UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
INSTITUTO DE QUÍMICA
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA ANALÍTICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO

DESENVOLVIMENTO DE UMA METODOLOGIA ESPECTROFOTOMÉTRICA PARA DETERMINAÇÃO DE CHUMBO EM SANGUE

Clara Macêdo Couto
Orientadora: Tania M. Tavares

Dissertação apresentada ao Instituto de Química da Universidade Federal da Bahia para a obtenção do título de Mestre em Ciências Naturais - Química.

Salvador - BA
Dezembro de 1996

COMISSÃO EXAMINADORA

Orientador:

Profa.Dra. TÂNIA MASCARENHAS TAVARES
IQ/UFBA

Prof.Dr. EDUARDO DE ALMEIDA NEVES
IQ/UFSCar

Prof.Dr. ANTÔNIO CELSO SPÍNOLA COSTA
IQ/UFBA

Homologada pelo Colegiado do Curso de Pós-Graduação em Química em ____/____/____ 1996.

A Jair Tércio,

que me mostrou o real sentido da ***VIDA***
e a verdadeira expressão da ***ARTE****.*

"Não devemos nunca, absolutamente nunca ceder, onde podemos, necessitamos, queremos e sabemos triunfar, afinal devemos isso a nós mesmos. A persistência vence a resistência".

O.CI.D.E.M.NT.E. - 7º C.D.E.

AGRADECIMENTOS

Ao ABSOLUTO, que no Seu movimento me fez observar o quanto ainda preciso aprender para evoluir.

Aos meus pais que, com seu carinho especial, muito contribuíram para a formação do meu ser, e aos meus irmãos, por simplesmente serem.

À profª . Dr.ª Tania Tavares pela orientação e apoio quando se fez necessário.

A Dorisvaldo, pela sua prontidão e boa vontade em atender aos meus pedidos de ajuda com os freqüentes problemas do nosso velho absorção atômica.

Ao Dr. Friedrich Alt e ao Dr. Burda, do ISAS-Dortmund, pela suas sugestões e facilidades de acesso à bibliografia.

Às profas Aldy Brandão e Mª de Lourdes Botelho pela colaboração não só pelo fornecimento de reagente, como também, de algumas sugestões dadas.

Aos amigos Luis Sergio, Angela, Magda, Bárbara, Roberto Márcio, Sérgio Oliva, Ivana, Lícia pelo auxílio dado para a apresentação escrita deste trabalho.

A Jaqueline, Ingrid e Ana Lúcia pela colaboração espontânea.

Ao profor Sérgio Luis Ferreira por ter chamado a atenção para o reagente complexante através da tese de Djane.

À CAPES pela ajuda financeira em dois anos de trabalho.

A todos aqueles, visíveis e invisíveis, que diretamente ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho.

A CS cuja amizade aliviou a minha alma em momentos difíceis.

E por último, mas não menos importante, a Jair Tércio cujo carinho, compreensão, conselhos e apoio foram imprescindíveis para mim.

SUMÁRIO

Resumo 9
Abstract 10

1. Introdução 11

2. Parte Experimental 32

2.1 Reagentes e Preparo 32
2.2 Equipamentos 34
2.3 Procedimento 35

2.3.1 Sistema de Determinação do Chumbo 35
2.3.2 Sistema de Separação de Chumbo dos outros Metais 35
2.3.3 Adaptação do Método às Concentrações Presentes no Sangue 39
2.3.4 Aplicação do Método a Amostra Real 39
2.3.5 Sistema Resina Acoplado ao Método Analítico 40

3. Resultados e Discussão 41

3.1 Sistema de Determinação de Chumbo em Solução Padrão . 41
3.2 Sistema de Separação de Chumbo dos outros Metais 44

3.2.1 Adaptação do Método às Concentrações Presentes no Sangue 47
3.2.2 Aplicação do Método a Amostra Real 48

3.3 Sistema Resina Acoplado ao Método Analítico 50
3.4 Protocolo Analítico de Determinação de Chumbo em Sangue 52

4. Conclusões 55

5. Trabalhos Futuros 56

6. Referências Bibliográficas 58

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1: Efeitos de chumbo inorgânico em crianças e adultos. Efeitos adversos observados às concentrações mais baixas. 18

FIGURA 2: Fórmula estrutural do 2-(2-piridilazo-5-dietilaminofenol) (PADAP) e alguns derivados. 25

FIGURA 3: Fórmula estrutural do 2-(5-bromo-2-piridilazo)-5-dietilaminofenol (5-Br-PADAP). 26

FIGURA 4: Curvas de absorvância versus pH para as soluções de Pb-Br-PADAP. 27

FIGURA 5: Espectros de absorção do Pb(II) e Fe(III) com o 5-Br-PADAP. 41

FIGURA 6: Curva padrão do Pb-5-Br-PADAP. 43

FIGURA 7: Curvas de recuperação de chumbo no branco e no sangue após a passagem pela resina aniônica quaternária. 49

LISTA DE TABELAS

TABELA 1: Classificação de risco para crianças sem sintomatologia (para refletir a prioridade para a avaliação médica dos resultados de proteção, não deve ser usado para propostas de diagnósticos) - 1978. 16

TABELA 2: Interpretação de resultados de chumbo no sangue e ações a serem tomadas: classe de criança baseada em concentração de chumbo no sangue. 17

TABELA 3: Níveis normais de metal no ser humano em alguns compartimentos biológicos. 28

TABELA 4: Relação metal:ligante, pH das soluções e $\lambda_{máx}$ de medida para chumbo, ferro, cobre e cádmio com o 5-Br-PADAP. 29

TABELA 5: Alguns elementos e seus mascarantes mais importantes. 30

TABELA 6: Programação do forno de grafite HGA 400 para os elementos Pb, Fe, Cu e Cd. 38

TABELA 7: Dados da curva de calibração do Pb-Br-PADAP. 42

TABELA 8: Brancos obtidos para a curva espectrofotométrica de Pb-5-Br-PADAP. 44

TABELA 9: Eficiência de separação do chumbo de outros metais nos métodos estudados. 45

TABELA 10: Recuperação dos metais nos líquidos de eluição e lavagem para os métodos I e II. 47

TABELA 11: Brancos encontrados para a coluna acoplada ao método analítico. 50

TABELA 12: Resultados encontrados em concentração para a amostra de referência. 51

TABELA 13: Comparação das aspirações do método de determinação espectrofotométrico de Pb em sangue com 5-Br-PADAP com os requisitos do CDC e etapas futuras de aprimoramento. 56

RESUMO

No presente trabalho desenvolveu-se uma nova metodologia analítica para a determinação de chumbo em sangue através da espectrofotometria molecular. O método utiliza o quelante 2-(5-bromo-2-piridilazo)-5-dietilamonofenol (5-Br-PADAP). A composição da solução final de medida é a seguinte: 5-Br-PADAP $1,2 \times 10^{-4}$ M; álcool etílico 50 % em volume; Triton X-100 0,15 %; ácido nítrico 0,5 M e hidróxido de amônia 0,5 M. As medidas espectrofotométricas foram realizadas a 575 nm, com abertura de fenda de 1 nm e cubeta com caminho ótico de 1 cm. A eliminação preliminar de interferências de metais foi obtida utilizando-se uma resina aniônica quaternária fortemente básica (AG1-X8, 200-400 mesh) empregando uma mistura a 90 % de metanol e 10 % v/v de ácido nítrico 5 N, em coluna de 3 cm de comprimento e diâmetro interno de 0,5 cm. O fluxo de eluição dos metais interferentes foi 0,5-0,6 mL/min e do chumbo, com ácido nítrico 1 N, 0,2 mL/min. As características analíticas da metodologia são: limite de quantificação (L.Q.) em 500 µL de amostra de sangue, 112 ppb; exatidão ao nível de 250 ppb ≥ 96,5 %, as quais permitem uma ampla aplicação a estudos epidemiológicos de populações e controle de exposição profissional.

ABSTRACT

In the present work, a new analytical methodology was developed to determine Pb in blood using molecular spectrophotometry. The method uses 2-(5-bromo-2-piridylazo)-5-dietylaminophenol (5-Br-PADAP) as a chelating agent. The content of the final measuring solution is the following: 5-Br-PADAP $1.2x10^{-4}$ M; ethylic alcohol 50 % in volume; Triton X-100 0.15 %; nitric acid 0.5 M and ammonium hydroxide 0.5 M. The spectrophotometric measurements were carried out in 575 nm, with a slit of 1 nm and using an optical length of 1 cm. A preliminary elimination of metal interferences was obtained using a strongly basic quaternary anionic resin (AG1-X8, 200-400 mesh) with a mixture of 90 % methanol and 10 % v/v 5 N nitric acid, in a 3 cm long column with internal diameter of 0.5 cm. The flux of elution of metal interferences was 0.5-0.6 mL/min and 0.2 mL/min for lead, with 1 N nitric acid. The analytical characteristics of the methodology are: quantification limit (Q.L.) in 500 µL of blood sample, 112 ppb; precision at Q.L. level; ≥ 3 ppb; accuracy at 250 ppb ≥ 96.5 %, thus enabling a wide application to epidemiological studies in populations and professional exposure control.

1 - INTRODUÇÃO

1.1- Exposição ambiental do homem ao chumbo

O chumbo (Pb) é um metal pesado que participa, em pequena quantidade, da composição da crosta terrestre e é responsável pelos valores "base line" de chumbo nos diversos compartimentos ambientais. Quanto às fontes antropogênicas deste metal, dentre outras destacamos indústrias metalúrgicas, soldas de cabos elétricos, tintas, gasolina aditivada com chumbo tetraetila, sendo que esta última está diminuindo devido a redução do seu uso, minas de chumbo, fundições primárias e secundárias de chumbo, usinas de depósito de baterias, manufatura de vidro, no manuseio de estabilizadores de chumbo em indústrias de cloreto de polivinila, na manipulação com tintas contendo óxido vermelho de chumbo bem como em plantas de refugo de tintas, e fumo de tabaco.

A poluição ambiental por metais tóxicos é um grande problema em muitos países em desenvolvimento devido a problemas econômicos ou técnicos (1) tais como, tecnologia e equipamentos utilizados que não são de última geração ou de melhor eficiência para redução dos efluentes industriais. Além disso, nestes países as exigências e principalmente a vigilância ambiental deixa a desejar, resultando freqüentemente em uma elevada exposição dos trabalhadores das indústrias e das populações circunvizinhas a metais tóxicos.

A exposição ao chumbo pelo homem pode ocorrer tanto por vias naturais, como antropogênicas. Esta exposição pode ser via inalação, ingestão, ou penetração através da pele. A inalação terá grande importância na exposição ocupacional, enquanto que a ingestão além dessa, será também essencial em situações de não exposição profissional, e a penetração através da pele poderá ter importância para certos compostos metálicos, especialmente compostos organometálicos tal como o chumbo tetraetila (1).

Em geral, a absorção de compostos metálicos pelo homem, não exposto profissionalmente ou à emissões industriais, se dá principalmente através da ingestão de alimentos e de água potável mais do que pelo ar (1). Exemplos deste tipo de exposição são o consumo de vinhos que podem conter chumbo, contato doméstico com tintas ou poeiras contendo chumbo, consumo de alimentos estocados em olarias esmaltadas ou soldadas com este metal, consumo de água distribuída em canos de chumbo, além de outros.

A absorção de metais pela ingestão depende da concentração de metais no alimento, na água potável, além das quantidades consumidas (1).

Na água potável a concentração de chumbo normalmente fica abaixo de 10 µg/L, mas pode ser maior em áreas de alto risco. A absorção de chumbo através da alimentação é estimada em cerca de 30-60 µg/dia, podendo alcançar níveis maiores a depender da contaminação do alimento, que está intimamente relacionado com a exposição do mesmo ao metal (1).

A concentração de chumbo no ar, mesmo em áreas urbanas, raramente excede 1 $\mu g/m^3$ (1 ng/L). Entretanto, em local de trabalho, envolvendo fundição de chumbo, este valor pode alcançar várias mg/m^3 (1), resultando em exposição profissional. Nesta situação a via aérea de exposição de chumbo ao homem terá grande importância.

Segundo Elinder et al. (1) a inalação é normalmente a via predominante de exposição ocupacional. O chumbo é absorvido por todos os compartimentos do trato respiratório, inclusive as passagens nasais, sendo, portanto, esta absorção mais completa e rápida do que por outra rota, como absorção através da pele ou ingestão, uma vez que a absorção de Pb pelo trato gastrointestinal é lenta e dependente da espécie envolvida (2). No ambiente industrial, trabalhadores podem ser contaminados por aerossóis de metais das poeiras e fumaças geradas na mesma. Poeiras de indústrias e cinzas de plantas de queima de carvão sempre contém um número de metais que podem ser fontes de contaminação para os trabalhadores e populações em geral (1).

No caso das crianças, contudo, a atitude de por as mãos na boca pode ser a via mais importante de exposição ao metal. Com este ato, e, a depender do grau de contaminação do ambiente, as crianças ingerem uma fonte adicional de chumbo através da poeira e sujeira, mais do que pela ingestão de alimentos e água (1).

A contaminação de águas subterrâneas, solos e ar por metais pesados são causados pelas atividades industriais o que provoca uma grande variação da concentração de chumbo nas populações circunvizinhas a estas atividades (1), pois a distribuição relativa do chumbo nas células sangüíneas depende da intensidade, da forma física e química de exposição, além de fatores individuais. A intensidade de exposição além da carga e forma de emissão está relacionada às características do corpo receptor, ou seja, tipo de ecossistemas, propriedades geográficas, geofísica e geoquímica da bacia receptora, e padrão de ocupação do solo. As formas físicas e químicas, pelo fato de afetarem o transporte e a translocação do metal através dos compartimentos ambientais e da cadeia alimentar, são fatores que influenciam na intensidade de exposição, além de serem determinantes da assimilação,

distribuição, interação, excreção e efeitos nos organismos. Os fatores individuais, que independem da exposição, tais como sexo, idade, raça, estado nutricional, dieta alimentar, estado de saúde, hábito de fumo ou de consumo de bebidas alcoólicas podem causar variações no nível de absorção.

Uma forma que torna possível o acesso à estimativa de dose de exposição/absorção/eliminação de metal pelo homem é a monitoração biológica. É pela biomonitoração, que tem como uma das maiores vantagens integrar todas as rotas de exposição que o homem pode sofrer, que se estima os riscos nas contaminações e dá-se acesso adequado ao estabelecimento de padrões de exposições. A monitoração biológica de metais envolve a determinação do metal, de seus metabólitos ou de seus compostos em materiais biológicos tais como sangue, urina ou tecidos. O seu objetivo está em oferecer possibilidade de gerenciamento que conduzam a uma diminuição da exposição. Um exemplo é a biomonitoração de chumbo através dos níveis sangüíneos em crianças, que indica absorção deste metal por inalação, ingestão ou através da pele. Repetidas medidas de Pb no sangue em vários países têm demonstrado declínio nestas concentrações em paralelo com a diminuição de Pb no ambiente (1).

A urina, o sangue total, o plasma ou o soro são os meios biológicos mais amplamente utilizados para a monitoração ocasional ou repetitiva da maioria dos metais. Cabelo e dente podem ser usados apenas para alguns metais específicos (1).

