais, <http://www2.mre.gov.br/dai/sur001.htm>, acessado em 29/03/2010.
- 15- Wanderley Rodrigues Bastos. Modelo do projeto: **Avaliação de risco para a saúde das populações expostas as alterações ambientais causadas pelas atividades antropogênicas na bacia do rio Jamari –Ro**. 2006.
- 16- Anna Kotrikla. **Environmental management aspects for TBT antifouling wastes from the shipyards**. Journal of Environmental Management, v. 90, p. S77–S85, 2009.
- 17- Geraldo Magela de Lima. **Síntese e caracterização de compostos organometálicos de estanho (IV)**. Química Nova, vol. 22, n.2, 1999.
- 18- Mala Nath, Sandeep Pokharia, Rakesh Yadav. **Organotin(IV) complexes of amino acids and peptides**. Coordination Chemistry Reviews vol. 215, p. 99–149, 2001.
- 19- Júlio César Cuter. **Formação e evolução da indústria de estanho no Brasil**. Dissertação de mestrado em economia da PUC/SP – 2005.
- 20- Santiago Gómez-Ruiz , Goran N. Kaluderovic', Sanjiv Prashar, Evamarie Hey-Hawkins, Aleksandra Eric', Z'eljko Z' iz'ak, Zorica D. Juranic'. **Study of the cytotoxic activity of di and triphenyltin(IV) carboxylate complexes**. Journal of Inorganic Biochemistry, v. 102, p. 2087–2096, 2008.
- 21- Mary Ann Johson and J.L.Greger. **Tin, Copper, Iron and Calcium Metabolism of Rats Fed Various Dietary Levelof Inorganic Tin and Zinc**. The Journal of Nutrition, p. 615-624, 1985.
- 22- Gunnar F. Nordberg, Bruce A. Fowler, Monica Nordberg, Lars T. Friberg. **Handbook on the toxicology of metals**. Cap. 42, p. 839 – 859, 2007.
- 23- Hiroya Harino, Madoka Ohji, Gullaya Wattayakorn, Karnjana Adulyanukosol, Takaomi Arai, Nobuyuki Miyazaki. **Accumulation of Organotin Compounds in Tissues and Organs of Dolphins from the Coasts of Thailand**. Arch Environ Contam Toxicol, v. 54, p. 145–153, 2008.
- 24- Bethany A. Buck-Koehntop, Fernando Porcelli, John L. Lewin, Christopher J. Cramer, Gianluigi Veglia. **Review - Biological chemistry of organotin compounds: Interactions and dealkylation by dithiols**. Journal of Organometallic Chemistry, vol. 691, p. 1748–1755, 2006.

- 25- Claudia Pellerito, László Nagy, Lorenzo Pellerito, Attila Szorcisk. **Biological activity studies on organotin(IV) $n^+$  complexes and parent compounds.** Journal of Organometallic Chemistry, v. 691, p. 1733–1747, 2006.
- 26- Predrag Djurdjevic and Divna Djokic. **Protein Interactions with Bivalent Tin. 1. Hydrolysis and Complexation of Tin (II) Ion with Glycine.** Journal of Inorganic Biochemistry, vol. 62, p. 17-29, 1996.
- 27- Yoshihiro Suzuki, Yoko Endo, Masanori Ogawa, Yangho Kim, Nobuhiko Onda, Kenzo Yamanaka. **Development of an analytical method to confirm toxic trimethylated tin in human urine.** Journal of Chromatography B, v. 868, p. 116–119, 2008.
- 28- Marcantonio Bragadin, Daniele Marton, Guido Scutari, Paolo Dell'Antone. **The interactions of trialkyltin compounds with lysosomes from rat liver.** Journal of Inorganic Biochemistry, vol. 78, p. 205–207, 2000.
- 29- Marcantonio Bragadin and Daniele Marton. **A Proposal for a New Mechanism of Interaction of Trialkyltin (TAT) Compounds with Mitochondria.** Journal of Inorganic Biochemistry, vol. 68, p. 75-78, 1997.
