

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

**DETERMINAÇÃO DE METAIS COMO
CONTAMINANTES EM FORMULAÇÕES
DE ERITROPOETINA EMPREGANDO
MÉTODOS VOLTAMÉTRICOS**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Júlia Cristina Garmatz

**Santa Maria, RS, Brasil
2007**

**DETERMINAÇÃO DE METAIS COMO CONTAMINANTES EM
FORMULAÇÕES DE ERITROPOETINA EMPREGANDO
MÉTODOS VOLTAMÉTRICOS**

por

Júlia Cristina Garmatz

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

Orientador: Prof. Dr. Leandro Machado de Carvalho

Santa Maria, RS, Brasil

2007

*Dedico este trabalho
à minha família,
ao meu pai Cláudio e à minha
mãe Bernadete, pela vida,
pelo incentivo, pelo carinho e
por acreditarem nos meus
sonhos, às minhas irmãs
Shana e Bruna, pelo
exemplo, pela força,
amizade, carinho e apoio,
aos maravilhosos e
fiéis amigos que
Deus me concedeu.*

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Leandro Machado de Carvalho, pela orientação, sabedoria, paciência, disposição na realização deste trabalho e por todas as contribuições à minha formação como pessoa e como profissional.

Ao Prof. Dr. Paulo Cícero do Nascimento, pela co-orientação e pelo esclarecimento de dúvidas pertinentes ao desenvolvimento deste trabalho.

À Prof^a. Dr^a. Denise Bohrer do Nascimento, pela contribuição a este trabalho.

Aos colegas e amigos Ana Lúcia Becker Rohlfes, Cristiane Jost, Adrian Ramirez, Luciana Del Fabro, Claudia Wollmann Carvalho, Wolmar Severo, Raquel Stefanello, Daniele Correia, Ana Paula Lima, Maurício Hilgemann, Marieli Marques, Cristiane Spengler, Vanessa Mörschbacher, Denise Bertagnolli, Sabrina Schirmer, Simone NoreMBERG, Michele Sauer, Sandra Ribeiro, Emilene Becker, Daiane Dias, Raquel Facco, Marlei Veiga, Alexandre Schneider, Carine Ieggli e Juliane Froncheti pelo incentivo, pelo apoio, pelos conselhos, pela força e pelos momentos de descontração vividos ao longo deste período em que trabalhamos juntos.

A todos os funcionários e professores que colaboraram indiretamente para o desenvolvimento deste trabalho.

À Universidade Federal de Santa Maria, pela oportunidade oferecida de realizar o curso de mestrado.

À Metrohm AG (Herisau, Suíça) pelo financiamento deste projeto através da doação de equipamentos e acessórios.

“A Deus por ter me acompanhado e me dado forças.”

RESUMO

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

DETERMINAÇÃO DE METAIS COMO CONTAMINANTES EM FORMULAÇÕES DE ERITROPOETINA EMPREGANDO MÉTODOS VOLTAMÉTRICOS

AUTORA: JÚLIA CRISTINA GARMATZ

ORIENTADOR: PROF. DR. LEANDRO MACHADO DE CARVALHO

Data e Local da Defesa: Santa Maria, 20 de Julho de 2007.

A contaminação de pacientes com insuficiência renal por espécies metálicas pode estar associada à presença destas na medicação empregada, uma vez que estas espécies podem ser absorvidas pelo organismo do paciente. O nível de contaminação através da medicação, nestes casos, dependerá da qualidade da medicação utilizada no tratamento. Dentre os possíveis contaminantes, estão metais como alumínio, cromo e níquel. Desta forma, o desenvolvimento de metodologias analíticas adequadas ao controle de qualidade dos medicamentos administrados ao paciente é de grande importância. No presente trabalho, investigou-se a presença de Al, Cr e Ni como contaminantes em formulações de eritropoetina (EPO), um antianêmico renal, através do desenvolvimento e otimização de um método voltamétrico adsorptivo de redissolução catódica (AdCSV) com a otimização de uma etapa de pré-tratamento das amostras empregando radiação UV para a decomposição dos componentes orgânicos da matriz. O método está baseado na deposição adsorptiva do complexo formado (metal-ligante) na superfície do eletrodo e na redução do ligante ou do metal durante a varredura catódica dos potenciais. Os valores de Al, Cr e Ni encontrados nas amostras estudadas, após a etapa de pré-tratamento, demonstram a aplicabilidade do método para a determinação de Al, Cr e Ni como contaminantes neste tipo de matriz. O método voltamétrico desenvolvido é vantajoso em relação a outros métodos existentes, devido à alta sensibilidade da medida quando associada a uma etapa de pré-tratamento da amostra com radiação UV combinado com adição de H₂O₂.

Palavras-chave: eritropoetina; metais; voltametria de redissolução; radiação UV

ABSTRACT

Master Dissertation in Chemistry
Graduate Pos in Chemistry
Universidade Federal de Santa Maria

DETERMINATION OF METALS AS CONTAMINANTS IN ERYTHROPOIETIN FORMULATIONS BY VOLTAMMETRIC METHODS

AUTHOR: JÚLIA CRISTINA GARMATZ
ADVISOR: PROF. DR. LEANDRO MACHADO DE CARVALHO
Santa Maria, July 20th, 2007.

The contamination of renal failure patients by metals can be associated to the presence of these metals in the medication, since they can be absorbed by the organism. The level of contamination caused by medication, in these cases, depends strongly on the quality of medication used in the treatment. Among the possible contaminants, there are metals such as aluminum, chromium and nickel. Therefore, the development of analytical methodologies for the quality control of medicaments used by anemic patients is of great importance. In the present work, the presence of Al, Cr and Ni as contaminants in erythropoietin formulations (EPO), a renal antianemic, was investigated by developing and optimizing an adsorptive cathodic stripping voltammetric (AdCSV) method. It involves the optimization of a pretreatment step of samples by using UV irradiation for decomposition of matrix organic components. The AdCSV method is based on the adsorptive deposition of the complex formed at the electrode surface and the subsequent reduction of ligand (or metal) during the cathodic potential scan. The results found for Al, Cr and Ni in the studied samples, after performing the pretreatment step, show the applicability of the method for the determination of Al, Cr and Ni as contaminants in this kind of samples. The developed voltammetric methods are advantageous in relation to other existing methods concerning the high sensitivity of measurement if associated to the pretreatment step by UV irradiation associated with the addition of H₂O₂.

Keywords: erythropoietin; metals; stripping voltammetry; UV radiation

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Seqüência de aminoácidos formando a estrutura da eritropoetina	05
Figura 2: Representação esquemática do procedimento usado na voltametria por redissolução mostrando as etapas para deposição e redissolução na determinação de um metal M^{n+} em presença de um ligante L.....	09
Figura 3: Estrutura molecular dos ligantes: A) Violeta de solocromo RS (SVRS); B) Ácido dietilenotriamino-pentaacético (DTPA) e C) Dimetilgloxima (DMG).....	10
Figura 4: Classes de compostos que sofrem decomposição pela radiação UV	15
Figura 5: Espectro UV-Vis da lâmpada de mercúrio	23
Figura 6: Esquema representativo do digestor empregado para irradiação com lâmpada de mercúrio.....	38
Figura 7: Representação esquemática do digestor desenvolvido	39
Figura 8: Sinais voltamétricos de Al^{3+} por AdCSV: adições de Al^{3+} 10-100 $\mu g L^{-1}$...	40
Figura 9: Sinais voltamétricos de Cr^{3+} por AdCSV: adições de Cr^{3+} 1-10 $\mu g L^{-1}$	41
Figura 10: Sinais voltamétricos de Ni^{2+} por AdCSV: adições de Ni^{2+} 1-10 $\mu g L^{-1}$	41
Figura 11: Determinação voltamétrica de alumínio na amostra de EPO sem a etapa de irradiação UV: adições de Al^{3+} (10 a 80 $\mu g L^{-1}$)	44
Figura 12: Determinação voltamétrica de cromo na amostra de EPO sem a etapa de irradiação UV: adições de Cr^{3+} (1 a 5 $\mu g L^{-1}$)	44
Figura 13: Determinação voltamétrica de níquel sem a etapa de irradiação UV: adições de Ni^{2+} (1 a 3 $\mu g L^{-1}$)	45
Figura 14: Determinação voltamétrica de alumínio na amostra de EPO após etapa de irradiação UV (2h a 86 ± 3 °C)	46
Figura 15: Determinação voltamétrica de cromo na amostra de EPO após etapa de irradiação UV (3h a 86 ± 3 °C)	47
Figura 16: Determinação voltamétrica de níquel na amostra de EPO após a etapa de irradiação UV (3h a 86 ± 3 °C)	47
Figura 17: Determinação voltamétrica de Al por AdCSV na amostra de EPO sem a etapa de irradiação UV.....	49

Figura 18: Monitoramento espectrofotométrico do H ₂ O ₂ sem radiação UV somente com aquecimento: A) antes do aquecimento; B) após 120 min de aquecimento em banho termostatizado a 86 ± 3 °C.....	50
Figura 19: Monitoramento espectrofotométrico da EPO sem radiação UV, com a presença de H ₂ O ₂ e com aquecimento: A) antes do aquecimento; B) após 120 min de aquecimento em banho termostatizado a 86 ± 3 °C.....	50
Figura 20: Monitoramento espectrofotométrico do H ₂ O ₂ com radiação UV: A) antes da irradiação; B) após 30 min de irradiação a 86 ± 3 °C.....	51
Figura 21: Monitoramento espectrofotométrico da EPO sem radiação UV, sem aquecimento e sem a presença de H ₂ O ₂	52
Figura 22: Média dos valores de recuperação (<i>n</i> = 5) para Al adicionado em amostras de EPO armazenadas e não-armazenadas submetidas à irradiação UV por 2 h a 86 ± 3 °C (Eritromax [®] solução injetável).....	54
Figura 23: Média dos valores de recuperação (<i>n</i> = 5) para Cr adicionado em amostras de EPO armazenadas e não-armazenadas submetidas à irradiação UV por 3 h a 86 ± 3 °C	55
Figura 24: Média dos valores de recuperação (<i>n</i> = 5) para Ni adicionado em amostras de EPO armazenadas e não-armazenadas submetidas à irradiação UV por 3 h a 86 ± 3 °C	56
Figura 25: Determinação voltamétrica de alumínio em amostra de EPO utilizando DASA como agente complexante: adições de Al ³⁺ de 20-100 µg L ⁻¹	59
Figura 26: Determinação voltamétrica de zinco em amostra de EPO utilizando DASA como agente complexante: adições de Zn ²⁺ de 100-250 µg L ⁻¹	60
Figura 27: Determinação voltamétrica de alumínio em amostra de EPO com adições do interferente Zn ²⁺ na presença de EDTA: adições de Zn ²⁺ de 100-250 µg L ⁻¹	61
Figura 28: Sinais voltamétricos de Al ³⁺ em amostra de EPO após irradiação UV por 2h a 86 ± 3 °C: adições de Al ³⁺ de 10-100 µg L ⁻¹	63
Figura 29: Sinais voltamétricos de Cr ³⁺ no modo SMDE em amostra de EPO após irradiação UV por 3h a 86 ± 3 °C: adições de Cr ³⁺ de 10-100 µg L ⁻¹	64
Figura 30: Sinais voltamétricos de Cr ³⁺ no modo HMDE em amostra de EPO após irradiação UV por 3h a 86 ± 3 °C: adições de Cr ³⁺ de 1-10 µg L ⁻¹	64
Figura 31: Sinais voltamétricos de Ni ²⁺ em amostra de EPO após irradiação UV por 3h a 86 ± 3 °C: adições de Ni ²⁺ de 1-10 µg L ⁻¹	65

Figura 32: Comparativo das concentrações de Al^{3+} , Cr^{3+} e Ni^{2+} encontradas em diferentes amostras de EPO após a etapa de irradiação UV. Amostras: Eritromax [®] solução injetável, Hemax-Eritron [®] pó líófilo e Alfaepoetina [®] solução injetável	70
Figura 33: A) Sinais voltamétricos de Al^{3+} e Fe^{3+} por AdCSV ; B) Sinais voltamétricos de Zn^{2+} , Cd^{1+} , Pb^{2+} e Cu^{2+} por ASV após determinação de Al^{3+} e Fe^{3+} : Solução de medida: 10 mL de água ultrapura	71
Figura 34: A) Sinais voltamétricos de Ni por AdCSV após determinação de Al^{3+} , Fe^{3+} , Zn^{2+} , Cd^{1+} , Pb^{2+} e Cu^{2+} ; B) Sinais voltamétricos de Tl^{1+} por ASV após determinação de Al^{3+} , Fe^{3+} , Zn^{2+} , Cd^{1+} , Pb^{2+} , Cu^{2+} e Ni^{2+} : Solução de medida: 10 mL de água ultrapura	72
Figura 35: A) Sinais voltamétricos de Al^{3+} e Fe^{3+} por AdCSV em amostra de EPO após irradiação UV por 3h a 86 ± 3 °C; B) Sinais voltamétricos de Zn^{2+} , Cd^{1+} , Pb^{2+} e Cu^{2+} por ASV na amostra de EPO após a determinação de Al^{3+} e Fe^{3+}	74
Figura 36: A) Sinais voltamétricos de Ni^{2+} por AdCSV na amostra de EPO após a determinação de Al^{3+} , Fe^{3+} , Zn^{2+} , Cd^{1+} , Pb^{2+} e Cu^{2+} ; B) Sinais voltamétricos de Tl^{1+} por ASV na amostra de EPO após a determinação de Al^{3+} , Fe^{3+} , Zn^{2+} , Cd^{1+} , Pb^{2+} , Cu^{2+} e Ni^{2+}	75
Figura 37: Resumo do procedimento experimental seqüencial testado para determinação de Al^{3+} , Fe^{3+} , Zn^{2+} , Cd^{1+} , Pb^{2+} , Cu^{2+} , Ni^{2+} e Tl^{1+} em amostras de EPO irradiada	79

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Formas farmacêuticas, apresentações e composições da eritropoetina humana recombinante (EPO).....	06
Tabela 2: Comparativo entre digestores através de ensaios de recuperação de Al, Cr e Ni por AdCSV em amostras de EPO submetidas à irradiação com lâmpada de Hg de alta pressão por 3 h a 86 ± 3 °C	57
Tabela 3: Recuperação do sinal de Al^{3+} ($40 \mu g L^{-1}$) na presença de interferentes após irradiação UV	58
Tabela 4: Recuperação do sinal de Cr^{3+} ($3 \mu g L^{-1}$) na presença de interferentes após irradiação UV.....	62
Tabela 5: Recuperação do sinal de Ni^{2+} ($3 \mu g L^{-1}$) na presença de interferentes após irradiação UV.....	62
Tabela 6: Valores de LD e LQ para cada metal investigado em amostras de EPO. Amostras: Eritromax [®] , Hemax-Eritron [®] e Alfaepoetina [®]	66
Tabela 7: Concentrações de Al^{3+} determinadas em diferentes amostras de EPO após a etapa de irradiação por 2 ou 3h a 86 ± 3 °C. Amostras: Eritromax [®] e Alfaepoetina [®]	67
Tabela 8: Concentrações de Cr^{3+} determinadas em diferentes amostras de EPO após a etapa de irradiação por 3h a 86 ± 3 °C. Amostras: Hemax-Eritron [®] pó líofilo e Alfaepoetina [®] solução injetável.....	68
Tabela 9: Concentrações de Ni^{2+} determinadas em diferentes amostras de EPO após a etapa de irradiação por 2 ou 3h a 86 ± 3 °C. Amostras: Eritromax [®] , Hemax-Eritron [®] e Alfaepoetina [®]	69
Tabela 10: Valores de constante de formação de alguns complexos.....	71
Tabela 11: Protocolo experimental para determinação sequencial de Al^{3+} , Fe^{3+} , Zn^{2+} , Cd^{1+} , Pb^{2+} , Cu^{2+} , Ni^{2+} e Tl^{1+} em amostras de EPO.....	78

LISTA DE SIGLAS E ABREVIações

ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
DNA	Ácido Desoxi Ribonucleico
AdCSV	Voltametria adsortiva de redissolução catódica
HMDE	Eletrodo de mercúrio de gota pendente
SMDE	Eletrodo de mercúrio de gota estática
λ	Comprimento de onda
EPO	Eritropoetina
UV	Ultravioleta
UI	Unidade Internacional
NPV	<i>Normal Pulse Voltammetry</i>
DPV	<i>Differential Pulse Voltammetry</i>
RPV	<i>Reverse Pulse Voltammetry</i>
SWV	<i>Square Wave Voltammetry</i>
SVRS	Violeta de Solocromo RS
DTPA	Ácido dietilenotriamino pentaacético
DMG	Dimetilglioxima
ASV	Voltametria de redissolução anódica
CSV	Voltametria de redissolução catódica
AAS	Espectrometria de Absorção Atômica
DOC	Carbono orgânico dissolvido
DOM	Matéria orgânica dissolvida
DASA	Vermelho de alizarina S
EDTA	Ácido etileno diamino tetraacético

SUMÁRIO

DEDICATÓRIA	iv
AGRADECIMENTOS	v
RESUMO.....	vi
ABSTRACT.....	vii
LISTA DE FIGURAS	viii
LISTA DE TABELAS	xi
LISTA DE SIGLAS E ABREVIACÕES	xii
1 INTRODUÇÃO	01
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	03
2.1 Tratamento da anemia na insuficiência renal	03
2.1.1 Contaminação de medicamentos por metais	07
2.2 Toxicidade e efeitos dos metais Al, Cr e Ni na saúde humana	07
2.2.1 Alumínio	08
2.2.2 Cromo.....	09
2.2.3 Níquel.....	10
2.3 Determinação de metais por voltametria	11
2.3.1 Voltametria adsortiva de redissolução catódica	12
2.3.2 Voltametria de redissolução anódica.....	16
2.3.3 Análise seqüencial por voltametria	16
2.4 Decomposição de amostras utilizando lâmpada de Hg de alta pressão	18
2.4.1 Espécies formadas na interação entre H ₂ O ₂ e a radiação UV.....	20
2.4.2 Lâmpadas como fonte de radiação UV	25
2.4.3 Aplicação da radiação UV na determinação de metais	29
3 MATERIAL E MÉTODOS	31
3.1 Instrumentação.....	31
3.2 Reagentes e Soluções	31
3.2.1 Determinação de Al.....	32
3.2.2 Determinação de Cr	33
3.2.3 Determinação de Ni.....	33
3.2.4 Irradiação de amostras com lâmpada de Hg.....	33
3.2.4.1 Purificação do peróxido de hidrogênio	34

3.3 Controle da contaminação.....	34
3.4 Procedimentos analíticos	34
3.4.1 Determinações voltamétricas	34
3.4.2 Irradiação de amostras com lâmpada de mercúrio de alta pressão	35
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	40
4.1 Determinação de Al, Cr e Ni em solução aquosa.....	40
4.2 Determinação de Al, Cr e Ni em amostras de EPO.....	43
4.3 Irradiação de amostras de EPO com lâmpada de Hg de alta pressão.....	45
4.4 Estudo da decomposição de amostras de EPO com radiação UV.....	48
4.4.1 Efeito do tempo, temperatura, H ₂ O ₂ , radiação UV e radical HO•	48
4.4.2 Eficiência da decomposição da amostra sob condições otimizadas	52
4.5 Interferentes na determinação de Al, Cr e Ni por AdCSV	57
4.6 Faixa linear de determinação para Al, Cr e Ni em amostras de EPO.....	63
4.7 Limite de detecção e quantificação para o Al, Cr e Ni em amostras de EPO irradiadas.....	65
4.8 Quantificação de Al, Cr e Ni como contaminantes em amostras de EPO	66
4.9 Análise seqüencial de metais em amostras de EPO empregando AdCSV e ASV	70
5 CONCLUSÕES	80
6 BIBLIOGRAFIA	81
ANEXOS	95

1 INTRODUÇÃO

A eritropoetina ou epoetina (EPO) é um antianêmico renal utilizado no tratamento da insuficiência ou doença renal crônica causada pela produção diminuída de eritropoetina, hormônio endógeno, produzido principalmente pelo rim e que induz a eritropoese estimulando a produção de hemácias no sangue. A EPO é uma glicoproteína produzida por tecnologia do DNA recombinante. Contém 165 aminoácidos em seqüência idêntica à da eritropoetina humana endógena. Sua atividade biológica é igual à do hormônio endógeno [1] e é administrada ao paciente via intravenosa ou subcutânea na dose de 50 UI/kg três vezes por semana.

No mercado farmacêutico existem várias formulações de EPO e podem ser apresentadas em pó líofilo ou solução injetável no qual cada frasco-ampola pode conter por mL de solução dosagens de 1000 UI, 2000 UI, 3000 UI, 4000 UI ou 10000 UI de eritropoetina recombinante, além de componentes não ativos como glicina, albumina humana, fosfato de sódio dibásico anidro, fosfato de sódio monobásico monohidratado (EPO liofilizado), cloreto de sódio, fosfato de sódio monobásico, fosfato de sódio dibásico e água (EPO solução injetável). Em pó líofilo a solução é preparada antes do uso pela adição de uma ampola de diluente (1 mL de água destilada para injetáveis) [1].

Os efeitos toxicológicos de contaminantes variam de uma espécie para outra. Estudos demonstram que o acúmulo de alumínio no organismo está relacionado a doenças neurológicas e ao comprometimento da estrutura óssea dos pacientes [2]. O cromo é um elemento traço essencial para o ser humano, porém, em excesso se torna tóxico, sendo que, taxas elevadas de cromo são associadas a lesões vasculares com aumento dos quadros de hemorragias e trombooses cerebrais. O níquel em quantidades pequenas tem sido classificado como um elemento importante ao organismo humano. Em doses elevadas é tóxico podendo causar irritação gastro intestinal, alterações neurológicas, alterações cardíacas e alergias como dermatite, rinite crônica, asma e outros estados alérgicos. O excesso de níquel pode chegar a ter conseqüências mais graves como necrose e carcinoma do fígado e câncer de pulmão.

A contaminação de pacientes com insuficiência renal por metais pode estar associada à presença destes na medicação empregada, uma vez que estes metais podem ser absorvidos pelo organismo do paciente. O problema aqui está

relacionado a uma capacidade reduzida dos pacientes com insuficiência renal de eliminar espécies tóxicas e indesejáveis ao metabolismo humano. O nível de contaminação através da medicação, nestes casos, dependerá da qualidade da medicação utilizada no tratamento. Portanto, a existência de metodologias analíticas adequadas ao controle de qualidade dos medicamentos administrados ao paciente é de grande relevância para a área clínica e deve ser estudado de forma sistemática.

A determinação de metais por voltametria de redissolução é extremamente sensível e está bem fundamentada na literatura. A voltametria adsortiva de redissolução catódica (AdCSV) empregando o HMDE como eletrodo de trabalho é um método que ocupa uma posição importante entre os métodos eletroanalíticos na investigação de metais, sendo as principais vantagens desta técnica a possibilidade de se realizar determinações analíticas em matrizes complexas e os baixos limites de detecção alcançados (da ordem de $\mu\text{g L}^{-1}$). O método está baseado na deposição adsortiva do complexo formado (metal-ligante) na superfície do eletrodo e na redução do ligante ou do metal durante a varredura catódica dos potenciais.

Em amostras complexas, como é o caso da EPO, as espécies metálicas a serem determinadas podem estar ligadas à matriz orgânica. Portanto, antes da determinação voltamétrica da espécie metálica de interesse por AdCSV, uma etapa de pré-tratamento da amostra envolvendo a liberação da espécie se faz necessária. Um dos métodos mais eficientes empregado para liberação de metais ligados à matriz orgânica envolve a irradiação da amostra por um determinado tempo com radiação ultravioleta (digestão UV) combinado com adição de H_2O_2 .

Considerando a dimensão do problema abordado e a interferência da matriz da amostra, o presente trabalho tem como objetivo investigar a presença de Al, Cr e Ni como contaminantes em formulações de EPO através do desenvolvimento e otimização de um método voltamétrico adsortivo de redissolução catódica (AdCSV) com a otimização de uma etapa de pré-tratamento das amostras empregando radiação UV para a decomposição dos componentes orgânicos da matriz.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Tratamento da anemia na insuficiência renal

A insuficiência renal crônica causa uma grande variedade de distúrbios metabólicos que afeta quase todo o sistema orgânico. Apesar da contínua melhoria do tratamento através da diálise, muitas funções do organismo são prejudicadas. Além disso, muitos medicamentos são freqüentemente usados em doenças e complicações urêmicas.

A saúde das pessoas que sofrem de insuficiência renal está diretamente ligada à possibilidade de purificação do sangue em sessões de hemodiálise. Devido ao fato de pacientes com insuficiência renal possuírem uma capacidade reduzida de excreção de metais tóxicos na urina, alguns órgãos internos podem ser debilitados pelo acúmulo destas espécies no sangue e nos tecidos. Em decorrência disso, diversas drogas são regularmente administradas ao paciente para o tratamento das doenças e complicações urêmicas decorrentes da hemodiálise [3]. As drogas mais freqüentemente utilizadas no tratamento dos pacientes com insuficiência renal são a eritropoetina (EPO), a vitamina D₃ (Calcitriol e Alfacalcidol), o carbonato de cálcio, o acetato de cálcio e o hidróxido de alumínio, empregadas com o objetivo de manter o nível de hematócritos no sangue e de cálcio nos ossos [3].

A possibilidade de contaminação de pacientes de hemodiálise por metais tóxicos presentes nos medicamentos administrados durante o tratamento tem sido pouco estudada até o presente momento. Entretanto, espécies metálicas podem ser absorvidas pelo organismo do paciente se presentes como contaminantes nos medicamentos utilizados no tratamento dos distúrbios decorrentes da hemodiálise.

A anemia é freqüentemente observada em pacientes com insuficiência renal e é considerada a consequência mais negativa do tratamento destes pacientes. Juntamente com a hipertensão, é a causa principal de problemas cardiovasculares em pacientes dialisados e transplantados [4, 5].

O rim produz um hormônio chamado eritropoetina (EPO), que estimula a produção de glóbulos vermelhos do sangue. O mau funcionamento dos rins diminui a formação desse hormônio, causando anemia. O tratamento da anemia é realizado com a reposição de eritropoetina entre outros medicamentos.

A EPO é um antianêmico renal utilizado na insuficiência ou doença renal crônica causada pela produção diminuída de eritropoetina, hormônio endógeno, produzido principalmente pelo rim e que induz a eritropoese estimulando a produção de hemácias no sangue. A EPO também provoca o aumento de viscosidade sangüínea e da resistência vascular periférica, que resultam em aumento da pressão arterial. A EPO é o único antianêmico renal disponível no Brasil, administrada ao paciente via intravenosa ou subcutânea na dose de 50 UI/kg três vezes por semana [1, 6-8].

A estrutura da eritropoetina é uma seqüência de aminoácidos relacionados a família das glicoproteínas [1] e produzida por tecnologia do DNA recombinante. Contém 165 aminoácidos em seqüência idêntica à da eritropoetina humana endógena como pode ser observado na figura 1.

O mercado farmacêutico apresenta o medicamento liofilizado (pó branco ou quase branco) ou solução injetável (líquido incolor e transparente) no qual cada frasco-ampola pode conter por mL de solução dosagens que variam de 1000 a 10000 UI de eritropoetina recombinante além de componentes não ativos. Na tabela 1 pode ser observado a composição das formulações de EPO.

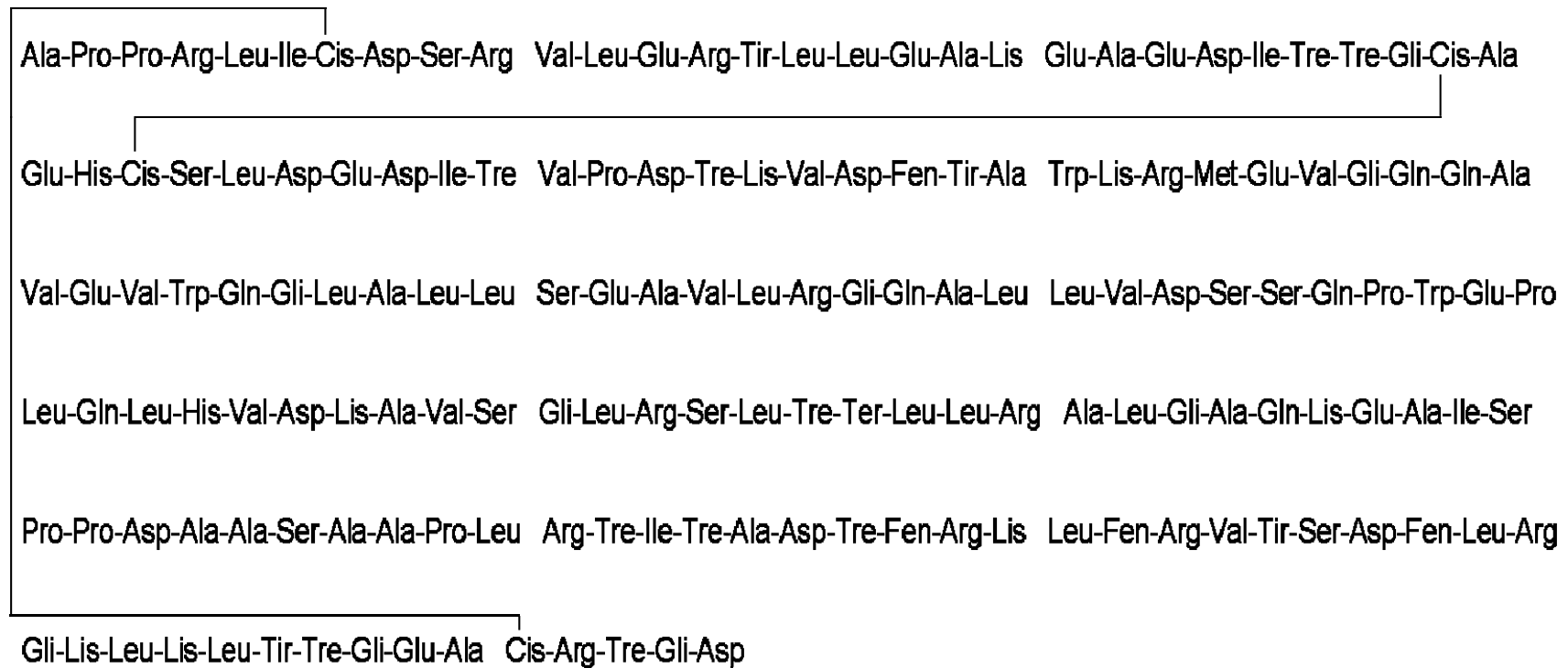


Figura 1: Seqüência de aminoácidos formando a estrutura da eritropoetina. Ala= alanina, Pro= prolina, Arg= arginina, Leu= leucina, Ile= isoleucina, Cis= cisteína, Asp= ácido aspártico, Ser= serina, Val= valina, Glu= ácido glutâmico, Tir= tirosina, His= histidina, Lis= lisina, Asp= asparagina, Tre= treonina, Gli= glicina, Trp= triptofano, Gln= glutamina, Fen= fenilalanina e Met= metionina.

Tabela 1: Formas farmacêuticas, apresentações e composições da eritropoetina humana recombinante (EPO).

Nome comercial	Forma farmacêutica	Apresentação	Composição (componentes não-ativos)
Eritromax [®]	Pó liofilizado	Frasco-ampola com 1000 UI, 2000 UI, 3000 UI, 4000 UI ou 10000 UI de EPO acompanhado de ampola de 1 mL de diluente	Glicina, albumina humana, fosfato de sódio dibásico anidro, fosfato de sódio monobásico monohidratado
	Solução injetável	Frasco-ampola de EPO nas dosagens 2000, 4000 e 10000 UI/mL ou 1000, 2000 e 4000 UI/2mL	Cloreto de sódio, fosfato de sódio monobásico, fosfato de sódio dibásico e água para injetáveis
Hemax-Eritron [®]	Pó liofilizado	Frasco-ampola com 1000 UI, 2000 UI, 3000 UI, 4000 UI e 10000 UI de EPO acompanhado de ampola de 1 mL ou de 2 mL de diluente	Albumina humana, manitol, cloreto de sódio, fosfato de sódio monobásico, fosfato de sódio dibásico dodecahidratado
Alfaepoetina [®]	Pó liofilizado	Frasco-ampola contendo 1000 UI, 2000 UI, 3000 UI ou 4000 UI de EPO acompanhado de ampola de diluente (1mL de água destilada para injetável)	Glicina, albumina humana, fosfato de sódio dibásico anidro, fosfato de sódio monobásico monohidratado
	Solução injetável	Frasco-ampola de EPO nas dosagens 1000, 2000, 3000, 4000 ou 10000 UI/mL	Albumina humana, cloreto de sódio, citrato de sódio, ácido cítrico e água para injetáveis.

