

## ESPECIAÇÃO DE COBRE E ZINCO EM URINA – IMPORTÂNCIA DOS METAIS EM DOENÇAS NEURODEGENERATIVAS

**Maria Fernanda C. Leal\*, Rita I. L. Catarino e Adriana M. Pimenta**

CEBIMED, Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade Fernando Pessoa, Rua Carlos da Maia, 296, 4200-150 Porto, Portugal / REQUIMTE, Departamento de Química-Física, Faculdade de Farmácia, Universidade do Porto, Rua Aníbal Cunha, 164, 4099-030 Porto, Portugal

**Maria Renata S. Souto**

CEBIMED, Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade Fernando Pessoa, Rua Carlos da Maia, 296, 4200-150 Porto, Portugal / CBQF, Escola Superior de Biotecnologia, Universidade Católica Portuguesa, Rua Dr. António Bernardino de Almeida, 4200-072 Porto Portugal

**Tatiana S. N. Pinheiro**

Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade Fernando Pessoa, Rua Carlos da Maia, 296, 4200-150 Porto, Portugal

Recebido em 5/3/12; aceito em 19/6/12; publicado na web em 31/8/12

SPECIATION OF COPPER AND ZINC IN URINE – IMPORTANCE OF METALS IN NEURODEGENERATIVE DISEASES. Metals such as copper and zinc are essential for the development and maintenance of numerous enzymatic activities, mitochondrial functions, neurotransmission, and also for memorization and learning. However, disruption in their homeostasis can cause neurodegenerative disorders such as the Alzheimer and Parkinson diseases. In this work, the speciation of copper and zinc in urine samples was carried out. To this end, free and total metal concentrations were determined by square wave anodic stripping voltammetry using a glassy carbon electrode coated with bismuth film. The digestion of the samples was performed in a microwave with the addition of oxidant reagents.

Keywords: metals; neurodegenerative diseases; stripping voltammetry.

### INTRODUÇÃO

#### Alterações bioquímicas, fisiológicas e neurológicas em doenças neurodegenerativas

As doenças neurodegenerativas, que se caracterizam pela progressiva perda da estrutura e função neuronal, têm vindo a aumentar em todo o mundo, revelando-se na atualidade um grave problema humano, social e até económico. Apesar de ainda não serem conhecidos todos os processos bioquímicos e/ou fisiológicos que conduzem ao desenvolvimento destas desordens, sabe-se hoje que as principais doenças neurodegenerativas, tais como a doença de Alzheimer e a doença de Parkinson, apresentam algumas semelhanças, especialmente no que respeita à deposição intra ou extracelular de emaranhados proteicos.<sup>1</sup>

A doença de Alzheimer é uma doença progressiva e irreversível, que começa por atingir a memória e com a evolução acaba por afetar outras funções mentais. Um doente de Alzheimer, após diagnosticada a doença, resiste em média 8 anos.<sup>2-4</sup> A doença de Alzheimer pode surgir com uma causa genética ou de forma esporádica, apontando-se neste caso vários fatores responsáveis pelo seu aparecimento, tais como a alteração da transmissão colinérgica, a cascata amiloide, a isoforma 4 da apolipoproteína E e a proteína tau.<sup>5-10</sup> Na doença de Alzheimer, do ponto de vista histopatológico, verifica-se a deposição de placas senis extracelulares (agregados do péptido  $\beta$ -amiloide ( $\beta$ A)), bem como a deposição de fibrilas intracelulares de proteína tau polimerizada (hiperfosforilada).<sup>9</sup> O péptido  $\beta$ A resulta da clivagem proteolítica da proteína precursora  $\beta$ -amiloide (PPA) por  $\alpha$ -,  $\beta$ - e  $\gamma$ -secretases.<sup>11</sup> As formas mais frequentes de  $\beta$ A são constituídas por 40 e 42 aminoácidos.<sup>9,12-14</sup> Os  $\beta$ A formados que assumem maior comprimento têm mais facilidade para uma rápida agregação,

oligomerização e formação de fibrilas.<sup>15</sup> A forma de oligómero é a mais neurotóxica. O mecanismo ativo existente para remover oligómeros do  $\beta$ A ocorre pela promoção da sua desagregação enzimática em monómeros.<sup>9</sup> Os axónios são constituídos em grande parte pela proteína tau e microtúbulos de baixo peso molecular. Os oligómeros formados do péptido  $\beta$ A provocam instabilidade na proteína tau, havendo uma rápida dissociação dos microtúbulos e o rompimento da estrutura axonal, permitindo uma desordem no processamento das sinapses e posteriormente a morte de neurónios.<sup>6,9</sup>

A doença de Parkinson é um distúrbio neurológico do movimento, progressivo e de evolução prolongada, que leva à incapacidade.<sup>16</sup> É uma doença multifactorial, cujo aparecimento se encontra associado a diferentes causas, nomeadamente, alterações bioquímicas, fatores ambientais e genéticos, incluindo aterosclerose, infeções virais, traumatismo craniano e uso crónico de medicamentos antipsicóticos.<sup>17,18</sup> A doença de Parkinson caracteriza-se pela presença de disfunção monoaminoérgica múltipla, incluindo o défice de sistemas dopaminérgicos, colinérgicos, serotoninérgicos e noradrenérgicos.<sup>16</sup> É uma desordem cerebral que é caracterizada pela neurodegeneração específica da substância negra, acompanhada pela diminuição significativa de dopamina em todos os componentes dos gânglios basais, e pela presença de corpos de Lewy, inclusões citoplasmáticas compostas por uma variedade de proteínas como a  $\alpha$ -sinucleína, a parkina e a ubiquitina.<sup>19</sup>

#### Importância dos metais em doenças neurodegenerativas

Estudos recentes têm revelado uma forte influência da homeostase de determinados metais, particularmente os que possuem actividade redox, na evolução de doenças neurodegenerativas, como as doenças de Alzheimer e de Parkinson.<sup>12,20</sup> A nível cerebral os referidos metais contribuem para um aumento do stress oxidativo, uma vez que podem conduzir à produção de espécies reativas de oxigénio, como o