- 30- Christine Syng-ai, Tushar S. Basu Baul, Anupam Chatterjee. **Antiproliferative and cytotoxic effect of a novel organotin compound on mammalian cells both in vitro and in vivo.** Mutation Research, v. 513, p. 49–59, 2002.
- 31- Haleem J. Issaq, Zhen Xiao, and Timothy D. Veenstra. **Serum and Plasma Proteomics.** Chem. Rev., 2007, vol. 107, p. 3601-3620.
- 32- Alfredo Sanz-Medel, Ana B. Soldado Cabezuelo, Radmila Milac'ic, Tjasa Bantan Polak. **The chemical speciation of aluminium in human serum.** Coordination Chemistry Reviews, vol. 228, p.373-383, 2002.
- 33- David W. Greening, Richard J. Simpson. **A centrifugal ultrafiltration strategy for isolating the low-molecular weight ( $\leq 25$  K) component of human plasma proteome.** Journal Of Proteomics, 2010, vol. 73, p. 637 – 648.
- 34- S. R. Silva; S. O. Procópio; T. F. N. Queiroz; L. E. Dias. **Caracterização de rejeito de mineração de ouro para avaliação de solubilização de metais pesados e arsênio e revegetação local.** Rev. Bras. Ciênc. Solo. Vol. 28 no.1. 2004.
- 35- W Chen, Z Zhuang, M D Attfield, B T Chen, Pi Gao, J C Harrison, C Fu, J-Q Chen and W E Wallace. **Exposure to silica and silicosis among tin miners in China: exposure-response analyses and risk assessment.** Occup. Environ. Méd, v. 58, p. 31-37, 2001.

- 36- Capítulo 15: **Doenças do Sistema Respiratório Relacionadas com o Trabalho**. <http://www.saudeetrabalho.com.br/t-toxicologia.php>, acessado em 15/10/2008.
- 37- Lígia M. Q. C. Julião, Dunstana R. Melo, Wanderson O. Sousa, Maristela S. Santos, Paulo César Fernandes and Maria Luiza D. P. Godoy. **Exposure Of Workers In A Mineral Processing Industry In Brazil**. Radiation Protection Dosimetry, v. 125, no. 1–4, p. 513–515, 2007.
- 38- Proponente: José Vicente Elias Bernardi. Título da Proposta de Formação da Rede: **Usos Múltiplos da Água na Amazônia Ocidental: Bacia Hidrográfica do rio Jamari, (Rondônia)**.
- 39- Érica Tomé da Silva<sup>1</sup>; Wanderley José de Melo; Sandra Tereza Teixeira. **Chemical attributes of a degraded soil after application of water treatment sludges**. Sci. Agric., v.62, n.6, p.559-563, 2005.
- 40- A. Oswaldo Sevá Fo. **Problemas intrínsecos e graves da expansão mineral, metalúrgica, petrolífera, e hidrelétrica nas Amazônias**. Texto atualizado e submetido ao I Seminário Nacional de Desenvolvimento e Conflitos Ambientais, Belo Horizonte - MG, 03 de abril de 2008.
- 41- YOUNG, J. E. **A extração de minérios da terra**. In: BROWN, L. (org.). Qualidade de vida. São Paulo: Globo, p.139-160, 1992.
- 42- <http://www.fundec.edu.br/cipa/historia.php>, acessado em 04/08/2010.
- 43- [http://www.mte.gov.br/legislacao/normas\\_regulamentadoras/nr\\_05.asp](http://www.mte.gov.br/legislacao/normas_regulamentadoras/nr_05.asp), acessado em 04/08/2010.
- 44- [http://www.planalto.gov.br/ccivil\\_03/\\_Ato2007-2010/2008/Lei/L11685.htm](http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/_Ato2007-2010/2008/Lei/L11685.htm), acessado em 04/08/2010.
- 45- IUPAC, *Pure Appl. Chem.*, v. 72, no. 8, p. 1453–1470, 2000.
- 46- Shona McSheehy, Zoltan Mester. **The speciation of natural tissues by electrospray-mass spectrometry II: Bioinduced ligands and environmental contaminants**. Trends in Analytical Chemistry, v. 22, no. 5, 2003.