2.1.1 Contaminação de medicamentos por metais

O metabolismo anormal de elementos-traço em diálise crônica tem sido estudado nos últimos anos. Entretanto, o conhecimento sobre o assunto ainda é incompleto pela pouca quantidade de amostra, dificuldade em análise e larga discrepância entre valores de medida por diferentes métodos. As fontes de anormalidades de elementos-traço em pacientes de hemodiálise são desconhecidas (exceto para o alumínio). A possibilidade de contaminação por traços metálicos em vários medicamentos e os efeitos desses metais no metabolismo dos pacientes de diálise ainda são desconhecidos [3]. O estudo feito por Lee e colaboradores investigou a presença de quantidade anormal de 6 metais (Cu, Zn, Al, Pb, Cd e Hg) em sangue de pacientes de hemodiálise e suas relações com drogas freqüentemente usadas, entre elas, a EPO.

Segundo os autores deste trabalho, a contaminação de pacientes com insuficiência renal pelos metais pode estar associada, entre outras coisas, à presença destes na medicação administrada. Entretanto, não existem outros trabalhos na literatura que relatam a determinação de contaminantes nefrotóxicos neste tipo de medicamento. Por serem as únicas drogas administradas no Brasil no tratamento de pacientes com insuficiência renal [1] e em doses crescentes, o risco de contaminação através da medicação é grande e deve ser estudado de forma sistemática.

2.2 Toxicidade e efeitos dos metais Al, Cr e Ni na saúde humana

Todas as formas de vida são afetadas pela presença de metais dependendo da dose e da forma química. Muitos metais são essenciais para o crescimento de todos os tipos de organismos, desde as bactérias até mesmo o ser humano, mas eles são requeridos em baixas concentrações.

A classificação biológica dos metais tem sido baseada somente na toxicidade: 1) elementos essenciais: sódio, potássio, cálcio, ferro, zinco, cobre, níquel e magnésio; 2) micro-contaminantes ambientais: arsênio, chumbo, cádmio, mercúrio, alumínio, titânio, estanho e tungstênio; e 3) elementos essenciais e simultaneamente micro-contaminantes: cromo, zinco, ferro, cobalto, manganês e níquel [9].

No organismo dos seres humanos, os elementos traço podem ser divididos em essenciais e não-essenciais. Os primeiros são fundamentais para o desenvolvimento e a manutenção da vida, devido à sua participação em diversos processos bioquímicos. Sua deficiência ou ausência na dieta ocasiona patologias carenciais. Por outro lado, o excesso destes elementos pode causar efeitos tóxicos ao organismo. Para alguns deles, a diferença entre a concentração considerada tóxica e essencial é muito pequena. Um metal pode atuar na atividade biológica de outro metal aumentando ou diminuindo sua toxicidade [10, 11, 12].

Os elementos não essenciais são aqueles que não participam do metabolismo humano e podem gerar sérios danos à saúde. A toxicidade de um metal ou composto metálico está relacionada diretamente aos níveis de concentração máximas toleradas num organismo. Estes elementos podem reagir com as proteínas, DNA, RNA e outras substâncias, afetando os processos metabólicos, resultando em mudanças fisiológicas. A contaminação devido a metais pode resultar em mudanças irreversíveis ou então em mudanças que podem ser revertidas pela remoção da exposição ao metal [12, 13].

Os efeitos toxicológicos de contaminantes variam de uma espécie para outra. Segue abaixo uma breve descrição da toxicidade e de alguns efeitos benéficos que metais como Al, Cr e Ni podem oferecer ao homem.

2.2.1 Alumínio

O alumínio é considerado um elemento não essencial. Porém está presente no organismo humano. A exposição a este elemento se dá oralmente, através de alimentos, medicamentos e água [14]. O Al é um elemento onipresente no ambiente. Também, é o metal mais abundante na crosta terrestre, perfazendo cerca 8% de sua massa [15]. O homem tem contato com o Al ou seus compostos diariamente, a média de ingestão humana de Al para adultos jovens é de aproximadamente 8 a 9 mg dia⁻¹ para homens, e 7 mg dia⁻¹ para mulheres, tanto por via oral, como por inalação, através de alimentos, utensílios domésticos, medicamentos, partículas de pó, assim como através da água potável, uma vez que sulfato de Al é usado como floculante em seu processo de purificação.

A exposição geral dos seres humanos ao Al é grande, mas devido à sua baixa absorção intestinal em indivíduos saudáveis, os problemas são minimizados. Uma

pequena parte é absorvida, passando para a corrente circulatória e sendo eliminada por via renal. O Al ingerido é eliminado em sua maior parte nas fezes e a pequena quantidade de Al solúvel que é absorvida é transportada pela corrente sanguínea e excretada na urina. Em indivíduos saudáveis, pouquíssimo alumínio é retido, mesmo quando ingerido em grandes quantidades. Do total de Al ingerido, apenas 0,01 a 0,02% é absorvido pelo organismo, sendo o restante - mais de 99% - eliminado *in natura* nas fezes. O Al proveniente da água potável, mesmo tratada com sulfato de alumínio, baseado num consumo médio diário de 2 litros, é de aproximadamente 0,244 mg, ou seja, correspondente a 1% do total ingerido diariamente [16]. A concentração máxima permitida de Al(III) em águas potáveis no Brasil, estabelecido pela Portaria nº 518 [17], é de 0,2 mg L⁻¹. Os efeitos tóxicos do elemento são mais evidentes em indivíduos com a função renal comprometida, pois o Al é absorvido pelos rins e deposita-se no organismo, principalmente no tecido ósseo, onde faz trocas com cálcio, o que causa Osteodistrofia e Encefalopatia [15].

De acordo com a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), é recomendado que o Al sérico dos pacientes em tratamento hemodialítico regular seja determinado anualmente. A quantificação do Al sérico é um indicador útil do grau de contaminação do paciente, quando determinado em intervalos regulares.

A intoxicação por Al tem sido cada vez mais estudada e tem sido associada à constipação intestinal, cólicas abdominais, anorexia, náuseas, fadiga, alterações do metabolismo do cálcio (raquitismo), alterações neurológicas com graves danos ao tecido cerebral. Na infância pode causar hiperatividade e distúrbios do aprendizado. Inúmeros estudos consideram que o alumínio tem um papel extremamente importante no agravamento do mal de Alzheimer (demência precoce). O excesso de alumínio interfere com a absorção do selênio e do fósforo [18].

2.2.2 Cromo

Cromo pode aparecer em solução na forma de Cr(III) e Cr(VI). As propriedades destas duas espécies diferem consideravelmente: Cr(VI) é tóxico devido principalmente pela facilidade com que penetra na pele, assim, é considerado como um forte agente carcinogênico, enquanto que Cr(III) é um elemento traço essencial ao funcionamento do nosso organismo na manutenção do metabolismo de lipídios, glicose e proteínas. Porém, quando em excesso se torna tóxico. Muitas

vezes, a determinação das duas espécies de cromo é realizada separadamente [18, 19].

A intoxicação de cromo devido a contaminação alimentar é rara, já a intoxicação industrial por cromo causa dermatites alérgicas, úlceras na pele e carcinomas. As taxas elevadas de cromo são associadas a lesões vasculares com aumento dos quadros de hemorragias e trombozes cerebrais [18].

Além dos compostos de cromo, o cromo metálico e ligas também são encontrados no ambiente de trabalho. Entre as inúmeras atividades industriais, destacam-se: galvanoplastia, soldagens, produção de ligas ferro-cromo, curtume, produção de cromatos, dicromatos, pigmentos e vernizes. A absorção de cromo por via cutânea depende do tipo de composto, de sua concentração e do tempo de contato. O cromo absorvido permanece por longo tempo retido na junção dermo-epidérmica e no estrato superior da mesoderme. A maior parte do cromo é eliminada através da urina, sendo excretada após as primeiras horas de exposição. Os compostos de cromo produzem efeitos cutâneos, nasais, bronco-pulmonares, renais, gastrointestinais e carcinogênicos. Os cutâneos são caracterizados por irritação no dorso das mãos e dos dedos, podendo transformar-se em úlceras. As lesões nasais iniciam-se com um quadro irritativo inflamatório, supuração e formação crostosa. Em níveis bronco-pulmonares e gastrointestinais produzem irritação bronquial, alteração da função respiratória e úlceras gastroduodenais [9].

2.2.3 Níquel

O Ni em quantidades pequenas tem sido classificado como um elemento importante ao organismo humano. Em doses elevadas é tóxico podendo causar: 1) irritação gastrointestinal com náuseas, vômitos e diminuição do apetite; 2) alterações neurológicas: dor de cabeça, vertigem; alterações musculares: fraqueza muscular; 3) alterações cardíacas: palpitações; 4) alergia: dermatite, rinite crônica, asma e outros estados alérgicos. O níquel inibe a ação da enzima superóxido dismutase que participa no processo de metabolização dos radicais livres. O excesso de níquel pode chegar a ter conseqüências graves como necrose e carcinoma do fígado e câncer de pulmão [18, 20].

Algumas fontes de contaminação de Ni são: 1) alimentos: chocolate, gordura hidrogenada, nozes, feijão, ervilha seca e cereais; 2) cigarro: cada cigarro contém de

2 a 6 mg de níquel (as pessoas que fumam ou convivem com a fumaça do cigarro geralmente apresentam taxas aumentadas de Ni); 3) baterias de níquel e cádmio; 4) petróleo e indústrias petroquímicas; 5) processos metalúrgicos de refinamento de Ni; 6) panelas de inox podem liberar Ni durante o cozimento de alimentos ácidos como o tomate.

O tratamento consiste de eliminação da fonte de contaminação, aumento da ingestão de fibras e suplementação com selênio, zinco, L-cisteína, D,L-metionina e terapia anti-oxidante [18].

2.3 Determinação de metais por voltametria

A voltametria estuda as relações entre a voltagem, a corrente e o tempo, durante a eletrólise numa célula. Normalmente o procedimento envolve o uso de uma célula com três eletrodos: 1) um eletrodo de trabalho no qual ocorre a eletrólise que se está investigando; 2) um eletrodo de referência que é usado para medir o potencial do eletrodo de trabalho e 3) um eletrodo auxiliar que, juntamente com o eletrodo de trabalho, permite a passagem da corrente da eletrólise [21]. Assim, nessa técnica, as informações sobre o analito são obtidas por meio da medição da magnitude da corrente elétrica que surge no eletrodo de trabalho ao se aplicar um potencial entre um eletrodo de trabalho e um eletrodo auxiliar. O parâmetro ajustado é o potencial (E) e o parâmetro medido é a corrente resultante (i). O registro da corrente em função do potencial, é denominado voltamograma, e a magnitude da corrente obtida pela transferência de elétrons durante um processo de oxidação (reação 1) pode ser relacionada com a quantidade de analito presente na interface do eletrodo/solução e conseqüentemente, na célula eletroquímica [22, 23].



Sendo Ox a forma oxidada do analito e Red a forma reduzida.

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

A voltametria ocupa uma importante posição entre os métodos eletroquímicos para a investigação de compostos orgânicos. Muitos grupos funcionais podem ser oxidados ou reduzidos no eletrodo de trabalho, o que torna possível a determinação de uma grande variedade de compostos [24]. A voltametria oferece potencialidades para investigar e estudar a especiação de metais pesados dissolvidos em águas naturais [25]. Por outro lado, certas espécies de metais dissolvidos, principalmente complexos orgânicos estáveis, são inacessíveis para a determinação voltamétrica. Portanto, para determinação dessas espécies faz-se necessário um pré-tratamento para transformar todo o conteúdo desses metais acessíveis de se determinar por voltametria.

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

O curto tempo de análise e a seletividade combinada com alta confiabilidade, devido a boa exatidão nas medidas, tem feito da voltametria uma boa alternativa para análise de traços de metais pesados em diversas matrizes. Associado a isto, tem-se ainda o baixo custo analítico, rapidez de detecção, alto potencial de automatização e possibilidade de determinação simultânea de diversos metais [26].

2.3.1 Voltametria adsortiva de redissolução catódica

A determinação de metais por voltametria de redissolução é extremamente sensível e está fundamentada na literatura [27-29].

Os métodos voltamétricos de análise apresentam uma grande sensibilidade na determinação de Al, Cr e Ni em matrizes aquosas. De especial interesse são, entretanto, os métodos voltamétricos que envolvem uma etapa de pré-concentração eletroquímica desses metais, onde o metal é primeiramente depositado no eletrodo de trabalho e posteriormente redissolvido em solução durante a varredura do potencial. Essas técnicas são conhecidas como voltametria de redissolução (catódica ou anódica) ou, ainda, como voltametria inversa. Na determinação de Al, Cr e Ni por voltametria, a técnica mais empregada é a voltametria de redissolução catódica (CSV) empregando eletrodo de mercúrio como eletrodo de trabalho.

Alternativamente aos métodos mais convencionais para a determinação de Al, Cr e Ni por CSV, alguns trabalhos relatam a deposição adsortiva desses metais no eletrodo de mercúrio na presença de ligantes orgânicos. Na voltametria adsortiva de redissolução (AdCSV), a etapa de deposição é feita pela adsorção da espécie eletroativa na superfície do eletrodo. O ligante orgânico é adicionado à solução contendo o íon metálico a ser analisado e o complexo formado (metal-ligante) será acumulado na superfície do eletrodo. Dessa maneira a etapa de deposição não depende da solubilidade do metal no mercúrio, como no caso da voltametria de redissolução convencional, mas sim da adsorção do complexo formado, possibilitando a determinação de espécies pouco solúveis no mercúrio.

Na voltametria adsortiva de redissolução também há a possibilidade do ligante sofrer redução ou oxidação no processo de redissolução do complexo adsorvido, se o ligante usado for uma espécie eletroativa. Assim, o seu sinal também poderá ser usado para a determinação do metal [27].

Na AdCSV, a deposição é feita eletroliticamente aplicando-se o potencial de deposição (E_d) durante um determinado tempo e com agitação da solução. O tempo de deposição (T_d) é escolhido em função da espécie eletroativa durante o qual a espécie de interesse será adsorvida sobre a superfície do eletrodo. A agitação faz com que o transporte de massa por convecção mantenha a concentração da espécie eletroativa junto à superfície do eletrodo igual à do seio da solução. Essa agitação deve ser feita à velocidade constante e controlada com precisão. As reações envolvidas nesta etapa são:



Na figura 2 está representado esquematicamente o procedimento usado na voltametria adsortiva por redissolução, para a determinação de um metal (M) na presença do ligante (L), formando o complexo a ser adsorvido (ML_n).

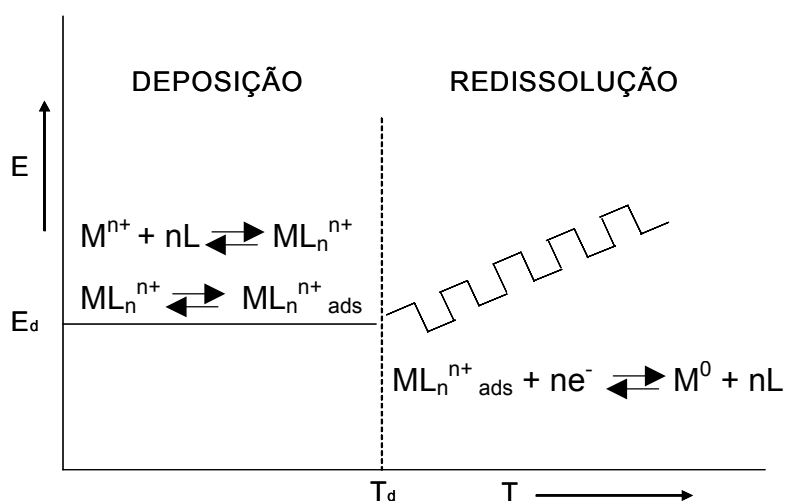


Figura 2: Representação esquemática do procedimento usado na voltametria de redissolução mostrando as etapas para deposição e redissolução na determinação de um metal M^{n+} em presença de um ligante L.

Após o término da etapa de deposição, procede-se a redissolução, fazendo-se a varredura usualmente na direção catódica de potenciais. A reação eletródica pode ser representada por:



A voltametria adsortiva de redissolução catódica (AdCSV) empregando o HMDE como eletrodo de trabalho é o método mais empregado na determinação de Al, Cr e Ni. A determinação de Al pode ser realizada na presença do ligante violeta de solocromo (SVRS), figura 3A, baseada na deposição adsortiva do complexo Al-SVRS na superfície do eletrodo e na redução do ligante durante a varredura catódica dos potenciais [30-32]. Na determinação de Cr, o complexo formado com DTPA (ácido dietilenotriamino-pentaacético), figura 3B, é depositado por adsorção na superfície do eletrodo e o metal é reduzido durante a varredura catódica dos potenciais na etapa de redissolução [33-39]. Na determinação de Ni o complexo formado com DMG (dimetilglioxima), figura 3C, é depositado na superfície do eletrodo, o qual é também reduzido durante a varredura catódica dos potenciais na etapa de redissolução. A determinação voltamétrica de metais por voltametria adsortiva na presença de um ligante orgânico provoca a deposição do metal na

forma complexada sobre a superfície do eletrodo, além de possibilitar a determinação de espécies com altos potenciais de redução no HMDE [40-42], a exemplo do Al.

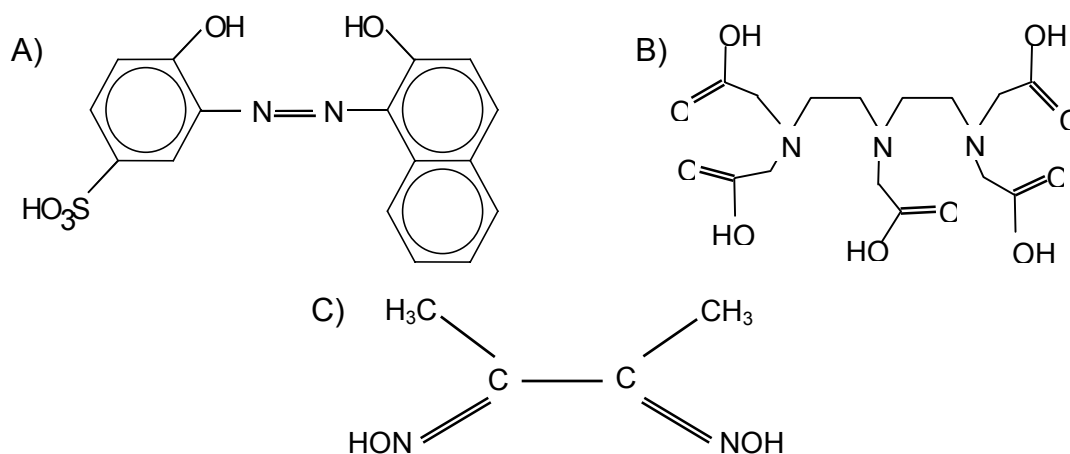


Figura 3: Estrutura molecular dos ligantes: **A)** Violeta de solocromo RS (SVRS); **B)** Ácido dietilenotriamino-pentaacético (DTPA) e **C)** Dimetilglioxima (DMG).

O Violeta de solocromo RS (SVRS) é encontrado usualmente na forma de ácido livre. É um sólido cristalino (massa molar 366,33 g) de coloração vermelho e facilmente solúvel em água, originando uma solução também vermelha em $\text{pH} < 7$ [43].

O SVRS tem sido bastante usado em técnicas voltamétricas para a determinação de diversos metais [44-46]. Os primeiros a sugerirem a utilização deste ligante foram Willard e Dean [46], referindo que o complexo Al(III)-SVRS, em $\text{pH} 4,7$, necessita de 5 horas para se formar em temperatura ambiente, 5 minutos a 50°C e 2 minutos a 60°C , Locatelli [44], em um de seus trabalhos, considerando que a reação entre o Al(III) e o ligante apresenta uma cinética lenta, sugeriu o aquecimento das soluções por 10 minutos em temperatura de 90°C antes de cada determinação voltamétrica.

O ácido dietilenotriaminopentaacético (DTPA) é um sólido branco de aparência cristalina possui fórmula molecular $\text{C}_{14}\text{H}_{23}\text{N}_3\text{O}_{10}$ (massa molar 393,35 g) e é solúvel em água. A dimetilglioxima (DMG) em forma de sal di-sódico 8-hidrato, por sua vez, possui fórmula molecular $\text{C}_4\text{H}_6\text{N}_2\text{Na}_2\text{O}_2 \cdot 8\text{H}_2\text{O}$ (massa molar 304,21 g), é também um sólido branco, solúvel em água e inodoro.

2.3.2 Voltametria de redissolução anódica

A voltametria de redissolução anódica (ASV) é muito utilizada para a análise de íons metálicos – como zinco, cádmio, chumbo, cobre e tálio – através da deposição catódica. Para que esta análise ocorra no eletrodo de gota pendente de mercúrio (HMDE) é necessário que os metais sejam solúveis no mercúrio (Hg), pois durante a etapa de pré-concentração dos metais forma-se um amálgama do metal com o Hg, ou seja, os metais são reduzidos no mercúrio. A reação que ocorre entre o analito e o eletrodo pode ser representada por:



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

Terminada a etapa de deposição do metal na gota de mercúrio, a agitação da solução é encerrada e o potencial é então varrido anodicamente, na forma de pulso diferencial, ocorrendo assim a redissolução do metal, ou seja, ocorre a oxidação dos metais para a solução [47, 48]. A redissolução é representada na equação abaixo.



A ASV pode ser vantajosa para quantificar traços de metais em amostras de EPO considerando os seguintes aspectos: 1) a possibilidade de determinações simultâneas; 2) a alta sensibilidade obtida com os métodos de redissolução e 3) o baixo custo do equipamento em comparação às medidas por outros métodos como, por exemplo, os métodos espectroscópicos [47, 49].

2.3.3 Análise seqüencial por voltametria

Diversos métodos analíticos são utilizados para a determinação quantitativa de traços de metais pesados em amostras ambientais, alimentícias e farmacêuticas tais como os métodos espectroscópicos e eletroquímicos [47].

Uma outra vantagem na determinação de metais por voltametria é a possibilidade de realizar a análise em seqüência, ou seja, realizar a determinação de vários metais utilizando-se a mesma amostra através de métodos voltamétricos diferentes seqüencialmente.

A possibilidade de realizar análise seqüencial de metais por voltametria é ampla e vem sendo estudada mais recentemente. Como exemplo, um estudo realizado por Colombo e Van Den Berg [50] mostrou a possibilidade de realizar análise simultânea de seis metais (Cu, Pb, Cd, Ni, Co e Zn) em amostras de água do mar através da voltametria de redissolução catódica (CSV) utilizando uma mistura de ligantes (dimetilglioxima e 8-hidroxiquinolina), apesar de ser uma análise simultânea, e não seqüencial. O trabalho foi realizado com mistura de ligantes e o estudo resultou em vantagens como a redução do tempo de análise e da quantidade de amostra utilizada.

Em estudos mais recentes, a metodologia de análise em seqüência está sendo cada vez mais empregada. Como exemplo, tem-se os estudos realizados por Melucci e Locatelli [51] para determinação de Zn, Cr, Cu, Sb, Sn e Pb por voltametria de redissolução anódica de onda quadrada (SWASV) seguida pela determinação de Fe, Mn e Mo por voltametria de onda quadrada (SWV) em amostras de alimentos utilizando solução de citrato de amônio dibásico $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 6,9 e 8,7) como eletrólito suporte. A determinação seqüencial realizada por Locatelli [52] de Pd, Pt e Rh por voltametria adsortiva de redissolução de onda quadrada (SWAdSV) seguida pela análise de Pb por SWASV em matrizes ambientais como, sedimentos, solos e água utilizando tampão acetato (pH 3,5) com dimetilglioxima, solução de HCl $0,3 \text{ mol L}^{-1}$ e formaldeído com hidrazina como eletrólitos suporte são outros exemplos de trabalhos [53-55] que ressaltam como os estudos em análise seqüencial por voltametria estão sendo cada vez mais desenvolvidos.

No presente trabalho, propõe-se o desenvolvimento de análises em seqüência utilizando voltametria de redissolução anódica (ASV) e voltametria adsortiva de redissolução catódica (AdCSV). A proposta do procedimento em seqüência permite que de forma simples e rápida se efetue a determinação de várias espécies metálicas seqüencialmente, sem a necessidade de se proceder a grandes alterações nos procedimentos. Portanto, através de alguns ensaios há uma tentativa de implementar um procedimento analítico para determinação seqüencial de Zn, Cd,

Pb, Cu e Tl aplicando-se ASV combinada com AdCSV para determinação de Al, Fe e Ni com eletrodo de mercúrio de gota pendente (HMDE) em amostras de EPO.

2.4 Decomposição de amostras utilizando lâmpada de Hg de alta pressão

A matéria orgânica presente na amostra interfere na determinação da concentração de metais por voltametria de três maneiras: 1) pela formação de fortes complexos com metais, os quais não são detectados durante a análise da amostra, levando a quantificação apenas da fração eletroquimicamente lábil; 2) competindo com o metal pela superfície do eletrodo, diminuindo assim a intensidade do sinal do analito ou provocando o aparecimento de sinais interferentes; e 3) a própria matéria orgânica pode sofrer redução ou oxidação eletroquímica, aumentando a corrente residual a ponto de impedir a execução da análise. Assim, a transformação dos complexos orgânicos torna-se uma etapa fundamental na análise total de metais por voltametria [56, 57].

Por esta razão, a preparação adequada da amostra, em particular a eliminação da matéria orgânica, é de grande importância no método analítico.

A expressão pré-tratamento da amostra indica o conjunto de procedimentos necessários para converter física e quimicamente uma amostra em uma forma que permita efetuar, dentre as limitações impostas pela natureza e a morfologia da mesma, a determinação do(s) analito(s) e realizar sua quantificação o quanto mais precisa e exata [57].

Um dos métodos mais eficientes empregado para a liberação de metais ligados à matriz orgânica, envolve a irradiação da amostra com radiação ultravioleta (digestão UV) por um determinado tempo. A destruição da matéria orgânica pela radiação UV é bem conhecida. Água e ar são comumente desinfetados usando lâmpadas de mercúrio. Elas também têm sido usadas na esterilização de vários objetos, água em indústrias de cosméticos, indústrias eletrônicas, piscinas, etc [59, 60].

Os mecanismos de decomposição da matéria orgânica por radiação UV tem sido descrito para muitos compostos orgânicos, por exemplo: DDT (1,1(4,4'-diclorofenil) 2,2,2-tricloroetano), HCB (hexaclorobenzeno), PCP (pentaclorofenol) e outros que decompõem depois da absorção da radiação na região UV de 180-250 nm [61].

Processos como fotooxidação envolvendo UV, similares aos que ocorrem na natureza, também são usados na decomposição industrial de substâncias tóxicas, em tratamentos de águas residuais urbanas e industriais e na produção de água ultrapura para análise de traços [62].

A Figura 4 ilustra algumas classes de compostos que podem ser decompostas pela ação da radiação UV e seus produtos de decomposição finais formados em solução [63].

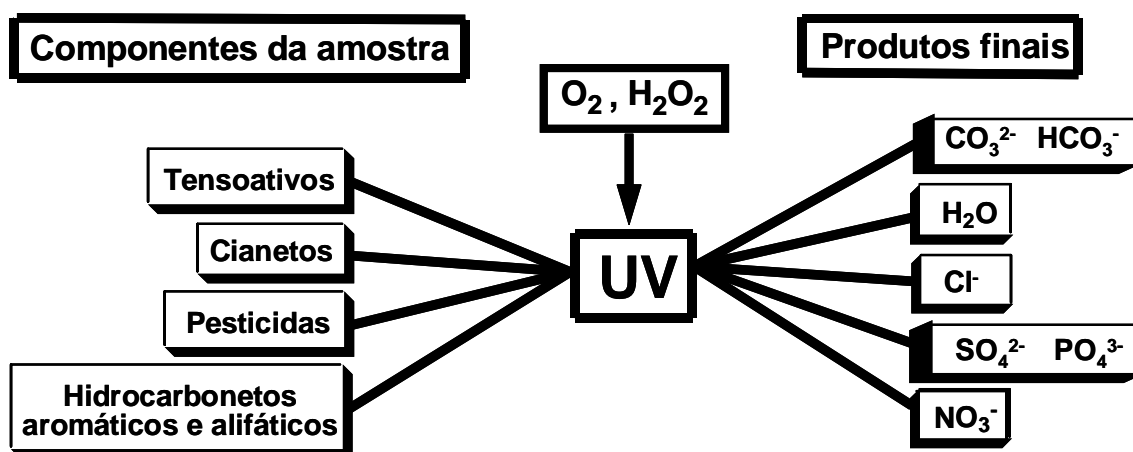


Figura 4: Classes de compostos que sofrem decomposição pela radiação UV.

Cerca de 40 e 80% da matéria orgânica presente em amostras de águas naturais é formada por compostos húmicos, que são macromoléculas de estrutura complexa e composição elementar variável. Grupos cromóforos com ácidos carboxílicos e estruturas aromáticas são abundantes nos compostos húmicos, que absorvem fortemente a radiação ultravioleta e podem atuar como fotossensibilizadores [64]. Os fotossensibilizadores são moléculas que quando excitadas transferem sua energia de excitação para outras moléculas presentes em solução, podendo formar espécies altamente reativas como o radical hidroxila (HO^\bullet), peróxido de hidrogênio (H_2O_2), oxigênio singlete ($^1\text{O}_2$), íon superóxido (O_2^-), elétron hidratado (\bar{e}_{hid}) e radicais alquilperóxido (RO_2^\bullet). Estas novas espécies podem fotooxidar os próprios fotossensibilizadores, como também outros compostos orgânicos presentes em solução. Portanto, na presença de uma fonte contínua e intensa de radiação ultravioleta a fotodegradação da matéria orgânica pode ser bastante rápida e eficiente [61, 65]. A adição de H_2O_2 em solução pode funcionar

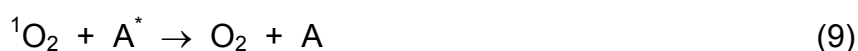
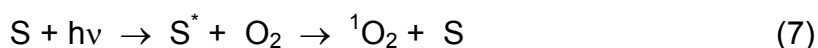
como uma fonte de oxigênio molecular e de radicais hidroxila, que são produzidos a partir da decomposição fotoquímica do H_2O_2 [66-68].

2.4.1 Espécies formadas na interação entre H_2O_2 e a radiação UV

Oxigênio singlete

A ação da radiação UV sobre moléculas de oxigênio muda seu estado de energia do estado fundamental O_2 (triplete) para o estado excitado $^1\text{O}_2$ (singlete), que é gerado possivelmente em comprimentos de onda (λ) igual a 366 nm. Este processo ocorre na presença de fotossensibilizadores [61].

Kautsky e Murray [69] foram os primeiros a proporem um mecanismo de oxidação no ambiente natural: a energia da luz solar absorvida pelos fotossensibilizadores é transferida para as moléculas de O_2 e as moléculas mudam seu estado de energia para $^1\text{O}_2$. Os átomos de $^1\text{O}_2$ formados reagem com a água e as substâncias orgânicas presentes formando peróxidos e radicais. Haag e Hoigné [70] propuseram a seguinte descrição química dos possíveis processos que ocorrem durante a absorção de energia na região UV:



onde, S e S^* são fotossensibilizadores no estado fundamental e excitado, respectivamente, e A é o composto aceptor de energia. A reação (7) mostra como os fotossensibilizadores participam no processo, a reação (8) mostra a extinção física de moléculas de oxigênio excitado pela água, e a reação (9) mostra a extinção física de moléculas de oxigênio por um aceptor orgânico, por exemplo, furfúril álcool sendo que a reação (10) mostra a reação química com A.