O sangue é o principal meio de transporte de metal no corpo (e também a linfa, a qual termina lançando para a corrente sangüínea). Pouco se conhece acerca do chumbo no plasma, mas esse pode representar uma absorção muito recente. O chumbo entra rapidamente em equilíbrio no plasma com o fluido extracelular. Mais vagarosamente, mas em escala de minutos, o chumbo é transferido do plasma para dentro das células do sangue. Assim, 99% do Pb estão nas células vermelhas e apenas 1% no plasma. Nas células vermelhas o Pb está ligado à hemoglobina e a outros componentes. A distribuição do Pb entre as células vermelhas e o plasma não é constante e depende de fatores individuais e do grau de contaminação. A proporção entre o conteúdo de chumbo nas células vermelhas não é constante em relação aos níveis de concentração. Assim a fração no plasma se eleva com um aumento da concentração de chumbo. Tal fato tem importância analítica e metabólica do indivíduo exposto. Sob o ponto de vista analítico deve-se analisar o sangue total e não apenas o plasma, sendo que, neste caso, a matriz é mais complexa. Sob o ponto de vista metabólico, o fato deve ter importância para a distribuição de diferentes órgãos, não existindo uma certeza de que os níveis de chumbo em sangue, numa faixa ampla de concentração, tenham uma relação constante com os níveis do metal em outros órgãos (3). O nível de

chumbo no sangue reflete o equilíbrio entre absorção, excreção e seqüestro em tecidos frouxos e rígidos (4).

Os principais meios de excreção do Pb são o gastrointestinal e o renal. Outros processos, tais como, secreção salivar, transpiração, lactação, exalação, esfolamento da pele, perda de cabelo e unhas, e perda de sangue, podem ter interesse, apenas em casos especiais, na determinação de níveis de Pb (1).

Em termos de forma química a contaminação por chumbo pode se dar através de duas fontes: exposição ao chumbo inorgânico ou chumbo orgânico. As propriedades toxicológicas do chumbo inorgânico e orgânico são diferentes, tanto pela dose de absorção considerada tóxica, como também a natureza dos efeitos biológicos e os sinais de envenenamento (5).

O chumbo orgânico, compostos de tetralquila e trialquila, em destaque por terem sido intensamente usados e ainda o são em escala reduzida como aditivos na gasolina, podem causar efeitos ao organismo tais como: anorexia, náusea, vômito, diarréia. Dor de cabeça, irritabilidade, insônia, nervosismo e ânsia podem ser sinais para a hipotermia, taquicardia, convulsões, delírio e até o coma. Compostos de chumbo trialquila são genotóxicos, mas o potencial carcinogênico ainda não foi avaliado (1). Alta exposição de vapores de chumbo tetrametila resulta numa absorção pulmonar um pouco menor do que com o chumbo tetraetila, mas ambos penetram rapidamente na pele e membranas mucosas. A maior parte do chumbo vindo da exposição aos compostos tetralquila do metal acumula em fígado e rins, algo menos no cérebro e apenas uma pequena fração no osso. A exposição ocupacional a compostos orgânicos de chumbo pode se dar durante a produção do chumbo orgânico e uso em oficinas automobilísticas, inalação ou ingestão acidental de gasolina podem causar toxicidade. Os níveis de chumbo orgânico no ambiente são originários de partidas frias de automóveis, evaporação e derramamento dos postos de gasolina, e quantidades da combustão incompleta provenientes da exaustão de carros. A metilação microbiótica do chumbo não resulta em exposição significativa (1).

Além das fontes de chumbo já mencionadas, durante a combustão no motor, o chumbo orgânico é transformado a chumbo inorgânico, e é emitido quase inteiramente como tal. Isto causa exposição a chumbo inorgânico em particular nas áreas com tráfego intenso (3).

O chumbo inorgânico pode afetar o corpo de várias formas: provocando distúrbio no sistema hematopoiético, ou seja, na síntese da heme (parte integrante da hemoglobina) e também na sobrevivência dos eritrócitos e em um número de enzimas em todas as células do corpo inclusive do cérebro, e no sistema nervoso. A julgar pelos experimentos com animais o grau de

passagem do Pb para dentro do sistema nervoso central em crianças, é, provavelmente, maior do que em adultos (2). Poderá ainda afetar os rins, o trato gastrointestinal (causando constipação ou diarréia, dores epigástricas, náusea, indigestão, perda de apetite e cólica), a reprodução, e provavelmente também causa efeitos cardiovasculares, efeitos mutagênicos e câncer (3).

Apesar do valor de chumbo total no corpo de um homem de 70 Kg variar entre 10 e 200 mg, dependendo da sua localização (1), o chumbo não tem nenhum valor biológico conhecido, podendo-se assim preconizar que o valor ideal deste metal no sangue seja 0 µg/dL (6).

O principal órgão governamental dos Estados Unidos de prevenção a doenças, CDC (Centers for Disease Control - Centro de Controle de Doenças) estabelece, entre outras atividades relacionadas aos serviços e saúde humana, os níveis de metais no homem em termos de risco, e em outubro de 1978, recomendava, em crianças, níveis máximos de chumbo no sangue de 30 µg/dL (1,44 µmol/L ou ainda 300 ppb) e associado à protoporfirina eritrócita (EP) um máximo no sangue de 50 µg/dL (500 ppb). O chumbo no sangue reflete a absorção deste metal enquanto o EP fornece os efeitos adversos metabólicos do chumbo na síntese da heme (4). As crianças sempre foram reconhecidas como a parcela da população mais sensível aos efeitos danosos do chumbo e também a mais expostas ambientalmente a este metal (7). Tanto assim que o CDC estabeleceu recomendações específicas para níveis de chumbo em crianças. A tabela 1 transcreve as recomendações do CDC de 1978 (4). Nesta época não havia evidência de que, abaixo deste nível do metal no sangue, houvesse distúrbios nas funções bioquímicas, com conseqüente perda irreversível de funções neurológica e intelectual. No entanto, os estudos conduzidos posteriormente, mostraram que isso não era verdade.

Tabela 1- Classificação de risco para crianças sem sintomatologia (para refletir a prioridade para a avaliação médica dos resultados de proteção, não deve ser usado para propostas de diagnósticos) - 1978.

Resultados dos testes de chumbo no sangue (µg/dL)	Eritrócito protoporfirina - EP (µg/dL do sangue total)			
	£ 49	50-109	110-249	³ 250
sem fazer	I	*	*	*
≤ 29	I	Ia	Ia	EPP+
30-49	Ib	II	III	III
50-69	**	III	III	IV
≥ 70	**	**	IV	IV

EPP+ = Protoporfirina eritropoiética - embora raramente a deficiência de ferro possa causar elevações de EP a 300µg/dL; * = chumbo no sangue necessário para estimar o risco; ** = combinação de resultados não observados geralmente na prática; se observado, retestar imediatamente com o sangue venoso.

Esta classificação sugere meramente o risco relativo de envenenamento por chumbo e a prioridade para avaliação médica e intervenção ambiental. Não deverá ser usado como uma classificação diagnóstica.

Classificação:
I - crianças em baixo risco, Ia - crianças com deficiência de ferro, Ib - crianças que aparentam ter níveis de chumbo no sangue transiente, estável ou em declínio e estão em baixo risco para envenenamento por chumbo, II - crianças que estão em risco moderado, III - crianças que estão em alto risco, IV - crianças que estão em risco urgente de envenenamento por chumbo e deve ser providenciado uma avaliação médica imediata.

Nota: A avaliação diagnóstica deveria ser mais rica em dados do que o indicado na classificação nos seguintes casos:
(1) Crianças com quaisquer sintomas compatíveis com contaminação por chumbo. (2) Crianças abaixo de 36 meses de idade. (3) Crianças cujos valores de chumbo no sangue e EP tem o seu lugar na parte superior de uma classe particular. Deve ser enfatizado e sugerido normas referentes a interpretação ou resultados apresentados, mas o diagnóstico final e a sua disposição repousa sobre um exame médico e laboratorial mais completo de cada criança individualmente.

A disfunção neurofisiológica, caracterizada pela redução da inteligência e alteração de comportamento, foi demonstrada como ocorrendo em crianças que não apresentavam sintomas de intoxicação, mas que possuíam significativo teor de chumbo no sangue. Resultados clínicos e estudos epidemiológicos conduzidos nos Estados Unidos, Alemanha e Inglaterra indicaram claramente que quantidades de Pb no sangue menores do que 50 µg/dL podem causar deficiências neurofisiológicas em crianças sem sintomatologia. Estudos experimentais e clínicos sugerem que os danos

neurofisiológicos podem ser produzidos em crianças mesmo com níveis de Pb no sangue menores do que 35 µg/dL (6). Recentemente, ficou comprovado que alguns distúrbios na função bioquímica ocorrem comprovadamente em concentrações inferiores a 30 µg/dL. Por exemplo, inibição do ácido δ-aminolevulínico dehidrase, uma enzima importante para a síntese da heme, e que é responsável pela introdução do ferro no anel tetrapirrol, ocorre a níveis de Pb abaixo de 10 µg/dL; a enzima ferroquelatase, que converte protoporfirina a heme, é inibida em crianças cuja concentração de chumbo no sangue é aproximadamente 15 µg/dL; diminuição nos níveis de circulação da 1,25-dehidroxivitamina D (a forma ativa da vitamina D) é observada em sangue mesmo em concentração de Pb abaixo de 25 µg/dL (6).

Com base nestes dados, o CDC a partir de outubro de 1991, considerando apenas a concentração do metal no sangue, estipulou que níveis de 25 µg/dL ou maiores de Pb no sangue, indica uma absorção excessiva do metal em crianças, recomendando assim, níveis mais baixos para as diferentes classes de risco a partir de 10 µg/dL de Pb no sangue, quantidade esta considerada tolerável. A figura 1 apresenta os efeitos do chumbo em crianças nos diferentes níveis e a tabela 2 apresenta as recomendações atuais.

Tabela 2- Interpretação de resultados de chumbo no sangue e ações a serem tomadas: classe de criança baseada em concentração de chumbo no sangue.

Classe	Concentração de Chumbo (µg/dL)	Comentário
I	≤ 9	Criança na classe I não é considerada como envenenada por chumbo.
IIA	10-14	Muitas crianças com níveis de chumbo no sangue nesta faixa devem participar de atividades comunitárias preventivas contra envenenamento por chumbo. Criança nesta faixa pode necessitar controle freqüente.
IIB	15-19	Criança na classe IIB deve receber intervenções nutricionais e educacionais e controle freqüente. Se o nível de chumbo no sangue persistir nesta faixa, investigação ambiental e intervenção devem ser feitas.
III	20-44	Criança na classe III deve receber avaliação ambiental e remediação e uma avaliação médica. Tal criança pode necessitar de tratamento farmacológico para envenenamento por chumbo.
IV	45-69	Criança na classe IV necessita tanto de intervenção médica quanto ambiental, incluindo terapia de quelação.
V	≥ 70	Criança na classe V de envenenamento por chumbo necessita de emergência médica. Gerenciamento médico e ambiental devem iniciar imediatamente.

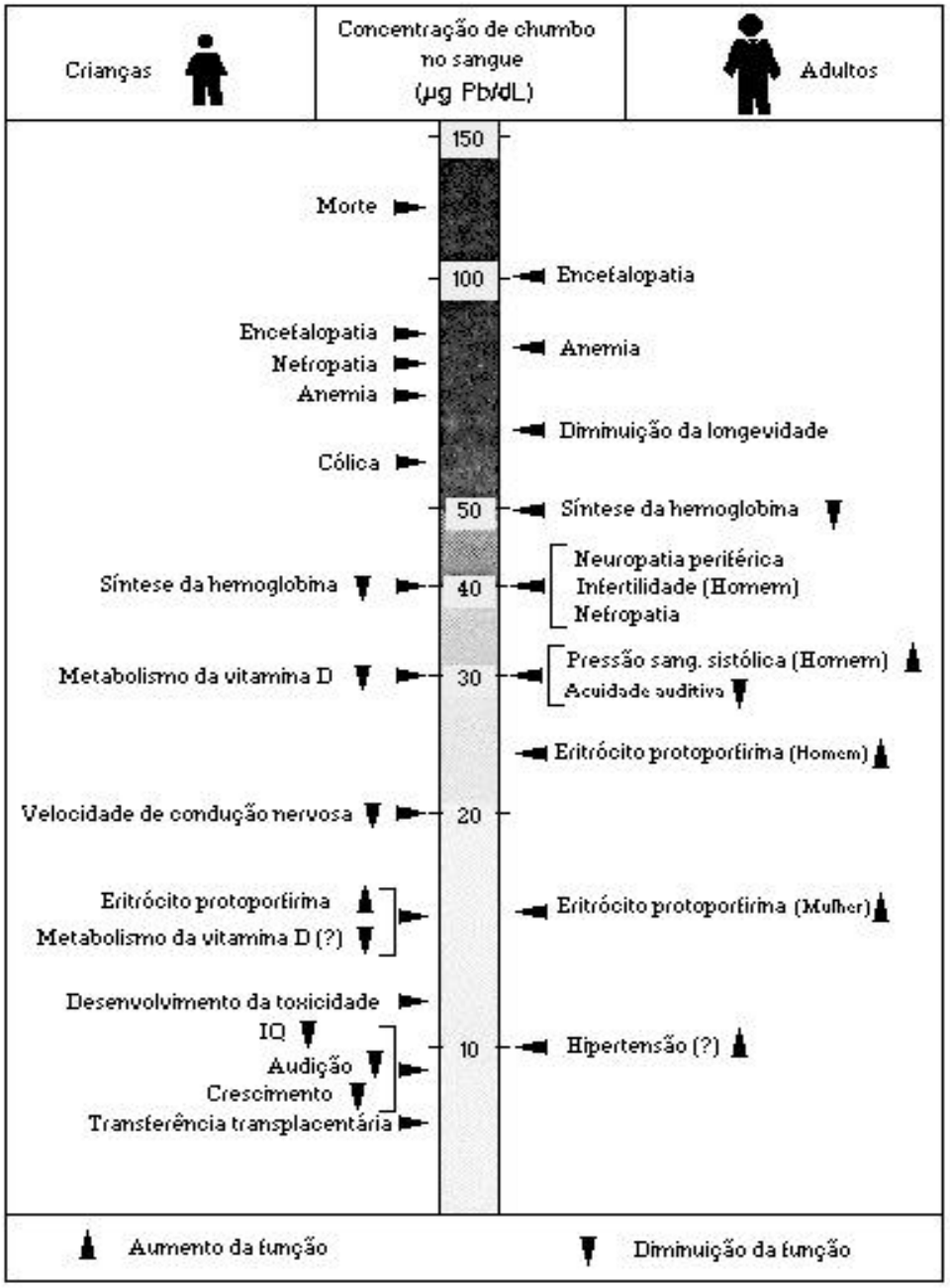


Figura 1: Efeitos de chumbo inorgânico em crianças e adultos. Efeitos adversos observados a concentrações mais baixas. Fonte: ASTDR, 1992.

OBS.: Os níveis neste diagrama não indicam, necessariamente, os valores mais baixos a partir dos quais o chumbo exerce um efeito. Estes são os níveis nos quais estudos demonstraram adequadamente um efeito.