- 47- R. Ritsema, F.M. Martin, Ph. Quevauviller. **Hydride generation for speciation analyses using CG/AAS**. Techniques and Instrumentation in Analytical Chemistry, v.17, p. 489-503, 1995.
- 48- U. M. Grüter · J. Kresimon · A.V. Hirner. **A new HG/LT-GC/ICP MS multi-element speciation technique for real samples in different matrices**. Fresenius J Anal Chem (2000) 368 :67–72

- 49- W.M.R. Dirkx, R. Łobński, F.C. Adams. **Speciation analysis of organotin by GC-AAS and GC-AES after extraction and derivatization.** Techniques and Instrumentation in Analytical Chemistry, v. 17, p. 357 – 409, 1995.
- 50- Donard, O. F. X.; Caruso, J. A.; **Spectrochim. Acta, Part B**, v. 53, p. 10, 1998.
- 51- J.L. Goñem Ariza, E. Morales, D. Sañchez-Rodas, I. Girañdez. **Stability of chemical species in environmental matrices.** Trends in analytical chemistry, v. 19, no. 2 e 3, 2000.
- 52- Christian Dietz, Jon Sanz, Estrella Sanz, Rian Muñoz-Olivas, Carmen C'amara. **Current perspectives in analyte extraction strategies for tin and arsenic speciation.** Journal of Chromatography A, v. 1153, p. 114–129, 2007.
- 53- Zolta'n Mester e Ralph Sturgeon. **Trace element speciation using solid phase microextraction.** Spectrochimica Acta, v. 60, p. 1243 – 1269, 2005.
- 54- Katerina Pomazal, Christian Prohaska, Ilse Steffan, Gregor Reich and Josef F. K. Huber. **Determination of Cu, Fe, Mn, and Zn in blood fractions by SEC-HPLC-ICP-AES coupling.** The Analyst, vol. 124, p. 657–663, 1999.
- 55- Y.K. Chau", F. Yang, M. Brown. **Evaluation of derivatization techniques for the analysis of organotin compounds in biological tissue.** Analytica Chimica Acta, vol. 338, p. 51-55, 1997.
- 56- Victor G. Mihucz, Eniko Tata'r, Bogla'rka Kmethy, Gyula Za'ray, Edit Cseh. **Investigation of the transported heavy metal ions in xylem sap of cucumber plants by size exclusion chromatography and atomic absorption spectrometry.** Journal of Inorganic Biochemistry, vol. 81, p. 81–87, 2000.
- 57- Hueih-Jen Yang, Shih-Jen Jiang, Yuh-Jen Yang, Chorng-jev Hwang. **Speciation of tin by reversed phase liquid chromatography with inductively coupled plasma mass spectrometric detection.** Analytica Chimica Acta, v. 312, p. 141-148, 1995.
- 58- **Cromatografía de Exclusión Molecular.** Cap. 8, p. 176.
- 59- **Cromatografía por exclusão.** Cap. 6, p. 97.
- 60- Bernhard Michalke. **The coupling of LC to ICP MS in element speciation: I. General aspects.** Trends in analytical chemistry, vol. 21, no. 2, p. 142- 153, 2002.
- 61- Claudia A. Ponce de Leo'n, Maria Montes-Bayo'n, Joseph A. Caruso. **Elemental speciation by chromatographic separation with inductively coupled plasma mass spectrometry detection.** Journal of Chromatography A, vol. 974, p. 1–21, 2002.
- 62- R.D. Ricker, L.A. Sandoval. **Fast, reproducible size-exclusion chromatography of biological macromolecules.** Journal of Chromatography A, vol. 743, p. 43-50, 1996.

- 63- Bernhard Michalke, Achim Berthele, Panos Mitrionis, Maria Ochsenkühn-Petropoulou, Stefan Halbach. **Manganese species from human serum, cerebrospinal fluid analyzed by size exclusion chromatography-, capillary electrophoresis coupled to inductively coupled plasma mass spectrometry.** Journal of Trace Elements in Medicine and Biology, vol. 21, S1, p. 4–9, 2007.
- 64- Didier Le Carrer. **Serum protein Electrophoresis Immunofixation.** Edition FM-BIO, Vanves, 2005.
