



UFSM

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

**AVALIAÇÃO DE PROCEDIMENTOS DE DIGESTÃO
PARA DETERMINAÇÃO VOLTAMÉTRICA DE
TRAÇOS METÁLICOS EM AMINOÁCIDOS USADOS
EM NUTRIÇÃO PARENTERAL – APLICAÇÃO NA
DETERMINAÇÃO DE CÁDMIO E CHUMBO**

Claudia Wollmann Carvalho

PPGQ

Santa Maria, RS, BRASIL

2004

**AVALIAÇÃO DE PROCEDIMENTOS DE DIGESTÃO
PARA DETERMINAÇÃO VOLTAMÉTRICA DE
TRAÇOS METÁLICOS EM AMINOÁCIDOS USADOS
EM NUTRIÇÃO PARENTERAL – APLICAÇÃO NA
DETERMINAÇÃO DE CÁDMIO E CHUMBO**

por

Claudia Wollmann Carvalho

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 a obtenção do grau de
Mestre em Química

PPGQ

Santa Maria, RS, Brasil

2004

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

A Comissão Examinadora, abaixo assinada,
aprova a Dissertação de Mestrado

**AVALIAÇÃO DE PROCEDIMENTOS DE DIGESTÃO
PARA DETERMINAÇÃO VOLTAMÉTRICA DE TRAÇOS
METÁLICOS EM AMINOÁCIDOS USADOS EM
NUTRIÇÃO PARENTERAL – APLICAÇÃO NA
DETERMINAÇÃO DE CÁDMIO E CHUMBO**

elaborada por
Claudia Wollmann Carvalho

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

COMISSÃO EXAMINADORA:

Prof. Dr. Paulo Cícero do Nascimento
(Orientador)

Prof. Dr. Leandro Machado de Carvalho

Prof^a. Dra. Solange Garcia Pomblum

Santa Maria, 17 de setembro de 2004.

Agradeço as pessoas
que me apoiaram de todas as formas e
que um dia estiveram junto a mim, mas
hoje não podem estar presentes.

A minha mãe pelo intenso apoio durante esta e todas as batalhas que foram superadas. Especialmente ao meu marido Marcelo, pelo amor, carinho, conselhos e pela crença em mim.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Paulo Cícero do Nascimento, pela orientação neste trabalho, pelos conselhos profissionais, pela amizade, dedicação e apoio demonstrado ao longo deste tempo.

Aos colegas e amigos Marieli Marques, Adrian Ramirez, Luciana Del Fabro, Joselito Trevisan, Emilene Becker, Denise Bertagnolli, Cristiane Jost, Vânia Polli, Zilda Baratto, Fernanda Depoi, Jean Karlo Mendonça, Eduardo Pilau, Maurício Hilgemann, Sabrina Schirmer, Sandra Maria Ribeiro, Morgana Dessuy, Raquel, Mareni pela amizade, apoio e momentos de descontração vividos ao longo deste período em que trabalhamos juntos.

Às amigas, de todas as horas, Nádia de Monte Baccar, Ana Lúcia Becker Rohlfes, Cristine Wickert, Diana Ströher, Michele Presta.

Aos colegas e amigos da Universidade de Santa Cruz do Sul pelo apoio e incentivo depositados em mim e à Universidade Federal de Santa Maria pela oportunidade oferecida de realizar o curso de mestrado.

A Deus por ter me ajudado com muita saúde e força de vencer. Muito obrigado.

RESUMO

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

AVALIAÇÃO DE PROCEDIMENTOS DE DIGESTÃO PARA DETERMINAÇÃO VOLTAMÉTRICA DE TRAÇOS METÁLICOS EM AMINOÁCIDOS USADOS EM NUTRIÇÃO PARENTERAL – APLICAÇÃO NA DETERMINAÇÃO DE CÁDMIO E CHUMBO

Autor: Claudia Wollmann Carvalho

Orientador: Paulo Cícero do Nascimento

Data e Local da Defesa: Santa Maria, 17 de setembro de 2004.

Neste trabalho, investigou-se a interação de todos os aminoácidos que compõem as soluções de nutrição parenteral com os metais cádmio e chumbo com o objetivo de determinar quais os níveis de contaminação e se eles são relevantes, podendo apresentar alguma toxicidade aos pacientes. Não há dados que comprove o limite permitido desses metais nessas soluções, mas a legislação brasileira, através do Ministério da Saúde, estipula que a concentração máxima de cádmio e chumbo em água potável não ultrapasse $5 \mu\text{g L}^{-1}$ e $10 \mu\text{g L}^{-1}$, respectivamente.

O presente trabalho é uma contribuição à quantificação de Cd e Pb em soluções de aminoácidos constituintes das formulações de Nutrição Parenteral (NP), propondo então, um método de *cleanup* para essas amostras que permita a determinação dos íons metálicos Cd e Pb através de medidas eletroquímicas por voltametria de redissolução.

Os aminoácidos são compostos orgânicos que interferem na determinação da concentração desses metais por voltametria, principalmente pela formação de fortes complexos com os metais ou competindo com o metal pela superfície do eletrodo, ou ainda, por redução ou oxidação eletroquímica na superfície do eletrodo.

Deste modo, diversas metodologias foram estudadas, utilizando digestão via úmida, radiação por microondas e radiação UV como pré-tratamentos das amostras de aminoácidos para alcançar a mineralização completa das amostras para a viabilização da análise voltamétrica das mesmas.

Portanto, para realizar as medidas voltamétricas, foi necessário trabalhar com baixas concentrações dos aminoácidos (Ile, Arg, Leu, Ala, Asp, Orn, Ser, Met, Tyr, Trp, Pro, Cys, Glu, Gly, Thr, Phe, Lys, His, Asn), na qual as soluções variaram na faixa de 0,01 a 6 g L⁻¹.

Os aminoácidos foram analisados individualmente e foi observado que com o pré-tratamento utilizando radiação UV obteve-se os melhores resultados. Através da adição de padrão, conseguiu-se obter maiores recuperações dos metais em estudo.

O tempo de irradiação UV mais eficaz foi de oito horas adicionado de peróxido de hidrogênio e ácido sulfúrico durante o período de irradiação.

Para os aminoácidos fenilalanina, ácido glutâmico, ácido aspártico, treonina, leucina, arginina, cisteína e histidina com a concentração variando na faixa de 3 a 25% da usualmente usada nas formulações de NP, foi possível determinar a contaminação por cádmio e chumbo presentes nestes aminoácidos. As concentrações encontradas foram: 0,15 nmol L⁻¹, 38 nmol L⁻¹, 49 nmol L⁻¹, 0,77 nmol L⁻¹, 0,32 μmol L⁻¹, 1,31 μmol L⁻¹, 11,1 nmol L⁻¹, 81,6 nmol L⁻¹ respectivamente de cádmio. Na determinação de chumbo os resultados encontrados foram: 3,04 μmol L⁻¹ na Phe, 53 nmol L⁻¹ em Glu, 42 nmol L⁻¹ em Asp, 0,78 μmol L⁻¹ em Tre, 1,56 μmol L⁻¹ em Arg, 1,4 nmol L⁻¹ em Cys e 21,5 nmol L⁻¹ em His.

A origem desta contaminação pode ser atribuída a diversos fatores, como na síntese do produto, tipo de embalagem (frasco e/ou tampa), processo de esterilização entre outros, sendo necessário uma investigação aprofundada para afirmar com certeza.

Com os resultados obtidos nos pré-tratamentos testados, pode-se concluir que em formulações contendo somente os aminoácidos ornitina, metionina, serina, tirosina, triptofano e prolina é possível determinar diretamente a contaminação existente de cádmio e chumbo sem necessidade de *cleanup*.

O pré-tratamento das amostras utilizando digestão por irradiação UV foi eficiente para a maioria dos aminoácidos estudados, o qual obteve recuperação acima de 75 % do sinal para ambos os metais. Para o aminoácido asparagina, a recuperação do sinal dos metais foi abaixo de 60%, para isoleucina foi de aproximadamente 65%.

Entre os dezenove aminoácidos analisados individualmente, alguns apresentaram contaminação por esses metais pesados, consideradas tóxicas ao organismo.

ABSTRACT

Master Dissertation in Chemistry
Post-Graduate In Chemistry
Federal University Of Santa Maria

EVALUATION OF DIGESTION PROCEDURES FOR VOLTAMMETRIC DETERMINATION OF METALLIC IONS IN AMINO ACIDS USED IN PARENTERAL NUTRITION - APPLICATION IN THE CADMIUM AND LEAD DETERMINATION

Author: Claudia Wollmann Carvalho
Advisor: Paulo Cicero do Nascimento
Santa Maria, September 17, 2004.

In this work, the interaction of all the amino acids that compose the parenteral nutrition solutions, was investigated with the cadmium and lead metals, with the objective of determining the levels of contamination and if they are important, representing some damage to the patients. There are not data that show the allowed limit of these metals in those solutions, but the Brazilian legislation, through Health Department, stipulates that the maximum cadmium and lead concentration in drinking water can not surpass $5 \mu\text{g L}^{-1}$ and $10 \mu\text{g L}^{-1}$, respectively.

The present work is a contribution to the quantification of Cd and Pb in amino acids solutions that constitute the NP formulations, proposing then, a cleanup method for those samples that allows the determination of Cd and Pb metallic ions through electrochemistries measurements by voltammetric redissolution.

The amino acids are organic compounds that interfere in the determination of the concentration of those metals by voltammetric methods, mainly because of the formation of fort complexes with metals or because of the competition with the metal by the surface of the eletrodo, or, because of the electrochemistry reduction or oxidation of the eletrodo surface.

This way, several methodologies were studied, using humid saw digestion, microwaves radiation and UV radiation as pre-treatments of the amino acids samples to reach the complete mineralization of these to viable the voltammetric analysis of them.

Therefore, to accomplish the voltammetric measurements, it was necessary to work with low amino acids concentrations (Ile, Arg, Leu, Ala, Asp, Orn, Ser, Met, Tyr, Trp, Pro, Cys, Glu, Gly, Thr, Phe, Lys, His, Asn), in solutions that varied from 0,01 to 6 g L⁻¹.

The amino acids were individually analyzed and we observed that with the pre-treatment using UV radiation we obtained the best results. Through the pattern addition, we got the largest recoveries of the metals in study.

The time of UV irradiation more effective was of eight hours added with hydrogen peroxide and sulfuric acid during the irradiation period.

For the phenilalanina, glutamic acid, aspartic acid, treonine, leucine, arginine, cystein and histidine with concentration from 3 to 25% of the usually used in NP formulations, it was possible to determine the cadmium and lead contamination in these amino acids. We found the following concentrations: 0,15 nmol L⁻¹, 38 nmol L⁻¹, 49 nmol L⁻¹, 0,77 μmol L⁻¹, 0,32 μmol L⁻¹, 1,31 μmol L⁻¹, 11,1 nmol L⁻¹, 81,6nmol L⁻¹ respectively of cadmium. In the lead determination we found: 3,04 μmol L⁻¹ in Phe, 53 nmol L⁻¹ in Glu, 42 nmol L⁻¹ in Asp, 0,78 μmol L⁻¹ in Tre, 1,56 μmol L⁻¹ in Arg, 1,4 nmol L⁻¹ in Cys and 21,5 nmol L⁻¹ in His.

The origin of this contamination can be attributed to several factors, as to synthesis of the product, packing type (flask and/or covers), sterilization process among others, being necessary an investigation to affirm it certainly.

With the results obtained in the tested pre-treatments, we could conclude that in formulations containing only ornitine, metionine, serine, tyrosine, triptofan and proline is possible to determine directly the cadmium and lead contamination, without using cleanup.

The pre-treatment of samples using digestion by UV irradiation were efficient for most of the studied amino acids, which we obtained recovery sign for both metals above 75%. For asparagine, the recovery sign of the metals was below 60%, for isoleucine it was of, approximately, 65%.

Among the nineteen amino acids individually analyzed, not all presented contamination of those heavy metals considered toxicant to the organism.

SUMÁRIO

Agradecimentos	iii
Resumo	iv
Abstract.....	vii
Lista de figuras	xiv
Lista de tabelas	xv
Lista de siglas e abreviações.....	xvi
1 Introdução	1
2 Revisão Bibliográfica.....	3
2.1 Nutrição Parenteral	3
2.2 Aplicação das soluções de NP	3
2.3 Complicações da NP	5
2.4 Preparo das soluções NP	6
2.5 Aminoácidos.....	7
2.5.1 Definição e configuração.....	7
2.5.2 Classificação	8
2.5.2.1 Teoria HSAB (ácidos e bases/duros e moles)	11
2.5.3 Ligações metais-aminoácidos.....	13
2.6 Toxicidade do Chumbo	13
2.6.1 Toxicocinética do Chumbo.....	14
2.7 Toxicidade do Cádmio	18
2.7.1 Toxicocinética do Cádmio.....	19
2.8 Determinação de metais por Voltametria	20
2.9 A destruição da matéria orgânica por radiação UV	22
2.9.1 Oxidantes formados sob influência da radiação UV	23
2.9.1.1 Oxigênio singlete.....	23

2.9.1.2 Radicais superóxidos O^{-2} e radicais alquilperóxidos RO_2	25
2.9.1.3 Ozônio	26
2.9.1.4 Radicais $\cdot OH$ e H_2O_2	28
2.9.2 Fontes de radiação UV	31
2.9.2.1 Lâmpadas de baixa pressão	33
2.9.2.2 Lâmpadas de média e alta pressão.....	33
2.9.3 Classificação dos aparelhos de digestão.....	33
2.9.4 Aplicação da fotooxidação UV	34
2.9.5 Determinação de metais	36
2.10 Digestão de amostras por decomposição via úmida.....	37
2.11 Digestão de amostras assistida por microondas.....	39
3 Materiais e Métodos	41
3.1 Instrumentação	41
3.2 Reagentes e Soluções	41
3.2.1 Preparo das soluções.....	43
3.3 Cuidados com a contaminação	44
3.4 Reagentes e soluções para ensaios voltamétricos.....	44
3.5 Soluções de nutrição parenteral.....	45
3.6 Procedimentos.....	46
3.6.1 Incubação dos metais Cd e Pb na presença dos aminoácidos	46
3.6.2 Ensaio voltamétrico.....	46
3.6.2.1 Eletrólitos utilizados.....	46
3.6.2.2 Efeito do tamanho da área do eletrodo de Hg	47
3.6.2.3 Efeito do tempo de pré-concentração.....	47
3.6.3 Determinação voltamétrica de Cd e Pb para limite de quantificação na ausência de aminoácido.....	48
3.6.4 Determinação voltamétrica de Cd e Pb na presença de aminoácido.....	49

3.7 Etapas de digestão das amostras.....	50
3.7.1 Digestão por irradiação com microondas.....	50
3.7.2 Digestão por via úmida.....	51
3.7.3 Digestão por irradiação ultravioleta (UV).....	52
3.8 Purificação do peróxido de hidrogênio.....	53
4 Discussão dos Resultados	54
4.1 Determinação voltamétrica de Cádmio e Chumbo.....	54
4.1.1 Limite de detecção para Cádmio e Chumbo na ausência de aminoácidos.....	55
4.1.2 Influência do tempo de pré-concentração na determinação de Cádmio e Chumbo.....	57
4.1.3 Influência da área do eletrodo de Hg na determinação de Cd e Pb.....	58
4.2 O problema de determinação voltamétrica de Cd e Pb na presença de aminoácidos.....	59
4.2.1 Ensaios para detecção da quantidade tolerável de aminoácido na célula voltamétrica.....	60
4.3 Estudo da interação aminoácido-metais.....	73
4.3.1 Incubação para ligação de Cd e Pb aos aminoácidos.....	75
4.4 Pré-tratamento das amostras.....	77
4.4.1 Digestão via úmida.....	79
4.4.2 Digestão por radiação de microondas.....	80
4.4.3 Digestão por radiação UV.....	81
5 Conclusões	91
6 Sugestões para trabalhos futuros	93

7 Apêndice	94
7.1 Apêndice 1	94
7.2 Apêndice 2	95
7.3 Apêndice 3	96
7.4 Apêndice 4	99
8 Referências Bibliográficas	107

LISTA DE FIGURAS

Figura 01 – Roteiro de absorção, distribuição e excreção dos tóxicos no organismo.....	17
Figura 02 – Curvas analíticas para Cd e Pb para valores de LOD	48
Figura 03 – Sinais voltamétricos de Cd e Pb obtidos nas condições utilizadas para LOD.....	56
Figura 04 – Influência do tempo de pré-concentração para Cd e Pb	57
Figura 05– Área do eletrodo vs.corrente para cádmio e chumbo.....	58
Figura 06 – Voltamograma do sinal do Cd livre (esquerda) e sinal do Cd na solução do aminoácido triptofano (direita).....	59
Figura 07 – Voltamograma e uma solução de aminoácido isoleucina ($3,43 \text{ g L}^{-1}$) com adição de Pb (10 nmol L^{-1}) nos três potenciais (E1, E2, E3).....	64
Figura 03 – Sinais voltamétricos de Cd e Pb obtidos nas condições utilizadas para LOD.....	54
Figura 08 – Gráficos do potencial de Cd nos aminoácidos em relação à Cd livre.....	65
Figura 09 – Gráficos do potencial de Pb nos aminoácidos em relação à Pb livre.....	67
Figura 10 - Gráfico das I1, I2, I3 do sinal de Cd livre vs I1,I2, I3 do Cd nos aminoácidos na concentração de $0,01 \text{ a } 1 \text{ g L}^{-1}$	69
Figura 11 - Gráfico das I1, I2, I3 do sinal de Cd livre vs I1,I2, I3 do Cd nos aminoácidos na concentração de $1 \text{ a } 6 \text{ g L}^{-1}$	70
Figura 12 - Gráfico das I1, I2, I3 do sinal de Pb livre vs I1,I2, I3 do Pb nos aminoácidos na concentração de $0,01 \text{ a } 1 \text{ g L}^{-1}$	71
Figura 13 - Gráfico das I1, I2, I3 do sinal de Pb livre vs I1,I2, I3 do Pb nos aminoácidos na concentração de $1 \text{ a } 6 \text{ g L}^{-1}$	72

LISTA DE TABELAS

Tabela 01- Ponto Isoelétrico (pI) dos aminoácidos	09
Tabela 02 – Valores de pKas para os aminoácidos	10
Tabela 03 – Lista dos reagentes utilizados para o desenvolvimento do trabalho.....	42
Tabela 04 – Soluções de NP comercialmente adquiridas.....	45
Tabela 05 – Programa 1 desenvolvido para o forno de microondas para abertura das amostras de aminoácidos utilizando solução ácida diluída.....	50
Tabela 06 – Concentração das soluções de aminoácidos utilizadas nos ensaios para detecção da qualidade tolerável na célula voltamétrica.....	63
Tabela 07 – Corrente em nA obtida na presença de Cd ²⁺ e Pb ²⁺ 1,6 nmol L ⁻¹	68
Tabela 08– Constantes de estabilidade dos aminoácidos com cádmio e chumbo.....	73
Tabela 09 – Resultado do ensaio de incubação (24 h) do Cd com os aminoácidos e avaliação dos aminoácidos prováveis de estarem contaminados por Cd.....	75
Tabela 10 – Resultado do ensaio de incubação (24 h) do Pb com os aminoácidos e avaliação dos aminoácidos prováveis de estarem contaminados por Pb.....	76
Tabela 11 – Grupos de aminoácidos conforme digestão.....	83
Tabela 12 - Condições dos pré-tratamentos utilizados para cada aminoácido com suas respectivas taxas de recuperação.....	84
Tabela 13 – Contaminação por Cd e Pb encontrada em algumas soluções de aminoácidos após digestão por UV.....	88
Tabela 14 - Aminoácidos não submetidos a pré-tratamento de radiação UV.....	89

LISTA DE SIGLAS E ABREVIACOES

Aa – aminoácido

NP - nutrição parenteral

NPT – nutrição parenteral total

pI – ponto isoeletrico

HSAB – Hard and Soft Acids and Bases

DOM – matéria orgânica dissolvida

COT – carbono orgânico total

mo – matéria orgânica

HMDE – eletrodo de mercúrio de gota pendente

AAS – Espectrometria de Absorção Atmica

UV/Vis – Ultravioleta/Visível

1 INTRODUÇÃO

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

Como a nutrição parenteral é aplicada a pacientes debilitados e com problemas de saúde, a administração via intravenosa, com a presença dos referidos contaminantes, mesmo em nível de traços, é prejudicial, pois além da conhecida toxicidade do cádmio e chumbo, sabe-se também que o cádmio pode substituir outros íons, entre eles: zinco, cobre e cálcio em metaloenzimas e possui forte afinidade por estruturas biológicas contendo grupos –SH, como proteínas, enzimas e ácidos nucleicos.[1]

A complexidade da matriz, associada à baixa concentração do analito e a ausência de padrões certificados para análise de cádmio e chumbo em aminoácidos constituintes das soluções NP são agravantes encontrados para a monitoração químico-clínico destes elementos.

Procedimentos como irradiação UV, por microondas e digestão ácida (via úmida) podem ser utilizados como etapas de *cleanup* na análise de amostras de aminoácidos para eliminar ou diminuir a interferência de compostos orgânicos.[2, 3, 4, 5]

Diante da necessidade de um rigoroso controle no nível de Cd e Pb nos aminoácidos das soluções NP, utilizados pelos pacientes que necessitam de tal tratamento e da complexidade da matriz, o presente trabalho propõe o estudo de diferentes formas de *cleanup* com o objetivo de encontrar uma metodologia de pré-tratamento mais eficiente e adequada das

amostras para diminuir e/ou eliminar a interferência dos aminoácidos nas análises de Pb e Cd por voltametria.

A voltametria possibilita a determinação de substâncias em solução que podem ser oxidadas ou reduzidas na superfície de um eletrodo. O eletrodo HMDE tem como característica o uso de uma única gota durante cada análise, sendo que a superfície do eletrodo não é renovada durante esta análise, levando a uma boa reprodutibilidade e um baixo consumo de mercúrio. Esta técnica oferece rapidez na análise, boa seletividade e sensibilidade com um custo relativamente baixo. [27]

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Nutrição parenteral

A nutrição parenteral é a administração intravascular, parcial ou total, de nutrientes imprescindíveis à vida.[6] Esta inclui a administração de micro e macronutrientes, sendo capaz de fornecer todos os nutrientes importantes aos seres humanos. Os nutrientes que sofrem uma depleção rápida, como a água e os minerais, que atuam regulando o metabolismo enzimático, mantendo o equilíbrio ácido-base e na pressão osmótica, são administrados via venosa, através de uma veia menor, geralmente na mão ou no antebraço. Já as proteínas e as calorias, são administradas através de soluções concentradas, por intermédio de uma veia de grande diâmetro, geralmente subclávia ou jugular interna, que chega diretamente ao coração. Para isto, na maioria das vezes é necessário puncionar uma veia central.[6,7]

2.2 Aplicação das soluções de nutrição parenteral

Como regra geral, a nutrição parenteral é necessária nos casos em que a alimentação oral normal não é possível, quando a absorção de nutrientes é incompleta, quando a alimentação oral é indesejável e principalmente, quando as condições mencionadas estão associadas ao estado de desnutrição. Atualmente, as soluções de nutrição parenteral são administradas a pessoas muito debilitadas e com problemas (como infecções, queimaduras graves, doença intestinal infecciosa, necessidade de

quimioterapia, transplantados) que necessitam o máximo de assepsia. Contudo, apresentam contra-indicação a pacientes que apresentam capacidade de se alimentar por via enteral, doença terminal com mau prognóstico e estado nutricional adequado.

Na nutrição parenteral completa, todos os nutrientes essenciais devem ser fornecidos em quantidades adequadas, o regime deve incluir carboidratos, gorduras, aminoácidos, eletrólitos, minerais, oligoelementos e vitaminas. Por isso, a formulação da solução de nutrição parenteral é um procedimento que deve ser adaptado às necessidades individuais de cada paciente.[7] Pela infusão de aminoácidos, as necessidades de proteínas nas soluções de nutrição parenteral são atendidas e, nos produtos comerciais, os perfis dos aminoácidos baseiam-se nas concentrações de aminoácidos plasmáticos com modificações para estimular o anabolismo.