O uso do eritrócito protoporfirina foi abandonado para fins de levantamentos. Isto porque não apresenta sensibilidade suficiente para concentrações de chumbo abaixo de 25 µg/dL. O eritrócito protoporfirina pode ser medido por fluorimetria após extração das células vermelhas ou pela medida direta de sua fluorescência em células vermelhas intactas. Esse metabólito está presente nas células vermelhas como zinco protoporfirina, sendo o zinco removido por processo de extração, levando a EP "livre". A medida de zinco protoporfirina e EP após extração reflete essencialmente o mesmo composto (4). A técnica de medida é muito simples, rápida, requer pequena quantidade de sangue e pode ser realizada *in loco*. A maior parte das prevenções de envenenamento de chumbo empregava a medida de zinco protoporfirina por hematofluorimetria como o indicador representante da exposição ao chumbo. Contudo, com o nível de interesse para chumbo no sangue diminuído para 10 µg/dL, o relatório do CDC de 1991 recomenda que a medida da concentração de chumbo no sangue deva substituir zinco protoporfirina como a medida de proteção de escolha, porque o teste de protoporfirina perde sensibilidade a níveis de chumbo abaixo de 25 µg/dL. Este indicador passa a ser usado apenas em avaliações de indivíduos que apresentem concentrações de chumbo no sangue acima deste valor (8, 9, 10).

Procurando atender ao novo nível recomendado pelo CDC-EUA e utilizando um método aplicável a um número elevado de amostras cobrindo grandes extensões geográficas, surge o interesse no desenvolvimento de uma metodologia para a determinação de chumbo no sangue, que seja preciso, exato, sensível, com baixo limite de detecção, barato e simples de execução que dispense o especialista altamente qualificado em química analítica para a sua realização, em substituição aos métodos envolvendo grandes equipamentos como absorção atômica com forno de grafite e redissolução anódica (métodos tradicionais de chumbo em sangue) ou mesmo espectrometria de emissão em plasma ou florescência de raio X.

Visando desenvolver esta metodologia foi pensado na espectrofotometria molecular, uma vez que é uma técnica simples, barata e facilmente disponível em laboratórios clínicos e dispensando instrumentalistas.

1.2- **A análise química de chumbo**

As absortividades molares das substâncias encontram-se normalmente entre 10000 a 40000 $L.cm^{-1}.mol^{-1}$, o que torna possível a determinação na faixa de concentração de 10^{-4} a 10^{-5} M, e com técnicas analíticas apropriadas, a faixa pode ser estendida, muitas vezes, até 10^{-6} ou mesmo 10^{-7} M. Essa técnica

freqüentemente possui uma seletividade desde moderada até elevada e está sujeita a erros relativos de 1 a 3 %, e são normalmente, de uma execução relativamente fácil e rápida (11).

Mesmo com essas vantagens, a técnica de espectrofotometria de absorção atômica, ao invés da espectrofotometria molecular (12, 13), tem sido amplamente usado para a determinação de chumbo no sangue e em outros materiais biológicos (14, 15, 16, 17, 18) por ser uma das técnicas mais sensíveis e seletivas e que não necessita de grandes manipulações com a amostra, o que favorece a não contaminação das amostras. Alguns pesquisadores além de usar esta técnica lançam mão de reagentes complexantes e/ou resina para pré-concentração do metal aumentando assim a sensibilidade do método, alcançando bons resultados mesmo usando pequena quantidade de amostra.

A espectrofotometria molecular, aplicada à análise de chumbo em sangue requer introdução de um maior número de etapas na metodologia, tanto para fornecer condições de determinação do elemento em questão, quanto para eliminação de interferentes. No entanto, a perspectiva de posteriormente vir a adaptá-la a um sistema de injeção de fluxo no qual várias destas etapas podem ocorrer em linha, justifica o esforço deste estudo visando uma ampla aplicabilidade do método no futuro. Uma vez que existem espectrofotômetros disponíveis no mercado em tamanho portátil, o objetivo em longo prazo de se substituir a absorção atômica ou a redissolução anódica na análise de chumbo do sangue dentro dos critérios do CDC, pode ser atingido e será o tema da continuação deste trabalho.

O analito em questão é um metal que no meio biológico de análise se encontra predominantemente na forma Pb^{+2}. Este íon não absorve radiação eletromagnética na região do visível sendo, portanto, necessário a conversão desta espécie a uma forma absorvente nesta região espectral para tornar possível a sua determinação pela espectrofotometria molecular no visível. Uma forma de tornar isso possível é com a utilização de agentes complexantes, espécies moleculares ou iônicas, de natureza orgânica ou não, que se ligam facilmente a elementos metálicos. Destes, os complexantes orgânicos, são os que oferecem maiores possibilidades de formação de complexos coloridos com chumbo. Os ligantes, podem ser monodentados, com capacidade de formar com o átomo central apenas uma ligação, ou polidentados, com capacidade de formar mais de uma ligação com o metal porque possuem estrutura com vários sítios complexantes em posições favoráveis. Estes últimos, geralmente, são mais estáveis.

O chumbo ocorre nos compostos com estado de oxidação +2 e +4, sendo o estado +2 o mais estável. Em soluções aquosas ácidas, o chumbo está mais

freqüentemente na forma de um íon incolor aquo-chumbo (II) e em meio fracamente alcalino forma o íon incolor Pb (II). O chumbo divalente tem um número de coordenação máximo de 4 (quatro) e forma complexos planares estáveis com ligantes contendo oxigênio ou enxofre como átomos doadores. Complexos comuns de chumbo quadrivalente hexacoordenado tem um arranjo octaédrico (19).

A formação de um complexo metálico estável requer a presença de grupos analíticos funcionais ácido ou básico na molécula do reagente, preferencialmente nas posições que permitem a formação de um anel quelato de 5 ou 6 membros. Os átomos doadores mais comuns são o oxigênio, nitrogênio e enxofre (19). Com corantes azo N-heterocíclicos o chumbo fornece complexos coloridos. Estas reações podem ser usadas devido a sua alta sensibilidade para determinação de Pb apesar da sua baixa seletividade. Quando estas reações são usadas para fins analíticos, os protocolos correspondentes mais usados envolvem métodos de separação, principalmente extração, precipitação e resinas trocadoras de íons.

Em termos de separação por extração, o método mais usado para o chumbo envolve a extração com ditizona em um meio levemente alcalino ou neutro. Na separação de grandes quantidades do metal (1-5 mg), a solução ditizona-clorofórmio é mais adequada devido ao fato da solubilidade do ditizonado de chumbo em clorofórmio ser maior do que em tetracloreto de carbono. Dietilditiocarbamato extrai chumbo em meio levemente ácido que é a condição mais favorável, em meio neutro contendo citrato e em meio alcalino contendo cianeto e tartarato. O complexo iodeto de chumbo é extraído com metil isobutil cetona ou metil isopropil cetona, ou ainda diclorometano contendo tributilamina (20).

Na separação por precipitação, microgramas de chumbo são precipitados em soluções levemente ácidas (pH $\geq$ 2) na forma de sulfeto moderadamente solúvel. Prata, cobre ou mercúrio servem como carreadores, e a presença do citrato evita a precipitação de ferro. Traços de chumbo podem ser isolados quantitativamente como seu hidróxido usando amônia como precipitante e lantânio como coletor. O chumbo também pode ser separado por coprecipitação com sulfato de estrôncio, sulfato de bário, cromato de bário e carbonato de cálcio (20).

No caso de separação de Pb por resina ônica, a resina catiônica é pouco utilizada porque o chumbo é eluído antes dos outros metais, o que apresenta o inconveniente de limitar a quantidade mínima de material a ser manipulado, pois o método é mais adequado quando envolve grandes quantidades de chumbo (se a amostra contiver um baixo teor do metal, a quantidade da mesma deverá ser aumentada), bem como de se tornar menos adequada para a

separação do chumbo de grandes quantidades de elementos como o Al(III), Fe(III), Ca(II), Mg(II), Cu(II) e U(VI) (21). Numa resina aniônica a eluição dos metais é feita preferencialmente frente ao Pb o que possibilita a separação de pequenas quantidades de Pb de grandes quantidades dos outros metais preferindo utilizar-se o metal na forma complexada aniônica. Assim é que o complexo aniônico chumbo-cloreto pode ser separado de outros metais por uma resina aniônica fortemente básica. Em uma solução a 1 M de ácido clorídrico, Pb e Bi são retidos na coluna enquanto que o Ca, Ba, Cu, Fe, Sn e Tl são eluídos. O chumbo é depois eluído da coluna com uma solução a 0,01 M de HCl enquanto que o bismuto fica retido. Soluções de amostras contendo metais em HBr 0,1-4 M, quando passadas por uma resina aniônica fortemente básica, tem a maioria dos metais eluídos com HBr 0,1 M ficando o chumbo retido, e então eluído seletivamente com uma solução a 0,3 M HNO_3 e 0,025 M HBr, permanecendo na coluna o Bi, Cd, Ti(III), Hg(II), Au(III), Pt(IV) e Pd(II). Misturas de eluentes contendo tetrahidrofurano e HNO_3 5-2,5 M para separar o chumbo de outros elementos também foram utilizados juntamente com uma resina Dowex-1. Chumbo adsorvido numa resina catiônica pode ser eluído com acetato de amônia 1 M e assim separado de Ba, Sr e Al (20).

Chumbo pode ser separado por redissolução anódica como PbO_2 num meio de 5-9 % em ácido nítrico. Para pequenas quantidades de chumbo, soluções de HNO_3 mais diluídas são mais adequadas. Microquantidades podem ser depositadas sob um cátodo de aço inoxidável (20).

Dos métodos de determinação espectrofotométricos, o mais conhecido é o da ditizona (H_2Dz), com a formação do ditizonato de chumbo, $Pb(HDz)_2$, que é solúvel em tetracloreto de carbono (CCl_4), clorofórmio ($CHCl_3$) e benzeno (C_6H_6), numa faixa de pH ótimo de extração de 7-10. O complexo apresenta uma absortividade molar de $6{,}86 \times 10^4$ $L.mol^{-1}.cm^{-1}$ num comprimento de onda máximo de 520 nm. Das várias modificações do método da ditizona para a determinação do chumbo, a técnica monocromática é a mais usada, apesar dos procedimentos de mistura de cores, reversão, bem como a extração e titulação espectrofotométrica terem também pontos favoráveis (20).

O principal agente mascarante usado na determinação espectrofotométrica do chumbo com ditizona é cianeto, que forma complexos estáveis com Ag, Hg, Pd, Au, Cu, Zn, Cd, Ni e Co, evitando desta forma a sua reação com a ditizona. Os cinco últimos podem ser separados do chumbo pela extração prévia com ditizona num meio ácido (pH < 1).

A adição de tartarato ou citrato na solução aquosa antes da extração do chumbo evita a precipitação de metais rapidamente hidrolizáveis tais como Al, Fe e Ti. Na presença de tartarato e cianeto, pequenas quantidades de ferro

não interferem na extração; grandes quantidades de ferro deverão, contudo, ser previamente separadas.

Outros métodos de determinação utilizados são apresentados abaixo:

O chumbo forma com o dietilditiocarbamato de sódio um complexo incolor, $Pb(DDTC)_2$, que é solúvel em CCl_4 e $CHCl_3$. O chumbo pode ser determinado espectrofotometricamente pelo deslocamento deste metal do complexo pelo cobre, que fornece um complexo mais estável e colorido, $Cu(DDTC)_2$, como mostra a equação 1.

$$Cu^{+2} + Pb(DDTC)_2 \rightarrow Pb^{+2} + Cu(DDTC)_2 \qquad \text{equação 1}$$

O complexo de $Pb(DDTC)_2$ extraído em CCl_4 a pH elevado, depois de misturado e agitado com uma solução de $CuSO_4$, resulta no complexo marrom, $Cu(DDTC)_2$, que é então medido no comprimento de onda de 435 nm. Uma quantidade de 2,5 µg por mL de solvente (2,5 ppm) pode ser analisado (20, 22).

O 4-(2-piridilazo)resorcinol (PAR) reage com íons de chumbo em meio fracamente amoniacal e forma um complexo vermelho apresentando uma absortividade molar de $4{,}0 \times 10^4$ $L.mol^{-1}.cm^{-1}$ a 520 nm, e permitindo detectação de 0-5 mg por mL deste metal. Este método tem sido utilizado para a determinação de chumbo em aço, latão e bronze. Outros corantes azo são particularmente promissores como por exemplo Arsazan, Sulfarsazan e o 5-Br-PADAP. O complexo chumbo-arsazan, após adequado mascaramento, pode ser extraído com butanol para efetuar a sua medida. O sulfarsazan {5-nitro-2-[3-(4-p-sulfofenilazofenil) 1-tiazeno] benzeno}, um derivado sulfônico ácido do arsazan, é solúvel em meio aquoso e em solução de tetraborato de sódio o complexo sulfarsazan-chumbo absorve a 420 nm. O 2-(5-bromo-piridilazo)-5-(dietilaminofenol) (5-Br-PADAP), complexo 1:1, apresenta um máximo de absorção a 575 nm (20, 22).

Ácido trissulfônico tetrafenilfosfina ($TPPS_3$), em solução alcalina, complexa o chumbo apresentando uma banda de absorção bem separada da banda de absorção do reagente. Em pH 9,8-10,5, com concentração do reagente 10 vezes maior, a reação se apresenta completa em 1 minuto a 70°C. A lei de Beer é seguida para 0,05-5 µg de Pb por litro (0,05-5 ppb). Os íons de cobre, cádmio, ferro, manganês, mercúrio e índio interferem no método, sendo que os íons de índio e manganês podem ser mascarados pelo íon cianeto (22).

Outros reagentes para o chumbo incluem corantes trifenilmetano; a difenilcarbazona; a 8-hidroxiquinolina; ácido cloroanílico; 2-(*o*-hidroxifenil)benzotiazolina; ácido tiomálico; fenazo-4-carboditioato de amônia; 9,9'-bixantene; vermelho de bromopirogalol; o,o'-dicloroditizona; dietilenotriamino; ácido pentacético; 3,4-dihidroxiazobenzeno; 6,13 - dihidroxi - 1,4,8,11 - pentracenoquinona - 2,9 - ácido dissulfônico; eosina; 1,10-fenantrolina; 1,5-difenilcarbohidrazida e corantes azo do ácido antranílico (20, 22).

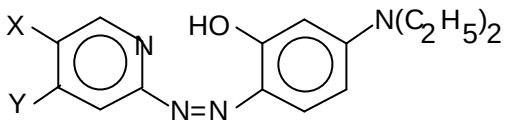
Dentre os métodos espectrofotométricos apresentados acima, os reagentes mais indicados seriam a ditizona, DDTC, PAR, 5-Br-PADAP e ácido trissulfônico terafenilfosfina ($TPPS_3$).

O método utilizando a ditizona apresenta alguns inconvenientes, para o objetivo deste trabalho, como por exemplo, o reagente ser sensível a luz e calor e ser facilmente oxidado a difeniltiocarbodiazona que tem coloração amarela, o que dificulta a análise, além disso a reação se processa em meio orgânico (CCl_4, $CHCl_3$, C_6H_6), onde os solventes adequados são bastante tóxicos. O reagente colorimétrico DDTC apresenta a desvantagem de não formar complexo colorido com o chumbo, envolvendo uma maior manipulação da amostra. Primeiramente, o complexo Pb-$(DDTC)_2$ é extraído com clorofórmio seguido da mistura com uma solução de cobre, para substituição do chumbo pelo cobre, sendo então, a medida espectrofotométrica realizada no $\lambda_{máx}$ de Cu-$(DDTC)_2$ para obtenção indireta do teor de chumbo. O $TPPS_3$, mesmo apresentando alta sensibilidade para chumbo, tem a desvantagem de não ser encontrado comercialmente nesta forma, sendo então necessário a sua síntese, seguida de purificação e testes para verificação da sua estabilidade. O reagente PAR, um corante azo solúvel em meio orgânico, apresenta uma sensibilidade menor do que o 5-Br-PADAP cuja análise pode ser efetuada numa faixa de concentração do metal cerca de 50 % menor do que o reagente PAR. O 5-Br-PADAP, apesar de pouco solúvel em meio aquoso é muito solúvel em meio alcoólico, sendo também bastante estável em meio ácido, o que se constitui uma grande vantagem. Por apresentar estas e outras vantagens, mais detalhadas abaixo, o reagente 5-Br-PADAP, foi escolhido para o presente trabalho.