O $^1\text{O}_2$ é altamente reativo; seu tempo de meia vida é cerca de 2 μs e seu estado regular de concentração [$^1\text{O}_2$] é cerca de 10^{-12} mol L^{-1} . Merkel e Kearns [71] mostraram que há uma relação linear entre esta concentração e a concentração de

carbono orgânico dissolvido (DOC), confirmando o mecanismo proposto para a formação de $^1\text{O}_2$.

Os autores citados também investigaram a influência do pH na velocidade da reação do $^1\text{O}_2$ com um aceptor A (a reação de oxidação do furfuril álcool). Na faixa de pH específica para águas naturais eles não encontraram nenhuma dependência entre o pH e a velocidade de fotooxidação, mas para soluções básicas ($\text{pH} > 8$) a velocidade da fotooxidação diminuiu. Todos estes dados indicam que o $^1\text{O}_2$ é um importante produto intermediário da decomposição de substâncias orgânicas provenientes de fontes naturais e de ambientes poluídos.

Radicais superóxidos e radicais alquilperóxidos

O primeiro produto da redução de uma molécula de O_2 é um íon superóxido ($\text{O}_2^{\cdot-}$), que é instável em soluções aquosas e rapidamente se decompõe a H_2O_2 e O_2 [72]. Alguns autores sugerem um possível mecanismo para a formação deste íon. Sabe-se que ácidos húmicos contêm quinonas e semi-quinonas, que se tornam excitadas quando absorvem radiação UV. Estas então reagem com moléculas de O_2 a íons $\text{O}_2^{\cdot-}$. Estes íons podem participar na decomposição de alguns poluentes, por exemplo, na decloração fotoquímica do metóxi-cloro.

Substâncias húmicas absorvem fótons na região UV e na região visível do espectro até 500 nm. A energia absorvida faz com que vários processos fotoquímicos possam ocorrer na faixa de 58-98 kJ mol^{-1} . Em particular, várias espécies reativamente capazes de transformar uma grande variedade de combinações orgânicas podem ser produzidas. O interesse pelo comportamento fotoquímico de substâncias húmicas se dá pela sua capacidade de agir como agentes de degradação de poluentes através da fotoindução. Aguer e colaboradores [64] identificaram algumas espécies reativas geradas por excitação fotoquímica de substâncias húmicas como, elétrons solvatados, radicais hidroxila, oxigênio singlete e triplete.

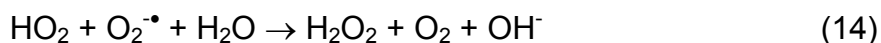
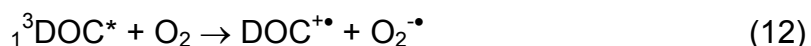
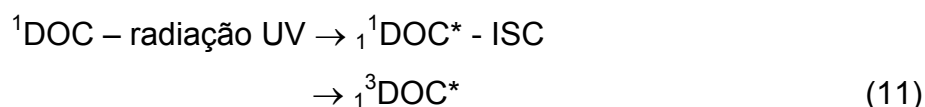
O radical alquilperóxido RO_2^{\cdot} representa um tipo de radical formado em solução aquosa contendo matéria orgânica durante a irradiação ultravioleta. A fotooxidação do isopropilbenzeno (cumeno) e piridina em soluções aquosas, por exemplo, fornece produtos característicos de reações com radicais alquilperóxidos

(RO₂[•]) e hidroxilas (HO[•]). A concentração RO₂[•] e HO[•] formados pode ser estimada em média de 10⁻⁹ e 10⁻¹⁷ mol L⁻¹ respectivamente. Essa concentração de RO₂[•] é suficiente para que o processo de oxidação continue em outras classes de substâncias químicas reativas presentes no meio [59].

Radicais hidroxila e peróxidos

A formação de radicais HO[•] e sua subsequente reação com a matéria orgânica é uma das formas naturais de biodegradação de compostos.

A formação de peróxido de hidrogênio pode acontecer em sistema aquático através da interação da radiação ultravioleta do sol e de carbono orgânico dissolvido (DOC) neste sistema. Quando a radiação UV é absorvida por DOC, forma um superóxido que reage consigo e produz peróxido de hidrogênio [67]. Cooper e colaboradores [73] sugeriram uma forma simplificada e teórica para o possível mecanismo de formação do H₂O₂:



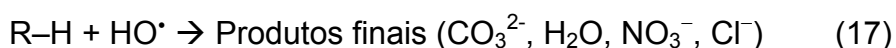
Um estado inicial de DOC (¹DOC) é excitado por radiação UV a um estado singlete (¹DOC*) e através de um intersistema cruzado (ISC) é transformado ao estado triplete (³DOC*) (equação 11). Este estado triplete pode reagir com oxigênio molecular formando superóxido (O₂^{•-}) ou seu ácido conjugado HO₂ (equação 12) que reage com ele mesmo formando H₂O₂ e O₂ (equação 13). Por último, a interação de HO₂ e O₂^{•-} resulta na formação do OH⁻ e ainda H₂O₂ e O₂ (equação 14) [67, 73].

A adição de H₂O₂ em solução pode funcionar como uma fonte de oxigênio molecular e de radicais hidroxila, que são produzidos a partir da decomposição fotoquímica do H₂O₂ [62, 66, 67].

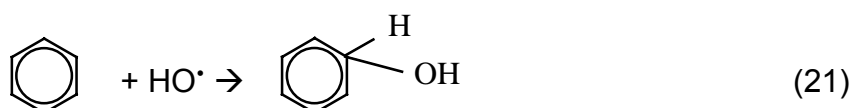
Os processos de mineralização usados em laboratórios têm feito uso de um método direto para geração de radical hidroxila (HO[•]) de alta reatividade através da

fotoclivagem do peróxido de hidrogênio por meio de irradiação UV. O processo $\text{H}_2\text{O}_2/\text{UV}$ forma radicais HO^\bullet durante a irradiação UV pela adição de H_2O e H_2O_2 à solução da amostra, podendo levar à degradação completa e à conversão a CO_2 e H_2O e sais inorgânicos da maioria dos compostos orgânicos ali presentes [63, 66, 74].

A fotólise do H_2O_2 e da H_2O pela radiação UV gera os radicais hidroxila (reação 15 e 16) que agem degradando a matéria orgânica e formando compostos minerais mais simples (reação 17) como possíveis produtos finais de degradação [63, 65, 75]. Quando o H_2O_2 está em excesso pode ocorrer uma reação paralela, que diminui a razão de degradação da matéria orgânica (reação 18) formando o radical menos reativo hidroperoxil (HO_2^\bullet). Isso ocorre porque o H_2O_2 em excesso age capturando radicais hidroxilas [60, 74].



Os radicais HO^\bullet formados possuem um alto potencial de oxidação (+ 2,8 V) e podem, com isso, provocar a oxidação de um grande número de moléculas orgânicas [60, 62, 74]. Esta reação pode ocorrer através de três mecanismos distintos: abstração de hidrogênio (reação 19), transferência de elétrons (reação 20) e adição radicalar (reação 21). Os radicais secundários formados durante estas reações podem novamente reagir com outros compostos [63].



Estudos com o peróxido de hidrogênio na degradação fotocatalítica de contaminantes orgânicos apresentam efeitos positivos e negativos. Muitos estudos informam que o peróxido de hidrogênio poderia aumentar a velocidade de reação ou

causar efeitos de inibição dependendo da concentração das soluções de reação. Os resultados de todos esses estudos sugerem que o efeito do peróxido de hidrogênio é uma função de muitos parâmetros inter-relacionados, incluindo as propriedades de radiação (comprimento de onda, intensidade), pH da solução, propriedades físico-químicas dos contaminantes e a fração molar de oxidante em relação ao contaminante [64, 66, 67, 76].

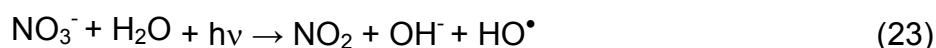
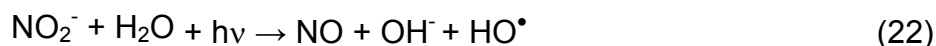
O H_2O_2 é o mais simples dos peróxidos, sendo um importante precursor em síntese química [62]. É também um componente fundamental de diversas tecnologias de oxidação química incluindo Fenton, foto-Fenton [77], radiação UV baseada em oxidação química, processos polioxometálicos e oxidação baseada na transição de metal de mais alta valência. Além disso, é composto apenas de átomos de hidrogênio e oxigênio e sob condições apropriadas pode produzir compostos desejáveis ambientalmente, tais como água e íons hidroxila. A maioria dessas aplicações focalizam a destruição de contaminantes orgânicos em água usando radiação UV (artificial) ou iluminação solar [78-80]. Persulfato, peroximonosulfato, periodato e outros oxidantes também são usados, mas o peróxido de hidrogênio é ainda o mais empregado [81]. Efeitos benéficos da adição de peróxido de hidrogênio foram registrados no tratamento fotocatalítico de matéria orgânica dissolvida (DOM) em efluente de celulose e indústria de papel, diversos pesticidas e outros contaminantes orgânicos [82].

O sinergismo atribuído ao peróxido de hidrogênio atribui-se ao fato de ele ser um aceptor de elétrons melhor do que o oxigênio molecular bem como a geração de radicais hidroxila adicionais pela reação correspondente. Conseqüentemente, adição de peróxido de hidrogênio resultará em efeito duplamente positivo: aumento da concentração de sítios disponíveis de oxidação (aumento da geração de radicais hidroxila) e formação de radicais hidroxilas adicionais devido à redução pelo H_2O_2 da condução da banda do elétron. Por outro lado, uma grande quantidade de peróxido de hidrogênio diminuirá a eficiência do processo devido à inibição das reações que os radicais hidroxila provocam.

A influência da adição de H_2O_2 sobre a eficiência da mineralização UV tem sido estudada para muitos compostos em solução [83-85]. Um método de decomposição freqüentemente usado consiste em acidificar (pH 2) amostras mineralizadas contendo H_2O_2 e a posterior fotooxidação. Inicialmente, este método foi usado para a determinação de carbono orgânico dissolvido onde o CO_2 formado

foi medido por Espectroscopia de Infravermelho (IR). O resultado demonstrou que a decomposição de substâncias orgânicas é quantitativa. Um efeito adicional da acidificação é a dissociação de complexos de compostos organometálicos lábeis.

Nitratos e nitritos ocorrem em águas naturais e podem também ser fonte de radicais HO[•]:



Kotzias e colaboradores investigaram a velocidade de decomposição de vários compostos orgânicos modelo dissolvidos em água e irradiados. Eles compararam as velocidades constantes de reações de fotooxidação em água pura e em água contendo nitratos e nitritos. Na presença destes íons, a decomposição de 4-nitrofenol foi 13 vezes maior na presença de nitritos e 5 vezes maior na presença de nitratos. Assim, a presença de íons nitrito reduz o tempo necessário para uma decomposição de compostos orgânicos contidos na solução examinada, que recomenda o uso de ácido nítrico na mineralização de amostras naturais [86].

Comparativamente a outros métodos de decomposição de amostras, a irradiação UV consiste em um método extremamente eficiente e que reduz a um mínimo a possibilidade de contaminação da amostra, devido ao baixo consumo de reagentes. Dependendo da potência da fonte de radiação UV empregada no processo, o uso de agentes oxidantes convencionais e de meios agressivos contendo misturas ácidas pode ser completamente suprimido [87].

2.4.2 Lâmpadas como fonte de radiação UV

Os comprimentos de onda da radiação UV estendem-se de 40 a 400 nm e podem ser divididas em: UV A (400-315 nm), UV B (315-280 nm) e UV C (< 280 nm) [61].

Como pode ser observado na figura 6, o espectro do mercúrio é rico em linhas na faixa de comprimentos de onda do ultravioleta.

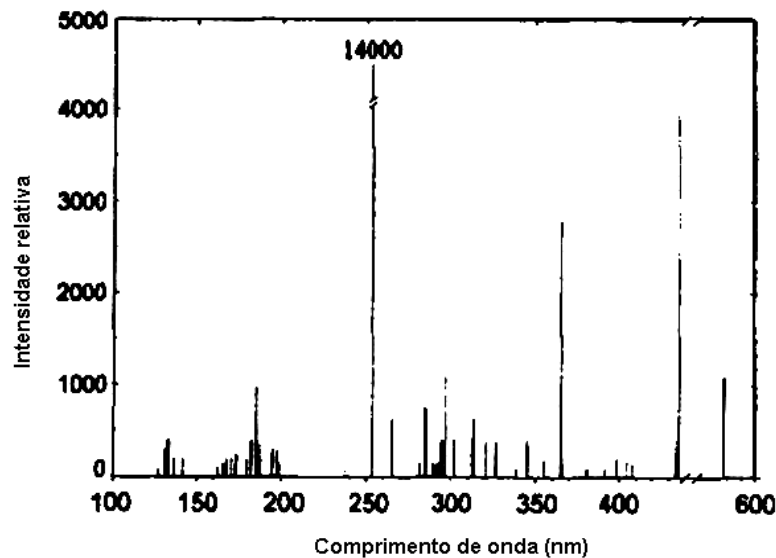
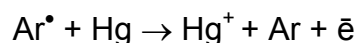
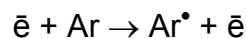


Figura 5: Espectro UV-Vis da lâmpada de mercúrio.

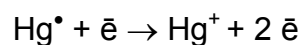
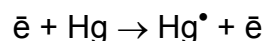
A energia de transição de átomos de Hg do estado menos excitado (6^3P_1) para o estado fundamental (6^1S_0) corresponde ao comprimento de onda de 253,7 nm, que é uma linha de ressonância. O mercúrio é um elemento relativamente inerte, não reage com o material do eletrodo e nem com o material do bulbo [55].

Além de vapores de mercúrio, as lâmpadas de mercúrio contém gás nobre, geralmente argônio (Ar). Embora esse não participe diretamente na geração do fóton ele contribui para o aumento do número de correntes transportadoras de elétrons e íons. Numa colisão elástica entre um elétron e um átomo uma parte da energia do elétron é transmitida para o átomo causando sua excitação e iniciando os processos ocorridos na lâmpada. Este pode ser descrito através das seguintes equações:

- durante a ignição na lâmpada:

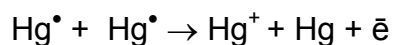
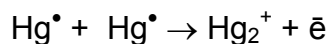


- durante o funcionamento da lâmpada:



Quando os elétrons não transferem energia suficiente para a reação ocorrer num único passo, o processo de ionização acontece num passo discreto.

- nas lâmpadas com maior pressão de vapor:



Um parâmetro característico das lâmpadas de mercúrio e freqüentemente utilizado para dividi-las em dois grupos é a pressão de vapor do Hg. Portanto, lâmpadas de mercúrio são divididas em: lâmpadas de baixa pressão (pressão de Hg 0,1-1 Pa ($10^{-3} - 10^{-2}$ Torr)) e lâmpadas de alta pressão (pressão de Hg > 0,1 MPa (1 atm)). Entretanto, pode-se ainda detalhar mais esta divisão separando em lâmpadas de média pressão (cerca de 0,1 MPa) e lâmpadas de alta pressão (cerca de 10 MPa). A fotólise do H_2O_2 por lâmpada de mercúrio de alta pressão, por exemplo, ocorre devido a reação de fótons de Hg de comprimentos de onda de 302 a 313 nm [87, 88].

Lâmpadas de baixa pressão

Este tipo de lâmpada de Hg é em forma de um longo tubo feito de vidro. As lâmpadas tem 1 m de comprimento de 15-40 mm de diâmetro. No final de cada lâmpada há um eletrodo de tungstênio (W) embutido. O gás armazenado no bulbo da lâmpada contém uma mistura de vapores de Hg (0,1-1 Pa) e um gás nobre (Ar sob pressão de 100 Pa). Uma gota de Hg é introduzida na lâmpada e a maior parte permanece líquida durante a operação da lâmpada. Os vapores de Hg formados permanecem em equilíbrio com o líquido.

O espectro da lâmpada de baixa pressão consiste basicamente de 2 linhas: a linha de ressonância a 253,7 nm da transição $6^3\text{P}_1 \rightarrow 6^1\text{S}_0$ e a linha 184,9 nm correspondendo a transição $6^1\text{P}_1 \rightarrow 6^1\text{S}_0$.

As lâmpadas de baixa pressão tem um tempo de operação longo de 5000-10000 h, embora, o uso freqüente da lâmpada o torne menor. Sua potência máxima é de 60 W. A eficiência de uma lâmpada de baixa pressão em transformar energia elétrica em irradiação por ressonância depende da: temperatura, pressão do gás nobre, geometria da lâmpada, intensidade e freqüência de uso. A eficiência de lâmpadas de baixa pressão fica na faixa UV C de radiação, equivalente a 40%.

Um tipo especial de lâmpada de baixa pressão é a chamada lâmpada de luz negra fluorescente. As paredes dentro da lâmpada são revestidas com substância

fluorescente, por exemplo fósforo (P), que absorve a radiação de 254 nm e emite a radiação em torno de 365 nm. O material de vidro usado para as paredes não transmitem a radiação de comprimentos de onda menores, mas permite a radiação de comprimentos de onda maiores passar através dele. Este tipo de lâmpada é freqüentemente aplicada para oxidação fotocatalítica de substâncias orgânicas em soluções com TiO_2 como catalisador.

Lâmpadas de média e alta pressão

Estas lâmpadas são mais curtas e menores que as lâmpadas de baixa pressão com igual poder. Elas têm 10-150 cm de comprimento e 10-40 mm de diâmetro. Lâmpadas mais curtas também são produzidas e são usadas para aplicações especiais.

O plasma à temperatura de operação da lâmpada contém um certo número de átomos excitados. As transições destes níveis somam-se à energia irradiada. O espectro da lâmpada de média pressão é mais rico que o espectro da lâmpada de baixa pressão. Além das linhas de emissão única, também contém uma emissão contínua, especialmente na faixa UV C. A relação entre a energia consumida pela lâmpada e suas contribuições para cada faixa UV são as seguintes:

UV C (180-280 nm) 16%;

UV B (280-315 nm) 7%;

UV A (315-400 nm) 7%.

A soma destas frações se dá somente em 30% da potência da lâmpada. 15% são convertidos em radiação visível e 35% em radiação térmica (IR e radiação das paredes da lâmpada). O restante (20%) é perdido no processo de condução de calor nos eletrodos. O tempo de operação deste tipo de lâmpada é cerca de 2000 h.

Estudos mais recentes demonstram progressos nas aplicações das lâmpadas de mercúrio de alta pressão principalmente na área industrial. Um estudo realizado por Morimoto e colaboradores [88] mostra alguns tipos de lâmpadas normalmente usadas na demanda industrial como, a lâmpada de super-alta pressão que possui um curto arco de Hg e é utilizada nas indústrias para fornecer energia principalmente no UV-visível. O tamanho pequeno do arco da lâmpada tem a vantagem de ser adaptado em sistemas de microequipamentos ópticos e na fabricação destes

equipamentos. As lâmpadas de super-alta pressão são úteis e usadas em processo de foto-litografia e em semicondutores utilizados em processos industriais.

2.4.3 Aplicação da radiação UV na determinação de metais

Para a determinação voltamétrica dos metais de interesse em amostras complexas, onde as espécies podem estar ligadas a compostos orgânicos (a exemplo dos medicamentos como a EPO), uma etapa de pré-tratamento da amostra envolvendo a liberação do metal para a sua posterior determinação por voltametria de redissolução se faz necessária.

O uso da irradiação ultravioleta para a decomposição de matrizes orgânicas surgiu entre a década de 1960 e 1970. A aplicação da fotooxidação UV como uma etapa preliminar para a determinação de metais (Hg) foi feita em 1975 por Frimmel e Winkler. Estes registros originaram o estudo sobre a digestão UV, especialmente por eletroanalistas, que determinaram a concentração de metais em águas por voltametria [83].

As condições de digestão por radiação UV dependem do elemento a se determinar, o método de determinação a ser utilizado, e o tipo de amostra [51, 55]. A determinação de metais requer amostras homogêneas, para as quais a digestão UV, como uma etapa preliminar na análise de metais, pode satisfazer esta exigência. Para quase todos os metais o processo de mineralização é feito usualmente em meio ácido para evitar a precipitação de sais.

A voltametria e a espectrometria de absorção atômica são amplamente utilizadas como técnicas de determinação de metais. Para ambos os métodos de determinação, a amostra tem de estar homogênea; para a voltametria também deve estar completamente mineralizada, enquanto que para a técnica de AAS a amostra pode estar parcialmente mineralizada [61].

Achtenberg e Van Den Berg [65] utilizaram digestão UV “in line” na análise de matéria orgânica dissolvida (DOM) para posterior determinação de metais traços em amostras naturais. A destruição da DOM é necessária para liberar os metais traços que estão complexados organicamente e para remoção dos surfactantes orgânicos interferentes. A digestão UV de água do mar da costa e oceânica alcançou completa liberação dos metais (Cu^{2+} e Ni^{2+}) a partir dos complexos orgânicos e destruição dos surfactantes interferentes (no caso da determinação do Cu^{2+} , Ni^{2+} e Cr^{3+}). As

condições otimizadas da digestão UV inclui a presença de oxigênio, H_2O_2 (9 mM de Ni^{2+} e Cu^{2+}) e tratamento a elevadas temperatura ($\sim 70^\circ\text{C}$) em amostras com tempo de digestão 150-175 s. As condições otimizadas da digestão UV para conversão de Cr^{3+} a Cr^{6+} antes da determinação voltamétrica de Cr total inclui adição de H_2O_2 3,5 mM, temperatura elevada ($\sim 85^\circ\text{C}$) e tempo de 150 s.

Em resumo, durante a irradiação da amostra com uma fonte de radiação UV (lâmpadas de mercúrio), ocorrem reações fotoquímicas geralmente do tipo radicalar e baseiam-se na formação do radical hidroxila (HO^\bullet), um agente oxidante altamente reativo capaz de romper ligações de caráter covalente e induzir a mineralização completa dos compostos orgânicos presentes na amostra e a subsequente liberação do cátion metálico na solução [49, 59, 65]. Além disso, este procedimento proporciona uma redução significativa no tempo de mineralização e nas quantidades de reagentes empregados [84].

A decomposição com radiação UV realiza uma associação muito vantajosa com as técnicas voltamétricas, no pré-tratamento de amostras de águas. O renovado interesse registrado na última década fez com que a radiação UV fosse levada em conta como uma técnica de abertura de uma gama mais ampla de amostras também para métodos com detecção eletroquímica [57]. São exemplos de aplicação da digestão por irradiação ultravioleta, como método de pré-tratamento, com posterior determinação voltamétrica a análise de metais como Zn^{2+} , Cd^{1+} , Pb^{2+} , Cu^{2+} , Co^{2+} e Ni^{2+} em amostras de águas de origem ambiental, bem como em efluentes de indústria galvânica [85], cobre em amostras de águas naturais e Zn^{2+} , Cd^{1+} , Pb^{2+} e Cu^{2+} em amostras de água e sangue total [89].

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Instrumentação

- Polarógrafo 693 VA Processor (Metrohm) e 694 VA Stand (Metrohm);
- Eletrodo de referência – Ag/AgCl/KCl 3 mol L⁻¹;
- Contra eletrodo – Platina;
- Eletrodo de trabalho – HMDE (eletrodo de mercúrio de gota pendente);
- pHmetro digital (Digimed – DM 20);
- Banho termostaticado (Colora);
- Balança Analítica Sartorius com precisão de 0,1 mg;
- Sistema de purificação de água Milli-Q, resistividade 18,2 MΩ cm⁻¹ (Millipore, Bedford, USA);
- Digestor UV Metrohm (Modelo UV 705) com lâmpada de mercúrio de alta pressão (500 W) com tubos de quartzo;
- Digestor UV (fabricação própria) com lâmpada de mercúrio de alta pressão (400 W) com tubos de quartzo;

3.2 Reagentes e Soluções

Todas as soluções foram preparadas com água destilada, deionizada e purificada em um sistema Milli-Q (resistividade de 18,2 MΩ cm⁻¹) e todos os reagentes utilizados foram de grau analítico.

$\text{Al}(\text{NO}_3)_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$, $\text{Ni}(\text{NO}_3)_2$, H_2O_2 30% (m/v), NaOH , NaNO_3 , NaCH_3COO e dimetilgloxima (Merck, Darmstadt, Alemanha);

HCl 37% (m/v) e H_2SO_4 98% (m/v) (Synth);

Violeta de Solocromo RS (SVRS) e ácido dietilenotriamino-pentaacético (DTPA) (Acros Organics, New Jersey, USA);

Ácido acético (Quimex);

$\text{Cr}(\text{NO}_3)_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$, HNO_3 destilado e NH_3 (Vetec).

A solução padrão estoque de Al 1000 mg L^{-1} em HNO_3 $0,5 \text{ mol L}^{-1}$ foi preparada em balão volumétrico de 50 mL adicionando 13 mL de água ultrapura + 1,6 mL de HNO_3 + 0,6947 g do sal $\text{Al}(\text{NO}_3)_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$ e completando o volume com água. O mesmo procedimento foi utilizado para preparar a solução padrão estoque de Cr (III) 1000 mg L^{-1} realizado a partir da dissolução em água ultrapura e HNO_3 de 0,3848 g do sal $\text{Cr}(\text{NO}_3)_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$ em balão volumétrico de 50 mL. A solução padrão estoque de Ni (II) 1000 mg L^{-1} também foi preparada pelo mesmo processo descrito acima a partir da dissolução em água ultrapura e HNO_3 de 0,1557 g do sal $\text{Ni}(\text{NO}_3)_2$ para um volume de 50 mL.

3.2.1 Determinação de Al

- Solução tampão acetato pH 4,6 (ácido acético 2 mol L^{-1} + NH_3 1 mol L^{-1}) preparada em balão volumétrico de 50 mL pela mistura de 5,55 mL de ácido acético + 3,7 mL de NH_3 em água ultrapura;
- Solução de violeta de solocromo (SVRS) 2 mmol L^{-1} em água ultrapura (0,0366 g de SVRS em balão volumétrico de 50 mL);
- Solução padrão estoque de Al 1000 mg L^{-1} preparada a partir do sal $\text{Al}(\text{NO}_3)_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$;
- Solução padrão Al-SVRS 1 mg L^{-1} preparada diariamente pela mistura de 10 mL de água ultrapura + 10 μL de Al 1000 mg L^{-1} + 100 μL de tampão acetato pH 4,6 + 1 mL de SVRS 2 mmol L^{-1} (aquecido em banho termostatizado a $40 \text{ }^\circ\text{C}$ por 10 min).

3.2.2 Determinação de Cr

- Eletrólito suporte preparado pela mistura de DTPA $0,05 \text{ mol L}^{-1}$ + NaNO_3 $2,5 \text{ mol L}^{-1}$ + acetato de sódio $0,2 \text{ mol L}^{-1}$ em água ultrapura e em balão volumétrico de 100 mL (1,6406 g de NaCH_3COO + 1,9667 g + 21,2 g de NaNO_3);
- Solução padrão estoque de Cr 1000 mg L^{-1} preparada a partir do sal $\text{Cr}(\text{NO}_3)_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$;
- Solução de NaOH 25% (m/v) em água ultrapura e em balão volumétrico de 50 mL (12,5 g de NaOH);
- Solução padrão de Cr 1 mg L^{-1} preparada diariamente pela diluição de 10 μL da solução padrão estoque de Cr 1000 mg L^{-1} em 10 mL de água ultrapura.

3.2.3 Determinação de Ni

- Solução padrão estoque de Ni 1000 mg L^{-1} preparada a partir do sal $\text{Ni}(\text{NO}_3)_2$;
- Solução tampão amônio pH 9,5 preparada pela mistura de ácido clorídrico 1 mol L^{-1} + hidróxido de amônio 2 mol L^{-1} em água ultrapura e em balão volumétrico de 100 mL (22,5 mL de NH_3 + 10,6 mL HCl);
- Solução de dimetilglioxima $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ preparada pela dissolução de 0,29 g de dimetilglioxima em 25 mL de etanol;
- Solução padrão de Ni 1 mg L^{-1} preparada diariamente pela diluição de 10 μL da solução padrão estoque de Ni 1000 mg L^{-1} em 10 mL de água.

3.2.4 Irradiação de amostras com lâmpada de Hg

- H_2SO_4 diluído em água ultrapura na proporção 1:10;
- Peróxido de hidrogênio 30% (m/v) purificado.

3.2.4.1 Purificação do peróxido de hidrogênio

O H_2O_2 P.A. apresenta uma elevada contaminação de alguns metais, principalmente ferro, zinco, cádmio, chumbo e cobre. Assim, fez-se necessário a purificação do mesmo empregando-se uma resina catiônica na forma Na^+ .

Para a purificação do peróxido de hidrogênio, pesou-se 5 g da resina Dowex 50 x 4 (50–100 mesh) (Fluka, Alemanha), a qual foi acondicionada em uma coluna de vidro, com 300 mL de solução de cloreto de sódio (Merck, Alemanha) 1 mol L^{-1} , numa vazão de 2 mL min^{-1} , com a finalidade de substituir os íons H^+ por Na^+ . O pH em torno de 5,5 da solução eluída da coluna indicou o término da troca iônica.

Ao passar o peróxido de hidrogênio pela coluna catiônica, ocorreu a troca dos íons da solução pelos íons Na^+ . O peróxido purificado foi armazenado em frasco âmbar.

3.3 Controle da contaminação

Para garantir uma superfície livre de contaminação por Al, apenas materiais plásticos foram empregados nas análises. Todos os materiais foram deixados por, pelo menos 48h em solução 10% de HNO_3 em etanol (v/v) e lavados abundantemente com água purificada imediatamente antes do uso. Para o Cr e Ni foram empregados materiais de vidro devidamente descontaminados em solução 1% de HNO_3 em água e lavados abundantemente com água purificada imediatamente antes do uso.

3.4 Procedimentos analíticos

3.4.1 Determinações voltamétricas

Todas as determinações voltamétricas foram realizadas em potenciostato 693 Processor (Metrohm) em conjunto com 694 VA Stand (Metrohm). Os três metais estudados no presente trabalho (Al, Cr e Ni) foram determinados pelo método voltamétrico adsortivo de redissolução catódica (AdCSV) empregando o eletrodo de mercúrio de gota pendente (HMDE) como eletrodo de trabalho.

A determinação do Al^{3+} foi baseada na deposição adsorptiva do complexo formado entre o Al e o ligante Violeta de Solocromo RS (SVRS) no HMDE em um potencial de -100 mV e na varredura catódica dos potenciais (40 mV s^{-1}) de -100 a -800 mV, onde ocorre a redução do ligante no complexo formado. Como eletrólito suporte foi usado o tampão acetato pH 4,6 e devido à baixa velocidade de formação do complexo Al-SVRS, as soluções de medida ($500 \mu\text{L}$ de EPO + $9,5$ mL de água ultrapura + $500 \mu\text{L}$ de tampão acetato pH 4,6 + $250 \mu\text{L}$ de SVRS 2 mmol L^{-1}) foram aquecidas a $40 \text{ }^\circ\text{C}$ por 10 minutos em um banho termostatizado antes de cada determinação. As determinações voltamétricas foram realizadas com as soluções em temperatura ambiente. Para a adição do padrão foi utilizado uma solução do complexo Al-SVRS 1 mg L^{-1} .

A determinação de Cr^{3+} , por sua vez, foi baseada na deposição do complexo formado entre o Cr^{3+} e o DTPA no HMDE em um potencial de -1000 mV e na varredura catódica dos potenciais (20 mV s^{-1}) de -1000 a -1450 mV, onde ocorre a redução do cromo no complexo formado. As soluções de medida ($500 \mu\text{L}$ de EPO + $9,5$ mL de água ultrapura + $2,5$ mL do eletrólito suporte) foram ajustadas em pH 6,2 ($\pm 0,1$) pela adição de aproximadamente $70 \mu\text{L}$ de solução NaOH 25% (m/v). Para a adição do padrão foi utilizado uma solução de Cr 1 mg L^{-1} , preparada a partir da solução padrão estoque Cr 1000 mg L^{-1} .