\*e-mail: fleal@ufp.edu.pt

peróxido de hidrogénio, e radicais hidroxilo, bem como de espécies reativas de azoto, como o óxido nítrico. Estes radicais livres são tóxicos e no caso de não serem removidos ou neutralizados reagem com lípidos, proteínas e ácidos nucleicos, danificando as funções celulares.<sup>21-23</sup> No cérebro de um doente de Alzheimer, para além da acumulação de placas amiloides e de emaranhados neurofibrilares, ocorre alteração nas reações redox, havendo registo de um aumento de danos oxidativos.<sup>24</sup> Suspeita-se que a secreção e a deposição do  $\beta$ A, bem como a agregação das placas senis ocorrem num segundo plano, funcionando como uma tentativa das células se protegerem contra os danos provocados pelo stress oxidativo.<sup>25</sup>

Biometais como o cobre (Cu) e o zinco (Zn) circulam no cérebro de forma regulada, através da barreira hematoencefálica. O Cu encontra-se distribuído por todo o organismo preferencialmente na forma de complexo orgânico, normalmente associado a metaloproteínas com função enzimática. Estas enzimas encontram-se envolvidas na síntese de proteínas constituintes do esqueleto e vasos sanguíneos, e neurotransmissores essenciais à função nervosa.<sup>26</sup> A absorção, distribuição e excreção do Cu são controladas por várias proteínas, prevenindo potenciais danos provocados pelas formas livres deste metal. Os níveis de Cu encontrados no plasma ao nascimento são baixos, aumentando mais tarde.<sup>23</sup> Não existe atualmente nenhum marcador específico para Cu. São utilizados para o efeito os valores de referência de Cu sérico (0,64-1,56  $\mu\text{g/mL}$ ), Cu urinário (12-80  $\mu\text{g/L}$ ) e Cu depositado no cabelo (10-20  $\mu\text{g/g}$ ).<sup>27</sup> Alterações na homeostasia dos níveis de Cu no cérebro levam a desordens neurológicas.<sup>23</sup> Elevadas concentrações de Cu foram encontradas nas placas amiloides de cérebros de doentes de Alzheimer, tanto associados ao  $\beta$ A como aos emaranhados neurofibrilares.<sup>28,29</sup> O  $\beta$ A liga-se ao Cu e este promove a agregação do  $\beta$ A.<sup>30</sup> O  $\beta$ A reduz o  $\text{Cu}^{2+}$  a  $\text{Cu}^+$  e catalisa a formação de peróxido de hidrogénio através de processos que usam oxigénio, colesterol, vitamina C e catecolaminas, originando radicais hidroxilo muito tóxicos, o que aumenta o stress oxidativo.<sup>22,31</sup> Ao agregar o excesso de Cu livre intracelular, o  $\beta$ A armazena temporariamente a sua toxicidade.<sup>28</sup> Além da produção de radicais livres, a caracterização da interação do  $\text{Cu}^{2+}$  com a  $\alpha$ -sinucleína demonstra a capacidade deste metal na aceleração da agregação de proteínas em concentrações fisiologicamente relevantes, sem alterar as estruturas fibrilares resultantes.<sup>20</sup> O Zn é um oligoelemento que tem como funções bioquímicas a participação em processos enzimáticos e estabilização da estrutura molecular dos componentes subcelulares e da membrana. Encontra-se em todos os tecidos e fluidos corporais, sendo o cérebro um dos órgãos que contém níveis mais elevados deste metal. A sua eliminação é feita através dos rins, da pele e do intestino. Num indivíduo saudável a excreção de Zn através da urina deve situar-se entre 300-600  $\mu\text{g/L}$ .<sup>32</sup> A concentração de Zn diminui com o avançar da idade, havendo acentuado decréscimo a partir dos 75 anos de idade. Esta diminuição em doentes de Alzheimer aumenta a patologia amiloide. A diminuição de Zn sistémico provoca aumento na retenção de Zn no cérebro.<sup>23,33</sup> A enzima degradante da insulina e a neprilissina são proteases da família das metalopeptidases de Zn. Estas proteases são responsáveis pela degradação do  $\beta$ A. A formação da placa senil pode ser reduzida, ou mesmo evitada, ao se aumentar os níveis da enzima degradante da insulina e da neprilissina.<sup>23</sup> Quando conjugados Cu e Zn, é facilmente provocada a precipitação de oligómeros  $\beta$ A.<sup>21</sup> Vários estudos revelam que o Cu e o Zn têm afinidade para o péptido  $\beta$ A e que ambos se ligam aos mesmos resíduos do  $\beta$ A, logo competem pelo mesmo local, tendo o Zn maior relevância na rápida agregação do péptido do que o Cu, que por sua vez induz principalmente mudanças conformacionais do  $\beta$ A.<sup>34,35</sup> O processamento da PPA pode também ser influenciado por Cu e Zn uma vez que as  $\alpha$ -,  $\beta$ - e  $\gamma$ -secretases, que são essenciais para o processamento da PPA, têm interações com estes metais.<sup>23</sup>

## Importância da determinação de metais em amostras biológicas – vantagem da voltametria de redissolução com eletrodo de filme de bismuto na especificação de metais

O Cu e o Zn são fatores de mediação em doenças neurodegenerativas, como as de Alzheimer e de Parkinson.<sup>36,37</sup> Para além disso, a doença de Wilson e, também, certos carcinomas caracterizam-se por um aumento dos níveis de Cu.<sup>38</sup> Sendo assim, o controlo dos níveis destes metais e o uso de terapias quelantes é também uma forma de controlar a evolução destas patologias.<sup>39</sup> Surge assim, na atualidade, a necessidade de desenvolver métodos que sejam eficazes na determinação das concentrações de Cu e Zn, principalmente a nível dos fluidos biológicos. Os fluidos biológicos são reconhecidos como meios úteis para a determinação de metais no diagnóstico e monitorização de determinados estados nutricionais e patologias. No entanto, a análise da concentração total do metal numa amostra não dá informação suficiente para prever a respetiva toxicidade. A forma química (i.e. espécie) pode influenciar a toxicocinética e toxicodinâmica do mesmo e deve ser considerada para melhorar a avaliação do risco na saúde humana.<sup>40</sup>