1.2.1- **Análise do chumbo com Br-PADAP**

Recentemente tem chamado a atenção para o desenvolvimento de métodos espectrofotométricos na determinação de chumbo, a classe de corantes azo

baseados nos derivados do 2-(2-piridilazo)-5-dietilaminofenol (PADAP), que mostraram-se, dentre os reagentes azo N-heterocíclicos, os mais sensíveis. O PADAP é um complexante orgânico polidentado com fórmula estrutural apresentada na figura 2 (23).



	X	Y	R_1	R_2	Nome
(1)	Br	H	$-C_2H_5$	$-C_2H_5$	5-Br-PADAP
(2)	Cl	H	$-C_2H_5$	$-C_2H_5$	5-Cl-PADAP
(3)	Br	Br	$-C_2H_5$	$-C_2H_5$	3,5-diBr-PADAP

Figura 2: Fórmula estrutural do 2-(2-piridilazo)-5-dietilaminofenol (PADAP) e alguns derivados.

Os mono halos derivados Br-PADAP e Cl-PADAP são os mais freqüentemente usados. Em muitos casos as reações do Br-PADAP são aproximadamente duas vezes mais sensíveis do que as reações correspondentes com o 4-(2-piridilazo)-resorcinol (PAR), reagente mais freqüentemente usado (24). A estabilidade do complexo é normalmente aumentada pelo aumento da basicidade do ligante; isto pode ser alcançado, por exemplo, quando o elétron-doador substituinte está presente na posição meta ou para do grupo ativo (19).

A primeira reação do Pb(II) com o Br-PADAP foi feita utilizando a extração fotométrica e determinação titrimétrica dos íons de Pb(II) na análise deste metal em ligas contendo antimônio, estanho e cobre, encontrando uma relação metal-complexante de 1:1 no comprimento de onda de máxima absorção (575 nm) e absortividade molar igual a $4{,}9 \times 10^4$ $L.mol^{-1}.cm^{-1}$. A extração do quelato foi feita em clorofórmio, tributilfosfato ou benzeno a pH > 6 (24).

Alguns trabalhos que se seguiram envolveram a determinação de micro quantidades de metais, em particular, cobre, ferro, chumbo e zinco em tecidos (25), com desenvolvimento de métodos mais seletivo e sensível na determinação de chumbo em concentração traço (24, 26, 27).

No presente trabalho utilizou-se o 2-(5-bromo-2-piridilazo)-5-dietilaminofenol (5-Br-PADAP), figura 3, que forma com o Pb^{+2} complexo na razão 1:1, ligante-metal. Este complexo é estável, forma complexo colorido

com o chumbo, absorvendo na região espectral do visível e fornece alta sensibilidade para a determinação do metal de interesse.

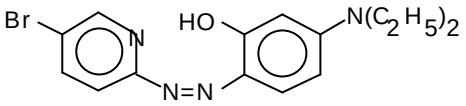
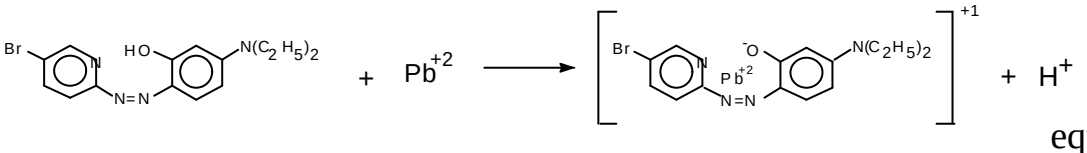


Figura 3: Fórmula estrutural do 2 - (5 - bromo - 2 - piridilazo) -5 - dietilaminofenol (5-Br-PADAP).

O quelante 5-Br-PADAP em solução de pH 4-9, apresenta estrutura LH e reage com o íon Pb(II) para formar o complexo PbL^+, como descrito na equação 2 fornecendo uma relação M:L de 1:1.

$$LH + Pb^{+2} \leftrightarrow PbL^+ + H^+ \qquad \text{equação 2}$$

A equação 2 pode ser expressa através das fórmulas estruturais com mostra a equação 3.



equação 3

Pelas curvas de absorvância versus pH para as soluções de Pb-Br-PADAP (figura 4), observa-se que a partir do pH 7 a curva apresenta um patamar, o que mostra a completa formação do complexo PbL^+ (24).

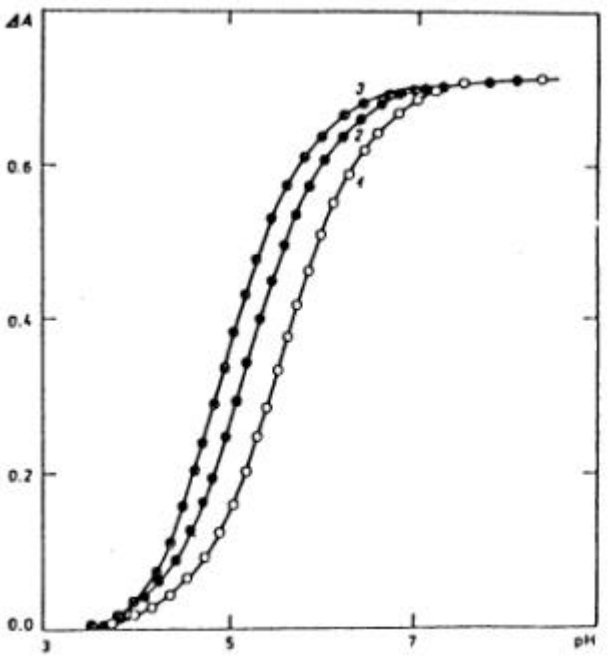


Figura 4: Curvas de absorvância versus pH para as soluções de Chumbo-Br-PADAP.

Condições: C_M = 1,128x10^{-5} moldm^{-3}, etanol 50% v/v, Triton X-100 (ρ = 3 gdm^{-3}), I = 0,1 moldm^{-3} (HNO_3 + NH_3), λ = 575 nm. C_L/(moldm^{-3})(C_L/C_M): 1- 5,1x10^{-5} (4,52); 2- 1,2x10^{-4} (10,63); 3- 2,4x10^{-4} (20,25).

Na técnica espectrofotométrica molecular, cuidados devem ser tomados com espécies interferentes, para que os mesmos não forneçam resultados errôneos nas medidas realizadas. Os agentes complexantes em geral possuem pouca especificidade em relação ao metal. A mesma pode ser aumentada mediante ajuste de pH. Mesmo com a escolha do pH ideal para a formação do complexo com a espécie desejada, nem sempre se consegue especificidade apenas para a substância de interesse, necessitando, nestes casos, de acréscimo de agentes mascarantes, ou de uma separação física prévia da espécie alvo ou interferente precedendo a reação de complexação.

No caso específico de sangue, medidas devem ser tomadas com relação a não interferência de metais possivelmente presentes que possam formar complexos com o ligante escolhido.

O sangue, mesmo não contaminado, possui um número grande e diversificado de metais (tabela 3).

Tabela 3- Níveis normais de metal no ser humano em alguns compartimentos biológicos.

Metal	"Níveis normais" de metal no ser humano				
	sangue total	sangue†	plasma	soro	urina
Alumínio	< 2-40 µg/L (1)		< 2-40 µg/L(1)	10µg/L*(1)	~ 17 µg/L◊(1)
Antimônio	3 µg/L(1)	3 mg/L(2)		0,8µg/L(1,2)	< 1 µg/L(1)
Arsênio	1 - 4 µg/L(1)				0,01-0,03 mg/L(2) 0,08(0,02-2,0)mg/L(2)
Bário		0,08-0,4 mg/L			26 µg/dia
Berílio	< 1 ng/mL				< 1 ng/mL
Bismuto		2-8 µg/Kg			
Cádmio	0,2-0,8µg/L(nf)(1) 1,4-4,5 µg/L (f)(1)				< 1 µg/L(1)
Cobalto	< 1,9 µg/L•(1)			0,4 µg/L(2)	< 2,0 µg/L•(1)
Cobre	~ 1 mg/L(2)		~ 1 mg/L(2)		20 µg/dia(2)
Chumbo	50 - 300µg/L•(1) 30 - 50 µg/Lð(1)				
Cromo		20-30 µg/L(2)	~ 0,1 µg/L (1)	~0,1µg/L(1)	~0,1 - 0,5 µg/L
Estanho	5 µg/L(1)	5 µg/L(2)	1,76±0,35µg/g•(1)		1,0 µg/L(1)
Ferro		0,5 mg/mL(2)		~1,3 mg/L(2)	0,1-0,3 mg/L(2)
Germânio		0,2 mg/Kg(2)		0,29mg/L(2)	1,26 mg/L(2)
Índio	s e m d a d o s				
Manganês	0,7-1,2µg/100mL(1)		4,3 µg/L(2)		1 - 8 µg/L(1)
Mercúrio		< 200 µg/L(2)			
Molibdênio	poucos µg/L(2)				49-71 µg/dia(2)
Níquel	0,05-1,05 µg/L(1)			0,1-1,1 µg/L(1)	0,5 - 6 µg/L(1)
Prata					1 µg/dia(2)
Selênio		0,21 mg/L(2)			0,034±0,024mg/L(2)
Tálio	3,0 µg/L(2)				0,13-1,69 µg/L(2)
Telúrio	s e m d a d o s c o n f i á v e i s				
Titânio		0,03-0,15 mg/Kg(2)			
Tungstênio				5,8 ± 3,5 ng/mL(2)	2,0-13,0 µg/dia(2)
Urânio	s e m d a d o s c o n f i á v e i s				
Vanádio		> 0,0005-1,5µg/Kg(2)			
Zinco	~ 5 mg/L(2)		~ 1 mg/L(2)	~ 1mg/L(2)	0,5 mg/dia(2)

Legenda: (†) - fração proteica; (nf) - não fumante; (f) - fumante; (∗) - limite superior;
(◊) - valor médio; (•) - sem exposição ocupacional;
(ð) - áreas sem indústria e tráfego.

Fonte: (1) - Clarkson, T.W.; Friberg, L.; Nordberg, G.F. and Sager, P.R. editores - *Biological monitoring of toxic metals* - New York, Plenum Press, 1988.
(2) - Friberg, L.; Nordberg, G.F. and Vouk, V.B. editores - *Handbook on the toxicology of metal*. Elsevier/North-Holland Biomedical Press, 1ª edição, 1979.

O ligante, 5-Br-PADAP, é capaz de reagir com vários metais (23, 28, 29), sendo os causadores de maior interferência para a determinação do chumbo em sangue o ferro e o cobre. Estes dois metais dispõem metodologias semelhantes às utilizadas para a determinação do chumbo. O ferro pode ser analisado com este complexo numa larga faixa de pH, indo de 3 à 10, e em comprimentos de onda que vai do 555 a 753 nm (30, 31, 32, 33, 34, 35); o cobre pode ser complexado numa faixa de pH de 4 a 9,2 e nos comprimentos de onda de 545 e 555 nm, a depender das condições do método (36, 37, 38). A tabela 4 mostra características importantes para a determinação espectrofotométrica dos principais metais presentes no sangue com Br-PADAP. Observa-se que metais interferentes na análise de Pb apresentam com o Br-PADAP, absortividades molares maiores do que o metal de interesse. Segundo Novákova (24) apresenta um valor de $6{,}5x10^4$ $L.mol^{-1}.cm^{-1}$ a λ_{max} 575 nm, num meio a 50 % v/v em etanol, triton X-100 (ρ = 3 $g.dm^{-3}$), e 0,1 $mol.dm^{-3}$ de tampão hexametilenotetramino ou amoniacal a pH 8.

Tabela 4- Relação metal:ligante, pH das soluções e $\lambda_{máx}$ de medida para chumbo, ferro, cobre e cádmio com 5-Br-PADAP.

Metal	Relação M:L	pH	$\lambda_{máx}$ (nm)	ε ($L.mol^{-1}.cm^{-1}$)	Ref.
Pb^{+2}	1:1	8	575	$6{,}5x10^4$	24
	1:2	7	575	$5{,}1x10^4$	26
	1:1	8,8 - 9,6	582	$5{,}5x10^4$	27
Fe^{+3}	1:2	5 - 7	555	$7{,}2x10^4$	31
	1:2	3 - 10	562 e 753	$8{,}8x10^4$ (562 nm) $3{,}4x10^4$ (753 nm)	33
	1:2	3 - 7	600	$1{,}3x10^5$	34
	-	2,5 - 3,5	592	$8{,}98x10^4$	32
Fe^{+2}	-	4	552	$4{,}5x10^4$	40
	-	2,5 - 3,5	557	$8{,}4x10^4$	32
	-	3,5 - 5,0	756	$3{,}35x10^4$	35
	-	3,5 - 10	558	$7{,}64x10^4$	41
Cu	1:2	4,0 - 7,0	545	$8{,}7x10^4$	38
	-	9,2	555	$1{,}041x10^5$	36
Cd	1:2	9	560	$1{,}16x10^5$	42

A maneira mais prática de se eliminar interferências em espectrofotometria é através de mascaramento. A tabela 5 apresenta os agentes mascarantes mais importantes para os elementos principais presentes no sangue. No entanto a utilização de agentes mascarantes na análise de chumbo em sangue fica inviabilizada uma vez que o número necessário de mascarantes é grande já

que o número de metais que estão presentes é grande e ainda pelo fato da concentração de ferro ser normalmente 5 mil vezes maior do que a quantidade de chumbo presente. Assim é que uma separação prévia torna-se uma opção mais atraente, a qual foi adotada para o presente trabalho. Para a separação prévia do chumbo dos outros metais interferentes foi utilizada uma resina trocadora de íons.

Tabela 5- Alguns elementos e seus agentes mascarantes mais importantes.

Elemento	Agente mascarante
Alumínio	F^-, oxalato, acetato, citrato, tartarato, EDTA, OH^-, trietanolamina, sulfosalicilato
Antimônio	Citrato, tartarato, I^-, S^{2-}, OH^-, F^-
Arsênio	S^{2-}, OH^-
Bário	EDTA, citrato, tartarato, SO_4^{2-}
Berílio	F^-, citrato, tartarato, sulfosalicilato
Bismuto	Citrato, tartarato, EDTA, I^-, tiouréia
Cádmio	EDTA, CN^-, $S_2O_3^{2-}$, SCN^-, I^-, citrato, tartarato
Cobalto	NH_3, NO_2^-, SCN^-, CN^-, $S_2O_3^{2-}$, EDTA
Cobre	NH_3, I^-, CN^-, $S_2O_3^{2-}$, tiouréia, EDTA, citrato, tartarato
Chumbo	Acetato, $S_2O_3^{2-}$, I^-, citrato, tartarato, EDTA, SO_4^{2-}
Cromo (III)	EDTA, citrato, tartarato, oxalato, acetato
Estanho	Citrato, tartarato, oxalato, OH^-, S^{2-}, F^-
Ferro (III)	F^-, PO_4^{3-}, $P_2O_7^{4-}$, EDTA, citrato, trietanolamina, tartarato, oxalato, sulfosalicilato
Fe (II)	CN^-, $S_2O_3^{2-}$, fenantrolina
Germânio	Oxalato, F^-
Índio	EDTA, oxalato, Cl^-, citrato
Manganês	Oxalato, $P_2O_7^{4-}$, EDTA, trietanolamina, citrato, tartarato
Molibdênio	F^-, Cl^-, oxalato, H_2O_2, citrato, tartarato, EDTA
Níquel	CN^-, EDTA, NH_3
Prata	CN^-, $S_2O_3^{2-}$, Br^-, I^-, Cl^-, tiouréia, NH_3
Tálio	F^-, citrato, oxalato, tartarato
Titânio	SO_4^{2-}, H_2O_2, F^-, citrato, tartarato, sulfosalicilato
Tungstênio	F^-, Cl^-, H_2O_2, oxalato, tartarato, citrato
Urânio	F^-, CO_3^{2-}, oxalato, H_2O_2, citrato, tartarato
Vanádio	H_2O_2, EDTA, F^-, oxalato
Zinco	CN^-, EDTA, SCN^-, OH^-, NH_3

Fonte: Marczenco, Z. - *Spectrophotometric determination of elements* - Ellis Horwood Limited, Chichester, 1976.