A determinação de Ni^{2+} foi baseada na deposição adsorptiva do complexo formado entre o Ni^{2+} e a dimetilglioxima no HMDE em um potencial de -700 mV e na varredura catódica dos potenciais (20 mV s^{-1}) de -700 a -1300 mV, onde ocorre a redução do Ni^{2+} no complexo formado. As soluções de medida foram preparadas utilizando $500 \mu\text{L}$ de EPO + $9,5$ mL de água ultrapura + $500 \mu\text{L}$ de tampão NH_4Cl (como eletrólito suporte) + $100 \mu\text{L}$ da solução de dimetilglioxima. Para a adição do padrão foi utilizado uma solução de Ni 1 mg L^{-1} , preparada a partir da solução padrão estoque Ni 1000 mg L^{-1} .

3.4.2 Irradiação de amostras com lâmpada de Hg de alta pressão

A eficiência da irradiação UV em meio ácido de H_2SO_4 para decompor a matriz orgânica das amostras de EPO foi investigada usando diferentes condições experimentais. Os seguintes parâmetros experimentais foram avaliados na etapa de

otimização: tempo de irradiação UV e quantidade de peróxido de hidrogênio empregado. Todas as condições investigadas foram para um volume final de 10 mL e a temperatura das amostras foi mantida a 86 ± 3 °C durante o processo de irradiação.

A influência da temperatura sem adição de H₂O₂ às amostras de EPO, bem como a influência de H₂O₂ adicionado às amostras de EPO sem mudança de temperatura (temperatura ambiente) foram investigadas para intervalos tempo de 30 a 180 min.

Para investigar a eficiência da ação do H₂O₂ na decomposição das amostras de EPO no processo de irradiação, investigou-se o perfil do espectro de absorção molecular do mesmo. Os espectros de absorção molecular foram medidos entre 200 e 750 nm em um espectrofotômetro UV-Visível, utilizando uma cubeta de quartzo de 10 mm de caminho óptico. Foram registrados os espectros de absorção molecular do H₂O₂ e da amostra de EPO sem irradiação UV e submetidos a tempos de 0 a 120 min de aquecimento em banho termostaticado a temperatura de 86 ± 3 °C. Coletou-se também espectros de absorção molecular do H₂O₂ submetido a tempos de 0 a 180 min de irradiação e um espectro de absorção molecular da amostra de EPO sem aquecimento, sem irradiação UV e sem a presença de H₂O₂. Utilizou-se água ultrapura como branco.

A decomposição das amostras de EPO com radiação UV foi realizada em digestor UV 705 (Metrohm) com lâmpada de mercúrio (500 W) de alta pressão à temperatura de 86 ± 3 °C e em digestor UV com lâmpada de Hg 400W de alta pressão (construção própria). O sistema de refrigeração do digestor UV 705 (Metrohm) é composto por um ventilador situado na parte inferior do digestor e um sistema de resfriamento a base de circulação de água, que circula através das paredes do bloco de alumínio que envolve o sistema (figura 6).

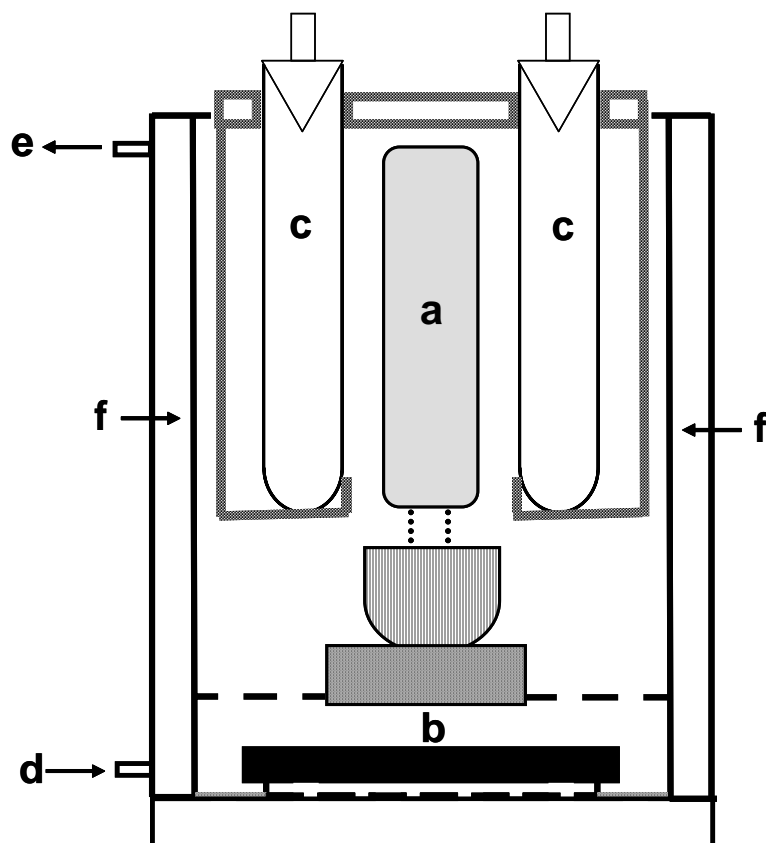


Figura 6: Esquema representativo do digestor (Metrohm) empregado para irradiação com lâmpada de mercúrio; **(a)** Lâmpada de mercúrio de alta pressão; **(b)** Ventilador para refrigeração; **(c)** Tubos de quartzo com capacidade para 10 mL de amostra; **(d)** Entrada de água; **(e)** Saída de água; **(f)** Canal de circulação de água para o resfriamento do sistema.

O sistema de irradiação UV construído e utilizado neste trabalho consiste dos seguintes componentes básicos: uma fonte de radiação UV de alta potência, um sistema de resfriamento por circulação forçada de ar e água, um termo-regulador comercial para controle de temperatura, um suporte para 12 tubos de quartzo e um bloco envoltório a base de alumínio (figuras 8A e 8B). Como fonte de radiação UV foi empregada uma lâmpada de mercúrio de alta pressão com potência nominal de 400 W, utilizada em iluminação pública. O bulbo da lâmpada foi exposto pela remoção do invólucro externo. A lâmpada com o bulbo exposto foi afixada na parte inferior do sistema onde está posicionado o soquete da lâmpada. O sistema de resfriamento foi constituído de um *cooler* posicionado na parte inferior do sistema, o qual é acionado ou desligado automaticamente pelo sensor de temperatura do termo-regulador

quando a temperatura excede ou diminui em 0,1 °C o valor estabelecido no *display* do termo-regulador. O termo-regulador utilizado, da marca Tholz (modelo MDH), possui um sensor metálico de temperatura mergulhado em um dos tubos contendo a amostra. Além da circulação de ar forçada, o sistema de resfriamento possui um canal de 0,8 cm de diâmetro entre a parte externa e interna do cilindro de alumínio por onde circula água (a temperatura ambiente) de forma ininterrupta durante o processo de irradiação. A combinação dos sistemas de acionamento do *cooler* e de circulação constante de água consiste no sistema de resfriamento do sistema de irradiação. O suporte para 12 tubos de quartzo foi construído e moldado em aço inoxidável, com dimensões precisas de modo que os tubos permaneçam dentro do sistema circundando o bulbo da lâmpada UV. Os tubos de quartzo utilizados foram obtidos comercialmente (Metrohm) e possuem dimensões de 12,5 cm de comprimento e 1,5 cm de diâmetro interno, com capacidade máxima para 10 mL de amostra. Em uma caixa metálica, estão colocados a fonte de alimentação geral do sistema com entrada de 110 e 220 V, o reator de 400 W para a lâmpada de mercúrio, uma fonte estabilizada que alimenta o *cooler* através de um transformador de entrada 110-220 V e saída 24 V, a chave liga/desliga da lâmpada UV e a chave geral do sistema.

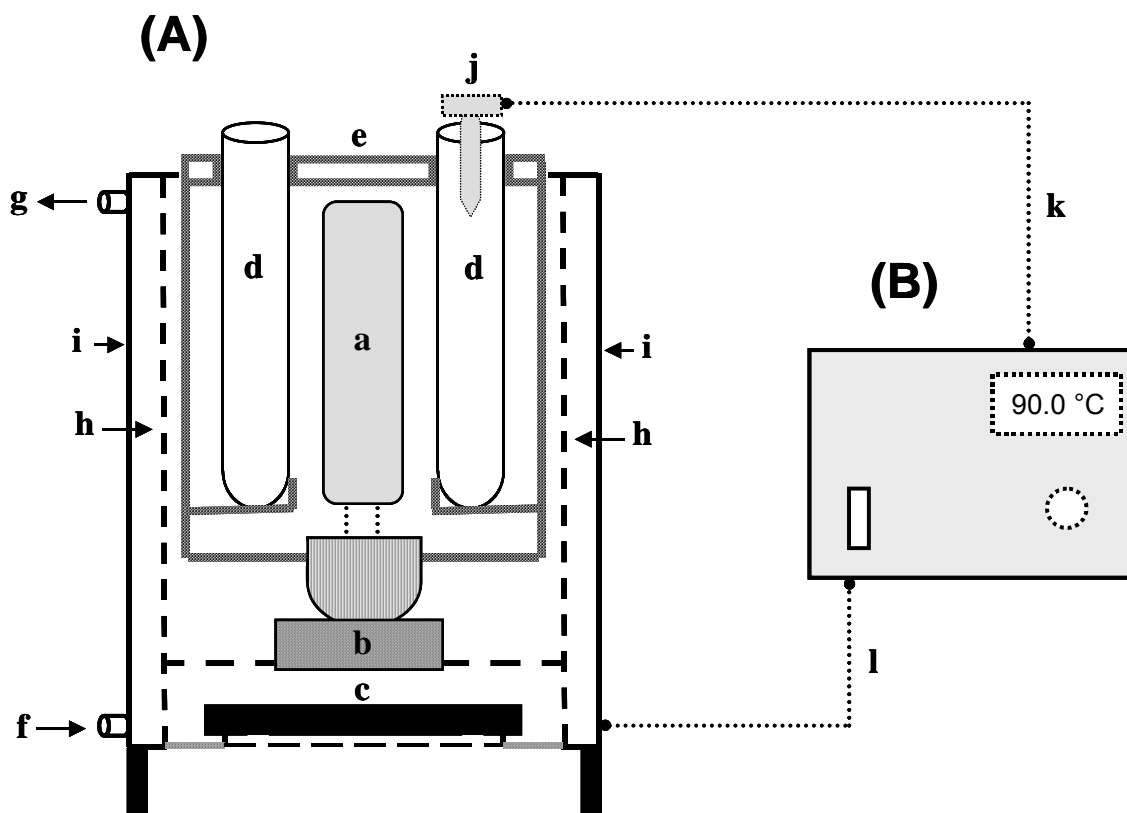


Figura 7: Representação esquemática do digester desenvolvido: **(A)** a) lâmpada UV; b) soquete da lâmpada UV; c) ventoinha; d) tubos de quartzo; e) suporte para os tubos de quartzo; f) entrada de água; g) saída de água; h) circulação de água para o resfriamento do sistema; i) bloco envoltório a base de alumínio; j) sensor de temperatura; **(B)** k) cabo do sensor de temperatura; l) cabo de conexão do digester com a fonte de alimentação.

A irradiação UV foi investigada para a decomposição da matriz orgânica das amostras de EPO e para determinação da concentração total de Al, Cr e Ni nestas amostras. A concentração total de Al foi determinada pelo método de adição de padrão ($n = 3$) nas formulações de Eritromax[®] nas diferentes concentrações de 2.000, 4.000 e 10.000 UI de EPO e Alfaeoptina[®] na concentração de 4000 UI de EPO. A concentração total de Cr e Ni foi determinada pelo método de adição do padrão ($n = 3$) nas formulações de Eritromax[®], Hemax-Eritron[®] e Alfaeoptina[®] todas na concentração de 4.000 UI de EPO.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Determinação de Al, Cr e Ni em solução aquosa

Os métodos para a determinação de Al, Cr e Ni foram primeiramente testados em solução aquosa utilizando tempo de deposição de 0 s para concentrações de Al de 10 a 100 $\mu\text{g L}^{-1}$ ($r = 0,999$) e de 1 a 10 $\mu\text{g L}^{-1}$ ($r = 0,998$) para o Cr. Para o Ni, o método foi testado utilizando concentrações de 1 a 10 $\mu\text{g L}^{-1}$ ($r = 0,998$) e tempo de deposição de 90 s. Curvas analíticas foram obtidas apresentando bons coeficientes de correlação linear. As figuras 8, 9 e 10 mostram os voltamogramas obtidos para o Al, Cr e Ni com adições crescentes dos respectivos padrões à célula voltamétrica contendo água ultrapura e o respectivo eletrólito suporte.

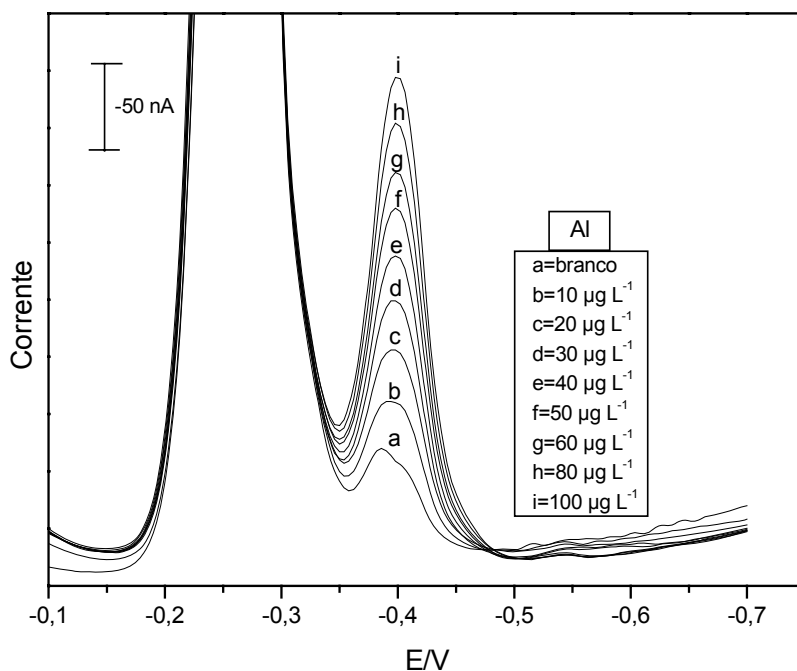


Figura 8: Sinais voltamétricos de Al³⁺ por AdCSV: adições de Al³⁺ 10-100 $\mu\text{g L}^{-1}$, $T_d = 0$ s, $E_d = -100$ mV, $V = 40$ mV s⁻¹. Solução de medida: 10 mL de água ultrapura + 500 μL tampão acetato + 250 μL de SVRS 2 mmol L⁻¹, ($\text{pH}_{\text{final}} = 4,6$).

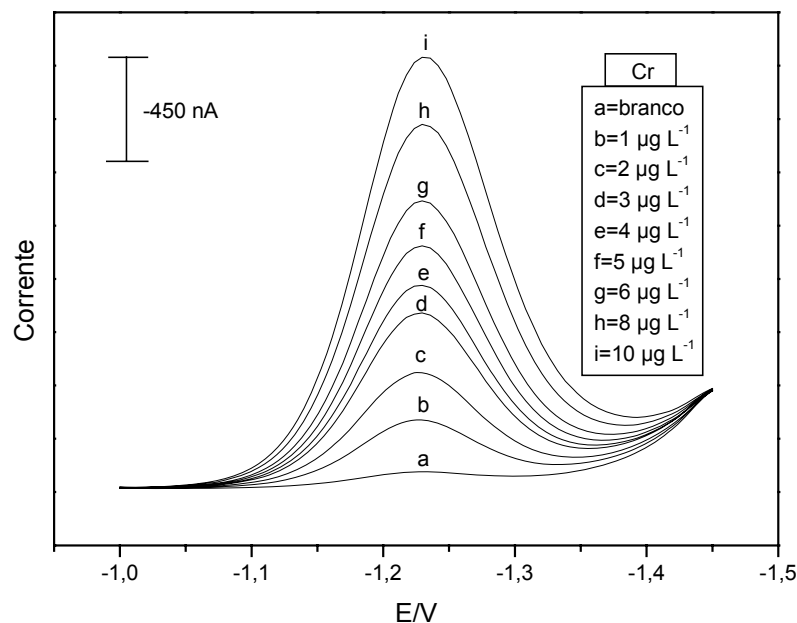


Figura 9: Sinais voltamétricos de Cr^{3+} por AdCSV: adições de Cr^{3+} 1-10 $\mu\text{g L}^{-1}$, $T_d = 0$ s, $E_d = -1000$ mV, $V = 20$ mV s⁻¹. Solução de medida: 10 mL de água ultrapura + 2,5 mL eletrólito suporte (DTPA), ($\text{pH}_{\text{final}} = 6,2$).

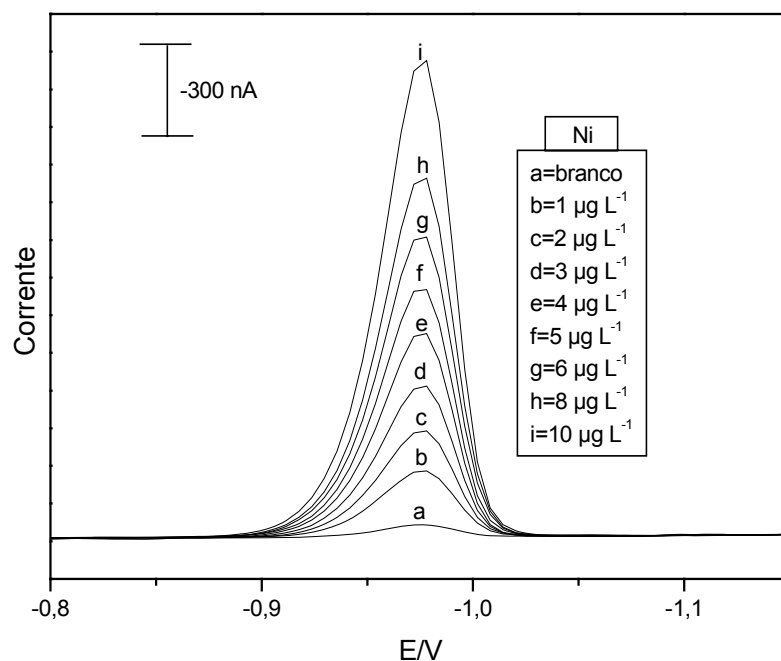
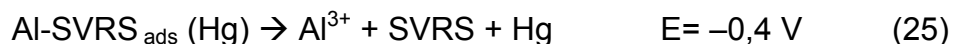
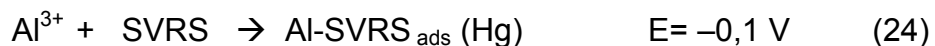


Figura 10: Sinais voltamétricos de Ni^{2+} por AdCSV: adições de Ni^{2+} 1-10 $\mu\text{g L}^{-1}$, $T_d = 90$ s, $E_d = -700$ mV, $V = 20$ mV s⁻¹. Solução de medida: 10 mL de água ultrapura + 500 μL de tampão NH_4Cl + 100 μL da solução de dimetilglioxima 0,1 mol L⁻¹, ($\text{pH}_{\text{final}} = 9,5$).

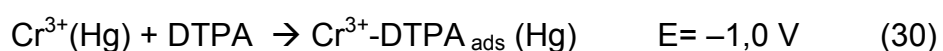
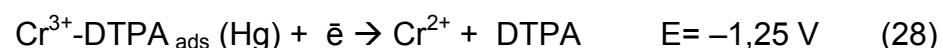
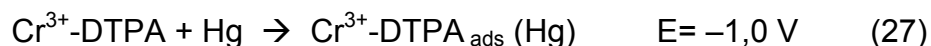
O princípio das determinações de Al, Cr e Ni, por AdCSV pode ser descrito esquematicamente pelos seguintes mecanismos:



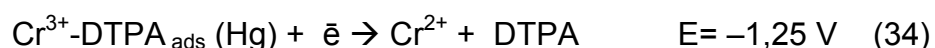
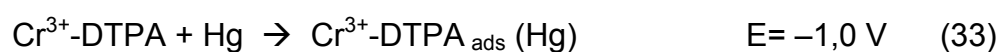
Como mostra a reação (25), a redução do ligante SVRS ocorre durante a varredura catódica dos potenciais em $-0,4 \text{ V}$, uma vez que o potencial de redução do Al^{3+} no HMDE é bastante negativo ($> -1,7 \text{ V}$) [30-33]. Por outro lado, a redução do ligante SVRS livre (não-complexado) no HMDE também ocorre em tampão acetato (pH 4,6) num potencial de $-0,25 \text{ V}$:



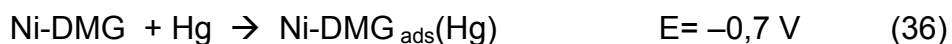
Com relação ao cromo, existem dois estados de oxidação eletroquimicamente ativos (Cr^{3+} e Cr^{6+}) [34-37], sendo que dois mecanismos de reação ocorrem simultaneamente no HMDE:



Na presença de íons NO_3^- como catalisador (agente oxidante), os seguintes processos eletroquímicos ocorrem na célula voltamétrica, tendo como consequência o aumento da sensibilidade do sinal voltamétrico em $-1,25 \text{ V}$ pela ação catalítica:



A determinação de níquel é baseada na sua complexação com o ligante dimetilglioxima (DMG) e a adsorção no HMDE do complexo formado em solução, seguido da redução do níquel no complexo no potencial de $-0,95$ V durante a varredura catódica dos potenciais [40, 41]:



4.2 Determinação de Al, Cr e Ni em amostras de EPO

A determinação de Al, Cr e Ni nas amostras de EPO sem pré-tratamento foi primeiramente investigada com o objetivo de determinar a fração livre (lábil) de cada metal nas formulações. Para avaliar a contribuição dos reagentes na contaminação das amostras, a água purificada (branco) foi submetida aos mesmos procedimentos que as amostras. As figuras 11 e 12 mostram que a determinação de Al e Cr não foi possível sem o pré-tratamento das amostras, devido à forte interferência da matriz orgânica presente no medicamento EPO. A evidência experimental deste fato foi a formação de uma grande quantidade de espuma, durante o borbulhamento de N_2 antes da medida voltamétrica das amostras, impedindo a execução da análise. Segundo Golimowski e Golimowska [61], a formação de espuma é um indício da presença de compostos orgânicos.

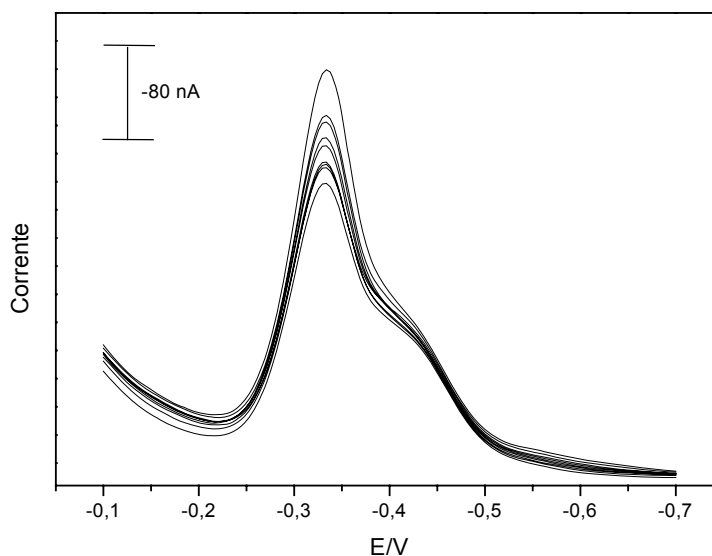


Figura 11: Determinação voltamétrica de alumínio na amostra de EPO sem a etapa de irradiação UV: adições de Al^{3+} (10 a $80 \mu\text{g L}^{-1}$), $T_d = 0 \text{ s}$, $E_d = -100 \text{ mV}$, $V = 40 \text{ mV s}^{-1}$. Solução de medida: $500 \mu\text{L}$ EPO + $9,5 \text{ mL}$ de água ultrapura + $500 \mu\text{L}$ tampão acetato + $250 \mu\text{L}$ de SVRS 2 mmol L^{-1} , ($\text{pH}_{\text{final}} = 4,6$).

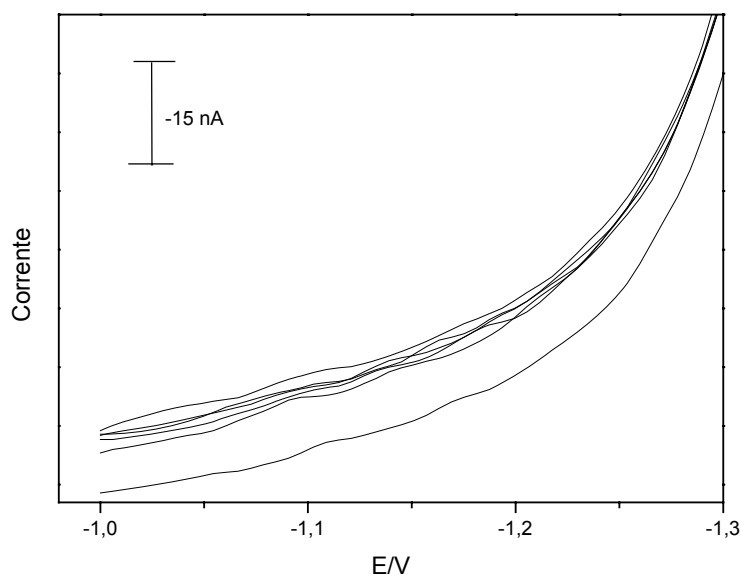


Figura 12: Determinação voltamétrica de cromo na amostra de EPO sem a etapa de irradiação UV: adições de Cr^{3+} (1 a $5 \mu\text{g L}^{-1}$), $T_d = 0 \text{ s}$, $E_d = -1000 \text{ mV}$, $V = 20 \text{ mV s}^{-1}$. Solução de medida: $500 \mu\text{L}$ EPO + $9,5 \text{ mL}$ de água ultrapura + $2,5 \text{ mL}$ eletrólito suporte (DTPA), ($\text{pH}_{\text{final}} = 6,2$).

Com relação ao Ni, houve a possibilidade de visualização dos sinais de corrente das três adições realizadas, como pode ser observado na figura 13, mas a determinação de Ni sem a etapa de radiação UV não foi possível devido à baixa corrente se comparado ao sinal de Ni em água purificada (branco). Esta corrente menor deve-se provavelmente à interferência dos compostos orgânicos que podem atuar como agentes complexantes de metais.

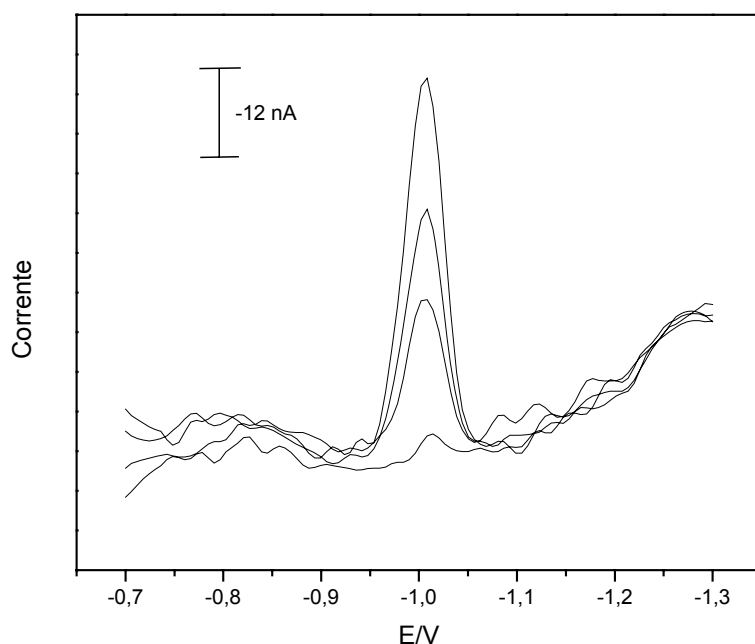


Figura 13: Determinação voltamétrica de níquel sem a etapa de irradiação UV: adições de Ni^{2+} (1 a $3 \mu\text{g L}^{-1}$), $T_d = 90 \text{ s}$, $E_d = -700 \text{ mV}$, $V = 20 \text{ mV s}^{-1}$. Solução de medida: $500 \mu\text{L}$ EPO + $9,5 \text{ mL}$ de água ultrapura + $500 \mu\text{L}$ de tampão NH_4Cl + $100 \mu\text{L}$ da solução de dimetilglioxima $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, ($\text{pH}_{\text{final}} = 9,5$).

4.3 Irradiação de amostras de EPO com lâmpada de Hg de alta pressão

A foto-decomposição UV de amostras ocorre através da reação de radicais livres. Não é a irradiação UV diretamente, mas os radicais HO^\bullet formados durante a irradiação que atacam as moléculas orgânicas. Quanto maior o número de radicais HO^\bullet formados por unidade de tempo, mais rápido o processo de decomposição. Os radicais HO^\bullet são gerados do peróxido de hidrogênio ou da água pela ação de radiação eletromagnética [85, 90]. De modo a aumentar a concentração de radicais

HO[•], podem ser usada adições repetitivas de H₂O₂ durante o processo de irradiação. Além disso, a degradação indireta de substâncias orgânicas por um mecanismo radicalar é muito acelerada se realizada a 90 °C. Apenas nestas temperaturas forma-se uma concentração suficientemente alta de radicais HO[•] no meio [91, 92].

Assim, a fim de aumentar ou acelerar a decomposição das amostras, utilizou-se H₂O₂ em conjunto com H₂SO₄ para todas as amostras no início do processo de irradiação. É sabido que oxidações com peróxido de hidrogênio em misturas ácidas contendo ácido sulfúrico são baseadas também na produção *in situ* de ácido permonossulfúrico [93].

Baseando-se no que foi observado nos voltamogramas do item 4.2, a completa decomposição da amostra se faz necessária para a determinação voltamétrica de Al, Cr e Ni como contaminante nas formulações de EPO. As figuras 14, 15 e 16 mostram o comportamento voltamétrico em amostras irradiadas por 2 ou 3 horas.

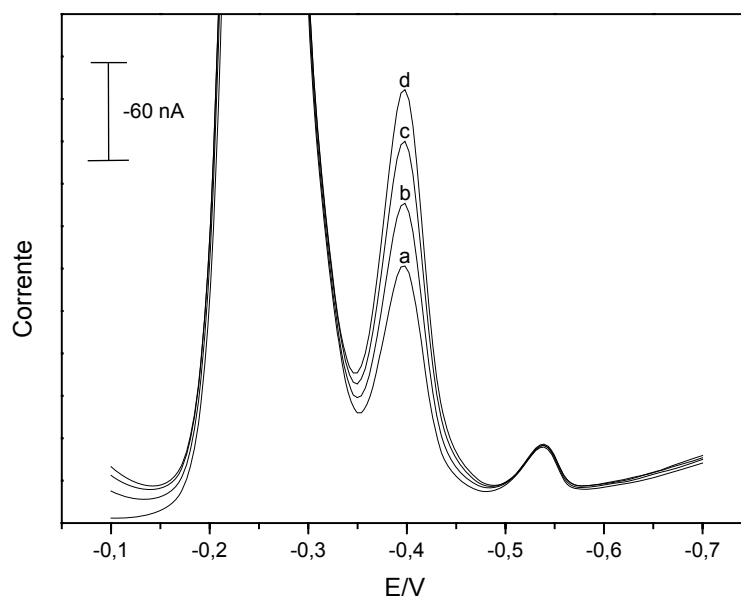


Figura 14: Determinação voltamétrica de alumínio na amostra de EPO após etapa de irradiação UV (2h a 86 ± 3 °C): (a) amostra, (b) amostra + $10 \mu\text{g L}^{-1}$ de Al^{3+} , (c) amostra + $20 \mu\text{g L}^{-1}$ de Al^{3+} , (d) amostra + $30 \mu\text{g L}^{-1}$ de Al^{3+} ; $T_d = 0$ s, $E_d = -100$ mV, $V = 40$ mV s⁻¹. Solução de medida: 500 μL EPO + 9,5 mL de água ultrapura + 500 μL tampão acetato + 250 μL de SVRS 2 mmol L^{-1} , ($\text{pH}_{\text{final}} = 4,6$).