A instituição de nutrientes parenterais a lactentes e crianças que não são capazes de manter ingesta suficiente para o crescimento e desenvolvimento normais têm sido de interesse dos pediatras. Existem dois motivos fundamentais pelos quais o lactente é suscetível à má nutrição calórica. O primeiro refere-se à composição corporal, especificamente à quantidade de gordura de depósito. Um segundo fator fisiológico fundamental, que torna o lactente mais suscetível à morte por insuficiência calórica é a sua alta taxa metabólica por unidade de massa corporal, comparada à do adulto.

Por conseguinte, a criança submetida a ingesta calórica inadequada está com dupla desvantagem, já que suas reservas calóricas são pequenas e seu ritmo é alto.

Em vista dos fatores fisiológicos referidos acima, os pediatras têm procurado um meio alternativo de fornecer os nutrientes necessários ao crescimento e desenvolvimento de crianças incapazes de receber estes nutrientes por via oral devido a distúrbios orgânicos ou funcionais do trato

gastrintestinal. A nutrição parenteral total encontra indicação precisa em pacientes com distúrbios pediátricos como anomalias graves do tubo gastrintestinal, que geralmente acarretam ressecção ampla do intestino delgado, diarreia crônica intratável e em crianças de muito baixo peso ao nascimento (menos de 1200 g).[6]

2.3 Complicações da nutrição parenteral

O uso de nutrição parenteral total (NPT) não é isento de complicações. Além das complicações relacionadas à administração, podem ocorrer complicações metabólicas muito importantes, pois incluem complicações como o coma hiperglicêmico, devido à sobrecarga de NPT e glicose, manifestações tóxicas devido à sobrecarga de aminoácidos, bem como a “síndrome do roubo celular”, que segundo Fischer [6], ocorre em pacientes desnutridos graves ou em jejum prolongado, quando submetidos a um suporte nutricional não balanceado. Esta síndrome gera deficiência dos oligoelementos, que são o F, Si, V, Cr, Mn, Fe, Co, Ni, Cu, Zn, Se, Mo, Sn e I, gerando sinais característicos devidos à deficiência.

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

H, C, N, O, Na, Mg, P, S, Cl, K e Ca. Do mesmo modo, estes também apresentam uma concentração tecidual ideal.

2.4 Preparo das soluções de nutrição parenteral

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

2.5 Aminoácidos

2.5.1 Definição e configuração

Os aminoácidos são substâncias que apresentam um grupo de amina e um carboxílico ligados ao mesmo carbono. Os aminoácidos de importância biológica tem estes grupos ligados a carbono α . As espécies de aminoácidos diferem uma das outras por possuírem diferentes cadeias laterais ao carbono α , assim a cadeia lateral dá a cada aminoácido a sua identidade.[8] Todos os 20 aminoácidos comumente encontrados em proteínas, exceto a prolina, possuem os grupos α amino e α carboxílico livres.

A cadeia lateral dos aminoácidos assegura diversas classificações como polaridade, acidez e basicidade. Os aminoácidos podem se apresentar na forma carregada ou neutra, dependendo do pH do meio no qual se encontram como pode ser observado nas figuras 1, 2, 3 e 4 no apêndice 3.

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

Dos 20 aminoácidos necessários para a síntese protéica, alguns são considerados essenciais para manter o crescimento e balanço nitrogenado que não são sintetizados pelo organismo, sendo obtidos somente pela

ingestão de alimentos via oral ou por nutrição parenteral via intravenosa, tais como: valina, isoleucina, leucina, lisina, triptofano, fenilalanina, metionina e treonina. [7]

2.5.2 Classificação

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

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

4) Aminoácidos nos quais R é carregado negativamente: a carga negativa é causada pela presença de um segundo grupo carboxílico. São denominados ácidos (ácido aspártico, ácido glutâmico).

Existe um valor de pH chamado ponto isoelétrico (pI), que é característico para cada aminoácido, (tabela 1), no qual o aminoácido não apresenta carga, pois a carga positiva do grupo NH_3^+ é neutralizada pela negativa do grupo COO^- . Quando o pH do meio for superior ao seu pI este se apresentará na forma predominante negativa enquanto que se o pH do meio for inferior ao seu pI o aminoácido se apresentará na sua forma positiva.[9] Devido a esta propriedade os aminoácidos são chamados “zwitterion”. [10]

Tabela 01 – Ponto Isoelétrico (pI) dos aminoácidos.

Aminoácidos	PI	aminoácidos	PI
Alanina	6,00	Arginina	10,76
Lisina	9,74	Glicina	5,97
Prolina	6,30	Cisteína	5,07
Leucina	5,98	Triptofano	5,89
Isoleucina	6,02	Ácido Glutâmico	3,22
Metionina	7,54	Ácido Aspártico	2,77
Fenilalanina	5,48	Serina	5,68
Treonina	5,64	Glutamina	5,65
Tirosina	5,66	Valina	5,96
Histidina	7,59	Asparagina	5,41
Ornitina	9,70		

Os aminoácidos que possuem além dos grupos amino e carboxílico outros grupos (tabela 2), podem reagir de diferentes formas dependendo da natureza do grupo funcional. Ácido aspártico e glutâmico possuem um segundo grupo carboxílico e apresentam um caráter mais ácido, enquanto

lisina, arginina e histina possuem um segundo grupo amino sendo, portanto, aminoácidos com um caráter básico maior.

A capacidade dos aminoácidos em atuarem como ligantes para íons metálicos está relacionada não só à presença dos grupos amino e carboxílico mas também, a estes outros grupos funcionais. Entretanto, como os grupos são diferentes em sua natureza, a capacidade dos aminoácidos de se ligarem a metais também é diferente. Por exemplo, os grupos R-OH, R-NH₂, R-CO₂ podem ser classificados como ligantes duros, enquanto que os grupos R-SH, R₂S podem ser classificados como moles. Com isso, os aminoácidos não podem ser classificados de uma única maneira e estão aptos a combinarem-se de diferentes formas com diferentes íons metálicos. [11]

Tabela 02 – Valores de pKas para os aminoácidos

Aminoácidos	Grupamento α -COOH	Grupamento α -NH ₃ ⁺	Cadeia Lateral
Alanina	2,3	9,9	
Lisina	2,2	9,2	10,8
Asparagina	2,02	8,80	
Ornitina	1,94	8,65	10,76
Prolina	2,1	10,6	
Leucina	2,4	9,6	
Isoleucina	2,4	9,7	
Metionina	2,3	9,2	
Fenilalanina	1,8	9,1	
Treonina	2,6	10,4	13,0
Tirosina	2,2	9,1	10,9
Histidina	1,8	9,2	6,0
Arginina	1,8	9,0	12,5
Glicina	2,4	9,8	
Cisteína	1,8	10,8	8,3

Continuação da tabela 02

Triptofano	2,38	9,39	
Ácido Glutâmico	2,2	9,7	4,3
Ácido Aspártico	2,0	10,0	3,9
Serina	2,1	9,2	
Glutamina	2,17	9,13	
Valina	2,3	9,6	

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

Em 1963 Pearson usou termos “Duro” e “Mole” para descrever interações entre íons metálicos (ácidos de Lewis) e ligantes (bases de Lewis). Ele convencionou que cátions duros são aqueles que formam complexos estáveis com ligantes duros e cátions moles com ligantes moles.

De acordo com essa classificação, os íons duros são caracterizados por pequeno raio e grande carga, ou seja, íons duros têm uma nuvem eletrônica pouco disponível para um partilhamento com o ligante. Enquanto que ligantes duros, também, não entregam com facilidade ao íon metálico suas densidades eletrônicas, logo a combinação de ambos, íons metálicos e ligantes duros resultam em um complexo estabilizado por simples força eletrostática. Por outro lado, íons metálicos e ligantes moles são aqueles que possuem nuvem eletrônica polarizada, estando assim mais disponíveis para o partilhamento destas, havendo entre eles um aumento na covalência da ligação, formando entre si complexos com uma alta estabilidade. Pearson não eliminou a hipótese de interação entre íons metálicos e ligantes de

classificação diferente, explica ele que caso ocorra, por exemplo, a combinação entre um íon metálico duro com um ligante mole, o metal não aceitará facilmente a densidade eletrônica que o ligante oferece e o resultado será um complexo com uma estabilidade baixa. Também é dito em seus trabalhos que certos íons e ligantes dispõem de uma classificação intermediária podendo, com isso, ser capazes de interagir reacionalmente bem como ambas as espécies moles e duras.

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

A seletividade entre íons metálicos e ligantes no meio biológico depende não somente da natureza dos dois, segundo a teoria HSAB, mas também de vários outros fatores como, por exemplo, estados de oxidação, geometria de coordenação, tamanho do íon e pH do meio [11,12]. Segundo a classificação de Pearson os íons metálicos, como mencionado anteriormente, podem ser divididos em 3 grupos. O primeiro grupo é a classe de metais denominados duros onde estão incluídos os elementos dos grupos IA, IIA e IIIA da tabela periódica, esses metais possuem um único estado de oxidação e, com exceção do Be e do IA, complexam fracamente ligantes orgânicos. Ao segundo grupo, pertencem os metais classificados como intermediários. Eles complexam de diferentes maneiras e mais fortemente os ligantes orgânicos do que os metais classificados como duros. Aqui estão incluídos todos os metais pertencentes à primeira série de transição do Ti ao Ga. Ao terceiro e último grupo pertencem os metais classificados como moles que são os metais do período do Mo ao Sb e do W ao Bi, e, ainda, aqueles da série de transição da tabela periódica. [13] Uma das melhores ilustrações desta teoria em química bioinorgânica é a formação dos complexos de proteínas de baixo peso molecular, (30-35% dos aminoácidos desta classe de pequenas proteínas são resíduos de

cisteína) através de grupos sulfidríla que complexam fortemente metais como Cd^{2+} , Hg^{2+} , Pb^{2+} e Tl^{2+} . [14]

2.5.3 Ligações Metais-Aminoácidos

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

Quando o aminoácido possui em sua cadeia lateral outro centro reativo além do grupamento aminoácido e atua mesmo assim como um ligante bidentado, a formação do anel pode se dar por reação do grupamento amino e carboxílico, pelo grupamento amino e grupamento da cadeia lateral, ou pelo grupamento carboxílico e o grupamento da cadeia lateral. [15,16,17]

2.6 Toxicidade do Chumbo

O chumbo foi um dos primeiros metais que o homem aprendeu a usar. Há evidências de que já era utilizado na Ásia Menor no ano 4.000 a.c. Por ser utilizado de forma tão intensiva por tão longo tempo, a história de sua intoxicação é extensa. No entanto, foi Hipócrates o primeiro a ligar os

sintomas de intoxicação por Pb a seu fator causal. Durante a Idade Média a intoxicação por chumbo foi totalmente esquecida e somente no século XVI apareceu novamente na literatura médica quando Paracelso descreveu a “doença dos mineiros”.

Atualmente, esta patologia (“doença dos mineiros”) é denominada saturnismo ou plumbismo, sendo comum em todo o mundo, principalmente nos países em desenvolvimento.

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

O chumbo é virtualmente onipresente no meio ambiente como resultado de sua ocorrência natural e sua utilização industrial. A ingestão diária média de um adulto é de 0,1 mg a 2 mg. Os casos de toxicidade resultam tanto de exposição ambiental quanto da industrial. [18]

2.6.1 Toxicocinética do Chumbo

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

Apenas seus compostos orgânicos conseguem penetrar no organismo por via cutânea, por exemplo, o chumbo tetraetila, que penetra rapidamente no organismo pelos pulmões, pelo trato gastrointestinal e pela pele. Pela via respiratória a absorção varia com a forma (fumos metálicos x partículas), a concentração e com as variações patológicas e fisiológicas individuais.[18]

As partículas de chumbo que são inaladas do ar ambiental são absorvidas pelo organismo e serão então, depositadas nas regiões nasofaríngeas, traqueobrônquica e alveolar, de onde serão eliminadas pelo mecanismo mucociliar da faringe, ou serão ingeridas e absorvidas, ou eliminadas pelo trato gastrointestinal, com exceção da região alveolar (figura 1).[26]

A absorção de chumbo pelo trato gastrointestinal é de aproximadamente 10% nos adultos, pois grande parte do chumbo ingerido é eliminado pelas fezes, urina e suor. Já que a maior parte do chumbo ingerido é excretado in natura, mas o índice de absorção pode chegar a 50% quando ingerido como solução. Porém, nas crianças essa absorção é maior, chegando a 40% do total de Pb ingerido com os alimentos, sendo bem maior a suscetibilidade de distúrbios neurológicos em crianças do que em adultos. Cumpre ressaltar que a absorção de chumbo pela via digestiva depende principalmente de fatores dietéticos, como o estado de jejum, a ingestão de proteínas e de presença de cálcio, ferro e fósforo.

Uma deficiência desses nutrientes aumenta a absorção de chumbo e vice-versa, provavelmente pela competição destes minerais por um mesmo mecanismo de transporte. Estudos demonstram que há uma relação recíproca entre o conteúdo de cálcio da dieta e a absorção do chumbo.

Setenta por cento do chumbo que ingerimos provêm dos alimentos como: frutos, legumes, cereais e mariscos e das bebidas como vinho, sumo de frutos e água. O saturnismo, intoxicação pelo chumbo, conhecido desde há muito tempo, corresponde a absorção deste elemento muito mais elevadas do que os teores normalmente encontrados nos alimentos e nas bebidas. Esta intoxicação está a maior parte das vezes ligada a uma poluição acidental, podendo ser fatal. Entretanto, a administração regular de pequenas quantidades de chumbo pode conduzir a efeitos sérios para a saúde, particularmente em indivíduos debilitados. É por isso que devem ser

desenvolvidos todos os esforços no sentido de se reduzir ao mínimo os efeitos associados a esse metal.[19,20] Depois de sua penetração na corrente sanguínea, o chumbo é depositado na forma de bifosfato no fígado, rins, baço, pulmões, cérebro e na medula óssea, fixando-se então nos ossos como trifosfatos.[21]

Em uma intoxicação aguda, os primeiros sintomas são a dor de cabeça e muscular, fadiga, emagrecimento, constipação, vômitos, anemia e dificuldade de concentração. Uma intoxicação maior dá seguimento a agitação, irritabilidade, perda de memória e de coordenação, vertigens e depressão, fortes dores abdominais, náuseas, debilidade muscular e encefalopatia. [22]

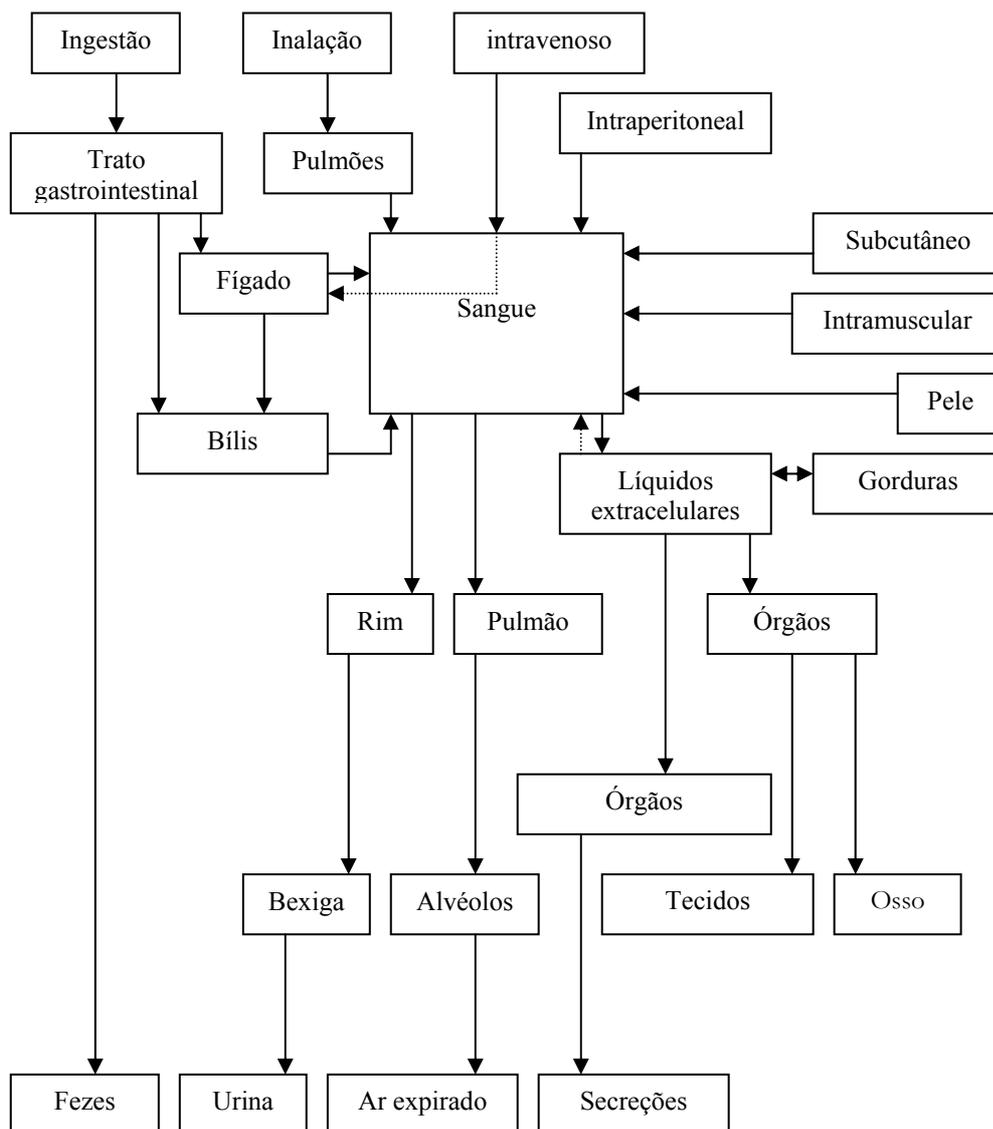
Ainda não tem estudos que comprovem qual o limite permitido desses metais pesados (Cd e Pb) em soluções de nutrição parenteral. A farmacopéia USP XXI (*United States Pharmacopeial Convention*, 1895, p.966) estabelece o limite de 0,3 ppm de metais pesados para algumas soluções parenteral de grande volume (LVP) [21]

A legislação brasileira, a partir da portaria 518/2004 do Ministério da Saúde, determina como padrão de potabilidade da água para consumo humano a presença de, no máximo, $0,01\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de chumbo. [23]

O Ministério da Saúde também define, através da Portaria n.º 82/2000, como padrão da qualidade da água tratada utilizada na preparação de solução de diálise a quantia de, no máximo, $0,005\text{ mg L}^{-1}$ de chumbo e as análises desta água devem ser feitas semestralmente. A AAMI (*Association for the Advancement of Medical Instrumentation*), instituição que define as normas desta área nos EUA, e a Farmacopéia Européia também possuem este valor como limite, mas as análises de controle devem ser realizadas mensalmente.[24,25] Se a água potável for rica em chumbo, o metal pode persistir mesmo após o tratamento, podendo, além das intoxicações com sintomas já descritos, levar o indivíduo à morte.[26]

Segundo Goes (1998) [27] a absorção, distribuição e excreção dos compostos tóxicos se dá no organismo humano conforme esquema a seguir:

Figura 01– Roteiro de absorção, distribuição e excreção dos compostos tóxicos no organismo



2.7 Toxicidade do Cádmi

A base da toxicidade do Cd é sua influência negativa sobre o sistema enzimático das células, resultante da substituição de outros íons metálicos (principalmente zinco, cobre e cálcio) em metaloenzimas e sua afinidade muito forte por estruturas biológicas contendo grupos –SH, como proteínas, enzimas e ácidos nucléicos. Muitos efeitos da ação do Cd resultam da interação com micro e macroelementos essenciais, Zn, Cu, Fe e Se. Estas interações podem acontecer em diferentes estágios da absorção, distribuição e excreção dos bioelementos e o Cd, assim como no estágio das funções biológicas dos elementos essenciais.

O Cd entra no organismo através dos pulmões (descargas industriais, fumaça de cigarro), em alimentos ou em águas de encanamentos com soldas galvanizadas. Tem sido sugerido que o Cd dissolvido dos encanamentos galvanizados na água causa hipertensão. Seus efeitos tóxicos são aparentes nos eritrócitos, rins e fígado e pelo bloqueio da ação biocatalítica do Cu, Zn e Co. O Cd acumula-se em tecidos e é um indicador da carga corporal total, embora concentrações típica de 10 nmol L^{-1} ou menos no sangue, principalmente no eritrócito e urina são monitorados para exposição ocupacional. Pouco é conhecido sobre a especiação de Cd em fluidos corporais. Após a absorção, Cd pode ligar-se não especificamente a albumina depois da liberação da circulação, primeiramente pelo fígado. Diversos experimentos demonstram que o Cd é um potente inibidor de sistemas enzimáticos a nível hepático.[28]

A legislação brasileira, a partir da portaria 518/2004 do Ministério da Saúde, determina como padrão de potabilidade a presença de, no máximo, $0,005 \text{ mg.L}^{-1}$ de cádmio na água para consumo humano.[29]

2.7.1 Toxicocinética do Cádmio

Wester et al (1992) investigando a absorção percutânea do cloreto de cádmio a partir da água e solo, numa situação experimental na qual foi utilizada a pele humana, postularam que a exposição de todo o corpo ou cádmio na água na concentração de 16 ppb, com 0,5% de absorção, resulta num ingresso sistêmico diário de 10µg de cádmio. Os estudos sobre a absorção dérmica sugerem que, embora a absorção por esta via seja lenta, pode atingir proporções relevantes nas situações em que soluções concentradas de cádmio estejam em contato com a pele por várias horas.

Os compostos solúveis de cádmio (cloreto e sulfato) podem se depositar na árvore brônquica, porém o sítio principal de absorção é o alvéolo. Quando inalado, uma fração do material particulado oriundo da fumaça do cigarro é depositada nas vias aéreas e no pulmão, e o resto é exalado, estima-se que 20% a 50% do cádmio seja absorvido [30].

A maior parte do cádmio ingerido não é absorvida pelo trato gastrointestinal, somente 1/20 do Cd contido nos alimentos ou água é absorvido por esta via. A absorção intestinal parece ocorrer em duas fases: do lúmen para a mucosa e transferência para a circulação.

Entre os fatores que afetam a absorção do Cd estão a interação metal-metal (por exemplo: ferro, cálcio, cromo, magnésio e zinco) e metal-proteína (metalotionina, glutathione, enzimas com radical sulfidril), presentes tanto nos alimentos como no organismo. [28]

De importância particular para a toxicocinética do Cd é a sua interação com a proteína metalotionina. O Cd se acumula nos rins e fígado porque a velocidade de eliminação destes órgãos é relativamente baixa, em parte devido à ligação do Cd às metalotioninas nestes tecidos. [31]

O Cd é distribuído na forma de íons ligados à eritrócitos, à albumina e à tioneína do eritrócito. Aproximadamente 80% a 90% da quantidade do

Cd está ligada a metalotionina, o que faz com que os níveis de Cd circulante diminua, diminuindo conseqüentemente a sua disponibilidade.[30,31]

A excreção do Cd é muito lenta, e conseqüentemente a sua meia vida é muito longa – 17 a 38 anos, sendo que nos rins estima-se uma meia vida entre 6 a 38 anos e no fígado 4 a 19 anos.

Grande parte de Cd inalado ou ingerido é excretado pelas fezes, via de regra, reflete, principalmente a poeira de Cd deglutida do ar industrial ou ingerida acidentalmente das mãos contaminadas, nas situações de exposição ocupacional.

Porem, quase todo o Cd excretado pelas fezes é devido a não absorção pelo trato gastrintestinal. O Cd absorvido é excretado vagarosamente e igualmente pela urina e fezes. [28, 30]

2.8 Determinação de metais por Voltametria

A voltametria estuda as relações entre a voltagem, a corrente e o tempo, durante a eletrólise numa célula. A técnica envolve comumente o estudo da influência das variações da voltagem aplicada sobre a corrente que passa pela célula, em alguns casos, investiga-se a variação da corrente com o tempo. 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.[32] O eletrodo de mercúrio de gota pendente HMDE tem como vantagem o fato de que cada nova gota pode ser facilmente formada e este

processo de renovação remove problemas que podem 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.[33]

A voltametria oferece potencialidades para investigar e estudar a especiação de metais pesados dissolvidos em águas naturais [34,35,36,37]. Por outro lado certas espécies de metais dissolvidos, principalmente complexos orgânicos estáveis, são inacessíveis para 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.