Tem sido difícil encontrar técnicas analíticas que sejam suficientemente sensíveis e seletivas para medir a especificação de metais vestigiais. Os métodos eletroquímicos apresentam uma vantagem sobre a maioria das outras técnicas analíticas, uma vez que provocam uma perturbação mínima do sistema durante a medição. A voltametria de redissolução, que combina uma etapa de pré-concentração com uma etapa de medição eletroquímica dos analitos acumulados, é uma ferramenta poderosa para a monitorização de metais vestigiais em diversas amostras.<sup>41-43</sup> Nas 2 últimas décadas os eletrodos de filme de mercúrio (Hg) (MFEs), preparados pelo revestimento de um material apropriado com um filme de Hg metálico, têm sido usados como suporte às técnicas de voltametria de redissolução devido à sua elevada reprodutibilidade e sensibilidade.<sup>41,43,44</sup> O eletrodo de filme de bismuto (Bi) (BFE) foi proposto pela primeira vez em 2000, como uma alternativa aos MFEs.<sup>45</sup> Estudos realizados comprovam que os BFE apresentam elevada sensibilidade, um sinal bem definido e altamente reprodutível, um grande intervalo de potencial catódico, uma boa resolução de picos vizinhos, e ainda são menos sensíveis do que os MFE ao oxigénio dissolvido.<sup>43,44,46-48</sup> No entanto, a vantagem mais significativa dos BFEs é que a toxicidade do Bi é negligenciável, ao contrário da extrema toxicidade do Hg usado na preparação dos MFEs.<sup>41,44,45,47,49,50</sup> Recentemente, encontram-se alguns trabalhos visando a determinação de metais por voltametria de redissolução em BFEs,<sup>51-53</sup> sendo no entanto escassos os trabalhos desenvolvidos tendo em vista a especificação dos mesmos em BFEs.<sup>54</sup> Neste trabalho, realizou-se a especificação de Cu e Zn em amostras de urina. Para tal, determinou-se a concentração livre e total dos metais por voltametria de redissolução anódica de onda quadrada, usando um eletrodo de carbono vítreo revestido com filme de bismuto. Para a determinação do metal total, a digestão prévia das amostras foi efetuada em micro-ondas com adição de reagentes oxidantes.

## PARTE EXPERIMENTAL

### Reagentes e soluções

Na preparação de todas as soluções foram utilizados reagentes de qualidade p.a. ou semelhante e água purificada por sistema Milli Q (resistividade  $\geq 18 \text{ M}\Omega \text{ cm}$ ). Todo o material usado foi previamente descontaminado por imersão num banho de ácido nítrico 2 M e lavado abundantemente com água desionizada. As soluções de ácido nítrico 2 e 6 M foram preparadas por diluição apropriada de uma solução de ácido nítrico concentrado (Panreac).

O tampão acetato 0,10 M (pH 4,5) foi preparado pela adição de 9 mL de ácido acético concentrado (Sigma Aldrich), 8,203 g de acetato de sódio (Fluka) e água ultrapura, de modo a perfazer o volume de 1 L. O tampão fosfato 0,25M (pH 7,4) foi preparado misturando 400 mL de uma solução de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0,25 M (Sigma Aldrich) e 200 mL de uma solução de  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  0,25M (Fluka).

As soluções de Bi foram preparadas por diluição apropriada de uma solução 1000 mg/L (Fluka) em tampão acetato 0,10 M (pH 4,5). As soluções de Cu e Zn foram preparadas por diluição de soluções 1000 mg/L (Fluka) em tampão fosfato 0,25 M (pH 7,4).

As amostras de urina utilizadas na análise foram recolhidas de pessoas saudáveis, ou seja, pessoas que não apresentavam nenhuma patologia nem tomavam qualquer fármaco.

### Instrumentação

As determinações voltamétricas foram efetuadas num potencióstato Ecochimie/Autolab modelo  $\mu$ Autolab Type III, ao qual foi acoplado um *stand* da Metrohm 663 VA. O potencióstato foi controlado por um computador com um software GPES 4.9. O eletrodo de trabalho, onde foi depositado o filme de Bi, era de carbono vítreo com um diâmetro de disco de 2 mm. Como eletrodo de referência utilizou-se um eletrodo de  $\text{AgCl}/\text{Ag}$  (KCl, 3,0 M) e o eletrodo auxiliar foi de carbono vítreo. Durante as etapas de deposição as soluções foram agitadas com uma haste rotativa de politetrafluoretileno (PTFE) a 2500 rpm. A purga das soluções foi realizada por um tubo que libertava azoto livre de oxigénio.

O aparelho de irradiação com micro-ondas utilizado foi um High Performance Microwave Digestion Unit MIs 1200 Mega da Milestone®.

### Determinação voltamétrica de Cu e Zn

No início de cada dia o eletrodo de trabalho foi polido manualmente por fricção da sua superfície com óxido de alumínio (Buehler 40-6603-030-016), tendo o material residual sido removido por passagem abundante de água desionizada. Realizou-se uma limpeza eletroquímica com tampão acetato 0,10 M (pH 4,5) por meio da aplicação de um potencial de condicionamento ( $E_c$ ) de 1,8 V durante 600 s ( $t_c$ ) (para que todos os resíduos adsorvidos e/ou depositados na superfície do eletrodo fossem removidos através da sua oxidação).