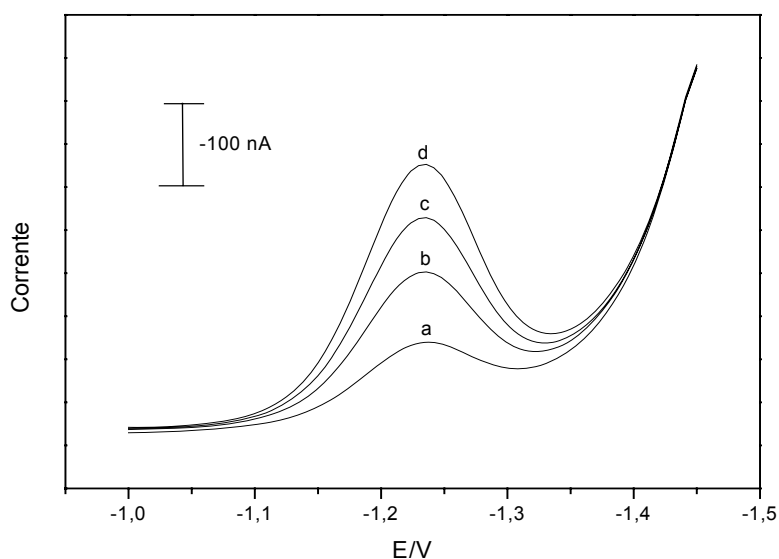


Figura 15: Determinação voltamétrica de cromo na amostra de EPO após etapa de irradiação UV (3h a $86 \pm 3 \text{ }^\circ\text{C}$): (a) amostra, (b) amostra + $1 \mu\text{g L}^{-1}$ de Cr^{3+} , (c) amostra + $2 \mu\text{g L}^{-1}$ de Cr^{3+} , (d) amostra + $3 \mu\text{g L}^{-1}$ de Cr^{3+} ; $T_d = 0 \text{ s}$, $E_d = -1000 \text{ mV}$, $V = 20 \text{ mV s}^{-1}$. Solução de medida: $500 \mu\text{L}$ EPO + $9,5 \text{ mL}$ de água ultrapura + $2,5 \text{ mL}$ eletrólito suporte (DTPA), ($\text{pH}_{\text{final}} = 6,2$).

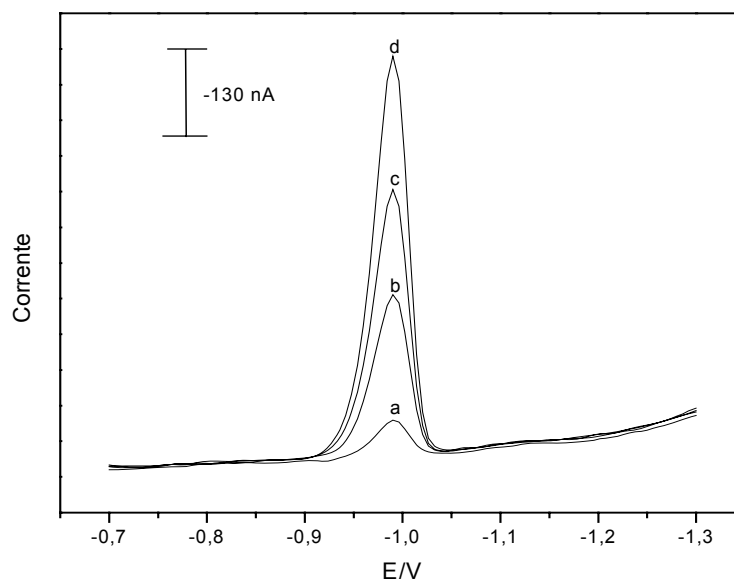


Figura 16: Determinação voltamétrica de níquel na amostra de EPO após a etapa de irradiação UV (3h a $86 \pm 3 \text{ }^\circ\text{C}$): (a) amostra, (b) amostra + $1 \mu\text{g L}^{-1}$ de Ni^{2+} , (c) amostra + $2 \mu\text{g L}^{-1}$ de Ni^{2+} , (d) amostra + $3 \mu\text{g L}^{-1}$ de Ni^{2+} , $T_d = 90 \text{ s}$, $E_d = -700 \text{ mV}$, $V = 20 \text{ mV s}^{-1}$. Solução de medida: $500 \mu\text{L}$ EPO + $9,5 \text{ mL}$ de água ultrapura + $500 \mu\text{L}$ de tampão NH_4Cl + $100 \mu\text{L}$ da solução de dimetilglioxima $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, ($\text{pH}_{\text{final}} = 9,5$).

4.4 Estudo da decomposição de amostras de EPO com radiação UV

O uso da radiação UV foi investigado como uma alternativa no pré-tratamento de amostras de EPO. Portanto, uma segunda etapa do trabalho envolveu a otimização da foto-decomposição das amostras empregando radiação UV que, além de ser eficiente, minimiza os riscos de contaminação das amostras pela utilização de pequenas quantidades de reagentes. Alguns parâmetros experimentais foram avaliados na eficiência do método como, o tempo de irradiação e a quantidade de H_2O_2 adicionado à amostra de EPO. É importante salientar que todas as condições investigadas foram para um volume final de 10 mL com a presença de 200 μL de H_2SO_4 1:10 (v/v) e a temperatura das amostras foi mantida a 86 ± 3 °C durante o processo de irradiação.

4.4.1 Efeito do tempo, temperatura, H_2O_2 , radiação UV e radical HO^\bullet

A influência do tempo é um parâmetro importante na digestão por radiação UV, pois dependendo da matriz da amostra, esta requer tempos maiores de irradiação para sua completa degradação [61, 85].

A irradiação com lâmpada de Hg por 30 min, 1, 2, 4 e 6 horas na ausência de peróxido não foi o suficiente para decompor totalmente as amostras de EPO. Os resultados evidenciaram a digestão incompleta das amostras ou a provável presença de subprodutos que interferem nas medidas. Com isso, constatou-se inicialmente que pouco resolve simplesmente aumentar o tempo de irradiação sem a adição de peróxido para a formação do radical HO^\bullet .

A influência direta da temperatura e do H_2O_2 no processo de decomposição da amostra foram investigadas por ensaios voltamétricos de recuperação de Al por AdCSV. Para isso, amostras de EPO foram submetidas a aquecimento em banho termostaticado a 86 ± 3 °C em diferentes intervalos de tempo (30 a 180 min) sem a presença de H_2O_2 . Já para avaliar apenas a influência do H_2O_2 , amostras de EPO foram submetidas a reação com H_2O_2 à temperatura ambiente para diferentes intervalos de tempo (30 a 180 min). Os voltamogramas das figuras 17A e 17B demonstram que a amostra não foi decomposta sob ação única da temperatura ou

do H_2O_2 , fato que também se confirmou pela formação de uma grande quantidade de espuma durante o borbulhamento de N_2 antes da medida voltamétrica.

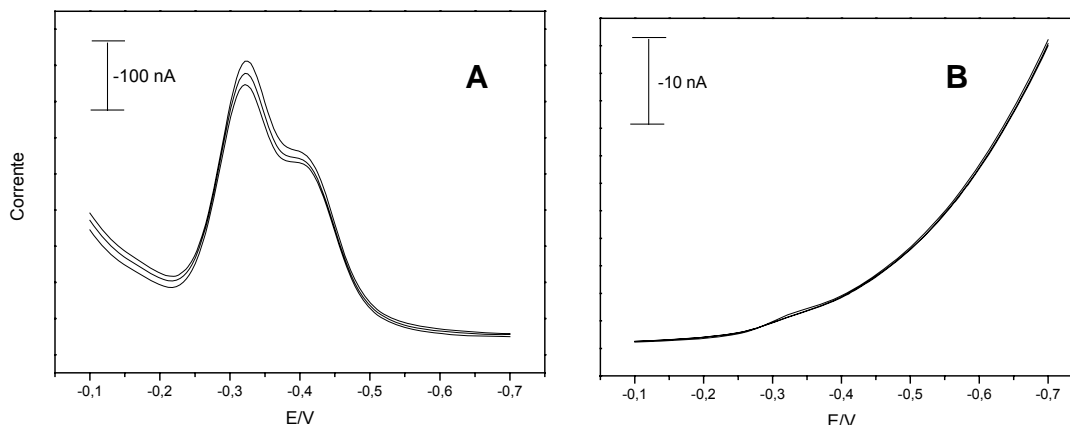


Figura 17: Determinação voltamétrica de Al^{3+} por AdCSV na amostra de EPO sem a etapa de irradiação UV: duas adições de $10 \mu\text{g L}^{-1}$ cada de Al, $T_d = 0 \text{ s}$, $E_d = -100 \text{ mV}$, $V = 40 \text{ mV s}^{-1}$. **A)** Ensaio com $500 \mu\text{L}$ EPO + $9,5 \text{ mL}$ de água ultrapura + $200 \mu\text{L}$ de H_2SO_4 1:10 (v/v) sob aquecimento em banho termostatizado por 180 min a temperatura de $86 \pm 3 \text{ }^\circ\text{C}$; **B)** Ensaio com $500 \mu\text{L}$ EPO + $9,5 \text{ mL}$ de água ultrapura + $100 \mu\text{L}$ de H_2O_2 + $200 \mu\text{L}$ de H_2SO_4 1:10 (v/v) à temperatura ambiente e tempo de espera de 180 min. Solução de medida para ambos ensaios: $500 \mu\text{L}$ EPO + $9,5 \text{ mL}$ de água ultrapura + $500 \mu\text{L}$ tampão acetato + $250 \mu\text{L}$ de SVRS 2 mmol L^{-1} , ($\text{pH}_{\text{final}} = 4,6$).

Para a confirmação da influência do peróxido de hidrogênio na decomposição das amostras submetidas a diferentes tempos de irradiação UV nos digestores usados, preparou-se uma solução contendo 10 mL de água ultrapura com $100 \mu\text{L}$ de H_2O_2 + $200 \mu\text{L}$ de H_2SO_4 1:10 (v/v) e investigou-se o perfil do espectro de absorção molecular do H_2O_2 submetido a tempos de aquecimento de 0 a 120 min em banho termostatizado a temperatura de $86 \pm 3 \text{ }^\circ\text{C}$, simulando a temperatura do digestor. O mesmo procedimento foi aplicado a uma solução de $500 \mu\text{L}$ EPO + $9,5 \text{ mL}$ de água ultrapura + $100 \mu\text{L}$ de H_2O_2 + $200 \mu\text{L}$ de H_2SO_4 1:10 (v/v).

As figuras 18A e 18B apresentam o perfil dos espectros de absorção molecular do H_2O_2 antes e depois do aquecimento por diversos intervalos de tempo. O perfil dos espectros de absorção molecular da amostra de EPO antes e depois do

aquecimento por diversos intervalos de tempo também podem ser observados como mostram as figuras 19A e 19B. Em todos os espectros não se observou grande variação no sinal de absorvância do H_2O_2 demonstrando, desta forma, que o H_2O_2 não influencia significativamente no processo de decomposição da amostra somente com temperatura elevada e sem irradiação com lâmpada de mercúrio de alta pressão.

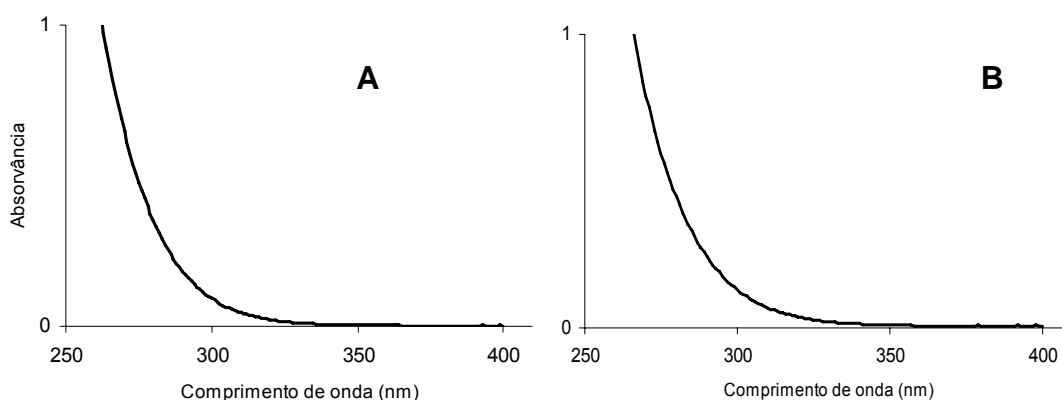


Figura 18: Monitoramento espectrofotométrico do H_2O_2 sem radiação UV somente com aquecimento: **A)** antes do aquecimento; **B)** após 120 min de aquecimento em banho termostatizado a $86 \pm 3 \text{ }^\circ\text{C}$.

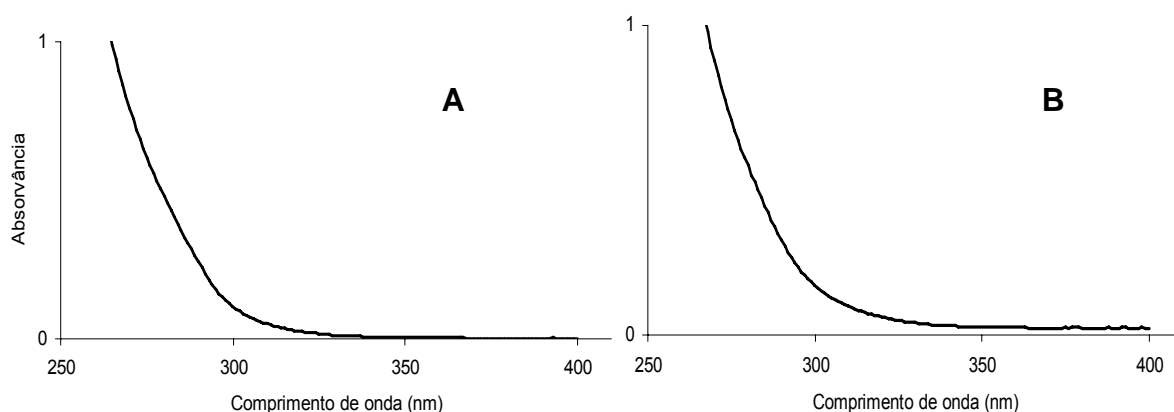


Figura 19: Monitoramento espectrofotométrico da EPO sem radiação UV, com a presença de H_2O_2 e com aquecimento: **A)** antes do aquecimento; **B)** após 120 min de aquecimento em banho termostatizado a $86 \pm 3 \text{ }^\circ\text{C}$.

Para acompanhar o comportamento do peróxido de hidrogênio mediante a irradiação com lâmpada de Hg, espectros de absorção molecular do H_2O_2 foram obtidos através de soluções contendo 10 mL de água ultrapura com 100 μL de H_2O_2 + 200 μL de H_2SO_4 1:10 (v/v) submetidas a tempos que variaram entre 0 a 180 min de radiação UV.

Analisando-se os espectros nas figuras 20A e 20B foi observado que o H_2O_2 sofre decomposição nos primeiros 30 min de irradiação com lâmpada de Hg (ocorre uma modificação na sua estrutura). Esses ensaios indicam a degradação de H_2O_2 sob ação da radiação eletromagnética pela formação do radical HO^\bullet , o qual atua como oxidante no meio. A combinação de peróxido de hidrogênio com radiação UV é necessária para produzir radicais HO^\bullet e iniciar a reação de oxidação, reduzindo assim, a presença de compostos orgânicos presentes na amostra. O poder oxidante do H_2O_2 não foi suficiente para promover a decomposição dos compostos orgânicos, necessitando assim, da presença de radiação UV para que a decomposição ocorra.

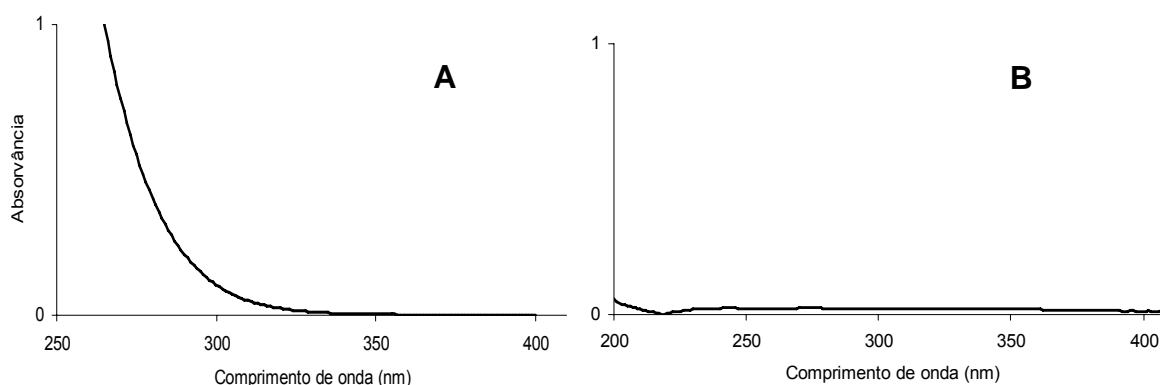


Figura 20: Monitoramento espectrofotométrico do H_2O_2 com radiação UV: **A)** antes da irradiação; **B)** após 30 min de irradiação a 86 ± 3 °C.

A ação direta da radiação eletromagnética sobre a amostra é também pouco provável, neste caso, como mostram os espectros da solução de EPO e da lâmpada de Hg comparativamente (figuras 21 e 5). Nas figuras observa-se também que tanto o espectro de absorção molecular do H_2O_2 como o espectro do medicamento EPO absorvem em regiões com bandas menores do espectro da lâmpada de Hg.

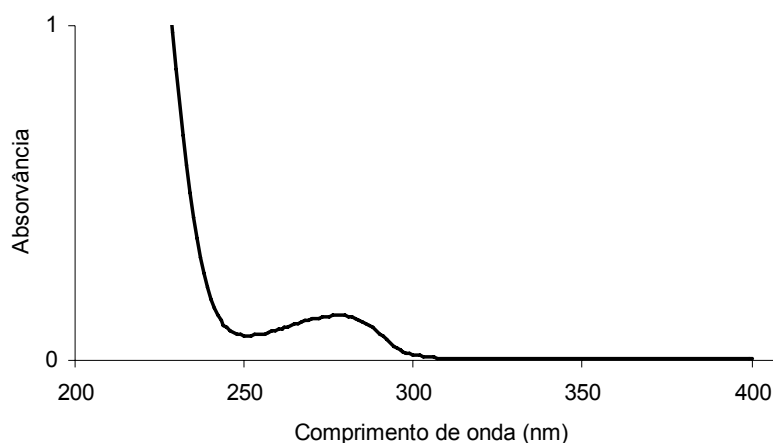


Figura 21: Monitoramento espectrofotométrico da EPO sem radiação UV, sem aquecimento e sem a presença de H_2O_2 . Solução de medida: 500 μL EPO + 9,5 mL de água ultrapura + 200 μL de H_2SO_4 1:10 (v/v).

Outro fator que pôde ser observado é que a decomposição da matéria orgânica presente nas amostras de EPO aumenta consideravelmente com o aumento da concentração de H_2O_2 . Entretanto, deve-se tomar o cuidado para que o excesso de H_2O_2 não provoque uma significativa diminuição no desempenho do processo $\text{H}_2\text{O}_2/\text{UV}$, devido à competição do H_2O_2 que age “capturando” radicais reativos hidroxila HO^\bullet para formar um radical menos reativo HO_2^\bullet [74].

Portanto, a investigação sobre os efeitos dos fatores descritos (tempo, temperatura, H_2O_2 , radiação UV e radical HO^\bullet) na decomposição da amostra, possibilitou a confirmação da ação direta do radical HO^\bullet e a determinação das condições ótimas para a decomposição das amostras de EPO.

4.4.2 Eficiência da decomposição da amostra sob condições otimizadas

A partir dos resultados obtidos e através de ensaios de recuperação, o tempo mínimo de irradiação UV necessário para amostras da marca Eritromax[®] (solução injetável) foi de 2 horas (500 μL de EPO com 9,5 mL de água ultrapura) com adição de 200 μL de solução de H_2SO_4 1:10 (v/v) e 50 μL de H_2O_2 30 % (m/v) no início do processo. Comportamentos diferenciados em relação à forma farmacêutica da EPO utilizada e a decomposição da matéria orgânica foram observados, levando a

necessidade de se aumentar o tempo de irradiação com lâmpada de Hg e a quantidade de peróxido adicionado. Portanto, em amostras de EPO de nomes comerciais Hemax-Eritron[®] pó liófilo e Alfaepoetina[®] solução injetável, foram necessárias 3 horas de irradiação UV (500 µL de EPO com 9,5 mL de água ultrapura) com adição de 200 µL de solução de H₂SO₄ 1:10 (v/v) e 50 µL de H₂O₂ 30 % (m/v) no início do processo, seguido por uma adição consecutiva da mesma quantidade de H₂O₂ após 1,5 h de irradiação.

Para o Al, ensaios de recuperação foram realizados com diferentes concentrações de Al (5, 10, 20 e 30 µg L⁻¹) adicionado a amostras de EPO. As determinações de Al foram realizadas em amostras de EPO fortificadas e armazenadas por 24 h a 4°C (temperatura de armazenamento do medicamento) e em amostras fortificadas não-armazenadas por 24 h. As amostras submetidas à irradiação UV por 2 h resultaram em valores de recuperação de Al entre 86 e 100% (média 91 ± 10%) para amostras fortificadas e não-armazenadas e recuperações em torno de 70% (média 70 ± 10%) após o armazenamento por 24 h a 4°C, indicando ser possível a determinação de Al nestas amostras após a etapa de decomposição como mostra a figura 22. Os valores de recuperação para as amostras armazenadas (~70%) inferiores aos obtidos para as amostras não-armazenadas indicam uma provável interação do Al com a EPO na temperatura de armazenamento (4°C) das formulações. Além disso, tempos de irradiação maiores (3 a 6 horas) não provocaram um aumento nos valores de recuperação para as amostras armazenadas, o que reforça a existência de algum tipo de interação do Al com a matriz orgânica.

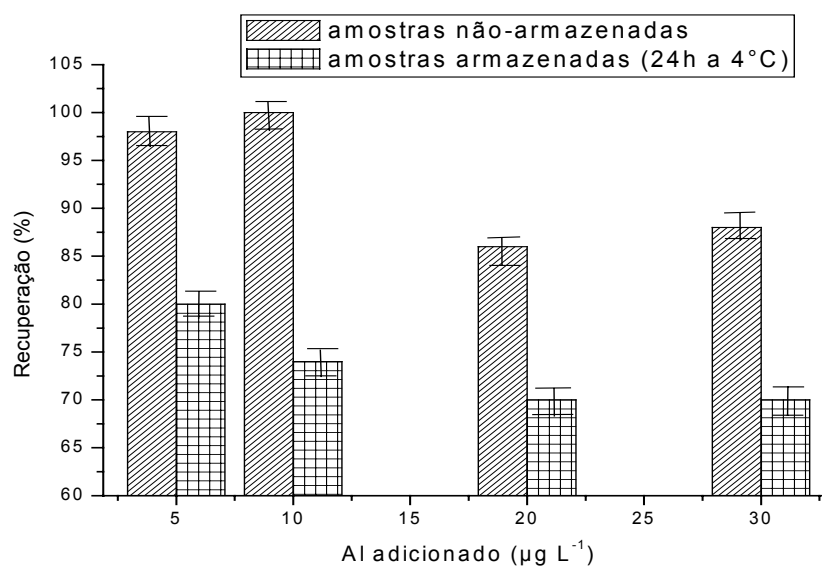


Figura 22: Média dos valores de recuperação ($n = 5$) para Al adicionado em amostras de EPO armazenadas e não-armazenadas submetidas à irradiação UV por 2 h a 86 ± 3 °C (Eritromax[®] solução injetável). Condições experimentais: 50 μL de H_2O_2 30% (m/v) + 200 μL de H_2SO_4 1:10 (v/v) no início da irradiação. Amostra: 500 μL de EPO + 9,5 mL de água ultrapura + 500 μL tampão acetato + 250 μL de SVRS 2 mmol L^{-1} , ($\text{pH}_{\text{final}} = 4,6$).

Da mesma forma que para o Al, foram também realizados ensaios de recuperação para o Cr adicionando a amostras de EPO em diferentes concentrações (1, 2 e 4 $\mu\text{g L}^{-1}$). As determinações de Cr foram realizadas em amostras de EPO fortificadas e armazenadas por 24 h e em amostras fortificadas não-armazenadas (mesmo procedimento descrito para o Al). Os valores de recuperação de Cr após a etapa de irradiação UV podem ser visualizados na figura 23, que mostra valores de recuperação entre 98 e 109% para amostras não-armazenadas e valores entre 87 a 110% após armazenamento por 24 h a 4°C.

Os valores obtidos indicam a possibilidade da determinação de Cr nestas amostras após a etapa de irradiação UV. Recuperações médias de 103% para as amostras não-armazenadas e de 97% para amostras armazenadas e irradiadas por 3 horas, com uma adição extra de peróxido após 1,5 h de irradiação, demonstram que provavelmente não há forte interação do Cr com a EPO na temperatura de armazenamento.

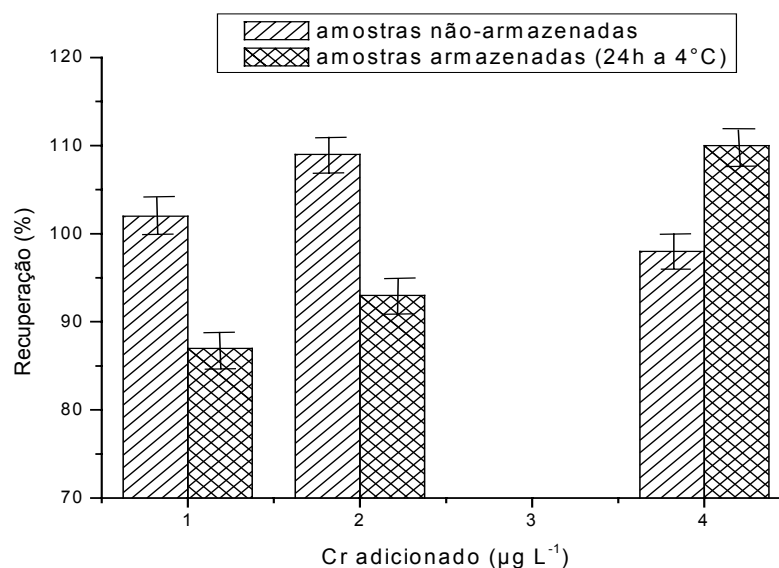


Figura 23: Média dos valores de recuperação ($n = 5$) para Cr adicionado em amostras de EPO armazenadas e não-armazenadas submetidas à irradiação UV por 3 h a 86 ± 3 °C. Condições experimentais: 50 µL de H₂O₂ 30% (m/v) + 200 µL de H₂SO₄ 1:10 (v/v) no início da irradiação + 50 µL de H₂O₂ 30% (m/v) após 1,5 h de irradiação (Hemax-Eritron[®] pó líofilo e Alfaepoetina[®] solução injetável). Amostra: 500 µL de EPO + 9,5 mL de água ultrapura + 2,5 mL eletrólito suporte (DTPA), (pH_{final} = 6,2).

Para o Ni foram realizados ensaios de recuperação adicionando a amostras de EPO concentrações de 1 e 2 µg L⁻¹. As determinações de Ni foram também realizadas em amostras de EPO armazenadas e amostras não-armazenadas conforme descrito anteriormente. Os valores de recuperações de Ni após a etapa de irradiação UV podem ser visualizados na figura 24, que demonstra valores de recuperação obtidos entre 83 e 88% para amostras não-armazenadas e valores em torno de 90% após armazenamento por 24 h a 4°C, indicando ser possível a determinação de Ni nestas amostras após a etapa de irradiação. Os valores de recuperação para as amostras armazenadas (~90%) indicam que provavelmente não existe uma interação significativa do Ni com a EPO na temperatura de armazenamento (4°C) das formulações.

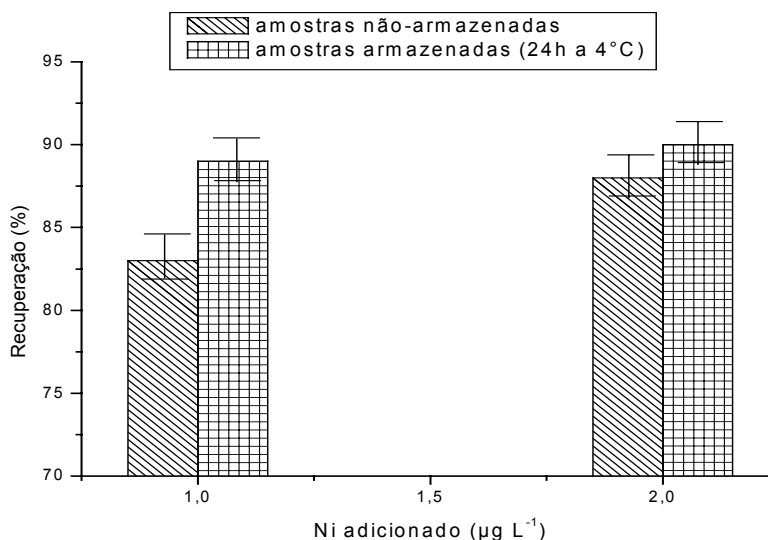


Figura 24: Média dos valores de recuperação ($n = 5$) para Ni adicionado em amostras de EPO armazenadas e não-armazenadas submetidas à irradiação UV por 3 h a 86 ± 3 °C. Condições experimentais: 50 μL de H_2O_2 30% (m/v) + 200 μL de H_2SO_4 1:10 (v/v) no início da irradiação + 50 μL de H_2O_2 30% após 1,5 h de irradiação (Hemax-Eritron[®] pó líofilo e Alfaepoetina[®] solução injetável). Amostra: 500 μL EPO + 9,5 mL de água ultrapura + 500 μL de tampão NH_4Cl + 100 μL da solução de dimetilglioxima 0,1 mol L^{-1} , ($\text{pH}_{\text{final}} = 9,5$).

É também importante ressaltar que os ensaios de recuperação foram realizados em amostras de EPO submetidas as mesmas condições experimentais de radiação eletromagnética em diferentes digestores (Digestor UV 705, Metrohm e Digestor UV de fabricação própria). A tabela 2 mostra a comparação entre os resultados obtidos por AdCSV na recuperação de quantidade conhecida do padrão utilizado dos metais adicionados às amostras de EPO.

Tabela 2: Comparativo entre digestores através de ensaios de recuperação de Al, Cr e Ni por AdCSV em amostras de EPO submetidas à irradiação com lâmpada de Hg de alta pressão por 3 h a 86 ± 3 °C.

	Metal adicionado ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Recuperação no digestor UV 705 (Metrohm) ^a	Recuperação no digestor UV (fabricação própria) ^b
Al	5	$87 \pm 3\%$	$80 \pm 3\%$
	10	$88 \pm 2\%$	$85 \pm 3\%$
Cr	1	$94 \pm 5\%$	$96 \pm 4\%$
	2	$93 \pm 5\%$	$87 \pm 3\%$
Ni	1	$82 \pm 3\%$	$86 \pm 3\%$
	2	$86 \pm 3\%$	$91 \pm 5\%$

^a Lâmpada de Hg de 500W de potência;

^b Lâmpada de Hg de 400W de potência.

Os resultados mostrados na tabela 2 demonstram que a potência da fonte de radiação UV (entre 400 e 500 W) não influencia de forma significativa na formação do radical OH^{\bullet} e na decomposição das amostras de EPO. O digestor construído com lâmpada de iluminação pública destruiu com grande eficiência as interferências orgânicas presentes na amostra, com a vantagem adicional de ser de fácil construção, empregar material de fácil aquisição e ter um baixo custo de construção (em torno de R\$ 1.000,00) e de manutenção quando comparado aos disponíveis comercialmente que possuem alto custo de aquisição (em torno de R\$ 25.000,00) e de manutenção.