Dentre as diversas técnicas de voltametria como a DPV (*Differential Pulse Voltammetry*), NPV (*Normal Pulse Voltammetry*), RPV (*Reverse Pulse Voltammetry*) e SWV (*Square Wave Voltammetry*), utilizou-se a DPV para a quantificação dos metais Cd e Pb livre e combinado na presença dos aminoácidos com o eletrodo de mercúrio de gota pendente.

Outra técnica voltamétrica muito utilizada na análise de traços, referida na literatura como voltametria inversa, inclui a pré-concentração do analito no eletrodo, separando-o da matriz, e, por uma inversão no sentido de varredura dos potenciais, obtém-se o sinal do analito pré-concentrado que é dependente do tempo de pré-concentração.

O curto tempo de análise e a seletividade combinadas com alta confiabilidade, devido a boa exatidão nas medidas, tem feito da voltametria melhor alternativa do que AAS para análise de traços de metais pesados tóxicos em muitos tipos de matrizes ambientais. Além do baixo custo das análises, curto tempo de detecção, alto potencial de automatização e possibilidade de determinação simultânea de diversos metais.[34,38,39]

2.9 A destruição da matéria orgânica por radiação UV

A matéria orgânica presente nas águas naturais interfere na determinação da concentração de metais por voltametria principalmente de três maneiras: 1) pela formação de fortes complexos com metais, os quais não são detectados durante a análise da amostra, levando à quantificação apenas da fração eletroquimicamente lábil; e 2) competindo com o metal pela superfície do eletrodo, diminuindo assim a intensidade do sinal do analito ou provocando o aparecimento de sinais interferentes; 3) a própria matéria orgânica pode sofrer redução ou oxidação eletroquímica, aumentando a corrente residual a ponto de impedir a execução da análise. [40] Os métodos de digestão úmida, que empregam aquecimento e adição de reagentes como ácidos oxidantes ou peróxido, têm sido bastante utilizados, mas apresentam a desvantagem de oferecer um alto risco de contaminação, principalmente no caso de amostras com metais em nível de traço.

Cerca de 40 a 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 como ácidos carboxílicos e estruturas aromáticas são abundantes nos compostos húmicos, que absorvem fortemente a luz ultravioleta e podem atuar como fotossensibilizadores. 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 ($\cdot\text{OH}$), peróxido de hidrogênio (H_2O_2), oxigênio singlete ($^1\text{O}_2$), íon superóxido (O_2^-) e elétron hidratado (e^-_{hid}). [41] Estas novas espécies podem fotooxidar os próprios fotossensibilizadores, como também outros compostos presentes em

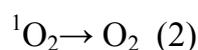
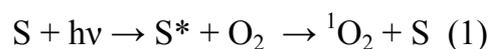
solução. Portanto, na presença de uma fonte contínua e intensa de radiação UV a fotodegradação da matéria orgânica pode ser bastante rápida e eficiente.[42] A adição de H₂O₂ em solução pode funcionar como uma fonte de oxigênio molecular e de radicais hidroxila, que são produzidos a partir da decomposição fotoquímica do H₂O₂. [43]

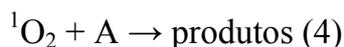
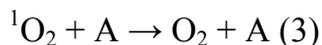
2.9.1 Oxidantes formados sob a influência da radiação UV

2.9.1.1 Oxigênio singlete

A ação da radiação UV sobre moléculas de oxigênio, muda seu estado de energia do estado fundamental O₂ (triplete) para o estado excitado ¹O₂ (singlete), que é gerado provavelmente a comprimentos de onda (λ) igual a 366 nm. Este processo ocorre na presença de fotossensibilizadores. Kautsky [44] foi o primeiro a propor um mecanismo de oxidação no ambiente natural: a energia da luz solar absorvida pelos fotossensibilizadores, é então transferida para as moléculas de O₂ e as moléculas mudam seu estado de energia para ¹O₂. Os átomos de ¹O₂ formados reagem com água e as substâncias orgânicas presentes formando peróxidos e radicais.

Haag e Hoigné [45] propuseram a seguinte descrição química dos possíveis processos que ocorrem durante a absorção de energia UV:





onde S e S* são fotossensibilizadores no estado fundamental e excitado, respectivamente, e A é o composto aceptor de energia (agente *trapping*). A reação (1) mostra como os fotossensibilizadores participam no processo, a reação (2) a extinção física de moléculas de oxigênio excitado pela água, a reação (3) mostra a extinção física de moléculas oxigênio por um aceptor orgânico, por exemplo, furfuril álcool e a reação (4) mostra a reação química com A.

Além de fotossensibilizadores ocorrentes em águas naturais, estes podem englobar outros compostos químicos, como por exemplo, corantes como azul de metileno. A adição destes compostos e a subsequente exposição a luz solar é recomendada como um dos métodos de tratamento de águas residuais. [46] O ${}^1\text{O}_2$ é altamente reativo, seu tempo de meia vida é cerca de $2\mu\text{s}$ e seu estado regular de concentração $[{}^1\text{O}_2]$ é cerca de 10^{-12} moles L^{-1} . Merkel e cols mostraram que há uma relação linear entre esta concentração e a concentração de carbono orgânico dissolvido (COD), confirmando o mecanismo proposto para a formação de ${}^1\text{O}_2$. [47]

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 diminui. 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 aquelas do ambiente poluído.

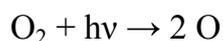
2.9.1.2 Radicais superóxidos O_2^- e radicais alquilperóxido RO_2

O primeiro produto de redução de uma molécula de O_2 é um íon superóxido, que é instável em soluções aquosas e rapidamente se decompõe a H_2O_2 e O_2 . [48] Os autores sugerem um possível mecanismo para a formação deste íon. É conhecido que ácidos húmicos contém quinonas e semi-quinonas, que tornam-se excitadas quando absorvem radiação UV. Estas então, reagem com moléculas de O_2 a íons O_2^- . Estes íons podem participar na decomposição de alguns poluentes, por exemplo, na decloração fotoquímica de metóxicloro.

O radical alquilperóxido RO_2^- representa um tipo de radical formado em solução aquosa contendo matéria orgânica durante irradiação UV. Mill e cols avaliaram a concentração de RO_2 a 10^{-9} M em suas investigações da fotooxidação de cumeno e piridina. [49]

2.9.1.3 Ozônio

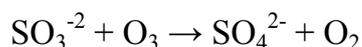
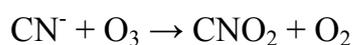
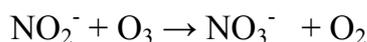
Sob a influência da radiação de comprimentos de onda curtos ($\lambda < 240$ nm), moléculas de O_2 reagem para formar moléculas de ozônio (O_3):



Numa lâmpada de mercúrio (Hg), a linha 185 nm é a principal responsável pela formação do O_3 .

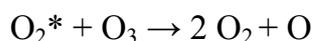
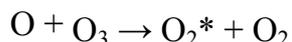
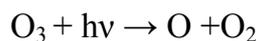
O O_3 é um agente oxidante poderoso ($E_0 = +2,08$ V) quando comparado a outros agentes oxidantes conhecidos como, por exemplo, H_2O_2 ($E_0 = +1,78$ V) permitindo com esta espécie que reaja com uma inúmera classe de compostos. A oxidação da matéria orgânica pode ocorrer de maneira direta ou indireta.

Oxidação direta: a molécula de O_3 pode reagir diretamente com outras moléculas orgânicas ou inorgânicas via adição eletrofílica. O ataque eletrofílico do O_3 pode acontecer a átomos com uma densidade de carga negativa (N, P, O ou carbonos nucleofílicos) ou a ligações duplas ou triplas do tipo C-C, C-N e N-N.



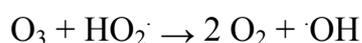
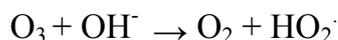
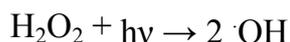
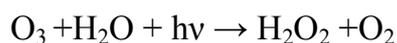
Onde R = radical alquila ou H

No escuro e em temperatura ambiente, o O_3 é moderadamente estável, período meia-vida é 15 h, mas quando irradiado com luz de 200-300 nm ele decompõe-se rapidamente numa reação em cadeia:[50]



Onde O_2^* representa as moléculas de O_2 excitadas. No entanto, a presença de O_2 ou outros gases (CO_2 , N_2 , Ar), inibe a decomposição do O_3 , diminuindo fortemente a velocidade da reação.

Oxidação indireta: em soluções aquosas, O_3 irradiado com UV forma radicais $\cdot\text{OH}$ ($E_0 = +2,8 \text{ V}$), um poderoso e não seletivo oxidante. Vários caminhos de formação do são possíveis [51,52], íons peróxido (HO_2^-) e superóxido (O_2^-) são formados como intermediários na dissociação do H_2O_2 .



O O_3 é um eficiente agente oxidante para compostos orgânicos encontrados na natureza. Foi investigado o processo de decomposição de ácidos húmicos em muitos tipos de água e verificou-se que a sua concentração diminui durante o processo de ozonização.[53] A decomposição de ácidos húmicos segue através do decaimento gradual a compostos com estrutura mais simples, as espécies resultantes tem uma massa molecular menor que 1000, então são facilmente degradáveis. Quando examinando estes processos, Gilbert [54] indicou que 3-4 mg de O_3 por mg de carbono orgânico dissolvido (COD) são suficientes para diminuir a demanda química de oxigênio em 60%.

Investigou-se os processos de oxidação que fazem uso do O₃, H₂O₂ e irradiação UV, e comparou-se a eficiência de decomposição de muitos compostos orgânicos presentes em águas naturais e águas residuais.[55,56] A velocidade de oxidação aumenta sempre em sistemas oxidantes/UV comparado a sistemas apenas com oxidantes.

2.9.1.4 Radicais ·OH e H₂O₂

Foi mostrado que os processos de fotooxidação em águas naturais sob a influência da luz solar tem também um caráter radicalar. A formação de radicais OH e sua subsequente reação com a matéria orgânica é uma das formas naturais de biodegradação.[57,58,59]

Os processos de mineralização usados em laboratórios também têm feito uso de radicais hidroxilas de alta reatividade, que foram gerados do H₂O₂ adicionado às soluções e expostos a ação da luz UV. Os radicais ·OH, iniciam reações em cadeia envolvendo as substâncias orgânicas de três mecanismos distintos: 1) abstração de hidrogênio; 2) transferência de elétrons; 3) adição radicalar. Os radicais secundários formados durante estas reações podem novamente reagir com outros compostos.[60]



Encontrou-se que a oxidação por radicais hidroxilas é mais eficiente na faixa de pH de 6-8. Malaiyandi e cols [61] investigaram a eficiência da mineralização de uma amostra de água usando um sistema H₂O₂/ UV. Quando utilizou-se 0,5 % (v/v) houve uma redução de 88 % do conteúdo carbono orgânico total (COT) em água destilada e um mínimo de 98 % em

água de torneira. Eles encontraram que o aumento da concentração de H_2O_2 para 1 % (v/v) não melhora a eficiência da mineralização. A duração ótima de mineralização foi de 4 h. Os autores também compararam a eficiência da mineralização de um sistema H_2O_2 / UV (88 % redução do conteúdo de COT) e um sistema UV apenas (28 % redução do conteúdo de COT). Eles indicaram que uma ozonização de 8 h é muito menos eficiente na remoção de compostos orgânicos não polares da água que o sistema H_2O_2 / UV.

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 taxa de reação ou efeito 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 o oxidante para fração molar contaminante.

O efeito do peróxido de hidrogênio na degradação fotocatalítica de contaminantes orgânicos em água foi investigado usando um reator fotocatalítico com disco rotatório de TiO_2 (RDPR) operado em modo contínuo e em estado constante.[63] O H_2O_2 é o mais simples dos peróxidos, é um importante precursor em síntese química.[63,64] É também um componente fundamental de diversas tecnologias de oxidação química incluindo Fenton, foto-Fenton, UV baseado em oxidação química, processos polioxometálicos, e oxidação baseada na transição de metal de mais alta valência [65,66,67,68] Além disso, é composto apenas de átomos de hidrogênio e oxigênio e sob apropriadas condições poder produzir produtos finais desejáveis ambientalmente, tais como água e íons hidroxila. Por isso, recentemente, existe grande interesse em diversas aplicações como química “green” e engenharia “green”. [69] Enquanto a maioria dessas

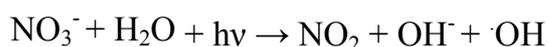
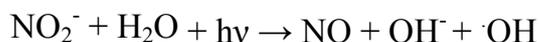
aplicações focalizam a destruição de contaminantes orgânicos em água usando ou UV artificial [65,66] ou iluminação solar e poucos estudos também com gases contaminantes. [72,73,74]. Persulfato, peroximonosulfato, periodato e outros oxidantes são também usados [74,75] mas peróxido de hidrogênio é mais popular por causa de suas vantagens como aditivo “green”. Efeitos benéficos da adição de peróxido de hidrogênio foram registrados no tratamento fotocatalítico de DOM em efluente de celulose e indústria de papel, diversos pesticidas e outros contaminantes orgânicos.[76]

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 hidroxilas 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 a favorável inibição das reações que os radicais hidroxilas degradam bem como a adsorção competitiva entre peróxido de hidrogênio, oxigênio e contaminantes orgânicos.

Estudou-se [77,78,79,80] a influência da adição de H_2O_2 sobre a eficiência da digestão UV de muitos compostos orgânicos em solução. Um método de decomposição freqüentemente usado consiste em acidificar amostras mineralizadas (pH 2) contendo H_2O_2 e a posterior fotooxidação. Inicialmente, este método foi usado para determinação de carbono orgânico dissolvido em que o CO_2 formado foi medido usando espectroscopia 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 $\cdot\text{OH}$:

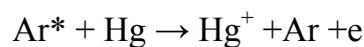
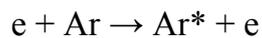


Kotzias e cols investigaram a velocidade de decomposição de vários compostos orgânicos modelos dissolvidos em água e irradiados com UV. Eles compararam as velocidades constantes de reações de fotooxidação em água pura e em água contendo nitratos e nitritos. Na presença destes íons, a decomposição de 4-nitrofenol foi 13 vezes maior na presença de nitritos e 5 vezes maior na presença de nitratos. Assim, a presença de íons nitrato 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.[81]

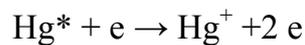
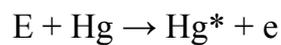
2.9.2 Fontes de radiação UV

As fontes artificiais de UV mais freqüentemente utilizadas são as lâmpadas de Hg que é um elemento inerte, não reage com o material do eletrodo nem com o material do bulbo. O espectro de Hg é rico em linhas na faixa UV. [82] A energia de transição de átomos de Hg do estado menos excitado (6^3P_1) para o estado fundamental (6^1P_0) corresponde ao comprimento de 253,7 nm.

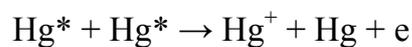
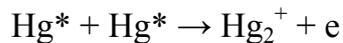
Além dos vapores de Hg, as lâmpadas contêm um gás nobre, geralmente argônio (Ar). Embora não participe diretamente na geração do fóton ele aumenta o número de correntes transportadoras de elétrons e íons. Numa colisão elástica entre um elétron e um átomo, parte da energia do elétron é transmitida ao átomo causando sua excitação e iniciando os processos ocorridos na lâmpada. Este pode ser descrito com as seguintes equações: [83]



Durante o funcionamento da lâmpada:



Quando os elétrons não transferem energia suficiente para a reação num único passo, o processo de ionização acontece num passo discreto. Nas lâmpadas com maior pressão de vapor:



Um parâmetro característico das lâmpadas de Hg é o valor de pressão de vapor do Hg. Lâmpadas de Hg são divididas mais freqüentemente em 2 grupos: lâmpadas de baixa pressão (pressão Hg 0,1-1Pa ($10^{-3} - 10^{-2}$ Torr)), e lâmpadas de alta pressão (pressão de Hg $> 0,1$ Mpa (1atm)).

2.9.2.1 Lâmpadas de baixa pressão

Este tipo de lâmpada de Hg é em forma de um longo tubo feito de vidro. Tem um tempo de operação longo de 5000- 10000 h, embora, acendimentos freqüentes da lâmpada torna-o menor. Seu poder máximo é 60 W. Um tipo especial de lâmpada de baixa pressão é a chamada luz negra fluorescente, freqüentemente aplicada para oxidação fotocatalítica de substâncias orgânicas em soluções com TiO_2 como um catalisador.

2.9.2.2 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. O espectro da lâmpada de média pressão é mais rico que o espectro da de baixa pressão. Além das linhas de emissão única, também contém uma emissão contínua, especialmente na faixa UV C. O tempo de operação da lâmpada é cerca de 2000 h.

2.9.3 Classificação dos aparelhos de digestão

Há em princípio 3 métodos de mineralização UV. O primeiro consiste na imersão de uma lâmpada de Hg dentro de um frasco de reação,

similar à síntese fotoquímica em química inorgânica. O segundo é baseado na aplicação do método em batelada. Consiste de uma lâmpada de Hg situada no centro e rodeada por tubos testes de 100 cm³ distribuídos simetricamente. Num terceiro método de mineralização UV, sistemas em fluxo são envolvidos. A amostra passa através do tubo enrolado em torno da lâmpada UV fixa.

Como há divergências a respeito de qual intensidade de luz UV utilizar, a posição e configuração das amostras ao redor da lâmpada, adição de substâncias oxidantes, acidificação e tempo de irradiação refletem as dificuldades em fazer avaliações comparativas. [84] O sistema de destruição de DOM descritos na literatura são geralmente tubos de quartzo dispostos ao redor do radiador. O resfriamento é sempre realizado por ventilação a ar. Todos os autores fazem uma acidificação bem como uma adição de substâncias oxidantes para acelerar a oxidação. Outros efeitos da acidificação são a dissociação de complexos estáveis resultando na diminuição da capacidade de ligação. A intensidade da lâmpada varia de 150 a 1200 W as quais tem uma importante influência na taxa de reação. Com intensidades acima de 300 W podem ocorrer problemas de resfriamento. Também, evita-se uma diminuição do volume devido a evaporação de compostos orgânicos voláteis, não ultrapassando a temperatura de 70-90°C.[85]

2.9.4 Aplicação da fotooxidação UV

Enquanto alguns ligantes evitam uma redução dos íons a serem analisados, outros formam complexos os quais resultam em variações

específicas dos potenciais redox. Há diferenças entre complexos estáveis e não-estáveis, por exemplo, complexos os quais se dissociam por acidificação são bastante estáveis, o que significa que o íon do metal pesado é trocado pelo íon H^+ . Muitos ligantes formam complexos com metais pesados não-estáveis, porém há também ligantes orgânicos estáveis naturalmente, como, por exemplo, os aminoácidos. [86,87]

W. Dorten e cols.[80] desenvolveram um novo sistema de digestão baseado na fotodigestão por irradiação UV e oxidação com química, os quais decompõe totalmente a DOM a dióxido de carbono. O dispositivo é desenvolvido como um módulo acoplado a um microprocessador controlado por voltametria.[88] Ele pode ser usado também independentemente e é facilmente adaptável em outros sistemas de análise automático. O sistema de digestão é completamente fechado para minimizar riscos de contaminação, e um processo de autolimpeza é programado. O período de meia-vida da destruição de DOM de 5 minutos é pequeno, na prática o tempo usual de irradiação é de 30 min, mesmo se a concentração de DOM é alta como as águas residuais municipais.[89]

2.9.5 Determinação de metais

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.

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.[78]

As condições para o processo de digestão UV depende do metal que será determinado, do método de determinação e da matriz. Para quase todos os metais o processo de mineralização é feito usualmente em meio ácido para evitar a precipitação de sais. Para determinações voltamétricas a amostra deve ser completamente mineralizada, enquanto que AAS admite amostras apenas parcialmente mineralizadas.

Achtenberg e cols.[42] 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 e Ni) a partir dos complexos orgânicos e destruição dos surfactantes interferentes (no caso da determinação do Cu, Ni e Cr). As condições otimizadas da digestão UV inclui a presença de oxigênio, H_2O_2 (9 mM de Ni e Cu) e tratamento a elevadas temperatura ($\sim 70^\circ C$) em amostras com tempo de digestão 150-175 s. As condições otimizadas da digestão UV para conversão de Cr (III) a

Cr(VI) antes da determinação voltamétrica de Cr total inclui adição de 3,5 mM H₂O₂, elevada temperatura e tempo de 150 s.

A digestão UV de ácidos húmicos foi mais eficiente em água Milli-Q do que em água do mar. Uma análise de 99,5% e 98% foi alcançada em uma solução de 15,5 mg C L⁻¹ em água Milli-Q e água do mar, respectivamente com tempo de digestão >275 s. Usando digestão UV uma análise > 99% foi realizada de solução de ácido húmico em água deionizada de concentrações 3,8; 7,75 e 15,5 mg C L⁻¹ com tempo de digestão de 100 s (lâmpada de média pressão – 100 W). A concentração média de carbono orgânico encontrado em água do mar está na faixa de 0,1 – 4 mg C L⁻¹[85], entre < 1 e 3 mg C L⁻¹ e lagos de baixa e entre 5 e 30 mg C L⁻¹ em lagos produtivos.[86] Os níveis mais altos testados neste estudo (acima de 15,5 mg C L⁻¹) foram por digestão UV, indicando que esta técnica é adequada para todas águas naturais. A adição de H₂O₂ aumentou a eficiência na digestão.

2.10 Digestão de amostras por decomposição via úmida

Em geral, a decomposição de materiais orgânicos ou biológicos por via úmida implica em aquecimento da amostra na presença de um ácido mineral oxidante concentrado, de misturas de ácidos oxidantes, ou mistura de um ácido oxidante com peróxido de hidrogênio. Torna-se possível oxidar completamente a maioria das amostras, deixando os elementos a serem determinados na solução ácida em formas inorgânicas simples e apropriadas para análise, se os ácidos forem suficientemente oxidantes, e se o

aquecimento for feito a temperaturas elevadas durante um período de tempo adequado.[92]

Os ácidos com propriedades oxidantes usados na decomposição por via úmida de amostras orgânicas ou biológicas são o nítrico, o sulfúrico e o perclórico. Estes ácidos podem ser usados individualmente (exceto o perclórico) ou combinados uns com os outros.

A decomposição por via úmida é particularmente útil para a determinação de baixas concentrações de metais em vários tipos de amostras, porque muitos elementos de interesse são convertidos em cátions inorgânicos simples não voláteis que permanecem no meio ácido.

A determinação de elementos considerados essenciais ou tóxicos em alimentos e outros materiais biológicos é comum em muitos laboratórios, e a maioria dos elementos a serem determinados ocorre em concentrações que estão muito próximas aos limites de detecção da maioria dos métodos analíticos. Resultados reprodutíveis e exatos somente serão obtidos se as amostras forem preparadas cuidadosamente, incluindo a completa destruição de toda a matéria orgânica.[92]

Como citado anteriormente, as amostras biológicas são tratadas com ácidos oxidantes. Os ácidos nítrico e perclórico são os mais importantes, sendo usados principalmente em misturas binárias. Em misturas ternárias utiliza-se também o ácido sulfúrico. O carbono contido na matriz orgânica é oxidado no intuito de formar dióxido de carbono e, assim, separado dos analitos. De todos os reagentes, o ácido perclórico é o que apresenta maior poder de oxidação para a matéria orgânica. Porém, apresenta algumas desvantagens como ser altamente reativo com a matéria orgânica, sendo usado sempre com o ácido nítrico e ainda, freqüentemente contém altas concentrações de elementos contaminantes, exceção ao de grau ultrapuro.

A decomposição via úmida em sistema fechado possui algumas vantagens quando comparado com um sistema aberto: não há perdas por

volatilização dos elementos; reações com duração relativamente curta podem ser realizadas, trabalhando-se em temperaturas acima do ponto de ebulição do reagente; reduzem-se as quantidades dos reagentes, diminuindo-se os valores dos brancos e não há risco de contaminação por fontes externas.[92]

2.11 Digestão de amostras assistida por microondas

A utilização de fornos de microondas como fonte de aquecimento para reações químicas e físicas vem ocorrendo há mais de 40 anos [93] e tem revolucionado o procedimento de digestão convencional, reduzindo o tempo de preparação de horas para minutos [88, 89] com reduzido risco de contaminação quando são utilizados recipientes de quartzo ou PTFE.[93]

Com fins não analíticos, as microondas têm sido utilizadas na hidrólise de albumina bovina para obtenção dos aminoácidos [95], em síntese orgânica e na secagem de amostras e materiais de laboratório. [96,97] Do ponto de vista analítico, pode-se dizer que o maior emprego é na decomposição de amostras, principalmente biológicas.[93,98,99,100,101]

Amostras biológicas como solo, tecidos vegetais e animais e amostras clínicas como sangue e urina podem ser decompostas com a associação de ácidos concentrados e das microondas. Na decomposição de tecidos hepático bovino através da ação de ácidos nítrico (65%) e perclórico (70%) a utilização do forno de microondas por 20 minutos a 600 W foram suficientes para decompor totalmente a amostra e possibilitar a análise de metais como Mn, Zn, Cu, Fe, Cd e Pd por ICP-ES.[102] Ganzler e cols. [99] realizaram a extração de pesticidas como preparação de amostras de

solo pela ação das microondas e solventes como metanol formando uma suspensão que sofreu ação das microondas por 30 segundos, sendo posteriormente centrifugado e o sobrenadante analisado por cromatografia líquida.