As determinações voltamétricas foram efetuadas pipetando 40 mL de solução numa célula voltamétrica. A formação do filme de Bi foi realizada *ex situ* com Bi em tampão acetato 0,10 M (pH 4,5), aplicando um potencial de deposição ( $E_d$ ) de -1,4 V durante 90 s ( $t_d$ ), sendo a solução purgada durante 180 s com azoto livre de oxigénio (parâmetros previamente otimizados).<sup>55</sup> Para a remoção do filme de Bi fez-se um varrimento anódico entre -1 e 1 V em tampão acetato 0,10 M (pH 4,5), após um  $t_c$  de 10 s.

Os parâmetros de deposição do Cu e Zn foram otimizados em tampão fosfato 0,25 M (pH 7,4). As determinações de Cu e Zn foram efetuadas em triplicado por voltametria de redissolução anódica, fazendo um varrimento de potencial após um tempo de equilíbrio ( $t_e$ ) de 10 s. Os parâmetros de varrimento utilizados (previamente otimizados) foram voltametria de onda quadrada, frequência de 10 Hz, amplitude de 0,05 V e grau de variação de potencial de 0,005 V.<sup>55</sup>

No final de cada dia procedeu-se à limpeza química por imersão do eletrodo de trabalho numa solução de ácido nítrico 6 M durante 120 s.<sup>56</sup>

### Digestão da amostra

A análise das amostras de urina foi efetuada antes e após des-truição da matéria orgânica. Para digerir as amostras utilizou-se um

processo combinado, micro-ondas e oxidação por compostos químicos. A 4 mL de amostra foram adicionados 4 mL de ácido nítrico concentrado e 2 mL de peróxido de hidrogénio (Panreac).<sup>57</sup>

O aparelho de irradiação com micro-ondas foi programado para uma potência de 600 W durante 16 min, atingido a temperatura máxima de 140 °C. A uma das amostras foi adicionada uma sonda para possibilitar o controlo da temperatura máxima atingida durante a digestão. As amostras foram refrigeradas até posterior análise.<sup>57</sup>

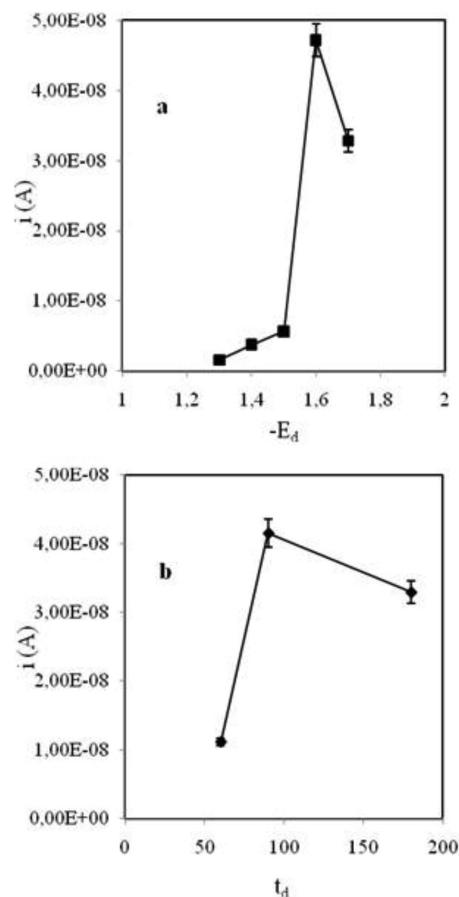
Depois do processo de digestão, e antes da diluição, foi necessário proceder à neutralização da urina com hidróxido de sódio concentrado (Panreac). Esta mistura foi ainda diluída 10 vezes com água desionizada.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

### Otimização das condições de deposição de Cu e Zn

#### Otimização do $E_d$ e do $t_d$

Para a primeira fase de optimização das condições de deposição dos metais utilizou-se uma solução de Bi 1 mg/L em tampão acetato 0,10 M (pH 4,5) e uma solução padrão de Zn 100  $\mu\text{g}/\text{L}$  preparada em tampão fosfato 0,25 M (pH 7,4). Estes parâmetros foram otimizados só para o Zn, visto este ser o metal que se apresenta a um potencial mais negativo após o varrimento de potencial. O primeiro parâmetro avaliado foi o  $E_d$ . Para um  $t_d$  de 90 s variou-se o  $E_d$  entre -1,3 e -1,7 V, verificando-se que a intensidade de corrente ( $i$ ) obtida para o Zn aumentava até -1,6 V, diminuindo para -1,7 V (Figura 1a). O segundo

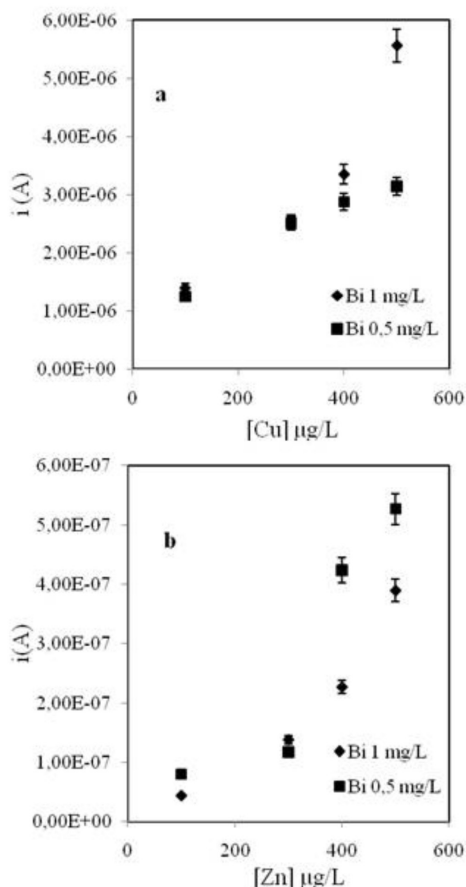


**Figura 1.** Influência do  $E_d$  (a) e do  $t_d$  (b) na intensidade de corrente ( $i$ ) (valor médio  $\pm$  desvio padrão,  $n = 3$ ) obtida para uma solução de Zn 100  $\mu\text{g}/\text{L}$  em tampão fosfato 0,25 M (pH 7,4), após deposição de Bi 1 mg/L em tampão acetato 0,10 M (pH 4,5)

parâmetro avaliado foi o  $t_d$ . Para um  $E_d$  de -1,6 V avaliaram-se  $t_d$  diferentes: 60, 90 e 180 s, obtendo-se um valor máximo de  $i$  produzida pelo Zn aos 90 s de deposição (Figura 1b).