Resinas aniônicas quaternárias fortemente básicas têm sido utilizadas como pré-concentradora de chumbo em amostras de sangue (14, 17), e também como separadora de vários metais em outros tipos de amostras (16, 17, 21, 44, 45, 46, 47, 48).

O chumbo proveniente de soluções aquosas nítrica não pode ser fixado em resina aniônica fortemente básica devido a baixa tendência dos íons de chumbo formarem complexos nitratos carregados negativamente. No entanto, em soluções parcialmente não aquosas contendo o ácido nítrico, a adsorção do chumbo é aumentada à medida que se aumenta a quantidade do composto orgânico na mistura, aumentando assim o coeficiente de distribuição do chumbo na resina (44). A adição de solventes orgânicos a sistemas aquosos modifica a afinidade dos íons pela resina com a mudança de solvatação dos íons, diminuindo a constante dielétrica do sistema, e estabilizando certos complexos que são muito fracos em solução aquosa (20). Por estas razões utilizam-se misturas de soluções ácidas (21, 48) ou até mesmo misturas de solvente orgânico com ácido nítrico (44, 45) para a separação do chumbo de outros metais.

No presente trabalho usou-se a resina aniônica quaternária fortemente básica (AG1-X8) para se fazer a separação do Pb dos outros metais no sangue. Adicionalmente as condições foram ajustadas de modo a se manipular uma pequena quantidade de amostra (sangue), evitando diluições, de modo a alcançar desta forma alguns dos pré-requisitos estipulados pelo programa lançado pelo CDC-EUA em 1992. Este programa constava de um edital para financiamento de cinco projetos americanos para desenvolvimento de metodologia analítica de chumbo no sangue, com as seguintes características: volume reduzido de sangue (200 µL ou menor), uso de instrumento de baixo custo envolvendo testes baratos; robustez e compactabilidade do equipamento para facilitar a portabilidade; possibilidade de associação a um registrador o qual associe dados do paciente com os valores de chumbo no sangue; necessidade de treinamento mínimo do operador para utilização do equipamento bem como da metodologia. Esses requisitos deverão facilitar a aplicação do método a uma grande quantidade de amostras bem como permitir uma biomonitoração de alcance a grandes áreas geográficas sem que para isso o custo seja elevado.

2- PARTE EXPERIMENTAL

2.1- REAGENTES E PREPARO

REAGENTES

- As soluções dos reagentes contendo 1 g de cada metal foram da marca Merck para Pb, Cd e Cu, e Dilui-it para Fe.

- Ácido nítrico (HNO_3) P.A. marca Quimex a 65% e densidade de 1,400 g/mL.

- Metanol (CH_3OH) grau HPLC da Merck.

  Acrescentou-se ao metanol, antes de sua destilação, cerca de 1 g de EDTA para 1 L, agitado, filtrado e, então, destilado.

- 2-(5-bromo-2-Piridilazo)-5-(dietilamino)fenol(5-Br-PADAP)($C_{15}H_{17}BrN_4O$) da Sigma.

  A solução foi preparada pesando-se a quantidade necessária para obter uma solução a 1,2 x 10^{-3} M e adicionou-se 1 mL de dimetilformamida destilada, antes de ser completado o volume.

- N,N-dimetilformamida (DMF)(C_3H_7NO) P.A. da Merck a 95 % e densidade 0,948-0,949 g/mL. O reagente foi previamente destilado.

- Triton X-100® de densidade 1,064-1,066 g/mL.

  A solução a 3 % foi preparada em etanol.

- Álcool etílico (CH_3CH_2OH) P.A. da Quimex.

- Hidróxido de amônia (NH_3OH) P.A. da Quimex.

  A solução a 3 M foi preparada em etanol.

- Ácido bromídrico (HBr) P.A. da Reagen.

- Padrão de referência de metais em sangue. Marca Referensmaterial AB, AMI Certificate of Analysis. Biological control material AMI, B1001-B1005. O sangue liofilizado foi reconstituído, após ter permanecido por 1 hora à temperatura ambiente, com 5 mL de água deionizada e depois misturado e colocado no ultrassom por mais 1 hora.

- Resina aniônica quaternária fortemente básica, grau analítico, AG® 1-X8, 200-400 mesh, forma acetato. Marca Bio-Rad.

SOLUÇÕES

- Solução-padrão estoque de metais: Pb, Fe, Cu e Cd:

  As soluções-padrão de cada metal foram preparadas separadamente partindo das soluções com 1 g do metal na forma cloreto e diluídas para 1 L com HNO_3 5 %.

- Solução-padrão estoque de ferro em HBr 1 M; a solução com 1 g do metal foi diluída para 250 mL com HBr 1 M.

2.2- Equipamentos

-pH-Meter E 516 - Metrohom Herison com Microeletrodo de vidro combinado.

-Balança analítica - Metter AE 200

-Absorção Atômica - Perkin Elmer
Atomic Absorption Spectrophotometer 460
HGA 400 Programer (forno)
Lâmpada de cátodo oco, dos elementos Pb, Fe, Cu e Cd (Perkin Elmer)
Registrador ABB Metrawatt SE 120

-Espectrofotômetro UV-visível - DMS 80 - VARIAN
Registrador - Intralab

- Centimicro® FANEM Mod. 212

- Ultrasom - BRANSON 3210

- Micropipetas reguláveis - EPPENDORF®
10 - 100 µL
100 - 1000 µL

- Purificador de água - MILLI-Q™ Water System

2.3- PROCEDIMENTO

2.3.1- SISTEMA DE DETERMINAÇÃO DO CHUMBO

A determinação de chumbo em solução padrão com o reagente complexante 5-Br-PADAP foi testado de acordo com Novákova & Kubán (24). Após confirmação dos resultados com os obtidos pelos autores, foram feitas e testadas algumas modificações para a adequação do método às condições a serem obtidas com o protocolo pretendido para chumbo no sangue quais sejam: desproteinização dos metais no sangue com solução ácida e separação do chumbo por cromatografia por troca iônica.

Ao final, a solução de medida espectrofotométrica, compatibilizando as condições requeridas pela determinação e pelas separações, apresentou as seguintes condições: concentração do complexante $1,2x10^{-4}$ M; álcool etílico 50 % em volume; Triton X-100 0,15 %; ácido nítrico 0,5 M; hidróxido de amônia 0,5 M. As soluções padrão, amostra e branco foram preparadas seguindo esta mesma ordem de adição. Foi utilizado para o preparo destas soluções alíquotas de 1,5 mL em ácido nítrico 1 M. O volume final foi de 3 mL.

As medidas de absorvância foram realizadas no espectrofotômetro molecular, em células de 1 cm de caminho ótico, no comprimento de onda de 575 nm, usando fenda de 1 nm.

2.3.2- SISTEMA DE SEPARAÇÃO DE CHUMBO DOS OUTROS METAIS

A separação de Pb dos outros elementos mais interferentes foi procedida em coluna trocadora de íons. O estudo desta separação foi acompanhado por absorção atômica, no caso do ferro, que representa a maior interferência e a mais difícil de ser separada, procedeu-se um estudo espectrofotométrico no visível em paralelo ao controle por absorção atômica. Três séries de experiências de otimização da separação cromatográfica foram realizadas e estão descritas abaixo. Basicamente as diferenças residem na natureza dos eluentes. Em todas as experiências utilizou-se colunas de vidro de diâmetro interno de 0,5-0,7 cm, recheadas com 10 cm de resina AG1-X8 (cerca de 2 g)

e concentrações de metais semelhantes às utilizadas em algumas referências consultadas (21, 45, 46, 48) e em condições equivalentes de separação.

A) ELUENTE METANOL/HNO_3 (9:1)

- **PRÉ-TRATAMENTO DA RESINA**

A resina AG1-X8 (cerca de 2 g) foi transformada para a forma nitrato com a passagem de ácido nítrico 5 N. Esta etapa foi realizada inicialmente em béquer, com adição à resina de duas porções de 10 mL do ácido nítrico. Na segunda porção, a solução com a resina foi transferida para a coluna. Após compactação do leito, é passada pela mesma mais 3 a 5 porções do ácido para a sua completa transformação à forma nitrato.

A resina foi então convertida para a forma específica desejada, passando-se 30 a 50 mL da solução de metanol/HNO_3 5 N 9:1 (chamada de solução de lavagem).

- **ETAPA DE ADSORÇÃO E ELUIÇÃO**

Pela coluna foi passada 20 mL da solução mistura dos componentes a serem separados em 90 % de metanol e 10% HNO_3 5 N contendo: 40 µg de Pb e 200 µg de cada elemento a saber: Fe, Cu e Cd. Depois foi feito passar pela coluna 60 mL da solução de lavagem, para eluição dos metais interferentes, seguido de 25 mL de HNO_3 1 N, para eluição do chumbo. O fluxo foi de 0,6-0,7 mL/min. Foram recolhidas 4 alíquotas de 5 mL quando da passagem da mistura; 6 alíquotas de 10 mL quando da passagem da solução de lavagem e 5 alíquotas de 5 mL quando da passagem da solução de eluição (HNO_3 1 N) para proceder a análise por absorção atômica e obtenção dos dados de eluição, assim como a recuperação do chumbo.

B) ELUENTE ETANOL/HNO_3 (9:1)

O mesmo procedimento descrito anteriormente foi seguido substituindo-se metanol por etanol. O fluxo de eluição foi 0,8 mL/min. Esta série de experiências foi feita num intuito de se substituir um solvente relativamente tóxico por um não tóxico, e também, visando baixar os custos.

C) ELUENTE HBr 0,2 M/HNO_3 0,5 M

- **PRÉ-TRATAMENTO DA RESINA:**

A conversão da resina para formar nitrato foi realizada passando-se pela mesma HNO_3 2 M. Procedeu-se inicialmente em béquer com adição à resina de duas porções de 10 mL do ácido, sendo que na segunda porção a solução com a resina é transferida para a coluna e lavada mais 3 a 5 vezes com ácido, após a sua compactação. Depois desta conversão a resina é lavada com água deionizada. A transformação para a forma brometo foi feita com a passagem de cerca de 40 mL de HBr 1 M.

Em todos os sistemas, a passagem do ácido nítrico tem a função de transformar, com igualdade, a resina para a forma nitrato e de purificá-la antes da sua conversão para a forma específica.

- **ETAPA DE RETENÇÃO E ELUIÇÃO**

Passou-se pela coluna 10 mL da solução da mistura contendo: 4140 μg de Pb; 4200 μg de Fe; 65,4 μg de Cu e 2250 μg de Cd em HBr 1 M. Depois passou-se 25 mL da solução a 0,2 M de HBr e 0,5 M de HNO_3 (solução de lavagem) para eliminação dos metais interferentes. Em seguida foi passado pela coluna cerca de 50 mL da solução a 0,05 M de HBr e 0,5 M de HNO_3 (solução de eluição) para eluição do Pb. O fluxo das etapas foi de 0,1 mL/min. As alíquotas recolhidas foram: 01 (de 10 mL) quando da passagem da solução de adsorção, 05 (de 5 mL cada) quando da passagem da solução de lavagem e 10 (de 5 mL cada) quando da passagem da solução de eluição.

As medidas dos metais Pb, Fe, Cu, e Cd de cada item descrito acima foram feitas para cada alíquota recolhida, utilizando-se espectrofotometria de absorção atômica com forno de grafite. O tubo de grafite utilizado foi: não pirolisado para os metais Pb e Fe, e pirolisado para os elementos Cu e Cd. A fenda utilizada para os metais foi de 0,7 nm exceto para o cádmio que foi usada em 2,0 nm, ambos no modo ALT do equipamento. Os comprimentos de onda usados foram: Pb a 283,3 nm; Fe a 248,6 nm; Cu a 324,7 nm, e Cd a 228,8 nm. As curvas padrão estiveram numa faixa de 0-100 ppb para o Fe e Pb; de 0-15 ppb para Cu e de 0-2 ppb para o Cd.

Cada elemento analisado teve as condições instrumentais otimizadas. As programações utilizadas para o forno estão descritas na tabela 6.

TABELA 6- Programação do forno de HGA 400 para os elementos Pb, Fe, Cu, e Cd.

	Valores de Temperatura (°C)/ tempo de rampa (s)/ tempo de permanência (s)			
ETAPAS	**Pb**	**Fe**	**Cu**	**Cd**
Secagem	100 / 10 / 20	120 / 10 / 20	120 / 10 / 20	100 / 10 / 20
Pré-tratamento	400 / 5 / 10	500 / 5 / 10	900 / 5 / 20	450 / 5 / 15
Atomização	1200 / 0 / 5	2500 / 0 / 5	2000 / 0 / 5	1400 / 0 / 5

Obs.: A etapa de limpeza do tubo de grafite foi igual para todos os elementos usando uma temperatura de 2650°C com tempos de rampa e de permanência de 1 e 3 s, respectivamente.

A tabela 6 fornece a temperatura, tempo de rampa e de permanência para cada etapa do forno, a saber: secagem (etapa correspondente a eliminação do solvente), pré-tratamento (etapa referente à destruição da matéria orgânica da amostra) e atomização (etapa onde ocorre a promoção a átomos neutros para posterior absorção de radiação). O primeiro valor numérico de cada coluna corresponde à temperatura de cada etapa, seguido do valor do tempo de rampa (tempo de aumento gradual da temperatura até atingir o valor fixado no programa) e o valor do tempo de permanência (tempo no qual a temperatura de cada etapa permanece fixada). Esta programação foi seguida na análise dos elementos descriminados na tabela 6.

2.3.3- ADAPTAÇÃO DO MÉTODO ÀS CONCENTRAÇÕES PRESENTES NO SANGUE

Uma vez otimizada a separação para concentrações altas equivalente àquelas de minérios, procedeu-se um estudo de adequação da separação cromatográfica às concentrações de metais ao nível de traços encontrados em sangue humano. Também a relação entre o Pb e os metais interferentes é diferente no sangue.

Enquanto no estudo acima descrito (método a) a quantidade de chumbo adicionada à coluna tenha sido de 40 µg de Pb para 200 µg de cada interferente, tal relação não é encontrada em sangue. Em sangue humano os níveis médios de Fe e Cu são, respectivamente, 500 ppm e 1 ppm. Considerando-se um sangue de indivíduo mediamente contaminado por chumbo e contaminado cádmio, pode-se tomar como exemplo 400 ppb para cada metal. Para obter-se uma quantidade de chumbo que resultasse em uma solução de medida espectrofotométrica acima do limite de detecção do método, optou-se por utilizar 500 µL de amostra.