Vários são os modelos de fornos de microondas disponíveis no mercado e planejados exclusivamente para uso em laboratório, apesar disto, fornos domésticos tem sido adaptados [102] ou simplesmente usados sem nenhuma adaptação, com grande eficiência e um custo bem inferior, pois fornos para laboratório, conforme o modelo, custam 10 a 20 vezes mais do que os fornos domésticos.



3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Instrumentação

3.1.1 – Equipamento para medidas voltamétricas

(condições: vide apêndice 1)

646 VA Processador (Metrohm)

675 VA Sample Changer (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)

Balança analítica Sartorius com quatro casas decimais

Ultrassom Thornton Potência 200W

Forno de Microondas doméstico marca Philco (1100 – 1600 W)

Câmara de fluxo laminar – Trox do Brasil, classe 100

Destilador de ácidos: Berghof, modelo BSP

Digestor UV com lâmpada de Hg 500W (Metrohm) com tubos de quartzo

3.2 Reagentes e Soluções

Todos os reagentes utilizados foram produtos de qualidade para análise e a água utilizada para o preparo das soluções foi purificada em

sistema de Milli-Q (resistividade de $18,2 \Omega \text{ cm}^{-1}$). As soluções dos aminoácidos, bem como, as soluções padrões de Cd e Pb foram armazenadas em recipientes de plástico que foram antes do uso, submetidos ao processo de descontaminação descrito no capítulo 3.3.

Os reagentes utilizados para o desenvolvimento deste trabalho estão listados na tabela 3.

Tabela 03 – Lista dos reagentes utilizados para o desenvolvimento do trabalho

Reagentes	Fabricantes
Ácido nítrico destilado	Merck
Hidróxido de sódio	Merck
Ácido perclórico	Merck
Ácido clorídrico	Merck
Etanol	Synth
Peróxido de hidrogênio	Merck
Ácido sulfúrico	Synth
Resina Dowex 50 x 4 (50 – 100 mesh)	Fluka
Cloreto de sódio	Vetec
Nitrato de chumbo	Sigma
Sulfato de cádmio	Merck
Histidina	Sigma
Leucina	Sigma
Ácido aspártico	Synth
Acido glutâmico	Eciba
Cisteína	Merck
Fenilalanina	Sigma
Ornitina	Vetec
Treonina	Vetec
Tirosina	Merck

Continuação da tabela 03

Glicina	Merck
Metionina	Merck
Triptofano	Merck
Isoleucina	Sigma
Arginina	Vetec
Alanina	Vetec
Serina	Vetec
Prolina	Vetec
Asparagina	Vetec
Lisina	Sigma

3.2.1 Preparo das soluções

As soluções estoque de aminoácidos na concentração média nos quais se encontram nas soluções de nutrição parenteral (apêndice 2) foram preparadas pela dissolução dos mesmos em água pura.

A solução estoque de Pb (II) de concentração $0,6 \text{ mol L}^{-1}$ foi preparada a partir do sal $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ e de Cd (II), na mesma concentração, a partir do sal $\text{Cd}(\text{SO}_4)_2$. As soluções utilizadas em todo este trabalho foram preparadas por diluição das soluções estoque.

3.3 Cuidados com a contaminação

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

Esses materiais foram armazenados em soluções alcoólicas de HNO_3 10% (v/v), por 48 horas antes do uso. Após este período, o material foi lavado com água Milli-Q em abundância, estando assim pronto para o uso. Todas as etapas de preparo de solução foram realizadas em Câmara de Fluxo Laminar, que foi sempre ligada 30 min. antes do início dos trabalhos.

3.4 Reagentes e soluções para os ensaios voltamétricos

- solução tampão KCl/NaAc (cloreto de potássio/ acetato de sódio)
pH 4,55;

- solução de NaOH $0,1 \text{ mol L}^{-1}$;

- solução de NaOH 25% (m/v);

- solução padrão dos metais (cádmio e chumbo) $0,6 \text{ mol L}^{-1}$;

- soluções dos aminoácidos (de 0,35 a $11,5 \text{ g L}^{-1}$)

3.5 Soluções de nutrição parenteral

As soluções de nutrição parenteral foram adquiridas comercialmente e a composição das mesmas encontra-se descrita no apêndice 4.

A Tabela 04 apresenta o nome comercial de algumas soluções de nutrição parenteral que podem ser adquiridas, bem como a indicação do fabricante.

Tabela 04 - Soluções de nutrição parenteral comercialmente adquiridas.

PRODUTO	FABRICANTE
Aminon 20	JP Indústria Farmacêutica S.A .
Soramim 10%	Darrow Laboratórios S/A
Aminoplasma L-10 ^A	Laboratórios B. Braun S.A .
Aminosteril 10%	Fresenius Laboratórios Ltda
Aminosteril Hepa 8%	Fresenius Laboratórios Ltda
Aminoped 10%	Fresenius Laboratórios Ltda
Aminosteril Nefro	Fresenius Laboratórios Ltda
Nefroamino	Laboratórios B. Braun S.A .

3.6 Procedimentos

3.6.1 Incubação dos metais Cd e Pb na presença dos aminoácidos

Inicialmente, transferiu-se cada uma das amostras de aminoácidos (10 mL), preparadas anteriormente na concentração usual em que se encontram nas formulações de NP, para frascos de polietileno com tampa e o pH foi ajustado entre 6-7, com solução de NaOH 25% (m/v). Após, adicionou-se uma concentração conhecida de um padrão de Cd - Pb, correspondente a uma concentração de 10 nmol L^{-1} , ou seja, as amostras foram contaminadas artificialmente com os metais cádmio e chumbo.

Após a adição dos metais as soluções foram homogeneizadas e conservadas por 24 horas a 37°C em banho-maria, com o objetivo de proporcionar a ligação dos metais com os aminoácidos, ou seja, favorecer a complexação dos metais com os aminoácidos.

3.6.2 Ensaio voltamétricos

3.6.2.1 Eletrólitos utilizados

Para as determinações dos metais por voltametria foram utilizados dois eletrólitos suporte: ácido perclórico (70%) e tampão acetato pH 4,55.

O eletrólito HClO_4 era adicionado diretamente na célula voltamétrica de trabalho, na qual a concentração final era $16,7 \text{ mmol L}^{-1}$ ($10 \text{ }\mu\text{L}$ do eletrólito em 10 mL de solução). A solução tampão de cloreto de potássio/acetato de sódio que foi preparado a partir de uma solução de KCl $1,5 \text{ mol L}^{-1}$, CH_3COONa $0,5 \text{ mol L}^{-1}$ e solução de NaOH $0,1 \text{ mol L}^{-1}$. O pH foi ajustado em 4,55 com uma solução de ácido acético 10% (v/v).

3.6.2.3 Efeito do tamanho da área do eletrodo de mercúrio

Para estudar o efeito do tamanho da área do eletrodo de mercúrio na determinação de cádmio e chumbo, utilizou-se uma concentração de $1,6 \text{ nmol L}^{-1}$ dos metais e foram investigadas as áreas de 0,29; 0,40; 0,50; 0,60 mm^2 .

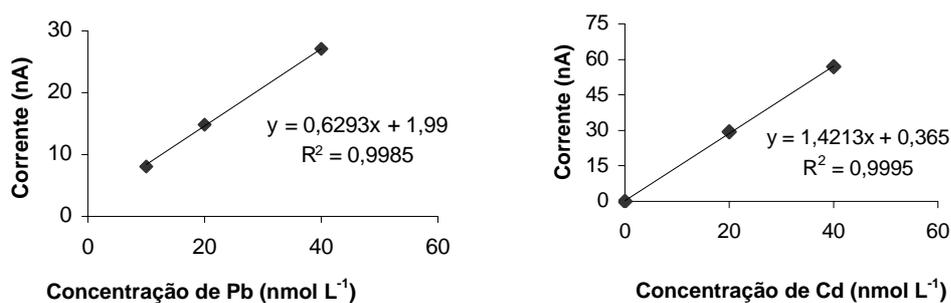
3.6.2.4 Efeito do tempo de pré-concentração

Para estudar o efeito do tempo de pré-concentração na determinação dos metais (Cd e Pb) foram investigados os tempos de pré-concentração de 30, 60, 90, 120 e 180 s, utilizando-se concentrações de 1,6; 4,0 e 8,0 nmol L^{-1} dos metais.

3.6.3 Determinação voltamétrica de Cd e Pb para limite de quantificação na ausência de aminoácidos

A partir das soluções estoque de cádmio $0,6 \text{ mol L}^{-1}$ e de chumbo $0,6 \text{ mol L}^{-1}$ preparadas como descrito na secção 3.2.1, preparou-se uma solução estoque dos dois metais. Para isso, foram feitas diluições das soluções estoques originais e obteve-se uma nova solução padrão estoque dos metais na concentração de $0,04 \text{ mmol L}^{-1}$. Para as determinações voltamétricas, alíquotas de $40 \text{ }\mu\text{L}$ deste padrão eram adicionadas à célula voltamétrica contendo 10 mL de água com o eletrólito HClO_4 na concentração de $16,7 \text{ }\mu\text{mol L}^{-1}$. Diluições desse padrão foram realizadas até uma concentração mais baixa de $0,4 \text{ }\mu\text{mol L}^{-1}$. Este padrão foi utilizado em todas as medidas voltamétricas realizadas na ausência de aminoácidos, para a posterior determinação da concentração mínima detectável dos metais na célula voltamétrica sem interferência de matéria orgânica.

Figura 02 –Curvas analíticas para Cd e Pb utilizadas para os valores de LOD



3.6.4 Determinação voltamétrica de Cd e Pb na presença de aminoácidos

Para as medidas voltamétricas, adicionou-se 10 μL da solução do eletrólito suporte (HClO_4 concentrado) à célula voltamétrica, deixando-se o sistema desaerando por 10 min. com nitrogênio SS. Terminada a etapa de digestão, as amostras eram transferidas para a célula voltamétrica. Para a obtenção dos voltamogramas, os analitos foram pré-concentrados em potencial de -800 mV (*vs.* Ag/AgCl) com um tempo de pré-concentração de 90 s e intervalo de varredura de -800 a -160 mV (*vs.* Ag/AgCl).

O método da adição do padrão ($n = 3$) foi empregado para a determinação da concentração dos analitos nas soluções de aminoácidos, pois é possível fazer a calibração nas condições da matriz, necessita menor tempo de saturação com nitrogênio entre análises é mais simples do que as outras formas de calibração.

3.7 Etapas de digestão das amostras

3.7.1 Digestão por irradiação com microondas

Dois programas foram testados utilizando o forno de microondas. Em ambos, o prato do forno usado era giratório e dois pontos foram marcados no prato: um para um béquer de vidro contendo água e outro para colocar o frasco de plástico contendo a amostra. A água do béquer era trocada nos intervalos em que a amostra era resfriada.

Os dois programas foram desenvolvidos para proporcionar uma ação gradual sobre a amostra, evitando um aquecimento exagerado, que poderia levar a um aumento da pressão interna e a abertura do tubo com a perda do material. O primeiro Programa adotado constou das etapas descritas na tabela 3. Após cada etapa do procedimento a amostra era resfriada. O mesmo programa de microondas foi testado utilizando os ácidos: nítrico, sulfúrico e tricloroacético (TCA); utilizou-se ainda, hidróxido de sódio, todos na concentração 10% (m/v), na proporção 9:1 (aminoácido: ácido).

Tabela 05 - Programa 1 desenvolvido para o forno de microondas para abertura das amostras de aminoácidos utilizando solução ácida diluída.

Etapa	Repetições	% potência	Potência (W)	Tempo (s)
1	5	10	174	10
2	5	20	244	5
3	5	30	296	5
4	5	40	348	5
5	5	50	383	5

Continuação da tabela 05

6	5	60	453	5
7	5	70	522	5
8	5	80	557	5
9	5	90	610	5
10	4	100	749	4

Outro Programa (P2) utilizado constou da seguinte metodologia: 25 μL de ácido sulfúrico concentrado e 50 μL de ácido nítrico foram irradiados em potência máxima por 20 s em um frasco de 40 mL. A seguir, adicionaram-se 100 μL da amostra (aminoácido na concentração usual das soluções NP) e aquecia-se por mais 20 s e então, adicionava alguns mililitros de água. A cada 20 s adicionava-se 100 μL da amostra até completar 1 mL. A partir daí, a amostra foi irradiada até completar oito min. e a cada 20 s a amostra era resfriada e a tampa do frasco aberta para reduzir a pressão. Após esta etapa, a amostra era diluída 10 vezes para determinação voltamétrica.

Alguns parâmetros como: a diluição prévia da amostra em 10 vezes e em seguida a sua adição em alíquotas de 100 μL e também, o aumento do tempo total de duração do programa para 20 min foram variados em busca da otimização do processo. Após esses procedimentos, realizavam-se as medidas voltamétricas para a determinação dos metais.

3.7.2 Digestão por via úmida

Uma metodologia comumente adotada para determinação de chumbo e mercúrio em sangue e urina foi utilizada.[104,105] Foi adicionado 7,5 mL

de ácido nítrico (conc.) 2,5 mL de ácido sulfúrico (conc.) a 1 mL de amostra de aminoácido na concentração usual das formulações NP em um frasco de plástico. Deixava-se em repouso por 24 h. Após levava-se à ebulição por, aproximadamente 3 h e a cada hora, adicionava-se 200 µL de peróxido de hidrogênio 30% (v/v). Após, a determinação dos metais era realizada por voltametria.

3.7.3 Digestão por irradiação ultravioleta (UV)

Inicialmente, as amostras de aminoácidos foram preparadas nas suas respectivas concentrações toleráveis para medida voltamétrica, já incubada com determinada concentração do padrão dos metais foram transferidas para o tubo de quartzo e submetidas (12 tubos no total) à radiação UV.

O pH de cada solução de aminoácido foi ajustado para encontrar-se entre 6-7 antes da etapa de incubação.

As amostras de aminoácidos foram transferidas em alíquotas de 10 mL para tubos cilíndricos de quartzo e estes eram fechados, de modo a impedir qualquer perda de algum componente por volatilização. O suporte dos tubos permite acomodar 12 tubos ao redor do bulbo de uma lâmpada de vapor de mercúrio de 500 W de potência. O sistema possui circulação de água e um ventilador para circulação de ar a fim de proporcionar o resfriamento impedindo o super aquecimento do sistema. Um termômetro de mercúrio foi inserido no tubo número 1 do conjunto. Há um dispositivo para controle do tempo, em horas. Neste trabalho foram testadas 2; 4 e 8 h de digestão e a temperatura utilizada foi de ~80°C. Antes do início da irradiação fazia-se a adição de 50 µL de peróxido de hidrogênio 30% purificado, após 2 horas fazia-se nova adição. Após o desligamento da

lâmpada, esperava-se em torno de 10 minutos para as amostras retomarem a temperatura ambiente, logo media-se o pH das amostras para então ajustá-lo a pH 4,55 com o tampão KCl/NaAc, utilizado como eletrólito na medida voltamétrica. Terminada essa etapa de digestão, as amostras eram retiradas dos tubos de quartzo do digestor UV e transferidas para a célula voltamétrica.

Diversos parâmetros foram avaliados para otimização do pré-tratamento UV, entre eles estão: volume da amostra, adição de ácidos e peróxido, tempo de irradiação UV, tempo de pré-concentração e diferentes eletrólitos.

3.8 Purificação do peróxido de hidrogênio

Devido à constatação do reagente H_2O_2 p.a. apresentar concentrações de Cd e Pb acima da provável contaminação trazidas pelos aminoácidos, fez-se necessário a purificação do mesmo. Foi utilizada uma resina catiônica (Resina Dowex 50 x 4 (50 – 100 mesh - Fluka), lavando-se 3,2 g da resina, em coluna de vidro com, aproximadamente, 300 mL de uma solução de cloreto de sódio (1 mol L^{-1}), com uma vazão de fluxo de 2 mL min^{-1} , a fim de fazer-se a substituição do H^+ por Na^+ . Fez-se o controle do pH do eluído realizando a medida a cada 10 mL eluído até o mesmo encontrar-se em torno de pH 5,5. A seguir, fez-se eluir através da resina 200 mL de peróxido de hidrogênio p.a. para haver a substituição do Na^+ pelos íons Cd^{2+} e Pb^{2+} . A partir daí o peróxido purificado foi armazenado em frasco âmbar para posterior utilização.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Determinação voltamétrica de Cd e Pb

A voltametria oferece rapidez na análise, seletividade e sensibilidade para investigar e estudar a especiação de metais pesados dissolvidos em águas naturais.[34,35,36,37] A maioria dos metais de significância ecotoxicológica são determinados por voltametria geralmente no modo pulso diferencial. [34,38, 105]

Por outro lado, certas espécies de metais dissolvidos, que formam complexos orgânicos estáveis, são de difícil determinação voltamétrica. Portanto, para determinação dessas espécies na forma livre faz-se necessário um pré-tratamento da amostra.

As soluções de aminoácidos apresentam-se como matrizes bastante complexas, por serem compostos orgânicos. A concentração dos metais presentes nesse tipo de matriz é baixa, o que os torna menos disponíveis para a determinação direta nos aminoácidos. Como comportamento geral na determinação voltamétrica dos metais, observa-se um aumento da linha de base para a maioria dos aminoácidos, ou seja, a presença da matéria orgânica encobre os sinais desses metais inviabilizando a análise.

Segundo Van den Berg [106] os compostos orgânicos interferem na determinação de metais por voltametria: 1) pela formação de fortes complexos com metais, os quais não são detectados durante a análise da amostra, levando à 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 ainda, 3) pela própria redução ou oxidação eletroquímica, aumentando a corrente residual a ponto de impedir a

execução da análise. Desta forma, no presente trabalho investigou-se individualmente o comportamento eletroquímico de todos os aminoácidos presentes nas formulações de NP. O critério geral adotado foi a comparação das correntes obtidas nas análises dos metais na presença e na ausência dos aminoácidos. Embora o valor absoluto das correntes em medidas voltamétricas não permita, via de regra, conclusões sobre a possibilidade ou não de determinar os metais na presença dos aminoácidos, o comparativo entre estas correntes é válido quando forem obtidas em condições tais que apenas a concentração do aminoácido varie. A partir deste estudo, foi possível dividir os aminoácidos que compõem as soluções de NP em três grupos de acordo com a necessidade ou não de abertura de amostra.

Na tentativa de tornar a determinação dos metais presentes nos aminoácidos mais simples, ou seja, sem a necessidade de realizar a abertura da amostra, investigou-se qual a influência da variação de alguns parâmetros na determinação desses metais. Dentre estes estão o tempo de pré-concentração, a área do eletrodo de mercúrio e os limites de detecção e quantificação dos metais.

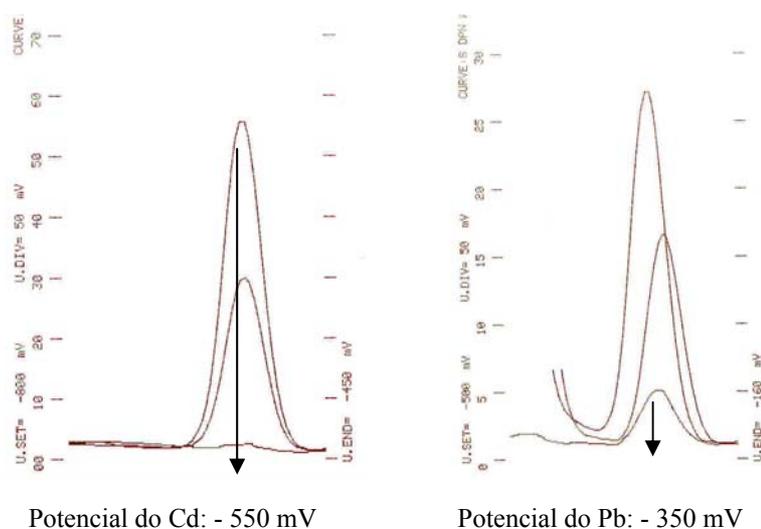
4.1.1 Limite de detecção para Cádmio e Chumbo na ausência dos aminoácidos

As concentrações mínimas dos metais (Cd e Pb) livres de qualquer interferência e determináveis por voltametria, foram obtidas a partir da adição de padrões destes metais à célula voltamétrica utilizando-se o ácido perclórico como eletrólito, uma vez que esta espécie não forma complexos estáveis com estes metais. (vide seção 3.6.3)

O cálculo do limite de detecção (LOD) foi realizado a partir da avaliação do desvio padrão (σ) observado em medidas sucessivas da linha

de base (B_L) na ausência dos analitos. O critério utilizado para o cálculo do LOD foi ($B_L \pm 3\sigma$). [102] Os valores calculados para Cd e Pb a partir das curvas analíticas, foram $0,22 \text{ nmol L}^{-1}$ e $0,86 \text{ nmol L}^{-1}$, respectivamente. Na figura 31 estão mostrados os voltamogramas típicos dos metais Cd e Pb obtidos nas condições utilizadas para os cálculos dos valores de LOD. Na figura 2 (item 3.6.3) observa-se as curvas analíticas correspondentes. Após realizados estes ensaios, investigou-se a concentração mínima detectável tomando como critério o limite de quantificação determinado pela relação ($B_L \pm 10\sigma$). Este valor foi $1,6 \text{ nmol L}^{-1}$ para cádmio e chumbo utilizando-se um tempo de pré-concentração no eletrodo de mercúrio (HMDE) de 90 s.

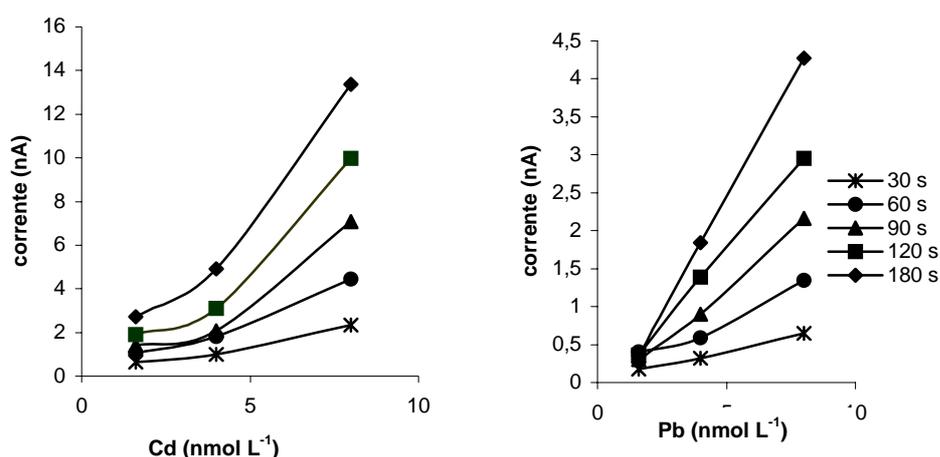
Figura 03 - Sinais voltamétricos de Cd e Pb obtidos nas condições utilizadas para os cálculos dos valores de LOD.



4.1.2 Influência do tempo de pré-concentração na determinação de Cádmio e Chumbo

Diversas análises voltamétricas foram realizadas variando o tempo de pré-concentração entre 30 e 180 s nas concentrações: 1,6; 4 e 8 nmol L⁻¹ dos padrões dos metais de acordo com o procedimento descrito na secção 3.6.2.4. A figura 04 mostra o comportamento do sinal para Cd e Pb em função do tempo de pré-concentração no eletrodo.