#### Optimização da concentração de Bi

Usando um  $E_d$  de -1,6 V e um  $t_d$  de 90 s, otimizou-se a concentração de Bi a utilizar para as determinações de Cu e Zn. Variou-se a concentração de Cu e Zn entre 100 e 500  $\mu\text{g/L}$  para concentrações de Bi 0,5 e 1 mg/L. Os resultados obtidos demonstraram que, para uma concentração de Bi 0,5 mg/L, a intensidade de corrente obtida para o Zn era superior à obtida para Bi 1 mg/L. No entanto, para o Cu obteve-se uma intensidade de corrente superior para Bi 1 mg/L (Figura 2). Como a intensidade de corrente obtida para as soluções de Zn é muito inferior (cerca de 10 vezes) à obtida para as soluções de Cu de igual concentração, e a determinação de Cu e Zn nas amostras é efetuada em simultâneo, a concentração de Bi a usar nas determinações de Cu e Zn foi otimizada em 0,5 mg/L.

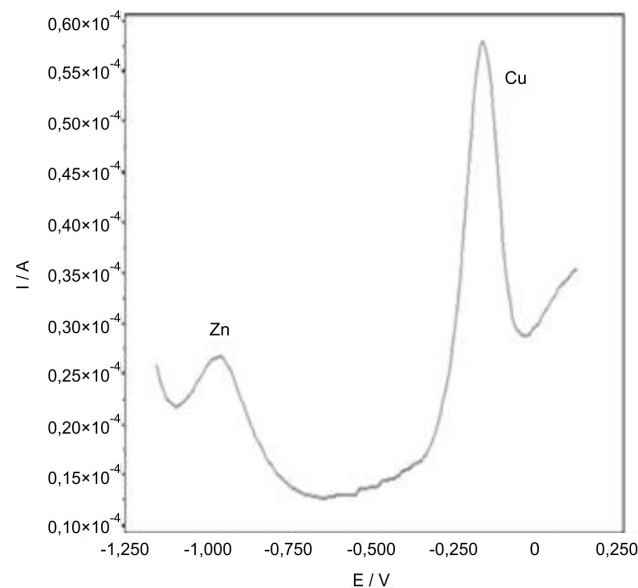


**Figura 2.** Intensidade de corrente ( $i$ ) (valor médio  $\pm$  desvio padrão,  $n = 3$ ) obtida para soluções de Cu (a) e Zn (b) em tampão fosfato 0,25 M (pH 7,4), após deposição de Bi 0,5 e 1 mg/L em tampão acetato 0,10 M (pH 4,5)

#### Deposição do Bi, Cu e Zn *in situ* vs *ex situ*

Durante os estudos de otimização foram também testados dois métodos diferentes: deposição do Bi, Cu e Zn *in situ* e *ex situ*. Para os estudos *in situ* utilizou-se uma solução de tampão fosfato 0,25 M (pH 7,4) contendo Cu e Zn 100  $\mu\text{g/L}$  e Bi 0,5 mg/L. A deposição tanto dos metais como do Bi foi feita simultaneamente, utilizando as condições de deposição já optimizadas. Foram realizadas várias determinações voltamétricas e nos voltamogramas obtidos o Zn não era detetado e o pico de intensidade do Cu era mascarado pelo do Bi. Para os estudos *ex situ*, fez-se a deposição prévia de Bi numa

solução de tampão acetato 0,10 M (pH 4,5) e Bi 0,5 mg/L e a posterior deposição do Cu e Zn numa solução tampão de fosfato 0,25 M (pH 7,4) contendo Cu e Zn 100  $\mu\text{g/L}$ , utilizando as condições de deposição já optimizadas. Nos voltamogramas obtidos, dos quais o voltamograma da Figura 3 é um exemplo, pode-se verificar a existência de dois picos de corrente correspondendo ao Zn ( $a \sim -0,96$  V) e ao Cu ( $a \sim -0,10$  V), não sendo o Bi detetado. Assim, a técnica de deposição *ex situ* do filme de Bi revela-se como a mais vantajosa, para as determinações a pH fisiológico. O método *in situ* foi então abandonado e o método utilizado para o estudo das amostras de urina foi o método *ex situ*.



**Figura 3.** Voltamograma obtido pelo método *ex situ* para uma solução de Cu e Zn 100  $\mu\text{g/L}$  em tampão fosfato 0,25 M (pH 7,4), após deposição de Bi 0,5 mg/L em tampão acetato 0,10 M (pH 4,5)

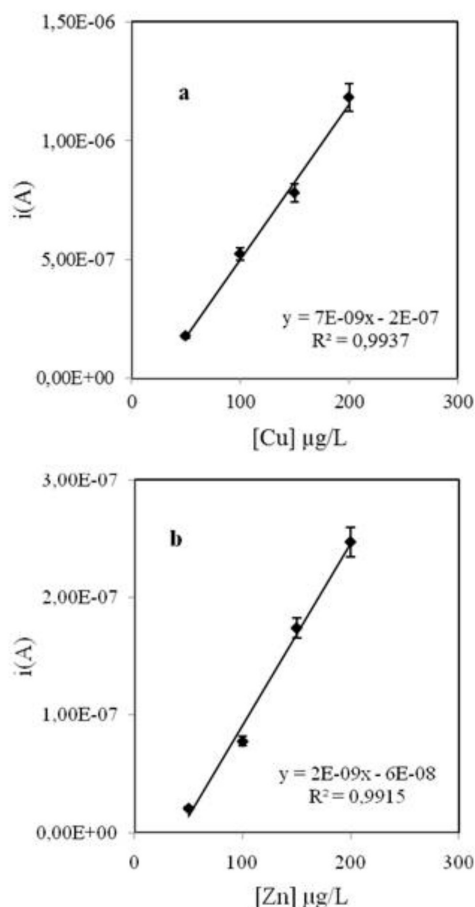
#### Curvas de calibração para Cu e Zn em tampão fosfato

Após optimização das condições de deposição foram realizadas calibrações para Cu e Zn, utilizando as condições optimizadas,  $E_d$  -1,6 V,  $t_d$  90 s e Bi 0,5 mg/L. As soluções padrão de Cu e Zn foram preparadas em tampão fosfato 0,25 M (pH 7,4) entre 50 e 200  $\mu\text{g/L}$  (Figura 4).