4.5 Interferentes na determinação de Al, Cr e Ni por AdCSV

A influência de outros íons metálicos na determinação de Al^{3+} , Cr^{3+} e Ni^{2+} por AdCSV foi estudada para avaliar a aplicabilidade do método em amostras de EPO, considerando a presença de outros contaminantes na amostra. Na determinação de

Al^{3+} na presença de SVRS, as espécies inorgânicas investigadas como prováveis contaminantes foram os íons metálicos Fe^{3+} , Cu^{2+} , Pb^{2+} e Zn^{2+} . A tabela 3 ilustra os ensaios de recuperação de Al na presença de diferentes concentrações dos interferentes testados.

Tabela 3: Recuperação do sinal de Al^{3+} ($40 \mu\text{g L}^{-1}$) na presença de interferentes em potencial após irradiação UV. Solução de medida: 500 μL EPO + 9,5 mL de água ultrapura + 500 μL tampão acetato + 250 μL de SVRS 2 mmol L^{-1} . $T_d = 0 \text{ s}$, $E_d = -100 \text{ mV}$, $V = 40 \text{ mV s}^{-1}$, ($\text{pH}_{\text{final}} = 4,6$).

Concentração de Interferente ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Recuperação do sinal de Al (%)			
	Fe^{3+}	Cu^{2+}	Pb^{2+}	Zn^{2+}
10	98,6	103,5	101,6	101,7
20	99,5	103,4	100,9	99,6
30	101,4	98,8	100,6	101,8
40	99,8	100,9	96,7	99,4
50	98,1	97,7	100,3	97,5
60	97,3	98,1	98,6	97,6
70	98,5	92,8	100,6	97,4
80	98,9	90,9	102,7	98,9

De acordo com a tabela 3, observa-se que os íons metálicos testados não interferem no sinal de Al de forma significativa, devido ao fato de seus potenciais de redução serem diferentes em relação ao do complexo Al-SVRS no eletrólito utilizado.

A determinação de Al baseada na deposição adsortiva do complexo entre o Al e o ligante vermelho de alizarina S (DASA) no HMDE é também descrita na literatura. Este método é bastante utilizado na determinação de Al por ter como principais vantagens o baixo limite de detecção e a rápida reação de formação do complexo, sem necessidade de pré-aquecimento da amostra e reagentes para a medida voltamétrica [94].

Sendo assim, o método para determinação de Al na presença de DASA foi também testado demonstrando ser inviável sua utilização em amostras de EPO devido a forte interferência de zinco. A alta concentração deste metal (1,58 a

$5,50 \mu\text{g mL}^{-1}$) nas amostras de EPO interfere de forma bastante significativa, pois o Zn^{2+} possui potencial de redução próximo aos potenciais onde o complexo Al-DASA se adsorve e é posteriormente reduzido, competindo, desta forma, com o analito pela superfície do eletrodo. As figuras 25 e 26 mostram voltamogramas obtidos com adições crescentes de Al e Zn, respectivamente. Pode-se observar os sinais de Al^{3+} e Zn^{2+} no mesmo potencial, motivo este que levou à escolha de outro método para a determinação de Al (AdCSV na presença do ligante violeta de solocromo RS).

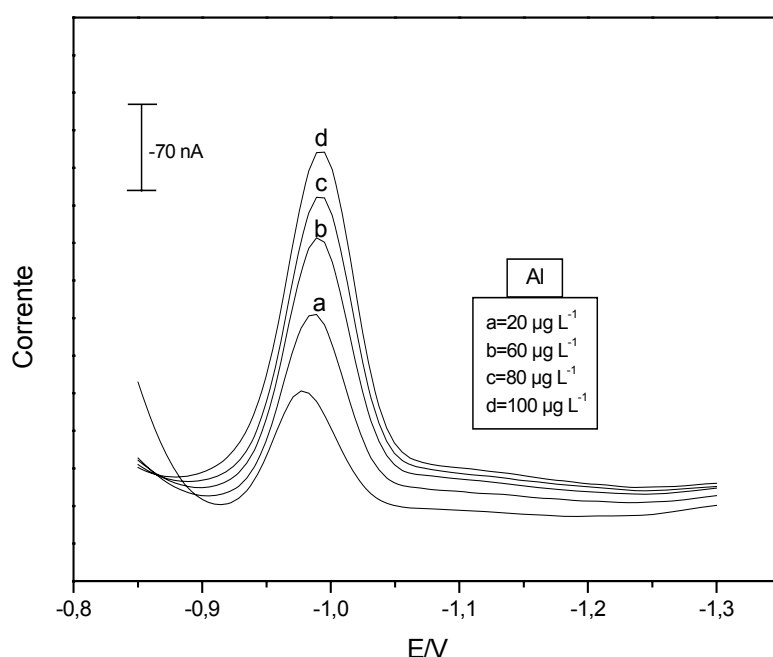


Figura 25: Determinação voltamétrica de alumínio em amostra de EPO utilizando DASA como agente complexante: adições de Al^{3+} de 20-100 $\mu\text{g L}^{-1}$, $T_d = 0 \text{ s}$, $E_d = -850 \text{ mV}$, $V = 20 \text{ mV s}^{-1}$. Solução de medida: 250 μL de EPO + 9,75 mL de água ultrapura + 100 μL de tampão BES + 100 μL de DASA 0,001 mol L^{-1} , ($\text{pH}_{\text{final}} = 7,1$).

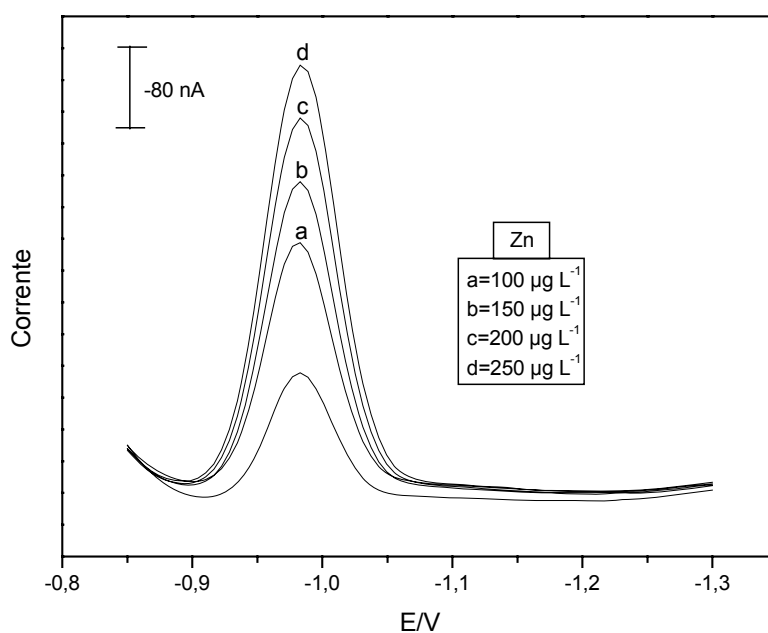


Figura 26: Determinação voltamétrica de zinco em amostra de EPO utilizando DASA como agente complexante: adições de Zn^{2+} de 100-250 $\mu\text{g L}^{-1}$, $T_d = 0$ s, $E_d = -850$ mV, $V = 20$ mV s^{-1} . Solução de medida: 250 μL de EPO + 9,75 mL de água ultrapura + 100 μL de tampão BES + 100 μL de DASA 0,01 mol L^{-1} , ($\text{pH}_{\text{final}} = 7,1$).

Visando minimizar ou mesmo eliminar a interferência de Zn^{2+} neste procedimento, adicionou-se ainda EDTA 0,1 mol L^{-1} à célula voltamétrica. Mesmo na presença de EDTA o Zn^{2+} causou uma interferência significativa no sinal do Al como pode ser observado na figura 27. Como pode se observar, tanto o sinal do Al como do Zn são distorcidos na presença de EDTA devido à complexação de ambos os metais pelo EDTA neste meio, que pode ser justificado pelos valores das constantes de formação. De acordo com a literatura, a constante de formação do complexo Zn-EDTA e do complexo Al-EDTA é a mesma ($\beta = 10^{16,5}$), mascarando assim, por complexação os dois cátions metálicos.

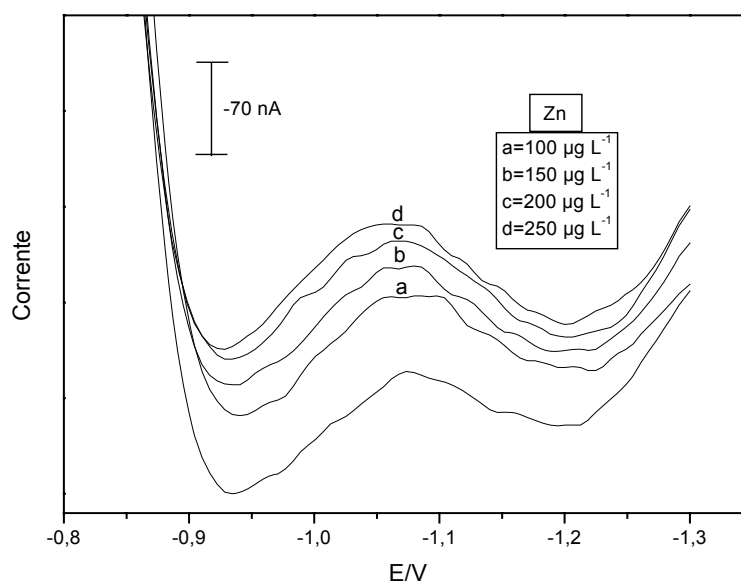


Figura 27: Determinação voltamétrica de alumínio em amostra de EPO com adições do interferente Zn^{2+} na presença de EDTA: adições de Zn^{2+} de 100-250 $\mu\text{g L}^{-1}$, $T_d = 0$ s, $E_d = -850$ mV, $V = 20$ mV s^{-1} . Solução de medida: 250 μL de EPO + 9,75 mL de água ultrapura + 100 μL de tampão BES + 100 μL de DASA 0,01 mol L^{-1} + 10 μL EDTA 0,1 mol L^{-1} , ($\text{pH}_{\text{final}} = 7,1$).

Ensaio de recuperação de Cr e Ni na presença de diferentes concentrações dos interferentes também foram testados. Os íons, Cu^{2+} , Zn^{2+} e Fe^{3+} não interferem de modo significativo no sinal do Cr e nem do Ni como pode ser observado nas tabelas 3 e 4. Entretanto, observa-se que o Pb^{2+} provoca uma diminuição do sinal de Cr. Apesar disso o sinal do Cr ainda é maior e o uso do método da adição do padrão de Cr compensa o sinal sem uma interferência significativa de Pb^{2+} .

Tabela 4: Recuperação do sinal de Cr^{3+} ($3 \mu\text{g L}^{-1}$) na presença de interferentes após irradiação UV. Solução de medida: 500 μL de EPO + 9,5 mL de água ultrapura + 2,5 mL eletrólito suporte (DTPA), ($\text{pH}_{\text{final}} = 6,2$). $T_d = 0 \text{ s}$, $E_d = -1000 \text{ mV}$, $V = 20 \text{ mV s}^{-1}$.

Concentração De interferente ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Recuperação do sinal de Cr (%)			
	Pb^{2+}	Cu^{2+}	Zn^{2+}	Fe^{3+}
2	88,1	101,2	96,7	105,9
4	78,6	107,5	102,7	100,2
6	74,5	104,7	110,6	102,9
8	69,9	108,1	103,9	99,8
10	65,2	102,1	105,1	94,1

Tabela 5: Recuperação do sinal de Ni^{2+} ($3 \mu\text{g L}^{-1}$) na presença de interferentes após irradiação UV. Solução de medida: 500 μL de EPO + 9,5 mL de água ultrapura + 500 μL de tampão NH_4Cl + 100 μL da solução de dimetilglioxima $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, ($\text{pH}_{\text{final}} = 9,5$). $T_d = 90 \text{ s}$, $E_d = -700 \text{ mV}$, $V = 20 \text{ mV s}^{-1}$.

Concentração de interferente ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Recuperação do sinal Ni (%)			
	Pb^{2+}	Cu^{2+}	Zn^{2+}	Fe^{3+}
2	104,8	101,1	103,6	84,6
4	103,2	102,3	108,7	105,3
6	101,7	110,2	102,9	105,6

De acordo com a literatura e também como observado neste trabalho, outros íons metálicos como Cd^{2+} , Co^{2+} , Mn^{2+} , Sb^{3+} , Fe^{3+} , Mg^{2+} , Na^{1+} , Ca^{2+} , K^{1+} e Tl^{1+} não interferem de modo significativo na determinação de Al, Cr e Ni por AdCSV, devido ao fato de seus potenciais de redução serem diferentes em relação aos dos complexos formados nos eletrólitos utilizados [94].

4.6 Faixa linear de determinação para Al, Cr e Ni em amostras de EPO

Com base nos resultados obtidos para a determinação de Al, Cr e Ni em amostras de EPO, curvas analíticas foram obtidas para avaliar a aplicabilidade do método desenvolvido neste tipo de matriz após a etapa de irradiação UV. As curvas analíticas apresentaram bons coeficientes de correlação para faixas de concentração de 10 a 100 $\mu\text{g L}^{-1}$ ($r = 0,999$) para o Al, de 10 a 100 $\mu\text{g L}^{-1}$ ($r = 0,997$) para o Cr utilizando eletrodo de mercúrio de gota estática (SMDE), de 1 a 10 $\mu\text{g L}^{-1}$ ($r = 0,993$) para o Cr utilizando eletrodo de mercúrio de gota pendente (HMDE) e de 1 a 10 $\mu\text{g L}^{-1}$ ($r = 0,998$) para o Ni. As figuras 28, 29, 30 e 31 mostram voltamogramas obtidos com adições crescentes de Al, Cr e Ni à célula voltamétrica contendo EPO submetida à irradiação UV em condições otimizadas.

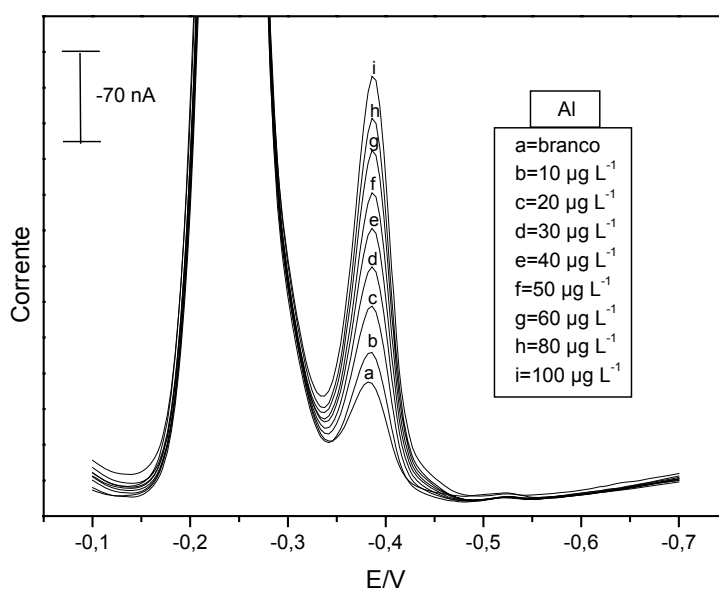


Figura 28: Sinais voltamétricos de Al^{3+} em amostra de EPO após irradiação UV por 2h a 86 ± 3 °C: adições de Al de 10-100 $\mu\text{g L}^{-1}$, $T_d = 0$ s, $E_d = -100$ mV, $V = 40$ mV s^{-1} . Solução de medida: 500 μL de EPO + 9,5 mL de água ultrapura + 500 μL tampão acetato + 250 μL de SVRS 2 mmol L^{-1} , ($\text{pH}_{\text{final}} = 4,6$).

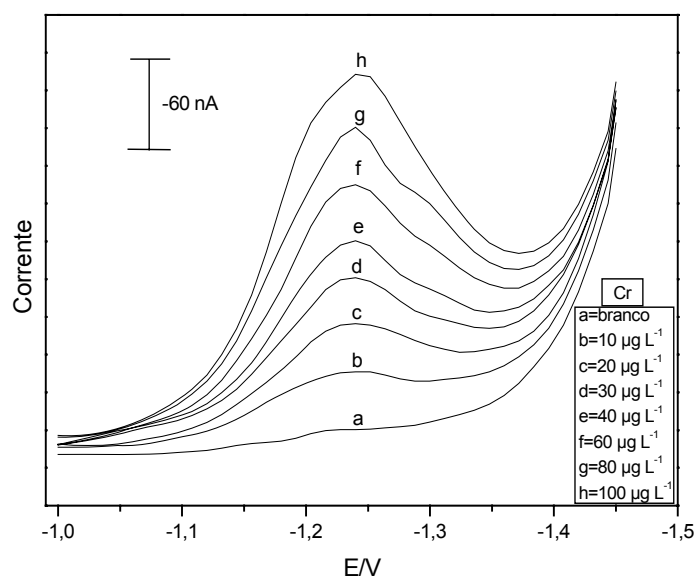


Figura 29: Sinais voltamétricos de Cr³⁺ no modo SMDE em amostra de EPO após irradiação UV por 3h a 86 ± 3 °C: adições de Cr de 10-100 µg L⁻¹, $V = 20$ mV s⁻¹. Solução de medida: 500 µL de EPO + 9,5 mL de água ultrapura + 2,5 mL eletrólito suporte (DTPA), ($\text{pH}_{\text{final}} = 6,2$).

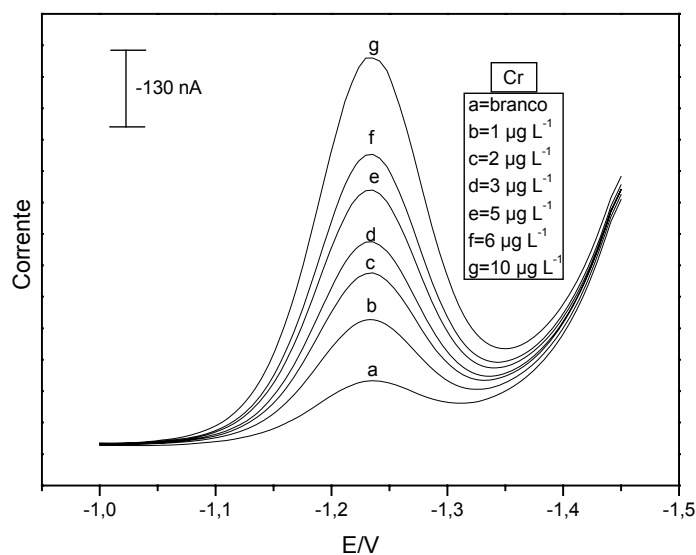


Figura 30: Sinais voltamétricos de Cr³⁺ no modo HMDE em amostra de EPO após irradiação UV por 3h a 86 ± 3 °C: adições de Cr de 1-10 µg L⁻¹, $T_d = 0$ s, $E_d = -1000$ mV, $V = 20$ mV s⁻¹. Solução de medida: 500 µL EPO + 9,5 mL de água ultrapura + 2,5 mL eletrólito suporte (DTPA), ($\text{pH}_{\text{final}} = 6,2$).

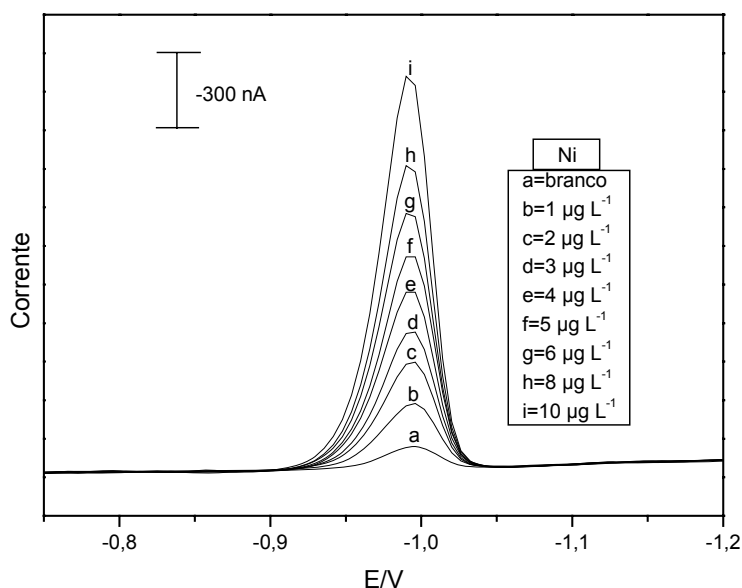


Figura 31: Sinais voltamétricos de Ni^{2+} em amostra de EPO após irradiação UV por 3h a 86 ± 3 °C: adições de Ni de $1\text{-}10 \mu\text{g L}^{-1}$, $T_d = 90$ s, $E_d = -700$ mV, $V = 20$ mV s^{-1} . Solução de medida: $500 \mu\text{L}$ de EPO + $9,5$ mL de água ultrapura + $500 \mu\text{L}$ de tampão NH_4Cl + $100 \mu\text{L}$ da solução de dimetilglioxima $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, ($\text{pH}_{\text{final}} = 9,5$).

4.7 Limite de detecção e quantificação para o Al, Cr e Ni em amostras de EPO irradiadas

O limite de detecção (LD) para cada metal foi calculado pela equação da curva analítica e três vezes o desvio padrão do branco ($3\sigma_B/b$) após 5 medidas da corrente da amostra de EPO irradiada. O limite de quantificação (LQ) foi calculado a partir de $10\sigma_B/b$. Para o cálculo do LD e LQ, curvas analíticas foram confeccionadas em concentrações de 1 a $3 \mu\text{g L}^{-1}$ para o Cr e para o Ni e em concentrações de 10 a $30 \mu\text{g L}^{-1}$ para o Al. Os valores obtidos podem ser observados na tabela 6.

Tabela 6: Valores de LD e LQ para cada metal investigado em amostras de EPO. Amostras: Eritromax[®], Hemax-Eritron[®] e Alfaepoetina[®].

	LD ($\mu\text{g L}^{-1}$) ^a na solução de medida	LQ ($\mu\text{g L}^{-1}$) na solução de medida	LD ($\mu\text{g mL}^{-1}$) ^a na amostra (EPO)	LQ ($\mu\text{g mL}^{-1}$) na amostra (EPO)
Alumínio	0,94	3,13	0,019	0,063
Cromo	0,099	0,33	0,002	0,007
Níquel	0,061	0,203	0,0012	0,004

^a 500 μL EPO + 9,5 mL de água ultrapura + eletrólito. Condições de irradiação: 50 μL de H_2O_2 30% (m/v) + 200 μL de H_2SO_4 1:10 (v/v) (Eritromax[®] solução injetável) ou 50 μL de H_2O_2 30% (m/v) + 200 μL de H_2SO_4 1:10 (v/v) no início da irradiação + 50 μL de H_2O_2 30% (m/v) após 1,5 h de irradiação (Hemax-Eritron[®] pó líófilo e Alfaepoetina[®] solução injetável).

4.8 Quantificação de Al, Cr e Ni como contaminantes em amostras de EPO

Após a otimização dos métodos para a determinação de Al, Cr e Ni por AdCSV, os métodos foram empregados na determinação dos metais como contaminantes em amostras de Eritromax[®], Hemax-Eritron[®] e Alfaepoetina[®].

De acordo com a tabela 7, concentrações de Al entre 0,42 a 0,84 $\mu\text{g mL}^{-1}$ foram determinadas, o que representa uma grave fonte de contaminação para os pacientes com insuficiência renal crônica submetidos ao tratamento com este tipo de medicação. Para o Cr e Ni concentrações mais baixas que variaram entre 0,012 a 0,042 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para o Cr e entre 0,004 a 0,008 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para o Ni foram determinadas conforme pode ser observado nas tabelas 8 e 9.

Tabela 7: Concentrações de Al determinadas em diferentes amostras de EPO após a etapa de irradiação por 2 ou 3h a 86 ± 3 °C. Amostras: Eritromax[®] e Alfaepoetina[®]. Condições de irradiação: 50 μ L de H₂O₂ 30% (m/v) + 200 μ L de H₂SO₄ 1:10 (v/v) (Eritromax[®] solução injetável) ou 50 μ L de H₂O₂ 30% (m/v) + 200 μ L de H₂SO₄ 1:10 (v/v) no início da irradiação + 50 μ L de H₂O₂ 30% (m/v) após 1,5 h de irradiação (Alfaepoetina[®] solução injetável). $T_d = 0$ s, $E_d = -100$ mV, $V = 40$ mV s⁻¹. Solução de medida: 500 μ L de EPO + 9,5 mL de água ultrapura + 500 μ L tampão acetato + 250 μ L de SVRS 2 mmol L⁻¹, (pH_{final}= 4,6).

EPO	Al determinado (μ g mL ⁻¹) ^a
Amostra 1	0,84
Amostra 2	0,61
Amostra 3	0,57
Amostra 4	0,66
Amostra 5	0,84
Amostra 6	0,62
Amostra 7	0,79
Amostra 8	0,65
Amostra 9	0,53
Amostra 10	0,45
Amostra 11	0,42
Amostra 12	0,47

^a RSD ($n = 3$): 2–6%

Tabela 8: Concentrações de Cr determinadas em diferentes amostras de EPO após a etapa de irradiação por 3h a 86 ± 3 °C. Amostras: Hemax-Eritron[®] pó liófilo e Alfaepoetina[®] solução injetável. Condições de irradiação: 50 μ L de H₂O₂ 30% (m/v) + 200 μ L de H₂SO₄ 1:10 (v/v) no início da irradiação + 50 μ L de H₂O₂ 30% (m/v) após 1,5 h de irradiação. $T_d = 0$ s, $E_d = -1000$ mV, $V = 20$ mV s⁻¹. Solução de medida: 500 μ L EPO + 9,5 mL de água ultrapura + 2,5 mL eletrólito suporte (DTPA), (pH_{final} = 6,2).

EPO	Cr determinado (μ g mL ⁻¹) ^a
Amostra 1	0,012
Amostra 2	0,042
Amostra 3	0,019
Amostra 4	0,018
Amostra 5	0,021
Amostra 6	0,025
Amostra 7	0,023
Amostra 8	0,022
Amostra 9	0,027
Amostra 10	0,017
Amostra 11	0,015
Amostra 12	0,022

^a RSD ($n = 3$): 3-8%

Tabela 9: Concentrações de Ni determinadas em diferentes amostras de EPO após a etapa de irradiação por 2 ou 3h a 86 ± 3 °C. Amostras: Eritromax[®], Hemax-Eritron[®] e Alfaepoetina[®]. Condições de irradiação: 50 µL de H₂O₂ 30% (m/v) + 200 µL de H₂SO₄ 1:10 (v/v) (Eritromax[®] solução injetável) ou 50 µL de H₂O₂ 30% (m/v) + 200 µL de H₂SO₄ 1:10 (v/v) no início da irradiação + 50 µL de H₂O₂ 30% (m/v) após 1,5 h de irradiação (Hemax-Eritron[®] pó líofilo e Alfaepoetina[®] solução injetável). $T_d = 90$ s, $E_d = -700$ mV, $V = 20$ mV s⁻¹. Solução de medida: 500 µL de EPO + 9,5 mL de água ultrapura + 500 µL de tampão NH₄Cl + 100 µL da solução de dimetilglioxima 0,1 mol L⁻¹, (pH_{final}= 9,5).

EPO	Ni determinado (µg mL ⁻¹) ^a
Amostra 1	0,006
Amostra 2	0,005
Amostra 3	0,004
Amostra 4	0,004
Amostra 5	0,004
Amostra 6	0,006
Amostra 7	0,008
Amostra 8	0,007
Amostra 9	0,008
Amostra 10	0,007
Amostra 11	0,004
Amostra 12	0,005

^a RSD ($n = 3$): 3-10%

De acordo com as tabelas 7, 8 e 9, os resultados obtidos mostram uma tendência muito clara com relação à contaminação das formulações comerciais de EPO por Al, Cr e Ni. Como pode se observar no gráfico da figura 32, os níveis de contaminação para Al, Cr e Ni diferem em aproximadamente uma ordem de grandeza em todas as amostras estudadas, ou seja, o alumínio é o maior contaminante metálico nas amostras de EPO, seguido de Cr e Ni.

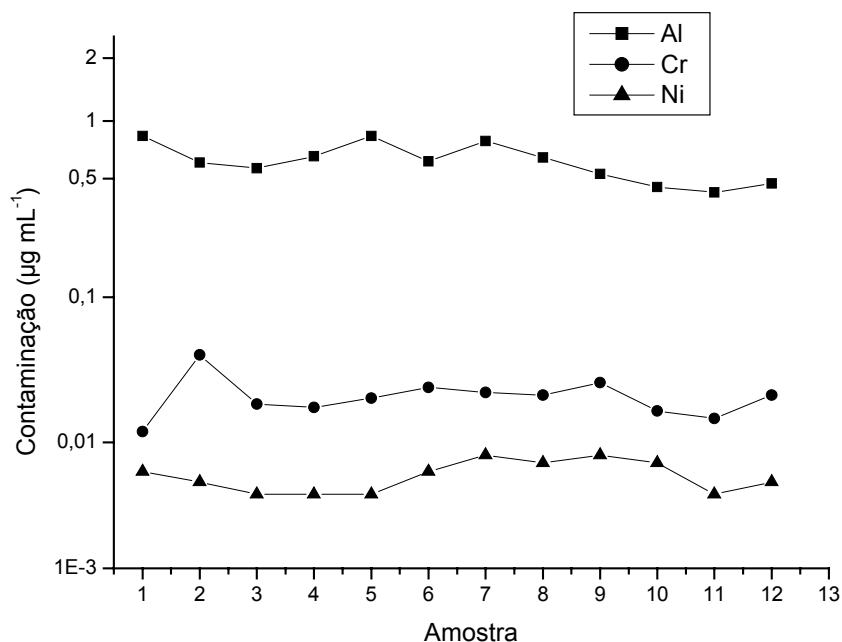


Figura 32: Comparativo das concentrações de Al, Cr e Ni encontradas em diferentes amostras de EPO após a etapa de irradiação UV. Amostras: Eritromax[®] solução injetável, Hemax-Eritron[®] pó líofilo e Alfaepoetina[®] solução injetável.

4.9 Análise seqüencial de metais em amostras de EPO empregando AdCSV e ASV

A voltametria adsortiva de redissolução catódica (AdCSV) empregando o HMDE como eletrodo de trabalho foi o método utilizado na determinação de Al, Cr e Ni em amostras de EPO no presente trabalho. A fim de simplificar e tornar a determinação de Al, Cr e Ni mais simples e rápida, optou-se por testar a determinação dos mesmos seqüencialmente sem necessidade de se proceder a alterações no método de cada metal e utilizando-se a mesma amostra. De acordo com testes realizados primeiramente em solução aquosa e depois em amostras de EPO devidamente irradiadas, os resultados da determinação em seqüência dos três metais na mesma amostra não foi possível. Entretanto, a análise seqüencial de Al e Cr, como também Al e Ni foi possível mesmo com a mistura de ligantes (SVRS + DTPA e SVRS + DMG) e empregando os respectivos eletrólitos suporte. Este fato que pode ser justificado pelos valores de constantes de formação dos complexos metal-ligante. Na tabela 10 podem ser observados alguns valores de constantes de

formação. O DTPA, por exemplo, forma complexos com diversas espécies metálicas, mas é muito provável que a constante de formação do complexo Al^{3+} -SVRS seja maior que a constante de formação do complexo Cr^{3+} -DTPA possibilitando assim a análise seqüencial. Pode-se observar também, que na seqüência Al e Ni utilizando SVRS e DMG como complexantes, a constante de formação do complexo Ni^{2+} -DMG é maior que a constante de formação do complexo Ni^{2+} -SVRS.

Tabela 10: Valores de constante de formação de alguns complexos.