Figura 04 - Influência do tempo de pré-concentração para Cd e Pb



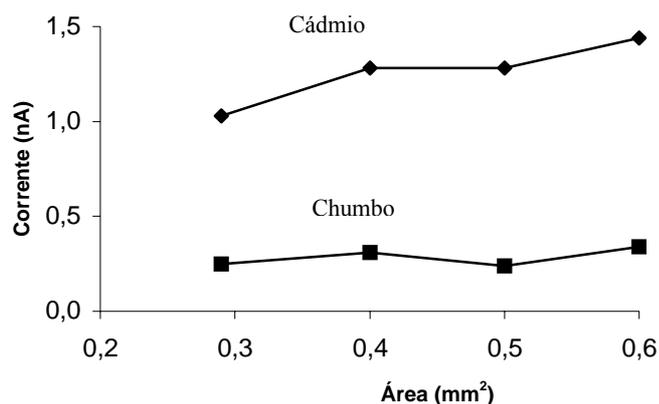
Considerando-se, neste trabalho, que a concentração mínima dos metais detectável na célula através das medidas voltamétricas dos metais foi de 1,6 nmol L⁻¹; na figura 4, observou-se que na menor concentração analisada, não houve variação significativa na corrente quando se utiliza a faixa de 30 a 180s como tempo de pré-concentração. Portanto, definiu-se 90s, por ser um tempo médio dentro desta faixa testada e desta forma, o tempo ideal para a pré-concentração dos metais no eletrodo de Hg na presença dos aminoácidos.

4.1.3 Influência da área do eletrodo de Hg na determinação de Cádmio e Chumbo

Com o objetivo de conhecer a influência da área do eletrodo de Hg nos sinais voltamétricos dos metais realizou-se os ensaios em uma faixa ampla de áreas.

A medida voltamétrica foi realizada em uma célula contendo uma concentração dos metais correspondente a $1,6 \text{ nmol L}^{-1}$ em água, variando o tamanho da gota de mercúrio entre $0,29$ a $0,60 \text{ mm}^2$ ilustrado na figura 05.

Figura 05 - Área do eletrodo vs. corrente para cádmio e chumbo

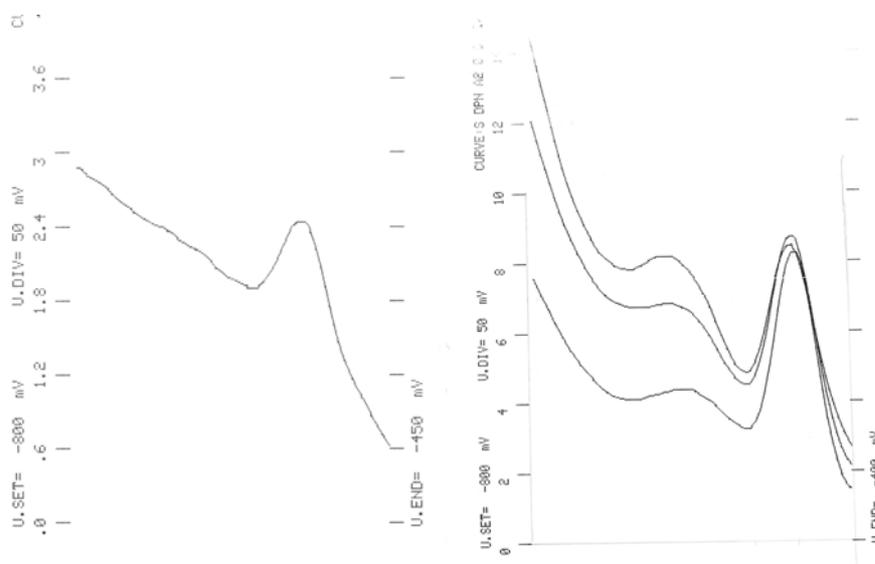


Utilizou-se a área máxima de $0,60 \text{ mm}^2$ na determinação dos metais na presença dos aminoácidos, pois quando analisados sem interferência de compostos orgânicos (em água Milli-Q) apresentam maior valor de corrente tanto para cádmio quanto para chumbo.

4.2 O problema da determinação voltamétrica de Cd e Pb na presença de aminoácidos

Nas condições estabelecidas neste trabalho, com a utilização do ácido perclórico como eletrólito e considerando a variação dos parâmetros voltamétricos descritos no item 4.1, foi possível determinar os metais, cádmio e chumbo em água na concentração mínima de $1,6 \text{ nmol L}^{-1}$. No entanto na presença dos aminoácidos observou-se interferências importantes devido às interações com os metais. Um sinal bem característico observado nos voltamogramas em decorrência dessa interferência, é a elevação significativa de linha base dos metais na presença dos aminoácidos em comparação ao voltamograma dos metais em água pura (figura 06).

Figura 06 - Voltamograma do sinal do Cd livre (esquerda) e sinal do Cd na solução de triptofano ($0,81 \text{ g L}^{-1}$) (direita)



4.2.1 Ensaio para detecção da quantidade tolerável de aminoácidos na célula voltamétrica

Inicialmente, preparou-se solução estoque de todos os aminoácidos individualmente na concentração média em que cada um encontra-se nas formulações de Soluções NP. Neste trabalho foram pesquisadas oito soluções mais comumente utilizadas nos pacientes (apêndice 4).

Cada solução de aminoácido foi preparada em concentração diferente uma das outras. As concentrações em g. L^{-1} e em mmol L^{-1} encontram-se listadas no apêndice 2.

Medidas voltamétricas de cada aminoácido foram realizadas nas concentrações usuais, porém observou-se a impossibilidade de trabalhar com essas concentrações, visto que, a presença de aminoácido modifica o sinal dos metais dificultando a percepção de algum contaminante nestas soluções.

Outra modificação também observada foi o deslocamento do potencial de pico dos metais. Para alguns aminoácidos observou-se um pequeno deslocamento dos sinais de cádmio e chumbo em direção a potenciais mais catódicos.

Analisando os sinais dos metais nos seus máximos, em meio contendo aminoácidos e em meio livre de aminoácidos, observou-se algumas variações dos potenciais onde os máximos dos sinais para cádmio e chumbo eram encontrados. Deste modo, para alguns aminoácidos o deslocamento dos sinais dos metais ocorreu na direção de potenciais mais catódicos e para outros na direção de potenciais mais anódicos.

Para fenilalanina ($2,68 \text{ g L}^{-1}$) ocorreu o deslocamento do potencial de -550 mV para -675 mV do sinal de cádmio, para o ácido glutâmico na mesma concentração da fenilalanina, o deslocamento foi de -500 mV para

-650 mV para cádmio. Entretanto, para o triptofano ($0,69 \text{ g L}^{-1}$), prolina ($0,05 \text{ g L}^{-1}$) e ornitina ($0,16 \text{ g L}^{-1}$) não ocorreram deslocamento para ambos os sinais. Para arginina ($0,51 \text{ g L}^{-1}$) e serina ($0,47 \text{ g L}^{-1}$) o deslocamento do potencial foi de 50 mV no sentido de potenciais mais anódicos para o sinal de Cd. Para leucina ($0,64 \text{ g L}^{-1}$) houve um deslocamento de 75 mV no sentido de potenciais mais anódicos para o sinal de cádmio. Este fenômeno tem, provavelmente, correlação com algum processo de adsorção dos aminoácidos na superfície do eletrodo de mercúrio.

A literatura reporta alguns estudos que também observam semelhanças neste tipo de modificação como o trabalho desenvolvido por Florence e cols. [109, 112] em águas naturais e utilizando ASV. Os autores observaram que efeitos como diminuição ou aumento na altura do pico e alteração do potencial podem ser trazidos por substâncias naturais (ácidos fúlvicos e húmicos) e por alguns poluentes industriais típicos como álcoois e aminas de cadeia longas, originando ainda ondas resultantes da adsorção e dessorção no eletrodo de Hg que são eliminados quando a amostra é irradiada com luz UV ou tratada com carvão ativado.[113] Adicionalmente, Dorten e cols. analisaram metais pesados por voltametria e polarografia em águas naturais e constataram que a influência da formação de complexos e adsorção complicam a interpretação dos resultados porque a matéria orgânica dissolvida não comporta-se como uma substância simples e pode causar uma mudança no potencial de pico pela complexação após a reoxidação no eletrodo de mercúrio. [114]

Assim, para avaliar a interferência do meio nas medidas, realizou-se diversas diluições das soluções usuais de aminoácidos com objetivo de alcançar uma concentração possível de determinar os metais na forma livre, ou seja, não complexada.

Porém, a diluição não pode ser excessiva, apesar do voltamograma de uma solução bastante diluída apresentar-se melhor visualmente, por que

sendo assim a concentração do metal como contaminante será proporcionalmente menor, impossibilitando muitas vezes a sua determinação. Encontra-se na literatura que a concentração de Cd e Pb presentes como contaminantes de aminoácidos é muito baixa, sendo encontrada na faixa de traços. [115]

Portanto, as medidas voltamétricas foram realizadas a partir de incrementos de concentrações conhecidas de aminoácidos na célula voltamétrica já contendo água e eletrólito.

Na tabela 06, estão listadas as respectivas concentrações das soluções de aminoácidos, as quais foram testadas para encontrar aquela em que fosse possível detectar o sinal do cádmio e do chumbo. Os dados na tabela mostram a concentração dos aminoácidos na forma percentual em que se encontram originalmente nas formulações de NP e na concentração efetiva em g L^{-1} .

Tabela 06 – Concentração das soluções de aminoácidos utilizadas nos ensaios para detecção da quantidade tolerável na célula voltamétrica

Aminoácidos	Percentagem de aminoácido da solução original de NP (%)	Concentração efetiva (g L ⁻¹)
Isoleucina (Ile)	50	3,43
Arginina (Arg)	5	0,51
	6,1	0,62
	6,9	0,70
Leucina (Leu)	5	0,48
	5,8	0,55
	6,7	0,64
Alanina (Ala)	4	0,46
Ácido aspártico (Asp)	2,0	0,18
	2,73	0,24
	3,33	0,30
Ornitina (Orn)	3	0,10
	3,9	0,16
	4,6	0,15
Serina (Ser)	10	0,47
Metionina (Met)	8	0,36
	8,5	0,38
	8,7	0,39
Tirosina (Tyr)	50	0,18
Tryptofano (Trp)	30	0,53
	39	0,69
	46	0,81
Prolina (Pro)	0,5	0,05
	13,6	1,43
	20,8	2,18
Cisteína (Cys)	1	0,01
	6	0,06
Ácido glutâmico(Glu)	40	2,72
	50	3,41
Glicina (Gly)	9	0,86
	26	2,47
	45	4,28
	55,5	5,28
Treonina (Thr)	30	1,37
	36,3	1,65
	42	1,91

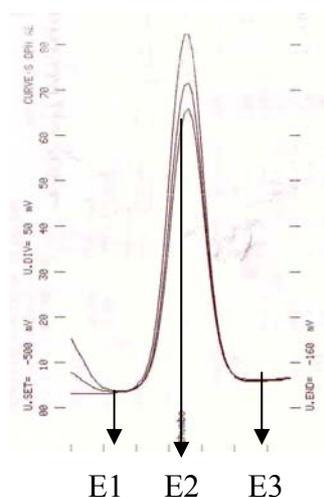
Continuação da tabela 06

Fenilalanina (Phe)	50	2,68
Lisina (Lys)	30	2,40
	42	3,37
	6	0,27
Histidina (His)	10	0,46
	25	1,14
	1	0,01
asparagina (Asn)	3	0,09
	8	0,1

As soluções de aminoácidos foram divididas em dois grandes grupos conforme as concentrações obtidas após as diluições: faixa de concentração de 0,01 a 1 g L⁻¹ e faixa de 1 a 6 g L⁻¹ para posterior organização dos dados na forma gráfica.

A corrente foi medida em três potenciais distintos: potencial no início da formação do sinal (E1); potencial referente ao máximo do sinal (E2) e ainda, o potencial no final do sinal de ambos metais (Cd e Pb) conforme ilustra a figura 07.

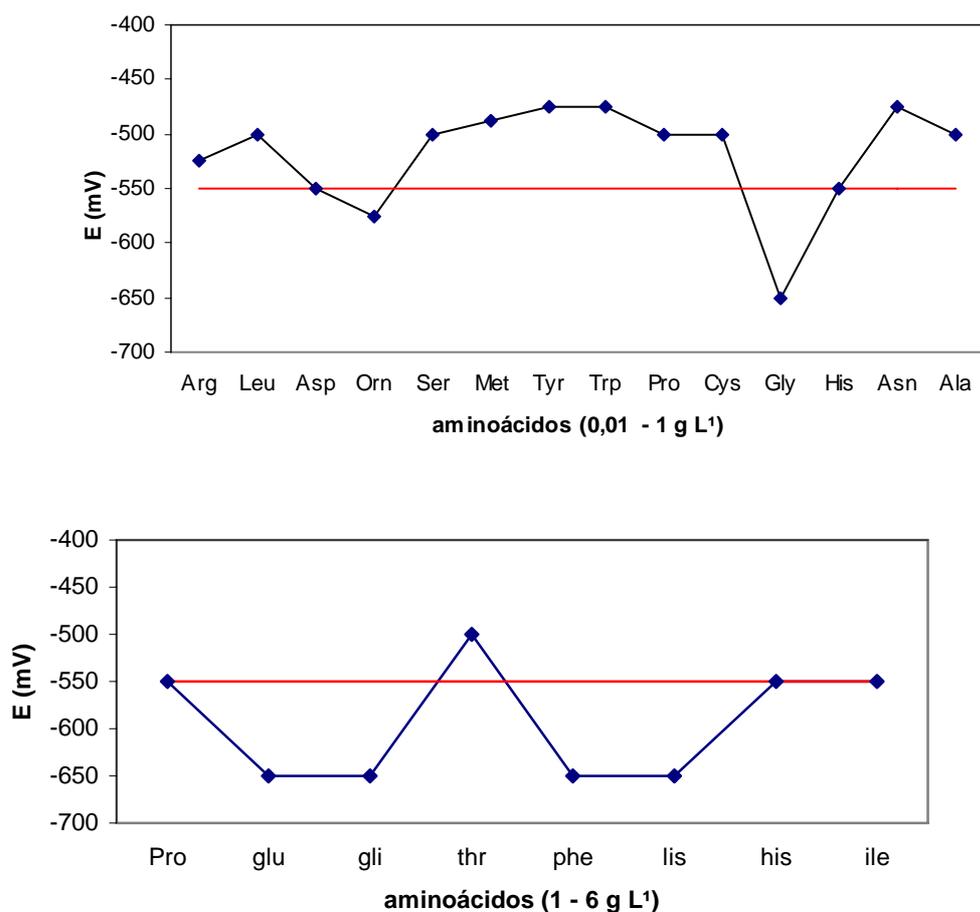
Figura 07 - Voltamograma de uma solução de aminoácido isoleucina (3,43 g L⁻¹) com adição de Pb (10 nmol L⁻¹) ilustrando a localização dos três potenciais (E1, E2, E3)



O efeito do deslocamento do potencial de pico dos metais observado para alguns aminoácidos, quando comparado o sinal do metal livre (Cd) com o sinal do metal em aminoácido foi demonstrado através da figura 08. O potencial em que foi medido o máximo do sinal para Cd livre foi de -550 mV.

A figura 08 mostra o deslocamento do potencial (no máximo do sinal do Cd) dos aminoácidos em duas faixas de concentrações, de $0,01$ a 1 g L^{-1} e de 1 a 6 g L^{-1} em relação ao potencial do sinal do Cd livre.

Figura 08 – Gráficos do potencial do sinal de Cd nos aminoácidos em relação ao potencial do Cd livre.

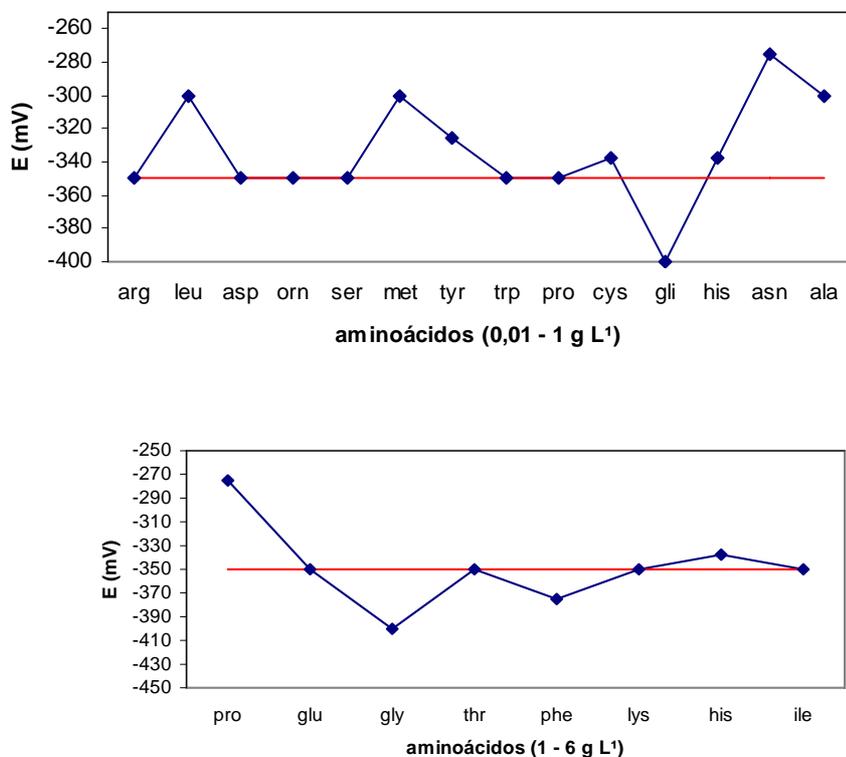


Entre todos os aminoácidos estudados, somente o ácido aspártico e a histidina na concentração de 0,24 e 0,46 g L⁻¹ respectivamente, não foi observado deslocamento do potencial. Para ornitina e glicina houve deslocamento do sinal para potenciais mais catódicos e para os demais o deslocamento do sinal foi no sentido de potenciais mais anódicos.

No grupo dos aminoácidos de concentração maior (1 a 6 g L⁻¹), a prolina (2,18 g L⁻¹), histidina (1,14 g L⁻¹) e isoleucina (3,43 g L⁻¹) não apresentaram deslocamento de potencial no máximo do sinal de cádmio. Entretanto, os aminoácidos ácido glutâmico (3,41 g L⁻¹), glicina (4,28 g L⁻¹), fenilalanina (2,68 g L⁻¹) e lisina (3,37 g L⁻¹) apresentaram deslocamento no sentido de potenciais mais catódicos, enquanto a treonina (1,65 g L⁻¹) foi deslocado para potencial mais anódico.

A figura 09 mostra o deslocamento do potencial para chumbo (no máximo do sinal do Pb) dos aminoácidos em duas faixas de concentrações, de 0,01 a 1 gL⁻¹ e de 1 a 6 g L⁻¹ em relação ao potencial do sinal do Pb livre.

Figura 09 – Gráficos do potencial do sinal de Pb nos aminoácidos em relação ao potencial do Pb livre.



Para o aminoácido glicina ($0,86 \text{ g L}^{-1}$) houve um deslocamento do potencial, no sentido catódico. Para os aminoácidos leucina ($0,48 \text{ g L}^{-1}$), metionina ($0,38 \text{ g L}^{-1}$), tirosina ($0,18 \text{ g L}^{-1}$), cisteína ($0,01 \text{ g L}^{-1}$), histidina ($0,46 \text{ g L}^{-1}$), asparagina ($0,04 \text{ g L}^{-1}$) e alanina ($0,86 \text{ g L}^{-1}$) deslocaram o potencial no sentido anódico e para os demais aminoácidos (de concentração entre $0,01$ a 1 g L^{-1}) não houve deslocamento do potencial.

No grupo dos aminoácidos de concentração maior (1 a 6 g L^{-1}), a prolina ($2,18 \text{ g L}^{-1}$) e histidina ($1,14 \text{ g L}^{-1}$) observou-se um deslocamento do potencial, no sentido de potenciais anódicos. Para os aminoácidos glicina ($4,28 \text{ g L}^{-1}$) e fenilalanina ($2,68 \text{ g L}^{-1}$) os potenciais deslocaram para o sentido catódico. Para os demais aminoácidos não houve deslocamento do

potencial no máximo do sinal do chumbo em relação ao sinal do chumbo livre.

As correntes obtidas por voltametria com os metais livres na célula (analito + eletrólito) foram relacionadas com as correntes obtidas na presença dos aminoácidos.

Os três sinais de corrente medidos corresponderam à I1: corrente (nA) medida no potencial do início da formação do sinal; I2: corrente (nA) medida no máximo do sinal e I3: corrente medida no final do sinal. Os potenciais onde as correntes são medidas não são fixos, ou seja, não são os mesmos para todos os aminoácidos, pois cada aminoácido interfere com a medida voltamétrica de forma particular.

Para os metais cádmio e chumbo livre, as respectivas correntes estão descritas na tabela 07.

Tabela 07 - Corrente em nA obtida na presença de Cd²⁺ e Pb²⁺ 1,6 nmol L⁻¹

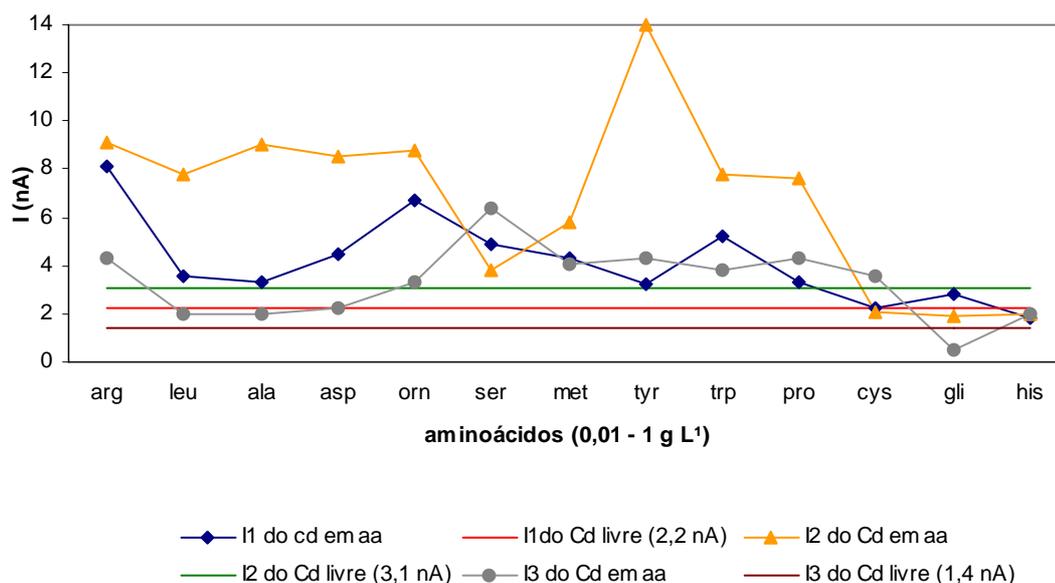
	I1	I2	I3
cádmio	2,2	3,1	1,4
chumbo	0,7	1,0	0,8

O critério adotado para rejeitar ou aceitar um dado valor de corrente da linha base está vinculado ao sinal obtido em água pura na presença dos metais na ordem de nmol L⁻¹. Correntes obtidas na presença de aminoácidos em concentrações superiores a duas vezes as correntes obtidas na ausência deles inviabilizavam a determinação das concentrações mínimas desejadas. Desta forma, para alguns aminoácidos os ensaios foram feitos em concentrações mais altas que para outros.

Na figura 10, o gráfico relaciona a corrente (nA) medida no potencial do início da formação do sinal (I1), no máximo do sinal (I2) e no final do sinal (I3) do cádmio livre com as mesmas correntes (I1, I2 e I3) do sinal do

cádmio nos aminoácidos individualmente. A faixa de concentração das soluções de aminoácido foi de 0,01 a 1 g L⁻¹.

Figura 10 – Gráfico das correntes (nA) I1, I2 e I3 do sinal de Cd nos aminoácidos, na concentração de 0,01 a 1 g L⁻¹, em relação às correntes do sinal do Cd livre.