#### Aplicação em fluidos biológicos (urina)

Após optimização do método procedeu-se à sua aplicação a amostras de fluidos biológicos, concretamente urina. As amostras de urina foram diluídas 2 e 10 vezes em tampão fosfato 0,25 M (pH 7,4) consoante a análise para metal livre e total, respetivamente. A análise foi efetuada em triplicado, no próprio dia da colheita, tanto para a determinação de metal livre, como para a determinação de metal total. A concentração de metal total foi também determinada, usando os mesmos procedimentos, em urina de referência (NIES CRM N.º 18 *Human Urine*) e os valores experimentais não foram estatisticamente diferentes dos valores certificados (teste  $t$ ,  $P > 0,05$ ).

Para a determinação da concentração de Cu e Zn, as amostras diluídas foram analisadas após deposição de Bi 0,5 mg/L em tampão acetato 0,10 M (pH 4,5). As retas de regressão linear foram construídas por adições sucessivas de padrão de Cu e Zn às amostras. Para a determinação de metal livre foi obtida linearidade para concentrações entre 100 e 500  $\mu\text{g/L}$ , tanto para Cu como para Zn. Para a determinação de metal total foi obtida linearidade para concentrações entre

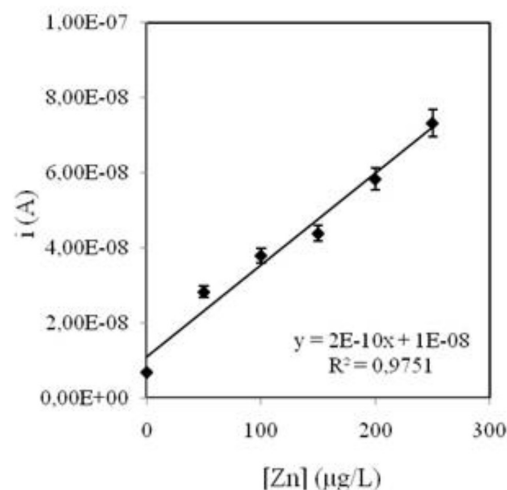


**Figura 4.** Curva de calibração para Cu (a) e Zn (b) (valor médio  $\pm$  desvio padrão,  $n = 3$ ) em tampão fosfato 0,25 M (pH = 7,4), após deposição de Bi 0,5 mg/L em tampão acetato 0,10 M (pH 4,5)

50 e 250  $\mu g/L$ , tanto para Cu como para Zn. Um exemplo de curva de adição de padrão obtida é representado na Figura 5.

As concentrações de Cu e Zn livre e total para 5 amostras de urina encontram-se na Tabela 1. Para Cu, a média das concentrações de metal total obtida para as 5 amostras ( $140,8 \pm 9,4 \mu g/L$ ) é elevada quando comparada com os valores existentes na literatura (12-80  $\mu g/L$ ). No entanto, a média das concentrações de Cu livre, ou seja, o mais biodisponível, obtida para as 5 amostras ( $53,8 \pm 1,7 \mu g/L$ ) fica dentro do intervalo desses valores. Para Zn, a média das concentrações de metal total obtida para as 5 amostras ( $486 \pm 101 \mu g/L$ ) encontra-se dentro do intervalo de valores referenciados como normais na literatura (300-600  $\mu g/L$ ). Não existem na literatura valores de referência para as concentrações de metal livre. Sendo assim, este trabalho é inovador em relação a esse aspeto.

Comparando as concentrações de metal livre e total, verifica-se que se obtiveram valores superiores quando se analisou a amostra



**Figura 5.** Curva de adição de padrão para a determinação de Zn total (valor médio  $\pm$  desvio padrão,  $n = 3$ ) numa amostra de urina diluída 10 vezes em tampão fosfato 0,25 M (pH = 7,4), após deposição de Bi 0,5 mg/L em tampão acetato 0,10 M (pH 4,5)

digerida. Para ambos os metais, procedeu-se posteriormente ao cálculo da percentagem de metal livre em relação ao total (Tabela 1). Para Cu e para as 5 amostras, a média das percentagens de metal livre em relação ao metal total foi de  $38,3 \pm 1,3\%$ . Para Zn e para as 5 amostras, a média das percentagens de metal livre em relação ao total foi de  $41,9 \pm 1,9\%$ . Verifica-se então que a percentagem de metal livre em relação ao metal total é muito idêntica para ambos os metais ( $\sim 40\%$ ). Estes resultados revelam a importância da especiação de metais em fluidos biológicos, concretamente na urina, pois a informação isolada do metal total pode levar à conclusão precipitada de certa patologia. Neste caso em concreto, do Cu e Zn total excretado na urina só  $\sim 40\%$  se encontram livres, ou seja, biodisponíveis, e 60% complexados com diversos ligandos, sendo menos biodisponível.

## CONCLUSÕES

Estudos recentes têm revelado uma forte influência da homeostase de determinados metais, como Cu e Zn, na evolução de doenças neurodegenerativas, como as doenças de Alzheimer e de Parkinson. O controlo dos níveis destes metais e o uso de terapias quelantes é uma forma de controlar a evolução destas patologias. Surge assim a necessidade de desenvolver métodos que sejam eficazes na determinação das concentrações de Cu e Zn, principalmente a nível dos fluidos biológicos. No entanto, a análise da concentração total do metal numa amostra não dá informação suficiente para prever a respetiva toxicidade. A forma química (i.e. espécie) pode influenciar a toxicocinética e toxicodinâmica do mesmo e deve ser considerada para melhorar a avaliação do risco na saúde humana.