- 65- José Godinho da Silva Junior. **Eletroforese de proteínas. Guia teórico-prático.** Editora Interciência, p. 3 – 32, 2001.
- 66- Katerina Pomazal, Christin Prohaska, Ilse Steffan. **Hydrophobic interaction chromatographic separation of proteins in human blood hyphenated to atomic spectrometry as detector of essential elements.** Journal of Chromatography A, vol. 960, p. 143–150, 2002.
- 67- X. Zhang, R. Cornelis, J. De Kimpe, L. Mees. **Arsenic speciation in serum of uraemic patients based on liquid chromatography with hydride generation atomic absorption spectrometry and on-line UV photo-oxidation digestion.** Analytica Chimica Acta, vol. 319, p. 177-185, 1996.
- 68- Mariella Moldovan, M. Milagros Gómez, M. Antonia Palacios, and Carmen Cámara. **Arsenic Speciation in Water and Human Urine by HPLC–ICP MS and HPLC–MO–HG–AAS.** Microchemical Journal, vol. 59, p. 89–99, 1998.
- 69- P. Niedzielski. **The new concept of hyphenated analytical system: Simultaneous determination of inorganic arsenic(III), arsenic(V), selenium(IV) and selenium(VI) by high performance liquid chromatography–hydride generation–(fast sequential) atomic absorption spectrometry during single analysis.** Analytica Chimica Acta, vol. 551, p. 199–206, 2005.
- 70- De-qiang Zhang, Zhe-ming Ni. **Separation and determination of trace inorganic germanium in P-carboxyethylgermanium sesquioxide by filtration chromatography and hydride generation-graphite furnace atomic absorption spectrometry.** Analytica Chimica Acta, vol. 330, p. 53-58, 1996.
- 71- R. Sur, L. Dunemann. **Method for the determination of five toxicologically relevant arsenic species in human urine by liquid chromatography–hydride generation atomic absorption spectrometry.** Journal of Chromatography B, vol. 807, p. 169–176, 2004.

- 72- Amit Chatterjee\_, Y. Shibata, M. Morita. **Determination of selenomethionine by high performance liquid chromatography-direct hydride generation-atomic absorption spectrometry.** Microchemical Journal, vol. 69, p. 179\_187, 2001.
- 73- S. Ri'ó-Segade, C. Bendicho. **On-line high-performance liquid-chromatographic separation and cold vapor atomic absorption spectrometric determination of methylmercury and inorganic mercury.** Talanta, vol. 48, p. 477–484, 1999.
- 74- Curtius, A.J. **Introdução à Absorção Atômica.** Rio de Janeiro: PUC – Rio, 1991. Notas de aula (apostila). p. 83;
- 75- <http://www.inmetro.gov.br/>, acessado em 14 de abril de 2010.
- 76- Dissertação de mestrado. **Influência das principais espécies reativas formadas durante o processo de destoxicação de toxinas por radiação ionizante.** Murilo Casare da Silva. Área de Tecnologia Nuclear-Aplicações. Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares.
- 77- Favarato M, Mizzen CA, McLachlan DR. **Resolution of serum aluminium-binding proteins by size-exclusion chromatography: identification of a new carrier of aluminium in human serum.** J Chromat 1992; 576:271-85.
- 78- Raab A, Bratter P. **Separation of metalloprotein complexes in serum by size-exclusion chromatography.** Optimisation of the separation parameters retention behaviour and recovery employing radiotracers. J Chromat B 1998; 707: 17-24.
- 79- Carrie Greenough, Rosalind E. Jenkins, Neil R. Kitteringham, Munir Pirmohamed, B. Kevin Park and Stephen R. Pennington. **A method for the rapid depletion of albumin and immunoglobulin from human plasma.** Proteomics, 2004, vol. 4, p. 3107–3111.
- 80- Leonardo S. Villar, Wilson Machado, Eliane P. Oliveira, Ricardo E. Santelli. **Determinação de Metalotneínas e de Metais Associados por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência Acoplada a Espectrometria de Massa com Fonte de Plasma.** EspeQBrasil, 2008.