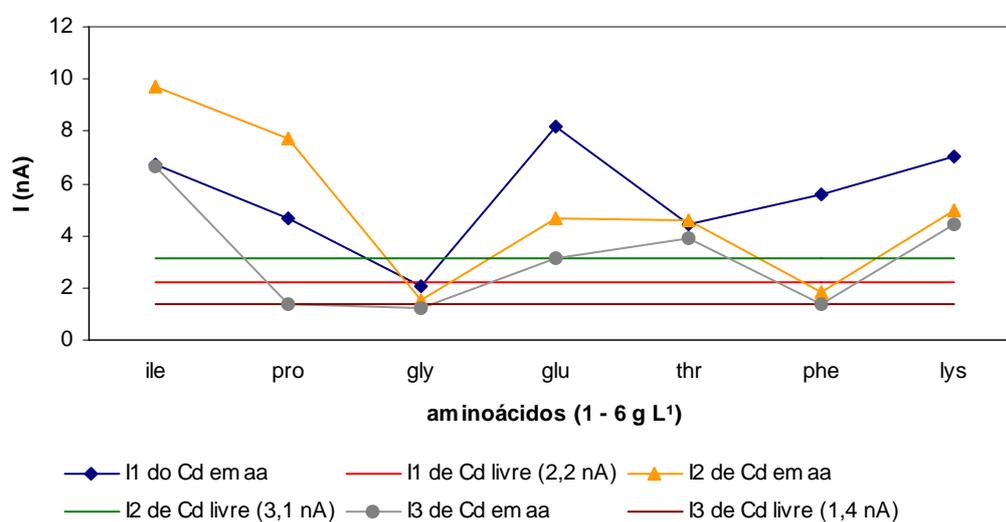
Entre os aminoácidos analisados, apenas para os aminoácidos cisteína (0,01 g L⁻¹) e histidina (0,46 g L⁻¹), não ocorreu aumento do sinal para cádmio quando medido no potencial do início da formação do sinal (I1). Para os demais aminoácidos, na faixa de concentração de 0,01 a 1 g L⁻¹, ocorreu um aumento da linha base.

O mesmo comportamento foi observado para I2, quando apenas para os aminoácidos cisteína (0,01 g L⁻¹), glicina (0,86 g L⁻¹) e histidina (0,46 g L⁻¹) não ocorreram aumento do sinal para cádmio quando medido no máximo do sinal. E ainda, quando a corrente foi medida no final do sinal do cádmio, observou-se que apenas a solução de glicina (0,86 g L⁻¹) não

aumentou o sinal de cádmio quando comparado com o mesmo livre (em água pura).

Na figura 11, o gráfico relaciona os mesmos dados da figura 13, porém com as soluções de aminoácidos na faixa de concentração de 1 a 6 g L⁻¹.

Figura 11 – Gráfico das correntes (nA) I1, I2 e I3 do sinal de Cd nos aminoácidos, na concentração de 1 a 6 g L⁻¹, em relação às correntes do sinal do Cd livre.



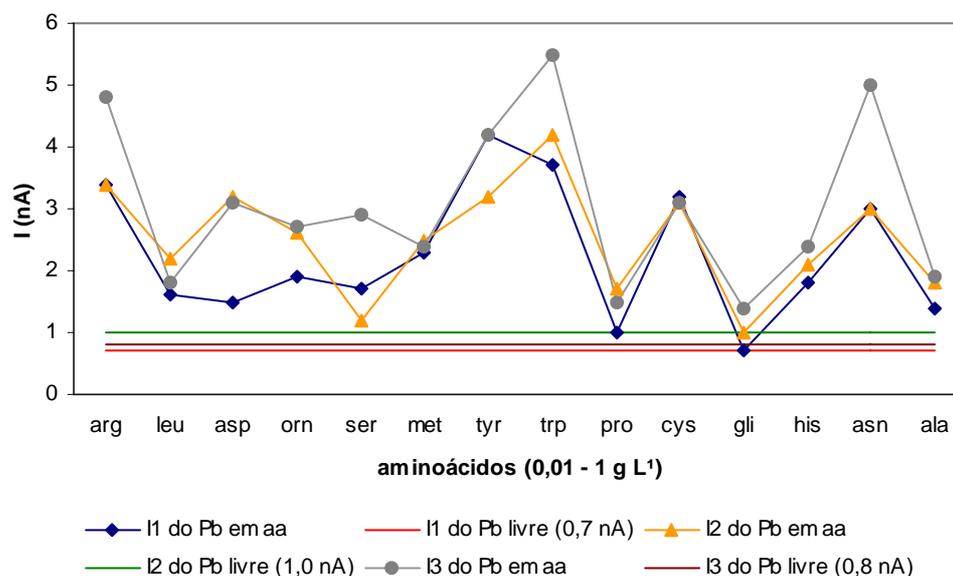
Entre os aminoácidos analisados, apenas a solução de aminoácido glicina (4,3 g L⁻¹) não foi observado aumento do sinal para cádmio quando medido no potencial do início da formação do sinal (I1). Para os demais aminoácidos, na faixa de concentração de 1 a 6 g L⁻¹, ocorreu um aumento da linha base.

O mesmo comportamento foi observado para I2, quando apenas os aminoácidos glicina (4,3 g L⁻¹) e fenilalanina (2,68 g L⁻¹) não houve

aumento do sinal para cádmio quando medido no máximo do sinal. Quando a corrente foi medida no final do sinal do cádmio (I3), observou-se que as soluções dos aminoácidos prolina (4,26 g L⁻¹), glicina (0,86 g L⁻¹) e fenilalanina (2,68 g L⁻¹), o sinal de cádmio não aumentou quando comparado com o sinal livre (em água pura).

Na figura 12, o gráfico relaciona a corrente (nA) medida no potencial do início da formação do sinal (I1), no máximo do sinal (I2) e no final do sinal (I3) do chumbo livre com as mesmas correntes (I1, I2 e I3) do sinal do chumbo nos aminoácidos individualmente. A faixa de concentração das soluções de aminoácido foi de 0,01 a 1 g L⁻¹.

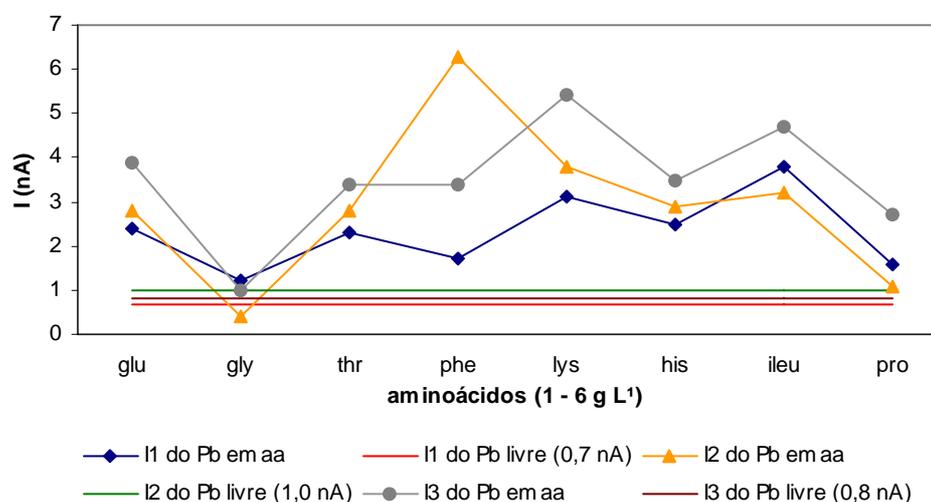
Figura 12 – Gráfico das correntes (nA) I1, I2 e I3 do sinal de Pb nos aminoácidos, na concentração de 0,01 a 1 g L⁻¹, em relação às correntes do sinal do Pb livre .



Entre as soluções de aminoácidos analisadas, com concentração na faixa de 0,01 a 1 g L⁻¹, apenas o aminoácido glicina (0,86 g L⁻¹) permaneceu com o mesmo sinal do Pb livre medida no potencial do início

da formação do sinal (I1) e no máximo do sinal (I2). As demais soluções de aminoácidos (figura 12) sofreram um aumento no sinal do chumbo quando comparado com o mesmo sinal em água pura, ou seja, houve um aumento significativo da linha base para todas as soluções analisadas na faixa de concentração (0,01 – 1 g L⁻¹).

Figura 13 – Gráfico das correntes (nA) I1, I2 e I3 do sinal de Pb nos aminoácidos, na concentração de 1 a 6 g L⁻¹, em relação às correntes do sinal do Pb livre.



Entre as soluções de aminoácidos analisadas, na faixa de concentração de 1 a 6 g L⁻¹, foi observado o aumento da linha base nas três correntes medidas (I1, I2, I3) para chumbo em relação ao sinal do chumbo em água pura (livre), com exceção de glicina (4,28 g L⁻¹) que diminuiu o sinal do Pb em I1 e I2.

4.3 Estudo da interação aminoácido - metais

Diversos aminoácidos formam complexos com diferentes metais pesados, entre eles cádmio e chumbo. Dependendo das propriedades de cada aminoácido este terá um comportamento específico com determinado metal. As constantes de estabilidade conhecidas para espécies metal-aminoácido explicam razoavelmente a presença de Cd e Pb como contaminantes em determinadas soluções de NP. No entanto, são conhecidas um número limitado de constantes de estabilidade (tabela 08) e as informações sobre a distribuição dos contaminantes entre os aminoácidos são investigadas.

Tabela 08: Constantes de estabilidade dos aminoácidos com cádmio e chumbo

Aminoácido	Cádmio ($\log K$)	Chumbo ($\log K$)
histidina	5.66	5.94
ornitina	não encontrado	não encontrado
cistina	8.22	não encontrado
arginina	3.27	não encontrado
metionina	3.68	4.39
isoleucina	3.64	não encontrado
leucina	3.84	não encontrado
valina	3.72	não encontrado
fenilalanina	3.62	4.63 ³
asparagina	4.07 ³	4.91 ³
tirosina	3.57	4.14
cisteína	10.1	12.2
triptofano	4.48 ³	5.08
prolina	4.27	não encontrado
glicina	4.25	4.72
ácido aspártico	4.35	6.08
ácido glutâmico	3.8	4.5

alanina	3.98	4.15
treonina	3.9	4.43
serina	3.77	4.41
lisina	3.06	não encontrado

Estudos realizados por Simões Gonçalves e cols. mostram que, embora a estabilidade dos complexos seja bastante semelhante, visto que os grupos quelatos dos ligantes são os mesmos, a taxa de dissociação dos complexos pode ser diferente. O aspecto cinético dos complexos de cádmio com aminoácidos em água do mar (0,7 M NaClO₄) foi estudado por voltametria cíclica sob a influência dos tipos de adsorção, mostrando ser possível determinar a constante de dissociação do complexo quando a adsorção é forte, pois os picos de difusão e adsorção apresentam-se bem separados. Aminoácidos do tipo HL ou HL⁻ (ácido glutâmico e ácido aspártico) são fracamente adsorvidos no mercúrio. Já os aminoácidos de longa cadeia de hidrocarbonetos (lisina e isoleucina), com grupos S em sua estrutura (metionina) ou ligação π (histidina) apresenta alta interação com a interface do mercúrio. No mesmo trabalho, os autores perceberam que o aumento do caráter polar das amins ou ácidos resultam na diminuição de suas atividades de superfície e concluíram que, dos compostos orgânicos as espécies neutras são mais adsorvidas do que as com carga, visto que o Hg é uma substância hidrofóbica e as espécies sem carga terão mais afinidade por ele. Por outro lado, deve-se considerar as forças físicas, de caráter eletrostático, visto que o eletrodo possui uma carga e as moléculas possuem grupos negativos ou positivos. [116]

4.3.1 Incubação para ligação de Cádmio e Chumbo aos aminoácidos

A partir das constantes de estabilidade é possível inferir quais os aminoácidos mais contaminados pelos metais. Contudo os aspectos cinéticos não são considerados pelos valores das constantes. Desta forma, foram realizados ensaios de incubação tomando como referência o estudo feito por Pomblum e cols. [117] com a finalidade de fornecer o tempo necessário de reação e condições adequadas de reação. Portanto, no presente trabalho, utilizou-se um tempo de 24 h para que o efeito cinético, que não é contemplado pela constante, se tornasse desprezível. Os ensaios de incubação estão descritos na seção 3.6.2.

As soluções, após incubadas, foram levadas a célula voltamétrica para determinação dos metais. A partir dos sinais obtidos foi possível observar que alguns metais se ligaram fortemente aos aminoácidos devido a completa supressão dos sinais. Em outros casos, esta supressão era apenas parcial ou, até mesmo não ocorria. Diante destes resultados as tabelas 09 e 10 indica a necessidade ou não de um processo de digestão da amostra para cada um dos aminoácidos analisados.

Tabela 09 – Resultado do ensaio de incubação (24h) do Cd com os aminoácidos e avaliação dos aminoácidos prováveis de estarem contaminados por Cd

aminoácido	Conc.(%)	Conc. (g L ⁻¹)	Cd adicionado (nmol L ⁻¹)	Recuperação do sinal do metal (%)	<i>cleanup</i> *
fenilalanina	50	2,68	10	40	+
fenilalanina	10	0,54	10	69	+
asparagina	8	0,10	10	56	+
treonina	42	1,91	10	100	-
ácido glutâmico	50	3,41	10	90	+
Glicina	9	0,86	10	100	-
triptofano	39	0,69	10	100	-

Lisina	30	2,40	10	72	+
arginina	5	0,51	10	44	+
isoleucina	50	3,43	10	97	-
cisteína	6	0,06	10	100	-
histidina	25	1,14	10	100	-
Alanina	4	0,46	10	75	+
Leucina	6,7	0,64	10	100	-
ácido aspártico	3,33	0,30	10	100	-
tirosina	50	0,18	10	100	-
Serina	10	0,47	10	86	+
metionina	10	0,45	10	100	-
Prolina	0,5	0,05	10	100	-
ornitina	4	0,13	10	100	-

* + = necessário o *cleanup* das amostras

* - = desnecessário o *cleanup* das amostras

Para a quantificação dos metais presentes nestes aminoácidos utilizou-se o método de adição do padrão na célula, porém observou-se que nos aminoácidos serina, alanina, arginina, lisina, ácido glutâmico, asparagina e fenilalanina o padrão de cádmio adicionado não foi totalmente recuperado, significando que houve ligação do metal com esses aminoácidos durante as 24h de incubação, sendo necessário um pré-tratamento da amostra antes da medida voltamétrica.

Tabela 10 – Resultado do ensaio de incubação (24h) do Pb com os aminoácidos e avaliação dos aminoácidos prováveis de estarem contaminados por Pb

Aminoácido	Conc.(%)	Conc. (g L ⁻¹)	Pb adicionado (nmol ⁻¹)	Recuperação do sinal <i>cleanup</i> do metal (%)	*
Fenilalanina	50	2,68	10	100	-
Fenilalanina	10	0,54	10	100	-
Asparagina	8	0,10	10	20,5	+
Treonina	42	1,91	10	83,6	+
ácido glutâmico	50	3,41	10	12,3	+
Glicina	9	0,86	10	71,5	+
Triptofano	39,1	0,69	10	100	-
Lisina	30	2,40	10	36,8	+
Arginina	5	0,51	10	18,9	+
Isoleucina	50	3,43	10	100	-
Cisteína	6	0,06	10	85,9	+
Histidina	25	1,14	10	78,5	+

Alanina	4	0,46	10	62,6	+
Leucina	6,7	0,64	10	100	-
ácido aspártico	3,33	0,30	10	54	+
Tirosina	50	0,18	10	95,3	-
Serina	10	0,47	10	90,7	+
metionina	10	0,45	10	90,8	+
Prolina	0,5	0,05	10	100	-
Ornitina	4	0,13	10	100	-

* + = necessário o *cleanup* das amostras

* - = desnecessário o *cleanup* das amostras

Para o chumbo a medida voltamétrica realizou-se da mesma forma, porém os aminoácidos tiveram diferente reação na presença de chumbo. A partir da tabela 10 nos aminoácidos: metionina, serina, ácido aspártico, histidina, cisteína, arginina, lisina, asparagina, treonina, ácido glutâmico e glicina não houve recuperação total do padrão de chumbo adicionado, ou seja, houve ligação do metal com esses aminoácidos durante as 24h de incubação sendo necessária um pré-tratamento da amostra antes da medida voltamétrica.

4.4 Pré- tratamento das amostras

Em geral, a decomposição de material orgânico ou biológico por via úmida implica em aquecimento da amostra na presença de um ácido mineral oxidante concentrado ou da mistura de ácidos oxidantes. Os ácidos oxidantes mais comumente utilizados na decomposição por via úmida são: nítrico, sulfúrico e o perclórico, podendo ser usados individualmente (exceto o perclórico) ou combinados uns com os outros. Utiliza-se este tipo de pré-tratamento para determinação de baixas concentrações de metais em vários tipos de amostra.

Outro tipo de pré-tratamento bastante utilizado é a radiação microondas, utilizadas em muitos campos da química. [118] A energia eletromagnética das microondas que é absorvida é convertida em energia térmica (calor), com o conseqüente aquecimento do meio reacional. A utilização da digestão assistida por microondas oferece vantagens como: segurança, versatilidade, controle da energia dispensada na amostra em análise e a programação da adição de alguma solução no processo.

É comum a ação conjunta de ácidos concentrados com microondas, ou seja, a combinação de ácidos com microondas. Amostras orgânicas, tais como óleos, geram grande quantidade de gases durante a digestão ácida e o uso da digestão assistida por microondas minimiza esse efeito, proporcionando maior segurança. A eficiência da digestão pode ser ainda melhorada pela adição de H_2SO_4 para alcançar temperaturas mais altas como $250^\circ C$. [119] Tradicionalmente, a digestão úmida é o método de destruição da matéria orgânica dissolvida em águas naturais. Geralmente esse método utiliza reagentes como ácidos oxidantes ou peróxidos para destruir a matéria orgânica, apresentando a desvantagem de oferecer um alto risco de contaminação, principalmente no caso de amostras com traços de metais. A radiação UV que se caracteriza por ser um método de preparação de amostra limpo e que não requer a adição de grandes quantidades de oxidantes. A fonte de radiação UV é uma lâmpada de vapor de Hg geralmente de 500 W, podendo variar até 1000W dependendo do tipo de amostra. [115]

4.4.1 Digestão via úmida

Stoepler e cols. analisaram traços de cádmio em amostras de sangue total e observaram que a digestão com ácido perclórico ou misturas de ácido perclórico e sulfúrico, entre outros, levam a completa destruição da matéria orgânica. Porém o uso de soluções fortemente oxidantes com aquecimento na digestão não é vantajoso para análises de ultra traços e abaixo de 1 ppb, valores normais de Cd em sangue total, não sendo recomendado este tratamento para esse tipo de matriz devido a volatilidade (acima de 400°C) de alguns compostos formados com Cd. [120]

A determinação dos metais (Cd e Pb) utilizando, como pré-tratamento nas amostras, uma digestão com adição de ácidos nítrico e sulfúrico como descrito na secção 3.7.2; não alcançaram resultados satisfatórios pois o procedimento testado não foi eficiente para romper as ligações existentes entre os metais e os aminoácidos e assim ser possível a determinação voltamétrica. Esse fenômeno pode ser justificado devido a elevada quantidade de ácidos presentes no meio a ser analisado, e sabendo-se que esses ácidos trazem em sua composição uma certa quantidade de metais pesados, principalmente chumbo, a qual passa a ser significativa quando a quantidade a ser determinada na matriz é na faixa de traços. Deste modo, a contaminação já contida nos ácidos foi superior a esperada nas soluções de aminoácidos.

4.4.2 Digestão por radiação de microondas

A utilização do pré-tratamento com radiação microondas associado com ácido, conforme descrito na secção 3.7.1 não alcançou a eficiência necessária. Os resultados das medidas voltamétricas obtidos após o procedimento de pré-tratamento tanto com o programa 1 como com o programa 2 (secção 3.7.1) não foram satisfatórios, uma vez que, a recuperação da concentração adicionada dos metais aos aminoácidos foi bastante baixa. Outro fator significativo para a ineficiência do método foi a contaminação oriunda dos ácidos utilizado no *cleanup*, geralmente em concentração superior a existente originalmente nas amostras de aminoácidos, tornando inviável a análise, uma vez que a concentração dos metais como contaminação dos aminoácidos é a nível de traços.

Embora o programa 2 (vide Metodologia (secção 3.7.2)) utilizar uma concentração de ácidos mais baixa que o primeiro, a digestão, para a maioria dos aminoácidos, alcançou no máximo 50% de sua eficiência, ou seja, quando adicionada uma concentração conhecida de metais, os mesmos eram recuperados aproximadamente a metade. Na maioria das amostras os sinais dos metais eram encobertos pela presença do aminoácido, visualizando-se pela elevação da linha base no voltamograma. Foi constatado que a presença de matéria orgânica no meio reacional e sobre o eletrodo, confirmando a não eficiência do processo de abertura. Houve algumas exceções como a asparagina (10% da concentração usual) que recuperou 68,5% do sinal para o chumbo, uma recuperação maior do que quando usada a abertura por radiação UV (47%). Para a histidina houve uma recuperação de 100% apresentando uma contaminação de 50 nmol L⁻¹ para chumbo, enquanto que com o uso da radiação UV a histidina na concentração de 25 % da usual encontrou-se uma contaminação de 21,5

nmol L⁻¹. Para a serina (concentração usual) observou-se uma contaminação de 2,65 nmol L⁻¹ para cádmio e 0,2 μmol L⁻¹ para chumbo e para metionina (concentração 50 % da usual) 1,21 μmol L⁻¹ para cádmio e 0,17 μmol L⁻¹ para chumbo.

4.4.3 Digestão por radiação UV

O pré-tratamento por radiação UV da amostra sem diluição não foi eficiente para nenhum dos aminoácidos, portanto utilizou-se diferentes diluições para cada aminoácido.

Inicialmente, a irradiação UV era efetuada apenas com a adição de peróxido de hidrogênio (conc.30%) purificado. Nesta adição alguns parâmetros foram variados como o volume (50 a 200 μL) e intervalo de tempo de adição(1 e 2 horas) , porém estes ensaios não foram realizados com todas as amostras. Observou-se maior eficiência com a adição de um volume total de 100 μL de peróxido e com intervalo de adição de 2 horas, principalmente aquela anterior ao término da irradiação.

Além da adição do peróxido durante a irradiação, estudou-se a adição de ácidos durante o processo. Entre os ácidos testados (nítrico e sulfúrico), o ácido sulfúrico (concentrado) mostrou-se eficiente para a digestão de alguns aminoácidos conforme descrito na tabela 12.

Diferentes tempos de irradiação UV foram comparados, como períodos de 4h e 8h de irradiação UV com a adição de 50 μL de H₂O₂ a cada 2 horas de irradiação UV, com e sem adição de ácido sulfúrico concentrado (100 μL). Para alguns aminoácidos um tempo de irradiação de 4 horas foi suficiente para a digestão, obtendo uma boa recuperação do sinal

dos metais. Entretanto, para outros aminoácidos foi necessário um tempo maior (8 horas) para a realização de uma digestão eficiente.

A utilização dos dois tipos de eletrólitos (ácido perclórico e tampão KCl/NaAc, pH 4,55) mostrou-se eficiente na análise voltamétrica dos metais nas soluções de aminoácidos. Para verificar que a utilização de um em relação ao outro não altera a medida voltamétrica, realizou-se um ensaio adicionando 10 µL de ácido perclórico na célula voltamétrica contendo 10 mL de água com uma concentração padrão conhecida dos metais. O mesmo ensaio foi realizado, porém utilizando o outro eletrólito (KCl/NaAc, pH 4,55). Deste modo, os dois voltamogramas foram analisados e comparados, verificando os mesmos sinais dos metais (cádmio e chumbo) com a utilização dos diferentes eletrólitos.

Na digestão com radiação UV utilizou-se, inicialmente, uma lâmpada de Hg de potência menor (250 W) e os aminoácidos triptofano, tirosina, histidina, alanina, lisina, e treonina, na concentração usual das formulações de NP, foram submetidas à luz UV por 4 horas. Após as amostras de aminoácidos deixarem o digestor, observou-se uma coloração diferente daquela em que apresentam-se as soluções de NP, ou seja, uma coloração escura resultado da ineficiência da irradiação nas condições empregadas.

Testou-se também a radiação UV com o tempo de apenas 2 horas com as amostras de aminoácidos na concentração 25% da usual, porém, na medida voltamétrica não se detectou sinal para cádmio nem chumbo, ou seja, o tempo não foi suficiente para destruição da matéria orgânica, encobrendo qualquer sinal dos metais.