**Tabela 1.** Concentração<sup>a</sup> ( $\mu g/L$ ) de Cu e Zn livre e total em diferentes amostras de urina

	Cu livre ( $\mu g/L$ )	Cu total ( $\mu g/L$ )	Cu livre / Cu total (%)	Zn livre ( $\mu g/L$ )	Zn total ( $\mu g/L$ )	Zn livre / Zn total (%)
Amostra 1	55,1	149	37,0	171	425	40,2
Amostra 2	56,0	150	37,3	156	378	41,3
Amostra 3	51,2	129	39,7	276	623	44,3
Amostra 4	52,7	133	39,6	243	559	43,5
Amostra 5	54,2	143	37,9	179	447	40,0
Média $\pm$ desvio padrão	$53,8 \pm 1,7$	$140,8 \pm 9,4$	$38,3 \pm 1,3$	$205 \pm 46$	$486 \pm 101$	$41,9 \pm 1,9$

<sup>a</sup>Valor médio ( $n = 3$ )

Neste trabalho, um eléctrodo de carbono vítreo revestido com filme de bismuto foi preparado e utilizado para a especiação de Cu e Zn em amostras de urina. As concentrações livre e total dos metais foram determinadas utilizando a voltametria de redissolução anódica de onda quadrada. Para a determinação do metal total, a digestão prévia das amostras foi efetuada em micro-ondas, com adição de reagentes oxidantes. Comparando os valores obtidos para o metal total nas amostras de urina com os existentes na literatura, concluiu-se que a concentração média de Cu total obtida para as 5 amostras ( $140,8 \pm 9,4 \mu\text{g/L}$ ) se encontra ligeiramente aumentada, enquanto a de Zn ( $486 \pm 101 \mu\text{g/L}$ ) se encontra no intervalo considerado normal (300-600  $\mu\text{g/L}$ ). No entanto, a concentração média de Cu livre obtida para as 5 amostras ( $53,8 \pm 1,7 \mu\text{g/L}$ ) encontra-se no intervalo de valores de Cu total existentes na literatura (12-80  $\mu\text{g/L}$ ). Como os estudos de especiação em fluidos biológicos não se encontram muito desenvolvidos, não existem valores de referência para as concentrações de metal livre em urina. Este fato mostra a importância de se continuarem a realizar estudos de especiação em fluidos biológicos, já que como se pode verificar pelos resultados obtidos só ~ 40% do metal (Cu e Zn) excretado se encontra no seu estado livre.

#### AGRADECIMENTOS

Este trabalho foi financiado pela Fundação para a Ciência e a Tecnologia através da bolsa n.º. PEst-C/EQB/LA0006/2011.