Espécie metálica	β (constantes de formação)			
	SVRS	DTPA	DMG	EDTA
Al^{3+}	$10^{12,78}$	$10^{18,6}$	–	$10^{16,5}$
Fe^{3+}	–	10^{28}	–	–
Zn^{2+}	$10^{-7,18}$	$10^{18,2}$	–	$10^{16,5}$
Cd^{1+}	$10^{10,5}$	–	–	–
Pb^{2+}	$10^{-8,12}$	$10^{18,8}$	–	10^{18}
Cu^{2+}	$10^{1,1}$	$10^{21,2}$	$10^{8,75}$	$10^{18,78}$
Ni^{2+}	$10^{-4,8}$	$10^{20,1}$	$10^{17,24}$	$10^{18,4}$
Tl^{1+}	–	$10^{5,97}$	–	$10^{6,41}$
Cr^{3+}	$10^{-2,26}$ (75 °C)	–	–	–

A voltametria adsortiva de redissolução catódica (AdCSV) empregando o HMDE como eletrodo de trabalho pode ser utilizado como método na determinação de Al e Fe, pois da mesma maneira que o Al complexa com o violeta de solocromo RS formando o Al^{3+} -SVRS, o Fe por sua vez, forma o complexo Fe^{3+} -SVRS possibilitando a determinação dos dois metais simultaneamente [95, 96]. De acordo com literatura, além de Al e Fe, o violeta de solocromo RS complexa outros cátions metálicos como Ti^{4+} , V^{3+} , V^{5+} , Mo^{3+} , Cd^{2+} , Ga^{3+} , Y, Zr, Tl^{1+} , Mg^{2+} , Ca^{2+} , Sr^{2+} , Ba^{2+} e metais alcalinos [22, 97-100], que baseado na constante de formação de cada complexo pode ou não interferir na determinação de Al^{3+} e Fe^{3+} .

A voltametria de redissolução anódica (ASV) também pode ser atrativa para quantificar traços de metais pesados em amostras de EPO considerando dois aspectos principais: a possibilidade de determinações simultâneas e a alta sensibilidade obtida com métodos de redissolução. Assim, as determinações de

Zn^{2+} , Cd^{1+} , Pb^{2+} e Cu^{2+} podem ser realizadas por voltametria de redissolução anódica (ASV). O método baseia-se na deposição dos metais, durante 60 s, no eletrodo de mercúrio de gota pendente (HMDE) em um potencial de -1150 mV e na redissolução durante a varredura anódica dos potenciais (60 mV s^{-1}) entre -1150 e $+150$ mV. A determinação de Tl^{1+} também pode ser realizada por ASV em seqüência à determinação dos metais (Zn^{2+} , Cd^{1+} , Pb^{2+} e Cu^{2+}), acrescentando-se à mesma amostra 200 μ L de EDTA $0,1$ mol L^{-1} antes de iniciar a medida. O método baseia-se na deposição de Tl, durante 180 s, no eletrodo de mercúrio de gota pendente (HMDE) em um potencial de -800 mV e na redissolução durante a varredura anódica dos potenciais (20 mV s^{-1}) entre -800 e -200 mV [91, 101].

O Ni^{2+} pode ser determinado, por AdCSV, na presença de Zn^{2+} , Cd^{1+} , Pb^{2+} e Cu^{2+} adicionando à célula voltamétrica 500 μ L de tampão NH_4Cl (pH 9,5) e 100 μ L da solução de dimetilglioxima.

Sendo assim, um procedimento de análise seqüencial para Al^{3+} , Fe^{3+} , Zn^{2+} , Cd^{1+} , Pb^{2+} , Cu^{2+} , Ni^{2+} e Tl^{1+} foi testado primeiramente em solução aquosa para posterior utilização em amostras de EPO devidamente irradiadas. As figuras 33A, 33B, 34A e 34B mostram voltamogramas obtidos para determinação seqüencial dos 8 metais com adições crescentes dos respectivos padrões (método da adição do padrão $n = 3$) à célula voltamétrica contendo água ultrapura e o respectivo eletrólito suporte.

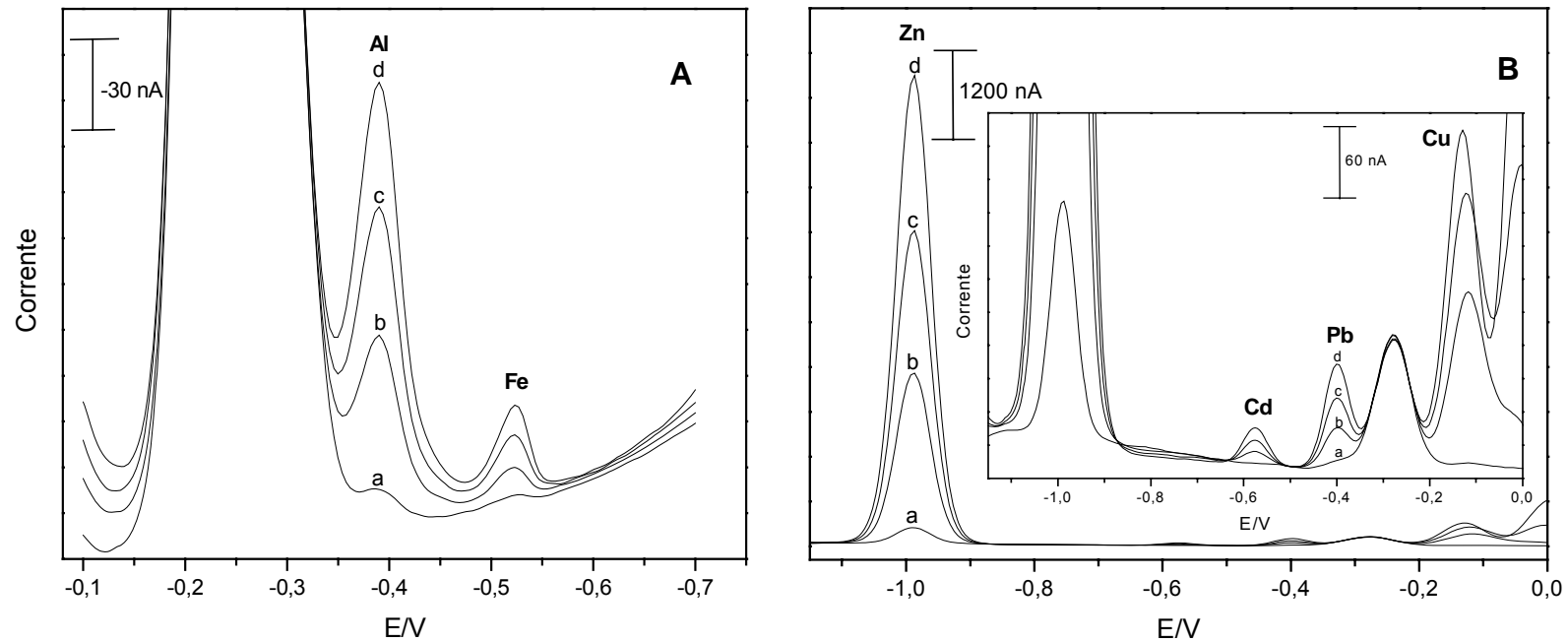


Figura 33: A) Sinais voltamétricos de Al^{3+} e Fe^{3+} por AdCSV: a) branco, b) água + $10 \mu\text{g L}^{-1}$ de Al + $10 \mu\text{g L}^{-1}$ de Fe, c) água + $20 \mu\text{g L}^{-1}$ de Al + $20 \mu\text{g L}^{-1}$ de Fe, e d) água + $30 \mu\text{g L}^{-1}$ de Al + $30 \mu\text{g L}^{-1}$ de Fe; $T_d = 0 \text{ s}$, $E_d = -100 \text{ mV}$, $V = 40 \text{ mV s}^{-1}$. Solução de medida: 10 mL de água ultrapura + 500 μL tampão acetato + 250 μL de SVRS 2 mmol L^{-1} , ($\text{pH}_{\text{final}} = 4,6$). **B)** Sinais voltamétricos de Zn^{2+} , Cd^{1+} , Pb^{2+} e Cu^{2+} por ASV após determinação de Al^{3+} e Fe^{3+} : a) branco, b) água + $100 \mu\text{g L}^{-1}$ de Zn + $1 \mu\text{g L}^{-1}$ de Cd + $5 \mu\text{g L}^{-1}$ de Pb + $25 \mu\text{g L}^{-1}$ de Cu, c) água + $200 \mu\text{g L}^{-1}$ de Zn + $2 \mu\text{g L}^{-1}$ de Cd + $10 \mu\text{g L}^{-1}$ de Pb + $50 \mu\text{g L}^{-1}$ de Cu, e d) água + $300 \mu\text{g L}^{-1}$ de Zn + $3 \mu\text{g L}^{-1}$ de Cd + $15 \mu\text{g L}^{-1}$ de Pb + $75 \mu\text{g L}^{-1}$ de Cu; $T_d = 60 \text{ s}$, $E_d = -1150 \text{ mV}$, $V = 60 \text{ mV s}^{-1}$. Solução de medida: 10mL de água ultrapura + 500 μL tampão acetato + 250 μL de SVRS 2 mmol L^{-1} + 500 μL tampão acetato, ($\text{pH}_{\text{final}} = 4,6$).

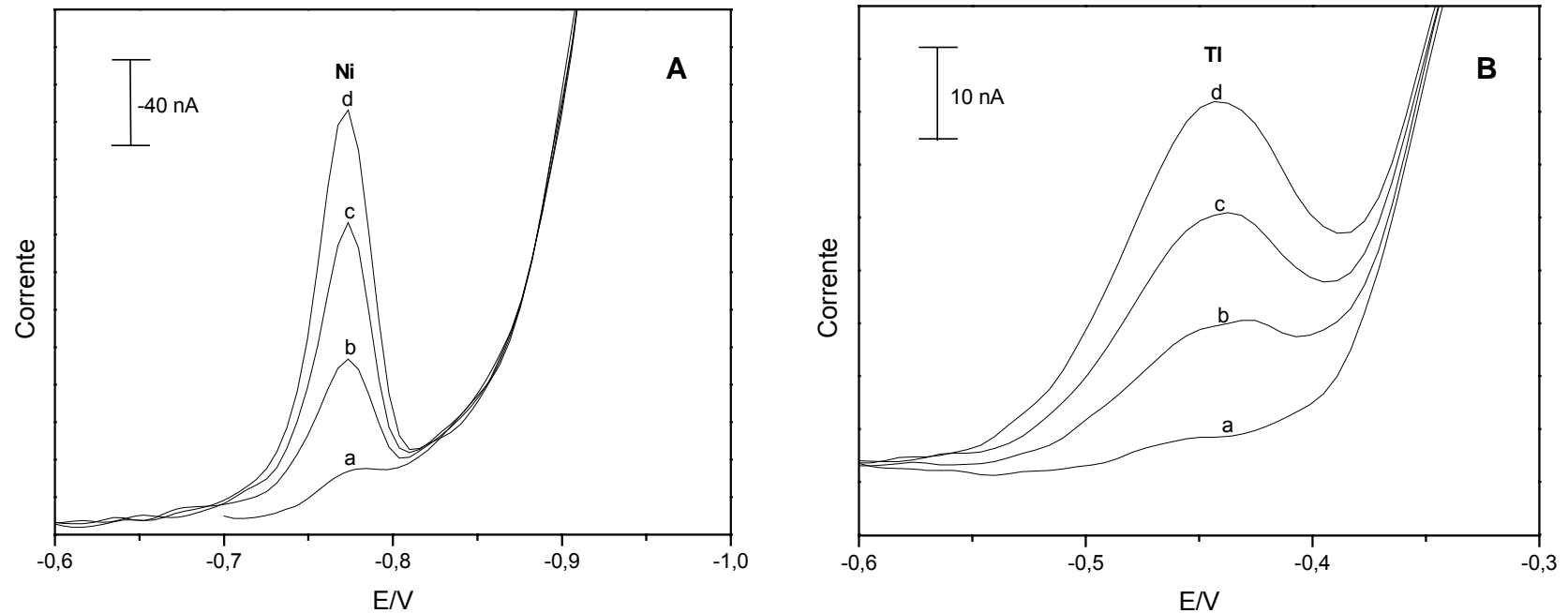


Figura 34: A) Sinais voltamétricos de Ni²⁺ por AdCSV após determinação de Al³⁺, Fe³⁺, Zn²⁺, Cd¹⁺, Pb²⁺ e Cu²⁺: (a) branco, (b) água + 1 µg L⁻¹ de Ni, (c) água + 2 µg L⁻¹ de Ni, (d) água + 3 µg L⁻¹ de Ni; T_d = 90 s, E_d = -550 mV, V = 20 mV s⁻¹. Solução de medida: 10 mL de água ultrapura + 500 µL tampão acetato + 250 µL de SVRS 2 mmol L⁻¹ + 500 µL tampão acetato + 500 µL de tampão NH₄Cl + 100 µL da solução de dimetilglioxima 0,1 mol L⁻¹, (pH_{final} = 9,5). **B)** Sinais voltamétricos de Tl¹⁺ por ASV após determinação de Al³⁺, Fe³⁺, Zn²⁺, Cd¹⁺, Pb²⁺, Cu²⁺ e Ni²⁺: (a) branco, (b) água + 2 µg L⁻¹ de Tl, (c) água + 4 µg L⁻¹ de Tl, (d) água + 6 µg L⁻¹ de Tl; T_d = 180 s, E_d = -800 mV, V = 20 mV s⁻¹. Solução de medida: 10 mL de água ultrapura + 500 µL tampão acetato + 250 µL de SVRS 2 mmol L⁻¹ + 500 µL tampão acetato + 500 µL de tampão NH₄Cl + 100 µL da solução de dimetilglioxima 0,1 mol L⁻¹ + 200 µL de EDTA 0,1 mol L⁻¹, (pH_{final} = 9,5).

Portanto, de acordo com os resultados obtidos em solução aquosa, implementou-se o mesmo procedimento analítico em amostras de EPO devidamente irradiadas resultando em voltamogramas que podem ser observados nas figuras 35A, 35B, 36A e 36B.

Alguns métodos são empregados na determinação seqüencial de espécies metálicas, uma das vantagens de utilizar a voltametria é a diminuição do custo em relação a análise realizada por espectrometria de absorção atômica (AAS) e por plasma indutivamente acoplado (ICP) que são métodos normalmente utilizados em análises seqüenciais e simultâneas mas que geram um custo mais elevado. Outra vantagem em relação ao custo é a diminuição da quantidade de amostra necessária para as análises seqüenciais. No caso de amostras caras ou de difícil obtenção em uma pequena alíquota de amostra várias espécies metálicas podem ser facilmente determinadas utilizando métodos em seqüência.

É importante ressaltar também a ausência de interferência mútua das espécies com relação aos seus potenciais de pico (E_p), onde cada espécie tem o seu E_p bem definido e uma espécie não interfere na determinação da outra. Além disso, a mistura de ligantes SVRS, DMG e EDTA não impediu a análise seletiva de cada elemento na seqüência de métodos escolhida.

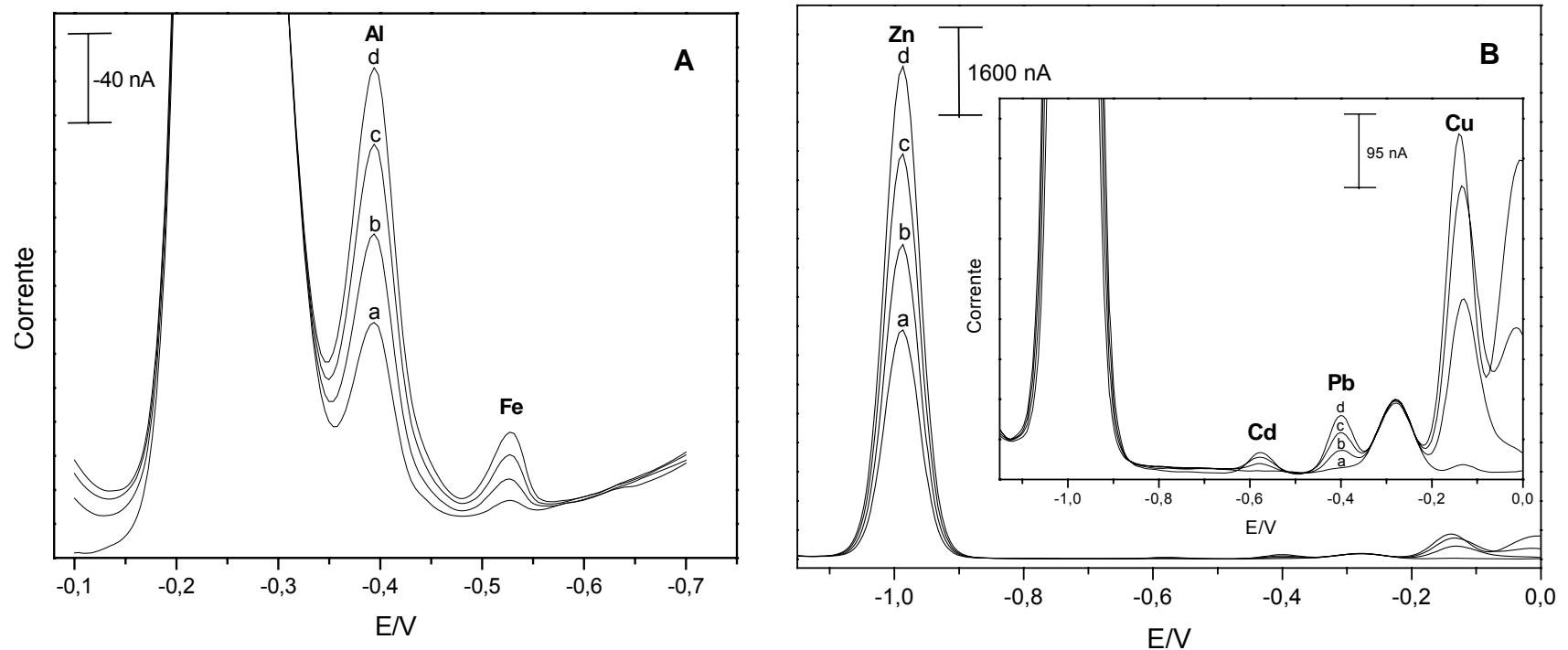


Figura 35: A) Sinais voltamétricos de Al³⁺ e Fe³⁺ por AdCSV em amostra de EPO após irradiação UV por 3h a 86 ± 3 °C: a) branco, b) amostra + $10 \mu\text{g L}^{-1}$ de Al + $10 \mu\text{g L}^{-1}$ de Fe, c) amostra + $20 \mu\text{g L}^{-1}$ de Al + $20 \mu\text{g L}^{-1}$ de Fe, e d) amostra + $30 \mu\text{g L}^{-1}$ de Al + $30 \mu\text{g L}^{-1}$ de Fe; $T_d = 0$ s, $E_d = -100$ mV, $V = 40$ mV s⁻¹. Solução de medida: 500 μL EPO + 9,5 mL de água ultrapura + 500 μL tampão acetato + 250 μL de SVRS 2 mmol L⁻¹, ($\text{pH}_{\text{final}} = 4,6$). **B)** Sinais voltamétricos de Zn²⁺, Cd¹⁺, Pb²⁺ e Cu²⁺ por ASV na amostra de EPO após a determinação de Al³⁺ e Fe³⁺: a) branco, b) amostra + $100 \mu\text{g L}^{-1}$ de Zn + $1 \mu\text{g L}^{-1}$ de Cd + $5 \mu\text{g L}^{-1}$ de Pb + $25 \mu\text{g L}^{-1}$ de Cu, c) amostra + $200 \mu\text{g L}^{-1}$ de Zn + $2 \mu\text{g L}^{-1}$ de Cd + $10 \mu\text{g L}^{-1}$ de Pb + $50 \mu\text{g L}^{-1}$ de Cu, e d) amostra + $300 \mu\text{g L}^{-1}$ de Zn + $3 \mu\text{g L}^{-1}$ de Cd + $15 \mu\text{g L}^{-1}$ de Pb + $75 \mu\text{g L}^{-1}$ de Cu; $T_d = 60$ s, $E_d = -1150$ mV, $V = 60$ mV s⁻¹. Solução de medida: 500 μL EPO + 9,5 mL de água ultrapura + 500 μL tampão acetato + 250 μL de SVRS 2 mmol L⁻¹ + 500 μL tampão acetato, ($\text{pH}_{\text{final}} = 4,6$).

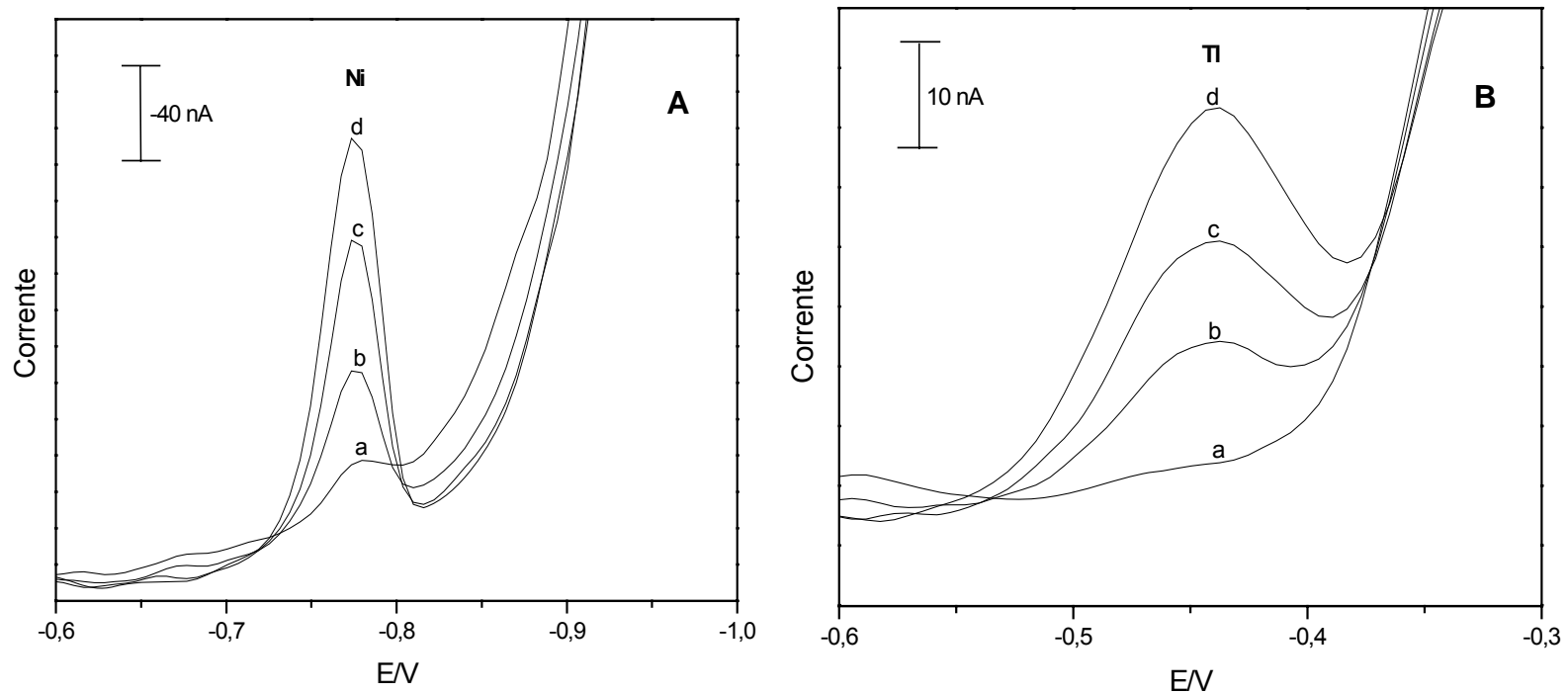


Figura 36: A) Sinais voltamétricos de Ni²⁺ por AdCSV na amostra de EPO após a determinação de Al³⁺, Fe³⁺, Zn²⁺, Cd¹⁺, Pb²⁺ e Cu²⁺: a) branco, (b) amostra + 1 μg L⁻¹ de Ni, (c) amostra + 2 μg L⁻¹ de Ni, (d) amostra + 3 μg L⁻¹ de Ni; T_d = 90 s, E_d = -550 mV, V = 20 mV s⁻¹. Solução de medida: 500 μL EPO + 9,5 mL de água ultrapura + 500 μL tampão acetato + 250 μL de SVRS 2 mmol L⁻¹ + 500 μL tampão acetato + 500 μL de tampão NH₄Cl + 100 μL da solução de dimetilgloxima 0,1 mol L⁻¹, (pH_{final}= 9,5). **B)** Sinais voltamétricos de TI¹⁺ por ASV na amostra de EPO após a determinação de Al³⁺, Fe³⁺, Zn²⁺, Cd¹⁺, Pb²⁺, Cu²⁺ e Ni²⁺: (a) branco, (b) amostra + 2 μg L⁻¹ de TI, (c) amostra + 4 μg L⁻¹ de TI, (d) amostra + 6 μg L⁻¹ de TI; T_d= 180 s, E_d= -800 mV, V = 20 mV s⁻¹. Solução de medida: 500 μL EPO + 9,5 mL de água ultrapura + 500 μL tampão acetato + 250 μL de SVRS 2 mmol L⁻¹ + 500 μL tampão acetato + 500 μL de tampão NH₄Cl + 100 μL da dimetilgloxima 0,1 mol L⁻¹ + 200 μL de EDTA 0,1 mol L⁻¹, (pH_{final}= 9,5).

Para melhor esclarecimento do procedimento seqüencial testado, a tabela 11 e a figura 39 resumem o protocolo experimental seguido para determinação de Al, Fe, Zn, Cd, Pb, Cu, Ni e Tl.

Tabela 11: Protocolo experimental para a determinação seqüencial de Al, Fe, Zn, Cd, Pb, Cu, Ni e Tl em amostras de EPO.

Etapa	Seqüência	Metal(is) determinado(s)
1 ^a	Irradiação com lâmpada de Hg de alta pressão. Condições de irradiação por 2 ou 3h a 86 ± 3 °C: 500 µL EPO + 9,5 mL de água ultrapura + 50 µL de H ₂ O ₂ 30% (m/v) + 200 µL de H ₂ SO ₄ 1:10 (v/v) ou 50 µL de H ₂ O ₂ 30% (m/v) + 200 µL de H ₂ SO ₄ 1:10 (v/v) no início da irradiação + 50 µL de H ₂ O ₂ 30% (m/v) após 1,5 h de irradiação.	-
2 ^a	Solução irradiada (10 mL) + 500 µL tampão acetato + 250 µL de SVRS 2 mmol L ⁻¹ , (pH _{final} 4,6)	Al e Fe
3 ^a	Adição de 500 µL de tampão acetato, (pH _{final} 4,6)	Zn, Cd, Pb e Cu
4 ^a	Adição de 500 µL de tampão NH ₄ Cl e 100 µL de solução de dimetilglioxima 0,1 mol L ⁻¹ , (pH _{final} 9,5)	Ni
5 ^a	Adição de 200 µL de EDTA 0,1 mol L ⁻¹ , (pH _{final} 9,5)	Tl

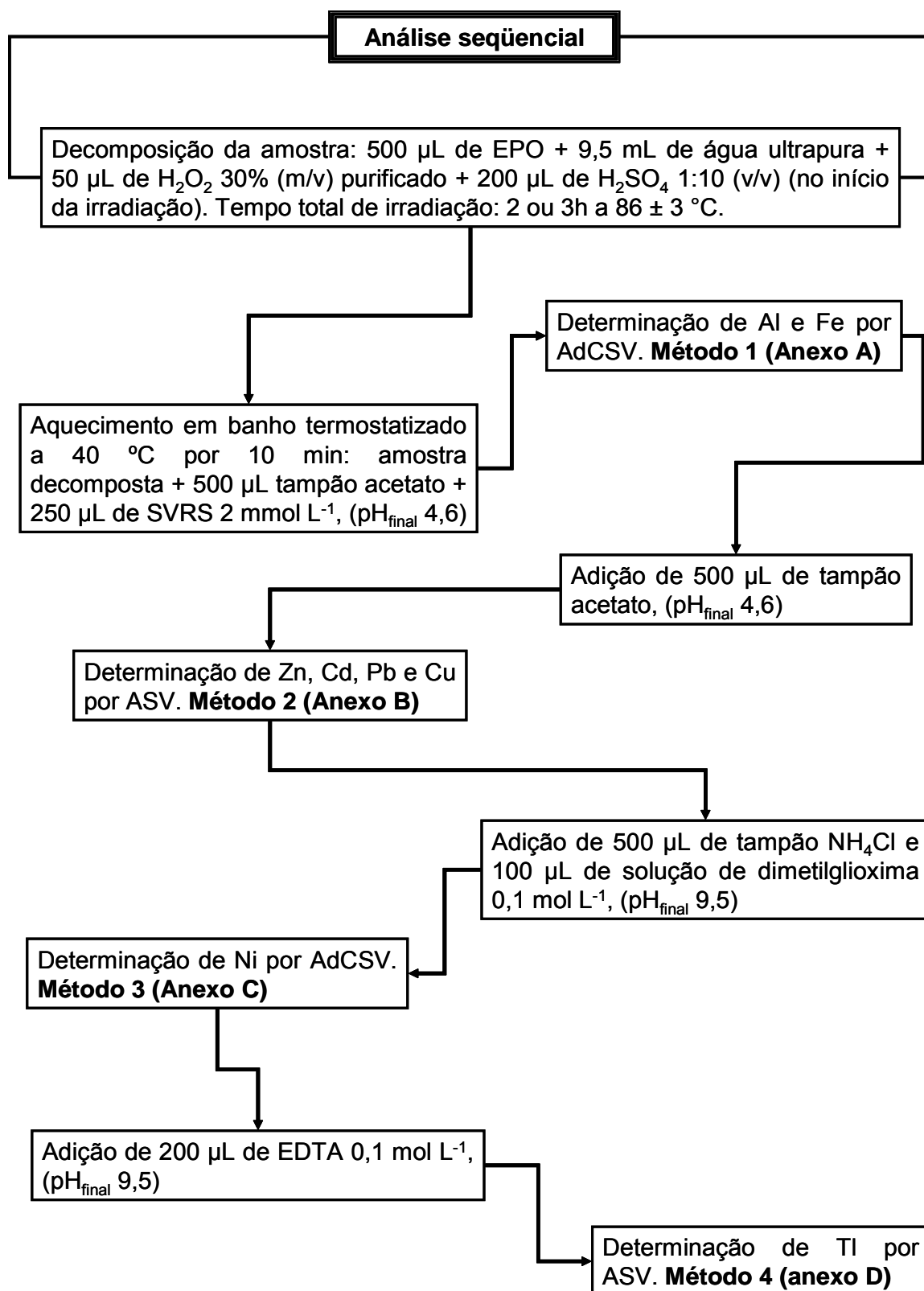


Figura 37: Resumo do procedimento experimental seqüencial testado para determinação de Al³⁺, Fe³⁺, Zn²⁺, Cd¹⁺, Pb²⁺, Cu²⁺, Ni²⁺ e Tl¹⁺ em amostras de EPO irradiada.

5 CONCLUSÕES

Na primeira parte desse trabalho foi investigado a eficiência da decomposição das amostras de EPO utilizando lâmpada de mercúrio de alta pressão, onde foram otimizados os tempos e as condições de irradiação UV para a amostra estudada. Este estudo demonstrou que a escolha das condições adequadas de decomposição depende da forma como a amostra se apresenta (solução injetável ou pó liófilo) e da sua composição.

A decomposição satisfatória das amostras de Eritromax[®] na forma de solução injetável pôde ser obtida após um tempo de 2 horas de irradiação. Já as amostras Hemax-Eritron[®] em forma de pó liófilo e Alfaepoetina[®] em forma solução injetável, além de serem necessárias 3 horas de irradiação, esta exigiu a renovação de H₂O₂ depois de 90 minutos de irradiação para destruição completa da matéria orgânica presente na amostra.

Através das comparações efetuadas dos voltamogramas entre as amostras irradiadas e não irradiadas com lâmpada de Hg de alta pressão, conclui-se que a destruição de espécies orgânicas para a determinação de metais traços é indispensável quando se utiliza a voltametria adsorptiva de redissolução catódica. Além disso, todo o procedimento foi desenvolvido sem a ocorrência de contaminações ou perdas significativas das espécies de interesse.