Ainda utilizando a lâmpada de 250 W por 4 horas de irradiação e com adição de peróxido de hidrogênio a cada hora, observou-se que para os aminoácidos fenilalanina, arginina, na concentração 25 % da usual, foi possível determinar cádmio, para glicina, na mesma concentração de 25 %

da usual, determinou-se cádmio e chumbo e, ainda para tirosina (concentração 25 % da usual), metionina (10 % da usual) e triptofano (75 % da concentração usual) foi possível determinar chumbo por voltametria sem digestão da amostra.

Embora com alguns aminoácidos não tenha ocorrido interferências nas determinações dos metais, testou-se a irradiação com uma lâmpada de UV com potência de 500 W para todos eles.

Todos os aminoácidos foram submetidos à radiação UV (500 W) por 4 h e foi possível dividir os aminoácidos em três grupos.

O grupo 1 compreende os aminoácidos para os quais não foi necessário *cleanup* com radiação UV para a determinação voltamétrica dos metais, apenas a diluição da amostra (tabela 11). No grupo 2 da tabela 11, estão listados os aminoácidos que, na concentração em torno de 50 % da usual, após o *cleanup* com radiação UV, não foi possível a determinação voltamétrica, pois o sinal para os metais continuavam encobertos mesmo após a adição do padrão. E no grupo 3 encontram-se os aminoácidos (50 % da concentração usual) para os quais foi possível determinar, por voltametria, os metais com 4 h de radiação UV.

Tabela 11 – Grupos de aminoácidos conforme digestão

Grupo 1	Grupo 2	Grupo 3
Serina	Lisina	Prolina
Ornitina	Ácido glutâmico	Glicina
Metionina	Isoleucina	Arginina
Tirosina	Fenilalanina	Alanina
Triptofano		Cisteína
		Leucina
		Histidina
		Ácido aspártico

Treonina

Asparagina

Grupo 1 - desnecessário *cleanup* com radiação UV

Grupo 2 – impossibilidade de determinação voltamétrica dos metais nas soluções de aminoácidos (concentração em torno de 50 % da usual encontrada nas formulações comerciais de NP), após o *cleanup* com radiação UV,

Grupo 3 - aminoácidos (50 % da concentração usual) nos quais foram determinados os metais Cd e Pb por voltametria, após 4 h de radiação UV.

Entretanto, para alguns aminoácidos, foi preciso irradiar por 8 h para otimizar o processo de digestão e obter melhores resultados (tabela 12).

Em todos os pré-tratamentos de digestão testados neste trabalho, como digestão úmida, radiação por microondas e radiação por UV, constatou-se que os melhores resultados foram obtidos com a radiação por UV e com o tempo de 8 h.

Na tabela 12 está descrito os pré-tratamentos utilizando UV para todos os aminoácidos que dele necessitaram, bem como as condições utilizadas, como concentração da amostra, tempo de irradiação, eletrólito e a percentagem de recuperação para cada metal (Cd e Pb) individualmente para cada aminoácido.

Para cada solução de aminoácido, individualmente, foi feita a incubação de Cd e Pb, cuja concentração final desses metais na célula foi de 10 nmol L^{-1} .

Porém, para alguns aminoácidos o aumento do tempo da irradiação para 8 h diminuiu a eficiência. Observando o aminoácido isoleucina quando foi irradiado 8 h a recuperação do sinal do cádmio diminuiu de 85,7% para 67%. Para cisteína e para histidina constatou-se o mesmo comportamento conforme tabela 12. Essa constatação pode ser relacionada à provável presença de subprodutos do processo de irradiação UV.

TABELA 12 - Condições dos pré-tratamentos utilizados para cada aminoácido com suas respectivas taxas de recuperação

A a	Concentração		Condições da abertura	Observações	Cd recuperado	Pb recuperado
	% da usual	Efetiva (g L ⁻¹)				
Phe	50	2,68	4h UV (*1) 100 µL H ₂ O ₂ a cada 2h (total: 2 adições)	Formação de ppt e espuma na medida do Pb	32,6%	-
Phe	10	0,54	4h UV (*1) 100 µL H ₂ O ₂ a cada 2h (total: 2 adições)	-	39,2%	100%
Phe	10	0,54	8h UV(*2) 25 µL H ₂ O ₂ a cada 2h 100µL H ₂ SO ₄ conc.	-	100%	100%
Lys	30	2,40	4h UV(*1) 100 µL H ₂ O ₂ a cada 2h (total: 2 adições)	Formação de ppt e espuma medida para ambos metais	-	-
Lys	10	0,80	4h UV (*1) 100 µL H ₂ O ₂ a cada 2h (total: 2 adições)		64,8%	-
Lys	10	0,80	8h UV (*2) 25 µL H ₂ O ₂ a cada 2h 100 µL H ₂ SO ₄ conc.		85%	66,15%
Gly	10	0,95	8h UV (*2) 25 µL H ₂ O ₂ a cada 2h 100 µL H ₂ SO ₄ conc.		75%	63,4%
Glu	50	3,41	4h UV(*1) 100 µL H ₂ O ₂ a cada 2h (total: 2 adições)	Formação de precipitado e espuma na medida de ambos metais	-	-
Glu	10	0,68	4h UV (*1) 100 µL H ₂ O ₂ a cada 2h (total: 2 adições)	Contaminação pelo H ₂ O ₂ na medida do Pb	52,1%	-
Glu	10	0,68	8h UV(*2) 60 µL H ₂ O ₂ 100µL H ₂ SO ₄ conc.		85,3%	74%

Aa	%da usual	Efetiva (g L ⁻¹)	Condições da abertura	Observações	Cd recuperado	Pb recuperado
Glu	10	0,68	8h UV(*2) 100 µL H ₂ O ₂ a cada 2h 100 µL H ₂ SO ₄ conc.		100%	100%
Asn	90	1,17	4h UV (*1) 100 µL H ₂ O ₂ a cada 2h (total: 2 adições)		46%	8%
Asn	10	0,13	8h UV(*2) 100 µL H ₂ O ₂ a cada 2h 100 µL H ₂ SO ₄ conc.		54,4%	47%
Asp	3,33	0,30	4h UV(*1) 100 µL H ₂ O ₂ a cada 2h (total: 2 adições)		90%	100%
Asp	3,33	0,30	8h UV (*2) 100 µL H ₂ O ₂ a cada 2h 100 µL H ₂ SO ₄ conc.		100%	100%
Thr	42	1,91	4h UV (*1) 100µL H ₂ O ₂ a cada 2h (total: 2 adições)	Formação de precipitado e espuma na medida de ambos metais		
Thr	10	0,45	4h UV (*1) 100µL H ₂ O ₂ (a cada 2h – total: 2 adições)	Contaminação pelo H ₂ O ₂	65,6%	
Thr	10	0,45	8h UV (*2) 100µL H ₂ O ₂ a cada 2h 100µL H ₂ SO ₄ conc.		100%	100%
Leu	6,7	0,64	4h UV (*1) 100 µL H ₂ O ₂ a cada 2h (total: 2 adições)		33,8%	95,8%
Leu	6,7	0,64	8h UV (*2) 100 µL H ₂ O ₂ a cada 2h 100 µL H ₂ SO ₄ conc.		100%	81,25%
Arg	5	0,51	4h UV (*1) 100 µL H ₂ O ₂ a cada 2h (total: 2 adições)		31%	100%

Aa	%da usual	Efetiva (g L ⁻¹)	Condições da abertura	Observações	Cd recuperado	Pb recuperado
Arg	10	1,02	8h UV (*2) 100 µL H ₂ O ₂ a cada 2h 100 µL H ₂ SO ₄ conc.		100%	100%
Ile	50	3,43	4h UV (*1) 100 µL H ₂ O ₂ a cada 2h (total: 2 adições)	Formação de precipitado e espuma na medida de ambos metais		
Ile	10	0,68	4h UV (*1) 100 µL H ₂ O ₂ a cada 2h (total: 2 adições)	Contaminação pelo H ₂ O ₂ na medida do Pb	85,7%	
Ile	10	0,68	8h UV (*2) 100 µL H ₂ O ₂ a cada 2h 100 µL H ₂ SO ₄ conc.		67%	61,1%
Ala	4	0,46	4h UV (*1) 100 µL H ₂ O ₂ a cada 2h (total: 2 adições)		96,4%	22,2%
Ala	4	0,46	8h UV (*2) 100 µL H ₂ O ₂ a cada 2h 100µL H ₂ SO ₄ conc.		99%	92,3%
Cys	6	0,06	4h UV + 100 µL H ₂ O ₂ (a cada 2h – total: 2 adições) eletrólito HClO ₄		100%	100%
Cys	6	0,06	8h UV (*2) 100 µL H ₂ O ₂ a cada 2h 100µL H ₂ SO ₄ conc.		72,8%	91%
His	25	1,14	4h UV (*1) 100 µL H ₂ O ₂ a cada 2h (total: 2 adições)		100%	100%
His	25	1,14	8h UV (*2) 100 µL H ₂ O ₂ a cada 2h 100 µL H ₂ SO ₄ conc.		74%	55%

*1 = eletrólito: HClO₄

*2 = eletrólito: tampão KCl/NaAc pH 4,55

Diversos aminoácidos alcançaram 100% de recuperação dos metais adicionados, conforme mostrado na tabela 12, confirmando a eficiência do método de digestão por UV empregado.

Para alguns aminoácidos, como: fenilalanina, ácido glutâmico ácido aspártico treonina, leucina, arginina, cisteína e histidina, na qual a recuperação dos metais foi representada na tabela 12 como maior que 100%, foi possível determinar a contaminação por Cd e Pb existente nesses aminoácidos, ou seja, a concentração desses metais contido nesses aminoácidos como contaminante.

A quantificação das contaminações encontradas nesses aminoácidos está representada na tabela 13.

Tabela 13 – Contaminação por Cd e Pb encontrada em algumas soluções de aminoácidos após digestão por UV

aminoácido	Concentração		Contaminação por Cd		Contaminação por Pb	
	g L ⁻¹	% da usual *	nmol L ⁻¹	µg L ⁻¹	nmol L ⁻¹	µg L ⁻¹
Fenilalanina	0,54	10	0,15	0,017	3040	340
Ácido glutâmico	0,68	10	38	4,27	53	6
Ácido aspártico	0,3	3,3	49	5,5	42	4,7
Treonina	0,45	10	770	86,5	780	200
Leucina	0,64	6,7	320	36,0	-	-
Arginina	1,02	10	1310	150	1560	300
Cisteína	0,06	6	11,1	1,25	1,4	0,3
histidina	1,14	25	81,6	9,2	21,5	4,4

*percentagem da concentração média utilizada nas formulações de NP.

Conforme os dados apresentados na tabela 13, a contaminação por Pb nas soluções de treonina, fenilalanina, e arginina foi acima de $100 \mu\text{g L}^{-1}$, concentração considerada tóxica ao organismo.

Para as soluções dos aminoácidos ácido aspártico, treonina, histidina, leucina, arginina e histidina a contaminação por Cd encontrada foi muito acima de $5 \mu\text{g L}^{-1}$, concentração foi considerada tóxica ao organismo, conforme legislação do Ministério da Saúde [21]. Apenas para as soluções dos aminoácidos fenilalanina, ácido glutâmico e cisteína a contaminação por Cd ficou abaixo das consideradas tóxicas ao organismo. Para as soluções dos aminoácidos: ácido glutâmico, ácido aspártico, cisteína e histidina, a contaminação por Pb também ficou abaixo das consideradas tóxicas ao organismo.

Entre todos os aminoácidos analisados, houve alguns que não necessitaram de abertura por digestão UV, pois no período de 24 h a 37°C os metais não formavam ligação com os aminoácidos (tabela 14).

Adotou-se o critério de até 10% de desvio para selecionar os aminoácidos que necessitavam, ou não, de um processo de abertura da amostra, ou seja, acima de 90% de recuperação do sinal dos metais medido por voltametria após a etapa de incubação; o aminoácido correspondente não foi submetido ao processo de abertura.

Tabela 14 - Aminoácidos não submetidos ao pré-tratamento de radiação UV

Aa (conc. % da usual)	Conc.(nmol L ⁻¹) metais incubado	Cd		Pb	
		recuperado	contaminação	recuperado	contaminação
Orn (4)	8,69	100%	6,4 nmol L ⁻¹ (0,72 $\mu\text{g L}^{-1}$)	100%	6,7 nmol L ⁻¹ (1,38 $\mu\text{g L}^{-1}$)
Met (10)	10	100%	2,8 nmol L ⁻¹ (0,31 $\mu\text{g L}^{-1}$)	90,8 %	-

Tyr (50)	10	100%	1,8 nmol L ⁻¹ (0,20 µg L ⁻¹)	95,3 %	-
Trp (39,1)	10	100%	2,0 nmol L ⁻¹ (0,22 µg L ⁻¹)	100%	4,2 nmol L ⁻¹ (0,87 µg L ⁻¹)
Pro (5)	10	100%	-	100%	8 nmol L ⁻¹ (01,65 µg L ⁻¹)

5 CONCLUSÕES

Devido ao grande emprego dos concentrados de aminoácidos como soluções de nutrição para pacientes debilitados e com falta de nutrientes, e ainda, à toxicidade do cádmio e chumbo para o homem, metodologias adequadas à quantificação destas espécies em nível de traços em soluções de NP comerciais são de grande importância.

A determinação dos metais, cádmio e chumbo, por voltametria em soluções de aminoácidos constituintes das soluções de NP é possível, utilizando o eletrodo de mercúrio, sendo observada uma alta sensibilidade na determinação dos analitos em estudo por voltametria de pulso diferencial empregando o HMDE. Estas espécies apresentaram um comportamento voltamétrico com um potencial de redução característico em -800 mV e -450 mV (*vs.* Ag/AgCl), num eletrólito de HClO₄, para o cádmio e chumbo, respectivamente.

No presente trabalho, buscou-se verificar quais os aminoácidos que interferem com a determinação dos metais (cádmio e chumbo) por voltametria, e a partir daí, buscar alternativas para que a determinação seja possível sem a interferência dos aminoácidos, por meio de pré-tratamentos das amostras.

Optou-se por trabalhar com os aminoácidos individualmente, para conhecer o comportamento de cada um com os metais em estudo (cádmio e chumbo), uma vez que, nas soluções comerciais de NP os aminoácidos encontram-se em concentrações variadas, o que dificulta a determinação dos metais devido a alta concentração de alguns destes aminoácidos contido na formulação.

Neste estudo foram desenvolvidas diversas metodologias para *cleanup* dos aminoácidos entre elas a radiação UV, digestão ácida e radiação microondas associada com ácidos.

Observou-se que o pré-tratamento de maior eficiência, entre os aminoácidos utilizou a radiação UV. O *cleanup* por radiação UV oferece vantagens como menos riscos para o analista e menor contaminação das amostras, estes dois fatores estão relacionados com o baixo ou nenhum consumo de ácidos durante a digestão.

Na existência de uma formulação contendo somente os aminoácidos ornitina, metionina, tirosina, triptofano e prolina será possível determinar diretamente alguma contaminação existente de cádmio e chumbo, sem necessidade de *clean-up*.

Para outras formulações, contendo os demais aminoácidos um tempo de 8h de radiação UV foi suficiente para possibilitar a determinação voltamétrica de traços dos metais sem a interferência de compostos orgânicos.

Entre os todos os aminoácidos analisados, a contaminação por Pb nas soluções de treonina, fenilalanina, e arginina foi considerada tóxica ao organismo (acima de $100 \mu\text{g L}^{-1}$). Para as soluções dos aminoácidos ácido aspártico, treonina, histidina, leucina, arginina e histidina a contaminação por Cd também foi considerada tóxica ao organismo (acima de $5 \mu\text{g L}^{-1}$).

6 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

Atualmente, ainda são poucas as metodologias que viabilizam a análise dos contaminantes cádmio e chumbo em aminoácidos constituintes das soluções de NP. As metodologias desenvolvidas neste trabalho podem ser complementadas correlacionando os resultados com outras técnicas como a espectroscopia.

Há a necessidade de investigar a origem da contaminação por Cd e Pb destas soluções, que pode ser da matéria-prima ou dos recipientes onde as mesmas são armazenadas.

Também é importante a otimização dos procedimentos desenvolvidos para a aplicação no conjunto de aminoácidos (conjuntos de aminoácidos crescentes até alcançar a quantidade de aminoácidos que constitui as formulações comerciais de NP).

7 APÊNDICE

Apêndice 01

Parâmetros utilizados na voltametria

- HMDE

Volume do eletrólito: 10 mL

Tempo da gota: 600 ms

Tempo de pré-concentração na gota: 90 s

Velocidade de varredura: 10 mV.s⁻¹

Amplitude de pulso: 50 mV

Duração do pulso: 40 ms

Tamanho da gota: 0,60 mm²

Faixa de potencial de varredura: - 800 mV a - 160 mV

Potencial de pré-concentração: - 800 mV

- CÉLULA VOLTAMÉTRICA

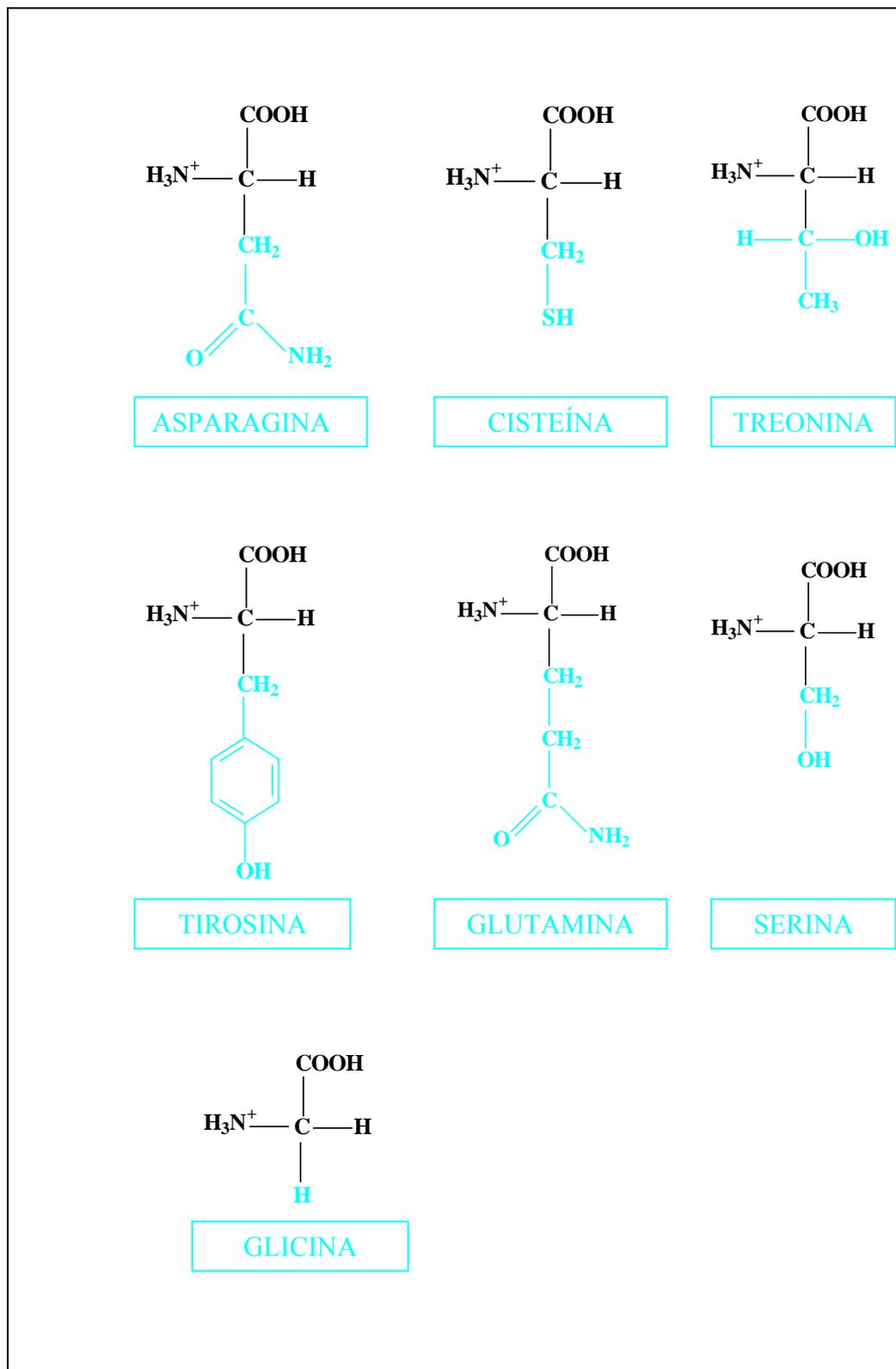
Célula voltamétrica de vidro transparente e formato cônico convencional (Metrohm, referência 6.1415.210), com diâmetro inferior de 2,0 cm e diâmetro superior de 6,5 cm. É necessário um volume mínimo de 10 mL de solução para que os três eletrodos sejam apropriadamente imersos. O volume máximo da célula é de 90 mL.

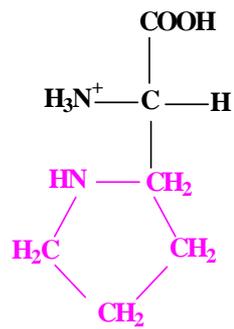
Apêndice 02

Concentrações médias (estoque) de cada aminoácido que compõe as soluções de nutrição parenteral

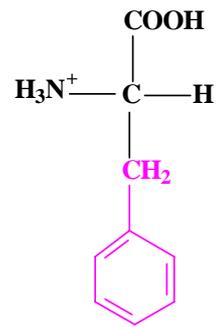
Aminoácido	g L⁻¹	Aminoácido	g L⁻¹
Triptofano	1,766	L-tirosina	0,35
L-histidina	4,550	L-cisteína	0,986
L-isoileucina	6,850	L-ornitina	3,20
L-alanina	11,540	L-fenilalanina	5,360
L-leucina	9,530	L-asparagina	1,30
L-serina	4,66	Glicina	9,505
L-lisina	8,011	L-ácido aspártico	8,90
L-prolina	10,48	L-treonina	4,550
L-metionina	4,500	L-ácido glutâmico	6,81
L-arginina	10,204		

Apêndice 3 – Estrutura dos aminoácidos

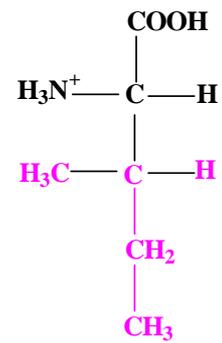




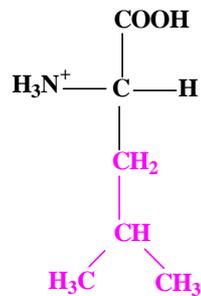
PROLINA



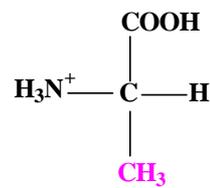
FENILALANINA



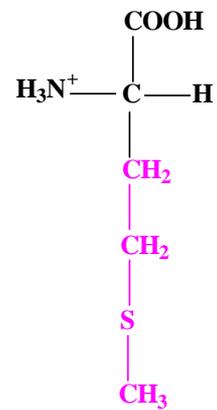
ISOLEUCINA



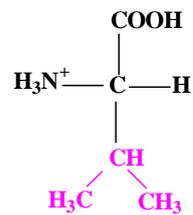
LEUCINA



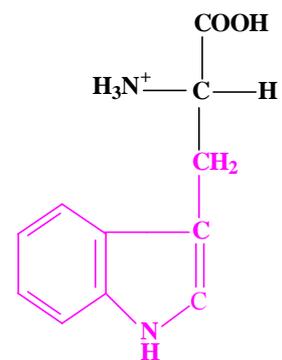
ALANINA



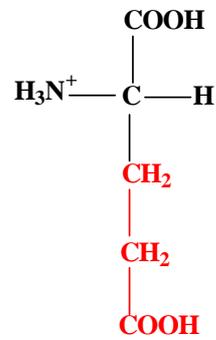
METIONINA



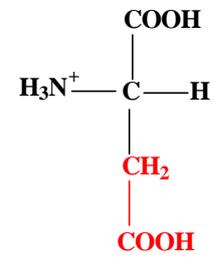
VALINA



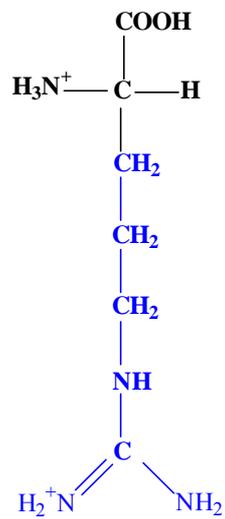
TRIPTOFANO



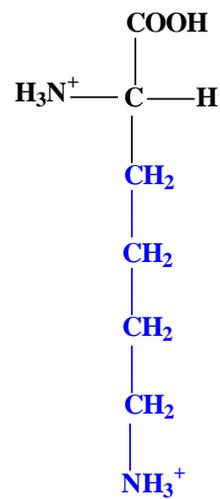
ÁCIDO GLUTÂMICO



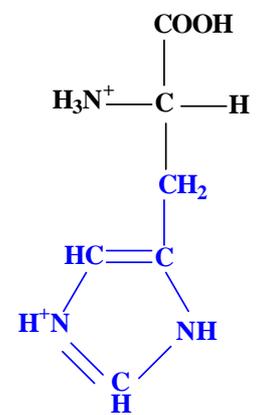
ÁCIDO ASPÁRTICO



ARGININA



LISINA



HISTIDINA

Apêndice 4Composição química das soluções de nutrição parenteral (g L⁻¹)**AMINOSTERIL Hepa 8%**

L - Isoleucina	10,4 g
L - Leucina	13,1 g
L - Lisina Acetato	6,9 g
L - Metionina	1,1 g
L - Cistina	0,5 g
L - Fenilalanina	0,9 g
L - Treonina	4,4 g
L - Alanina	4,6 g
L - Prolina	5,8 g
Ácido Aminoacético (Glicina)	5,5 g
Ácido Acético	7,2 g
Nitrogênio Total	12,9 g L ⁻¹
Água q.s.p.	1000 mL
pH	5,7 - 6,3
Osmolaridade Teórica	770 mosm L ⁻¹

Fabricante: FRESENIUS LABORATÓRIOS LTDA.