#### REFERÊNCIAS

- Migliorini, C.; Porciatti, E.; Luczkowski, M.; Valensin, D.; *Coord. Chem. Rev.* **2012**, 256, 352.
- Fehlbaum-Beurdeley, P.; Jarride-Le Prado, A. C.; Pallares, D.; Carrière, J.; Guihal, C.; Soucaille, C.; Rouet, F.; Drouin, D.; Sol, O.; Jordan, H.; Wu, D.; Lei, L.; Einstein, R.; Schweighoffer, F.; Bracco, L.; *Alzheimers Dement* **2010**, 6, 25.
- Maslow, K.; *Alzheimers Dement* **2010**, 6, 158.
- Weiner, M. W.; Aisen, P. S.; Jack, C. R. Jr.; Jagust, W. J.; Trojanowski, J. Q.; Shaw, L.; Saykin, A. J.; Morris, J. C.; Cairns, N.; Beckett, L. A.; Toga, A.; Green, R.; Walter, S.; Soares, H.; Snyder, P.; Siemers, E.; Potter, W.; Cole, P. E.; Schmidt, M.; *Alzheimers Dement* **2010**, 6, 202.
- Contestabile, A.; *Behav. Brain Res.* **2010**, 221, 334.
- Maccioni, R. B.; Farias, G.; Morales, I.; Navarette, L.; *Arch. Med. Res.* **2010**, 41, 226.
- McGuinness, B.; Carson, R.; Barrett, S. L.; Craig, D.; Passmore, A. P.; *Neurosci. Lett.* **2010**, 483, 62.
- Pimplikar, S. W.; *Int. J. Biochem. Cell B* **2009**, 41, 1261.
- Rauk, A.; *Chem. Soc. Rev.* **2009**, 38, 2698.
- van Beek, A. H. E. A.; Claassen, J. A. H. R.; *Behav. Brain Res.* **2011**, 221, 537.
- Sola Vigo, F.; Kedikian, G.; Heredia, L.; Heredia, F.; Anel, A. D.; Rosa, A. L.; Lorenzo, A.; *Neurobiol. Aging* **2009**, 30, 1379.
- Hureau, C.; Faller, P.; *Biochimie* **2009**, 91, 1212.
- Perez, J. L.; Carrero, I.; Gonzalo, P.; Arevalo-Serrano, J.; Sanz-Anguela, J. M.; Ortega, J.; Rodríguez, M.; Gonzalo-Ruiz, A.; *Exp. Neurol.* **2010**, 223, 410.
- Pitt, J.; Roth, W.; Lacor, P.; Smith, A. B.; Blankenship, M.; Velasco, P.; De Felice, F.; Breslin, P.; Klein, W. L.; *Toxicol. Appl. Pharm.* **2009**, 240, 189.
- Vetrivel, K.; Thinakaran, G.; *Biochim. Biophys. Acta* **2010**, 1801, 860.
- Teive, A.G. H.; *Rev. Neurocienc.* **2005**, 13, 201.
- Elbaz, A.; Tranchant, C.; *J. Neurol. Sci.* **2007**, 262, 37.
- Lana, R. C.; Álvares, L. M. R. S.; Nasciutti-Prudente, C.; Goulart, F. R. P.; Teixeira-Salmela, L. F.; Cardoso, F. E.; *Rev. Bras. Fisioter.* **2007**, 11, 397.
- Togo, T.; Iseki, E.; Marui, W.; Akiyama, H.; Uéda, K.; Kosaka, K.; *J. Neurol. Sci.* **2001**, 184, 71.
- Kozłowski, H.; Janicka-Kłos, A.; Brasun, J.; Gaggelli, E.; Valensin, D.; Valensin, G.; *Coordin. Chem. Rev.* **2009**, 253, 2665.
- Barnham, K.; Bush, A.; *Chem. Biol.* **2008**, 12, 222.
- Chauhan, V.; Chauhan, A.; *Pathophysiology* **2006**, 13, 195.
- Duce, J. A.; Bush, A. I.; *Prog. Neurobiol.* **2010**, 92, 1.
- Zawia, N. H.; Lahiri, D. K.; Cardozo-Pelaez, F.; *Free Radical Biol. Med.* **2009**, 46, 1241.
- Liu, G.; Men, P.; Kudo, W.; Perry, G.; Smith, M. A.; *Neurosci. Lett.* **2009**, 455, 187.
- World Health Organization; *Trace elements in human nutrition and health*, WHO: Bélgica, 1996.
- Jacobs, D.; DeMott, R.; Oxley K.; *Laboratory Test Handbook*, 5<sup>th</sup> ed., Lexi-Comp.: Hudson, 2001.
- Uranga, R. M.; Giusto, N. M.; Salvador, G. A.; *Neuroscience* **2010**, 170, 381.
- Rivera-Mancía, S.; Pérez-Neri, I.; Rios, C.; Tristán-Lopez, L.; Rivera-Espinosa, L.; Montes, S.; *Chem.-Biol. Interact.* **2010**, 186, 184.
- Arendash, G. W.; Schleif, W.; Rezai-Zadeh, K.; Jackson, E. K.; Zacharia, L. C.; Cracchiolo, J. R.; Shippy, D.; Tan, J.; *Neuroscience* **2006**, 142, 941.
- Zatta, P.; Drago, D.; Bolognin, S.; Sensi, S. L.; *Trends Pharmacol. Sci.* **2009**, 30, 346.
- Dutra, L.; Carasek, A.; Cantos, E.; *Rev. Bras. Anal. Clin.* **2006**, 38, 217.
- Maynard, C. J.; Cappai, R.; Volitakis, I.; Cherny, R. A.; Masters, C. L.; Li, Q. X.; Bush, A. I.; *J. Inorg. Biochem.* **2006**, 100, 952.
- Hoernke, M.; Koksche, B.; Brezesinski, G.; *Biophys. Chem.* **2010**, 150, 64.
- Marino, T.; Russo, N.; Toscano, M.; Pavelka, M.; *Interdiscip. Sci. Comput. Life Sci.* **2010**, 2, 57.
- Cuajungco, M.; Faget, K.; *Brain Res. Rev.* **2003**, 41, 44.
- Nischwitz, V.; Berthele, A.; Michalke, B.; *Anal. Chim. Acta* **2008**, 627, 258.
- Oliveira, A.; *Rev. Anal.* **1996**, 25, 76.
- Lin, C.; Wang, L.; Shen, K.; *J. Clin. Lab. Anal.* **2009**, 23, 192.
- Yokel, R. A.; Lasley, S. M.; Dorman, D. C.; *J. Toxicol. Env. Health, Part B* **2006**, 9, 63.
- Economou, A.; *Trends Anal. Chem.* **2005**, 24, 334.
- Wang, J.; *Analytical Electrochemistry*, Wiley: Hoboken, 2006.
- Chuanuwatanakul, S.; Dungchal, W.; Chailapakul, O.; Motomizu, S.; *Anal. Sci.* **2008**, 24, 589.
- Wang, J.; *Electroanalysis* **2005**, 17, 1341.
- Wang, J.; Lu, J. M.; Hocevar, S. B.; Farias, P. A. M.; Ogorevc, B.; *Anal. Chem.* **2000**, 72, 3218.
- Nunes, L. M. S.; Faria, R. C.; *Electroanalysis* **2008**, 20, 2259.
- Wu, Y.; Li, N. B.; Luo, H. Q.; *Sens. Actuators, B* **2008**, 133, 677.
- Jia, J.; Cao, L.; Wang, Z.; Wang, T.; *Electroanalysis* **2008**, 20, 542.
- Kokkinos, C.; Economou, A.; *Curr. Anal. Chem.* **2008**, 4, 183.
- Kruusma, J.; Banks, C. E.; Compton, R. G.; *Anal. Bioanal. Chem.* **2004**, 379, 700.
- Economou, A.; Voulgaropoulos, A.; *Talanta* **2007**, 71, 758.
- Hutton, E. A.; Hocevar, S. B.; Mauko, L.; Ogorevc, B.; *Anal. Chim. Acta* **2006**, 580, 244.
- Legeai, S.; Bois, S.; Vittori, O.; *J. Electroanal. Chem.* **2006**, 591, 93.
- Alberich, A.; Serrano, N.; Arinó, C.; Diaz-Cruz, J. M.; Esteban, M.; *Talanta* **2009**, 78, 1017.
- Leal, F.; Catarino, R.; Pimenta, A.; Souto, R.; *Revista da Faculdade de Ciências da Saúde, Edições Universidade Fernando Pessoa* **2009**, 6, 220.
- Zešli, H.; Sharrock, P.; Hidalgo-Hidalgo de Cisneros, J. L.; Naranjo-Rodríguez, I.; Tamsamani, K. R.; *Talanta* **2005**, 68, 79.
- Eilola, K.; Perämäki, P.; *Anal. Chim. Acta* **2009**, 634, 205.