Adicionalmente, o comprimento da coluna foi reduzido, passando a 3 cm. Depois de otimizada a separação nestas novas condições, reduziu-se ainda mais a concentração do chumbo, chegando-se a 100 ppb. Como nestas condições o metanol utilizado, embora grau HPLC, apresentava brancos altos devido a presença de Fe no metanol, passou-se, então, a destilar este álcool. Foi mantido o mesmo tratamento da coluna e a quantidade de solução de lavagem e eluição do método ***a***.

2.3.4- APLICAÇÃO DO MÉTODO À AMOSTRA REAL.

- **TRATAMENTO DA AMOSTRA DE SANGUE**

A 500 µL de ácido nítrico 1 M foi adicionado à mesma quantidade do sangue de referência. Depois de vigorosa agitação manual, a amostra foi levada ao ultra-som por 5 minutos, após o qual a mesma foi centrifugada a alta velocidade por 15 minutos. A solução ácida resultante era então utilizada no procedimento seguinte.

- **TRATAMENTO DA COLUNA**

Primeiramente, foi passada pela coluna (a mesma do item 2.3.3) 5 mL de ácido nítrico 5 N. Para a sua conversão, foi passada 30 mL da solução a 90 % de metanol (destilado do grau HPLC) e 10 % de HNO_3 5 N (chamada de solução de lavagem).

- **CONFIRMAÇÃO DA SEPARAÇÃO DOS INTERFERENTES**

Após o pré-tratamento da coluna colocou-se 500 µL da solução ácida resultante da extração dos metais do sangue, seguida da passagem de 40 mL da solução de lavagem. Para a eluição do Pb, foi passado pela coluna HNO_3 1 N e depois recolhido o volume de 1,5 mL em porções de 0,1 mL. O fluxo foi de 0,5-0,6 mL/min para todo o processo, exceto no momento da eluição do chumbo que foi deixado passar um fluxo de 0,2 mL/min. O branco da amostra, HNO_3 1 N, seguiu o mesmo processo descrito acima. As alíquotas retiradas da eluição foram analisadas no aparelho de absorção atômica para os metais Pb e Fe, este último para observar a sua influência no método.

2.3.5. SISTEMA RESINA ACOPLADO AO MÉTODO ANALÍTICO.

Uma vez otimizadas as condições do pré-tratamento da amostra de sangue e da separação do Pb dos interferentes, procedeu-se a determinação espectrofotométrica do analito da seguinte maneira: após passagem da amostra e do branco pela coluna, como descrito acima, a solução decorrente da eluição do chumbo (1,5 mL) era submetida ao mesmo procedimento dos padrões para determinação espectrofotométrica (de acordo com o item 2.3.1), medindo-se a absorvância a 575 nm no espectrofotômetro DMS-80.

3 - RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1- SISTEMA DE DETERMINAÇÃO DE CHUMBO EM SOLUÇÃO PADRÃO

Os espectros de absorção do chumbo e do ferro com o Br-PADAP foram obtidos para melhor se entender e eliminar a interferência do ferro são mostrados na figura 5. Pelo apresentado, o melhor comprimento de onda de trabalho para o chumbo-ligante é 575 nm. Pelo espectro observa-se também a grande interferência que o ferro apresenta ao sistema Pb-Br-PADAP, sendo, portanto, necessária uma real separação prévia destes dois metais, principalmente quando se considera que a relação de Fe/Pb em sangue não contaminado é de 5000.

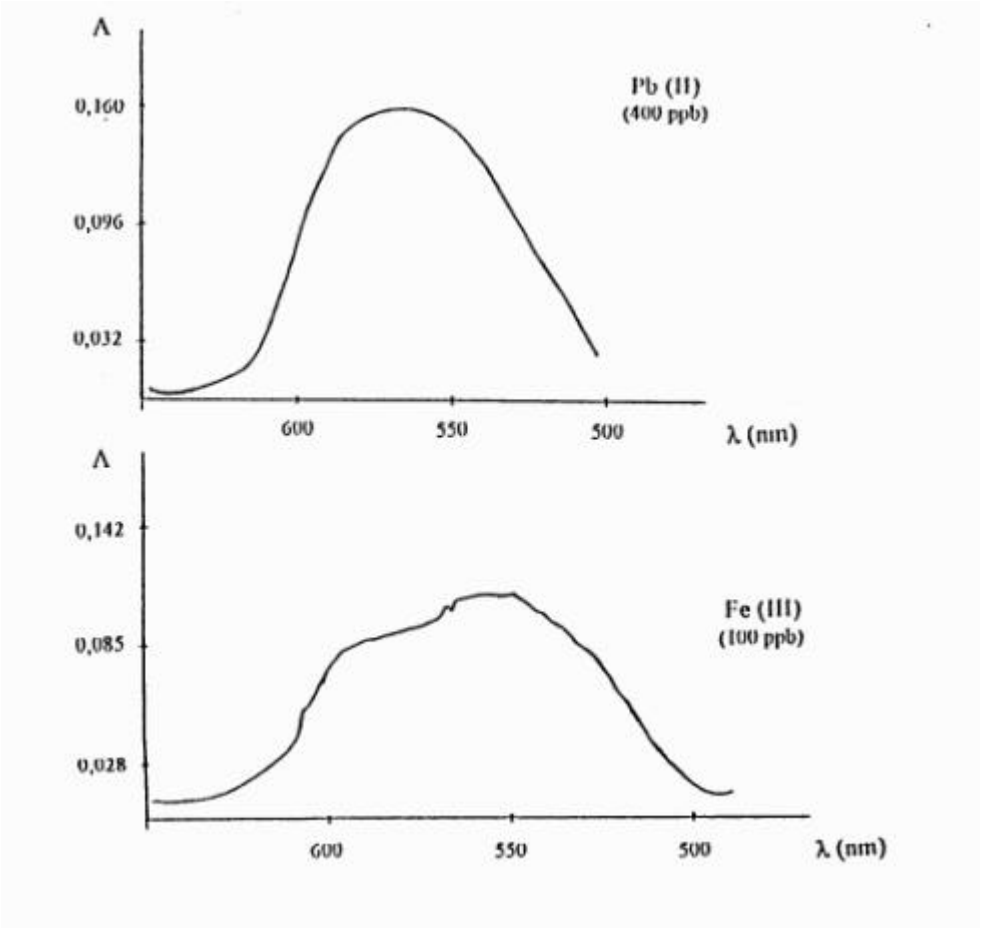


Figura 5: Espectros de absorção do Pb(II) e Fe(III) com o 5-Br-PADAP.
(condições: concentração do complexante a 1,2x10-4 M; etanol a 50% v/v, Triton X-100 a 0,15 %; meio ácido a 0,5 M e hidróxido de amônia a 0,5 M)

O sistema Pb-5-Br-PADAP apresentou um valor de absortividade molar (ε) de $6{,}92 \times 10^4$ L/mol.cm, a um pH medido de 9,20 ± 0,05 e a 50 % em etanol.

O pH é chamado lido devido à influência do solvente no meio que afeta a atividade do íon hidrogênio. Esta influência reflete nas interações eletrostática e química entre o íon (H^+) e o solvente, no qual a primeira interação é a solvatação. Este efeito pode ser descrito pela comparação da energia livre padrão num solvente não aquoso e em água. Por exemplo, a atividade do íon hidrogênio em etanol é muito maior (~ 200 vezes) do que em água. A correlação entre a atividade do íon hidrogênio num padrão aquoso e a atividade numa amostra não aquosa não é válida. Se, contudo, o valor de pH obtido é estável e pode ser correlacionado a alguns resultados, a atividade do íon hidrogênio não precisa ser conhecida. O valor de pH relativo pode ser usado como um indicador na sua alteração durante o processo (49).

A curva padrão do Pb-5-Br-PADAP revelou alta linearidade e sensibilidade como é mostrada na figura 6. A tabela 7 expõe os dados de desvio-padrão (s) para cada ponto da curva.

Tabela 7 : Dados da curva de calibração do Pb-Br-PADAP.

Conc. (ppb)	Absorvância†			desvio padrão (s)
10	0.002	0.003	*	0.00071
20	0.006	0.006	0.005	0.00058
30	0.009	0.009	0.010	0.00058
40	0.012	0.013	0.012	0.00058
50	0.016	0.017	0.015	0.0010
60	0.019	0.020	0.019	0.00058
80	*	0.026	0.025	0.00071
100	0.032	0.033	0.032	0.00058
150	0.047	0.051	0.048	0.0021

* Sem resultado.

† Resultados subtraídos do branco (mesmas condições descritas na figura 5).

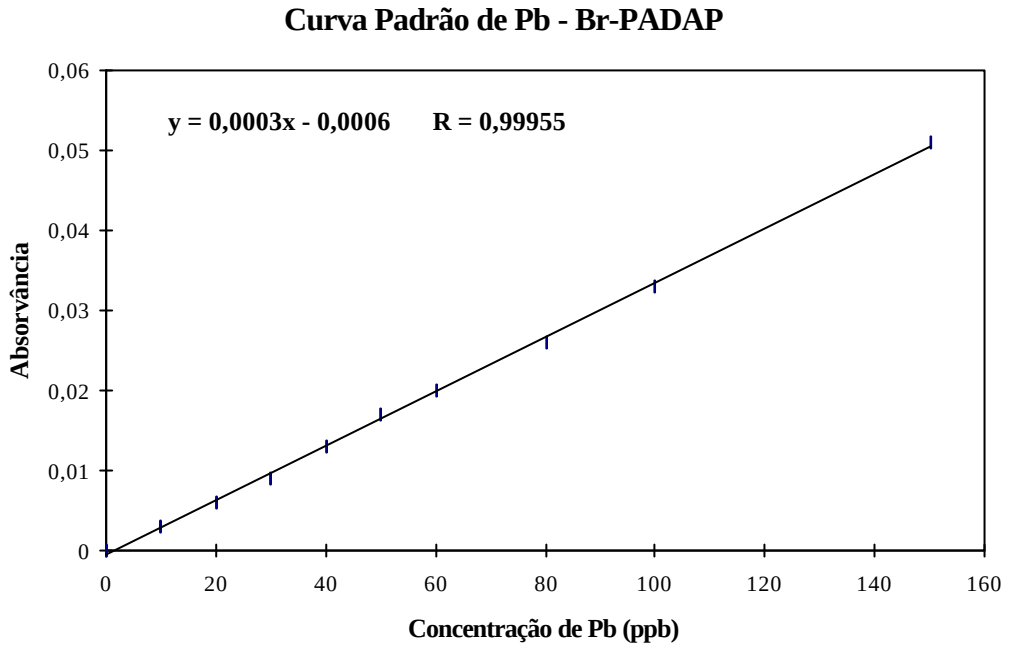


Figura 6: Curva padrão do Pb-5-Br-PADAP
(mesmas condições descritas na figura 5)

Os valores de brancos encontrados para o método espectrofotométrico estão relacionados na tabela 8. Eles apresentam uma média de 0,070 (em absorvância) e um desvio padrão (s) de 0,00162.

Para determinar o limite de detecção (L.D.) do sistema Pb-Br-PADAP, foram feitos os seguintes cálculos:

L.D. = 3 x s = 0,005 (em absorvância)

Pela curva encontra-se a correspondência em concentração. Então:

L.D. = 18,7 ppb

Sensibilidade é dada pela inclinação da curva, $\Delta A/\Delta C$ (α)

Considerando-se ΔA = 1 % a menor variação detectável com confiança, então:

S = 0,044.α, ou seja, 13 ppb para a faixa de 19-150 ppb.

TABELA 8: Brancos Obtidos para a Curva Espectrofotométrica de Pb-5-Br-PADAP.

Nº BRANCO	ABSORVÂNCIA
01	0.068
02	0.068
03	0.068
04	0.068
05	0.068
06	0.069
07	0.070
08	0.070
09	0.070
10	0.070
11	0.071
12	0.071
13	0.071
14	0.071
15	0.071
16	0.072
17	0.072
18	0.072
19	0.072
20	0.072
21	0.072
22	0.073

3.2. SISTEMA DE SEPARAÇÃO DE CHUMBO DOS OUTROS METAIS

A ordem de eluição dos quatro metais em questão, Pb que é o analito e Fe, Cu e Cd que são os interferentes foi igual no caso dos métodos ***a*** e ***b*** (item 2.3.2), ou seja, Fe, Cd e Cu eluiram em primeiro lugar conjuntamente e depois eluiu o chumbo. Esta ordem de eluição foi diferente no método ***c***, a saber: em primeiro lugar o Fe e o Cu, depois eluiu o chumbo e por fim o cádmio. A tabela 9 apresenta os dados obtidos.

A eficiência de separação foi calculada para os três sistemas e estão apresentadas na tabela 9. Para seleção final, priorizou-se a eficiência de separação do Pb e Fe e, depois, a do Cu e, por último a de Cd. Esta

preferência baseou-se nas quantidades encontradas destes elementos em amostras reais (ver tabela 3).

TABELA 9- Eficiência da Separação do Chumbo de outros Metais nos Métodos Estudados.

Método	*Solução*	*Eficiência de Separação dos Metais (%)*			
		Pb	*Fe*	*Cu*	*Cd*
a	L_E	*106*	*0.8*	*0.03*	*0.2*
	L_L	-	*7.5*	*9.44*	*90.1*
	L_A	-	*91.7*	*90.53*	*9.7*
b	L_E	*105*	*2.7*	*0.08*	*0.40*
	L_L	-	*19.5*	*66.37*	*99.59*
	L_A	-	*77.8*	*33.55*	*0.01*
c	L_E	*99.914*	*0.1*	*0.02*	*3.3**
	L_L	*0.084*	*37.0*	*26.87*	-
	L_A	*0.002*	*62.9*	*73.11*	-

* Na última alíquota para recuperação total do Pb.

Legenda: (a) Método utilizando eluente Metanol/HNO_3 (9:1) (45, 46)
(b) Modificação do método (a) utilizando eluente Etanol/HNO_3
(c) Método utilizando eluente HBr 0,2 M/HNO_3 0,5 M (21, 48)
L_E : Fração total das alíquotas recolhidas provenientes da passagem da solução de eluição (solução para eluir apenas o chumbo).
L_L: Fração total das alíquotas recolhidas provenientes da passagem da solução de lavagem (solução para eliminação de interferentes).
L_A: Fração total das alíquotas recolhidas provenientes da passagem da solução com a mistura dos metais.

Pelos resultados apresentados, observa-se que:

* Baseado na eliminação de interferências do Fe apenas, métodos (***a***) e (***c***) são os mais satisfatórios. Entre os dois métodos, o (***a***) é o mais eficiente na eliminação do Cd que o (***c***).

Deste modo, o método (***a***) foi escolhido para o trabalho. Foram fatores adicionais na escolha do método (***a***):

• Necessidade de purificação dos reagentes.

Para se atingir o limite de quantificação desejado necessita-se purificar previamente os solventes e compostos utilizados na eluição, para eliminação de impurezas, principalmente o ferro. Geralmente o método mais viável é a

destilação. Para o método (***c***) necessita-se de ácido bromídrico na solução eluente, cuja destilação é problemática e a obtenção no mercado a alta pureza é difícil e bastante dispendioso. Já o metanol, utilizado no método (***a***), pode ser encontrado a um custo não tão elevado e com grau de pureza significativa.