As amostras de EPO, analisadas após o pré-tratamento com irradiação UV sob condições otimizadas, apresentaram contaminação na faixa de 0,42 a 0,84 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para o Al, de 0,012 a 0,042 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para o Cr e de 0,004 a 0,008 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para o Ni. Ensaio de recuperação foram realizados a partir da contaminação das soluções de EPO com os metais e percentuais de recuperação situaram-se na faixa entre 83 e 109% para amostras não-armazenadas e entre 70 e 110% após armazenamento por 24 h a 4°C. Deste modo, a etapa de pré-tratamento com irradiação UV é necessária para posterior quantificação por AdCSV.

O método possibilita a determinação de Al, Cr e Ni livre de interferentes inorgânicos como Fe³⁺, Cu²⁺, Pb²⁺ e Zn²⁺. Os limites de quantificação calculados de 0,063 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para o Al, 0,007 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para o Cr e 0,0041 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para o Ni em amostras de EPO demonstram a aplicabilidade do método para determinação destes metais como contaminantes em quantidade traço nesta matriz.

6 BIBLIOGRAFIA

- [1] KOROLKOVAS, A. **Dicionário Terapêutico Guanabara**. 6ª ed, Rio de Janeiro: Guanabara Koogan S.A., 1999.
- [2] LIMA, D. **Manual de Farmacologia clínica, Terapêutica e Toxicologia**. Ed. Guanabara, Rio de Janeiro, 1992.
- [3] LEE, S.-H. et al. Trace metals' abnormalities in hemodialysis patients: relationship with medications. **Artificial Organs**, v. 24, n. 11, p. 841-844, 2000.
- [4] LOCATELLI, F.; DEL VECCHIO, L.; ANDRULLI, S. Dialysis: its role in optimizing recombinant erythropoietin treatment. **Nephrology Dialysis Transplantation**, v. 16, p. 29-35, 2001.
- [5] LOCATELLI, F.; DEL VECCHIO, L. Dialysis adequacy and response to erythropoietic agents: what is the evidence base?. **Nephrology Dialysis Transplantation**, v. 18, p. 29-35, 2003.
- [6] VANHOLDER, R. et al. The role of trace elements in uraemic toxicity. **Nephrology Dialysis Transplantation**, v. 17, n. 2, p. 2-8, 2002.
- [7] HOSOKAWA, S.; YOSHIDA, O. Effect of erythropoietin (rHuEPO) on trace elements and quality of life (QoI) in chronic hemodialysis patients. **International Journal of Artificial Organs**, v. 32, n. 8, p. 415-421, 1994.
- [8] HOSOKAWA, S.; YOSHIDA, O. Effect of erythropoietin on trace elements in patients with chronic renal failure undergoing hemodialysis. **Nephron**, v. 65, p. 414-417, 1993.

- [9] METAIS PESADOS E SEUS EFEITOS. In: MUNDO DO QUÍMICO. Disponível em: <<http://www.mundodoquímico.hpg.com.br>>. Acesso em: 11 maio 2007.
- [10] WYNGAARDEN, J.; SMITH, L.; BENNET, J. **Tratado de Medicina Interna**, 19^a ed., Ed. G. Koogan, Rio de Janeiro, 1993.
- [11] SAVORY, J.; WILLS, M.R. Trace metals: essential nutrients or toxins. **Clinical Chemistry**, v. 38, n. 8, p. 1565-1573, 1992.
- [12] ONAGA, H. **Métodos de pré-concentração para determinação simultânea de Cr, Mn, Fe, Co, Ni, Cu, Hg e Pb por fluorescência de raios-X**. 1996. 95f. Dissertação (Mestrado em Química) – Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 1996.
- [13] FAVARON, R. **Desenvolvimento de métodos voltamétricos para a determinação de Zn, Cu, Pb, Ni, Sn e Cr em águas de efluentes de indústrias de galvanoplastia**. 2005. 125f. Tese (Doutorado em Química) – Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2005.
- [14] GREGER, J. L.; SUTHERLAND, J.E. Aluminum exposure and metabolism. **Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences**, v. 34(5), p. 439-474, 1997.
- [15] LARINI, L. **Toxicologia**. São Paulo: Manole, p.135-143, 1987.
- [16] ALUMÍNIO E SAÚDE. In: ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DO ALUMÍNIO (ABAL). Disponível em: <<http://www.abal.org.br>>. Acesso em: 11 maio 2007.
- [17] BRASIL. Portaria nº 518, de 25 de março de 2004. **Diário Oficial da União**, Poder Executivo, Brasília, DF, 26 mar 2004. Disponível em: <<http://e-legis.anvisa.gov.br/leisref/public/showAct.php?id=22322&word=>>>. Acesso em: 11 maio 2007.

- [18] BIBLIOTECA DE INTOXICAÇÕES. In: ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE MEDICINA COMPLEMENTAR (ABMC). Disponível em: <<http://www.medicinacomplementar.com.br>>. Acesso em: 11 maio 2007.
- [19] DOMÍNGUEZ, O.; ARCOS, M. J. Simultaneous determination of chromium(VI) e chromium(III) at trace levels by adsorptive stripping voltammetry. **Analytica Chimica Acta**, v. 470, p. 241-252, 2002.
- [20] SANCHO, D. et al. Determination of nickel and cobalt in refined beet sugar by adsorptive cathodic stripping voltammetry without sample pretreatment. **Food Chemistry. Analytical, Nutritional and Clinical Methods Section**, v. 71, p. 139-145, 2000.
- [21] VOGEL, A. **Análise química quantitativa**. 5ª ed, Rio de Janeiro: LTC, p. 295-315, 1992.
- [22] HENZE, G. **Polarographie und voltammetrie: grundlagen und analytische Praxis**, Springer-Verlag, Berlin, 2001.
- [23] WANG, J. **Stripping analysis: principles, instrumentation and applications**. Weinheim: Wiley - VCH, 1985.
- [24] SKOOG, D. A.; LEARY, J. J. **Principles of instrumental analysis**. 4ª ed., Saunders College Publishing, Philadelphia, 1992.
- [25] BAREK, J. et al. Polarography and voltammetry at mercury electrodes. **Critical Reviews in Analytical Chemistry**, v. 31, n. 4, p. 291-309, 2001.
- [26] NÜRNBERG, H. W. et al. The reliable determination of mercury traces in sea water by subtractive differential pulse voltammetry at the twin gold electrode. **Analytica Chimica Acta**, v. 115, p. 25-42, 1980.
- [27] THOMAS, F. G.; HENZE, G. **Introduction to Voltammetric Analysis – Theory and Practice**. Csiro Publishing Collingwood VIC, Austrália, 2001.

- [28] FLORENCE, T. M., Electrochemical approaches to trace element speciation in waters. **Analyst**, v. 111, p. 489-599, 1986.
- [29] NÜRNBERG, H. W. Investigations on heavy metal speciation in natural waters by voltammetric procedures. **Fresenius' Journal of Analytical Chemistry**, v. 316, n. 6, p. 557-565, 1983.
- [30] WANG, J.; FARIAS, P. A. M.; MAHMOUD, J. S. Stripping voltammetry of aluminum based on adsorptive accumulation of its solochrome violet RS complex at the static mercury drop electrode. **Analytica Chimica Acta**, v. 172, p. 57-64, 1985.
- [31] YANG, C. **Synthesis, purification and characterisation of Solochrome Violet RS**. 2000. 97f. University of Regina, 2000.
- [32] VAN DEN BERG, C. M. G.; MURPHY, K.; RILEY, J.P. The determination of aluminum in seawater and freshwater by cathodic stripping voltammetry. **Analytica Chimica Acta**, v. 188, p. 177-185, 1986.
- [33] BOUSSEMART, M.; VAN DEN BERG, C. M. G.; GHADDAF, M. The determination of the chromium speciation in sea water using catalytic cathodic stripping voltammetry. **Analytica Chimica Acta**, v. 262, p. 103-115, 1992.
- [34] SANDER, S.; NAVRATIL, T.; NOVOTNY, L. Study of the complexation, adsorption and electrode reaction mechanisms of chromium(VI) and (III) with DTPA under adsorptive stripping voltammetric conditions. **Electroanalysis**, v. 15 (19), p. 1513-1521, 2003.
- [35] GRABARCZYK, M.; KOROLCZUK, M. Modification of catalytic adsorptive stripping voltammetric method of hexavalent chromium determination in the presence of DTPA and nitrate. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 376 (7), p. 1115-1118, 2003.

- [36] SANDER, S. et al. Electrosorption of chromium-diethylenetriaminepentaacetic acid on mercury electrode under voltammetric conditions. **Electroanalysis**, v. 14 (15-16), p. 1133-1137, 2002.
- [37] KOROLCZUK, M. How faster and cheaper to determine chromium by adsorptive cathodic stripping voltammetry in the presence of DTPA and nitrate. **Fresenius Journal of Analytical Chemistry**, v. 367 (8), p. 761-762, 2000.
- [38] DOMINGUEZ, O.; SANLLORENTE, S.; ARCOS, M.J. Application of an optimization procedure of adsorptive stripping voltammetry for the determination of chromium in wine. **Electroanalysis**, v. 11 (17), p. 1273-1279, 1999.
- [39] HUSÁKOVÁ, L. et al. Catalytic adsorptive stripping voltammetry versus electrothermal atomic absorption spectrometry in the determination of trace cobalt and chromium in human urine. **Talanta**, v. 66, p. 999-1004, 2005.
- [40] MEYER, A.; NEEB, R. Determination of cobalt (and nickel) by adsorption voltammetry in supporting electrolytes containing triethanolamine and dimethylglyoxime. **Fresenius' Zeitschrift für Analytische Chemie**, v. 315, p. 118-120, 1983.
- [41] KOROLCZUK, M. et al. Adsorptive stripping voltammetry of nickel and cobalt at in situ plated lead film electrode. **Electrochemistry Communications**, v. 7, p. 1185-1189, 2005.
- [42] KIPTOO, J. K.; NGILA, J. C.; SAWULA, G. M. Speciation studies of nickel and chromium in wastewater from an electroplating plant. **Talanta**, v. 64, p. 54-59, 2004.

- [43] DANTAS, A. F. **Uso do ácido violeta de alizarina N como reagente espectrofotométrico na determinação de alumínio e cobalto**. 1997. 97f. Dissertação (Mestrado em Química) – Universidade Federal da Bahia, Bahia, 1997.
- [44] LOCATELLI, C. Simultaneous determination of aluminum and iron in high salt content matrices by adsorptive stripping voltammetry. Application to dialysis fluids. **Electroanalysis**, v. 15, n. 17, p. 1397-1402, 2003.
- [45] WANG, X. et al. Determination of the speciation of aluminum (III) in natural waters by adsorption stripping voltammetry and complexation with Al^{III}-solochrome violet RS. **Analytica Chimica Acta**, v. 449, p. 35-44, 2001.
- [46] WILLARD, H. H.; DEAN, J. A. Polarographic Determination of Aluminum. **Analytical Chemistry**, v. 22, n. 10, p. 1264-1267, 1950.
- [47] GHONEIM, N. M. et al. Simultaneous determination of Cd, Pb, Cu, Sb, Bi, Se, Zn, Mn, Ni, Co and Fe in water samples by differential pulse stripping voltammetry at a hanging mercury drop electrode. **Fresenius' Journal of Analytical Chemistry**, v. 367(4), p. 378-383, 2000.
- [48] HARRIS, D. C. **Química analítica quantitativa**. 5ª ed, Rio de Janeiro: LTC, p. 402-430, 2001.
- [49] VAN DEN BERG, C. M. G.; **In chemical Oceanography**; Riley, J. P., Ed.; London, Academic Press, p. 198, 1988.
- [50] COLOMBO, C.; VAN DEN BERG, C. M. G. Simultaneous determination of several trace metals in seawater using cathodic stripping voltammetry with mixed ligands. **Analytica Chimica Acta**, v. 337, p. 29-40, 1997.
- [51] MELUCCI, D.; LOCATELLI, C. Sequential voltammetric determination of trace metals in meals. **Microchemical Journal**, v. 85, p. 321-328, 2007.

- [52] LOCATELLI, C. Possible interference in the sequential voltammetric determination at trace and ultratrace concentration of platinum group metals (PGMs) and lead: application to environmental matrices. **Electrochimica Acta**, v. 52, p. 614-622, 2006.
- [53] LOCATELLI, C. Heavy metals in matrices of food interest: sequential voltammetric determination at trace and ultratrace level of copper, lead, cadmium, zinc, arsenic, selenium, manganese and iron in meals. **Electroanalysis**, v. 16, n. 18, p. 1478-1486, 2004.
- [54] LOCATELLI, C.; MELUCCI, D.; TORSI G. Determination of platinum-group metals and lead in vegetable environmental bio-monitors by voltammetric and spectroscopic techniques: critical comparison. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 382, p. 1567-1573, 2005.
- [55] LOCATELLI, C. Simultaneous square wave stripping voltammetric determination of platinum group metals (PGMs) and lead at trace and ultratrace concentration level application to surface water. **Analytica Chimica Acta**, v. 557, p. 70-77, 2006.
- [56] SANDER, S.; WAGNER, W.; HENZE, G. Direct determination of uranium traces by adsorptive stripping voltammetry. **Analytica Chimica Acta**, v. 305 (1-3), p. 154-158, 1995.
- [57] CAVICCHIOLI, A.; GUTZ, I. G. R. O uso de radiação ultravioleta para o pré-tratamento de amostras em análise inorgânica. **Química Nova**, v. 26, n. 6, p. 913-921, 2003.
- [58] MARQUES, M. S. **Metodologia analítica para o estudo da interação de cádmio e chumbo com alguns aminoácidos presentes em soluções de nutrição parenteral**. 2005. 169f. Tese (Doutorado em Química Analítica) – Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2005.

- [59] MILL, T.; HENDRY, D. G.; RICHARDSON, H. Free-radical oxidants in natural-waters. **Science**, v. 207 (4433), p. 886-887, 1980.
- [60] KLÖPFER, W.; KOHL, E. G. Bimolecular OH rate constants of organic compounds in solution – Measurements in water using hydrogen peroxide as an OH source. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 22, p. 67-78, 1991.
- [61] GOLIMOWSKI, J.; GOLIMOWSKA, K. UV-photooxidation as pretreatment step in inorganic analysis of environmental samples. **Analytica Chimica Acta**, v. 325, p. 111-133, 1996.
- [62] PERÓXIDO DE HIDROGÊNIO. Disponível em: <<http://www.h2o2.com>>. Acesso em: 04 junho 2007.
- [63] CALVOSA, L.; MONTEVERDI, A.; RINDOME, B.; RIVA, G. Ozone oxidation of compounds resistant to biological degradation. **Water Research**, v. 25, n. 8, p. 985-993, 1991.
- [64] AGUER, J. P.; RICHARD, C.; ANDREUX, F. Effect of light on humic substances: production of reactive species. **Analysis**, v. 27, n. 5, p. 387-390, 1999.
- [65] ACHTERBERG, E. P.; VAN DEN BERG, C. M. G. In-line ultraviolet-digestion of natural water samples for trace metal determination using an automated voltammetric system. **Analytica Chimica Acta**, v. 291, p. 213-232, 1994.
- [66] SONA, M.; BAUS, C.; BRAUCH, H.J. UV irradiation versus combined UV/hydrogen peroxide and UV/ozone treatment for the removal of persistent organic pollutants from water. **Internacional Conference Ozone and UV**, p. 69-76, 2006.

- [67] SCULLY, N. M. et al. Hydrogen peroxide formation: The interaction of ultraviolet radiation and dissolved organic carbon in lake waters along a 43-75 °N gradient. **Limnology and Oceanography**, v. 41, n. 3, p. 540-548, 1996.
- [68] WHITEHEAD, R. F.; MORA, S. Marine photochemistry and UV radiation. **Environmental Science and Technology**, n. 14, p. 37-60, 2000.
- [69] KAUTSKY, H.; MURRAY, C. N. Artificial radioactivity in the North-Sea. **Atomic Energy Review**, n. 2, p. 63-105, 1981.
- [70] HAAG, W. R.; HOIGNÉ, J. Singlet oxygen in surface waters .3. photochemical formation and steady-state concentrations in various types of waters. **Environmental Science & Technology**, v. 20, n. 4, p. 341-348, 1986.
- [71] MERKEL, P. B.; KEARNS, D. R. Radiationless decay of singlet molecular-oxygen in solution. Experimental and theoretical study of electronic-to-vibrational energy transfer. **Journal of the American Chemical Society**, v. 94, n. 21, p. 7244-7253, 1972.
- [72] BAXTER, R. M.; CAREY, J. H. Evidence for photochemical generation of superoxide ion in humic waters. **Nature**, v. 306 (5943), p. 575, 1983.
- [73] COOPER, W.J. et al. Factors affecting the distribution of H₂O₂ in surface waters. **Environmental Chemistry of Lakes and Reservoirs**, ser. 237, p. 393-422. 1994.
- [74] ARAÚJO, F. V. F.; YOKOYAMA, L. Remoção de cor em soluções de corantes reativos por oxidação com H₂O₂/UV. **Química Nova**, v. 29, n. 1, p.11-14, 2006.
- [75] ACHTERBERG, E. P. et al. UV digestion of seawater samples prior to the determination of copper using flow injection with chemiluminescence detection. **Analytica Chimica Acta**, v. 440, p. 27-36, 2001.

- [76] AL-ANANZEH, N. M. **Oxidation processes: experimental study and theoretical investigations**. Dissertation (Doctor in Chemical Engineering) – Worcester Polytechnic Institute, 2004.
- [77] RODRIGUEZ, M. **Fenton and UV-vis based advanced oxidation processes in wastewater treatment: Degradation, mineralization and biodegradability enhancement**. Programa de Doctorado de Ingeniería Química Ambiental – Universitat de Barcelona, Facultat de Química, Barcelona, 2003.
- [78] HISLOP K.A.; BOLTON, J.R. The Photochemical Generation of Hydroxyl Radicals in the UV-vis/Ferrioxalate/H₂O₂ System. **Environmental Science & Technology**, v. 33, n. 18, p. 3119-3126, 1999.
- [79] ESPLUGAS, S. J. et al. Comparison of different advanced oxidation processes for phenol degradation. **Water Research**, v. 36, n. 4, p. 1034-1042, 2002.
- [80] CARVALHO, C. W. **Avaliação de procedimentos de digestão para determinação voltamétrica de traços metálicos em aminoácidos usados em nutrição parenteral-aplicação na determinação de cádmio e chumbo**. 2004. 119f. Dissertação (Mestrado em Química Analítica) – Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2004.
- [81] POULIOS, I. et al. Photooxidation of eosin Y in the presence of semiconducting oxides. **Applied Catalysis B: Environmental**, v. 41, n. 4, p. 345-355, 2003.
- [82] MACHADO, A. E. H. et al. Destruction of the organic matter present in effluent from a cellulose and paper industry using photocatalysis. **Photochemical and Photobiological A: Chemistry**, v. 155, n. 1-3, p. 231-241, 2003.
- [83] FRIMMEL, F. H. et al. Anwendung der Adsorptionsanalyse auf natürliche organische Wasserinhaltsstoffe. **Vom Wasser**, v. 79, p. 237 – 248, 1992.

- [84] SODRÉ, F. F.; PERALTA-ZAMORA, P. G.; GRASSI, M. T. Digestão fotoquímica, assistida por microondas, de águas naturais: aplicação em estudos de partição e especiação do cobre. **Química Nova**, v. 27, n. 5, p. 695-700, 2004.
- [85] KOLB, M.; RACH, P.; SCHÄFER, J.; WILD, A. Investigation of oxidative UV photolysis. **Fresenius' Journal of Analytical Chemistry**, v. 342, p. 341-349, 1992.
- [86] KOTZIAS, D.; PARALAR, H.; KORTE, F. Photoreaktivität organischer Chemikalien in wäßrigen Systemen in Gegenwart von Nitraten und Nitriten. **Nature Wissenschaften**, v.69, n. 9, p. 444-445, 1982.
- [87] WANG, F.; HAAG, W. Comparison of commercial UV lamps for radical oxidation and direct photolysis in water. **Lawrence Livermore National Laboratory**, p. 1-13, 1999.
- [88] MORIMOTO, Y. et al. Recent progress on UV lamps for industries. **R&D Center, Lamp Company Ushio Inc.**, p. 1008-1015, 2004.
- [89] BATLEY, G.E.; FARRAR, Y.J.; Irradiation techniques for the release of bound heavy metals in natural waters and blood. **Analytica Chimica Acta**, v. 99, p. 283-292, 1978.
- [90] LIXIONG, L.; CHEN, P.; GLOYNA, E. F. Generalized kinetic model for oxidation of organic compounds. **AIChE Journal**, v. 37, n. 11, p. 1687- 1697, 1991.
- [91] SAUR, D. **Sample Preparation Techniques in Voltammetric Analysis**; Bruttel, P. A.; Schäfer, J, eds.; Metrohm: Herisau, p. 5, 1992.
- [92] KOTRLY, S. **Handbook of chemical equilibria in analytical chemistry**. 1th. ed., Ed. Ellis Horwood Limited, West Sussex, England, p. 376-379, 1985.

- [93] ZIMMERMANN, S. et al. Trace analysis of platinum in biological samples: a comparison between sector field ICP-MS and adsorptive cathodic stripping voltammetry following different digestion procedures. **Analytica Chimica Acta**, v. 439, p. 203-209, 2001.
- [94] CARVALHO, L. M. et al. Determination of aluminum as contaminant in dialysis concentrates by adsorptive cathodic stripping voltammetry. **Analytica Chimica Acta**, v. 546, p. 79-84, 2005.
- [95] SAVORY, J., WILLS, M.R. Aluminum and chronic failure: sources, absorption, transport and toxicity. **Critical Reviews in Analytical Chemistry**, v. 27, n. 1, p. 59-107, 1989.
- [96] SPENGLER, C. **Determinação voltamétrica de metais em água e fluidos biológicos empregando foto-decomposição das amostras com radiação ultravioleta**. 2007. 68f. Monografia (Graduação em Química Industrial) - Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2007.
- [97] WANG, J.; FARIAS, P. A. M.; MAHMOUD, J. S. Trace measurements of calcium, magnesium, strontium and barium, based on stripping voltammetry adsorptive accumulation. **Journal of Electrochemical Chemistry**, v. 195, p. 165-173, 1985.
- [98] JAGNER, D.; RENMAN, L.; STEFANSDOTTIR, S. H. Determination of iron(III) and titanium(IV) as their solochrome violet RS complexes by constant-current stripping potentiometry .1. automated single-point calibration method for iron(III). **Analytica Chimica Acta**, v. 281 (2), p. 305-314, 1993.
- [99] JAGNER, D.; RENMAN, L.; STEFANSDOTTIR, S. H. Determination of iron(III) and titanium(IV) as their solochrome violet RS complexes by constant-current stripping potentiometry .2. partial least-squares regression calibration procedure for iron(III) and titanium(IV). **Analytica Chimica Acta**, v. 281 (2), p. 315-321, 1993.

- [100] FARIAS, P.; TAKASE, I. Cathodic stripping voltammetry of vanadium based on adsorptive accumulation of its solochrome violet RS complex at the static mercury drop electrode. **Electroanalysis**, v. 4, p. 823-828, 1992.
- [101] GALLERY, E. D. M.; BLOMFIELD, J.; DIXON, S.R. Acute zinc toxicity in hemodialysis. **British Medical Journal**, v. 4, p. 331-333, 1972.
- [102] LOCATELLI, C. Voltammetric methods for the simultaneous determination of trace metals in foods, plant tissues and soils. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 87, n. 2, p. 305-312, 2006.
- [103] BERTAGNOLLI, D. **Avaliação da intoxicação por alumínio na dieta alimentar e medicamentos de pacientes com insuficiência renal crônica**. 2004. 96f. Dissertação (Mestrado em Química) – Universidade Federal de Santa Maria – UFSM, Santa Maria, 2004.
- [104] ŠČANČAR, J. et al. Total metal concentrations in serum of dialysis patients and fractionation of Cu, Rb, Al, Fe and Zn in spent continuous ambulatory peritoneal dialysis fluids. **Talanta**, v. 59, p. 355-364, 2003.
- [105] JOST, C. L. **Determinação simultânea de Al(III) e Fe(III) em fluidos pós-hemodiálise empregando espectrofotometria e métodos de calibração multivariada**. 2005. 74f. Dissertação (Mestrado em Química Analítica) - Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2005.
- [106] PATRIARCA, M. et al. Recent developments in trace element analysis in the prevention, diagnosis, and treatment of diseases. **Microchemical Journal**, v. 59, p. 194-202, 1998.
- [107] D'HAESE, P. C.; DE BROE, M. E. Adequacy of dialysis: trace elements in dialysis fluids. **Nephrology Dialysis Transplantation**, v. 11, n. 2, p. 92-97, 1996.

- [108] YU, B. et al. Separation and detection of erythropoietin by CE and CE-MS. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 24, n. 4, p. 350-357, 2005.
- [109] PILAU, E. J. **Desenvolvimento de novas metodologias para a especificação de arsênio em águas e matrizes salinas empregando voltametria adsortiva de redissolução catódica**. 2005. 92f. Dissertação (Mestrado em Química Analítica) – Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2005.
- [110] CIENFUEGOS, F. **Estatística Aplicada ao Laboratório**. 1ª ed, Rio de Janeiro: Interciência, 2005.
- [111] BOHRER, D. Alumínio em diálise – Uma visão analítica. **Jornal Brasileiro de Nefrologia**, v. 19 (3), p. 264-270, 1997.
- [112] NIEBOER, E.; RICHARDSON, D. H. S. The replacement of the nondescript term “heavy metal” by a biologically and chemically significant classification of Metal Ions. **Environmental Pollution Series B: Chemical and Physical**, v. 1, p. 3-26, 1980.
- [113] TEMPLETON, D. M. et al. Guidelines for terms related to chemical speciation and fractionation of elements. Definitions, structural, aspects, and methodological approaches. **Pure and Applied Chemistry**, v. 72, n. 8, p. 1453-1470, 2000.
- [114] ACHTERBERG, E.; BRAUNGARDT, C. Stripping voltammetry for determination of trace metal speciation and in-situ measurements of trace metal distributions in marine waters. **Analytica Chimica Acta**, v. 400, p. 381-397, 1999.

ANEXOS

ANEXO A – Método 1: Parâmetros utilizados na determinação de Al e Fe na análise seqüencial

=====METROHM 746 VA TRACE ANALYZER (5.746.C101) =====

OPERATION SEQUENCE

Instructions		t/s	Main parameters		Auxiliary parameters	
1	SMPL/M		V.fraction	10.000 mL	V.total	10.8 mL
2	DOS/M		V.added	0.750 mL		
3	PURGE					
4	STIR	300.0	Rot.speed	2000 /min		
5	(ADD					
6	PURGE					
7	STIR	10.0	Rot.speed	2000 /min		
8	OPURGE					
9	(REP					
10	SEGMENT		Segm.name	Al e Fe		
11	REP)0					
12	ADD>M		Soln.name	Al_Std	V.add	0.100 mL
13	ADD)3					
14	END					

SEGMENT Al e Fe

Instructions		t/s	Main parameters		Auxiliary parameters	
1	STIR	5.0	Rot.speed	2000 /min		
2	HMDE		Drop size	9	Meas.cell	normal
3	DPMODE		U.ampl	-50 mV	t.meas	20.0 ms
			t.step	0.10 s	t.pulse	40.0 ms
4	MEAS		U.meas	-100 mV		
5	OSTIR	10.0				
6	SWEEP	15.3	U.start	-100 mV	U.step	4 mV
			U.end	-700 mV	Sweep rate	40 mV/s
7	OMEAS		U.standby	mV		
8	END					

ANEXO B – Método 2: Parâmetros utilizados na determinação de Zn, Cd, Pb e Cu na análise seqüencial

===== METROHM 746 VA TRACE ANALYZER (5.746.C101) =====

OPERATION SEQUENCE

Instructions		t/s	Main parameters		Auxiliary parameters	
-----		----	-----		-----	
1	SMPL/M		V.fraction	10.000 mL	V.total	11.0 mL
2	DOS/M		V.added	1.000 mL		
3	PURGE					
4	STIR	300.0	Rot.speed	2000 /min		
5	(ADD					
6	PURGE					
7	STIR	30.0	Rot.speed	2000 /min		
8	0PURGE					
9	(REP					
10	SEGMENT		Segm.name	ASV		
11	REP)0					
12	ADD>M		Soln.name	ZnCdPbCu	V.add	0.100 mL
13	ADD)3					
14	END					

SEGMENT
ASV

Instructions		t/s	Main parameters		Auxiliary parameters	
-----		----	-----		-----	
1	STIR	5.0	Rot.speed	2000 /min		
2	HMDE		Drop size	4	Meas.cell	normal
3	DPMODE		U.ampl	50 mV	t.meas	20.0 ms
			t.step	0.10 s	t.pulse	40.0 ms
4	MEAS	60.0	U.meas	-1150 mV		
5	0STIR	5.0				
6	SWEEP	21.9	U.start	-1150 mV	U.step	6 mV
			U.end	150 mV	Sweep rate	60 mV/s
7	0MEAS		U.standby	mV		
8	END					

ANEXO C – Método 3: Parâmetros utilizados na determinação de Ni na análise seqüencial

===== METROHM 746 VA TRACE ANALYZER (5.746.C101) =====

OPERATION SEQUENCE

Instructions	t/s	Main parameters	Auxiliary parameters
1 SMPL/M		V.fraction 10.000 mL	V.total 10.6 mL
2 DOS/M		V.added 0.600 mL	
3 PURGE			
4 STIR	300.0	Rot.speed 2000 /min	
5 (ADD			
6 PURGE			
7 STIR	10.0	Rot.speed 2000 /min	
8 OPURGE			
9 (REP			
10 SEGMENT		Segm.name Ni_AdCSV	
11 REP)0			
12 ADD>M		Soln.name Ni_Std	V.add 0.010 mL
13 ADD)3			
14 END			

SEGMENT
Ni_AdCSV

Instructions	t/s	Main parameters	Auxiliary parameters
1 STIR	5.0	Rot.speed 2000 /min	
2 HMDE		Drop size 4	Meas.cell normal
3 DPMODE		U.ampl -50 mV	t.meas 20.0 ms
		t.step 0.30 s	t.pulse 40.0 ms
4 MEAS	90.0	U.meas -550 mV	
5 OSTIR	10.0		
6 SWEEP	33.6	U.start -550 mV	U.step 6 mV
		U.end -1200 mV	Sweep rate 20 mV/s
7 OMEAS		U.standby mV	
8 END			

ANEXO D – Método 4: Parâmetros utilizados na determinação de TI na análise seqüencial

===== METROHM 746 VA TRACE ANALYZER (5.746.C101) =====

OPERATION SEQUENCE

Instructions	t/s	Main parameters	Auxiliary parameters
1 SMPL/M		V.fraction 10.000 mL	V.total 11.5 mL
2 DOS/M		V.added 1.500 mL	
3 PURGE			
4 STIR	300.0	Rot.speed 2000 /min	
5 (ADD			
6 PURGE			
7 STIR	10.0	Rot.speed 2000 /min	
8 OPURGE			
9 (REP			
10 SEGMENT		Segm.name TI_ASV	
11 REP)0			
12 ADD>M		Soln.name TI_Std	V.add 0.100 mL
13 ADD)3			
14 END			

SEGMENT
TI_ASV

Instructions	t/s	Main parameters	Auxiliary parameters
1 STIR	5.0	Rot.speed 2000 /min	
2 HMDE		Drop size 4	Meas.cell normal
3 DPMODE		U.ampl 50 mV	t.meas 20.0 ms
		t.step 0.30 s	t.pulse 40.0 ms
4 MEAS	180.0	U.meas -800 mV	
5 OSTIR	10.0		
6 SWEEP	30.9	U.start -800 mV	U.step 6 mV
		U.end -200 mV	Sweep rate 20 mV/s
7 OMEAS		U.standby mV	
8 END			