AMINON 20

L - Leucina	8,90 g
L - Isoleucina	5,10 g
L - Lisina acetato	7,90 g
L - Metionina	3,80 g
L - Fenilalanina	5,10 g
L - Treonina	4,10 g
L - Triptofano	1,80 g
L - Valina	4,80 g
L - Arginina	9,20 g
L - Histidina	5,20 g
L - Alanina	13,70 g
L - Prolina	8,90 g
Ácido L - Aspártico	1,30 g
L - Asparagina	3,30 g
L - Cisteína Cloridrato	0,72 g
Ácido L - Glutâmico	4,60 g
L - Ornitina Cloridrato	3,20 g
L - Serina	2,40 g
N - Acetil L - Tirosina	1,60 g
Glicina	7,90 g
Nitrogênio Total	15,5 g L ⁻¹
Água q.s.p.	1000 mL
Conteúdo calórico	400 kcal L ⁻¹
pH	6,0-6,3
Osmolaridade teórica	939 mosm L ⁻¹

Fabricante: JP INDÚSTRIA FARMACÊUTICA S.A .

SORAMIN 10%

L- Fenilalanina	5,4 g
L - Isoleucina	3,7 g
L - Leucina	9,8 g
L - Lisina	5,9 g
L - Metionina	5,3 g
L - Treonina	8,9 g
L - Triptofano	1,8 g
L - Valina	5,3 g
L - Alanina	10,3 g
L - Asparagina	3,8 g
L - Ácido Aspártico	2,7 g
L - Ácido Glutâmico	2,5 g
Ácido Aminoacético	8,0 g
L - Cistina	0,3 g
L - Ornitina	2,6 g
L - Prolina	8,4 g
L - Serina	2,5 g
L - Tirosina	1,6 g
L - Arginina	10,6 g
L - Histidina	4,6 g
Nitrogênio Total	15,5 g L ⁻¹
Água q.s.p.	1000 mL
Conteúdo Calórico	400 kcal L ⁻¹
pH	6,0-6,7
Osmolaridade teórica	890 mosm L ⁻¹

Fabricante: DARROW LABORATÓRIOS S/A

AMINOPLASMAL L-10^A

L - Leucina	8,9 g
L - Isoleucina	5,1 g
L - Lisina Acetato	7,9 g
L - Metionina	3,8 g
L - Fenilalanina	5,1 g
L - Treonina	4,1 g
L - Triptofano	1,8 g
L - Valina	4,8 g
L - Arginina	9,2 g
L - Histidina	5,2 g
L - Alanina	13,7 g
L - Prolina	8,9 g
Ácido L - Aspártico	1,3 g
L - Asparagina	3,3 g
L - Cisteína Cloridrato	0,65 g
Ácido Glutâmico	4,6 g
L - Ornitina Cloridrato	3,2 g
L - Serina	2,4 g
N - Acetil L - Tirosina	1,6 g
Glicina	7,9 g
Nitrogênio Total	15,5 g L ⁻¹
Água q.s.p.	1000 mL
Conteúdo Calórico	400 kcal L ⁻¹
pH	6,0 - 7,0
Osmolaridade teórica	890 mosm L ⁻¹

Fabricante: LABORATÓRIOS B. BRAUN S.A .

AMINOSTERIL 10%

L - Isoleucina	5,0 g
L - Leucina	7,4 g
L - Lisina Acetato	6,6 g
L - Metionina	4,3 g
L - Fenilalanina	5,1 g
L - Treonina	4,4 g
L - Triptofano	2,0 g
L - Valina	6,2 g
L - Arginina	12,0 g
L - Histidina	3,0 g
L - Alanina	15,0 g
L - Prolina	15,0 g
Ácido Aminoacético (Glicina)	14,0 g
Ácido Acético	8,0 g
Nitrogênio Total	16,4 g L ⁻¹
Água q.s.p.	1000 mL
pH	5,7 - 6,3
Osmolaridade Teórica	939 mosm L ⁻¹

Fabricante: FRESENIUS LABORATÓRIOS LTDA.

AMINOPED 10%

L - Isoleucina	6,40 g
L - Leucina	10,8 g
L - Lisina	7,1 g
L - Metionina	4,6 g
L - Cisteína	0,4 g
L - Fenilalanina	4,6 g
L - Treonina	5,2 g
L - Triptofano	1,8 g
L - Valina	7,1 g
L - Arginina	6,4 g
L - Histidina	4,1 g
L - Alanina	7,2 g
L - Serina	9,0 g
L - Prolina	16,2 g
L - Tirosina	5,5 g
L - Ácido Málico	4,8 g
Ácido aminoacético	4,1 g
Nitrogênio Total	14,4 g
Água q.s.p.	1000 mL
Osmolaridade Teórica	848 mosm L ⁻¹

Fabricante: FRESENIUS LABORATÓRIOS LTDA

AMINOSTERIL NEFRO

L - Isoleucina	7,5 g
L - Leucina	11,4 g
L - Lisina	9,6 g
L - Metionina	6,6 g
L - Fenilalanina	7,8 g
L - Treonina	6,8 g
L - Triptofano	2,9 g
L - Valina	9,5 g
L - Histidina	4,9 g
L - Ácido málico	6,5 g
Sorbitol	25,0 g
Xilitol	25,0 g
Nitrogênio Total	8,8 g
Água q.s.p.	1000 mL
Osmolaridade Teórica	835 mosm L ⁻¹

Fabricante: FRESENIUS LABORATÓRIOS LTDA

NEFROAMINO

L - Isoleucina	7,0 g
L - Leucina	11,0 g
L - Histidina	5,5 g
L- Lisina acetato	11,3 g
L - Metionina	11,0 g
L - Fenilalanina	11,0 g
L - Treonina	5,0 g
L - Triptofano	2,5 g
L - Valina	8,0 g
Nitrogênio Total	8,8 g
Água q.s.p.	1000 mL
Osmolaridade Teórica	545 mosm L ⁻¹
pH	5,7 - 6,0

Fabricante: LABORATÓRIOS B. BRAUN S.A

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. DREISBACH, R.H., *J. Chromatogr.*, **Handbook of Poisoning**, Lange Medical: Los Altos, CA, p. 162 - 199, 1969.
2. ERIC P. ACHTERBERG et al., *Analytica Chimica Acta*, v. 440 p. 27 – 36, 2001.
3. JOAQUIM A. NÓBREGA et al., *Spectrochimica Acta Part B – Review*, p.1855-1876, 2002.
4. J.L. LUQUE-GARCÍA, M. D. LUQUE DE CASTRO, *Trends in Analytical Chemistry*, v. 22 (2), p. 90-98, 2003.
5. ZENG-YEI HSEU, *Bioresource Technology* v. 95, p. 53-59, 2004.
6. FISCHER, J.E., *Nutrição Parenteral*, Ed. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, 1978.
7. WAITABERG, D.L., **Nutrição Enteral e Parenteral na prática Clínica**, 2ª edição, Ed. Atheneu, Rio de Janeiro, 1995.
8. GREENSTEIN WINITZ, *Chemistry of the amino acids*, volume II, Krieger Publishing Company, 1961.
9. GARRETT, R. H. AND GRISHAM, C.H., *Biochemistry*, International Edition, Saunders College Publishing,

10. HOLUM, J.R., *Fundamentals of General, Organic and Biological Chemistry*, Fifth Edition, John Wiley & Sons, 1994.
11. PERSON, R.G., *Hard and soft acids and bases*, part 1. *J. Chem. Ed.* 45 (9): 581-87,1968
12. COWAN, J. A., **Inorganic Biochemistry and Introduction**, VCH Publishers, 1993
13. FRAUSTO DA SILVA, J.J.R and WILLIANMS, R.J.P., *The Biological Chemistry of Elements. "The inorganic Chemistry of life"*. New York,1993.
14. STEPHEN J. LIPPARD AND JEREMY M. BERG. *Principles of Bioinorganic Chemistry*. University Science Books, 1994.
15. GOULD, R.K. AND VOSBURGH,W.C, Complex ions II. A study of some complex ions in solution by means of the spectrophotometer. *J. Am. Chem. Soc.* 64:1630,1942.
16. DAVIES, C.W. AND WAIND, G. M., *J.Chem.Soc.*301,1950 (In Greenstein Winitz, *Chemistry of the amino acids*, vol. II, Krieger Publishing Company, 1961.
17. NEVILLE, R.G. AND GORIN, G., *J. Am. Chem.Soc.* 77:5225,1995 (In Greenstein Winitz, *Chemistry of the amino acids*, vol. II, Krieger Publishing Company, 1961.

18. SADAO, Marcelo, *Revista de Oxicologia*, (Janeiro, Fevereiro, Março) 2002.
19. FRANCO, Guilherme. *Tabela de composição química dos alimentos*. 9 ed. São Paulo: Atheneu, 1992.
20. (<http://www.ivp.pt/pt/Investigacao>)
21. PAVANETTO, F. et al., *International J. of Pharmaceutics*, 54, p.143 – 148, 1989.
22. EVANGELISTA, José. *Alimentos - um estudo abrangente*. São Paulo: Atheneu, 1992.
23. (<http://www.saude.gov.br>)
24. (<http://www.anvisa.gov.br>)
25. JORNAL BRASILEIRO DE NEFROLOGIA. *Nephrol Dial Transplant* 17 (7): 45-62, 2002.
26. SILVA, A. M. M. et al. *Revisão/Atualização em diálise: Água para hemodiálise*. J. Bras. Nefrol., v.18(2), p. 180-188, 1996.
27. GOES, Roberto Charles. *Toxicologia industrial*. Rio de Janeiro: Revinter, 1998. 250p.

28. *World Health Organizations Cadmium*. Geneva, 1992 (*Environmental Health Criteria* 134)
29. (<http://www.saude.gov.br>)
30. *Agency for Toxic Substances and Disease Registry – Toxicological profile for cadmium*. Atlanta: ATSDR, 1997, 347p
31. GOYER, R.A. *Toxic effects of metals*. In: Klassen, C.D. Casarett & Doull's toxicology. *The basic science of poisons*. 5th ed New York, Mc Graw Hill, 691 – 736, 1996
32. VOGEL; *Análise Química Quantitativa*; 5^o edição; ed. LTC; P.478, 1992.
33. SKOOG, D.A., LEARY, J.J., **Principles of Instrumental Analysis**, Fourth edition, Saunders College Publishing, 1992.
34. NÜRNBERG HW (1982) *Pure Appl Chem* 54:853
35. NÜRNBERG HW, VALENTA P, In: Wong Cs, Boyle E, Bruland K E, (eds) *Trace metals in sea water*. Plenum Press, New York, 1983.
36. NÜRNBERG HW *Fresenius Z Anal Chem* 316:557(1983)
37. NÜRNBERG HW, RASPOR B., *Environm Technol Letters* 2:213, 1981
38. NÜRNBERG HW., *Chem. Ing. Techn.*, 51:717, 1979

39. DULKA JJ, RISBY TH., *Anal. Chem.* 48:640, 1976
40. VAN DEN BERG, C. M. G. In *Chemical Oceanography*; Riley, J. P., Ed., Academic Press; London, p 198, 1988.
41. VASCONCELOS, M. T. S. D.; Leal, M. F. C.; *Anal. Chim. Acta*, 353, p. 189.
42. ACHTEBERG, E. P.; VAN DEN BERG, C. M. G.; *Anal. Chim. Acta*, (291), p. 213, 1994.
43. TURCHI, C. S.; OLLIS, D. F.; *J Catal.*, , 122, 178, 1990.
44. KAUTSKY H.; *Trans. Faraday Soc.*, (35), p. 216, 1939
45. HAAG, W. R. and J. Hoigné; *Environ. Sci. Technol.*, (20), p. 341, 1986.
46. HAAG, W. R. and J. Hoigné; *Environ. Sci. Technol.*, (22), p. 507, 1989.
47. MERKEL, P. B. and D. R. Kearns; *J. Am. Chem. Soc.*, (94), p. 7244, 1972.
48. BAXTER, R.M. and J. H. Carey; *Nature*, (306), p. 575, 1983.
49. T. MILL, D. G. Hendry and H. Richardson; *Science*, (207), p. 886, 1989.
50. KOLLER, L. R.; *Ultraviolet Radiation*, John Wiley, New York, (22), p. 236, 1965.

51. GALBRAITH, M. M, Shu, S. Davies and S. Masten; *Hazardous Ind. Wastes*, (24), p. 411, 1992.
52. CHELKOWSKA K., K., Grasso D., Fabián I. and G. Gordon; *Ozone Sci. Eng.*, (14) p. 33, 1992.
53. KILLOPS, S. D.; *Water Res.*, (55), p.1, 1986.
54. GILBERT E.; *Water Res.*, (22), p.123, 1988.
55. GALBRAITH M., M.M, Shu, S. Davies and S. Masten; *Hazardous Ind. Wastes*, (24), p. 411, 1992.
56. NIITSUMA T., K. Suzuki, E. Hachiya and Y. Takemoto, Kankyo Kagaku; *Chem. Abstr.*, (119), 11264, 1993.
57. MILL T., D. G. Hendry and H. Richardson; *Science*, (207), p.886, 1989.
58. HAAG, W. R. and J. Hoigné; *Chemosphere*, (14), p. 1659, 1985.
59. KOTZIAS, D., H. Paralar and F. Korte; *Natur. Wissenschaften*, (69), p. 444, 1982.
60. CALVOSA, L.;Monteverdi, A; Rindone, B.; Riva, G.;*Wat. Res.*, (25), p.985, 1991.

61. MALAIYANDI, M., M. H. Sadar, P. Lee and R. O'Grady; *Water Res.*, (14), p.1131, 1980.
62. DIONYSIOS D. Dionysiou, Makram T. Suidan, Isabelle Baudin, Jean-Michel Laine, *Applied Catalysis B: Environmental* 50, p. 259-269, 2004.
63. GHOSH A. et. al. *Pure Appl.Chem.* 73, p. 113, 2001.
64. RAJA R. et al. *Top. Catal.* 20, p. 85, 2002.
65. HISLOP K.A., J.R. Bolton, *Environ. Sci. Technol.* 33, p. 3119, 1999.
66. ESPULGAS S., J. Giménez, S. Contreras, E. Pascual, M. Rodríguez, *Water Res.* 36, p. 1034, 2002.
67. ANTONARAKI S., D. Dimotikali, A. Hiskia, E Papaconstantinou, *J. Photochem. Photobiol. A: Chem.* 148, p. 191, 2002.
68. BORA U., M. K. Chaudhuri, D. Dey, S.S. Dhar, *Pure Appl. Chem.* 73, p. 93, 2001.
69. GHOSH A. et. al. *Pure Appl.Chem.* 73, p.,113, 2001.
70. CHUN H.D., J.K. Park, *Haz. Waste Haz. Mater.* 11, p. 501, 1994.
71. MENGYUE Z., C. Shifu, T. Yaowu, T. Yaowu, *J. Chem. Tchnol.* 30, p. 817, 1996.

72. PACHECO J.E., M. R. Prairie, L. Yellowhorse, *J. Solar Energy Eng.* 115, p. 123, 1993.
73. PACHECO E., g.e. Tyner, *Solar engineering*, in: Proceedings of the 1990 ASME International Solar Energy Conference, Miami, Florida, 1-4, p. 163-166, 1990.
74. MALATO S., J. Blanco, C. Richter, B. Braun, M. I. Maldonado, *Appl. Catal. B: Environ.* 17, p. 347, 1998.
75. POULIOS I., E. Micropoulou, R. Panou, E. Vorontsov, E. V. Savinov, L. Davydov, P.G. Smirniotis, *Appl. Catal. B: Environ.* 32 Kostopoulou, *Appl. Catal. B: Environ.* 41, p. 345, 2003.
76. MACHADO A.E. H., J. A. de Miranda, R. D. de Freitas, E.T.F.M. Duarte, L.F. Ferreira, Y.D. T. Albuquerque, R. Ruggiero, C. Sattler, L. de Oliveira, *J. Photochem. Photobiol. A: Chem.* 155, p. 231, 2003.
77. NIITSUMA T., K. Suzuki, E. Hachiya and Y. Takemoto, *Kankyo Kagaku; Chem. Abstr.*, 119, p. 11264, 1993.
78. FRIMMEL F. H., W. O Fritsch and Ch. F. Scheck; *Vom Wasser*, 79, p. 101, 1992.
79. KRODER H., K. H. Bauer and D. Saur; *Vom Wasser*, 82, p. 269, 1994.
80. DORTEN W., P. Valenta and H. W. Nürnberg; *Fresenius Z. Anal. Chem.*, 317, p. 264, 1984.

81. KOTZIAS D. Kotzias, H. Paralar and F. Korte; *Natur. Wissenschaften*, 69, p. 444, 1982.
82. *Handbook of Chemistry and Physics*, 67th edn., CRC Press, Boca Raton, Flórida, p. 257, 1986-1987.
83. PHILIPS R., *Sources and Applications of Ultraviolet Radiation*, Academic Press, London, New York, 198, p. 179-184,193,196.
84. BREZONIK P.L., Brauner P.A., Stumm W. *Water Res* 20, p. 605, 1976.
85. MART L. *Talanta* 29, p.1035, 1982.
86. SIMÕES-Gonçalves MLS, Valenta P. *J. Electroanal. Chem.*, p. 132:357, 1982.
87. SIMÕES-Gonçalves MLS, Valenta P.,Nürnberg HW *J. Electroanal. Chem.*, p.149:249, 1983.
88. VALENTA P., Siós L., Kramer I, Krumpen P, Rützel H. *Fresenius Z Anal Chem.*, p. 312:101, 1982.
89. STOEPPLER M., Backhaus F. Ber KFA Jülich, p. 1571, 1979.
90. JOHNSON K.S., K.H. Coale and H.W. Jannasch, *Anal. Chem.*, 64, p. 1065A, 1992.
91. BUFFLE J., *Complexation Reactions in Aquatic Systems; an Analytical Approach*, Ellis Horwood, Chichester, p.148, 1988.

92. KRUG Francisco José, IV Workshop sobre preparo de Amostras, Salvador, 2003.
93. KOKOT, S., King, G., Massart, D. L., et al. Microwave Digestion: an Analysis of Procedures, *Analytica Chimica Acta*, v. 259, p. 267-279, 1992.
94. FARFÁN, J. A. Química de proteínas, UNICAMP, 1990.
95. KINGSON, H.M.Jassie, L.,Margolis, S. A.The hidrolisis of proteins by microwave energy, *J. Automatic Chemistry*, 13, p. 93-95, 1991.
96. CHRISTOPHER, M. S.,Aust, J.F.,Mytrick, M.L. In situ Spectroscopic study f microwave polymerization *Applied Spectroscopy*, 49, p. 392-394, 1995.
97. KINGSTON, H. M. Koch, W.F., Pratt, K.W. et al. Voltammetric and Liquid Chromatographic Identification of Organic Products of Microwave – Assistid Wet Ashing of Biological Samples, *Anal. Chem.* 60, p. 2024-2027, 1988.
98. KINGSTON, H. M., Jassie, L. B. Microwave Energy for Acid Decomposition at Elevated Temperatures and Pressures Using Biological and Botanical Samples, *Anal. Chem.*, 58, p. 2534-2541, 1986.
99. GANZLER, K., SALGÓ, A., VALKÓ, K. Microwave Extraction – A Novel Sample Preparation Method for Chromatography, *J. Chromatograph*, 31, p. 307-312, 1986.

100. LOON, J. C. V. *Select Methods of Trace Metal Analysis: Biological and Environmental Samples*, J. WILEY & SONS, 1985.
101. TANG, S., PARSONS, P., SLAVIN, W., *Analyst*, 121, p. 195-200, 1996.
102. PECORARO, E., Davolos, M.R.Jafelicci Jr. M. Adaptações para Forno de Microondas Doméstico para utilização em laboratório, *Química Nova*, v. 20, p. 89-92, 1997.
103. *Analysis of Hazardous Substances in Biological Materials – Methods for Biological Monitoring*, vol. 2, DFG, J. Angerer and K. H. Schaller, p. 199, 1988.
104. ANDREW Taylor et al., *J. Anal. At. Spectrom.*, 16, 421-446, 2001.
105. NÜRNBERG HW, Valenta P. *Gewässerschutz – Wasser-Abwasser* 44, p. 105, 1980.
106. BERG Van Den, C. M. G. In *Chemical Oceanography*; Riley, J. P. Ed.; Academic Press; London, p. 198, 1988.
107. BULDINI Pier Luigi et al., *Food Chemistry* 73, p. 487-495, 2001.
108. FLORENCE T.M., *Anal. Chim. Acta*, 119, p. 217, 1980.
109. FLORENCE T.M., *Talanta Review*, 29, p. 345-364, 1982.

110. FLORENCE T.M. and G.E. Beatley, *CRC Crit. Rev. Anal. Chem.*, 9, p. 219, 1980.
111. SHEPHARD B.K., A.W. Mc Intosh, G.J. Atchison and D.W. Nelson, *Water Res.*, 14, p. 1061, 1980.
112. BATLEY G.E. and T. M. Florence, *J. Electroanal. Chem.*, 55, p. 23, 1974.
113. BATLEYAND G.E. and T. M. Florence, *J. Electroanal. Chem.*, 72, p. 121, 1976.
114. DORTEN W., P. Valenta, H. W. Nürnberg, *Fresenius Z. Anal. Chem.*, 317, p. 264-272, 1984.
115. ACHTERBERG Eric P. et al., *Analytica Chimica Acta*, 440, p. 27-36, 2001.
116. GONÇALVES M.L.S. Simões, M.M. Correia dos Santos, *J. Electroanal.Chem.*, 187, p. 333-348, 1985.
- 117.POMBLUN Solange et al. *J. Analytical Atomic Spectrometry*, 13, p. 635-639, 1998.
118. KINGSTON H.M. “Skip”., S.J. Haswell (Eds.), *Microwave-Enhanced Chemistry. Fundamentals, Sample Preparation and Applications*, American Chemical Society, Washington, 1997.

119. COSTA L.M., F.V. Silva,S.T. Gouveia, J.A. Nóbrega, A.R.A. Nogueira, Focused microwave-assisted acid digestion of oils: na evaluation of the residual carbon content, *Spectrochim. Acta part B* 56, p. 1981-1985, 2001.

120. STOEPPLER, M., Backhaus, F.,Dumont, M, Hagedor-Gotz, H., Dahl, R., Hilpert, K.,Klahre, P.,Rutzel, H.,Valenta, P.,Nurnberg, H. W. : In Symp. CEC-WHO-EPA Recent Advances in the Assesment of Health Effects of Environmental Pollution, Paris, June 1974, Vol. IV, p.2231. Luxemburg: Commission European Communities, 1975.