- Volumes necessários para eluição.

A recuperação completa do chumbo é obtida a volumes menores no método (***a***) o que reduz o tempo de análise.

- Situações possíveis na aplicabilidade a estudos epidemiológicos.

Embora a concentração de cádmio em sangue normal seja < 1µg/L para não fumantes (tabela 3), em muitas situações de exposição profissional e ambiental, notadamente naquelas relacionadas com exploração ou processamento de minérios, o chumbo vem associado ao cádmio, resultando na exposição e conseqüente absorção simultânea de ambos os metais. Neste caso, a eliminação da interferência de Cd em concentrações de 50 ppb é comum, e a eficiência da separação deste metal e do Pb passa a ser também muito importante. As amostras de referência certificadas, usadas neste trabalho continham os dois metais em concentrações comparáveis com situações de não-intoxicação e intoxicação simultânea de ambos.

Deve-se, no entanto, deixar aqui registrado que o método (***c***) apresenta uma vantagem sobre os métodos (***a***) e (***b***), qual seja a perspectiva de dosagem adicional de Cd na amostra, uma vez que sua eluição é isolada dos outros metais e esta idéia será perseguida futuramente pela autora dessa dissertação, no trabalho de doutorado.

3.2.1- ADAPTAÇÃO DO MÉTODO ÀS CONCENTRAÇÕES PRESENTES NO SANGUE.

A primeira grande modificação introduzida ao método de separação cromatográfica selecionado (método ***a***) foi a redução das concentrações dos metais ao nível dos valores normais encontrados em sangue, exceto para chumbo e cádmio cujo valores foram a nível de intoxicação por estes metais.

Os resultados para a coluna de 10 cm apresentaram uma completa recuperação do chumbo, sem perdas no momento da passagem da solução de lavagem. Com a redução do tamanho da coluna para 3 cm de altura, houve mais uma vez recuperação total do Pb, sem perdas na solução de lavagem. Foi obtida também a eliminação completa do Cu e Cd (tabela 10), mas com relação ao ferro, este ainda apresentou um pequeno teor no líquido de eluição recolhido, 18,3 ng, que numa solução de 3 mL de volume total, corresponderia a uma concentração de 6,1 ppb de Fe. A esta concentração, o complexo de Fe-Br-PADAP não é detectado pelo método espectrofotométrico apresentado.

Tabela 10: Recuperação dos metais nos líquidos de eluição e lavagem para os métodos I e II:

	RECUPERAÇÃO (%)			
	MÉTODO I: SOLUÇÕES		MÉTODO II: SOLUÇÕES	
METAIS	L_E	L_L	L_E	L_L
Pb	106	-	102	-
Fe	0.8	99.2	0.01	99.99
Cu	5.8	94.2	-	100
Cd	0.9	99.1	-	100

Condições: Adição de 500 µL da solução a 400 ppb Pb, 500 ppm Fe, 1 ppm de Cu e 400 ppb Cd.
Método (I) - 10 cm de altura de resina (mesma coluna do item 2.3.2-a).
Recolhidas 15 alíquotas de 10 mL cada quando da passagem do líquido de lavagem e 10 alíquotas (2-3 mL cada) quando da passagem do líquido de eluição.
Método (II) - 3 cm de altura de resina (mesma coluna do item 2.3.3).
Etapa 1: Medidas feitas para Cu e Cd em 5 alíquotas (1 mL cada).
Etapa 2: Medidas feitas para Pb e Fe em 15 alíquotas (0,1 mL cada).

3.2.2- APLICAÇÃO DO MÉTODO À AMOSTRA REAL.

Para este estudo, utilizaram-se sempre amostras de sangue de referência certificadas em dois diferentes níveis de concentração: 250,4 ppb e 355,7 ppb.

Os resultados encontrados nesta etapa referendam a eficiência das separações obtidas para soluções de padrões. Foi também confirmado o baixo valor de ferro recuperado juntamente com o Pb, ou seja, de 0,01 %. A figura 7 apresenta as curvas de eluição do Pb no branco e na amostra de referência de sangue. A recuperação do chumbo foi medida, em 15 alíquotas consecutivas de 0,1 mL. Tal estudo descreve também a evolução da eliminação deste metal durante o processo, o que é de interesse futuro, quando se deseja o método a injeção de fluxo.

Com base ainda na figura 7, pode-se fazer as seguintes considerações:

A massa total de Pb recolhido da amostra de sangue corresponde a: 148 ng

A massa total de Pb recolhido do branco do método corresponde a: 17,8 ng

A massa referente ao sangue será: 148 - 17,8 = 130,2 ng

A concentração do Pb no sangue encontrada foi = 260,4 ppb

O valor de referência certificado da amostra é: 250,4 ppb ± 0,4 ppb

A exatidão obtida na análise é: ≥ 96%

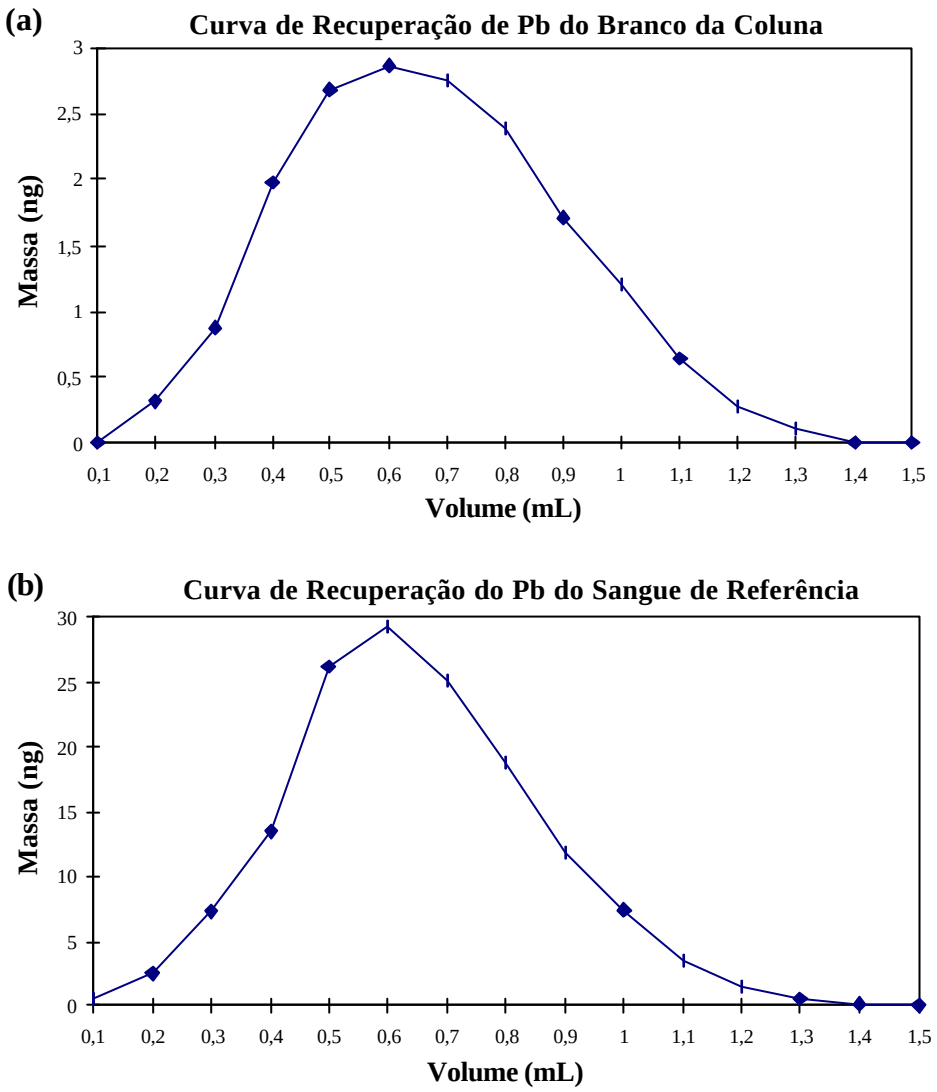


Figura 7: Curvas de recuperação de chumbo no branco e no sangue, após a passagem pela resina aniônica quaternária.

Assim sendo, podemos concluir que a recuperação do Pb separado dos outros metais em amostras de sangue é $\geq$ 96 %. Os resultados encontrados para a amostra de referência a 250,4 ppb foram 257,6 $\pm$ 6,0 ppb o que oferece um erro de cerca de 3 %.

3.3- SISTEMA RESINA ACOPLADO AO MÉTODO ANALÍTICO

Nesta etapa, foi utilizado o padrão de referência certificado 1004, com concentração de 250,4 ppb.

A introdução de um extrato de matriz complexa, após passagem pela resina, não afetou a determinação espectrofotométrica do Pb com o Br-PADAP.

Os resultados encontrados para o método proposto neste trabalho estão apresentados nas tabelas 11 e 12. A tabela 11 expõe os valores dos brancos decorrentes da passagem pela coluna e posterior determinação espectrofotométrica de acordo com o item 2.3.1. Estes forneceram um valor médio de 0,070 (em absorvância) e um desvio padrão (s) de 0,00174, o que está bastante coerente com os valores encontrados para os brancos da curva padrão. Em outras palavras, isto demonstra que o chumbo proveniente do branco da coluna é insignificante e não interfere nos resultados.

TABELA 11- Brancos encontrados para a coluna acoplada ao método espectrofotométrico

N° do Branco	Absorvância
01	0,067
02	0,068
03	0,068
04	0,068
05	0,068
06	0,069
07	0,069
08	0,069
09	0,069
10	0,069
11	0,069
12	0,070
13	0,070
14	0,071
15	0,071
16	0,072
17	0,072
18	0,072
19	0,072
20	0,073
Valor médio (X)	**0,070**
Desvio padrão (s)	**0,00174**

A tabela 12 apresenta os resultados encontrados para a amostra de referência 1004 utilizando o método proposto por este trabalho, assim como as características estatísticas das medidas.

TABELA 12- Resultados encontrados em concentração para a amostra de referência.

Porção de amostra 1004 analisada	Absorvância subtraída do branco	Concentração encontrada na solução de leitura (ppb)	Concentração encontrada na amostra (ppb)
A_1	0,015	43,3	259,8
A_2	0,012	42,0	252,0
A_3	0,013	44,3	265,8
X	Média das amostras	(ppb)	259,2
s	Desvio padrão	(ppb)	6,92
CV	Coeficiente de variância	(ppb)	2,7
Valor certificado (ppb)			250,4
Exatidão ao nível de 250 ppb/sangue (%)			96,5

O limite de quantificação (L.Q.) do método é determinado tomando-se como base o limite de detecção da curva padrão como segue:

L.D. = 18,7 ppb

A massa retida na coluna será 3 vezes maior que este valor devido às diluições do protocolo analítico espectrofotométrico ser de 3 mL, então:

m (ng) = 3 x 18,7 = 56,1 ng

Como utilizam-se 500 µL de amostra, a concentração mínima quantificada pelo método será:

L.Q. = 56,1 / 0,5 = 112,2 ppb

O sangue de referência utilizado apresentava um teor de chumbo de 250,4 ppb. Como são adicionados 0,5 mL do extrato do sangue à coluna, a massa retida será:

m (ng) = 250,4 x 0,5 = 125,2 ng

Como a massa média recolhida corresponde a 129,6 ng o erro apresentado pelo método é de 3,5 %.

Estes resultados demonstram que o método desenvolvido tem uma boa precisão, mas uma exatidão discretamente reduzida. Apesar disto, o resultado se apresentou comparável com o encontrado pelo método de absorção atômica (erro de 3 %), o que mostra a confiabilidade que o método oferece, fornecendo-nos, portanto, segurança no momento da sua aplicação.

3.4 - PROTOCOLO ANALÍTICO DE DETERMINAÇÃO ESPECTROFOTOMÉTRICA DE CHUMBO EM SANGUE

O método desenvolvido resulta no seguinte protocolo analítico:

1-Reagentes e soluções

- Solução padrão estoque de chumbo:

  A solução estoque, a 1000 ppm em HNO_3 5 %, é preparada partindo-se da solução padrão de referência da marca Merck.

- Metanol (CH_3OH) grau HPLC:

  O metanol antes de ser destilado adiciona-se EDTA (cerca de 1 g para 1 L) com agitação, filtra-se e depois destila, utilizando-se para tal uma vidraria recoberta com papel aluminizado.

- Ácido nítrico (HNO_3):

  Soluções a 1 e 5 M.

- 2-(5-bromo-2-piridilazo)-5-(dietilamino)fenol (5-Br-PADAP):

  A solução é preparada pesando-se a quantidade necessária para obter uma solução a $1{,}2 \times 10^{-3}$ M, adiciona-se 1 mL de dimetilformamida destilada e depois completa-se o volume com etanol.

- N,N-dimetilformamida destilada (DMF)(C_3H_7NO).
- Etanol (CH_3CH_2OH).
- Triton® X-100:

  Solução a 3 % em etanol.

- Hidróxido de amônia (NH_4OH).

  Solução a 3 M em etanol.

- Resina aniônica quaternária fortemente básica (AG1-X8).
- Padrão de referência de metais em sangue e/ou amostra de sangue em heparina.

2-Extração do chumbo do sangue

A amostra de sangue é primeiramente homogeinizada com movimentos suaves de rolamento. A 500 µL de ácido nítrico 1 M são adicionados 500 µL do sangue. Depois de vigorosa agitação manual, a amostra permanece no ultra-som por 5 minutos seguidos de centrifugação a alta velocidade por 15 minutos. A solução ácida resultante pode ser então utilizada no procedimento que se segue.

3-Separação do chumbo dos outros metais

3.1- Pré-tratamento da resina

Passar pela coluna (3 cm de comprimento e 0,5 cm de diâmetro interno) 5 mL de ácido nítrico 5 N e depois 30 mL da solução de metanol/HNO_3 5 N 9:1 (chamada solução de lavagem).

3.2- Etapa de retenção e eluição

Após o pré-tratamento da coluna coloca-se 500 µL da solução ácida resultante da extração da amostra ou branco seguida da passagem de 40 mL da solução

de lavagem (para eluição dos metais interferentes) e para a eluição do chumbo, passar HNO_3 1 N e recolher o volume de 1,5 mL do líquido final. Utilizar um fluxo de 0,5-0,6 mL/min para todo o processo exceto no momento da eluição do chumbo que é de 0,2 mL/min.

4- **Determinação espectrofotométrica de chumbo**

A solução final para a determinação de chumbo apresenta a seguinte composição: concentração do 5-Br-PADAP $1,2x10^{-4}$ M; álcool etílico a 50 % em volume; Triton X-100 0,15 %; solução padrão, amostra ou branco em ácido nítrico a 0,5 M; hidróxido de amônia 0,5 M. As soluções padrão, amostra e branco são preparadas seguindo esta mesma ordem de adição. Para o preparo destas soluções, são utilizadas alíquotas de 1,5 mL em ácido nítrico 1 M. O volume final da solução é de 3 mL.

As medidas são realizadas no espectrofotômetro molecular, em cubeta de 1 cm de caminho ótico, no comprimento de onda de 575 nm e fenda de 1 nm.

5- **Características do método**

Limite de quantificação em 500 μL de amostra de sangue, 112 ppb; precisão ao nível do L.Q. ≥ 3 ppb e exatidão ao nível de 250 ppb ≥ 96,5 %.

4 - CONCLUSÕES

a- Foi desenvolvida uma metodologia para determinação de chumbo em sangue utilizando espectrofotometria molecular de baixo custo, e que permite a ampla implantação em laboratórios de análise clínica sem necessidade de investimentos de capital.

b- As características analíticas do método são: limite de quantificação 112 ppb; precisão ao nível do L.Q. ≥ 3 ppb; exatidão ao nível de 250 ppb ≥ 96,5 %. Estas características permitem a aplicabilidade para controle de exposição profissional.

c- O método desenvolvido é bastante encorajador para atingir, a um curto e médio prazo, as aspirações do CDC para aplicação a amplos estudos epidemiológicos infantis.

5 - TRABALHOS FUTUROS

Pretende-se a continuação do trabalho, como tese de doutorado, alcançar os objetivos estipulados pelo programa do CDC (vide tabela 13) utilizando o método de fluxo contínuo que permitirá automação, propiciará a redução de volume de sangue utilizado e, acoplado a um espectrofotômetro molecular de pequeno porte de campo, permitirá portabilidade e robustez, tornando-se deste modo um método para campo, e podendo assim ser aplicado a grandes áreas geográficas.

TABELA 13- Comparação das aspirações do método de determinação espectrofotométrica de Pb em sangue com 5-Br-PADAP com os requisitos do CDC e etapas futuras de aprimoramento.

Parâmetro	Especificações do CDC	Especificações obtidas pelo método	Etapas futuras visando atendimento às exigências do CDC.
L.Q.	100 ppb	112 ppb	Mudança de cubeta Aumento da relação volume de sangue para volume de ácido de desproteinização
Precisão	10-20 ppb	2,7 ppb	-
Exatidão	90 %	96,5 %	-
Volume de sangue	200 µL	500 µL	Mudança de cubeta p/ caminho ótico de 2,5cm Miniaturização adicional do método Injeção de fluxo
Tempo de medida	5 min	90 min	Injeção de fluxo Separação em coluna sob média pressão

Como forma de aprimorar o método pretende-se fazer também a miniaturização da coluna e aumentar o caminho ótico utilizando cubetas de 2-2,5 cm, de pequeno volume. Adicionalmente pretende-se a aplicação a amostras de urina visando o monitoramento de populações expostas profissionalmente ou a altas concentrações ambientais. Pretende-se inclusive aplicar este método, intercalibrando com absorção atômica, a populações vizinhas a trabalhadores de metalúrgicas, trabalhadores de indústrias de tintas, ceramistas, pintores etc., de modo a se certificar que todas as possíveis interferências serão eliminadas.

Estes resultados demonstram que o método apresenta um limite de quantificação apenas 12 % acima do referido pelo CDC (o qual poderá

facilmente ser reduzido), com uma precisão e exatidão superiores àquela exigida por este órgão.

No entanto o método por nós desenvolvido ainda utiliza uma quantidade de sangue superior à desejável, exigindo amostragem intravenosa, ao invés do retirado do dedo, além do tempo de análise ser muito demorado para fins de análise de rotina. No entanto tais características indesejáveis poderão ser eliminadas adaptando-se o método a injeção de fluxo, a mudanças de caminho ótico com a cubeta, a miniaturização adicional do método e a introdução de média pressão manual, com seringa, na etapa de separação, como pode ser verificado na tabela 13 que resume as etapas futuras que visam atendimento às aspirações do CDC e que serão por nós desenvolvidas.

6 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

01. ELINDER, C. G.; Gerhardsson, L. and Oberdoerster, G. - *Biological Monitoring of Toxic Metals* - Overview. In: Clarkson,T.W.; Fiberg, L. ; Noberg, G.F. and Sager, P.R. - *Biological Monitoring of Toxic Metals*, New York, Plenum Press, 1-71, (1988).

02. OEHME, F. W. - Mechanisms of Heavy Metal Inorganic Toxicities In: _____. - *Toxicity of Heavy Metals in the Environment*, New York, Marcel Dekker Inc., Part 1, 72-74, (1978).

03. SKERFVING, S. - Biological Monitoring of Exposure to Inorganic Lead. In: Clarkson, T.W.; Friberg, L.; Nordberg, G.F. and Sager, P.R. - *Biological Monitoring of Toxic Metals*, New York, Plenum Press, 169-197, (1988).

04. CENTER for Disease Control - Preventing lead poisoning in young children - *The Journal of PEDIATRICS*, **93**(4), 709-720, Oct. (1978).

05. HAMMOND, P.B. - Metabolism and Metabolic Action of Lead and Other Heavy Metals. In: Oehme, F. W. - *Toxicity of Heavy Metals in the Environment*, New York, Marcel Dekker Inc., Part 1, 87-99, (1978).

06. COMMITTEE on Environmental Hazards, Committee on Accident and Poison Prevention - Statement on Childhood Lead Poisoning - *American Academy of Pediatrics*, **79**(3), p. 457-465, Mar. (1987).

07. WALDMAN, S - Lead and your kids - *Newsweek*, July 15, 42-48 (1991).

08. CARVALHO, F.M.; Silvany-Neto, A.M.; Barbosa, A.C.; Cotrim, C.R. & Tavares, T.M. - Erythrocyte Protoporphyrin Versus Blood Lead: The Effect of Iron Status Among Children Exposed to Gross Environmental Pllution - *Environ. Res.*, **71**(1), 11-15, (1995).

09. CARVALHO, F.M.; Silvany-Neto, A.M.; Peres, M.F.T.; Gonçalves H.R.; Guimarães, G.C.; Amorin, C.J.B.; Silva Jr., J.A.S. & Tavares, T.M. - Intoxicação pelo Chumbo: Zinco Protoporfirina no sangue de crianças de Santo Amaro da Purificação e de Salvador, BA - *Jornal de Pediatria*, **72**, 5 (1996).

10. SILVANY-NETO, A.; Carvalho, F.M.; Tavares, T.M.: Guimarães, G.C.; Amorin, C.J.B.; Peres, F.T.; Lopes, R.S.; Rocha, C.M. - Evolution of Lead Intoxication in Santo Amaro, Bahia - 1980, 1985 and 1992 - *PAHO Bull*, **30**(1), 51-62 (1996).

11. OHLWEILER, O.A. - Química Analítica Quantitativa - *LTC - Livros Técnicos Científicos Editora S.A.*, Rio de Janeiro, **3**(2), 101-102, (1982).

12. FUKUMOTO K., Karai I., Horiguchi S. - Spectrophotometric determination of lead in blood with tetraphenylporfine trisulfonic acid - *Sangyo Igaku*, **24**, 90-91, (1982).

13. VOLODER K., Ivicic N., Svigir B. - Determination of lead in a minute blood sample by the spectrophotometric method - *Mikrochim. Acta*, **2**, 341-347, (1971).

14. LYONS H., Quinn F.E. - Measurement of lead in biological materials by combined anion-exchange chromatography and atomic absorption spectrophotometry - *Clin. Chem*., **17**, 152-155, (1971).

15. MATSUTO T., Kitamura T., Abe H., Tsukamoto H. - Studies on the direct extraction method for determination of lead in blood by atomic absorption spectrophotometry - *Rinsho Byori*, **26**, 611-614, (1978).

16. UNY, G.; Mathien, C.; Tardif, J.P. et Van Danh, T - Dosage du zinc, du fer et du plomb dans un cobalt de tres haute purete - *Anal. Chim. Acta*, **53**, 109-116, (1971).

17. VENS M.D., Lauwerys R. - Simultaneous determination of lead and cadmium in blood and urine by coupling ion exchange resin chromatography and atomic absorption spectrophotometry - *Arch. Mal. Prof. Med. Trav. Secur. Soc*., **33**, 97-105, (1972).

18. WATANABE T., Iwahana T., Ikeda M. - Comparative study on determination of lead in blood by flame and flameless atomic

absorption spectrophotometry with and without wet digestion - *Int. Arch. Occup. Environ. Health*, **39**, 121-126, (1977).

19. HOLZBECHER, Z.; Divis, L.; Král, M.; Sucha, L.; Vlácil, F. - Handbook of organic reagents in inorganic analysis - *John Wiley & Sons Inc.*, New York, 477-8 e 351, (1976).

20. MARCZENCO, Z. - Spectrophotometric determination of elements - *Ellis Horwood Limited*, Chichester, 322-8, (1976).

21. STRELOW, F.W.E. and Toerien, F. Von S. - Separation of lead (II) from bismuth (III), thallium (III), cadmium (II), mercury (II), gold (III), platinum (IV), palladium (II), and other elements by anion exchange chromatography - *Anal. Chem.*, **38**(4), April (1966).

22. SNELL, F.D. - Photometric and fluorometric methods of analysis - *John Wiley & Sons*, New York, parte 1, 1-42, (1978).

23. CHENG, K.L.; Ueno, K.; Imamura, T. - Handbook of organic analytical reagents - *CRC Press*, Florida, 237-57, (1982).

24. NOVÁKOVÁ, M. and Kubán,V. - Spectrophotometric determination of trace concentrations of lead using 2-5(bromo-2-pyridylazo)-5-diethylaminophenol in the presence of nonionic surfactants - *Chem. Papers*, **42**(2), 183-195, (1988).

25. Y. SUMI, T. Inoque, T. Muraki and T. Suzuki - A Highly Sensitive Chelator for Metal Staining. Brmopyridylazo-Diethylaminophenol - *Stain Technol*, **58**(6), 325-8, (1983).

26. ABU ZUHRI, ALI Z. - Specthotometric Determination of Lead with 2-(5-Bromo-2-Pyridylazo)-5-Diethylaminophenol and Cetyltrimethylammonium Bromide - *Spectroscopy Letters*, **19**(4), 333-341, (1986).

27. FAN, J.; Min, Q.; Wang, S. - Color reaction of lead and zinc with 5-Br-PADAP. (I). Color reaction of lead (II)-5-Br-PADAP-iodide-Triton-X-100 - *Sandong Daxue Xuebao, Ziran Kexuebao*, **22**(2), 121-5 (1987). C.A. 107:222881e (1987).

28. FERREIRA, S.L.C.; Costa, A.C.S.; Jesus, D.S. - Derivative spectrophotometric determination of nickel using Br-PADAP - *Talanta*, **43**, 1649-56 (1996).

29. COSTA, A.C.S.; Ferreira, S.L.C.; Andrade, M.G.M.; Lobo, I.P. - Simultaneous spectrophotometric determination of nickel and iron in copper-base alloy with Bromo-PADAP - *Talanta*, **40**(8), 1267-71 (1993).

30. FENG, J.; Zhang, B. - Spectrophotometric determination of microamounts of iron in natural water, hair, and blood - *Beijing Daxue Xueboa, Ziran Kexueban*, (3), 71-6, (1983). C.A. 100:114177b (1984).

31. RONG, O.; Li, H; Lin, L.; Li, M. - Spectrophotometric determination of trace amounts of iron (II) wich 2-(5-bromo-2-pyridylazo)-5-diethylaminophenol - *Fenxi Huaxue*, **10**(4), 224-6, 253 (1982). C.A. 98:82936v (1983).

32. WANG, B.; Song, N. - Simultaneous spectrophotometric determination of inorganic multicomponent systems. IV. Determination of microamounts of iron (III) and iron (II) by 2-(5-bromo-2-pyridylozo)-5-diethylaminophenol (5-Br-PADAP) - *Fenxi Huaxue*, **16**(5), 402-5, (1988). C.A. 109:141686j (1988).

33. WEI, F.; Song, Q.; Yin, F.; Shen, N. - Spectrophotometric determination of iron in aluminum alloys using 2-(5-bromo-2-pyridylazo)-5-diethylaminophenol - *Mikrochim. Acta*, **2**(1-2), 17-21, (1983). C.A. 98:227131r (1983).

34. WU, X.- Color-forming system of iron(II) - 5-Br-PADAP[2-(5-bromo-2-pyridylazo)-5-diethylaminophenol]- OP [polyethylene glycol octylphenyl ether] and its analytical applications - *Chengdu Keji Daxue Xuebao*, (1), 15-19, (1987). C.A. 107:189858c (1987).

35. YAN, G. - Spectrophotometric determination of iron in pure aluminum and reagents in the presence of dimethylformamide and 5-Br-PADAP - *Fenxi shiyanshi*, **7**(1), 61-2, (1989). C.A. 111:208334e (1989).

36. NAVRATILOVA-SEVCIKOVA, R.; Jancar, L.; Sommer, L. - Spectrophotometric determination of trace amounts of copper with 2-(5-bromo-2-pyridylazo)-5-diethylaminophenol - *Scr. Fac. Sci. Nat. Univ. Purkynianae Brun.*, **15**(9-10), **5**05-28, (1985). C.A. 105:17336y (1986).

37. QIU, X.C.; Zhu, Y.Q. - Spectrophotometric determination of available copper in acidic soils using 2-(5-bromo-2-pyriddylazo)-5-

diethylaminophenol - *Analyst*, **111**(5), 585-7, (1986). C.A. 105:132783d (1986).

38. XIA, D.; Lin, Q. - Color reaction of copper (I) with 5-Br-PADAP in the presence of an anionic surfactant - *Fenxi Huaxue*, **13**(5), 365-7, (1985). C.A. 103:134091j (1985).

39. FRIBERG, L.; Nordberg, G.F. and Vouk, V.B. (ed) - Handbook on the toxicology of metals - *Elsevier/North-Holland Biomedical Press*, 1ª edição, 1979.

40. ABU-ZUHRI, Ali Z. - Sensitive spectrophotometric determination of iron (II) with 2-(5-bromo-2-pyridilazo)-5-diethylaminophenol - *Indian J. Chem.*, sect A, **22**A(10), 990-10, (1983). C.A. 100:131607j (1984).

41. JIN, Y. - Spectrophotometric determination of microamount of iron in hard metal and tungsten trioxide - *Yejin Fenxi*, **8**(5), 56-7, (1988). C.A. 112:47842x (1990).

42. SUN, Y.; Han, X.; Zhao, B. - Spectrofotometric determination of trace cadmium (II) with 5-Br-PADAP [2-(5-bromo-2 pyridylazo)-5-diethylaminophenol] in the presence of polyethylene glycol octyl phenyl ether (OP) - *Fenxi Huaxue*, **14**(12), 917-19, (1986). C.A. 106:168043x (1987).

43. SALIM, R.; Shraydeh, B. - Spectrofotometric determination of cadmium (II) using 2-(5-bromo-2 pyridylazo)-5-diethylaminophenol - *Microchem. J.*, **34**(3), 251-3, (1986). C.A. 106:43125u (1987).

44. KORKISCH, J. and Feik, F. - Separation of lead by anion exchange - *Anal. Chem.*, **36** (9), Aug (1964).

45. KORKISCH, J. and Tera, F. - Separation of thorium by anion exchange - *Anal. Chem.*, **30**(9), Aug (1961).

46. KORKSICH, J.; Farag, A und Hecht, F. - Eine neue methode zur anreicherung des urans mittels ionen-austausches und deren anwendung zur bestimmung des urans in festen proben - *Mikrochim. Acta*, **3**, 415-25, (1958).

47. NELSON, F. and Kraus, K.A - Anion-exchange studies. XI. Lead (II) and bismuth (III) in chloride and nitrate solutions - *Journal of the American Chemical Society*, **76**, (1954).

48. STRELOW, F.W.E. - Distribution coefficients and anion exchange behavior of some elements in hydrobromic-nitric acid mixtures - *American Chemical Society*, **50**(9), Aug. (1978).

49. WESTCOOT, C.C. - pH Measurements - *Academic Press Inc.*, New York, (1978).